

Aus der Abteilung Neuroanatomie
(Prof. Dr. med. J. Staiger)
Im Zentrum Anatomie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Elektronenmikroskopische Untersuchung der Veränderungen
von chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks von
Vti1a/Vti1b-Doppel-Knockout-Mäusen**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Thomas Fleischmann
aus Erfurt

Göttingen 2012

Dekan:	Prof. Dr. med. M.P. Schön
I. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. Rickmann
II. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. rer. nat. Schu
III. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. med. Oppermann
Tag der mündlichen Prüfung:	23.04.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Der sekretorische Transportweg.....	8
1.2	Membran-umschlossene Kompartimente der Endozytose.....	11
1.2.1	Frühe oder sortierende Endosomen.....	11
1.2.2	Recycling-Endosomen.....	12
1.2.3	Späte Endosomen und Lysosomen.....	13
1.2.4	Multivesicular bodies.....	14
1.2.5	Sekretorische Lysosomen.....	15
1.2.6	Sekretorische Vesikel, sekretorische Granula.....	15
1.2.7	Synaptische Vesikel, synapsenartige Mikrovesikel.....	16
1.3	SNARE-Superfamilie.....	17
1.3.1	SNARE-Protein-Struktur.....	19
1.3.2	SNARE-vermittelte Membranfusion.....	21
1.3.3	Verteilungsmuster der SNARES innerhalb der Zelle.....	23
1.3.4	SNAREs bei Fusionsereignissen von frühen und späten Endosomen....	25
1.3.5	Vorkommen und Funktion von Vti1a und Vti1b.....	27
1.4	Vti1a- und Vti1b-Doppel-Knockout-Mäuse.....	30
2	Fragestellung.....	33
3	Material und Methoden.....	34
3.1	Tiere.....	34
3.2	Genotypisierung.....	35
3.2.1	Gewebeaufbereitung.....	35
3.2.2	DNA-Extraktion.....	35
3.2.3	Polymerasekettenreaktion.....	36
3.2.3.1	Der Mastermix-Ansatz.....	36

3.2.3.2	Primer-Sequenzen.....	37
3.2.3.3	PCR-Programm.....	38
3.2.3.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	38
3.3	Anfertigen von Ultradünnschnitten für das Transmissionselektronenmikroskop.....	40
3.3.1	Osmierung.....	40
3.3.2	Entwässerung und Einbettung.....	41
3.3.3	Anfertigung der Semidünnschnitte.....	42
3.3.4	Schnellfärben der Semidünnschnitte.....	44
3.3.5	Aufkleben der Semidünnschnitte mit Epon.....	45
3.3.6	Anfertigung der Ultradünnschnitte.....	46
3.3.7	Kontrastieren in einem Kontrastierautomaten.....	47
3.3.8	Fotobearbeitung und Auswertung.....	48
3.4	Liste der Chemikalien und ihrer Hersteller.....	50
4	Ergebnisse.....	52
4.1	Qualitative Beschreibung der EM-Bilder	52
4.2	Methode der Datengewinnung.....	54
4.3	Vesikeldaten.....	55
4.4	Daten zum rauen endoplasmatischen Retikulum.....	61
4.5	Abstandsanalyse.....	63
5	Diskussion.....	68
5.1	Methodendiskussion.....	68
5.1.1	Datengewinn zu Vesikeln und zum rauen endoplasmatischen Retikulum	68
5.1.2	Abstandsanalyse.....	71
5.2	Ergebnisdiskussion.....	72
5.2.1	Begründung der Wahl des Nebennierenmarks als Forschungsmodell für diese Arbeit.....	72

5.2.2 Datendiskussion zu Vesikeln und zum rauen endoplasmatischen Retikulum.....	76
5.2.3 Abstandsanalysendiskussion.....	78
6 Zusammenfassung.....	79
7 Anhang.....	81
8 Abkürzungen.....	83
9 Literaturverzeichnis.....	87

1 Einleitung

Ein Charakteristikum eukaryotischer Zellen ist ihre aufwendige Unterteilung durch innere Membranen. Im elektronenmikroskopischen Querschnitt einer solchen Zelle sind zahlreiche kleine Membran-umschlossene Säckchen, Röhren, Kugeln und unregelmäßig geformte Strukturen zu sehen, die scheinbar zufällig angeordnet sind. Diese Strukturen sind Organellen oder Teile von Organellen und stellen Membran-umschlossene Kompartimente innerhalb der Zelle dar. Sie bilden abgeschlossene Reaktionsräume und unterscheiden sich durch Struktur, Inhalt (z.B. unterschiedliche Enzyme, Proteine usw.) und spezielle Funktionen voneinander. Um ihren Funktionen, der Stoffwechselsituation angepasst, nachkommen zu können, müssen sie mit den anderen Organellen und dem Extrazellulärraum im Austausch stehen. Deshalb findet ein permanenter Transport zwischen den Kompartimenten statt. Ohne diesen Transport würden lebenswichtige Prozesse, wie das Einlagern verschiedener Proteine in die Zellmembran, synaptischer Vesikelverkehr oder die Größenveränderung der Plasmamembran nicht stattfinden (Alberts et al. 1994). Die Transportform sind Membran-umschlossene Vesikel. Diese Vesikel können sich mit nicht-Membran-gängigen Makromolekülen beladen und sich mit Hilfe von Hüllproteinen abschnüren. Die Hüllproteine rekrutieren anschließend Hilfsfaktoren, welche Interaktionen mit dem Zytoskelett vermitteln und schließlich die Bindung an die Zielmembran herbeiführen (Bonifacino und Lippincott-Schwartz 2003). Viele Organellen wie zum Beispiel Golgi-Apparat, endoplasmatisches Retikulum (ER), Plasmamembran, Lysosomen, frühes Endosom (FE), spätes Endosom (SE) oder *recycling*-Endosom (RE) kommunizieren auf diese Weise miteinander. Diese Kommunikation wird nur erreicht, wenn mannigfaltige Vesikel konstant in der Zelle zirkulieren und dort beständig abknospen, wandern, haften und verschmelzen. Hierfür ist jedoch eine genaue Regulation und das Beibehalten der Identität unabdingbar.

1 Einleitung

Es gibt allerdings nicht nur den Transport mit Hilfe von Membranvesikeln innerhalb der Zelle, sondern auch den Transport von Substanzen mit Hilfe von Membranvesikeln zur Plasmamembran (Exozytose) und die Aufnahme von Substanzen mit Hilfe von Membranvesikeln von extrazellulär (Endozytose) (Alberts et al. 1994). Eine Vielzahl von Molekülen, die auf irgendeine Weise diese Transporte beeinflussen, wurde mittlerweile entdeckt. SNAREs (*soluble NSF attachment protein receptor*, wobei NSF für *N-ethyl-maleimide-sensitive fusion protein* steht) sind zentral an einer Vielzahl, wenn nicht sogar an allen, bisher untersuchten intrazellulären Membrantransporte beteiligt (Chen und Scheller 2001).

1.1 Der sekretorische Transportweg

An den Ribosomen des rauen ER (rER) werden die sekretorischen (nicht für das Zytosol bestimmte) Proteine und Membranproteine synthetisiert. Bei dieser Translation von einer *Messenger-Ribonukleinsäure* (mRNA) in eine Aminosäuresequenz erhält das Protein am N-Terminus eine Signalsequenz, die noch im Zytosol von einem *signal recognition particle* (SRP) erkannt und gebunden wird. Der gesamte Komplex bindet an einen Membran-gebundenen Rezeptor und liefert das gebundene Protein an einen Translokationskanal in der Membran des rER. Über diesen Kanal gelangen die Proteine in das Lumen des ER (Keenan et al. 2001), wo sie chemisch verändert werden.

Beim Verlassen des ER findet eine Qualitätskontrolle für Proteine statt. Fehl gefaltete oder falsch zusammen gelagerte Proteine sind häufige Nebenprodukte im ER und werden durch Chaperone wie zum Beispiel Calnexin zurückgehalten (Hammond und Helenius 1994). Besitzen diese Proteine ein ER-Retentionssignal, verbleiben sie im ER, bis sie korrekt gefaltet sind. Ebenso können Proteine, die der Selektion entweichen, aus nachgeschalteten Organellen und dem Golgi-Apparat wieder zurück geholt werden (ERAD = *ER-associated degradation pathway*) (Meusser et al. 2005). Einige Qualitätskontrollen betreffen alle Proteine (primär), andere sind spezifisch für ausgewählte Proteine oder Proteinfamilien (sekundär) (Ellgaard et al. 1999). Die Proteine, welche die Qualitätskontrolle vorerst überstanden haben, werden mittels der drei löslichen Proteine Sec13-Komplex, Sec23-Komplex, der kleinen GTPase Sar1p und dem Hüllprotein COPII in Vesikel verpackt und zur Cis-Seite des Golgi-Apparates gebracht. Hier dockt die Vesikel an und verschmilzt mit der Golgi-Membran (Barlowe 1995). COPI-Proteine führen einen retrograden Transport herbei, der selektiv Proteine von der Cis-Seite des Golgi-Apparates zum ER zurückführt (Duden 2003). Falls sie keiner der Qualitätskontrollen zum Opfer fallen, durchlaufen die Proteine die aufeinander folgenden Zisternen mithilfe von Transportvesikeln, bis sie zur Trans-Seite des Golgi-Apparates gelangen. Hierbei erfahren sie eine Vielzahl positionsbezogener Veränderungen (Alberts et al. 1994).

1 Einleitung

Es erfolgt die Sortierung der Proteine in sekretorische Proteine und zukünftige Membranproteine, welche zur Zellmembran transportiert werden (Tooze 1998) und lysosomale Proteine, die an Lysosomen geliefert werden (Yamashiro et al. 1984, Feng et al. 1995, Luzio et al. 2003). Die sekretorischen Proteine und die zukünftigen Membranproteine können unselektiert über den konstitutiven Exozytoseweg, einem Strom von Vesikeln vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zur Plasmamembran, zu eben dieser Plasmamembran transportiert werden, um mit ihr zu verschmelzen (Palade 1975, Schmoranzner et al. 2000). Sie können aber auch, vornehmlich in auf Sekretion spezialisierten Zellen, über den geregelten Exozytoseweg in sekretorischen Vesikeln selektiv zur Zellmembran transportiert werden. Diese Vesikel sind zum einen Teil, nach einem Adenosintriphosphat (ATP)-abhängigen *Priming* und einem Calciumeinstrom, in Form eines *readily releasable pools* umgehend fusionsbereit (Söllner et al. 1993 a, Bennett 1997, Robinson und Martin 1998). Zum anderen gibt es einen *reserve pool* von fusionsbereiten Vesikeln, die intrazellulär, dicht an der aktiven Zone der Zellmembran befindlich, auf ihren Einsatz warten (Südhof 2004). In Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) konnte man diesen *reserve pool* genauer charakterisieren. Die fusionsbereiten Vesikel sind über Synapsine, eine Familie synaptischer Vesikelproteine, welche essentiell für die Regulation der Neurotransmitterfreisetzung sind, reversibel an Aktin gebunden. Reversibel wird diese Bindung durch Calcium-abhängige Phosphorylierung (Hosaka et al. 1999).

Die Membranfusion erfolgt unter der Kontrolle von verschiedenen Proteinfamilien, einschließlich SNAREs, Ras (*rat sarcoma*) *related in brain proteins* (Rab-Proteine) und Sec1/Munc-18-verwandten Proteinen (SM-Proteine)(Jahn und Südhof 1999).

Da bei der Exozytose die Vesikelmembran Teil der Zellmembran wird, könnte man vermuten, dass dies eine enorme Membranoberflächenvergrößerung zur Folge haben müsste. Diese Zunahme ist allerdings nur vorübergehend. Es ist allgemein bekannt, dass die durch Exozytose hinzugefügten Membranbestandteile durch Endozytose im gleichen Maße wieder dem Zellinneren zugeführt werden.

Proteine, die für das Lysosom bestimmt sind, gelangen durch vesikulären Transport vom TGN über späte Endosomen dorthin. Der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor

1 Einleitung

(MPR46) befindet sich hauptsächlich am TGN und an Endosomen (Kornfeld und Mellman 1989) und hat die Aufgabe, lösliche lysosomale Proteine im TGN zu binden und sie zu Endosomen zu transportieren. Aufgrund des niedrigen lysosomalen pH-Werts dissoziiert der Rezeptor von den Proteinen und kehrt zum TGN zurück, wo er für den nächsten Kreislauf bereit steht. Schlägt der Transport zum Endosom fehl, werden die Proteine über den sekretorischen Weg zur Plasmamembran gebracht. Dort werden sie dann durch einen anderen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (MPR 300) wieder aufgenommen und über Endozytose in Endosomen angereichert (Kasper et al. 1996).

1.2 Membran-umschlossene Kompartimente der Endozytose

Eukaryotische Zellen nehmen fortwährend Flüssigkeiten und Moleküle unterschiedlichster Größen auf. Wenn diese Flüssigkeiten und Moleküle aufgrund ihrer strukturellen oder biochemischen Eigenschaften nicht-Membran-gängig sind, werden sie in Form von Membranvesikeln aufgenommen. Dieser Vorgang heißt Endozytose.

Man unterscheidet die Pinozytose („Zelltrinken“), bei der Flüssigkeiten und Moleküle über kleine Vesikel mit einem Durchmesser bis zu 150 nm aufgenommen werden, von der Phagozytose („Zellfressen“). Sie beinhaltet die Aufnahme großer Partikel, wie etwa Mikroorganismen oder Zelltrümmer, durch große Vesikel mit einem Durchmesser von gewöhnlich über 250 nm (Alberts et al. 1994). Endozytosevesikel kommen in unterschiedlichsten Spielarten vor. Die großen Phagosomen sind meist Aktin-abhängig. Die kleinen, am besten untersuchten, Clathrin-ummantelten Vesikel (CCV) sind verantwortlich für die Flüssigkeitsaufnahme (nicht selektiv, alle gelösten Substanzen werden aufgenommen) und für die Aufnahme von rezeptorgebundenen Liganden (selektiv). Generell ist es das Schicksal jeder Endozytosevesikel über unterschiedliche Stationen zum Lysosom transportiert zu werden, wo dann der Abbau stattfindet (Mellman 1996).

Der Endozytoseweg hat neben der Funktion, den Materialverlust durch die Exozytose auszugleichen, einen großen Anteil an der Sortierung und Lieferung von Proteinen und Lipiden. Diese Funktionen übernehmen zu einem großen Anteil die im Folgenden vorgestellten, intrazellulären Strukturen.

1.2.1 Frühe oder sortierende Endosomen

Durch Pinozytose aufgenommene Vesikel übertragen ihren Inhalt innerhalb weniger Minuten an ein Membransystem unterhalb der Zellmembran mit tubulovesikulärer

1 Einleitung

Gestalt, den frühen Endosomen (FE) (Alberts et al. 1994). Die primäre Funktion der FE ist das Sortieren. Sie sind leicht sauer (pH-Wert 6,3-6,8) und hauptverantwortlich für das Dissoziieren des Liganden-Rezeptor-Komplexes. Die Rezeptoren müssen, sollen sie nicht im Lysosom verdaut werden, via *recycling*-Endosom (RE) zu der Plasmamembran zurück kehren. Es wurde beschrieben, dass einige Rezeptoren, wie beispielsweise der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (MPR), erst bei einem niedrigerem pH-Wert von seinem Liganden dissoziiert (Yamashiro et al. 1984, Kornfeld und Mellman 1989, Mellman 1996). Daraus kann man folgern, dass der nur leicht saure Charakter der FE das Beschädigungsrisiko der zu recycelnden Rezeptoren abschwächt. Gleichzeitig ist aber der pH niedrig genug, dass es zum Rezeptor-*recycling* kommt.

Im weiteren Verlauf des Endozytosewegs gibt es zwei Theorien. Entweder reifen die FE zu späten Endosomen (SE) heran (Stoorvogel et al. 1991) oder sie fusionieren mit anderen Membrankompartimenten wie den SE (Antonin et al. 2000 b), um letztendlich zu Lysosomen zu werden (Mellman, 1996).

Außerdem gibt es einen Transport von den FE zum TGN und zum ER (Mallard et al. 1998).

1.2.2 Recycling-Endosomen

Bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose spalten sich typischerweise eine tubuläre und eine vesikuläre Fraktion Fracht-tragender Vesikel ab. Während die tubuläre Fraktion, in Form von *recycling*-Endosomen (RE), ihre Fracht (überwiegend dissoziierte Rezeptoren) zurück zur Zellmembran transportiert, befördert die vesikuläre Fraktion lösliche Inhalte (überwiegend Liganden) zum späten Endosom (SE) oder zum Lysosom (Geuze et al. 1983, Geuze et al. 1984). Wissenschaftler haben herausgefunden, dass diese Vesikel sich in ihrer Morphologie von den frühen Endosomen unterscheiden (Daro et al. 1996). Untereinander sind die RE, was ihre biochemische Zusammensetzung, ihre Ionen-transport-Fähigkeiten und ihren pH-Wert betrifft, gleich (Gruenberg und Maxfield 1995). Allerdings unterscheiden sie sich

1 Einleitung

wahrscheinlich von den FE durch ihren weniger sauren pH-Wert (Yamashiro et al. 1984). Letztendlich werden sie durch die RE-Rezeptoren, im Sinne einer Wiederverwertung, zur Zellmembran oder zum perinukleären MTOC (*microtubule organizing centre*) gebracht, wo sie zu einem intrazellulären Rezeptorvorrat akkumulieren (Hopkins 1983, Yamashiro et al. 1984).

1.2.3 Späte Endosomen und Lysosomen

In Markierungsexperimenten konnte man, neben den FE, die unmittelbar nach Endozytose nahe der Zellmembran auftauchen, auch eine Endosompopulation in der Nähe des Zellkerns feststellen. Diese Population erschien jedoch erst 5-15 Minuten später (Alberts et al. 1994). Definiert werden späte Endosomen (SE) als vesikuläre Strukturen, welche internalisierte Inhalte nach deren Transport durch FE akkumulieren und konzentrieren. Zur Entstehung dieser späten Endosomen (SE) gibt es zwei Theorien. Eine Theorie geht davon aus, dass FE und SE eigenständige Kompartimente sind. In diesem Fall nimmt man an, dass die für das Lysosom bestimmten Proteine mit Hilfe von Carriervesikeln von den FE abknospen, welche zuvor entlang der Mikrotubuli in Richtung Zellkern gewandert sind. Die Carriervesikel wiederum verschmelzen mit den SE (Mellman 1996). Nach der anderen Theorie reifen die FE zu SE heran (Stoorvogel et al. 1991). Die SE haben einen lysosomartigen Charakter, da sie hydrolytisch aktive lysosomale Hydrolasen besitzen. Sie beginnen bereits mit dem Abbau der Fracht und verschmelzen schließlich mit den Lysosomen (Mellman 1996).

Die Besonderheit an den Lysosomen ist das Vorhandensein einer Protonen-ATPase (Ohkuma et al. 1982), die für einen niedrigen pH von ungefähr 4,5-5 sorgt. In diesem Medium können viele abbauende, aus ER und Golgi-Apparat gelieferte, Enzyme ihrer Arbeit nachkommen. Lysosomen werden in elektronenmikroskopischen Aufnahmen auch als *dense core vesicle* (DCV) bezeichnet (Bright et al. 1997) und sind von einer einzelnen Membran umgeben. Sie erscheinen elektronendicht, da sie der Speicherort für lysosomale Enzyme sind, die man anfärben kann. Die

1 Einleitung

Rückgewinnung von Material aus Lysosomen (z.B. Abbauprodukte, die der Zelle als Nährstoffe dienen) geht sehr langsam von statten. Dies erklärt, warum Zellen in ihrem Inneren eine Vielzahl von aufgenommenen Material anhäufen und zusätzlich auch das dunkle Erscheinungsbild der Lysosomen im Elektronenmikroskop (EM) (Mellman 1996).

1.2.4 Multivesicular bodies

Manchmal nehmen SE viele einzelne Teile der Plasmamembran der Zelle auf, sodass sie in viele Membran-umschlossene Mikrodomänen unterteilt sind. Solche Kompartimente werden *multivesicular bodies* (MVB) genannt und sind Bestandteil des Endozytose-Mechanismus (Haigler et al. 1979, van Deurs et al. 1993). Wahrscheinlich ist aus bisher unbekanntem Gründen das Schaffen von unterschiedlichen Reaktionsräumen nötig. Man hat herausgefunden, dass die Bildung der Mikrodomänen entweder von der Zusammensetzung der Transmembranmoleküle des betroffenen Membranabschnittes oder von einer Markierung mit Ubiquitin abhängt (Piper und Luzio 2001).

MVB werden für unterschiedlichste zelluläre Prozesse benötigt. Zum Beispiel spielen sie eine Rolle in der Herabregulierung von aktivierten Signalrezeptoren oder der exakten Stimulation der Immunantwort (Katzmann et al. 2002). In einer Arbeit konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass es eine Verteilung von verschiedenen Subtypen des EGFR (*epidermal growth factor receptor*) auf den verschiedenen inneren Membranen der MVB gibt, was den Schluss zulässt, dass MVB eine Sortierung der EGFR Subtypen durchführen (Felder et al. 1990). Zudem wurden zahlreiche weitere Rezeptoren auf den inneren Zellmembranen der MVB gefunden.

1 Einleitung

1.2.5 Sekretorische Lysosomen

Sowohl natürliche Killerzellen (NK), als auch zytotoxischen T-Lymphozyten (ZTL) verfügen über sekretorische Granula, deren Inhalte mittels Exozytose zum Attackieren ihrer Ziele benutzt werden. Burkhardt und seine Mitarbeiter konnten einen Typus sekretorischer Granula bei Untersuchungen von NK und ZTL beschreiben, der in Morphologie und Zusammensetzung Ähnlichkeiten mit klassischen Lysosomen und auch mit Prälysosomen, wie MVB teilweise bezeichnet werden, aufweist. Im Unterschied zu Lysosomen und MVB sind diese Granula zur regulierten Sekretion in der Lage (Burkhardt et al. 1990), was in der Bezeichnung sekretorische Lysosomen (SL) Ausdruck findet.

Neuere Untersuchungsergebnisse belegen, dass Lysosomen auch sekretorische Proteine enthalten können. Beispielsweise wird die Melaninsekretion aus Melanosomen, via regulierter Exozytose, mithilfe lysosomverwandter Organellen bewerkstelligt (Stinchcombe et al. 2004).

1.2.6 Sekretorische Vesikel, sekretorische Granula

Diese Vesikel sind für den Transport von Proteinen verantwortlich, die vom Inneren der Zelle in den Extrazellularraum (EZR) gelangen sollen. Aufgrund von spezifischen Signalen werden diese Proteine im TGN in sekretorische Vesikel (SV) oder sekretorische Granula (SG) sortiert. Im Unterschied zu den SV liegen die Proteine in den SG aggregiert vor, weshalb sie auch *dense core* SG (erscheinen dunkel im EM) genannt werden. Außerdem werden SG ausschließlich über einen kontrollierten Weg abgegeben, wo hingegen SV auch konstitutiv abgegeben werden können (Tooze et al. 1991, Pryer et al. 1992, Bauerfeind und Huttner 1993, Chidgey 1993).

1 Einleitung

1.2.7 Synaptische Vesikel, synapsenartige Mikrovesikel

Die Funktion der SV und SG wird in Neuronen von synaptischen Vesikeln und in einigen endokrinen Zellen von synapsenartigen Mikrovesikeln (SAM) übernommen. Die Besonderheit dieser Kompartimente ist ihre Fracht. Sie vermitteln nicht die Exozytose sekretorischer Proteine, sondern die Sekretion von Neurotransmittern (Tooze et al. 1991, Pryer et al. 1992, Bauerfeind und Huttner 1993).

1.3 SNARE-Superfamilie

Der Verkehr von Zellmembran zu Zellmembran, aber auch zwischen einzelnen Kompartimenten, wird in eukaryoten Zellen durch Membran-*carrier* vermittelt.

In jedem Falle erfolgt an der Zielmembran eine Membranfusion. Diese ist ein lebenswichtiger Prozess, bei welchem sich zwei separate Membranen zu einem einzigen *bilayer* vereinigen. Für das Abknospen der Vesikel, die Zielauswahl, das enge Zusammenlagern der Membranen (um die Lipid-Wasser-Grenzfläche zu destabilisieren) und das Verschmelzen der Membranen ist eine Vielzahl diverser Proteine nötig. Zelluläre Fusionsmaschinen sind notwendig, um diese Prozesse zu kontrollieren. SNARE-Proteine sind dabei ein wesentlicher Bestandteil (Südhof 1995, Rizo und Südhof 2001, Chen und Scheller 2001, Jahn et al. 2003, Ungar und Hughson 2003).

Seit den 1980er Jahren sind diese SNARE-Proteine intensiver Forschungsgegenstand. Die beiden ersten löslichen Proteine, die dabei benannt wurden, waren NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*) und der dazu gehörige Adapter SNAP (*soluble NSF attachment protein*) (Block et al. 1988, Clary et al. 1990).

In Rindergehirnen fand man anschließend in der Synapsenmembran ein 4-Protein-Komplex, der nach Affinitätsaufbereitung von SNAP als SNAP-Rezeptor fungierte und somit SNARE (*soluble N-ethylmaleimide attachment protein receptor*) genannt wurde (Söllner et al. 1993b). Neuronale SNARE-Komplexe, die in der neuronalen Exozytose wirken, wurden zuerst identifiziert und charakterisiert. Sie werden aus dem synaptischen Vesikelprotein Syntaxin (Bennett et al. 1992), SNAP-25 (25-kDa-Synaptosomen-assoziiertes Protein) (Oyler et al. 1989) und VAMP (*vesicle associated membrane protein* oder auch Synaptobrevin) (Trimble et al. 1988) gebildet (Sutton et al. 1998).

Aufgrund ihres Vorkommens auf der Vesikel (*v*) oder auf der Zielmembran (*t* für *target*) hat man das *v/t* SNARE-Klassifikationsschema entwickelt (Söllner et al.

1 Einleitung

1993b). In neuronalen Zellen ist diese Bezeichnung zutreffend, in anderen Bereichen, zum Beispiel bei der Fusion von Vakuolen in Hefezellen, führt das zur Verwirrung. Nachdem man aber festgestellt hat, dass ein SNARE-Komplex immer aus vier Untereinheiten besteht, von denen drei die Aminosäure Glutamin und eine die Aminosäure Arginin enthalten, hat man eine zweite Nomenklatur eingeführt.

Man unterscheidet zusätzlich Q-SNAREs (Glutamin-enthaltend) von R-SNAREs (Arginin-enthaltend) (Fasshauer et al. 1998). Meistens befinden sich jedoch der R-SNARE auf der Vesikel und die drei Q-SNAREs auf der Zielmembran (Ungar und Hughson 2003). Es gibt zusätzlich eine weitere Klassifizierung der Q-SNAREs in Abhängigkeit von der Position des SNARE-Motivs (siehe 1.3.1, S. 19). Befindet sich das SNARE-Motiv auf der gleichen Position wie bei Syntaxin aus dem neuronalen Kernkomplex spricht man von einem Qa-SNARE. Ist das SNARE-Motiv an der selben Stelle wie das N-terminale oder C-terminale SNARE-Motiv des SNAP-25 aus dem neuronalen Kernkomplex, spricht man entweder von einem Qb,- oder Qc-SNARE (Bock et al. 2001).

Mittlerweile besteht die SNARE-Superfamilie aus 25 Mitgliederproteinen in *Saccharomyces cerevisiae*, 36 menschlichen und 54 in *Arabidopsis thaliana* (Hong 2005, Jahn und Scheller 2006). Kloepper und seine Kollegen konnten kürzlich mithilfe bioinformatischer Arbeitstechniken 20 Subgruppen von SNAREs klassifizieren, die das SNARE-Equipment der eukaryoten Zellen repräsentieren. Diese sind an Fusionsereignissen am ER, am Golgi-Apparat, am TGN, an der Plasmamembran und am endolysosomalen System beteiligt (Kloepper et al. 2007, Kloepper et al. 2008)

Typischerweise bilden vier Proteine einen SNARE-Kernkomplex, welcher die Fusion steuert. Evolutionär gesehen sind die SNARE-Kernkomplexe sehr stark konserviert und weisen eine gemeinsame Domänenstruktur auf. Ist der Kernkomplex einmal entstanden, ist er widerstandsfähig gegen SDS-Denaturierung (durch *sodium dodecylsulfate*), Aufschluss durch Proteasen und Spaltung durch Neurotoxine aus Klostridien (z.B. botulinum neurotoxin). Außerdem ist der Komplex hitzestabil bis

1 Einleitung

90°C (Hayashi et al. 1994, Poirier et al. 1998 a, Yang et al. 1999, Chen und Scheller 2001).

Dadurch, dass mittlerweile so viel SNAREs bekannt sind, hat man angefangen kleinere Proteinfamilien innerhalb der Superfamilie zu gründen (z. B. Syx1-Familie, Sed5p-Familie und andere).

1.3.1 SNARE-Protein-Struktur

Der SNARE-Komplex ist ein Bündel aus vier α -*Helices* in Form einer gewundenen Spirale. Die meisten SNAREs sind integrale Membranproteine mit einer einzelnen Transmembranhelix am C-terminalen Ende. Sie sind charakterisiert durch das Vorhandensein von von circa 60-Aminosäuren-langen SNARE-Motiven. Diese Motive sind auf jedem Protein homolog, meist in der Nähe solch eines C-terminalen Membranankers, zu finden (Weimbs et al. 1997, Poirier et al. 1998 b, Sutton et al. 1998, Antonin et al. 2002, Ungar und Hughson 2003).

Die Besonderheit an den SNARE-Motiven ist, dass an jeder siebenten Stelle eine hydrophobe Aminosäure zu finden ist. Sie ist für die Bildung der Spiralstruktur verantwortlich. Dabei ordnen sich die hydrophoben Seitenketten alle auf der selben Seite der α -*Helix* an, wie bei einem Leuzin-*zipper* schon bekannt. Somit kann sich spontan ein irreversibles Vier-Helix-Bündel (*core complex*) bilden. Die hydrophoben Seiten der vier α -*Helices* werden im Inneren des Komplexes begraben (Sutton et al. 1998).

Vor der Komplexbildung liegen die SNAREs ungeordnet vor, doch durch die Zusammenlagerung steigt die Bildung von α -helikalen Sekundärstrukturen, was die Proteine verkürzt (Fasshauer et al. 1997). Diese Bildung von α -helikalen Sekundärstrukturen und die parallele Zusammenlagerung der SNARE-Motive bringt die Transmembrananker und die beiden Membranen in enge Nachbarschaft (Hanson et al. 1997). An ihren freien N-terminalen Enden treiben verschiedene SNAREs die Strukturbildung voran oder kontrollieren die Membranfusion (Dietrich et al. 2003).

1 Einleitung

Da die verschiedenen Kernkomplexe sich untereinander sehr ähneln, möchte ich den sehr gut verstandenen neuronalen Kernkomplex als Anschauungsmodell nutzen, um die Struktur von SNAREs genauer zu beschreiben.

Der neuronale Kernkomplex besteht, wie alle SNARE-Kernkomplexe, aus einem Vier-Helix-Bündel bestehend aus den v-SNAREs Synaptobrevin-1 oder Synaptobrevin-2 auf synaptischen Vesikeln und den t-SNAREs Syntaxin-1 und SNAP-25 auf der Plasmamembran (Sutton et al. 1998).

Die H3-Domäne des Syntaxins, die beiden SNARE-Motive des SNAP-25 und das SNARE-Motiv eines Synaptobrevins interagieren auf einem 16-Aminosäuren-langen Abschnitt (an den Stellen 7 und 8) miteinander. Wahrscheinlich zwingt die Nähe dieser Domänen zu den Transmembrandomänen von Syntaxin-1 und dem Synaptobrevin die Vesikel an die Membran. Die Wechselwirkungen im neuronalen Kernkomplex haben einen hydrophoben Charakter mit Ausnahme der Stelle 0 in der Mitte des Bündels. An dieser Position haben Syntaxin-1 und SNAP-25 insgesamt drei Glutaminreste, die mit dem Argininrest des Synaptobrevins reagieren (Q-SNAREs reagieren mit R-SNARE) (Fasshauer et al. 1998). Hier hat der Komplex seinen größten Durchmesser und es wird vermutet, dass diese Stelle für die Membranausrichtung oder die Dissoziation des Komplexes verantwortlich ist (Lin und Scheller 2000).

1 Einleitung

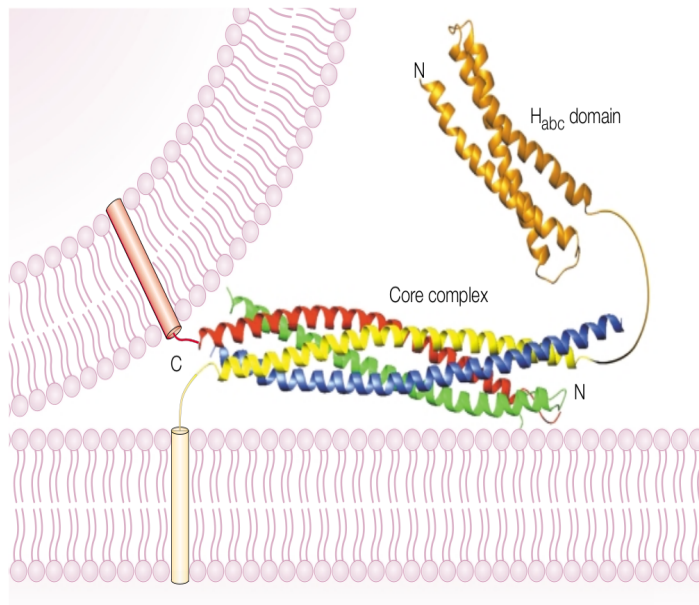


Abb. 1.1 Modell des neuronalen SNAREs zusammen gelagert zu einem Kernkomplex. Die SNARE-Motive sind folgendermaßen gefärbt: rot: Synaptobrevin; gelb: Syntaxin-1; blau: SNAP-25 N-Terminus; grün: SNAP-25 C-Terminus. Die Transmembrandomänen (als Zylinder dargestellt) sind wie folgt gefärbt: hellrot: Synaptobrevin; hellgelb: Syntaxin-1. Mit orange ist die H_{abc}-Domäne des Syntaxin-1 dargestellt, die über einen kurvig dargestellten Linker mit dem SNARE-Motiv verbunden ist und im Text nicht diskutiert wird (aus Rizo und Südhof 2002, S. 643)

1.3.2 SNARE-vermittelte Membranfusion

Die grundlegende Biophysik von Membranfusionen ist immer noch nicht richtig verstanden (Jahn und Grubmüller 2002).

Seit Jahren hat die *stalk*-Hypothese („Belästigungshypothese“) die Diskussionen über Membranfusionen dominiert. Demnach bilden sich nach der Annäherung zweier Membranen Vertiefungen, die von beiden Seiten aufeinander zuwachsen und mit *tight junctions* verknüpft werden (Markin et al. 1984). Anschließend verschmelzen die äußeren *monolayer* der beiden Membranen zu einem neuen *bilayer*, der letztlich eine Fusionspore bildet (Kozlov et al. 1989, Siegel 1993, Siegel 1999). Bei Untersuchungen, der Aufnahme und des Verschmelzens von Teilen des *influenza Virus* mit Lysosomen, hat man festgestellt, dass dies mit einem *stalk*-ähnlichen Mechanismus geschieht. Man hat herausgefunden, dass es virale Fusionsproteine gibt, welche die Verschmelzung herbeiführen. Sie ähneln den SNAREs sehr stark (Kanaseki et al. 1997). Also vermutete man, dass die SNAREs der Vesikelmembranen die gleiche Rolle übernehmen, wie diese viralen Fusionsproteine.

1 Einleitung

Diese Hypothese versucht man seither zu beweisen und den genauen Mechanismus zu klären (Ungar und Hughson 2003).

Wahrscheinlich funktioniert es folgendermaßen: SNAP-25 und Syntaxin auf der Zielmembran bilden einen Zweierkomplex. Anschließend verbindet sich das Synaptobrevin (oder VAMP) der Vesikelmembran mit diesem Zweierkomplex, sodass die Membrananker von Synaptobrevin und Syntaxin auf der selben Seite des Komplexes zu liegen kommen (Sutton et al. 1998). Die Zusammenlagerung von Synaptobrevin und Syntaxin funktioniert wie ein Reißverschluss (*zipper*) und ist Calcium-abhängig. Sie ordnen sich parallel an und beginnen sich am N-terminalen Ende zu verbinden. Diese Verbindung setzt sich dann in Richtung des C-Terminus fort (Lin und Scheller 1997, Hanson et al. 1997), ein Prozess, der für die Überwindung der Abstoßungskräfte der beiden *bilayer* verantwortlich gemacht wird (Chen und Scheller 2001, Ungar und Hughson 2003).

Nach dem *zipping* und dem Aufbringen der nötigen Energie bildet sich, wie bei der *stalk*-Hypothese beschrieben, zuerst eine Hemifusion und anschließend eine Fusionspore, durch die der Vesikelinhalt abgegeben werden kann. Dabei wird der SNARE-Komplex über α -SNAP an NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein*) gebunden und in der Zellmembran gehalten. Unter ATP-Verbrauch dissoziiert dieser Komplex und die beteiligten Proteine kehren zu ihren Ursprungsmembranabschnitten zurück (Chen und Scheller 2001). Dort blockiert ein SM-Protein (n-sec1/Munc18-ähnliches Protein) das Syntaxin-ähnliche SNARE so lange, bis das SM-Protein dissoziiert. Dies geschieht durch die GAP-abhängige (*GTPase activating protein*) Blockade von Rab-Proteinen (Pevsner et al. 1994). Dann sind alle SNARE-Proteine wieder fusionsbereit und der Kreislauf kann von Neuem beginnen.

1 Einleitung

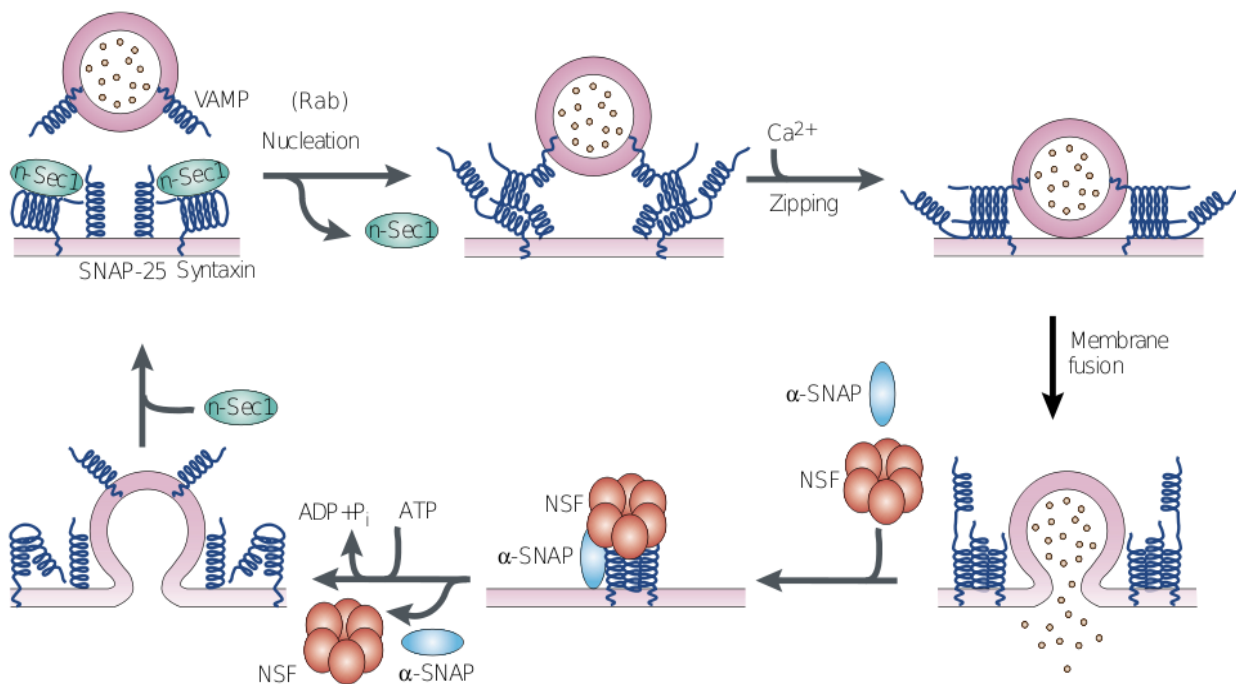


Abb. 1.2 Molekulares Modell der neuronalen Vesikelexozytose, als Beispiel für SNARE-vermittelte Membranfusion. Vor der Kernkomplexbildung ist Syntaxin an n-Sec1 gebunden. Wahrscheinlich erleichtern Rab-Proteine die Dissoziation von n-Sec1 und Syntaxin, was die Verbindung der drei neuronalen SNAREs Syntaxin, VAMP und SNAP-25 (der Einfachheit halber durch nur eine Spirale dargestellt) erlaubt. Ca^{2+} vermittelt das *zipping*, was in der Membranfusion und der Freilassung des Vesikelinhalts resultiert. Nach dem Fusionsereignis führt die Rekrutierung von α -SNAP (Synaptosomen-assoziiertes Protein α) und NSF (*N-ethyl-maleimide-sensitive fusion protein*) und die Hydrolyse von ATP durch NSF zur Dissoziation des SNARE-Komplexes. Syntaxin, VAMP und SNAP-25 sind dann frei, um für den nächsten Exozytoseprozess regeneriert zu werden (aus Chen und Scheller 2001, S. 102).

1.3.3 Verteilungsmuster der SNARES innerhalb der Zelle

Fast alle zellulären Kompartimente beinhalten SNARE-Proteine. Die menschliche SNARE-Superfamilie besteht aus mindestens 36 Mitgliederproteinen (Jahn und Scheller 2006). Man kann sie innerhalb der Komplexe noch als Mitglieder der Syntaxin,- Synaptobrevin,- oder SNAP-25-Familien unterteilen, von denen die meisten in spezifischen zellulären Kompartimenten vorkommen. Das kann bedeuten,

1 Einleitung

dass die unterschiedlichen SNAREs selektiv an der Regulation unterschiedlicher Transportvorgänge beteiligt sind (Jahn und Südhof 1999, Chen und Scheller 2001).

Auf die Verteilung von einigen bekannten SNARE-Proteinen möchte ich noch genauer eingehen. Beispielsweise zeigte Immunofluoreszenzmikroskopie, dass Vti1a, ein Qb-SNARE, hauptsächlich am Golgi-Apparat und am TGN lokalisiert ist (Xu et al. 1998). Im Gehirn kommt es vornehmlich als Spleißvariante Vti1a-beta in kleinen synaptischen,- und Clathrin-ummantelten Vesikeln (CCV) der Nervenendigungen vor (Antonin et al. 2000 a).

Vti1b hingegen fand man meist an membranösen Tubuli, an Vesikeln in der Nähe des TGN und an Endosomen (Advani et al. 1998, Kreykenbohm et al. 2002).

Endobrevin (VAMP-8) wurde an frühen und späten Endosomen nachgewiesen (Antonin et al. 2000 b). VAMP-3 befindet sich an frühen Endosomen, VAMP-4 am Golgi-Apparat, VAMP-5 an der Zellmembran und VAMP-7 an späten Endosomen (Chen und Scheller 2001).

Syntaxin-8 kommt vorzugsweise, markiert durch Rab-5, an frühen Endosomen (Subramaniam et al. 2000) und am TGN (Prekeris et al. 1999) vor. Syntaxin-7 befindet sich sowohl an frühen (Prekeris et al. 1999) als auch auf späten Endosomen (Mullock et al. 2000). Das Vorkommen von Syntaxin-6 gilt für das TGN als gesichert (Watson und Pessin 2000). Bestätigt ist auch das Vorhandensein von Syntaxin-16 und Syntaxin-5 im Golgi-Apparat (Tang et al. 1998), wobei Syntaxin-16 auch mit Syntaxin-6 zusammen am TGN lokalisiert ist (Shewan et al. 2003).

1 Einleitung

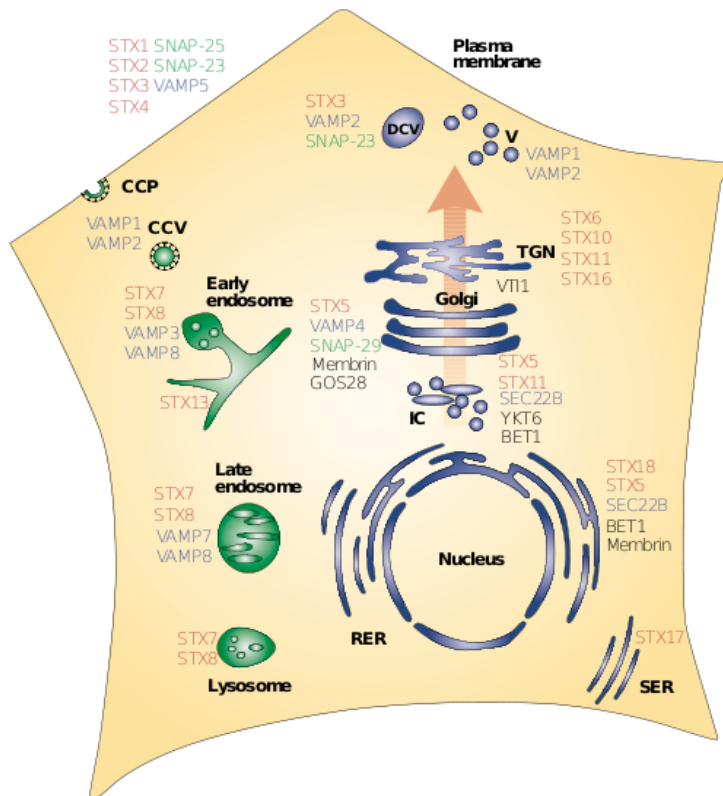


Abb. 1.3 Subzelluläre Verteilung der Säugetier-SNAREs. Säugetier-SNAREs, welche bisher für den sekretorischen Weg gefunden wurden, sind hier folgendermaßen dargestellt: rot: Syntaxin-Familie; blau: VAMP-Familie; grün: SNAP-25-Familie; schwarz: andere; CCP: *clathrin coated pits* (Clathrin-ummantelte Vertiefung); CCV: Clathrin-ummantelte Vesikel; DCV: *dense core vesicle* (elektronendichte Vesikel); IC: Intermediärkompartiment; RER: raues ER; SER: glattes (*smooth*) ER; V: Vesikel; SNAP-25: 25-kDa-Synaptosomen-assoziiertes Protein; TGN: Trans-Golgi-Netzwerk; VAMP: Vesikel-assoziiertes Membranprotein (aus Chen und Scheller 2001, S. 99).

1.3.4 SNAREs bei Fusionsereignissen von frühen und späten Endosomen

Wenn man der Fusionstheorie glaubt, gibt es zwei Fusionsereignisse während der Endozytose. Zunächst verschmelzen die FE mit anderen Membrankompartimenten, wie den SE (Antonin et al. 2000 b). Die SE ihrerseits verschmelzen mit den Lysosomen. Im Folgenden möchte ich die in Frage kommenden SNARE-Proteine für die frühendosomalen und spätendosomalen Fusionsereignisse vorstellen.

Syntaxin-13 wurde auf FE und RE gefunden und steht im Verdacht bei den frühendosomalen Fusionsereignissen eine Rolle zu spielen (Prekeris et al. 1998). Da Syntaxin-13 spezifisch mit Syntaxin-6 reagiert (Mills et al. 2001) und ebenso an

1 Einleitung

endosomalen Strukturen nachgewiesen wurde (Bock et al. 1997), wird Syntaxin-6 ebenso verdächtig.

Blockiert man Vti1a durch Antikörper, gab es die Fusionen nicht mehr, was Vti1a als potentiell Protein für die Verschmelzung von FEs ausweist (Antonin et al. 2000 c). Durch Koimmunopräzipitation hat man dann einen SNARE-Komplex, bestehend aus Syntaxin-16 (Qa-SNARE), Vti1a (Qb-SNARE), Syntaxin-6 (Qc-SNARE) und VAMP-4 (R-SNARE), entdeckt (Kreykenbohm et al. 2002), der die Fusion von FEs herbeiführen könnte.

Untersuchungen von Endobrevin/VAMP-8 (Vorkommen auf allen mit FEs-agierenden Membranen, also Zellmembran, CCV, SE und TGN) zeigten, dass es bei einer Blockade von VAMP-8 durch Antikörper weder zu frühendosomalen noch zu spätendosomalen Fusionsereignissen kommt. Fehlt VAMP-8 im Gehirn, kann es durch eine Überexpression von VAMP-4 als R-SNARE ersetzt werden. Zudem können beide Proteine in anderen Geweben koexistieren (Antonin et al. 2000 b).

Eine andere Theorie besagt, dass die neuronalen SNAREs SNAP-25 und Synaptobrevin mit Syntaxin-13 einen SNARE-Komplex bilden (Sun et al. 2003).

Letztlich kommen theoretisch alle SNARE-Proteine, die auf FEs oder auf den Zielkompartimenten (Zellmembran, CCV, SE und TGN) vorkommen, infrage.

Jüngst hat man festgestellt, dass ein Komplex bestehend aus Syntaxin-13, Syntaxin-6, Vti1a und VAMP-4 verantwortlich für frühendosomale Fusionsereignisse ist. Die für SE-Fusion und Exozytose verantwortlichen SNAREs sind hierbei auch vorhanden, spielen aber keine, oder nur eine untergeordnete, Rolle (Brandhorst et al. 2006).

Für die Fusionsprozesse an FE lässt sich zusammenfassend sagen, dass die am ehesten in Frage kommenden SNAREs Syntaxin-13 oder Syntaxin-16 (Qa-SNARE), Vti1a (Qb-SNARE), Syntaxin-6 (Qc-SNARE), und VAMP-4 sind (Jahn und Scheller 2006).

Betrachtet man die Fusionsereignisse bei SE, hat man festgestellt, dass es hier einen SNARE-Komplex ganz ähnlich dem neuronalen SNARE-Komplex gibt. Dieser besteht aus Syntaxin-7, Syntaxin-8, Vti1b und Endobrevin/VAMP-8. Man hat zwar

1 Einleitung

auch VAMP-7 (Advani et al. 1999) und Syntaxin-13 (McBride et al. 1999) entdeckt, aber wurden die Proteine Syntaxin-7, Syntaxin-8, Vti1b und Endobrevin/VAMP-8 durch spezifische Antikörper blockiert, war die Fusion von SEs unterbrochen. Zusätzlich wurde die Auslieferung von EGF (*epidermal growth factor*) zum Lysosom gebremst (Antonin et al. 2000 b). Zusammengenommen macht das den Komplex aus Syntaxin-7, Syntaxin-8, Vti1b und Endobrevin/VAMP-8, als Fusionen vermittelnden SNARE-Komplex im SE, sehr wahrscheinlich.

Leider ist es nicht ganz leicht die Funktionen einzelner SNARE-Komplexe zu identifizieren. Zum einen sind einige SNAREs in mehr als einem Fusionsgeschehen involviert (von Mollard et al. 1997). Zum anderen werden *in vitro* erzeugte, stabile Komplexe nicht immer auch *in vivo* gebildet (Fasshauer et al. 1999, Yang et al. 1999). Außerdem sind lokale Regulationsfaktoren bei der Bildung von SNAREs notwendig, deren Vorhandensein zusätzlich gegeben sein muss (Christoforidis et al. 1999).

Zusammenfassend kann man sagen, dass es nach bisherigem Kenntnisstand zwei SNARE-Komplexe gibt, wobei einer bei den Fusionsprozessen am FE und einer bei denen am SE wirkt. Dabei ist Vti1a Mitglied des SNARE-Komplexes am FE und Vti1b Mitglied des SNARE-Komplexes am SE.

1.3.5 Vorkommen und Funktion von Vti1a und Vti1b

Der Membranverkehr in eukaryotischen Zellen benötigt die Interaktion von vesikelassoziierten v-SNAREs mit auf der Zielmembran befindlichen t-SNAREs. Dieses Prinzip hilft Transportvesikeln dabei ihren Bestimmungsort zu finden, um ihren Inhalt dort abzuliefern.

Mithilfe von Datenbankuntersuchungen wurde ein, dem Hefe-Golgi-SNARE Vti1p homologes, 29-kDa-schweres und 217-Aminosäuren-langes, in der Golgi-Membran angereichertes, integrales Membranprotein mit einem COOH-terminalen, hydrophoben Membrananker entdeckt. Man hat durch immunhistochemische

1 Einleitung

Untersuchungen, dieses, Vti-rp2 (entspricht Vti1a) (Xu et al., 2002) genannten, Proteins festgestellt, dass es in den Proteinverkehr beim sekretorischen Weg verwickelt ist (Xu et al. 1998). Ein Sequenzvergleich zwischen dem Hefe-SNARE und 2 homologen Maus-SNAREs zeigte, dass sie alle aus einer sehr konservierten und komprimierten *alpha-Helix* aufgebaut sind, die sich in ungefähr 30 % ihrer Aminosäuresequenz gleichen (Advani et al. 1998, von Mollard und Stevens 1998).

Säugetiere exprimieren die SNARE-Proteine Vti1a und Vti1b. Beide Proteine haben eine unterschiedliche, aber sich teilweise überschneidende Verteilung. Vti1a wurde überwiegend am Golgi-Apparat und am Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) nachgewiesen. Vti1b hingegen meist an membranösen Tubuli, Vesikeln in der Nähe des TGN und an Endosomen (Kreykenbohm et al. 2002). Nahezu in allen Geweben kommen diese Proteine vor. Vti1a wurde zum Beispiel in der Niere (Barile et al. 2005), in allen Zellen mit GLUT-4-enthaltenden Membranen (Fettzellen, Skelett- und Herzmuskelzellen) (Bose et al. 2005) und im Darm (Siddiqi et al. 2006) gefunden. Einen positiven Nachweis für Vti1b hat man in der Leber (Atlashkin et al. 2003) und in Makrophagen (Murray et al. 2005) durchgeführt.

Zusammen kommen Vti1a und Vti1b in Arterienendothelzellen der Lunge (Sehgal et al. 2007) und im Gehirn (dort allerdings vornehmlich als Spleißvariante Vti1a-*beta* in kleinen synaptischen und Clathrin-ummantelten Vesikeln der Nervenendigungen) vor. Im Unterschied zu Vti1a besitzt dieses SNARE-Protein sieben zusätzliche Aminosäuren (LIKLREE) in der Nähe seines SNARE-Motivs, was für die zelluläre Verteilung dieses Proteins entscheidend sein kann (Antonin et al., 2000 c).

Mithilfe der *western-blot*-Methode ermittelte man auch ein gemeinsames Vorkommen von Vti1a und Vti1b in Thymus, Nebenniere, Milz und Pankreas (Antonin et al. 2000 c).

Trotz der sich überlappenden Verbreitung, bilden die Proteine unterschiedliche SNARE-Komplexe mit unterschiedlichen Funktionen.

Vti1a (Qb-SNARE) bildet, zusammen mit Syntaxin-6 (Qc-SNARE) und Syntaxin-16 (Qa-SNARE), einen t-SNARE am TGN und interagiert mit den v-SNAREs VAMP-

1 Einleitung

3/cellubrevin oder VAMP-4 (R-SNAREs) am frühen/*recycling*-Endosom, was beim retrograden Transport von den FE/RE zum TGN eine Rolle spielt (Mallard et al. 2002).

Da Vti1a auch mit Syntaxin-5, welches nicht in einem Komplex mit Syntaxin-6 vorkommt, durch Koimmunopräzipitation gefällt wurde, vermutet man die Existenz zweier unterschiedlicher Golgi-SNARE-Komplexe. Diese sind wahrscheinlich für den Proteintransport vom ER zur Plasmamembran verantwortlich (Xu et al. 1998).

In Enterozyten fand man einen zweiten 112-kDa-SNARE-Komplex bestehend aus Vti1a, VAMP-7, Syntaxin-5 und Bet-1, der den Prechylomykrontransportvesikel (PCTV) vom ER zu cis-Seite des Golgi-Apparates unterstützt (Siddiqi et al. 2006).

Vti1b, Syntaxin-7, Syntaxin-8, und Endobrevin/VAMP-8 bilden einen SNARE-Kernkomplex, der die Fusion der späten Endosomen reguliert. Zudem ähnelt er biochemisch und biophysologisch dem neuronalen Kernkomplex. Beispielsweise durch den gemeinsamen Aufbau aus einem ungewöhnlich langen Bündel, bestehend aus 4 *alpha-Helices*. Außerdem tragen alle vier Proteine eine Transmembrandomäne und drei von ihnen haben eine unabhängig gefaltete N-terminale Domäne. Vti1b entspricht hierbei der N-terminalen Position von SNAP-25 und Syntaxin-8 übernimmt die Funktion der C-terminalen *Helix* von SNAP-25. Endobrevin übernimmt die Position von Synaptobrevin-2 und Syntaxin-7 die Position von Syntaxin-1 (Antonin et al. 2002).

Außerdem vermitteln Vti1b, Syntaxin-7 und Syntaxin-8 *in vitro* die Transportvorgänge von SE zu Lysosomen, allerdings im Zusammenspiel mit VAMP-7 (Pryor et al. 2004).

Wie oben beschrieben sind Vti1a und Vti1b SNARE-Proteine, die typischer Weise an frühen und späten Endosomen verschiedenster Gewebe zu finden sind. Durch Bildung von SNARE-Komplexen unterstützen sie die Fusion der Endosomen mit ihren Zielorganellen. Obwohl eine Vielzahl einzelner molekularer Mechanismen bekannt ist, ist weitgehend unklar, für welche der Transportvorgänge in den verschiedenen Zelltypen Vti1a/1b verantwortlich sind und welche Bedeutung sie für die Zelle haben.

1.4 Vti1a- und Vti1b-Doppel-Knockout-Mäuse

Um die Bedeutung der SNARE-Proteine Vti1a und Vti1b für die Zelle zu untersuchen, wurden *knockout-Mäuse* für diese Proteine gezüchtet (Kunwar et al. 2011), die in unserem Labor morphologisch charakterisiert wurden.

Die Züchtung von Doppel-*knockout*-Mäusen (DKO) verlangt das Kreuzen von *single-knockout*-Mäusen, wobei ein Elternteil den triallelen Genotyp (Vti1a^{+/-}, Vti1b^{-/-}) und das andere den triallelen Genotyp (Vti1a^{-/-}, Vti1b^{+/-}) zeigen muss.

Die Mäuse der Elterngeneration sind existenzfähig, fertil und wachsen ohne Schwierigkeiten zur vollen Größe heran. Mäuse des Genotyps Vti1b^{-/-} zeigen lediglich kleinere Defekte beim lysosomalen Membranverkehr in Leberzellen.

Die DKO sind hingegen nicht lebensfähig und sterben zwischen Embryonaltag 18,5 (E18,5) und der Geburt. Die meisten DKO waren etwas kleiner als Embryonen aus Kontrollgruppen mit dem Genotyp (Vti1a^{+/-}, Vti1b^{+/-}), wobei die Größe kein zuverlässiges Vergleichskriterium ist.

Das Gehirn der DKO war generell kleiner und zeigte erweiterte Ventrikel. Dabei sind die Seitenventrikel beidseitig bis in die Hemisphären hinein erweitert und enthalten Liquor. Große Projektionsbahnen und Kommissurfasern (z.B. *Commissura anterior*) fehlten entweder oder waren nur schwach ausgebildet, verglichen mit Gehirnen von Kontrollembryonen. Das *Corpus callosum* ist in der anterior-posterior-Achse verkürzt und in der Mitte dünner in den DKO, verglichen mit Kontrollembryonen.

Im Gegensatz zu den Kontrollgruppen fanden sich in den DKO im *Hippocampus* ein aufgrund von Zellvermehrung verdickter *Gyrus dentatus*, ein Faserverlust und der Verlust der *Commissura hippocampi*, ein Verlust der *Fornix*-Fasern, im *Thalamus* der Verlust des *Tractus mamillothalamicus*, der Verlust der Brückenkerne, eine Aussparung im Vorderhirn, wo normalerweise die *Capsula externa* liegt, eine Reduktion der Faserbündel im *Striatum*, dafür das Auftreten eines ungewöhnlichen Faserbündels lateral des *Striatums*, auf halbem Weg endende thalamiko-kortikale

1 Einleitung

Fasern in der *Capsula-interna*-Region und nur teilweise ihr Ziel erreichende *kortiko-thalamikale* Fasern.

Zusätzlich finden sich in den DKO, im Gegensatz zu den Kontrollembryonen, deutlich kleinere *Pedunculi cerebrales*, keine Pyramidenbahn, kein Lissauertrakt, kein *Tractus corticospinalis*, kein *Tractus spinotrigeminalis*, ein deutlich dünnerer *Tractus opticus*, ein dünneres *Chiasma opticum*, ein Faserverlust in den *Colliculi superiores* der Vierhügelplatte, ein Verlust neuroendokriner Zellen im Darm und ein Faserverlust in der *Glandula mandibularis*.

Im dopaminergen System der DKO zeigte sich in der *ventralen tegmentalen* Region (VTA) und in der *Substantia nigra* (SN) eine 52%ige Degeneration, mit Verlust von Neuriten und einer Vielzahl toter Zellen, in der SN. Im *Locus coeruleus* zeigte sich gegenüber den Kontrollembryonen auch eine Degeneration von 34 %.

Das serotonerge System ist in Form eines Neuritenverlustes im *dorsalen Raphe*-Kern betroffen, was in der Kontrollpopulation nicht der Fall war.

Eine wichtige Beobachtung ist, dass DKO im Gegensatz zu Embryonen der Kontrollgruppen unterschiedlich stark ausgeprägte Degenerationen der peripheren Ganglien aufweisen. So sind die *Ganglia trigeminale, petrosum, nodosum, geniculatum* und *spinale* von einer fast vollständigen, das *Ganglion cervicale superius* und das motorische Ganglion bei L12 von einer 50-60%igen und die *Ganglia vestibulare* und *cochleare* von einer 14-26%igen Degeneration betroffen.

Im, bei Mäusen aus sechs Schichten aufgebauten, *Kortex* ist im Gegensatz zu den Kontrollembryonen bei den DKO festzustellen, dass in Schicht 5 die Neurone fehlen, die Schicht 6 vergrößert ist, dass mit fortschreitendem Alter Progenitorzellen der ventrikulären Zone verloren gehen, die *radiale Glia* leichte morphologische Unterschiede aufweist, GAP-43(färbt Zellmembranen)-gefärbte Zellen stark reduziert sind, LAMP-1 (färbt Membranen von Lysosomen und SE)-positive Zellen zunehmen, keine Synaptophysin (Membranprotein kleiner SV)-exprimierenden Zellen vorhanden sind und dass im *entorhinalen Kortex* die Zahl der GFAP (*glial fibrillary acidic protein*,

1 Einleitung

ein Intermediärfilamentprotein in Gliazellen wie beispielsweise Astrozyten)-positiven Zellen zunimmt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Vielzahl von Faserbahnen innerhalb des ZNS entweder fehlt, in ihrer Größe reduziert oder fehlgeleitet ist, in Bezug auf die Richtung und/oder das Wachstum.

Zusätzlich zeigten sich in DKO-Embryonen (E18,5) Veränderungen im Nebennierenmark, die unter 4.2, S. 54 erläutert werden (Kunwar 2008).

2 Fragestellung

Vti1a und Vti1b sind SNARE-Proteine, die typischerweise an frühen und späten Endosomen verschiedenster Gewebe zu finden sind. Durch Bildung von SNARE-Komplexen unterstützen sie die Fusion der Endosomen mit ihren Zielorganellen.

Die Aufgabe dieser Arbeit wird es sein, die durch *knockout* (KO) von Vti1a und Vti1b hervorgerufenen Veränderungen in Membrankompartimenten zu untersuchen und messbar zu machen.

Dabei untersuchen wir, eine Arbeitsgruppe um PD Dr. med. M. Rickmann innerhalb des Zentrums für Neuroanatomie der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen, im speziellen Veränderungen der *dense-core*-Vesikel, des rauen endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks (NNM). Diese Veränderungen treten als biologische Konsequenz auf das Fehlen der Proteine Vti1a und Vti1b auf.

Chromaffine Zellen sind neuroendokrine Zellen, die von der Neuralleiste abstammen und von präganglionären sympathischen Neuronen innerviert werden. Sie sezernieren kontinuierlich Adrenalin, Noradrenalin und Enkephalin in die Blutbahn. Aufgrund dieser Funktion bilden sie kontinuierlich eine große Anzahl gut darzustellender Vesikel, was sie für eine funktionelle Deutung geeignet macht. Sie sind ein funktionell gut charakterisiertes System für die Untersuchung von Membran-gebundenem Transport.

Deshalb haben wir sie für unsere elektronemikroskopischen Untersuchungen ausgewählt.

3 Material und Methoden

3.1 Tiere

Die Züchtung von Vti1a/Vti1b Doppel-*knockout*-Mäusen (DKO) verlangt das Kreuzen von *single-knockout*-Mäusen, wobei ein Elternteil den triallelen Genotyp (Vti1a^{+/-}, Vti1b^{-/-}) und das andere den triallelen Genotyp (Vti1a^{-/-}, Vti1b^{+/-}) zeigen muss. Die Mäuse der Elterngeneration sind existenzfähig, fertil und wachsen ohne Schwierigkeiten zur vollen Größe heran, wohingegen die Doppel-*knockout*-Mäuse nicht lebensfähig sind und zwischen Embryonaltag 18,5 (E18,5) und Geburt sterben. Die DKO wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Gabi Fischer von Mollard, Universität Bielefeld, Biochemie II, Bielefeld, Deutschland (Atlashkin et al. 2003) gezüchtet.

Der Morgen des Tages, an dem eine vaginale Einführung festgestellt wurde, wird als Trächtigkeitstag 0,5 bezeichnet. Die Experimente wurden gemäß den nationalen gesundheitlichen und ethischen Bestimmungen durchgeführt. Die Tiere wurden in einer regulierten Umwelt (23°C ± 1°C, 50% ± 5% Luftfeuchtigkeit) mit einem 12-Stunden-hell-, 12-Stunden-dunkel-Zyklus, Futter und Wasser *ad libitum* gehalten. Anschließend wurden die Embryonen in unserem Labor morphologisch charakterisiert, genotypisiert und deren Nebennieren (NN) extrahiert, welche letztendlich in 0,1-molarem Phosphatpuffer nach Sörensen aufbewahrt wurden. Mit den Embryonen, aus denen die NN stammen, wurde zunächst die Genotypisierung vorgenommen.

3.2 Genotypisierung

3.2.1 Gewebeaufbereitung

Die totale genetische DNA wird aus den Gliedern und dem Schwanz der Embryonen isoliert, indem man nach unserem Standardprotokoll vorgeht. Dabei schneidet man die Gewebe klein und inkubiert sie mit 400 µl Lysepuffer (diese Puffermenge wird in etwa für die Gewebemenge eines Schwanzes benötigt). Für den Lysepuffer verwendet man 100 mM Tris-pH 8, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA und 0,2% SDS. Zusätzlich inkubiert man dieses Zelllysate mit 8 µl Proteinkinase-K (20 µl Proteinase-K/ml Lysepuffer), welche sowohl als Endopeptidase, als auch als Exopeptidase tätig wird und somit zur Freisetzung von Nukleinsäuren führt. Die Probe wird per Hand geschüttelt und auf 55°C erwärmt. Über Nacht wird sie unter kräftigem Schütteln auf einer Rüttelplatte bei 55°C aufbewahrt. Am nächsten Tag kühlt man die Probe auf 4°C ab und bewahrt sie bei dieser Temperatur auf.

3.2.2 DNA-Extraktion

Nachdem das gesamte Genom der Zellen isoliert wurde, wird die DNA von Haaren und anderen unlöslichen Substanzen durch 10minütige Zentrifugation bei 13000 U/Min abgetrennt. Der Überstand wird in ein neues autoklaviertes Eppendorfgefäß überführt. Anschließend fügt man dieselbe Menge Isopropanol, also 400 µl, hinzu und zentrifugiert noch einmal 10 Min mit 13000 U/Min. Dieses mal verwirft man den Überstand und wäscht den Niederschlag mit 300 µl 70%igem Ethanol und zentrifugiert noch einmal bei 13000 U/Min, allerdings nur 5 Min. Das Ethanol wird abpipettiert und der Niederschlag je nach Größe mit 20-100 µl destilliertem Wasser wieder aufgelöst. Die Lösung wird bei 37 °C 2 Stunden schonend geschüttelt, wobei man den Deckel über die ersten 20 Min offen hält, damit der Alkohol komplett

3 Material und Methoden

verdunsten kann. Die DNA kann nun bei 4°C für weitere Experimente aufbewahrt werden.

3.2.3 Polymerasekettenreaktion

Um die Genotypen der Mäuse zu bestimmen, führen wir die Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) (Mullis und Faloona 1987) durch, eine gängige Methode, mit der DNA-Sequenzen, welche von zwei bekannten Sequenzen umgeben sind, amplifiziert werden. Die Reaktion beginnt mit der Denaturierung des DNA-Doppelstrangs in zwei DNA-Einzelstränge durch Erhitzen auf 94-96°C. Danach wird die Temperatur gesenkt, sodass sich die *primer* an die DNA-Einzelstränge anlagern können (*primer*-Hybridisierung, *annealing*). Schließlich füllt eine thermostabile DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf. Sie beginnt am 3'-OH-Ende des angelagerten *primers* und folgt dann dem DNA-Strang (Elongation). Der *primer* wird nicht wieder abgelöst, er bildet den Anfang des neuen Einzelstrangs. Wiederholt man die Schritte Denaturierung, *annealing* und Elongation in 35 Zyklen, erreicht man eine exponentielle Vermehrung der, mit *primern* flankierten, DNA-Sequenz. Die PCR-Reaktion findet in einem 30- μ l-Reaktionsvolumen mit den folgenden wesentlichen Bestandteilen statt: genomische DNA, *primer*, dNTPs, 10x PCR-Puffer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, rekombinante *Taq*-DNA-Polymerase, MgCl_2 .

3.2.3.1 Der Mastermix-Ansatz

Um ein endgültiges Reaktionsvolumen von 50 μ l zu erhalten, wurden folgende Volumina und Konzentrationen verwendet:

19,3	μ l	H ₂ O
3,0	μ l	10X PCR-Puffer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
3,0	μ l	MgCl_2 25mM

3 Material und Methoden

0,6	μl	dNTPs 10 mM
1,5	μl	<i>primer</i> vorwärts 10mM
1,5	μl	<i>primer</i> rückwärts 10mM
1,0	μl	Niederschlag (genomische DNA)
0,1	μl	rekombinante <i>Taq</i> -DNA- Polymerase

3.2.3.2 Primer-Sequenzen

Vti1a^{+/+}:

primer vorwärts: AXhoA-5': ATG AAC TGT CTG CTA AAA TTT AAC

primer rückwärts: A SalC-3': GCA AAT AAG CTC CCA ATT GTC TC

PCR-Produkt: 350 Basenpaare

Vti1a-KO^{-/-}:

primer vorwärts: A SalC: GCA AAT AAG CTC CCA ATT GTC TC

primer rückwärts: AK32: CCT GCG TGC AAT CCA TCT TG

PCR-Produkt: 450 Basenpaare

Vti1b^{+/+}:

primer vorwärts: Seq6: ATA CCT TCT CCT GGC ATC CAT G

primer rückwärts: Seq7: TAC CAA TTT GAT CAG TTT CTG TGG

PCR-Produkt: 400 Basenpaare

3 Material und Methoden

Vti1b-KO^{-/-}:

Primer vorwärts: Seq7: TAC CAA TTT GAT CAG TTT CTG TGG

Primer rückwärts: AK32: CCT GCG TGC AAT CCA TCT TG

PCR-Produkt: 350 Basenpaare

3.2.3.3 PCR-Programm

Die Amplifizierungsreaktion wurde in einem PCR Thermo-cycler (*mastercycler* Eppendorf) bei folgendem Programm durchgeführt:

PCR-Programm für Vti1a^{+/+}, Vti1a^{-/-}, Vti1b^{+/+} und Vti1b^{-/-}:

initiale Denaturierung	4 Min	95°C	} 35 Zyklen
Denaturierung	1 Min	93°C	
<i>annealing</i>	40 s	51,5°C	
Elongation	40 s	72°C	
finale Elongation	5 Min	72°C	
Halten		10°C	

3.2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte werden in 1,5%igem Agarosegel analysiert. Die Agarose wird in TAE-Puffer (Tris-Azetat-EDTA-Puffergemisch) für 6 Min in der Mikrowelle erhitzt. Das erstarrende Gel wird in die Elektrophoresekammer gegeben, wobei man mit einem Elektrophoresekamm Taschen für die DNA-Proben ausspart. Die Kammer wird mit 1x TAE-Puffer aufgefüllt. Dann wird 5x Probenpuffer mit Farbmarkern zu den DNA-

3 Material und Methoden

Proben hinzugefügt und in die Taschen pipettiert. Anschließend legt man für 60 Min eine Spannung von 120 V an und lässt die Transkripte entsprechend ihrer Größe und Ladung in der Kammer wandern. Abschließend wird das Gel 30 Min in einem Ethidiumbromidbad getränkt und unter einer UV-Lampe fotografiert. Auf den Fotos bilden sich Banden, wenn die gesuchten DNA-Abschnitte amplifiziert wurden.

3.3 Anfertigen von Ultradünnschnitten für das Transmissionselektronenmikroskop

Das Ziel der folgenden Abschnitte wird sein zu erläutern, wie es gelingt eine Gewebeprobe so zu behandeln, dass sie in Form von Ultradünnschnitten auf, mit Formvar beschichtete, Kupfer-*grids* (Trägerplättchen) gebracht wird und im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) fotografiert werden kann.

3.3.1 Osmierung

Zunächst werden die NN mit Osmium infundiert. Diese befinden sich in Eppendorfgefäßen (*E-cups*) in 0,1 M Phosphatpuffer nach Sørensen, mit dem pH-Wert 7,4, welcher folgendermaßen angesetzt wird. 19,6 ml einer Lösung A werden mit 80,4 ml einer Lösung B vermischt, um 100 ml 0,2 M Puffer zu erhalten. 0,2 M Lösung A besteht zu 250 ml aus *Aqua dest*, in dem 6,9 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH_2PO_4) gelöst sind. 0,2 M Lösung B wird erzeugt, indem 35,56 g di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na_2HPO_4) mit 1000 ml *Aqua dest* vermischt werden. Setzt man den 100 ml Puffer wieder 100 ml *Aqua dest* hinzu, entsteht der gewünschte 0,1 M Phosphatpuffer nach Sørensen.

Mit diesem Puffer werden die NN zwei mal fünf Minuten gespült. Unter einem Abzug wird nun der gesamte, in den *E-cups* befindliche Puffer, mit einer Pasteurpipette abgesaugt und durch eine definierte Menge Puffer ersetzt (beispielsweise 2 ml). Davon wird die Hälfte wieder abgesaugt, sodass sich in jedem *E-cup* genau dieselbe Menge (beispielsweise 1 ml) Puffer befindet. Anschließend wird der im *E-cup* befindlichen Puffermenge genau dieselbe Menge 2%iges Osmiumtetroxid hinzugegeben, welches gut verpackt im Kühlschrank lagerte. Die *E-cups* werden verschlossen, beschriftet und ein bis drei Stunden, je nach Gewebedicke, auf einer Wackelpumpe unter dem Abzug gelagert.

3 Material und Methoden

Die NN werden hier gründlich mit Osmium infundiert. Dieses ist fettlöslich und bildet durch Anlagerung an die Doppelbindungen ungesättigter Fettsäuren Reaktionsprodukte, die Fetteinschlüsse schwarz hervorheben.

3.3.2 Entwässerung und Einbettung

Zur Entwässerung werden die Gewebeproben 2x mit 0,1 M Phosphatpuffer gespült und einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 90%, 99,9% und Isopropanol) unterzogen. Anschließend werden die Proben mit Propylenoxid (Zwischenmedium) behandelt, wodurch wiederum der Alkohol aus dem Gewebe verdrängt wird.

Nun wird das Gewebe von einem niederviskösen Medium durchzogen und schließlich in dieses eingebettet. Das Medium besteht aus einem niederviskösen Epoxidharz, einem mäßig niederviskösen Epoxidharzweichmacher, einem Anhydridhärter und einem Beschleuniger. Das Gemisch heißt Spurr (Spurr 1969) und hat eine so niedrige Viskosität, dass es in der Lage ist selbst Gewebe mit hohem Lipidgehalt, harten Zellwänden und vielen Vakuolen gründlich zu infundieren. Das Epoxidmedium wird in einem, mit einem Rührmagneten bestückten, Urinbecher frisch angesetzt, da es lange durchmischt werden muss. Für eine Menge von circa 40 ml gibt man nacheinander 10 g VCD (Venylcyclohexen, Epoxidharz mit niedriger Viskosität), 6 g D.E.R. (Diglycidylether, ein Epoxidharzweichmacher), 26 g NSA (Nonenylsuccinicanhydrid, einen Anhydridhärter) und 0,4 g DMAE (Dimethylaminoethanol, einem Beschleuniger) in den, auf einer tarierten Waage befindlichen, Urinbecher. Der Urinbecher wird verschlossen auf einen Magnetrührer gestellt. Man beschleunigt den Rührmagneten bis die Umdrehungen einen Strudel erzeugen, der den Magneten selbst aber nicht erreichen darf, damit keine Luftblasen entstehen. Das Spurr wird so lange durchmischt, bis es verwendet wird.

Nun wird das Epoxidmedium mit Propylenoxid eins zu eins vermengt. Dieses Gemisch diffundiert eine Stunde auf der Wackelpumpe durch das Gewebe.

3 Material und Methoden

Anschließend werden die NN in, mit reinem Epoxidmedium gefüllte, *E-cups* überführt und über Nacht auf der Wackelpumpe gelagert.

Der Harzblock mit den NN soll sich am Ende in abgeschnittenen *E-cup*-Deckeln befinden. Damit die NN dabei nicht auf dem Boden zu liegen kommen, werden einige Tropfen Epoxidmedium in die Deckel gegeben, sodass der Boden bedeckt ist. Im Anschluss kommen die Deckel alle über Nacht in den 70°C-Wärmeschrank, damit am Boden schon einmal eine Harzgrundfläche entsteht. Das Epoxidmedium wird unter dem Abzug bis zum nächsten Tag stehen gelassen. Am nächsten Morgen wird das Epoxidmedium in den *E-cups* noch einmal ersetzt. Diese werden erneut für zwei bis drei Stunden auf die Wackelpumpe gelegt.

Anschließend werden die beiden zusammengehörigen NN auf die Harzgrundfläche, der am Abend vorpolymerisierten *E-cup*-Deckel, gelegt, welche so weit wie möglich mit Epoxidmedium aufgefüllt werden. Dann polymerisieren die NN im 70°C-Wärmeschrank aus.

3.3.3 Anfertigung der Semidünnschnitte

Das Gewebe wurde osmiert, entwässert und in einen Kunstharzblock eingebettet. Nun ist es zum Anfertigen von Semidünnschnitten vorbereitet.

Hierfür wird zunächst der Epoxidmediumblock von dem Kunststoff-*E-cup*-Deckel getrennt. Dazu wird der Block so in einen Schraubstock eingespannt, dass eine kleine Rundung oben heraus steht. Anschließend wird dieser Überstand mit einer Laubsäge abgesägt und der Block aus seiner Ummantelung befreit. Dann wird der Block so eingespannt, dass die beiden NN sauber durch einen mittigen Schnitt mit der Laubsäge getrennt werden können. Eine NN wird aufgehoben, eine wird weiterverarbeitet. Diese liegt in dem, nun halbkreisförmigen, Zylinder dicht an der ehemaligen Grundfläche. Um die NN herum werden überständige Harzanteile mit der Laubsäge senkrecht nach unten, auf mindestens zwei Seiten, entfernt. Auf diese Weise wird der Block so verkleinert, dass er in den Präparatehalter des Mikrotoms

3 Material und Methoden

vom Typ ULTRACUT Manual (Reichert-Jung, Wien) eingespannt werden kann. Dieser wird auf dem Trimmblock befestigt. Mit einer groben Rasierklinge wird ein in etwa gleichschenkliges Trapez, um die Gewebeposition herum, auf die Oberfläche geritzt.

Unter dem Mikrotom werden nun die Seiten des Harzblocks schräg vom Gewebe weg, von außen nach innen, abgetragen, bis man von allen vier Seiten das vorgezeichnete Trapez erreicht hat. Es entsteht eine abgeschnittene Pyramide mit trapezförmiger Grund- und Deckfläche, in deren Deckfläche die NN liegt.

Der Präparatehalter wird in den Präparatträgerstab eingespannt, sodass die längere, der beiden parallelen, Seiten des Trapezes zur Tischplatte zeigt. Dann wird der Trimmblock durch einen Messerträger ersetzt, in dem ein altes, für Anschnitte genutztes, Diamantmesser für Semidünnschnitte (Diatome, Biel, Schweiz) eingespannt ist. Der Präparatehalter und das Messer sind jeweils in zwei Ebenen verstellbar. So wird, unter Annäherung, die Pyramidenoberfläche möglichst parallel zur Messerschneide ausgerichtet. Anschließend wird, unter manuellem Vorschub von je 2 μm , die Pyramide vorgeschoben und es werden so viele 2 μm dicke Schnitte gemacht, bis die NN getroffen wird.

Jetzt wird das Anschnittmesser durch ein anderes Diamantmesser für Semidünnschnitte (Diatome, Biel, Schweiz) ersetzt. Nach Parallelausrichtung der NN zur Messerschneide werden weiterhin 2 μm dicke Schnitte angefertigt, wobei man circa alle 50 μm ein paar Schnitte auf Objektträger aufnimmt. Die Schnitte gleiten nach dem Schneiden in die, mit *Aqua dest* gefüllte, Wanne des Messers. Dort werden sie mit Hilfe eines Glaskugelstabs aufgenommen, auf gereinigte Objektträger aufgetragen und gefärbt.

3.3.4 Schnellfärben der Semidünnschnitte

Unter dem Mikroskop kann analysiert werden, ob man sich schon im Nebennierenmark (NNM) befindet. Das wird geprüft, indem die Semidünnschnitte der Schnellfärbung nach Richardson (Richardson et al. 1960) unterzogen werden, welche eine Qualitätskontrolle der Schnitte unter dem Mikroskop zulässt.

Die Schnellfärbelösung nach Richardson erhält man, indem man eine Lösung A mit einer Lösung B eins zu eins mischt. Dabei wird Lösung A erzeugt, indem 1 g Methylenblau ($C_{16}H_{17}N_3S^+-Cl^-$) und 1 g Borax (di-Natriumtetraborat-Decahydrat) auf 100 ml mit *Aqua dest* aufgefüllt und erwärmt werden, damit sich alles löst. Lösung B entsteht, wenn 1 g Azurll (1:1 Gemisch aus Methylenblau und Azurl) bis 100 ml mit *Aqua dest* aufgefüllt werden.

Auf einem Objektträger befinden sich mehrere zu färbende Schnitte, die allerdings noch wässrig sind. Deshalb werden die Objektträger zunächst auf einer 60°C-warmen Heizplatte getrocknet. Anschließend werden sie noch fünf Minuten auf einer 100°C-warmen Heizplatte fest gebacken. Danach erhält jeder Schnitt einen Tropfen der Färbelösung. Dazu zieht man eine 10 ml Kunststoffspritze mit der Färbelösung auf und setzt ihr einen Spritzenfilter auf. Aus dieser Spritze wird die Richardson-Färbelösung aufgetragen. Die Objektträger mit Richardson-Färbelösung werden 2-3 Minuten auf einer der 60°C-Wärmeplatte erhitzt und dann unter fließendem Wasser und mit *Aqua dest* abgespült. Die Schnitte sind nun gefärbt und können auf der 60°C- Wärmeplatte getrocknet werden. Basophile und osmiophile Strukturen werden blau, metachrome Substanzen werden rot-violett gefärbt. Die Schnitte auf den Objektträger können nun auf Region und Qualität geprüft werden. Ist das NNM gut getroffen und sauber geschnitten, werden die Objektträger, an der Stelle an der sich die Schnitte befinden, von unten mit einem wasserfesten Stift kreisförmig markiert. 3-4 Schnitte werden anschließend zur Weiterverarbeitung ausgewählt.

3.3.5 Aufkleben der Semidünnschnitte mit Epon

Ziel der nächsten Schritte ist die Anfertigung von Ultradünnschnitten auf Grundlage der Semidünnschnitte. Dazu werden die markierten Schnitte auf einen neuen Kunstharzblock aufgeklebt. Das hier verwendete Kunstharz ist Epon (Craig et al. 1962), da sich dieses mit den Diamantmessern für Ultradünnschnitte schneiden lässt ohne diese zu beschädigen. Um 30 g Epon herzustellen benötigt man 14,4 g Epon-812 (Glycidether, ein Epoxidharz), 8,5 g DDSA (2-Dodeceny succinacid, ein Abbindemittel), 7,1 g MNA (Methylnadicanhydrid, ein Härter) und 0,9 g BDMA (Benzoldimethylamin, ein Beschleuniger). Die Komponenten werden, auf die gleiche Weise wie Spurr, unter einem Abzug zusammen gemischt (siehe 3.3.2, S. 41). Anschließend wird das Epon in 10 ml Spritzen aufgezogen, mit Parafilm verschlossen und im Tiefkühlschrank aufbewahrt. Diese Eponspritzen müssen vor Gebrauch auftauen, da Epon flüssig verwendet wird.

Um die Semidünnschnitte aufzukleben bastelt man sich zuerst eine Gussform für das flüssige Epon. Dazu nimmt man eine Gelatinekapsel und zieht sie auseinander. Der größeren Hälfte wird mit einem erhitzten Skalpell die Rundung abgetrennt, sodass ein kreisförmiger Zylinder mit einer ebenen Grundfläche entsteht. Dann trägt man etwas Epon auf einen leeren Objektträger auf und benetzt die ebene Fläche des Zylinders. Man stellt den Zylinder anschließend so auf die Objektträger mit den Schnittpräparaten, dass er einen Schnitt mit seiner benetzten Grundfläche umschließt. Der Objektträger wird etwa eine Stunde auf eine 100°C-warme Heizplatte gelegt, wo das Epon auspolymerisiert und eine feste Verbindung zwischen Glas und Gelatine bildet. Der Zylinder wird nun luftblasenfrei mit flüssigem Epon gefüllt und über Nacht in dem 70°C-Wärmeschrank ausgehärtet.

Am nächsten Tag kann man mit einem erhitzten Skalpell den unteren Rand der Kapsel von hartem Epon reinigen. Anschließend wird der Zylinder mit einer etwa 30°-schräg angesetzten Rasierklinge durch einen Hammerschlag von dem Objektträger getrennt. Der Semidünnschnitt sitzt nun dem Eponblock auf.

3.3.6 Anfertigung der Ultradünnschnitte

Jetzt kann der Semidünnschnitt mit dem Mikrotom zu einigen Ultradünnschnitten, mit einer Dicke von 60-90 nm, verarbeitet werden.

Wie bei den Semidünnschnitten wird dazu der Block, mit dem Präparat nach außen, in den Präparatehalter eingespannt und unter dem Mikrotom zu einem Pyramidenstumpf, mit einem in etwa gleichschenkligen Trapez als Deckfläche, verarbeitet. Hierzu wird zunächst eine grobe Rasierklinge benutzt. Da das Trapez allerdings sehr klein wird, muss eine ständige mikroskopische Kontrolle erfolgen, ob an der richtigen Stelle gearbeitet wird. Denn aufgrund der geringen Größe des Trapezes, muss man sich für eine Region des Semidünnschnittes entscheiden. Die Größe des Trapezes darf die Größe der ovalen Innenfläche der Formvarbeschichteten (Polyvinylformal) Kupfer-*grids* nicht übersteigen. Am Ende werden die Seitenflächen der Pyramide mit einer feinen Rasierklinge nachgezogen, damit transparente Flächen entstehen.

Die Ultradünnschnitte werden prinzipiell genauso angefertigt wie die Semidünnschnitte, allerdings wird hier ein Diamantmesser für Ultradünnschnitte (Diatome, Biel, Schweiz) verwendet. Außerdem wird der Vorschub hier automatisch erzielt und es werden Schnitte mit einer Dicke von 60-90-nm angefertigt. Nachdem die, in *Aqua dest* geglihtenen, Schnittpräparate zur Glättung mit Chloroform bedampft wurden, werden sie mit einer Öse aufgenommen. Eine Öse ist eine flach geschlagene Drahtschlaufe, in der sich nach dem Eintauchen in Wasser ein Wassertropfen bildet. Hebt man damit einen Ultradünnschnitt aus dem Wasser, schwimmt dieser auf dem Tropfen. Der Schnitt kann nun mit der Innenfläche eines *grids* abgetupft werden. Dies funktioniert allerdings nur, wenn die mittige Aussparung der ovalen Kupfer-*grids* dünn und gleichmäßig von einem Formvar-Film überzogen ist.

Mit diesen beschichteten *grids* kann man unter dem Mikrotom einen Schnitt von der Öse abtupfen. Zusätzlich aufgenommenes Wasser wird dann mit Filterpapier

abgezogen. Zum Schluss werden die *grids* in speziellen Aufbewahrungsboxen getrocknet und in einem weiteren Schritt kontrastiert.

3.3.7 Kontrastieren in einem Kontrastierautomaten

In einem Kontrastierautomaten des Typs Reichert Ultrastain (Leica, Bensheim, Deutschland) werden die Ultradünnschnitte mit einer Uranylacetatlösung (1% in *bi dest*) und mit Bleizitrat behandelt. Dafür werden die *grids* zunächst in eine elastische Kunststoffhalterung gesetzt. Diese wird ihrerseits in die Kammer des Kontrastierautomaten gespannt und mit den Lösungen umspült.

Bei dieser Kontrastiermethode werden die Salze von den Objekten unterschiedlich stark absorbiert, sodass später im elektronenmikroskopischen Bild unterschiedlich intensiv markierte Strukturen erscheinen. Das Uranylacetat bindet sehr fest an Phosphat- und Aminogruppen. Im Elektronenmikroskop sind demnach Nukleinsäuren und bestimmte Proteine durch hohen Kontrast gekennzeichnet. Bleiionen binden an negativ geladene Strukturen, sowie Strukturen die mit Osmium reagiert haben (beispielsweise Membranen) und verstärken auf diese Weise dort die Kontraste. Werden Kontraste durch das direkte Anfärben einer Struktur hervorgehoben, spricht man von einem *positive staining*.

Der Ultrastain arbeitet folgendermaßen. Zuerst spült er die Kammer mit Wasser zu Injektionszwecken. Anschließend wird die Kammer mit Uranylacetat 30 Minuten bei 25°C durchgespült. Darauf folgt ein zweiter Waschgang mit Wasser zu Injektionszwecken und eine 2 Minuten lange Spülung mit Bleizitrat bei 25°C. Den Abschluss bildet ein dritter Waschgang mit Wasser zu Injektionszwecken. Der gesamte Vorgang dauert 43,20 Minuten.

Nun sind die Schnitte so weit, dass sie im TEM (Typ LEO 906 E, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) angeschaut und fotografiert werden können.

3.3.8 Fotobearbeitung und Auswertung

Da wir es uns zur Aufgabe gemacht haben, durch KO von Vti1a und Vti1b hervorgerufene, Veränderungen in Membrankompartimenten des Zytoplasmas zu untersuchen und messbar zu machen, haben wir das Zytoplasma von Zellen des NNM, an stichprobenartig-gewählten Stellen, fotografiert. Sind Zellkerne und andere unbrauchbare Strukturen getroffen worden, haben wir sie mit einem Fotobearbeitungsprogramm (*imageJ*) ausgeschnitten und ihre Fläche von der Fläche des gesamten Zytoplasmas abgezogen. Anschließend haben wir die Kompartimente gezählt, um ihre Anzahl festzustellen. Dabei haben wir definiert, dass es zwei Arten von Vesikeln gibt. Wir unterscheiden zwischen Vesikeln mit einer ausgesackten Membran (der Flächeninhalt des Membran-umschlossenen Bereichs, welcher als weißer Hof erscheint, ist doppelt so groß, wie der Flächeninhalt des elektronendichten Inhalts der Vesikel) und Vesikeln ohne, beziehungsweise mit kleiner ausgesackter Membran. Außerdem haben wir *multivesicular bodies* und Golgi-Apparate gezählt.

Zur Längenbestimmung von Membranen haben wir anschließend auf die Fotos vom Zytoplasma ein zweites Bild, mit dreizehn horizontalen Linien in gleichem Abstand und mit gleicher Stärke, projiziert. Die Fläche und Länge der Linien haben wir berechnet und deren Schnittpunkte mit den Organellen gezählt. Dabei hat eine, von einer Linie durchzogene, Vesikel zwei Schnittpunkte, eine, eine Linie berührende, Vesikel einen Schnittpunkt erhalten. Hier haben wir zwischen Schnittpunkten mit Vesikeln mit ausgesackter Membran, Schnittpunkten mit Vesikeln ohne ausgesackte Membran und Schnittpunkten mit dem ER unterschieden.

Mithilfe von stereologischen Referenzen kann man Rückschlüsse auf die Verteilung, das Vorkommen und die Membranlängen veränderter Strukturen in DKO und Kontrollembryonen ziehen. Außerdem haben wir eine Abstandsmessung der Vesikel von der Zellmembran durchgeführt. Wir wollten heraus zu bekommen, ob es aufgrund des Abstands der Vesikel zur Zellmembran im DKO zu einer

3 Material und Methoden

eingeschränkten Exozytose kommt. Alle Aussagen werden mit Hilfe von Mittelwerten getroffen, die mit einer Standardabweichung angegeben werden.

Für die Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder haben wir nur Fotos mit einer 10000fachen Vergrößerung und einer Auflösung von 1024x1024 Pixeln benutzt. Um die Vergleichbarkeit zu wahren, sind alle Bilder mit demselben Elektronenmikroskop (Leo 906) im .tif-Format aufgenommen worden.

3.4 Liste der Chemikalien und ihrer Hersteller

Agarose (Roth, Germany, Cat. No. 2267.3)

Azurll (Merck, Best.nr.: 1.09211.0010)

BDMA (Serva, Best.nr.: 14835)

Bleizitrat (Schuchardt München BL 6071)

DDSA (Serva, Best.nr.: 20755)

D.E.R. (Serva, Best.nr.: 10247)

di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Merck, Best.nr.: 1.06580.1000)

di-Natriumtetraborat-Decahydrat (Carl Roth GmbH + Co, Art.nr.: T880.1)

DMAE (Serva, Best.nr.: 20130)

dNTPs (Roche, Cat. No. 1969046)

EDTA (Ethylendiamintetraacetat) (Carl Roth, Art. No. 8043.2)

Epon-812 (Serva, Best.nr.: 21045)

Ethanol 99% (GeReSo mbH, EG-Kennzeichnung: 200-578-6), (99,8%, Carl Roth, Art. No 9065.4 für Genotypisierung)

Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Best.nr.: E-1510)

Essigsäure (CH₃COOH) (Carl Roth, Art. No. 3738.1)

Formvar (Plano, Best.nr.: R 1202)

hyper ladder (Indikator für Gelelektrophorese) (Bioline lot No. H2-105H)

Isopropanol (Carl Roth, Art. No.. 9866.5)

Methylenblau (Serva, Best.nr.: 29198)

MgCl₂ (Invitrogen, part. No. Y02016)

MNA (Serva, Best.nr.: 29452)

3 Material und Methoden

NaCl (Carl Roth, Art. No. 3957.1)

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Merck, Best.nr.: 6346.1000)

NSA (Serva, Best.nr.: 30812)

Osmiumtetroxid (Dr. Rickmann, Neuroanatomie Göttingen, 14.02.2003)

PCR-Puffer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Invitrogen, part. No. Y 02028)

primer (Invitrogen)

Propylenoxid (Serva, Best.nr.: 33715)

Proteinase-K (Roche, Cat. No. 03115 879001)

rekombinante *Taq*-DNA-Polymerase (Invitrogen, cat. No. 10342-020)

SDS (sodium dodecylsulfate) (AppliChem Art. No. A1502.1000)

Tris (Roth, Art. No. 3580.1)

Uranylacetat (Laurylab lot No. 08/273)

VCD (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Best.nr.: 94956)

4 Ergebnisse

4.1 Qualitative Beschreibung der EM-Bilder

Die *grids*, die zum fotografieren mit dem TEM verwendet wurden, stammen zum einen von Doppel-*knockout*-Maus-Embryonen (DKO-Embryonen) mit dem Genotyp (Vti1a^{-/-}, Vti1b^{-/-}), zum anderen stammen sie von Kontrollmaus-Embryonen (Ctrl-Embryonen) mit dem Genotyp (Vti1a^{+/+}, Vti1b^{+/+}). Das Material, was uns zur Verfügung stand, lieferte uns eine ausreichend große Anzahl an Gewebeproben, um vergleichende Untersuchungen durchzuführen. Ziel dieser Untersuchungen war es, die feinstrukturellen Gemeinsamkeiten und, vor allem, Unterschiede beider Populationen darzustellen.

Nachdem sämtliche Proben mit der gleichen Methode aufgearbeitet wurden, haben wir das Zytoplasma von Zellen des NNM mit dem TEM nach dem Stichproben-Prinzip fotografiert. Das stichprobenartige Fotografieren bewirkt eine optimale Vergleichbarkeit zwischen den Fotos des NNM der Ctrl und den Fotos des NNM der DKO. Exemplarisch sei hier ein elektronenmikroskopisches Foto von einem DKO gezeigt (Abb. 4.1).

4 Ergebnisse

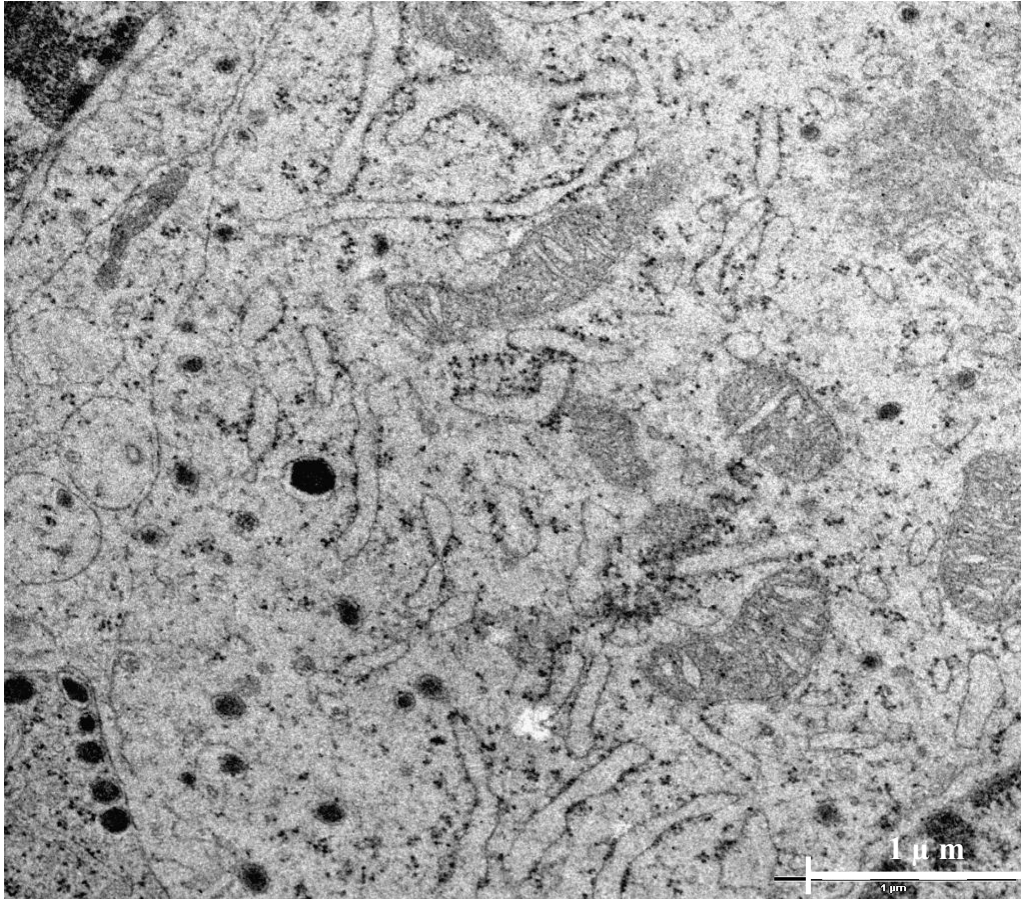


Abb. 4.1 Elektronenmikroskopisches Foto des Zytosols chromaffiner Nebennierenmarkszellen einer DKO-Maus (Doppel-*knockout*-Maus)

4.2 Methode der Datengewinnung

Die chromaffinen Zellen des NNM sind ein beliebtes Studienobjekt des Membrantransportes und enthalten eine Vielzahl von Vesikeln. Diese Vesikel enthalten eine komplexe Mischung aus Strukturproteinen, Katecholaminen, Peptidhormonen, Verarbeitungsenzymen, Proteaseinhibitoren, ATP, Ascorbinsäure, und Calcium (Crivellato et al. 2008).

Aufgrund unserer Färbemethode (Osmium, welches Fetteinschlüsse schwarz hervorhebt; Uranylacetat, welches Nukleinsäuren und bestimmte Proteine schwärzt; Bleiionen, die negativ geladene Strukturen färben und so zum Beispiel den Osmiumeffekt verstärken), erscheinen ultrastrukturell sämtliche Zellmembranen schwarz. Zusätzlich färben sich die Vesikelinhalte schwarz, weshalb man sie als elektronendichte Vesikel (DCV) bezeichnet. In früheren elektronenmikroskopischen Untersuchungen hat man festgestellt, dass zwei unterschiedliche Populationen von DCV existieren, eine größere und eine kleinere. Vermutlich repräsentieren diese Subpopulationen zwei unterschiedliche Synthesepfade in der DCV-Biogenese oder, alternativ, verschiedene Stadien der DCV-Biosynthese (Grabner et al. 2005).

Bei unserer Arbeit liegt das Interesse bei den morphologischen Veränderung der DCV. In 18,5 Tage alten DKO-Embryos zeigen die DCV teilweise eine Aussackung der Vesikelmembran, sodass zwischen der Membran und dem Inhalt der Vesikel ein weißer Hof entsteht. Erreicht der geschätzte Flächeninhalt des weißen Hofes den gleichen oder einen größeren Flächeninhalt des zum selben DCV gehörigen schwarz-gefärbten Vesikelinhalts, sprechen wir von dilatierten Vesikeln.

Da diese mit besonderer Häufigkeit in DKO vorkommen, haben wir sie in dieser Arbeit getrennt analysiert. Wir betrachten also normale Vesikel, dilatierte Vesikel, Golgi-Apparat, rER und MVB mit der Fragestellung, ob sich an Vorkommen und Morphologie dieser Organellen etwas ändert, wenn die SNARE-Proteine Vti1a und Vti1b in einem Embryo nicht existieren.

4.3 Vesikeldaten

Die Bilder kann man als stichprobenartig-gewählte, zweidimensionale Proben der dreidimensionalen Zelle betrachten. Um vergleichbare Daten zu gewinnen, werden die Vesikel zunächst in jedem Bild gezählt und in einer Tabelle notiert. Die Aussagen sollen auf das Zytoplasma bezogen werden. Durch die Bestimmung der Gesamt-Zytosol-Fläche pro Bild und das einfache Auszählen der normalen und dilatierten Vesikel lässt sich die Anzahl pro Fläche leicht bestimmen (Tab. 4.1).

	Vesikelanzahl gesamt [μm^{-2}]	Vesikelanzahl normal [μm^{-2}]	Vesikelanzahl dilatiert [μm^{-2}]	Vesikelanzahl dilatiert [%]
Ctrl	3,06	2,83 \pm 1,25	0,23 \pm 0,2	8
DKO	2,67	2,39 \pm 1,11	0,28 \pm 0,31	11

Tab. 4.1 Anzahl der Vesikel pro μm^2 Zytoplasma der Nebennierenmarkszellen, sowohl von Kontrollmäusen (Ctrl) als auch von Doppel-*knockout*-Mäusen (DKO); dilatierte Vesikel: Der geschätzte Flächeninhalt des weißen Hofes eines Vesikels erreicht den gleichen oder einen größeren Flächeninhalt, als der zu demselben Vesikel gehörige, schwarz-gefärbte Vesikelinhalt.

Aus diesen Daten lässt sich ableiten, dass die gesamte Vesikelanzahl in den DKO reduziert ist. Graphisch ist dieser Zusammenhang in Abb. 4.2, S. 56 dargestellt. Der Anteil an dilatierten Vesikeln ist im DKO, im Verhältnis zu den normalen Vesikeln, größer als in der Kontrolle.

4 Ergebnisse

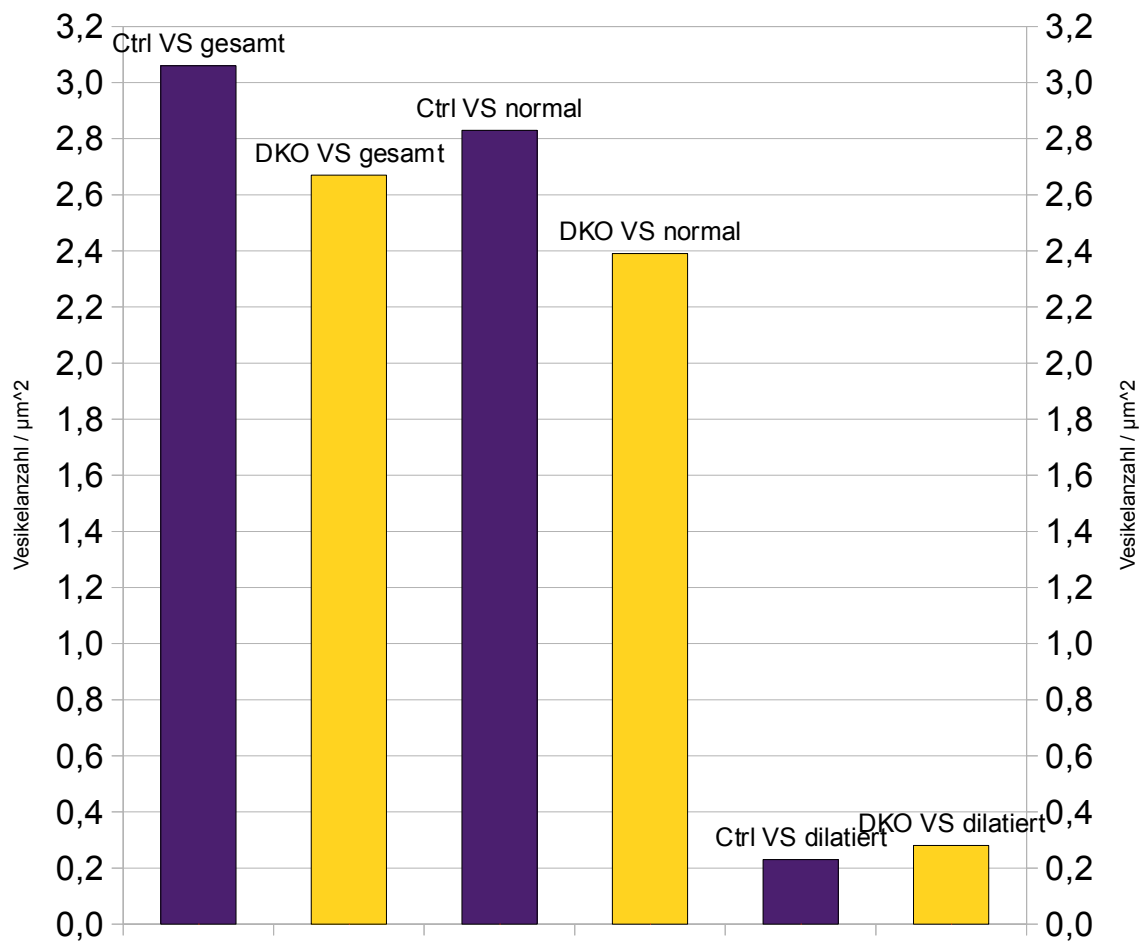


Abb. 4.2 Anzahl der Vesikel pro μm^2 Zytoplasma der Nebennierenmarkszelle, sowohl von Kontrollmäusen (Ctrl) als auch von Doppel-*knockout*-Mäusen (DKO); dilatierte Vesikel: Der geschätzte Flächeninhalt des weißen Hofes eines Vesikels erreicht den gleichen oder einen größeren Flächeninhalt, als der zu demselben Vesikel gehörige, schwarz-gefärbte Vesikelinhalt.

Eine direkte Methode, die Membranlänge pro Fläche zu bestimmen, wäre das Ausmessen des Vesikelumfangs. Wird dieser auf die Fläche bezogen, erhält man das Ergebnis. Diese Vorgehensweise ist aber nicht genauer als die hier verwendete stereologische Methode (Underwood 1970), bei der vom Verhältnis von Schnittpunkten zu Längen auf das Verhältnis von Längen zu Flächen geschlossen wird.

Dazu wird ein 1024x1024-Pixel-großes weißes Bild mit einer definierten Anzahl vertikaler schwarzer Linien (in unserem Fall 13 Linien) über ein Foto, wie in Abb. 4.1, S. 53,

4 Ergebnisse

projiziert und auf diese Weise ein Bildstapel erzeugt. Der genaue Flächeninhalt des Fotos (in Pixeln) und der Flächenanteil der schwarzen Linien am Gesamtflächeninhalt (in Pixeln) sind bekannt. Falls Zellbestandteile aus den Bildern ausgeschnitten wurden, werden der Flächeninhalt des Zytoplasmas und der Flächeninhalt der Linien neu berechnet, sodass wir ausschließlich Aussagen über die Verhältnisse im Zytoplasma treffen (siehe Abb. 4.3).

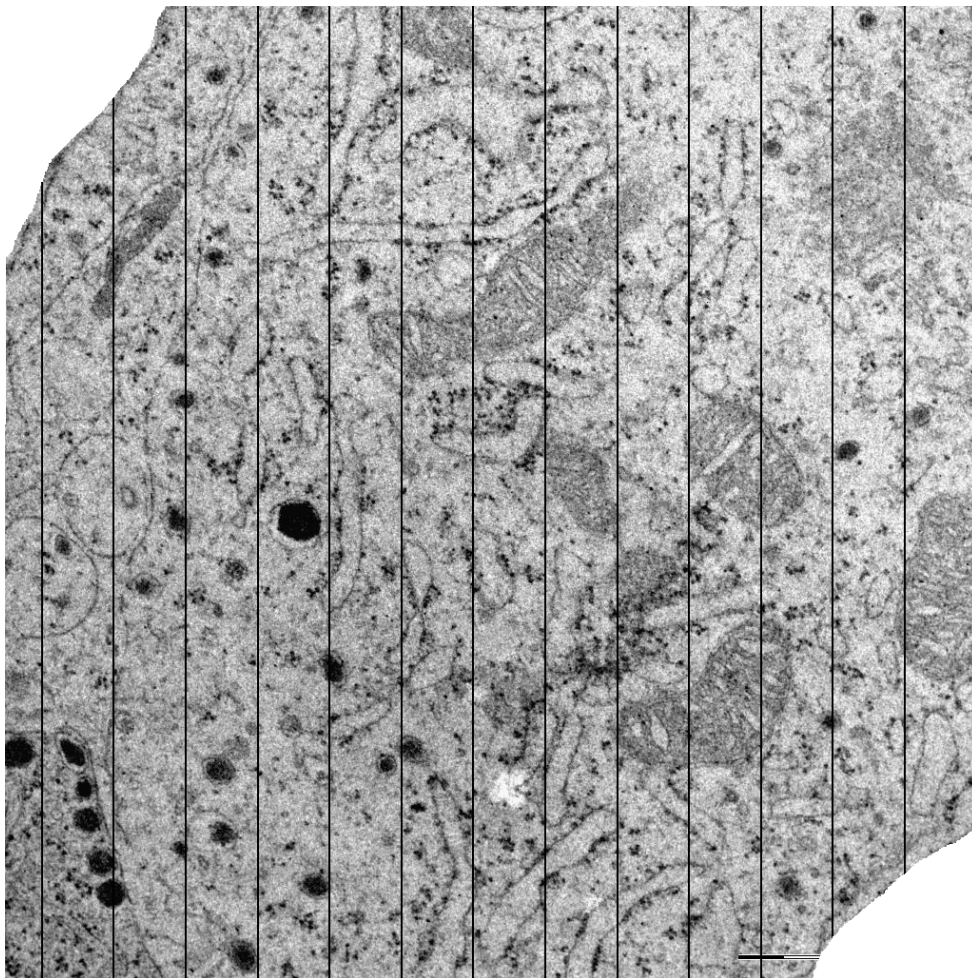


Abb. 4.3 Zytoplasma einer Nebennierenmarkszelle mit Messraster überlegt

Anschließend werden die Schnittpunkte der Vesikelmembranen mit den Linien gezählt und man erhält eine Anzahl von Schnittpunkten pro Vesikel und Bild (siehe Abb. 4.4, S. 58).

4 Ergebnisse

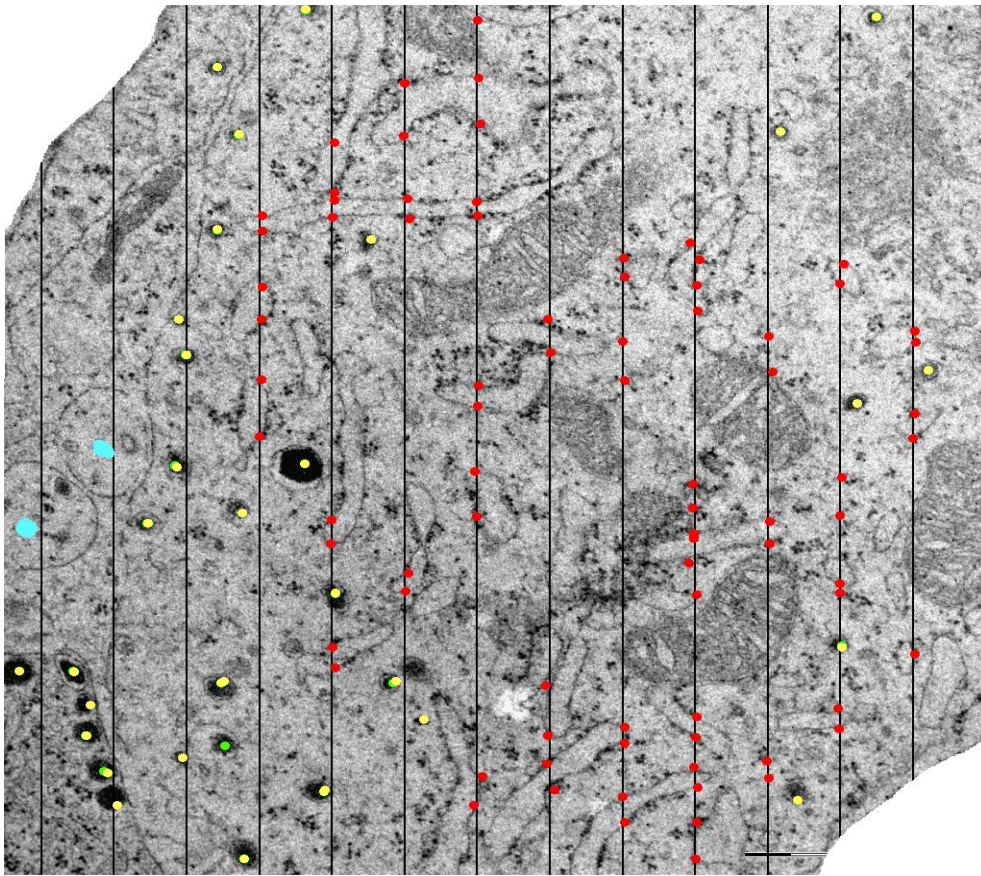


Abb. 4.4 Zytoplasma einer Nebennierenmarkszelle mit Messraster überlegt und mit, für die Berechnung, markierten Zellstrukturen; gelb: Anzahl normaler Vesikel; grün: Anzahl dilatierter Vesikel; rot: Schnittpunkte rER mit Linien; türkis: Anzahl *multivesicular bodies* (fanden in dieser Arbeit jedoch keine Berücksichtigung); kein Golgi-Apparat

Die Länge der Vesikelmembran wird mit folgender Formel berechnet:

$$L_a = \pi/2 \times \text{Anzahl der Schnittpunkte einer Vesikelart mit den Linien} / \text{Länge der Linien}$$

$$L_a = \text{Länge pro Fläche} = [1/\text{Pixel}]$$

Mit der Einheit 1/Pixel lässt sich gut arbeiten, da alle Bilder genormt sind und 241 Pixel einem Mikrometer entsprechen. Durch Multiplikation der Ergebnisse obiger

4 Ergebnisse

Formel mit dem Faktor 241 wird die Membranlänge der Vesikelarten pro μm errechnet (Tab. 4.2):

	Membranlänge der Vesikel gesamt [μm^{-1}]	Membranlänge der normalen Vesikel [μm^{-1}]	Membranlänge der dilatierten Vesikel [μm^{-1}]	Membranlänge der dilatierten Vesikel [%]
Ctrl	1,34	1,19 \pm 0,54	0,15 \pm 0,16	11
DKO	1,23	1,03 \pm 0,41	0,2 \pm 0,23	16

Tab. 4.2 Membranlänge der Vesikelarten pro μm Zellmembran der Nebennierenmarkszellen, sowohl von Kontrollmäusen (Ctrl) als auch von Doppel-*knockout*-Mäusen (DKO); dilatierte Vesikel: Der geschätzte Flächeninhalt des weißen Hofes eines Vesikels erreicht den gleichen oder einen größeren Flächeninhalt, als der zu demselben Vesikel gehörige, schwarz-gefärbte Vesikelinhalt.

Tab 4.2 zeigt, dass die gesamte Vesikelmembranlänge in den DKO gegenüber der Kontrolle reduziert ist. Allerdings ist der Anteil der Membranlänge dilatierter Vesikel im DKO größer. Graphisch ist dieser Zusammenhang in Abb. 4.5, S. 60 dargestellt.

4 Ergebnisse

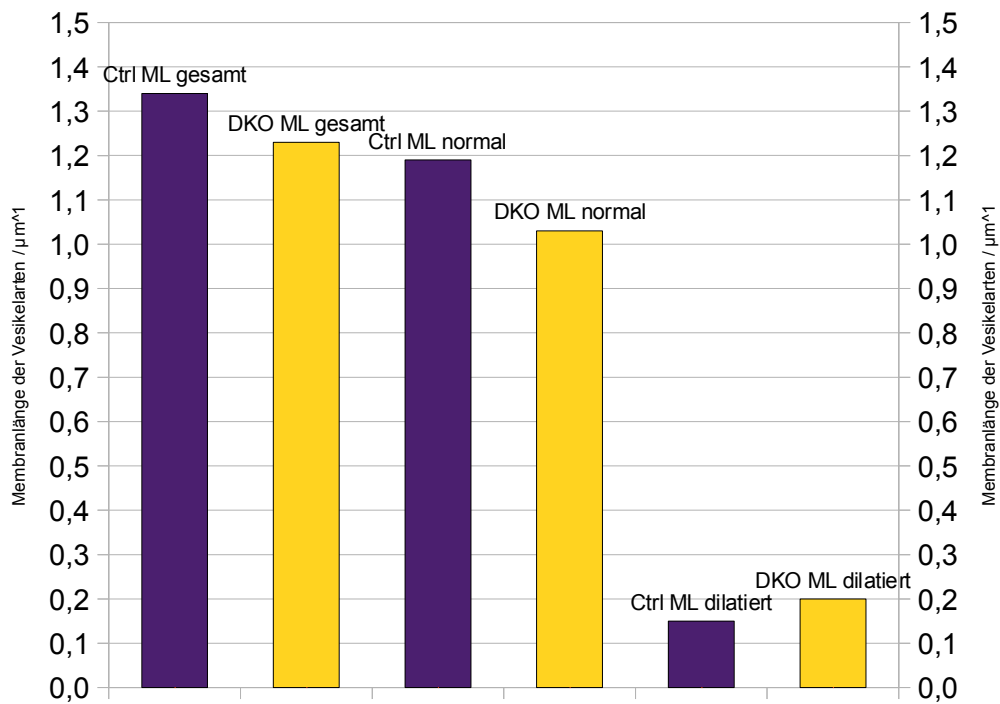


Abb. 4.5 Membranlänge (ML) der Vesikelarten pro μm Zellmembran der Nebennierenmarkszellen, sowohl von Kontrollmäusen (Ctrl) als auch von Doppel-*knockout*-Mäusen (DKO); dilatierte Vesikel: Der geschätzte Flächeninhalt des weißen Hofes eines Vesikels erreicht den gleichen oder einen größeren Flächeninhalt als der zu demselben Vesikel gehörige, schwarz-gefärbte Vesikelinhalt

4.4 Daten zum rauen endoplasmatischen Retikulum

Die Methode zur Datengewinnung unterscheidet sich nicht von der zum Vesikeldatengewinn. Man zählt die Schnittpunkte des rER mit den Linien in einem Bildstapel (siehe Abb. 4.4) und berechnet das Verhältnis zur Länge der Linien pro Bild. Anschließend schließt man stereologisch auf das Verhältnis von der Länge zur Fläche.

Zunächst wird die Gesamtlänge der rER-Membran durch folgende Formel berechnet:

$$La = \pi/2 \times \text{Anzahl der Schnittpunkte des rER mit den Linien} / \text{Länge der Linien}$$

$$La = \text{Länge pro Fläche} = [1/\text{Pixel}]$$

Da sich an der Normierung der Bilder nichts geändert hat, werden auch hier die Ergebnisse aus obiger Formel mit dem Faktor 241 multipliziert. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.3 dargestellt.

	rER Gesamtmembranlänge [μm^{-1}]
Ctrl	0,82 ± 0,64
DKO	1,53 ± 1,03

Tab 4.3 Membranlänge rER pro μm Zellmembran der Nebennierenmarkszellen, sowohl von Kontrollmäusen (Ctrl) als auch von der Doppel-*knockout*-Mäusen (DKO).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich entnehmen, dass die Gesamtlänge der rER-Membran im DKO deutlich erhöht ist (siehe Abb. 4.6, S. 62).

4 Ergebnisse

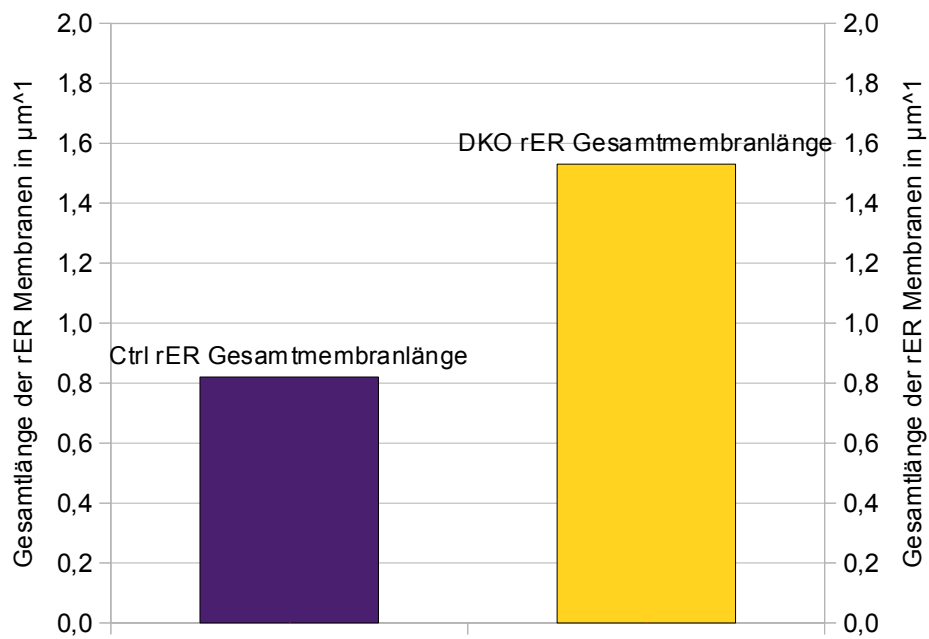


Abb.4.6 Gesamtlänge der rER-Membranen pro μm Zellmembran der Nebennierenmarkszellen, sowohl von Kontrollmäusen (Ctrl) als auch von Doppel-*knockout*-Mäusen (DKO).

4.5 Abstandsanalyse

Die Vesikel in unseren Betrachtungen sind mit einem erheblichen Anteil an exo- oder endozytotischen Prozessen beteiligt. Deshalb entstand die Theorie, dass sich Vesikelanzahl und Abstand zur Zellmembran im DKO gegenüber der Kontrollgruppe verändern könnten. In den nachfolgenden Untersuchungen wurden deshalb die Vesikelverteilung und Vesikelanzahl, im Bereich dicht unter Zellmembranen, näher charakterisiert.

Ist auf einem Foto eine Zell-Zellgrenze (siehe Abb. 4.1, S. 53 links unten) zu sehen, wird ihre Länge ermittelt. Danach wird der Abstand definiert, in welchem die Vesikel registriert werden. Im hier vorliegenden Fall ist das 1 μm .

Im DKO befinden sich nach unseren Untersuchungen durchschnittlich 3,35 Vesikel im Abstand von 1 μm über einem 1 μm langen Membranabschnitt. Bei den Kontrollembryonen sind es durchschnittlich 4,26 Vesikel.

Zusätzlich haben wir den Abstand in 10 Teile untergliedert, um herauszufinden, ob es bevorzugte Aufenthaltsgebiete der Vesikel gibt und ob der Verlust von Vti1a und Vti1b zu einer Umverteilung der Vesikel im membranahen Bereich führt. Unsere Betrachtungen beziehen sich zum einen auf die Gesamtzahl der Vesikel in ihrem spezifischen Abstand über der Membran, zum anderen auf die durchschnittliche Anzahl der Vesikel in ihrem spezifischen Abstand über 1 μm der Membran.

4 Ergebnisse

Die folgenden Abbildungen und Tabellen zeigen die Verhältnisse im DKO und in der Ctrl.

Abstand in μm von Zellmembran	Vesikelanzahl pro μm Zellmembranlänge		prozentuale Vesikelverteilung pro μm Zellmembranlänge	
	DKO	Ctrl	DKO	Ctrl
0 - 0,1	1,25	1,5	37,36	35,34
0,1 – 0,2	0,59	0,73	17,58	17,14
0,2 – 0,3	0,48	0,61	14,29	14,29
0,3 – 0,4	0,29	0,39	8,79	9,05
0,4 – 0,5	0,15	0,2	4,4	4,76
0,5 – 0,6	0,11	0,3	3,3	7,14
0,6 – 0,7	0,22	0,16	6,59	3,81
0,7 – 0,8	0,07	0,12	2,2	2,86
0,8 – 0,9	0,11	0,2	3,3	4,76
0,9 – 1,0	0,07	0,04	2,2	0,95

Tab 4.4 Verteilung der Abstände der Vesikel von der Zellmembran, sowohl von Kontrollmäusen (Ctrl) als auch von Doppel-*knockout*-Mäusen (DKO).

4 Ergebnisse

Der graphische Vergleich der Daten der DKO mit denen der Ctrl:

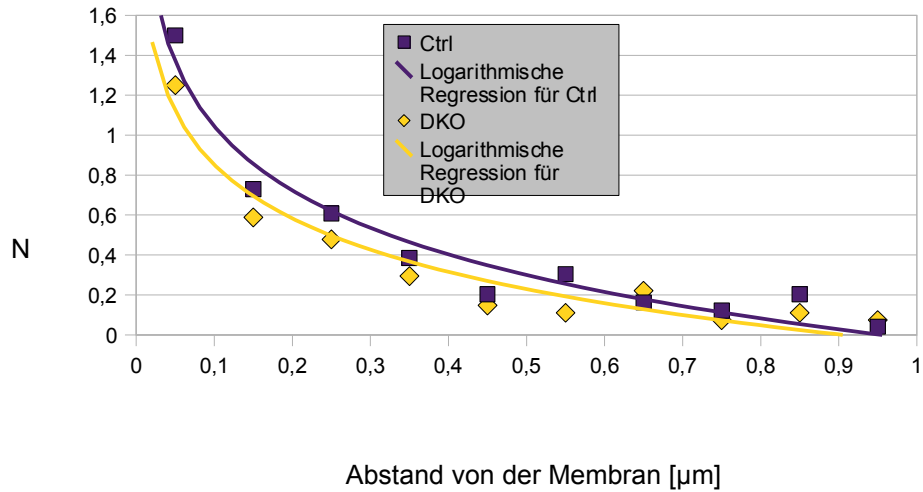


Abb. 4.7 Vergleich der Vesikelanzahlen pro μm der Zellmembranlänge in Nebennierenmarkszellen, sowohl von Kontrollmäusen(Ctrl) als auch von Doppel-*knockout*-Mäusen (DKO), N = Anzahl der Vesikel pro μm .

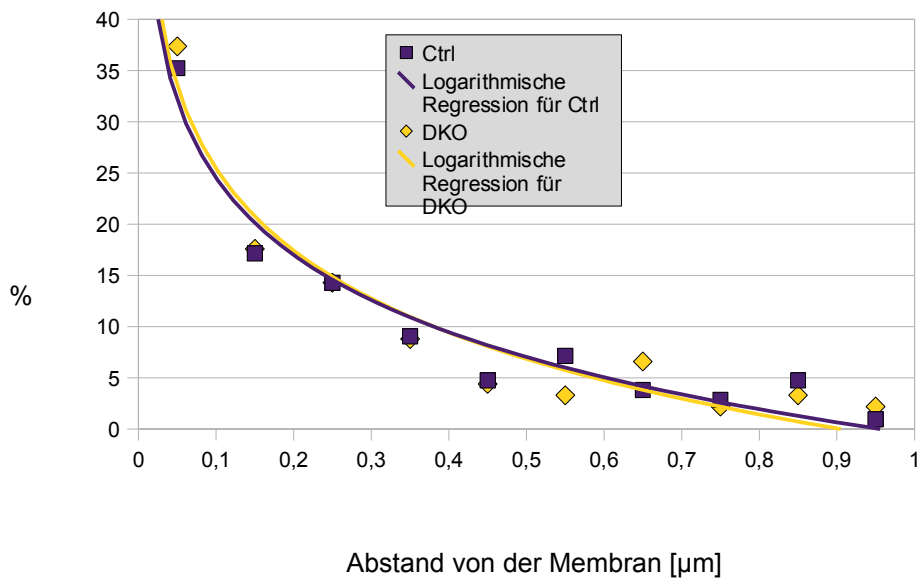


Abb. 4.8 Vergleich der prozentualen Vesikelverteilung pro μm der Zellmembranlänge in Nebennierenmarkszellen, sowohl von Kontrollmäusen(Ctrl) als auch von Doppel-*knockout*-Mäusen (DKO), % = prozentuale Verteilung pro μm .

4 Ergebnisse

Die Auswertung ergibt, dass sich der DKO von der Ctrl zwar durch die absolute Menge der Vesikel unterscheiden, dass aber bei der gewählten Unterteilung keine erheblichen Unterschiede im Verteilungsmuster der Vesikel zur Zellmembran zu beobachten sind.

In einer abschließenden Betrachtung haben wir den zu betrachtenden Abstand zur Zellmembran auf 0,5 μm verkleinert. Zunächst zeigt Abb. 4.9 die prozentuale Verteilung der Vesikel im Abstand von 50 nm zur Zellmembran.

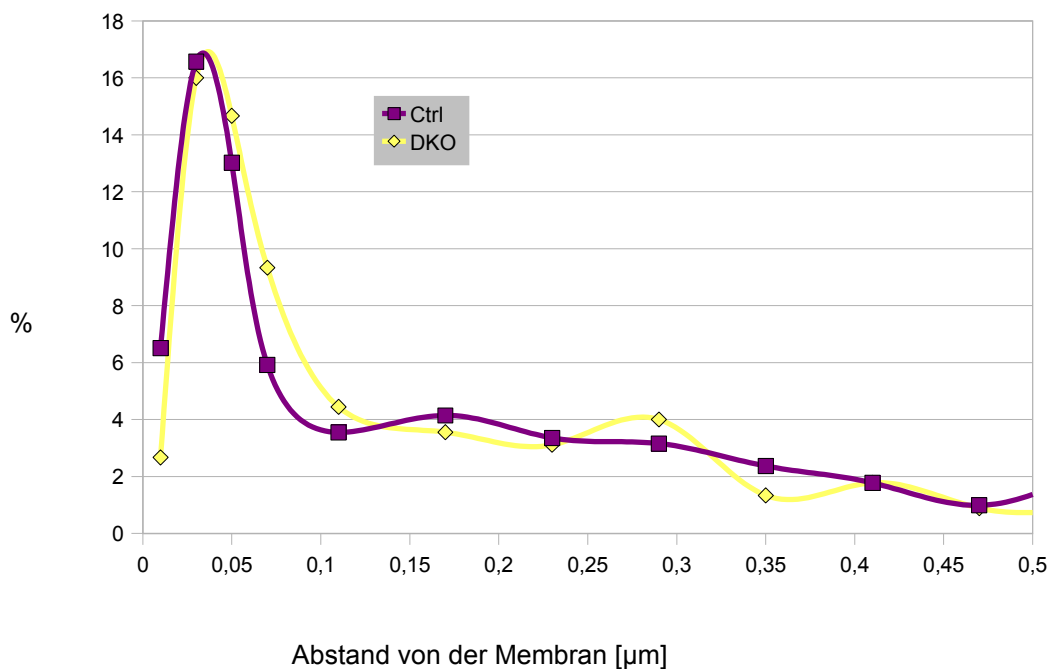


Abb. 4.9 Direkte Auftragung zum Vergleich der prozentualen Vesikelverteilung pro μm der Zellmembranlänge in Nebennierenmarkszellen, sowohl von Kontrollmäusen (Ctrl) als auch von Doppel-*knockout*-Mäusen (DKO), % = prozentuale Verteilung pro μm .

4 Ergebnisse

In Abb. 4.10 ist die direkte Auftragung der durchschnittlichen Vesikelanzahlen in einem Abstand von 0,5 μm zur Zellmembran dargestellt.

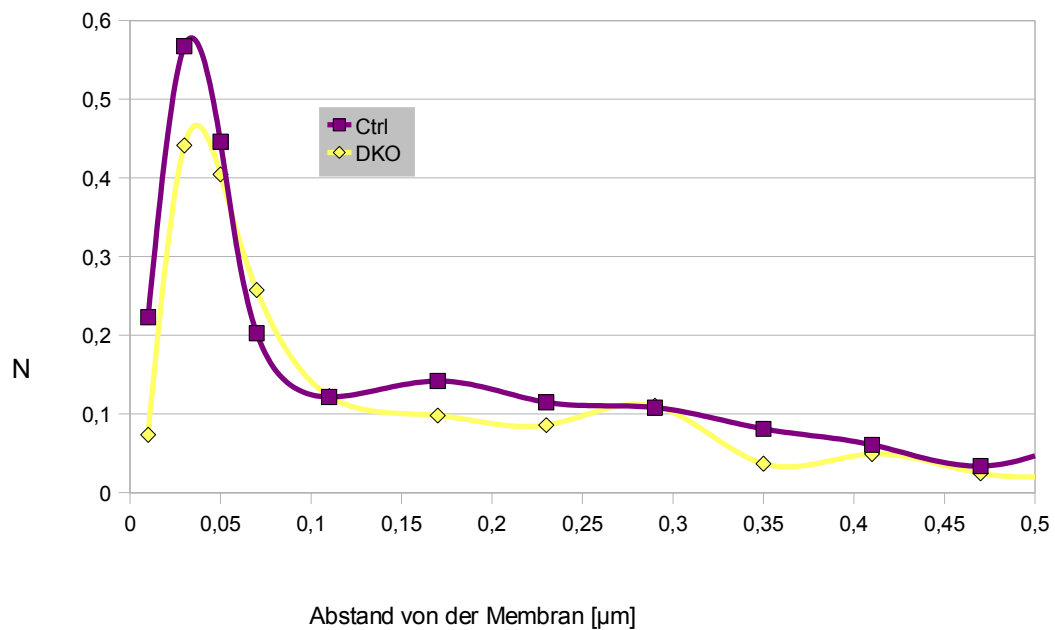


Abb. 4.10 Direkte Auftragung zum Vergleich der Vesikelanzahlen pro μm der Zellmembranlänge in Nebennierenmarkszellen, sowohl von Kontrollmäusen (Ctrl) als auch von Doppel-*knockout*-Mäusen (DKO), N = Anzahl der Vesikel pro μm .

Der Unterschied in der Verteilung der Vesikelpopulation besteht vor allem in dem, der Membran am nächsten gelegenen, Abstand von 50 nm. Es ist auffällig, dass in diesem nächsten Bereich mehr Vesikel in den Kontrollen als in den DKO lokalisiert sind.

5 Diskussion

5.1 Methodendiskussion

Arbeitsschritte wie das Züchten der Doppel-*knockout*-Mäuse, die Genotypisierung, das Anfertigen von Ultradünnschnitten für das TEM oder das standardisierte Fotografieren sind etablierte Verfahren und werden mit großer Sicherheit und Zuverlässigkeit durchgeführt. Betonen möchte ich, dass sämtliche Proben nach der gleichen Methode und unter vergleichbaren Bedingungen aufgearbeitet wurden. Den Schwerpunkt dieses Abschnittes setze ich auf die Methode der Datengewinnung.

5.1.1 Datengewinn zu Vesikeln und zum rauen endoplasmatischen Retikulum

Es gibt unterschiedliche Herangehensweisen, ultrastrukturelle Vorgänge mittels TEM zu beurteilen. Ein Verfahren beruht auf der gezielten Auswahl von Bereichen mit einer gut zu beurteilenden Ultrastruktur in einer gezielt gewählten Region (de Wit et al. 1999).

Die in dieser Arbeit angewendete Methode beruht auf einer Zuordnung stichprobenartig-fotografierter Bilder des Zytoplasmas von NNR-Zellen. Auf diese Weise wird die Ultrastruktur der zu beurteilenden Zellen wiedergespiegelt und es können Aussagen über morphologische Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen DKO und Ctrl getroffen werden.

Jedoch ist eine Einschränkung zu erwähnen. In unseren Untersuchungen wurden zunächst Regionen gesucht, die ausschließlich NNM-Gewebe enthalten. Innerhalb dieser Region fotografierten wir stichprobenartig Anschnitte des Zytoplasmas, sodass wir für das spätere Auswertungsverfahren stereologische Methoden anwenden konnten, die ebenfalls auf Stichproben beruhen. Eine gute Vergleichbarkeit zwischen

unseren Bildern erreichten wir durch die Verwendung des gleichen Dateiformats und der gleichen Vergrößerung.

Bei den Größenverhältnissen in NNM-Zellen lässt es sich nicht immer vermeiden, Strukturen zu fotografieren, die für unsere Untersuchungen keine Relevanz besitzen. In erster Linie betrifft das die Zellkerne und den extrazellulären Raum (EZR). Zellkerne nehmen bei einer 10000fachen Vergrößerung ein großes Volumen ein, in dem das zu beurteilende Zellplasma nicht vorkommt. Deshalb haben wir uns entschieden, die Zellkerne aus den Bildern herauszuschneiden und ihren Flächeninhalt vom Gesamtflächeninhalt abzuziehen. Der Anteil des EZR an den Bildflächen ist im Vergleich zum Anteil eventuell getroffener Zellkerne sehr gering. Aus praktischen Gründen (geringer Anteil der Bildfläche, hoher Aufwand) haben wir uns entschlossen die EZR-Flächen in unseren Betrachtungen zu vernachlässigen. Zudem tritt der zu erwartende Fehler in beiden zu untersuchenden Populationen, sowohl in den Ctrl als auch in den DKO, in gleichem Umfang auf.

Die in dieser Arbeit verwendeten stereologischen Methoden sind Standardmethoden. Sie setzen voraus, dass die zu betrachtenden Fragestellungen auf Stichproben beruhen. In dem Werk *quantitative stereology* von E. E. Underwood, das seit 1970 für Fragestellungen unserer Art Standard ist, werden die hier verwendeten Berechnungen beschrieben (Underwood 1970).

Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit sind dilatierte Vesikel, welche folgendermaßen definiert werden. Erreicht der geschätzte Flächeninhalt des weißen Hofes (*halo*) den gleichen oder einen größeren Flächeninhalt des zum selben DCV gehörigen schwarz-gefärbten Vesikelinhalts, sprechen wir von dilatierten Vesikeln.

Generell gibt es verschiedene Theorien zur Entstehung von solchen weißen Höfen, beziehungsweise dilatierten Vesikeln. Zum einen gibt es die Theorie, dass Zellen mit dichtem Zytoplasma und feinen Granula, sowie Zellen mit hellem Zytoplasma und Vesikel mit *halos* im NNM Adrenalin speichern (Koval et al. 2000). Laut persönlichen Aussagen von Heidi de Wit (2009) besteht die Möglichkeit, dass die dilatierten Vesikel Artefakte bei der Gewebeaufbereitung sind.

5 Diskussion

Aufgrund der Ergebnisse der in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen sollte zukünftig untersucht werden, ob es dilatierte und normale Vesikelpopulationen gibt. Und falls sich das bestätigt, ob die Ursache ein unterschiedlicher Syntheseweg oder eher ein unterschiedliches Stadium der Vesikelsynthese ist.

Bei der Beurteilung der Vesikel ist zu beachten, dass es sich bei unseren Präparaten um ca. 80 nm dicke Kappenanschnitte handeln kann. Werden nun Schnittfolgen betrachtet kann es sein, dass man die relative Vesikelanzahl überschätzt. Andererseits könnte, wenn beispielsweise nur der weiße Hof durchschnitten und der schwarz-gefärbte Vesikelinhalt nicht mehr erkannt wird, auch ein entgegengesetzter Fehler entstehen. Das Problem ließ sich praktisch nicht lösen, da die DCV keine konstante Geometrie aufweisen, was bei stereologischen Korrekturen große Unsicherheiten birgt. Nach der in dieser Arbeit gewählten Definition liegt der Zuordnung zu den Kategorien „normal“ oder „dilatiert“ ein Schätzwert zu Grunde. In der Mehrzahl der Fälle ist eine eindeutige Zuordnung zweifelsfrei möglich. Doch bei schlecht einzuschätzenden Größenverhältnissen zwischen Hofoberfläche und Vesikelinhaltsfläche muss man zwei Faktoren berücksichtigen. Erstens ist der Flächeninhalt des *cores* schwer mit dem Flächeninhalt des weißen Hofes vergleichend zu schätzen. Zweitens handelt es sich um ein zweidimensionales Abbild einer dreidimensionalen Struktur und es ist unbekannt, in welcher Ebene des Vesikelkörpers unser Schnittbild liegt.

Ausschlaggebend in dieser Arbeit ist ohnehin der Vergleich zwischen DKO-NNM-Gewebestruktur mit der Ctrl-NNM-Gewebestruktur. Da in beiden Populationen potenziell die gleichen Fehler entstehen können, ist die Vergleichbarkeit gegeben.

Die Beurteilung des rERs ist sicher möglich, da es eindeutig zu identifizieren und klar abzugrenzen ist.

Weitere Membransysteme, die in dieser Arbeit ausgewertet werden sollten, sind der Golgi-Apparat und *multivesicular bodies* (MVB). Die Analyse wurde aufgegeben, da deren Anzahl zu gering für eine statistische Auswertung war. Der Golgi-Apparat ist außerdem schwer zu analysieren, da die Grenze zwischen zuführenden,

beziehungsweise abführenden, Vesikeln fließend und damit schlecht charakterisierbar ist.

5.1.2 Abstandsanalyse

Für die Abstandsanalyse haben wir verschiedene Bedingungen gestellt. Zunächst mussten möglichst deutlich erkennbare und möglichst senkrecht geschnittene Membranabschnitte von mindestens 1 μm Länge in unseren Fotos identifiziert werden. Eine weitere Voraussetzung war, dass die ausgewertete Membran von mindestens 1 μm Zytoplasma unterlegt ist.

Diese Bedingungen schließen die Auswertung dünner Zellfortsätze aus. Erschwert wurde die Abstandsanalyse durch die Tatsache, dass wir unsere Bilder nach dem Stichprobenprinzip fotografiert haben. Das Heraussuchen gut auszuwertender Membrananschnitte konnte aufgrund unserer Methode nicht direkt beim fotografieren erfolgen, sondern musste, anhand der stichprobenartig entstandenen Bilder des Zytoplasmas, nachgeholt werden.

Die Messung der Membranlänge und die Messung der Abstände der Vesikel, welche maximal bis zu 1 μm von der Membran entfernt im Zytoplasma lokalisiert sein sollten, sind mit Hilfe eines Bildbearbeitungsprogramm erfolgt. Die Tatsache, dass Länge und Fläche manuell gemessen wurde, birgt die Gefahr kleiner Abweichungen in sich. Aber auch die im Bereich des 1- μm -Abstands befindlichen Vesikel wurden in Bezug auf ihren spezifischen Abstand zur Membran manuell vermessen. Dabei wurde der Vesikelrand des zu betrachtenden DCV durch eine Senkrechte mit der Zellmembran verbunden. Sowohl die Auswahl der geeignetsten Stelle des Vesikelrandes als auch die exakte 90°-Ausrichtung einer Senkrechten auf eine unregelmäßig geformte Zellmembran sind nicht ganz exakt.

Aber auch in diesem Fall ist der Vergleich zwischen DKO-NNM-Gewebestruktur und der Ctrl-NNM-Gewebestruktur ausschlaggebend. Da in beiden Populationen potentiell die gleichen Fehler entstehen, ist die Vergleichbarkeit gegeben.

5.2 Ergebnisdiskussion

5.2.1 Begründung der Wahl des Nebennierenmarks als Forschungsmodell für diese Arbeit

Es stellt sich die Frage, weshalb in dieser Arbeit das NNM als Forschungsmodell gewählt wurde.

Es existieren bereits Arbeiten aus unserer Abteilung, die sich mit den Auswirkungen des Fehlens der SNARE-Proteine Vti1a und Vti1b im ZNS und im PNS beschäftigen (Kunwar 2008, Kunwar et al. 2011). Die Ergebnisse dieser Arbeiten werden in den folgenden Abschnitten teilweise vorgestellt. In der vorliegenden Arbeit sollte das NNM, als weniger komplexe Struktur verglichen mit dem ZNS oder dem PNS, besser zu interpretierende Ergebnisse liefern.

Wie in der Einleitung bereits beschrieben (1.4, S. 31), ist der, bei Mäusen aus sechs Schichten aufgebauten, *Kortex* bei den DKO im Gegensatz zu den Kontrollembryonen anders aufgebaut. Es ist festzustellen, dass in Schicht-5 die Neurone in den meisten Teilen des Gehirns fehlen, die Zahl der Neurone in Schicht-6 hingegen vergrößert ist. Die Schichten 1 bis 4 wiesen keine Unterschiede auf. Die Unterschiede in den Schichten 5 und 6 konnten in Ajaya Jang Kunwars Arbeit nicht auf das fehlen von Reelin zurückgeführt werden (Kunwar 2008), welches eine Schlüsselrolle bei der architektonischen Entwicklung des ZNS von Säugetieren spielt (Jossin et al. 2003).

Auch die Rolle der radialen Glia bei der Entstehung und Migration von Neuronen wurde untersucht. Sie wurden mit B1bp und mit Nestin gefärbt. B1bp-gefärbte DKO-Gliazellen zeigten ein wabenartiges, Ctrl-Gliazellen ein normales (longitudinales) Erscheinungsbild, also morphologische Unterschiede. Die Nestin-gefärbten Zellen zeigten keine morphologischen Unterschiede, allerdings war die Dichte der Nestin-positiven Zellen in den DKO reduziert. Trotzdem bleibt zu bedenken, dass die Schichten 1 bis 4 des *Kortex* unverändert waren. Wenn die radialen Gliazellen eine

5 Diskussion

entscheidende Rolle bei der Migration der Neurone gespielt hätten, wären auch Veränderungen in den oberen Schichten zu erwarten gewesen. Eine partielle Rolle der radialen Glia bei der Migration von Neuronen konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden. Der radialen Glia wird auch eine Funktion bei der Entstehung von Neuronen zugesprochen. Unterstützt wird diese These durch die Tatsache, dass Gliazellen von DKO gegenüber Gliazellen der Kontrollembryonen am Tag 18,5 Unterschiede in der Dichte Nestin-positiver Zellen aufweisen, am Tag 14,5 jedoch noch nicht. Das impliziert, dass die Teilung der Gliazellen zwischen dem 14,5ten und dem 18,5ten Tag stattfindet. Es ist somit denkbar, dass *Vti1a/b* eine Rolle bei der symmetrischen/asymmetrischen Teilung von Progenitorzellen innehaben.

Letztendlich ist in allen oben genannten Untersuchungen gezeigt worden, dass *Vti1a/1b*-defiziente Mäuse Unterschiede in der *Kortex-Morphologie*, im Vergleich zu Mäusen der Kontrollgruppe, aufweisen. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass all diese Prozesse auf der Induktion von Wachstumsfaktoren beruhen. Diese können ihrerseits Transduktionsfaktoren induzieren, welche die Spezifität in der Entwicklung einer Zelle bedingen.

Den *Kortex* zu betrachten scheint für unsere grundlegende Forschung sehr verschlungen und ist mit sehr vielen unbekanntem oder bekannten Variablen versehen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt aus Ajaya Jang Kunwars Arbeiten ist die Diskussion über die Neurodegeneration in den peripheren Ganglien. Es war überraschend zu sehen, dass die Degeneration in den verschiedenen untersuchten Ganglien unterschiedlich stark war (Kunwar 2008, Kunwar et al. 2011). Eine Überlegung zum Entstehen dieser Unterschiede ist, dass die Entwicklung von Neuronen diverser Ganglien von unterschiedlichen Neurotrophinen (Yuen et al. 1996) und der Art der Signalübertragung von Synapse zum Zellkörper abhängt (Bronfman et al. 2007).

Im Unterschied zu Neuronen des ZNS sind die Neurone von Ganglien nahezu komplett abhängig von Faktoren, welche in der Regel vom Zielgewebe der Neurone produziert werden. Diese Zielgewebe wiederum befinden sich in einer anderen, extrazellulären Matrix (EZM) und unterliegen somit unter Umständen ganz anderen

5 Diskussion

Einflüssen und Prozessen. Die Faktoren (Neurotrophine) können aufgrund ihres Synthese- und Transportwegs oder ihrer Wirkungsweise unterschiedlich stark vom endosomalen Geschehen (somit auch von Vti1a/1b) abhängig sein.

Beispielsweise sind Neurone des *Ganglion vestibulare* hauptsächlich abhängig von BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), Neurone des *Ganglion cochleare* von NT3 (Neurotrophin-3) (Ernfors et al. 1995). 70-80% der Spinalganglienneurone benötigen NGF (*nerve growth factor*) für ihre Entwicklung (Silos-Santiago et al. 1995). Die Abhängigkeit von einem Neurotrophin kann sich im Laufe der Embryonalentwicklung auch verändern. Im Falle des *Ganglion trigeminale* gibt es einen Wechsel von einer früh-embryonalen BDNF-Abhängigkeit zu einer spät-embryonalen NGF-Abhängigkeit (Huang et al. 1999).

Neurotrophine müssen an ihrem Rezeptor an der Synapse binden und retrograde Signale über weite Strecken zum Perikaryon vermitteln, um die Genexpression zu beeinflussen. Es gibt das *wave propagation model*, das *retrograde effector model* und das *signalling endosome model* (Bronfman et al. 2007), wobei Letzteres als Erklärungsansatz für die unterschiedlich starke Degeneration von Neuronen in peripheren Ganglien bei Vti1a/1b-DKO-Mäusen dienen kann.

Demnach gibt es Beobachtungen, bei denen *growth-factor*-Rezeptoren nach Stimulation internalisiert werden und ihr Signal über Endosomen weitergeleitet wird. Gut beschrieben haben dies einige Autoren anhand von Untersuchungen an Spinalganglien, bei welchen die NGF-getriggerten Signale letztendlich durch signalisierende Endosomen transportiert werden, welche Charakteristika von FE aufweisen (Delcroix et al. 2003). Letztendlich lassen diese Ergebnisse vermuten, dass ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Neurodegeneration in peripheren Ganglien und dem Gebrauch endosomaler Transportmechanismen besteht. Bei sensiblen Ganglien, wie den Spinalganglien oder den *Ganglia trigeminale*, die überwiegend NGF-abhängig sind, gibt es starke Neurodegenerationen. Dahingegen fallen in Ganglien mit überwiegender Abhängigkeit von BDNF oder NT3 geringere Neurodegenerationen auf. Vermutlich deshalb, weil die Rolle der endosomalen Prozesse hier geringer einzuschätzen ist.

5 Diskussion

Zwei Aspekte waren bemerkenswert. Erstens hat die Degeneration in den DKO vor den bekannten ontogenetischen Zelltodperioden stattgefunden. Zweitens korreliert das Ausmaß des Zelltods nicht mit dem beschriebenen Vorhandensein unterschiedlicher Neurotrophine. Deshalb ist nicht auszuschließen, dass Prozesse in der früheren Entwicklung von Neuronen diese Degenerationen mitbedingen. Denkbar wäre beispielsweise eine frühe Unterstützung durch, nicht aus dem Zielgewebe stammende, Neurotrophine, welche gestört sein könnte. Außerdem könnten auch Störungen im Bereich des Axonwachstums vorliegen, sodass die Neurone ihr Ziel nicht erreichen und dadurch untergehen. Diese Theorie wäre auch ein Erklärungsansatz für das unterschiedliche Ausmaß der Neurodegenerationen in den verschiedenen peripheren Ganglien. Die *Ganglia vestibulare* und *cochleare* mit Neuronen mit kurzen Axonen, hätten demnach trotz des eingeschränkten Wachstums eine große Chance ihr Zielgewebe zu erreichen. Neurone mit langen Axonen, wie die sensorischen Zellen des *Ganglion trigeminale* oder der Spinalganglien, hätten demnach eher eine geringe Chance. Sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA Ebene wurde getestet, ob eine unterschiedlich starke Expression von Vti1a/1b die Ursache für die Ausprägungsunterschiede der Neurodegenerationen in den unterschiedlichen Ganglien sein kann. Dafür wurden PCR-Experimente und immunohistochemische Experimente mit Gewebe aus dem *Ganglion trigeminale* und dem *Ganglion vestibulare* von Wildtypen durchgeführt. Ab Tag E14.5 wurden in beiden Ganglien immunohistochemisch die Proteine Vti1a und Vti1b nachgewiesen. Am Tag E18.5 zeigte die RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*), dass in beiden Ganglien die für Vti1a und Vti1b kodierende mRNA nachweisbar war.

Folgern kann man, dass das Expressionslevel von Vti1a und Vti1b nicht ursächlich für die Ausprägungsunterschiede der Neurodegenerationen in den unterschiedlichen Ganglien sein kann (Kunwar 2008, Kunwar et al. 2011).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Untersuchungen im zentralen und peripheren Nervensystem sehr schwer zu interpretierende und nicht immer einwandfrei zu belegende Ergebnisse liefert. Deshalb wurde beschlossen für diese

Arbeit das NNM als Forschungsmodell zu etablieren. Von dieser Maßnahme wurden leichter zu interpretierende Ergebnisse erhofft, da die Struktur des NNM vergleichsweise weniger komplex ist, als die des ZNS oder PNS.

Aufgrund ihres ontogenetischen Ursprungs und aufgrund der Tatsache, dass es ein funktionell gut charakterisiertes System für die Untersuchung von Membran-gebundenem Transport ist, erschien uns das NNM als für eine funktionelle Deutung geeignet. Zudem handelt es sich um Neuronen-ähnliche Zellen, welche Adrenalin, Noradrenalin und Enkephalin in die Blutbahn sezernieren. Aufgrund dieser Funktion bilden sie kontinuierlich eine große Anzahl gut darzustellender Vesikel, wobei SNARE-Komplexe und vor allem die SNAREs Vti1a/1b garantiert involviert sind.

5.2.2 Datendiskussion zu Vesikeln und zum rauen endoplasmatischen Retikulum

Eine wichtige Aussage ist, dass die gesamte Vesikelanzahl in den DKO gegenüber der gesamten Vesikelanzahl in den Ctrl reduziert ist.

Vti1a ist in den retrograden Transport von den frühen/*recycling*-Endosomen zum TGN involviert (Mallard et al. 2002). Den Ergebnissen einer anderen Forschungsgruppe zu folge, kann Vti1a eine Relevanz bei dem Proteintransport vom endoplasmatischen Retikulum (ER) zur Plasmamembran nachgewiesen werden (Xu et al. 1998). Der Transport von PCTV vom ER zur cis-Seite des Golgi-Apparats wird ebenfalls durch einen Vti1a-enthaltenden SNARE-Komplex unterstützt (Siddiqi et al. 2006). Das SNARE-Protein Vti1b findet sich in einem Kernkomplex, der die Fusion der SE reguliert (Antonin et al. 2002) und in einem Komplex, der *in vitro* die Transportvorgänge von SE zu Lysosomen vermittelt (Pryor et al. 2004). In unseren DKO wurden die Gensequenzen, welche für die Proteine Vti1a/1b kodieren entfernt. Somit ist die Synthese der in den NNM Zellen produzierten SNARE-Komplexe, die Vti1a/1b als SNARE-Motive enthalten, gestört. Eine zu erwartende biologische Konsequenz aus einer gestörten Syntheserate von SNARE-Komplexen ist eine verminderte Vesikelsyntheserate, welche in dieser Arbeit nachgewiesen wurde.

5 Diskussion

Eine weitere wichtige Aussage dieser Arbeit ist, dass der Anteil an dilatierten Vesikeln pro Fläche in den DKO größer ist als in den Ctrl. Die Entstehungsmöglichkeiten dilatierter Vesikel wurden unter 5.1.1, S. 69 diskutiert.

Zum einen gibt es die Theorie, dass Zellen mit dichtem Zytoplasma und feinen Granula, sowie Zellen mit hellem Zytoplasma und Vesikeln mit weißem Hof im NNM, Adrenalin speichern (Koval et al. 2000). Laut persönlichen Aussagen von Heidi de Wit (2009) besteht die Möglichkeit, dass die dilatierten Vesikel Artefakte bei der Gewebeaufbereitung sind. Das oben genannte Untersuchungsergebnis stellt einen Hinweis dar, dass es dilatierte und normale Vesikelpopulationen gibt. Zukünftig wäre demnach zu prüfen, ob ein unterschiedlicher Syntheseweg oder eher ein unterschiedliches Stadium der Vesikelsynthese ursächlich ist.

Betrachtet man die gesamte Vesikelmembranlänge, wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass sie in den DKO, gegenüber der Kontrolle, reduziert ist.

Diese Tatsache korreliert mit der Aussage über die Gesamtvesikelanzahl. Betrachtet man jedoch nur den Anteil der Membranlänge dilatierter Vesikel, ist dieser bei den DKO größer als bei den Ctrl. Da wir nicht unterscheiden wie stark die Vesikel dilatiert sind, sondern lediglich ob sie dilatiert sind, unterstützt dieses Ergebnis die Aussage, dass der Anteil dilatierter Vesikel pro Fläche in den DKO gegenüber der Ctrl erhöht ist.

Aus unseren Ergebnissen lässt sich ebenfalls entnehmen, dass die Gesamtlänge der rER-Membran im DKO deutlich erhöht ist.

Das ist als morphologisches Korrelat zu einer erhöhten rER-Population in den DKO zu werten. Dieser Umstand könnte auf eine verstärkte Proteinbiosynthese in den Zellen des NNM von DKO hindeuten. Legt man die „Theorie der unterschiedlichen Vesikelpopulationen“ (siehe 5.1.1, S.70) zu Grunde drängt sich der Verdacht auf, dass mit einem vermehrten Auftreten von dilatierten Vesikeln in DKO eine gesteigerte rER- und Proteinbiosynthese einhergeht.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Zunahme der rER-Gesamtmembranlänge Ausdruck eines Kompensationsversuches der NNM-Zellen ist. Eine Transportstörung

bereits synthetisierter Proteine könnte beispielsweise zu einem Reiz führen, der die Zelle zur Vergrößerung der rER-Population veranlasst.

5.2.3 Abstandsanalyse

Die Auswertung ergibt, dass sich die DKO von den Ctrl zwar durch die absolute Menge der Vesikel unterscheiden, dass aber keine erheblichen Unterschiede im Verteilungsmuster der Vesikel zur Zellmembran zu beobachten sind. Einzige Ausnahme ist der, der Ziellmembran am nächsten gelegene, Bereich des 50-nm-Abstands. In diesem Bereich gibt es eine höhere Anzahl an Vesikeln in den Ctrl verglichen mit den DKO. Ursächlich hierfür könnte eine veränderte ER- und Proteinbiosynthese oder eine Modifizierung des *ready release pools* sein. Zukünftig sollte diesem Hinweis durch weiterführende Untersuchungen nachgegangen werden.

6 Zusammenfassung

Endozytose, Exozytose, das Zirkulieren von Vesikeln im Zellinneren und auch das Absprossen und Verschmelzen von Vesikeln sind Ausdruck der Membranzirkulation in eukaryoten Zellen. Für das Absprossen und Verschmelzen von Vesikeln ist eine Vielzahl diverser Proteine nötig. Zelluläre Fusionsmaschinen sind notwendig, um diese Prozesse zu kontrollieren. SNARE-Proteine sind dabei ein wesentlicher Bestandteil und das TGN/FE-SNARE Vti1a und das SE-SNARE Vti1b sind Teil der SNARE-Superfamilie. Vti1a und Vti1b sind in unterschiedlichen, aber nahezu allen Geweben verteilt. Gemeinsam kommen sie zum Beispiel in dem, in dieser Arbeit untersuchten, Nebennierenmark (NNM) vor. Obwohl viele molekulare Mechanismen bei Transportvorgängen in den unterschiedlichsten Zelltypen weitgehend untersucht wurden, ist die Bedeutung der Proteine Vti1a/1b für die unterschiedlichen Gewebe bis heute weitgehend unklar.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die biologischen Konsequenzen des Fehlens der Proteine Vti1a und Vti1b im NNM zu untersuchen. Für unsere Forschung verwendeten wir von Prof. G. Fischer von Mollard (Göttingen/Bielefeld) generierte Mäuse, denen die Gene für die SNARE-Proteine Vti1a und Vti1b fehlen. Die Doppel-*knockout*-Mäuse (DKO) sind nicht lebensfähig und sterben zwischen Embryonaltag 18,5 (E18,5) und der Geburt. Im Vorfeld gab es Untersuchungen zur Funktion von Vti1a/1b im zentralen und peripheren Nervensystem, welche schwer zu interpretierende Ergebnisse lieferten. Als weniger komplexes, allerdings ontogenetisch von der Neuralleiste stammendes und funktionell gut charakterisiertes System für die Untersuchung von Membran-gebundenem Transport schien uns das NNM als geeignetes Forschungsmodell.

Die zentrale Methode in dieser Arbeit ist das Erzeugen elektronenmikroskopischer Bilder von zufällig ausgewählten Bereichen des Zytoplasmas von NNM-Zellen. Um anschließend die NNM-Zellen von DKO- und Kontrollmäusembryonen zu vergleichen, wurden deren Nebennieren auf die gleiche Weise aufgearbeitet und

6 Zusammenfassung

gefärbt. Bei der Betrachtung der Morphologie, Lokalisation und Anzahl von Vesikeln und rauem endoplasmatischem Retikulum (rER) zeigte sich in den DKO eine reduzierte Anzahl von Vesikeln, unter welchen allerdings ein erhöhter Anteil morphologisch verändert ist. Zudem ist der Anteil an rER in den DKO erhöht. Daraus ließ sich schließen, dass entweder die rER- und Proteinbiosynthese in den DKO gesteigert sein könnte, oder dies ein Kompensationsversuch, beispielsweise einer Transportstörung synthetisierter Proteine, darstellen kann. Zusätzlich wurde der Abstand der Vesikel zur Zellmembran beurteilt. Dabei wurde festgestellt, dass zwar die absolute Menge der Vesikel im Zytoplasmabereich, der einer Zellmembran unterliegt, im DKO reduziert ist, sich aber keine relevanten Unterschiede im Verteilungsmuster der Vesikel zeigten. Nur innerhalb eines Abstandes von 50 nm von der Zellmembran war die Vesikelanzahl im DKO reduziert. Dies deutet ebenfalls auf eine veränderte rER- und Proteinbiosynthese, oder aber auch auf eine Modifizierung des *ready release pools* hin.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Verlust der Proteine Vti1a/1b, neben vielen dramatischen Auswirkungen in anderen Geweben, die molekularen Mechanismen, die Struktur und die Funktionsweise des NNM einschränkt. In weiteren wissenschaftlichen Untersuchungen müssen die präzisen molekularen und zellbiologischen Mechanismen erforscht werden, welche durch das Fehlen von Vti1a/1b eingeschränkt werden und welche zu den hier beschriebenen morphologischen Veränderungen führen. Es ist denkbar, dass sich Hinweise zur Pathogenese neurologischer oder psychiatrischer Erkrankungen ergeben, deren Ursache bis heute ungeklärt ist, wobei der Funktionsverlust bestimmter Transportwege innerhalb betroffener Zelltypen nachgewiesen wurde. Ein Beispiel dafür wäre die Alzheimer-Erkrankung.

7 Anhang

Abbildungen

Abb. 1.1 Modell des neuronalen SNARE-Komplexes.....	21
Abb. 1.2 Molekulares Modell der neuronalen Vesikelexozytose.....	23
Abb. 1.3 Subzelluläre Verteilung der Säugetier- SNAREs.....	25
Abb. 4.1 Elektronenmikroskopisches Foto des Zytoplasms chromaffiner Nebennierenmarkszellen einer DKO-Maus (Doppel- <i>knockout</i> -Maus).....	53
Abb. 4.2 Anzahl der Vesikel pro μm^2 Zytoplasma der Nebennierenmarkszelle.....	56
Abb. 4.3 Zytoplasma einer Nebennierenmarkszelle mit Messraster überlegt.....	57
Abb. 4.4 Zytoplasma einer Nebennierenmarkszelle mit Messraster überlegt und mit, für die Berechnung, markierten Zellstrukturen.....	58
Abb. 4.5 Membranlänge der Vesikelarten pro μm Zellmembran der Nebennierenmarkszellen.....	60
Abb.4.6 Gesamtlänge der rER-Membranen pro μm Zellmembran der Nebennierenmarkszellen.....	62
Abb. 4.7 Vergleich der Vesikelanzahlen pro μm der Zellmembranlänge in Nebennierenmarkszellen.....	65
Abb. 4.8 Vergleich der prozentualen Vesikelverteilung pro μm der Zellmembranlänge in Nebennierenmarkszellen.....	65
Abb. 4.9 Direkte Auftragung zum Vergleich der prozentualen Vesikelverteilung pro μm der Zellmembranlänge in Nebennierenmarkszellen,.....	66
Abb. 4.10 Direkte Auftragung zum Vergleich der Vesikelanzahlen pro μm der Zellmembranlänge in Nebennierenmarkszellen.....	67

Tabellenverzeichnis

Tab. 4.1 Anzahl der Vesikel pro μm^2 Zytoplasma der Nebennierenmarkszellen.....	55
Tab. 4.2 Membranlänge der Vesikelarten pro μm Zellmembran der Nebennierenmarkszellen.....	59
Tab 4.3 Membranlänge rER pro μm Zellmembran der Nebennierenmarkszellen.....	61
Tab 4.4 Verteilung der Abstände der Vesikel von der Zellmembran,	64

8 Abkürzungen

α -SNAP	Synaptosomen-assoziiertes Protein α
ATP	Adenosintriphosphat
BDMA	Benzyl dimethylamin
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
CCV	Clathrin-ummantelte Vesikel
Ctrl	Kontrollmäus(e)
DCV	<i>dense core vesicle(s)</i>
DDSA	2-Dodeceny succini acid
D.E.R.	Diglycidylether
DKO	Doppel- <i>knockout</i> -Mäus(e)
DMAE	Dimethylaminoethanol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E18,5	Embryonaltag 18,5
E-cups	Eppendorfgefäße
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EM	Elektronenmikroskop
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>ER-associated degradation pathway</i>

8 Abkürzungen

EZR	Extrazellularraum
FE	frühe(s) Endosom(en)
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GLUT	Glukosetransporter
GTP	Guanintriphosphat
kDA	Kilodalton
KO	<i>knockout</i>
LA	Länge pro Fläche
µm	Mikrometer
ml	Milliliter
ML	Membranlänge
MNA	Methylnadicanhydrid
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MTOC	<i>microtubule organizing centre</i>
MVB	<i>multivesicular bodies</i>
N	Vesikelanzahl pro µm
NGF	<i>nerve growth factor</i>
nm	Nanometer
NN	Nebennieren
NNM	Nebennierenmark
NSA	Nonenylsuccinicanhydrid
NSF	<i>N-ethylmaleimide sensitive fusion protein</i>

8 Abkürzungen

NT3	Neurotrophin 3
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PCTV	Prechylomykronentransportvesikel
PNS	peripheres Nervensystem
Rab Protein	<i>Ras related in brain protein</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
RE	<i>recycling</i> -Endosomen
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
SE	späte(s) Endosom(en)
SG	sekretorische Granula
SL	sekretorische(s) Lysosom(en)
SM Protein	Sec1/Munc-18-verwandtes Protein
SN	<i>Substantia nigra</i>
SNAP	<i>soluble NSF attachment protein</i>
SNARE	<i>soluble NSF attachment protein receptor</i>
SRP	<i>signal recognition particle</i>
SV	sekretorische Vesikel
TAE Puffer	Tris-Azetat-EDTA-Puffergemisch
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
VAMP	<i>vesicle associated membrane protein</i>
VCD	Venylcyclohexen

8 Abkürzungen

VS	Vesikelanzahl pro μm^2
VTA	ventrale tegmentale Region
ZNS	zentrales Nervensystem

9 Literaturverzeichnis

Advani RJ, Bar HR, Bock JB, Chaos DS, Doung YC, Prekeris R, Yoo JS und Scheller RH (1998): Seven novel mammalian SNARE proteins localize to distinct membrane compartments. *J Biol Chem* 273(17), 10317-10324

Advani RJ, Yang B, Prekeris R, Lee KC, Klumperman J und Scheller RH (1999): VAMP-7 mediates vesicular transport from endosomes to lysosomes. *J Cell Biol* 146(4), 765-76

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD: Molecular Biology of the cell. 4. Auflage; UK: Garland Publishing, Inc., New York, NY, USA, und London 1994

Antonin W, Riedel D und von Mollard GF (2000 a): The SNARE Vti1a-beta is localized to small synaptic vesicles and participates in a novel SNARE complex. *J Neurosci* 20(15), 5724-32

Antonin W, Holroyd C, Tikkanen R, Höning S und Jahn R (2000 b): The R-SNARE Endobrevin/VAMP-8 Mediates Homotypic Fusion of Early Endosomes and Late Endosomes. *Mol Biol Cell* 11(10), 3289–3298

Antonin W, Holroyd C, Fasshauer D, Pabst S, von Mollard GF und Jahn R (2000 c): A SNARE complex mediating fusion of late endosomes defines conserved properties of SNARE structure and function. *EMBO J* 19(23), 6453-64

9 Literaturverzeichnis

Antonin W, Fasshauer D, Becker S, Jahn R und Schneider TR (2002): Crystal structure of the endosomal SNARE complex reveals common structural principles of all SNAREs. *Nat Struct Mol Biol* 9(2), 107-11

Atlashkin V, Kreykenbohm V, Eskelinen EL, Wenzel D, Fayyazi A und von Mollard GF (2003): Deletion of the SNARE vti1b in mice results in the loss of a single SNARE partner, syntaxin 8. *Mol Cell Biol* 23(15), 5198-207

Barile M, Pisitkun T, Yu MJ, Chou CL, Verbalis MJ, Shen RF und Knepper MA (2005): Large scale protein identification in intracellular aquaporin-2 vesicles from renal inner medullary collecting duct. *Mol Cell Proteomics* 4(8), 1095-106

Barlowe C (1995): COPII: a membrane coat that forms endoplasmic reticulum-derived vesicles. *FEBS Letters* 369(1), 93-96

Bauerfeind und Huttner WB (1993): Biogenesis of constitutive secretory vesicles, secretory granules and synaptic vesicles. *Curr Opin Cell Biol* 5(4), 628-635

Bennett, MK (1997): Ca²⁺ and the regulation of neurotransmitter secretion. *Curr Opin Neurobiol* 7(3), 316-322

Bennett MK, Calakos N und Scheller RH (1992): Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* 257(5067), 255-9

9 Literaturverzeichnis

Block MR, Glicks BS, Wilcox CA, Wieland FT und Rothman JE (1988): Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(21), 7852-6

Bock JB, Klumperman J, Davanger S und Scheller RH (1997): Syntaxin 6 functions in trans-Golgi network vesicle trafficking. *Mol Biol Cell* 8(7), 1261-1271

Bock JB, Matern HT, Peden AA und Scheller RH (2001): A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* 409(6822), 839-41

Bonifacino JS und Lippincott-Schwartz J (2003): Coat proteins: shaping membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(5), 409-14

Bose A, Guilherme A, Huang S, Hubbard AC, Lane CR, Soriano NA und Czech MP (2005): The v-SNARE Vti1a regulates insulin-stimulated glucose transport and Acrp30 secretion in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 280(44), 36946-51

Brandhorst D, Zwillig D, Rizzoli SO, Lippert U, Lang T und Jahn R (2006): Homotypic fusion of early endosomes: SNAREs do not determine fusion specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(8), 2701-6

Bright N, Reaves BJ, Mullock BM und Luzio LP (1997): Dense core lysosomes can fuse with late endosomes and are re-formed from the resultant hybrid organelles. *J Cell Sci* 110(17), 2027-2040

Bronfman FC, Escudero CA, Weis J und Kruttgen A (2007): Endosomal transport of neurotrophins: roles in signaling and neurodegenerative diseases. *Dev Neurobiol* 67(9), 1183-1203

Burkhardt JK, Hester S, Lapham CK und Argon Y (1990): The lytic granules of natural killer cells are dual-function organelles combining secretory and pre-lysosomal compartments. *J Cell Biol* 111(6 Pt 1), 2327-40

Chen YA und Scheller RH (2001): SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(2), 98-106

Chidgey MA (1993): Protein targeting to dense-core secretory granules. *Bioessays* 15(5), 317-21

Christoforidis S, McBride HM, Burgoyne RD und Zerial M (1999): The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* 397(6720), 621-5

Clary DO, Griff IC und Rothman JE (1990): SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell* 61(4), 709-21

Craig EL, Frajola WJ und Greider MH (1962): An embedding technique for electron microscopy using EPON 812. *J Cell Biol* 12, 190-194

Crivellato E, Nico B und Ribatti D (2008): The chromaffin vesicle: advances in understanding the composition of a versatile, multifunctional secretory organelle. *Anat Rec* 291(12), 1587-1602

9 Literaturverzeichnis

Daro E, van der Sluijs P, Galli T und Mellman I (1996): Rab4 and cellubrevin define different early endosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(18), 9559-64

Delcroix J, Valletta JS, Wu C, Hunt SJ, Kowal AS und Mobley WC (2003): NGF signaling in sensory neurons: evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals. *Neuron* 39(1), 69-84

de Wit H, Lichtenstein Y, Geuze HJ, Kelly RB, van der Sluijs P und Klumperman J (1999): Synaptic Vesicles Form by Budding from Tubular Extensions of Sorting Endosomes in PC12 Cells. *Mol Biol Cell* 10(12), 4163-4176

de Wit H, Amsterdam: Mündliche Mitteilung 2009

Dietrich LEP, Boeddinghaus C, LaGrassa TJ und Ungermann C (2003): Control of eukaryotic membrane fusion by N-terminal domains of SNARE proteins. *Biochim Biophys Acta* 1641(2-3), 111-119

Duden R (2003): ER-to-Golgi transport: COP I and COP II function (Review). *Mol Membr Biol* 20(3) 197-207

Dunn K und Maxfield F (1992): Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting endosomes. *J Cell Biol* 117(2), 301-310

Ellgaard L, Helenius A und Molinari M (1999): Setting the Standards: Quality Control in the Secretory Pathway. *Science* 286(5446), 1882-1888

9 Literaturverzeichnis

Ernfors P, van de Water T, Loring J und Jaenisch R (1995): Complementary roles of BDNF and NT-3 in vestibular and auditory development. *Neuron* 14(6), 1153-1164

Fasshauer D, Otto H, Eliason WK, Jahn R und Brünger AT (1997): Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation. *J Biol Chem* 272(44), 28036-41

Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT und Jahn R (1998): Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(26), 15781-6

Fasshauer D, Antonin W, Mergittai M, Pabst S und Jahn R (1999): Mixed and non-cognate SNARE complexes. Characterization of assembly and biophysical properties. *J Biol Chem* 274(22), 15440-6

Felder S, Miller K, Moehren G, Ullrich A, Schlessinger J und Hopkins CR (1990): Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body. *Cell* 61(4), 623-34

Feng Y, Press B und Wandinger-Ness A (1995): Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J Cell Biol* 131(6 Pt 1), 1435-1452

Geuze HJ, Slot JW, Strous GJ, Lodish HF und Schwartz AL (1983): Intracellular site of asialoglycoprotein receptor-ligand uncoupling: double-label immunoelectron microscopy during receptor-mediated endocytosis. *Cell* 32(1), 277-287

Geuze HJ, Slot JW, Strous GJ, Peppard J, von Figura K, Hasilik A und Schwartz AL (1984): Intracellular receptor sorting during endocytosis: comparative immunoelectron microscopy of multiple receptors in rat liver. *Cell* 37(1), 195-204

Grabner CP, Price SD, Lysakowski A und Fox AP (2005): Mouse chromaffin cells have two populations of dense core vesicles. *J Neurophysiol* 94(3), 2093-2104

Gruenberg J und Maxfield FR (1995): Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol* 7(4), 552-563

Haigler HT, McKanna JA und Cohen S (1979): Direct visualization of the binding and internalization of a ferritin conjugate of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. *J Cell Biol* 81(2), 382-395

Hammond C und Helenius A (1994): Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J Cell Biol* 126(1), 41-52

Hanson PI, Roth R, Morisaki H, Jahn R und Heuser JE (1997): Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell* 90(3), 523-35

Hayashi T, McMahon H, Yamasaki S, Binz T, Hata Y, Südhof TC und Niemann H (1994): Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J* 13(21), 5051-5061

Hong W (2005): SNAREs and traffic. *Biochim Biophys Acta* 1744(3), 493-517

9 Literaturverzeichnis

Hopkins CR (1983): Intracellular routing of transferrin and transferrin receptors in epidermoid carcinoma A431 cells. *Cell* 35(1), 321-330

Hosaka M, Hammer RE und Südhof TC (1999): A phospho-switch controls the dynamic association of synapsins with synaptic vesicles. *Neuron* 24(2), 377-87

Huang EJ, Zang K, Schmidt A, Saulys A, Xiang M und Reichardt LF (1999): POU domain factor Brn-3a controls the differentiation and survival of trigeminal neurons by regulating Trk receptor expression. *Development* 126(13), 2869-2882

Jahn R und Südhof TC (1999): Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem* 68, 863-911

Jahn R und Grubmüller H (2002): Membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol* 14(4), 488-95

Jahn R und Scheller RH (2006): SNAREs-engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(9), 631-43

Jahn R, Lang T und Südhof TC (2003): Membrane fusion. *Cell* 112(4), 519-33

Jossin Y, Bar I, Ignatove N, Tissir F, de Rouvroit CL und Goffinet AM (2003): The reelin signaling pathway: some recent developments. *Cereb Cortex* 13(6), 627-633

Kanaseki T, Kawasaki K, Murata M, Ikeuchi Y und Ohnishi S (1997): Structural Features of Membrane Fusion between Influenza Virus and Liposome as Revealed by Quick-Freezing Electron Microscopy. *J Cell Biol* 137(5), 1041-1056

Kasper D, Dittmer F, von Figura K und Pohlmann R (1996): Neither type of mannose 6-phosphate receptor is sufficient for targeting of lysosomal enzymes along intracellular routes. *J Cell Biol* 134(3), 615 -623

Katzmann DJ, Odorizzi G und Emr SD (2002): Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(12), 893-905

Keenan RJ, Freymann DM, Stroud RM und Walter P (2001): The signal recognition particle. *Annu Rev Biochem* 70, 755-775

Kloepper TH, Kienle CN und Fasshauer D (2007): An Elaborate Classification of SNARE Proteins Sheds Light on the Conservation of the Eukaryotic Endomembrane System. *Mol Biol Cell* 18(9), 3463-3471

Kloepper TH, Kienle CN und Fasshauer D (2008): SNAREing the basis of multicellularity: consequences of protein family expansion during evolution. *Mol Biol Evol* 25(9), 2055-2068

Kornfeld S und Mellman I (1989): The Biogenesis of Lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* 5(1), 483-525

Koval LM Yavorskaya EN und Lukyanetz EA (2000): Ultrastructural features of medullary chromaffin cell cultures: *Neuroscience* 96(3), 639-649

9 Literaturverzeichnis

Kozlov MM, Leikin SL, Chernomordik LV, Markin VS und Chizmadzhev YA (1989): Stalk mechanism of vesicle fusion. Intermixing of aqueous contents. *Eur Biophys J* 17(3), 121-129

Kreykenbohm V, Wenzel D, Antonin W, Atalachkine V, von Mollard GF (2002): The SNAREs vti1a and vti1b have distinct localization and SNARE complex partners. *Eur J Cell Biol* 81(5), 273-80

Kunwar AJ : Functions of Vti1a and Vti1b in the Development of the Mouse Nervous System: Evidence from Double Knockout Mice. *Math.-Naturwiss. Diss.* Göttingen 2008

Kunwar AJ, Rickmann M, Backofen B, Browski MB, Rosenbusch J, Schöning S, Fleischmann T, Krieglstein K und von Mollard GF (2011): Lack of the endosomal SNAREs vti1a and vti1b led to significant impairments in neuronal development. *Proc Natl Acad Sci* 108(6), 2575 -2580

Lin RC und Scheller RH (1997): Structural organization of the synaptic exocytosis core complex. *Neuron* 19(5), 1087-1094

Lin RC und Scheller RH (2000): Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 19-49

Luzio JP, Poupon V, Lindsay MR, Mullock BM, Piper RC, Pryor PR (2003): Membrane dynamics and the biogenesis of lysosomes. *Mol Membr Biol* 20(2), 141-54

Mallard F, Antony C, Tenza D, Salamero J, Goud B und Johannes L (1998): Direct Pathway from Early/Recycling Endosomes to the Golgi Apparatus Revealed through the Study of Shiga Toxin B-fragment Transport. *J Cell Biol* 143(4), 973-990

Mallard F, Tang BL, Galli T, Tenza D, Saint-Pol A, Yue X, Antony C, Hong W, Goud B und Johannes L (2002): Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *J Cell Biol* 156(4), 653-64

Markin VS, Kozlov MM und Borovjagin VL (1984): On the theory of membrane fusion. The stalk mechanism. *Gen Physiol Biophys* 3(5), 361-77

McBride HM, Rybin V, Murphy C, Giner A, Teasdale R und Zerial M (1999): Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell* 98(3), 377-86

Mellman I (1996): Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 575-625

Meusser B, Hirsch C, Jarosch E und Sommer T (2005): ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol* 7(8), 766-772

Mills IG, Urbé S und Clague MJ (2001): Relationships between EEA1 binding partners and their role in endosome fusion. *J Cell Sci* 114(Pt 10), 1959-65

Mullis KB und Faloona FA (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350

9 Literaturverzeichnis

Mullock BM, Smith CW, Ihrke G, Bright NA, Lindsay M, Parkinson EJ, Brooks DA, Parton RG, Lames DE, Luzio JP et al. (2000): Syntaxin 7 is localized to late endosome compartments, associates with Vamp 8, and is required for late endosome-lysosome fusion. *Mol Biol Cell* 11(9), 3137-53

Murray RZ, Wylie FG, Khromykh T, Hume DA und Stow JL (2005): Syntaxin 6 and Vti1b form a novel SNARE complex, which is up-regulated in activated macrophages to facilitate exocytosis of tumor necrosis Factor-alpha. *J Biol Chem* 280(11), 10478-83

Ohkuma S, Moriyama Y und Takano T (1982): Identification and characterization of a proton pump on lysosomes by fluorescein-isothiocyanate-dextran fluorescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 79(9), 2758-62

Oyler GA, Higgin GA, Hart RA, Battenberg E, Billingsley M, Bloo FE und Wilson MC (1989): The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J Cell Biol* 109(6 Pt 1), 3039-52

Palade GE (1975): Intracellular aspects of the process of protein secretion. *Science* 189, 347-358

Pevsner J, Hsu SC, Braun JE, Calakos N, Ting AE, Bennett MK und Scheller RH (1994): Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex. *Neuron* 13(2), 353-361

Piper RC und Luzio JP (2001): Late Endosomes: Sorting and Partitioning in Multivesicular Bodies. *Traffic* 2(9), 612-621

Poirier MA, Hao JC, Malkus PN, Chan C, Moore MF, Kings DS und Bennett MK (1998 a): Protease resistance of syntaxin.SNAP-25.VAMP complexes. Implications for assembly and structure. *J Biol Chem* 273(18), 11370-11377

Poirier MA, Xiao W, Macosko JC, Chan C, Shin YK und Bennett MK (1998 b): The synaptic SNARE complex is a parallel four-stranded helical bundle. *Nat Struct Mol Biol* 5(9), 765-769

Prekeris R, Klumperman J, Chen YA und Scheller RH (1998): Syntaxin 13 mediates cycling of plasma membrane proteins via tubulovesicular recycling endosomes. *J Cell Biol* 143(4), 957-71

Prekeris R, Klumperman J, Chen YA und Scheller RH (1999): Differential roles of syntaxin 7 and syntaxin 8 in endosomal trafficking. *Mol Biol Cell* 10(11), 3891-908

Pryer NK, Wuestehube LJ und Schekman R (1992): Vesicle-mediated protein sorting. *Ann Rev Biochem* 61, 471-516

Pryor PR, Mullock M, Bright NA, Lindsay MR, Gray SR, Richardson SC, Steward A, James DE, Piper RC et al. (2004): Combinatorial SNARE complexes with VAMP7 or VAMP8 define different late endocytic fusion events. *EMBO* 5(6), 590-595

Richardson KC, Jarett L und Finke EH (1960): Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol* 35, 313-323

Rizo J und Südhof TC (2002): Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat Rev Neurosci* 3(8), 641-653

Robinson LJ und Martin TF (1998): Docking and fusion in neurosecretion. *Curr Opin Cell Biol* 10(4), 483-92

Schmoranzer J, Goulian M, Axelrod D und Simon SM (2000): Imaging Constitutive Exocytosis with Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. *J Cell Biol* 149(1), 23-32

Sehgal PB, Mukhopadhyay S, Xu F, Patel K und Shah M (2007): Dysfunction of Golgi tethers, SNAREs, and SNAPs in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292(6), L1526-42

Shewan AM, van Dam EM, Martin S, Luen TB, Hong W, Bryant NJ und James DE (2003): GLUT4 recycles via a trans-Golgi network (TGN) subdomain enriched in Syntaxins 6 and 16 but not TGN38: involvement of an acidic targeting motif. *Mol Biol Cell* 14(3), 973-86

Siddiqi SA, Siddiqi S, Mahan J, Peggs K, Gorelick FS und Mansbach CM 2nd (2006): The identification of a novel endoplasmic reticulum to Golgi SNARE complex used by the prechylomicron transport vesicle. *J Biol Chem* 281(30), 20974-82

Siegel DP (1993): Energetics of intermediates in membrane fusion: comparison of stalk and inverted micellar intermediate mechanisms. *Biophys J* 65(5), 2124-2140

Siegel DP (1999): The modified stalk mechanism of lamellar/inverted phase transitions and its implications for membrane fusion. *Biophys J* 76(1 Pt 1), 291-313

9 Literaturverzeichnis

Silos-Santiago I, Molliver DC, Ozaki S, Smeyne RJ, Fagan AM, Barbacid M und Snider WD (1995): Non-TrkA-expressing small DRG neurons are lost in TrkA deficient mice. *J Neurosci* 15(9), 5929-5942

Söllner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH und Rothman JE (1993 a): A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75(3), 409-418

Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P und Rothman JE (1993 b): SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362(6418), 318-24

Spurr AR (1969): A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Struct Res* 26(1), 31-43

Stinchcombe J, Bossi G und Griffiths GM (2004): Linking albinism and immunity: the secrets of secretory lysosomes. *Science* 305(5680), 55-9

Stoorvogel W, Strous GJ, Geuze HJ, Oorschot V und Schwartz AL (1991): Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell* 65, 417-427

Subramaniam VN, Loh E, Horstmann H, Habermann A, Xu Y, Coe J, Griffiths G und Hong W (2000): Preferential association of syntaxin 8 with the early endosome. *J Cell Sci* 113 (Pt 6), 997-1008

Südhof TC (1995): The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375(6533), 645-653

Südhof TC (2004): The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27, 509-547

Sun W, Yan Q, Vida TA, und Bean AJ (2003): Hrs regulates early endosome fusion by inhibiting formation of an endosomal SNARE complex. *J Cell Biol* 162(1), 125-37

Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R und Brunger AT (1998): Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395(6700), 347-53

Tang BL, Low DY, Lee SS, Tan AE und Hong W (1998): Molecular cloning and localization of human syntaxin 16, a member of the syntaxin family of SNARE proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 242(3), 673-9

Tooze SA (1998): Biogenesis of secretory granules in the trans-Golgi network of neuroendocrine and endocrine cells. *Biochim Biophys Acta* 1404(1-2), 231-244

Tooze SA, Flatmark T, Tooze J und Huttner WB (1991): Characterization of the immature secretory granule, an intermediate in granule biogenesis. *J Cell Biol* 115(6), S.1491-1503.

Trimble WS, Cowan DM und Scheller RH (1988): VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(12), 4538-4542

Underwood EE: Quantitative Stereology; hrsg. v. Underwood EE, Addison Wesley Publishing Company, Reading, Massachusetts 1970, 23-47

9 Literaturverzeichnis

Ungar D und Hughson FM (2003): SNARE protein structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 493-517

van Deurs B, Holm PK, Kayser L, Sandvig K und Hansen SH (1993): Multivesicular bodies in HEp-2 cells are maturing endosomes. *Eur J Cell Biol* 61(2), 208-224

von Mollard GF und Stevens TH (1998): A human homolog can functionally replace the yeast vesicle-associated SNARE Vti1p in two vesicle transport pathways. *J Biol Chem* 273(5), 2624-30

von Mollard GF, Nothwehr SF und Stevens TH (1997): The yeast v-SNARE Vti1p mediates two vesicle transport pathways through interactions with the t-SNAREs Sed5p and Pep12p. *J Cell Biol* 137(7), 1511-1524

Watson RT und Pessin JE (2000): Functional cooperation of two independent targeting domains in syntaxin 6 is required for its efficient localization in the trans-golgi network of 3T3L1 adipocytes. *J Biol Chem* 275(2), 1261-8

Weimbs T, Low SH, Chapin SJ, Mostov KE, Buchner P und Hofmann K (1997): A conserved domain is present in different families of vesicular fusion proteins: a new superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(7), 3046-51

Xu Y, Wong SH, Tang BL, Subramaniam VN, Zhang T und Hong W (1998): A 29-kilodalton Golgi soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (Vti1-rp2) implicated in protein trafficking in the secretory pathway. *J Biol Chem* 273(34), 21783-9

9 Literaturverzeichnis

Xu Y, Martin S, James DE und Hong W (2002): GS15 forms a SNARE complex with syntaxin 5, GS28, and Ykt6 and is implicated in traffic in the early cisternae of the Golgi apparatus. *Mol Biol Cell* 13(10), 3493-507

Yamashiro DJ, Tycko B, Fluss SR und Maxfield FR (1984): Segregation of transferrin to a mildly acidic (pH 6.5) para-Golgi compartment in the recycling pathway *Cell* 37(3), 789-800

Yang B, Gonzales LJr, Prekeris R, Steegmaier M, Advani RJ und Scheller RH (1999): SNARE Interactions Are Not Selective. *J Biol Chem* 274(9), 5649 -5653

Yuen EC, Howe CL, Li Y, Holtzman DM und Mobley WC (1996): Nerve growth factor and the neurotrophic factor hypothesis *Brain Dev* 18(5), 362-368

Danksagung

Die Vorliegende Dissertation wurde in der Abteilung für Neuroanatomie im Zentrum Anatomie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen unter der wissenschaftlichen Leitung von PD. Dr. med. Michael Rickmann verfasst.

Ganz besonders danke ich dir, Michael, für das interessante Thema, für deine unzähligen Ideen, Ratschläge, die Diskussionen mit dir, deine stetige Hilfsbereitschaft, dein Vertrauen, die Korrektur meiner Dissertation und die Möglichkeit zu publizieren, Studentenunterricht zu geben und so früh im Studium zu promovieren.

Danken möchte ich auch Dr. rer. nat. Ajaya J. Kunwar für die Einführung in die Genotypisierung, die Bereitstellung von Literatur und Forschungsergebnissen und die Präparation der Nebennieren. Frau Prof. Dr. Kerstin Kriegelstein möchte ich sehr herzlich für die Unterstützung zu Beginn dieser Arbeit danken. Ohne sie hätte es diese Arbeit wohl nicht gegeben. Bei Frau Prof. Gabriele Fischer von Mollard möchte ich mich für den unkomplizierten Austausch von Material und Informationen bedanken. Auch Frau *Assistant Prof.* Heidi de Wit danke ich für die Bereitstellung wichtiger Informationen und Forschungsergebnisse.

Herrn Prof. Dr. Jochen Staiger möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Arbeit in seinem Institut weiterzuführen.

Bei allen meinen jetzigen und ehemaligen Labor- und ArbeitskollegInnen möchte ich mich für die angenehme Atmosphäre im Team bedanken.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich auch Frau Simona Hellbach aussprechen. Ohne deine Geduld und Hilfe wäre vieles nicht so reibungslos verlaufen.

Für das Probelesen und die zahlreiche Kritik danke ich meiner Schwester Carolin Fleischmann. Meinen Eltern möchte ich für die großartige Möglichkeit danken studieren zu können.

Publikationen

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?>

term=Lack+of+the+endosomal+SNAREs+vti1a+and+vti1b+led+to+significant+impairments+in+neuronal+development

Lebenslauf

Mein Name ist Thomas Fleischmann. Geboren wurde ich am 17.12.1984 in Erfurt. Ich bin 27 Jahre alt, ledig und besitze die deutsche Staatsangehörigkeit. Zurzeit wohne ich im Steinweg 25 in Göttingen.

Mein Vater Udo Fleischmann, geboren am 18.05.1959 in Rostock, arbeitet als Apotheker und lebt in Berlin. Meine Mutter Bettina Fleischmann, geboren am 27.04.1960 mit dem Namen Rödel in Cottbus, arbeitet als Apothekerin und lebt in Burg/Spreewald. Desweiteren habe ich eine 30jährige und eine 33jährige Schwester. Carolin Fleischmann lebt und arbeitet als Kommunikationswissenschaftlerin (M.A.) in Berlin. Isabel Mayer, geborene Fleischmann, ist Apothekerin und lebt in München.

Mein schulischer Werdegang begann 1991 an der Goethe-Grundschule Welzow. Darauf folgend besuchte ich von 1997 bis 2001 das Gymnasium der Stadt Welzow. Von 2001 bis 2004 erlangte ich dann mein Abitur am Erwin-Strittmatter-Gymnasium in Spremberg. Meinen Zivildienst leistete ich im Carl-Thiem-Klinikum in Cottbus vom 01.09.2004 bis zum 30.06.2005. Nach unterschiedlichen Praktika und Gelegenheitsarbeiten im Gesundheitswesen habe ich damals beschlossen, mich zum Wintersemester 2005/06 zum Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen einzuschreiben. Dort studiere ich auch zur Zeit und werde die Approbation voraussichtlich im Frühjahr 2013 erlangen.

Untrennbar mit meiner Persönlichkeit sind meine Aktivitäten bei den Klinik-Clowns, den Klinik-VorleserInnen und der Medizinischen Flüchtlingshilfe Göttingen e.V. verbunden. Diese Tätigkeiten haben nicht nur zu der Herausbildung meiner kritischen, reflektierenden Persönlichkeit beigetragen, sondern auch Berührung zu Themenbereichen wie der Organisation von Interessengemeinschaften, Teamfähigkeit, Migration, Flucht, Gesundheitspolitik, Gesundheitsversorgung und Regionalpolitik geschaffen.