

Identifizierung eines endosomalen SNARE-Komplexes

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von
Dipl.-Biochem. Wolfram Antonin
geboren am 26.9.1972 in Bad Nauheim

Referent: Prof. Dr. W. Müller
Korreferent: Prof. Dr. R. Jahn

Tag der Promotion: 19.01.2001

Zusammenfassung

Durch subzelluläre Fraktionierung und quantitative Immunogoldelektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, daß das R-SNARE Endobrevin auf allen Membranen, die mit frühen Endosomen über Membrantransport im Kontakt sind, lokalisiert ist. Man findet es auf der Plasmamembran, Clathrin coated pits, späten Endosomen und dem Trans-Golgi-Netzwerk. Fab-Fragmente von gegen Endobrevin gerichteten Antikörpern inhibieren die homotypische Fusion von frühen und späten Endosomen *in vitro*. Weiterhin inhibiert rekombinantes Endobrevin beide Fusionsreaktionen mit ähnlicher Effizienz. Daraus kann geschlossen werden, daß Endobrevin an der Fusion von frühen und späten Endosomen beteiligt ist.

Endobrevin bildet einen Komplex mit den Q-SNAREs Syntaxin 7, Syntaxin 8 und Vti1b, der an der Fusion von späten Endosomen/Lysosomen beteiligt ist. Antikörper gegen jedes der vier Proteine koprizipitieren den Komplex, inhibieren die homotypische Fusion von späten Endosomen *in vitro* und verlangsamen den Transport von endozytiertem epidermalen Wachstumsfaktor EGF zu den Lysosomen. Die gereinigten rekombinanten Proteine bilden einen Kernkomplex, der in seinen biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften dem neuronalen Kernkomplex aus Synaptobrevin 2, Syntaxin 1 und SNAP-25 sehr ähnelt, obwohl alle vier Proteine je eine Transmembranregion und drei unabhängig gefaltete N-terminale Domänen besitzen. Austauschexperimente sowie Sequenz- und Strukturvergleiche mit den Proteinen des neuronalen Kernkomplexes zeigen, daß jedes Protein eine definierte Position im Komplex einnimmt, wobei die Position von Syntaxin 7 der von Syntaxin 1 entspricht, Vti1b und Syntaxin 8 den N- bzw. C-terminalen Domänen von SNAP-25 entsprechen. Wir schließen daraus, daß die Struktur des Kernkomplexes und die molekularen Mechanismen der Membranfusion zwischen verschiedenen SNAREs hochkonserviert ist.

Desweiteren wurde Vti1b und sein Homolog Vti1a in Gehirn untersucht. Vti1b wurde auf synaptischen Vesikeln gefunden, ist aber dort nicht angereichert. Es wurde eine hirnspezifische Splicevariante von Vti1a identifiziert, die eine Insertion von sieben Aminosäuren in der Nähe des SNARE-Motivs besitzt. Dieses Vti1a- β ist auf kleinen synaptischen Vesikeln und Clathrin coated Vesikeln, die aus Nervenendigungen isoliert wurden, angereichert. Vti1a- β wurde durch Immunisolierungen parallel mit Synaptobrevin 2, einem Marker für synaptische Vesikel, auf synaptischen Vesikeln und Endosomen isoliert. Vti1a- β ist in Nervenendigungen Teil eines SNARE-Komplexes, an den NSF und α -SNAP binden. Dieser SNARE-Komplex ist verschieden vom exozytotischen, weil keine Koimmunpräzipitation von Vti1a- β und Syntaxin 1 bzw. SNAP-25 festgestellt werden konnte. Da nach unseren Befunden Vti1a an der Fusion von frühen Endosomen beteiligt ist, stellen wir die Hypothese auf, daß Vti1a- β nicht an der Exozytose, sondern in einem anderem SNARE-Komplex an einem Membranfusionsschritt während des Recyclings oder der Biogenese von synaptischen Vesikeln beteiligt ist.

Summary

Using subcellular fractionation and quantitative immunogold electron microscopy we found that the R-SNARE endobrevin is present on all membranes known to communicate with early endosomes including the plasma membrane, clathrin-coated pits, late endosomes, and membranes of the trans-Golgi network. Fab fragments specific for endobrevin potentially inhibit homotypic fusion of both early and late endosomes *in vitro*. Recombinant endobrevin inhibited both fusion reactions with similar potency. We conclude that endobrevin operates in the fusion of early and late endosomes.

Endobrevin forms a complex with the Q-SNAREs syntaxin 7, syntaxin 8, and vti1b, that functions in the fusion of late endosomes/lysosomes. Antibodies specific for each of the proteins coprecipitate the complex, inhibit homotypic fusion of late endosomes *in vitro*, and retard delivery of endocytosed epidermal growth factor to lysosomes. The purified recombinant proteins form core complexes with biochemical and biophysical properties remarkably similar to the neuronal core complex although each of the four proteins carries a transmembrane domain, and three have independently folded N-terminal domains. Substitution experiments in combination with sequence and structural comparisons revealed that each protein occupies a unique position in the complex, with syntaxin 7 corresponding to syntaxin 1, and vti1b and syntaxin 8 corresponding to the N- and C-terminal domains of SNAP-25, respectively. We conclude that structure of core complexes and thus their molecular mechanism in membrane fusion is highly conserved between distant SNAREs.

Furthermore, vti1b and its homologue vti1a were studied in brain. Vti1b was found on synaptic vesicles but was not enriched on this organelle. A brain specific splice variant of vti1a was identified that had an insertion of seven amino acid residues next to the putative SNARE-interacting helix. This vti1a- β was enriched in small synaptic vesicles and clathrin coated vesicles isolated from nerve terminals. Vti1a- β also copurified with the synaptic vesicle R-SNARE synaptobrevin 2 during immunoisolation of synaptic vesicles and endosomes. Vti1a- β was part of a SNARE complex in nerve terminals which bound NSF and α -SNAP. This SNARE complex was different from the exocytic SNARE complex because we could not detect a coimmunoprecipitation of vti1a- β with syntaxin 1 or SNAP-25. As we found vti1a to be involved in fusion of early endosomes we speculate that vti1a- β does not function in exocytosis but in a separate SNARE complex in a membrane fusion step during recycling or biogenesis of synaptic vesicles.

Schlagworte: SNARE Proteine, Endosomen, Recycling von synaptischen Vesikeln

Keywords: SNARE Proteins, endosomes, synaptic vesicle recycling

1	Einleitung.....	8
1.1	Intrazellulärer Proteintransport und die SNARE-Hypothese	8
1.2	Der neuronale SNARE Komplex als Paradigma eines SNARE Komplexes ...	9
1.3	Modell der SNARE-Funktion bei der Membranfusion.....	10
1.4	Endozytotischer Weg	11
1.5	Ziel dieser Arbeit.....	14
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Materialien	15
2.2	Klonierung der DNA-Konstrukte.....	15
2.3	Reverse Transkriptase PCR.....	19
2.4	Proteinaufreinigung.....	20
2.5	Antikörper	20
2.6	Herstellung von Fab-Fragmenten.....	21
2.7	Organellenisolierung	21
2.8	Immunpräzipitationen	22
2.9	Bindung von NSF und α -SNAP an den SNARE Komplex	23
2.10	Dissoziation von SNARE-Komplexen.....	23
2.11	Limitierte Proteolyse der zytoplasmatischen SNARE-Komplexe.....	24
2.12	Bildung von gemischten Komplexen	24
2.13	Inhibition der <i>in vitro</i> Bildung von SNARE Komplexen durch Antikörper	24
2.14	Peroxidase-Diaminobenzidin (DAB)-H ₂ O ₂ Reaktion.....	25
2.15	Zellfreier Fusionsassay.....	25
2.16	Mikroinjektion von Fab-Fragmente in HeLa-Zellen.....	26
2.17	Sonstige Methoden.....	26
3	Ergebnisse	27
3.1	Charakterisierung des R-SNAREs Endobrevin.....	27
3.1.1	Identifizierung von Endobrevin.....	27
3.1.2	Subzelluläre Lokalisation von Endobrevin.....	27
3.1.3	Identifizierung der Fusionsschritte, an denen Endobrevin beteiligt ist	34
3.2	Identifizierung und Charakterisierung eines Endobrevin enthaltenden SNARE Komplexes	37
3.2.1	Vorbemerkung: mögliche Ansätze zur Identifizierung von SNARE Partnern.....	37
3.2.2	Immunpräzipitation des endosomalen Komplexes.....	38
3.2.3	Identifizierung des Fusionsschrittes, an dem der endosomale Komplex beteiligt ist	41
3.2.4	Biochemische und biophysikalische Untersuchung des endosomalen Komplexes.....	44
3.2.5	Strukturelle Zuordnung der SNAREs im endosomalen Komplex.....	48
3.3	Charakterisierung des Proteins Vti1a- β	53
3.3.1	Vti1a besitzt eine hirsnspezifische Splicevariante	53
3.3.2	Vti1a- β ist auf synaptischen Vesikeln und allen Recyclingintermediaten lokalisiert	55
3.3.3	Vti1a- β bildet einen vom neuronalen verschiedenen SNARE Komplex in Synapsen.....	59
4	Diskussion.....	62

4.1	Subzelluläre Lokalisation von endosomalen SNAREs	62
4.2	Funktion der endosomalen SNAREs.....	64
4.3	Vti1a- β	66
4.4	Spezifität von SNARE Interaktionen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	68
4.5	Strukturelle Merkmale eines SNARE Komplexes	70
5	Literaturverzeichnis.....	72

Abkürzungen

Abb	Abbildung
ATPase	Adenosintriphosphatase
ATP γ S	Adenosin-5'-O-(3-Thiotriphosphat)
BSA	Rinderserumalbumin
CCV	Clathrin coated Vesikel
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's minimal essential medium
DTT	Dithiothreitol
eb	Endobrevin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EST	expressed sequence tag
GST	Glutathion-S-Transferase
GTPase	Guanosintriphosphatase
GTP γ S	Guanosin-5'-O-(3-Thiotriphosphat)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl-)piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HRP	Meerettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LIMP-II	lysosomal integral membrane protein II
MALLS	multi-angle laser light scattering
NEM	N-Ethylmaleimid
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive factor
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNS	postnuklearer Überstand
rpm	Umdrehungen pro Minute
sb	Synaptobrevin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNAP	soluble NSF attachment protein
SNAP-25	synaptosomal associated protein of 25kDa
SNARE	SNAP-receptor
sx	Syntaxin
syp	Synaptophysin
Tab	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethan
Vol	Volumen

1 Einleitung

1.1 Intrazellulärer Proteintransport und die SNARE-Hypothese

Alle eukaryontischen Zellen besitzen eine Vielzahl von membranumschlossenen Kompartimenten, deren spezialisierte Funktion eine definierte Proteinzusammensetzung erfordert. Diese Proteine werden hauptsächlich am Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und müssen dann innerhalb der Zelle sortiert und durch vesikulären Transport zu ihrem Zielort befördert werden. Vergleichbare Transportvorgänge sind für sekretorische Proteine beschrieben, die am Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und nach der Passage durch den Golgi-Apparat in Sekretionsgranulen verpackt werden, die mit der Plasmamembran der Zelle fusionieren (Palade, 1975).

Transportvesikel sind von einer Lipiddoppelschicht umgeben, die mit der Lipiddoppelschicht der Zielmembran verschmelzen muß. In der Zelle sind solche Fusionsereignisse kontrollierte Prozesse und stellen eines der faszinierendsten Probleme der Zellbiologie dar. Rothman und Mitarbeitern gelang es 1984 den vesikulären Transport innerhalb des Golgi Apparates *in vitro* zu rekonstituieren (Balch *et al.*, 1984). Dabei konnten sie den Transport durch N-Ethylmaleimid (NEM) blockieren (Glick und Rothman, 1987). Daraufhin isolierten sie den verantwortlichen NEM sensitiven Faktor (NSF) als lösliches zytosolisches Protein (Block *et al.*, 1988). Bei der Suche nach NSF interagierenden Faktoren konnten weitere lösliche Proteine isoliert werden, sogenannte SNAPs (soluble NSF attachment protein, von denen drei Isoformen α , β und γ bekannt sind) (Clary *et al.*, 1990; Clary und Rothman, 1990; Whiteheart *et al.*, 1993). In Bindungsversuchen mit α -SNAP und NSF mit Hirnextrakt gelang es 1993 (Söllner *et al.*, 1993b) einen Komplex aus den drei Proteinen Synaptobrevin 2 (auch vesicle associated membran protein, VAMP genannt), Syntaxin 1 und SNAP-25 (synaptosomal associated protein of 25kDa) zu isolieren. Diese drei Proteine wurden als SNAP-Rezeptoren (SNAREs) bezeichnet. Von Synaptobrevin 2 war bekannt, daß es auf synaptischen Vesikeln lokalisiert ist, während Syntaxin 1 und SNAP-25 plasmamembranständig sind. Durch Bindung von α -SNAP und NSF an den Komplex aus den drei SNARE-Proteinen entsteht der sogenannte 20S-Komplex. NSF ist eine ATPase und kann in Gegenwart von α -SNAP den SNARE Komplex dissoziieren (Söllner *et al.*, 1993a).

Parallel konnte über die Identifizierung von Sekretionsmutanten in Hefe (Novick *et al.*, 1980) unter anderem Sec17p und Sec18p (Novick *et al.*, 1981) identifiziert werden, die Homologen zu α -SNAP (Clary *et al.*, 1990) und NSF (Wilson *et al.*, 1989). An der Exozytose von Transportvesikeln des sekretorischen Weges an der Plasmamembran sind in der Hefe Proteine beteiligt, die denen des neuronalen Komplexes ähneln (Ferro-Novick und Jahn, 1994). Die Proteine Snc1p/Snc2p entsprechen Synaptobrevin 2 und sind auf den Transportvesikeln lokalisiert, Sso1p/Sso2p sind homolog zu Syntaxin 1 und Sec9p zu SNAP-25 und sind an der Plasmamembran lokalisiert.

Etwa zur gleichen Zeit stellte sich heraus, daß Synaptobrevin 2, Syntaxin 1 und SNAP-25 von clostridialen Neurotoxinen (Tetanustoxin und den Botulinus-Neurotoxinen BoNT/A, B, C1, D, E, F und G) hochselektiv gespalten werden (Jahn

und Niemann, 1994; Montecucco und Schiavo, 1994). Diese Gifte blockieren die Exozytose von synaptischen Vesikeln in Neuronen irreversibel. Das zeigte, daß jedes der drei Proteine eine essentielle Funktion bei der Exozytose hat.

1993 formulierten Rothman und Kollegen die sogenannte SNARE-Hypothese, nach der Fusionsvorgänge in der Zelle durch spezifische Kombinationen von SNAREs vermittelt werden. Dabei sollen SNAREs auf Transportvesikeln (v-SNAREs) mit ihren Partnern auf der Zielmembran (t-SNAREs) interagieren und die Spezifität des Fusionschrittes vermitteln (Söllner *et al.*, 1993b).

Weiterhin wurde postuliert, daß α -SNAP und NSF unter ATP-Spaltung den SNARE-Komplex dissoziieren und durch die strukturellen Umlagerungen die Fusion vermitteln (Söllner *et al.*, 1993a). Auch wenn sich die meisten Postulate der ursprüngliche SNARE Hypothese als nicht korrekt herausstellten, hat sich diese Hypothese als außerordentlich befruchtend auf die weitere Erforschung intrazelluläre Membranfusionsvorgänge und des vesikulären Transport erwiesen.

1.2 Der neuronale SNARE Komplex als Paradigma eines SNARE Komplexes

Der sogenannte neuronale SNARE-Komplex, den Söllner *et al.* identifiziert haben, besteht wie erwähnt aus den drei Proteinen Synaptobrevin 2, Syntaxin 1 und SNAP-25. Es wird vermutet, daß dieser Komplex die neuronale Fusionsmaschinerie darstellt (Hanson *et al.*, 1997).

Syntaxin 1 (auch als HPC-1 bezeichnet) ist ein Typ II-Membranprotein, das hauptsächlich in Neuronen an der Plasmamembran lokalisiert ist. Es besitzt ein Molekulargewicht von 35kDa (Barnstable *et al.*, 1985; Bennett *et al.*, 1992).

SNAP-25 wird ebenfalls neuronal exprimiert (Oyler *et al.*, 1989) und ist durch palmitoylierte Cysteinreste in der Mitte des Moleküls an der Plasmamembran verankert (Veit *et al.*, 1996).

Synaptobrevin 2 (auch als VAMP-2 bezeichnet) ist als Typ II-Membranprotein in der Membran von synaptischen Vesikeln oder sonstigen Sekretionsgranulen verankert. Es besitzt ein Molekulargewicht von 12kDa (Baumert *et al.*, 1989; Trimble *et al.*, 1988).

Untersuchungen an rekombinanten SNAREs haben gezeigt, daß die zytosolischen Domänen von Synaptobrevin 2 und Syntaxin 1 sowie SNAP-25 *in vitro* einen stabilen ternären Komplex bilden, der in einem SDS-Polyacrylamidgel als singuläre Bande wandert (Hayashi *et al.*, 1994). Dieser sogenannte SDS-resistente Komplex zerfällt in seine Einzelproteine, wenn er vor dem Auftragen in SDS-Probenpuffer erhitzt wird. In den letzten Jahren wurde dieser Komplex ausführlich biophysikalisch charakterisiert.

Durch limitierte Proteolyse des Komplexes konnte ein stabiler Kernbereich identifiziert werden (Fasshauer *et al.*, 1998a; Poirier *et al.*, 1998). Dieser besteht aus vier Proteinfragmenten Synaptobrevin 2 (Aminosäuren 1-96), Syntaxin 1 (Aminosäuren 180-262) und zwei SNAP-25 Fragmenten (Aminosäuren 1-83 und 120-206). Es fehlt also die N-terminale Region von Syntaxin 1, die die sogenannte Habc Domäne beinhaltet, und der mittlere Bereich von SNAP-25 (Aminosäuren 84-119). Die vier Fragmente enthalten die Bindungsregion der SNAREs für die Ausbildung des ternären Komplexes, während die Habc-Domäne von Syntaxin 1 nicht an der Bindung nicht beteiligt ist. Dieser Kernkomplex besitzt einige charakteristische Merkmale des ternären Komplexes. So können die Komponenten dieses Komplexes *in vitro* spontan assoziieren und durch NSF und α -SNAP dissoziiert werden. Die Assoziation des Kernkomplexes ist durch eine drastische Zunahme des α -helikalen Anteils

charakterisiert. Der Komplex ist thermisch außerordentlich stabil, und besitzt eine SDS-Resistenz (Fasshauer *et al.*, 1998a).

Dieser Kernkomplex konnte kristallisiert und die Struktur aufgeklärt werden (Sutton *et al.*, 1998). Es handelt sich um ein Bündel aus vier parallel zueinander angeordneten Helizes, die eine rechtgängige coiled coil Struktur ausbilden. Die Kontakte zwischen den Helizes im Kern des Bündels werden fast ausschließlich von hydrophoben Aminosäureseitenketten gebildet, die eine regelmäßige Folge planarer Schichten senkrecht zur Achse des Bündels bilden. In der ungefähren Mitte des Komplexes liegt eine Ebene, in der drei Glutaminreste und ein Argininrest eine hydrophile Interaktion ausbilden. Sequenzvergleiche von SNAREs aus verschiedenen Organismen haben gezeigt, daß diese Proteine generell in zwei Gruppen eingeteilt werden können (Weimbs *et al.*, 1998). Die erste Gruppe besitzt in der 0-Ebene fast ausschließlich die Aminosäure Arginin, die zweite Gruppe ein Glutamin. Die SNARE Proteine wurden deswegen als Q (Glutamin)- bzw. als R-SNAREs (Arginin) reklassifiziert (Fasshauer *et al.*, 1998b). Die R-SNARE Familie beinhaltet Synaptobrevin 2, die Q-SNARE Familie Syntaxin 1 und SNAP-25. Die Domänen von Synaptobrevin 2, Syntaxin 1 und SNAP-25, die an der Bildung des Vierhelixbündel beteiligt sind, sowie die homologen Regionen in den verwandten R- und Q-SNAREs werden als SNARE Motiv bezeichnet (Jahn und Südhof, 1999).

1.3 Modell der SNARE-Funktion bei der Membranfusion

Die Untersuchungen der letzten Jahre haben zu einer Abwandlung der ursprünglichen SNARE-Hypothese geführt (Hanson *et al.*, 1997; Jahn und Südhof, 1999). Das aktuelle Fusionsmodell soll deswegen hier kurz dargestellt werden.

1. In einem Vorbereitungsschritt werden sogenannte cis-SNARE Komplexe durch NSF und α -SNAP dissoziiert und dadurch die SNARE Proteine für die Fusion aktiviert (Abb. 1, a und b). Bei cis-SNARE Komplexen befinden sich alle beteiligten SNAREs auf derselben Membran und stellen damit einen inaktiven Endzustand nach der Membranfusion dar (Abb. 1, g).
2. Proteinvermittelt "erkennen" sich die beiden Membranen.
3. Die Fusion wird durch die Bildung sogenannter trans-SNARE Komplexe initiiert, d.h. in diesem Komplex sitzen die SNARE-Partner auf unterschiedlichen Membranen (Abb. 1, d und e).
4. Die eigentliche Fusionsreaktion wird über Verschmelzung der beiden distalen Membranen eingeleitet werden, es bildet sich eine Fusionspore.
5. Schließlich dehnt sich die Fusionspore aus. Dabei gehen die trans-SNARE Komplexe in cis-SNARE Komplexe über (Abb. 1, f und g).

Nach der SNARE Hypothese werden alle intrazellulären Fusionsvorgänge von SNARE vermittelt, die dann jeweils Komplexe bilden. Allerdings sind neben dem neuronalen SNARE Komplex keine weiteren Komplexe in ähnlicher Ausführlichkeit untersucht worden. Die SNAREs, die in der Hefe an der Exozytose beteiligt sind, ähneln denen des neuronalen Komplexes (Ferro-Novick und Jahn, 1994). Die Proteine Snc1p/Snc2p und Sso1p/Sso2p entsprechen Synaptobrevin 2 und Syntaxin 1. Die C-terminale Domäne von Sec9p entspricht SNAP-25 insofern, daß es zwei SNARE-Motive besitzt und keine Transmembrandomäne. Die SNARE-Komplexe, die an anderen Fusionsereignissen beteiligt sind, müssen eine andere Zusammensetzung besitzen. So ist die Hefe, obwohl das Gesamtgenom bekannt ist, mit Ausnahme von

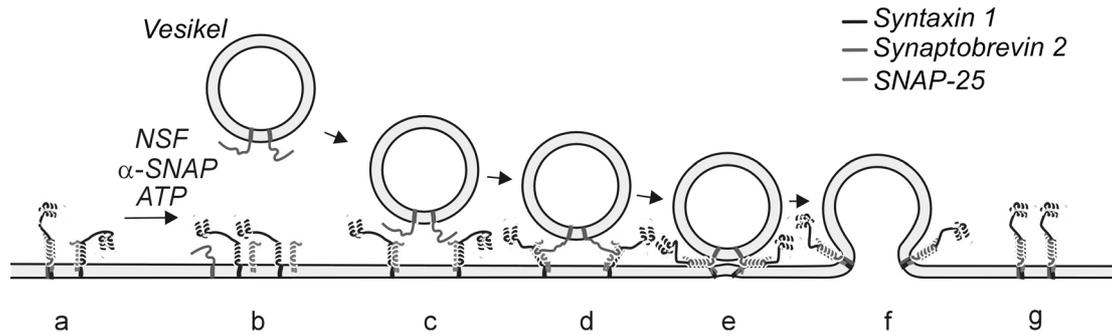


Abb. 1: Modell zur SNARE-Komplex vermittelten Fusion von synaptischen Vesikeln mit der präsynaptischen Plasmamembran

Cis-SNARE Komplexe (a, nur auf der Plasmamembran gezeigt) bestehend aus Synaptobrevin 2 (rot), Syntaxin 1 (blau) und SNAP-25 (grün) werden durch NSF und α -SNAP dissoziiert. Die SNAREs werden dadurch für die Fusion aktiviert (b). Proteinvermittelt bindet das synaptische Vesikel an die Plasmamembran, das sogenannte docking (b und c). Synaptobrevin 2, Syntaxin 1 und SNAP-25 bilden einen trans-SNARE-Komplex (d und e). Bei der Verschmelzung der beiden distalen Membranen und dem Ausdehnen der Fusionspore gehen die trans-SNARE-Komplexe in cis-SNARE-Komplexe über (f und g).

Nicht gezeigt sind weitere Proteine, die das docking und Regulationsschritte vermitteln. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Jahn und Hanson, 1998).

Spo20p, das Sec9p bei der Sporulation ersetzt (Neiman, 1998), kein weiteres Protein bekannt, das zwei SNARE-Motive besitzt. Es ist deswegen denkbar, daß andere SNARE-Komplexe aus mehr als drei Proteinen bestehen. Dennoch kann vermutet werden, daß die Stöchiometrie von drei Q-SNARE- und einem R-SNARE-Motiv auch in anderen Komplexen zu finden ist (Fasshauer *et al.*, 1998b).

1.4 Endozytischer Weg

Eukaryontische Zellen haben eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt, um kleine Moleküle, Makromoleküle oder auch ganze Partikel aufzunehmen und sie in bestimmte membranumschlossene Kompartimente zu transportieren. Diese Mechanismen werden allgemein als Endozytose bezeichnet, nach einem Vorschlag von de Duve (de Duve, 1963). Unter dieser breiten Definition beinhaltet Endozytose verschiedene Wege der Aufnahme von extrazellulärem Material wie Phagozytose, Pinozytose, Clathrin abhängige/rezeptorvermittelte und Clathrin-unabhängige Endozytose.

Nach der Endozytose erscheinen Zelloberflächenrezeptoren und andere Membranproteine sowie lösliche Substanzen zuerst in dem sogenannten frühen Endosomen (siehe Abb. 2A). Von hier werden viele Lipide und Proteine, unter ihnen auch einige Rezeptoren wie z. B. der Transferrin Rezeptor, relativ schnell zur Plasmamembran zurücktransportiert. Dabei passieren sie ein Kompartiment, das das Recycling Endosom genannt wird. Im Gegensatz zu den recycelten Proteinen werden andere Membranproteine, vor allem herunterregulierte Zelloberflächenrezeptoren wie der EGF-Rezeptor, Liganden wie EGF und lösliche Substanzen zum späten Endosom und von dort zum Lysosom transportiert, wo sie abgebaut werden.

Es existieren ein Vielzahl von Bezeichnungen für die endosomalen Kompartimente, wobei die einzelnen Definitionen die Funktion, Morphologie oder Markerproteine der

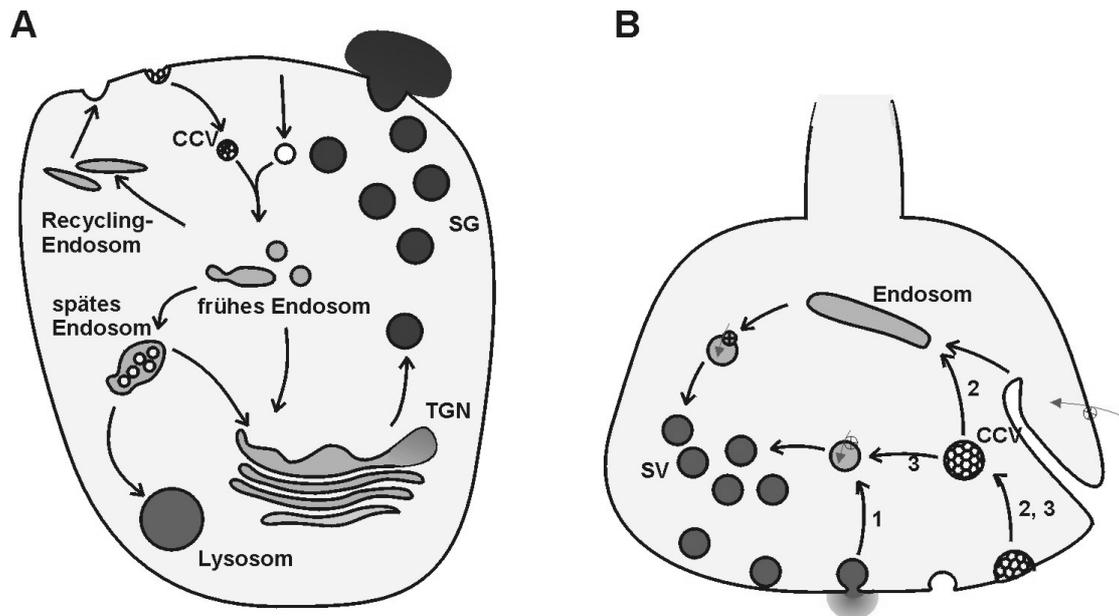


Abb. 2: Übersicht zum endosomalen Weg

A: Schematische Darstellung des exo- und endozytotischen Weges in einer Zelle. Sekretorische Granulen (SG) entstehen durch Abschnüren vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und fusionieren mit der Plasmamembran. Nach der Endozytose erreicht das aufgenommene Material zuerst ein frühes Endosom und wird von dort zum Recycling Endosom und zurück zur Plasmamembran transportiert oder über das späte Endosom zum Lysosom.

B: Schematische Darstellung des Recycling von synaptischen Vesikeln. Rot bzw. grau gefüllte Kreise stellen mit Neurotransmitter gefüllte bzw. leere synaptische Vesikel (SV) dar. Die roten Pfeile zeigen den Transport des Neurotransmitters aus dem Extrazellulärraum ins Zytosol bzw. aus dem Zytosol ins synaptische Vesikel an.

CCV, Clathrin coated Vesikel.

Kompartimente betonen. Trotz der unterschiedlichen Sichtweisen sind wahrscheinlich multivesikuläre Körper, das prälysosomale Kompartiment und das späte Endosom dasselbe Kompartiment. Als Marker für das Kompartiment gelten die kleinen GTPasen Rab7 und Rab9, sowie die lysosomalen Membranproteine LAMP-1/lgp120 und LIMP-II, die sich auch schon in diesem Kompartiment finden. Der kationunabhängige Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (ciM6PR) dagegen erreicht das Lysosom nicht, sondern wird zum Trans-Golgi-Netzwerk zurücktransportiert (Griffiths *et al.*, 1988) und kann deswegen zur Differenzierung dieser zwei Organellen herangezogen werden. Spätes Endosom und Lysosom sind in der Zelle perinukleär angeordnet. Das späte Endosom ist elektronenmikroskopisch an den internalisierten Membranen in multivesikulären Körpern zu erkennen.

Das tubovesikuläre Endosom, das sorting endosome, CURL (compartment of uncoupling ligand from receptor) entsprechen dem frühen Endosom. Als Marker gelten hier Rab5, Rab4 und EEA1. Das frühe Endosom ist peripher in Plasmamembrannähe lokalisiert. Morphologisch ist es an der tubovesikulären und vakuolären Struktur festzumachen.

Recycling Endosomen sind meist in der Nähe des Kerns lokalisiert und elektronenmikroskopisch durch eine tubuläre Morphologie gekennzeichnet. Als Marker gilt der Transferrin-Rezeptor, der zwar auch das frühe Endosom passieren muß, aber an Recycling Endosomen deutlich angereichert ist. Leider werden frühe Endosomen und Recycling Endosomen oft kollektiv als frühe Endosomen bezeichnet.

Frühes und spätes Endosom sind eine operationelle Definition, die auf der Markierung

der endosomalen Kompartimente mit fluid phase Markern durch pulse und pulse-chase Protokollen beruht (Aniento *et al.*, 1993). In *in vitro* Versuchen konnte die Fusion an frühen Endosomen und an späten Endosomen rekonstituiert werden. Dabei zeigte sich, daß sowohl frühe wie auch späte Endosomen effizient homotypisch (d.h. frühes Endosom mit frühem Endosom, spätes Endosom mit spätem Endosom) fusionieren, nicht jedoch heterotypisch (d.h. das frühe mit dem späten Endosom). Beide homotypischen Fusionen werden durch Antikörper gegen NSF und durch NEM blockiert, wobei der NEM Block durch Zugabe von rekombinanten NSF und α -SNAP aufgehoben werden kann (Robinson *et al.*, 1997). Das legt nahe, daß diese Fusionsvorgänge durch SNAREs vermittelt werden.

Ein Spezialfall des endozytotischen Weges findet man an der Synapse in Neuronen. Hier können die Membranproteine der synaptischen Vesikel hunderte bis tausende Zyklen von Exozytose, Endozytose und erneuter Bildung eines synaptischen Vesikels durchlaufen (De Camilli und Takei, 1996). Dabei wurden verschiedene Modelle diskutiert (Cremona und De Camilli, 1997). Synaptische Vesikel könnten im sogenannten "Kiss and Run" Modell transient mit der Plasmamembran fusionieren und durch eine Fusionspore die Neurotransmitter freisetzen und sich wieder schließen, ohne daß es zu einer Vermischung von Proteinen und Lipiden des synaptischen Vesikels und der Plasmamembran kommt (Klingauf *et al.*, 1998; Abb. 2, Weg 2). In den anderen Modellen (Weg 2 und 3) würde es zur vollständigen Verschmelzung der Membran des synaptischen Vesikels mit der Plasmamembran kommen, so daß eine Endozytose beim Recycling von synaptischen Vesikeln notwendig wäre. Bei der Endozytose würden sich Clathrin coated Vesikel, die die Membranproteine des synaptischen Vesikels enthalten, von der Plasmamembran abschnüren. Clathrin coated Vesikel wurden als Intermediate des Recyclings von synaptischen Vesikeln durch verschiedene Methoden identifiziert (Miller und Heuser, 1984; van der Blik und Meyerowitz, 1991). Dabei ist es unklar, ob die Clathrin coated Vesikel nach Verlust des Coats direkt zu synaptischen Vesikeln werden (Weg 2), oder ob dies einen weiteren Fusionsschritt mit einem endosomalen Kompartiment benötigt (Weg 3) (Murthy und Stevens, 1998; Takei *et al.*, 1996). Für die Existenz eines endosomalen Kompartiments spricht die hohe Konzentration von Rab5 in Synapsen (Fischer von Mollard *et al.*, 1994b), für das eine Funktion in der Fusion von frühen Endosomen gezeigt wurde (Gorvel *et al.*, 1991).

1.5 Ziel dieser Arbeit

Ziel der hier vorgelegten Experimente war es, zur strukturellen und funktionellen Charakterisierung von intrazellulären SNARE-Komplexen beizutragen. Als Ausgangspunkt diente das Synaptobrevinhomolog Endobrevin, das von mir durch Suche in EST-Datenbanken identifiziert wurde, und unabhängig von zwei Arbeitsgruppen als endosomales SNARE beschrieben wurde (Advani *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 1998b). Die hier gestellten Aufgaben umfaßten

- a) den (die) intrazellulären Fusionsschritt(e) zu identifizieren, an dem (denen) Endobrevin beteiligt ist,
- b) SNARE Partner von Endobrevin zu identifizieren sowie nachzuweisen, an welchem der von Endobrevin vermittelten Fusionsschritte diese Proteine beteiligt sind,
- c) im Erfolgsfall den neuen SNARE-Komplex mit biochemischen und strukturellen Methoden zu charakterisieren, wobei die Eigenschaften dieses Komplexes mit dem neuronalen Komplex verglichen werden sollten.

In einem zweiten Teil der Arbeit sollte das SNARE-Protein Vti1a im Gehirn untersucht werden. Durch Immunoblotting hatte Dr. Gabriele Fischer von Mollard festgestellt, daß man in Gehirn neben dem ubiquitären Vti1a eine intensive Bande von leicht geringerer Mobilität findet (Abb. 25). Hierbei stellte sich die Frage, ob es sich dabei um eine hirnspezifische Isoform handelt und wo Vti1a im Gehirn lokalisiert ist.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Reagenzien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den folgenden Firmen bezogen: Enzyme für die Molekularbiologie von New England Biolabs, GSH-Sepharose 6B, Protein A-Sepharose 6B und CNBr-Sepharose 4B von Pharmacia, Ni-NTA-Agarose von Qiagen. Zellkultirmidien wurden von Gibco und alle anderen Reagenzien von Sigma bezogen. Klonierungen wurden im *Escherichia coli* Stamm XL1Blue durchgeführt.

NSF und α -SNAP in pQE-9 Vektoren, die für His₆-getaggte Proteine kodieren, stammen von S. Whiteheart und J.E. Rothman (Sloan-Kettering Center, New York). Die lösliche Domäne von Syntaxin 6 (Aminosäuren 1-232) im pGEX-KG-Vektor, der für ein thrombinspaltbares Glutathion-S-Transferase (GST)-Syntaxin 6 kodiert, wurde von R.H. Scheller (Stanford, CA) zur Verfügung gestellt (Bock *et al.*, 1996). Die folgenden Expressionskonstrukte für die Expression der neuronalen Kernfragmente wurden früher beschrieben (Syntaxin 1 (Aminosäure 180-262), SNAP-25 (Aminosäure 1-83, SN1), SNAP-25 (Aminosäure 120-206, SN2) und Synaptobrevin 2 (Aminosäure 1-96) (Fasshauer *et al.*, 1998a). Die cDNA für Syntaxin 1 wurde von R.H. Scheller, die cDNAs für Cellubrevin, Syntaxin 2 und SNAP-25a wurden von T.C. Südhof (Dallas, TX) zur Verfügung gestellt.

2.2 Klonierung der DNA-Konstrukte

Vti1a und Vti1a- β aus Ratte wurden mit den Primern (rvti1b5' und rvti1b3', für die Primersequenzen siehe Tab. I) basierend auf Sequenzinformationen aus EST-tags (Genbank accession numbers: AI010508, AI227646 und AI555622) aus cDNA Bibliotheken aus Rattenlunge und Rattenzerebellum (λ ZAPII libraries, Stratagene). Die PCR-Produkte aus Zerebellum wurden in den pGEM-Teasy Vektor (Pharmacia) kloniert. Es wurden drei Klone mit einem kleineren und drei Klone mit einem etwas größerem Insert erhalten. Das kleinere Insert entsprach der Vti1a Sequenz aus Ratte, das größere der von Vti1a- β , das eine Insertion von 21 Basenpaaren enthält.

Endobrevin aus Ratte wurde mit den Primern (SybHompBSforKpn und SybHompBSbackBamHI) basierend auf Sequenzinformationen aus EST-tags (R47061, C06819) aus cDNA Bibliotheken aus Rattenniere, Rattenlunge und Rattenleber amplifiziert. Die PCR Produkte wurden in den pBS-Vektor (Stratagene) kloniert. Alle Sequenzen aus den drei Geweben waren identisch.

Syntaxin 7 aus Ratte wurde mit den Primern (sx7afwBam und sx7bbwKpn) basierend auf der publizierten Sequenz (AF031430) aus cDNA Bibliotheken aus Rattenniere und Rattenzerebellum amplifiziert. Die PCR Produkte wurden in den pBS-Vektor kloniert. Alle Sequenzen aus den zwei Geweben waren identisch, allerdings zeigte ein Vergleich mit der publizierten Rattensequenz einen Nukleotidaustausch (c416a), der zu einem Aminosäureaustausch (A139E) führt. Da sowohl die humane (HSU77942) wie auch die Maus (AF056323) Sequenz ein Glutamat in dieser Position besitzen, gehe ich davon aus, daß die hier ermittelte Sequenz richtig ist.

Primer	Sequenz
sx7afwBam	cgcggatccatgtcttacctccgggat
sx7bbwKpn	cgcggtacctcagcctttcagacccatac
rvti1b5'	gggtaccggagctgccatgtcag
rvti1b3'	cgggatccgcctcagtgctccttgac
pBSsnap29fwBam	cgcggatccatgtctggctatctttaaagc
pBSsnap29bwXho	gcgctcgagctactcgcgtgcccacctt
sx12bbwKpn	gcggtacctcacttagaagcaaccagataac
sx12afwXba	gctctagatgtcctacggcccttaga
Sy8-ATG	cggggatccatggccccagaccctg
Sy8-Sol	gggaattctaggaagctgactttctgtcc
vti1b fw XhoI/Kozak/Ha(opt)	gccgctcgagccaccatggagtagccctacgacgtgcccactacgccatggccgctccgccg
vti1b bw XbaI	ctagtctagatcaatgggtgctgaaagaatttg
sx8 fw XhoI/Kozak/Ha(opt)	gccgctcgagccaccatggagtagccctacgacgtgcccactacgccatggccccagaccctg
sx8 bw XbaI	ctagtctagatcagttgggtggccacac
eb fw XhoI/Kozak/myc(opt)	gccgctcgagccaccatggagcagaagctgatcagcaggaggacctgatggaggccagtgaggag
eb bw XbaI	ctagtctagattaagtgaggatgggtgccc
sx7 fw XhoI/Kozak/Ha(opt)	gccgctcgagccaccatggagtagccctacgacgtgcccactacgccatgtcttacctccgggg
sx7 bw XbaI	ctagtctagatcagcctttcagacccca
sx8/136ndepEt28fw	gaggcacatatgggttctgatgagatccgg
sx7/159ndepEt28fw	gaggcacatatggaatcacagaggatgac
vti1a130ndepEtfw	gcgccgcatatg gcattactcctacaaggc
MAsol mit Xho	gccgctcgagttactgttggtatcacttttc
syx1213rn, fw, XbaI	gctctagatgtcctacggcccttagac
CBpgEXfwBam	gcgggatccatgtctacaggggtgcc
CBpEtfwNhe	gcggctagcatgtctacaggggtgcc
CBpgEXbwXho	gcgctcgagtcattacatcttgcagttctcc
Sx12pEt28fwNde	ggcggcatatgtcctacggccctta
Sx12pGEXfwXma	gcgcccgggaatgtcctacggccctta
Sx12pET28/pgEXbwXho(StOP)	ggcggctcgagctattactcttgcgagatttttc
Sx7pEt28fwNde	ggcggcatatgtcttacctccggg
Sx7pEt28bwXho	ggcggctcgagctattattttctggatttgcgctg
SybHompBSforKpn	caggtaccaagtgtccgagac
SybHompBSbackBamHI	gcggatccaccctgaagagtagg
pBSsn23Bamfw	cgcggatccatggatgatctatcaccag
pBSsn23Xhobw	gccgctcgagctattagctgcaatgagtttc
SybHomfwpGEX(BamHI)	cgggatccatggaggccagtgaggag
SybHombapGEX(SERI)	cgaattctacttcacattttccaccag

Tab I: Sequenz der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

SNAP-29 aus Ratte wurde mit den Primern (pBSsnap29fwBam und pBSsnap29bwXho) basierend auf der publizierten Sequenz GS32 Sequenz (AF035822, (Wong *et al.*, 1999)) aus cDNA Bibliotheken aus Rattenniere und Rattenlunge amplifiziert. Die PCR Produkte wurden in den pBS-Vektor und pGEX2T-Vektor kloniert. Alle Sequenzen aus den zwei Geweben waren identisch, allerdings zeigte ein Vergleich mit der publizierten Rattensequenz zwei Nukleotidaustausche (c109g, t194c), die zu Aminosäureaustauschen (P37A, F65S) führt, und zwei Verschiebungen im Leserahmen (t-153ca, c162a), die zu zwei Aminosäureaustauschen führen (G52R, P53A). Vergleiche mit dem humanen SNAP-29 (AF115436) und EST-tags aus Maus (z.B. AA388177, AA270049, AA388158) zeigen, daß unsere Sequenz korrekt ist: Ala³⁷ korrespondiert zu Ala im humanen SNAP-29 und Arg-Ala-Glu in den Positionen 52-54 sind identisch zu den korrespondierenden Aminosäuren in der humanen SNAP-29 Sequenz und in den EST-tags aus Maus.

Syntaxin 13 wurde ebenfalls mit Primern (sx12afwXba und sx12bbwKpn) basierend auf der publizierten Sequenz (AF031430) aus cDNA Bibliotheken aus Lunge und Zerebellum isoliert und in den pBS-Vektor kloniert. Hier wurden zwei Sequenzen gleichzeitig von zwei verschiedenen Gruppen unter den Namen Syntaxin 12 (Tang *et al.*, 1998b) und Syntaxin 13 (Advani *et al.*, 1998) publiziert, wobei sich Advani *et al.* aufgrund eines Sequenzierfehlers nicht das Start-ATG des offenen Leserahmens identifiziert haben, sondern das folgende. Welche der beiden Initiationsstellen richtig ist, kann man über Vergleiche mit EST-tags aus Maus und Mensch leicht herausfinden. So zeigen z.B. die damals zugänglichen EST-Klone AA271054 und AI430286 aus Maus sowie AA305025 und AA167677 aus Mensch sowie die inzwischen bekannte humane Syntaxin 13 Sequenz (AL035306.1) einen Initiationsbeginn wie Tang *et al.*

Die Sequenzen aus den zwei Geweben waren bis auf einen Basenaustausch (g700a) in der Sequenz aus dem Zerebellum identisch. Da beide publizierten Sequenzen an dieser Stelle ein Guanin besitzen (Position 700 in Advani *et al.* Position 715 bei Tang *et al.*, Position 721 in unserer eigenen Sequenz, auf die sich im folgenden bezogen wird) und das in Übereinstimmung mit den bekannten EST-Taggs ist, wurde mit einem Klon aus der Lunge weitergearbeitet.

Die publizierte Sequenz von Syntaxin 12 unterscheidet sich noch in folgenden Punkten von der publizierten Syntaxin 13 Sequenz und unseren Sequenzen aus Lunge und Zerebellum: Deletionen (c36- und die Basen 52-56 (cagcc), was zu den Aminosäureaustauschen P14R, S15R, G16S, P17L, Q18-, P19- führt) und Basenaustausche (g47a, t60g, a68g, a84g, t90c, wobei g47a in dem durch Verschiebung des Leserahmens falschen Bereich liegt und a68g zu einem Aminosäureaustausch N23S führt, alle anderen Mutationen zu keinen Veränderungen in der Aminosäuresequenz führen). Unsere Sequenzen unterscheiden sich in zwei weiteren Positionen von der publizierten Syntaxin 13 Sequenz (c50- und g54gg) was zu Aminosäureaustauschen P17L und Q18R führt. Das Cytosin in Position 50 findet sich auch in der Syntaxin 12 Sequenz, für Position 54 kann die Sequenz aufgrund der Deletion nicht zur Hilfe gezogen werden. Alle die hier aufgeführten Fehler in den publizierten Sequenzen können durch eine Vielzahl von EST-Klonen aus Maus (AW908079, AW231164, BE311186, AA271054 und AI430286) und Mensch (AI816321, AA167677) sowie der inzwischen bekannten humanen Syntaxin 13 Sequenz (AL035306.1) bestätigt werden.

SNAP-23 aus Ratte wurde mit den Primern (pBSsn23Bamfw und pBSsn23Xhobw) basierend auf der publizierten Sequenz (AF052596) aus cDNA Bibliotheken aus Lunge und Zerebellum amplifiziert. Die PCR Produkte wurden in den pBS-Vektor und den pGEX2T Vektor (Pharmacia) kloniert. Alle Sequenzen aus den zwei Geweben waren identisch, und - man sollte es kaum glauben - stimmten mit der publizierten Sequenz überein.

Die zytosolische Domäne von Syntaxin 8 (Aminosäure 1-213) aus Ratte wurde mit den Primern (Sy8-ATG und Sy8-Sol) basierend auf der publizierten Sequenz (AF033109) aus einer cDNA Bibliotheken aus Lunge (lambda ZAPII libraries) amplifiziert. Die PCR Produkte wurden in den pGEX2T-Vektor kloniert, um ein bakterielles Expressionskonstrukt GST-Syntaxin 8 zu erhalten (pBK45).

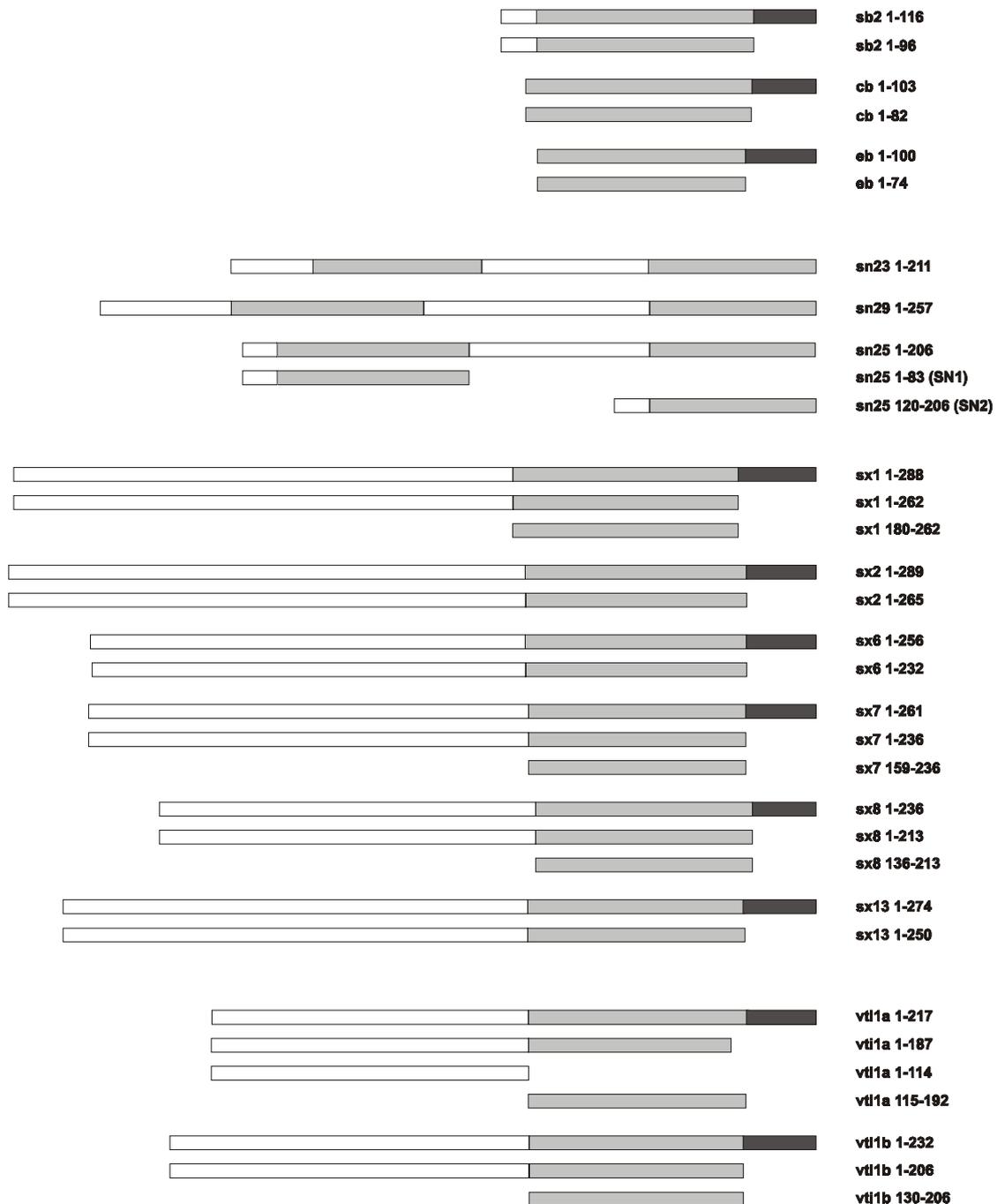


Abb. 3: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteinfragmente

Es ist jeweils das vollständige Protein und darunter die zugehörigen Fragmente gezeigt. Transmembranregionen sind schwarz, die SNARE-Motive grau gezeichnet. Die Positionen der Aminosäuren sind auf der rechten Seite angezeigt.

sb2, Synaptobrevin 2; cb, Cellubrevin; eb, Endobrevin; sn23, SNAP-23; sn29, SNAP-29; sn25, SNAP-25; sx1, Syntaxin 1; sx2, Syntaxin 2; sx6, Syntaxin 6; sx7, Syntaxin 7; sx8, Syntaxin 8; sx13, Syntaxin 13.

Zur Expression in eukaryontischen Zellen wurde Vti1b, Syntaxin 7 und Syntaxin 8 mit einem N-terminalen HA-tag unter der Kontrolle eines SV40 Promoters kloniert. Endobrevin wurde mit einem N-terminalen myc-tag kloniert. Dabei wurden die

Primer vti1b fw XhoI/Kozak/HA(opt), vti1b bw XbaI, sx7 fw XhoI/Kozak/HA(opt), sx7 bw XbaI, sx8 fw XhoI/Kozak/HA(opt), sx8 bw XbaI, eb fw XhoI/Kozak/myc(opt) und eb bw XbaI zur Amplifikation durch PCR benutzt und das PCR Produkt in den pSI-Vektor (Stratagene) kloniert.

GST-Fusionsproteine der löslichen Domänen von Endobrevin (Aminosäuren 1-74), Cellubrevin (Aminosäuren 1-82), Syntaxin 7 (Aminosäuren 1-236), und Syntaxin 13 (Aminosäuren 1-250) wurden mithilfe der Primer SybHomfwpGEX(BamHI), SybHombapGEX(SER1), CBpGEXfwBam, CBpGEXbwXho, sx7 fw BamHI, Sx7pET28bwXho, Sx12pGEXfwXma und Sx12pET28/pGEXbwXho(STOP) hergestellt. Die PCR-Produkte wurden in den pGEX2T Vektor kloniert.

Die zytosolischen Domänen von Syntaxin 7 (Aminosäuren 1-236) und Syntaxin 13 (Aminosäuren 1-250) wurden in den pET28a Vektor (Novagen), der eine Thrombinschnittstelle zum Entfernen eines N-terminalen His₆-tag besitzt, kloniert. Dabei wurden die Primer Sx7pET28fwNde, Sx7pET28bwXho, Sx12pET28fwNde und Sx12pET28/pGEXbwXho(STOP) benutzt.

Das zytosolische Fragment von Syntaxin 8 (Aminosäuren 1-213) wurde in den pET30b Vektor, der eine Enterokinaschnittstelle zum Entfernen eines N-terminalen His₆-tag besitzt, kloniert. Dabei wurde ein NcoI/EcoRI Fragment aus pBK45 ausgeschnitten und in den pET30b Vektor (Novagen), der mit denselben Enzymen vorbereitet wurde, eingefügt. Das zytosolische Fragment von Syntaxin 2 (Aminosäuren 1-265) wurde in den pHO2c Vektor (Fasshauer *et al.*, 1997), der eine C-terminale His₆-Sequenz enthält, kloniert.

Die SNARE Motive von Vti1b (Aminosäuren 130-206), Syntaxin 7 (Aminosäuren 159-236) und Syntaxin 8 (Aminosäuren 136-213) wurden in den pET28a Vektor kloniert. Dabei wurden zur PCR Amplifikation die Primer vti1a130ndepETfw, MASol, sx7/159ndepET28fw, Sx7pET28bwXho, sx8/136ndepET28fw und sy8-sol benutzt.

2.3 Reverse Transkriptase PCR

Gesamt RNA wurde aus je 200mg Rattengewebe (Zerebellum, Cortex, Hippocampus, Lunge, Leber, Niere und Milz) mit TRIZOL Reagenz isoliert. Dabei wurde das Gewebe in 2ml TRIZOL Reagenz in einem Glas-Teflon Homogenisator (6×2000rpm) homogenisiert, die Proben 5min bei Raumtemperatur inkubiert, 0,4ml Chloroform zugegeben und nach kräftigem Durchmischen nochmals 3min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Phasentrennung wurde 15min bei 8000×g_{av} (10.000rpm, Biofuge Fresco) bei 4°C zentrifugiert, die wäßrige Phase abgenommen und aus dieser die RNA durch Zugabe von 1ml Isopropanol ausgefällt. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 10min bei 8000×g_{av} (10.000rpm) bei 4°C zentrifugiert und das Pellet zweimal mit 75%igen Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 200µl Wasser resuspendiert und die Konzentration an RNA über die Absorption bei 260nm bestimmt (1OD₂₆₀=40mg/ml). 5mg RNA wurde als Matrix für 20µl RT-PCR eingesetzt, wobei das Superscript II Kit von Life Technologies eingesetzt wurde. Ein Zehntel dieses Produkts wurde als Matrix für die spezifischen PCRs eingesetzt.

2.4 Proteinaufreinigung

Alle rekombinanten Proteine wurden als His₆- oder GST-getaggte Fusionsproteine in *E. coli* BL21(DE3) Zellen nach Standardprotokollen exprimiert und durch Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose bzw. GSH-Sepharose gereinigt. Die Tags wurden durch Spaltung mit Thrombin entfernt mit Ausnahme aller Vti1a-Konstrukte, der zytosolischen Fragmente von Syntaxin 8 und Vti1b. Aufgrund einer proteasesensitiven Region in Syntaxin 8 waren wir nicht in der Lage, die zytosolische Domäne des Proteins ohne tag zu gewinnen. Die Proteine wurden durch Ionenaustauschchromatographie weiter aufgereinigt. Dabei wurde für Endobrevin, Synaptobrevin 2 und das SNARE Motiv von Vti1b (Aminosäuren 130-206) eine Mono-S, in allen anderen Fällen eine Mono-Q-Säule verwendet. Es wurden lineare Gradienten von 0-1M NaCl in 20mM Tris-HCl/1mM EDTA/1mM DTT verwendet.

Für die Aufreinigung der zytoplasmatischen Komplexe wurden äquimolare Mengen von Syntaxin 7 (Aminosäuren 1-236), Syntaxin 8 (Aminosäuren 1-213 mit der N-terminalen Sequenz die den His₆-tag enthält), Vti1b (Aminosäuren 1-206 mit der N-terminalen Sequenz die den His₆-tag enthält) und Endobrevin (Aminosäuren 1-74) über Nacht bei 4°C inkubiert. Für die Aufreinigung der Kernkomplexe wurden äquimolare Mengen der SNARE Motive von Endobrevin (Aminosäuren 1-74), Syntaxin 8 (Aminosäuren 136-213), Syntaxin 7 (Aminosäuren 159-236) und Vti1b (Aminosäuren 130-206) über Nacht bei 4°C inkubiert. Beide Komplexe wurden über Anionenaustauschchromatographie an einer Mono-Q-Säule gereinigt.

Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie Blue analysiert. Die Hauptfraktionen wurden vereinigt und gegen Standardpuffer (20mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT) dialysiert. Alle Proteine waren mindestens zu 95% rein.

Rekombinantes NSF und α -SNAP wurde gereinigt wie beschrieben (Hanson *et al.*, 1995).

2.5 Antikörper

Antiseren wurden in Kaninchen gegen rekombinantes SNAP-29, lösliches Syntaxin 7 (Aminosäuren 1-236) lösliches Syntaxin 13 (Aminosäuren 1-250), lösliches Endobrevin, die als GST-Fusionsproteine generiert wurden, durch Thrombin gespalten und durch Ionenaustauschchromatographie vom GST abgetrennt wurden, erzeugt. Für die Gewinnung von Antiseren gegen Syntaxin 8, Vti1a und Vti1b wurden GST-Fusionproteine in Kaninchen injiziert, nämlich GST-Syntaxin 8 (Aminosäuren 1-213, pBK45), GST-Vti1a (Aminosäuren 1-187, pBK10), GST-Vti1b (Aminosäuren 1-207, pBK9).

Die folgenden Antikörper wurden schon früher beschrieben: Cellubrevin (Kaninchenserum R54 (Annaert *et al.*, 1997)), Rab5 (Kaninchenserum R6 und monoklonaler Antikörper, Cl 621.3 (Fischer von Mollard *et al.*, 1994a)), Synaptophysin (Kaninchenserum G96 und monoklonaler Antikörper, Cl 7.2 (Jahn *et al.*, 1985)), Synaptobrevin 2 (monoklonaler Antikörper, Cl 69.1 (Edelmann *et al.*, 1995)), Rab3a (monoklonaler Antikörper, Cl42.2 (Matteoli *et al.*, 1991), SNAP-25 (monoklonaler Antikörper, Cl 71.2 (Bruns *et al.*, 1997)).

Die folgenden Antikörper wurden von anderen Laboren zur Verfügung gestellt: Syntaxin 1 (monoklonaler Antikörper, HPC-1, von Dr. C. Barnstable, New Haven) (Barnstable *et al.*, 1985), Sec61 α (Kaninchenserum, von Dr. E. Hartmann, Göttingen) (Görlich *et al.*, 1992), VAMP-4 (Kaninchenserum, von Dr. R. Scheller, Stanford)

(Steegmaier *et al.*, 1999), VAMP-7 (Kaninchenserum, von Dr. R. Scheller, Stanford) (Advani *et al.*, 1999). LIMP-II (Kaninchenserum und monoklonaler Antikörper, von Dr. Y. Tenaka, Fukuoka) (Barriocanal *et al.*, 1986), MPR46 (Kaninchenserum MSC1, von Dr. A. Hille-Rehefeld, Göttingen) (Hille-Rehefeld, 1995).

Kommerziell erhältlich waren: SCAMP (Kaninchenserum, Synaptic Systems, Göttingen), Syntaxin 6 (monoklonaler Antikörper, Transduction Laboratory). Hybridomazelllinien zur Herstellung von myc- und HA-spezifischen Antikörpern wurden von ATCC bezogen.

Affinitätsgereinigte Antikörper wurden aus den entsprechenden Seren hergestellt: Vti1a, Vti1b, Syntaxin 8 mittels Affigel 10 Säulen, an das His₆-Vti1a (Aminosäuren 1-187, pBK39), His₆-Vtib (Aminosäuren 1-207) bzw. GST-Syntaxin 8 durch kovalente Bindung gekoppelt war.

Vti1a Antiserum, das spezifisch für den N-Terminus oder C-Terminus von Vti1a war wurde durch Affinitätsreinigung mit rekombinanten GST-Vti1a (Aminosäuren 1-114) oder GST-Vti1a (Aminosäuren 115-192) das an CNBr-Sepharose gekoppelt war, gereinigt. Die affinitätsgereinigten Antikörper waren spezifisch für ihre Proteinhälften, d.h. die gegen den N-Terminus gerichteten Antikörper erkannten im Western Blot GST-Vti1a (Aminosäuren 115-192) nicht, die gegen den C-Terminus gerichteten Antikörper erkannten GST-Vti1a (Aminosäuren 1-114) nicht.

Für die Affinitätsaufreinigung von Antikörpern gegen Cellubrevin und SNAP-29 wurde GST-Cellubrevin bzw. GST-SNAP-29 an CNBr-Sepharose gekoppelt. Für die Affinitätsaufreinigungen von Endobrevin, Syntaxin 7 und Syntaxin 13 Seren wurden die zytosolischen Domänen von Endobrevin (Aminosäuren 1-74 mit einem C-terminalen His₆-tag), Syntaxin 7 (Aminosäuren 1-236 aus pET28 nach Abspaltung des His₆-tags) und Syntaxin 13 (Aminosäuren 1-250 aus pET28 nach Abspaltung des His₆-tags) an CNBr Sepharose gekoppelt. Kaninchenserum gegen Synaptophysin wurde affinitätsgereinigt wie beschrieben (Navone *et al.*, 1986).

2.6 Herstellung von Fab-Fragmenten

Affinitätsaufgereinigte Antikörper gegen Endobrevin, Synaptophysin, Syntaxin 7, Syntaxin 8, Vti1a, Vti1b und Cellubrevin wurden mit an Agarose gekoppeltem Papain für 90min bei 37°C in PBS (Phosphate buffered saline: 137mM NaCl, 3mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄ pH7,4), das 1mM EDTA und 10mM Cystein enthielt, gespalten (0.8mg Beads pro 1mg IgGs). Die Agarose wurde durch 5minütige Zentrifugation bei 14,000×g_{av} (13,000rpm, Biofuge Fresco) abgetrennt und der Überstand mit 2µg/ml Antipain und 0,5mM PMSF versetzt. Die Fab-Fragmente wurden durch Anionenaustauschchromatographie an einer Mono-Q-Säule an einem FPLC System aufgereinigt (0-500mM NaCl in 20mM Tris-HCl pH8.5). Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und Immunoblotting auf Fab-Fragmente und unverdaute IgGs untersucht. Die Fab-Fragmente enthaltenden Fraktionen waren frei von IgGs, IgMs oder sonstigen Produkten der Spaltung. Bei Tests mit seriellen Verdünnungen im Immunoblot zeigten die gereinigten Fab-Fragmente eine Affinität vergleichbar mit den unverdauten IgGs.

2.7 Organellenisolierung

Synaptische Vesikel wurden isoliert wie beschrieben (Huttner *et al.*, 1983), Clathrin coated Vesikel wurden gereinigt wie beschrieben (Maycox *et al.*, 1992). Zur

Immunisolierung von Organellen wurden monoklonale Antikörper gegen Synaptobrevin 2 (69.1), Rab3a (42.2), Rab5 (621.3) und polyklonale affinitätsgereinigte Antikörper gegen Endobrevin kovalent an Eupergit C1Z Methacrylat Mikrobeads gekoppelt wie beschrieben (Burger *et al.*, 1989).

Für die Immunisolierung mittels Mikrobeads aus Gehirn wurde Rattenhirn in 25ml Homogenisierungspuffer (320mM Saccharose, 50mM HEPES pH7.4, 1mM EDTA, 0.1mM GTP γ S und PI-Mix (10 μ g/ml Soybean Trypsin Inhibitor, 1 μ g/ml Pepstatin, 11 μ g/ml Benzamidin, 1 μ g/ml Antipain, 1 μ g/ml Leupeptin, 0,1mM PMSF) in einem Glas-Teflon Homogenisator (10 \times 1000rpm) homogenisiert. Postnuklearer Überstand (PNS) wurde durch Zentrifugation bei 1000 \times g (3000rpm, SS34-Rotor) für 10min generiert. Um Myelin aus der Präparation zu entfernen, das unspezifisch an das Beadmaterial bindet, wurde der PNS noch einmal für 30min bei 50.000 \times g_{av} (20.500rpm, SS34-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Proteinkonzentration von 1mg/ml eingestellt, und 800 μ l wurde mit 20 μ l der entsprechenden Beads bei 4°C für eine Stunde inkubiert. Die Inkubation wurde auf ein Kissen von 500 μ l 0.8M Saccharoselösung überschichtet und 5min bei 4.800 \times g_{av} (7000rpm, Biofuge Fresco) zentrifugiert. Der Überstand wurde 30min bei 200.000 \times g_{av} (70.000rpm, TLA100.3 Rotor) zentrifugiert um ungebundene Membranen zu pelletieren. Das Beadmaterial wurde fünfmal mit PBS gewaschen. Aliquots von jeder Probe sowie des Ausgangsmaterials wurden durch SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert.

Für die Immunisolierung aus Leber wurde Rattenleber in 25ml Homogenisierungspuffer in einem Glas-Teflon-Homogenisator (5 \times 600rpm) homogenisiert. Postnuklearer Überstand (PNS) wurde durch Zentrifugation bei 1000 \times g_{av} (3000rpm, SS34-Rotor) für 10min generiert. Der PNS wurde auf eine Proteinkonzentration von 0.5mg/ml eingestellt, und 400 μ l hiervon mit 20 μ l der entsprechenden Beads bei 4°C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde wie oben verfahren.

Eine angereicherte Membranfraktion aus verschiedenen Geweben aus Ratte wurde für das Austesten der Antiseren, und aus Rattenleber für die Koimmunpräzipitationsstudien zur Charakterisierung des endosomalen SNARE Komplexes verwendet. Dazu wurden die entsprechenden Organe in Homogenisierungspuffer (320mM Saccharose, 50mM Tris-HCl pH7.4, 1mM EDTA, 0.1mM PMSF) in einem Glas-Teflon-Homogenisator (10 \times 1000rpm) homogenisiert (5ml Puffer pro Gramm Feuchtgewicht). Postnuklearer Überstand wurde durch Zentrifugation bei 1000 \times g_{av} (3000rpm, SS34-Rotor) für 10min generiert. Der Überstand wurde für 1h bei 200.000 \times g_{av} (70.000rpm, TLA100.3 Rotor) zentrifugiert und das entstandene Pellet in 50mM Tris-HCl pH7.4, 1mM EDTA, 0.1mM PMSF resuspendiert.

2.8 Immunpräzipitationen

Für die Koimmunpräzipitationsstudien zur Charakterisierung des endosomalen SNARE Komplexes wurde eine angereicherte Membranfraktion aus Leber (siehe oben) in Extraktionspuffer (50mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1mM PMSF, 1% Triton X-100) bei einer Proteinkonzentration von 0.3mg/ml für 1h bei 4°C solubilisiert. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation von 10min bei 200.000 \times g_{av} (70.000rpm, TLA100.3 Rotor) entfernt. Für die Immunpräzipitation wurde ein Überschuß an Antikörper je Aliquot eingesetzt, um eine möglichst

vollständige Depletion des entsprechenden Antigens aus dem Überstand zu erreichen. Nach 2h bei 4°C wurde 50µl einer Suspension, die 50% Protein A-Sepharose enthielt, zugegeben und noch einmal für 1h inkubiert. Aus dem ungebundenem Material wurden die Proteine ausgefällt (Wessel und Flügge, 1984), das an die Sepharose gebundene Material wurde nach achtmaligen Waschen mit Extraktionspuffer mit SDS-Probenpuffer eluiert.

NRK (narural rat kidney)-Zellen wurden in DMEM Medium mit 10% fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin bei 5% CO₂ und 37°C bei 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert und durch Elektroporation transfiziert wie beschrieben (Lang *et al.*, 1997). Nach 48h wurden die Zellen geerntet und im fünffachen Volumen 280mM Saccharose, 50mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA, 0.1mM PMSF in einem Kugel-Homogenisator (0.0009 inch Spaltbreite, 20 Passagen) homogenisiert. Eine angereicherte Membranfraktion wurde wie oben generiert. Die Proben wurden solubilisiert und zentrifugiert wie oben beschrieben. Sofern angegeben, wurden Membranen von verschiedenen Kombinationen transfizierter Zellen vor dem Solubilisieren gemischt. Immunpräzipitationen wurden mit Antikörpern, die gegen das myc- oder HA-Epitop gerichtet waren, ausgeführt wie oben beschrieben.

Für die Immunpräzipitationen aus Gehirn wurde eine synaptosomale Fraktion (P2) in Extraktionspuffer bei einer Proteinkonzentration von 0.5mg/ml wie oben solubilisiert und zentrifugiert. Die Immunpräzipitation wurde durchgeführt wie oben beschrieben. Die Immunpräzipitate und 30% des ungebundenen Materials wurde durch SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert. Für die Detektion von SNAP-25 wurde ein Anti-Maus-Fc Antikörper als sekundärer Antikörper verwendet um eine Kreuzreaktivität mit der leichten Kette der IgGs auszuschließen

2.9 Bindung von NSF und α -SNAP an den SNARE Komplex

Um einen Vti1a- β enthaltenden 20S Komplex zu detektieren wurde vorgegangen wie beschrieben (Söllner *et al.*, 1993a), wobei eine LP2 Fraktion, die synaptische Vesikel angereichert enthält, aus Rattenhirn statt eine Homogenats aus Rinderhirn als Ausgangsmaterial benutzt wurde. LP2 Fraktion (0,5 mg/ml Proteingehalt) wurde in 20mM Hepes, pH7.4, 100mM KCl 1mM EDTA 0.5% Triton X-100 für 1h bei 4°C solubilisiert. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation für 10min bei 200.000 \times g_{av} (70.000rpm, TLA100.3-Rotor) entfernt. 1ml des Überstandes wurden mit 0,3µM rekombinanten NSF und 0,9µM rekombinanten α -SNAP bei 4°C für 1h inkubiert und auf einen 10-35% (w/v) Glyceringradienten im obigen Puffer überschichtet und 19h bei 200.000 \times g_{av} (40.000rpm, SW41 Rotor) zentrifugiert. 1ml Fraktionen wurden abgenommen, der Glyceringehalt refraktometrisch bestimmt und die Proteine durch TCA Präzipitation aufkonzentriert und vom Detergenz getrennt, und durch SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert. In einer Kontrollreaktion wurde kein rekombinantes NSF und α -SNAP zugegeben.

2.10 Dissoziation von SNARE-Komplexen

LP2 Fraktion in einer Proteinkonzentration von 0.5mg/ml wurde mit 3µM NSF, 9µM α -SNAP, 3mM MgCl₂ und 3mM ATP in 50mM Hepes pH7.4 für 10min bei 30°C präinkubiert. Dann wurde Trypsin zugegeben (0,05mg/ml Endkonzentration) und die Proben 15min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100µg/ml Soybean-Trypsininhibitor und 1mM PMSF abgebrochen. Die Proben wurden mit

SDS-Probenpuffer versetzt und sofort 5min auf 100°C erhitzt und durch SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert. In Kontrollreaktionen wurde NSF und α -SNAP weggelassen, oder ATP durch 3mM ATP γ S, oder MgCl₂ durch 10mM EDTA ersetzt. Bei der Dissoziation des zytoplasmatischen und des endosomalen Kernkomplexes wurde 5 μ M des entsprechenden Komplexes mit 4 μ M NSF, 36 μ M α -SNAP, 3mM MgCl₂ und 3mM ATP für 30min bei 30°C in Standardpuffer inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet, und die Proben durch SDS-PAGE und Immunoblotting mit einem gegen Endobrevin gerichteten Antikörper auf die Anwesenheit von SDS-resistenten Komplexen analysiert.

2.11 Limitierte Proteolyse der zytoplasmatischen SNARE-Komplexe

100 μ g des zytoplasmatischen Komplexes wurde 30min mit 1 μ g Trypsin inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1mM PMSF abgebrochen, und die Proteine durch Gelfiltration über eine Superdex 75 PC 3.2/30 Säule aufgetrennt. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE mit und ohne Erhitzen der Proben analysiert.

2.12 Bildung von gemischten Komplexen

Gereinigte SNARE Motive der neuronalen SNAREs, das sind Synaptobrevin 2 (Aminosäuren 1-96), SNAP-25 (Aminosäuren 1-83), SNAP-25 (Aminosäuren 120-206) und Syntaxin 1 (Aminosäuren 180-262), und der endosomalen SNAREs, das sind Endobrevin (Aminosäuren 1-74), Syntaxin 8 (Aminosäuren 136-213), Syntaxin 7 (Aminosäuren 159-236) und Vti1b (Aminosäuren 130-206), wurden bei einer Endkonzentration von 6 μ M in Standardpuffer in den angegebenen Mischungen über Nacht inkubiert. Anschließend wurde durch SDS-PAGE die Bildung von SDS-resistenten SNARE-Komplexen analysiert.

2.13 Inhibition der in vitro Bildung von SNARE Komplexen durch Antikörper

Es wurde in dieser Arbeit zweimal die inhibitorische Wirkung von Fab-Fragmenten auf die Bildung von Endobrevin enthaltende SNARE Komplexen untersucht, und zwar auf die Bildung eines gemischten Komplexes (3.1.3) und auf die Bildung des endosomalen Komplexes (3.2.4).

Im ersten Fall wurde 0,05 μ M rekombinantes Endobrevin (Aminosäure 1-74) mit 0,06 μ M affinitätsaufgereigtem IgG oder 0,06 μ M Fab-Fragmenten, die gegen Synaptophysin oder Endobrevin gerichtet waren, für 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 0,05 μ M aufgereinigter sogenannter binärer Komplex (bestehend aus SNAP-25 und Syntaxin 1 zugegeben und 10h bei 4°C inkubiert. Die Bildung des SDS-resistenten Komplexes aus Endobrevin, SNAP-25 und Syntaxin 1 wurde durch SDS-PAGE und Immunoblotting mit einem gegen Syntaxin 1 gerichteten monoklonalen Antikörper (HPC-1) untersucht.

Im zweiten Fall wurden rekombinante SNARE Motive des endosomalen Kernkomplexes in PBS für 1h auf Eis mit einem 10- bzw. 30-fachen molaren Überschuß an Fab-Fragmenten, die gegen das entsprechende Protein gerichtet waren, inkubiert. Anschließend wurden die drei fehlenden SNARE-Motive zu jedem Ansatz hinzugegeben und die Proben 10h bei 4°C inkubiert. Endkonzentration war 0,06 μ M für die SNARE Motive und 0,6 μ M bzw. 1,8 μ M für die Fab-Fragmente. Die Reaktion wurde durch Zugabe von SDS-Probenpuffer ohne DTT beendet, und die Bildung der SDS-resistenten Kernkomplexe durch SDS-PAGE und Immunoblotting mit gegen

Endobrevin gerichteten Antikörpern untersucht. Dabei wurde als sekundärer Antikörper ein Anti-Kaninchen-Fc-Antikörper verwendet, um eine Kreuzreaktivität mit der leichten Kette der Fabs auszuschließen. In Kontrollreaktionen wurde Endobrevin entweder ohne oder mit gegen Cellubrevin oder Synaptophysin gerichteten Fab-Fragmenten präinkubiert.

2.14 Peroxidase-Diaminobenzidin (DAB)-H₂O₂ Reaktion

Fluid phase Internalisierung von Meerrettichperoxidase in BHK-21 (bovine hamster kidney) Zellen und das Ernten der Zellen wurde durchgeführt wie beschrieben (Link *et al.*, 1993). Die Zellen wurden im fünffachen Volumen 250mM Saccharose, 4mM Hepes pH7.2 in einem Kugel-Homogenisator (0.0009 inch Spaltbreite, 8 Passagen) homogenisiert. Die Homogenate wurden bei $1800 \times g_{av}$ (3000rpm, Biofuge Fresco) für 15min zentrifugiert. Die Diaminobenzidin (DAB) Behandlung wurde modifiziert nach Stoorvogel *et al.* (Stoorvogel *et al.*, 1988). Zwei 1ml Aliquots des postnukleären Überstandes wurden für 15min mit 0,33mg/ml DAB bei Raumtemperatur inkubiert und dann mit 12.5mM Thimerosal versetzt. Ein Aliquot wurde mit 0,0375 H₂O₂ versetzt, um die Reaktion zu starten. Nach 5min Inkubation bei Raumtemperatur wurde nochmals H₂O₂ zugegeben (0,005%) und 15min inkubiert. Die Proben wurden dann auf Eis gesetzt, auf 1,2mM EDTA eingestellt und auf einen kontinuierlichen 0,3-2M Saccharosegradienten in 4mM Hepes pH7,2 1,2mM EDTA aufgetragen. Nach Zentrifugation für 19h bei $200.000 \times g_{av}$ (40.000rpm, SW41 Rotor) wurden 0,8ml Fraktionen von oben abgenommen, die Proteine durch Präzipitation (Wessel und Flügge, 1984) aufkonzentriert und durch SDS-PAGE und Immunoblotting auf Rab5 und Endobrevin analysiert. Die Bandenintensitäten der Chemiluminiszenz wurden im Fuji LAS 1000 System quantifiziert, der Saccharosegehalt wurde über den Brechungsindex bestimmt.

2.15 Zellfreier Fusionsassay

Um die Fusion von Endosomen zu messen, wurden ein Aliquot von Zellen mit biotinylierter Meerrettichperoxidase ein anderes mit Avidin inkubiert, so daß diese fluid phase Marker internalisiert werden konnten. Wenn PNS-Präparationen von diesen mit den beiden komplementären Markern markierten Zellen inkubiert werden, bildet sich bei der Fusion von Endosomen ein stabiler Komplex zwischen Avidin und der biotinylierten Peroxidase, der nach Immunpräzipitation quantifiziert werden kann. Die Internalisierung der Fluid phase Marker zur Markierung der frühen Endosomen von PC12 Zellen (eine Pheochromozytom-Zelllinie aus Rattennebennierenzellen) wurde durchgeführt wie beschrieben (Holroyd *et al.*, 1999; Link *et al.*, 1993). Für späte Endosomen wurde die Inkubationszeit auf 20min erhöht, die Zellen fünfmal 5min mit PBS mit 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂ und 0,5% BSA gewaschen und für 60min in markerfreiem Medium mit 0,2% BSA inkubiert.

Die Versuche zur homotypischen Fusion von frühen und von späten Endosomen wurden durchgeführt wie für frühe Endosomen beschrieben (Holroyd *et al.*, 1999), wobei das Reaktionsvolumen auf ein Endvolumen von 200µl erhöht wurde. Für die Inhibierungsversuche mit Fab-Fragmenten wurden beide PNS-Fraktionen einzeln mit 6µg Fab bei 37°C für 10min präinkubiert, bevor sie vereinigt wurden und die Fusionsreaktion initialisiert wurde. Für die Inhibierungsversuche mit rekombinanten Protein wurden die PNS-Fraktionen mit 30µM rekombinantem Protein präinkubiert.

2.16 Mikroinjektion von Fab-Fragmente in HeLa-Zellen

HeLa-Zellen (humane Cervixcarcinom-Zelllinie) wurden in DMEM Medium mit 10% fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin bei 5% CO₂ und 37°C bei 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für die Mikroinjektion wurden die Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen (100µg/ml in Wasser für 1h, dann dreimal mit Wasser waschen) für 24h wachsen gelassen, so daß sie 50% konfluent waren. Fab-Fragmente, die gegen 20mM Tris-HCl pH 7.4 dialysiert worden waren, wurden mit 25µg/ml DAPI versetzt und in die Zellen mikroinjiziert (Eppendorf Transjector 5246, Injektionsdruck 425hPa, Injektionszeit 0,5s, Basisdruck 75hPa). Die Zellen wurden 1h bei 37°C in DMEM-Medium, das mit 0,1% (w/v) BSA versetzt war, inkubiert. Um den endozytotischen Weg zu markieren wurden die Zellen für 1h bei 4°C in 1µg/ml Texas-Red-EGF in 0,1% BSA/DMEM inkubiert. Die Zellen wurden fünfmal mit PBS gewaschen und in 0,1% BSA/DMEM für 1h bzw. 3h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, für 1h auf Eis mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert und im Immunfluoreszenzmikroskop analysiert.

2.17 Sonstige Methoden

SDS-PAGE wurde durchgeführt wie beschrieben (Laemmli, 1970). Wenn die Bildung eines SDS resistenten Komplexes analysiert werden sollte, wurden die Proben in SDS-Probenpuffer aufgenommen (Endkonzentration war 10mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% Saccharose, 25mM DTT) und 5min bei Raumtemperatur inkubiert oder für 5min auf 95°C erhitzt. Sofern nicht vermerkt, wurde die SDS-PAGE mit 15%igen Gelen durchgeführt. Immuoblotting wurde durchgeführt wie beschrieben (Towbin *et al.*, 1979).

CD-Messungen und MALLS-Messungen wurden durchgeführt wie beschrieben (Fasshauer *et al.*, 1999). DNA-Proben wurden durch Elektrophorese auf einem 1%igen Agarosegel in 45mM Tris-Borat 1mM EDTA (TBE) analysiert.

Immunfluoreszenz an Hippocampuschnitten wurde durchgeführt wie beschrieben (Takamori *et al.*, 2000), Immunfluoreszenz an kultivierten Hippocampusneuronen wurde nach einem Standardprotokoll (Hannah *et al.*, 1998) mit Triton X-100 als Detergenz durchgeführt. Die Färbungen wurden am konfokalen Mikroskop (LSM-410-Invert, Zeiss) analysiert. Die Neuronen waren zu dem Zeitpunkt drei Wochen in Kultur wie beschrieben (Rosenmund *et al.*, 1995). Immunogold-Elektronenmikroskopie an ultradünnen Gefrierschnitten wurde nach der Methode nach Tokoyasu (Slot und Geuze, 1985; Tokuyasu, 1973) wie beschrieben (Tikkanen *et al.*, 2000) durchgeführt. Sequenzvergleiche wurden mit ClustalW-alignment (<http://clustalw.genome.ad.jp/>) mit folgendne Parametern durchgeführt: ktup: 1, Window: 0, Matrix: blosum PairGap: 0.05, GapOpen: 10, GapExt: 0.05, GapDist: 0.05, EndGaps: 10.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des R-SNAREs Endobrevin

3.1.1 Identifizierung von Endobrevin

Zu Beginn dieser Arbeit waren im Säugersystem die drei Synaptobrevinisoformen Synaptobrevin 1 und 2 sowie Cellubrevin bekannt (Baumert *et al.*, 1989; McMahon *et al.*, 1993; Trimble *et al.*, 1988). Da alle drei an der Exozytose von Vesikeln an der Plasmamembran beteiligt sind (Galli *et al.*, 1994; Schiavo *et al.*, 1992), bestand die Vermutung, daß noch weitere Synaptobrevinhomologe existieren, die intrazelluläre Fusionsereignisse vermitteln könnten. Über Homologiesuche in EST-Datenbanken mit der Synaptobrevin-2-Sequenz gelang es einige mögliche Homologe zu identifizieren, von denen eines ausführlicher charakterisiert wurde. Da im Laufe dieser Studie das Protein von zwei weiteren Gruppen beschrieben wurde, die es VAMP-8 (Advani *et al.*, 1998) bzw. Endobrevin (Wong *et al.*, 1998b) bezeichnet haben, wurde der Name Endobrevin übernommen.

Basierend auf den Sequenzinformationen der verschiedenen EST-tags von Endobrevin aus der Ratte wurden Oligonukleotide entworfen, die außerhalb der kodierenden Region binden. Mit diesen konnte mittels PCR die DNA aus cDNA-Bibliotheken aus Rattenleber, aus Rattenlunge und aus Rattenniere gewonnen und subkloniert werden. Das Protein besteht aus 101 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 11,3kDa. Wie die meisten SNAREs besitzt es eine C-terminale hydrophobe Region, die putative Transmembranregion. Ein Sequenzvergleich mit Synaptobrevin 1, 2 und Cellubrevin zeigt, daß die Sequenzübereinstimmung relativ gering ist, die Aminosäuren, die die Interaktionsebenen in der Kristallstruktur des neuronalen Kernkomplexes bilden, aber konserviert sind (Abb. 4). Dies findet man auch bei anderen R-SNAREs und in den Q-SNARE Familien (Fasshauer *et al.*, 1998b).

```

sb1  MSAPPAQPPAEGTEGAAPGGPPGPPNNTTSNRRLLQQTQAQVEEVVDIIRVNVDKVLERDQK
sb2  MSATAATVPPAAP--AGEGGPPAPPNLTSNRRLLQQTQAQVDEVVDIMRVNVDKVLERDQK
cb   -----MSTGVPSGSSAATGSNRRLLQQTQNVDEVVDIMRVNVDKVLERDQK
eb   -----MEASGSAGNDRVRNLQSEVEGVKNIMTQNVVERILSRGEN

sb1  LSELDDRADALQAGASVFESSAAKIKRKYWWKMKKMMIMLGATCATTVVVIVIVYIFT----
sb2  LSELDDRADALQAGASQFETSAAKIKRKYWWKMLKMMIILGVICAIILIIIVYFST----
cb   LSELDDRADALQAGASQFETSAAKIKRKYWWKMKMWAIGTSLVIVIVIIIVVWCVS----
eb   LDHLIRNKTEDLEATSEHFKTTSSQKVARKFVWKVVKMIVITCVTVLIIIVILIIILFATGTIPT

```

Abb 4. Sequenzvergleich von Endobrevin mit Synaptobrevin 1, 2 und Cellubrevin aus Ratte

Identische Aminosäuren sind schwarz, konservierte Aminosäuren sind grau unterlegt. Die Aminosäuren, die zur Ebenenbildung im neuronalen Kernkomplex beitragen sind blau unterlegt, die 0-Ebene grün. Die putativen Transmembranregionen am C-Terminus sind rot umrahmt. sb1, Synaptobrevin 1; sb2, Synaptobrevin 2; cb, Cellubrevin; eb, Endobrevin. Genbank-Accession-numbers: sb1 U74621; sb2 M24105; cb S36380; eb AF132812.

3.1.2 Subzelluläre Lokalisation von Endobrevin

Die zytoplasmatische Region von Endobrevin (Aminosäuren 1-74) wurde in einen prokaryontischen Expressionsvektor subkloniert, um Glutathion-S-Transferase (GST)-getagtes lösliches Protein exprimieren zu können. Diese wurden nach Expression durch Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Durch

Proteolyse mit Thrombin wurde der GST-Teil von dem rekombinanten Endobrevin abgespalten. Endobrevin wurde über eine Kationenaustauschchromatographie weiter gereinigt und zur Antikörperherstellung in Kaninchen injiziert. Die Seren erkennen in allen getesteten Geweben außer dem Gehirn ein Protein von einer Mobilität von 14kDa (Abb. 5). Das Antiserum reagiert mit rekombinantem Endobrevin, nicht jedoch mit den rekombinanten Homologen Synaptobrevin 2 und Cellubrevin. Zu diesem Zeitpunkt wurde Endobrevin von zwei weiteren Gruppen beschrieben. Beide Gruppen fanden eine Gewebeverteilung, die der hier gezeigten entspricht (Advani *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 1998b). Wong *et al.* beschrieben Endobrevin als Protein, das auf frühen Endosomen lokalisiert ist. Sie machten dies an einer Kolo-kalisation mit dem Transferrin-Rezeptor fest. Advani *et al.* beschrieben dasselbe Protein als VAMP-8 und vermuteten aufgrund immunzytochemischer Daten mit VAMP-8, das mit einem aminoterminalen myc-Epitop in NRK-Zellen transfiziert wurde, eine endosomale oder lysosomale Lokalisation. Dabei konnten sie im Widerspruch zu Wong *et al.* keine Kolo-kalisation mit dem Transferrin-Rezeptor oder LAMP-1/Igp120, einem lysosomalen Markerprotein, feststellen. Sie vermuteten eine distinkte Klasse von Endosomen.

In eigenen immunzytochemischen Untersuchungen haben wir keine Kolo-kalisation mit dem Transferrin-Rezeptor feststellen können. Die subzelluläre Lokalisation von Endobrevin wurde daraufhin in Zusammenarbeit mit Dr. Ritva Tikkanen und Dr. Stefan Höning elektronenmikroskopisch untersucht. Dazu wurde die Verteilung von Endobrevin im endozytotischen Weg von der Plasmamembran zum Lysosom analysiert. NRK-Zellen wurden für 15min mit BSA-Gold als endozytotischem Marker inkubiert. Der Marker wird dabei internalisiert und in die endozytotischen Kompartimente transportiert. Die Reaktion wurde durch Fixierung der Zellen beendet.

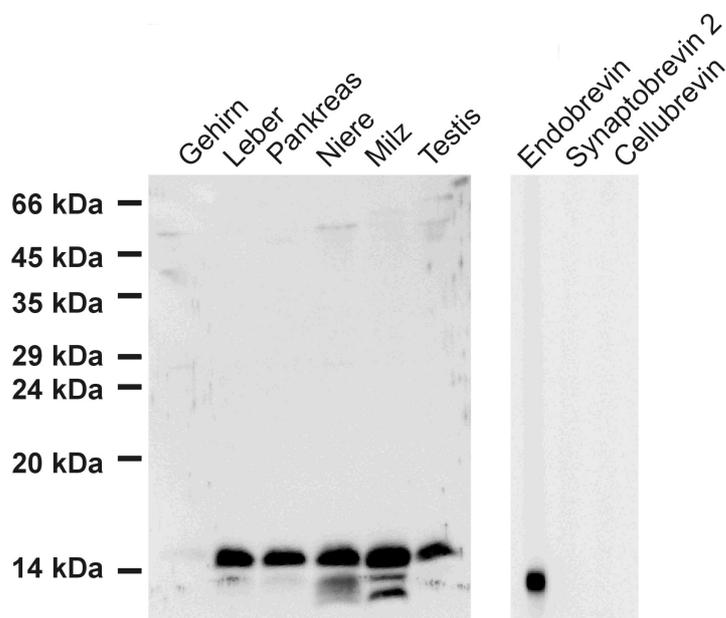


Abb. 5: Gewebeverteilung von Endobrevin und Spezifität der Seren

20µg einer angereicherten Membranfraktion aus verschiedenen Geweben (linke Seite) wurden durch SDS-PAGE und Immuoblotting analysiert. Die Spezifität des gegen Endobrevin gerichteten Anti-körper wurde mit je 40ng rekombinanten löslichem Endobrevin, Synaptobrevin 2 und Cellubrevin, die durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert waren, überprüft.

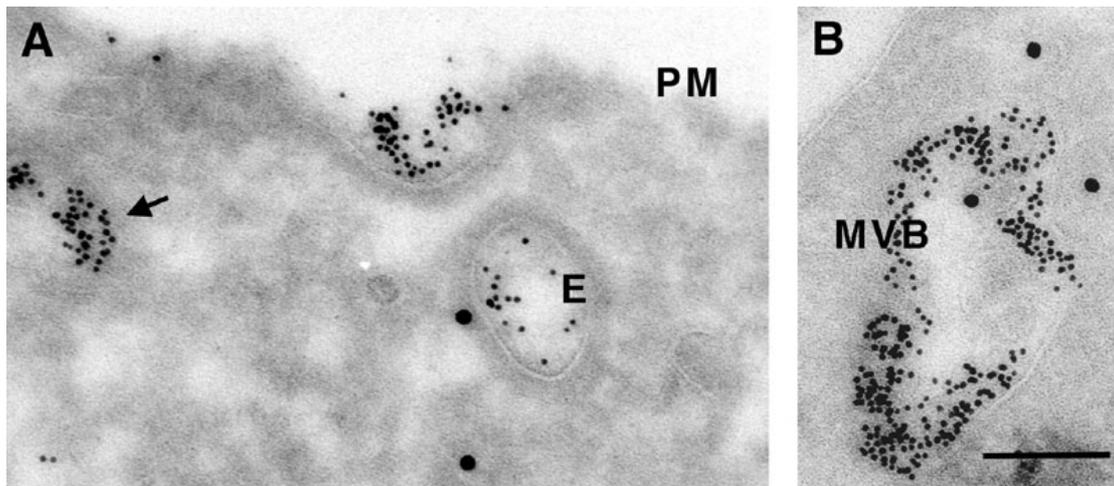


Abb. 6: Ultrastrukturelle Analyse der Lokalisation von Endobrevin

NRK-Zellen wurden 15min mit BSA-Gold (5nm) inkubiert und fixiert. Ultradünne Kryoschnitte von den Zellen wurden mit affinitätsgereinigtem Antikörper gegen Endobrevin und 15nm Protein-A-Gold immunmarkiert und mit einem Philips CM120 Elektronenmikroskop untersucht. PM, Plasmamembran; E, Endosom vom vakuolären Typ; MVB, multivesikuläre Körper. Balken, 100nm

Nach Einbettung der Zellen wurden Kryoschnitte hergestellt, mit Antikörpern gegen Endobrevin und Protein-A-Gold immunmarkiert und elektronenmikroskopisch analysiert. Endobrevin ist auf tubovesikulären Strukturen, kleinen Vesikeln (Abb. 6A) und vakuolären Endosomen zu erkennen. Dies sind Kompartimente, die relativ früh von einem endozytierten Marker erreicht werden (de Wit *et al.*, 1999). Es handelt sich dabei um frühe Endosomen in Übereinstimmung mit Wong *et al.*. Zusätzlich wurde Endobrevin auf BSA-markierten multivesikulären Körpern gefunden (Abb 6B). Endozytierte Marker erreichen diese Strukturen erst nach einer Passage durch die frühen Endosomen. Dabei handelt es sich um späte Endosomen (de Wit *et al.*, 1999).

Um einen genaueren Überblick über die Verteilung von Endobrevin zu bekommen wurden Doppelmarkierungen mit Antikörpern gegen Endobrevin und verschiedenen Markerproteinen hergestellt. Dazu wurden ultradünne Gefrierschnitte von NRK-Zellen mit Antikörpern und Protein-A-Gold markiert und elektronenmikroskopisch analysiert. Dabei zeigte sich, daß auf multivesikulären Körpern Endobrevin oft mit LIMP-II zu finden ist. LIMP-II ist ein Membranprotein, das innerhalb des endozytotischen Weges in späteren Kompartimenten angereichert ist. In NRK-Zellen wird das Protein auf seinem biosynthetischen Weg vom Trans-Golgi-Netzwerk zum Lysosom durch das endosomale Kompartiment transportiert, ohne jedoch die Plasmamembran zu passieren (Barriocanal *et al.*, 1986). Endobrevin war auf tubulovesikulären Strukturen, multivesikulären Körpern und Endosomen vom vakuolären Typ zu finden. (Tab. II, Abb 7). Die quantitative Auswertung zeigt, daß Endobrevin gleichermassen auf den tubulovesikulären Strukturen in der Nähe der Plasmamembran und sonstigen tubulären Membranstrukturen (26% und 18% der Goldpartikel), die frühe endosomale Kompartimente beinhalten, vakuolären Endosomen und multivesikulären Körpern (29% der Goldpartikel) verteilt ist. Auf späteren Kompartimenten des Weges, den multivesikulären Körpern, ist eine signifikante Überlappung mit LIMP-II festzustellen. Mehr als 70% der Endobrevin positiven Strukturen waren auch für LIMP-II markiert. Im Gegensatz dazu war nur ein geringerer Prozentsatz der Endobrevin positiven tubovesikulären Strukturen in der Nähe der Plasmamembran positiv für LIMP-II.

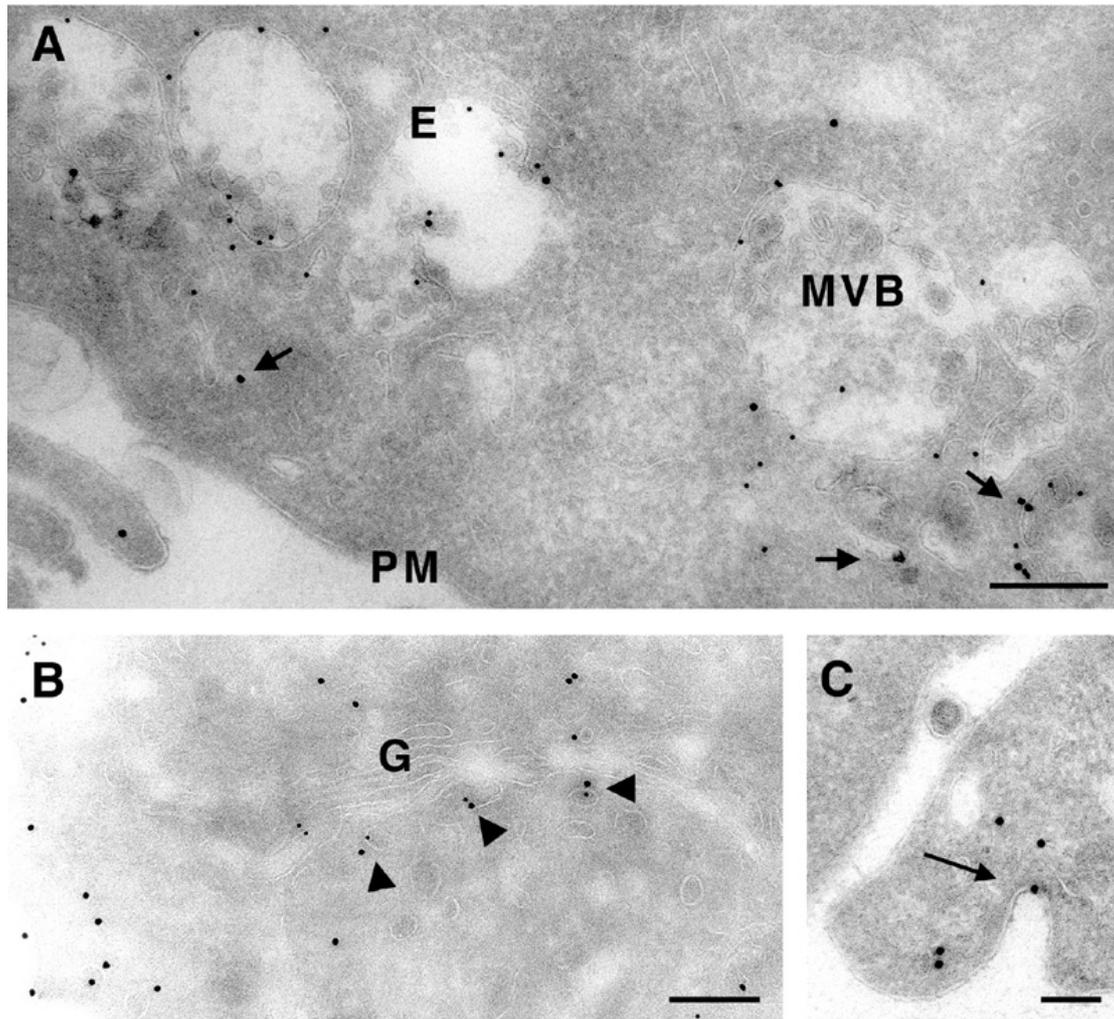


Abb. 7: Analyse der Lokalisation von Endobrevin im Vergleich zu LIMP-II und MPR46 durch Immunogold Markierung

Ultradünne Kryoschnitte von NRK-Zellen wurden mit Antikörpern gegen Endobrevin (15nm Protein-A-Gold) und entweder mit Antikörpern gegen LIMP-II (10nm Protein-A-Gold, A) oder MPR46 (10nm Protein-A-Gold, B und C) markiert. Die Schnitte wurden mit einem Philips CM120 Elektronenmikroskop analysiert. PM, Plasmamembran; E, Endosom vom vakuolären Typ; MVB, multivesikuläre Körper; G, Golgi Apparat. Balken, 100nm

Doppelmarkierungen von Endobrevin und MPR-46 zeigten beide Proteine an Trans-Golgi Netzwerk assoziierten Strukturen (Abb. 7B). Endobrevin war desweiteren markiert an der Plasmamembran und Clathrin coated pits (Abb. 7C). Das zeigt, daß Endobrevin an frühen und späten Endosomen sowie möglichen Recycling-Intermediaten wie das Trans-Golgi-Netzwerk und die Plasmamembran zu finden ist. Es ist somit deutlich weiter verteilt als ursprünglich angenommen.

Kompartiment	% Goldpartikel	von diesen %-positiv für LIMP-II	LIMP-II in NRK-Zellen
Golgi/TGN	12	0	5
tubuläre Membranstrukturen und Vesikel, die nicht zum TGN oder der Plasmamembran zugeordnet wurden	18	14	8
Tubulovesikuläre Strukturen in der Nähe der Plasmamembran	26	15	8
Plasmamembran	8	0	2
multivesikuläre Körper, vakuoläre Endosomen und assoziierte Membranstrukturen und Vesikel	29	71	72
nicht klassifiziert	7	0	5

Tab. II: Quantifizierung von Endobrevin in NRK-Zellen:

Die Zellen wurden fixiert, mit Antikörpern gegen Endobrevin und LIMP-II markiert und elektronenmikroskopisch analysiert. 34 Schnitte mit einer Gesamtzahl von 2.800 Goldpartikeln wurden ausgezählt. TGN, Trans-Golgi-Netzwerk

Um dieses Ergebnis durch einen methodisch unabhängigen Ansatz zu bestätigen wurden subzelluläre Fraktionierungen unternommen. In einem ersten Versuch wurden frühe Endosomen von BHK-21 Zellen mit dem fluid phase Marker Meerrettichperoxidase durch eine zehnmündige Inkubation geladen. Nach Homogenisierung wurde die Probe mit Diaminobenzidin versetzt und ein Teil der Probe mit Wasserstoffperoxid behandelt. Unter diesen Bedingungen katalysiert die Peroxidase die Bildung eines dichten Reaktionsprodukts, so daß die Dichte der Peroxidase enthaltenden Organellen zunimmt. Die Proben wurden auf einen linearen Saccharosegradienten aufgetragen und bis zur Gleichgewichtseinstellung zentrifugiert. Fraktionen wurden abgenommen und durch SDS-PAGE und Immunoblotting für Endobrevin und Rab5 analysiert. Rab5 dissoziiert nach der Fusion von frühen Endosomen zumindest zum Teil von der Membran und wird deswegen als ein sehr spezifischer Marker für dieses Organell angesehen (Novick und Zerial, 1997).

Wie in Abbildung 8 zu sehen ist, wird durch die Wasserstoffperoxidbehandlung ein kleiner, aber signifikanter Anteil des Endobrevins in Regionen höher Dichte verschoben. Dagegen wird Rab5 deutlich verschoben, wie es für den Marker des frühen Endosoms zu erwarten ist. Wie die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigt dieses Experiment, daß Endobrevin an frühen Endosomen zu finden ist und deswegen zum Teil verschoben wird, aber nicht der gesamte Pool von Endobrevin auf diesem Organell lokalisiert ist.

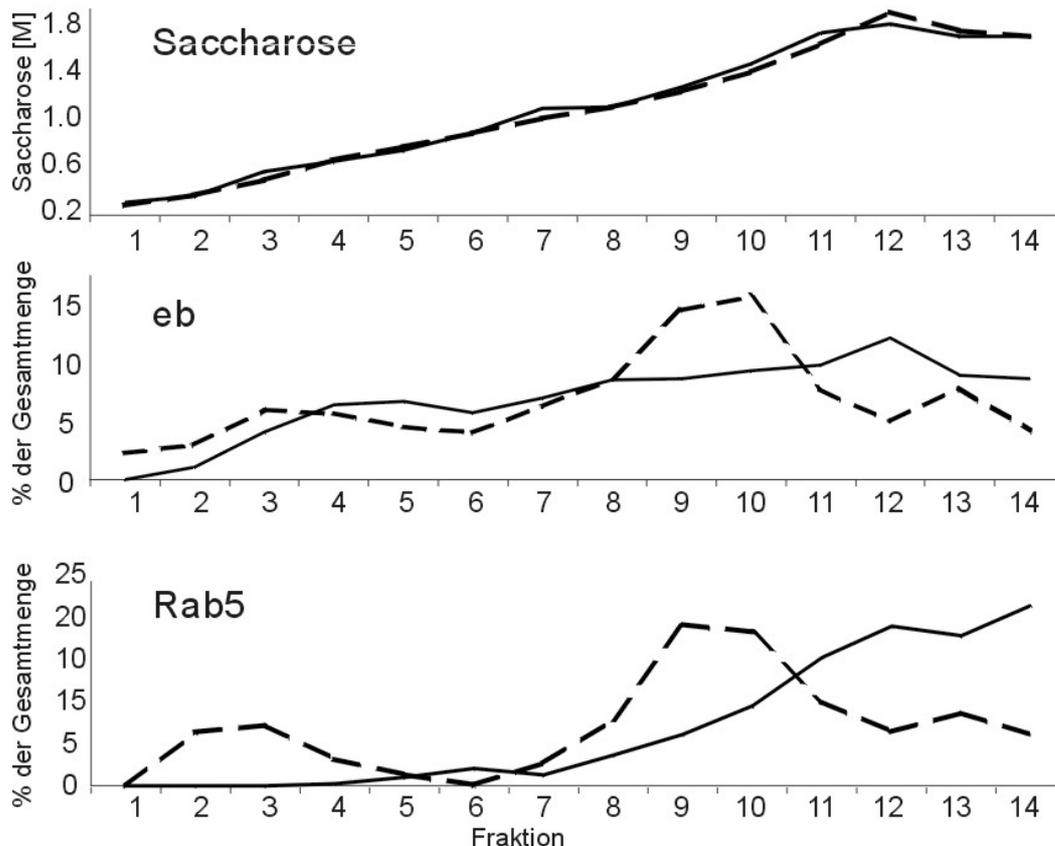


Abb. 8: Verschiebung von frühen Endosomen im Dichtegradienten nach einer Peroxidase-DAB-H₂O₂-Reaktion

Ein postnuklearer Überstand aus BHK-21-Zellen, deren frühe Endosomen durch 10-minütige Inkubation mit Meerrettichperoxidase markiert wurden, wurde mit Diaminobenzidin (DAB) und H₂O₂ (Kontrolle ohne H₂O₂) versetzt, so daß sich ein dichtes Reaktionsprodukt in Peroxidase enthaltenden Organellen bildet. Nach Gleichgewichtszentrifugation durch einen kontinuierlichen Saccharosegradienten wurden Fraktionen abgenommen und der Rab5- und Endobrevin-Gehalt quantifiziert. Durchgehenden Linie: Proben, die mit H₂O₂ versetzt waren; gestrichelte Linie: Kontrollproben ohne H₂O₂.

In einem weiteren Experiment, das in Zusammenarbeit mit Claudia Holroyd aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurde, wurden Endobrevin enthaltende Organellen immunisoliert und mit Rab5 positiven immunisolierten Organellen verglichen. Hierzu wurden für Rab5- und Endobrevin spezifische Antikörper an Methylacrylat-Mikrobeads gebunden. Diese Beads wurden anschließend mit einem postnuklearen Überstand (PNS) inkubiert, wobei die Konzentrationsverhältnisse so eingestellt wurden, daß alle Bindungsstellen gesättigt waren, also ein Überschuß von antigen-enthaltenden Membranvesikeln vorhanden war. Nach Isolierung der Beads durch Zentrifugation durch ein Saccharosekissen wurden aus dem ungebundenen Material durch Ultrazentrifugation die Membranen pelletiert und vom löslichen Material getrennt. Alle Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert. Als Referenz für unspezifische Bindung fungierten Methylacrylat-Mikrobeads, die durch Behandlung mit Glycin inaktiviert waren (Kontroll-Beads). Es wurde in früheren Arbeiten gezeigt, daß dieses Methode eine Organellisolierung von großer Reinheit mit sehr geringeren Kontaminationen durch andere subzelluläre

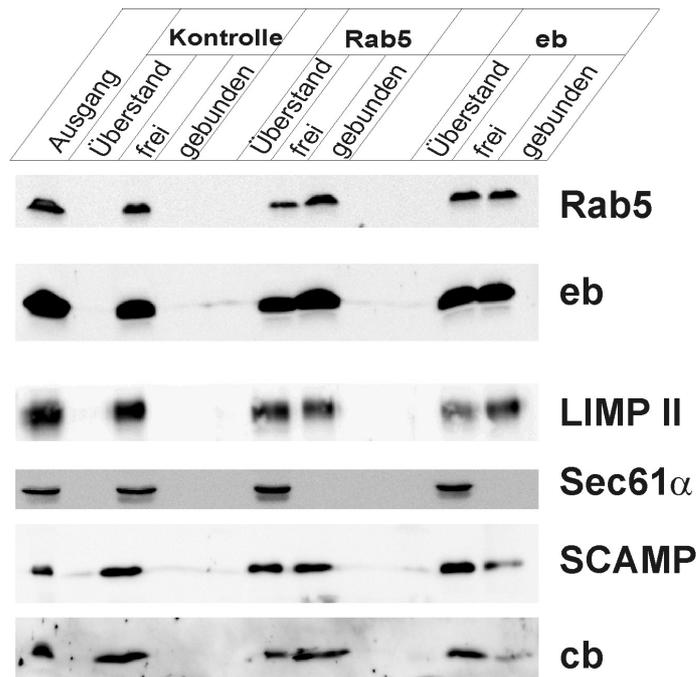


Abb. 9: Charakterisierung von Organellen, die mit Rab5- oder Endobrevin-Immunobeads isoliert wurden

Ein postnuklearer Überstand aus Rattenleber wurde mit geringen Mengen Immunobeads inkubiert, an die Antikörper gegen Rab5 oder Endobrevin (eb) kovalent gekoppelt waren. Durch Glycin inaktivierte Beads (Kontrolle) dienten als Kontrolle für unspezifische Bindung. Die Proteinzusammensetzung der an die Beads gebundenen wurde mit der der ungebundenen Membranen, die durch Ultrazentrifugation pelletiert worden waren (frei), verglichen. Alle Fraktionen wurden durch Immunoblotting analysiert. Ausgang: Postnuklearer Überstand aus dem die Immunoisolierung durchgeführt wurde, Überstand: membranfreie Überstand, der nach der Ultrazentrifugation des ungebundenen Materials erhalten wurde und konzentriert wurde (Wessel und Flügge, 1984). Ausgang, Überstand und freie Fraktionen enthalten ca. 10µg Protein/Bahn; in der gebundenen Fraktion wurde ca. 6µl Beads aufgetragen.

Fraktionen erlaubt (Burger *et al.*, 1989; Fischer von Mollard *et al.*, 1994b).

Wie in Abbildung 9 gezeigt, gelingt es mit Rab5- und Endobrevin-Beads Organellen, die das entsprechende Antigen besitzen, immunzuisolieren. Rab5-Immunistrate sind positiv für Endobrevin und Endobrevin-Immunistrate für Rab5. Dies bestätigt die Lokalisation von Endobrevin auf frühen Endosomen. Allerdings kann man mit Endobrevin-Beads relativ weniger SCAMP- und Cellubrevin-positive Organellen isolieren als mit Rab5-Beads. SCAMP (Brand und Castle, 1993) und Cellubrevin (Galli *et al.*, 1994) rezyklisieren zwischen frühen Endosomen und der Plasmamembran, sind aber nicht auf späten Endosomen angereichert. Im Gegensatz dazu ist LIMP-II, das auf späten Endosomen und Lysosomen zu finden ist, in Endobrevin-Immunistraten stärker angereichert als in Rab5-Immunistraten. Das zeigt, daß Endobrevin auch auf späteren Kompartimenten des endosomalen Weges zu finden ist, die positiv für LIMP-II sind. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der elektronenmikroskopischen Untersuchungen, wo Endobrevin auf multivesikulären Körpern zusammen mit LIMP-II gefunden wurde. Sec61α, eine Untereinheit der kotranslationalen Proteintranslokationsmaschinerie (Görllich und

Rapoport, 1993) des Endoplasmatischen Retikulums ist weder auf Rab5- noch auf Endobrevin-Beads zu finden, was die Spezifität der Methode unterstreicht. Keines der überprüften Proteine hat unspezifisch an die Kontroll-Beads gebunden. Es sei angemerkt, daß der Anteil an Membranproteinen, der an die Beads bindet, mindestens zehnfach niedriger ist als der der ungebundenen Fraktionen. Es wurde, wie oben erwähnt mit einem Unterschluß an Immunobeads gearbeitet, so daß keines der Antigene aus dem PNS depletiert wurde.

3.1.3 Identifizierung der Fusionsschritte, an denen Endobrevin beteiligt ist

In den nächsten Experimenten sollte der Frage nachgegangen werden, ob und in welche Fusionschritte Endobrevin involviert ist. Dazu mußte zunächst überprüft werden, ob die Antikörper gegen Endobrevin als Inhibitor der SNARE Funktion eingesetzt werden können. Da die Bildung eines SNARE Komplexes als ein entscheidender Schritt bei der Fusion gilt (siehe Einleitung, Abb. 1), wurde untersucht, ob die gegen Endobrevin gerichteten Antikörper die Bildung eines Kernkomplexes inhibieren können. Als diese Versuche durchgeführt wurden, waren die SNARE Partner von Endobrevin noch nicht bekannt. Es war aber gezeigt worden, daß Endobrevin Synaptobrevin 2 im neuronalen Komplexen ersetzen kann (Fasshauer *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999). Der entstandene gemischte Komplex ist dem neuronalen strukturell sehr ähnlich, da der α -helikale Anteil, SDS- und Hitzeresistenz, Stöchiometrie und Dissoziation durch NSF nicht verändert werden. Obwohl diese gemischten Komplexe physiologisch wahrscheinlich keine Relevanz besitzen, stellen sie doch ein nützliches Modell für *in vitro* Untersuchungen dar (siehe auch 3.2.5).

Rekombinantes Endobrevin wurde mit affinitätsgereinigten IgGs und Fab-Fragmenten für 15min präinkubiert und dann mit Syntaxin 1 und SNAP-25 versetzt. Die Bildung des SDS-resistenten gemischten Komplexes wurde durch SDS-PAGE und Immunoblotting detektiert. In Abbildung 10 sieht man, daß IgGs und Fab-Fragmente gegen Endobrevin die Komplexbildung inhibieren, während dies bei IgGs oder Fab-Fragmenten gegen das Protein Synaptophysin (Jahn *et al.*, 1985; Wiedenmann und Franke, 1985) nicht der Fall ist.

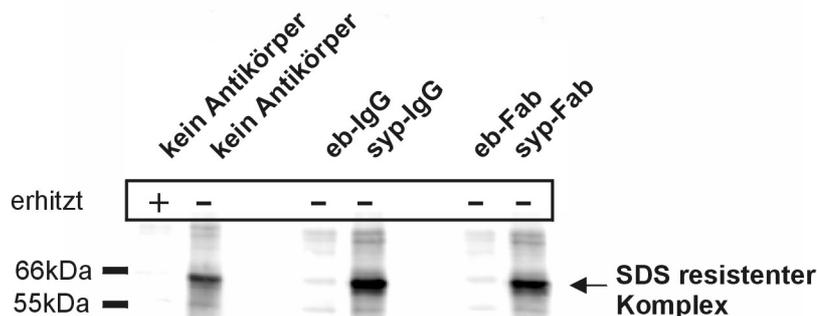


Abb. 10: Antikörper gegen Endobrevin verhindern die Bildung eines gemischten Komplexes von Endobrevin, SNAP-25 und Syntaxin 1

Rekombinantes Endobrevin wurde mit affinitätsgereinigten Antikörpern (IgG) oder Fab-Fragmenten gegen Endobrevin (eb) oder Synaptophysin (syp) präinkubiert und dann mit binären Komplex aus SNAP-25 und Syntaxin 1 versetzt. Die Bildung des SDS-resistenten gemischten Komplexes wurde durch Immunoblotting mit einem gegen Syntaxin gerichteten Antikörper detektiert. SDS-resistente Komplexe können durch Erhitzen in SDS-Probenpuffer dissoziiert werden (linke Bahn).

Als wir im Verlauf dieser Arbeit einen Endobrevin enthaltenden SNARE-Komplex identifizieren konnten, war es möglich diesen Versuch statt mit Syntaxin 1 und SNAP-25 mit den physiologisch relevanten SNARE-Partnern durchzuführen (siehe 3.2.3, Abb. 21). Dabei zeigte sich natürlich ebenfalls, daß die für Endobrevin spezifischen Fab-Fragmente die Komplexbildung inhibieren.

Weil Endobrevin auf frühen und späte Endosomen zu finden ist, bestand die Vermutung, daß das Protein an einem oder mehreren Fusionsritten an frühen und/oder späten Endosomen beteiligt ist. Diese Fusionen sind gut charakterisiert, da *in vitro* Testsysteme etabliert sind (Gruenberg und Howell, 1989). Beide Fusionsereignisse benötigen NSF und ATP und dürften deswegen von SNARE Proteinen vermittelt werden (Robinson *et al.*, 1997). Für diese Versuche, die in Zusammenarbeit mit Claudia Holroyd durchgeführt wurden, wurde die neuroendokrine Zelllinie PC12 (Greene und Tischler, 1976) verwendet, da für dieses System stringente Kontrollsystem im Labor vorhanden waren (siehe unten). PC12 Zellen wurden mit komplementären Markern durch Endozytose geladen. Dazu wurde die Hälfte der Zellen mit biotinylierter Meerrettichperoxidase, die andere Hälfte der Zellen mit Avidin inkubiert. Für die Markierung von frühen Endosomen wurde 5 Minuten mit Marker inkubiert, für das Beladen von späten Endosomen 20 Minuten gefolgt von einem 60 minütigen chase. Anschließend wurden PNS-Präparationen generiert und die Fusion durch Mischen derselben und Zugabe von ATP initiiert. Durch die homotypische Fusion bilden die endozytierten Marker einen Komplex, der mit Antikörpern gegen Avidin immunisoliert werden kann. Die Menge der immunisierten Meerrettichperoxidase kann über einen enzymatischen Test bestimmt werden und zeigt die Fusionseffizienz an. Präinkubiert man die PNS-Fraktionen vor dem Mischen mit gegen Endobrevin gerichteten Fab-Fragmenten, so beobachtete man eine deutliche Inhibierung der Fusion (Abb. 11) sowohl von frühen (ca. 50%) als auch von späten Endosomen (ca. 60%). Wenn man frühe oder späte Endosomen über einen Saccharosegradienten aufreinigte, erhielt man ähnliche Werte, nämlich 52% Inhibierung für die frühe, 65% Inhibierung für die Fusion der späten Endosomen. Als Kontrolle wurden Fab-Fragmente gegen Synaptophysin, ein abundantes Membranprotein auf Endosomen in neuroendokrinen Zellen wie den PC12 Zellen (Johnston *et al.*, 1989), eingesetzt. Diese Fab-Fragmente haben keinen Effekt auf die Fusion der späten und nur einen geringen auf die Fusion der frühen Endosomen (Abb. 11). Durch Präinkubation der Fab-Fragmente gegen Endobrevin mit stöchiometrischen Mengen von rekombinantem löslichen Endobrevin konnte die inhibitorische Wirkung aufgehoben werden.

Da SNAREs nach dem in der Einleitung vorgestellten Modell einen Komplex mit seinen SNARE Partnern bilden müssen, um die Fusion zu vermitteln (Abb. 1), wurde untersucht, ob ein Überschuß von löslichem Endobrevin als kompetitiver Inhibitor in den Fusionsversuchen wirken kann. Wie in Abbildung 11 gezeigt, inhibiert rekombinantes Endobrevin beide Fusionsreaktionen in einem ähnlichen Maß wie die Fab-Fragmente. Als Kontrolle diente lösliches rekombinantes Synaptobrevin 2, ein R-SNARE, das wie erwähnt an der Exozytose beteiligt ist und in PC12 Zellen während seines Recyclingweges auf Endosomen zu finden ist, dort aber nicht an der Fusion von frühen Endosomen beteiligt ist (Link *et al.*, 1993). Rekombinantes Synaptobrevin 2 konnte die Fusion von frühen und späten Endosomen nicht inhibieren.

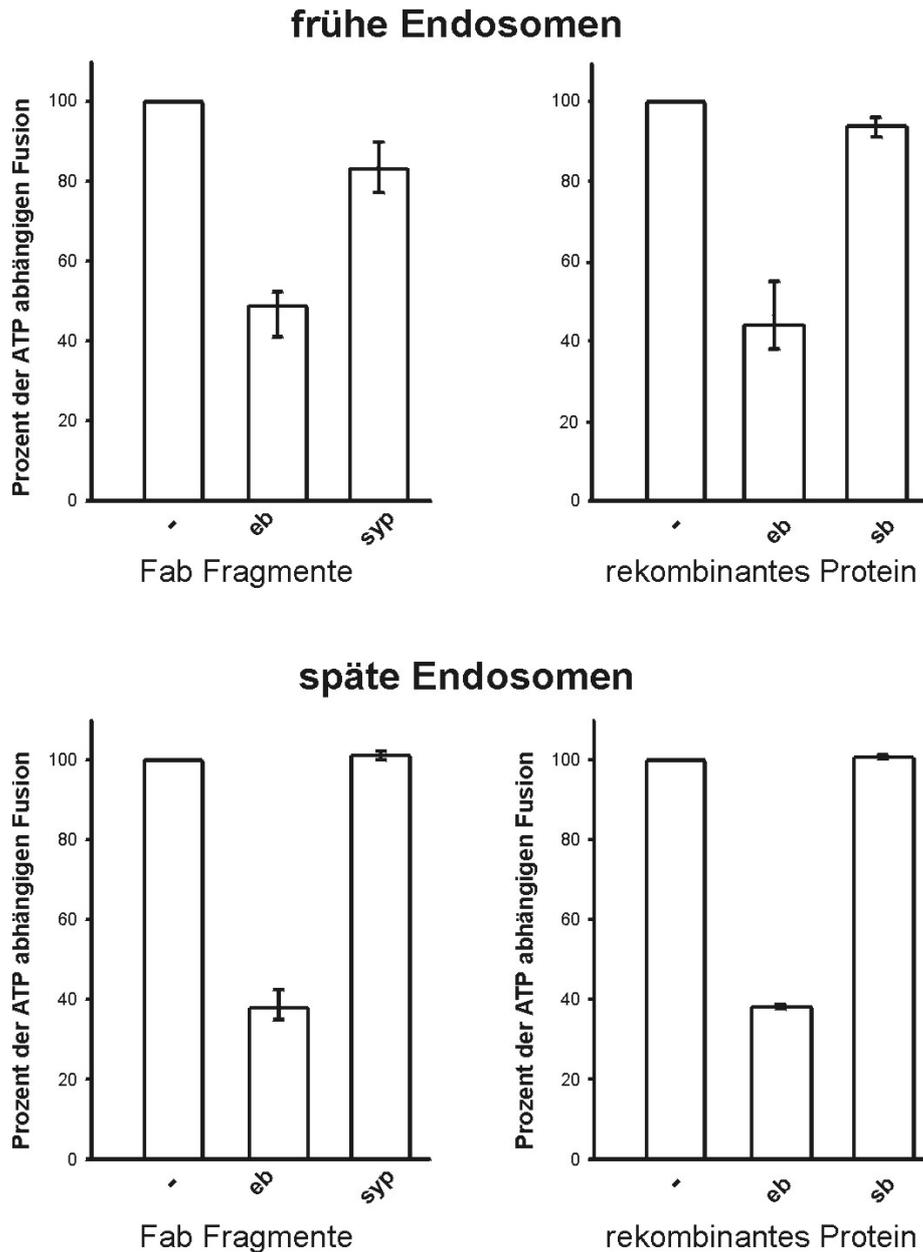


Abb. 11: Die Fusion von frühen und späten Endosomen wird durch Fab-Fragmente gegen Endobrevin oder durch lösliches rekombinantes Endobrevin inhibiert

Die Fusion von frühen und späten Endosomen aus PC12 Zellen wurde *in vitro* mit einem "content-mixing assay" gemessen. Die postnuklearen Überstände wurden mit 1.2 μ M Fab-Fragmenten gegen Endobrevin (eb) oder Synaptophysin (syp) (linke Spalte) oder 30 μ M löslichem rekombinanten Endobrevin oder Synaptobrevin 2 (sb) (rechte Spalte) präinkubiert. ATP-abhängige Fusionsaktivität ohne Zusatz von Fab-Fragmenten oder rekombinanten Protein wurde als 100% definiert. Die Fusion wurde durch das Mischen von Donor und Akzeptor-Fractionen und die gleichzeitige Zugabe von ATP und Zytosol initiiert, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C. Gezeigt sind die Mittelwerte von je vier unabhängigen Experimenten, die Balken zeigen den Wertebereich (Minimal-Maximal-Wert) an.

3.2 Identifizierung und Charakterisierung eines Endobrevin enthaltenden SNARE Komplexes

3.2.1 Vorbemerkung: mögliche Ansätze zur Identifizierung von SNARE Partnern

Die bisher beschriebenen Experimente haben ergeben, daß das R-SNARE Endobrevin in den Kompartimenten des endozytotischen Transportweges vorkommt. Weiterhin wurde nachgewiesen, daß Endobrevin eine wichtige Rolle bei der homotypischen Fusion von frühen und späten Endosomen spielt. Hierbei handelt es sich um zwei klar unterscheidbare Fusionsschritte, die nach bisherigem Kenntnisstand unterschiedlicher Kontrolle durch Regulatorproteine (z. B. Rabs) unterliegen. Es stellte sich nun die Frage, mit welchen Q-SNAREs Endobrevin in diesen Fusionsschritten interagiert, und weiterhin, ob die SNARE-Partner bei der Fusion früher Endosomen identisch mit denen bei der Fusion später Endosomen sind.

Ein Problem bei der Suche nach den SNARE-Partnern von Endobrevin bestand darin, daß die Bildung von SNARE-Komplexen *in vitro* sehr wenig spezifisch ist. Beispielsweise bildet Endobrevin mit den exozytotischen SNAREs SNAP-25 und Syntaxin 1 stabile Komplexe, die sich nur unwesentlich von Synaptobrevin 2 enthaltenden Komplexen unterscheiden (Fasshauer *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999). Versuche, Bindungspartner durch Affinitätschromatographie an immobilisiertem Endobrevin zu identifizieren, erschienen daher wenig aussichtsreich. In intakten Zellen bilden sich jedoch offensichtlich solche unspezifische Komplexe nicht aus, da Endobrevin nicht mit den neuronalen SNAREs aus Membranextrakten kopräzipitiert werden kann (Fasshauer *et al.*, 1999). Ausserdem ist bekannt, daß die neuronalen SNAREs an der Endosomenfusion nicht beteiligt sind (Link *et al.*, 1993). Problematisch ist weiterhin, daß die steady-state Konzentration von SNARE-Komplexen wahrscheinlich relativ klein ist, da solche Komplexe von der ATPase NSF und dem Kofaktor α -SNAP wieder dissoziiert werden. Dies erklärt vermutlich warum Vorversuche, Bindungspartner von Endobrevin in Immunpräzipitaten nach elektrophoretischer Auftrennung durch Mikrosequenzierung zu identifizieren, nicht erfolgreich waren - die Mengen waren zu gering.

Aus diesen Gründen wurde eine andere Strategie verfolgt. Mehrere Arbeitsgruppen haben die Datenbanken sehr gründlich nach SNARE-Proteinen durchsucht, und man kann inzwischen davon ausgehen, daß die meisten in Säugetieren vorkommenden SNAREs bereits identifiziert sind. So sind eine ganze Reihe von SNARE-Proteinen bekannt, die am endozytotischen Transportweg angereichert sind und somit als mögliche Bindungspartner von Endobrevin in Frage kommen. Mit Hilfe spezifischer Antikörper sollte daher überprüft werden, ob, und wenn ja, welche dieser SNARE-Proteine mit Endobrevin aus Detergenzextrakten kopräzipitieren.

Zu Beginn dieser Untersuchungen standen uns Antikörper gegen Endobrevin und Cellubrevin zur Verfügung. Um weitere Antikörper zu erhalten, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Gabriele Fischer von Mollard eine Reihe von Q-SNAREs, die aufgrund ihrer endosomalen Lokalisation als Partner von Endobrevin in Frage kommen, kloniert, als lösliche rekombinante Proteine exprimiert und in Kaninchen Antikörper erzeugt. Dabei handelt es sich um SNAP-29 (auch als GS32 bezeichnet) (Steggmaier *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 1999), Syntaxin 7 (Wong *et al.*, 1998a),

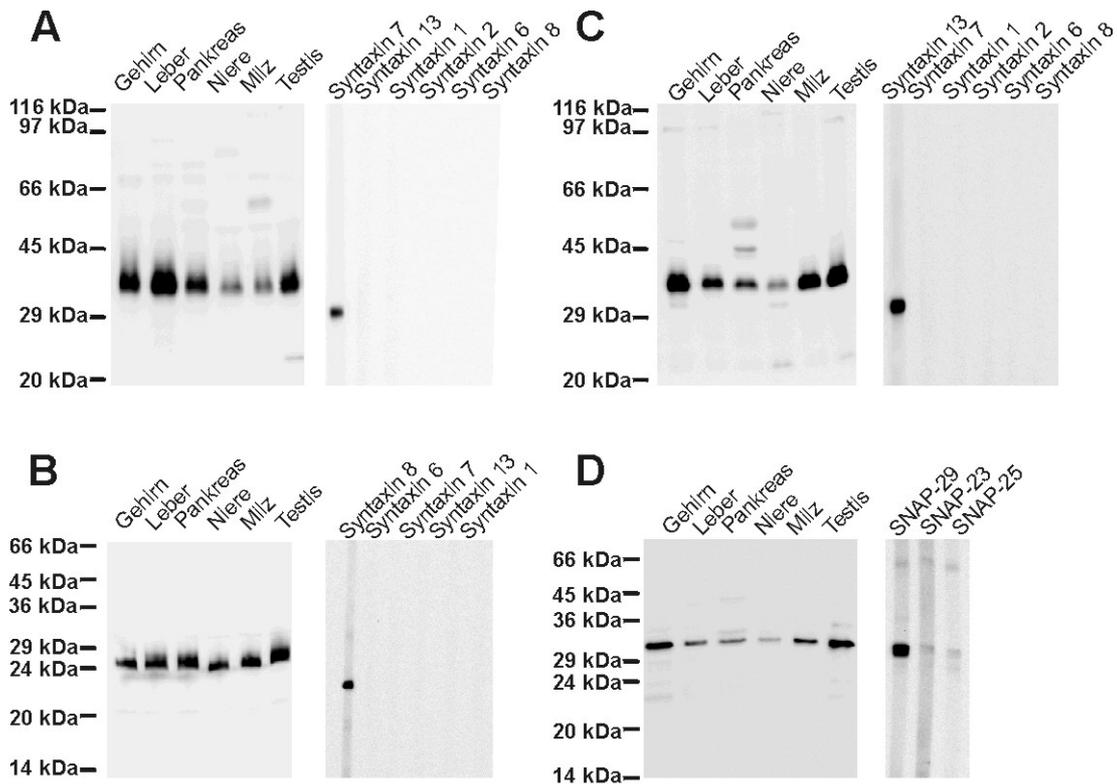


Abb. 12: Gewebeverteilung von Syntaxin 7, Syntaxin 8, Syntaxin 13 und SNAP-29 und Spezifität der Seren

20µg einer Membranfraktion (linke Seite) aus verschiedenen Geweben wurden durch SDS-PAGE und Immuoblotten mit Antikörpern gegen Syntaxin 7 (A), Syntaxin 8 (B), Syntaxin 13 (C) und SNAP-29 (D) analysiert. Die Spezifität der Antikörper wurde mit je 40ng verschiedenen rekombinanten Syntaxinen bzw. SNAP-23, SNAP-25 und SNAP-29, die durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert waren, durch Immuoblotting überprüft. In A und C sind 12%-ige, in B und D 15%-ige Polyacrylamidgelle verwendet worden.

Syntaxin 8 (Subramaniam *et al.*, 2000) und Syntaxin 13 (auch als Syntaxin 12 bezeichnet) (Advani *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 1998b). Mit den erzeugten Antiseren konnten Syntaxin 7, Syntaxin 8, Syntaxin 13 und SNAP-29 in allen getesteten Geweben nachgewiesen werden (Abb. 12). Die vier Antikörper erkennen nur das entsprechende Antigen als rekombinantes Protein, nicht jedoch verwandte Syntaxine bzw. SNAP-25-Homolge. Dabei ist die Differenzierung von Syntaxin 7 und Syntaxin 13 aufgrund ihrer großen Sequenzähnlichkeit (53% Sequenzidentität (Prekeris *et al.*, 1999)) besonders kritisch. Im Falle von Syntaxin 8 ist Syntaxin 6 das am nächsten verwandte Protein. Antikörper gegen Vt1a und Vt1b, die in den folgenden Versuchen eingesetzt wurden, werden an späterer Stelle ausführlicher charakterisiert (siehe 3.3.1, Abb. 25). Vt1a und Vt1b sind auch auf Endosomen lokalisiert (persönliche Mitteilung von Vera Kreykenbohm und Dr. Gabriele Fischer von Mollard).

3.2.2 Immunpräzipitation des endosomalen Komplexes

Mit diesen und weiteren bereits vorhandenen Antikörpern wurden Immunpräzipitationsstudien durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß mit gegen Endobrevin gerichteten Antikörpern drei Q-SNAREs immunpräzipitiert werden

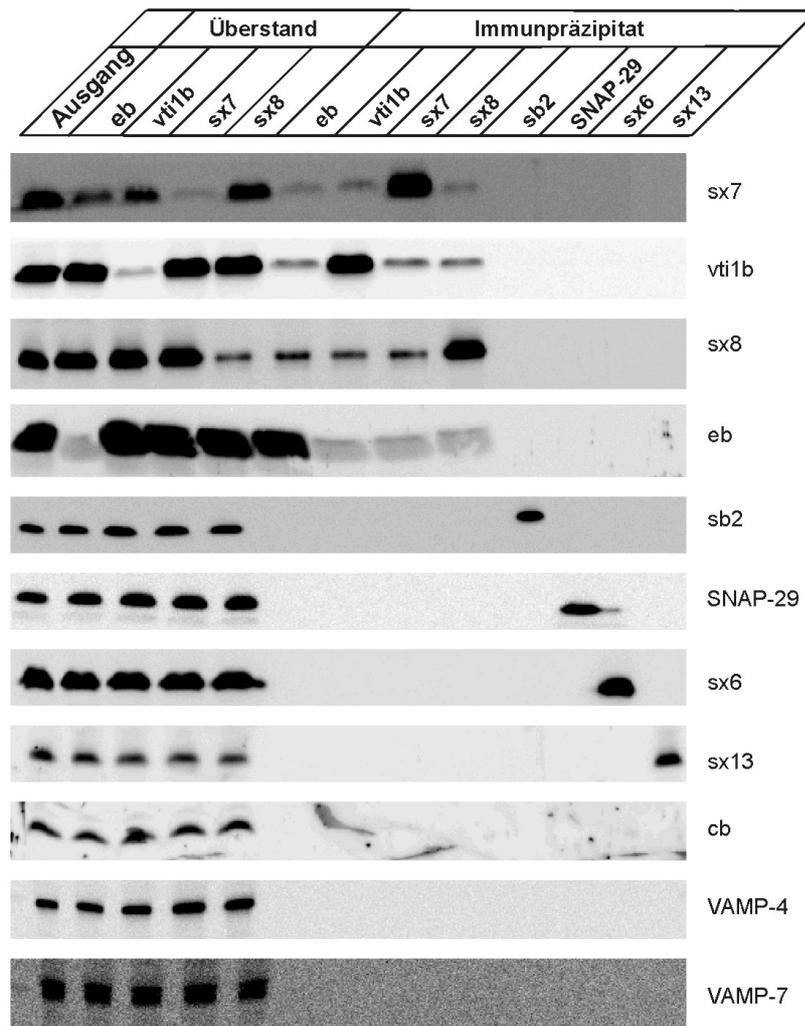


Abb. 13: Endobrevin, Syntaxin 7, Syntaxin 8 und Vti1b bilden einen SNARE Komplex

Membranfraktionen aus Rattenleber wurden mit Triton X-100 extrahiert und als Ausgangsmaterial für Immunpräzipitationen eingesetzt. Antikörper spezifisch für folgende Proteine wurden eingesetzt: Endobrevin (eb), Vti1b, Syntaxin 7 (sx7), Syntaxin 8 (sx8), Synaptobrevin 2 (sb2), SNAP-29, Syntaxin 6 (sx6) und Syntaxin 13 (sx13). Jeweils äquivalenten Mengen (bezogen auf das Ausgangsmaterial) des Detergenzextrakts (Ausgang), des Überstandes nach der Immunpräzipitation (nur für Endobrevin, Vti1b, Syntaxin 7 und Syntaxin 8) und der Immunpräzipitate wurden durch Immunoblot auf folgende Proteine untersucht: Syntaxin 7, Vti1b, Syntaxin 8, Endobrevin, Synaptobrevin 2, SNAP-29, Syntaxin 6, Syntaxin 13, Cellubrevin (Cb), VAMP-4 und VAMP-7.

konnten, Syntaxin 7, Syntaxin 8 und Vti1b (Abb. 13). Um zu untersuchen, ob die Proteine in einem Komplex vorhanden sind, wurden Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen Syntaxin 7, Syntaxin 8 und Vti1b durchgeführt. Es wurden jeweils neben dem entsprechenden Antigen die drei weiteren SNAREs koimmunpräzipitiert. Dagegen waren SNAP-29, Synaptobrevin 2, Syntaxin 13, Syntaxin 6, VAMP-4, VAMP-7 und Cellubrevin in keinem der Präzipitate nachweisbar. Zur Kontrolle wurden Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen Synaptobrevin 2, SNAP-29, Syntaxin 6 und Syntaxin 13 durchgeführt. Während die Antikörper das jeweilige entsprechende Antigen immunpräzipitierten, wurden keine anderen SNAREs im Präzipitat detektiert.

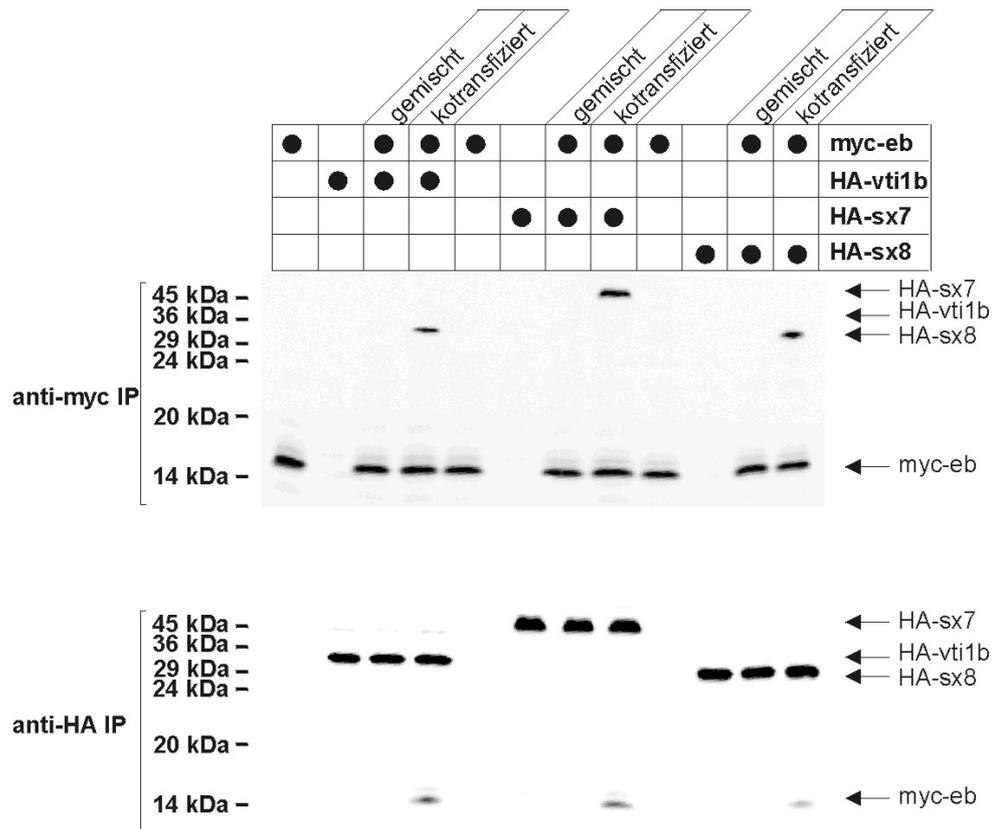


Abb. 14: Der Komplex aus Endobrevin, Syntaxin 7, Syntaxin 8 und Vti1b existiert in Membranen vor der Solubilisierung

NRK-Zellen wurden transfiziert, so daß sie entweder myc-Endobrevin, HA-Vti1b, HA-Syntaxin 7 und HA-Syntaxin 8 einzeln exprimieren oder HA-Vti1b, HA-Syntaxin 7 bzw. HA-Syntaxin 8 jeweils mit myc-Endobrevin koexprimieren (kotransfiziert). Membranfraktionen wurden aus den jeweiligen Zellen isoliert. Hieraus wurden Detergenzextrakte mit Triton X-100 generiert und für die Immunpräzipitationen mit gegen das myc-Epitop (oberer Teil) oder das HA-Epitop (unterer Teil) gerichtete Antikörper eingesetzt. Um zu überprüfen, ob sich Komplexe während oder nach Solubilisierung bilden, wurden Aliquots der Membrane, die von einzeltransfizierten Zellen stammen, vor der Solubilisierung und Immunpräzipitation gemischt (gemischt).

Eine Komplikation bei Koimmunpräzipitationen von SNAREs besteht darin, daß sich Komplexe aufgrund der Promiskuität der SNAREs (Fasshauer *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999) möglicherweise erst nach Solubilisierung durch Detergenz bilden und daher nicht den Zustand in intakten Zellen repräsentieren (Otto *et al.*, 1997). Um diese Möglichkeit auszuschließen wurde Endobrevin, das mit einem aminoterminalen myc-Epitop versehen wurde, und Vti1b, Syntaxin 7 und Syntaxin 8, die jeweils ein aminoterminales HA-Epitop trugen, in NRK-Zellen in verschiedenen Kombinationen transfiziert. Die intrazelluläre Verteilung der transfizierten Proteine wurde durch Immunzytochemie überprüft. Dabei stellte sich heraus, daß die Lokalisationen der exogenen Proteine mit denen der endogenen identisch waren (nicht gezeigt). Paarweise Transfektion von myc-Endobrevin mit den anderen SNAREs wurde jeweils auf zwei unterschiedliche Weisen durchgeführt. Im ersten Ansatz wurden Zellen mit beiden Proteinen kotransfiziert, so daß die Proteine in denselben Zellen exprimiert wurden. Nach Ernten der Zellen wurde eine Membranfraktion isoliert und ein

Detergenzextrakt hergestellt, das für die Immunpräzipitationen mit einem gegen das myc-Epitop oder gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper eingesetzt wurde. Im zweiten Ansatz wurden die Zellen aufgeteilt und entweder mit myc-Endobrevin oder einem HA-SNARE-Partner transfiziert. Danach wurden wie oben Membranfraktionen isoliert und diese vor der Extraktion mit Detergenz gemischt. In dem zweiten Ansatz sind also die transfizierten Proteine in verschiedenen Zellen exprimiert und können erst während des Solubilisationsprozesses mit Detergenz miteinander in Kontakt kommen. Auch hier wurden mit einem gegen das myc-Epitop oder gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper Immunpräzipitationen durchgeführt. Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, wird jedes der HA-getaggen Q-SNAREs nur dann mit myc-Endobrevin koimmunpräzipitiert, wenn es kotransfiziert wurde, nicht jedoch wenn es in verschiedenen Zellen exprimiert wurde und die Membranen erst vor der Extraktion gemischt wurden. Ebenso wird myc-Endobrevin nur in kotransfizierten Zellen mit dem HA-spezifischen Antikörper koimmunpräzipitiert. Aufgrund dieser Daten kann ausgeschlossen werden, daß die Koimmunpräzipitation des SNARE-Komplexes ein durch Detergenz induziertes *in vitro* Artefakt ist.

3.2.3 Identifizierung des Fusionsschrittes, an dem der endosomale Komplex beteiligt ist

Die Immunpräzipitationsstudien zeigen, daß Endobrevin, Syntaxin 7, Syntaxin 8 und Vti1b in einem SNARE Komplex vorkommen. Da Endobrevin an der homotypischen Fusion von frühen und späten Endosomen beteiligt ist, stellt sich die Frage, in welchem der beiden Fusionsschritte der hier beschriebene Komplex involviert ist. Deswegen wurden Fab-Fragmente aus den affinitätsaufgereinigten Antisera erzeugt und deren Wirkung im Fusionsassay der frühen und späten Endosomen untersucht. Auch diese Experimente sind in Zusammenarbeit mit Claudia Holroyd durchgeführt worden. Fusion von späten Endosomen wurde durch Fab-Fragmente spezifisch für Endobrevin, Syntaxin 7, Syntaxin 8 und Vti1b inhibiert (Abb. 15). Im Gegensatz dazu wurde die Fusion von frühen Endosomen durch die Fab-Fragmente gegen Syntaxin 7 und Syntaxin 8 nicht inhibiert. Fab-Fragmente gegen Vti1b zeigten nur einen geringen Effekt. Als Kontrolle wurden Antikörper gegen das R-SNARE Cellubrevin, das funktionell auf dem exozytotischen Weg lokalisiert ist, und Vti1a benutzt. Cellubrevin Antikörper haben keine der beiden Fusionsreaktionen beeinträchtigt. Dagegen inhibieren Fab-Fragmente gegen Vti1a die Fusion früher Endosomen und haben fast keinen Einfluß auf die der späten Endosomen. Diese Daten deuten darauf hin, daß der identifizierte SNARE Komplex an der Fusion der späten, nicht jedoch an der der frühen Endosomen beteiligt ist.

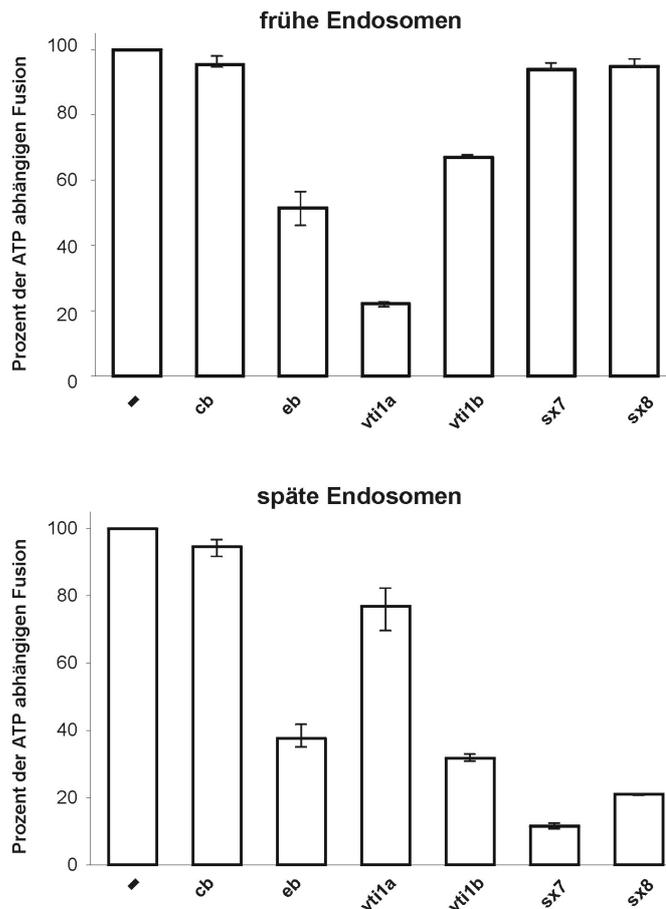


Abb. 15: Hemmung der Fusion von frühen und späten Endosomen durch SNARE-spezifische Fab-Fragmente

Homotypische Fusion von frühen und späten Endosomen aus PC12 Zellen wurde wie in Abb. 11 untersucht. Die postnuklearen Überstände wurden mit $1.2\mu\text{M}$ Fab-Fragmenten gegen Cellubrevin (cb), Endobrevin (eb), Vti1a, Vti1b, Syntaxin 7 (sx7) und Syntaxin 8 (sx8) inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte von je drei (vier bei eb, dieselben Experimente wie in Abb. 11) unabhängigen Experimenten.

Um diese Befunde durch einen unabhängigen Versuchsansatz zu bestätigen, haben wir den endozytotischen Transport in intakten HeLa Zellen nach Mikroinjektion von Fab-Fragmenten untersucht. Dabei wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkiertem epidermalen Wachstumsfaktor EGF inkubiert. EGF bindet an der Zelloberfläche an seinen Rezeptor, wird über Clathrin coated Vesikel endozytiert und zum Lysosom transportiert, wo es abgebaut wird (Gruenberg und Maxfield, 1995; Mellman, 1996). Inhibierung des Transportes führt zu einem verlangsamten Abbau von EGF (Yoshimori *et al.*, 2000; Yoshimori *et al.*, 1991). Um die mikroinjizierten Zellen identifizieren zu können wurde der DNA Farbstoff DAPI koinjiziert, der den Zellkern anfärbt. Die Zellen wurden ein oder drei Stunden nach der Inkubation mit dem fluoreszenzmarkiertem EGF fixiert und analysiert. Jedes der Fab-Fragmente, das gegen eine der Komponenten des neuen SNARE Komplexes gerichtet war, hatte einen deutlichen Effekt auf den Transport und Abbau von EGF (Abb. 16). Nach einer Stunde waren in nichtinjizierten Kontrollzellen große Kompartimente gefärbt wie man das für EGF, das sich in späten Endosomen/Lysosomen befindet, erwartet. Dagegen war die Färbung in injizierten Zellen dispers, was auf eine Verteilung des EGF in

kleinen

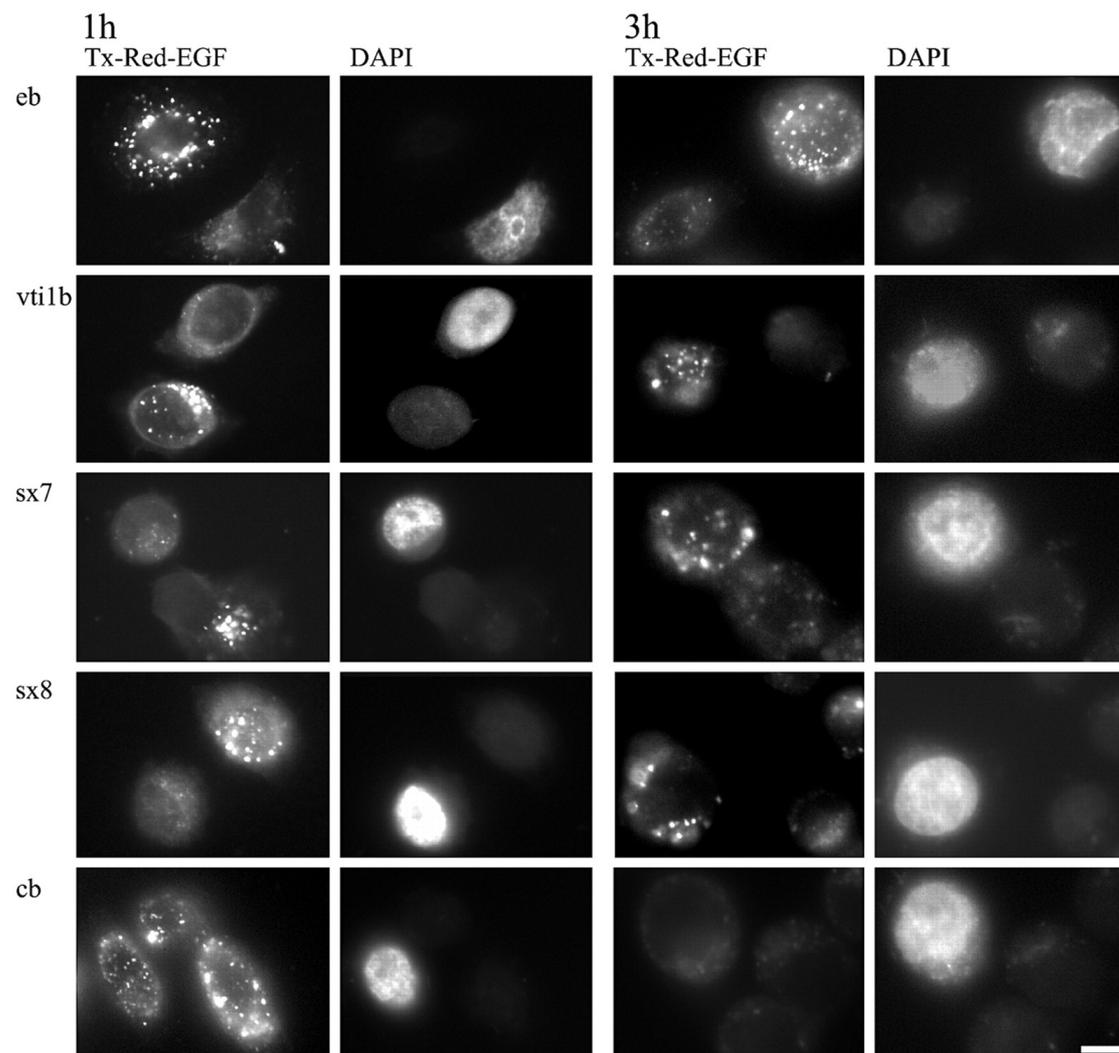


Abb. 16: Der endozytotische Transport und lysosomale Abbau von fluoreszenzmarkiertem epidermalen Wachstumsfaktor EGF wird durch Mikroinjektion von Fab-Fragmenten spezifisch für Endobrevin, Syntaxin 7, Syntaxin 8 und Vti1b verlangsamt

Fab-Fragmente spezifisch für Cellubrevin, Endobrevin, Syntaxin 7, Syntaxin 8 und Vti1b wurden in HeLa-Zellen mikroinjiziert. Anschließend wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkiertem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) inkubiert. Nach der Bindung des EGF an seinen Rezeptor wurden die Zellen 1h (linke Seite) oder 3h (rechte Seite) inkubiert. Am Ende der Inkubation wurden die Zellen fixiert und durch Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Mikroinjizierte Zellen wurden anhand der Kernfärbung durch den koinjizierte DAPI-Farbstoff identifiziert. Balken, 10 μ m.

Transportvesikeln hindeutet. Nach drei Stunden waren Kontrollzellen durch den Abbau des EGFs in Lysosomen kaum noch gefärbt. Dagegen zeigten jetzt die mikroinjizierten Zellen eine deutliche lysosomale Färbung. Das zeigt, daß in den mikroinjizierten EGF zwar aufgenommen wird, der Transport zum Lysosom aber deutlich verlangsamt ist. Fab-Fragmente gegen Cellubrevin hatten keinen Effekt auf den Transport und die Prozessierung von EGF.

3.2.4 Biochemische und biophysikalische Untersuchung des endosomalen Komplexes

Der hier beschriebene späte endosomale SNARE Komplex (im folgenden endosomaler Komplex genannt) unterscheidet sich in einigen wichtigen Punkten vom sogenannten neuronalen Komplex, der an der Exozytose von synaptischen Vesikeln beteiligt ist. Er besteht erstens aus vier statt drei SNARE Proteinen, von den drei zusätzlich zum SNARE Motiv N-terminale Regionen enthalten, während beim neuronalen Komplex aus Synaptobrevin 2, Syntaxin 1 und SNAP-25 lediglich Syntaxin 1 eine weitere strukturierte N-terminale Region, die sogenannte Habc-Domäne besitzt. Zweitens besitzen beim endosomalen alle vier SNARE Proteine Transmembranregionen, beim neuronalen Komplex nur Synaptobrevin 2 und Syntaxin 1. Drittens ist, während die Struktur von drei Q-SNARE Motiven und einem R-SNARE Motiv erhalten ist, ein Komplex, der zwei sogenannte Syntaxine enthält, auf den ersten Blick überraschend. Deswegen haben wir rekombinante Proteinversionen der vier SNAREs ohne ihre Transmembranregionen benutzt, um die Eigenschaften *in vitro* zu untersuchen.

Wenn die vier rekombinanten Proteine im äquimolarem Verhältnis gemischt wurden, bildete sich ein Komplex, der über Anionenaustauschchromatographie von den Monomeren abgetrennt werden konnte. Dieser aufgereinigte Komplex (im folgenden zytosolischer Komplex genannt) wandert im SDS-Gel, wenn man die Probe vor dem Auftragen nicht erhitzt, als Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 100.000 (Abb. 17). Solch eine SDS-Resistenz wurde auch beim neuronalen Komplex beobachtet (Hayashi *et al.*, 1994). Allerdings ist in unserem Fall die SDS-Resistenz

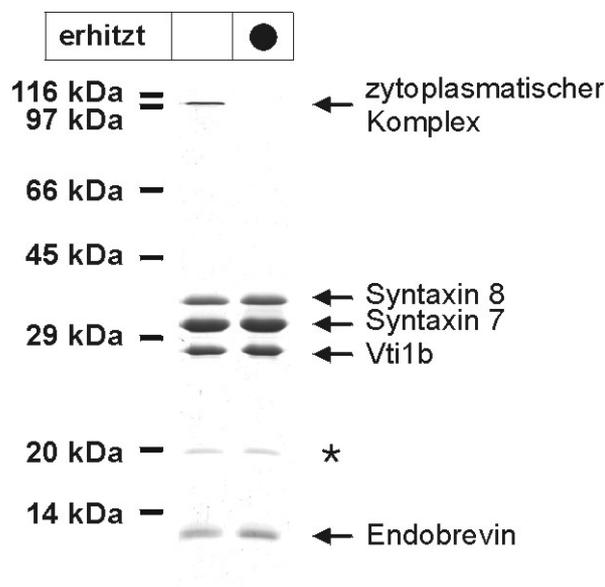


Abb. 17: Der endosomale Komplex ist partiell SDS-resistent

Der endosomale zytosolische Komplex aus den löslichen Domänen von Endobrevin, Syntaxin 7, Syntaxin 8 und Vti1b wurde durch Anionenaustauschchromatographie von den Monomeren abgetrennt und durch SDS-PAGE mit und ohne Erhitzen der Proben in SDS-Probenpuffer gefolgt von Färbung mit Coomassie Blue analysiert. Das Sternchen zeigt ein kontaminierendes Abbauprodukt von Syntaxin 8.

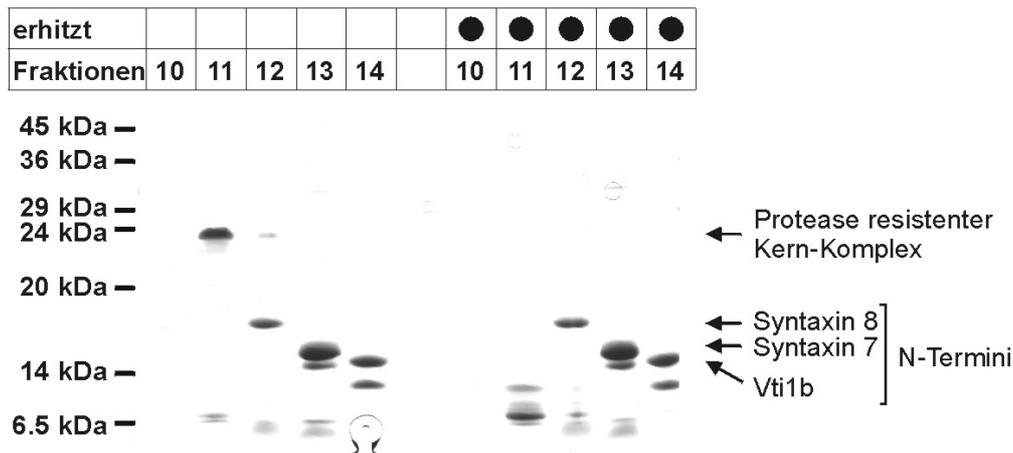


Abb. 18: Limitierte Proteolyse des endosomalen Komplexes

Der gereinigte zytoplasmatische Komplex (aus Abb. 17) wurde 30min mit Trypsin inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde durch Gelfiltration aufgetrennt und die proteinhaltigen Fraktionen durch SDS-PAGE mit (links) und ohne (rechts) Erhitzen der Proben in SDS-Probenpuffer gefolgt von Färbung mit Coomassie Blue analysiert. Die N-Termini von Syntaxin 7, Syntaxin 8 und Vti1b wurden durch Sequenzierung identifiziert.

nicht vollständig, so daß auch die Monomere im Gel sichtbar sind. Erhitzt man die Probe in SDS-Probenpuffer vor dem Auftragen auf 100°C, verschwindet die 100kDa Bande. Die vier SNAREs sind im Komplex in gleichen stöchiometrischen Verhältnis vertreten, wie ein Vergleich mit den Monomeren im SDS-PAGE und Coomassie Blue Färbung zeigte (nicht gezeigt).

Eine bemerkenswerte Eigenschaft des neuronalen Komplexes ist die Resistenz der SNARE-Motive gegen Proteasen, wenn die SNAREs einen Komplex bilden (Fasshauer *et al.*, 1998a; Poirier *et al.*, 1998). Daher wurde der aufgereinigte zytoplasmatische Komplex einer limitierten Proteolyse unterworfen und die entstandenen Fragmente durch Gelfiltration aufgetrennt. Wie in Abb. 18 gezeigt eluiert zuerst ein partiell SDS-resistenter Kernkomplex und dann kleiner Fragmente, die durch N-terminale Sequenzierung als die N-terminalen Regionen von Syntaxin 7, Syntaxin 8 und Vti1b identifiziert wurden. Diese drei N-terminalen Fragmente erhält man auch durch Proteolyse der Einzelproteine. Es ist anzunehmen, daß es sich also um unabhängig gefaltete N-terminale Regionen handelt, wie man sie auch bei Syntaxin 1 findet (die sogenannte Habc Domäne). Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit den Proteasen Chymotrypsin und Proteinase K erhalten (nicht gezeigt).

In einer nächsten Versuchsreihe, die in Zusammenarbeit mit Stefan Pabst aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurde, haben wir die molekulare Masse und den Oligomerisierungsstatus der Einzelproteine und der Komplexe durch Gelfiltration gefolgt von multi-angle laser light scattering (MALLS) bestimmt. In diesem und allen folgenden Experimenten wurde der sogenannte Kernkomplex aus den vier rekombinant hergestellten und aufgereinigten SNARE Motiven gebildet und wie der zytoplasmatische Komplex durch Anionenaustauschchromatographie von den Monomeren abgetrennt. Die SNARE Motive wurden durch Sequenzvergleich mit den neuronalen SNARE Motiven definiert (siehe Methodenteil). Der zytoplasmatische Komplex

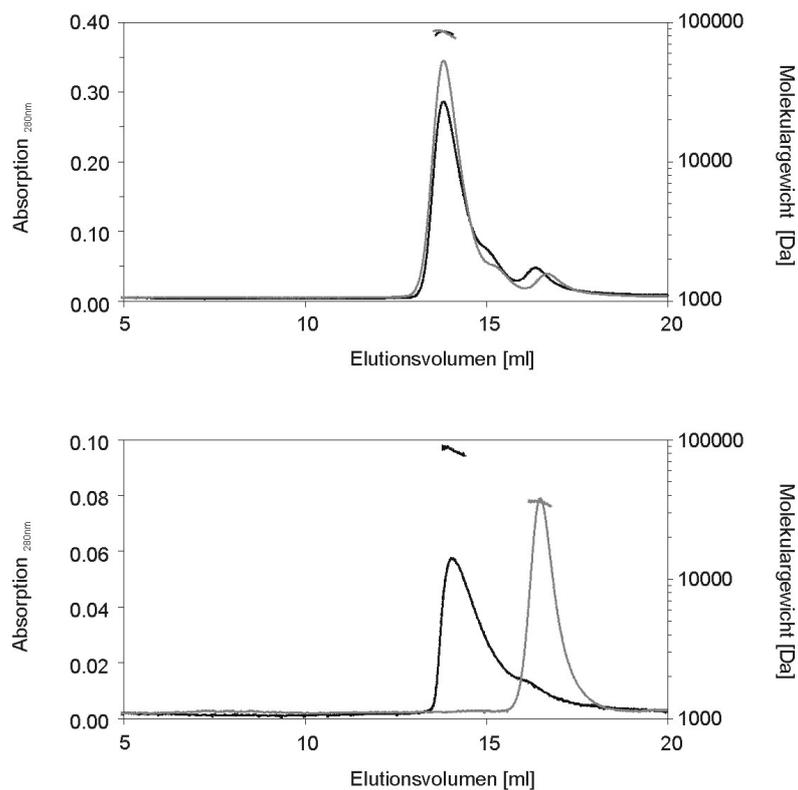


Abb. 19: Zytoplasmatischer und Kernkomplex sind definierte Partikel mit einer 1:1:1:1-Stöchiometrie der SNARE-Komponenten

Zytoplasmatischer (obere Profile) und Kernkomplex (untere Profile) wurden durch Gelfiltration gefolgt von einer MALLS-Analyse (multiangle laser light scattering) untersucht. Die Absorption bei 280nm ist als kontinuierliche Linie mit der linken Achse und das aus der MALLS-Messung bestimmte Molekulargewicht durch die unterbrochene Linie mit der rechten Achse angezeigt. Die Gelfiltrationen wurden entweder in Niedrig- (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT pH7.4; schwarz) oder Hochsalzpuffer (1M NaCl statt 150 mM; grau) durchgeführt. Die Proteinkonzentrationen der aufgetragenen Proben waren 10 μ M.

wandert als definierte Spezies mit einem Molekulargewicht von 84,8 \pm 0,5 kDa (errechnet 89,0 kDa) wie bei einer 1:1:1:1 Stöchiometrie zu erwarten ist (Abb. 19). Im Gegensatz dazu zeigt der Kernkomplex ein Molekulargewicht von 83,4 \pm 0,6 kDa, was auf eine Oligomerisierung hindeutet. Unter Hochsalzbedingungen (1M NaCl) erhält man ein Molekulargewicht von 35,2 \pm 0,5kDa (errechnet 38,1 kDa für eine 1:1:1:1 Stöchiometrie). Eine ähnliche hochsalzsensitive Oligomerisierung wurde auch für den neuronalen Komplex beobachtet (Fasshauer *et al.*, 1997). Die Einzelproteine eluierten als Monomere (nicht gezeigt).

In den nächsten Experimenten wurde getestet, ob die endosomalen Komplexe durch die ATPase NSF und α -SNAP dissoziiert werden können. Wie man in Abbildung 20 erkennt, verschwinden in Gegenwart von ATP und Mg²⁺ die SDS-resistenten Komplexe, nicht jedoch, wenn die ATPase Aktivität durch Zugabe von EDTA statt Mg²⁺ inhibiert wird.

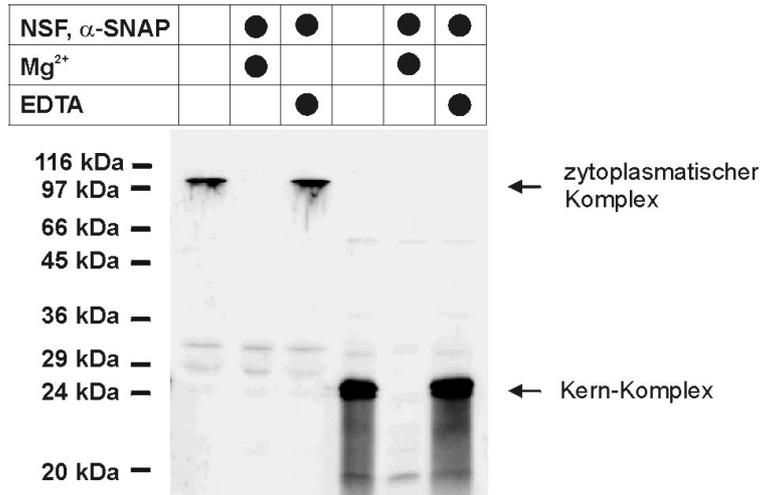


Abb. 20: Zytoplasmatischer und Kernkomplex werden durch NSF und α -SNAP dissoziiert

Gereinigte zytoplasmatische und Kernkomplexe wurden wie angezeigt in der Gegenwart von ATP inkubiert. Die Dissoziation der Komplexe durch NSF und α -SNAP wurde an dem Verschwinden der SDS-resistenten Bande festgemacht. Die Proben wurden im Immunoblot mit einem gegen Endobrevin gerichteten Antikörper analysiert.

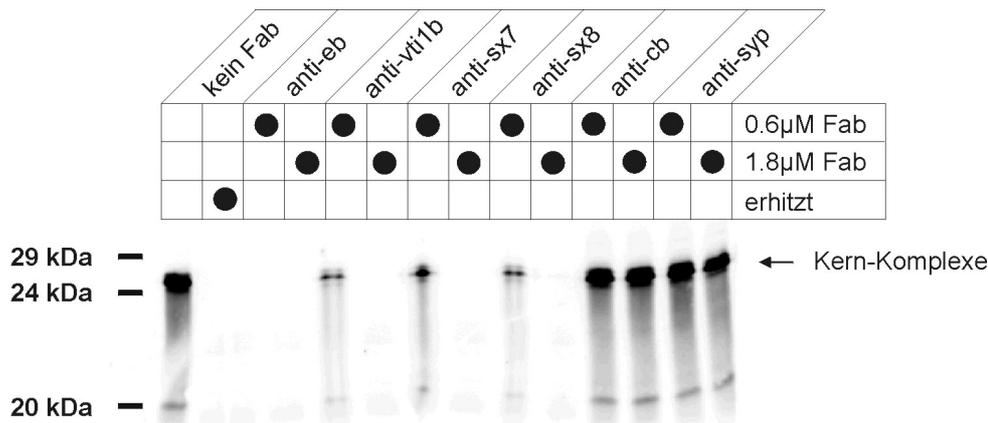


Abb. 21: Fab-Fragmente spezifisch Endobrevin, Syntaxin 7, Syntaxin 8 und Vti1b inhibieren die Bildung des Kernkomplexes

SNARE-Motive von Endobrevin, Syntaxin 7, Syntaxin 8 oder Vti1b wurden jeweils mit zwei verschiedenen Konzentrationen der entsprechenden Fab-Fragmente präinkubiert. Die anderen drei SNARE-Motive wurden zugegeben, so daß sich ein SDS-resistenter Kernkomplex ausbilden kann. Die Proben wurden im Immunoblot mit einem gegen Endobrevin gerichteten Antikörper analysiert. Als Kontrolle wurde Endobrevin mit Fab-Fragmenten gegen Cellubrevin oder Synaptophysin präinkubiert. Erhitzen führte zu einem Auseinanderfallen der Komplexe.

In den nachfolgenden Experimenten wurde untersucht, ob die Fab-Fragmente, die wie unter 3.2.3. beschrieben die Fusion der späten Endosomen inhibieren, auch die Bildung des endosomalen Komplexes *in vitro* inhibieren. Wie in der Einleitung dargestellt, gilt die Ausbildung von SNARE-Komplexen als entscheidender Schritt bei der Membranfusion (siehe Abb. 1). Eine Korrelation zwischen der Inhibierung der Fusion und der Inhibierung der Komplexbildung würde dieses Modell stützen. Wie in Abbildung 21 gezeigt, inhibieren Fab-Fragmente spezifisch für Endobrevin, Syntaxin

7, Syntaxin 8 und Vti1b die Komplexbildung, und zwar in einem ähnlichen Konzentrationsbereich wie die Inhibierung der *in vitro* Endosomenfusion. Dagegen zeigen Fab-Fragmente spezifisch für Cellubrevin oder Synaptophysin keinen Effekt.

In den folgenden Versuchen wurde Circular dichroismusspektroskopie (CD) benutzt, um zu untersuchen, inwiefern der endosomale Komplex strukturell dem neuronalen Komplex ähnelt. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß die SNARE Motive von Synaptobrevin 2 und SNAP-25 als Monomere größtenteils ungefalted sind, jedoch bei Zugabe von Syntaxin 1 einen Komplex bilden und dabei eine drastische Zunahme der α -Helizität zeigen (Fasshauer *et al.*, 1998a). Dieser Kernkomplex ist außerordentlich stabil gegen Denaturierung durch Erwärmung und zerfällt erst bei einer Temperatur von über 80°C in die Monomere. Desweiteren ist eine Zunahme der α -Helizität auch zu beobachten, wenn Syntaxin 1 mit zwei von den drei SNARE Motive des neuronalen Komplexes gemischt wird. Solche partiellen Komplexe könnten von physiologischer Relevanz sein, z.B. Komplexe zwischen Syntaxin 1 und SNAP-25 an der Plasmamembran vor dem Docken der synaptischen Vesikel.

Die CD-Spektren der einzelnen SNARE Motive der endosomalen Proteine zeigen einen geringen α -helikalen Anteil, während die äquimolare Mischung aller vier SNARE Motive einen deutliche Zunahme von α -Helizität aufweist, die an den Minima bei 208 und 222nm deutlich wird (Abb. 22A). Die molare Elliptizität bei 222nm kann als Parameter dienen, um den α -helikalen Anteil zu bestimmen. Dabei gilt eine molare Elliptizität von 36300 als Indikator für vollständige α -Helizität, während bei einer Elliptizität von 0 von keinem α -helikalen Anteil ausgegangen wird. Anders als beim neuronalen Komplex beobachtet man keine Induktion von α -Helizität beim Mischen von zwei oder drei SNARE Motiven, was gegen eine Bildung von partiellen Komplexen spricht (Abb. 22B). Im Einklang mit diesen Befunden konnte man auch keine SDS-resistenten partiellen Komplexe in der SDS-PAGE oder stabile Komplexe im Nativgel detektieren (nicht gezeigt).

Bei der Denaturierung durch Erwärmen zeigt sich, daß der endosomale Kernkomplex bei einer $T_{1/2}$ von 78°C schmilzt, nur geringfügig niedriger als der neuronale Kernkomplex (Abb. 22C). Aus den CD-Spektren der vollständigen zytoplasmatischen Domänen der drei Q-SNAREs konnte ein α -helikaler Anteil von 32% für Syntaxin 8, und 55% für Syntaxin 7 und für Vti1b errechnet werden. Dies bestätigt die Vermutung aus den Experimenten der limitierten Proteolyse, daß diese SNAREs unabhängig gefaltete α -helikale N-terminale Regionen besitzen.

3.2.5 Strukturelle Zuordnung der SNAREs im endosomalen Komplex

Aus den vorherigen Versuchen hat sich ergeben, daß, obwohl der endosomale Komplex aus vier Proteinen statt wie der neuronale aus dreien besteht, doch bemerkenswerte Gemeinsamkeiten mit dem neuronalen Komplex bestehen. So bilden die jeweiligen SNARE-Proteine einen proteaseresistenten Kernkomplex, der einen großen α -helikalen Anteil aufweist. Die Beteiligung stöchiometrischer Mengen von vier SNARE Motiven am endosomalen Kernkomplex legt nahe, daß es sich um ein Vierhelixbündel mit sehr ähnlicher Struktur wie der neuronale Kernkomplex handelt. In den nächsten Versuchen sollte deswegen untersucht werden, ob diese strukturellen Ähnlichkeiten zwischen den Komplexen auf die einzelnen SNAREs im Komplex übertragbar sind, d.h. ob man bestimmen kann, welches Q-SNARE im endosomalen

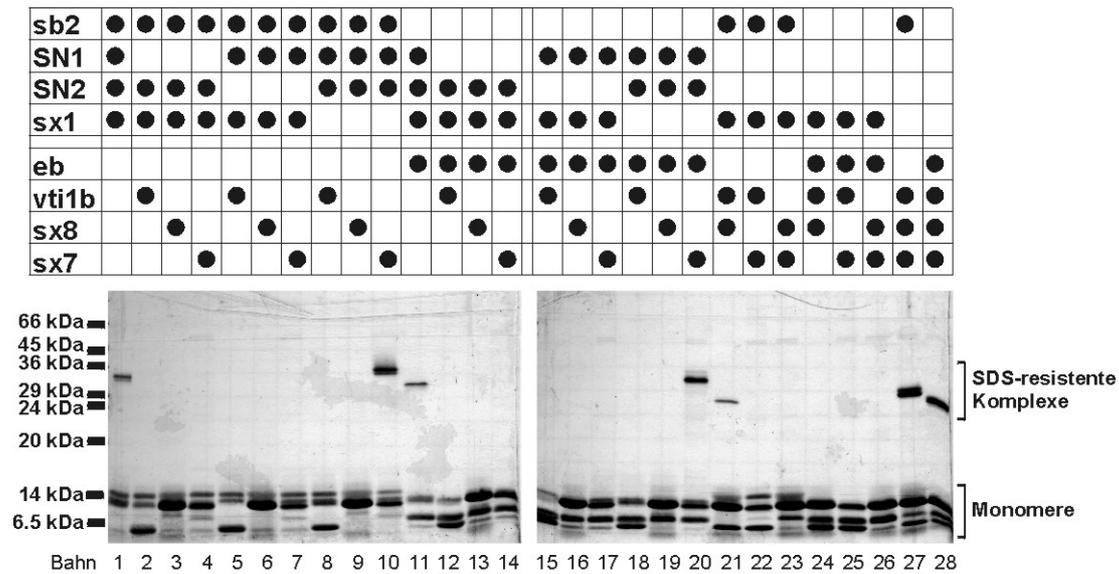


Abb. 23: SDS-resistente gemischte SNARE Komplexe zwischen dem endosomal und dem neuronalen Komplex bilden sich nur, wenn äquivalente SNARE-Motive gegeneinander ausgetauscht werden

Kombinationen von gereinigten SNARE Motiven des neuronalen und des endosomal Komplexes wurden in ungefähr äquimolarem Verhältnis gemischt, 10h inkubiert und durch SDS-PAGE ohne Erhitzen der Proben in SDS-Probenpuffer gefolgt von Färbung mit Coomassie Blue analysiert. sb2, Synaptobrevin 2; SN1, N-terminales SNARE-Motiv von SNAP-25; SN2, C-terminales SNARE-Motiv von SNAP-25; sx1, Syntaxin 1

Komplex Syntaxin 1, welches der N-terminalen (SN1) und welches der C-terminalen Domäne (SN2) von SNAP-25 entspricht. Wie erwähnt (siehe 3.1.3) können *in vitro* korrespondierende SNAREs gegeneinander ausgetauscht werden, so daß man *in vitro* eine Vielzahl von sogenannten gemischten SNARE Komplexen erzeugen kann.

Gereinigte SNARE Motive des neuronalen und des endosomal Komplexes wurden *in vitro* in allen möglichen Kombinationen von drei Q-SNAREs mit den beiden R-SNAREs Synaptobrevin 2 und Endobrevin zusammengegeben. Nach Inkubation über Nacht wurde mittels SDS-PAGE analysiert, welche Kombinationen SDS-resistente Komplexe ergaben (Abb. 23). Dabei bilden sich neben den neuronalen (Bahn 1) und endosomal (Bahn 24) Komplexe unter den folgenden Bedingungen: Erstens führt ein Austausch der R-SNAREs Synaptobrevin 2 und Endobrevin immer noch zur Komplexbildung (Bahn 11 und 27). Zweitens kann Syntaxin 7 Syntaxin 1 im neuronalen Komplex ersetzen (Bahn 10), was nahelegt, daß Syntaxin 7 das echte Syntaxin des endosomal Komplexes darstellt. Drittens bilden sich SDS-resistente Komplexe mit Endobrevin/SN1/SN2/Syntaxin 7 (Bahn 20) und Synaptobrevin 2/Vti1b/Syntaxin 8/Syntaxin 1 (Bahn 21). Vti1b und Syntaxin 8 können demnach zusammen die beiden SNARE-Motive von SNAP-25 ersetzen, während ein Austausch einzelner Komponenten nicht möglich ist.

Diese Befunde wurden durch Sequenzvergleiche gestützt (Abb. 24A). Syntaxin 1 und Syntaxin 7 besitzen in der -3 Ebene eine Phenylalanin wie die meisten anderen Syntaxine, während Syntaxin 8 (und einige andere Syntaxine wie z. B. Syntaxin 6) Aminosäuren mit kleinen Seitengruppen in dieser Position haben. Die Kristallstruktur zeigt, daß diese -3 Ebene im neuronalen Komplex sehr asymmetrisch ist, wobei zwei

große hydrophobe Aminosäurereste (Phe von Syntaxin 1 und Met von Synaptobrevin 2) den meisten Raum beanspruchen (Abb 24C). Deswegen ist es wahrscheinlich, daß die zwei verbleibenden Q-SNARE Motive kleine Seitenketten beisteuern, nämlich Gly und Ala von SNAP-25 (Fasshauer *et al.*, 1998b). Im endosomalen Komplex dürfte diese -3 Ebene durch Phe von Syntaxin 7, Met von Endobrevin und zwei Glycinresten von Vti1b und Syntaxin 8 gebildet werden.

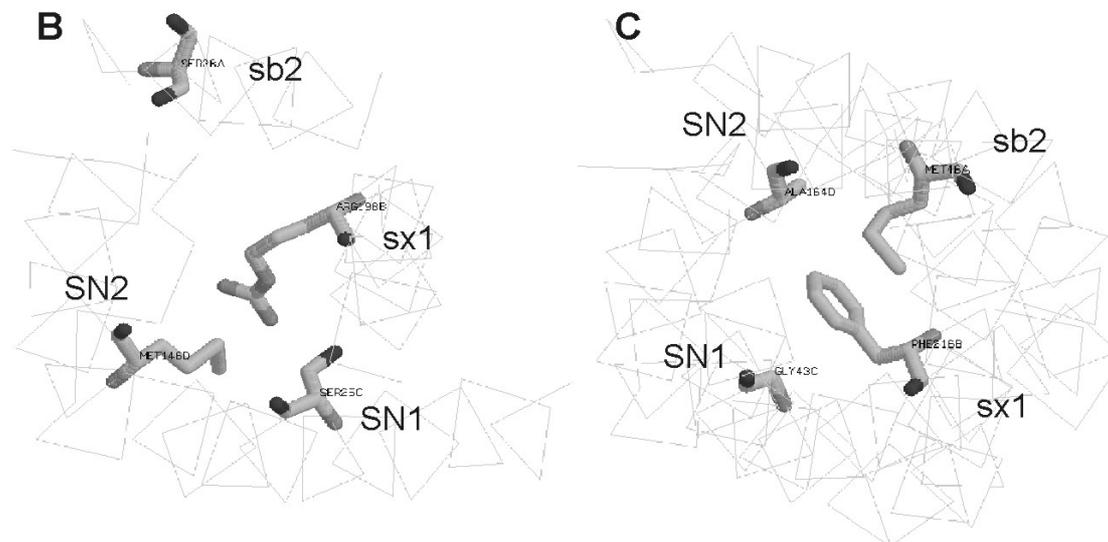
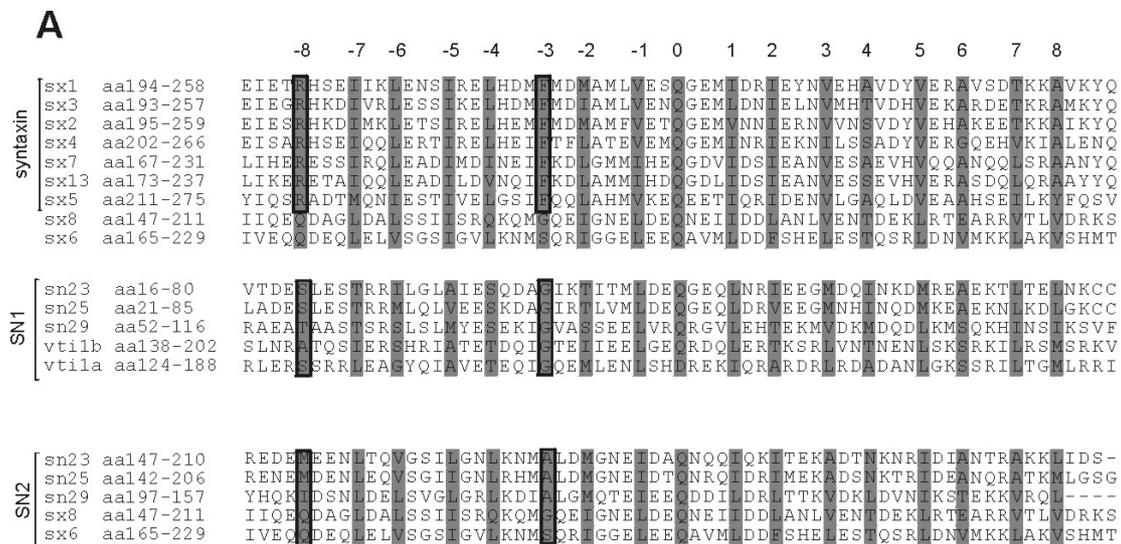


Abb. 24: Sequenzvergleich der SNARE-Motive von verschiedenen Q-SNAREs

A: Die graue Unterlegung markiert die Positionen der Aminosäuren, die in der Kristallstruktur des neuronalen Komplexes an der Bildung der Ebenen der Interaktionen der vier α -Helizes beteiligt sind (numeriert nach Fasshauer *et al.*, 1998b). Die Seitenketten, die die Syntaxin-, SN1- und SN2-Familien unterscheiden, sind eingekastelt.

Genbank accession numbers: sx1 P3285; sx2 L20823; sx3 Q08849; sx4 Q08850; sx5 Q08851; sx7 AF031430; sx13 AF031430; sx6 U56815; sx8 AF033109; SNAP-23 AF052596; SNAP-25 AF245227; SNAP-29 AF260577; vti1a AF035209; vti1b AF035208

B: Ansicht der -8 Ebene im neuronalen Kernkomplex

C: Ansicht der -3 Ebene im neuronalen Kernkomplex

Eine weitere Asymmetrie findet sich in der -8 Ebene (Abb 24B). Obwohl Synaptobrevin 2 nicht mehr an der Kontaktbildung beteiligt ist, interagiert hier das Arginin 198 von Syntaxin 1 mit einem Serinrest (SN1) und einem Methionenrest (SN2). Auch hier ist das Arginin unter den klassischen Syntaxinen konserviert, nicht jedoch bei Syntaxin 8 und Vti1b. Hier entspricht das Alanin in Vti1b eher dem Serin in SN1 als dem Methionin in SN2 und das Glutamin in Syntaxin 8 eher dem Methionin in SN2 als dem Serin in SN1. Ein Vergleich der SNARE Motive zeigt eine größere Ähnlichkeit von Vti1b mit SN1 (24,6% statt 14,0% für Vti1b mit SN2) und Syntaxin 8 mit SN2 (28,1% statt 17,5% für Syntaxin 8 mit SN1)

Damit läßt sich zusammenfassend sagen, daß Syntaxin 7 das „echte“ Syntaxin im endosomalen Komplex ist. Syntaxin 8 und Vti1b entsprechen den beiden SNARE-Motiven von SNAP-25 im neuronalen Komplex. Dabei dürfte Syntaxin 8 die Position der C-terminalen Hälfte von SNAP-25 einnehmen, Vti1b die der N-terminalen.

3.3 Charakterisierung des Proteins Vti1a- β

3.3.1 Vti1a besitzt eine hirnspezifische Splicevariante

Bei der Charakterisierung der Vti1a und Vti1b Antiseren stellte sich heraus, daß beide Proteine in allen getesteten Geweben exprimiert werden (Abb. 25). Interessanterweise reagierte das Vti1a Antiserum im Gehirn mit einer weiteren Bande einer leicht geringeren Mobilität. Um zu überprüfen, ob diese Bande eine hirnspezifische Splicevariante von Vti1a repräsentiert, wurde die kodierende Sequenz von Vti1a mit spezifischen Primern aus einer cDNA-Bibliothek aus Rattenlunge und Rattenzerebellum amplifiziert. Aus Lunge erhält man dabei ein PCR Produkt, aus dem Gehirn zwei (Abb. 26A). Alle drei PCR-Produkte wurden subkloniert und sequenziert. Dabei zeigte sich, daß die Bande höherer Mobilität aus Lunge und Zerebellum die zur publizierte Vti1a-Sequenz aus Maus homologe Sequenz aus Ratte darstellten. Die zusätzliche Bande aus Zerebellum enthielt eine Insertion von 21 Nukleotiden, während der übrige Bereiche identisch mit der Ratten Vti1a-Sequenz waren. Die Sequenz kodierte für eine hirnspezifische Isoform von Vti1a, die Vti1a- β genannt wurde. Vti1a- β besitzt eine Insertion der Aminosäuren LIKLREE C-terminal von Aminosäure 114. Aminosäure 114 ist am N-terminalen Ende des SNARE Motivs lokalisiert. Mit spezifischen Primern für die beiden Isoformen von Vti1a und solchen, die die Isoformen nicht unterscheiden, wurde das Expressionsmuster mittels RT-PCR überprüft. Vti1a- β wurde in den neuronalen Geweben (Zerebellum, Cortex, Hippocampus), aber nicht in Lunge, Leber, Niere oder Milz gefunden, während die RT-PCRs für die ubiquitäre Isoform in allen Geweben positiv war (Abb. 26B).

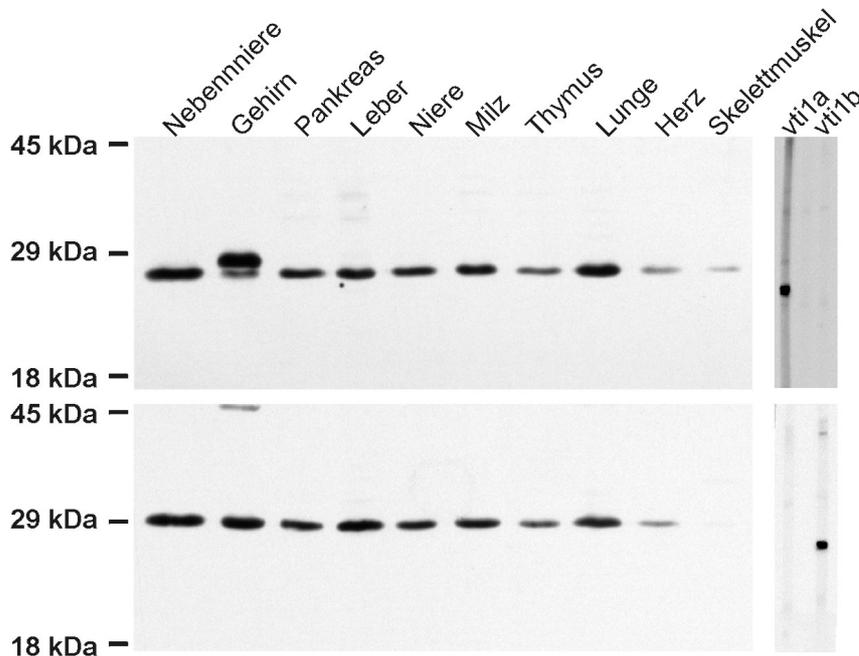


Abb. 25: Gewebeverteilung von Vti1a und Vti1b und Spezifität der Seren

20 μ g einer Membranfraktion (linke Seite) aus verschiedenen Geweben wurden durch 12%-ige SDS-PAGE und Immuoblotting mit Antikörpern gegen Vti1a (A) und Vti1b (B) analysiert. Die Spezifität der Antikörper wurde mit je 40ng verschiedenen rekombinanten Vti1a und Vti1b, die durch 12%-ige SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert waren, überprüft.

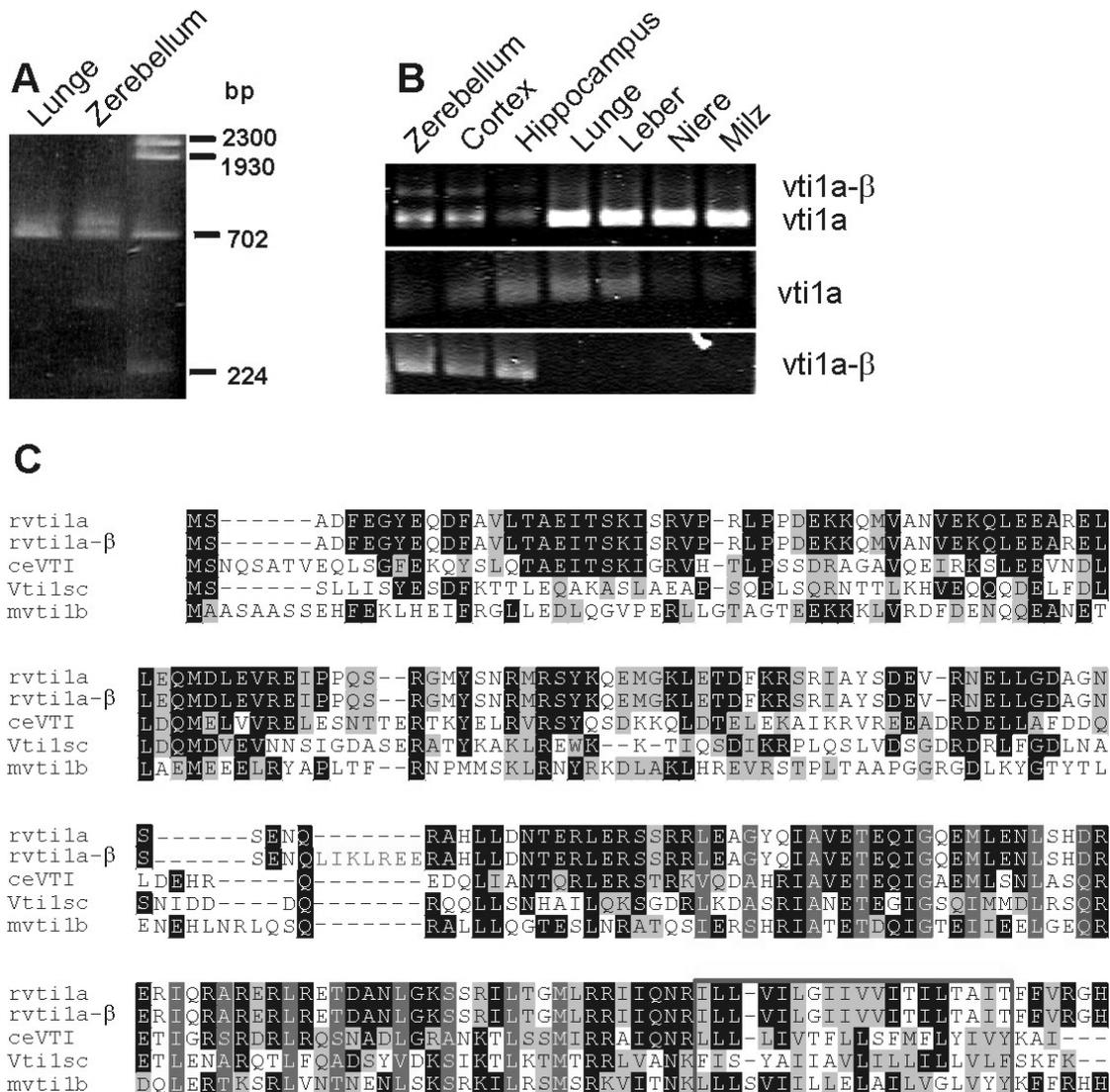


Abb. 26: Vt1a besitzt eine hirnspezifische Splicevariante

A: Produkte der PCR mit Primern für Vt1a, die aus einer cDNA Bibliothek aus Rattenlunge und Rattenzerebellum amplifiziert wurden.

B: Expressionmuster von Vt1a und Vt1a-β in verschiedenen Geweben. RT-PCRs wurden durchgeführt mit Primern, die sowohl Vt1a als auch Vt1a-β (oben), nur Vt1a (5'-Primer bindet an die Kodons 110-116, Mitte) oder nur Vt1a-β (5'-Primer bindet an die Vt1a-β spezifischen Kodons 115-121, unten) amplifizieren.

C: Sequenzvergleich von Vt1p aus *S. cerevisiae* (VTI1sc, Genebank accession number Z47815), dem C-terminalen Teil des putativen *C. elegans* Protein (ceVTI, CAB16506), Vt1b aus Maus (mvt1b, AF035208), Vt1a (rvt1a, AF262221) und Vt1a-β (rvt1a-β, AF262222) aus Ratte. Identische Aminosäuren sind schwarz, konservierte Aminosäuren sind grau unterlegt. Die Aminosäuren, die zur Ebenenbildung im neuronalen Kernkomplex beitragen sind blau unterlegt, die 0-Ebene rot. Die putativen Transmembranregionen am C-Terminus sind rot umrahmt.

Maus und Ratten Vt1a wie auch die humane Sequenz, die aus Fragmenten der EST-Datenbanken zusammengesetzt wurde, weisen ein Aspartat in Position 156 statt des in anderen Vt1-Proteinen und Q-SNAREs gefundenen konservierten Glutamins auf. Vt1a-Proteine aus den verschiedenen Säugern sind die einzig bisher bekannten SNAREs, die in dieser Position ein Aspartat aufweisen. Ein Aspartat in dieser Position könnte ebenfalls eine hydrophile Interaktion mit einem Arginin des korrespondierenden R-SNAREs ausbilden. Die Vt1a Proteine aus Ratte und Maus

sind zu 96% identisch (Abb. 26C).

3.3.2 Vti1a- β ist auf synaptischen Vesikeln und allen Recyclingintermediaten lokalisiert

In weiteren Versuchen wurde die subzelluläre Lokalisation von Vti1a untersucht. Dazu wurden kultivierte Hippocampuszellen und Schnitte aus dieser Gehirnregion immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. In kultivierten Neuronen ist Vti1b in großen Zisternen im Zellkörper lokalisiert (Abb. 27A). Doppelfärbungen zeigen keine Überlappung von Vti1b und Synaptobrevin 2. Dagegen wurde Vti1a zusätzlich zum Zellkörper in den Fortsätzen der Zellen gefunden. Hier war eine deutliche Überlappung mit Synaptobrevin 2 zu sehen. Es handelt sich dabei um Verdickungen im Neuriten, sogenannte Varikositäten, die eine Vielzahl von Synapsen enthalten und deswegen eine deutliche Färbung des sich auf synaptischen Vesikeln befindlichen Synaptobrevin 2 zeigen. Ein vergleichbares Ergebnis wurde bei Färbungen an Hippocampuschnitten erhalten (Abb. 27B). Hier markieren Vti1b Antikörper den Zellkörper der sehr großen Pyramidenzellen, während Vti1a zusätzlich die Nervenendigungen der Moosfaserschicht anfärbt. Für Vti1b ist in der Moosfaserschicht eine Kollokalisierung mit Synaptobrevin festzustellen.

Die Immunfluoreszenz zeigt, daß ein Teil von Vti1a in Synapsen lokalisiert ist. Um einen genaueren Überblick von der Lokalisation von Vti1a in Synapsen zu bekommen, wurden subzelluläre Fraktionierungen durchgeführt. In einem ersten Versuch wurden synaptische Vesikel nach einer Methode von Huttner *et al.* (Huttner *et al.*, 1983) isoliert und die einzelne Fraktionen durch SDS-PAGE und Immunoblotten mit Antikörpern gegen Vti1a, Vti1b und als Marker für synaptische Vesikel Synaptobrevin 2 analysiert (Abb. 28). Bei dieser Präparation wird aus Homogenat aus Rattenhirn-Synaptosomen (P2) isoliert, lysiert und durch differentielle Zentrifugation in eine Plasmamembranfraktion (LP1) und eine Fraktion der synaptischen Vesikel (LP2) getrennt. Die LP2 Fraktion wird über ein Saccharosedichtegradienten und anschließende Chromatographie auf einer CPG-Säule gereinigt. Man erhält von dieser Säule in einer Fraktion synaptische Vesikel von hoher Reinheit, die CPG3 Fraktion. Vti1a- β wird parallel mit Synaptobrevin 2 in den Fraktionen P2, LP2 und CPG3 angereichert. Die etwas kleinere ubiquitäre Vti1a Isoform und Vti1a- β waren beide im Homogenat und P1 zu finden, während Vti1a- β auch in LP2 und CPG3 detektierbar und damit auf synaptischen Vesikeln angereichert ist. Vti1b ist zwar in jeder Fraktion detektierbar, aber nicht auf synaptischen Vesikeln angereichert.

In einem nächsten Versuch wurde untersucht, ob Vti1a auch auf Clathrin coated Vesikeln (CCV) zu finden ist. Da die Membran synaptischer Vesikel bei der Exozytose in die Plasmamembran inkorporiert wird, müssen die Membranproteine über Endozytose wieder rezykliert werden (siehe 1.4.). Clathrin coated Vesikel wurden nach einer Methode von Maycox *et al.* isoliert (Maycox *et al.*, 1992). Dabei werden wieder Synaptosomen aus Rattenhirnhomogenat isoliert und lysiert. CCVs werden dann über Ficollgradienten und Saccharosegradienten in Schwerem Wasser aufgereinigt. Als Marker für die CCVs haben wird die leichte Kette von Clathrin benutzt. Vti1a ist wie andere Membranproteine des synaptischen Vesikels (SCAMP, Synaptobrevin 2 und Synaptophysin) auf CCVs zu finden (Abb. 29). Dagegen ist Vti1b und die GTPasen Rab3a und Rab5, wie früher gezeigt (Fischer von Mollard *et al.*, 1994b; Maycox *et al.*, 1992), abgereichert.

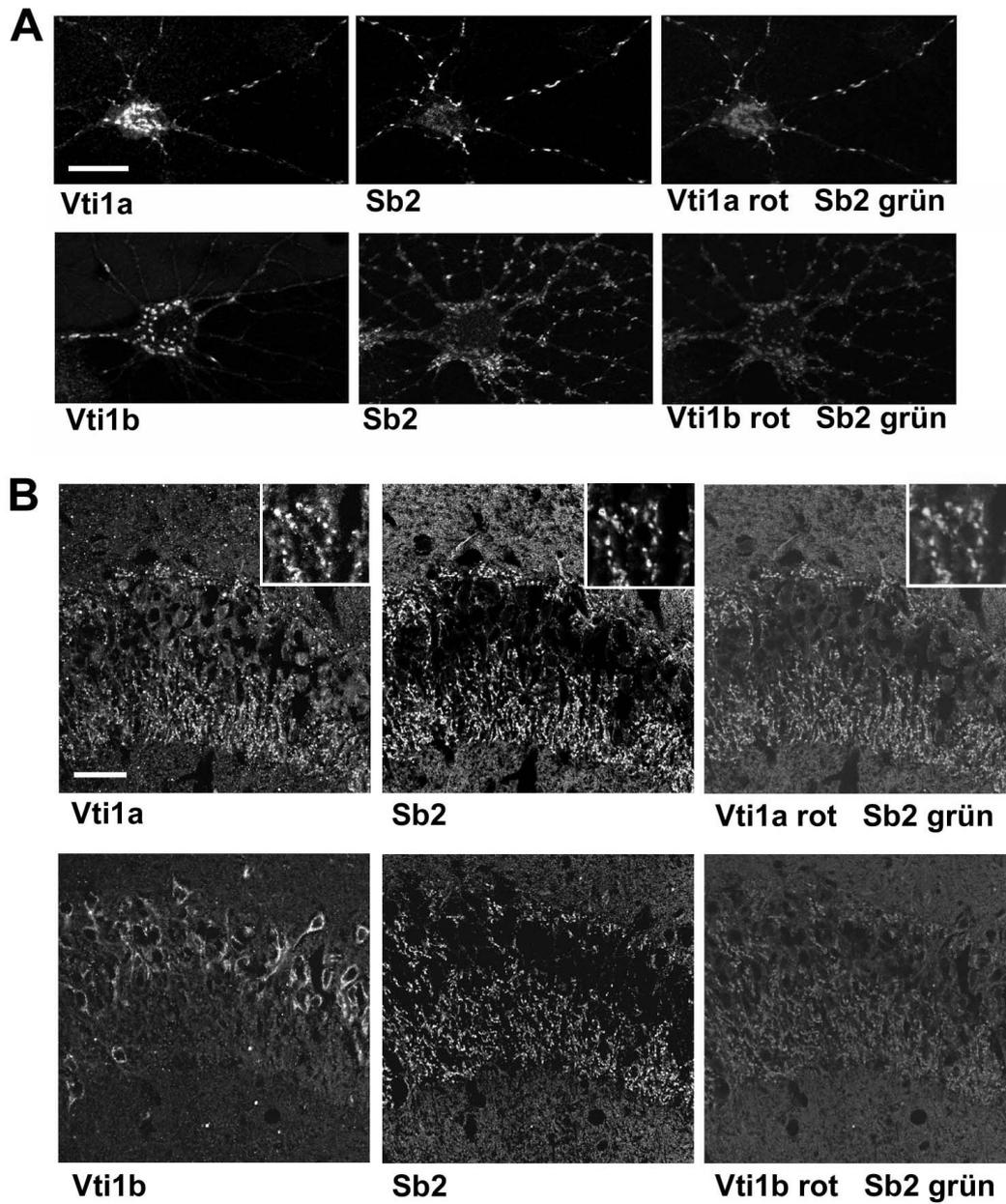


Abb. 27: Immunofluoreszenzmarkierung von Vti1a und Vti1b

A: Kultivierte Hippocampusneuronen aus Ratte wurden mit Antikörpern gegen Vti1a oder Vti1b (rot) und Synaptobrevin 2 (grün) doppelmarkiert. Balken 20µm

B: 7µm dicke Kryoschnitte vom Hippocampus aus der Ratte wurden mit Antikörpern gegen Vti1a oder Vti1b (rot) und Synaptobrevin 2 (grün) doppelmarkiert. Die Insets zeigen eine 3-fache Vergrößerung. Balken 30µm

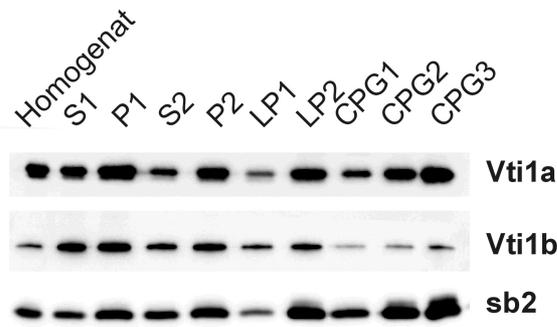


Abb. 28: Anreicherung von Vti1a- β während der Isolierung von synaptischen Vesikeln

Synaptosomen (P2) wurden aus Rattenhirnhomogenat (Homogenat) isoliert, osmotisch lysiert und durch differentielle Zentrifugation in eine Membranfraktion (LP1), die bei niedriger Drehzahl pelletiert wird und hauptsächlich die Plasmamembran der Synapsen enthält, und eine Membranfraktion (LP2), die bei hoher Drehzahl pelletiert wird und die synaptische Vesikel enthält, fraktioniert. Die synaptischen Vesikel (LP2) wurden über einen Saccharosedichtegradienten und durch Chromatographie auf einer CPG-Säule weiter gereinigt. Von der CPG Säule eluieren drei Fraktionen (CPG1, CPG2, CPG3), von denen CPG3 sehr reine synaptische Vesikel enthält. Gleiche Proteinmengen der Proben wurden durch SDS-PAGE und Immunoblotting mit den angezeigten Antikörpern analysiert. sb2, Synaptobrevin 2, S1 und P1 sind Überstand und Pelletfraktion nach einer ersten Zentrifugation von 10min bei $800\times g_{av}$, S2 der Überstand, den man nach dem Pelletieren der Synaptosomen (P2) erhält.

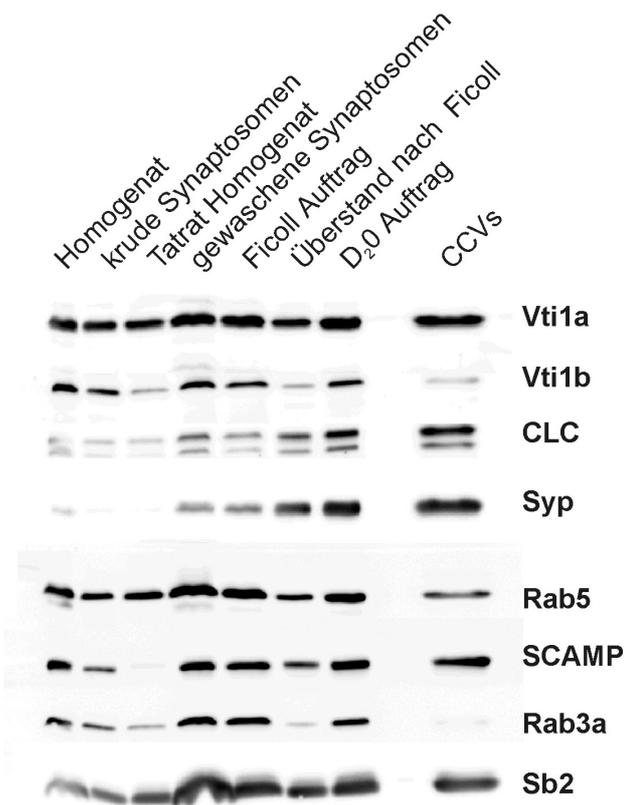


Abb. 29: Anreicherung von Vti1a- β während der Isolierung von Clathrin coated Vesikeln

Clathrin coated Vesikel (CCVs) wurden aus einer Synaptosomenfraktion (CCVs) die aus Rattenhirnhomogenat (Homogenat) als Startmaterial gewonnen wurde, aufgereinigt. Die Synaptosomen werden noch einmal homogenisiert (Taträt Homogenat) und gewaschen (gewaschene Synaptosomen). Eine angereicherte Fraktion von CCVs wurde aus einem Pellet einer Zentrifugation von lysierten Synaptosomen, das auf einen Ficoll-Gradienten aufgetragen wurde (Ficoll Auftrag), gewonnen. Der Überstand nach der Ficollzentrifugation (Überstand nach Ficoll) wurde nach weiteren differentiellen Zentrifugationen auf eine Saccharosegradienten in schweren Wasser aufgetragen (D₂O Auftrag), aus dem die CCVs gewonnen werden. CLC, Clathrin light chain; sb2, Synaptobrevin 2; syp, Synaptophysin.

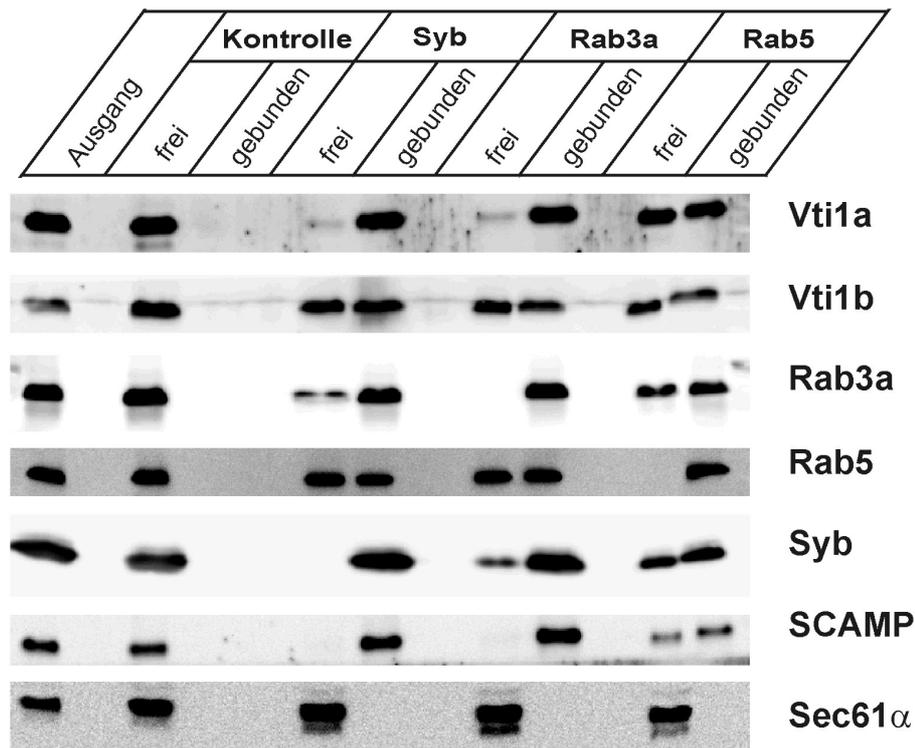


Abb. 30: Immunisolierung von synaptischen Vesikeln und Endosomen aus Gehirn

Der Überstand einer $50.000\times g_{av}$ Zentrifugation eines Rattenhirnhomogenates (Ausgang) wurde mit Immunobeads, an die Antikörper gegen Synaptobrevin 2 (sb2), Rab3a oder Rab5 kovalent gekoppelt waren, versetzt. Durch Glycin inaktivierte Beads (Kontrolle) dienten als Kontrolle für unspezifische Bindung. Die Proteinzusammensetzung der an die Beads gebundenen (gebunden) wurde mit der der ungebundenen Membranen (frei), die durch Ultrazentrifugation pelletiert worden waren, verglichen. Alle Fraktionen wurden durch Immunoblot analysiert.

In einem weiteren unabhängigen Experiment sollte die Lokalisation von Vti1a auf synaptischen Vesikeln und endosomalen Kompartimenten überprüft werden. Durch Immunisolierung mit Antikörper gegen Synaptobrevin 2, Rab3a und Rab5 wurden Organellen aus einem $50.000\times g_{av}$ Überstand aus Rattenhirnhomogenat isoliert. Rab3a und Rab5 haben eine überlappende, aber nicht identische Verteilung. Rab3a ist wie Synaptobrevin 2 ein Marker für synaptische Vesikel, und findet sich nicht auf Clathrin coated Vesikeln und im Golgi Apparat. Rab5 gilt als Marker für frühe Endosomen, ein Teil ist aber in Synapsen auch auf synaptischen Vesikeln zu finden.

Vti1a- β enthaltende Organellen wurden fast quantitativ mit Synaptobrevin 2 und Rab3a-Beads isoliert (Abb. 30). Dies bestätigt die Lokalisation des Proteins auf synaptischen Vesikeln. Mit Rab5-Beads konnte ebenfalls eine deutliche Menge von Vti1a- β positiven Organellen isoliert werden, ebenso wie Synaptobrevin 2, SCAMP und Rab3a. Es könnte sich dabei um Rab5 positive synaptische Vesikel oder Endosomen handeln.

Vti1b positive Organellen wurden auch immunisoliert, allerdings in deutlich geringeren Ausbeuten. Dies zeigt, daß Vti1b nur in niedriger Konzentration auf synaptischen Vesikeln vorkommt.

3.3.3 Vti1a- β bildet einen vom neuronalen verschiedenen SNARE Komplex in Synapsen

Weil Vti1a- β auf synaptischen Vesikeln gefunden wurde, stellte sich die Frage, ob es einen SNARE-Komplex mit den SNARE-Proteinen, die für die neuronale Exozytose verantwortlich sind (Synaptobrevin 2, Syntaxin 1 und SNAP-25) bildet. Deswegen wurden aus einem Triton-X-100 Extrakt aus Synaptosomen Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen Synaptobrevin 2, Syntaxin 1, SNAP-25 und Vti1a durchgeführt (Abb. 31). Synaptobrevin 2, Syntaxin 1 und SNAP-25 wurden nicht durch Antikörper gegen Vti1a koimmunpräzipitiert, obwohl Vti1a fast vollständig aus dem Extrakt depletiert wurde. Das gegen Vti1a gerichtete Antiserum konnte das Golgi SNARE Syntaxin 6 koimmunpräzipitieren in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Xu *et al.* (Xu *et al.*, 1998). Das zeigt, daß das Serum in der Lage ist, SNARE Komplexe immunpräzipitieren.

Die Antikörper gegen Synaptobrevin 2, Syntaxin 1 und SNAP-25 präzipitierten das entsprechende Protein, sowie die Partner im neuronalen SNARE Komplex, jedoch nicht Vti1a. Das zeigt, daß unter den gegebenen Versuchsbedingungen SNARE Komplexe präzipitierbar sind, diese aber nicht Vti1a in detektierbaren Mengen enthalten. Lediglich eine schwache Vti1a Bande war in den Synaptobrevin 2 Immunpräzipitaten zu detektieren. Da Vti1a kein Synaptobrevin koimmunpräzipitiert, dürfte es sich um eine unspezifische Interaktion handeln (siehe Diskussion).

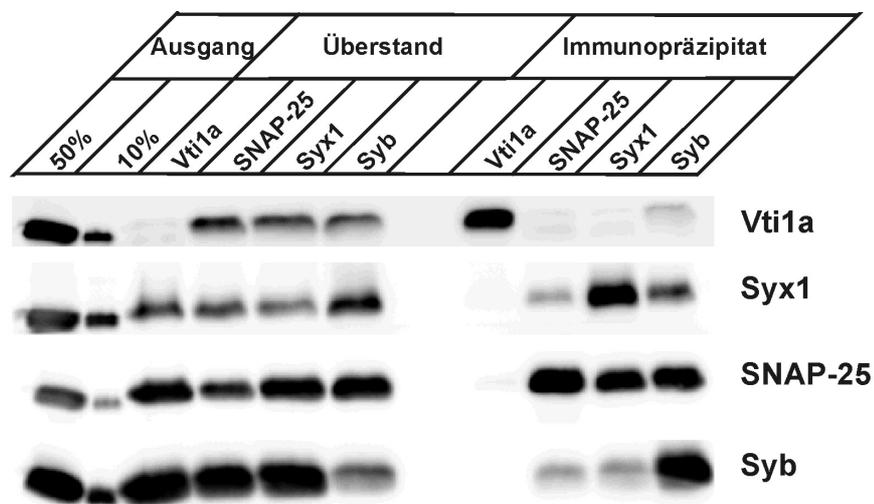


Abb. 31: Vti1a- β ist nicht Bestandteil des neuronalen SNARE-Komplexes

Aus Detergenzextrakt aus mit Triton X-100 solubilisierte Synaptosomen wurden Immunpräzipitationen mit Antikörper gegen Vti1a, SNAP-25, Syntaxin 1 (sx1) und Synaptobrevin 2 (sb2). Gezeigt ist die Immunoblotanalyse mit den angezeigten Antikörpern des Detergenzextrakts (Ausgang, aufgetragen sind 50% bzw. 10% bezogen auf die äquivalente Menge des Immunpräzipitats) des Überstandes nach der Immunpräzipitation (aufgetragen sind 30% des Materials) und der Immunpräzipitate (aufgetragen ist das gesamte Material).

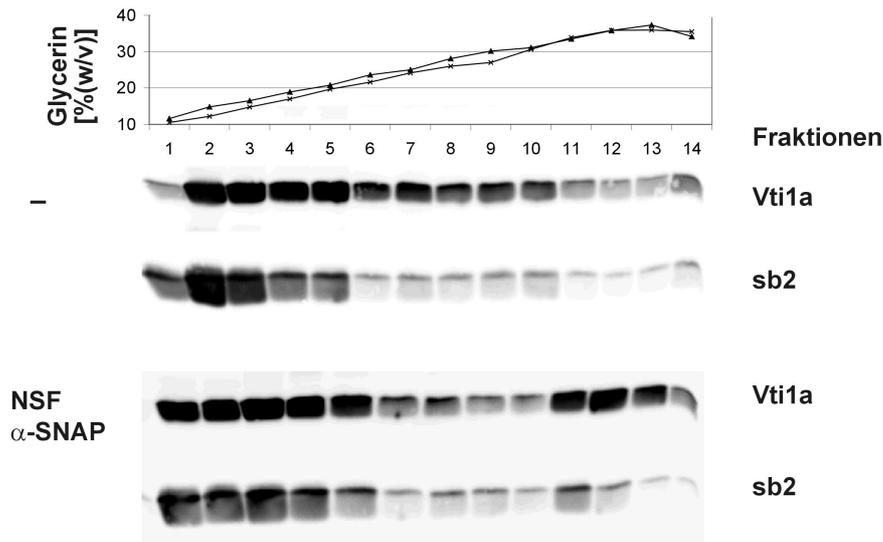


Abb. 32: Vti1a- β ist Teil eines SNARE-Komplexes der NSF und α -SNAP bindet

Ein Detergenzextrakt mit Triton X-100 aus einer Präparation von synaptischen Vesikeln (LP2) wurde ohne (-) oder mit NSF und α -SNAP inkubiert und über einem Glyceringradienten aufgetrennt. Nach Gleichgewichtszentrifugation wurden die Fraktionen durch SDS-PAGE und Immunoblotting mit Antikörpern gegen Vti1a und Synaptobrevin 2 (sb2) analysiert.

Nachdem gezeigt wurde, daß Vti1a- β keinen SNARE-Komplex mit den neuronalen SNAREs bildet, wollten wir untersuchen, ob Vti1a- β in Synapsen Teil eines neuen SNARE Komplexes ist. SNARE Komplexe besitzen die Eigenschaft, NSF und α -SNAP zu binden und einen sogenannten 20S-Komplex zu bilden (Söllner *et al.*, 1993a). NSF kann unter ATP-Verbrauch die SNARE Komplexe wieder dissoziieren. Ein Triton X-100 Extrakt wurde aus LP2 Fraktion aus Rattenhirn, die an synaptischen Vesikeln angereichert ist, generiert und mit rekombinanten NSF und α -SNAP in Gegenwart von EDTA inkubiert. Da EDTA das zur Hydrolyse von ATP notwendige Mg^{2+} bindet, kann sich zwar ein 20S-Komplex bilden, der aber nicht durch NSF dissoziiert wird. In einem Kontrollansatz wurde NSF und α -SNAP weggelassen. Die Extrakte wurden auf einem Glycerindichtegradienten aufgetrennt. Vti1a und Synaptobrevin 2 wurden in den einzelnen Fraktionen durch Immunoblotten identifiziert (Abb. 32). Signifikant mehr Synaptobrevin 2 und Vti1a- β wurden nach Zugabe von NSF und α -SNAP in Fraktionen höherer Dichte (Fraktionen 11-14) als in der Kontrollreaktion gefunden. Das deutet darauf hin, daß eine Subfraktion von Vti1a- β in einem SNARE-Komplex vorhanden ist, an den NSF und α -SNAP binden können.

In einem weiteren Versuch machten wir uns die Beobachtung zunutze, daß das Vierhelixbündel eines SNARE-Komplexes (Kernkomplex) deutlich stabiler gegen Proteasen ist als die Einzelproteine (Fasshauer *et al.*, 1998a; Poirier *et al.*, 1998) (siehe auch 3.2.4). Wir haben deswegen untersucht, ob ein Teil vom Vti1a- β in Synapsen ebenfalls in solch einem proteasegeschützten Kernkomplex vorhanden ist.

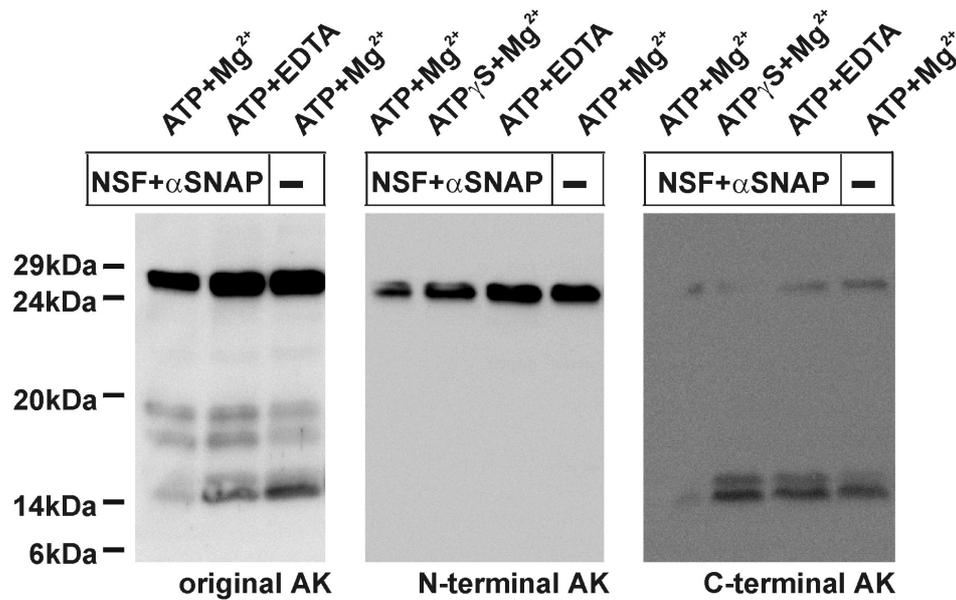


Abb. 33: Das SNARE-Motiv von Vti1a- β ist in einem SNARE Komplex resistent gegen limitierte Proteolyse

Ein Detergenzextrakt mit Triton X-100 aus einer Präparation von synaptischen Vesikeln (LP2) wurde mit NSF und α -SNAP in Gegenwart von ATP und Mg^{2+} (Dissoziation von SNARE Komplexen) oder ATP γ S und Mg^{2+} oder ATP und EDTA (Inhibierung der Dissoziation) inkubiert. Die Fraktionen wurden mit Trypsin inkubiert und durch SDS-PAGE und Immunoblotting mit Antikörpern gegen Vti1a (links), gegen die N-terminale Region von Vti1a (Mitte) sowie gegen die C-terminale Region von Vti1a (rechts) gerichtete Antikörper analysiert.

Ein Triton X-100 Extrakt wurde aus einer LP2 Fraktion wurde mit Trypsin unter verschiedenen Bedingungen inkubiert (Abb. 33). Dissoziation der SNARE Komplexe durch Zugabe von NSF, α -SNAP, ATP und Mg^{2+} (erste Bahn), Inhibierung der Dissoziation durch Blockieren der ATPase-Aktivität von NSF durch EDTA (Bahn 2), oder ohne Zugabe von NSF und α -SNAP (Bahn 3). Vti1a- β wurde in den Fraktionen durch Immunoblotten detektiert. Ein proteasegeschütztes 14kDa Fragment wurde in den Proben gefunden, die die Komplexbildung favorisieren, aber nicht wenn SNARE Komplexe dissoziiert werden. Um sicher zu stellen, daß es sich bei dem 14kDa Fragment um das SNARE Motiv handelt, wurde das Vti1a-Serum affinitätsgereinigt mit immobilisiertem GST-Fusionproteinen des N-terminalen Teils von Vti1a (Aminosäuren 1-114) und des C-terminalen SNARE Motivs (Aminosäuren 115-192). Die affinitätsgereinigten Antikörper waren spezifisch für das jeweilige Antigen und zeigten keine Kreuzreaktivität (nicht gezeigt). Dissoziation der SNARE Komplexe wurde in diesem Versuch auch durch Zugabe von dem nicht hydrolysierbaren ATP Analog ATP γ S inhibiert, um einen EDTA Effekt auf die Proteolyse auszuschließen. Das 14kDa Fragment wurde nur von Antikörpern gegen das SNARE Motiv erkannt, nicht jedoch von Antikörpern gegen den N-Terminus. Aus der Verschiebung im Dichtegradienten wie aus dieser limitierten Proteolyse kann geschlossen werden, daß Vti1a- β Bestandteil eines SNARE Komplexes in Nervenendigungen ist, dessen Zusammensetzung noch geklärt werden muß.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß Endobrevin ein R-SNARE mit einer weiten Verteilung innerhalb des endosomalen Weges ist und an der homotypischen Fusion von frühen und von späten Endosomen beteiligt ist. Es wurde ein Endobrevin enthaltender SNARE Komplex mit Syntaxin 7, Syntaxin 8 und Vti1b identifiziert, der an der Fusion von späten Endosomen beteiligt ist. Desweiteren wurde gezeigt, daß eine hirnspezifische Splicevariante von Vti1a auf kleinen synaptische Vesikeln lokalisiert ist und an einem neuen SNARE Komplex in Synapsen beteiligt ist.

4.1 Subzelluläre Lokalisation von endosomalen SNAREs

Jedes Transportvesikel, das sich von einem Donorkompartiment abschnürt, muß die SNAREs, die die spezifische Fusion mit der Zielmembran erlauben, tragen. Nach der Fusion müssen die entsprechenden SNAREs wieder zum Donorkompartiment transportiert werden. Da es sich bei den meisten SNAREs um Transmembran- oder zumindest membranassoziierte Proteine handelt, ist anzunehmen, daß auch dieses Recycling durch vesikulären Transport erfolgt. Deswegen kann man erwarten, daß man zumindest einen SNARE-Partner eines an einem bestimmten Fusionsereignis beteiligten SNARE-Komplexes auf dem Donor wie auf dem Akzeptorkompartiment, Transportvesikeln und sämtlichen Intermediaten des Recycling Weges, wenn auch in unterschiedlichen Konzentrationen, finden kann. Da wahrscheinlich das Sortieren nicht mit absoluter Effizienz funktioniert, findet man alle SNARE Partner auf allen erwähnten Kompartimenten. Man findet z.B. Syntaxin 1 und SNAP-25, die an der Fusion von synaptischen Vesikeln mit der Plasmamembran beteiligt sind, hauptsächlich auf der Plasmamembran, aber auch auf frühen Endosomen und synaptischen Vesikeln (Otto *et al.*, 1997; Walch-Solimena *et al.*, 1995). Es kommt hinzu, daß SNARE-Proteine als Transmembranproteine vom endoplasmatischen Retikulum (Annaert *et al.*, 1997; Kutay *et al.*, 1995) über den biosynthetischen Weg zu ihrem Zielort gelangen müssen und deswegen auf einer Vielzahl von Organellen (wie z.B. ER, Golgi Apparat, Trans-Golgi-Netzwerk), wenn auch in niedriger Konzentration, lokalisiert sind, ohne hier funktionell zu sein.

SNAREs, die einen Fusionsschritt katalysieren, müssen zwischen Donor- und Akzeptormembran verteilt sein. Bei einer „heterotypischen“ Fusion, z.B. der Fusion eines synaptischen Vesikels mit der Plasmamembran, ist unter normalen Bedingungen Synaptobrevin 2 hauptsächlich auf der Vesikelmembran lokalisiert, während Syntaxin 1 und SNAP-25 überwiegend an der Plasmamembran zu finden sind. Auch bei sogenannten homotypischen Fusionsritten wie den hier untersuchten (also der Fusion gleichartiger Organelle) kann man nicht unbedingt davon ausgehen, daß alle an der Fusion beteiligten SNAREs eine identische Verteilung aufweisen.

Ein detailliertes Wissen über die Lokalisation von SNARE-Proteinen ist deswegen eine Grundvoraussetzung, um Hypothesen über die Funktion dieser Proteine zu formulieren, aber keineswegs ausreichend, um Rückschlüsse auf die von ihnen katalysierten Fusionsritte zu ziehen. Aufgrund des Recyclingprozesses und der dadurch bedingten, mitunter weiten, Verteilung auf verschiedenen Organellen ist es oft sehr schwierig durch Immunfluoreszenzstudien die Lokalisation eines SNAREs zweifelsfrei festzustellen. Als Methode der Wahl gilt daher eine quantitative Analyse von elektronenmikroskopischen Markierungen und ein Vergleich mit bekannten Markerproteinen.

Einige der in dieser Arbeit behandelten SNAREs sind bereits durch

Immunogoldelektronenmikroskopie lokalisiert worden. Syntaxin 7 wurde in NIH3T3-Zellen (Nakamura *et al.*, 2000) und MDCK-Zellen (Mullock *et al.*, 2000) späten, in CHO-Zellen frühen Endosomen zugeordnet (Prekeris *et al.*, 1999). In allen drei Studien wurde jedoch eine deutliche Markierung an multivesikulären Körpern beobachtet. Es handelt sich hier weniger um Unterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen als vielmehr Differenzen in der Interpretation der markierten Membranstrukturen. Die quantitative Immungoldauswertung mit verschiedenen Markerproteinen zeigt die deutlichste Kollokalisierung mit dem kationenunabhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (Mullock *et al.*, 2000). Der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor ist vor allem an späten Endosomen lokalisiert und erreicht das Lysosom nicht, sondern wird zum Trans-Golgi-Netzwerk zurücktransportiert (Griffiths *et al.*, 1988).

Syntaxin 8 wurde in PC12 und COS7-Zellen innerhalb des endosomalen Kompartiments auf frühen und späten Endosomen sowie Lysosomen gleichmäßig verteilt gefunden, ein deutlicher Anteil ist im Trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert (Prekeris *et al.*, 1999). Subramanian *et al.* fanden Syntaxin 8 in NRK-Zellen auf vesikulotubulären Strukturen und multivesikulären Körpern, die sie den frühen Endosomen zuordnen, und einen geringeren Anteil auf späten Endosomen, der Zelloberfläche und coated pits (Subramaniam *et al.*, 2000). Auch hier ist eher eine Differenz in der Bezeichnung der Kompartimente als ein Unterschied in der Lokalisation zu sehen.

Aufgrund der Differenzen in der Literatur zur Lokalisation von Endobrevin zwischen Advani *et al.* (Advani *et al.*, 1998) und Wong *et al.* (Wong *et al.*, 1998b) war eine detaillierte Untersuchung notwendig. Advani *et al.* konnten durch Immunfluoreszenz mit myc-getaggten-Endobrevin in NRK Zellen keine Überlappung mit Mannosidase II, einem Markerprotein für den cis und medialen Golgi-Apparat, dem Transferrin-Rezeptor als Marker für Recycling-Endosomen und LAMP-1/lgp120 als Marker für späte Endosomen/Lysosomen feststellen. Wong *et al.* dagegen fanden eine Kollokalisierung von Endobrevin und dem Transferrin-Rezeptor, so daß sie Endobrevin auf Recycling-Endosomen vermuteten. Durch Immunogoldelektronenmikroskopie in J774-Zellen wurde Endobrevin an tubovesikulären Strukturen des frühen Endosoms, das durch internalisiertes BSA Gold markiert war, lokalisiert. Eine sehr viel geringere Markierung an der Plasmamembran und dem späten Endosom wird erwähnt.

In dieser Arbeit wurde Endobrevin auf frühen und späten Endosomen gefunden. Die hier durchgeführte elektronenmikroskopische Analyse zeigt deutlich, daß Endobrevin auf Endosomen vom vakuolären Typ wie auch auf multivesikulären Körpern, also auf frühen und späten Endosomen zu finden ist (Abb. 6). Die Lokalisation auf späten Endosomen wird durch eine deutliche Überlappung auf diesem Kompartiment mit LIMP-II und MPR-46 unterstrichen (Abb. 7 und Tab. II). In Übereinstimmung mit diesen Befunden zeigt die Verschiebung von mit Meerrettichperoxidase markierten endosomalen Kompartimenten im Dichtegradienten, daß Endobrevin eine weitere Verteilung besitzt als Rab5 als Marker für frühe Endosomen (Abb. 8). Ein ähnliches Ergebnis erhält man bei der Immunisolierung von Rab5-positiven und Endobrevin-positiven Organellen. Es gibt keine vollständige Überlappung. Vielmehr ist Endobrevin deutlich auch im späten endosomalen Weg lokalisiert, wie die Isolierung von LIMP-II positiven Organellen mit Endobrevin-Beads zeigt (Abb. 9).

In einer kürzlich erschienenen Studie wurde in MDCK-Zellen durch

Immunfluoreszenz eine Kollokalisierung von Syntaxin 7 und Endobrevin, sowie Endobrevin und LAMP-1 gezeigt (Mullock *et al.*, 2000). Die Kollokalisierung von Endobrevin und Syntaxin 7 ist durch quantitative Immunelektronenmikroskopie in diesem Zelltyp untermauert. Es wurden auch Endobrevin-positive Strukturen beobachtet, die von Syntaxin 7 positiven Strukturen verschieden waren, wobei es sich hier um frühe Endosomen handeln könnte.

Mit den in dieser Arbeit beschriebenen Antikörpern gegen Vt1a und Vt1b ist es bisher nicht gelungen die Lokalisation der Proteine durch Elektronenmikroskopie zu analysieren. Auch die publizierten Daten zu diesen Proteinen sind spärlich. Überexpression von epitopmarkiertem Vt1b führte zu einer Akkumulation in der Golgi-Region (Advani *et al.*, 1998), immunzytochemische Markierung von nativen Protein zeigen eine Überlappung mit dem Golgi-Marker Mannosidase II (Xu *et al.*, 1998). Immunzytochemische Färbungen mit den beschriebenen Antikörpern gegen das endogene Protein sprechen eher für eine Lokalisation auf Endosomen und Trans-Golgi-Netzwerk (persönliche Mitteilung von Vera Kreykenbohm und Dr. Gabriele Fischer von Mollard). Vt1a dürfte ebenfalls wie immunzytochemische Untersuchungen zeigen auf Endosomen und Trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert sein (persönliche Mitteilung von Vera Kreykenbohm und Dr. Gabriele Fischer von Mollard, im Einklang mit nichtpublizierten Ergebnissen, die in Subramaniam *et al.*, (2000) erwähnt wurden).

4.2 Funktion der endosomalen SNAREs

Einige vor kurzem erschienene Studien aus anderen Laboren zeigen ebenfalls, daß Syntaxin 7, Syntaxin 8 und Endobrevin am endosomalen Transport beteiligt sind (Mullock *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2000; Prekeris *et al.*, 1999; Ward *et al.*, 2000). Bei der Untersuchung der Exozytose von synaptischen Vesikeln hatten sich clostridialen Neurotoxine (Tetanustoxin und Botulinumneurotoxine) als sehr wertvolles Hilfsmittel erwiesen, da die an diesem Fusionschritt beteiligten SNAREs Synaptobrevin 2, Syntaxin 1 und SNAP-25 von diesen Toxinen hochselektiv gespalten werden (Jahn und Niemann, 1994; Montecucco und Schiavo, 1994). Da keines dieser SNAREs von den getesteten clostridialen Neurotoxinen (Tetanustoxin, Botulinumneurotoxine C, D und E) geschnitten wird (nicht gezeigt), mußte die Funktion dieser SNAREs entweder durch Inhibierung durch Antikörper oder durch Konkurrenz mit einem Überschuß an löslichem SNAREs untersucht werden.

Überexpression der löslichen Domäne von Syntaxin 7 führte zu einer Verlangsamung des Transports von Dextran in "LAMP-2 positive Organelle", d.h. in späte Endosomen und/oder Lysosomen (Nakamura *et al.*, 2000). Die *in vitro* Fusion von späten Endosomen/Lysosomen aus Leber wurde durch Antikörper gegen Syntaxin 7 und rekombinantes lösliches Syntaxin 7 inhibiert (Ward *et al.*, 2000). Dagegen wurde die Fusion von frühen Endosomen nicht beeinträchtigt, wie das auch hier beobachtet wurde (Abb. 15). Mullock *et al.* zeigten, daß Antikörper gegen Syntaxin 7 die Fusion von späten Endosomen mit Lysosomen aus Leber inhibiert (Mullock *et al.*, 2000).

In permeabilisierten HeLa Zellen wurde durch IgGs spezifisch für Syntaxin 8 eine Verlangsamung des Transports von EGF in das Lysosom beobachtet (Prekeris *et al.*, 1999), wiederum in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen (Abb. 16). Dagegen war das Recycling des Transferrin-Rezeptors zwischen Plasmamembran, frühen Endosom und Recycling-Endosom nicht betroffen. Allerdings konnte in dieser Studie kein Effekt auf den EGF-Transport mit Antikörper gegen Syntaxin 7 beobachtet

werden. Diese Ergebnisse sind allerdings nicht aussagekräftig, da unbekannt ist, ob der in dieser Studie verwendete Antikörper in irgendeinem anderen Testsystem eine inhibierende Wirkung zeigt.

Welcher Fusionschritt wird durch den hier beschriebenen endosomalen SNARE Komplex vermittelt? Die Inhibierungsexperimente der *in vitro* Fusionen zeigen, daß es sich um einen späten Schritt innerhalb des endosomalen Weges handeln muß, da die Fusion von frühen Endosomen durch Fab-Fragmente gegen Syntaxin 7, Syntaxin 8 und Vti1b nicht inhibiert wird. Der Komplex ist am Transport von EGF zum Lysosom beteiligt (Abb. 16). Es kann sich nicht ausschließlich um eine homotypische Fusion von Lysosomen handeln. In diesem Fall dürfte die Kinetik des Transports und Abbaus von EGF nicht betroffen sein. Wir können anhand unserer Daten nicht unterscheiden, ob der Komplex an der Fusion von Transportvesikeln, die vom frühen Endosom kommen, mit dem späten Endosom, an der homotypischen Fusion von späten Endosomen oder an der Fusion von späten Endosomen mit Lysosomen beteiligt ist. Möglich ist auch, daß der Komplex an mehreren dieser Fusionen beteiligt ist. Die Frage läßt sich mit dem hier verwendeten *in vitro* Assay nicht klären, da man mit den verwendeten pulse-chase-Protokollen sicher nicht nur einen Organelltyp markiert. So werden wahrscheinlich durch die fünfminütige Inkubation mit Marker, die wir bei der Markierung der frühen Endosomen durchführen, Transportvesikel von der Plasmamembran zum frühen Endosom, frühe Endosomen und vielleicht schon Transportvesikel vom frühen Endosom zu anderen Kompartimenten markiert. Alle diese Organellen tragen, wenn sie mit Organellen vom selben Typ oder den anderen markierten Organellen fusionieren können, zu dem Signal in dem Assay bei. Bei der Markierung von späten Endosomen durch 20 Minuten Inkubation mit Marker gefolgt von einem 60 minütigen chase hat man ein ähnliches Problem. Wir können ausschließen, daß hier frühe Endosomen markiert sind, da eine Präparation von frühen Endosomen in unserem Assay nicht mit einer von späten Endosomen fusioniert (nicht gezeigt). Da wahrscheinlich Transportvesikel vom frühen Endosom zum späten Endosom, späte Endosomen und möglicherweise auch Lysosomen markiert sind, können wir den Transportschritt nicht eindeutig bestimmen. Diese Problematik betrifft natürlich alle Fusionsassays, die auf pulse und pulse-chase Protokollen beruhen. Diese Frage kann auch mithilfe der anderen publizierten Studien nicht aufgelöst werden. Es sind zur Zeit meines Wissens nach keine aussagekräftigeren Versuchssysteme etabliert, um den endosomalen/lysosomalen Weg zu untersuchen.

Interessanterweise ist VAMP-7, das auch an der Fusion von späten Endosomen (Ward *et al.*, 2000) bzw. am Transport von EGF zum Lysosom (Advani *et al.*, 1999) beteiligt ist, nicht Teil des hier beschriebenen Komplexes. VAMP-7 könnte parallel zu dem hier beschriebenen Komplex denselben Fusionschritt mit anderen SNARE-Partnern vermitteln oder an einem anderen Fusionschritt auf demselben Weg beteiligt sein.

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten legen nahe, daß Endobrevin nicht nur die homotypische Fusion von späten, sondern auch von frühen Endosomen vermittelt (Abb. 11). In Versuchen mit Fab-Fragmenten und intakten IgGs gegen Endobrevin (nicht gezeigt) und rekombinantem löslichen Endobrevin wurde eine 50%-ige Inhibierung festgestellt. Es stellt sich die Frage, warum man keine Inhibierung von 100% beobachtet, obwohl in den *in vitro* Versuchen die Fab-Fragmente die Komplexbildung vollständig unterbinden (Abb. 10 und 21). Es ist möglich, daß die

Bindung der Antikörper an Endobrevin ineffizient ist, weil sich Endobrevin in der Endosomenmembran in einem Komplex mit seinen SNARE Partnern befindet, d.h. sogenannten cis-SNARE-Komplexe bildet. Weil kein ATP während der Präinkubation anwesend ist, könnten solche Komplexe nicht durch NSF und α -SNAP dissoziiert werden bis durch die Zugabe von ATP die Fusionsreaktion initiiert wird. Deswegen wurde in einem weiteren Versuch die Präinkubation der PNS-Fractionen mit Fab-Fragmenten in Gegenwart von ATP und Zytosol (als Quelle von NSF und α -SNAP) durchgeführt. Dennoch veränderte sich der Grad der Inhibierung nicht, selbst wenn die Konzentration von NSF und α -SNAP durch Zugabe von rekombinanten Proteinen erhöht wurde (nicht gezeigt).

Es ist wahrscheinlich, daß in diesem Fusionsassay der frühen Endosomen parallel ein weiterer Komplex ohne Endobrevin operiert. So wurde z.B. gezeigt, daß Syntaxin 13 an der Fusion von frühen Endosomen (McBride *et al.*, 1999) (und eigene unpublizierte Daten mit IgGs) und am Recycling von Plasmamembranrezeptoren beteiligt ist (Prekeris *et al.*, 1998). In den Immunpräzipitationen konnte keine Assoziation von Endobrevin und Syntaxin 13 detektiert werden (Abb. 13). Allerdings könnte es sich hierbei auch um ein Detektionsproblem handeln (in 4.4 ausführlicher diskutiert). Eigene Experimente zeigen, daß man mit IgGs spezifisch für Rab5 und Endobrevin eine additive Hemmung erhält (nicht gezeigt). Dies alles paßt in ein Szenario, in dem mindestens ein weiteres R-SNARE an Fusionsritten im frühen endosomalen Kompartiment beteiligt ist.

4.3 Vti1a- β

Die Befunde, daß Antikörper gegen Vti1a die Fusion von frühen Endosomen inhibieren (Abb. 15) und daß Vti1a- β auf synaptischen Vesikeln (Abb. 27-30) vorkommt, legen die Vermutung nahe, daß diese hirnspezifische Splicevariante am Recyclingprozeß von synaptischen Vesikeln in Neuronen beteiligt ist. Wie in der Einleitung erwähnt, sind verschiedene Modelle des Recyclings von synaptischen Vesikeln vorgeschlagen worden (Cremona und De Camilli, 1997). Eine Vielzahl von Studien zeigen die Bedeutung von Clathrin coated Vesikeln für den Zyklus des synaptischen Vesikels (Maycox *et al.*, 1992; Miller und Heuser, 1984; van der Blik und Meyerowitz, 1991), so daß ein alleiniger Kiss-and-Run Modus (Abb. 2, Weg 1) sehr unwahrscheinlich ist. Es wird zur Zeit intensiv diskutiert, ob Clathrin coated Vesikel durch direktes Uncoat ohne einen weiteren Fusionsritt zu synaptischen Vesikeln werden (Abb. 2, Weg 2) oder vorher ein endosomales Kompartiment durchlaufen (Weg 3) (De Camilli und Takei, 1996). Für die Existenz eines endosomalen Kompartiments spricht die hohe Konzentration von Rab5 in Synapsen (Fischer von Mollard *et al.*, 1994b), dem eine Funktion in der Fusion von frühen Endosomen zugeordnet werden konnte (Gorvel *et al.*, 1991). In einem Modell, bei dem ein endosomales Kompartiment durchlaufen wird, würden die Clathrin coated Vesikel nach dem Uncoat mit einem endosomalen Kompartiment fusionieren und sich synaptische Vesikel vom Endosom abschnüren (Abb. 2, Weg 3). An der Fusion von uncoated Vesikeln mit dem Endosom könnte Vti1a- β beteiligt sein. Denkbar ist auch, daß beide Wege 2 und 3 parallel existieren. Synaptische Vesikel könnten sich direkt aus Clathrin coated Vesikeln bilden, solange sie die entsprechende Proteinzusammensetzung besitzen. Eine Passage durch das endosomale Kompartiment könnte notwendig sein, um eine entsprechende Proteinzusammensetzung wiederherzustellen und Proteine am Ende ihrer Lebenszeit auszusortieren.

Die aus der Nebenniere der Ratte stammende neuroendokrine Zelllinie PC12 wurde als Modellsystem benutzt, um die Frage des Recyclings zu untersuchen. Dabei entsprechen in PC12-Zellen die sogenannten synaptic like microvesicles (SLMVs) den synaptischen Vesikeln in Neuronen. Die Abschnürung von SLMVs wurde sowohl von einem endosomalen Kompartiment (Clift-O'Grady *et al.*, 1998) als auch von einem subplasmalemalem Kompartiment (Schmidt und Huttner, 1998), das noch im direkten Kontakt zur Plasmamembran ist, rekonstituiert.

Vt1a- β könnten auch eine Funktion bei der Biogenese von synaptischen Vesikeln haben. Obwohl der genaue Ablauf der Biogenese noch unklar ist, zeichnet sich ab, daß die Proteine der synaptischen Vesikel das Trans-Golgi-Netzwerk im Zellkörper der Neuronen in sekretorischen Granulen des konstitutiven Weges verlassen (Hannah *et al.*, 1999). Diese Vesikel gelangen durch einen schnellen axonalen Transport zur Synapse. Reife synaptischen Vesikel werden durch einige Zyklen von konstitutiver Exozytose und Recycling durch ein endosomales Kompartiment gebildet. Hier könnte Vt1a- β an der Fusion mit dem endosomalen Kompartiment beteiligt sein.

Eine Funktion von Vt1a- β bei der Exozytose scheint dagegen unwahrscheinlich. Vt1a- β wird nicht durch clostridiale Neurotoxine (Tetanustoxin, Botulinumneurotoxine C, D und E) proteolysiert. Dennoch wird die Fusion von synaptischen Vesikeln durch diese Toxine vollständig inhibiert (Bruns *et al.*, 1997). Desweiteren ist das Hefehomolog Vt1p an Transportvorgängen zum prävakuolären/endosomalen Kompartiment (Fischer von Mollard *et al.*, 1997) und vakuolären/lysosomalen Kompartiment (Fischer von Mollard und Stevens, 1999) beteiligt, nicht jedoch an der Exozytose.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zu Vt1a, Vt1a- β und Vt1b zeigen einen interessanten Aspekt zur evolutionären Entwicklung der SNAREs. In der Hefe existiert nur ein Homolog, Vt1p, das an mindestens zwei unterschiedlichen intrazellulären Fusionsereignissen mit verschiedenen Kombinationen von SNARE-Partnern beteiligt ist. Es handelt sich dabei um den vesikulären Transport von dem Trans-Golgi-Netzwerk zum prävakuolären/endosomalen Kompartiment (Fischer von Mollard *et al.*, 1997) und alle Wege zum vakuolären/lysosomalen Kompartiment (Fischer von Mollard und Stevens, 1999). In *Arabidopsis thaliana* wurden zwei Homologe identifiziert (AtVTI1a und AtVTI1b) (Zheng *et al.*, 1999). Wenn AtVTI1a in Hefe exprimiert wird, kann es das Hefe-Vt1p nur beim Transport zum prävakuolären Kompartiment ersetzen, während AtVTI1b für Vt1p nur beim Transport zur Vakuole substituieren kann. Während die Fusions Schritte, die AtVTI1a und AtVTI1b in der Pflanze vermitteln, noch nicht bekannt sind, zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse, daß Vt1a und Vt1b in Säugerzellen an zwei verschiedenen Fusionen beteiligt sind, nämlich Vt1a an einem Fusionsereignis an frühen, Vt1b an späten Endosomen, den funktionellen Äquivalenten des prävakuolären bzw. des vakuolären/lysosomalen Kompartiment. Offensichtlich stammen die Säuger-Vt1-Proteine von einem gemeinsamen Vorläuferprotein ab, das vermutlich ähnlich wie in der Hefe an mehreren Transportschritten beteiligt war. Es ist möglich, daß während der Evolution eine ähnliche Diversifikation auch bei anderen SNAREs stattgefunden hat, d.h. daß es ursprünglich nur wenige SNARE-Proteine gegeben hat, die viele (vielleicht sogar alle) Membranfusionsschritte in den Ur-Eukaryonten katalysiert haben. Diversifikation führte dann zu einer zunehmenden Spezialisierung und zum

Teil auch zur Redundanz, so daß es heute Beispiele für SNAREs gibt, die nur an einem Fusionschritt beteiligt sind (wie vermutlich Syntaxin 1 und Synaptobrevin 2), sowie SNAREs, die an mehreren Schritten beteiligt sind (wie Endobrevin). Außerdem ist es möglich, wenn auch noch nicht zweifelsfall geklärt, daß ein und derselbe Fusionschritt von zwei oder mehr verschiedenen SNARE-Komplexen katalysiert wird.

Im Gehirn wird Vt1a- β , eine Splicevariante von Vt1a, exprimiert, die eine Insertion von sieben Aminosäuren in Position 114 von Vt1a besitzt. Diese Insertion ist in der Nähe des N-Terminus des SNARE Motivs (Position 132 in Vt1a) lokalisiert. Diese Nähe könnte dazu führen, daß die Bindung von SNARE-Partnern durch die Insertion beeinflusst wird und Vt1a- β mit anderen SNAREs interagiert als das ubiquitäre Vt1a. Mit Bestimmtheit könnte man dies nur sagen, wenn es gelänge die SNARE-Partner von Vt1a und Vt1a- β zu identifizieren. Die Insertion könnte auch für das Sorting von Vt1a- β auf synaptischen Vesikel wichtig sein. Konsenssignale für synaptische Vesikel Proteine sind nicht bekannt. Allerdings wurde gezeigt, daß das SNARE Motiv von Synaptobrevin 2 für das korrekte Sorting auf SLMVs in PC12-Zellen wichtig ist (Grote *et al.*, 1995).

Wie erwähnt sind die SNARE-Partner von Vt1a und Vt1a- β nicht bekannt. Wenn man annimmt, daß Vt1a die Fusion von frühen Endosomen vermittelt, kommen andere endosomal vorkommende SNAREs in Frage. Die drei R-SNAREs Endobrevin, VAMP-7/TI-VAMP (Advani *et al.*, 1999) und VAMP-4 (Steggmaier *et al.*, 1999) wurden auf Endosomen lokalisiert. Endobrevin ist im Gehirn nicht detektierbar (Abb. 5; Advani *et al.*, 1998; Steegmaier *et al.*, 2000)) und es ist daher unwahrscheinlich, daß es ein SNARE-Partner von Vt1a- β ist. Da sowohl Endobrevin wie auch Vt1a an der Fusion von frühen Endosomen beteiligt sind, kann man über eine mögliche Interaktion der beiden Proteine spekulieren. In der Tat haben wir Koimmunpräzipitationen von Endobrevin und Vt1a sowohl mit Antikörpern gegen Endobrevin als auch mit Antikörpern gegen Vt1a beobachtet (nicht gezeigt). Es ist allerdings noch nicht gelungen, einen vollständigen SNARE-Komplex zu identifizieren. Insofern sind wir nicht in der Lage die weiter unten aufgestellten stringenten Kriterien für physiologisch relevante SNARE-Komplexe zu überprüfen. VAMP-7/TI-VAMP wurde kürzlich in kultivierten Neuronen an somatodendritischen Tubules und Vesikeln, aber nicht in Synapsen wie Vt1a- β lokalisiert (Coco *et al.*, 1999). Die Q-SNAREs Syntaxin 6 (Simonsen *et al.*, 1999), Syntaxin 13 (Prekeris *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 1998b), Syntaxin 7 (Prekeris *et al.*, 1999), Syntaxin 8 (Prekeris *et al.*, 1999), Syntaxin 11 (Valdez *et al.*, 1999) und Syntaxin 10 (Tang *et al.*, 1998a) wurden auf endosomalen Kompartimenten lokalisiert und kommen damit als mögliche SNARE Partner in Betracht. Eine Interaktion von Syntaxin 6 und Vt1a wurde bereits beschrieben (Xu *et al.*, 1998).

4.4 Spezifität von SNARE Interaktionen *in vitro* und *in vivo*

Wie in 3.2.1. ausgeführt und in dieser Arbeit ausgenutzt wurde (3.1.4 Abb.10 und 3.2.5, Abb. 23), bilden SNAREs *in vitro* gemischte Komplexe (Fasshauer *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999). Deswegen ist es wichtig Kriterien zu definieren, um physiologisch nicht funktionelle von funktionellen SNARE Komplexen zu unterscheiden. Die folgenden Beobachtungen stützen die Vermutung, daß die hier untersuchten SNARE Proteine Endobrevin, Syntaxin 7, Syntaxin 8 und Vt1b *in vivo* einen Komplex bilden. Erstens wurde mit Antikörpern gegen jedes der vier SNAREs eine vergleichbare

Menge der drei anderen SNARE-Partner kopräzipitiert. Das zeigt, daß es sich hier um einen einzelnen Komplex von definierter Stöchiometrie handelt. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit zwei kürzlich erschienenen Publikationen, wo eine Koimmunpräzipitation aus Rattenleber von Syntaxin 8 und Vti1b mit Antikörpern gegen Syntaxin 8 (Subramaniam *et al.*, 2000) bzw. aus MDCK-Zellen von Syntaxin 7 und Endobrevin mit Antikörpern gegen Syntaxin 7 (Mullock *et al.*, 2000) beobachtet wurde. Zweitens zeigen die Kontrollexperimente aus transfizierten NRK-Zellen, daß der immunpräzipitierte Komplex in intakten Membranen vorhanden ist und sich nicht erst während oder nach der Solubilisierung mit Detergenz ausbildet. Dasselbe Ergebnis erhält man, wenn man durch *in vitro*-Translation radioaktiv markiertes Endobrevin in Membranen des Endoplasmatischen Retikulums integriert und diese Membranen mit Membranfraktionen aus Leber mischt. Nach Solubilisierung wird mit Antikörpern gegen Vti1b nur das endogene nichtradioaktive Endobrevin, nicht jedoch das radioaktiv markierte Endobrevin koimmunpräzipitiert (nicht gezeigt). Desweiteren konnte Syntaxin 8 und Vti1b in intakten Membranen mit einer Reihe von Crosslinkern vernetzt werden (nicht gezeigt), was eine Assoziation dieser beiden Proteine *in vivo* zusätzlich belegt. Drittens haben Antikörper gegen SNAP-29, Synaptobrevin 2, Syntaxin 6 und Syntaxin 13 keine detektierbaren Mengen von Syntaxin 7, Syntaxin 8, Vti1b und Endobrevin koimmunpräzipitiert. Die Antikörper gegen Syntaxin 7, Syntaxin 8, Vti1b und Endobrevin haben andererseits keines der getesteten weiteren SNARE-Proteine präzipitiert. Dies unterstreicht die Spezifität der Immunpräzipitation. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß zusätzliche Komplexe der hier untersuchten Proteine existieren, die aber wegen ihrer geringen Konzentration nicht detektierbar waren. So dürfte Endobrevin nach den hier gezeigten Daten zumindest noch an einem weiteren SNARE Komplex, der die Fusion von frühen Endosomen vermittelt, beteiligt sein. Viertens inhibieren Fab-Fragmente, die spezifisch für die vier SNAREs sind, denselben Fusionsschritt mit vergleichbarer Effizienz.

Eine ähnliche Spezifität wurde auch bei den Immunpräzipitationen aus Gehirn mit Antikörpern gegen Vti1a, Synaptobrevin 2, SNAP-25 und Syntaxin 1 beobachtet. Allerdings wurde in diesen Versuchen eine geringe Menge von Vti1a mit Antikörpern gegen Synaptobrevin 2 koimmunpräzipitiert. Es läßt sich nicht entscheiden, ob es sich um eine *in vivo* relevante Interaktion, oder um ein *in vitro* Artefakt handelt. Aufgrund der von Henning Otto in unserem Labor erhobenen Befunde, die zeigen, daß Immunpräzipitationen von synaptischen Vesikeln nicht unbedingt den *in vivo* Zustand repräsentieren, da sich SNARE-Komplexe auch erst nach dem Solubilisieren ausbilden könnten, (Otto *et al.*, 1997), und weil trotz einer vollständigen Depletion von Vti1a aus dem Überstand kein Synaptobrevin 2 im Immunpräzipitat detektierbar ist, neige ich zur zweiten Interpretationsmöglichkeit. Allgemein sollte man gerade bei Immunpräzipitationen mit SNARE Proteinen aufgrund ihrer Promiskuität *in vitro* beachten, daß man die Membranen mit ausreichend Detergenz in einer möglichst niedrigen Proteinkonzentration solubilisiert.

Die Inhibierung der *in vitro* Fusion durch rekombinantes Endobrevin, aber nicht durch Synaptobrevin 2 zeigt, daß eine gewisse Spezifität in diesem System gegeben ist. Erhöht man jedoch die Konzentration von Synaptobrevin 2, so kann man auch dadurch eine Inhibition erzielen (nicht gezeigt), daß heißt es gibt einen Konzentrationsbereich, in dem das System noch spezifisch reagiert. Eine ähnliche

Spezifität wurde in einem weiteren *in vitro* System festgestellt (Scales *et al.*, 2000). Dabei wird die Exozytose von Dense-Core Granulen von PC12 Zellen an der Plasmamembran in geöffneten Zellen und nach Zugabe von Zytosol, ATP und Ca^{2+} durch die Freisetzung von ^3H -Noradrenalin untersucht (Hay und Martin, 1992). Hier können die SNARE-Motive von Syntaxinen der Plasmamembran (Syntaxin 1, Syntaxin 3, Syntaxin 4) die Fusion inhibieren, nicht jedoch intrazelluläre Syntaxine (Syntaxin 6, Syntaxin 8, Syntaxin 13, Syntaxin 17, wobei es sich ja bei Syntaxin 6 und Syntaxin 8 gar nicht um echte Syntaxine handelt). Ebenso inhibieren die löslichen Domänen der R-SNAREs Synaptobrevin 2 und VAMP-4 die Fusion, nicht jedoch Sec22, VAMP-7 oder Endobrevin.

4.5 Strukturelle Merkmale eines SNARE Komplexes

Der neuronale und der endosomale SNARE Komplex unterscheiden sich in einigen Punkten deutlich voneinander. Im Gegensatz zum neuronalen besteht der endosomale Komplex aus vier verschiedenen Proteinen, von denen jedes eine C-terminale Transmembranregion besitzt. Im neuronalen Komplex besitzen lediglich Synaptobrevin 2 und Syntaxin 1 Transmembranregionen, während SNAP-25 über Palmitoylierungen in der Plasmamembran verankert ist. Im endosomalen Komplex besitzen drei der vier Proteine unabhängig gefaltete N-terminale Regionen, während im neuronalen Komplex nur Syntaxin 1 eine sogenannte N-terminale Habc Domäne besitzt. Und nicht zuletzt sind die Fusionschritte, die von den beiden Komplexen vermittelt werden sehr verschieden: Die Fusion im späten endozytotischen Weg stellt einen konstitutiven Transportschritt jeder eukaryontischer Zelle dar (Mellman, 1996). Die Fusion von synaptischen Vesikeln mit der Plasmamembran in Synapsen ist dagegen ein regulierter und extrem schneller Prozeß von hochgradig spezialisierten Zellen (Südhof *et al.*, 1993).

Durch den Vergleich der strukturellen Eigenschaften dieser beiden Protein-Komplexe konnten generelle Eigenschaften von SNARE Komplexen abgeleitet werden. Die hier vorgestellten Ergebnisse unterstützen die von unserem Labor aufgestellte Hypothese (Fasshauer *et al.*, 1998b), daß jeder SNARE Komplex eine Kernregion aus vier Helizes besitzt, die von vier verschiedenen SNARE Motiven beigesteuert werden. Drei Helizes stammen von Q-SNAREs eine Helix von einem R-SNARE. Die Positionen der drei Q-SNAREs sind nicht äquivalent. Durch eine Kombination von Substitutionen zwischen neuronalen und endosomalen Q-SNAREs und Sequenzvergleichen, die auf der Kristallstruktur des neuronalen Kernkomplexes (Sutton *et al.*, 1998) gründeten, war es möglich, jedem SNARE des endosomalen Komplexes das Äquivalent im neuronalen Komplex zuzuordnen. Diese Methode dürfte es erlauben, allgemeine Kriterien zu entwickeln, um die richtige Zuordnung der entsprechenden SNARE Proteinen in anderen SNARE-Komplexen zu finden. So ähnelt z.B. das SNARE Motiv von Syntaxin 6 dem von Syntaxin 8 und der C-terminalen Hälfte von SNAP-25. Vti1a weist die höchste Homologie zum N-Terminus von SNAP-25 auf. In der Tat könnten Vti1a und Syntaxin 6 Teil eines SNARE-Komplexes sein, was durch Koimmunpräzipitationen nahegelegt wird (Xu *et al.*, 1998). Da Syntaxin 6 kein echtes Syntaxin ist, dürfte es sich dagegen bei der beschriebenen Interaktion von Syntaxin 6 und SNAP-29 (oder GS32) (Wong *et al.*, 1999) um eine unspezifische Interaktion handeln. Wir konnten keine Koimmunpräzipitation der beiden Proteine detektieren (Abb. 13).

Die strukturellen Ähnlichkeiten zwischen dem neuronalen und dem endosomalen Kernkomplexen sind bemerkenswert. Erstens sind beide sehr resistent gegen Proteaseverdau, und die resultierenden Fragmente besitzen eine ähnliche Länge, wie die Sequenzanalyse zeigte (der N-Terminus des proteaseresistenten Fragments von Vti1b ist 17 Aminosäuren aufwärts von der -8-Ebene, Endobrevin bleibt ungespalten). Zweitens ist die Bildung des Kernkomplexes von den vor der Interaktion nicht α -helikalen SNARE-Motiven von einer dramatischen Zunahme des α -helikalen Anteils begleitet, d.h. die Bildung des Komplexes führt zu drastischen konformationellen Änderungen in den Proteinen. Interessanterweise konnte kein Hinweis auf die Ausbildung von partiellen Komplexen der endosomalen SNAREs gefunden werden, im Gegensatz zum neuronalen Komplex. Hier wurde eine Zunahme der α -Helizität beobachtet, wenn Syntaxin 1 mit zwei von den drei SNARE Motiven des neuronalen Komplexes gemischt wird (Fasshauer *et al.*, 1998a). Solche partiellen Komplexe könnten von physiologischer Relevanz sein, z.B. Komplexe zwischen Syntaxin 1 und SNAP-25 an der Plasmamembran vor dem Docken der synaptischen Vesikel. Drittens sind beide Kernkomplexe hochgradig stabil gegenüber Denaturierung durch Erwärmen und zeigen eine ähnliche Schmelztemperatur. Viertens ist auch der endosomale Komplex zumindest partiell gegen Dissoziation durch SDS resistent, obwohl diese Eigenschaft beim neuronalen Komplex deutlicher ausgebildet ist (Hayashi *et al.*, 1994). Und zu guter letzt werden beide Komplexe durch NSF und α -SNAP dissoziiert, wie man das für SNARE Komplexe erwarten darf.

Obwohl eine hochauflösende Strukturanalyse nur für den neuronalen Kernkomplex verfügbar ist (Sutton *et al.*, 1998), stärken die hier gezeigten Arbeiten die Hypothese, daß alle Kernkomplexe aus einem Vierhelixbündel aus parallelen SNARE Motiven bestehen und daß Aminosäuren, die die Interaktionsebenen in der Kristallstruktur des neuronalen Kernkomplexes bilden, konserviert sind. Insofern vermuten wir, daß es sich beim sogenannten pentameren Komplex (bestehend aus den Q-SNAREs Vam3p, Vam7p und Vti1p, und den beiden R-SNAREs Nyv1p und Ykt6p) der homotypischen Vakuolenfusion (Ungermann *et al.*, 1999) nicht um einen echten SNARE Komplex handelt. Die in der Publikation erwähnte Sensitivität dieses Komplexes gegen Hochsalmz läßt eher vermuten, daß die Assoziation der fünf SNAREs zumindest zum Teil auf unspezifische Interaktionen beruht.

Wie eingangs erläutert und durch die hier vorgelegten Befunde weiter gestützt, stellt die Ausbildung von Kernkomplexen einen entscheidenden Schritt bei der Membranfusion dar. SNARE-Proteine können jedoch auch definierte Komplexe mit anderen Proteinen eingehen. Für zwei solcher Komplexe sind in den letzten Monaten Kristallstrukturen publiziert worden. Wenn Syntaxin 1 an nsec1/Munc-18 gebunden ist, ist nur der N-terminale Teil des SNARE-Motivs α -helikal, während der C-terminale Teil nach einem kurzen strukturierten Zwischenstück unstrukturiert bleibt (Misura *et al.*, 2000). Munc-18 ist wie die exozytotischen SNAREs essentiell für die Fusion, aber sein Mechanismus ist noch ungeklärt. Eine völlig abweichende Struktur wurde für Synaptobrevin 2 im Komplex mit Botulinumneurotoxin B gefunden (Hanson und Stevens, 2000). Hier sind die Fragmente des SNARE-Motivs an der Oberfläche des Toxins in einer Art random coil gebunden, d.h. es gibt hier keine helikalen Abschnitte. Diese Befunde unterstützen die Annahme, daß SNAREs eine hohe konformationelle Flexibilität besitzen. Sie können je nach Bindungspartner unterschiedlich strukturiert sein.

5 Literaturverzeichnis

Advani, R.J., Bae, H.R., Bock, J.B., Chao, D.S., Doung, Y.C., Prekeris, R., Yoo, J.S. and Scheller, R.H. (1998) Seven novel mammalian SNARE proteins localize to distinct membrane compartments. *J. Biol. Chem.*, **273**, 10317-24.

Advani, R.J., Yang, B., Prekeris, R., Lee, K.C., Klumperman, J. and Scheller, R.H. (1999) VAMP-7 mediates vesicular transport from endosomes to lysosomes. *J. Cell Biol.*, **146**, 765-76.

Aniento, F., Emans, N., Griffiths, G. and Gruenberg, J. (1993) Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J. Cell Biol.*, **123**, 1373-87.

Annaert, W.G., Becker, B., Kistner, U., Reth, M. and Jahn, R. (1997) Export of cellubrevin from the endoplasmic reticulum is controlled by BAP31. *J. Cell Biol.*, **139**, 1397-410.

Balch, W.E., Dunphy, W.G., Braell, W.A. and Rothman, J.E. (1984) Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine. *Cell*, **39**, 405-16.

Barnstable, C.J., Hofstein, R. and Akagawa, K. (1985) A marker of early amacrine cell development in rat retina. *Brain Res.*, **352**, 286-90.

Barriocanal, J.G., Bonifacino, J.S., Yuan, L. and Sandoval, I.V. (1986) Biosynthesis, glycosylation, movement through the Golgi system, and transport to lysosomes by an N-linked carbohydrate-independent mechanism of three lysosomal integral membrane proteins. *J. Biol. Chem.*, **261**, 16755-63.

Baumert, M., Maycox, P.R., Navone, F., De Camilli, P. and Jahn, R. (1989) Synaptobrevin: an integral membrane protein of 18,000 daltons present in small synaptic vesicles of rat brain. *EMBO J.*, **8**, 379-84.

Bennett, M.K., Calakos, N. and Scheller, R.H. (1992) Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science*, **257**, 255-9.

Block, M.R., Glick, B.S., Wilcox, C.A., Wieland, F.T. and Rothman, J.E. (1988) Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **85**, 7852-6.

Bock, J.B., Lin, R.C. and Scheller, R.H. (1996) A new syntaxin family member implicated in targeting of intracellular transport vesicles. *J. Biol. Chem.*, **271**, 17961-5.

Brand, S.H. and Castle, J.D. (1993) SCAMP 37, a new marker within the general cell surface recycling system. *EMBO J.*, **12**, 3753-61.

Bruns, D., Engers, S., Yang, C., Ossig, R., Jeromin, A. and Jahn, R. (1997) Inhibition of transmitter release correlates with the proteolytic activity of tetanus toxin and botulinus toxin A in individual cultured synapses of *Hirudo medicinalis*. *J. Neurosci.*, **17**, 1898-910.

Burger, P.M., Mehl, E., Cameron, P.L., Maycox, P.R., Baumert, M., Lottspeich, F.,

- De Camilli, P. and Jahn, R. (1989) Synaptic vesicles immunisolated from rat cerebral cortex contain high levels of glutamate. *Neuron*, **3**, 715-20.
- Clary, D.O., Griff, I.C. and Rothman, J.E. (1990) SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell*, **61**, 709-21.
- Clary, D.O. and Rothman, J.E. (1990) Purification of three related peripheral membrane proteins needed for vesicular transport. *J. Biol. Chem.*, **265**, 10109-17.
- Clift-O'Grady, L., Desnos, C., Lichtenstein, Y., Faundez, V., Horng, J.T. and Kelly, R.B. (1998) Reconstitution of synaptic vesicle biogenesis from PC12 cell membranes. *Methods*, **16**, 150-9.
- Coco, S., Raposo, G., Martinez, S., Fontaine, J.J., Takamori, S., Zahraoui, A., Jahn, R., Matteoli, M., Louvard, D. and Galli, T. (1999) Subcellular localization of tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein (VAMP)/VAMP7 in neuronal cells: evidence for a novel membrane compartment. *J Neurosci*, **19**, 9803-12.
- Cremona, O. and De Camilli, P. (1997) Synaptic vesicle endocytosis. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **7**, 323-30.
- De Camilli, P. and Takei, K. (1996) Molecular mechanisms in synaptic vesicle endocytosis and recycling. *Neuron*, **16**, 481-6.
- de Duve, C. (1963) Lysosomes. Ciba Foundation Symposium edited by A. V. S. de Reuck and M. P. Cameron. London: Churchill, 411-412.
- de Wit, H., Lichtenstein, Y., Geuze, H.J., Kelly, R.B., van der Sluijs, P. and Klumperman, J. (1999) Synaptic vesicles form by budding from tubular extensions of sorting endosomes in PC12 cells. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 4163-76.
- Edelmann, L., Hanson, P.I., Chapman, E.R. and Jahn, R. (1995) Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *EMBO J.*, **14**, 224-31.
- Fasshauer, D., Antonin, W., Margittai, M., Pabst, S. and Jahn, R. (1999) Mixed and Non-cognate SNARE Complexes. Characterization of assembly and biophysical properties. *J. Biol. Chem.*, **274**, 15440-15446.
- Fasshauer, D., Eliason, W.K., Brunger, A.T. and Jahn, R. (1998a) Identification of a minimal core of the synaptic SNARE complex sufficient for reversible assembly and disassembly. *Biochemistry*, **37**, 10354-62.
- Fasshauer, D., Otto, H., Eliason, W.K., Jahn, R. and Brunger, A.T. (1997) Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation. *J. Biol. Chem.*, **272**, 28036-41.
- Fasshauer, D., Sutton, R.B., Brunger, A.T. and Jahn, R. (1998b) Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 15781-6.
- Ferro-Novick, S. and Jahn, R. (1994) Vesicle fusion from yeast to man. *Nature*, **370**, 191-3.
- Fischer von Mollard, G., Stahl, B., Khokhlatchev, A., Südhof, T.C. and Jahn, R. (1994a) Rab3C is a synaptic vesicle protein that dissociates from synaptic vesicles

after stimulation of exocytosis. *J. Biol. Chem.*, **269**, 10971-4.

Fischer von Mollard, G., Stahl, B., Walch-Solimena, C., Takei, K., Daniels, L., Khoklatchev, A., De Camilli, P., Südhof, T.C. and Jahn, R. (1994b) Localization of Rab5 to synaptic vesicles identifies endosomal intermediate in synaptic vesicle recycling pathway. *Eur. J. Cell Biol.*, **65**, 319-26.

Fischer von Mollard, G., Nothwehr, S.F. and Stevens, T.H. (1997) The yeast v-SNARE Vti1p mediates two vesicle transport pathways through interactions with the t-SNAREs Sed5p and Pep12p. *J. Cell Biol.*, **137**, 1511-24.

Fischer von Mollard, G. and Stevens, T.H. (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* v-SNARE Vti1p Is Required for Multiple Membrane Transport Pathways to the Vacuole. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 1719-1732.

Galli, T., Chilcote, T., Mundigl, O., Binz, T., Niemann, H. and De Camilli, P. (1994) Tetanus toxin-mediated cleavage of cellubrevin impairs exocytosis of transferrin receptor-containing vesicles in CHO cells. *J. Cell Biol.*, **125**, 1015-24.

Glick, B.S. and Rothman, J.E. (1987) Possible role for fatty acyl-coenzyme A in intracellular protein transport. *Nature*, **326**, 309-12.

Gorlich, D., Prehn, S., Hartmann, E., Kalies, K.U. and Rapoport, T.A. (1992) A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell*, **71**, 489-503.

Gorlich, D. and Rapoport, T.A. (1993) Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*, **75**, 615-30.

Gorvel, J.P., Chavrier, P., Zerial, M. and Gruenberg, J. (1991) rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell*, **64**, 915-25.

Greene, L.A. and Tischler, A.S. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **73**, 2424-8.

Griffiths, G., Hoflack, B., Simons, K., Mellman, I. and Kornfeld, S. (1988) The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell*, **52**, 329-41.

Grote, E., Hao, J.C., Bennett, M.K. and Kelly, R.B. (1995) A targeting signal in VAMP regulating transport to synaptic vesicles. *Cell*, **81**, 581-9.

Gruenberg, J. and Howell, K.E. (1989) Membrane traffic in endocytosis: insights from cell-free assays. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **5**, 453-81.

Gruenberg, J. and Maxfield, F.R. (1995) Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7**, 552-63.

Hannah, M.J., Schmidt, A.A. and Huttner, W.B. (1999) Synaptic vesicle biogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **15**, 733-98.

Hannah, M.J., Weiss, U. and Huttner, W.B. (1998) Differential extraction of proteins from paraformaldehyde-fixed cells: lessons from synaptophysin and other membrane proteins. *Methods*, **16**, 170-81.

Hanson, M.A. and Stevens, R.C. (2000) Cocystal structure of synaptobrevin-II bound to botulinum neurotoxin type B at 2.0 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 687-92.

- Hanson, P.I., Heuser, J.E. and Jahn, R. (1997) Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **7**, 310-5.
- Hanson, P.I., Otto, H., Barton, N. and Jahn, R. (1995) The N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein and alpha-SNAP induce a conformational change in syntaxin. *J. Biol. Chem.*, **270**, 16955-61.
- Hay, J.C. and Martin, T.F. (1992) Resolution of regulated secretion into sequential MgATP-dependent and calcium-dependent stages mediated by distinct cytosolic proteins. *J. Cell Biol.*, **119**, 139-51.
- Hayashi, T., McMahon, H., Yamasaki, S., Binz, T., Hata, Y., Südhof, T.C. and Niemann, H. (1994) Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J.*, **13**, 5051-61.
- Hille-Rehfeld, A. (1995) Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1241**, 177-94.
- Holroyd, C., Kistner, U., Annaert, W. and Jahn, R. (1999) Fusion of Endosomes Involved in Synaptic Vesicle Recycling. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 3035-44.
- Huttner, W.B., Schiebler, W., Greengard, P. and De Camilli, P. (1983) Synapsin I (protein D), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. *J. Cell Biol.*, **96**, 1374-88.
- Jahn, R. and Hanson, P.I. (1998) Membrane fusion. SNAREs line up in new environment. *Nature*, **393**, 14-5.
- Jahn, R. and Niemann, H. (1994) Molecular mechanisms of clostridial neurotoxins. *Ann. New York Acad. Sci.*, **733**, 245-55.
- Jahn, R., Schiebler, W., Ouimet, C. and Greengard, P. (1985) A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **82**, 4137-41.
- Jahn, R. and Südhof, T.C. (1999) Membrane fusion and exocytosis. *Annu. Rev. Biochem.*, **68**, 863-911.
- Johnston, P.A., Cameron, P.L., Stukenbrok, H., Jahn, R., De Camilli, P. and Südhof, T.C. (1989) Synaptophysin is targeted to similar microvesicles in CHO and PC12 cells. *EMBO J.*, **8**, 2863-72.
- Klingauf, J., Kavalali, E.T. and Tsien, R.W. (1998) Kinetics and regulation of fast endocytosis at hippocampal synapses. *Nature*, **394**, 581-5.
- Kutay, U., Ahnert-Hilger, G., Hartmann, E., Wiedenmann, B. and Rapoport, T.A. (1995) Transport route for synaptobrevin via a novel pathway of insertion into the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J.*, **14**, 217-23.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Lang, T., Wacker, I., Steyer, J., Kaether, C., Wunderlich, I., Soldati, T., Gerdes, H.H. and Almers, W. (1997) Ca²⁺-triggered peptide secretion in single cells imaged with green fluorescent protein and evanescent-wave microscopy. *Neuron*, **18**, 857-63.
- Link, E., McMahon, H., Fischer von Mollard, G., Yamasaki, S., Niemann, H., Südhof,

- T.C. and Jahn, R. (1993) Cleavage of cellubrevin by tetanus toxin does not affect fusion of early endosomes. *J. Biol. Chem.*, **268**, 18423-6.
- Matteoli, M., Takei, K., Cameron, R., Hurlbut, P., Johnston, P.A., Südhof, T.C., Jahn, R. and De Camilli, P. (1991) Association of Rab3A with synaptic vesicles at late stages of the secretory pathway. *J. Cell Biol.*, **115**, 625-33.
- Maycox, P.R., Link, E., Reetz, A., Morris, S.A. and Jahn, R. (1992) Clathrin-coated vesicles in nervous tissue are involved primarily in synaptic vesicle recycling. *J. Cell Biol.*, **118**, 1379-88.
- McBride, H.M., Rybin, V., Murphy, C., Giner, A., Teasdale, R. and Zerial, M. (1999) Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell*, **98**, 377-86.
- McMahon, H.T., Ushkaryov, Y.A., Edelmann, L., Link, E., Binz, T., Niemann, H., Jahn, R. and Südhof, T.C. (1993) Cellubrevin is a ubiquitous tetanus-toxin substrate homologous to a putative synaptic vesicle fusion protein. *Nature*, **364**, 346-9.
- Mellman, I. (1996) Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **12**, 575-625.
- Miller, T.M. and Heuser, J.E. (1984) Endocytosis of synaptic vesicle membrane at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.*, **98**, 685-98.
- Misura, K.M., Scheller, R.H. and Weis, W.I. (2000) Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. *Nature*, **404**, 355-62.
- Montecucco, C. and Schiavo, G. (1994) Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. *Mol. Microbiol.*, **13**, 1-8.
- Mullock, B.M., Smith, C.W., Ihrke, G., Bright, N.A., Lindsay, M., Parkinson, E.J., Brooks, D.A., Parton, R.G., James, D.E., Luzio, J.P. and Piper, R.C. (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**, 3137-3153.
- Murthy, V.N. and Stevens, C.F. (1998) Synaptic vesicles retain their identity through the endocytic cycle. *Nature*, **392**, 497-501.
- Nakamura, N., Yamamoto, A., Wada, Y. and Futai, M. (2000) Syntaxin 7 mediates endocytic trafficking to late endosomes. *J. Biol. Chem.*, **275**, 6523-9.
- Navone, F., Jahn, R., Di Gioia, G., Stukenbrok, H., Greengard, P. and De Camilli, P. (1986) Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. *J. Cell Biol.*, **103**, 2511-27.
- Neiman, A.M. (1998) Prospore membrane formation defines a developmentally regulated branch of the secretory pathway in yeast. *J. Cell Biol.*, **140**, 29-37.
- Novick, P., Ferro, S. and Schekman, R. (1981) Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell*, **25**, 461-9.
- Novick, P., Field, C. and Schekman, R. (1980) Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell*, **21**, 205-15.
- Novick, P. and Zerial, M. (1997) The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 496-504.

- Otto, H., Hanson, P.I. and Jahn, R. (1997) Assembly and disassembly of a ternary complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP-25 in the membrane of synaptic vesicles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 6197-201.
- Oyler, G.A., Higgins, G.A., Hart, R.A., Battenberg, E., Billingsley, M., Bloom, F.E. and Wilson, M.C. (1989) The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J. Cell Biol.*, **109**, 3039-52.
- Palade, G. (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*, **189**, 347-58.
- Poirier, M.A., Hao, J.C., Malkus, P.N., Chan, C., Moore, M.F., King, D.S. and Bennett, M.K. (1998) Protease resistance of syntaxin.SNAP-25.VAMP complexes. Implications for assembly and structure. *J. Biol. Chem.*, **273**, 11370-7.
- Prekeris, R., Klumperman, J., Chen, Y.A. and Scheller, R.H. (1998) Syntaxin 13 mediates cycling of plasma membrane proteins via tubulovesicular recycling endosomes. *J. Cell Biol.*, **143**, 957-71.
- Prekeris, R., Yang, B., Oorschot, V., Klumperman, J. and Scheller, R.H. (1999) Differential roles of syntaxin 7 and syntaxin 8 in endosomal trafficking. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 3891-908.
- Robinson, L.J., Aniento, F. and Gruenberg, J. (1997) NSF is required for transport from early to late endosomes. *J. Cell Sci.*, **110**, 2079-87.
- Rosenmund, C., Feltz, A. and Westbrook, G.L. (1995) Synaptic NMDA receptor channels have a low open probability. *J. Neurosci.*, **15**, 2788-95.
- Scales, S.J., Chen, Y.A., Yoo, B.Y., Patel, S.M., Doung, Y.C. and Scheller, R.H. (2000) SNAREs contribute to the specificity of membrane fusion. *Neuron*, **26**, 457-64.
- Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Polverino de Laureto, P., DasGupta, B.R. and Montecucco, C. (1992) Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature*, **359**, 832-5.
- Schmidt, A. and Huttner, W.B. (1998) Biogenesis of synaptic-like microvesicles in perforated PC12 cells. *Methods*, **16**, 160-9.
- Simonsen, A., Gaullier, J.M., D'Arrigo, A. and Stenmark, H. (1999) The Rab5 effector EEA1 interacts directly with syntaxin-6. *J Biol Chem*, **274**, 28857-60.
- Slot, J.W. and Geuze, H.J. (1985) A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. *Eur. J. Cell Biol.*, **38**, 87-93.
- Söllner, T., Bennett, M.K., Whiteheart, S.W., Scheller, R.H. and Rothman, J.E. (1993a) A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*, **75**, 409-18.
- Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. and Rothman, J.E. (1993b) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*, **362**, 318-24.
- Stegmaier, M., Klumperman, J., Foletti, D.L., Yoo, J.S. and Scheller, R.H. (1999)

Vesicle-associated membrane protein 4 is implicated in trans-Golgi network vesicle trafficking. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 1957-72.

Stegmaier, M., Lee, K.C., Prekeris, R. and Scheller, R.H. (2000) SNARE protein trafficking in polarized MDCK cells. *Traffic*, **1**, 553-560.

Stegmaier, M., Yang, B., Yoo, J.S., Huang, B., Shen, M., Yu, S., Luo, Y. and Scheller, R.H. (1998) Three novel proteins of the syntaxin/SNAP-25 family. *J. Biol. Chem.*, **273**, 34171-9.

Stoorvogel, W., Geuze, H.J., Griffith, J.M. and Strous, G.J. (1988) The pathways of endocytosed transferrin and secretory protein are connected in the trans-Golgi reticulum. *J. Cell Biol.*, **106**, 1821-9.

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

Südhof, T.C., De Camilli, P., Niemann, H. and Jahn, R. (1993) Membrane fusion machinery: insights from synaptic proteins. *Cell*, **75**, 1-4.

Sutton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R. and Brunger, A.T. (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*, **395**, 347-53.

Takamori, S., Riedel, D. and Jahn, R. (2000) Immunoprecipitation of GABA-specific synaptic vesicles defines a functionally distinct subset of synaptic vesicles. *J. Neurosci.*, **20**, 4904-11.

Takei, K., Mundigl, O., Daniell, L. and De Camilli, P. (1996) The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. *J. Cell Biol.*, **133**, 1237-50.

Tang, B.L., Low, D.Y. and Hong, W. (1998a) Syntaxin 11: a member of the syntaxin family without a carboxyl terminal transmembrane domain. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **245**, 627-32.

Tang, B.L., Tan, A.E., Lim, L.K., Lee, S.S., Low, D.Y. and Hong, W. (1998b) Syntaxin 12, a member of the syntaxin family localized to the endosome. *J. Biol. Chem.*, **273**, 6944-50.

Tikkanen, R., Obermüller, S., Denzer, K., Pungitore, R., Geuze, H.J., von Figura, K. and Höning, S. (2000) The Dileucine Motif within the tail of MPR46 is required for sorting of the receptor in endosomes. *Traffic*, **1**, 631-640.

Tokuyasu, K.T. (1973) A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. *J. Cell Biol.*, **57**, 551-65.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4.

Trimble, W.S., Cowan, D.M. and Scheller, R.H. (1988) VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **85**, 4538-42.

Ungermann, C., Fischer von Mollard, G., Jensen, O.N., Margolis, N., Stevens, T.H. and Wickner, W. (1999) Three v-SNAREs and two t-SNAREs, present in a

- pentameric cis-SNARE complex on isolated vacuoles, are essential for homotypic fusion. *J. Cell Biol.*, **145**, 1435-42.
- Valdez, A.C., Cabaniols, J.P., Brown, M.J. and Roche, P.A. (1999) Syntaxin 11 is associated with SNAP-23 on late endosomes and the trans- Golgi network. *J. Cell Sci.*, **112**, 845-54.
- van der Blik, A.M. and Meyerowitz, E.M. (1991) Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila shibire* gene associated with vesicular traffic. *Nature*, **351**, 411-4.
- Veit, M., Söllner, T.H. and Rothman, J.E. (1996) Multiple palmitoylation of synaptotagmin and the t-SNARE SNAP-25. *FEBS Lett.*, **385**, 119-23.
- Walch-Solimena, C., Blasi, J., Edelmann, L., Chapman, E.R., von Mollard, G.F. and Jahn, R. (1995) The t-SNAREs syntaxin 1 and SNAP-25 are present on organelles that participate in synaptic vesicle recycling. *J. Cell Biol.*, **128**, 637-45.
- Ward, D.M., Pevsner, J., Scullion, M.A., Vaughn, M. and Kaplan, J. (2000) Syntaxin 7 and VAMP-7 are soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors required for late endosome-lysosome and homotypic lysosome fusion in alveolar macrophages. *Mol. Biol. Cell*, **11**, 2327-33.
- Weimbs, T., Mostov, K., Low, S.H. and Hofmann, K. (1998) A model for structural similarity between different SNARE complexes based on sequence relationships. *Trends Cell Biol.*, **8**, 260-2.
- Wessel, D. and Flugge, U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.*, **138**, 141-3.
- Whiteheart, S.W., Griff, I.C., Brunner, M., Clary, D.O., Mayer, T., Buhrow, S.A. and Rothman, J.E. (1993) SNAP family of NSF attachment proteins includes a brain-specific isoform. *Nature*, **362**, 353-5.
- Wiedenmann, B. and Franke, W.W. (1985) Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell*, **41**, 1017-28.
- Wilson, D.W., Wilcox, C.A., Flynn, G.C., Chen, E., Kuang, W.J., Henzel, W.J., Block, M.R., Ullrich, A. and Rothman, J.E. (1989) A fusion protein required for vesicle-mediated transport in both mammalian cells and yeast. *Nature*, **339**, 355-9.
- Wong, S.H., Xu, Y., Zhang, T., Griffiths, G., Lowe, S.L., Subramaniam, V.N., Seow, K.T. and Hong, W. (1999) GS32, a novel Golgi SNARE of 32 kDa, interacts preferentially with syntaxin 6. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 119-34.
- Wong, S.H., Xu, Y., Zhang, T. and Hong, W. (1998a) Syntaxin 7, a novel syntaxin member associated with the early endosomal compartment. *J. Biol. Chem.*, **273**, 375-80.
- Wong, S.H., Zhang, T., Xu, Y., Subramaniam, V.N., Griffiths, G. and Hong, W. (1998b) Endobrevin, a novel synaptobrevin/VAMP-like protein preferentially associated with the early endosome. *Mol. Biol. Cell*, **9**, 1549-63.
- Xu, Y., Wong, S.H., Tang, B.L., Subramaniam, V.N., Zhang, T. and 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**, 21783-9.

Yang, B., Gonzalez, L., Jr., Prekeris, R., Steegmaier, M., Advani, R.J. and Scheller, R.H. (1999) SNARE interactions are not selective. Implications for membrane fusion specificity. *J. Biol. Chem.*, **274**, 5649-53.

Yoshimori, T., Yamagata, F., Yamamoto, A., Mizushima, N., Kabeya, Y., Nara, A., Miwako, I., Ohashi, M., Ohsumi, M. and Ohsumi, Y. (2000) The mouse SKD1, a homologue of yeast Vps4p, is required for normal endosomal trafficking and morphology in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell*, **11**, 747-63.

Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyama, Y., Futai, M. and Tashiro, Y. (1991) Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J. Biol. Chem.*, **266**, 17707-12.

Zheng, H., Fischer von Mollard, G., Kovaleva, V., Stevens, T.H. and Raikhel, N.V. (1999) The plant vesicle-associated SNARE AtVTI1a likely mediates vesicle transport from the trans-Golgi network to the prevacuolar compartment. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 2251-64.

Lebenslauf

Wolfram Antonin

geboren am 26.9.1972 in Bad Nauheim

- 1979-80 Besuch der Grundschule in Oberesslingen
- 1980-83 Besuch der Grundschule in Rottenburg-Wurmlingen
- 1983-92 Besuch des Uhlandgymnasiums in Tübingen
- 1992 Abitur am Uhlandgymnasium in Tübingen
- 1992-1997 Studium der Biochemie an der Universität Hannover
- 1992-1997 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
- 1994 Vordiplom im Fach Biochemie
- 1997 Diplomarbeit im Fach Biochemie am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin in der Arbeitsgruppe von Dr. Enno Hartmann
- 1997 Diplom im Fach Biochemie

- seit 1997 am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen in der Arbeitsgruppe von Prof. Reinhard Jahn

Teile dieser Arbeit sind in folgende Publikationen eingegangen:

Antonin, W., Holroyd, C., Tikkanen, R., Höning, S. and Jahn, R. (2000) The R-SNARE Endobrevin/VAMP-8 mediates homotypic fusion of early endosomes and late endosomes. *Mol. Biol. Cell*, **11**, 3289-98.

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

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

Pabst, S., Hazzard, J.W., Antonin, W., Südhof, T.C., Jahn, R., Rizo, J. and Fasshauer, D. (2000) Selective interaction of complexin with the neuronal SNARE complex. Determination of the binding regions. *J. Biol. Chem.*, **275**, 19808-18.

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

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Reinhard Jahn für die Betreuung dieser Arbeit, sein Ideenreichtum und Diskussionsbereitschaft sowie die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und Freiräume in seinem Labor.

Herrn Prof. Walter Müller danke ich für die prompte Übernahme des Referates.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Gottfried Mieskes. Wenn man mit seinen kleinen und großen Sorgen nicht mehr zu ihm dürfte, würde die Arbeit in unsere Abteilung sehr viel weniger leicht von der Hand gehen. Meinen Kollegen und Freunden danke ich für das nette Arbeitsklima und die ständige Diskussionsbereitschaft. Das gilt besonders für den SNARE-Club mit Dirk Fasshauer, Martin Margittai und Stefan Pabst, denen ich nicht nur unzählige Stunden der Diskussion im Labor oder beim Nachsitzen im Zak verdanke, sondern auch eine Vielzahl rekombinanter Proteine in der berühmten Reinheit. Reinhard Jahn, Dirk Fasshauer und Martin Margittai haben sich auch dieses Manuskripts angenommen und mich ermuntert, etwas mehr Worte zu benutzen und die letzten schwäbischen Überreste zu entfernen. Ihnen sei herzlich dafür gedankt. Claudia Holroyd danke ich für die Zusammenarbeit bei der Endosomen-Fusion. Dieter Bruns danke ich für interessante Diskussionen und wertvolle Ratschläge, Dietmar Riedel unter anderem für den Spaß, den wir mit unseren biochemischen Assays haben, und daß er mich mit meiner Mausexperimente nicht alleine läßt, und Phil Holroyd nicht nur für die Bereicherung meines ornithologischen Wissens. Stefan Pabst sei speziell für die Geduld gedankt, mit der er mich an seiner Laborbank duldet.

Bei Susanne Lausmann, Maria Druminski, Ursel Ries, Beate Köhler, Silke Bruns-Engers, Dagmar Diezmann und Matthias Böddener bedanke ich mich für ihre Hilfe bei der Immunzytochemie, Klonierungen, Aufreinigung von synaptischen Vesikeln und rekombinanten Proteinen und bei der Herstellung der Antiseren. Ein besonderer Dank gebührt unseren guten Seelen in der Spülküche und den Tierpflegern in unserem und in dem Tierhaus des MPI für experimentelle Medizin. Gordon Dowe danke ich für die Sequenzierung von unzähligen DNA-Konstrukten und Uwe Pleßmann für die Sequenzierung von Proteinfragmenten.

Bei Ritva Tikkanen und Stefan Höning bedanke ich mich für ihre Hilfe bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung zur Lokalisation von Endobrevin, bei Gabriele Fischer von Mollard und Vera Kreykenbohm für die gute Zusammenarbeit bei den Vti1-Projekten. Bei Nils Brose und seinen Kollegen, insbesondere Iris Augustin, bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme in ihr Labor während der ersten Wochen meiner Arbeit, bei der ich eine Menge über Klonierungen und Mausgenetik lernen konnte.

Meinen Eltern und Brüdern möchte ich für ihre Unterstützung danken.