

Untersuchungen zur Funktion des O-Layers und potentieller divalenter Bindungsstellen des neuronalen SNARE-Komplexes

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl. Chem. Ulf Matti,
geboren am 23. Oktober 1971 in Ulm

Hannover, April 2002

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Homburg, den 30. April 2002

Referent: Prof. Dr. W. Müller
Institut für Physiologische Chemie
Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent: PD Dr. T. Tamura–Niemann
Institut für Physiologische Chemie
Medizinische Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 30. Mai 2002

Für Hannah, Julia und Ramona

Danksagung

Mein Dank gilt all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit in irgendeiner Weise beigetragen haben.

Prof. Dr. Heiner Niemann möchte ich dafür danken, dass er mir dieses spannende Thema anvertraut und mir sowohl Freiheit als auch umfangreiche Hilfestellung bei der Bearbeitung gegeben hat.

Besonderen Dank schulde ich Dr. Thomas Binz für seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie die hervorragende praktische Betreuung dieser Arbeit.

Bei Prof. Dr. W. Müller möchte ich mich für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit nach dem Tod von Prof. Dr. Heiner Niemann bedanken.

Danksagen möchte ich PD Dr. Teruko Tamura-Niemann für ihre Diskussionsbereitschaft und die Übernahme des Korreferats.

Besonderer Dank gilt den Mitarbeitern von Prof. Dr. E. Neher vom Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, insbesondere Dr. Jakob B. Sørensen, Dr. Shun-hui Wei und Prof. Dr. Jens Rettig, welche durch ihre elektrophysiologischen Messungen entscheidende Beiträge zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben.

Prof. Dr. J. Alves vom Institut für Biophysikalische Chemie möchte ich für die Unterstützung bei der Aufnahme der CD-Spektren danken.

Dr. Harald John vom Niedersächsischen Institut für Peptidforschung in Hannover gilt mein Dank für die Aufnahme der Massenspektren und die Peptidsequenzierungen.

Tina Schaper, Stefanie Feldhege, Martina Enge und Karsten Heidrich gebührt besonderer Dank für ihre tatkräftige Unterstützung. Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Dr. Thomas Binz danke ich für die große Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Zusammenfassung

Die präsynaptischen Proteine SNAP-25 und Syntaxin 1 lagern sich während der calciuminduzierten Neurotransmitterfreisetzung aus synaptischen Vesikeln mit dem vesikelassoziierten Membranprotein Synaptobrevin 2 zum ternären SNARE-Komplex zusammen. Der gebildete SNARE-Komplex besteht aus vier superhelikalen α -Helices (je eine Helix von Syntaxin 1 und Synaptobrevin 2 und zwei Helices von SNAP-25) und besitzt eine große Stabilität, welche sich in einem Schmelzpunkt von über 90°C und der Resistenz gegenüber der denaturierenden Wirkung von Detergenzien auch bei erhöhten Temperaturen äußert. Es wird angenommen, dass die bei der Ausbildung des ternären SNARE-Komplexes freigesetzte Energie in Form von mechanischer Arbeit zur Überwindung der zwischen vesikulärer- und präsynaptischer Membran bestehenden elektrostatischen Barriere verwendet wird. Clostridiale Neurotoxine, deren Substrate einzelne SNARE-Proteine sind, blockieren die Neurotransmitterfreisetzung aus synaptischen Vesikeln, woraus der essentielle Charakter der SNARE-Proteine für die Fusionsreaktion ersichtlich ist. *In vitro* sind die rekombinanten SNARE-Proteine alleine in der Lage nach Rekonstitution von vesikulären und präsynaptischen SNAREs in Liposomen, diese miteinander zu fusionieren, weshalb die SNAREs auch als Fusionsmaschine bezeichnet werden. Neben den neuronalen SNAREs gibt es noch eine Vielzahl weiterer SNARE-Proteine, welche sich alle durch eine große Sequenzhomologie sowie durch ihre Beteiligung an unterschiedlichsten Membranfusions-schritten auszeichnen. Besonders streng konserviert sind dabei drei Glutamine und ein Arginin in der Mitte des gebildeten SNARE-Komplexes, welche im Gegensatz zu den ansonsten hydrophoben, in Schichten erfolgenden Wechselwirkungen zwischen den Helices eine ionische Wechselwirkung ausbilden. Diese zentrale ionische Schicht wird aufgrund der bei der Beschreibung der Kristallstruktur des neuronalen SNARE-Komplexes eingeführten Zählung der Schichten von -7 bis +8 als O-Layer bezeichnet. Zudem zeigt die Kristallstruktur Bereiche, in denen Wechselwirkungen mit zweiwertigen Metallionen stattfinden, weshalb die direkte Regulation der calciumregulierten Neurotransmitterfreisetzung durch Bindung von Calcium an den SNARE-Komplex nicht ausgeschlossen wurde.

In dieser Arbeit wurde durch Mutation der ionischen O-Layer-Aminosäuren zu hydrophoben Aminosäuren die Funktion des O-Layers bei der Bildung und Dissoziation des SNARE-Komplexes untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Mutation aller vier O-Layer-Aminosäuren zu Leucin zu einem SNARE-Komplex mit unverändertem Gehalt an Sekundärstruktur, jedoch zu einem um 10°C verringerten Schmelzpunkt führt. Zudem wird der gebildete mutierte SNARE-Komplex effizienter durch α -SNAP und NSF dissoziiert, was vermutlich auf die durch die fehlende ionische Wechselwirkung verringerte Stabilität zurückzuführen ist. Das Fehlen des ionischen O-Layers hatte keinen Effekt auf die Findung der richtigen Schichten, dem sog. Register der einzelnen Helices bei der Zusammenlagerung zum ternären Komplex, wie durch proteolytischen Partialverdau und Fragmentanalyse gezeigt werden konnte. Kinetische Untersuchung der SNARE-Komplex-Bildung *in vitro* ergaben eine deutliche Verringerung der Bildungsgeschwindigkeit. Diese steht im Einklang mit Ergebnissen aus in

Kollaboration gewonnen elektrophysiologischen Messungen an Chromaffinzellen des Rindes. Kapazitive- und amperometrische Messungen zeigten in diesem System, dass die Geschwindigkeit der Wiederauffüllung der Pools von fusionskompetenten Vesikeln, also die Bildung neuer trans-SNARE-Komplexe, nach einem Calciumstimulus stark verlangsamt erfolgt. Dagegen wurde kein Effekt auf die Kinetik der Fusionsreaktion selbst beobachtet, weshalb der ternäre SNARE-Komplex schon vor der Fusion bis über den O-Layer assembliert sein muss.

Die Mutation von Aminosäuren in den potentiellen Bindungsstellen für divalente Kationen in Synaptobrevin 2 (Aminosäuren S75, E78 und T79) und SNAP-25 (Aminosäuren D58, Q170 und E177) zu Alanin führt zu einer spektroskopisch unveränderten Struktur und lediglich geringen Veränderungen im Schmelzverhalten der ternären SNARE-Komplexe. Die Mutationen zu Alanin beeinflussen die Bindung von α -SNAP an den ternären Komplex nicht, die α -SNAP/NSF-vermittelte Dissoziation der SNAP-25-Mutante ist jedoch verringert. α -SNAP bindet im Bereich der Bindungsstelle von SNAP-25 an den ternären SNARE-Komplex, was bei der Einführung von Lysinresten in dieser Bindungsstelle durch eine deutliche Verringerung der α -SNAP-Bindung ersichtlich wird.

Gleichgewichtsdialyseexperimente erbrachten keine Hinweise, dass Wildtyp oder mutierte SNARE-Komplexe in Gegenwart von Phospholipiden Calcium binden. Bei den in Kollaboration durchgeführten elektrophysiologischen Messungen der mutierten SNARE-Proteine zeigte sich jedoch, dass sowohl die Mutationen in der Bindungsstelle von Synaptobrevin 2 als auch von SNAP-25 zu einer Blockierung des exozytotischen Bursts führen. Dies unterstreicht die trotz relativ geringem Konservierungsgrad große Bedeutung der Oberfläche des SNARE-Komplexes für die Interaktion mit für die Exozytose wichtigen regulatorischen Proteinen. Untersuchungen der Calciumabhängigkeit der Exozytose ergaben zudem, dass die Mutation in der SNAP-25-Bindungsstelle zu dem Verlust eines von drei in Chromaffinzellen bekannten Calciumbindungsschritten führt. Da keine direkte Bindung von Calcium an den ternäre SNARE-Komplex erfolgt, interagiert der ternäre SNARE-Komplex im Bereich der Bindungsstelle SNAP-25 D58/Q170/E177 vermutlich mit dem noch zu identifizierenden Calciumsensor der calciumregulierten Exozytose.

Schlagerworte: SNARE, Calciumregulation, Exozytose

Summary

During calcium induced release of neurotransmitter from synaptic vesicles the presynaptic proteins SNAP-25 and Syntaxin 1 form the ternary SNARE complex with the vesicle associated membrane protein Synaptobrevin 2. The formed SNARE complex consists of four α -helical strands. Syntaxin 1 and Synaptobrevin 2 contribute each to one helical strand whereas SNAP-25 contributes two α -helical domains. The complex exhibits a remarkable high melting point of more than 90°C and resist against detergent even at elevated temperatures.

It is thought that the free energy released during formation of the ternary SNARE complex is converted into mechanical work used to overcome the electrostatic energy barrier between the phospholipids of vesicle and presynaptic membrane. The central role of the SNAREs in membrane fusion has been illustrated by clostridial neurotoxins. Indeed, these toxins completely abolish neurotransmission by specifically cleaving peptide bonds of the SNARE proteins. Moreover, SNAREs constitute the minimal fusion machinery. Recombinant SNARE proteins alone are sufficient to mix phospholipids in *in vitro* essays. In addition to the neuronal SNAREs, a large number of SNARE proteins exist showing a high sequence homology. All members of this SNARE family are involved in membrane fusion events during intracellular transport between cellular compartments. The residues of the four helices at their hydrophobic interacting interface are highly conserved, while three central glutamines and an arginine are strictly conserved and form an ionic interaction. These interhelical interactions take place in layers which are numbered according to the crystal structure of the neuronal SNARE complex from -7 to +8, the ionic layer being the so called O-layer. Furthermore, probable binding sites for divalent cations were found on the crystal structure of the SNARE complex. This suggests that calcium ions can bind to the SNARE complex and that the complex itself is involved in the mechanism of calcium regulated neurotransmitter release.

In this work the function of the O-layer during formation and dissociation of the SNARE complex is analyzed. To this end the effect of mutations exchanging the ionic residues against hydrophobic aminoacids was studied. Mutation of all four O-layer aminoacids to leucins resulted in a reduction of the melting point by 10°C but didn't alter the content of the secondary structure. This mutated SNARE complex is disassembled by α -SNAP and NSF with higher efficiency than wild type SNARE complex, probably due to the loss of complex stability as a result of the missing ionic interaction. Mutation of the ionic residues doesn't affect the finding of the proper register of the interacting layers during complex formation that could be demonstrated by partial proteolysis followed by fragment analysis. Analysis of SNARE complex formation *in vitro* showed a significant reduction of the reaction rates. This result is in good agreement with electrophysiologic measurements from bovine chromaffine cells which were done in collaboration with S.H. Wei and J.B. Sørensen from the MPI-BPC in Göttingen. Capacitance and amperometric measurements showed a reduction in the refilling rates of release ready vesicle pools after a calcium stimulus, indicating a slow down of trans-SNARE complex formation. The kinetics of the fusion reaction itself were unaffected,

indicating that the area of the O-layer is already assembled into the ternary SNARE complex before the last step of the fusion reaction takes place.

Mutation of aminoacid residues in the potential divalent cation binding sites of Synaptobrevin 2 (aminoacids S75, E78 and T79) and SNAP-25 (aminoacids D58, Q170 and E177) to alanine had no influence on the secondary structure of the SNARE complexes and showed only minor reductions in the heat stability. These mutations had no effect on the binding of α -SNAP to the ternary SNARE complex, however mutations in SNAP-25 caused a reduction of α -SNAP/NSF mediated dissociation of the ternary SNARE complex. Mutation of SNAP-25 residues forming the potential binding site to lysines caused a strong reduction of α -SNAP binding to the complex, indicating that this area is involved in α -SNAP binding.

Equilibrium dialysis experiments with wildtype and mutant SNARE complexes in presence of phospholipids indicated that the SNARE complex doesn't bind calcium itself. Electrophysiological measurements revealed that the mutations of the SNAREs cause a block of the exocytotic burst. This finding stands out against the low level of conservation of these surface residues of the SNARE complex. However, it indicates the relevance of these mutated residues for the interactions with regulatory proteins of the exocytotic mechanism.

Analysis of the calcium dependence of exocytosis revealed the loss of one of the three known calcium binding steps in chromaffine cells. As the SNARE complex doesn't bind calcium itself this loss of a calcium binding step is likely due to the loss of interaction with the so far unknown calcium sensor of calcium regulated exocytosis via the binding site D58/Q170/E177 of SNAP-25.

Keywords: SNARE, calcium regulation, exocytosis

Inhaltsverzeichnis		Seite
1	Einleitung	1
1.1	Membranfusion	1
1.2	Komponenten des Membranfusionsapparates	2
1.2.1	Die Proteine der SNARE-Familie	3
1.3.1	Synaptobrevin und dessen Homologe	5
1.3.2	Syntaxin und Syntaxinhomologe	6
1.3.3	Die SNAP-25-Familie	7
1.3.4	SNARE-Proteine und die clostridiellen Neurotoxine	7
1.4	Der ternäre SNARE-Komplex	7
1.4.1	Die Kristallstruktur des ternären SNARE-Komplexes	9
1.4.1.1	Der O-Layer des ternären SNARE-Komplexes	10
1.4.1.2	Potentielle Bindungsstellen für divalente Kationen	12
1.5	Die SNARE-Hypothese	13
1.6	Munc18/Sec1	15
1.7	Rab Proteine	16
1.8	Synaptotagmin	17
1.9	Elektrophysiologische Messungen an Chromaffinzellen	19
1.10	Aufgabenstellung	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Materialliste	21
2.1.1	Reagenzien	21
2.1.2	Systeme	25
2.1.3	Standards	25
2.1.4	Enzyme	27
2.1.5	Häufig verwendete Puffer und Medien	27
2.1.6	Bakterien	28
2.1.7	Plasmide	29
2.1.8	Oligonukleotide	34
2.1.9	Antikörper	35
2.2	Methoden	36
2.2.1	Polymerase-Kettenreaktion	36
2.2.2	Reinigung von PCR-Produkten	37
2.2.3	Restriktionsspaltung	38
2.2.4	Auffüllen von DNA-Überhängen mit Klenow-Fragment	39
2.2.5	Kinasierung von Oligonukleotiden	39
2.2.6	Dephosphorylierung von Vektoren	40
2.2.7	Agarose-Gelelektrophorese	40
2.2.8	Reinigung von DNA	41
2.2.8.1	Reinigung von Spaltprodukten nach einem Restriktionsschnitt	41
2.2.8.2	Phenol-Chloroform-Extraktion	42

2.2.8.3	Ethanolpräzipitation von DNA	43
2.2.9	Ligation	43
2.2.10	Transformation	44
2.2.10.1	Herstellung kompetenter Bakterien-Zellen	44
2.2.10.2	Herstellung kompetenter, tiefrierbarer Bakterien-Zellen	45
2.2.10.3	Transformation von <i>E. coli</i>	45
2.2.11	Aufbewahrung transformierter Klone	45
2.2.11.1	Anlegen von <i>E. Coli</i> Glycerinkulturen	45
2.2.12	Plasmid-Präparation	45
2.2.12.1	Plasmid-Mini-Präparation	46
2.2.12.2	Plasmid-Midi-Präparation	47
2.2.13	Bestimmung der DNA-Konzentration	48
2.2.14	Expression von His ₆ -tag- und GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	48
2.2.14.1	GST-Fusionsproteine	48
2.2.14.2	Ultraschallaufschluß	49
2.2.14.3	Aufreinigung durch Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose	49
2.2.14.4	Thrombinspaltung von GST-Fusionsproteinen	50
2.2.14.5	Proteine mit His ₆ -tag	51
2.2.14.6	Aufreinigung durch Affinitätschromatographie an Ni ²⁺ -NTA-Agarose unter nativen Bedingungen	51
2.2.14.7	Aufreinigung durch Affinitätschromatographie an Ni ²⁺ -NTA-Agarose unter denaturierenden Bedingungen	52
2.2.14.8	Aufreinigung von His ₆ -NSF	53
2.2.14.9	Aufreinigung von His ₆ - α -SNAP	53
2.2.14.10	Lagern des Proteins nach der Dialyse	54
2.2.15	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	54
2.2.15.1	SDS-Polacrylamidgel	54
2.2.15.2	Probenvorbereitung	55
2.2.15.3	Elektrophorese	55
2.2.16	Coomassiefärbung	56
2.2.17	Fluorographie und Autoradiographie von SDS-Polyacrylamidgelen	56
2.2.18	Westernblot	57
2.2.18.1	Transfer auf eine Nitrocellulosemembran	57
2.2.18.2	Immunologische Identifizierung von Proteinen auf der Westernblot-Membran	58
2.2.18.3	ECL-Detektion von Proteinen	58
2.2.19	Proteinkonzentrationsbestimmung	59
2.2.19.1	Densitometrische Proteinkonzentrationsbestimmung	59
2.2.19.2	Photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung	59
2.2.20	DNA-Sequenzanalyse	60
2.2.21	<i>In vitro</i> Transkription	61
2.2.21.1	Phenol-Chloroform-Extraktion von <i>in vitro</i> Transkriptionsansätzen	62
2.2.22	<i>In vitro</i> Translation	63

2.2.23	Komplexstabilitätstest	64
2.2.23.1	Bildung von ³⁵ S-markiertem ternärem SNARE-Komplex	64
2.2.24	Dissoziation des ternären SNARE-Komplexes durch α -SNAP/NSF	65
2.2.25	Bindung von α -SNAP an den ternären SNARE-Komplex	67
2.2.26	Gelfiltration	68
2.2.27	Limitierter Verdau des ternären SNARE-Komplexes mit Proteinase K und Trypsin	69
2.2.27.1	Zusammensetzung und limitierter Verdau des SNARE-Komplexes	69
2.2.27.2	Analyse des ternären SNARE-Komplexes nach Verdau mit Proteinase K und Trypsin durch RP- μ HPLC, Aminosäuresequenzierung und Massenspektrometrie	70
2.2.28	Bindung von Ca^{2+} an den ternären SNARE-Komplex	71
2.2.28.1	Zusammensetzung des ternären SNARE-Komplexes	71
2.2.28.2	Berechnung und Ansatz von ⁴⁵ Ca-markierten Ca-EGTA-Dialysepuffern mit definierter freier Ca^{2+} -Ionenkonzentration	72
2.2.28.3	Szintillationsmessung von Ca-45	73
2.2.29	CD-Spektroskopie	73
3	Ergebnisse	75
3.1	Effekte von Mutationen der O-Layer-Aminosäuren	75
3.1.1	Struktur und Stabilität des ternären SNARE-Komplexes	75
3.1.1.1	Analyse der Komplexstruktur durch CD-Spektroskopie	75
3.1.1.2	Stabilität des ternären SNARE-Komplexes bei Austausch der ionischen Wechselwirkung im O-Layer gegen hydrophobe Wechselwirkung	76
3.1.1.3	Stabilität des SNARE-Komplexes bei teilweisem Austausch der O-Layer-Aminosäuren gegen Leucine	78
3.1.2	Dissoziation des ternären SNARE-Komplexes durch α -SNAP und NSF	79
3.1.3	Untersuchung der Komplexstruktur durch limitierte Proteolyse	80
3.1.4	Einfluss von Mutationen auf die Kinetik der Bildung des SNARE Komplexes	81
3.2	Analyse von in potentiellen Bindungsstellen für divalente Kationen	83
3.2.1	Die Bindungsstellen D58/E170/Q177 von SNAP-25 und S75/E78/T79 von Synaptobrevin 2	83
3.2.2	Charakterisierung der mutierten Komplexe durch thermische Denaturierung und CD-Spektroskopie	84
3.2.3	Bindung von α -SNAP an ternäre SNARE-Komplexe	87
3.2.4	Dissoziation von SNARE-Komplexen durch α -SNAP und NSF	88
3.2.5	Bindung von Calcium an den ternären SNARE-Komplex	90
3.3	Elektrophysiologische Charakterisierung von Mutationen in SNARE-Proteinen	91

3.3.1	Elektrophysiologische Charakterisierung von Mutationen im O-Layer Des SNARE-Komplexes	91
3.3.2	Elektrophysiologische Charakterisierung von Mutationen in potentiellen Bindungsstellen für divalente Kationen	94
3.3.2.1	Die Bindungsstelle SNAP-25 D58/E170/Q177	94
3.3.2.2	Die Bindungsstelle Synaptobrevin 2 S75/E78/T79	96
3.3.2.3	Calciumabhängigkeit der Exozytose	98
4	Diskussion	100
4.1	Der zentrale ionische O-Layer	100
4.1.1	Korrelation zwischen Stabilität und Funktion bei mutierten SNARE- Komplexen	101
4.1.2	Kontrolliert der O-Layer die Findung des richtigen Registers der SNARE-Helices?	102
4.1.3	Dissoziation durch α -SNAP und NSF	103
4.1.4	Kinetik der Bildung des ternären SNARE-Komplexes.	104
4.2	Funktion potentieller Ca^{2+} -Bindungsstellen	105
4.2.1	Struktur der mutierten SNARE-Komplexe	106
4.2.2	Bindung von α -SNAP und Effekt auf α -SNAP/NSF-vermittelte Dissoziation	106
4.2.3	Direkte Calciumbindung an den ternären SNARE-Komplexe	107
4.2.4.1	Ausblick auf mögliche Interaktionspartner des fusionskompetenten SNARE-Komplexes	108
5	Literaturverzeichnis	110

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α -SNAP	α soluble NSF attachment protein
γ	γ -Quant
AS	Aminosäure
BoNT/A-G	Botulinusneurotoxin A-G
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cirkulardichroismus
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	3',5'-Didesoxyribonukleotid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEPC-Wasser	DEPC behandeltes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	enhanced GFP (Codonnutzung für Säugerzellen optimiert)
EGTA	Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure
GFP	green fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein)
GST	Glutathion S-Transferase
GT-Sepharose	Glutathion-Sepharose
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LMW	low molecular weight
Lubrol	Polyoxyethylen-9-Laurylether
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption and ionisation – time of flight
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure

MS	Massenspektrometrie
n	Neutron
NP-40	Nonidet P-40
NSF	N-Ethylmaleimid-sensitiver Faktor
p. a.	zur Analyse
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pH	Potentia Hydrogenii
PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RBS	Ribosomenbindungsstelle
reRNA	Replicon-RNA
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rNTP	Ribonukleotid
RP	Reverse Phase
rpm	Umdrehungen pro Minute
rSyb	Synaptobrevin (rattus norvegicus)
SDS	Natrium-dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SFV	Semliki Forest Virus
SM-Proteine	Proteine der Sec1/Munc-18-Familie
SNAP-25	syn aptosome ass ociated p rotein of 25 kDa
SNARE	sol uble NSF att achment p rotein receptor
Syb	Synaptobrevin
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TeNT	Tetanusneurotoxin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TFA	Trifluoressigsäure

Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
U	Unit
v/v	Volumen pro Volumen
VAMP	vesicle associated membrane protein
w/v	Gewicht pro Volumen

1 Einleitung

1.1 Membranfusion

Ein Hauptmerkmal von eukaryotischen Zellen gegenüber den prokaryotischen Zellen ist die funktionelle Organisation der Stoffwechselwege in verschiedenen, durch Membranen voneinander abgetrennten Kompartimenten, den Zellorganellen. Aufgrund dieser strikten Abgrenzung durch Membranen benötigt die eukaryotische Zelle einen Transportmechanismus für nicht membranpermeable Stoffe und Makromoleküle, deren Transport und Austausch zwischen den einzelnen Kompartimenten für das Leben der Zelle notwendig ist. Zudem müssen sich die Zellorganellen während der Zellteilung zur gleichmäßigen Weitergabe teilen, Membranen beim Wachstum hinzugefügt werden und ganze Zellen sowie deren Organellen miteinander verschmelzen können. Für den Transport von Ladung/Fracht zwischen zwei Organellen wird diese in einem Prozess, welcher als Knospung bezeichnet wird, durch Abschnüren eines Teils der Organellmembran in ein Transportvesikel verpackt. Nach dem aktivem Transport des beladenen Vesikels zum Zielkompartiment wird das Transportvesikel mit diesem fusioniert und die Ladung/Fracht damit in das Zielkompartiment eingebracht. Dieser Transportmechanismus ist in Zellen hochgradig reguliert und einer der Schlüsselschritte des Transportes ist die Fusion der vesikulären Membran mit der Zielmembran. Dabei muss die aus dem Aufeinandertreffen der elektrisch geladenen Oberflächen resultierende elektrostatische Abstoßung der Lipiddoppelschichten beider Membranen überwunden und hydrophobe Phospholipide in einer wässrigen Umgebung miteinander gemischt werden. Bis zur Ausbildung einer wässrigen Fusionspore muss erneut ein energetisch ungünstiger Übergangszustand überwunden werden, in welchem die eine Seite der Lipiddoppelschichten teilweise stark gekrümmt und teilweise von der anderen Schicht unter Überwindung der hydrophoben Wechselwirkungen abgelöst wird.

Wegen der Höhe der zu überwindenden Energiebarrieren findet Membranfusion nicht spontan statt. In biologischen Membranen wird die gezielte Membranfusion durch eine komplexe Maschinerie von Fusionsproteinen betrieben. Das genaue Funktionsprinzip dieses Fusionsapparates ist nicht bekannt. Die derzeit diskutierten Modelle für die Funktion der Fusionsproteine reichen von der Ausbildung eines ringförmigen Proteinkanals zwischen den beiden gegenüberliegenden zu fusionierenden Membranen, welcher die Diffusion von Phospholipiden durch Protein-Phospholipid-Interaktion erleichtert, sich füllt und dabei die Fusionspore ausbildet (Almers und Tse, 1990; Lindau und Almers, 1995), bis hin zu einem Modell, bei welchem die Fusionsproteine die Aktivierungsenergie absenken und die räumliche Organisation der Fusionsstellen übernehmen (Monck *et al.*, 1995).

Wegen der guten experimentellen Zugänglichkeit ist die exocytotische Membranfusion bislang eines der mit am besten untersuchten Membranfusionsereignisse. Eine Sonderstellung nimmt dabei die synaptische Vesikelfusion ein, welche ein in der Synapse ankommendes Aktionspotential nach dem Anstieg der internen Calciumkonzentration durch das potentialabhängige Öffnen von Calciumkanälen innerhalb von wenigen Millisekunden in ein chemisches Signal umwandelt. Dabei wird durch das Calciumsignal die Fusion von mit Neurotransmitter gefüllten präsynaptischen Vesikel mit der präsynaptischen Membran initiiert

und der Neurotransmitter in den synaptischen Spalt ausgeschüttet, wo er auf der postsynaptischen Seite durch Stimulation der entsprechenden Rezeptoren wiederum ein Aktionspotential auslöst.

1.2 Komponenten des Membranfusionsapparates

Die am Membranfusionsprozess beteiligten Proteine lassen sich in drei Klassen zusammenfassen:

1. SNARE-Proteine: Die Familie der SNAREs (soluble NSF attachment protein receptors) besteht aus drei Proteinunterfamilien, den Syntaxin-, SNAP-25- (synaptosomen assoziiertes Protein von 25 kDa) und Synaptobrevin/VAMP (vesikel assoziiertes Membranprotein)-Homologen. Am besten untersucht sind die neuronalen SNARE-Proteine Syntaxin 1, SNAP-25 und Synaptobrevin 2. SNAREs zeigen untereinander eine relativ geringe Homologie, zeichnen sich jedoch durch ein charakteristisches α -helikales Peptidmotiv (SNARE-Motiv) in ihrer Aminosäuresequenz aus. Diese Domäne ermöglicht die Ausbildung von sehr stabilen ternären Komplexen zwischen dem vesikulär lokalisierten Synaptobrevin und den vorwiegend plasmamembrangebundenen Syntaxin und SNAP-25. Diese Komplexe werden durch die Chaperonwirkung der ATPase NSF (N-ethylmaleimid sensitiver Faktor) im Zusammenspiel mit den NSF-Adapterproteinen α -, β - und γ -SNAP (soluble NSF attachment protein) dissoziiert. Die α -, β - und γ -SNAPs sind mit SNAP-25 nicht verwandt.
2. Sec1/Munc18 Homologe: Diese auch als SM-Proteine bezeichneten cytosolischen Mitspieler mit einem Molekulargewicht von ca 65 kDa interagieren mit Mitgliedern der Syntaxin Familie. Das synaptische Syntaxin 1 kann nicht gleichzeitig an SNARE- und SM-Proteinen binden, was die Vermutung nahe legt, dass die Interaktion nacheinander stattfindet.
3. Rab Proteine: Die Familie der Rab Proteine umfasst mehr als 40 Mitglieder alleine bei Säugern (Olkkonen und Stenmark, 1997; Schimmoller *et al.*, 1998) sowie 10 Rab-Proteine in Hefe (Lazar *et al.*, 1997). Es handelt sich dabei um 20-25 kDa kleine GTPasen, welche Ähnlichkeiten mit den *ras*-Proteinen zeigen.

Für die calciumregulierte Exozytose synaptischer Vesikel ist eine weitere Proteinfamilie von Bedeutung.

5. Synaptotagmine: Die Synaptotagmin-Familie besteht aus derzeit 13 Synaptotagminen, deren Struktur evolutionär stark konserviert ist und welche jeweils zwei Calcium- und Phospholipid-bindende C_2 Domänen besitzen. Die großteils vesikellokalisierten Synaptotagmine spielen eine entscheidende Rolle bei der calciumregulierten Membranfusion (Geppert *et al.*, 1994) und werden oft auch als der eigentliche Calciumrezeptor gehandelt (Perin *et al.*, 1990; Brose *et al.*, 1992).

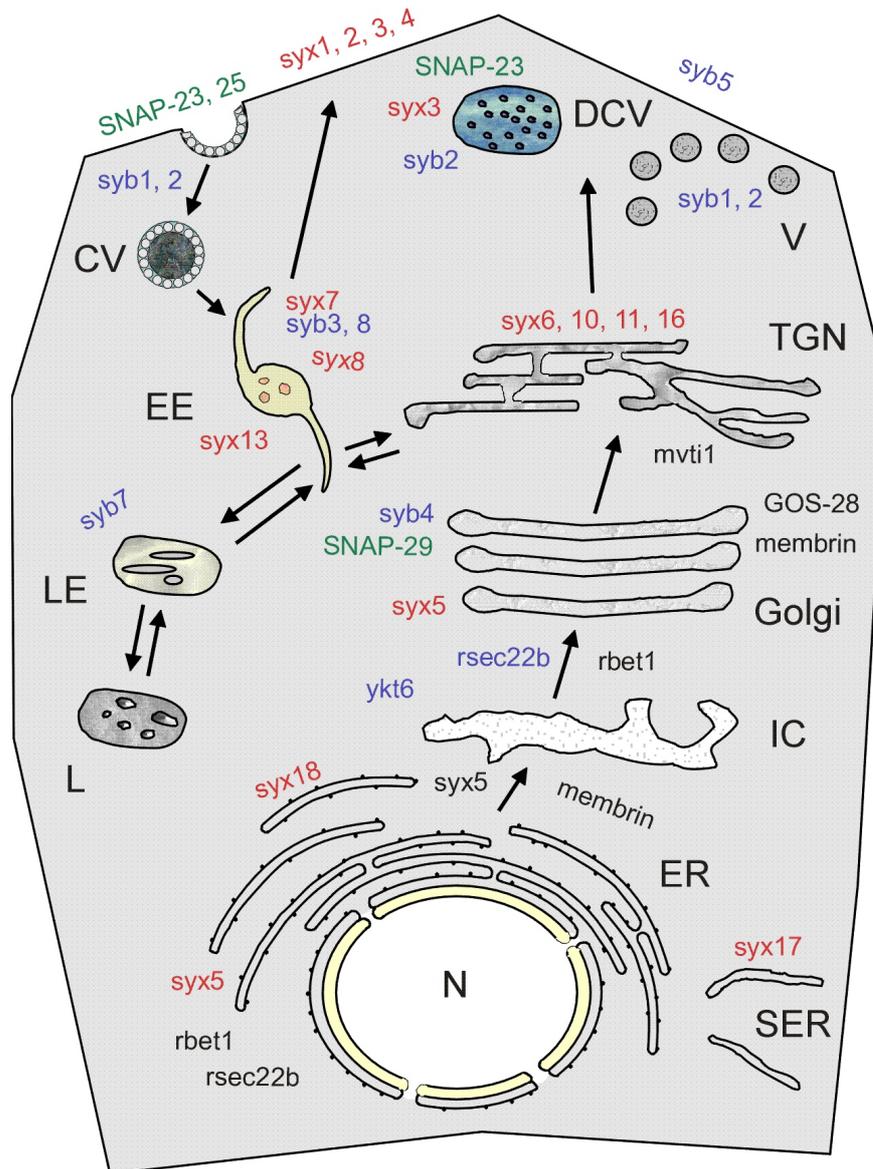


Abbildung 1: Subzelluläre Lokalisation von SNARE-Proteinen mit Beteiligung am Transport zwischen Zellkompartimenten. (N; Nucleus; ER, Endoplasmatisches Reticulum, SER, glattes Endoplasmatisches Reticulum; IC, intermediäres Kompartiment; TGN, Transgolginetzwerk; V, Vesikel; DCV, „dense core“ Vesikel; CV, Clathrin beschichtete Vesikel; EE, frühes Endosom; LE, spätes Endosom; L, Lysosom; syb, Synaptobrevin; syx, Syntaxin) (aus Bock und Scheller, 1999, abgewandelt)

1.3 Die Proteine der SNARE-Familie

Die SNARE-Proteine wurden unabhängig von einander in Hefen und Neuronen entdeckt. Zunächst war deren Funktion jedoch unbekannt. Erst durch die Entdeckung der SNARE-Proteine als die Substrate der Zn^{2+} -Proteasen Tetanusneurotoxin (TeNT) und Botulinusneurotoxin A-G (BoNTVA-G) ergaben sich erste Hinweise auf deren Funktion, da die clostridiellen Neurotoxine die Exocytose hemmen.

Anhand der Proteinstruktur und Lokalisation wurde die SNARE-Familie in Analogie zum neuronalen System in zwei Untergruppen aufgeteilt: Die synaptobrevinhomologen SNAREs werden wegen ihrer vesikulären Lokalisierung als v-SNAREs, die vorwiegend auf der

Zielmembran lokalisierten SNAREs mit Homologie zu Syntaxin und SNAP-25 werden als t-SNAREs (target membrane) bezeichnet. Die Einordnung neuentdeckter SNARE-Proteine in diese Nomenklatur wird erschwert durch die teilweise relativ geringe Homologie zu den neuronalen SNAREs sowie dem Vorhandensein eines für alle SNARE-Proteine charakteristischen Motivs, dem sogenannten SNARE-Motiv (Terrian und White, 1997; Weimbs *et al.*, 1997; Weimbs *et al.*, 1998). Das SNARE-Motiv ist ein Abschnitt von etwa 60 Aminosäuren Länge, welches durch die regelmäßige Abfolge von hydrophoben und hydrophilen Aminosäureseitengruppen die Ausbildung von untereinander wechselwirkenden α -Helices, sogenannten coiled-coils, ermöglicht. Diese umeinander verdrehten α -Helices der zusammengelagerten SNARE-Proteine bilden das Kernstück des ternären SNARE-Komplexes, den Kern- oder „core-Komplex“. Nach der Lösung der Kristallstruktur des „core-Komplexes“ der neuronalen SNARE-Proteine findet eine weitere Nomenklatur zunehmend Verwendung. Diese beruht auf einer Besonderheit im „core-Komplex“. Die Interaktionen zwischen den einzelnen α -Helices der SNARE-Proteine im „core-Komplex“ findet bis auf eine Ausnahme über in Schichten oder Lagen organisierten hydrophoben Wechselwirkungen statt. Nur im Zentrum des ‚core-Komplexes‘, in der als O-Layer bezeichneten Schicht befindet sich eine ionische Wechselwirkung von drei Glutamin- mit einer Arginin-Seitengruppe. Durch einen Sequenzvergleich aller SNARE-Proteine hat sich gezeigt, dass diese Aminosäuren streng konserviert sind, weshalb die SNARE-Proteinfamilie anhand des Vorhandenseins von Glutamin (Q) oder Arginin (R) in dieser Position auch in Q- und R-SNAREs unterteilt werden. Vereinfacht lässt sich dabei feststellen, dass die ursprünglich als v-SNAREs bezeichneten Synaptobrevinhomologen R-SNAREs sowie die Syntaxin- und SNAP-25-Homologen t-SNAREs Q-SNAREs sind. Jedoch gibt es Ausnahmen, welche darauf zurückzuführen sind, dass die tatsächliche Lokalisation einiger SNAREs nicht mit der Einordnung in v- und t-SNAREs anhand ihrer sonstigen Strukturmerkmale korreliert. Eine Erleichterung bringt die Q/R-Nomenklatur bei SNARE-Proteinen ohne Ähnlichkeit zu bekannten SNAREs, wie z.B. Tomosyn, welches nur ein C-terminales SNARE-Motiv besitzt, jedoch keinerlei sonstige Ähnlichkeiten zu den anderen SNARE-Unterfamilien aufweist. Anhand des Sequenzalignments lässt es sich als R-SNARE identifizieren (Fujita *et al.*, 1998).

Die Lokalisierung der SNARE-Proteine ist nicht so scharf abgegrenzt wie es die ursprüngliche v-/t-Nomenklatur vermuten lässt. So kommen auch die t-SNARE-Proteine auf synaptischen Vesikeln vor, wo sie jedoch deutlich unterrepräsentiert sind (molares Verhältnis von v- zu t-SNARE etwa 6:1) (Walch-Solimena *et al.*, 1995). Ebenso konnte der ternäre SNARE-Komplex von synaptischen Vesikeln isoliert werden (Otto *et al.*, 1997).

Zusätzlich zum SNARE-Motiv besitzen die SNARE-Proteine noch weitere, das SNARE-Motiv flankierende Bereiche, welche bei den einzelnen SNARE-Proteinen beschrieben werden. Einen Überblick über die Domänen und Struktur der SNARE-Proteine gibt Abbildung 2.

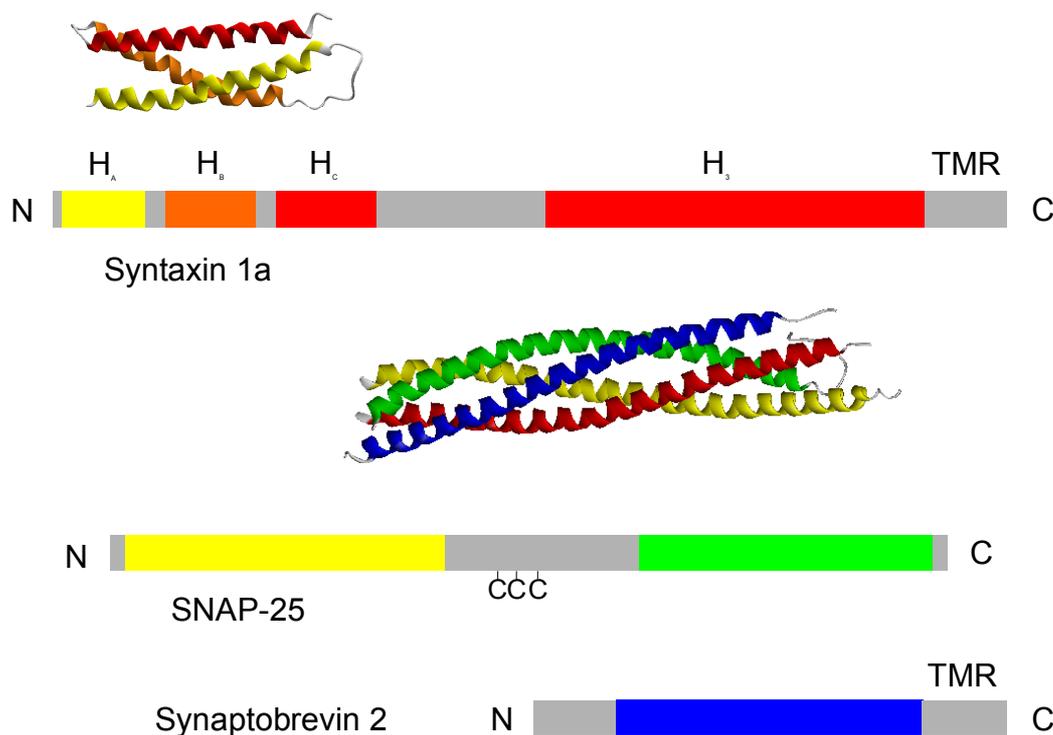


Abbildung 2: Struktur des ternären SNARE-Komplexes und die monomeren SNAREs. Gezeigt sind die bekannten Strukturen des „core-Komplexes“ und der α -helikalen H_{abc} -Domäne (oben) von Syntaxin 1a (H_A , gelb; H_b , orange; H_c , rot; H_3 rot neben dem C-terminalen Transmembranbereich (TMR)). Unstrukturierte Bereiche sind grau gezeichnet. SNAP-25 (gelb, N-terminale Helix; grün, C-terminale Helix) und Synaptobrevin (blau) besitzen in monomerer Form keine Sekundärstruktur. Die Abbildung wurde unter Verwendung der pdb-Dateien 1SFC (Sutton *et al.*, 1998) und 1BRO (Fernandez *et al.*, 1998) mit WebLabViewerPro (MSI, San Diego, CA, USA) erstellt.

1.3.1 Synaptobrevin und dessen Homologe

Synaptobrevin 2 ist ein auf synaptischen Vesikeln lokalisiertes Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 13 kDa (Trimble *et al.*, 1988; Baumert *et al.*, 1989) und ist über eine 20 Aminosäuren umfassende C-terminale Transmembrandomäne in die Lipiddoppelschicht integriert, so dass sich die 96 N-terminalen Aminosäurereste im Cytosol befinden. Das N-terminale Ende der meisten Synaptobrevine, welches sich an das von Aminosäure 30-96 reichende SNARE-Motiv anschließt, zeichnet sich durch einen hohen Anteil an Prolin aus, weshalb es unstrukturiert ist. Monomeres Synaptobrevin 2 zeigt in Lösung keine Sekundärstruktur. Synaptobrevin 1 ist ebenfalls auf synaptischen Vesikeln lokalisiert, im Gehirn sind beide teilweise kolokalisiert (Elferink *et al.*, 1989; Trimble *et al.*, 1990). Synaptobrevin 1 und 2 kommen auch außerhalb des zentralen Nervensystems in anderen Geweben vor (Ralston *et al.*, 1994; Volchuk *et al.*, 1994; Regazzi *et al.*, 1995). VAMP3 oder Cellubrevin wird in Säugern ubiquitär exprimiert (McMahon *et al.*, 1993). VAMP4 und VAMP7 sind beide deutlich größer als die anderen Mitglieder der Synaptobrevinfamilie. Beide kommen im Gewebe weit verbreitet vor, während VAMP4 besonders stark im Herzgewebe und dort in Nähe des Zellkerns lokalisiert ist, ist VAMP7 dort

nicht nachweisbar. VAMP7 ist lysosomal lokalisiert (Advani *et al.*, 1998). Ebenfalls in der Herz-, aber auch in der Skelettmuskulatur, jedoch nicht im Gehirn, ist VAMP5 verbreitet (Zeng *et al.*, 1998). VAMP6 ist bisher nur als EST (expressed sequence tag) bekannt. VAMP8/Endobrevin ist zusammen mit Syntaxin 7, Syntaxin 8 und vti1b an der Fusion von Endosomen beteiligt (Advani *et al.*, 1998; Antonin *et al.*, 2000).

1.3.2 Syntaxin und Syntaxinhomologe

Die Syntaxin-Familie umfaßt derzeit 17 Mitglieder. Syntaxin 1 existiert in den Isoformen 1A und 1B, die eine Sequenzidentität von 84% zueinander besitzen (Bennett *et al.*, 1992). Die beiden Isoformen unterscheiden sich in ihrer Lokalisation im Gehirn (Ruiz-Montasell *et al.*, 1996). Syntaxin 1 hat ein Molekulargewicht von 35 kDa und besitzt wie Synaptobrevin 2 eine C-terminale Transmembrandomäne, welche das Protein in der präsynaptischen Membran verankert und ein SNARE-Motiv. Der N-Terminus ist cytosolisch exponiert und besitzt im Gegensatz zu Synaptobrevin eine ausgeprägte Sekundär- und Tertiärstruktur. Der N-terminus besteht aus drei mit H_{ABC} bezeichneten α -helicalen Domänen. Diese können mit der das SNARE-Motiv enthaltenden H₃-Domäne wechselwirken, wodurch Syntaxin eine geschlossenen Konformation einnimmt. In *in vitro* Experimenten konnte der Einfluß dieser Interaktion auf die Fusionsgeschwindigkeit von Phospholipidvesikeln gezeigt werden, weshalb dem N-terminus eine regulatorische Funktion zugeschrieben wird (Parlati *et al.*, 1999). Eine weitere Regulation beruht auf der Interaktion der H_{ABC}-Domäne sowie eines Teils der H₃-Domäne mit Munc-18-1/nSec1 (Jahn, 2000). Syntaxin ist bevorzugt auf präsynaptischen Membranen lokalisiert, kommt jedoch auch auf synaptischen Vesikeln (Walch-Solimena *et al.*, 1995) und entlang der axonalen Plasmamembran vor (Galli *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 1995).

Syntaxin 2, 3, und 4 kommen in Membranen der Leber, Milz und Niere vor (Fujita *et al.*, 1998), Syntaxin 3 ist zusätzlich in Darmzellen (Delgrossi *et al.*, 1997), am apikalen Transport beteiligt (Riento *et al.*, 1998), sowie in der Retina detektierbar (Morgans *et al.*, 1996). Syntaxin 4 ist zudem in die Fusion von GLUT4-haltigen Vesikeln mit der Plasmamembran involviert (Tamori *et al.*, 1998). Syntaxin 5 ist an Transportprozessen vom Endoplasmatischen Reticulum (ER) zum Golgi-Apparat (Dascher *et al.*, 1994), Syntaxin 6, Syntaxin 10, Syntaxin 16 am Transport von Vesikeln im trans-Golgi-Netzwerk (Bock *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 1998b+c; Simonsen *et al.*, 1998) und Syntaxin 7 am Vesikeltransport vom trans-Golgi zum Lysosom beteiligt (Wang *et al.*, 1997). Syntaxin 11 besitzt wie Syntaxin 6 keine Transmembrandomäne (Tang *et al.*, 1998a). 6 der 13 C-terminalen Aminosäuren sind Cysteine, welche wie bei SNAP-25 mit Palmitinsäure verestert werden können und somit das Protein ebenfalls in Membranen verankert werden kann (Advani *et al.*, 1998). Syntaxin 12 ist endosomal lokalisiert (Tang *et al.*, 1998d). Syntaxin 13 wird nur im Gehirn exprimiert, wo es am Zellkörper lokalisiert ist (Advani *et al.*, 1998). Die beiden Syntaxin 1 homologen Syntaxin 14 und 15 sind bisher nur als EST bekannt (Bock *et al.*, 1997).

1.3.3 Die SNAP-25-Familie

Wie Syntaxin 1 befindet sich auch SNAP-25 auf der präsynaptischen Membran, kommt aber auch in nichtneuronalem Gewebe vor. Von SNAP-25 existieren zwei Spleißvarianten, SNAP-25A und SNAP-25B (Bark and Wilson, 1994) sowie die homologen, nicht neuronale SNAP-23 (Ravichandran *et al.*, 1996; Mollinedo und Lazo, 1997) und SNAP-29 (Steggmaier *et al.*, 1998). SNAP-25 besitzt zwei durch einen cysteinreichen, unstrukturierten Bereich getrennte SNARE-Motive mit Glutaminen in den O-Layer-Positionen. Im Gegensatz zu Synaptobrevin und Syntaxin hat es jedoch keine Transmembrandomäne. SNAP-25 ist über drei mit Palmitinsäure veresterte Cysteine in der Molekülmitte in der präsynaptischen Membran integriert (Hess *et al.*, 1992; Veit *et al.*, 1996). Die beiden Spleißvarianten von SNAP-25 unterscheiden sich nur geringfügig in der Anordnung der Cysteine. Eine Sonderstellung kommt vti1b zu. Vti1b besitzt nicht die typischen Merkmale und Struktur der SNAP-25 Familie, seine Funktion ist jedoch die eines halben SNAP-25. Vti1b ist wie Syntaxin ein Q-SNARE mit einem SNARE-Motiv und einer C-terminalen Transmembrandomäne, besitzt aber nicht die für die Syntaxin-Familie charakteristische N-terminale strukturierte Domäne. Vti1b fungiert zusammen mit dem ebenfalls untypischem Syntaxin 8 als ein Vertreter von SNAP-25 in der Fusion von Endosomen unter Ausbildung eines Komplexes mit Endobrevin und Syntaxin 7 (Antonin *et al.*, 2000)

1.3.4 SNARE-Proteine und die clostridiellen Neurotoxine

Die clostridiellen Neurotoxine sind hochspezifische Zinkproteasen mit großteils nur einem einzigen Mitglied der SNARE-Proteinfamilie als Substrat, jedoch werden nicht alle SNARE-Proteine durch die Neurotoxine gespalten. So wird SNAP-25A und B effizient, murines SNAP-23 schlecht und humanes SNAP-23 nicht gespalten (Vaidyanathan, 1999). Von den Syntaxinen wird Syntaxin 1 gespalten, für die Syntaxine 4 bis 16 konnte bisher keine Spaltbarkeit nachgewiesen werden (Schiavo *et al.*, 1995; V. V. Vaidyanathan, persönliche Mitteilung). Syntaxin 2 und 3 aus COS-1-Zellen wird nicht gespalten (Bittner *et al.*, 1996), während Syntaxin 2 und 3 aus Ratte hydrolysiert wird (Schiavo *et al.*, 1995). Aus der Synaptobrevinfamilie werden Synaptobrevin 1 und 2 sowie Cellubrevin durch *clostridiale* Neurotoxine gespalten (Yamasaki *et al.*, 1994; McMahon *et al.*, 1993), während alle anderen Proteine dieser Familie nicht proteolysiert werden (Galli *et al.*, 1998; ; V. V. Vaidyanathan, persönliche Mitteilung).

1.4 Der ternäre SNARE-Komplex

Syntaxin 1A, SNAP-25A und Synaptobrevin 2 lagern sich *in vitro* spontan zu einem ternären SNARE-Komplex zusammen, in welchem die drei Proteine in äquimolarem Verhältnis vorliegen. In dieser sehr stabilen, komplexierten Form werden die drei Proteine nicht von den clostridiellen Neurotoxinen proteolysiert. Die Stabilität des gebildeten ternären SNARE-Komplexes zeigt sich in seiner besonderen thermischen Stabilität sowie seiner Resistenz gegenüber proteolytischem Verdau (Fasshauer *et al.*, 1998a; Poirier *et al.*, 1998) und

Neurotoxinen (Hayashi *et al.*, 1994). In Abwesenheit von denaturierenden Reagenzien entfaltet sich die Struktur erst bei einer Temperatur von 90°C (Fasshauer *et al.*, 1997b). In Anwesenheit von denaturierenden Reagenzien sinkt die Entfaltungstemperatur ab, jedoch wird der ternäre SNARE-Komplex selbst in Gegenwart von 2%iger SDS-Lösung (Sodium dodecyl sulphate, Natrium-dodecylsulfat) erst bei einer Temperatur von 60°C dissoziiert (Hayashi *et al.*, 1994), was auf eine außergewöhnliche Stabilität der Struktur des ternären SNARE-Komplexes und das Vorliegen eines energetischen Minimums hindeutet. Aufgrund dieser Eigenschaft wird der ternäre SNARE-Komplex auch als SDS-resistenter Komplex bezeichnet. In einem *in vitro* Fusionsassay konnte gezeigt werden, dass künstlich hergestellte, mit rekombinanten v- bzw. t-SNARE-Proteinen rekonstituierte Vesikel bei physiologischer Temperatur spontan miteinander fusionieren. Dies zeigt, dass die SNARE-Proteine die für die Fusion synaptischer Vesikel mit der präsynaptischen Membran minimal essentielle Maschinerie bilden. (Weber *et al.*, 1998). Aus diesen Befunden wird für die Funktion der SNARE-Proteine das folgende Modell abgeleitet: Bei der Ausbildung des energiearmen ternären SNARE-Komplexes aus vesikelverankertem Synaptobrevin und cytoplasmamembranverankertem Syntaxin und SNAP-25 wird Energie freigesetzt, die in Form von mechanischer Arbeit über die Transmembranverankerungen des Komplexes auf die Lipiddoppelschichten übertragen wird. Die mechanische Arbeit bewirkt, dass die elektrostatische Barriere zwischen den Lipiddoppelschichten der Membranen überwunden wird und die Fusion der Membranen initiiert wird. Dieses Modell wird auch gestützt durch die Tatsache, dass die Länge des Transmembranbereiches sowie dessen Abstand zum SNARE-Motiv entscheidend für eine effiziente *in vitro* Fusion ist (McNew *et al.*, 2000). Die vor der Bildung des SNARE-Komplexes durch clostridiale Neurotoxine proteolytisch gespaltenen SNARE-Proteine können sich zwar ebenfalls zu einem ternären Komplex zusammenlagern, dieser zeigt jedoch keine oder eine verringerte Stabilität in Gegenwart von SDS. Die Blockade der Neurotransmitterfreisetzung aus neurotoxinvergifteten Nervenzellen kann daher mit der entsprechend verringert freiwerdenden Energie bei der Komplexbildung erklärt werden, welche nicht mehr für eine effiziente Fusion der Membranen von synaptischen Vesikeln mit der präsynaptischen Membran ausreichen (Hayashi *et al.*, 1994). Nach Injektion von Neurotoxin in Synapsen können Vesikel deshalb zwar an der präsynaptischen Membran andocken, jedoch nicht mehr fusionieren (Hunt *et al.*, 1994). Andererseits kann die Proteolyse einzelner SNARE-Proteine zu einer Veränderung der Interaktion von anderen, für die Fusion essentiellen Proteinen mit dem SNARE-Komplex führen und dadurch die Exozytose behindern, was den gleichen Phänotyp zur Folge hätte. So gibt es z. B. Hinweise darauf, dass durch die Spaltung von SNAP-25 mit BoNT/A und E die calciumabhängige Interaktion von monomeren sowie komplexiertem SNAP-25 mit Synaptotagmin geschwächt oder verhindert wird (Gerona *et al.*, 2000).

Die verringerte Stabilität des SNARE-Komplexes ist mit der Abspaltung von Teilen der an der Protein-Protein-Interaktion beteiligten Domänen zu erklären. So konnte anhand von Deletionsmutanten gezeigt werden, dass Synaptobrevin 2 über einen zentralen, die Aminosäuren 27-96 umfassenden Bereich mit Syntaxin 1 und SNAP-25 interagiert. (Hayashi *et al.*, 1994). Die Wechselwirkungen zwischen SNAP-25 und Synaptobrevin 2 erfolgen über

den C-terminalen Bereich von SNAP-25, über den N-terminalen Bereich einschließlich der Acylierungsdomäne erfolgt die Bindung an Syntaxin 1 (Hayashi *et al.*, 1994; Chapman *et al.*, 1994). Für die Interaktion von Syntaxin 1 mit den beiden anderen Bindungspartnern im SNARE-Komplex ist die C-terminale, die Aminosäuren 199-243 umfassende Domäne, essentiell (Chapman *et al.*, 1994; Calakos *et al.*, 1994).

Die für die Ausbildung des SDS-resistenten Komplexes essentiellen, das SNARE-Motiv umfassende Domänen besitzen eine hohe Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung von superspiralisierten α -Helices, sogenannten coiled-coils (Hayashi *et al.*, 1994; Chapman *et al.*, 1994). Diese entstehen, wenn aufgrund der Heptadsymmetrie zweier oder mehrerer α -Helices hydrophobe Seitengruppen über einen längeren Bereich miteinander in Wechselwirkung treten können. Dabei kommt es zur Ausbildung eines hydrophoben Kernes, während die Peripherie der sich umeinander windenden α -Helices größtenteils geladen ist. Bis auf Syntaxin 1, welches einen α -Helixgehalt von 43% aufweist, besitzen die SNARE-Proteine in monomerer Form keine ausgeprägte Sekundärstruktur. Erst bei der Zusammenlagerung von SNAP-25 und Syntaxin zu einem binären Komplex oder bei der Bildung des ternären SNARE-Komplexes kommt es zu einer starken Zunahme an α -helikalen Bereichen, was durch CD-Analysen nachgewiesen wurde (Fasshauer *et al.*, 1997a; Fasshauer *et al.*, 1997b). Durch Elektronenmikroskopie (Hanson *et al.*, 1997) sowie mit paramagnetischer Elektronenresonanzspektroskopie spinmarkierter SNARE-Proteine wurde für den SNARE-Komplex eine Struktur mit vier parallel verlaufenden superspiralisierten α -Helices vorausgesagt (Poirier *et al.*, 1998). Dies wurde durch die Lösung der Kristallstruktur bestätigt (Sutton *et al.*, 1998).

1.4.1 Die Kristallstruktur des ternären SNARE-Komplexes

Die von Sutton *et al.* (1998) gelöste Kristallstruktur ist in Abbildung 3 wiedergegeben. Die Strukturdaten umfassen lediglich den sogenannten minimalen Kernkomplex (Fasshauer *et al.*, 1998a), welcher großteils aus den SNARE-Motiven der einzelnen Proteine besteht, weshalb die in der Abbildung gezeigte Struktur mit ihrer Membranverankerung lediglich ein, wenn auch sehr wahrscheinliches, Modell darstellt. Bei der genauen Analyse der Strukturdaten wurde die schon länger vermutete Interaktion der einzelnen Proteine durch Ausbildung von coiled-coils mit hydrophoben Wechselwirkungen bestätigt. Denkt man sich den SNARE-Komplex als zylinderförmig, so finden diese Wechselwirkungen in 16 parallelen Schichtlagen entlang der Achse des Zylinders statt. Die entlang der Achse des SNARE-Komplexes in den Schichten liegenden Aminosäuren sind sehr stark konserviert (siehe Abbildung 4). Da die Strukturdaten aus drei etwas unterschiedlichen Einzelkristallen gemittelt wurde, welche ausgehend vom Zentrum des zylinderförmigen SNARE-Komplexes übereinandergelagert wurden, wird die mittlere Schicht als 0-Layer bezeichnet und alle weiteren Schichten ausgehend vom 0-Layer mit negativen und positiven Zahlen nummeriert.

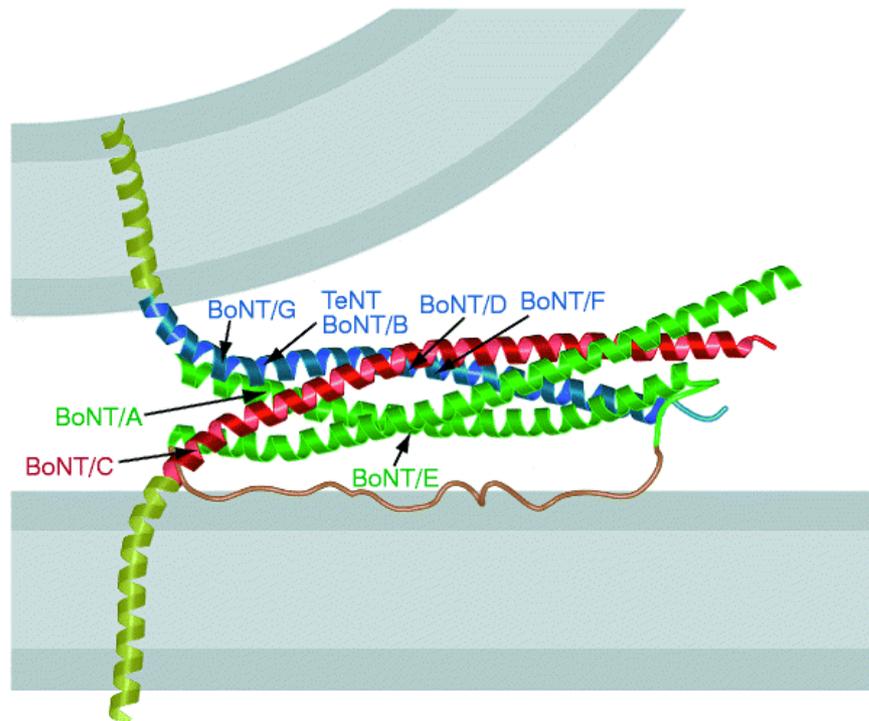


Abbildung 3: Kristallstruktur des neuronalen SNARE-Komplexes. Gezeigt ist ein hypothetisches Modell des in die Membranen integrierten SNARE-Komplexes aus Syntaxin 1a (rot), SNAP-25 (grün) und Synaptobrevin 2 (blau). Die Kristallstruktur selber enthält keine Transmembrananker (gelb). Die die N- und C-terminale Helices von SNAP-25 verbindende Schleife wurde als unstrukturierte Polypeptidkette eingezeichnet (orange). Zudem sind die Spaltstellen der clostridiellen Neurotoxine eingezeichnet (entnommen aus Sutton *et al.*, 1998).

1.4.1.1 Der O-Layer des ternären SNARE-Komplexes

Der 0-Layer des ternären SNARE-Komplexes zeichnet sich gegenüber allen anderen Schichten durch seine ionischen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen SNARE-Proteine aus. Er wird durch zwei Glutamine der beiden SNAP-25-Helices und einem Glutaminrest aus Syntaxin sowie einem Argininrest von Synaptobrevin gebildet. Die Guanidingruppe des Arginins liegt dabei relativ zentral im Kern und wechselwirkt mit den drei Glutaminresten (siehe Abbildung 9, Seite 75). Aufgrund der Besonderheit der ionischen Wechselwirkung sowie der hohen Konservierung (Abbildung 4) des 0-Layers, auch über die Artgrenzen hinweg, wird in dem 0-Layer mit seiner hydrophoben Abschirmung durch die benachbarten Schichten eine besondere Funktion vermutet. Zudem sind Mutationen in den 0-Layer-Aminosäuren bekannt, welche den Membrantransport stark stören. So führt eine Mutation des konservierten Argininrestes zu einem Glycinrest in Sec22 zu einem Phenotyp vergleichbar mit einem Totalverlust des Sec22-Gens (Novick *et al.*, 1980; Ossig *et al.*, 1991). Erstaunlicherweise haben andere Mutationen der Aminosäuren des O-Layers des hefehomologen SNARE-Komplexes kaum einen Effekt auf die Sekretion oder das Zellwachstum. So kann der Argininrest gegen einen Glutaminrest ersetzt oder die Position des Argininrestes mit der Position eines Glutaminrestes einer anderen Helix getauscht werden ohne einen ausgeprägten Phenotyp zu verursachen. Lediglich die Einführung eines weiteren

Argininreste im 0-Layer zeigt einen drastischen Phenotyp mit stark verringertem Wachstum (Katz and Brennwald, 2000; Ossig *et al.*, 2000).

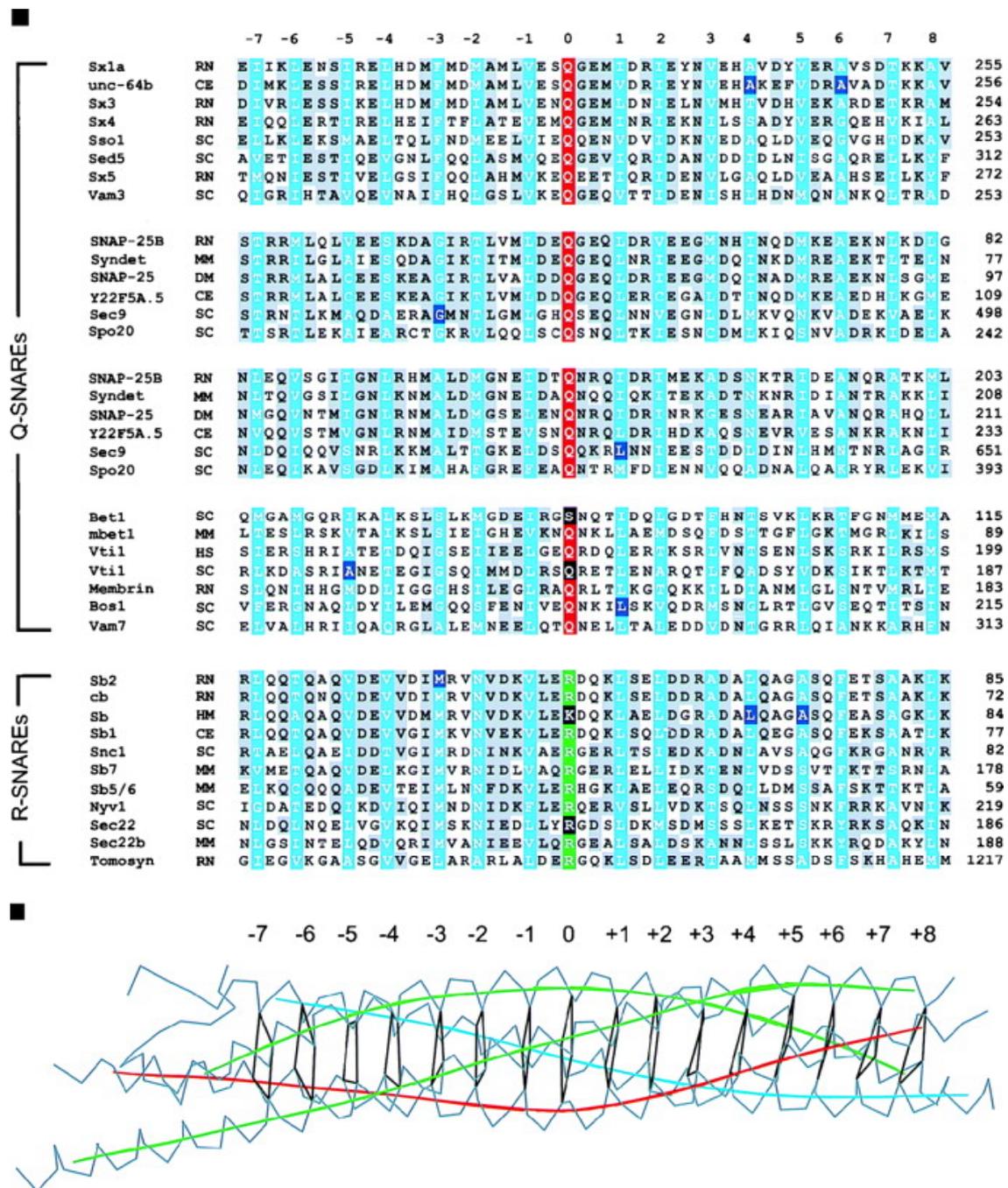


Abbildung 4: Sequenzalignment einer repräsentativen Auswahl von Mitgliedern der SNARE-Proteinfamilie. Gezeigt sind die Aminosäurebereiche des „core-Komplex“. Die 16 Layer des SNARE-Komplexes (unten) sind hellblau, konservierte Aminosäuren grau hinterlegt. Die Glutamine des O-Layers sind rot, Argininreste grün hinterlegt. Schwarz bzw. dunkelblau hinterlegte Aminosäuren zeigen natürlich vorkommende Mutationen. Verwendete Abkürzungen: sx, Syntaxin; sb, Synaptobrevin; cb, Cellubrevin; HS, *Homo sapiens*; MM, *Mus musculus*; RN, *Rattus norvegicus*; SC, *Saccharomyces cerevisiae*; DM, *Drosophila melanogaster*; TM, *Torpedo marmorata*; CE, *Caenorhabditis elegans*; und HM, *Hirudo medicinalis* (entnommen aus Fasshauer *et al.*, 1998b).

1.4.1.2 Potentielle Bindungstellen für divalente Kationen

Die Kristallisation des synaptischen SNARE-Komplexes erfolgte in Anwesenheit von 49 mM Strontiumchlorid (Sutton *et al.*, 1998), wodurch die Kristallstruktur ebenfalls Strontiumionen enthält. Die drei SNARE-Komplexe umfassende Strukturdatei 1SFC (www.rcsb.org) enthält neben den Proteindaten zudem Koordinaten von 13 Strontiumionen sowie von 19 Wassermolekülen. Die Oberfläche des SNARE-Komplexes besteht größtenteils aus hydrophilen Aminosäuren welche zahlreiche ionische Wechselwirkungen miteinander eingehen. Die Verteilung von hydrophoben und hydrophilen Aminosäureseitengruppen auf der Oberfläche des SNARE-Komplexes sowie das elektrostatische Oberflächenpotential ist in Abbildung 5 wiedergegeben. Die Oberfläche des Komplexes zeigt eine auffällige Verteilung von Bereichen mit saurem oder basischem Charakter. Der gesamte mittlere Bereich des Komplexes besitzt bis auf wenige Ausnahmen einen sauren Charakter, während die Oberflächenaminosäuren des Carboxyterminus fast ausschließlich basisch sind. Es ist zu vermuten, dass diese ausgeprägten Bereiche wichtig für die Interaktion des SNARE-Komplexes mit regulatorischen Proteinen ist. So führt die Mutation von sauren Aminosäureresten am C-Terminus von SNAP-25 zu einer gegenüber Wildtyp verstärkten Sekretion in PC-12-Zellen, was auf die Veränderung der Wechselwirkung mit einem negativen Regulator hindeutet (Chen *et al.* 2001). In Abbildung 5 ist neben dem elektrostatischen Potential auch die Lage zweier Sr^{2+} - Ionen eingezeichnet. Diese sind wegen der sie koordinierenden Umgebung besonders interessant. Ein Strontiumion wird von den Aminosäureresten Serin-75, Glutamat-78 und Threonin-79 von Synaptobrevin koordiniert. Diese Aminosäuren liegen im Bereich der Spaltstelle von Tetanustoxin und Botulinumtoxin B, welche Synaptobrevin zwischen Glutamin-76 und Phenylalanin-77 proteolysieren. Das zweite, in der Mitte des SNARE-Komplexes liegende Strontiumion befindet sich in einer Vertiefung in enger Nähe der 0-Layer-Aminosäuren und wird durch die Aminosäuren Aspartat-58 und Glutamat-177 von SNAP-25 koordiniert. Zudem befindet sich hinter dem Strontiumion noch ein Wassermolekül in direkter Nähe zum Glutaminrest-170 von SNAP-25. Im Gegensatz zu den sehr engen Wechselwirkungen der Aminosäuren von Synaptobrevin mit dem Strontiumion handelt es sich bei den Wechselwirkungen in der Vertiefung zwischen den beiden SNAP-25-Helices um weitreichende und damit schwächere Wechselwirkungen über

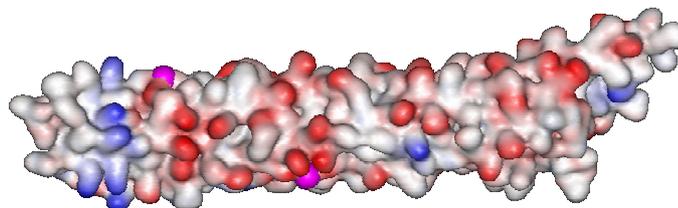


Abbildung 5: Elektrostatischer Oberflächenplot des neuronalen SNARE-Komplexes mit zwei gebundenen Strontiumionen (pink). Basische Bereiche sind blau, saure Bereiche rot dargestellt.

eine relativ große Distanz. Die Bindung von Strontiumatomen durch den SNARE-Komplex zeigt die potentielle Möglichkeit der Interaktion von zweiwertigen Metallionen mit dem SNARE-Komplex. Wegen der bei der Kristallisation eingesetzten unphysiologisch hohen Konzentration von Strontiumchlorid ist es nicht ausgeschlossen, dass es sich dabei um Artefakte handelt. Da die Inhibition der Exocytose durch Spaltung von SNAP-25 mit BoNT/A durch eine Erhöhung der Calciumkonzentration umgangen werden kann, ist eine direkte Interaktion des SNARE-Komplexes mit Calcium nicht ausgeschlossen (Xu *et al.*, 1998a; Capogna *et al.*, 1997; Banerjee *et al.*, 1996; Trudeau *et al.*, 1998).

1.5 Die SNARE-Hypothese

Die SNARE-Hypothese war 1993 der erste Versuch die Anheftung und Fusion von Transportvesikeln auf molekularer Ebene zu erklären. Darin wurde die Notwendigkeit des Vorliegens von v- und t-SNARE-Proteinen auf den zu fusionierenden Vesikel- und Zielmembranen gefordert. Zudem sollten aber auch das cytosolische Protein NSF, eine homohexamere ATPase (Lenzen *et al.*, 1998), sowie die NSF-Adapterproteine α -, β - und γ -SNAP für die Membranfusion notwendig sein (Söllner *et al.*, 1993b). Dies wurde aus der Beobachtung geschlossen, dass effizienter vesikulärer Transport nur in Gegenwart dieser Proteine sowie Mg^{2+} /ATP möglich ist (Balch *et al.*, 1984). Dabei wurde die Ausbildung des Komplexes mit der Funktion des Dockings der Vesikel an die Zielmembran gleichgesetzt und NSF/ α -SNAP sollten durch Dissoziation des Komplexes die Membranfusion antreiben. Die SNARE-Hypothese postulierte außerdem, dass die Spezifität von intrazellulären Membranfusionsprozessen durch die an unterschiedlichen Transportwegen jeweils exklusiv beteiligten SNARE-Proteinvarianten sichergestellt würde. Dass die Sortierung von Transportvesikeln *in vivo* zu einem viel früheren Zeitpunkt stattfindet, war bekannt und wurde in der SNARE-Hypothese auch nicht in Frage gestellt.

Die Funktion der SNARE-Proteine setzt erst nach der Anhaftung der Vesikel an der Zielmembran, wohin sie durch aktiven Transport gelangen, ein. Dies schließt die reine Zielerkennung unter Ausbildung des SNARE-Komplexes mit den t-SNAREs der Zielmembran aus, bedeutet jedoch auch nicht, dass die Zielinformation nicht trotzdem in den v-SNAREs codiert sein kann. Die Ausbildung des extrem stabilen Fusionspartikels führte Anfangs zu der Annahme, dass die Stabilität ein Maß für die Spezifität der Fusionsmaschinerie darstellte. Die Mitglieder der SNARE-Proteinfamilie bilden jedoch eine Vielzahl von stabilen gemischten SNARE-Komplexen aus, welche eine ähnlich hohe, teilweise sogar höhere thermische Stabilität als die aus den bekannten *in vivo* Fusionspartnern bestehenden Komplexe aufweisen (Fasshauer *et al.*, 1999). Mit Hilfe eines *in vitro* Fusionsassay konnte jedoch gezeigt werden, dass v- und t-SNAREs, welche zwar stabile Komplexe miteinander bilden können, nicht auch zwangsläufig Membranen miteinander fusionieren können, sondern dies nur durch Kombination von passenden SNAREs möglich ist (Parlati *et al.*, 2000; McNew *et al.*, 2000). Ausbildung eines ternären SNARE-Komplexes ist demnach kein ausreichendes Kriterium für das erfolgreiche Mischen von Phospholipidmembranen. Dies zeigt zudem, dass, entsprechend dem Postulat der SNARE-

Hypothese, isolierte SNAREs ohne weitere Faktoren in der Lage sind, der Membranfusion ihre Spezifität zu verleihen.

Für die eigentliche Membranfusion werden NSF und α -SNAP nicht benötigt. Entgegen der ursprünglichen SNARE-Hypothese hat sich mittlerweile gezeigt, dass Membranen bei oder vielmehr durch die Bildung des ternären SNARE-Komplexes und nicht durch dessen Dissoziation miteinander fusioniert werden (Weber *et al.*, 1998). Da für die eigentliche Membranfusion die SNARE-Proteine SNAP-25, Syntaxin und Synaptobrevin ausreichen (Weber *et al.*, 1998) und der dabei gebildete SNARE-Komplex durch NSF und α -SNAP unter Verbrauch von ATP dissoziiert wird (Söllner *et al.*, 1993a; Hayashi *et al.*, 1995), wird angenommen, dass die Rolle von NSF und α -SNAP bei der Membranfusion in der Aktivierung des vesikulären SNARE-Komplexes und im Recycling von v- und t-SNARE-Proteinen nach der Fusion liegt (Mayer *et al.*, 1996; Nichols *et al.*, 1997; Ungermann *et al.*, 1998). Elektrophysiologische Messungen an chromaffinen Zellen zeigen ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen α -SNAP/NSF-Aktivität und der Kinetik des Fusionschrittes, zeigen aber einen Einfluß auf die Wiederauffüllung des fusionierbaren Vesikelpools. Diese Erkenntnisse führen zu dem Schluß, dass die Spezifität der Membranfusion auch alleine durch die SNAREs codiert und vermittelt werden kann (McNew *et al.*, 2000). Die abgewandelte SNARE-Hypothese bezieht sich lediglich auf die Spezifität von Membranfusionsereignissen, trifft jedoch keine Aussage über die Regulierung des aktiven, gerichteten Transport von Vesikel, welcher bereits zeitlich vor der Ausbildung des ternären SNARE-Komplexes zu einer Sortierung der Transportvesikel führt. Es gibt bislang keine Erkenntnisse, ob an diesem Sortiermechanismus ebenfalls SNAREs beteiligt sind. Die entsprechend der SNARE-Hypothese vermittelte Spezifität könnte somit ein letzter Kontrollschritt direkt vor der Fusion des Transportvesikels mit seiner Zielmembran sein und sollte nicht mit dem spezifischen Transport vermischt werden.

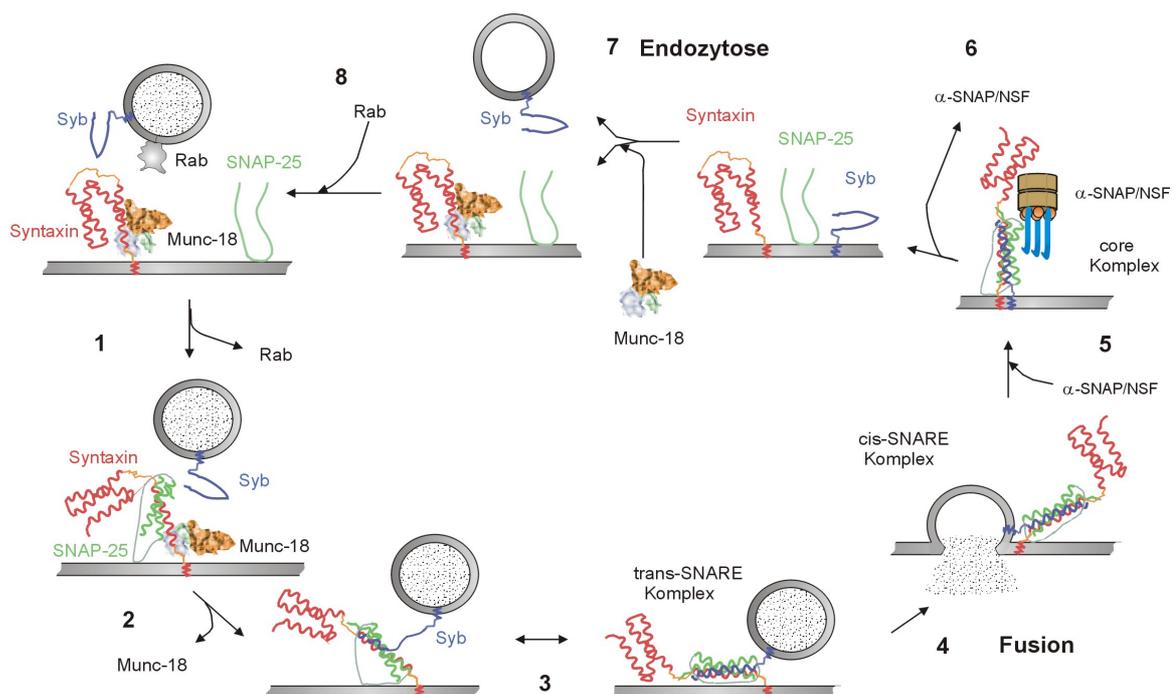


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Ablaufs von Vesikelfusion und Endozytose.

1.6 Munc18/Sec1

Die Familie der Munc-18/Sec1 oder auch SM-Proteine umfasst eine Vielzahl 60-70 kDa schwerer hydrophiler Proteine ohne auffällige, mit anderen Proteinen vergleichbare funktionelle Untereinheiten oder Homologie. Sie wurden unabhängig voneinander in Hefe (Sly1p, Sec1p), *C. elegans* (unc18) und Säugern (munc18) entdeckt (Novick *et al.*, 1980; Hosono *et al.*, 1992; Hata *et al.*, 1993; Garcia *et al.*, 1994; Pevsner *et al.*, 1994; Dascher *et al.* 1991). Die SM-Proteine zeigen untereinander nur eine relativ geringe aber über die Primärstruktur gleichmäßig verteilte Sequenzidentität von 20-22%. Die vier in Hefe vorkommenden SM-Proteine sind essentiell für unterschiedliche Transportvorgänge in den Zellen und Mutationen der Gene führen zu einer Blockierung der Fusionsereignisse an denen die jeweiligen SM-Proteine beteiligt sind (Ossig *et al.*, 1991; Schekman 1992). In Mäusen führt die Deletion von Munc18-1 zu einem Verlust der synaptischen Exocytose und damit zum Tod der Tiere. Die Anheftung der Vesikel an die presynaptische Membran ist jedoch unverändert (Verhage *et al.*, 2000). In Säugern existieren noch mindestens drei weitere SM-Proteine welche an intrazellulären Transportschritten beteiligt sind, vermutlich existieren jedoch weitere, bislang unentdeckte SM-Proteine (Jahn und Südhof, 1999). Obwohl die Proteine für Membranfusion unerlässlich sind ist ihre Funktion bislang völlig unklar. SM-Proteine interagieren mit den Mitgliedern der Syntaxin-Familie. Diese Interaktion findet nur mit monomerem Syntaxin und nicht in Gegenwart von SNAP-25 oder dem „core-Komplex“ statt, da sich die Bindungsdomänen überlappen (Fernandez *et al.*, 1998)(siehe Abbildung 7). Durch diese Syntaxin-Munc18-Interaktion könnte freies Syntaxin aus dem Gleichgewicht der SNARE-Komplexbildung entzogen werden, weshalb den SM-Proteinen oft eine negative regulatorische Funktion zugeschrieben wurde. Da sich der SNARE-Komplex zumindest *in vitro* spontan bildet erklärt dies nicht die essentielle Funktion der SM-Proteine für die Fusion. Des weiteren könnten die SM-Proteine nach der Dissoziation des SNARE-Komplexes durch NSF und α -SNAP durch eine chaperonartige Funktion Syntaxin in die für die Komplexbildung notwendige Konformation bringen. *In vitro* ist dies für die Komplexbildung nicht notwendig, da freies Syntaxin in Lösung eine nahezu identische Struktur wie Syntaxin im Komplex mit Munc18 besitzt (Dulubova *et al.*, 1999), jedoch kann NSF auch mit freiem Syntaxin interagieren (Jahn und Südhof, 1999) und möglicherweise dessen Konformation ändern. Für das volle Verständnis der Funktion der SM-Proteine fehlen sicher noch einige Puzzlestücke, da über weitere mit den SM-Proteinen interagierende Proteine wie Tomosyn, welches den Syntaxin-Munc18-Komplex dissoziieren kann, (Fujita *et al.*, 1998) noch zu wenig bekannt ist und sich der Schlüssel zum Verständnis der Funktionsweise der SM-Proteine vielleicht gerade hier befindet.

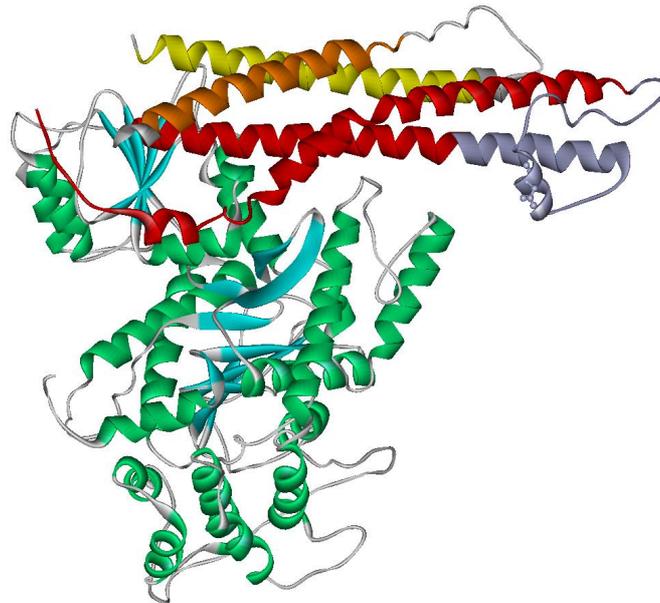


Abbildung 7: Struktur von Syntaxin im Komplex mit Munc18. Im Komplex mit Munc18 (grün/türkis) ist der α -helikale Bereich der H_c -Domäne (rot) von Syntaxin (Farben wie in Abbildung 2) im Gegensatz zur Struktur in Abwesenheit von Munc18 länger um den grau gefärbten Bereich länger. Die H_3 -Domäne ist bereits bis einschließlich der O-Layer-Aminosäure α -helikal, während der C-Terminus unstrukturiert ist. Die Abbildung wurde unter Verwendung der pdb-Datei 1DN1 (Misura *et al.*, 2000) mit WebLabViewerPro (MSI, San Diego, CA, USA) erstellt.

1.7 Rab Proteine

Die Familie der Rab Proteine umfasst in Säugerzellen mehr als 40 Mitglieder. Der wohl bekannteste Vertreter ist Rab3A, welches in großen Mengen in präsynaptischen Nervenenden zu finden ist. Rab Proteine sind kleine durch Geranylierung an Membranen gebundene GTPasen. Rab3A ist in GTP gebundener Form auf synaptischen Vesikeln lokalisiert von welchen es während oder nach der Exozytose unter Hydrolyse von GTP zu GDP und Verlust des Geranylgeranylrestes abdissoziiert. Nach dem Austausch von GDP zu GTP wird Rab3A wiederum an die Membran von reendozytierten Vesikeln geheftet (Südhof 1997). Obwohl der Verlust des Rab3A-Gens in Mäusen und *C. elegans* nur zu einem milden Phänotyp führt und einen geringen Effekt auf die Exozytose zeigt. Wegen der unterschiedlicher Lokalisation ist dies wahrscheinlich nicht auf Redundanzeffekte durch die beiden Isotypen Rab3B und Rab3C zurückzuführen (Geppert *et al.*, 1994; Nonet *et al.*, 1997). Der knock-out von Rab3A zeigt jedoch einen Einfluß auf die calciumabhängige Fusion und die presynaptische Plastizität (Geppert *et al.*, 1997; Castillo *et al.*, 1997; Lonart *et al.*, 1998). Die Funktion von Rab3A wird in Synapsen zeitlich nach der Ausbildung des SNARE-Komplexes vermutet (Geppert *et al.*, 1996), was in starkem Kontrast zu den Erkenntnissen über die Funktion der Rab Proteine in Hefezellen steht. Dort sind die Rab Proteine essentiell am zielgerichteten Transport zeitlich vor der Ausbildung des ternären SNARE-Komplexes beteiligt (Ungermann *et al.*, 1998; Cao *et al.*, 1998). Aufgrund von Mutationen z. B. im GTP-Bindungsbereich von Rab Proteinen, welche in Säugerzellen ebenfalls zur Blockierung von Membranfusionsschritten führen (Holz *et al.*, 1994; Lazzarino *et al.*, 1998; Ren *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1994; Tisdale *et al.*, 1992) wird

die allgemeine Bedeutung der Rab Proteine für die Membranfusion nicht angezweifelt. Unklar ist jedoch ob der beobachtete Unterschied auf eine vollständig anderes Funktionsprinzip von Rab Proteinen in Hefen und Säugern zurückzuführen ist, oder die Rab Proteine im Laufe der Evolution bei Säugern ihre essentiellen Funktion hin zu einem rein modulatorischen Effekt gewandelt haben. Rab Proteine interagieren nicht direkt mit den SNARE- oder SM-Proteinen und obwohl ihre Funktionsweise weitgehend ungeklärt ist wird vermutet, dass sie universelle Regulatoren dieser beiden Komponenten des Membranfusionsapparates sind (Jahn und Südhof, 1999)

1.8 Synaptotagmin

Synaptotagmin umfasst eine Familie von mindestens dreizehn an Membranfusionsprozessen beteiligten Proteinen mit einem Molekulargewicht zwischen 45 und 90 kDa. Synaptotagmine sind über einen aminoterminalen Transmembrananker auf synaptischen Vesikeln lokalisiert. Synaptotagmin VII dagegen ist bevorzugt auf der Plasmamembran lokalisiert (Sugita *et al.*, 2001). Alle Synaptotagmine besitzen in ihrem cytosolischen Bereich zwei calcium- und phospholipidbindende C₂ Domänen, welche mit C₂A und C₂B bezeichnet werden. Einige Isoformen sind exklusiv aber mit unterschiedlicher regionaler Verteilung im Gehirn und in Endokrinzellen exprimiert (Synaptotagmin I, II, III, V, und X), während die restlichen Synaptotagmin-Isoformen ubiquitär vorkommen (Schiavo *et al.*, 1998). Die ursprünglich in Proteinkinase C entdeckten C₂-Domänen von Synaptotagmin können mehrere Calciumionen binden, weshalb schon seit vielen Jahren vermutet wird, dass die Synaptotagmine die Calciumsensoren für die Membranfusion sind. Die Struktur der cytoplasmatischen Bereiche einiger Synaptotagmine ist mit Hilfe der NMR- und Röntgenstrukturanalyse bestimmt worden. In Abbildung 8 ist die Struktur von Synaptotagmin III mit den wahrscheinlichen Positionen von vier Ionenbindungsstellen gezeigt (Sutton *et al.*, 1999). Die Calciumionen werden von Aspartat- und Glutamatresten gebunden, wobei eine Reihe von Reaktionen stattfinden. Synaptotagmin ist ein äußerst interaktionsfreudiges Protein, hierbei ist die Relevanz dieser scheinbaren Unspezifität für die Funktion von Synaptotagmin unklar (Sugita und Südhof, 2000). Einige der wohl wichtigeren Interaktionen seien im folgenden aufgezählt. Die C₂A-Domäne von Synaptotagmin bindet in Gegenwart von Calcium an Membranen, wenn diese saure Phospholipide enthalten (Brose *et al.*, 1992). Eine halbmaximale Bindung findet dabei bei Calciumkonzentrationen von 20-70 µM statt (Davis *et al.*, 1999). Die durch ein Aktionspotential in Synapsen freigesetzte Konzentration an Calciumionen ist abhängig vom Typ der Synapse und reicht von 5-15 µM (Schneggenburger und Neher, 2000; Bollmann *et al.*, 2000) bis hin zu 100-200 µM (Heidelberger *et al.*, 1994; Hsu *et al.*, 1996). Die Calciumbindung an eine Schleife der C₂A-Domäne führt innerhalb weniger Millisekunden zu einem direkten Eintauchen in die Membran ohne vorangehende Konformationsänderung (Shao *et al.*, 1998; Davis *et al.*, 1999). Ob diese calciumabhängige Membranbindung einen entscheidenden Beitrag zur calciumregulierten Membranfusion leistet ist unklar. Dagegen spricht neben der für einige Synapsentypen zu hohen Calciumkonzentration, dass eine Mutation der sauren Aminosäurereste der C₂A-Domäne nicht zu einer zu erwartenden Blockierung der Neurotransmitterfreisetzung führt (Augustine,

2001). Ein weiterer calciumabhängiger Effekt ist die homomere und heteromere Oligomerisierung von Synaptotagminen über deren C₂B- Domänen (Chapman *et al.*, 1998; Osborne *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 1999; Fukuda *et al.*, 1999). Die calciumabhängige Oligomerisierung hat ein Halbmaximum von etwa 100 μ M und führt zu einer Konformationsänderung des Proteines (Chapman *et al.*, 1998; Desai *et al.*, 2000), welche aber ebenfalls nur wenige Millisekunden dauert (Davis *et al.*, 1999). Trotz der für die Oligomerisierung notwendigen relativ hohen Calciumkonzentrationen führt eine Blockierung dieser Funktion durch Mutationen oder Injektion eines Peptides aus dem Bindungsbereich zu einem Verlust der Neurotransmitterfreisetzung (Desai *et al.*, 2000; Bommert *et al.*, 1993; Fukuda *et al.*, 2000). Zudem führt die Bindung von Calcium an Synaptotagmin zu einer intramolekularen Assoziation von C₂A und C₂B-Domäne (Garcia *et al.*, 2000).

Des Weiteren interagiert Synaptotagmin calciumabhängig mit Syntaxin, wobei die notwendige Calciumkonzentration abhängig von der Synaptotagminisoform ist, was mit der in verschiedenen Synapsen unterschiedlichen notwendigen Calciumkonzentration in Einklang gebracht wird (Li *et al.*, 1995). Die Wechselwirkung findet vor allem mit der C₂A-Domäne statt, wobei die Anwesenheit der C₂B-Domäne den Effekt verstärkt (Davis *et al.*, 1999). Welchen Einfluß die Syntaxin-Synaptotagmin-Interaktion auf die Neurotransmitterfreisetzung hat ist derzeit unklar (Augustine, 2001). Ebenso interagiert Synaptotagmin mit SNAP-25 und dem ternären SNARE-Komplex (Schiavo *et al.*, 1997; Gerona *et al.*, 2000; Leveque *et al.*, 2000). Dabei zeigt insbesondere das C-terminale Ende von SNAP-25 einen entscheidenden Einfluß sowohl auf die Interaktion von Synaptotagmin mit monomerem SNAP-25 als auch mit dem ternären SNARE-Komplex. In Abhängigkeit von den experimentellen Randbedingungen wurde sowohl eine calciumabhängige Assoziation (Gerona *et al.*, 1999) als auch Dissoziation (Leveque *et al.*, 2000) von Synaptotagmin und SNARE-Komplex gezeigt. Für den Fall der calciumabhängigen Dissoziation von Synaptotagmin vom SNARE-Komplex wäre für Synaptotagmin die Funktion einer inhibitorischen Klemme denkbar, welche die vollständige Ausbildung des sich vom N-terminalen Ende zusammenlagernden Komplexes durch Bindung an dessen C-Terminus bis zum Anstieg des Calciumspiegels verhindert. Auf das Calciumsignal hin würde der Weg für die Ausbildung des vollständig assemblierten SNARE-Komplexes freigegeben, wodurch dann die elektrostatische Abstoßung der zu fusionierenden Membranen überwunden wird und die Fusion zusammen mit der dann einsetzenden Interaktion von Synaptotagmin mit Phospholipiden eingeleitet würde. Im umgekehrten Fall wäre denkbar, dass das auf dem Vesikel lokalisierte Synaptotagmin durch Interaktion mit dem erst partiell assemblierten SNARE-Komplex zu einer Vervollständigung der Ausbildung des SNARE-Komplexes führt (Gerona *et al.*, 2000). Die calciumabhängige Interaktion von Synaptotagmin mit dem C-Terminus von SNAP-25 könnte auch eine Erklärung für den großen Effekt auf die Neurotransmitterfreisetzung sein, welcher durch die proteolytische Abspaltung von C-terminalen SNAP-25-Fragmenten durch einige der Neurotoxine verursacht wird.

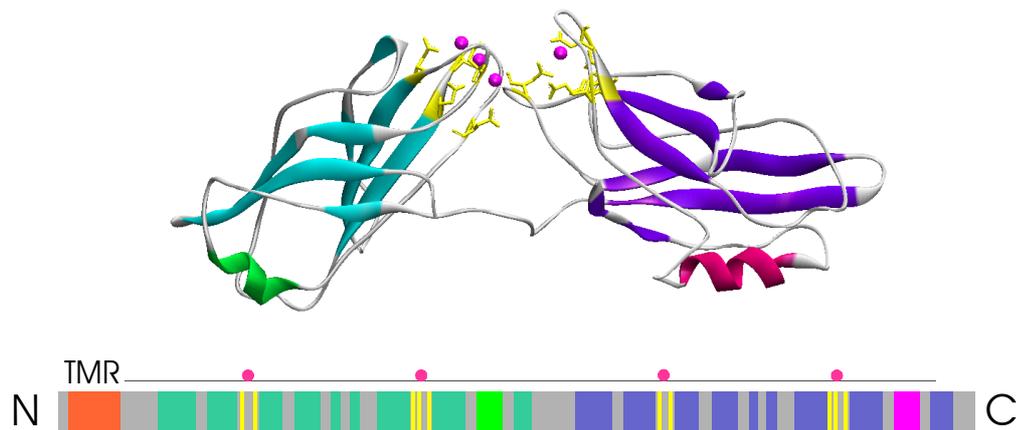


Abbildung 8: Struktur und Domänenorganisation von Synaptotagmin. Synaptotagmin besitzt zwei calciumbindende C2-Domänen, welche mit C2A (türkis/grün) und C2B (violett/magenta) bezeichnet werden. In der Kristallstruktur sind vier Calciumionen (pink) an vorwiegend saure Aminosäuren gebunden (gelb). Die Abbildung wurde unter Verwendung der pdb-Datei 1DQV (Sutton *et al.*, 1999) mit WebLabViewerPro (MSI, San Diego, CA, USA) erstellt.

1.9 Elektrophysiologische Messungen an Chromaffinzellen

Die Sekretion von Catecholaminen und Neuropeptiden in Chromaffinzellen wird wie in Neuronen durch Depolarisation und darauffolgende Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration hervorgerufen. Die Exocytose ist in diesem Zelltyp bereits sehr gut charakterisiert, weshalb die Chromaffinzelle als Modellsystem für die regulierte Sekretion gilt. Elektrophysiologische Messungen an Chromaffinzellen haben gegenüber der Messung in neuronalen Systemen eine deutlich bessere zeitliche Auflösung, da die bei der Exocytose eintretende Oberflächenvergrößerung direkt durch Messung der Kapazität zugänglich ist. Zudem lassen sich Chromaffinzellen nicht nur durch Depolarisation der Plasmamembran stimulieren. Die Stimulation kann, wie bei den in dieser Arbeit vorgestellten Messungen, auch durch eine schrittweise Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration auf Werte von 10-20 μM durch blitzlichtinduzierte Freisetzung des Calciums aus Nitrophenyl-EGTA:Calcium-Komplex erfolgen. Das Ca:NP-EGTA wird dafür zuvor über die Patchpipette in die Zelle dialysiert. Die intrazelluläre Calciumkonzentration kann dabei online mit Hilfe der ebenfalls in die Zellen dialysierten Calcium-sensitiven Farbstoffe Fura-2 und Fura-2/AM gemessen werden. Der Vorteil der Calciumfreisetzung aus komplexiertem Calcium durch Applikation des UV-Blitzes gegenüber der Aktivierung endogener Calciumausschüttung liegt in der definierten, schrittartigen Erhöhung unter Ausschaltung von Effekten, welche durch unterschiedliche Konzentrationen oder Konzentrationsgradienten an Calciummicrodomänen entstehen und welche die Kinetik beeinflussen. Die schnelle Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führt zu einem exozytotischen Burst gefolgt von einer Phase mit verzögerter Sekretion, was die Existenz von zwei Pools exozytosekompetenter Vesikel nahe legt (Heinemann *et al.*, 1994). Elektrophysiologisch lassen sich drei Vesikelpools unterscheiden (Voets *et al.*, 1999), welche am Gesamtprozess der Sekretion beteiligt sind. Die mit der Zellmembran verschmelzenden, exozytosekompetenten Vesikel stammen aus dem

verzögert freigesetzten Pool (engl.: slowly releasable pool; SRP), dessen Vesikel mit einer Geschwindigkeit von etwa 3 Vesikeln pro Sekunde fusionieren, oder aus dem mit einer Geschwindigkeit von 30 Vesikeln pro Sekunde fusionierendem Pool der fusionskompetenten Vesikel (engl.: rapidly releasable pool; RRP). Beide Pools stehen im Gleichgewicht miteinander und werden, von einem dritten, großen Depotpool (UPP; unprimed pool) mit Vesikeln befüllt. Da die Injektion von clostridiellen Neurotoxinen in Nervenenden nicht zu einer Verringerung der Zahl von morphologisch gedockten Vesikeln führt (Hunt *et al.*, 1994), Neurotoxine jedoch die Freisetzung von Neurotransmitter verhindern, wird der SNARE-Komplex zeitlich erst nach dem Dockingprozess benötigt. Von den beiden isomeren Formen des SNARE-Komplexes, *cis* und *trans*, scheint nur der *trans*-SNARE-Komplex fusionskompetent zu sein (Ryan, 1998; Ungermann *et al.*, 1998) und in zwei Formen, dem losen (engl.: loose state) sowie dem festen Zustand (engl.: tight state) zu existieren, welche untereinander im Gleichgewicht stehen. Der „loose state“ repräsentiert dabei einen Neurotoxin-sensitiven, nicht SDS-resistenten Zustand des SNARE-Komplexes, während der SNARE-Komplex im „tight state“ sowohl SDS-resistent als auch insensitive gegenüber Neurotoxinen ist (Rizo and Südhof, 1998; Sutton *et al.*, 1998; Fiebig *et al.*, 1999). Beide Zustände des SNARE-Komplexes lassen sich auch durch Injektion von Neurotoxin oder Antikörper gegen Komponenten des SNARE-Komplexes in Chromaffinzellen mit Hilfe elektrophysiologischer Methoden unterscheiden (Xu *et al.*, 1998 und 1999). Der „loose“ und „tight“ Zustand des SNARE-Komplexes ist in dem Modell der drei Vesikelpools equivalent zum SRP und RRP. So wird durch Abspaltung der letzten neun Aminosäuren von SNAP-25 durch die Injektion von BoNT/A selektiv der „Fast Burst“, welcher die Summation der Fusionsereignisse aus dem RRP repräsentiert, reduziert. Dagegen ist der Slow Burst, welcher die Fusionsereignisse aus dem SRP widerspiegelt, nicht betroffen. Auf molekularer Ebene entspricht dies einer Destabilisierung des „tight state“ und der damit verbundenen Verringerung des RRP (Xu *et al.*, 1998).

1.10 Aufgabenstellung

Der SNARE-Komplex ist essentiell für die Fusion von Phospholipidmembranen bei intrazellulären Transportprozessen und der Sekretion. Dabei übernimmt der SNARE-Komplex die Funktion des Motors, welcher bei Konformationsänderungen frei werdende Energie in mechanische Arbeit umwandelt, die zur Überwindung der zwischen den Lipidoberflächen bestehenden elektrostatischen Abstoßung eingesetzt wird.

Die von Sutton et al. 1998 gelöste Kristallstruktur des neuronalen SNARE-Komplexes zeigt einige strukturelle Besonderheiten auf, welche im Rahmen dieser Arbeit biochemisch untersucht werden sollten. Aus diesen Untersuchungen sollten Rückschlüsse auf die Bedeutung der Strukturelemente für die Funktion des SNARE-Komplexes bei der Membranfusion gezogen werden.

Eine Zielsetzung dieser Arbeit bestand darin, die Bedeutung des zentralen ionischen O-Layers für die Bildung und die α -SNAP/NSF-vermittelte Dissoziation des ternären SNARE-Komplexes aufzuklären. Dazu sollte ein mutierter SNARE-Komplex generiert werden, welcher durch geeignete Punktmutation statt der ionischen Wechselwirkungen des O-Layers lediglich hydrophobe Wechselwirkungen besitzt, dessen Gesamtstruktur jedoch durch die Mutationen möglichst unbeeinflusst ist. Der Einfluss der Mutation auf die Integrität der Struktur des ternären SNARE-Komplexes sollte dabei zunächst durch CD-Spektroskopie und Analyse des Schmelzverhaltens in Gegenwart von Detergenz untersucht werden. Durch partiellen Proteaseverdau von mutiertem SNARE-Komplex sollte anschließend überprüft werden, ob sich die einzelnen Helices des SNARE-Komplexes auch ohne die zentrale ionische Wechselwirkung im O-Layer sich korrekt zusammenlagern.

Durch Mutation von Oberflächenaminoacidsollten Bereiche, welche in der Kristallstruktur des SNARE-Komplexes Strontiumionen binden und daher als potentielle Bindungsstellen für divalente Kationen gelten, untersucht werden. Auch hier sollte mittels CD-Spektroskopie und Stabilitätsanalyse zunächst ein negativer Einfluss der Mutationen auf die Komplexstruktur ausgeschlossen werden. Bindungsstudien von α -SNAP am ternären SNARE-Komplex sowie Dissoziation durch α -SNAP/NSF sollten den Effekt der Oberflächenmutationen auf Veränderungen im Bindungsverhalten und Funktionalität des Komplexes zeigen. Durch Gleichgewichtsdialyse von rekombinantem SNARE-Komplex in Gegenwart von Phospholipiden und Calcium-45 sollte bestimmt werden, ob der SNARE-Komplex selber Calciumionen bindet und somit als Calciumrezeptor fungieren kann.

Der in vivo-Effekt der Mutationen an einzelnen SNARE-Proteinen sollte in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Neher vom Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen elektrophysiologisch an Chromaffinzellen des Rindes charakterisiert werden. Dazu sollten die mutierten Gene der SNARE-Proteine in Plasmide kloniert werden, welche die Gewinnung von rekombinantem Semliki-Forest Virus erlaubten.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Materialliste

2.1.1 Reagenzien

1,4-Piperazindiethansulfonsäure (PIPES)	Boehringer Mannheim
10x Transkriptionspuffer	Boehringer Mannheim
2,5- Diphenyloxazol (PPO)	New England Nuclear
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris)	Merck
2-Propanol, p. a.	Merck
³⁵ S-Methionin	Amersham
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES)	Sigma
4-Morpholinpropansulfonsäure (MOPS)	Roth
8-Hydroxychinolin	Merck
Aceton, reinst	Riedel-DeHaën
Acrylamid 2 x, research grade	Serva
Aminosäuremix ohne Methionin	Promega
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma
Ampicillin, Natriumsalz	Sigma
Bacto Pepton, enzymatisch verdaut	Difco Laboratories
Bacto-Agar	Difco Laboratories
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories
Benzamidin	Sigma
Blue Dextran 2000	Pharmacia Biotech
β-Mercaptoethanol, zur Synthese	Merck
Bromphenolblau, Natriumsalz reinst	Serva
Calciumchlorid, getrocknet	Merck
Cap-Struktur-Analagon 7m-3'Gppp5'G	Biolabs
Chloroform, p. a., stabilisiert mit ca. 0,75 % Ethanol	J. T. Baker
Coomassie Brilliant Blue R 250, für die Elektrophorese	Merck
dATP	Boehringer Mannheim
dCTP	Boehringer Mannheim
dGTP	Boehringer Mannheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Serva

di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
di-Natriumhydrogenphosphat, wasserfrei, p. a.	Merck
Dithiothreitol	Biolabs
dTTP	Boehringer Mannheim
Essigsäure, reinst	Riedel-DeHaën
Ethanol, p. a.	J. T. Baker
Ethidiumbromid	Boehringer Mannheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Dinatriumsalz, p. a.	Serva
Ficoll 400	Pharmacia Biotech
Glutathion Sepharose® 4B	Parmacia Biotech
Glutathion, reduziert	Sigma
Glycerin, doppelt destilliert, p. a.	Serva
Guanidiniumchlorid <i>Ultra Pure</i>	ICN Biomedicals
Harnstoff, p. a.	Roth
Hefeextrakt, für die Bakteriologie	Roth
Imidazol	Merck
Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid (IPTG), dioxanfrei	Merck
Kaliumchlorid, p. a.	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat, p. a.	Merck
Kanamycin, 781 µg/mg Pulver	USB
Leupeptin	Boehringer Mannheim
MDY 64, yeast vacuole membrane marker	Mo Bi Tec
Methanol, p. a.	J. T. Baker
m-Kresol	Merck
N, N, N', N', Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma
N',N'-Methylen-Bisacrylamid, 2x krist. research grade	Serva
Natriumacetat, wasserfrei, p. a.	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumcitrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Natriumhydroxid	Merck
Natriumhydroxid-Lösung, 1 N, für Titration	Merck

Nonidet P-40	Boehringer Mannheim
Pepstatin A	Sigma
Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut	Roth
Phenylmethylylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Polyethylenglycol 4000	Merck
p-Phenylendiamin	Sigma
rATP	Boehringer Mannheim
rCTP	Boehringer Mannheim
Reticulocytenlysat	Promega
rGTP	Boehringer Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA), lyophilisiert, pH 7,0, standard grade	Serva
Rotiszint eco plus	Roth
rRNasin	Promega
rRNasin Ribonucleaseinhibitor	Promega
rUTP	Boehringer Mannheim
Salzsäure 37% p.a.	Merck
Salzsäure, 1 N, für Titration	Merck
SeaKem ME Agarose, reines Agarosepulver aus Agar	FMC BioProducts
Sorbitol	Sigma
Triton [®] X-100, für Szintillationstechnik	Serva
Whatman-3MM-Papier	Whatman
Xylen Cyanol FF	Sigma
Calciumchlorid Suprapur 99.995%	Merk
PEO-Iodoacetyl-Biotin	Pierce
Lubrol	Sigma
Trypsininhibitor (aus Sojabohnen)	Boehringer Mannheim
Chelex 100	Sigma
EGTA Rotipuran	Roth
Tween-20	

2.1.2 Systeme

QIAquick Gel-Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR-Purification Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
Anionenaustauschersäule tip-100	Qiagen
BigDye RR Terminator AmpliTaq	PE Applied Biosystems
Thrombin Cleavage and Capture Kit	Novagen

2.1.3 Standards

DNA-Standard:

Lambda DNA/ <i>EcoRI</i> / <i>HindIII</i>	eigene Herstellung
Größen: 21226, 5148, 4973, 4277, 3530, 2027, 1904, 1580, 1330, 983, 831, 564 und 125 bp	

Proteinstandards:

SDS-PAGE Standard, low range (14,4 kDa - 97,4 kDa)	Biorad
--	--------

Molekulargewicht	Protein	Herkunft
97,4 kDa	Phosphorylase B	Kaninchenmuskel
66,2 kDa	Serumalbumin	Rind
45 kDa	Ovalbumin	Hühnereiweiß
31 kDa	Carboanhydrase	Rind
21,5 kDa	Trypsininhibitor	Sojabohne
14,4 kDa	Lysozym	Hühnereiweiß

SDS-PAGE Standard, LMW (14,4 kDa - 97,4 kDa)

MBI Fermentas

Molekulargewicht	Protein	Herkunft
97,4 kDa	β -Galactosidase	<i>E.coli</i>
66,2 kDa	Serumalbumin	Rind
45 kDa	Ovalbumin	Hühnereiweiß
35 kDa	Lactat Dehydrogenase	Schweinemuskel
25 kDa	Trypsininhibitor	<i>E.coli</i>
18,4 kDa	β -Lactoglobulin	Kuhmilch
14,4 kDa	Lysozym	Hühnereiweiß

¹⁴C-Molekulargewichtsstandard (2,35 kDa-30 kDa)

Amersham

Molekulargewicht	Protein
30 kDa	Carboanhydrase
21,5 kDa	Trypsininhibitor
12,5 kDa	Cytochrom C
6,5 kDa	Aprotinin
3,4 kDa	Insulin B

LMW-Gel Filtration Calibration Kit

Pharmacia Biotech

Molekulargewicht	Protein
67 kDa	Albumin
43 kDa	Ovalbumin
25 kDa	Chymotrypsin
13,7 kDa	Ribonuclease A

HMW-Gel Filtration Calibration Kit

Pharmacia Biotech

Molekulargewicht	Protein
669 kDa	Thyroglobulin
440 kDa	Ferritin
232 kDa	Catalase
158 kDa	Aldolase

2.1.4 Enzyme

Restriktionsenzyme: <i>Hind</i> III, <i>Bam</i> HI, <i>Bcl</i> I, <i>Bss</i> HIII, <i>Cla</i> I, <i>Dra</i> I, <i>Eco</i> RV, <i>Hpa</i> I, <i>Nae</i> I, <i>Nco</i> I, <i>Nde</i> I, <i>Pst</i> I, <i>Sac</i> II, <i>Spe</i> I, <i>Stu</i> I	Biolabs
<i>Kpn</i> I, <i>Hind</i> II, <i>Not</i> I, <i>Sac</i> I, <i>Sal</i> I, <i>Eco</i> RI, <i>Eco</i> 47 III, <i>Xba</i> I, <i>Xho</i> I	Boehringer Mannheim
<i>Bst</i> XI, <i>Mfe</i> I, <i>Sma</i> I	MBI Fermentas
T4-DNA-Ligase (400 U/μl)	Biolabs
Alkalische Phosphatase aus Kälberdärmen (1 U/μl)	Boehringer Mannheim
SP6-RNA-Polymerase (20 U/μl)	Boehringer Mannheim
T7-RNA-Polymerase (20 U/μl)	Promega
T3-RNA-Polymerase (20 U/μl)	Boehringer Mannheim
<i>pfu</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/μl)	Boehringer Mannheim
Klenow-Fragment	Boehringer Mannheim
T4-Polynukleotidkinase	Biolabs
Proteinase K	Boehringer Mannheim
Thrombin (aus humanem Serum)	Boehringer Mannheim
Trypsin	Boehringer Mannheim
biotinyliertes Thrombin (0,6 U/μl)	Novagen

2.1.5 Häufig verwendete Puffer und Medien

PBS	140 mM NaCl ₂ 7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ autoklaviert
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 1 mM EDTA, pH 7,5

2YT-Platten (1l)	16 g Pepton 10 g Hefeextrakt 5 g Natriumchlorid 15 g Bacto-Agar autoklaviert
2YT-Medium (1l)	16 g Pepton 10 g Hefeextrakt 5 g Natriumchlorid autoklaviert
LB-Medium (1l)	10 g Pepton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl autoklaviert
TAE-Puffer	40 mM Tris 0,11 % (v/v) Essigsäure 1 mM EDTA pH 8,0
TBE-Puffer	90 mM Tris 90 mM Borsäure 2 mM EDTA pH 8,0

2.1.6 Bakterien

E. coli TG1:

Dieser Bakterienstamm wird zur Expression des rekombinanten SNARE-Proteins Synaptobrevin-2-His₆ verwendet. *E. coli* TG1 trägt das *lacI*^q-Gen. Dieses hat einen mutierten Promotor, der zur Produktion von zehnmal mehr *lac*-Repressor als beim Wildtyp führt. Der *lac*-Repressor bindet an den *lac*-Promotor und verhindert so die Proteinexpression. Durch Zugabe von IPTG zum Medium wird der *lac*-Repressor gebunden und löst sich vom *lac*-Promotor. Dadurch wird eine hoch effiziente Proteinexpression ermöglicht. Geringe IPTG-Mengen können den Gehalt an *lac*-Repressor so reduzieren, dass Transkription auf niedriger Stufe stattfindet. Dieses Prinzip erlaubt eine gute Kontrolle über den Grad der Proteinexpression.

Genotyp: F' traD36 *lacI*^q Δ(*lacZ*)M15 proA⁺B⁺/supE, Δ(*hsdM-mcrB*)5 (r_K⁻ m_K⁻ McrB⁻) thi Δ(*lac-proAB*)

E. coli BLR und BLR (DE3):

E. coli BLR und BLR (DE3) besitzen keine *lon*- und *ompT*-Proteasen und sind zudem recA⁻, wodurch die Wahrscheinlichkeit von homologen Rekombinationsereignissen reduziert ist. Der Bakterienstamm BLR (DE3) besitzt zudem eine chromosomale Kopie des T7-RNA-

Polymerase-Gens des Phagen λ DE3. Das T7-RNA-Polymerase-Gen wird durch den *lacUV5* Promotor kontrolliert und ist somit durch IPTG induzierbar. *E. coli* BLR (DE3) wird zur Expression von auf pET-Vektoren codierten Proteinen verwendet. *E. coli* BLR wird zur Expression von besonders proteolyseempfindlichen Proteinen verwendet. Beide Stämme tragen zudem ein Tetracyclinresistenzgen.

Genotyp BLR: $F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm \Delta(srl-recA)306::Tn10(tet^R)$

Genotyp BLR (DE3): $F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm \Delta(srl-recA)306::Tn10(tet^R)$ (DE3)

E. coli M 15 pREP4:

E. coli M 15 pREP4 wird für die Expression von rekombinantem SNAP-25-His₆ verwendet. *E. coli* m15 pREP4 basiert auf dem *E. coli*-Stamm K-12. Die Zellen tragen jedoch das Plasmid pREP4, welches für den *lac*-Repressor codiert, wodurch die für die effiziente Repression von auf pQE-Vektoren codierten Genen notwendige hohe Konzentration an *lac*-Repressor zur Verfügung steht. Das Plasmid pREP4 trägt den Selektionsmarker APH.

Genotyp: $Nal^S Str^S rif^S, lac^- ara^- gal^- mtl^- F^- recA^+ uvr^+$

E. coli JM110: $F' traD36 lacI^q \Delta(lacZ)M15 proA^+ B^+ /rpsL (Str^r) thr leu thi lacY galK galT ara fhuA dam dcm glnV44 \Delta(lac-proAB)$

E. coli DH5 α : $F' /endA1 hsdR17 (r_K^- m_K^+) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^r) relA1 \Delta(lacIZYA-argF)U169 deoR (\phi80dlac\Delta(lacZ)M15)$

E. coli HB101:

Dieser Stamm wird zur Expression von GST-Syntaxin verwendet. HB 101 ist *recA*⁻ und verhindert somit homologe Rekombination.

Genotyp: $F^- \Delta(gpt-proA)62 leu supE44 ara14 galK2 lacY1 \Delta(mcrC-mrr) rpsL20 (Str^r) xyl-5 mtl-1 recA13$

2.1.7 Plasmide

pSP73:

Größe: 2464 bp

pSP73 (Promega) ist ein Standardklonierungsvektor, der sich auch für *in vitro* Transkriptionen eignet. RNA kann von einem Strang als Matrize durch die SP6 RNA-Polymerase, vom anderen durch die T7 RNA-Polymerase synthetisiert werden. Zur Selektion von transformierten Bakterien besitzt das Plasmid das β -Lactamasegen Amp^r.

Auf diesem Plasmid basieren die für Synaptobrevin 2 und davon abgeleitete Deletions- und Punktmutanten codierenden Plasmide für die *in vitro* Transkription / Translation.

pGEX-KG:

Größe: 5006 bp

Das *E. coli*-Plasmid basiert auf dem Expressionsvektor pGEX-2T (Pharmacia Biotech), dessen Polylinkerregion um 58 bp erweitert wurde (Guan und Dixon, 1991).

Gene, die in dieses Plasmid hineinkloniert werden, werden als Fusionsproteine exprimiert, die am N-Terminus die Glutathion S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* tragen. Glutathion S-Transferase ermöglicht eine schnelle Aufreinigung der Proteine über eine Affinitäts-Chromatographiesäule aus Glutathionsepharose. Zwischen der Glutathion S-Transferase und dem fusionierten Protein befinden sich eine Thrombinspaltstelle und eine glycinreiche Aminosäuresequenz. Letztere sorgt dafür, dass sich die beiden Proteine des Fusionsproteins unabhängig voneinander falten können. Durch Thrombinspaltung kann das rekombinante Protein nach der Aufreinigung freigesetzt werden. Die Expression des Fusionsproteins steht unter der Kontrolle des *tac*-Promotors und des *lacI^q*-Gens, das für einen mutierten *lac*-Repressor codiert. Dadurch wird eine gezielte Induktion der Expression durch Zugabe von IPTG zum Medium möglich. Als Selektionsmarker verfügt pGEX-KG über das β -Lactamasegen *Amp^r*.

pBN10:

Dieses für SNAP-25A-His₆ codierende Plasmid wurde von T. Binz zur Verfügung gestellt. Es basiert auf dem Vektor pQE3 von Qiagen, wobei jedoch die Ribosomenbindungsstelle (RBS) des Vektors pQE3 nicht mehr enthalten ist. Dazu wurde das SNAP-25A-Gen mittels PCR amplifiziert, wobei durch einen entsprechend designten 5'-Primer eine neue RBS sowie eine *EcoR* I-Schnittstelle angefügt wurde. Das so erhaltene Insert wurde *EcoR* I / *Sal* I in den *EcoR* I / *Sal* I geschnittenen Vektor kloniert, wobei die RBS des Vektors herausgeschnitten wurde. Auf diesen Vektor basieren alle Plasmide für die Expression von SNAP-25 Punkt- und Deletionsmutanten.

pET28a:

pET28a (Novagen) ist ein Standardklonierungsvektor, der für Proteinexpression und *in vitro* Transkription geeignet ist. Die Expression des rekombinanten Proteins wird durch den T7-Promotor kontrolliert. Die Expression des Zielproteins wird durch Repression des T7-RNA-Polymerasegens im Bakterienstamm BLR (DE3) kontrolliert. Die Expression von T7-RNA-Polymerase ist durch IPTG induzierbar. Dadurch eignet sich dieses Vektorsystem besonders zur Expression rekombinanter Proteine, die auf Grund ihrer Toxizität normalerweise schlecht oder überhaupt nicht exprimiert werden. pET28a enthält ein Kanamycin-Resistenzgen als Selektionsmarker.

pET15b:

Das Plasmid pET15b (Novagen) besitzt im Gegensatz zu pET28a als Selektionsmarker ein Ampicillin-Resistenzgen und codiert für einen N-terminalen His₆-tag. Zwischen dem His₆-tag und dem inklonierten Gen codiert pET15b zudem eine Thrombinspaltungssequenz, wodurch der His₆-tag durch Thrombin abgespalten werden kann.

Synaptobrevin-2-His₆

Dieses auf das pET-Vektorsystem basierende Plasmid wurde von D. Fasshauer (Göttingen) zur Verfügung gestellt. Das Plasmid enthält die codierende Sequenz des Synaptobrevin 2 Gens (*rattus norvegicus*), dessen Startcodon Teil einer *NdeI*-Restriktionsschnittstelle ist. Von diesem Vektor leiten sich alle Synaptobrevin 2 Punkt- und Deletionsmutanten mit C-terminalem His₆-tag ab.

His₆-Synaptobrevin-2 (AS 1-97)

Dieser Vektor wurde durch Ligation des *NdeI*/*BclI*-geschnittenen Synaptobrevin-2-Gens sowie der aus den kinasierten Stop-Oligonukleotiden bestehenden Stop-Oligokassette in den *NdeI*/*BamHI*-geschnittenen Vektor pET15b erhalten. Der durch den *BamHI*-Schnitt entstehende Überhang wurde mit Klenow-Fragment zum Erzeugen eines glatten Endes aufgefüllt. Alle weiteren Punktmutanten von His₆-Synaptobrevin-2 (AA1-97) basieren auf diesem Plasmid.

His₆-Synaptobrevin-2-StreptagII

Dieses Plasmid codiert für das Synaptobrevin-2-Gen mit N-terminalem His₆-tag und C-terminalem StreptagII[®]. Dazu wurde das Synaptobrevin-2-Gen mittels *NdeI*- und *EcoRI*-Restriktionsschnitt aus dem Plasmid Synaptobrevin-2-His₆ isoliert und zusammen mit der für den StreptagII kodierenden Oligokassette (Syb2 Strep CS + Syb2 Strep NCS) in den *NdeI*/*BamHI*-geschnittenen Vektor pET15b ligiert.

His₆-Syntaxin (AS 180-262)

Dieses Plasmid codiert für den C-terminalen Bereich von Syntaxin 1A mit den Aminosäuren 180 bis 262. Es basiert auf dem Plasmid pET15b, in dessen *NdeI*-*BamHI*-geschnittenen Polylinker das mit Hilfe der Primer SyxCT Fw und SyxCT Rev durch PCR am Plasmid pTW12 generierte Fragment inseriert wurde.

pBluescript SK +/-:

Größe: 2958 bp

pBluescript SK +/- (Stratagene) ist ein Standardtranskriptionsvektor, dessen Polylinker von einem T7- sowie T3-Promoter flankiert ist. Je nach Orientierung des Gens kann RNA entweder durch T7- oder T3-RNA-Polymerase synthetisiert werden. Als Selektionsmarker verfügt der Vektor über ein β -Lactamasegen.

pGEX-KG-Syntaxin:

Dieses *E. coli*-Plasmid beruht auf dem Plasmid pGEX-KG und codiert für das Fusionsprotein GST-Syntaxin. Das Plasmid wurde von T. Binz zur Verfügung gestellt.

pQE5:

Größe: 3415 bp

Das Plasmid pQE5 (Qiagen) ist ein Standardexpressionsvektor mit einer Größe von 3415 bp. In pQE-Vektoren klonierte Gene werden durch einen T5-Promotor, welcher von der *E. coli*-

RNA-Polymerase erkannt wird, kontrolliert. Zur effizienten Repression des T5-Promotors besitzt der pQE5-Vektor zwei *lac*-Operatoren, an welche der Repressor binden kann. Durch IPTG wird der *lac*-Repressor inaktiviert und die Expression des rekombinanten Proteins induziert. Für eine hohe Translationsrate besitzen die pQE-Vektoren eine synthetische ribosomale Bindungsstelle mit dem Startcodon vor dem Polylinker. Die Vektoren pQE3, pQE4 und pQE5 unterscheiden sich lediglich durch den Leserahmen des Polylinkers ab dem Startcodon. Alle drei Vektoren besitzen ein β -Lactamasegen als Selektionsmarker.

pTW12 und pTW19:

Die Plasmide pTW12 und pTW19 wurden von J. Rothman (New York) zur Verfügung gestellt. Beide Plasmide basieren auf einem modifizierten pET-Vektor und kodieren für Syntaxin 1A (pTW12) bzw. Syntaxin 1A (AA 1-267) (pTW19) mit C-terminalem His₆-tag. Beide tragen als Selektionsmarker ein Kanamycin-Resistenzgen. Die Syntaxin-Q226L-Punktmutanten mit His₆-tag basieren auf diesen beiden Plasmiden.

pSCA1 und pSFV1:

Die Plasmide pSCA1 und pSFV1 (Gibco BRL, Bethesda, MD) sind Teil eines auf dem Replicon des Semliki Forest Virus (SFV) basierenden Expressionssystem, welches insbesondere für die Überexpression von Genen in Neuronen (Liljeström und Garoff, 1991; DiCiommo und Bremner, 1998) und chromaffinen Zellen (Ashery *et al.*, 1999) geeignet ist. Die Plasmide pSCA1 und pSFV1 enthalten das Genom des SFV bis auf den die Strukturproteinecodierenden Bereich, welcher durch einen multiplen Klonierungsbereich ersetzt wurde. Beide Plasmide enthalten einen für die Replikation in *E. coli* notwendigen *ori* sowie ein β -Lactamasegen als Selektionsmarker. Das Plasmid pSFV1 enthält stromaufwärts vom SFV-Genom einen Promoter für SP6-RNA-Polymerase, wodurch nach Linearisierung des Plasmids und *in vitro* Transkription gecappte Replicon RNA (re-RNA) einschließlich des Verpackungssignals ψ erhalten wird. Das Plasmid pSCA1 enthält dagegen anstatt des SP6-Promoters einen CMV IE (cytomegalovirus immediate early) Enhancer/Promoter sowie einen Promoter für T7-RNA-Polymerase, wodurch re-RNA sowohl durch *in vitro* Transkription als auch durch *in vivo* Transkription nach Elektroporation in BHK-Zellen (baby hamster kidney) möglich ist. Aufgrund der fehlenden Strukturproteine kommt es nach Transfektion von Zellen alleine mit re-RNA oder pSCA1 nicht zur Produktion und Freisetzung von Viruspartikeln. Für die Produktion von Viruspartikeln ist die co-Transfektion von reRNA des Plasmids pSFV-Helper2 oder des pSCA-Helper-Plasmids notwendig, welche die SFV-Strukturproteine codieren. Die Helfer-RNA enthält jedoch kein Verpackungssignal, weshalb der die Strukturgene des Virus codierende Teil des Virusgenoms nicht mehr in dem gebildeten Virus enthalten ist. Die so erhaltenen SFV-Partikel sind daher zwar infektiös, können aber aufgrund der fehlenden Gene für die Strukturproteine nicht replizieren und neue Viruspartikel freisetzen. Zudem enthält das Plasmid pSFV-Helper2 drei Punktmutationen im Bereich des Hüllproteins p62 (Berglund *et al.*, 1993), welches für eine effiziente Infektion proteolytisch aktiviert werden muß, wodurch die freigesetzten Viruspartikel erst nach Behandlung mit Chymotrypsin infektiös werden.

pSCA1-GFP-SNAP-25 und pSFV1-GFP-SNAP-25:

Zur Expression von GFP-SNAP-25 in chromaffinen Zellen wurde der multiple Klonierungsbereich der beiden Vektoren pSCA1 und pSFV1 durch einsetzen einer Oligonukleotidkassette in die *XmaI*-Schnittstelle um eine singuläre *ClaI* und *BssHI*-Schnittstelle erweitert. Der für GFP-5 kodierende Bereich (cDNA wurde von G. Hobom, Giessen, zur Verfügung gestellt) wurde durch PCR mit einer 5'-*BglI* und 3'-*BamHI*-Schnittstelle versehen, entsprechend geschnitten und in die modifizierten, *BamHI*-geschnittenen Vektoren eingesetzt. Nach Überprüfung der richtigen Orientierung des GFP wurde der codierende Bereich von SNAP-25 aus dem Plasmid pBN10 bzw. den darauf basierenden Punktmutanten mit den Primern pSFV-SNAP-25 Fw und pSFV-SNAP-25 Rev amplifiziert, mit *BamHI* und *BssHII* geschnitten und in die *BamHI/BssHII*-geschnittenen Vektoren eingesetzt. Alle weiteren Punkt- und Deletionsmutanten wurden entsprechend kloniert bzw. basieren auf diesen beiden Plasmiden.

pcDNA3-ECMV-IRES-PV-IRES-EGFP:

Dieses von J. Rettig (Göttingen) zur Verfügung gestellte Plasmid enthält die interne Ribosomen Eintrittsstelle (IRES) des Cytomegalovirus gefolgt von der Poliovirus IRES und dem Gen für EGFP.

pSFV1-Synaptobrevin-2-PV-IRES-EGFP:

Für die Expression von Synaptobrevin und Synaptobrevin-Punktmutanten wurde das Gen durch PCR mit den Primern Syb pSFV Rev und Syb pSFV Fw an dem Plasmid Synaptobrevin-2-His₆ amplifiziert und über die dabei generierten *BamHI*- und *EcoRI*-Schnittstellen in das Plasmid pcDNA3-ECMV-IRES-PV-IRES-EGFP ligiert. Die nicht benötigte ECMV-IRES wurde durch Religation des so erhaltenen Plasmids nach Restriktionschnitt mit *EcoRI*, *EcoRV* und Auffüllen des *EcoRI*-Überhangs mit Klenow-Fragment entfernt. Aus dem so erhaltenen Plasmid wurde das für Synaptobrevin-2-PV-IRES-EGFP kodierende Fragment durch *NotI*-Schnitt, Klenow-fill-in und *BamHI*-Schnitt isoliert und in das *BamHI*-/*SmaI*-geschnittene Plasmid pSFV1 ligiert. Das so erhaltene Plasmid kann für die Überexpression von Synaptobrevin-2 unter Kontrolle von EGFP ohne Risiko des Einflusses einer C- oder N-terminalen Fusion an EGFP verwendet werden.

2.1.8 Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')
Syb pSFV Rev	GGAATTCGCGCGCTTAAGTGCTGAAGTAAACGATGAT
Syb pSFV Fw	CGCGGATCCGCCACCATGTCCGGCTACCGCTGCC
Syb SET-A-Fw	ATATATGGCGCCGCCAGTTTGCAGCAAGTGCAGCCAA
Syb SET-A Rev	TATATTGGCGCCTGCCTGGAGGGCATCT
XmaI ClaI BssHII XmaI (Fw)	CCGGATCGATAGGCGCGCAGAC
XmaI ClaI BssHII XmaI (Rev)	CCGGGTCTGCGCGCTATCGAT
pSFV Fw seq	GTCCTAGATTGGTGCCTTAA
SNAP D58A Fw	TTAATGCGCGCTCGAAGAAGGCATGAACC
SNAP D58A Rev	ATATAGCGCGCGAGTTGTTTCGCCTTGCTC
Stop-Oligo	TAAGCTAATTTAAATTAGCTTA
Seq pSFV Rev	GTAAAACGTTTTCGTAGGG
SP-2	CGCGGGCGCCACCGCGGGCCG
3'-SNAP-25	CTCTCGTCGTCGACGTTAACACCACTTCCCAGCATCTTTGTTGCAC
3RSB2	CACAAAGCTTGTTAACACCCCAATCACTCCCAGGATGATCATCAT
SNAP-25 CTF AA93-	CTCTGGATCCATGAACAAGTTAAATCCAGTGATGC
SNAP-25 Rev SCA-1	CCGGAATTCGCGCGCTTAACCACTTCCCAGCATCTTT
SybR56L Fw	TCTGGAGCTCGACCAGAAGCTATCGG
Syb R56L Rev	TGGTCGAGCTCCAGGACCTTGTCC
SNAP-25 Glu 170A	TGGCTCTAGACATGGGCAATGCGATCGATACCCAGAATC
SNAP-25 Q177A Fw	AATGAGATCGATACCCAGAATCGCGCGATCGACAGG
SNAP 25 Cla I Rev	TTCGCGGTATCGATCTCATTGCCCATGT
rSyx 1-0	TGGAGAGCCTAGGGGAGATGATTGAC
rSyx 2-0	CATCTCCCCTAGGCTCTCCACCAGCA
SNAP 25 BamHI 3'	TCTGGATCCTTAACCACTTCCCAGCATCTTTGT
SNAP 25 NdeI	GATAATACATATGGCCGAAGACGCGGA
Gln Leu SNAP 25 Fw	AATGAAATCGATACCCTGAATCGCCAGATCGAC
Gln 53 Leu SNAP 25 Fw	GTTGGATGAGCTCGGCCGAACAA
Gln 53 Leu SNAP 25 Rev	TTGTTCCGCGAGCTCATCCAAC
rSyb4	CTGGAGATCGATCAGAAGCTATCGG
rSyb5	CTTCTGATCGATCTCCAGGACCTTG
pGex Rev (seq)	CATCACCGAAACGCGCGAGG
pGex Fw (seq)	
GFP-500C	CCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAG
GFP-500N	TTGTGCCCATTAACATCACC
SNAP-25 pSFV Fw	TCTGGATCCTATGGCCGAAGACGCGGA
SNAP-25 pSFV Rev	TCTATCGATTTAACCACTTCCCAGCATCTTTGT
SNAP-25 Rev (delta9)	TCTATCGATTTATTGGTTGGCTTCATCAATTCTG
GLN53LEU SNAP 25 Fw	GTTGGATGAGCTCGGCCGAACAA
GLN53LEU SNAP 25 Rev	TTGTTCCGCGAGCTCATCCAAC
SNAP-25 Q177 Fw	AATGAGATCGATACCCAGAATCGCGCGATCGACAGG
SNAP-25 Glu170 Ala	TGGCTCTAGACATGGGCAATGCGATCGATACCCAGAATC
SNAP-25 C/F	CTCTGGATCCATGAACAAGTTAAATCCAGTGATGC
SNAP-25 CTF AA93-	CAGTGGTGGCTTCATCC
Syb pSFV Rev	GGAATTCGCGCGCTTAAGTGCTGAAGTAAACGATGAT
Syb pSFV Fw	CGCGGATCCGCCACCATGTCCGGCTACCGCTGCC
Seq PV-IRES Rev	TCTGGGGTGGGTACAACC
Ex-2	TAGGCGTATCACGAGGC

Ex-3	TGAGGTCATTACTGGATCTA
Ex-4	TGGCAGCAGCCAACTCAGC
SP6-Primer	CGATTTAGGTGACACTATAG
T7-Primer	TAATACGACTCACTATAGGG
Syb2 Strep CS	AATTCGGCTTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAATAG
Syb2 Strep NCS	GATCCTATTTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAAGCCG
SyxCT Fw	GGAATTCCATATGGGGATCATCATGGACTCCA
SyxCT Rev	TATGGATCCTTAGCGTGCCTTGCTCTGGTA

2.1.9 Antikörper

Bezeichnung	Eingesetzte Verdünnung	Antigen	Hersteller
α -Synaptobrevin2	1:1000		Synaptic Systems
Klon 69.1		Synaptobrevin 2	
α -SNAP-25 Klon 71.2	1:1000	SNAP-25	Synaptic Systems
HPC-1	1:2000	Syntaxin 1A	Sigma
α -GFP (monoklonal)	1:1000	GFP	Boehringer Mannheim
α -Synaptotagmin I	1:1000	Synaptotagmin I	Synaptic Systems
α -Maus-POD	1:1000	Maus Ig	Sigma

2.2 Methoden

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Durch die Polymerase-Kettenreaktion oder kurz PCR (**p**olymerase **c**hain **r**eaction) lassen sich beliebige Teile einer Nukleinsäuresequenz einer Matrize *in vitro* selektiv vervielfältigen. Dazu werden zwei chemisch synthetisierte, zum Randbereich des zu amplifizierenden Genbereiches komplementäre Oligonukleotide, die sogenannten Primer, im Überschuß zur Matrize gegeben. Durch Hitzedenaturierung der doppelsträngigen DNA und anschließendes Abkühlen auf die Anlagerungstemperatur erhält man einzelsträngige DNA, die nur im Primerbereich doppelsträngig ist. Dieser anhybridisierte, doppelsträngige Bereich dient der DNA-Polymerase als Startpunkt für die weitere Polymerisation des komplementären DNA-Stranges. Die Polymerisation erfolgt dabei vom 5'- zum 3'-Ende. Die neu synthetisierten DNA-Doppelstränge werden im nächsten Schritt durch Erhitzen wieder zu Einzelsträngen denaturiert, an die wiederum die Primer hybridisieren können. Ausgehend von einem DNA-Doppelstrang erhält man nach n durchgeführten PCR-Reaktionszyklen 2^n Doppelstränge. Für die DNA-Polymerisation wird die bis 95°C hitzestabile *Pfu*-DNA-Polymerase (Boehringer) mit einem Temperaturoptimum von 72°C verwendet. Die geklonte *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* zeichnet sich gegenüber der häufig verwendeten *Taq*-DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* durch eine höhere Lesegenauigkeit aus. Durch entsprechend synthetisierte, teilweise nichtkomplementäre Primer können durch PCR auch DNA-Fragmente mit Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen im 5'- und 3'-Bereich generiert werden, wodurch diese nach einem entsprechenden Restriktionsverdau in einen Vektor ligiert werden können. Zudem können die 5'- und 3'-Enden des amplifizierten Genes um nicht komplementäre Sequenzen erweitert werden.

Ein typischer Ansatz für eine PCR-Reaktion sieht wie folgt aus:

- 10 µl 10x *Pfu*-Polymerase-Puffer (Boehringer Mannheim)
- 2 µl dNTP-Mix (jeweils 10 mM)
- 0,6 µl 5'-Primer (50 pmol)
- 0,6 µl 3'-Primer (50 pmol)
- 1 µl Template-DNA (auf 5 fmol verdünnt)
- mit autoklaviertem ddH₂O auf ein Volumen von 100 µl auffüllen

Der gesamte Ansatz wird zur vollständigen Denaturierung der Template-DNA für 15 Minuten auf 95 °C erhitzt und nach Zugabe von 0,7 µl (2,5 U/µl) *Pfu*-DNA-Polymerase wird in einem Hybaid TouchDown Thermocycler (MWG-Biotech) mit beheiztem Deckel folgendes Temperaturprogramm durchlaufen:

- | | | | |
|-------------|-----------|------|------------------------------------|
| 1. Schritt: | 1 Minute | 94°C | Denaturierung doppelsträngiger DNA |
| 2. Schritt: | 2 Minuten | 54°C | Hybridisierung der Primer |
| 3. Schritt: | 2 Minuten | 72°C | Polymerisation |

Die Schritte 1 bis 3 werden 25 mal wiederholt.

Anschließend wird die Temperatur von 72°C für 10 Minuten gehalten, um unvollständig polymerisierte Stränge zu vervollständigen. Am Programmende wird die Probe auf 4°C abgekühlt. Als Kontrolle dient ein gleichbehandelter PCR-Ansatz, der jedoch keine Template-DNA enthält.

Die Reaktion wird im Anschluß auf einem Agarosegel (Kap. 2.2.5.) analysiert.

10x *Pfu*-Polymerasepuffer:

- 100 mM KCl
- 100 mM (NH₄)₂SO₄
- 200 mM Tris-HCl, pH 8,75
- 20 mM MgSO₄
- 1% Triton X-100
- 1 mg/ml BSA

2.2.2 Reinigung von PCR-Produkten

Bevor ein durch PCR gewonnenes DNA-Fragment durch Restriktionsendonukleasen geschnitten werden kann, um es als Insert in einen Vektor zu ligieren, muß die *Pfu*-Polymerase entfernt werden. Ansonsten würde die, zwar bei 37°C nur wenig aktive DNA-Polymerase die durch Restriktionsendonukleasen generierten überhängenden Enden wieder mit Nukleotiden zu einem glatten Ende auffüllen, wodurch eine nachfolgende Ligation des Inserts nicht mehr möglich wäre.

Die Reinigung erfolgt in Anlehnung an das *QIAquick Spin Handbook* (1997) unter Verwendung eines *QIAquick PCR Purification Kits* (Qiagen) durch selektive Bindung der im PCR-Reaktionsgemisch enthaltenen DNA an eine mit Silicagel beschichtete Membran. Die Membran bindet nur DNA-Fragmente von 100 bp bis 1000 bp, so dass Primer und Template-DNA entfernt werden. Zu den 100 µl des PCR-Reaktionsgemisch werden 500 µl Puffer PB gegeben und gemischt. Durch den Puffer PB wird die für die Bindung der DNA an die Silicagelmembran benötigte Ionenstärke eingestellt. Das Gemisch wird auf eine Minizentrifugationssäule gegeben und in einer Tischzentrifuge (5415 C, Eppendorf) durch die Membran in ein Auffanggefäß zentrifugiert (45 s, 14000 rpm). Der Durchfluß wird verworfen und die Säule wird zur Entfernung von DNA-gebundenem Protein und Salzen mit 750 µl Puffer PE gespült. Nach Entleeren des Auffanggefäßes wird eine Minute mit 14000 rpm zentrifugiert, um restlichen Puffer zu entfernen. Zur Elution der membrangebundenen DNA werden 30 µl des leicht alkalischen, salzarmen Elutionspuffers EB auf die Mitte der Silicagelmembran gegeben, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und das Eluat durch Zentrifugation in einem frischen 1,5 ml Eppendorfgefäß aufgefangen. Alternativ kann die DNA auch mit ddH₂O eluiert werden, dabei ist jedoch zu beachten, dass der pH-Wert für eine hohe Elutionseffizienz zwischen 7,0 und 8,5 liegen muß.

2.2.3 Restriktionsspaltung

Restriktionsenzyme hydrolysieren die Bindung zwischen Phosphatgruppe und Desoxyribose im Zuckerphosphatrückgrad beider Stränge eines DNA-Doppelstranges. Die Spaltprodukte tragen an den 5'-Enden eine Phosphatgruppe, an den 3'-Enden eine Hydroxylgruppe.

In der Gentechnologie werden am häufigsten Typ II-Endonukleasen verwendet. Diese schneiden die DNA innerhalb einer für das Enzym charakteristischen Erkennungssequenz aus 4 - 8 Basenpaaren. Sie erzeugen dabei glatte bzw. 3'- oder 5'-überhängende Enden.

Die Verwendung von Restriktionsenzymen dient verschiedenen Zwecken. Mit ihrer Hilfe können DNA-Stücke schnell aus Plasmiden herausgeschnitten werden, um sie in andere Vektoren einzufügen. Außerdem können erfolgreiche Subklonierungen dieser Art anhand des Spaltmusters bestimmter Restriktionsenzyme identifiziert werden.

Ein typischer analytischer Restriktionsansatz hat folgende Zusammensetzung:

5	µl	Plasmid-DNA (etwa 1 µg)
2	µl	10 x NE-Puffer
0,5	µl	Restriktionsenzym (5 - 10 Units)
12,5	µl	dH ₂ O
<hr/>		
20	µl	

Der Ansatz wird 2 h bei 37 °C inkubiert.

Je nach verwendetem Restriktionsenzym sind unterschiedliche Pufferbedingungen für eine optimale Enzymaktivität notwendig. Die Wahl des in die Reaktion eingesetzten NE-Puffers (1 - 4) richtet sich nach den Bedürfnissen des Enzyms. Wenn bei Restriktionsspaltungen mehrere Enzyme verwendet werden, die jeweils unterschiedliche Puffer benötigen, werden die Reaktionen nacheinander durchgeführt. Die Pufferbedingungen für die zweite Reaktion werden dann durch Zusatz weiterer Puffer eingestellt.

Ein präparativer Restriktionsansatz wird analog, aber mit größeren Volumina (5 µg DNA) durchgeführt. Außerdem erfolgt hierbei häufig nach der Hälfte der Inkubationszeit eine erneute Zugabe von Restriktionsenzym, da die Enzyme im Laufe der Zeit an Aktivität verlieren.

Zusätzlich zu den beiden für eine angestrebte Ligationsreaktion zwischen Vektor und Insert notwendigen Enzymen, kann der Vektor mit einem dritten gespalten werden, dessen Erkennungsstelle zwischen diesen beiden liegt. Eine solche Behandlung verringert die Gefahr einer Religation des Vektors nach einem unvollständigen Restriktionsschnitt. Eine Dephosphorylierung des Vektors (Kap. 2.2.5.) ist dann nicht mehr unbedingt notwendig.

NE-Puffer 1 (10 x) (Biolabs):

100 mM Tris/HCl, pH 7,0
100 mM MgCl₂
10 mM DTT

NE-Puffer 2 (10 x) (Biolabs):

100 mM Tris/HCl, pH 7,9
500 mM NaCl
100 mM MgCl₂
10 mM DTT

NE-Puffer 3 (10 x) (Biolabs):

500 mM Tris/HCl, pH 7,9
 1 M NaCl
 100 mM MgCl₂
 10 mM DTT

NE-Puffer 4 (10 x) (Biolabs):

200 mM Tris/Acetat, pH 7,9
 500 mM Kaliumacetat
 100 mM MgCl₂
 10 mM DTT

2.2.4 Auffüllen von DNA-Überhängen mit Klenow-Fragment

Durch Restriktionsschnitt erzeugte 3'-Überhängen können durch die 3'-DNA-Polymeraseaktivität der Klenow-Untereinheit von DNA-Polymerase in Gegenwart von dNTPs zu glatten Enden aufgefüllt werden. Ein typischer Ansatz sieht wie folgt aus:

20 µl DNA in Restriktionspuffer	
0,5 µl dNTP-Mix	
0,5 µl Klenow (2 U/µl)	
9 µl dH ₂ O	
20 µl	

Der Ansatz wird für 15 Minuten bei RT inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 3,3 µl 100 mM EDTA pH 8,0 und zehnmütiges Erhitzen auf 75°C beendet. Das Enzym sowie überschüssige dNTPs werden durch PCR-Aufreinigung, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, entfernt.

2.2.5 Kinasierung von Oligonukleotiden

Synthetisierte Oligonukleotide besitzen keine 5'-Phosphatgruppe. Daher können mittels PCR generierte DNA-Fragmente nicht direkt in dephosphorylierte Vektoren mit glatten Enden kloniert werden. Ebenso können zwei PCR-generierte Fragmente mit glatten Enden nicht gleichzeitig in einen Vektor ligiert werden. Für diese Zwecke werden mittels T4-Polynukleotidkinase Phosphatgruppen an die synthetischen Oligonukleotide angehängt. Ein typischer Kinasierungsansatz setzt sich zusammen aus:

10 µl Primer (100 pmol/µl)
2 µl 10 x T4-Polynukleotidkinasepuffer
4 µl 5 mM rATP
0,5 µl 0,1 M DTT
1 µl T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl)
2,5 µl dH ₂ O

Nach Inkubation für 30 Minuten bei 37°C wird die T4-Polynukleotidkinase durch Hitzedenaturierung (10 min., 68°C) inaktiviert und die gewünschte Oligonukleotidkonzentration durch Verdünnen mit ddH₂O eingestellt.

T4-Polynukleotidkinasepuffer (10x) (Biolabs)

70 mM Tris/HCl, pH 7,6 (25°C)
 10 mM MgCl₂
 5 mM DTT

2.2.6 Dephosphorylierung von Vektoren

Um Genfragmente mit hoher Effizienz in geeignete Plasmid-Vektoren zu klonieren (Kap. 2.2.7.), muß eine Religation des Vektors ohne Insertion verhindert werden. Zu diesem Zweck behandelt man Vektor-DNA, besonders nach Linearisierung mit nur einem Restriktionsenzym oder solchen Nukleasen, die glatte Enden erzeugen, mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdärmen. Diese entfernt die terminalen 5'-Phosphatgruppen des linearen Vektors und verhindert dadurch eine Rezirkularisierung des Vektors.

Durchführung der Dephosphorylierung:

16,0	µl	DNA-Lösung (ca. 5 µg DNA)
2,0	µl	10 x Dephosphorylierungspuffer
1,0	µl	alkalische Phosphatase (0,1 U/µl)
<hr/>		
19,0	µl	

Der Reaktionsansatz wird 60 min bei 37 °C inkubiert, wobei nach 30 min noch einmal die gleiche Enzymmenge zugegeben wird. Danach wird das Enzym inaktiviert, indem eine EDTA-Konzentration von 2,5 mM eingestellt und die Probe 15 min lang auf 68 °C erwärmt wird. Durch diese Behandlung werden Zn²⁺-Ionen des Enzyms, die für die Stabilität der Untereinheiten und seine katalytische Aktivität notwendig sind, chelatisiert.

Das denaturierte Enzym kann dann durch Phenol-Chloroform-Extraktion (Kap. 2.2.6.2.) oder präparative Agarose-Gelelektrophorese aus der Probe entfernt werden.

10 x Dephosphorylierungspuffer (Boehringer Mannheim):

500 mM Tris/HCl, pH 8,5 (bei 20°C)
 1 mM EDTA

2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur Identifikation, Trennung und Reinigung von DNA- und RNA-Fragmenten verwendet. Beim Anlegen einer Spannung wandert DNA aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode. Die Mobilität der Nucleinsäuren hängt dabei von ihrer Molekülgröße und der Dichte der Gelmatrix ab. Bei DNA werden in dieser Arbeit für präparative und analytische Zwecke 1%ige, bei der Analyse von RNA 2%ige Agarosegele verwendet. Mit Hilfe eines Standards läßt sich die Molekülgröße von DNA-Fragmenten durch Vergleich der Laufstrecke bestimmen.

Es wird folgender Standard eingesetzt:

Lambda-DNA, verdaut mit *EcoRI/HindIII* (21226, 5148, 4973, 4277, 3530, 2027, 1904, 1584, 1330, 983, 831, 564, 125 bp)

Zur Herstellung eines Agarosegels wird die entsprechende Menge Agarose (w/v) durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle in TAE-Puffer gelöst. Nach dem Abkühlen auf etwa 60 °C wird die Lösung mit 1 µl Ethidiumbromid pro 20 ml versetzt und in ein horizontales Gelbett (Eigenbau bzw. Easy Cast Electrophoresis System, Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH) gegossen. Nach dem Erstarren wird das Gel mit TAE-Laufpuffer überschichtet. Die Proben werden mit einem Sechstel ihres Volumens an Auftragspuffer für Agarosegele versetzt und die Elektrophorese für die ersten 5 min bei 50 V, anschließend 40 min bei 70 V (Power Pac 3000, Biorad) durchgeführt. Währenddessen interkaliert das Ethidiumbromid in die DNA und macht so die DNA-Banden bei Bestrahlung mit UV-Licht (366 nm) sichtbar. Eine Aufzeichnung erfolgt mit dem Photodokumentationssystem Digit Store Duo der Firma Intas, Göttingen.

TAE-Laufpuffer:

40 mM Tris
0,11 % (v/v) Essigsäure
1 mM EDTA, pH 8,0

Auftragspuffer für Agarosegele:

0,25 % (w/v) Bromphenolblau
0,25 % (w/v) Xylen Cyanol FF
30 % (w/v) Glycerin

Auftragspuffer für RNA-Agarosegele

0,25 % (w/v) Xylen Cyanol FF
30 % (w/v) Glycerin

2.2.8 Reinigung von DNA

2.2.8.1 Reinigung von Spaltprodukten nach einem Restriktionsschnitt

Zur Isolation von Spaltprodukten nach einem Restriktionsschnitt (Kap. 2.2.3.) werden die DNA-Fragmente zunächst in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt (Kap.2.2.5.) und dann aus diesem mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* (Qiagen) wiedergewonnen. Das Trennverfahren beruht auf der selektiven Bindung von DNA an silicagelbeschichteten Membranen bei hoher Salzkonzentration. Die Durchführung basiert weitestgehend auf dem von Qiagen mitgelieferten Extraktionsprotokoll:

Die Banden der DNA-Fragmente werden unter UV-Bestrahlung (366 nm) (Roth) mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die erhaltenen Gelstücke werden mit dem Dreifachen ihres Volumens an Puffer QG (100 µg ≈ 100 µl) und 10 min lang unter wiederholtem Mischen auf 50 °C erwärmt. Das chaotrope Salz NaClO₄, das im Puffer QG1 in hoher Konzentration enthalten ist, zerstört die Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen den Zuckermolekülen im Agarosepolymer, wodurch das Gel aufgelöst wird. Dem Puffer QG ist

ein Indikator zugesetzt, um den pH-Wert kontrollieren zu können. Bleibt die Farbe der Lösung während des Lösens des Geles nicht gelb, werden 10 µl 3 M Natriumacetat-Lösung zugesetzt. Anschließend wird zu der Lösung noch das dem Gelstück entsprechende gleiche Volumen an Isopropanol zugegeben, wodurch DNA-Fragmente die kleiner als 500 bp oder größer als 4000 bp stärker an die Membran binden, womit die Ausbeute erhöht wird. Die Lösung wird anschließend auf eine in einem 2 ml Auffanggefäß steckende QIAquick Minizentrifugensäule gegeben und durch Zentrifugation (45 s, 14000 rpm) in einer Eppendorf 5415 C Tischzentrifuge durch die Membran gedrückt. Dabei bindet die DNA, begünstigt durch die hohe Elektrolytkonzentration an die Silicagelbeschichtung, während Agarose, Proteine, Ethidiumbromid, Salze und weitere Verunreinigungen, die keine Nukleinsäuren sind, sich im Durchfluß der Säule befinden. Der Durchfluß wird verworfen und die Säule durch Zentrifugation mit 500 µl Puffer QG zur vollständigen Entfernung von Agaroseresten gewaschen. Durch Auftragen von 750 µl Puffer PE, 2 minütige Inkubation bei Raumtemperatur und anschließende Zentrifugation (45 s, 14000 rpm) wird überschüssiges Salz von der Säule eluiert. Der Durchfluß wird verworfen und die Säule zur vollständigen Entfernung von Resten des Puffers PE eine Minute bei 14000 rpm zentrifugiert. Bei allen Waschschrritten wird das gleiche Auffanggefäß verwendet. Zur Elution der gebundenen DNA wird die Säule in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gesteckt, 30 µl Elutionspuffer EB mittig auf die Membran aufgetragen, 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und dann 1 Minute mit 14000 rpm zentrifugiert. Aufgrund der geringen Salzkonzentration und dem leicht basischen pH-Wert dissoziiert die DNA von der Silicagemembran ab. Zur Erhöhung der DNA-Ausbeute kann der Elutionsschritt auch noch einmal wiederholt werden. Das Eluat, welches die gereinigte DNA enthält, wird anschließend auf einem Agarosegel analysiert.

Puffer QG (Qiagen):

Guanidiniumthiocyanat-haltiger
Solubilisierungspuffer, pH 5,0, mit pH-
Indikator

PE-Puffer (Qiagen):

ethanolhaltiger Tris-HCl-Waschpuffer,
pH 7,7, mit moderater Salzkonzentration

Puffer EB (Qiagen):

10 mM Tris-HCl, pH 8,5

2.2.8.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion dient der Abtrennung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen. Dabei macht man sich zunutze, dass Phenol Proteine denaturiert, während es mit Nukleinsäuren nicht interagiert. Da sich Phenol viel besser in Chloroform löst als in Wasser, wird durch eine gleichzeitige Extraktion mit Phenol und Chloroform verhindert, dass Phenolreste in der wäßrigen Phase, welche die DNA oder RNA enthält, zurückbleiben und nachfolgende Reaktionen stören.

Die von Proteinen zu befreiende DNA-Lösung wird mit dem gleichen Volumen eines Phenol-Chloroform-Gemisches versetzt und geschüttelt, bis eine Emulsion entstanden ist. Zur

Phasentrennung wird 2 min in der Tischzentrifuge (5415 C, Eppendorf) zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wird in ein neues Gefäß überführt und die DNA aus dieser durch Ethanol-fällung (Kap. 2.2.6.3.) isoliert. Die meisten denaturierten Proteine verbleiben an der Grenzfläche zwischen der wäßrigen und der Phenol-Chloroform-Phase und bilden dort eine sogenannte Interphase aus.

Phenol-Chloroform-Gemisch:

50 % (v/v) Phenol-Lösung
50 % (v/v) wassergesättigtes
Chloroform

Phenol-Lösung:

1 kg Phenol, verflüssigt bei 40 °C
441 ml 1 M Tris/HCl, pH 7,8
55 ml H₂O
55 ml m-Kresol
2,2 ml β-Mercaptoethanol
1,5 g 8-Hydroxychinolin
gegen TE-Puffer, pH 8,0, äquilibriert

2.2.8.3 Ethanolpräzipitation von DNA

Eine Fällung von DNA mit Ethanol wird eingesetzt, um die DNA zu konzentrieren oder niedermolekulare Bestandteile zu entfernen.

Eine DNA-Lösung wird mit einem Zehntel ihres Volumens an 3 M Kaliumacetatlösung (pH 5,2) und dem 2,5-fachen ihres Volumens an absolutem Ethanol versetzt. Die Probe wird gemischt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die gefällte DNA 10 min bei 14000 rpm in der Tischzentrifuge (5415 C, Eppendorf) abzentrifugiert. Der Überstand wird mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die DNA einmal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, um Salzreste zu entfernen. Nach dem Trocknen des Pellets bei 37 °C wird die DNA in der gewünschten Menge dH₂O gelöst.

2.2.9 Ligation

T4-DNA-Ligase kann DNA-Fragmente, die durch Restriktionsspaltung entstanden sind, wieder miteinander verknüpfen, wenn die Enden der linearen DNA glatt oder komplementär vorliegen. Das Enzym katalysiert dabei die Veresterung eines 5'-Phosphorsäureesters mit einer 3'-Hydroxylgruppe. Wurde der Vektor zuvor mit alkalischer Phosphatase am 5'-Ende dephosphoryliert, so besitzt das rekombinierte DNA-Molekül in beiden Strängen je einen Einzelstrangbruch, an dem eine 3'-Hydroxylgruppe des Inserts auf eine 5'-Hydroxylgruppe des Vektors trifft. Dennoch ist das DNA-Molekül stabil genug für eine Transformation in eine Bakterienzelle, in der Reparaturenzyme des Wirtes den Einzelstrangbruch beheben.

In einem Ligationsansatz zur Ligation komplementärer DNA-Enden werden etwa 20 ng Vektor-DNA eingesetzt und soviel Insert-DNA, dass sich ein molares Vektor-Insert-Verhältnis von 1 : 3 ergibt. Liegen die Enden der DNA glatt vor, so wird die Ligation mit einem molaren Vektor-Insert-Verhältnis von 1:6 bei ebenfalls 20 ng eingesetzter Vektor-DNA

durchgeführt. Das Gemisch aus Vektor und Insert wird mit 1 µl 10 x Ligationspuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 : 3 mit dH₂O verdünnt = 2 Units) versetzt. Anschließend wird der Ansatz mit dH₂O auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt und etwa 3 h bei 16 °C inkubiert. Ligationen von glatten DNA-Enden werden ca. 16 h bei 16°C inkubiert.

Parallel zu jeder Ligrationsreaktion wird eine Kontrolle mitgeführt, die zwar Vektor und T4-DNA-Ligase enthält, aber keine Insert-DNA. Nach einer Transformation zeigt diese Kontrolle die Anzahl an Kolonien an, die auf eine Religation des Vektors zurückzuführen sind.

Ligationspuffer (10 x) (Biolabs):

- 0,5 M Tris/HCl, pH 7,8
- 100 mM MgCl₂
- 100 mM DTT
- 10 mM ATP
- 25 % (w/v) BSA

2.2.10 Transformation

Das gramnegative Bakterium *E. coli* ist nicht in der Lage, Fremd-DNA von außen mit ausreichender Effizienz aufzunehmen. Deshalb wird die Zellwand von *E. coli* durch Behandlung mit unphysiologisch hohen Konzentrationen an zweiwertigen Metallkationen destabilisiert und damit die Aufnahmefähigkeit der Zellen für Plasmid-DNA gesteigert. Auf diese Weise werden die Zellen kompetent gemacht. Der Wirkungsgrad einer Transformation kann durch einen Hitzeschock oder einen kurzen starken Stromstoß erhöht werden.

2.2.10.1 Herstellung kompetenter Bakterien-Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgt nach der Methode von Dagert und Ehrlich (1979).

20 ml 2YT-Medium werden mit 200 µl einer Übernachtskultur eines geeigneten *E. coli*-Stammes angeimpft und 2 h bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend werden die Zellen 10 min bei 4 °C und 2500 rpm abzentrifugiert (5403, Eppendorf), in 20 ml 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und 2 h im Eis inkubiert. Nach 10minütiger Zentrifugation (1200 rpm, 4 °C) wird das Bakteriensediment in 2 ml 0,1 M CaCl₂ aufgenommen. Nach weiteren 2 h auf Eis sind die Bakterien kompetent und können 48 h lang für eine Transformation verwendet werden.

2.2.10.2 Herstellung kompetenter, tieffrierbarer Bakterien-Zellen

Die Herstellung kompetenter, tieffrierbarer Bakterien-Zellen erfolgt analog der Herstellung kompetenter Zellen. Es werden 200 ml 2 YT-Medium mit 2 ml Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,6 bis 0,8 bei 37°C und 180 rpm im Schüttelinkubator wachsen gelassen. Anschließend werden die Zellen 10 min bei 4 °C und 2500 rpm abzentrifugiert (5403, Eppendorf), das Pellet in 100 ml einer 50 mM $CaCl_2$, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, enthaltenden Lösung resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden erneut sedimentiert (8 min, 4°C) und in 20 ml einer 15 mM $CaCl_2$ und 15 % (v/v) Glycerin enthaltenden Lösung resuspendiert. Die kompetenten Zellen werden aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

2.2.10.3 Transformation von *E. coli*

Eine DNA-Lösung, z. B. ein Ligationsansatz mit etwa 20 ng Vektor-DNA oder 7-10 ng ringförmige Plasmid-DNA, wird mit 100 µl kompetenten *E. coli*-Zellen gemischt und 30 min auf Eis stehengelassen. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock (5 min, 37 °C), nach dem die Bakterien 10 min lang auf Eis abgekühlt werden. Nach Zugabe von 300 µl 2YT-Medium wird der Ansatz 30 min bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. In dieser Zeit können die transformierten Bakterien die jeweilige Antibiotikaresistenz ausbilden, bevor sie auf einer 2YT-Agarplatte ausplattiert werden, die das für die Selektion notwendige Antibiotikum enthält. Die transformierten Zellen wachsen bei 37 °C im Wärmeschrank über Nacht zu Kolonien heran.

2.2.11 Aufbewahrung transformierter Klone

2.2.11.1 Anlegen von *E. coli* Glycerinkulturen

Für die Herstellung von *E. coli* Glycerinkulturen werden zunächst 2 ml 2YT-Medium mit einer Einzelzellkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag werden 800 µl dieser Kultur mit 800 µl 87 %igem Glycerin gemischt und bei -80 °C eingefroren.

2.2.12 Plasmid-Präparation

Plasmide sind ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle, die in der Bakterienzelle unabhängig von der chromosomalen DNA vermehrt werden. Auf den unterschiedlichen Eigenschaften von Plasmid- und chromosomaler DNA bei ihrer Denaturierung mit Natriumhydroxid und anschließender schneller Renaturierung beruhen die hier verwendeten Methoden zur Isolation von Plasmid-DNA, die eine Abwandlung des Protokolls von Birnboim und Doly (1979) darstellen. Beim raschen Absenken des pH-Wertes nach alkalischer Denaturierung renaturiert Plasmid-DNA und bleibt löslich, wohingegen chromosomale DNA an Zellwandbruchstücken und Proteinen haftet und mit diesen abzentrifugiert werden kann.

2.2.12.1 Plasmid-Mini-Präparation

Mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) lassen sich innerhalb kurzer Zeit kleine Mengen (etwa 5-10 µg pro ml Kultur) Plasmid-DNA in hoher Reinheit aus Bakterien isolieren. Die Durchführung erfolgt in Anlehnung an das *QIAprep Miniprep Handbook* von Qiagen (1997).

Es werden 2 ml antibiotikumhaltiges 2YT-Medium mit einer Einzelzellkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Bakterienzellen werden anschließend 5 min bei 5000 rpm in der Tischzentrifuge (5415 C, Eppendorf) pelettiert und in 250 µl Puffer P1 vollständig resuspendiert. Durch Zugabe von 250 µl des alkalischen und detergenzhaltigen Puffers P2, sofortiges Mischen und fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur werden die Zellen lysiert und gleichzeitig die DNA denaturiert. Anschließend wird die Lösung durch Zugabe von 350 µl Puffer N3 neutralisiert und auf die richtige Salzkonzentration für die Bindung der DNA an die Silicagelmembran eingestellt. Dabei erfolgt das Mischen durch 4-6 maliges invertieren des Eppendorfgefäßes, um zu verhindern, dass genomische DNA gesichert wird. Zelluläre RNA wird durch die in Puffer P1 enthaltene RNase A zerstört. Durch 10 min Zentrifugation (14000 rpm) in der Tischzentrifuge werden Zellwandbruchstücke und ausgefallene Proteine zusammen mit der genomischen DNA sedimentiert und die sich im Überstand befindende Plasmid-DNA kann durch vorsichtiges Dekantieren auf eine in einem Auffanggefäß steckende Minizentrifugensäule überführt werden. Durch Zentrifugation (45 s, 14000 rpm) wird die DNA an die Silicagelmembran gebunden. Der Durchfluß wird verworfen. Die an die Membran gebundene DNA wird erst mit 500 µl Puffer PB, dann mit 750 µl Puffer PE zur Entfernung von Salzen gewaschen. Dazu wird die Lösung jeweils auf die Säule pipettiert und durch die Membran zentrifugiert (45 s, 14000 rpm). Der Durchfluß wird nach jedem Zentrifugationsschritt verworfen. Nach dem letzten Waschschrift wird das Auffanggefäß entleert und restlicher Waschpuffer durch erneute Zentrifugation (1 min, 14000 rpm) entfernt. Die so gereinigte DNA wird durch mittiges Auftragen von 50 µl Puffer EB auf die Silicagelmembran, einminütige Inkubation bei Raumtemperatur und anschließende Zentrifugation eluiert und in einem frischen 1,5 ml Eppendorfgefäß aufgefangen. Die so erhaltene DNA wird auf einem Agarosegel (Kap. 2.2.5.) analysiert und kann ohne weitere Reinigung in kompetente Zellen transformiert (Kap. 2.2.8.3.) oder sequenziert (Kap. 2.2.17.) werden.

RNase A - Lösung (Qiagen):

100 mg/ml Ribonuklease A

Puffer P1 (Qiagen):

50 mM Tris-HCl

10 mM EDTA

pH 8,0

Puffer P2 (Qiagen):

200 mM NaOH

1 % (w/v) SDS

Puffer N3 (Qiagen):

Kaliumacetat/Essigsäure, pH 4,3

Guanidiniumchlorid

Puffer PB (Qiagen):

Isopropanol
Guanidiniumchlorid, pH 7,0

PE-Puffer (Qiagen):

ethanolhaltiger Tris-HCl-Waschpuffer,
pH 7,7, mit moderater Salzkonzentration

Puffer EB (Qiagen):

10 mM Tris-HCl, pH 8,5

2.2.12.2 Plasmid-Midi-Präparation

Die Midi-Präparationsmethode beinhaltet eine Plasmidreinigung über kommerzielle Anionenaustauschersäulen. Auch diese Extraktionsmethode basiert auf einer alkalischen, mit dem Einsatz von SDS gekoppelten Lyse der Zellen. Anschließend wird die Plasmid-DNA bei geringer Salzkonzentration und niedrigem pH-Wert an eine Anionenaustauschersäule gebunden. Bei mittlerer Salzkonzentration wird sie von Verunreinigungen befreit und bei hoher Salzkonzentration wieder eluiert. Mit dieser Methode kann man DNA-Ausbeuten von bis zu 4 µg pro ml Kultur erzielen.

Die Durchführung erfolgt in Anlehnung an das *Plasmid Handbook* von Qiagen (1995).

Von einer 2YT-Agarplatte mit Einzelzellkolonien oder aus einer Glycerin-Kultur (Kap. 2.2.9.1.) werden 25 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Rüttler inkubiert. Anschließend werden die Bakterien 5 min bei 3500 rpm abzentrifugiert (5305, Eppendorf) und in 4 ml gekühltem Puffer P1 mit 100 µg/ml RNase A resuspendiert. Durch Zugabe von 4 ml frisch hergestellter NaOH/SDS-Lösung (Lösung 2) werden die Zellen lysiert und die DNA und Proteine denaturiert. Um die Plasmid-DNA zu renaturieren, wird das Gemisch nach 5 min bei Raumtemperatur mit 4 ml 5 M K-Acetat-Lösung, pH 5,2, neutralisiert. Der hohe Salzgehalt dieses Puffers bewirkt außerdem, dass das vorhandene SDS gefällt wird. Das geschieht während einer 15minütigen Inkubation auf Eis und ist notwendig, weil das SDS sonst eine spätere Bindung der DNA an die Anionenaustauschersäule verhindert. Das Präzipitat wird anschließend 15 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, durch ein Filter auf die mit 10 ml Puffer QBT äquilibrierte Säule (tip 100, Qiagen) überführt. Aufgrund der vorhandenen Salzkonzentration und des pH-Wertes kann nur Plasmid-DNA an die Säule binden, nicht aber die durch RNase A degradierte RNA oder zelluläre Proteine.

Die Säule wird zweimal mit 10 ml Waschpuffer QC behandelt, wodurch neben RNA- und Proteinresten auch RNase A und nukleinsäurebindende Proteine entfernt werden. Außerdem enthält der Puffer QC 15 % Ethanol, das unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen verringert und so die Reinheit der Plasmid-DNA weiter erhöht.

Eluiert wird die Plasmid-DNA dreimal mit 1,2 ml Puffer QF in 2 ml Reaktionsgefäße. Die DNA wird mit 750 µl Isopropanol gefällt und 30 min bei 15000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wird zweimal mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und 5 - 10 min bei 37 °C getrocknet, bevor die DNA in 80 µl dH₂O gelöst wird.

Puffer P1:

50 mM Tris/HCl, pH 8,0
 10 mM EDTA
 autoklaviert

Puffer P2:

200 mM NaOH
 1 % (w/v) SDS

Puffer P3:

3 M Kaliumacetat
 pH 5,5

Puffer QBT:

0,75 M NaCl
 50 mM MOPS, pH 7,0
 15 % (v/v) Ethanol
 0,15 % (w/v) Triton X-100
 sterilfiltriert

Waschpuffer QC:

1 M NaCl
 50 mM MOPS, pH 7,0
 15 % (v/v) Ethanol
 sterilfiltriert

Puffer QF:

1,25 M NaCl
 50 mM Tris/HCl, pH 8,5
 15 % (v/v) Ethanol

2.2.13 Bestimmung der DNA-Konzentration

Bei der Bestimmung der DNA-Konzentration macht man sich zunutze, dass die Menge an Ethidiumbromid, die während einer Agarose-Gelelektrophorese in die DNA interkaliert, proportional zur Anzahl ihrer Basenpaare ist. Durch einen Vergleich der Bandenintensitäten der Probe mit denen eines mitgelaufenen Standards läßt sich die DNA-Konzentration auf einem Transilluminator (366 nm) abschätzen.

2.2.14 Expression von His₆-tag- und GST-Fusionsproteinen in *E. coli***2.2.14.1 GST-Fusionsproteine**

Proteine, die als Fusionsproteine mit Glutathion S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* exprimiert werden, lassen sich schnell über eine Glutathionagarosesäule aufreinigen (Smith and Johnson, 1988). Es handelt sich dabei um eine Affinitätschromatographie, da Glutathion ein Substrat der Glutathion S-Transferase darstellt.

2 ml 2YT-Medium mit Antibiotikazusatz werden angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wird aus dieser Vorkultur eine 200 ml Kultur aus 2YT-Medium mit Antibiotikum so angeimpft, dass sie bei 600 nm eine Extinktion von 0,06 - 0,07 erreicht. Diese Kultur wächst bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer Extinktion von 0,6 - 0,7 bei 600 nm, bevor die Expression des GST-Fusionsproteins durch Zugabe von 1 M Isopropyl-β-thio-D-Galactopyranosid-Lösung (IPTG) bis zu einer Endkonzentration von

0,02 - 1 mM induziert wird. Vor und während der Induktion werden 2 ml Aliquots aus der Kultur entnommen, um später auf einem SDS-Polyacrylamidgel (Kap. 2.2.13.1.) den zeitlichen Verlauf der Expression verfolgen zu können. Nach 1 - 3 h Induktion der Proteinexpression wird die Bakteriensuspension 20 min bei 5000 rpm und 4 °C abzentrifugiert (GSA-Rotor, RC2-B, Sorvall Superspeed). Das Pellet wird in 8 ml Resuspendierungspuffer aufgenommen und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C eingefroren.

Photometer: Ultraspec 2000 (Pharmacia Biotech)

2.2.14.2 Ultraschallaufschluß

Nach dem Auftauen werden die Zellen im Eisbad mit Ultraschall aufgebrochen (2 x 90 s, Duty cycle 50 %, Branson Sonifier 250). Um eine zu starke Wärmeentwicklung zu vermeiden, wird die Bakteriensuspension zwischen den Pulsen 30 s im Eis abgekühlt. Anschließend werden die Zelltrümmer 20 min bei 15000 rpm und 4 °C abzentrifugiert (SS-34-Rotor, RC2-B, Sorvall Superspeed). Cytosolische Proteine, unter anderem das rekombinante Protein, verbleiben dabei im Überstand. Für eine Kontrolle wird das Pellet in 8 ml Resuspendierungspuffer aufgenommen. Ein Aliquot dieser Probe wird mit 2 x Probenpuffer für Proteingele versetzt und bei - 20 °C gelagert. Aus dieser Kontrolle wird nach Coomassiefärbung eines Polyacrylamidgels ersichtlich, ob das exprimierte Protein durch die Bildung von Einschlußkörpern oder ungenügenden Zellaufschluß in das Pellet gelangte, oder ob es sich in löslicher Form im Cytosol befand und durch die Zentrifugation von den Zelltrümmern abgetrennt werden konnte. Um auch sehr kleine Zelltrümmer und ungelöste Bestandteile, welche die Affinitätschromatographiesäule leicht verstopfen können, zu entfernen, wird der Überstand in einem Ti70-Rotor ultrazentrifugiert (1 h, 40000 rpm, 4°C, L8-70 M Ultrazentrifuge, Beckman).

2.2.14.3 Aufreinigung durch Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose

Durch den GST-Fusionsanteil kann das Protein selektiv und reversibel an GSH-Agarose gebunden werden. Dazu wird der Überstand nach der Ultrazentrifugation auf die mit 5 ml Äquilibriumspuffer vorbereitete Säule (250 µl Glutathion Sepharose® 4B) überführt. Nicht gebundene Proteine werden mit 25 ml PBS-Waschpuffer und 20 ml Tris-Waschpuffer beseitigt. Anschließend wird das rekombinante GST-Fusionsprotein mit 3 ml Elutionspuffer von der Säule eluiert, wobei das Eluat in 500 µl Fraktionen aufgefangen wird. Das freie Glutathion, das in diesem Puffer enthalten ist, verdrängt das an der Agarose immobilisierte Glutathion vom Protein, indem es selbst an den GST-Anteil des Fusionsproteins bindet. 5 µl der Elutionsfraktionen werden durch SDS-PAGE analysiert, um die Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration für die nachfolgende Dialyse zu vereinigen. Das vom Protein gebundene Glutathion wird durch zweimalige Dialyse gegen einen β-Mercaptoethanolhaltigen Puffer beseitigt und das β-Mercaptoethanol wiederum durch Dialyse gegen einen β-Mercaptoethanolfreien Puffer. Für die zweite Dialyse wird in der Regel der Puffer verwendet, in dem die Proteine in einer späteren Reaktion eingesetzt werden sollen. Um das Protein während der Aufarbeitung vor proteolytischem Abbau zu schützen, enthalten

der Resuspendierungs- und die Waschpuffer die Proteaseinhibitoren PMSF, Benzamidin, Pepstatin A und EDTA.

Resuspendierungspuffer:

1 x PBS
5 mM EDTA, pH 8,0
1 mM PMSF
5 mM Benzamidin
0,1 % (w/v) Pepstatin A

PBS-Waschpuffer:

1 x PBS
100 mM EDTA, pH 8,0
0,5 % (w/v) Triton-X 100
5 mM Benzamidin
1 mM PMSF
0,1 % (w/v) Pepstatin A

Tris-Waschpuffer:

50 mM Tris/HCl, pH 8,0
10 mM EDTA
0,5 % (w/v) Triton-X 100
5 mM Benzamidin
1 mM PMSF
0,1 % (w/v) Pepstatin A

Elutionspuffer:

50 mM Tris/HCl, pH 8,0
10 mM Glutathion
0,5 % (w/v) Triton-X 100

Dialysepuffer mit β -Mercaptoethanol:

50 mM Tris/HCl, pH 8,0
150 mM NaCl
1 mM EDTA
0,1 % (v/v) β -Mercaptoethanol

Dialysepuffer ohne β -Mercaptoethanol:

50 mM Tris/HCl, pH 8,0
150 mM NaCl
1 mM EDTA

2.2.14.4 Thrombinspaltung von GST-Fusionsproteinen

Die für die Expression von GST-Fusionsproteinen verwendeten pGex-Vektoren kodieren zwischen N-terminalen GST und dem C-terminalen Fusionsprotein zusätzlich die Aminosäuresequenz LVPR|GS, welche spezifisch durch Thrombin gespalten wird. Die Spaltung mit Thrombin kann sowohl nach Elution des GST-Fusionsproteins von der GT-Sepharosematrix mittels Glutathion, wie in Kapitel 2.2.14.3 beschrieben, als auch direkt auf dem Säulenmaterial erfolgen. Letzteres hat dabei den Vorteil, dass der GST-Anteil des Fusionsproteins auf der GT-Sepharosematrix verbleibt und nicht durch erneute Zugabe von GT-Sepharosebeads entfernt werden muß. Die Bindung des GST-Fusionsproteins an GT-Sepharose kann unter Umständen zu sterischen Hinderungen und damit zu einer Verschlechterung oder Verhinderung der Spaltung führen. Alle in dieser Arbeit beschriebenen und verwendeten GST-Fusionsproteine lassen sich jedoch problemlos direkt auf der GT-Sepharosematrix mit Thrombin spalten. Dazu wird die GT-Sepharosematrix nach Beendigung des letzten in Kapitel 2.2.14.3 beschriebenen Waschschriffs mit 10 ml

Thrombinspaltungspuffer equilibriert, das Säuleende mit einem Stopfen verschlossen und die Menge und Reinheit des gebundenen GST-Fusionsproteins durch SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.2.15) bestimmt. Für die Spaltung von jeweils 1 mg GST-Fusionsprotein wird 1 U Thrombin (Boehringer Mannheim) in 50 % des gewünschten Endvolumens Thrombinspaltungspuffer gelöst, auf die GT-Sepharosematrix mit dem gebundenem GST-Fusionsprotein gegeben, resuspendiert und eine Stunde bei RT oder 3 Stunden bei 4°C (GST-Synaptotagmin I) unter gelegentlichem Resuspendieren inkubiert. Anschließend wird der Überstand aus der Säule abgelassen und zur vollständigen Elution des freigesetzten Proteins zweimal mit Thrombinspaltungspuffer (jeweils 25 % des gewünschten Endvolumens) gewaschen. Das eluierte Protein wird gegen den gewünschten Puffer dialysiert und die Konzentration, wie in Kapitel 2.2.19.1 beschrieben, nach SDS-PAGE und Coomassiefärbung densitometrisch bestimmt.

Thrombinspaltungspuffer
20 mM Tris pH 8.4
150 mM NaCl

2.2.14.5 Proteine mit His₆-tag

Proteine können durch Klonierung N- und C-terminal leicht um die Aminosäuresequenz HisHisHisHisHisHis, abgekürzt His₆, erweitert werden. Die His₆-Aminosäuresequenz bildet hochaffine Chelatkomplexe mit zweifach positiv geladenen Schwermetallionen wie Zn²⁺, Cu²⁺ oder Ni²⁺ aus. Unter Verwendung von über den chelatisierenden Linker Nitrilotriacetic acid (NTA) an Agarose immobilisierten Ni²⁺ kann das Protein gereinigt werden. Dabei bindet das Protein über jeweils 2 Histidinreste an ein Ni²⁺-Ion, wodurch ein oktaedrischer Komplex entsteht. Durch die Verwendung von 6 Histidinresten, die an drei benachbarte Ni²⁺-Ionen der Ni²⁺-NTA-Agarose binden, kann das Protein von anderen histidinreichen Proteinen durch Elution mit einem Gradienten getrennt werden. Die Elution kann durch Verdrängung mit Imidazol oder durch Protonierung der leicht basischen Histidinreste erfolgen.

Die Expression der Proteine in *E. coli* und der Ultraschallaufschluß erfolgen wie bei GST-Fusionsproteinen (Kap. 2.2.12.1. und 2.2.12.2.).

2.2.14.6 Aufreinigung durch Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose unter nativen Bedingungen

Das ultrazentrifugierte Bakterienlysat wird mit 600 µl äquilibrierter Ni²⁺-NTA-Agarose (Qiagen) versetzt und unter Schütteln 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wird die Suspension in eine leere Säule (Biorad) überführt und der Durchfluß aufgefangen. Die Säule wird zuerst mit 6 ml Sonicationsbuffer gewaschen, um unselektiv gebundene Proteine und andere Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wird die Säule mit 6 ml 20 mM Imidazol enthaltendem Sonicationsbuffer gewaschen, wodurch Histidincluster enthaltende Proteine entfernt werden. Die Elution erfolgt in 6 Fraktionen mit jeweils 500 µl 100 mM

Imidazol in Sonicationbuffer. Vom Säulendurchfluß, den Waschfraktionen sowie den Elutionen werden jeweils 5 µl mit dem gleichen Volumen an 2x Gelladepuffer versetzt und auf einem SDS-Acrylamidgel analysiert. Die das gewünschte Protein enthaltenden Fraktionen werden vereint, in einen Dialyseschlauch gefüllt und dreimal ca. 6 Stunden gegen den später benötigten Puffer dialysiert.

Sonicationbuffer:

50 mM Na₂HPO₄
 300 mM NaCl
 mit HCl auf pH 8,0 eingestellt

2.2.14.7 Aufreinigung durch Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose unter denaturierenden Bedingungen

Unter denaturierenden Bedingungen können auch im Cytosol unlösliche oder aufgrund vorhandener hydrophober Transmembrandomänen in Membranen lokalisierte Proteine, welche unter nativen Bedingungen mit den Zelltrümmern sedimentieren würden, mit guten Ausbeuten aufgearbeitet werden. Die Durchführung basiert auf Protokoll 14 des Handbuchs *The QIAexpressionist, Handbook for high-level Expression and Purification of 6xHis-tagged Proteins* (1997, Qiagen). Das durch 6 M Guanidiniumchlorid und Ultraschallaufschluß gewonnene Bakterienlysat wird nach der Ultrazentrifugation mit 600 µl Ni²⁺-NTA-Agarose (Qiagen) 30 Minuten bei Raumtemperatur in einem Schüttler inkubiert. Anschließend wird die Suspension in eine leere Säule (Biorad) überführt und zweimal mit 5 ml Waschpuffer A gewaschen. Durch den niedrigen pH-Wert wird unselektiv gebundenes Protein entfernt. Das gebundene Protein wird in 500 µl Fraktionen zuerst mit 2 ml Elutionspuffer B und dann mit 2 ml Elutionspuffer C eluiert. Vom Säulendurchfluß, der Waschfraktion sowie den Elutionen werden jeweils 5 µl auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert und die Protein enthaltenden Fraktionen dreimal etwa 6 Stunden gegen den später benötigten Puffer bei 4°C dialysiert.

Resuspendierungspuffer:

6 M Guanidiniumchlorid
 100 mM NaH₂PO₄
 10 mM Tris-HCl
 pH 8,0

Waschpuffer A:

8 M Harnstoff
 100 mM NaH₂PO₄
 10 mM Tris-HCl
 pH 6,3

Elutionspuffer B:

8 M Harnstoff
 100 mM NaH₂PO₄
 10 mM Tris-HCl
 pH 5,9

Elutionspuffer C:

8 M Harnstoff
 100 mM NaH₂PO₄
 10 mM Tris-HCl
 pH 4,5

Der pH-Wert der harnstoffhaltigen Puffer muß kurz vor Verwendung überprüft und eingestellt werden, da er sich durch Hydrolyse des Harnstoffs verändert.

Da die monomeren Proteine Synaptobrevin 2 und SNAP-25 keine ausgeprägte Sekundärstruktur besitzen, sondern diese erst bei Bildung des ternären Komplexes induziert wird, hat die denaturierende Aufarbeitung keinen Einfluß auf die Funktionalität dieser Proteine.

2.2.14.8 Aufreinigung von His₆-NSF

Der Zellaufschluß der nach Standardprotokoll induzierten und pelletierten Bakterien erfolgt nach Resuspension in 100 ml Puffer A in zwei Durchläufen in einer French Press bei 1000 psi. Das Lysat wird durch Zentrifugation (30 min, 15000 rpm, 4°C) im SS 34 Rotor (Sorvall) und einen anschließenden Ultrazentrifugationsschritt (60 min, 50000 rpm, 4°C) im Ti 70 Rotor (Beckman) geklärt. Vor dem Auftragen auf zwei mit 10 ml Puffer A equilibrierte Ni-NTA-Säulen (400 µl Bettvolumen) wird das Lysat durch einen 0,45µm Spritzenfilter filtriert. Die Säule wird solange mit Puffer A gewaschen, bis keine Verunreinigung mehr von der Säule eluieren. Dies wird durch wiederholtes messen der Absorption bei 280 nm gegen Puffer A detektiert. Das His₆-NSF wird durch schrittweises Erhöhen der Imidazolkonzentration von 50 mM auf 300 mM Imidazol in Puffer A eluiert. Dabei werden jeweils 200µl große Fraktionen aufgefangen. Die Eluate werden auf einem 12,5 %igem SDS-Polyacrylamidgel analysiert. His₆-NSF enthaltende Fraktionen werden vereint und 2 h in einem gespülten Dialyseschlauch (Thermapor High-Tech Dialyseschlauch CE Spektrapor, Reichelt) gegen 2-3 Liter Dialysepuffer dialysiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Puffer A:

20 mM HEPES/KOH pH 7.0
200 mM KCl
2 mM β-Mercaptoethanol
0.5 mM ATP
10% Glycerin
50 mM Imidazol

Dialysepuffer:

20 mM HEPES/KOH pH 7.0
100 mM KCl
2 mM MgCl₂
1 mM DTT
0.5 mM ATP
10% Glycerin

2.2.14.9 Aufreinigung von His₆-α-SNAP

Die nach Standardprotokoll induzierten und pelletierten Bakterien werden in 25 ml TKD-Puffer resuspendiert. Die Bakterien werden zweimal in einer French Press bei 1000 psi lysiert. Das Zelllysate wird durch Zentrifugation (30 min, 15000 rpm, 4°C) im SS 34 Rotor (Sorvall) und einen anschließenden Ultrazentrifugationsschritt (60 min, 50000 rpm, 4°C) im Ti 70 Rotor (Beckman) geklärt sowie vor dem Auftragen auf zwei mit 10 ml Puffer A equilibrierte Ni-NTA-Säulen (400 µl Bettvolumen) durch einen 0,45µm Spritzenfilter filtriert. Die Säulen werden mit 10 ml TKD-Puffer und 10 ml TKD-Puffer mit 20 mM Imidazol gewaschen und durch schrittweises Erhöhen der Imidazolkonzentration von 50mM auf 200 mM Imidazol in TKD-Puffer eluiert (Fraktionsgröße 400 µl). Die Eluate werden auf 12,5%igem SDS-Polyacrylamidgelen analysiert und die His₆-α-SNAP enthaltenden Fraktion vereint und gegen

3 Liter TKD-Puffer dialysiert. Nach der Dialyse wird das Protein zentrifugiert (10 min, 14000 rpm, 4°C, Eppendorf 5417R), um ausgefallenes α -SNAP abzutrennen, der Überstand wird in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

TKD Puffer:

25 mM Tris/HCl pH 7.8
50 mM KCL
1 mM DTT
10% Glycerin (w/v)

2.2.14.10 Lagern des Proteins nach der Dialyse

Nach erfolgter Dialyse wird die Proteinlösung 15 min mit 14000 rpm bei 4°C zentrifugiert, um eventuell ausgefallenes Protein zu entfernen. Der Überstand wird in 1,5 ml Eppendorfgefäßen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.15 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht es, Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen.

In dieser Arbeit wird eine modifizierte Form der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach (Laemmli, 1970) angewendet.

2.2.15.1 SDS-Polyacrylamidgel

Das 0,75 mm dicke Gel setzt sich zusammen aus dem 1 cm hohen Taschenbereich, einem 1 cm hohen und 8,3 cm breiten Sammelgel, gefolgt von einem Trenngel mit den Maßen 5 cm x 8,3 cm. Das 12,5 %ige Trenngel besteht aus:

1,25 ml Trenngelpuffer
50 μ l 10 %igem (w/v) SDS
2,063 ml 30 %iger (w/v) Acrylamid-/Bisacrylamidlösung
1,638 ml dH₂O
7,5 μ l TEMED
30 μ l 10 %iger (w/v) Ammoniumpersulfatlösung

Sofort nach dem Gießen wird das Gel mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu gewährleisten. Nach einer halben Stunde Polymerisation bei Raumtemperatur wird das Isopropanol mit einem Stück saugfähigen Papier entfernt, um nachfolgend das 5,7 %ige Sammelgel zu gießen. Dieses besteht aus:

313 μ l Sammelgelpuffer
25 μ l 10 %igem (w/v) SDS
415 μ l 30 %iger (w/v) Acrylamid-/Bisacrylamidlösung
1,75 ml dH₂O
5 μ l TEMED
20 μ l 10 %iger (w/v) Ammoniumpersulfatlösung

Sofort nach Einfüllen des Sammelgels wird ein 15-zähliger Kamm aus 0,75 mm starkem Teflon 1 cm tief in das Sammelgel gesteckt, um die Taschen zu formen. Das nach etwa einer halben Stunde auspolymerisierte Gel wird entweder noch am selben Tag verwendet, oder bis zum nächsten Tag mit feuchten Tüchern abgedeckt in einer Plastiktüte im Kühlschrank aufbewahrt.

Trenngelpuffer:

1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

Sammelgelpuffer:

0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

30 %ige Acrylamid-/ Bisacrylamidlösung:

29 % (w/v) Acrylamid

1 % (w/v) N'-N'-Methylenbisacrylamid

2.2.15.2 Probenvorbereitung

Die hier verwendeten Geltaschen nehmen ein Probenvolumen von 10 µl auf. Handelt es sich bei den Proben um rekombinante, aufgereinigte Proteine oder um Bakterienlysate, so werden sie mit dem gleichen Volumen an 2 x Probenpuffer für Proteingele versetzt und 2 min im kochenden Wasserbad denaturiert.

Probenpuffer für Proteingele (2 x):

12,5 mM Tris/HCl, pH 6,75

20 % (w/v) Glycerin

4 % (w/v) SDS

10 % (v/v) β-Mercaptoethanol

0,002 % (w/v) Bromphenolblau

0,002 % (w/v) Xylene Cyanol FF

Probenpuffer für Proteingele (4 x):

25 mM Tris/HCl, pH 6,75

40 % (w/v) Glycerin

8 % (w/v) SDS

20 % (v/v) β-Mercaptoethanol

0,004 % (w/v) Bromphenolblau

0,004 % (w/v) Xylene Cyanol FF

2.2.15.3 Elektrophorese

Zwei Gele werden senkrecht in die Elektrophorese-Apparatur (Mini Protean™, Biorad bzw. Eigenbau) eingespannt. Dabei entsteht zwischen ihnen das Pufferreservoir für die Kathode. Sowohl dieses Reservoir als auch dasjenige für die Anode werden mit Laemmli-Laufpuffer gefüllt. Anschließend werden die Taschen des Sammelgels mit den Proben und einem ungefärbten Molekulargewichtsstandard der Firma Biorad beladen. Gele für anschließende Autoradiographie werden mit einem durch Methylierung ¹⁴C-markierten Molekulargewichtsstandard (Amersham) beladen. Die Elektrophorese wird bei 20 mA pro Gel durchgeführt bis der Farbmarker des Probenpuffers das Ende des Trenngels erreicht hat. Das Gel wird anschließend mit Coomassie Blue R250 gefärbt, um die Proteinbanden sichtbar zu machen. Gele mit denen radioaktiv markierte Proteine analysiert wurden, werden anstelle dessen anschließend fluorographiert (Kap. 2.2.15.)

Laemmli-Laufpuffer:

- 25 mM Tris
- 250 mM Glycin
- 0,1 % (w/v) SDS

2.2.16 Coomassiefärbung

Das Gel wird 30 bis 45 min in Coomassie-Lösung geschwenkt und danach mehrere Stunden lang entfärbt, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abheben. Während des Entfärbens wird die Entfärbelösung von Zeit zu Zeit gegen frische ausgetauscht.

Bis zum Trocknen wird das Gel dann in Wasser aufbewahrt. Zum Trocknen wird ein Whatman-3MM-Papier mit Wasser angefeuchtet und das Gel darauf luftblasenfrei ausgebreitet. Danach wird es 60 min lang unter Vakuum auf 70°C erwärmt (Slab Gel Dryer SGD 2000 mit Gel Pump GP 110, Savant) bis das Gel vollständig trocken ist.

Coomassie-Lösung:

- 0,25 % (w/v) Coomassie Blau R250
- 45 % (v/v) Methanol
- 10 % (v/v) Essigsäure
- filtriert

Entfärbelösung:

- 30 % (v/v) Methanol
- 10 % (v/v) Essigsäure

2.2.17 Fluorographie und Autoradiographie von SDS-Polyacrylamidgelen

SDS-Polyacrylamid-Gele mit ^{35}S -Methionin markierten Proteinen werden durch Szintillationsautoradiographie ausgewertet. ^{35}S ist ein weicher β -Strahler mit einer Halbwertszeit von 87,4 Tagen. Da die gemessene Zahl der Zerfälle von ^{35}S direkt proportional zur Proteinmenge ist, können die Gele anhand der Schwärzung eines aufgelegten Röntgenfilmes oder einer Phosphoimagerplatte auch quantitativ ausgewertet werden. Zur Erhöhung der Nachweisgrenze wird nach Beendigung des elektrophoretischen Laufes der Szintillator PPO (2,5-Diphenyloxazol) in das Gel eingebracht. Die beim Zerfall von ^{35}S entstehenden hochenergetischen Elektronen regen auf ihrem Weg durch das Gel Elektronen der Szintillatorsubstanz an, welche ihre aufgenommene Energie in Form von Fluoreszenz wieder abgeben. Sowohl die β -Strahlung als auch die Fluoreszenzstrahlung führen zur Schwärzung des Röntgenfilms und somit zu einem stärkeren Signal als durch β -Strahlung allein.

Die Phosphoimager Platte besteht aus einer 150 μm starken photoempfindlichen Schicht auf einem Trägermaterial. Die photoempfindliche Schicht enthält 3 μm große BaFX:Eu $^{2+}$ -Kristalle (X = Cl, Br, J). Durch β -Strahlung können Elektronen des Kristalls in metastabile Zustände angeregt werden. Beim Scannen der Phosphoimagerplatte wird diese mit einem Laser punktweise abgetastet und der Übergang der Elektronen vom angeregten metastabilen Zustand in den stabilen Grundzustand induziert. Die bei dem induzierten Übergang in Form

von (Phosphoreszenz-) Strahlung freiwerdende Energie wird mit einem Photodetektor registriert.

Das Gel wird zunächst durch zweistündige Behandlung mit DMSO entwässert, wobei das DMSO zwischendurch dreimal erneuert wird. Anschließend wird das Polyacrylamidgel eine Stunde mit in DMSO gelöstem PPO behandelt. In dieser Zeit diffundiert das PPO in das Gel, wo es beim nachfolgenden zweistündigen Wässern weiß ausfällt. Das Gel wird anschließend auf ein angefeuchtetes Whatman-3MM-Papier transferiert und, wie für die normalen SDS-Gele in Kapitel 2.2.14. beschrieben, getrocknet. Das getrocknete Gel wird mit Klebestreifen auf einer 5 mm starken Kunststoffplatte befestigt, die ganze Platte zum Schutz der Phosphoimagerplatten mit Frischhaltefolie überzogen und in eine Filmkassette gelegt. Eine durch 20 minütiges Belichten mit weißem Licht in einem Löschergerät (Eraser, Raytest) gelöschte Phosphoimagerplatte (BAS-MP 2040 S, Fujifilm) wird auf das Gel gelegt und 6-16 Stunden exponiert. Anschließend wird die Phosphoimagerplatte mit einem Laserscanner (BAS-1500, Fujifilm) gescannt und die Bilddatei mit dem Programm TINA 2.0 (Version 2.09f, Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH) ausgewertet.

2.2.18 Westernblot

Beim Westernblot nach Khyse-Anderson (1984) werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Polyacrylamidgel durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dort können sie mit spezifischen Reagenzien nachgewiesen werden.

2.2.18.1 Transfer auf eine Nitrocellulosemembran

Der Proteintransfer erfolgt durch Semidry-Blotting in einer speziellen Westernblotkammer (Transblot SD, Biorad), die aus zwei platinbeschichteten Edelstahlplatten besteht. Diese dienen als Kathode und Anode.

Die Kathode wird mit Blottingpuffer befeuchtet. Dann werden 3 in Blottingpuffer getränkte Whatman 3MM Filterpapiere, die auf die Größe des Trenngels zugeschnitten wurden, luftblasenfrei aufgelegt. Es folgt die mit Blottingpuffer befeuchtete Nitrocellulosemembran (0,2 µm Porengröße, Roth) und das Polyacrylamidgel, welches zuvor in Blottingpuffer geschwenkt wurde. Darüber werden 3 in Blottingpuffer getränkte Whatmanpapiere gelegt. Nach oben wird der Blot durch die mit Blottingpuffer benetzte Anode abgeschlossen. Im Blotstapel dürfen sich keine Luftblasen befinden, da diese einen gleichmäßigen Proteinfluß verhindern. Des weiteren ist darauf zu achten, dass sich die Blotpapiere ober- und unterhalb des Polyacrylamidgels nicht berühren, da es sonst an dieser Stelle zu einem erleichterten Stromfluß kommt, was ebenfalls den Transfer des Proteins aus dem Gel heraus behindert.

Der einzustellende Stromfluß hängt von der Fläche des Gels ab. Bei 0,88 mA pro cm² Gelfläche ist der Transfer nach 60 min abgeschlossen. Zur Kontrolle, dass sich im Gel keine Proteine mehr befinden, kann dieses mit Coomassieblau gefärbt werden (Kap. 2.2.16) Der Nachweis, dass die Proteine aus dem Gel auf die Membran transferiert wurden, kann durch eine Ponceau-Rot-Färbung der Membran erbracht werden. Dazu wird die Membran für einige

Minuten in eine Ponceau S-Lösung gelegt und dann mit ddH₂O entfärbt. Proteinbanden erscheinen rot.

Blottingpuffer:

48 mM Tris
39 mM Glycin
1,3 mM SDS
20 % (v/v) Methanol

Ponceau S-Lösung:

2 % (w/v) Ponceau S
30 % (w/v) Trichloressigsäure
30 % (w/v) Sulfosalicylsäure

2.2.18.2 Immunologische Identifizierung von Proteinen auf der Westernblot-Membran

Unter Verwendung von Antikörpern können Proteine, die durch einen Westernblot auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert wurden, nachgewiesen werden. Teilweise ist es auch möglich, ihre Menge zu bestimmen.

Hat ein Antikörper spezifisch an ein Protein gebunden, wird er mit einem zweiten gegen ihn gerichteten (sekundären) Antikörper inkubiert, der entweder radioaktiv markiert oder kovalent an ein Enzym gebunden ist, das durch eine Farbreaktion detektiert werden kann.

Die Nitrocellulosemembran wird 2 h in einem Gemisch aus PBS-Tween und 5 % (w/v) Magermilchpulver geschwenkt. Dabei sättigen die Magermilch und Tween-20[®] unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran ab (Blatteiger und Newhall, 1982). Anschließend wird das Milchpulver kurz mit PBS-Tween abgespült. Der erste Antikörper wird in PBS-Tween mit 1 % (w/v) BSA verdünnt und 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C auf der Membran inkubiert. Danach wird die Antikörperlösung abgeschüttet und der Blot dreimal 20 min mit PBS-Tween bei Raumtemperatur gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Mit der Verdünnung des sekundären, peroxidasegekoppelten Antikörpers, der gegen den primären gerichtet ist, wird weitere 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundene Antikörpermoleküle werden abschließend durch Waschen mit PBS-Tween (3 x 20 min) entfernt.

PBS-Tween:

1x PBS
0,05% (w/v) Tween[®]-20

2.2.18.3 ECL-Detektion von Proteinen

Die Bestimmung der Lokalisation der Proteine auf der Membran erfolgt durch eine Chemolumineszenzreaktion, für die das ECL-System von Amersham verwendet wird. Die an den zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase aus Meerettich katalysiert die Oxidation von Luminol, einem Diacylhydrazin, in Gegenwart von Wasserstoffperoxid. Nach der Oxidationsreaktion befindet sich das Produkt zunächst in einem energetisch angeregten Zustand. Beim Übergang eines Elektrons aus diesem angeregten Zustand in den

Grundzustand wird Energie frei, die in Form eines Lichtquanten abgegeben wird. Die auftretenden Lichtblitze können mit Hilfe eines Autoradiographiefilms detektiert werden.

Die Durchführung erfolgt nach den Angaben in *ECL Western Blotting protocols* (Amersham, 1992). 5 ml Reagenz 1 und 5 ml Reagenz 2 werden gemischt und der Blot darin 60 s geschwenkt. Anschließend wird die Membran in eine Klarsichtfolie gesteckt und ein Röntgenfilm (BioMax, Kodak) aufgelegt. Entwickelt wird der Film in der Filmentwicklungsmaschine Optimax von Protec.

ECL Reagenzien 1 und 2: Die Zusammensetzung gibt der Hersteller nicht bekannt.

2.2.19 Proteinkonzentrationsbestimmung

2.2.19.1 Densitometrische Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration aufgereinigter Proteine erfolgt durch einen SDS-Gellauf zusammen mit einer BSA-Standardreihe. Von dem zu bestimmenden Protein werden 2-3 Proben mit einem Volumen zwischen 0,5 und 5 μl sowie je 10 μl einer BSA-Standardreihe mit 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; und 1,6 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ auf ein SDS-Polyacrylamidgel (Kap. 2.2.13.) geladen. Nach dem elektrophoretischen Lauf wird das Gel mit Coomassie Blue R250 gefärbt (Kap. 2.2.14.), luftblasenfrei zwischen zwei 0,5 mm starke Kunststoffplatten gelegt und mit einem Sharp JX-325 High Resolution Color Scanner gescannt. Die einzelnen Proteinbanden des so erhaltenen Bildes werden nach Abzug des Hintergrundes mit der 'Contour Band'-Funktion des Softwareprogramms ImageMasterTM 1-D (Pharmacia Biotech) detektiert und mit der 'contour band'-Funktion integriert. Durch lineare Regression wird aus den so erhaltenen ODxmm^2 -Werten und den bekannten BSA-Konzentrationen eine Eichgerade erstellt, aus welcher, unter der Annahme der gleichen Coomassie-Färbbarkeit von BSA und dem zu bestimmenden Protein, die Konzentration des zu untersuchenden Proteins errechnet wird. Durch diese Methode können im Gegensatz zur Bestimmung über photometrische Messung auch die Konzentrationen nicht 100% reiner Proteine mit derselben Genauigkeit bestimmt werden.

2.2.19.2 Photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung

Die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt mit Hilfe des BioRad DC Proteinassays. Damit lassen sich insbesondere die Konzentration von durch Gelfiltration homogen aufgereinigter Proteine schnell und zuverlässig photometrisch bestimmen.

Die Konzentrationsbestimmung basiert auf der Methode von Lowry *et al.* (1951), ist aber in Hinblick auf den Zeitbedarf sowie der Stabilität des Messsignals über einen Zeitraum von bis zu 2 Stunden optimiert. Zudem ist es kompatibel mit den meisten üblicherweise verwendeten Detergenzien (detergent compatible, DC) wie Triton X-100, SDS oder Tween-20.

Die Farbreaktion basiert auf der Reaktion von Protein mit einem alkalischen Kupfer-Tartrat-Komplex sowie einer nachfolgenden Reduktion von Folinreagenz durch das kupferbeladene Protein. Die Farbentwicklung wird vor allem durch die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan

sowie zu einem kleineren Teil durch Cystine, Cysteine und Histidine hervorgerufen (Peterson, 1979).

Für die Eichreihe werden jeweils 5,0 µg, 12,5 µg, 20,0 µg, 30 µg und 37,5 µg BSA in 25 µl ddH₂O durch Verdünnung einer geeigneten BSA-Stammlösung in Kunststoffküvetten (Sarstedt) gegeben und mit 125 µl Lösung A und 1 ml Lösung B gemischt. Als Referenz dient eine nur 25 µl ddH₂O enthaltende Probe. Von der zu bestimmenden Probe werden zwischen 20 und 30 µl eingesetzt und zur Kontrolle jeweils Proben mit der entsprechenden Menge des Puffers der Proteinlösung mitgeführt. Die Küvetten werden mit Parafilm verschlossen, gemischt und 15 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wird die Extinktion der Proben bei 750 nm gemessen. Aus den bekannten Mengen an eingesetztem BSA und den gemessenen Extinktionen wird mittels linearer Regression eine Eichgerade erstellt, aus welcher sich die Proteinkonzentration der zu bestimmenden Probe nach Subtraktion des evtl. auftretenden Pufferhintergrundes ermitteln lässt.

2.2.20 DNA-Sequenzanalyse

Bei der Polymerasekettenreaktion nimmt die Wahrscheinlichkeit für eine Punktmutation mit der Länge des zu amplifizierenden Bereiches zu. Um sicher gehen zu können, dass durch PCR generierte Klone die richtige Sequenz und keine Mutationen enthalten, wird durch DNA-Minipräparation das klonierte Plasmid aus den Bakterien isoliert und die Sequenz des Inserts durch Sequenzanalyse bestätigt.

Die hier angewendete DNA-Sequenzierung erfolgt nach der Methode von Sanger (1977) durch Kettenabbruch. Hierbei wird unter Verwendung eines spezifischen Primers, welcher komplementär zu einem vektoriiellen Bereich stromaufwärts bzw. stromabwärts des zu untersuchenden Insert ist, die DNA durch DNA-Polymerase und Desoxynukleotide in den Insertbereich hinein neu synthetisiert. Um die neu synthetisierten Stränge zu markieren, wird zunächst eine Markierungsreaktion mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden durchgeführt und nachfolgend mit der Terminationsreaktion kombiniert. Hierfür sind die 2',3'-Dideoxynukleotide (ddNTP) mit jeweils einem anderen Fluorophor versehen. Dadurch ergeben sich statistisch verteilt unterschiedliche Kettenlängen, die mit jeweils einem für das jeweilige Nukleotid spezifischen Farbstoff enden (Lee *et al.*, 1992). Diese DNA-Fragmente werden durch eine Kapillargelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und beim Passieren eines Fensters durch Anregung mit LASER-Licht zur Fluoreszenz gebracht. Die je nach Nukleotid bzw. Fluorophor emittierten unterschiedlichen Wellenlängen werden fokussiert, von einem Spektrographen nach Wellenlänge zerlegt und simultan von einer CCD-Kamera (charge-coupled device) aufgenommen und digitalisiert. Anschließend werden die Rohdaten mit Hilfe der ABI Prism DNA Sequencing Analysis 3.0 Software ausgewertet und als scf-Datei abgespeichert.

Sequenzierungsansatz:

250 ng DNA in HPLC-H₂O (600 ng bei pSFV und pSCA basierenden Vektoren)

1 pmol Primer

2 µl BigDye RR Terminator AmpliTaq

ad 10 µl mit HPLC-H₂O

Sequenz-Reaktion mit Hybaid Touchdown Thermocycler

Programmablauf:

Doppelstrangtrennung	30 s bei 96°C
Primerbindung	15 s bei 50°C
Strangverlängerung (Polymerisation)	4 min bei 60°C
	25 Zyklen
	abkühlen auf 4°C

Nach der abgeschlossenen Sequenzreaktion wird die neu synthetisierte DNA von überschüssigen, nicht eingebauten fluoreszenzmarkierten 2',3'-Dideoxynukleotiden durch DNA-Präzipitation abgetrennt. Dazu wird zum Reaktionsansatz 90 µl HPLC-H₂O und 10 µl 3 M Natriumacetat-Lösung, pH 4,6 gegeben. Zur DNA-Präzipitation werden 250 µl abs. Ethanol hinzugefügt, gemischt und 15 min bei 14000 rpm (RT, 5415 C, Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig entfernt und das Pellet mit 250 µl 70% (v/v) Ethanol/HPLC-H₂O zur Entfernung von präzipitiertem Salz gewaschen und erneut 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Auch dieser Überstand wird verworfen. Das Pellet wird 5 min bei 37°C getrocknet und in 25 µl HPLC-H₂O gelöst. Die DNA wird anschließend durch Inkubation für 2 min bei 90°C denaturiert und das Reaktionsgefäß mit einem Gummiseptum versehen.

Die Analyse erfolgt mit einem ABI PRISM 310 von Perkin Elmer

Kapillare (grün):	Lichte Weite 50 µm, Länge 47 cm
Polymer:	POP-6, 8 M Harnstoff
Puffer:	1 x GA mit EDTA
Leseweite:	ca. 450 Basen in 55 min

Das Chromatogramm der DNA-Sequenzanalyse wird als Chromatogramm-Datei im scf-Dateiformat mit dem Programm Chromas 1.51 von Technelysium Pty Ltd auf Mutationen überprüft.

2.2.21 *In vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription ermöglicht die zellfreie Synthese von mRNA im µg-Maßstab. Dazu werden Vektoren benötigt, welche stromaufwärts des zu transkribierenden Fremdgens einen Promotor für phagencodierte RNA-Polymerase besitzen. Es werden, abhängig von auf dem Transkriptionsvektor vorhandenem Promotor, RNA-Polymerasen des Phagen SP6 aus *Salmonella typhimurium* oder der Bakteriophagen T3 und T7 verwendet. Die für die *in vitro* Transkription eingesetzte DNA wird für eine bessere Transkriptionseffizienz durch einen Restriktionsschnitt (Kap. 2.2.3.) linearisiert und die Restriktionseendonuklease durch Phenol-Chloroform-Extraktion (Kap. 2.2.6.2) entfernt. Nach Ethanolpräzipitation der linearisierten DNA (Kap. 2.2.6.3.) wird diese in DEPC-Wasser aufgenommen, wobei eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt wird. Durch Verwendung des Cap-Struktur-Analogons 7m-3'Gppp5'G (Capping-Reagenz) wird die entstehende mRNA stabilisiert und deren Translationseffizienz

erhöht. Das Cap-Struktur-Analogon wird *in vitro* beim Transkriptionsstart an das 5'-Ende der mRNA eingebaut.

Transkriptionsansatz:

- 2 µl linearisierte DNA (2 µg)
- 5 µl 10x Transkriptionspuffer
- 5 µl 100 mM DTT
- 0,5 µl BSA (10 mg/ml)
- 5 µl 5 mM rATP
- 5 µl 5 mM rCTP
- 5 µl 5 mM rUTP
- 5 µl 0,5 mM rGTP
- 5 µl 5 mM Capping-Reagenz (7m-3'Gppp5'G)
- 11 µl ddH₂O
- 0,5 µl RNasin (40 U/µl)
- 0,5 µl (10 U) RNA-Polymerase

10x Transkriptionspuffer:

- 400 mM Tris-HCl, pH 8,0
- 60 mM MgCl₂
- 100 mM DTT
- 20 mM Spermidin

Der Ansatz wird 60 Minuten bei 37°C inkubiert, wobei nach 30 Minuten nochmals die gleiche Menge RNA-Polymerase zugegeben wird. Von dem Transkriptionsansatz werden 2,5 µl abgenommen, mit 2 µl RNA-Gelladepuffer und 8 µl DEPC-Wasser versetzt und auf einem 2%igen Agarosegel analysiert (Kap. 2.2.5.).

2.2.21.1 Phenol-Chloroform-Extraktion von in vitro Transkriptionsansätzen

Zum Entfernen der RNA-Polymerase nach erfolgter Transkription werden zu dem restlichen Ansatz 150 µl DEPC-Wasser und 200 µl Phenollösung gegeben, kurz auf einem Vibrationsmischer gemischt und 1 Minute mit 14000 rpm zentrifugiert (5415 C, Eppendorf). Der Überstand wird abgenommen und wiederum mit 200 µl Phenollösung versetzt, gemischt und zentrifugiert. Dies wird mit dem Überstand ein weiteres Mal wiederholt, anschließend wird in der wässrigen Phase verbliebenes Phenol durch zweimalige Extraktion mit DEPC-Wasser gesättigtem Chloroform entfernt. Nach dem Abnehmen der wässrigen Phase werden RNA und DNA daraus durch Zusatz von 30 µl 4 M Ammoniumacetat-Lösung und 480 µl absolutem Ethanol und Inkubation bei -80°C über Nacht gefällt. Nach Zentrifugation (10 min, 14000 rpm) wird der Überstand verworfen und das Pellet mit 400 µl 70%igem Ethanol (280 µl abs. Ethanol + 120 µl DEPC-Wasser) gewaschen und 5-10 Minuten bei 30°C getrocknet. Anschließend wird das Pellet in 20 µl DEPC-Wasser unter Zusatz von 0,5 µl RNasin gelöst.

Phenol-Lösung:

1 kg Phenol, verflüssigt bei 40 °C
 441 ml 1 M Tris/HCl, pH 7,8
 55 ml H₂O
 55 ml m-Kresol
 2,2 ml β-Mercaptoethanol
 1,5 g 8-Hydroxychinolin
 gegen TE-Puffer, pH 8,0, equilibriert

Chloroform:

Mit DEPC-Wasser gesättigtes
 Chloroform

2.2.22 In vitro Translation

Durch *in vitro* Translation von mRNA kann Protein radioaktiv markiert werden. Dazu wird im Translationsansatz ein Aminosäure-Mix ohne Methionin verwendet und ³⁵S-Methionin zugesetzt. Zur Translation wird Retikulocytenlysate von Kaninchen verwendet, welches durch Behandlung mit *Micrococcus*-Nuklease aus *Staphylococcus aureus* von endogener mRNA befreit wurde, wodurch die Hintergrundtranslation verringert wird. *Micrococcus*-Nuclease ist Ca²⁺ abhängig und kann durch Zusatz eines Chelatbildners wie EDTA vollständig inhibiert werden. Das Retikulocytenlysate enthält alle für die Proteinbiosynthese notwendigen Komponenten wie Ribosomen, tRNAs, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, Enzyme und Proteine für die Initiation, Elongation und Termination der Proteinbiosynthese, energieliefernde Systeme sowie K⁺- und Mg²⁺-Ionen.

Der 7-Methylguanostrest des Cap-Struktur-Analogons ist in eukaryontischen Zellen ein wichtiges Signal für die Initiation der Transkription von mRNA. Er reagiert unter Zusammenspiel mit spezifischen Cap-Bindungsproteinen mit der 40S-Untereinheit der Ribosomen. Daraufhin wandert die 40S-Untereinheit in 3'-Richtung entlang der mRNA bis zum Initiationscodon AUG, wo das Ribosom endgültig aus den Untereinheiten zusammengesetzt wird und die Translation startet.

Translationsansatz:

8,5 µl Retikulocytenlysate
 0,4 µl Aminosäure-Mix ohne Methionin
 1,0 µl [³⁵S]-Methionin
 2,6 µl mRNA aus Transkription (Kap. 2.2.18.)

Der Translationsansatz wird 60 Minuten bei 30°C inkubiert und bis zur Weiterverwendung auf Eis gelagert. 0,5 µl des Translationsansatzes werden auf einem SDS-Gel (Kap. 2.2.13.) analysiert.

2.2.23 Komplexstabilitätstest

2.2.23.1 Bildung von ³⁵S-markiertem ternärem SNARE-Komplex

Der ternäre SDS-resistente Komplex wird unter Verwendung des GST-Fusionsproteins Syntaxin 1A an Glutathion-Sepharose-Beads[®] (Pharmacia Biotech) aufgebaut. Für jeden Ansatz werden 150 µl der suspendierten Beads verwendet, was einem Beadvolumen von 100 µl entspricht. Diese werden durch zweimaliges Waschen mit 1 ml Bindungspuffer äquilibriert. Alle folgenden Waschschrte werden bei 4°C durch Zugabe von eisgekühltem Puffer, kurzes Resuspendieren, anschließende Sedimentation der Glutathion-Sepharose-Beads durch Zentrifugation (1 min, 14000 rpm, 4°C, 5415C, Eppendorf) und Verwerfen des Überstandes durchgeführt. Zuerst wird der binäre Komplex aus GST-Syntaxin und SNAP-25-His₆ an die Beads gebunden. Dazu werden 14,25 µg (0,25 nmol) GST-Syntaxin und 50µg (2,0 nmol) SNAP-25A-His₆ in 1 ml Bindungspuffer mit den äquilibrierten Beads gemischt. Nach 2 Stunden Inkubation im Über-Kopf-Schüttler (Eigenbau) bei 4°C wird ungebundenes SNAP-25 durch dreimaliges Waschen mit 1 ml Bindungspuffer entfernt. Die Beads werden in 1 ml Bindungspuffer aufgenommen, und zur Bildung des mit ³⁵S radioaktiv markierten Komplexes werden 10 µl Translationsansatz (Kap. 2.2.19.) zugegeben und über Nacht bei 4°C im Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Zur Entfernung des bei der Translation nicht eingebauten [³⁵S]-Methionins sowie der im Retikulocytenlysat enthaltenen Proteine wird dreimal mit 1 ml Waschpuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrte wird dazu der Überstand von den Glutathion-Sepharose-Beads quantitativ abgenommen. Die Beads werden in 330 µl 1x SDS-Gelladepuffer aufgenommen und auf 10 500 µl PCR-Gefäße (Sarstedt) verteilt. Die Proben werden zusammen mit den Vergleichsproben in einer auf die entsprechende Temperatur vorgewärmten PCR-Maschine jeweils 10 Minuten inkubiert und anschließend bis zur Analyse auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel kurz auf Eis gelagert.

Inkubationstemperaturen: 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C.

Bindungspuffer:

4 mM HEPES-NaOH, pH 7.4
 100 mM NaCl
 3,5 mM CaCl₂
 3,5 mM MgCl₂
 1 mM EDTA
 0.1 % Nonidet P-40

Waschpuffer:

50 mM Tris-HCl, pH 8.0
 100 mM NaCl
 0.1 % Nonidet P-40

Nach dem Ende des Gellaufs werden die Gele wie in Kapitel 2.2.17 beschrieben mit DMSO/PPO behandelt, getrocknet und mit dem Phosphoimager ausgewertet. Dabei wird der Anteil von ³⁵S-markiertem ternärem SNARE-Komplex in Relation zu der Gesamtmenge an ³⁵S-markiertem Synaptobrevin und ternärem SNARE-Komplex für die betrachteten Inkubationstemperaturen gesetzt.

2.2.24 Dissoziation des ternären SNARE-Komplexes durch α -SNAP/NSF

Der ternäre SNARE-Komplex wird durch die Chaperonwirkung der ATPase NSF und das Adapterprotein α -SNAP in die monomeren SNARE-Proteine zerlegt. Dazu wird der ternäre SNARE-Komplex aus GST-Syntaxin, SNAP-25 und durch invitro Transkription / Translation ^{35}S -markiertem Synaptobrevin an GT-Sepharosebeads zusammengesetzt, gewaschen und durch Inkubation mit α -SNAP und NSF in Gegenwart von MgATP dissoziiert. Das durch Dissoziation von den GT-Sepharosebeads in den Überstand gehende Protein wird vom undissoziierten, auf den GT-Sepharosebeads verbleibendem SNARE-Komplex und GST-Syntaxin abgetrennt. Die Proteine des Überstandes werden durch Fällung mit TCA auf das gleiche Volumen wie das an GT-Sepharosebeads gebundene Protein gebracht und gleiche Volumina durch SDS-PAGE auf einem 15%igen Gel analysiert. Dazu wird die Menge des mit ^{35}S -markierte Synaptobrevin nach Behandlung der Gele mit DMSO/PPO mit Hilfe eines Phosphoimagers, wie in Kapitel 2.2.17 beschrieben, quantifiziert. Der Anteil an dissoziiertem ternären SNARE-Komplex wird dabei errechnet, indem der Anteil des sich im Überstand befindlichen ^{35}S -Synaptobrevins ins Verhältnis zur Gesamtmenge von ^{35}S -Synaptobrevin im Überstand und gebunden an GT-Sepharose gesetzt wird. Als Kontrollen werden Ansätze mit EDTA statt MgATP im Puffer sowie ohne α -SNAP/NSF mitgeführt. Von den GT-Sepharosebeads werden Proben nach Inkubation für 10 Minuten bei 37°C und bei 99°C analysiert, um die erfolgreiche Komplexbildung zu kontrollieren. Bei der Untersuchung von Mutanten der SNARE-Proteine werden Ansätze mit mutierten und unmutierten Proteinen parallel untersucht.

Equilibrierungspuffer:

1x PBS
2 mM EDTA pH 8.0
0.1% NP-40

Bindungspuffer:

20 mM Hepes-KOH pH 7.0
100 mM KCl
2 mM EDTA
1 mM DTT
0.5% Triton X-100

Dissoziationspuffer:

20 mM Hepes-KOH pH 7.0
100 mM KCl
1 mM ATP
1.6 % Glycerin
0.5 % Triton X-100
0.1 % BSA
1 mM DTT

Dissoziationspuffer mit MgCl_2 :

20 mM Hepes-KOH pH 7.0
100 mM KCl
1 mM ATP
1.6 % Glycerin
0.5 % Triton X-100
0.1 % BSA
1 mM DTT
2 mM MgCl_2

Dissoziationspuffer mit EDTA:

20 mM Hepes-KOH pH 7.0
100 mM KCl
1 mM ATP
1.6 % Glycerin
0.5 % Triton X-100
0.1 % BSA
1 mM DTT
2 mM EDTA

Für jeden zu untersuchenden SNARE-Komplex werden 71,5 µl GT-Sepharosebeadsuspension, entsprechend einem Beadvolumen von 55 µl, durch dreimaliges Waschen mit 500 µl Equilibrierungspuffer equilibriert und mit 14,25 µg (0,25 nmol) GST-Syntaxin in 750 µl Bindungspuffer 2 Stunden bei 4°C in einem Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Anschließend wird ungebundenes GST-Syntaxin durch dreimaliges Waschen mit 500 µl Bindungspuffer entfernt. Es werden 50 µg (2,0 nmol) SNAP-25 und 10 µl ³⁵S-Synaptobrevin enthaltender *in vitro* Transkriptions- / Translationsansatz (siehe Kapitel 2.2.22) zugegeben, mit Bindungspuffer auf 1 ml aufgefüllt und über Nacht bei 4°C im Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Ungebundenes Protein sowie bei der *in vitro* Transkription / Translation nicht eingebautes ³⁵S-Methionin wird durch dreimaliges Waschen mit 500 µl Bindungspuffer sowie zweimaliges Waschen der GT-Sepharosebeads mit 500 µl Dissoziationspuffer entfernt. Die GT-Sepharosebeads werden in 150 µl Dissoziationspuffer aufgenommen und jeweils 40 µl davon in eines von 4 Eppendorfreaktionsgefäße gegeben.

Für einen Dissoziationsansatz werden 32 µg α-SNAP und 12 µg NSF zugegeben, mit Dissoziationspuffer mit MgCl₂ auf 600µl aufgefüllt und durch Zugabe von 1,2 µl 1 M MgCl₂ eine Endkonzentration von 2 mM MgCl₂ eingestellt.

Als Kontrollansatz wird in einem Gefäß statt mit MgCl₂-haltigem Dissoziationspuffer mit EDTA-haltigem Dissoziationspuffer aufgefüllt, zu einem Ansatz kein α-SNAP und zu einem weiteren weder α-SNAP noch NSF gegeben. Die Ansätze werden bei 4°C im Über-Kopf-Schüttler für eine Stunde inkubiert und nach Zentrifugation (1 min., 4°C, 5000 rpm, Eppendorf 5415C) der Überstand in ein frisches Gefäß überführt. Durch Zugabe von 550 µl 20% TCA und Inkubation für 30 Minuten auf Eis wird das enthaltende Protein gefällt. Nach Zentrifugation (10 min., 4°C, 13000 rpm, Eppendorf 5415C) wird das erhaltene Pellet zur Entfernung von TCA zweimal mit 600 µl Aceton gewaschen, 3 Minuten bei 37°C getrocknet und in 30 µl 2x SDS-Ladepuffer bei 37°C gelöst. Durch Zugabe von 0,5M Tris pH 8.8 bis zur normalen Blaufärbung des Ladepuffers wird der pH-Wert korrigiert. Es wird mit ddH₂O auf 60 µl aufgefüllt und 60 µl 1x SDS-Ladepuffer zugegeben.

Die GT-Sepharosebeads werden nach entfernen des Überstandes dreimal mit 500 µl des entsprechenden Dissoziationspuffer gewaschen, mit 20 µl ddH₂O und 30 µl 2x SDS-Ladepuffer versetzt und 30-60 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation (1min., RT, 5000 rpm, Eppendorf 5415C) werden 50 µl des Überstandes abgenommen und die GT-Sepharosebeads nochmals kurz mit 50 µl 1x SDS-Ladepuffer extrahiert. Beide Überstände der

Extraktion werden vereinigt, mit der entsprechenden Menge des für die Neutralisation der Überstände nach der TCA-Fällung eingesetzten 1 M Tris pH 8.8 versetzt und auf 120 µl aufgefüllt. Jeweils 60 µl werden für 10 Minuten bei 37°C und 99°C inkubiert. Von den so vorbereiteten Proben werden jeweils 10 µl auf ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel geladen und wie in Kapitel 2.2.17 beschrieben für die Detektion von ³⁵S-markiertem Synaptobrevin mit dem Phosphoimager vorbereitet.

2.2.25 Bindung von α-SNAP an den ternären SNARE-Komplex

Ein Mol des ternären SNARE-Komplexes bindet unter sättigenden Bedingungen 3 Mol des Adapterproteins α-SNAP (T. Hayashi *et al.*, 1995). Zur Untersuchung, ob die Bindungseigenschaften des ternären SNARE-Komplexes durch die Einführung von Mutationen der an der Oberfläche des Komplexes liegenden Aminosäuren verändert ist, werden die Bindungseigenschaften wie von Hayashi *et al.*, 1995 beschreiben, untersucht.

Dazu wird der ternäre SNARE-Komplex aus GST-Syntaxin, SNAP-25-His₆ und His₆-Synaptobrevin an GT-Sepharosebeads zusammengesetzt, mit verschiedenen molaren Überschüssen an His₆-α-SNAP inkubiert, ungebundenes α-SNAP weggewaschen und die Menge an gebundenem α-SNAP nach der Dissoziation des SNARE-Komplexes durch zehnmütige Inkubation bei 99°C in SDS-Ladepuffer mittels SDS-PAGE, Coomassiefärbung und densitometrische Auswertung, wie in Kapitel 2.2.19.1 beschrieben, bestimmt. Die gebundene Menge an α-SNAP wird dazu jeweils mit der detektierten Menge GST-Syntaxin und SNAP-25 ins Verhältnis gesetzt und unter Annahme der gleichen Färbbarkeit das stöchiometrische Verhältnis berechnet. Zur Kontrolle, ob das zugegebene α-SNAP unspezifisch an GT-Sepharosebeads bindet oder präzipitiert, wird ein Kontrollansatz mit GT-Sepharosebeads ohne SNARE-Proteine aber unter Zugabe der größten Menge an α-SNAP entsprechend mitgeführt.

Für jeden Ansatz werden 30µl GT-Sepharosebeads dreimal mit 500 µl Equilibrierungspuffer equilibriert und 4 µg GST-Syntaxin (1-267), 6 µg SNAP-25-His₆ und 6 µg His₆-Synaptobrevin zugegeben, mit Equilibrierungspuffer auf 400 µl aufgefüllt und bei 4°C über Nacht im Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Ungebundenes Protein wird durch dreimaliges Waschen mit 400 µl Bindungspuffer entfernt. Für einen vierfachen molaren Überschuß werden 10 µg His₆-α-SNAP, für zweiunddreißigfachen Überschuß 80 µg His₆-α-SNAP zugegeben, mit Bindungspuffer auf 200 µl aufgefüllt und bei 4°C 3 Stunden im Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Ungebundenes α-SNAP wird durch dreimaliges Waschen der Beads mit jeweils 400 µl Bindungspuffer entfernt die gebundenen Proteine durch zehnmütige Inkubation mit 15 µl SDS-Ladepuffer bei 99°C von den GT-Sepharosebeads eluiert und 10 µl auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

Equilibrierungspuffer:

20 mM Tris pH 7.4
 200 mM NaCl
 1 mM DTT
 0.1% Lubrol

Bindungspuffer:

20 mM Hepes-KOH pH 7.0
 100 mM KCl
 2 mM EDTA
 1 mM DTT
 0.5% Triton X-100

2.2.26 Gelfiltration

Durch Gelfiltration lassen sich insbesondere hochmolekulare Stoffe auf Grund ihrer Molekülgröße und dem damit verbundenem Molekulargewicht trennen. Der Vorteil der Gelfiltration gegenüber der Gelelektrophorese ist die relativ große Unabhängigkeit der Trennwirkung vom verwendeten Puffer. Im Gegensatz zur Gelelektrophorese kann z.B. auch Guanidiniumchlorid im Laufpuffer enthalten sein. Die Trennung der Substanzen erfolgt auf einer mit SuperdexTM-75 oder SuperdexTM-200 gefüllten HR 10/30 (Pharmacia Biotech) Säule, durch welche das zu trennende Stoffgemisch mit einem Druck von bis zu 1,8 MPa (1,5 MPa für SuperdexTM-200) gepumpt wird. SuperdexTM-75/200 besteht aus kovalent an hochquervernetzte poröse Agarose gebundenem Dextran mit einer Korngröße von 13-15 µm Durchmesser und zeichnet sich durch eine hohe chemische Resistenz aus. Die einzelnen Substanzen des zu trennenden Stoffgemisches können, bedingt durch ihre unterschiedliche Molekülgröße, verschieden stark in die Poren der Gelmatrix diffundieren, weshalb kleine Moleküle, die tief in den Porenraum diffundieren, einen längeren Weg in der Säule zurücklegen als größere Moleküle, welche schlechter in die Poren diffundieren können. Die durch den längeren Aufenthalt in den Poren stärker retardierten kleinen Moleküle werden entsprechend später als große Moleküle von der Säule eluiert. SuperdexTM-75/200 besitzt eine Ausschlußgrenze (exclusion limit) von ungefähr 100 kDa / 1 MDa für globuläre Proteine, das heißt, Moleküle mit einem Gewicht von mehr als 100 kDa bzw. 1 MDa können nicht mehr in die Poren diffundieren und werden daher mit dem Leervolumen der Säule (void volume, v_0) eluiert. Das Leervolumen der Säule wird durch einen Gelfiltrationslauf mit Blue Dextran 2000 (Pharmacia) bestimmt, was ein Molekulargewicht von 2000 kDa besitzt und nicht in die Poren diffundieren kann. Dazu wird 1 mg Blue Dextran 2000 in 500 µl Laufpuffer gelöst, ungelöste Bestandteile durch Zentrifugation sedimentiert (10 min, 14000 rpm, 5415 C, Eppendorf) und 100 µl unter den gleichen Flußbedingungen wie die späteren Gelfiltrationsläufe auf der Säule untersucht. Das Leervolumen wird durch Detektion der Absorption bei 620 nm bestimmt.

Ein weiterer Effekt der Gelfiltration ist ein Pufferaustausch. Da der mit einer Probe injizierte Puffer erst nach einem Säulenvolumen eluiert, kann während des Gelfiltrationslaufes gleichzeitig ein Pufferaustausch erfolgen, was insbesondere bei den unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigten Proteinen SNAP-25 und Synaptobrevin einen weiteren Dialyseschritt erspart.

Zur präparativen Reinigung von Proteinen wird jeweils 750 µl Proteinlösung mit einer 1 ml Einwegspritze in eine 1 ml Probenschleife gefüllt und auf der mit 50 ml Laufpuffer

equilibrierten Säule getrennt. Der Gelfiltrationslauf wird bei den Wellenlängen 220, 254 und 280 nm verfolgt und ab einem Elutionsvolumen von 7,5 ml (gemessen ab Probeninjektion auf die Säule) bis zu einem Elutionsvolumen von 22 ml werden signifikante Mengen Protein enthaltende Peaks unter Tropfensynchronisation fraktioniert. Jeweils 5 µl der Fraktionen werden mittels SDS-PAGE auf ihre analysiert und vereinigt.

HPLC: ÄKTApurifier 10 mit Fraktionssammler Frac-900 (Pharmacia Biotech)
Software: Unicorn 2.0 (Pharmacia Biotech)
Probenschleife: 1 ml
Säulen: Superdex 75 HR 10/30 und Superdex 75 HR 10/30 (Pharmacia Biotech)
Flußrate: 0,5 ml/min

2.2.27 Limitierter Verdau des ternären SNARE-Komplexes mit Proteinase-K und Trypsin

2.2.27.1 Zusammensetzung und limitierter Verdau des SNARE-Komplexes

Zur Untersuchung des Einflusses von Aminosäuremutationen auf die Lage der einzelnen Helices im ternären SNARE-Komplex wird der ternäre SNARE-Komplex einem Verdau mit den Proteasen Proteinase K und Trypsin unterworfen. Dazu wird der ternäre SNARE-Komplex aus 3.6 nmol Syntaxin-His₆, 3.6 nmol SNAP-25-His₆ und 3.6 nmol Synaptobrevin-His₆ in 600 µl Standardpuffer durch Inkubation für 16 Stunden bei 4°C im Über-Kopf-Schüttler gebildet und, nach Entnahme eines Aliquots zur Analyse mittels SDS-PAGE, mit 0.91 µg Proteinase K (Boehringer Mannheim) und 0.91 µg Trypsin (Boehringer Mannheim) gelöst in 15 µl Standardpuffer versetzt. Nach Inkubation für 30 Minuten bei 37°C wird der Verdau durch Zugabe von Proteaseinhibitor (300 µg Pefabloc SC und 1 µg Trypsininhibitor aus Sojabohnen (beides Boehringer Mannheim)) sowie Abkühlung auf 0°C gestoppt. Nach der Entnahme eines Aliquots zur SDS-PAGE-Analyse wird der nach dem Proteaseverdau übrigbleibende proteaseresistente Kernkomplex durch Gelfiltration (siehe Kapitel 2.2.26) über eine Superdex 200 HR 10/30 Säule (Pharmacia Biotech) aus dem Reaktionsgemisch isoliert. Die gesammelten Fraktionen werden durch SDS-PAGE analysiert, die den proteaseresistenten Kernkomplex enthaltenden Fraktionen vereinigt und in einer SpeedVac (Sorvall) lyophilisiert.

Standardpuffer:

20 mM Tris pH 7.4
100 mM NaCl
1 mM DTT

2.2.27.2 Analyse des ternären SNARE-Komplexes nach Verdau mit Proteinase K und Trypsin durch RP- μ HPLC, Aminosäuresequenzierung und Massenspektrometrie

Das Lyophilisat des isolierten proteaseresistenten Kernkomplexes wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Harald John vom Niedersächsischen Institut für Peptidforschung in Hannover charakterisiert. Dazu wurden die Lyophilisate in 50 μ l eines angesäuerten Wasser/Acetonitril-Gemisches (30% v/v Acetonitril, 0.06% v/v TFA) gelöst und 20 μ l des Gemisches an einer Jupiter C4-RP-Säule chromatographisch in die einzelnen Bestandteile getrennt und fraktioniert.

HPLC-Ausrüstung:

Solvent Delivery System 140B (Applied Biosystems)
 Programmable Absorbance Detector 785A (Applied Biosystems)
 Oven Injector 112A mit 20 μ l Probenschleife (Applied Biosystems)
 Chromjet Integrator (SpectraPhysics)
 Jupiter C4; 150 x 1 mm I. D. (Phenomenex)
 Eluent A: 0.06% (v/v) TFA in Wasser
 Eluent B: 0.05% (v/v) TFA in Acetonitril
 Flussrate: 20 μ l/min
 Fraktionierung: 1 min/Fraktion
 Gradient:

Zeit [min]	0	70	75	80	90
Eluent B [vol-%]	10	80	95	95	10

Die zu Peakmaxima gehörenden Fraktionen wurden vollständig mittels Edman-Sequenzierung N-terminal sequenziert und zur Bestimmung der C-Termini die Masse bestimmt.

Aminosäuresequenzer:

Sequencer Procise 494 (Applied Biosystems)
 Microgradient System 140C (Applied Biosystems)
 Programmable Absorbance Detector 785A (Applied Biosystems)
 Software Model 610A 2.1 (Applied Biosystems)

MALDI-TOF Massenspektrometer:

Voyager RP Biospectrometry Workstation (PerSeptive Biosystems) gesteuert durch die Software GRAMS/386, Version 3.04, Level III im linearen Modus (PerSeptive Biosystems).
 Matrix: Cyano-hydroxyzimtsäure / Fucose

2.2.28 Bindung von Ca^{2+} an den ternären SNARE-Komplex

Die direkte Bindung von zweiwertigen Calciumionen an den ternären SNARE-Komplex lässt sich durch Gleichgewichtsdialyse in Gegenwart von radioaktivem $^{45}\text{CaCl}_2$ detektieren (Brose *et al.*, 1992). Dazu wird ternärer SNARE-Komplex zusammen mit Liposomen in einem Dialyseschlauch mit ^{45}Ca markiertem Ca^{2+} /EGTA-Puffern mit definierten Konzentrationen an freiem Ca^{2+} ins Gleichgewicht gebracht und die Calciumgesamtkonzentration im Puffer sowie im Dialyseschlauch durch Flüssigszintillationsmessung (siehe Kapitel 2.2.28.3) bestimmt. Findet im Dialyseschlauch eine Calciumbindung an Protein und Liposomen statt, so erhöht sich dadurch die Gesamtkonzentration an Calcium im Dialyseschlauch. Durch Abzug der Calciumkonzentration des Dialysepuffers von der gemessenen Calciumkonzentration im Dialyseschlauch ergibt sich die Konzentration des an Protein und Liposomen gebundenen Calciums. Der nur an die Liposomen gebundene Calciumanteil kann durch mitführen von Proben, welche identisch zusammengesetzt sind, jedoch kein Protein erhalten, durch Subtraktion eliminiert werden, wodurch die Konzentration des nur an Protein gebundenen Calciums ermittelt wird. Durch Bezug der Konzentration des an Protein gebundenen Calciums auf die Proteinkonzentration ergibt sich die Zahl Calciumionen, welche an ein Molekül des ternären SNARE-Komplexes binden. Da es während der Dialyse durch osmotische Effekte zur Änderung der Protein- und Liposomenkonzentration im Dialyseschlauch kommen kann, wird diese Änderung durch Zusatz von Blue Dextran (Amersham Pharmacia Biotech) und Messung der Extinktion der Proben bei 620 nm vor und nach der Dialyse detektiert, berechnet, und die Messwerte entsprechend korrigiert.

2.2.28.1 Zusammensetzung des ternären SNARE-Komplexes

Für die Messung der Calciumbindung an den SNARE-Komplex werden acht Proben von jeweils 1 ml Volumen mit einer Proteinkonzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ bei acht verschiedenen Konzentrationen an freiem Ca^{2+} inkubiert.

Für jeden zu untersuchenden SNARE-Komplex werden 1 ml GT-Sepharosebeadsuspension dreimal mit je 1 ml Bindungspuffer equilibriert, 2 mg GST-Syntaxin (1-267), 10 mg SNAP-25-His₆ und 5 mg His₆-Synaptobrevin2 zugegeben, mit Bindungspuffer auf 15 ml aufgefüllt und über Nacht bei 4°C im Über-Kopf-Schüttler inkubiert.

Nach Sedimentation der GT-Sepharosebeads durch Zentrifugation (1 min., 4°C, 1000 rpm, Eppendorf 5415R) wird der Überstand mit dem ungebundene Protein abgenommen und durch dreimaliges Waschen mit 5 ml Thrombinspaltungspuffer Reste von ungebundenem Protein entfernt. Der ternäre SNARE-Komplex wird durch Spaltung des GST-Syntaxins durch Inkubation für eine Stunde mit 3,345 U Thrombin (Boehringer Mannheim) in 4 ml bei RT von den GT-Sepharosebeads freigesetzt, die GT-Sepharosebeads mit dem verbleibendem GST-Anteil durch Zentrifugation (1 min., 4°C, 1000 rpm, Eppendorf 5415R) sedimentiert und der den ternären SNARE-Komplex enthaltende Überstand abgenommen. Die GT-Sepharosebeads werden zur vollständigen Elution des abgespaltenen ternären SNARE-Komplexes viermal mit 750 μl Thrombinpuffer gewaschen und nach Sedimentation der Beads durch Zentrifugation (1 min., 4°C, 1000 rpm, Eppendorf 5415R) alle Überstände vereint. Das Volumen wird durch Zugabe von Thrombinpuffer auf 7,220 ml aufgefüllt und 100 μl Probe

zur Analyse und Proteinkonzentrationsbestimmung mittels SDS-Page (Kapitel 2.2.19.1) und BioRad DC Proteinkonzentrationsassay (Kapitel 2.2.19.2) abgenommen.

Es werden 680 μ l Liposomen (20 mg/ml, 75% DPPC/25% DPPS, Novosom) und 200 μ l Blue Dextran (10,9 mg/ml) zugegeben, gemischt und die Extinktion bei 620 nm im Photometer gegen Thrombinpuffer gemessen (Pharmacia Biotech Spectroquant). Zur Bestimmung der Calciumbindung an Liposomen wird 7,120 ml Thrombinpuffer ebenfalls mit 680 μ l Liposomen und 200 μ l Blue Dextran versetzt, die Extinktion bei 620 nm bestimmt und entsprechend den anderen Proben weiterbehandelt.

Jeweils 1 ml Probenlösung wird in einen durch kurzes Kochen in ddH₂O rehydrierten Dialyseschlauch (10 mm Visking, Roth) gefüllt und mit Dialyseclips verschlossen. Alle Proben werden 16 Stunden gegen 2 Liter calciumfreien Dialysepuffer, in welchem zur Entfernung von Calciumkontaminationen 6g Chelex 100 (Sigma) in einem Dialyseschlauch (25 mm Visking, Roth) zugegeben werden. Anschließend werden die Proben 18 Stunden bei 13°C gegen 200 ml des, wie in Kapitel 2.2.28.2 beschrieben, zusammengesetzten Ca-EGTA-Puffers dialysiert. Die Inkubation erfolgt dabei in einem Wasserbad unter Rühren der einzelnen Dialysepuffer mit einem Mehrplatzrührer. Alle mit den Proben in Kontakt kommenden Geräte wurden zuvor mit, durch eintägige Inkubation mit 3 g/Liter Chelex 100 im Dialyseschlauch (25 mm Visking, Roth), calciumfreiem ddH₂O gespült. Während der Dialyse wurde die Temperatur und der pH-Wert in einem ⁴⁵Ca-freien Puffergefäß mit einer kombinierten pH-Temperatur-Meßkette (Sentix 41, WTW) verfolgt. Die Proben wurden anschließend mit einer Pasteurpipette aus den Dialyseschläuchen in Kunststoffküvetten überführt, die Extinktion bei 620 nm gemessen und von jeder Probe sowie jedem Dialysepuffer drei 200 μ l Aliquots mit 4 ml Flüssigszintillationslösung (EcoSzint plus, Roth) gemischt und, wie in Kapitel 2.2.28.3 beschrieben, die Aktivität von ⁴⁵Ca bestimmt.

Bindungspuffer:

20 mM Tris pH 7.4
200 mM NaCl
1 mM DTT
0.1 % Lubrol

Thrombinspaltungspuffer:

20 mM Tris pH 8.4
150 mM NaCl

Dialysepuffer:

20 mM Tris pH 7.2
100 mM NaCl

2.2.28.2 Berechnung und Ansatz von ⁴⁵Ca markierten Ca-EGTA-Dialysepuffern mit definierter freier Ca²⁺-Ionenkonzentration

Die Calciumbindung an den ternären SNARE-Komplex wird bei acht verschiedenen Konzentrationen an freiem Ca²⁺ im Bereich von 10 nM bis 300 μ M untersucht. Die Konzentration von freiem Ca²⁺ wird mit Hilfe eines Ca-EGTA-Puffersystem eingestellt, um größere Schwankungen der freien Calciumkonzentration zu verhindern.

Die Pufferzusammensetzungen werden mit dem Programm BAD 4.0 (Brooks und Storey, 1992) berechnet.

$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{(frei)}}$	10^{-8} M	10^{-7} M	10^{-6} M	$3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	10^{-5} M	$3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	10^{-4} M
$[\text{EGTA}]_{\text{(gesamt)}}$	150 μM	50 μM	25 μM	25 μM	25 μM	25 μM	25 μM
$[\text{}^{40}\text{Ca}^{2+}]$	7.59 μM	17.7 μM	21.81 μM	26.18 μM	34.14 μM	54.43 μM	124.54 μM
$[\text{}^{44}\text{Ca}^{2+} + \text{}^{45}\text{Ca}^{2+}]$	4.2 nM	4.2 nM	4.2 nM	4.2 nM	4.2 nM	4.2 nM	4.2 nM
$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{(gesamt)}}$	8.01 μM	18.12 μM	22.23 μM	26.60 μM	34.56 μM	54.85 μM	124.96 μM
[Tris-HCl]	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM
[NaCl]	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM
Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	13.0 $^{\circ}\text{C}$	13.0 $^{\circ}\text{C}$	13.0 $^{\circ}\text{C}$	13.0 $^{\circ}\text{C}$	13.0 $^{\circ}\text{C}$	13.0 $^{\circ}\text{C}$	13.0 $^{\circ}\text{C}$
pH-Wert	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2
$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{(gesamt)}} +$ 2,99 μM Ca^{2+} (Proteingebunden)	11.0 μM	21.11 μM	25.22 μM	29.59 μM	37.13 μM	57.84 μM	127.95 μM
Änderung [%]	37.33	16.50	13.45	11.24	8.65	5.45	2.39

Zum Ansetzen der Puffer wird doppelt destilliertes Wasser verwendet, aus welchem durch mehrtägige Inkubation auf einem Kreisschüttler mit 3 g/Liter Chelex 100 (Sigma) in einem Dialyseschlauch (25 mm Visking, Roth) etwaige Calciumrestkontaminationen entfernt werden. Die ^{40}Ca -Konzentration wird durch Zugabe einer entsprechenden Menge an frisch aus CaCl_2 -Festschubstanz (99,995%, Suprapur, Merck) eingewogener Stammlösung und geeigneter Verdünnungsreihen eingestellt. Der Zusatz von EGTA erfolgt ebenfalls aus einer frisch eingewogenen Stammlösung von EGTA (Rotipuran, Roth), deren pH-Wert mit Natronlauge (p.A., Baker) auf 7.2 eingestellt wird. Natriumchlorid (Rotipuran, Roth) wird direkt aus Festschubstanz eingewogen. Der pH-Wert der Puffer wird nach Temperierung aller Lösungen auf 13 $^{\circ}\text{C}$ mit 37%iger Salzsäure (p.A., Baker) eingestellt und zur radioaktiven Markierung zu jeweils 200 ml Dialysepuffer 25 μl einer wässrigen Lösung von $^{45}\text{CaCl}_2$ (Amersham Pharmacia Biotech) gegeben. Dabei wird die Kontamination des $^{45}\text{CaCl}_2$ mit nichtradioaktivem $^{44}\text{CaCl}_2$ durch den Produktionsprozeß ($^{44}\text{Ca} + n \rightarrow ^{45}\text{Ca} + \gamma$) bei der Pufferzusammensetzung berücksichtigt.

2.2.28.3 Szintillationsmessung von Ca-45

Nach der Messung der optischen Dichte werden aus jeder Küvette 3 Proben a 200 μl entnommen und in ein Szintillationsgefäß (Poly-Q-Vial, Beckman) mit 4 ml Flüssigszintillator (Rotiszint eco plus, Roth) gegeben und gemischt. Die so vorbereiteten Proben werden in einem Beckman LS 6000IC Szintillationsmeßgerät gemessen. Das für die Flüssigszintillationsmessung verwendete Programm enthält folgende Messparameter:

Probenmessdauer: 15 Minuten

Energiefenster: 0-256 keV

Zählkreisbeute: 96%

2.2.29 CD-Spektroskopie

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie lassen sich Aussagen über die Struktur eines Proteins gewinnen. Dies wird ermöglicht durch die Symmetrieverzerrung des $n \rightarrow \pi^*$ Übergangs der Peptidbindung, welcher symmetrieverboten ist. Der Extinktionskoeffizient des $n \rightarrow \pi^*$

Übergangs wird im wesentlichen durch die unterschiedliche Substitution der von C und N-Atomen der Peptidbindung und der daraus resultierenden Symmetrieverzerrung bestimmt. Der bei der CD-Spektroskopie gemessene chiroptische Extinktionskoeffizient wird durch die Chiralität der Symmetrieverzerrung erzeugt, weshalb die Größe des gemessenen CD-Effektes von der Konformation der Polypeptidkette abhängig ist. Das CD-Spektrum α -helikaler Proteine besitzt charakteristische Minima bei Wellenlängen von 210 und 222 nm sowie einem dazwischenliegendem Maximum bei etwa 213 nm. Da sich der gemessene CD-Effekt näherungsweise aus der Summe der CD-Effekte der einzelnen Aminosäuren in ihrer jeweiligen Konformation zusammensetzt kann aus dem gemessenen CD-Spektrum der Anteil an Aminosäuren in α -helikaler, β -Faltblatt und statistisch ungeordneter Konformation errechnet werden. Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung des Sekundärstrukturgehaltes eines unbekanntes Proteins ist durch Vergleich mit den CD-Spektren von natürlichen Proteinen mit bekannter räumlicher Struktur. Mutationen, welche zu einer Veränderung der Faltung z. B. durch sterische Hinderung durch Aminosäureseitenketten oder die Veränderung ionischer Wechselwirkungen eines Proteins führen, lassen sich daher durch Vergleich der CD-Spektren von nativem und mutiertem Protein erkennen.

Für die Aufnahme der CD-Spektren der verschiedenen ternären SNARE-Komplexe wird eine Proteinkonzentration von 0,15 – 0,3 mg/ml eingesetzt. Der SNARE-Komplex wird dazu durch 18 stündige Inkubation von 250 μ g an GT-Sepharose gebundenem GST-Syntaxin mit einem Überschuß von SNAP-25-His₆ (250 μ g) und His₆-Synaptobrevin (150 μ g) in 500 μ l Bindungspuffer bei 4°C zusammengesetzt, anschließend 3 x mit 1 ml Thrombinpuffer gewaschen und durch 16 stündige Inkubation mit 0.3 U biotinyliertem Thrombin (Novagen) in 250 μ l Thrombinpuffer bei 4°C von GST abgespalten. Das biotinylierte Thrombin wird durch Inkubation mit 30 μ l Streptavidin-Agarose (Novagen) (equilibriert mit Thrombinpuffer) innerhalb von 3 h bei 4°C gebunden, durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand für die CD-Messung eingesetzt. Die bei der CD-Messung eingesetzte Proteinkonzentration wird wie in Kapitel 2.2.19.2 beschrieben photometrisch bestimmt.

CD-Spektrometer: Dichrograph Mark III (Jobin-Yvon)
 Schichtdicke: 0,1 mm
 Auflösung: 0,5 nm/Punkt
 Geschwindigkeit: 0,1 nm/s
 Zeitkonstante: 2 s
 Wellenlängen: 195-250 nm
 Analysesoftware: Circ42 (Anpassung nach geringsten Fehlerquadraten mit Vergleichsspektren nach Chen), Eigenentwicklung des Instituts für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover.

Bindungspuffer:

20 mM Tris pH 7.4
 200 mM NaCl
 1 mM DTT
 0.1 % Lubrol

Thrombinspaltungspuffer:

20 mM Tris pH 8.4
 150 mM NaCl

3 Ergebnisse

3.1 Effekte von Mutationen der O-Layer-Aminosäuren

3.1.1 Struktur und Stabilität des ternären SNARE-Komplexes

Zur Untersuchung der Funktion des O-Layers des ternären SNARE-Komplexes wurden Punktmutationen der den O-Layer bildenden Aminosäuren erzeugt. Der ternäre SNARE-Komplex zeichnet sich einerseits durch seine außergewöhnliche Stabilität bei höheren Temperaturen und in Gegenwart von denaturierenden Reagenzien aus, jedoch ist aus früheren Untersuchungen bekannt, dass bereits einzelne Mutationen von Aminosäuren, welche an den Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Helices beteiligt sind, einen dramatischen Einfluß auf die Stabilität des SNARE-Komplexes haben können. Deshalb wurden die geplanten Mutationen der Aminosäureseitenketten unter Verwendung der durch Sutton et al. (1998) gelösten Kristallstruktur mit Hilfe des Insight II Softwarepaketes (MSI, San Diego) simuliert und analysiert. Die ionischen Wechselwirkungen der drei Glutaminreste von Syntaxin und SNAP-25 mit dem Argininrest von Synaptobrevin wurden gegen hydrophobe Seitengruppen ausgetauscht. Am günstigsten erwies sich dabei eine Mutation aller vier O-Layer-Aminosäuren zu Leucinen, da dabei die sterischen Hinderungen zwischen den Leucin-Seitengruppen und Aminosäureresten der benachbarten Lagen minimal sind.

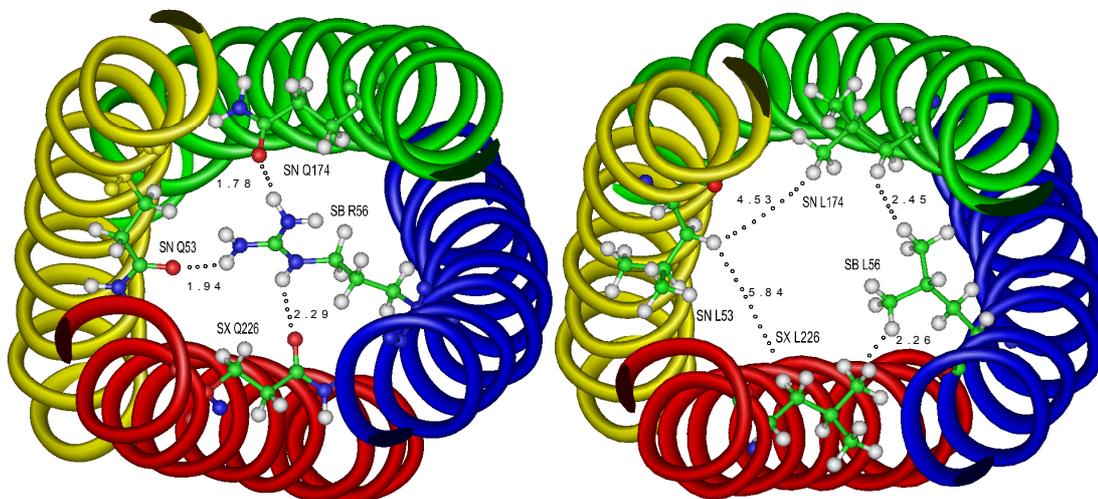


Abbildung 9: Vergleich der Lage der Aminosäureseitengruppen des O-Layers des ternären SNARE-Komplexes in der Kristallstruktur (links) und nach computersimulierter Mutation zu Leucinresten (rechts). Abstände zwischen den Atomen sind in Angström angegeben. Helixdarstellung des N- (gelb) und C-terminalen (grün) Peptidrückgrats von SNAP-25, Syntaxin (rot) und Synaptobrevin (blau), Aminosäureseitenketten des O-Layers in Kugel-Stab-Darstellung.

3.1.1.1 Analyse der Komplexstruktur durch CD-Spektroskopie

Die Änderung des Gehaltes an Sekundär- und Tertiärstruktur des SNARE-Komplexes durch die Mutation der vier den O-Layer bildenden Aminosäuren wurde unter nativen Bedingungen

CD-spektroskopisch untersucht. Es wurde kein signifikanter Unterschied im Gehalt an α -Helizität, β -Faltblattstruktur oder Zufallsstruktur zwischen Wildtyp und mutiertem SNARE-Komplex gemessen. Dies bestätigt die Ergebnisse aus den Komplexbildungsexperimenten (siehe 3.1.4 ?) und zeigt, dass auch der Anteil an gebildetem, aber SDS-sensitivem Komplex unter nativen Bedingungen eine dem Wildtyp-Komplex sehr ähnliche Struktur besitzt.

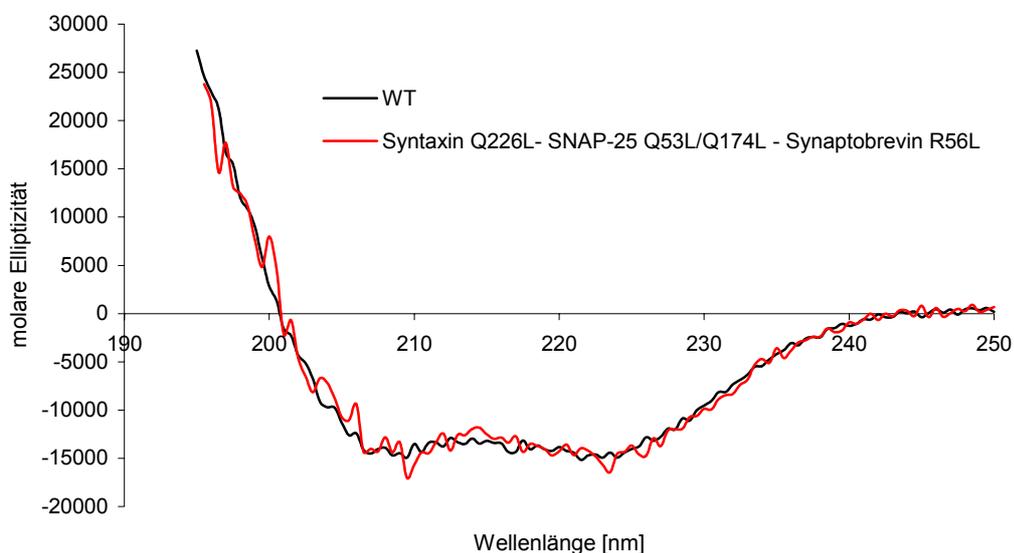


Abbildung 10: CD-Spektren von gereinigtem Wildtyp SNARE-Komplex (schwarz) und SNARE-Komplex mit Leucinresten (rot) in den vier Aminosäurepositionen des O-Layers. Gehalt an Sekundärstruktur: Wildtyp: 47 % α -Helix, 8 % β -Faltblatt, 45 % unstrukturiert. Mutierter SNARE-Komplex: 48 % α -Helix, 9% β -Faltblatt, 43% unstrukturiert.

3.1.1.2 Stabilität des ternären SNARE-Komplexes bei Austausch der ionischen Wechselwirkung im O-Layer gegen hydrophobe Wechselwirkung

Die Mutation der drei Glutamin- sowie des Argininrestes zu Leucinresten im zentralen O-Layer kann zu einer Änderung der Struktur des SNARE-Komplexes führen. Dies würde sich in einem veränderten Schmelzverhalten des SNARE-Komplexes zeigen. Dazu wurde der ternäre SNARE-Komplex aus rekombinantem GST-Syntaxin und SNAP-25 sowie durch *in vitro* Transkription / Translation ^{35}S -markiertem Synaptobrevin zusammengesetzt und in Gegenwart von 2% SDS jeweils 10 Minuten bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Die Analyse des Anteils an freiem und gebundenem Synaptobrevin in Abbildung 10 zeigt für den Komplex mit den Mutationen zu Leucin einen um ca. 10°C verringerten Schmelzpunkt ($T_m = 50\%$ geschmolzen). Zudem führen die Mutationen dazu, dass ein Anteil von etwa 20% des gebildeten Komplexes auch bei niedrigen Temperaturen nicht SDS-resistent ist.

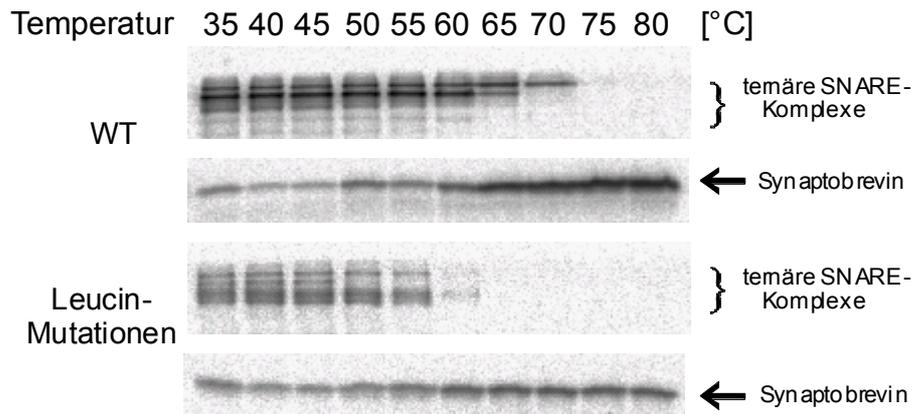
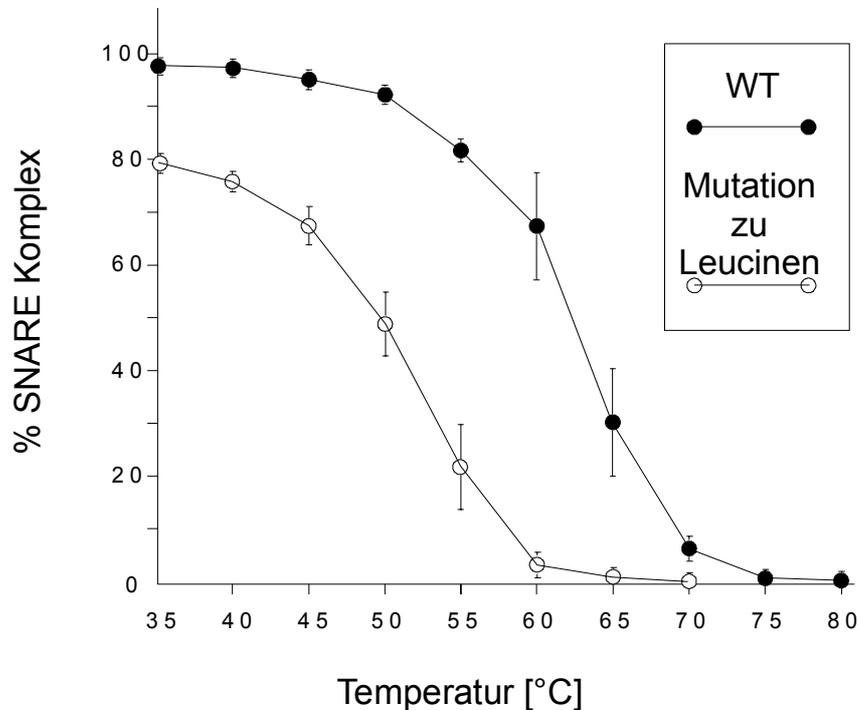
A**B**

Abbildung 11: Schmelzverhalten von Wildtyp-SNARE-Komplex (n=8; geschlossene Kreise) und SNARE-Komplex mit 4 Leucinresten im O-Layer (n=4; offene Kreise) in Gegenwart von 2% SDS. SNARE-Komplexe wurden aus GST-Syntaxin, SNAP-25-His₆ und durch *in vitro* Translation ³⁵S-markiertem Synaptobrevin an GT-Sepharose zusammengesetzt, gewaschen, Aliquots in SDS-Ladepuffer 10 Minuten bei der angegebenen Temperatur inkubiert und mittels SDS-PAGE und Phosphoimaging analysiert. (A) Phosphoimagerscan von typischen SDS-Polyacrylamidgelen. (B) Quantitative Auswertung der Phosphoimagerscans in Prozent komplexgebundenem ³⁵S-Synaptobrevin vom Gesamtgehalt an ³⁵S-Synaptobrevin (Mittelwerte ± SEM).

3.1.1.3 Stabilität des SNARE-Komplexes bei teilweisem Austausch der O-Layer-Aminosäuren gegen Leucine

Die Mutation von einzelnen hydrophilen Aminosäuren des O-Layers zu hydrophoben Aminosäuren führt zu einer Destabilisierung des SNARE-Komplexes. Das Einbringen von einem hydrophoben Leucinrest in die hydrophile Lage des O-Layers bewirkt eine Verminderung des Schmelzpunktes um 12-17°C gegenüber dem Wildtyp-SNARE-Komplex in Gegenwart von 2% SDS. Die Mutation von Glutamin 174 zu Leucin in SNAP-25 weist dabei eine vergleichbare Stabilität wie die Mutation aller Aminosäuren des O-Layers zu Leucinen auf. Die Einführung von zwei hydrophoben Aminosäuren in die hydrophile Schicht verursacht eine starke Verminderung der Komplexstabilität in Gegenwart von 2% SDS, verhindert jedoch nicht die Bildung des ternären SNARE-Komplexes in Abwesenheit von SDS.

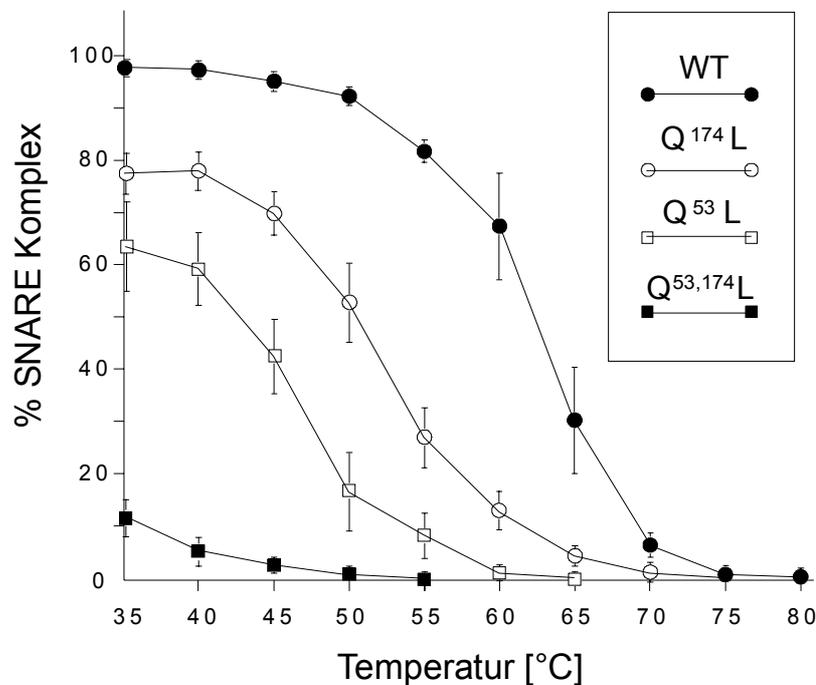


Abbildung 12: Schmelzverhalten von ternären SNARE-Komplexen mit Mutationen der Aminosäureseitenketten des O-Layers in den Positionen 53 (n=3; offene Quadrate), 174 (n=3; offene Kreise) sowie 53 und 174 (n=3; geschlossene Quadrate) von SNAP-25 zu Leucinresten sowie Wildtyp-SNARE-Komplex (n=8; geschlossene Kreise) in Gegenwart von 2% SDS. SNARE-Komplexe wurden aus GST-Syntaxin, SNAP-25-His₆ und durch *in vitro* Translation ³⁵S-markiertem Synaptobrevin an GT-Sepharose zusammengesetzt, gewaschen, Aliquots in SDS-Ladepuffer 10 Minuten bei der angegebenen Temperatur inkubiert und mittels SDS-PAGE und Phosphoimaging quantitativ in Prozent komplexgebundenem ³⁵S-Synaptobrevin vom Gesamtgehalt an ³⁵S-Synaptobrevin (Mittelwerte ± SEM) analysiert.

3.1.2 Dissoziation des ternären SNARE-Komplexes durch α -SNAP und NSF

Die ATP-abhängige Dissoziation von ternärem SNARE-Komplex durch die chaperone Wirkung der ATPase NSF in Zusammenarbeit mit dem Adapterprotein α -SNAP wurde *in vitro* untersucht. Dazu wurde der ternäre SNARE-Komplex an GT-Sepharose aus GST-Syntaxin, SNAP-25-His₆ und durch *in vitro* Transkription/Translation in Gegenwart von ³⁵S-Methionin radioaktiv markiertem Synaptobrevin zusammengesetzt, gewaschen und durch

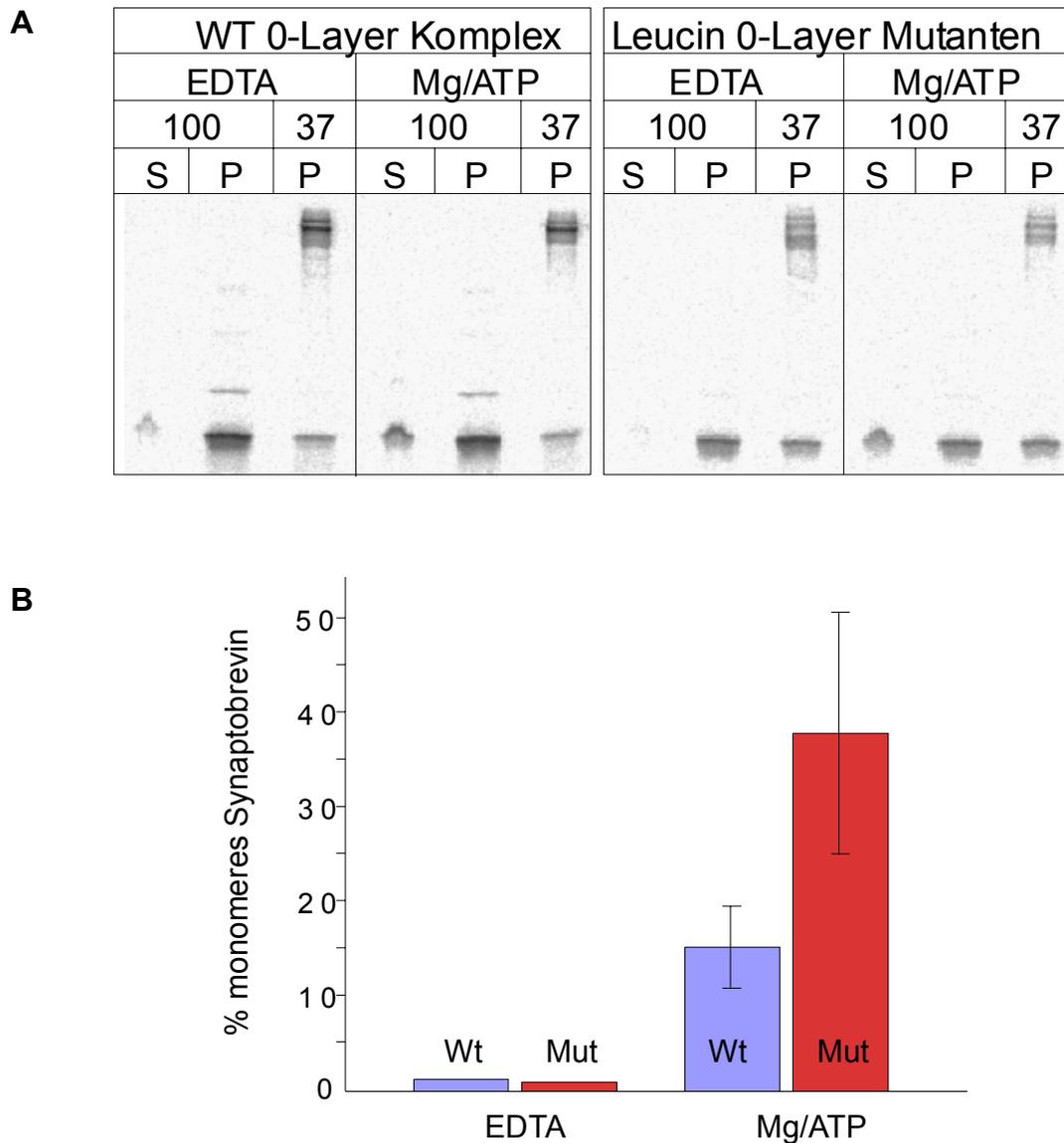


Abbildung 13: ATP-abhängige Dissoziation von ternären SNARE-Komplexen mit Mutationen der O-Layer Aminosäurepositionen zu Leucinen durch α -SNAP und NSF. Ternäre SNARE-Komplexe wurden über Nacht durch Inkubation von monomerem SNAP-25-His₆ und GST-Syntaxin mit durch *in vitro* Translation ³⁵S-markiertem Synaptobrevin an GT-Sepharose zusammengesetzt und durch Inkubation in Gegenwart von α -SNAP und NSF bei 4°C dissoziiert. Nach Trennung von Überstand und GT-Sepharosebeads durch Zentrifugation wurde der Anteil an Synaptobrevin in beiden Fraktionen durch SDS-PAGE und Phosphoimaging analysiert. Kontrollansätze enthielten EDTA statt Mg-ATP. **(A)** Phosphoimagerscan eines typischen Gels mit Überstand (S) und Pelletfraktion (P) nach Inkubation bei 37°C und 100°C. **(B)** Quantitative Auswertung (n=4; Mittelwerte \pm SEM).

Zugabe von α -SNAP und NSF in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Mg-ATP bei 4°C dissoziiert. Der Anteil an freigesetztem Synaptobrevin wurde mit Hilfe von SDS-PAGE und Phosphoimagerscanning analysiert. Der mutierte SNARE-Komplex wird im Vergleich mit dem Wildtyp-SNARE-Komplex leichter durch NSF und α -SNAP dissoziiert. Durchschnittlich werden 37 % (\pm 13%) des radioaktiv markierten Synaptobrevins freigesetzt, während Wildtyp-Komplex unter gleichen Inkubationsbedingungen nur durchschnittlich 15% (\pm 4%) des Synaptobrevins als freies Synaptobrevin im Überstand liefert.

3.1.2 Untersuchung der Komplexstruktur durch limitierte Proteolyse

Da die Interaktion zwischen den einzelnen Helices der SNARE-Proteine im SNARE-Komplex mit Ausnahme der ionischen Aminosäuren des O-Layers über hydrophobe Wechselwirkungen der zwischen den Helices liegenden Seitengruppen erfolgt, ist es denkbar, dass die ionische Schicht des O-Layers für das richtige Auffinden der untereinander wechselwirkenden Seitengruppen, des sogenannten Registers notwendig ist. Zur Untersuchung der Auswirkung von Mutationen der ionischen Aminosäureseitengruppen des zentralen O-Layers auf das Finden des richtigen Registers wurde sowohl der aus Wildtyp als auch aus mutierten Proteinen zusammengesetzte ternäre SNARE-Komplex partiell mit Proteinase K verdaut. Der dabei erhaltene, aus den α -helikalen Bereichen bestehende, etwa 45 kDa große „core-Komplex“ wurde durch Gelfiltration von kleineren Bruchstücken abgetrennt. Der so gereinigte Komplex wurde durch Acetonitril/TFA in seine Bestandteile zerlegt, die nach Auftrennung mittels RP-HPLC durch N-terminale Aminosäuresequenzierung sowie MALDI-TOF-Massenspektroskopie analysiert wurden. Diese Arbeit wurde in Kollaboration mit Harald John vom Niedersächsischen Institut für Peptidforschung durchgeführt. Bei der Analyse der Fragmentmuster wurde kein signifikanter Unterschied zwischen mutiertem und nativem ternären SNARE-Komplex gefunden.

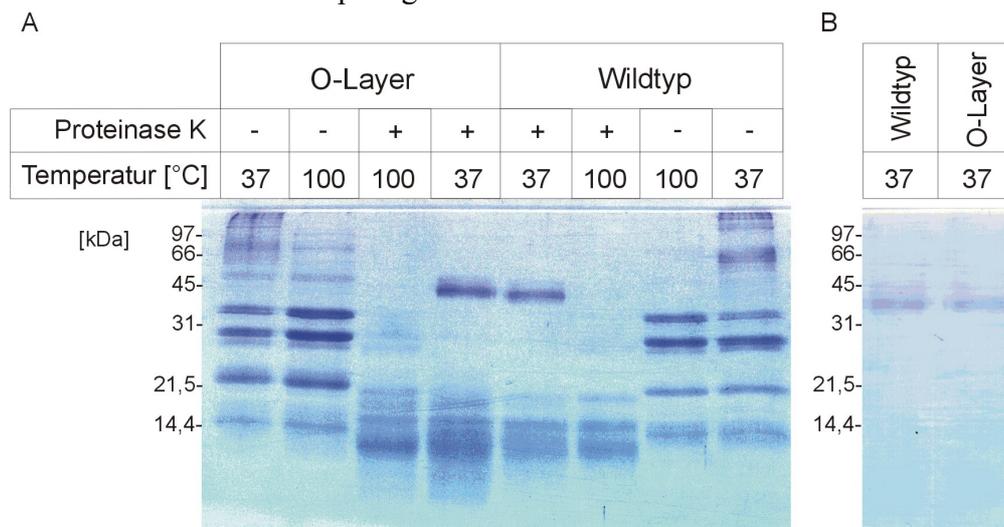


Abbildung 14: Partielle Proteinase K-Verdau von Wildtyp-SNARE-Komplex und SNARE-Komplex mit Mutationen der Aminosäureseitenketten des O-Layers zu Leucinen. Coomassie gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel. Die Proben wurden vor dem Auftragen 10 Minuten bei 37 bzw. 100°C in SDS-Ladepuffer inkubiert. (A) Analyse nach partiellem Proteinase K Verdau (B) Partiiell mit Proteinase K verdaute SNARE-Komplexe nach Aufreinigung durch Gelfiltration auf einer Superdex 200 HR 10/30 Säule.

	N-terminale Sequenzierung Aminosäuresequenz	von AA	Massenspektrum [Da]	bis AA	
SNAP-25 N	AEDADMRNRLEE..	2-	12192, 12870	-107, -114	WT
			11175*, 12182, 12871	-98, -107, -114	Mut.
SNAP-25 C	SQPARVVDEREQ.. GGFIRRV...	115-	10009, 11814	-C-Terminus	WT
		131-	9947, 11765	-C-Terminus	Mut.
Syntaxin	GIIMDSSISKQALS..	180-	10416, 11590	-His ₆ , -C-Term.	WT
			11524	-C-Terminus	Mut.
Synapto- brevin	TVPPAAPAGEGG.. GGPPA.....	7-	11180, 12122	-C-Terminus	WT
		17-	12165	-C-Terminus	Mut.

Tabelle 1: Analyse der Zusammensetzung der durch Proteinase K partiell verdauten SNARE-Komplexe. Übersicht der nach HPLC-Trennung durch N-terminale Sequenzierung und Massenspektroskopie gefundenen Fragmentgröße der einzelnen Bestandteile der ternären SNARE-Komplexe. Hauptfragmente (>90%) sind fett gedruckt. WT = Wildtyp, Mut. = alle O-Layer-Aminosäuren zu Leucinen mutiert. * = Intensität < 2%.



Abbildung 15: Graphische Übersicht der gefundenen Haupt- (geschlossene Pfeile) und Nebenspaltstellen (offene Pfeile). Helikale Bereiche des SNARE-Komplexes sind farbig dargestellt.

3.1.4 Einfluss von Mutationen auf die Kinetik der Bildung des SNARE Komplexes

Die Geschwindigkeit der Bildung von ternärem SNARE-Komplex durch Zusammenlagerung von vorgebildetem binären Syntaxin-SNAP-25-Komplex und Synaptobrevin wurde *in vitro* untersucht. Die Mutation der ionischen Aminosäurereste des O-Layers zu Leucinresten führt im Vergleich mit den Wildtypproteinen zu einer stark verlangsamten Bildung des ternären SDS-resistenten SNARE-Komplexes. Während die Wildtyp-SNARE-Proteine bereits nach 8 Minuten zu 75% im Komplex vorliegen, ist bei mutierten SNARE-Proteinen zum gleichen Zeitpunkt erst 27% an ternärem Komplex zusammengetreten. Sowohl Wildtyp als auch Komplexe mit Leucinmutationen erreichen nach mehr als 4 Stunden Inkubationszeit vergleichbare Mengen an gebildetem Komplex. Auch die Einzelmutation von Glutamin 174

in SNAP-25 zu Leucin führt zu einer ähnlich stark verringerten Bildungsgeschwindigkeit von ternärem SDS-resistentem SNARE-Komplex.

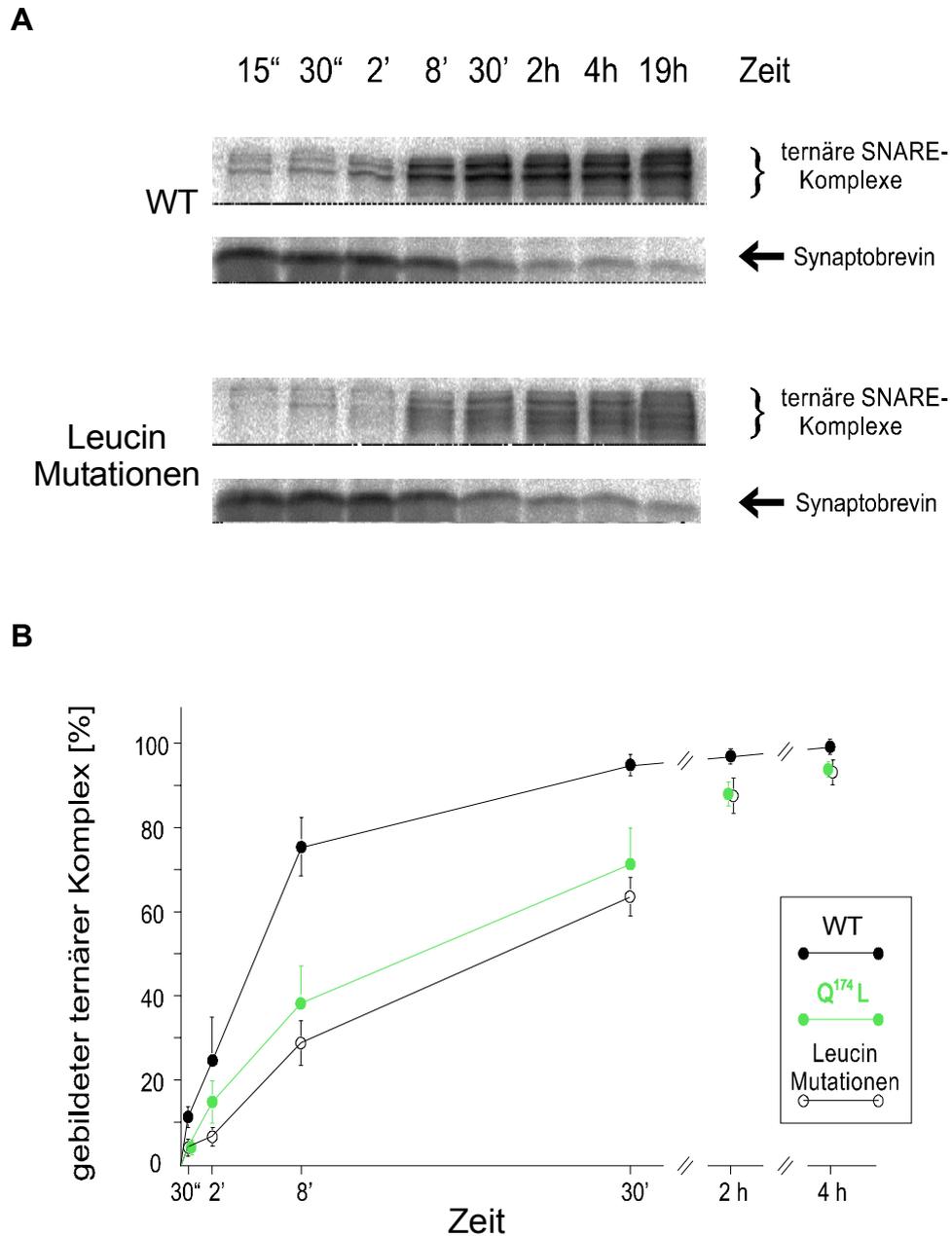


Abbildung 16: Kinetik der Bildung von ternären SNARE-Komplexen mit Mutationen im O-Layer. Binärer SNARE-Komplex aus SNAP-25-His₆ und GST-Syntaxin wurde in Standardpuffer an GT-Sepharosebeads zusammengesetzt, gewaschen und mit ³⁵S-markiertem Synaptobrevin bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Aliquots entnommen, mit SDS-Ladepuffer abgestoppt und bis zur Analyse mittels SDS-PAGE und Phosphoimaging auf Eis gelagert. (A) Phosphoimagerscan von typischen SDS-Polyacrylamidgelen. (B) Quantitative Auswertung der Bildungskinetik von ternären SNARE-Komplexen mit Mutation der Aminosäuren SNAP-25 Q53L/Q174L, Synaptobrevin R56L und Syntaxin Q226L (offene Kreise) sowie Mutation des Glutaminrestes von SNAP-25 in Position 174 zu Leucin (grüne geschlossene Kreise) im Vergleich zum Wildtyp-Komplex (schwarze geschlossene Kreise) (n=3; Mittelwerte ± SEM). Aus der Anpassung einer einfachen Exponentialfunktion mit Hilfe von IGOR Pro (WaveMetrics, Lake Oswego, OR) ergeben sich die folgenden Zeitkonstanten: Wildtyp: $\tau = 5.8 \pm 0.9$ min; Leucinmutationen: $\tau = 21.8 \pm 3.5$ min; Q174L: $\tau = 18.6 \pm 3.2$ min.

3.2 Analyse von in potentiellen Bindungsstellen für divalente Kationen

3.2.1 Die Bindungsstellen D58/E170/Q177 von SNAP-25 und S75/E78/T79 von Synaptobrevin 2

Die Oberfläche des ternären SNARE-Komplexes zeichnet sich durch viele hydrophile saure und basische Bereiche aus. Ein Oberflächenplot der Ladungsverteilung der Kristallstruktur des SNARE-Komplexes ist in Abbildung 17 C wiedergegeben. Die Kristallisation des SNARE-Komplexes wurde in Gegenwart von Strontiumionen durchgeführt, weshalb die Kristallstruktur mehrere Strontiumatome enthält. Die Positionen der Strontiumionen in der Kristallstruktur sind potentielle Bindungsstellen für zweiwertige Metallionen wie z.B. Calcium, dem entscheidende Bedeutung bei der Regulation der Exozytose zukommt. Deshalb wurden zwei dieser potentiellen divalenten Metallionen-Bindungsstellen durch Mutationsanalysen auf mögliche Funktionen untersucht. Die erste potentielle Bindungsstelle befindet sich in der Mitte des SNARE-Komplexes (grüner Pfeil in Abbildung 17 A) in direkter Nähe des O-Layers und wird durch die Aminosäuren Aspartat 58, Glutamat 170 und Glutamin 177 von SNAP-25 gebildet. Zwischen den beiden C- und N-terminalen Helices von SNAP-25 befindet sich zwischen den Aminosäureresten 58 und 170 eine kleine Vertiefung, deren Boden durch Glutamin 177 gebildet wird. Direkt über dem Glutaminrest ist ein Wasser-

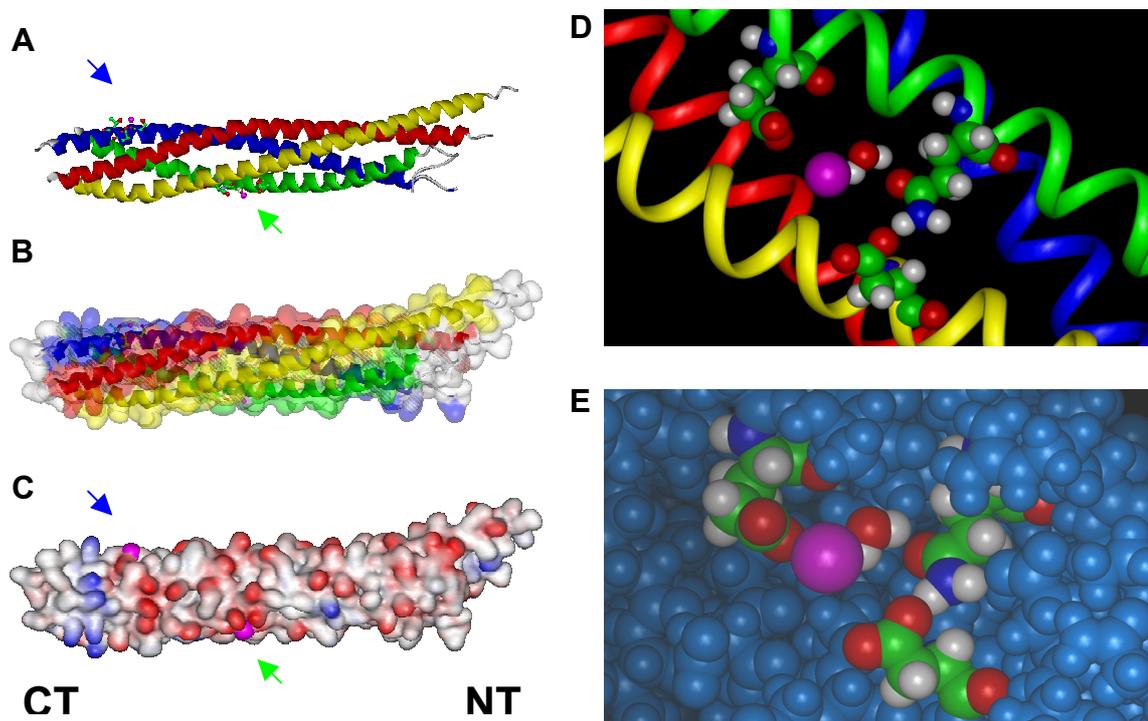


Abbildung 17: Kristallstruktur des ternären SNARE-Komplexes. (A) Helices: Syntaxin 1 (rot), Synaptobrevin 2 (blau), SNAP-25 (gelb und grün), Strontiumionen (pink) und Strontium-interagierende Aminosäuren (Kugel/Stabdarstellung). Die C-terminalen Transmembranregionen von Syntaxin 1 und Synaptobrevin 2 sowie strukturlose Bereiche sind nicht gezeigt. (B) Van-der-Waals-Oberfläche, Farben wie in a. (C) Oberflächenladung (rot = sauer, blau = basisch) (D) Strontiumbindungsstelle bestehend aus den Aminosäuren D58 (links oben), E170 (unten) und Q177 (rechts oben) von SNAP-25 sowie koordinierendes Wassermolekül. Farben wie in A. (E) Kalottendarstellung von D zusammen mit allen anderen Atomen (hellblau).

molekül koordiniert, welches wiederum zusammen mit Aspartat 58 und Glutamat 170 die Tasche für das Strontiumion auskleidet. In Abbildung 17 D und E ist die räumliche Anordnung der Aminosäureseitenketten sowie der Heteroatome im Detail wiedergegeben. Eine weitere Strontiumbindungsstelle befindet sich benachbart zur BoNT/B und TeNT Spaltstelle in Synaptobrevin und wird durch die drei Aminosäuren Serin 75, Glutamat 78 und Threonin 79 von Synaptobrevin gebildet (blauer Pfeil in Abbildung 17 A), wobei das Strontiumatom, im Gegensatz zur 58/170/177 Bindungsstelle in SNAP-25, nicht in einer Tasche oder Furche, sondern mehr oberflächlich koordiniert ist. Beide Bindungsstellen wurden durch Mutation der Seitenketten der koordinierenden Aminosäuren zu Alaninresten zerstört. In der Bindungsstelle von SNAP-25 wurde neben der Mutation aller drei beteiligten Aminosäuren auch eine Doppelmutation der Aminosäuren E170/Q177 zu Alanin sowie eine Ladungsumkehr durch Mutation der negativ geladenen Aminosäuren zu positiv geladenen Lysin erzeugt.

3.2.2 Charakterisierung der mutierten Komplexe durch thermische Denaturierung und CD-Spektroskopie

Die durch die Mutation von Aminosäureseitengruppen auf der Oberfläche des ternären SNARE-Komplexes verursachten Effekte auf die strukturelle Integrität wurden anhand von CD-Spektren der gereinigten SNARE-Komplexe sowie deren Schmelzverhalten in Gegenwart von 2% SDS untersucht. Wie den in Abbildung 18 gezeigten CD-Spektren zu entnehmen ist, haben die Mutationen von Seitengruppen zu Alaninresten keine signifikanten Auswirkungen auf den α -Helixgehalt der SNARE-Komplexe. Die Schmelzkurven in Gegenwart von 2 % SDS zeigen eine leichte Verringerung der Schmelztemperatur, im Falle der SNAP-25 Doppelmutante um 2.5°C bzw. 5°C für die Dreifachmutante 58/170/177A, wohingegen die Schmelztemperatur des die Synaptobrevin-Mutante S75/E78/T79A enthaltenden Komplexes im Vergleich zum Wildtyp um etwa 3°C erhöht ist (siehe Abbildung 20). Die Ladungsumkehr der SNAP-25-Seitenkette E170 zu Lysin führt mit einer Verringerung von 3°C zu einer ähnlichen Stabilitätsverminderung wie die Mutation zu Alaninresten. Die vergleichsweise starke sterische Hindernisse hervorrufende Mutation von D58 und E170 zu Lysinresten zeigt dagegen eine stärkere Verringerung der thermischen Stabilität des ternären SNARE-Komplexes um 8°C gegenüber Wildtyp Komplex.

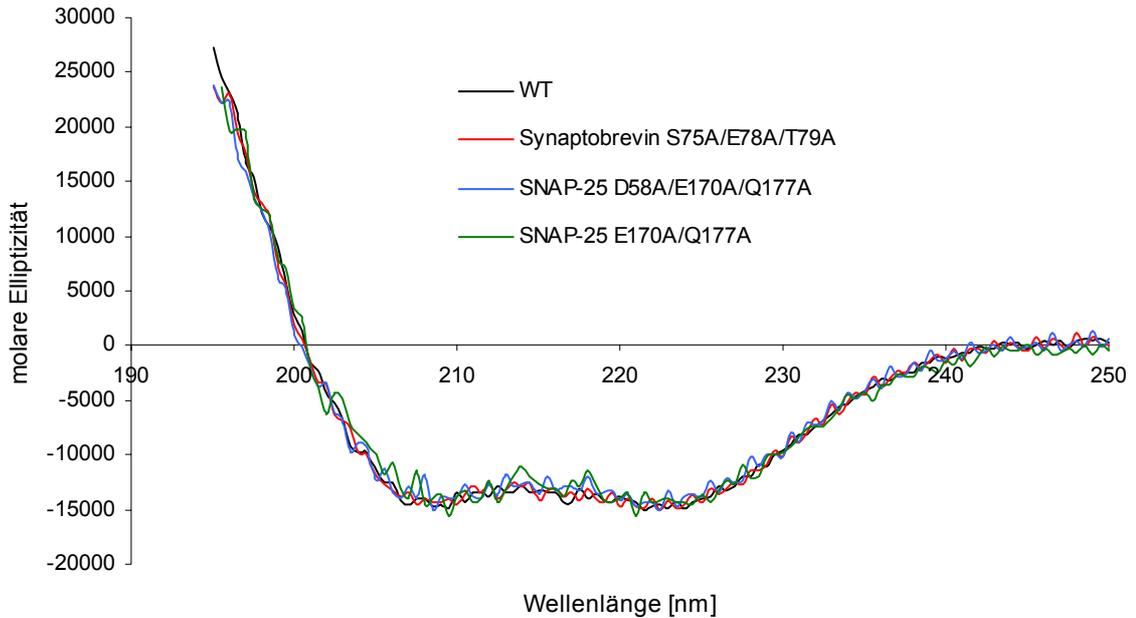


Abbildung 18: CD-Spektren der gereinigten SNARE-Komplexe ohne Mutation von Aminosäuren (schwarz), mit Mutation der Aminosäureseitenketten E170/Q177 (grün) bzw. D58/E170/Q177 (blau) in SNAP-25 oder mit Mutation von S75/E78/T79 in Synaptobrevin (rot) zu Alanin.

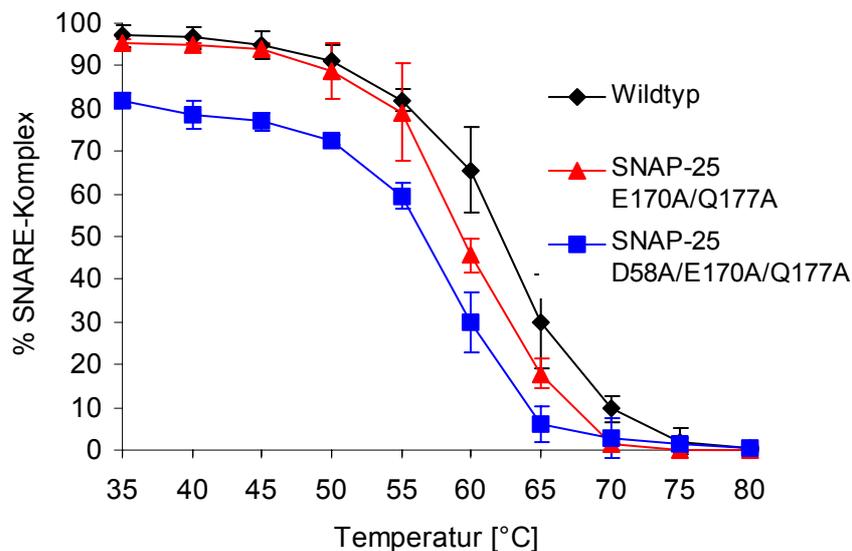


Abbildung 19: Schmelzverhalten von ternären SNARE-Komplexen (I) ohne (n=8; schwarze Rauten) oder mit Mutationen der Aminosäuren E170/Q177 (n=3; rote Dreiecke) bzw. D58/E170/Q177 (n=3; blaue Quadrate) von SNAP-25 zu Alanin in Gegenwart von 2% SDS. SNARE-Komplexe wurden aus GST-Syntaxin, SNAP-25-His₆ und durch *in vitro* Translation ³⁵S-markiertem Synaptobrevin an GT-Sepharose zusammengesetzt und gewaschen. Aliquots wurden in SDS-Ladepuffer 10 Minuten bei der angegebenen Temperatur inkubiert und mittels SDS-PAGE und Phosphoimaging analysiert. Quantitative Auswertung der Phosphoimagerscans in Prozent komplexgebundenem ³⁵S-Synaptobrevin vom Gesamtgehalt an ³⁵S-Synaptobrevin (Mittelwerte ± SEM).

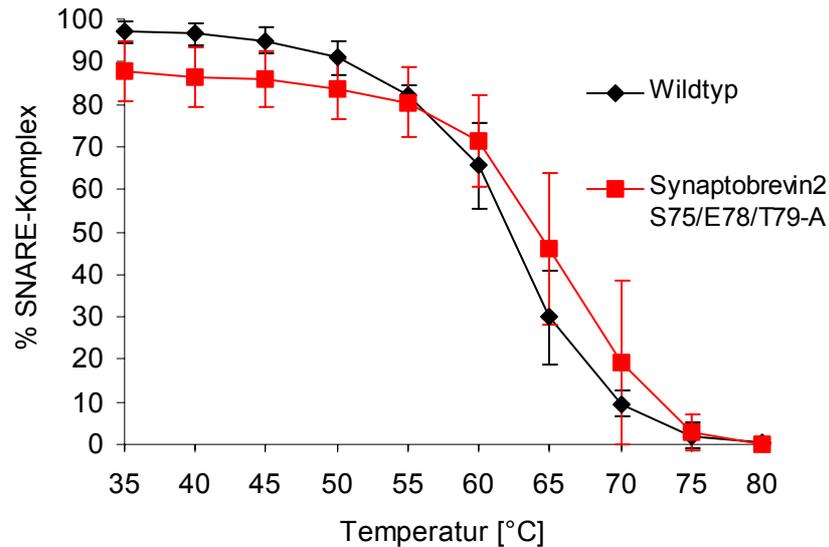


Abbildung 20: Schmelzverhalten von ternären SNARE-Komplexen (II) ohne (n=8; schwarze Rauten) oder mit Mutationen der Aminosäuren S75/E78/T79 von Synaptobrevin (n=3; rote Quadrate) zu Alanin in Gegenwart von 2% SDS. SNARE-Komplexe wurden aus GST-Syntaxin, SNAP-25-His₆ und durch *in vitro* Translation ³⁵S-markiertem Synaptobrevin an GT-Sepharose zusammengesetzt und gewaschen. Aliquots wurden in SDS-Ladepuffer 10 Minuten bei der angegebenen Temperatur inkubiert und mittels SDS-PAGE und Phosphoimaging analysiert. Quantitative Auswertung der Phosphoimagerscans in Prozent komplexgebundenem ³⁵S-Synaptobrevin vom Gesamtgehalt an ³⁵S-Synaptobrevin (Mittelwerte ± SEM).

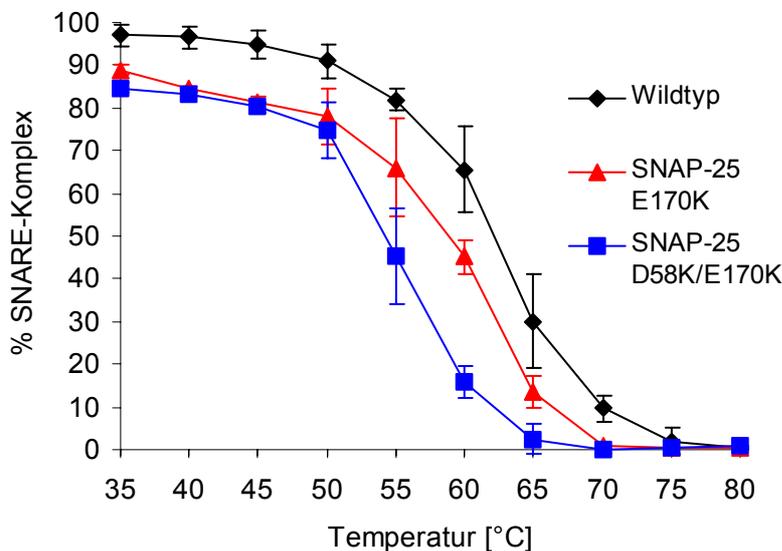


Abbildung 21: Schmelzverhalten von ternären SNARE-Komplexen (III) ohne (n=8; schwarze Rauten) oder mit Mutationen der Aminosäureseitenketten E170 (n=3; rote Dreiecke) bzw. D58/E170 (n=3; blaue Quadrate) von SNAP-25 zu Lysinresten in Gegenwart von 2% SDS. SNARE-Komplexe wurden aus GST-Syntaxin, SNAP-25-His₆ und durch *in vitro* Translation ³⁵S-markiertem Synaptobrevin an GT-Sepharose zusammengesetzt und gewaschen. Aliquots wurden in SDS-Ladepuffer 10 Minuten bei der angegebenen Temperatur inkubiert und mittels SDS-PAGE und Phosphoimaging analysiert. Quantitative Auswertung der Phosphoimagerscans in Prozent komplexgebundenem ³⁵S-Synaptobrevin vom Gesamtgehalt an ³⁵S-Synaptobrevin (Mittelwerte ± SEM).

3.2.3 Bindung von α -SNAP an ternäre SNARE-Komplexe

Im Zuge der Exozytose bilden sich cis-SNARE-Komplexe, die zwecks Wiederverwendung der einzelnen SNARE-Moleküle durch Einwirkung von Proteinen der SNAP-Familie und der homohexameren ATPase NSF dissoziiert werden. Für diese Reaktion sind Wechselwirkungen mit oberflächenexponierten Aminosäuren essentiell, weshalb das Bindungsverhalten der

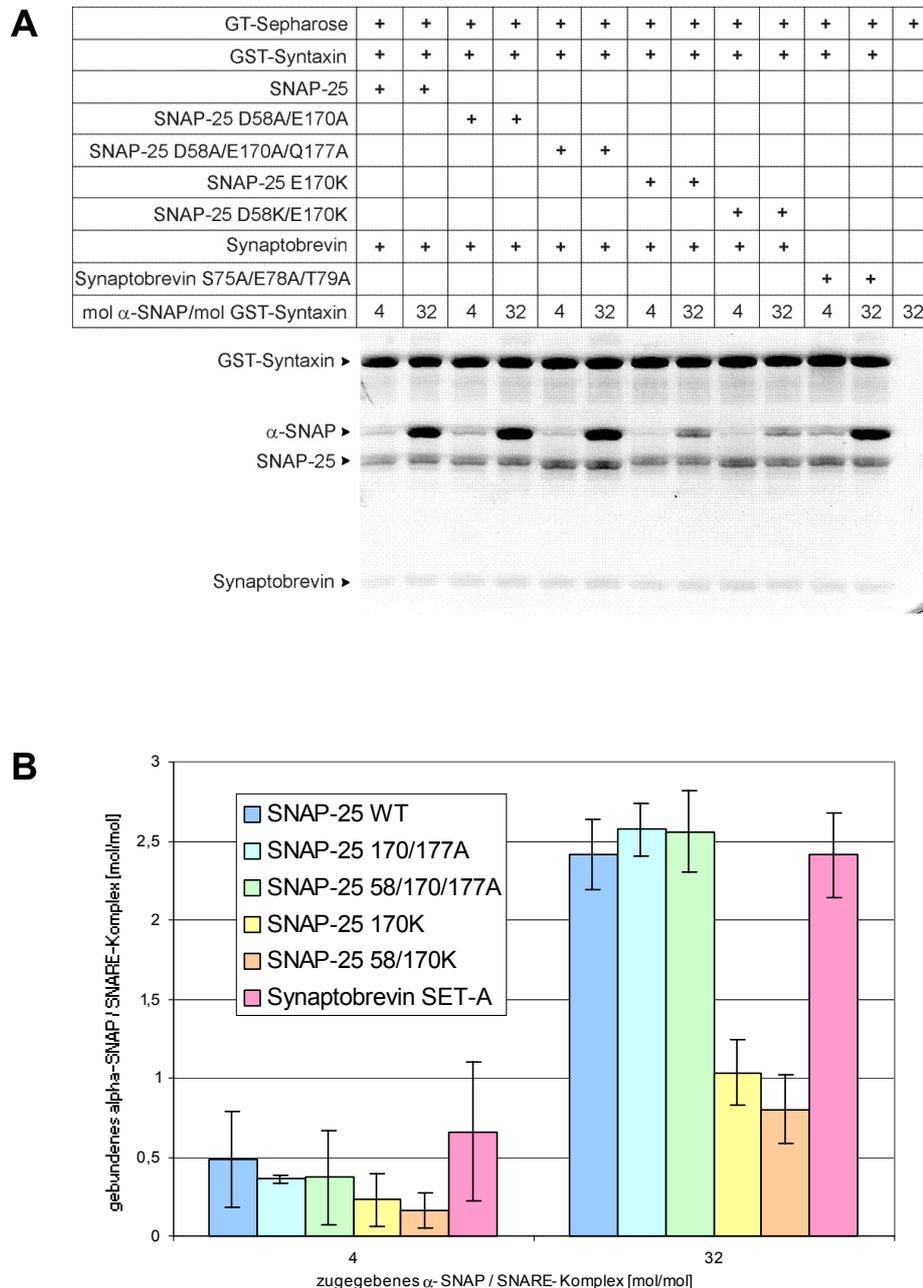


Abbildung 22: Bindung von α -SNAP an SNARE-Komplexe mit Mutationen der von D58 und/oder E170 von SNAP-25 zu Alanin- oder Lysinresten bzw. von Synaptobrevin S75/E78/T79 zu Alanin. SNARE-Komplexe wurden aus GST-Syntaxin, SNAP-25-His₆ und His₆-Synaptobrevin an GT-Sepharose zusammengesetzt, gewaschen und mit dem angegebenen Überschuß an α -SNAP über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Beads wurden gewaschen und nach SDS-PAGE und Coomassiefärbung (**A**) densitometrisch analysiert (**B**) (Mittelwerte \pm SEM). Zur Kontrolle von unspezifischer Bindung oder Präzipitation wurde ein Ansatz nur mit GT-Sepharosebeads mitgeführt (n = 4) und die Messwerte durch Subtraktion dieser Kontrollwerte korrigiert.

mutierten Komplexe gegenüber α -SNAP untersucht wurde. Dazu wurde der ternäre SNARE-Komplex aus GST-Syntaxin, SNAP-25-His₆ und His₆-Synaptobrevin an GT-Sepharosebeads zusammengesetzt, gewaschen und mit der vierfachen bzw. zweiunddreißigfachen molaren Menge α -SNAP inkubiert. Die an die Beads gebundenen Proteine wurden nach dem Entfernen von ungebundenem Protein durch mehrfaches Waschen mit Bindungspuffer durch SDS-Ladepuffer eluiert, gekocht und mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert. Das molare Verhältnis von gebundenem α -SNAP zu SNARE-Komplex wurde densitometrisch bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Mutation von Oberflächenamino­säuren des SNARE-Komplexes zu Alaninen keinen signifikanten Einfluß auf die Bindung von α -SNAP an den ternären Komplex hat, während die Ladungsumkehr der Aminosäurereste durch Mutation der Aspartat und Glutamatreste in der Bindungsstelle von SNAP-25 zu einer deutlich verringerten Bindung von α -SNAP an den ternären SNARE-Komplex unter saturierenden Bedingungen führt.

3.2.4 Dissoziation von SNARE-Komplexen durch α -SNAP und NSF

Der Einfluß der veränderten Bindung von α -SNAP an ternäre SNARE-Komplexe auf die Fähigkeit der chaperonen ATPase NSF zur Dissoziation des SNARE-Komplexes in die monomeren SNARE-Proteine wurde in einem Dissoziationsassay getestet. Dazu wurde ternärer SNARE-Komplex aus GST-Syntaxin, SNAP-25-His₆ und durch *in vitro* Transkription / Translation in Gegenwart von ³⁵S-Methionin radioaktiv markiertem Synaptobrevin an GT-Sepharosebeads zusammengesetzt, gewaschen und durch Inkubation mit His₆- α -SNAP und His₆-NSF dissoziiert. Der Anteil des durch NSF/ α -SNAP freigesetzten Synaptobrevins wurde durch SDS-PAGE und Phosphoimaging bestimmt. Wie in Abbildung 23 gezeigt, führt sowohl die Mutation der Aminosäuren in SNAP-25 zu Alanin als auch zu Lysin zu einer um 35% bzw. 45% gegenüber dem Wildtypkomplex verringerten Dissoziation des ternären SNARE-Komplexes, während die Mutation der von Synaptobrevin gebildeten Bindungsstelle keinen signifikanten Einfluss auf die α -SNAP/NSF-vermittelte Dissoziation hat.

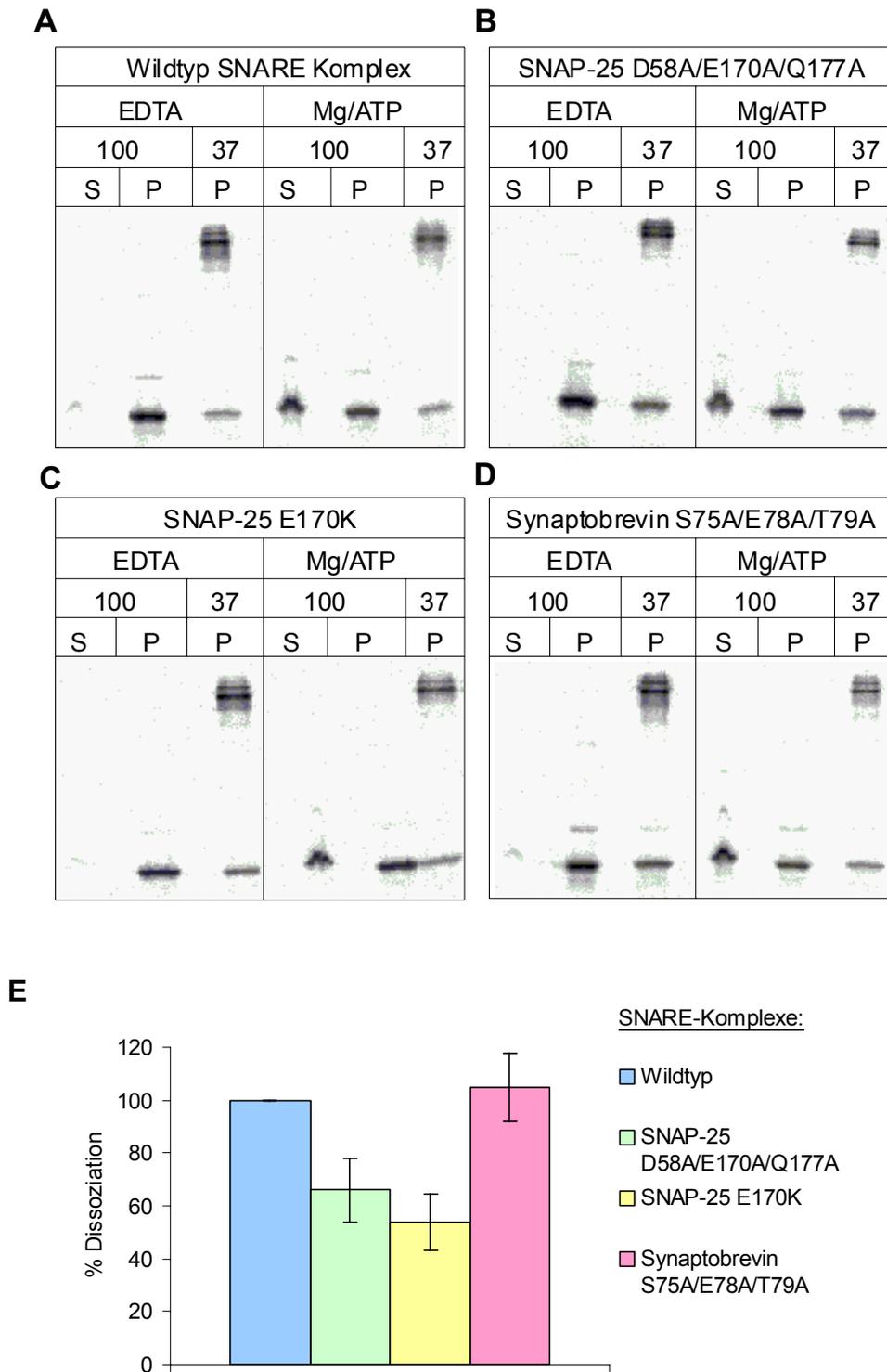


Abbildung 23: ATP-abhängige Dissoziation von ternären SNARE-Komplexen mit Mutationen in potentiellen Bindungsstellen für divalente Kationen durch α -SNAP und NSF. Ternäre SNARE-Komplexe wurden über Nacht durch Inkubation von monomerem SNAP-25-His₆ und GST-Syntaxin mit durch *in vitro* Translation ³⁵S-markiertem Synaptobrevin an GT-Sepharose zusammengesetzt, gewaschen und durch Inkubation in Gegenwart von α -SNAP und NSF dissoziiert. Nach Trennung von Überstand und GT-Sepharosebeads durch Zentrifugation wurde der Anteil an Synaptobrevin in beiden Fraktionen durch SDS-PAGE und Phosphoimaging analysiert. Kontrollansätze enthielten EDTA statt Mg-ATP. (A-D) Phosphoimager-scans von typischen Gelanalysen von Überstand (S) und der Pellet (P)-Fraktion nach Inkubation bei 37°C bzw. 100°C. (E) Quantitative Auswertung (n=4; Mittelwerte \pm SEM).

3.2.5 Bindung von Calcium an den ternären SNARE-Komplex

Die in der Kristallstruktur des ternären SNARE-Komplexes mitkristallisierten Strontiumatome zeigen potentielle Bindungsstellen für divalente Kationen. Daher wurde die Bindung von Calcium an den ternären SNARE-Komplex im physiologisch relevanten Konzentrationsbereich durch Gleichgewichtsdialyse gemessen. Da Calcium eine oktaedrische Koordination bevorzugt, was mit den koordinierenden Aminosäuren der Bindungsstellen alleine nicht erreicht wird, wurde die Bindung von Calcium an den gereinigten ternären SNARE-Komplex in Gegenwart von Phospholipiden zur potentiellen Vervollständigung der Koordinationssphäre durchgeführt. Wie in Abbildung 24 dargestellt, bindet sowohl ternärer Wildtyp-SNARE-Komplex als auch ternärer SNARE-Komplex mit Mutation der SNAP-25-Aminosäuren D58/E170/Q177 zu Alanin in der potentiellen SNAP-25-Bindungsstelle im physiologisch relevanten Konzentrationsbereich kein Calcium.

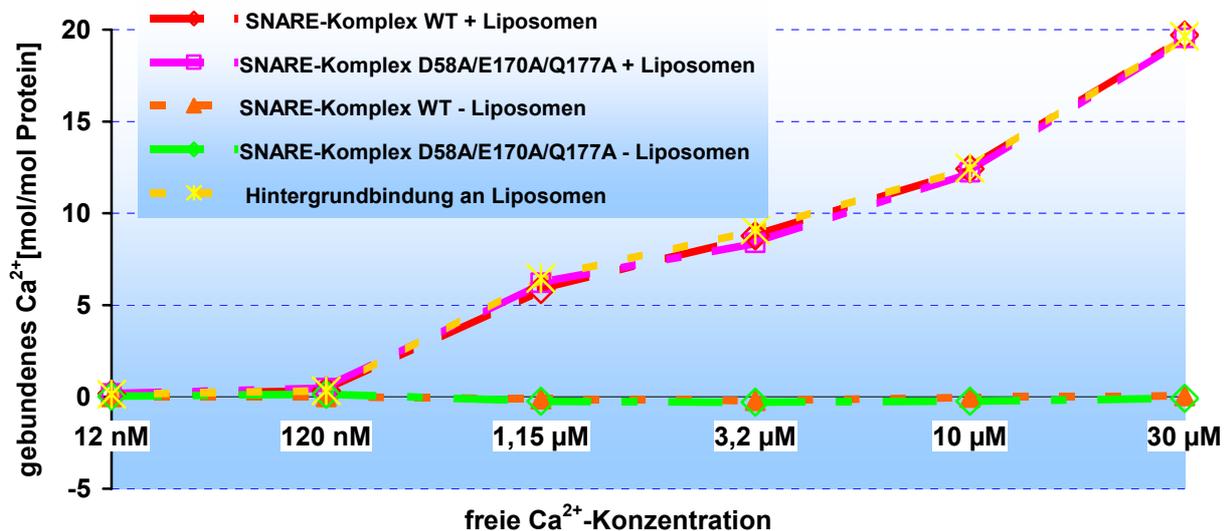


Abbildung 24: Messung der direkten Bindung von Calcium an den ternären SNARE-Komplex mit und ohne Mutation der Aminosäuren D58/E170/Q177 von SNAP-25 zu Alanin in Gegenwart von Phospholipiden (75% DPPC / 25% DPPS) durch Gleichgewichtsdialyse mit ⁴⁵Ca. Gereinigte SNARE-Komplexe wurden 18 h in Gegenwart von Liposomen in ⁴⁵Ca-haltigen Puffern mit definierter freier Calciumionenkonzentration dialysiert und die Calciumkonzentration durch Flüssigszintillationszählung bestimmt. Eventuelle Volumenänderungen während der Dialyse wurde durch Zusatz von Bluedextran und photometrische Messung verfolgt und berücksichtigt. Gezeigt sind die Messwerte von Wildtyp-SNARE-Komplex (rot) und D58A/E170A/Q177A-SNARE-Komplex (magenta) mit Liposomen sowie nach Abzug der Hintergrundbindung (gelb) an Liposomen alleine (orange bzw. grün).

3.3 Elektrophysiologische Charakterisierung von Mutationen in SNARE-Proteinen

In Zusammenarbeit mit Shunhui Wei und Jakob Sørensen aus der Abteilung Membranbiophysik (Prof. Dr. E. Neher) des Max-Planck-Instituts für Biophysikalische Chemie wurde der Effekt von Mutationen im O-Layer und auf der Oberfläche des SNARE-Komplexes auf die Sekretion von Catecholaminen aus Chromaffinzellen untersucht. Dazu wurde SNAP-25 oder Synaptobrevin 2 mit Hilfe des Semliki-Forest-Virus Expressionssystem (Lundstrom *et al.*, 1999 Ashery *et al.*, 1999) in chromaffinen Zellen überexprimiert und die Sekretion nach Stimulation kapazitiv und amperometrisch mit hoher Zeitauflösung verfolgt.

3.3.1 Elektrophysiologische Charakterisierung von Mutationen im O-Layer des SNARE-Komplexes

Zur Untersuchung der Rolle von Aminosäuren des O-Layers wurde die Plasmide pSCA1-GFP-SNAP-25 und pSCA1-GFP-SNAP-25 Q174L generiert. Durch Elektroporation der linearisierten Plasmide zusammen mit dem Plasmid pSCA-helper in BHK Zellen lassen sich davon rekombinante Semliki-Forest-Viren gewinnen, mit welchen sich Chromaffinzellen mit einer Effizienz von 50% infizieren lassen. Wie Abbildung 25 zu entnehmen ist, führt die Überexpression von GFP-SNAP-25 Q174L zu einer Verringerung der Sekretion in Chromaffinzellen. Die Sekretion ist in der Antwort auf einen ersten Calciumstimulus durch Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA:Calcium nur in der sustained Phase signifikant verringert, während in der Antwort auf einen zwei Minuten später erfolgenden weiteren Stimulus sowohl der Burst als auch die sustained Phase gegenüber den nicht infizierten Kontrollzellen signifikant verringert sind. Die genaue Analyse der ersten zwei Sekunden nach dem Stimulus zeigt nach der Skalierung, wie in Abbildung 26A zu sehen ist, keinen signifikanten Unterschied in der Kinetik und Amplitude der langsamen und schnellen Komponente des Bursts. Die Darstellung der Anfangsgeschwindigkeit der Fusion in Abhängigkeit von der intrazellulären Calciumkonzentration zeigt ebenfalls keinen Unterschied zwischen Kontroll- und SNAP-25 Q174L überexprimierenden Zellen. Daraus folgt, dass die Mutation von Glutamat 174 zu Leucin in SNAP-25 keinen Einfluss auf das dynamische Gleichgewicht zwischen SRP und RRP hat. Anhand des starken Effektes der Mutation auf die Antwort des zweiten Calciumstimulus zeigt sich die Bedeutung des O-Layers für das Gleichgewicht zwischen UPP und SRP/RRP, was vermutlich auf eine verlangsamte Bildung von *trans*-SNARE-Komplex zurückzuführen ist.

Überexpressionsversuche der Doppelmutante SNAP-25 Q53L/Q174L führten zu keinem messbaren physiologischen Effekt in Chromaffinzellen. Dies ist vermutlich auf die Destabilisierung durch die große sterische Hinderung und Abstoßung zurückzuführen, welche aus der Einführung von zwei hydrophoben Leucinen in die ionische Schicht des O-Layers resultiert und sich auch in der deutlich verringerten Stabilität des derart zusammengesetzten SNARE-Komplexes zeigt (siehe Abbildung 12). Da das überexprimierte SNAP-25 sich in Konkurrenz mit dem endogenen SNAP-25 befindet, kann die Mutante, bedingt durch die

Destabilisierung des mutierten SNARE-Komplexes, nicht mehr das endogene SNAP-25 verdrängen, wodurch der eigentliche Effekt der Mutation nicht messbar ist.

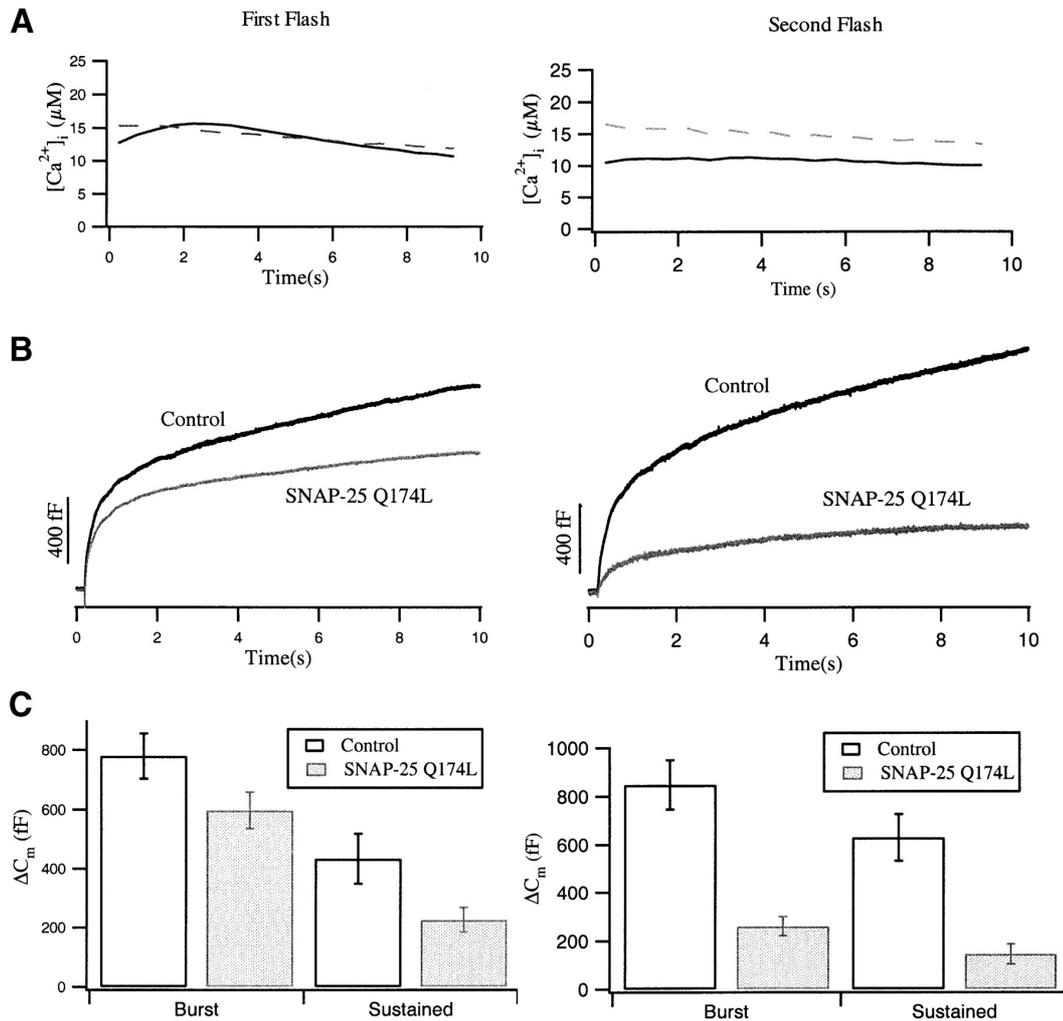


Abbildung 25: Die Überexpression von SNAP-25 Q174L in chromaffinen Zellen führt zu einer Reduktion der „sustained“ Phase in der Antwort auf den ersten Calciumstimulus (links), sowie zur Verringerung von exozytotischen Burst und der „sustained“ Phase in der Antwort auf einen 2 Minuten später applizierten Calciumstimulus (rechts). (A) Durchschnittliche intrazelluläre Calciumkonzentration in Kontroll- (durchgezogene Linie, n= 23) und SNAP-25 Q174L-überexprimierenden Zellen (gestrichelte Linie, n= 26). (B) Korrespondierende Kapazitätsänderungen der Antworten auf den ersten und zweiten Calciumstimulus. (C) Gemittelte Amplituden des exozytotischen Bursts und der „sustained“ Phase für Kontroll- (weiß) und SNAP-25 Q174L überexprimierende Zellen (grau). In der Antwort auf den ersten Calciumstimulus (links) ist nur die „sustained“ Phase signifikant verringert (t-test $p < 0.05$), während in der Antwort auf den zwei Minuten später erfolgten zweiten Calciumpuls (rechts) sowohl der exozytotische Burst als auch die „sustained“ Phase signifikant reduziert sind (t-test $p < 0.01$). Die Abbildung wurde aus Wei *et al.*, 2000 entnommen.

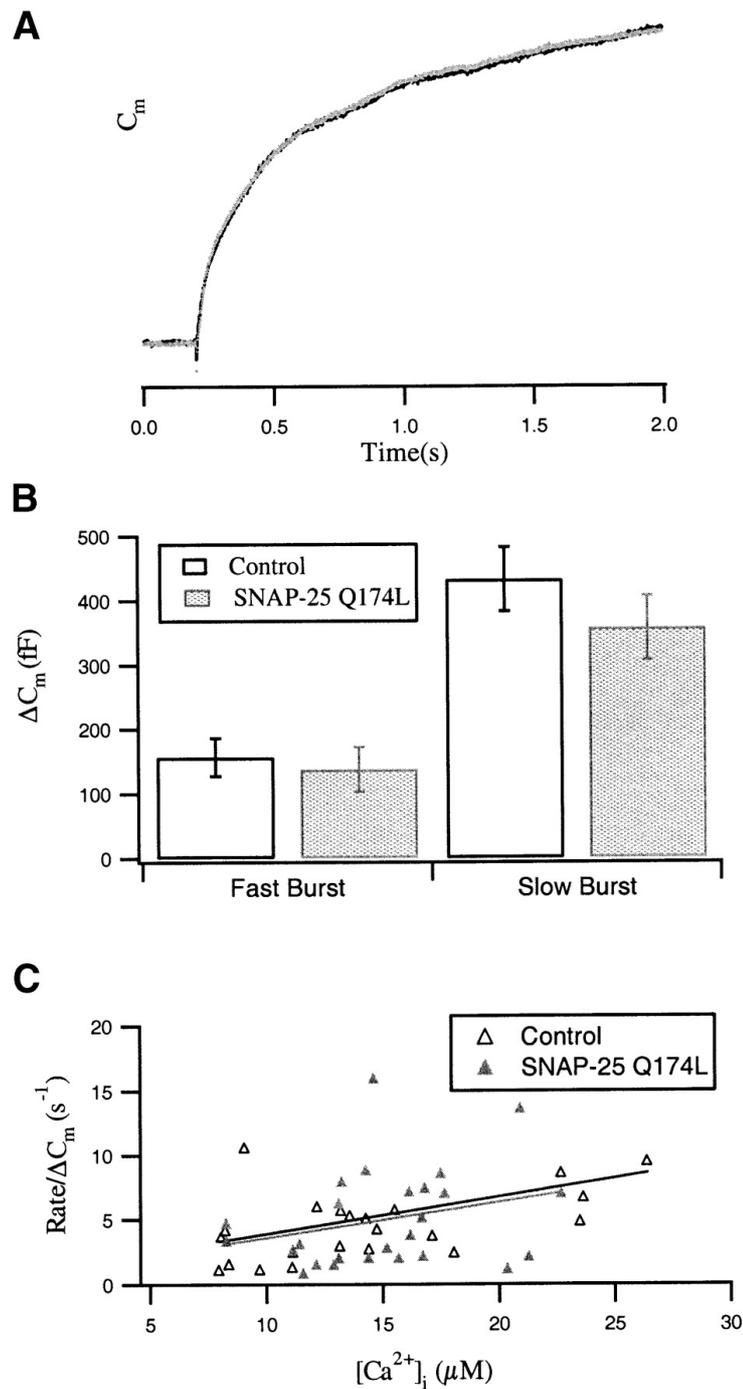


Abbildung 26: Das Gleichgewicht zwischen den schnellen und langsamen Komponenten des exozytotischen Bursts ist in SNAP-25 Q174L überexprimierenden Zellen unverändert. (A) Normalisierter Verlauf der Kapazitätsänderung während des Zeitraumes des exozytotischen Bursts (0-2 Sekunden nach dem Stimulus) in Kontroll- (schwarze Linie) und SNAP-25 Q174L überexprimierender Zellen (graue Linie). (B) Vergleich der Amplitude von schneller und langsamer Burst-Komponente nach dem ersten Stimulus in Kontroll- (weiß) und SNAP-25 Q174L überexprimierenden Zellen zeigt keine signifikanten Unterschiede. (C) Anfangsgeschwindigkeit der Kapazitätzunahme in Abhängigkeit von der intrazellulären Calciumkonzentration. Die Anpassung für Kontroll- (schwarze Linie) und SNAP-25 Q174L-überexprimierende Zellen (graue Linie) ist nahezu identisch. Die Abbildung wurde aus Wei *et al.*, 2000 entnommen.

3.3.2 Elektrophysiologische Charakterisierung von Mutationen in potentiellen Bindungsstellen für divalente Kationen

Der Effekt der Oberflächenmutationen im Bereich der potentiellen divalenten Kationenbindungsstellen wurde in chromaffinen Zellen durch Überexpression von GFP-SNAP-25 D58A/E170A/Q177A, GFP-SNAP-25 E170A/Q177A und Synaptobrevin2 S75A/E78A/T79A untersucht. Da für Synaptobrevin2 im Gegensatz zu SNAP-25 keinerlei Daten aus Experimenten mit Neurotoxinen als Kontrollen vorhanden sind, wurde der für Synaptobrevin2 kodierende Vektor nicht als GFP-Fusionprotein konstruiert, sondern das fluoreszierende Reportergen zur Identifizierung von infizierten Zellen mit einer internen Ribosomeneintrittsstelle (IRES) hinter das Synaptobrevin-Gen kloniert.

3.3.2.1 Die Bindungsstelle SNAP-25 D58/E170/Q177

Die elektrophysiologischen Daten für die Dreifachmutante SNAP-25 D58A/E170A/Q177A zeigen eine starke Inhibition der Sekretion, was die Auswertung der Daten stark erschwert. Daher wurde in weiteren Versuchen die Doppelmutante SNAP-25 E170A/Q177A verwendet, welche die Sekretion ebenfalls drastisch verringert, jedoch nur in einem Ausmaß, das eine brauchbare Auswertung erlaubt. Wie aus Abbildung 27 zu entnehmen ist, sind sowohl die schnelle und langsame Komponente des Bursts als auch die verzögerte Sekretion bei der Dreifachmutante stark inhibiert, bei der Doppelmutante stark verringert. Die kinetische Analyse der Sekretion zeigt dagegen keinen signifikanten Unterschied gegenüber SNAP-25-Wildtyp überexprimierenden Zellen.

Die Ladungsumkehr der Bindungsstelle SNAP-25 D58/E170/Q177 durch Einführung von Lysinresten in den Positionen 58 und 170 führt, wie Abbildung 28 zu entnehmen ist, ebenfalls zu einer Eliminierung des exozytotischen Bursts. Demnach ist der bei den Alanin-Mutationen beobachtete Effekt nicht alleine auf die durch Zerstörung der negativ geladenen potentiellen Bindungsstelle verhinderte Ladungsumkehr, wie sie bei der Bindung von Calcium erfolgen würde, zurückzuführen.

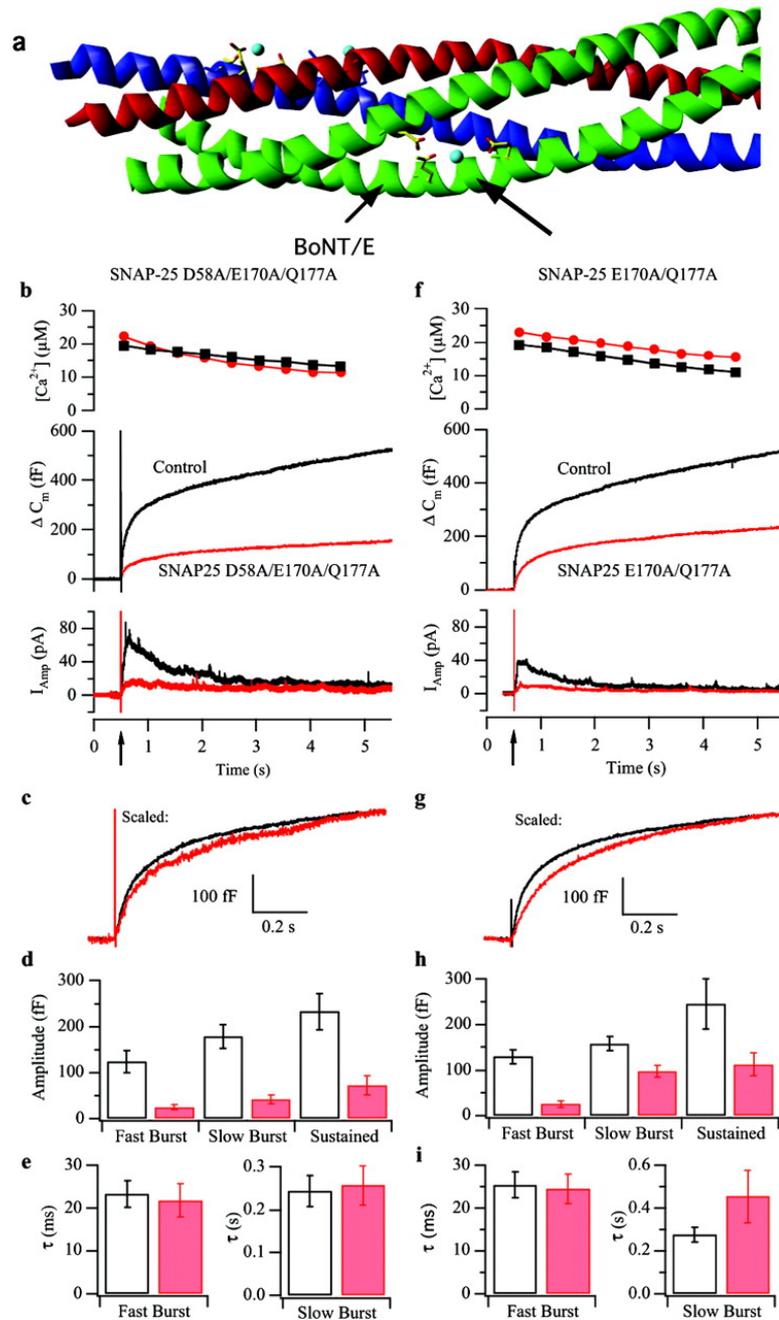


Abbildung 27: Auswirkung der Mutationen D58/E170/Q177 und E170A/Q177A in SNAP-25 auf die Sekretion in chromaffinen Zellen. Mutation von D58/E170/Q177 in SNAP-25 inhibiert die Sekretion. (a) Die Kristallstruktur des ternären SNARE-Komplexes enthält mehrere Strontiumionen (hellblau). Pfeile zeigen auf die in dieser Abbildung untersuchte Bindungsstelle sowie die Spaltstelle von Botulinumneurotoxin E. Rot: Syntaxin 1, blau: Synaptobrevin 2, grün: SNAP-25, gelb: mit Strontiumionen interagierende Aminosäureseitenketten. (b) Sekretion von chromaffinen Zellen nach Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration durch Blitzlichtphotolyse von Calcium-Nitrophenyl-EGTA. Mittelwerte von 31 nicht überexprimierenden Kontrollzellen (schwarz) und 29 Zellen, welche SNAP-25 D58A/E170A/Q177A überexprimieren (rot). (Oben) $[Ca]_i$ nach Blitzlichtphotolyse (Pfeil auf der Zeitachse) von Ca:NP-EGTA. $[Ca]_i$ vor Blitzlichtphotolyse: 200-500 nM. (Mitte) Kapazitätsänderung (Mittelwerte). (Unten) Amperometrischer Strom (Mittelwerte). (c) Skalierung der mittleren Kapazitätsänderung von überexprimierenden Zellen (rot) an Kontrollzellen (schwarz) 1s nach Blitzlichtphotolyse. (d+e) Amplituden und Zeitkonstanten (Mittelwerte \pm SEM) aus exponentieller Anpassung an individuelle Antworten. (f-i) **Die Doppelmutation E170A/Q177A in SNAP-25 verlangsamt die Sekretion.** Mittelwerte von 47 Kontrollzellen (schwarz) und 36 SNAP-25 E170A/Q177A überexprimierender Zellen (rot). Siehe Legende zu b-e für Erklärungen. Die Abbildung wurde aus Sørensen *et al.*, 2002 entnommen.

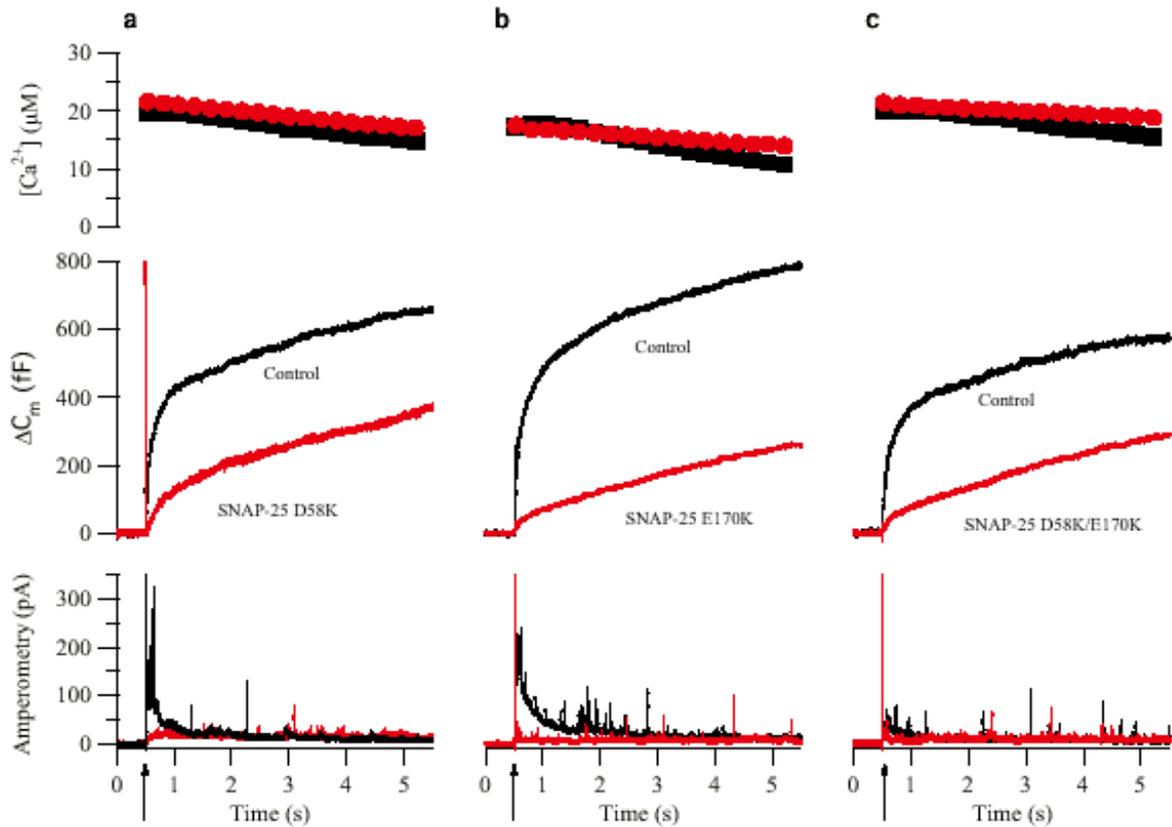


Abbildung 28: Ladungsumkehr in der SNAP-25 D58/E170/Q177 Bindungsstelle eliminiert den exozytotischen Burst. Durchschnittliche freie intrazelluläre Calciumkonzentration (oben) nach Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA:Ca (Pfeil), Kapazitätsänderung (Mitte) sowie amperometrische Messung der Sekretion von Catecholamin (unten) von sieben Kontrollzellen (schwarz) und (a) SNAP-25 D58K (n=9), (b) SNAP-25 E170K (n=7) oder (c) SNAP-25 D58K/E170K (n=6) überexprimierender Zellen (rot).

3.3.2.2 Die Bindungsstelle Synaptobrevin 2 S75/E78/T79

Die in Abbildung 30 dargestellten Messungen an Synaptobrevin 2 S75A/E78A/T79A überexprimierenden Chromaffinzellen zeigen eine starke Verringerung des exozytotischen Bursts, wogegen die verzögerte Sekretion unverändert ist. Die Überexpression von Wildtyp-Synaptobrevin 2 zeigt nur geringe Veränderungen der Sekretion in Chromaffinzellen, wobei die Gesamtsekretion nach fünf Sekunden gleich ist. Die Skalierung der Burstphase zeigt jedoch keinen Unterschied in der Kinetik (Kasten in Abbildung 30 b), während die Dreifachmutante von Synaptobrevin 2 eine deutlich veränderte Kinetik zeigt (Kasten in Abbildung 30 c). Demnach hat die Mutation der Bindungsstelle von Synaptobrevin 2 einen großen Effekt auf den exozytotischen Burst, während die Rekrutierung von Vesikeln aus dem UPP unbeeinflusst ist.

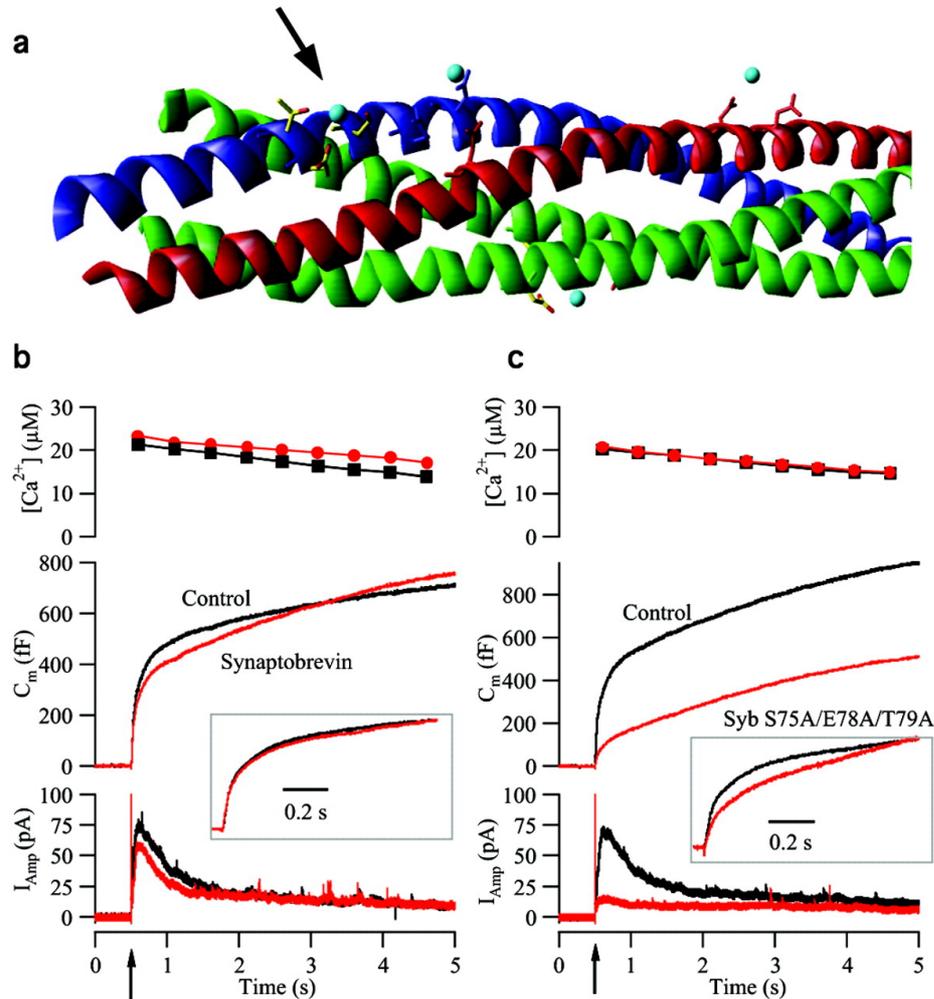


Abbildung 30: Dreifachmutation der Aminosäuren S75/E78/T79 in der Synaptobrevin 2 Strontiumbindungsstelle blockiert den exozytotischen Burst. (a) Kristallstruktur mit den mutierten Aminosäuren (Pfeil). Farben wie in Abbildung 28. (b) Mittelwerte von 51 nicht überexprimierenden Kontrollzellen (schwarz) und 35 Synaptobrevin 2 Wildtyp überexprimierenden Zellen (rot). (Oben) $[Ca]_i$ nach Blitzlichtphotolyse (Pfeil auf der Zeitachse) von Ca:NP-EGTA. $[Ca]_i$ vor Blitzlichtphotolyse: 200-500 nM. (Mitte) Kapazitätsänderung (Mittelwerte). (Unten) Amperometrischer Strom (Mittelwerte). (Kasten) Skalierung der mittleren Kapazitätsänderung von überexprimierenden Zellen (rot) an Kontrollzellen (schwarz) 1 s nach Blitzlichtphotolyse. (c) Mittelwerte von 47 Kontrollzellen (schwarz) und 42 Synaptobrevin 2 S75A/E78A/T79A überexprimierenden Zellen (rot). Erklärungen wie für b. Die Abbildung ist aus Sørensen *et al.*, 2002 entnommen.

3.3.2.3 Calciumabhängigkeit der Exozytose

Ein deutlicher Unterschied zwischen den Effekten von Mutationen in den potentiellen ionischen Bindungsstellen von SNAP-25 und Synaptobrevin 2 zeigt sich bei Betrachtung der Calciumabhängigkeit der Exozytose der entsprechenden Mutanten beider SNAREs. Die Calciumabhängigkeit der Exozytose ist experimentell durch langsame Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bei gleichzeitiger Messung der Gesamtkapazität der Zelle zugänglich. Dazu wird das Calcium nicht wie in den Flash-Experimenten schlagartig durch Applikation eines starken UV-Blitzes, sondern durch wechselnde Beleuchtung mit UV-Licht verschiedener Wellenlänge unter gleichzeitiger Messung der freien Calciumkonzentration rampenartig erhöht. Die so gemessenen Daten sind in Abbildung 31 dargestellt. Das Standardmodell der Exozytose aus Chromaffinzellen beinhaltet drei sequentielle calciumbindende Schritte welche vor der Fusion eines Vesikels ablaufen (Voets, 2000). Die mit der Calciumrampenmethode an Synaptobrevin 2 S75A/E78A/T79A und Kontrollzellen gemessenen Daten lassen sich problemlos an das Standardmodell anpassen und zeigen keine Veränderung in der Calciumabhängigkeit der Sekretion. Die Mutation der potentiellen Bindungsstelle D58/E170/Q177 von SNAP-25 lässt sich dagegen nur mit einem verändertem Fusionsmodell, welches anstatt der drei nur zwei Calciumbindungsschritte umfasst, in Einklang bringen. (Abbildung 31 d und f). Die Inhibition der Sekretion durch Mutation von Aminosäuren in potentiellen Bindungsstellen für divalente Kationen ist demnach im Fall der untersuchten SNAP-25-Mutante auf den Verlust eines Calciumbindungsschrittes zurückzuführen, während es bei der untersuchten Synaptobrevinmutante keinen Einfluss auf oder Zusammenhang mit calciumabhängigen Schritten gibt. Der Verlust des Calciumbindungsschrittes lässt sich nicht durch eine Ladungsumkehr durch Mutation zu Lysin in der Bindungsstelle, wie sie bei einer Bindung von Calciumionen in der Bindungsstelle erfolgen würde, wiederherstellen (siehe Abbildung 29). Die Funktion der Synaptobrevin 2 S75A/E78A/T79A Bindungsstelle hat einen starken Einfluss auf die Größe von SRP und RRP, jedoch keinen Effekt auf die Calciumabhängigkeit der Exozytose.

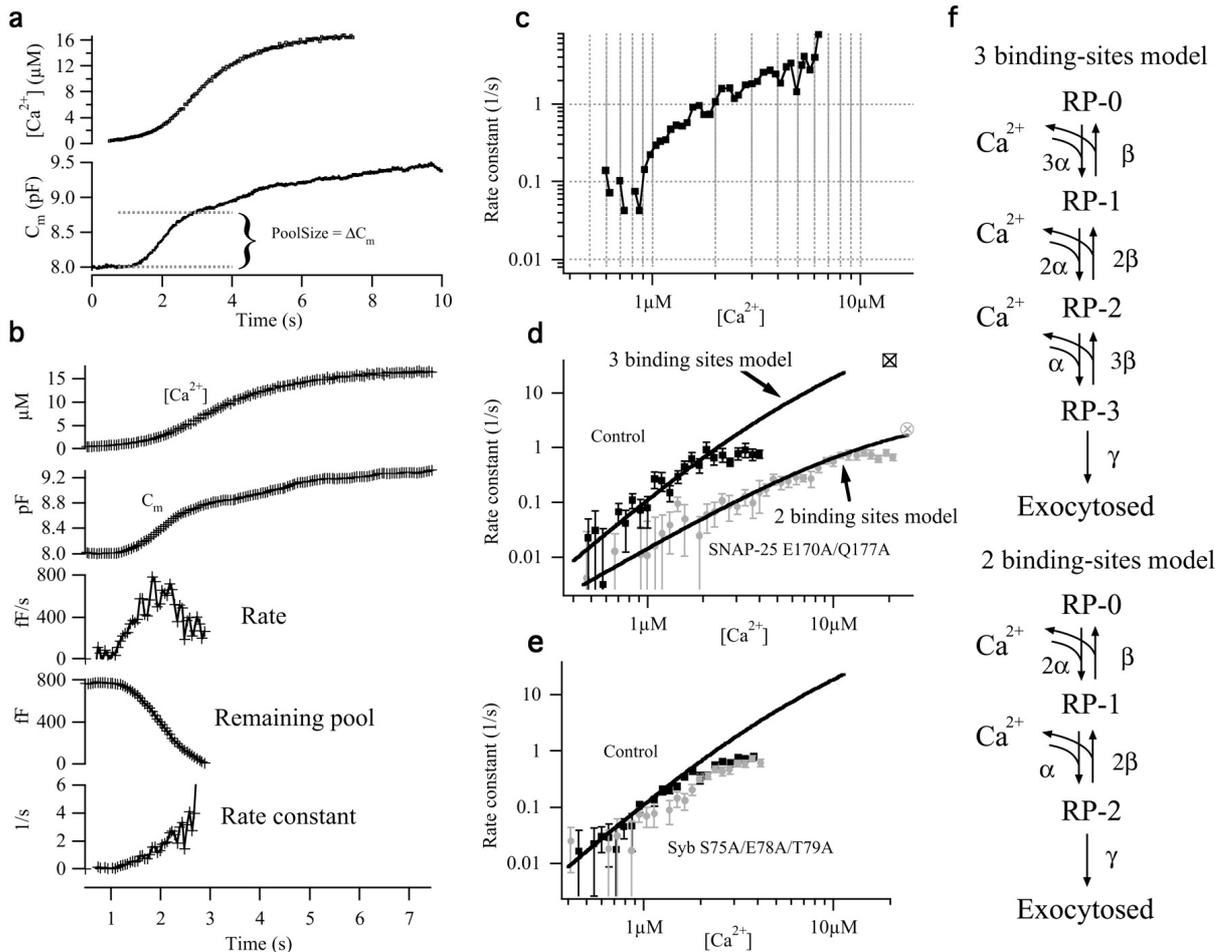


Abbildung 31: Die Mutation der Aminosäuren E170/Q177 von SNAP-25 zu Alanin ändert die Calciumabhängigkeit der Exocytose. (a) Beispiel einer Kontrollzelle während kontinuierlicher Bestrahlung mit UV-Licht. (Unten) Kapazitätsänderung und (Oben) Messung der intrazellulären Calciumkonzentration. (b) Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten. Der Kapazitätsverlauf (2. Spur) wurde um jede Calciummessung (1. Spur) gemittelt und die lokale Geschwindigkeit errechnet (3. Spur). Nach Abschätzung der Größe des „readily releasable pools“ (siehe a) wurde der verbleibende Pool berechnet (4. Spur) sowie letztendlich die Geschwindigkeitskonstante (5. Spur) durch Division der Geschwindigkeit durch die Größe des verbleibenden Pools. (c) Doppeltlogarithmische Auftragung der Geschwindigkeitskonstante gegen die Calciumkonzentration. (d) Doppelt logarithmische Auftragung der Geschwindigkeitskonstante gegen die Calciumkonzentration für 15 Kontrollzellen (schwarze Kästen) und 13 SNAP-25 E170A/Q177A überexprimierende Zellen (graue Kreise). Zum Vergleich der Daten aus Rampen- und Blitzlichtphotolyseexperimenten sind die Ergebnisse aus Abbildung 27i als offene Symbole mit Kreuzen eingezeichnet. Für Kontrollzellen wurde die Geschwindigkeitskonstante des „readily releasable pools“, für die SNAP-25-Mutation die Geschwindigkeitskonstante des „slowly releasable pools“ gezeigt. Die beobachtete Sättigung der Geschwindigkeitskonstante bei etwa 1/s wird wahrscheinlich durch die Vermischung des „readily releasable pools“ mit späteren Pools und einem daraus resultierendem Fehler bei der Bestimmung der Poolgröße verursacht. Die angepassten Kurven zeigen für die Kontrollzellen das 3-Bindungsstellen-Modell aus (f), wogegen für die SNAP-25-Mutante das 2-Bindungsstellen-Modell verwendet wurde. (e) Doppeltlogarithmische Auftragung der Geschwindigkeitskonstante gegen die Calciumkonzentration von 13 Kontrollzellen (schwarz) und 13 Synaptobrevin 2 S75A/E78A/T79A überexprimierender Zellen (grau). (f) Sequentielles Calciumbindungsmodell der Exozytose. (Oben) Standardmodell für chromaffine Zellen mit 3 äquivalenten Calciumbindungsstellen. (Unten) Modifiziertes Modell mit zwei äquivalenten Calciumbindungsstellen. Die Modelle wurden numerisch gelöst mit Hilfe einer Runge-Kutta-Methode 4. Grades, automatischer Schrittweitenkontrolle und einer typischen Calciumrampe als treibende Funktion. Die Modelle wurden mit einer Simplex Methode an die Daten in d angepasst. Parameter: $\alpha = 5.7 \mu M^{-1} s^{-1}$; $\beta = 56 s^{-1}$; $\gamma = 1450 s^{-1}$ für den Fit des 3-Bindungsstellen-Modell an Kontrolldaten (nur α wurde variiert, β und γ wurden aus Voets, T. (2000) übernommen); $\alpha = 4.2 \mu M^{-1} s^{-1}$; $\beta = 69 s^{-1}$; $\gamma = 4.7 s^{-1}$ für den Fit des 2-Bindungsstellen-Modells an die SNAP-25 E170A/Q177A Daten. Die Abbildung ist aus Sørensen *et al.*, 2002, entnommen.

4 Diskussion

Der SNARE-Komplex ist essentieller Bestandteil der für die Fusion von Membranen unterschiedlicher Kompartimente notwendigen Proteinmaschinerie. Eines der spezialisiertesten und effektivsten Membranfusionsereignisse ist die Freisetzung von Neurotransmitter aus synaptischen Vesikeln bei der Fusion mit der präsynaptischen Membran. Die Bestandteile des neuronalen SNARE-Komplexes, Synaptobrevin 2, SNAP-25 und Syntaxin 1, durchlaufen während der Reifung des freien Vesikels zum fusionskompetenten Vesikel eine Reihe modulatorischer Wechselwirkungen mit einer Vielzahl von anderen, teilweise noch unbekanntem Proteinen.

Die Bereiche der Protein-Protein-Wechselwirkungen der SNARE-Proteine untereinander finden, mit Ausnahme der ionischen Wechselwirkungen des O-Layers, in einem hydrophoben inneren Kern des SNARE-Komplexes statt, während die Oberfläche stark hydrophil ist und ionische Wechselwirkungen mit regulatorischen Proteinen und geladenen Molekülen ermöglicht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch gezielte Mutation die Funktion des O-Layers im neuronalen SNARE-Komplex sowie die Bedeutung von potentiellen Bindungsstellen für divalente Kationen auf der Oberfläche des SNARE-Komplexes untersucht.

Die erzielten Ergebnisse sollen zusammen mit den in Kollaboration mit Shunhui Wei, Jakob B. Sørensen und weiteren Mitarbeitern aus der Abteilung Membranbiophysik (Prof. E. Neher) des Max-Planck-Instituts für biophysikalische Chemie in Göttingen gewonnenen Ergebnissen aus elektrophysiologischen Messungen an chromaffinen Zellen in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

4.1 Der zentrale ionische O-Layer

Der zentrale ionische O-Layer des neuronalen SNARE-Komplexes ist innerhalb der SNARE-Proteinfamilie und über die Artgrenzen hinweg streng konserviert. Diese Konservierung deutet auf eine wichtige Funktion des O-Layers hin, die bislang jedoch unbekannt ist. Folgende Funktionen des O-Layers sind für die Gesamtfunktion des SNARE-Komplexes denkbar:

SNARE-Komplexe werden nach der Fusion durch α -SNAP/NSF dissoziiert und damit für weitere Fusionsrunden zur Verfügung gestellt. Die ionischen Aminosäuren des O-Layers könnten dabei Angriffspunkte für das brecheisenartig wirkende α -SNAP im Dissoziationsprozess sein.

Zudem ist denkbar, dass die starke ionische Wechselwirkung der O-Layer-Aminosäuren innerhalb des ansonsten hydrophoben SNARE-Komplexes essentiell für die Menge der während der Fusion über die Membrananker übertragene Energie ist, welche zur Überwindung der elektrostatischen Abstoßung zwischen den zu fusionierenden Membranen benötigt wird. Die Entfernung der ionischen Wechselwirkung könnte daher zu einer

Blockierung der Fusion aufgrund der bei der Bildung des SNARE-Komplexes in geringerem Ausmaß freigesetzten Energie führen.

Eine weitere Funktion könnte in der Kontrolle der richtigen Ausrichtung der vier Helices im korrekten Register bei der Bildung des SNARE-Komplexes liegen. Dies würde verhindern, dass die SNARE-Proteine fusionsinkompetente Komplexe mit gegeneinander verschobenen Helices bilden, welche bei der vollständigen Ausbildung des SNARE-Komplexes nicht genügend Zug auf die gegenüberliegenden Membranen ausüben können.

4.1.1 Korrelation zwischen Stabilität und Funktion bei mutierten SNARE-Komplexen

Die unter nativen Bedingungen aufgenommenen CD-Spektren zeigen keinen Unterschied im Strukturgehalt des gebildeten Komplexes, was anhand der Schmelzkurven und der Rechnersimulation zu erwarten war. Der gemessenen Anteil an α -Helizität liegt etwas unter den zuvor von Fasshauer *et al.*, 1998, ermittelten Werten für Wildtyp-Komplex. Dies ist vermutlich auf die zusätzlichen Aminosäuren der N- und C-terminalen Affinitätstags zurückzuführen.

Der ternäre SNARE-Komplex wird auf Grund seiner bereits 1994 von Hayashi *et al.* gezeigten Eigenschaft, auch bei erhöhten Temperaturen stabil gegen Einwirkung von SDS und chaotropen Salze zu sein, als SDS-resistenter SNARE-Komplex bezeichnet. Die SDS-Resistenz ist dabei ein Indiz, wie perfekt die einzelnen Helices der monomeren SNARE-Proteine im ternären SNARE-Komplex zusammenpassen und damit Detergenzien den Zugang zu den im Inneren des Komplexes stattfindenden hydrophoben Wechselwirkungen versperren. Eine deutliche Erniedrigung des Schmelzpunktes von mutierten SNARE-Komplexen kann daher als Indikator für Veränderungen der Quartärstruktur, welche die Integrität der Struktur des SNARE-Komplexes beeinflussen, verwendet werden. In permeabilisierten PC12 Zellen wurde von Chen *et al.* (1999) gezeigt, dass die Ausschüttung von Adrenalin mit der Stabilität des SNARE-Komplexes in Gegenwart von SDS teilweise stark korreliert, jedoch eine Verringerung der Schmelztemperatur nicht zwangsläufig zu einer verringerten Sekretion führen muß. So führte ein Austausch von Glutamat 174 zu Alanin oder Isoleucin zu einer Verringerung der Schmelztemperatur um 9 bzw. 14°C in Gegenwart von 0.67% SDS führt, jedoch ist die Adrenalin-Sekretion nicht signifikant verringert. Die vergleichsweise starke Schmelzpunkterniedrigung der Alanin und Isoleucinmutante in 0.67% SDS gegenüber der Mutation zu Leucin in 2% SDS ist wahrscheinlich auf die schlechteren Wechselwirkungen bzw. stärkeren sterischen Hinderungen zurückzuführen. Bei der durch Computersimulation unterstützten Suche nach geeigneten Mutationen im O-Layer wurden diese ebenfalls beobachtet (Daten nicht gezeigt). Anhand der rechnergestützten Simulation ist aus den gleichen Gründen auch die zunehmende Instabilität des SNARE-Komplexes bei Austausch von zwei ionischen Aminosäuren zu Leucinen im O-Layer zu erwarten.

Die verringerte Stabilität des SNARE-Komplexes mit Mutationen im O-Layer zeigt indirekt auch den zu erwartenden Verlust an bei der Bildung des SNARE-Komplexes freigesetzten Energie an. Ob verringerte Stabilität des Komplexes mit einem Austausch aller vier O-Layer-Aminosäuren zu Leucinen *in vivo* zu einem Verlust der Fusionskompetenz führt, ist fraglich..

Da die Verringerung der Stabilität mit dem Stabilitätsverlust bei Mutation von Glutamin 174 in SNAP-25 alleine vergleichbar ist, und diese Mutation *in vivo* einen voll fusionskompetenten SNARE-Komplex bildet, liegt der Schluss nahe, dass die Stabilität des Komplexes mit hydrophobem O-Layer ebenfalls noch fusionskompetent ist. Dass die Toleranz gegenüber dem Verlust an Stabilität bzw. freigesetzter Energie nicht unbegrenzt ist, lässt sich an der Doppelmutation beider O-Layer-Aminosäuren von SNAP-25 erahnen. Der daraus gebildete Komplex ist, wie anhand der Stabilitätskurve erkennbar ist (Abb.12, Seite 78), zu instabil, als dass er trotz Überexpression mit dem endogenen SNAP-25 in Konkurrenz treten kann.

Die gelegentlich vermutete Korrelation von SDS-Sensitivität oder SDS-Resistenz mit dem „loose“ oder „tight“- Zustand des SNARE-Komplexes (Rizo and Südhof, 1998; Sutton *et al.*, 1998; Fiebig *et al.*, 1999) findet sich in den hier vorgestellten Daten nicht wieder. Bei nahezu allen Stabilitätskurven ist das Verhältnis bei 35°C leicht zum SDS-sensitiven Komplex hin verschoben, wonach eine Reduktion des schnellen Bursts, jedoch keine Reduktion des langsamen Bursts zu erwarten wäre. Zwar zeigen SNAP-25 Q174L überexprimierende Zellen nach dem ersten UV-Blitz eine leichte, wenn auch unsignifikante Reduktion des schnellen Bursts, jedoch eine sehr starke Reduktion des langsamen Bursts (Abb. 25, Seite 92). Demnach korreliert der Verlust von SDS-Resistenz mit einer Schwächung der Burst Phase allgemein, kann jedoch nicht direkt einem der beiden hypothetischen Zustände des SNARE-Komplexes zugeordnet werden. Der Umkehrschluss ist, wie ein Vergleich der Daten von Stabilität und Elektrophysiologie für die Oberflächenmutationen zeigt, nicht möglich, da der exozytotische Burst bei der regulierten Fusion nicht alleine von der Stabilität abhängt, sondern auch sekundäre Effekte wie Interaktion mit regulatorischen Proteinen eine Rolle spielen können.

4.1.2 Kontrolliert der O-Layer die Findung des richtigen Registers der SNARE-Helices?

Die Kinetik der Bildung von *trans*-SNARE-Komplex kann durch verschiedene Mechanismen durch die Aminosäuren des O-Layers beeinflusst sein. Der „loose“-Zustand des SNARE-Komplexes wird während des Primings der Vesikel aus monomeren SNARE-Proteinen gebildet und steht vermutlich im Gleichgewicht mit diesen (Xu *et al.*, 1998). Durch Stabilisierung des losen Zustandes verschiebt sich die Gleichgewichtslage in Richtung des losen Zustandes und es kommt zu einer verringerten Rückreaktion. Umgekehrt führt das Fehlen einer attraktiven Wechselwirkung wie z.B. der ionischen Wechselwirkung zu einer Destabilisierung und Erhöhung der Rückreaktion. Das derzeit gängigste Modell der Funktionsweise des ternären SNARE-Komplexes geht von einem reißverschlussartigem Zusammenfinden der Helices vom N- zum C-Terminus aus, wobei Vesikel- und Plasmamembran aufeinander zu bewegt werden. Bei diesem Prozess ist eine Vielzahl von intermediären Helix-Helix-Interaktionen denkbar, welche jedoch alle bis auf eine nicht zu dem richtigen Produkt führen, da eine Verschiebung der Transmembranbereiche gegeneinander zu einer deutlich verlangsamten Fusion führt (McNew *et al.*, 1999). Je weiter die Helices zueinander finden würden, desto schwerer und, bedingt durch die Zunahme der Wechselwirkungen, langsamer wäre das Auffinden des richtigen Registers der einzelnen

Helices untereinander. Wesentlich effizienter wäre die Auffindung des richtigen Registers der einzelnen Helices des SNARE-Komplexes, wenn die Lage des Registers an einem Punkt des Reißverschlusses kontrolliert werden würde. Es ist denkbar, dass die Funktion des O-Layers in einer derartigen Kontrollfunktion liegt und damit bei Umwandlung der ionischen Wechselwirkung in eine hydrophobe Wechselwirkung die Kinetik der Bildung verringert wird. Wie in Abbildung 15 auf Seite 81 gezeigt, finden sich nach einem Proteaseverdau von Komplex mit ionischem und hydrophoben O-Layer keine unterschiedlichen Fragmente. Dabei wird deutlich, dass der Komplex auch ohne die ionische Wechselwirkung des O-Layers das richtige Register findet, lässt jedoch keine Aussagen über die Effizienz der Registerfindung zu, da die Analyse nur nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes durchgeführt werden konnte.

4.1.3 Dissoziation durch α -SNAP und NSF

Die Mutation der O-Layer-Aminosäuren zu Leucinen führt zu einer leichteren Dissoziierbarkeit durch α -SNAP und NSF. Erstaunlicher Weise bewirkt die Mutation von Gln 226 in Syntaxin zu Arginin sowie Mutation aller vier O-Layer-Aminosäuren zu Alanin oder Isoleucin zur vollständigen Inhibition der Dissoziation durch α -SNAP und NSF (Scales *et al.*, 2001). Der Effekt wird dabei auf eine Interaktion von α -SNAP/NSF mit dem Glutamin 226 von Syntaxin zurückgeführt. Jedoch hat ein Austausch des Glutamins in Syntaxin alleine nur bei der mit großen sterischen Hinderungen verbundenen Einführung von Arginin einen deutlichen Effekt, während ein Alanin oder Isoleucin lediglich die Geschwindigkeit der Dissoziation verringert. Da α -SNAP und NSF nur *cis*-SNARE-Komplexe dissoziieren (Weber *et al.*, 2000) bei welchen das Glutamin 226 von Syntaxin im Innern des SNARE-Komplexes liegt und damit primär nicht im Kontakt mit α -SNAP steht, ist eine Interaktion lediglich nach erfolgter Dissoziation zumindest eines Teils der Helices denkbar. Andererseits führen die Mutationen teilweise zum Verlust der SDS-Resistenz und zu starken Änderungen der Schmelztemperaturen des SNARE-Komplexes in Gegenwart und Abwesenheit von SDS (Scales *et al.*, 2001), was auf erhebliche strukturelle Änderungen schließen lässt. Damit ist auch nicht auszuschließen, dass das Unvermögen von α -SNAP und NSF zur Dissoziation der mutierten Komplexe alleine auf eine gestörte Bindung der beiden Proteine an den Komplex zurückzuführen ist.

Die beobachtete leichtere Dissoziierbarkeit des SNARE-Komplexes mit Leucinresten in allen vier O-Layer-Positionen gibt keinen Hinweis auf eine Funktion des O-Layers für die ATP-abhängige Dissoziation des SNARE-Komplexes durch die chaperone Wirkung von NSF in Zusammenarbeit mit dem Adapterprotein α -SNAP. Bei einer Bedeutung des O-Layers für die α -SNAP/NSF-vermittelte Dissoziation wäre bei einer Störung der Funktion eine verringerte Dissoziation zu erwarten, was jedoch nicht der Fall ist (Abb. 13, Seite 79). Andernfalls müsste dem O-Layer eine negativ regulatorische Bedeutung für die Dissoziation zukommen. Diese würde jedoch lediglich Sinn für eine Begrenzung des SRP und RRP machen, da α -SNAP und NSF undissoziierte *cis*-SNARE-Komplexe für die Bildung von *trans*-SNARE-Komplexen verfügbar machen (Xu *et al.*, 1999; Weber *et al.*, 2000). Da die Dissoziation des

im O-Layer mutierten SNARE-Komplexes jedoch eher erleichtert als erschwert ist, wäre in diesem Fall eine Vergrößerung von SRP und RRP zu erwarten, beobachtet wurde dagegen ein verringerter exozytotischer Burst bei unveränderter Kinetik.

Die beobachtete scheinbar leichtere Dissoziierbarkeit des mutierten SNARE-Komplexes kann dabei zwei Ursachen haben. Der Komplex lässt sich wegen fehlender ionischer Wechselwirkung und der damit verringerten Stabilität, welche sich auch im Schmelzverhalten äußert, leichter dissoziieren. Andererseits ist es nicht ausgeschlossen, dass sich der Komplex unter den Bedingungen des Dissoziationsexperimentes wieder neu bildet und es, verursacht durch die verlangsamte Bildungskinetik des mutierten Komplexes, zu einer Anreicherung von freiem Synaptobrevin im Überstand kommt, welche nicht auf eine erhöhte Dissoziation zurückzuführen ist. Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass die Dissoziation des SNARE-Komplexes nicht signifikant ineffizienter ist, da in vergleichbaren Experimenten kaum ein Einfluss der Kinetik auf die Dissoziation zu bemerken war (Scales *et al.*, 2001).

Eine veränderte, insbesondere verringerte Dissoziierbarkeit des ternären SNARE-Komplexes hätte zwar einen vergleichbaren Effekt auf die elektrophysiologischen Messungen wie die Überexpression der SNAP-25 Q174L-Mutante (siehe Abb. 5; Xu *et al.*, 1999), da α -SNAP und NSF während des „Primings“ vermutlich ternäre SNARE-Komplexe auf den Vesikeln dissoziieren und damit erst verfügbar machen (Hanson *et al.*, 1997). Als Ursache für den beobachteten Effekt ist eine Beeinträchtigung der Aktivität von α -SNAP und NSF jedoch auszuschließen, da sowohl der vierfachmutierte SNARE-Komplex als auch SNARE-Komplexe mit Mutationen von SNAP-25-Q174 zu Alanin und Isoleucin problemlos dissoziiert werden und lediglich die Mutation von Glutamin 226 in Syntaxin zu Arginin zu einem deutlich negativen Einfluss auf die Dissoziierbarkeit führt (Scales *et al.*, 2001). Wie hier gezeigt, ist die Dissoziation des mutierten SNARE-Komplexes dagegen erleichtert, was vermutlich auf die verringerte Stabilität des gebildeten SNARE-Komplex zurückzuführen ist. Die elektrophysiologischen Messungen zeigen dagegen eine verringerte Wiederbefüllung von SRP und RRP, was mit der leichteren Dissoziierbarkeit im Widerspruch steht. Demnach hat der biochemisch gezeigte Effekt der leichteren Dissoziierbarkeit des SNARE-Komplexes mit Mutationen im O-Layer durch α -SNAP/NSF entweder keinen Effekt auf das „Priming“ von Vesikeln oder der zu erwartende Effekt wird durch die verringerte Kinetik der SNARE-Komplexbildung überwogen, so dass trotz der erleichterten Bereitstellung von monomeren SNAREs durch Dissoziation die Bildung von *trans*-SNARE-Komplexen verlangsamt ist.

4.1.4 Kinetik der Bildung des ternären SNARE-Komplexes.

Die Kinetik der Bildung des SNARE-Komplexes mit Mutationen des O-Layers ist deutlich verringert (siehe Abb. 16, Seite 82). Dabei führen die Mutation aller vier O-Layer-Aminosäuren zu Leucin interessanter Weise zu einem ähnlichen kinetischen Effekt wie die alleinige Mutation von Glu174 zu Leucin in SNAP-25. Aus den elektrophysiologischen Messungen (Abb. 25, Seite 92) ergibt sich eine verlangsamte Kinetik der Vesikelrekrutierung aus dem UPP, während die Kinetik der Fusionsereignisse selber unverändert ist. Dies wurde kürzlich auch für Mutationen beider O-Layer-Glutamine in SNAP-25 zu Glutamaten gezeigt (Graham *et al.*, 2002), bei deren Untersuchung mittels Einzelpeakanalyse von

amperometrischen Signalen an überexprimierenden Chromaffinzellen eine unveränderte Kinetik, aber eine Verringerung der Zahl von Fusionsereignissen festgestellt wurde. Beim Vergleich der *in vitro* Bildungsgeschwindigkeit des ternären Wildtyp-SNARE-Komplexes mit der Mutation Q174L in SNAP-25 innerhalb von 2 Minuten (Abb. 16, Seite 82) mit den *in vivo* Daten zeigt im Vergleich der Kapazitätsänderung zwischen erstem und zweitem UV-Blitz einen in der Größenordnung ähnlichen Unterschied. Der elektrophysiologisch gemessene Effekt kann daher alleine durch die veränderte Bildungskinetik verursacht werden. Ein weiteres Indiz dafür, dass die ebenfalls mit der Mutation einhergehende Veränderung der Dissoziation des SNARE-Komplexes nicht für den elektrophysiologisch gemessenen Effekt verantwortlich ist. Aufgrund der vorliegenden Daten muss davon ausgegangen werden, dass sich die coiled-coils des ternären SNARE-Komplexes während des Primings der Vesikel bis über die Aminosäuren des O-Layers hinaus ausbilden, da ansonsten eine Veränderung der Kinetik des Bursts selbst zu erwarten wäre. Die beiden hypothetischen Zustände des SNARE-Komplexes nach dem Vesikelpriming, der „loose“ und „tight“-Zustand, sollten sich daher lediglich in Strukturen und Funktionen unterscheiden, welche keine Veränderungen am O-Layer selbst mehr beinhalten. Da davon ausgegangen wird, dass sich der SNARE-Komplex vom N-Terminus her in Richtung der C-terminalen Transmembrananker ausbildet (Jahn und Südhoff, 1999; Lin und Scheller, 2000), bedeutet dies, dass die Unterschiede von „loose“- und „tight“ *trans*-SNARE-Komplex alleine im C-terminalen Bereich zu suchen sind. Es gibt Hinweise, dass sich der „loose“-Zustand durch seine Sensitivität gegenüber clostridiellen Neurotoxinen vom „tight“-Zustand unterscheiden lässt (Hua und Charlton, 1999; Xu *et al.*, 1998).

Die *in vitro* Untersuchung zeigt ähnliche Auswirkungen der SNAP-25 Q174L-Mutante und Mutation aller O-Layerpositionen auf die Komplexbildungskinetik, so dass der Effekt nicht alleine auf die Funktion der Registerfindung zurückzuführen ist, da ansonsten bei dem Wegfall von nur einer ionischen Aminosäure des Registerkontrollpunktes ein größerer Unterschied zwischen den beiden Bildungskinetiken zu erwarten wäre. Die Funktion im Hinblick auf die Kinetik der Komplexbildung sowie der hohe Konservierungsgrad der O-Layer-Aminosäuren hängt wahrscheinlich mit einer Mischung von beiden Mechanismen zusammen: Richtige Registerfindung und gleichzeitige Stabilisierung des SNARE-Komplexes durch die starke ionische Wechselwirkung im hydrophoben Innern des SNARE-Komplexes. Weitere Bedeutungen des O-Layers für bislang unbekannt Wechselwirkungen mit anderen Proteine sind nicht ausgeschlossen, erscheinen eher sogar wahrscheinlich, da die optimierten Kinetik zwar für die hoch spezialisierte regulierte schnelle Exozytose im neuronalen System sehr wichtig ist, jedoch die Konservierung des O-Layers über Artgrenzen und die gesamten SNARE-Familien hinweg schwer alleine für eine optimierte Kinetik zu verstehen ist.

4.2 Funktion potentieller Ca²⁺-Bindungsstellen

Die Kristallstruktur des neuronalen SNARE-Komplexes enthält mehrere Strontiumionen, welche ein Anzeichen für potentielle Bindungsstellen von divalenten Kationen oder auch allgemein von ionischen Wechselwirkungen sein können. Zur Untersuchung etwaiger

Funktionen wurden zwei dieser potentiellen Bindungsstellen durch Mutationen der interagierenden Aminosäureseitengruppen verändert und der daraus resultierende Effekt biochemisch und elektrophysiologisch untersucht.

4.2.1 Struktur der mutierten SNARE-Komplexe

Die Struktur der SNARE-Komplexe mit Alaninmutationen in den beiden durch die Aminosäuren Aspartat 58, Glutamat 170 und Glutamin 177 von SNAP-25 beziehungsweise Serin 75, Glutamat 78 und Threonin 79 von Synaptobrevin2 gebildeten potentiellen Bindungsstellen für divalente Kationen zeigt in CD-spektroskopischen Messungen unter nativen Bedingungen keine Veränderungen im α -Helix- oder β -Faltblatt-Anteil oder dem Schmelzpunkt. Auch in Gegenwart von 2% SDS unterscheiden sich die Schmelzpunkte der mutierten Komplexe nur geringfügig vom Wildtyp-Komplex, was ein weiteres Indiz für den vernachlässigbar kleinen Einfluss der Mutationen auf die Integrität und Stabilität der Struktur des ternären Komplexes ist und in Einklang mit den *in silico* erhaltenen Strukturvoraussagen steht. Selbst der Einbau von deutlich größeren Aminosäureresten wie bei der Ladungsumkehrmutation von SNAP-25 D58K/E170K führt nur zu einer Verringerung der Schmelztemperatur um etwa 7°C. Die durch den Einbau von zwei Lysinresten hervorgerufenen sterischen Hinderungen können demnach wegen der gegenüber dem Komplexinnern geringeren Packungsdichte und der damit verbundenen relativ großen Beweglichkeit der Seitengruppen von Oberflächenamino­säuren in diesem Bereich durch Übergang in ein günstigeres Rotamer abgebaut werden, was auch bei rechnergestützten Moleküldynamiksimulationen der Doppelmutterante zu beobachten war.

4.2.2 Bindung von α -SNAP und Effekt auf α -SNAP/NSF-vermittelte Dissoziation

Sowohl die Lysin-Einzelmutation in Position 170 als auch die Lysin-Doppelmutterante führen zu einer deutlich verringerten Bindung von α -SNAP an den ternären SNARE-Komplex (Abb. 22, Seite 87). Dies zeigt, dass α -SNAP im Bereich der Bindungsstelle SNAP-25 58/170/177 mit dem SNARE-Komplex wechselwirkt. Es wird angenommen, dass der SNARE-Komplex unter sättigenden Bedingungen drei Moleküle α -SNAP bindet (Hayashi *et al*, 1995). Die Einführung von Lysinresten verringert die Bindung unter sättigenden Bedingungen um mindestens ein Molekül α -SNAP (siehe Abbildung 22, Seite 87). Da die drei α -SNAP-Moleküle bei der Bindung an den ternären SNARE-Komplex aufgrund der räumlichen Anordnung nicht nur mit dem SNARE-Komplex sondern vermutlich auch untereinander wechselwirken, ist anzunehmen, dass durch die eingeführte sterische Hinderung oder durch mit der Ladungsumkehr verbundenen Abstoßung nicht die Bindung von einem Molekül α -SNAP an den Komplex verhindert wird, sondern vielmehr die Affinität von α -SNAP zum Komplex verringert ist. α -SNAP wird für die Dissoziation des SNARE-Komplexes durch die chaperone Wirkung der ATPase NSF benötigt und überträgt dabei vermutlich die Drehbewegung des hexameren NSF-Ringes auf die einzelnen Helices des SNARE-Komplexes (Brunger, 2001). Eine verringerte Affinität des Adapters α -SNAP zum SNARE-Komplex

erklärt auch die Beobachtung, dass die Dissoziation des SNARE-Komplexes trotz der verringerten Bindung von α -SNAP gegenüber dem Wildtyp-Komplex um weniger als 50% reduziert ist. Etwas überraschend ist die ebenfalls verringerte Dissoziation des SNARE-Komplexes mit der Dreifachmutation zu Alanin in SNAP-25, die keine Auswirkung auf α -SNAP-Bindung hat. Vermutlich kommt die Funktion dieser geladenen Reste erst bei der Kraftübertragung oder der während der Dissoziation induzierten Konformationsänderung zum Tragen. Die hier diskutierten Effekte der veränderten α -SNAP-Bindung und α -SNAP/NSF-vermittelten Dissoziation können nicht die bei den elektrophysiologischen Messungen gemachten Beobachtungen erklären, da α -SNAP und NSF bei der regulierten Exozytose lediglich während des Primingprozesses und nicht direkt an den letzten Schritten kurz vor der Fusion beteiligt sind (Xu *et al.*, 1999).

4.2.3 Direkte Calciumbindung an den ternären SNARE-Komplex

Alle von SNAP-25 und Synaptobrevin 2 elektrophysiologisch untersuchten Oberflächenmutationen zeigen eine inhibitorische Wirkung auf den exozytotischen Burst, was die Bedeutung der Oberfläche des SNARE-Komplexes für den Gesamtmechanismus der Fusionsmaschinerie unterstreicht. Die stark hydrophile ionische Oberfläche bietet eine Vielzahl von Interaktionsmöglichkeiten mit regulatorischen Proteinen, Phospholipiden oder Ionen, welche an der Fusion beteiligt sind.

Wie durch Messung der Abhängigkeit der Fusion von der freien intrazellulären Calciumkonzentration herausgefunden wurde, lassen sich die Daten für die Bindungsstelle SNAP-25 D58/E170/Q177 nur durch den Verlust eines der drei nach dem Standardmodell (Voets, 2000) in Chromaffinzellen während der calciumregulierten Exozytose stattfindenden Calciumbindungsschritten erklären. Dieser Effekt der Mutation der Bindungsstelle SNAP-25 D58/E170/Q177 kann unterschiedliche Ursachen haben:

Der ternäre SNARE-Komplex bindet selbst Calcium. Unterstützt wird diese Annahme durch das in der Kristallstruktur des neuronalen SNARE-Komplexes in diesem Bereich gebundene Strontiumion. Die von den Aminosäuren gebildeten Koordinationssphäre ist bei Vergleich mit bekannten calciumbindenden Proteinen für eine hochaffine Calciumbindung alleine nicht ausreichend, weshalb für eine funktionelle Calciumbindung ein Partner notwendig ist, welcher weitere Koordinierungsstellen für Calcium zur Verfügung stellt. Nach den in Abbildung 24 auf Seite 90 gezeigten Daten bindet der ternäre SNARE-Komplex im physiologischen Konzentrationsbereich auch in Gegenwart von Phospholipiden kein Calcium. Demnach ist für die direkte Calciumbindung in der Bindungsstelle ein Proteinpartner notwendig. Eine Ladungsumkehr der Bindungstasche von negativer zu neutraler oder positiver Ladung durch Einführung von Lysinresten führt, wie in Abbildung 28, Seite 96 dargestellt, zum Verlust des exozytotischen Bursts, jedoch nicht zur permanenten Fusion von Vesikeln oder Erhöhung der Frequenz von Miniaturereignissen. Dies zeigt, dass für die regulierte Exozytose eine reine Ladungsumkehr der Bindungsstelle D58/E170/Q177 in SNAP-25, wie sie durch eine direkte Bindung von Calcium in der Bindungsstelle erfolgen würde, nicht ausreicht. Auch wenn nicht auszuschließen ist, dass es durch die Einführung der recht großen Lysinreste zu einem Herausdrehen einer der Seitengruppen aus der

Bindungstasche und damit zu einem Effekt durch sterische Hinderung kommt, spricht diese Beobachtung mehr für eine Interaktion mit einem Protein, über welches ein dritter Calcium-abhängiger Schritt am Fusionsprozess beteiligt ist, als für eine Bindung von Calcium in einer Art Sandwich zwischen dem SNARE-Komplex und einem Protein.

4.2.4 Ausblick auf mögliche Interaktionspartner des fusionskompetenten SNARE-Komplexes

Der ternäre neuronale SNARE-Komplex interagiert neben den bereits genannten Proteinen mit einer Reihe von calciumbindenden Proteinen.

Ein Kandidat für eine Interaktion mit der Bindungsstelle Synaptobrevin 2 S75/E78/T79 ist Calcium/Calmodulin. Synaptobrevin besitzt im Bereich der Aminosäuren 77 bis 90 ein Calcium/Calmodulin Bindungsmotiv, dessen Zerstörung durch Spaltung von Synaptobrevin durch Tetanusneurotoxin zwischen den Aminosäure 76 und 77 zum Verlust der Bindung von Calcium/Calmodulin führt (Quetglas *et al.*; 2000). Wie aus den hier gezeigten Daten für die Mutation der Aminosäuren in der Bindungsstelle Synaptobrevin 2 S75/E78/T79 zu Alaninen hervorgeht, ist der Effekt nicht auf eine durch die Mutation verursachte veränderte Calciumabhängigkeit der Fusion zurückzuführen. Dies schließt nicht zwangsläufig die Interaktion mit Calcium/Calmodulin bei der Fusion aus, würde jedoch bedeuten, dass Calcium/Calmodulin keine Funktion als Calciumsensor bei der calciumregulierten Exozytose zukommt. Elektrophysiologische Daten deuten jedoch auf eine Funktion der SNARE-Komplex-Calcium-Calmodulin-Interaktion bei der Endozytose hin (Artelejo *et al.*, 1996) Gegen Calcium/Calmodulin als Calciumsensor spricht zudem die zu hohe Affinität der Interaktion von Calcium und Calmodulin, während der für die physiologische Funktion als Calciumsensor benötigte Affinität deutlich niedriger liegt.

In dem entsprechenden Ca^{2+} -Konzentrationsbereich liegt der K_d -Wert des seit langem als Calciumsensor postulierten Synaptotagmin I, welches sowohl mit den monomeren SNAREs (Chapman *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1995; Davis *et al.*, 1999; Verona *et al.*, 2000) als auch calciumabhängig mit dem ternären SNARE-Komplex und dabei insbesondere mit der C-terminalen Helix von SNAP-25 interagiert (Gerona *et al.*, 2000), was Synaptotagmin I zum Hauptkandidaten für die Interaktion mit der Bindungsstelle SNAP-25 D58/E170/Q177 macht. Synaptotagmin I defiziente Zellen zeigen zudem ebenfalls einen Verlust des exozytotischen Bursts (Jakob Sørensen und Gabor Nagy, persönliche Mitteilung). Eines der Haupthindernisse bei der *in vitro* Untersuchung von Synaptotagmin I als Bindungspartner ist die teilweise geringe Spezifität von Synaptotagmin I, welche sich z. B. in calciumabhängigen und unabhängigen Wechselwirkung mit BSA, GST oder Streptavidin äußert. Zudem existiert Synaptotagmin I in zwei Isoformen (Littleton *et al.*, 2001). Diese unterscheiden sich lediglich in der Aminosäureposition 374 (Aspartat bzw. Glycin), jedoch erheblich im Bindungsverhalten, was das teilweise gegensätzlich publizierte Interaktionsverhalten von Synaptotagmin I gegenüber dem SNARE-Komplex erklärt (Leveque *et al.*, 2000; Gerona *et al.*, 2000). Eigene Experimente zur calciumabhängigen Bindung von Synaptotagmin I D³⁷⁴ an den ternären SNARE-Komplex mit und ohne Mutationen in der SNAP-25-Bindungsstelle zeigten zwar leichte aber statistisch nicht signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und

Mutante (Daten nicht gezeigt). Da Synaptotagmin I-D³⁷⁴ im Gegensatz zu Synaptotagmin I-G³⁷⁴ jedoch bei Überexpression in Synaptotagmin I defizienten Zellen nicht in der Lage ist den exozytotischen Burst wieder herzustellen (Jakob Sørensen und Gabor Nagy, persönliche Mitteilung), ist nicht ausgeschlossen, dass die Aminosäuremutation in Synaptotagmin I-D³⁷⁴ ein Artefakt ist und die normale physiologische Funktion von Synaptotagmin I zerstört. Dafür spricht auch, dass die Isoform D³⁷⁴ laut Protein- und Nukleotidsequenzdatenbank lediglich in der Ratte und nicht in anderen Organismen existiert.

Eine ebenfalls große Bedeutung für die durch den SNARE-Komplex vermittelte Vesikelfusion kommt der Interaktion des SNARE-Komplexes mit Complexin zu. Über die Bindung von Complexin kommt es zu einer Oligomerisierung von SNARE-Komplexen. Eine Störung der SNARE-Komplex/Complexin-Interaktion führt zu einer Inhibition der Neurotransmitterfreisetzung aus Nervenenden. (Tokumaru *et al.*, 2001) Eine Bindung von Complexin in den Bereichen der hier untersuchten Bindungsstellen des SNARE-Komplex ist biochemischen Studien zufolge (Pabst *et al.*, 2000) sehr unwahrscheinlich. Demnach, sowie erst kürzlich durch Co-Kristallisation von SNARE-Komplex und Complexin gezeigt (Chen *et al.*, 2002), ist für die Wechselwirkung lediglich ein relativ kleiner Bereich der H3-Domäne von Syntaxin entscheidend. Damit kann mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden, dass die Complexin-SNARE-Komplex-Wechselwirkung durch die hier untersuchten Mutationen auf der Oberfläche des SNARE-Komplexes in Zusammenhang mit den hier beobachteten Effekten stehen.

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, 10317-10324

Almers, W., and Tse, F. W., (1990)

Transmitter release from synapses: does a preassembled fusion pore initiate exocytosis?
Neuron 6, 813-818

Antonin, W., Holroyd, C., Fasshauer, D., Pabst, S., Von Mollard, G. F., Jahn, R. (2000)

A SNARE complex mediating fusion of late endosomes defines conserved properties of SNARE structure and function.
EMBO J. 23, 6453-6464.

Antonin, W., Holroyd, C., Tikkanen, R., Honing, S., Jahn, R. (2000)

The R-SNARE endobrevin/VAMP-8 mediates homotypic fusion of early endosomes and late endosomes.
Mol Biol Cell. 10, 3289-3298

Ashery, U., Betz, A., Xu, T., Brose, N. and Rettig, J. (1999)

An efficient method for infection of adrenal chromaffin cells using the Semliki Forest virus gene expression system.
Eur. J. Cell Biol. 78, 525-532

Augustine, G. J. (2001)

How does calcium trigger neurotransmitter release?
Curr Opin Neurobiol. 3, 320-326

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, 405-416

Banerjee, A., Barry, V. A., DasGupta, B. R., Martin, T. F. (1996)

N-Ethylmaleimide-sensitive factor acts at a prefusion ATP-dependent step in Ca²⁺-activated exocytosis.
J Biol Chem. 271, 20223-20226

Bark, I. C. and Wilson, M. C. (1994)

Human cDNA clones encoding two different isoforms of the nerve terminal protein SNAP-25.
Gene 139, 291-292

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, 379-384

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, 255-259

Bennett, M. K., Miller, K. G. and Scheller, R. H. (1993)

Casein kinase II phosphorylates the synaptic vesicle protein p65.

J. Neurosci. 13, 1701-1707

Berglund, P., Sjöberg, M., Garoff, H., Atkins, G. J., Sheahan, B. J. and Liljeström, P. (1993)

Semliki Forest virus expression system: Production of conditionally infectious recombinant particles.

Biotechniques 11, 123-136

Bittner, M. A., Bennett, M. K. and Holz, R. W. (1996)

Evidence that syntaxin 1A is involved in storage in the secretory pathway.

J. Biol. Chem. 271, 11214-11221

Blasi, J., Chapman E. R., Yamasaki, S., Binz, T., Niemann, H., and Jahn, R. (1993)

Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin.

EMBO J. 12, 4821-4828

Blasi, J., Chapman, E. R., Link, E., Binz, T., Yamasaki, S., DeCamilli, P., Südhof, T. C., Niemann, H. and Jahn, R. (1993)

Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25.

Nature 365, 160-163

Blatteiger, B. and Newhall, W. (1982)

The use of Tween-20® as a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes.

Journal of Immunological Methods 55, 297-307

Bock, J. B., Klumperman, J., Davanger, S. and Scheller, R. H. (1997)

Syntaxin 6 functions in trans-Golgi network vesicle trafficking.

Mol. Biol. Cell 8, 1261-1271

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, 17961-17965

Bock, J. B., Scheller, R. H. (1999)

SNARE proteins mediate lipid bilayer fusion.

Proc Natl Acad Sci USA 96, 12227-12229

Bollmann, J. H., Sakmann, B., Borst, J. G. (2000)

Calcium sensitivity of glutamate release in a calyx-type terminal.

Science 289, 953-957

Bommert, K., Charlton, M. P., DeBello, W. M., Chin, G. J., Betz, H., Augustine, G. J. (1993)

Inhibition of neurotransmitter release by C2-domain peptides implicates synaptotagmin in exocytosis.

Nature 363, 163-165

Brooks, S.P.J. and Storey, K.B. (1992)

Bound and determined: A computer program for making buffers of defined ion concentrations.

Anal. Biochem. 201, 119-126

Brose, N., Petrenko, A. G., Südhof, T. C. and Jahn, R. (1992)

Synaptotagmin: A Calcium Sensor on the Synaptic Vesicle Surface.

Science, 256, 1021-1025

Brunger, A. T. (2001)

Structure of proteins involved in synaptic vesicle fusion in neurons.

Annu Rev Biophys Biomol Struct. 30, 157-171

Calakos, N., Bennett, M. K., Peterson, K. E. and Scheller, R. H. (1994)

Protein-protein interactions contributing to the specificity of intracellular vesicular trafficking.

Science 263, 1146-1149

Cao, X., Ballew, N., Barlowe, C. (1998)

Initial docking of ER-derived vesicles requires Uso1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins.

EMBO J. 17, 2156-2165

Capogna, M., McKinney, R. A., O'Connor, V., Gähwiler, B. H., Thompson, S. M. (1997)

Ca²⁺ or Sr²⁺ partially rescues synaptic transmission in hippocampal cultures treated with botulinum toxin A and C, but not tetanus toxin.

J Neurosci. 17, 7190-7202

Castillo, P. E., Janz, R., Südhof, T. C., Tzounopoulos, T., Malenka, R. C., Nicoll, R. A. (1997)

Rab3A is essential for mossy fibre long-term potentiation in the hippocampus.

Nature. 388, 590-593

Chapman, E. R., Davis, A. F. (1998b)

Direct interaction of a Ca²⁺-binding loop of synaptotagmin with lipid bilayers.

J Biol Chem. 273, 13995-4001

Chapman, E. R., Desai, R. C., Davis, A. F., Tornehl, C. K. (1998a)

Delineation of the oligomerization, AP-2 binding, and synprint binding region of the C2B domain of synaptotagmin.

J Biol Chem. 273, 32966-32972

Chapman, E. R., An, S., Barton, N. and Jahn, R. (1994)

SNAP-25, a t-SNARE which binds to both syntaxin and synaptobrevin via domains that may form coiled coils.

J. Biol. Chem. 269, 27427-27432

- Chapman, E. R., An, S., Edwardson, J. M. and Jahn, R. (1996)**
A novel funktion for the second C2 domain of synaptotagmin. Ca²⁺-triggered dimerization.
J. Biol. Chem. 271, 5844-5849
- Chen, Y. A., Scales, S. J., Duvvuri, V., Murthy, M., Patel, S. M., Schulman, H., Scheller, R. H. (2001)**
Calcium regulation of exocytosis in PC12 cells.
J Biol Chem. 276, 26680-26687
- Dagert, M. and Ehrlich, S. D. (1979)**
Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells.
Genes 6, 23-28
- Dascher, C., Matteson, J., Balch, W. E. (1994)**
Syntaxin 5 regulates endoplasmic reticulum to Golgi transport.
J Biol Chem. 269, 29363-29366.
- Dascher, C., Ossig, R., Gallwitz, D., Schmitt, H. D. (1991)**
Identification and structure of four yeast genes (SLY) that are able to suppress the functional loss of YPT1, a member of the RAS superfamily.
Mol Cell Biol. 11, 872-885
- Dascher, C. and Balch, W. E. (1996)**
Mammalian Sly1 regulates syntaxin 5 function in endoplasmic reticulum to Golgi transport.
J. Biol. Chem. 271, 15866-15869
- Davis, A. F., Bai, J., Fasshauer, D., Wolowick, M. J., Lewis, J. L., Chapman, E. R. (1999)**
Kinetics of synaptotagmin responses to Ca²⁺ and assembly with the core SNARE complex onto membranes.
Neuron 24, 363-376
- Delgrossi, M. H., Breuza, L., Mirre, C., Chavier, P. and Le Bivic, A. (1997)**
Human Syntaxin 3 is located apically in human intestinal cells.
J. Cell Sci. 110, 2207-2214
- Desai, R. C., Vyas, B., Earles, C. A., Littleton, J. T., Kowalchuck, J. A., Martin, T. F., Chapman, E. R. (2000)**
The C2B domain of synaptotagmin is a Ca(2+)-sensing module essential for exocytosis.
J Cell Biol. 150, 1125-1136
- DiCiommo, D. P. and Bremner, R. (1998)**
Rapid, high level protein production using DNA-based Semliki Forest virus vectors.
J. Biol. Chem. 273, 18060-18066
- Dulubova, I., Sugita, S., Hill, S., Hosaka, M., Fernandez, I., Sudhof, T. C., Rizo, J. (1999)**
A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18.
EMBO J. 18,4372-4382

Dunphy, W. G., Brands, R. and Rothman J. E. (1985)

Attachment of terminal N-acetylglucosamine to asparagine-linked oligosaccharides occurs in central cisternae of the Golgi stack.

Cell 40, 463-472

Ehrengruber, M. U., Lundstrom, K., Schweitzer, C., Heuss, C., Schlesinger, S., Gahwiler, B. H. (1999)

Recombinant Semliki Forest virus and Sindbis virus efficiently infect neurons in hippocampal slice cultures.

Proc Natl Acad Sci USA 96, 7041-7046

Fasshauer, D., Antonin, W., Margittai, M., Pabst, S., Jahn, R. (1999)

Mixed and non-cognate SNARE complexes. Characterization of assembly and biophysical properties.

J Biol Chem. 274, 15440-15446

Fasshauer, D., Bruns, D., Shen, B., Jahn, R. and Brunger, A. T. (1997a)

A structural change occurs upon binding of syntaxin to SNAP-25.

J. Biol. Chem. 272, 4582-4590

Fasshauer, D., Eliason, W. K., Brünger, A. T. and Jahn, R. (1998a)

Identification of a Minimal Core of the Synaptic SNARE Complex Sufficient for Reversible Assembly and Disassembly.

Biochemistry 37, 10354-10362

Fasshauer, D., Sutton, R. B., Brunger, A. T., 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, 15781-15786

Fasshauer, D., Otto, H., Eliason, W. K., Jahn, R. and Brunger, A. T. (1997b)

Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation.

J. Biol. Chem. 272, 28036-28041

Fernandez, I., Ubach, J., Dulubova, I., Zhang, X., Südhof, T. C. and Rizo, J. (1998)

Three-Dimensional Structure of an Evolutionarily Conserved N-Terminal Domain of Syntaxin 1A.

Cell 94, 841-849

Fiebig, K. M., Rice, L. M., Pollock, E., Brunger, A. T. (1999)

Folding intermediates of SNARE complex assembly.

Nat Struct Biol. 6, 117-123

Foster, L. J., Yeung, B., Mohtashami, M., Ross, K., Trimble, W. S. and Klip, A. (1998)

Binary interaction of the SNARE proteins syntaxin-4, SNAP-23 and VAMP-2 and their regulation by phosphorylation.

Biochemistry 37, 11089-11096

- Fujita, H., Tuma, P. L., Finnegan, C. M., Locco, L. and Hubbard, A. L. (1998)**
Endogenous syntaxins 2, 3 and 4 exhibit distinct but overlapping patterns of expression at the hepatocyte plasma membrane.
Biochem. J. 329, 527-538
- Fukuda, M., Kanno, E., Mikoshiba, K. (1999)**
Conserved N-terminal cysteine motif is essential for homo- and heterodimer formation of synaptotagmins III, V, VI, and X.
J Biol Chem. 274, 31421-31427
- Fukuda, M., Mikoshiba, K. (2000)**
Distinct self-oligomerization activities of synaptotagmin family. Unique calcium-dependent oligomerization properties of synaptotagmin VII.
J Biol Chem. 275, 28180-28185
- Fukuda, R., McNew, J. A., Weber, T., Parlati, F., Engel, T., Nickel, W., Rothman, J. E., Sollner, T. H. (2000)**
Functional architecture of an intracellular membrane t-SNARE.
Nature 407, 198-202
- Galli, T., Garcia, E. P., Mundigl, O., Chilcote, T. J. and De Camilli, P. (1995)**
v- and t-SNAREs in neuronal exocytosis: a need for additional components to define sites of release.
Neuropharmacology 34, 1351-1360
- Galli, T., Zhraoui, A., Vaidyanathan, V. V., Raposo, G., Tian, J. M., Karin, M., Niemann, H. and Louvard, D. (1998)**
A novel tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein in SNARE complexes of the apical plasma membrane of epithelial cells.
Mol. Biol. Cell 9, 1437-1448
- Garcia, E. P., Gatti, E., Butler, M., Burton, J., De Camilli, P. (1994)**
A rat brain Sec1 homologue related to Rop and UNC18 interacts with syntaxin.
Proc Natl Acad Sci USA 91, 2003-2007
- Garcia, R. A., Forde, C. E., Godwin, H. A. (2000)**
Calcium triggers an intramolecular association of the C2 domains in synaptotagmin.
Proc Natl Acad Sci USA. 97, 5883-5888
- Garcia, E. P., McPherson, P. S., Chilcote, T. J., Takei, K. and De Camilli, P. (1995)**
rbSec1A and B colocalize with syntaxin 1 and SNAP-25 throughout the axon, but are not in a stable complex with syntaxin.
J. Cell. Biol. 129, 105-120
- Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R. E., Li, C., Rosahl, T. W., Stevens, C. F., Sudhof, T. C. (1994)**
Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse.
Cell 79, 717-727

Geppert, M., Goda, Y., Stevens, C. F., Sudhof, T. C. (1997)

The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion.
Nature 387, 810-814.

Gerona, R. R., Larsen, E. C., Kowalchuk, J. A., Martin, T. F. (2000)

The C terminus of SNAP25 is essential for Ca²⁺-dependent binding of synaptotagmin to SNARE complexes.
J Biol Chem. 275, 6328-6336.

Grote, E. and Kelly, R. B. (1996)

Endocytosis of VAMP is facilitated by a synaptic vesicle targeting signal.
Cell Biol. 132, 537-547

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, 581-589

Guan, K. L. and Dixon, J. E. (1991)

Eukaryotic Proteins Expressed in Escherichia coli: An Improved Thrombin Cleavage and Purification Procedure of Fusion Proteins with Glutathione S-Transferase.
Anal. Biochem. 192, 262-267

Hanson, P. I., Roth, R., Morisaki, H., Jahn, R. and Heuser, J. E. (1997)

Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy.
Cell 90, 523-535

Hao, J. C., Salem, N., Peng, X. R., Kelly, R. B. and Bennett, M. K. (1997)

Effect of mutations in vesicle-associated membrane protein (Vamp) on the assembly of multimeric protein complexes.
J. Neurosci. 17, 1596-1603

Hata, Y., Slaughter, C. A., Sudhof, T. C. (1993)

Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin.
Nature 366, 347-351.

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, 5051-5061

Hayashi, T., Yamasaki, S., Nauenburg, S., Binz, T. and Niemann, H. (1995)

Disassembly of the reconstituted synaptic vesicle membrane fusion complex in vitro.
EMBO J. 14, 2317-2325

Heidelberger, R., Heinemann, C., Neher, E., Matthews, G. (1994)

Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal.
Nature 371, 513-5.

Heinemann, C., Chow, R. H., Neher, E., Zucker, R. S. (1994)

Kinetics of the secretory response in bovine chromaffin cells following flash photolysis of caged Ca²⁺.

Biophys J. 67, 2546-2557

Hess, D. T., Slater, T. M., Wilson, M. C. and Skene, J. H. (1992)

The 25 kDa synaptosomal-associated protein SNAP-25 is the major methionine-rich polypeptide in rapid axonal transport and a major substrate for palmitoylation in adult CNS.

J. Neurosci. 12, 4634-4641

Holz, R. W., Brondyk, W. H., Senter, R. A., Kuizon, L., Macara, I. G. (1994)

Evidence for the involvement of Rab3A in Ca(2+)-dependent exocytosis from adrenal chromaffin cells.

J Biol Chem. 269, 10229-10234

Hosono, R., Hekimi, S., Kamiya, Y., Sassa, T., Murakami, S., Nishiwaki, K., Miwa, J., Taketo, A., Kodaira, K. I. (1992)

The unc-18 gene encodes a novel protein affecting the kinetics of acetylcholine metabolism in the nematode *Caenorhabditis elegans*.

J Neurochem. 58, 1517-1525

Hsu, S. F., Augustine, G. J., Jackson, M. B. (1996)

Adaptation of Ca(2+)-triggered exocytosis in presynaptic terminals.

Neuron 17, 501-512.

Hunt, J. M., Bommert, K., Charlton, M. P., Kistner, A., Habermann, E., Augustine, G. J. and Betz, H. (1994)

A post-docking role for synaptobrevin in synaptic vesicle fusion.

Neuron 12, 1269-1279

Ibelgaufts, H., (1993)

Gentechnologie von A bis Z, Studienausgabe, korrigierter Nachdruck der 1. Auflage, VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge

Jahn, R., Sudhof, T. C. (1999)

Membrane fusion and exocytosis.

Annu Rev Biochem. 68, 863-911

Jahn, R. (2000)

Sec1/Munc18 proteins: mediators of membrane fusion moving to center stage.

Neuron 27, 201-204

Jahn, R. and Hanson, P. I. (1998)

SNAREs line up in new environment.

Nature 393, 14-15

Jongeneel, C. V., Bouvier, J. and Bairoch, A. (1989)

A unique signature identifies a family of zinc-dependent metallopeptidases.

FEBS Lett. 242, 211-4

Katz, L. and Brennwald, P. (2000)

Testing the 3Q:1R "rule": mutational analysis of the ionic "zero" layer in the yeast exocytic SNARE complex reveals no requirement for arginine.

Mol Biol Cell. 11, 3849-3858

Khyse-Anderson, J. (1984)

Electroblotting of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from acrylamid to nitrocellulose.

J. Biochem. Biophys. Meth. 10, 203-209

Lacy, B. D., Tepp, W., Cohen, A. C., DasGupta, B. R. and Stevens, R. C. (1998)

Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity.

Nature Structural Biology 5, 898-902

Laemmli, U. K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4.

Nature 227, 680-685

Lazar, T., Gotte, M., Gallwitz, D. (1992)

Vesicular transport: how many Ypt/Rab-GTPases make a eukaryotic cell?

Trends Biochem Sci. 22, 468-472

Lazzarino, D. A., Blier, P., Mellman, I. (1998)

The monomeric guanosine triphosphatase rab4 controls an essential step on the pathway of receptor-mediated antigen processing in B cells.

J Exp Med. 188, 1769-1774

Lee, L. G., Connell, C. R., Woo, S. L., Cheng, R. D., McArdle, B. F., Fuller, C. W., Halloran, N. D., Wilson, R.K., (1992)

DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: effect of dyes and dNTPs on incorporation of dye-terminators and probability analysis of termination fragments.

Nucleic Acids Res. 10, 2471-83

Lenzen, C. U., Steinmann, D., Whiteheart, S. W. and Weis, W. I. (1998)

Crystal Structure of the Hexamerization Domain of N-ethylmaleimide-sensitive Fusion Protein.

Cell 94, 525-536

Leveque, C., Boudier, J. A., Takahashi, M., Seagar, M. (2000)

Calcium-dependent dissociation of synaptotagmin from synaptic SNARE complexes.

J Neurochem. 74, 367-374

Li, C., Davletov, B. A., Sudhof, T. C. (1995)

Distinct Ca²⁺ and Sr²⁺ binding properties of synaptotagmins. Definition of candidate Ca²⁺ sensors for the fast and slow components of neurotransmitter release.

J Biol Chem. 270, 24898-24902

Li, C., Takei, K., Geppert, M., Daniell, L., Stenius, K., Chapman, E. R., Jahn, R., De Camilli, P., Südhof, T. C. (1994)

Synaptic targeting of rabphilin-3A, a synaptic vesicle Ca²⁺/phospholipid-binding protein, depends on rab3A/3C.

Neuron 13, 885-898

Liljeström, P. and Garoff, H. (1991)

A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon.

Biotechniques, 9, 1356-1361.

Lindau, M. and Almers, W. (1995)

Structure and function of fusion pores in exocytosis and ectoplasmic membrane fusion.

Curr Opin Cell Biol. 7, 509-517

Link, E., Edelmann, L., Chou, J. H., Binz, T., Yamasaki, S., Eisel, U., Baumert, M., Südhof, T. C., Niemann, H. and Jahn, R. (1992)

Tetanus toxin action: inhibition of neurotransmitter release linked to synaptobrevin proteolysis.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 189, 1017-1023

Lonart, G., Janz, R., Johnson, K. M., Südhof, T. C. (1998)

Mechanism of action of rab3A in mossy fiber LTP.

Neuron 21, 1141-1150

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951)

Protein measurement with the folin phenol reagent.

J. Biol. Chem. 193, 265-275.

Mayer, A., Wickner, W. and Haas, A. (1996)

Sec18p (NSF)-driven release of Sec17p (alpha-SNAP) can precede docking and fusion of yeast vacuoles.

Cell 85, 83-94

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, 346-349

McNew, J. A., Parlati, F., Fukuda, R., Johnston, R. J., Paz, K., Paumet, F., Sollner, T. H., Rothman, J. E. (2000)

Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins.

Nature 407, 153-159

McNew, J. A., Weber, T., Parlati, F., Johnston, R. J., Melia, T. J., Sollner, T. H., Rothman, J. E. (2000)

Close is not enough: SNARE-dependent membrane fusion requires an active mechanism that transduces force to membrane anchors.

J Cell Biol. 150, 105-117

Misura, K. M., Scheller, R. H., Weis, W. I. (2000)

Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex.
Nature 404, 355-362

Mollinedo, F., Lazo, P. A. (1997)

Identification of two isoforms of the vesicle-membrane fusion protein SNAP-23 in human neutrophils and HL-60 cells.
Biochem Biophys Res Commun. 231, 808-812

Monck, J. R., Oberhauser, A. F., Fernandez, J. M. (1995)

The exocytotic fusion pore interface: a model of the site of neurotransmitter release.
Mol Membr Biol. 12, 151-156

Morgans, C. W., Brandstatter, J. H., Kellerman, J., Betz, H. and Wassle, H. (1996)

A SNARE complex containing syntaxin 3 is present in ribbon synapses of the retina.
J. Neurosci. 16, 6713-6721

Nichols, B. J., Ungermann, C., Pelham, H. R. B., Wickner, W. T. and Haas, A. (1997)

Homotypic vacuolar fusion mediated by t- and v-SNAREs
Nature 387, 199-202

Niemann, H., Blasi, J. and Jahn, R. (1994)

Clostridial neurotoxins: new tools for dissecting exocytosis.
Trends Cell Biol. 4, 179-185

Nonet, M. L., Staunton, J. E., Kilgard, M. P., Fergestad, T., Hartweg, E., Horvitz, H. R., Jorgensen, E. M., Meyer, B. J. (1997)

Caenorhabditis elegans rab-3 mutant synapses exhibit impaired function and are partially depleted of vesicles.
J Neurosci. 17, 8061-8073

Novick, P., Field, C., Schekman, R. (1980)

Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway.
Cell 21, 205-215

Olkkonen, V. M., Stenmark, H. (1997)

Role of Rab GTPases in membrane traffic.
Int Rev Cytol. 176, 1-85

Osborne, S. L., Herreros, J., Bastiaens, P. I., Schiavo, G. (1999)

Calcium-dependent oligomerization of synaptotagmins I and II. Synaptotagmins I and II are localized on the same synaptic vesicle and heterodimerize in the presence of calcium.
J Biol Chem. 274, 59-66

Ossig, R., Dascher, C., Trepte, H. H., Schmitt, H. D., Gallwitz, D. (1991)

The yeast SLY gene products, suppressors of defects in the essential GTP-binding Ypt1 protein, may act in endoplasmic reticulum-to-Golgi transport.
Mol Cell Biol. 11, 2980-2993

Ossig, R., Schmitt, H. D., de Groot, B., Riedel, D., Keranen, S., Ronne, H., Grubmuller, H., Jahn, R. (2000)

Exocytosis requires asymmetry in the central layer of the SNARE complex.
EMBO J. 19, 6000-6010

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, 6197-6201

Parlati, F., McNew, J. A., Fukuda, R., Miller, R., Sollner, T. H., Rothman, J. E. (2000)

Topological restriction of SNARE-dependent membrane fusion.
Nature 407, 194-198

Parlati, F., Weber, T., McNew, J. A., Westermann, B., Sollner, T. H., Rothman, J. E. (1999)

Rapid and efficient fusion of phospholipid vesicles by the alpha-helical core of a SNARE complex in the absence of an N-terminal regulatory domain.
Proc Natl Acad Sci USA 96, 12565-12570

Perin, M. S., Fried, V. A., Mignery, G. A., Jahn, R., Sudhof, T. C. (1990)

Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C.
Nature 345, 260-263

Peterson, G. L. (1979)

Review of the folin phenol quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall.
Anal. Biochem. 100, 201-220

Pevsner, J., Hsu, S. C., Scheller, R. H. (1994)

n-Sec1: a neural-specific syntaxin-binding protein.
Proc Natl Acad Sci USA 91, 1445-1449

Poirier, M. A., Xiao, W., Macosko, J. C., Chan, C., Shin, Y. K. and Bennett, M. K. (1998)

The synaptic SNARE complex is a parallel four-stranded helical bundle.
Nat. Struct. Biol. 5, 765-769

Qiagen GmbH and Qiagen Inc. (1995)

Plasmid Handbook for Plasmid Midi Kit

Quetglas, S., Leveque, C., Miquelis, R., Sato, K., Seagar, M. (2000)

Ca²⁺-dependent regulation of synaptic SNARE complex assembly via a calmodulin- and phospholipid-binding domain of synaptobrevin.
Proc Natl Acad Sci USA 97, 9695-700

Ralston, E., Beushausen, S. and Ploug, T. (1994)

Expression of the synaptic vesicle proteins VAMPs/synaptobrevins 1 and 2 in non-neural tissues.
J. Biol. Chem. 269, 15403-15406

Ravichandran, V., Chawla, A., Roche, P. A. (1996)

Identification of a novel syntaxin- and synaptobrevin/VAMP-binding protein, SNAP-23, expressed in non-neuronal tissues.

J Biol Chem. 271, 13300-13303

Regazzi, R., Wollheim, C. B., Lang, J., Theler, J. M., Rossetto, O., Montecucco, C., Sadoul, K., Weller, U., Palmer, M. and Thorens, B. (1995)

VAMP-2 and cellubrevin are expressed in pancreatic beta-cells and are essential for Ca²⁺- but not for GTP gamma S-induced insulin secretion.

EMBO J. 14, 2723-2730

Ren, M., Xu, G., Zeng, J., De Lemos-Chiarandini, C., Adesnik, M., Sabatini, D. D. (1998)

Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes.

Proc Natl Acad Sci USA 95, 6187-6192

Riento, K., Galli, T., Jansson, S., Ehnholm, C., Lehtonen, E. and Olkkonen, V. M. (1998)

Interaction of Munc-18-2 with syntaxin 3 controls the association of apical SNAREs in epithelial cells.

J. Cell Sci. 111, 2681-2688

Rizo, J., Sudhof, T. C. (1998)

C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain.

J Biol Chem. 273, 15879-15882

Rizo, J., Sudhof, T. C. (1998)

Mechanics of membrane fusion.

Nat Struct Biol. 5, 839-842

Rowe, T., Dascher, C., Bannykh, S., Plutner, H. and Balch, W. E. (1998)

Role of vesicle-associated syntaxin 5 in the assembly of pre-Golgi intermediates.

Science 279, 696-700

Ruiz-Montasell, B., Aguado, F., Majo, G., Chapman, E. R., Canals, J. M., Marsal, J. and Blasi, J. (1996)

Differential distribution of syntaxin isoforms 1A and 1B in the rat central nervous system.

Eur. J. Neurosci. 8, 2544-2552

Ryan, T. A. (1998)

Probing a complex question: when are SNARE proteins ensnared?

Nat Neurosci. 1, 175-176

Sakaguchi, G. (1983)

Clostridium botulinum toxins.

Pharmac. Ther. 19, 165-94

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson A. R. (1977)

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.

Proc Natl Acad Sci USA 74, 5463-5467

Schekman, R. (1992)

Genetic and biochemical analysis of vesicular traffic in yeast.
Curr Opin Cell Biol. 4, 587-592

Schiavo, G., Osborne, S. L., Sgouros, J. G. (1998)

Synaptotagmins: more isoforms than functions?
Biochem Biophys Res Commun. 248, 1-8

Schiavo, G., Shone, C. C., Bennett, M. K., Scheller, R. H. and Montecucco, C. (1995)

Botulinum neurotoxin type C cleaves a single Lys-Ala bond within the carboxyl-terminal region of syntaxins.
J Biol Chem. 270, 10566-10570

Schimmoller, F., Simon, I., Pfeffer, S. R. (1998)

Rab GTPases, directors of vesicle docking.
J Biol Chem. 273, 22161-22164

Schmidt, T. G. M., Koepke, J., Frank, R. and Skerra, A. (1996)

Molecular Interaktion Between the Strep-tag Affinity Peptide and its Cognate Target, Streptavidin.
J. Mol. Biol. 255, 753-766

Schneggenburger, R. and Neher, E. (2000)

Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse.
Nature 406, 889-893

Shao, X., Fernandez, I., Sudhof, T. C., Rizo, J. (1998)

Solution structures of the Ca²⁺-free and Ca²⁺-bound C2A domain of synaptotagmin I: does Ca²⁺ induce a conformational change?
Biochemistry 37, 16106-16115

Simonsen, A., Bremnes, B., Ronning, E., Aasland, R. and Stenmark, H. (1998)

Syntaxin-16, a putative Golgi t-SNARE
Eur. J. Cell Biol. 75, 223-231

Smith, D. B. and Johnson, K. S. (1988)

Single step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusion with glutathione S-transferase
Gene 67, 31-40

Söllner, T. and Rothman, J. E. (1996)

Molecular machinery mediating vesicle budding, docking and fusion.
Experienta 52, 1021-1025

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, 409-418

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, 318-324

Sørensen, J. B., Matti, U., Wei, S. H., Nehring, R.B., Voets, T., Ashery, U., Binz, T., Neher, E., Rettig, J. (2002)

The SNARE protein SNAP-25 is linked to fast calcium triggering of exocytosis.

Proc Natl Acad Sci USA 99, 1627-1632

Steggmaier, M., Yang, B., Yoo, J. S., Huang, B., Shen, M., Yu, S., Luo, Y., Scheller, R. H. (1998)

Three novel proteins of the syntaxin/SNAP-25 family.

J Biol Chem. 273, 34171-34179

Stryer, L. (1996)

Biochemie, 4. Auflage

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

Südhof, T. C. (1997)

Function of Rab3 GDP-GTP exchange.

Neuron 18, 519-522

Sugita, S., Han, W., Butz, S., Liu, X., Fernandez-Chacon, R., Lao, Y., Südhof, T. C. (2001)

Synaptotagmin VII as a plasma membrane Ca(2+) sensor in exocytosis.

Neuron 30, 459-473

Sugita, S. and Südhof, T. C. (2000)

Specificity of Ca²⁺-dependent protein interactions mediated by the C2A domains of synaptotagmins.

Biochemistry 39, 2940-2949

Sugita, S., Hata, Y. and Südhof, T. (1996)

Distinct Ca(2+)-dependent properties of the first and second C2-domains of synaptotagmin I.

J. Biol. Chem. 271, 1262-1265

Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R., Brunger, A. T. (1998)

Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution.

Nature 395, 347-353

Sutton, R. B., Ernst, J. A., Brunger, A. T. (1999)

Crystal structure of the cytosolic C2A-C2B domains of synaptotagmin III. Implications for Ca(+2)-independent snare complex interaction.

J Cell Biol. 147, 589-598

Tamori, Y., Kawanishi, M., Niki, T., Shinoda, H., Araki, S., Okazawa, H. and Kasuga, M. (1998)

Inhibition of insulin-induced GLUT4 translocation by Munc18c through interaction with syntaxin 4 in 3T3-L1 adipocytes.

J. Biol. Chem. 273, 19740-19746

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. Commun. 245, 627-632

Tang, B. L., Low, D. Y., Lee, S. S., Tan, A. E. and Hong, W. (1998b)

Molecular cloning and localization of human syntaxin 16, a member of the syntaxin family of SNARE proteins.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 242, 673-679

Tang, B. L., Low, D. Y., Tan, A. E. and Hong, W. (1998c)

Syntaxin 10: a member of the syntaxin family localized to the trans-Golgi network.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 242, 345-350

Tang, B. L., Tan, A. E., Lim, L. K., Lee, S. S. and Hong, W. (1998d)

Syntaxin 12, a member of the syntaxin family localized to the endosome.

J. Biol. Chem. 273, 6944-6950

Terrian, D. M. and White, M. K. (1997)

Phylogenetic analysis of membrane trafficking proteins: a family reunion and secondary structure predictions.

Eur J Cell Biol 73, 198-204

Thomas, D.M., Ferguson, G. D., Herschman, H. R., Elferink, L. A. (1999)

Functional and biochemical analysis of the C2 domains of synaptotagmin IV.

Mol Biol Cell. 10, 2285-2295

Tisdale, E. J., Bourne, J. R., Khosravi-Far, R., Der, C. J., Balch, W. E. (1992)

GTP-binding mutants of rab1 and rab2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex.

J Cell Biol. 119, 749-761

Elferink, L. A., Trimble, W. S., Scheller, R. H. (1989)

Two vesicle-associated membrane protein genes are differentially expressed in the rat central nervous system.

J Biol Chem. 264, 11061-11064

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, 4538-4542

Trimble, W. S., Gray, T. S., Elferink, L. A., Wilson, M. C. and Scheller, R. H. (1990)

Distinct patterns of expression of two VAMP genes within the rat brain.

J. Neurosci. 10, 1380-1387

Trudeau, L. E., Fang, Y., Haydon, P. G. (1998)

Modulation of an early step in the secretory machinery in hippocampal nerve terminals.
Proc Natl Acad Sci USA 95, 7163-7168

Ubach, J., Zhang, X., Shao, X., Südhof, T. C. and Rizo, J. (1998)

Ca²⁺ binding to synaptotagmin: how many Ca²⁺ ions bind to the tip of a C2-domain?
EMBO J. 17, 3921-3930

Ungermann, C., Nichols, B., Pelham, R. B. H. and Wickner, W. (1998)

A vacuolar v-t-SNARE complex, the predominant form in vivo and on isolated vacuoles, is disassembled and activated for docking and fusion
J. Cell Biol. 140, 61-69.

Vaidyanathan, V. V., Yoshino, K., Jahnz, M., Dörries, C., Bade, S., Nauenburg, S., Niemann, H. and Binz, T. (1999)

Proteolysis of SNAP-25 Isoforms by Botulinum Neurotoxin Types A, C and E: Domains and Amino Acid Residues Controlling the Formation of Enzyme-Substrate Complexes and Cleavage.
J. Neurochemistry, 72, 327-337

Veit, M., Söllner, T. H. and Rothman, J. E. (1996)

Multiple palmitoylation of synaptotagmin and the t-SNARE SNAP-25.
FEBS Lett. 385, 119-123

Verhage, M., Maia, A. S., Plomp, J. J., Brussaard, A. B., Heeroma, J. H., Vermeer, H., Toonen, R. F., Hammer, R. E., van den Berg, T. K., Missler, M., Geuze, H. J., Südhof, T. C. (2000)

Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion.
Science 287, 864-869

Voets, T., Neher, E., Moser, T. (1999)

Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices.
Neuron 23, 607-615

Voets, T. (2000)

Dissection of three Ca²⁺-dependent steps leading to secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices.
Neuron 28, 537-545

Volchuk, A., Mitsumoto, Y., He, L., Liu, Z., Habermann, E., Trimble, W. and Klip, A. (1994)

Expression of vesicle-associated membrane protein 2 (VAMP-2)/synaptobrevin II and cellubrevin in rat skeletal muscle and in a muscle cell line.
Biochem. J. 304, 139-145

Volchuk, A., Wang, Q., Ewart, H.S., Liu, Z., He, L., Bennett, M. K. and Klip, A. (1996)

Syntaxin 4 in 3T3-L1 adipocytes: regulation by insulin and participation in insulin-dependent glucose transport.
Mol. Biol. Cell 7, 1075-1082

Walch-Solimena, C., Blasi, J., Edelmann, L., Chapman, E. R., Fischer von Mollard, G. 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, 637-645

Wang, H., Frelin, L. and Pevsner, J. (1997)

Human syntaxin 7: a Pep12p/Vps6p homologue implicated in vesicle trafficking to lysosomes.

Gene 199, 39-48

Weber, T., Zemelman, B. V., McNew, J. A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Söllner, T. H. and Rothman, J. E. (1998)

SNAREpins: Minimal Machinery for Membrane Fusion.

Cell 92, 759-772

Wei, S., Xu, T., Ashery, U., Kollwe, A., Matti, U., Antonin, W., Rettig, J., and Neher, E. (2000)

Exocytotic mechanism studied by truncated and zero layer mutants of the C-terminus of SNAP-25.

EMBO J. 19, 1279-1289

Weimbs, T., Low, S. H., Chapin, S. J., Mostov, K. E., Bucher, P., Hofmann, K. (1997)

A conserved domain is present in different families of vesicular fusion proteins: a new superfamily.

Proc Natl Acad Sci USA 94, 3046-3051

Weimbs, T., Mostov, K., Low, S. H., Hofmann, K. (1998)

A model for structural similarity between different SNARE complexes based on sequence relationships.

Trends Cell Biol. 8, 260-262

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, 355-359

Xu, T., Binz, T., Niemann, H., Neher, E. (1998)

Multiple kinetic components of exocytosis distinguished by neurotoxin sensitivity.

Nat Neurosci. 1, 192-200

Xu, T., Ashery, U., Burgoyne, R. D., Neher, E. (1999a)

Early requirement for alpha-SNAP and NSF in the secretory cascade in chromaffin cells.

EMBO J. 18, 3293-3304

Xu, T., Rammner, B., Margittai, M., Artalejo, A. R., Neher, E., Jahn, R. (1999b)

Inhibition of SNARE complex assembly differentially affects kinetic components of exocytosis.

Cell 99, 713-722

Yamasaki, S., Baumeister, A., Binz, T., Blasi, J., Link, E., Cornille, F., Roques, B., Fykse, E. M., Südhof, T. C., Jahn, R. and Niemann, H. (1994a)

Cleavage of members of the synaptobrevin/VAMP family by types D and F botulinical neurotoxins and tetanus toxin.

J. Biol. Chem. 269, 12764-12772

Yamasaki, S., Hu, Y., Binz, T., Kalkuhl, A., Kurazono, H., Tamura, T., Jahn, R., Kandel, E. and Niemann, H., (1994b)

Synaptobrevin/vesicle-associated membrane protein (VAMP) of *Aplysia californica*: Structure and proteolysis by tetanus toxin and botulinical neurotoxins type D and F.

Neurobiology 91, 4688-4692

Zeng, Q., Subramaniam, V. N., Wong, S. H., Tang, B. L., Parton, R. G., Rea, S., James, D. E. and Hong, W. (1998)

A Novel Synaptobrevin/VAMP Homologous Protein (VAMP5) Is Increased during In Vitro Myogenesis and Present in the Plasma Membrane.

Mol. Biol. Cell 9, 2423-2437

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Ulf Matti
Geburtsdatum	23.10.1971
Geburtsort	Ulm
Anschrift	Erikastr.32 66424 Homburg
Familienstand	verheiratet, 2 Kinder
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1978-1981	Ernst-Reuter-Gundschule, Egestorf, Niedersachsen
1981-1982	Grundschule Öpfingen, Baden-Württemberg
1982-1984	Schubert-Gymnasium, Ulm, Baden-Württemberg
1984-1991	Ganztagsgymnasium Barsinghausen, Niedersachsen
Juni 1991	Abitur

Studium

1992-1998	Studium der Chemie an der Universität Hannover
November 1998	Diplom in Chemie an der Universität Hannover Diplomarbeit: Thermische und chemische Stabilität von SNARE-Komplexen (an der Medizinischen Hochschule Hannover, Institut für Physiologische Chemie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Heiner Niemann) Gesamtnote: Sehr gut

Beruflicher Werdegang

4/94-17/94	Studentische Hilfskraft: Chemisches Praktikum für Studenten der Allgemeinmedizin, Abteilung Medizinische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover
1/95-3/96	Studentische Hilfskraft am Institut für Grundbau, Bodenmechanik und Energiewasserbau der Universität Hannover
4/96-8/96	Shell Research Center Thornton, UK, Additives Development Department
9/96-12/97	Studentische Hilfskraft am Institut für Grundbau, Bodenmechanik und Energiewasserbau der Universität Hannover
1.01.1999 – 31.05.2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Heiner Niemann und Dr. Thomas Binz
seit 1. Juni 2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Physiologie der Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jens Rettig

Veröffentlichungen

Wei, S., Xu, T., Ashery, U., Kollwe, A., Matti, U., Antonin, W., Rettig, J., and Neher, E. (2000)

Exocytotic mechanism revealed by truncated and zero layer mutants of the C-terminus of SNAP-25. *EMBO J.* 19, 1279-1289

Sørensen, J. B., Matti, U., Wei, S., Nehring, R. B., Voets, T., Ashery, U., Binz, T., Neher, E., Rettig, J. (2002)

The SNARE protein SNAP-25 is linked to fast calcium triggering of exocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(3), 1627-1632

Tomes, C. N., Michaut, M., De Blas, G., Visconti, P., Matti, U., Mayorga, L. S. (2002)

SNARE complex assembly is required for human sperm acrosome reaction. *Dev Biol.* 243(2), 326-338

Nagy, G., Matti, U., Nehring, R. B., Binz, T., Rettig, J., Neher, J., Sørensen, J. B. Protein Kinase C Dependent Phosphorylation of SNAP-25 at Ser¹⁸⁷ Potentiates Vesicle Recruitment.

(eingereicht)

Matti, U., Binz, T. and Niemann, H. (1999)

The 'zero-layer' of the SNARE complex does not control α -SNAP/NSF mediated dissociation but increases stability.

Fall Meeting of the Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Hamburg