

**THE SYNAPTOPHYSIN-SYNAPTOBREVIN
COMPLEX: A MARKER FOR SYNAPTIC VESICLE
MATURATION**

**DER SYNAPTOPHYSIN-SYNAPTOBREVIN KOMPLEX: EIN
INDIKATOR DER REIFUNG SYNAPTISCHER VESIKEL**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Anja Becher
aus Much, Rhein-Sieg-Kreis

Berlin 1999

Gutachter: Prof. Dr. (rer. nat.) G. Ahnert-Hilger
Prof. Dr. (rer. nat.) F. Hucho

Datum der Disputation: 15 November 1999

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude to my supervisor, Prof. Dr. Gudrun Ahnert-Hilger, for her encouragement and support throughout this project. I very much enjoyed her focussed and positive approach towards scientific research.

I am also very grateful to Prof. Dr. Ferdinand Hucho for his interest in my work, and for offering to co-supervise my thesis.

Thank you to Dr. Andreas Draguhn for supplying me with kindled rats, to Evelyn Heuckendorf for growing the tissue culture cells, to Drs. Thomas Jöns and Klaus Buchner for performing the HPLC analyses, to Dr. Ingrid Hähnlein for supplying the immunofluorescence diagram, and to Dr. Michael Veit for handling the radioactive part of the palmitoylation experiments. A special thank you goes to Prof. Dr. Reinhard Jahn, who, apart from supplying our group with large quantities of excellent antibodies, supported my work and scientific progress throughout this project. I am grateful to Prof. Dr. Gudrun Ahnert-Hilger, Prof. Dr. Hartmut Hilger, Dr. Ingrid Hähnlein, Markus Höltje, Dr. Thomas Jöns, and especially to my husband Jan Ewert for critically reading this manuscript.

My research has been supported financially by the Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant SFB 515.

PUBLICATIONS

Full Papers

Becher, A., Drenckhahn, A., Pahner, I., Margittai, M., Jahn, R., Ahnert-Hilger, G. (1999). The synaptophysin-synaptobrevin complex – a hallmark of synaptic vesicle maturation. *J. Neurosci.* **19**, 1922-1931.

Becher, A., Drenckhahn, A., Pahner, I., Ahnert-Hilger, G. (1999). The synaptophysin-synaptobrevin complex is developmentally upregulated in cultivated neurons but is absent in neuroendocrine cells. *Eur. J. Cell. Biol.*, in press.

Abstracts

Becher, A., Hähnlein, I., Ahnert-Hilger, G. Synaptobrevin and its complexes during neuronal maturation. *European Forum of Neuroscience* **1998** (Berlin, Germany).

Becher, A., Hähnlein, I., Ahnert-Hilger, G. Synaptobrevin / Synaptophysin complex: a hallmark of neuronal maturation. *Göttinger Neurobiologentagung* **1998** (Göttingen, Germany).

Becher, A., Drenckhahn, A., Pahner, I., Ahnert-Hilger, G. The synaptophysin-synaptobrevin complex: an indicator for vesicle maturation. *15. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft* **1998** (Würzburg, Germany).

Becher, A., Drenckhahn, A., Pahner, I., Ahnert-Hilger, G. The synaptophysin-synaptobrevin complex: a marker for vesicle maturation. *British Neuroscience Association* **1999** (Harrogate, United Kingdom).

TABLE OF CONTENTS

| | page |
|---|-------------|
| Title page | i |
| Acknowledgements | ii |
| Publications | iii |
| | |
| <u>Section 1</u> | |
| Introduction | 1 |
| 1.1 Synaptic transmission and plasticity | 1 |
| 1.2 Proteins involved in exocytotic membrane fusion | 2 |
| 1.2.1 Synaptobrevin | 3 |
| 1.2.2 Syntaxin | 3 |
| 1.2.3 SNAP 25 | 4 |
| 1.3 Characterisation of the assembled fusion complex | 4 |
| 1.4 Role of synaptotagmin in regulated exocytosis | 6 |
| 1.5 Regulation of SNARE complex formation | 7 |
| 1.6 Synaptophysin: an abundant vesicle protein whose function has remained controversial | 8 |
| 1.6.1 Localisation and structure of synaptophysin | 9 |
| 1.6.2 Proposed functions of synaptophysin | 10 |
| 1.7 Perspective | 11 |
| | |
| <u>Section 2</u> | |
| Materials | 12 |
| 2.1 Antibodies | |
| 2.1.1 Primary antibodies (monoclonal) | 12 |
| 2.1.2 Primary antisera (polyclonal) | 12 |
| 2.1.3 Secondary antibodies | 13 |
| 2.1.4 Recombinant antibodies | 13 |
| 2.2 Chemicals and reagents | 13 |
| 2.3 Buffers and solutions | 15 |
| 2.4 Equipment | 19 |
| 2.4.1 Centrifuges | 19 |
| 2.4.2 Centrifugal filter units | 20 |

| | page |
|--|-------------|
| 2.4.3 Electrophoresis equipment | 20 |
| 2.4.4 Spectrophotometers | 20 |
| | |
| <u>Section 3</u> | |
| Methods | 21 |
| 3.1 Preparation of synaptosomes and synaptic vesicles from rat brain | 21 |
| 3.1.1 Preparation of synaptosomes | 21 |
| 3.1.2 Preparation of crude synaptic vesicles | 22 |
| 3.2 Determination of protein concentrations | 22 |
| 3.2.1 Bicinchoninic acid method to determine protein concentration | 22 |
| 3.2.2 Bradford method to determine protein concentration | 23 |
| 3.3 Immunoprecipitation of protein complexes | 23 |
| 3.4 Protein gel electrophoresis | 24 |
| 3.5 Western blotting and immunodetection | 25 |
| 3.6 Chemical Cross-linking using DSS | 26 |
| 3.7 Preparation of cell line and primary tissue culture samples | 26 |
| 3.8 Immunoisolation of synaptic vesicles | 26 |
| 3.9 Recombinant synaptobrevins | 27 |
| | |
| <u>Section 4</u> | |
| Results | 29 |
| 4.1 Establishment of experimental procedures | 29 |
| 4.2 The synaptophysin-synaptobrevin complex and the SNARE complex in embryonic brain and neuroendocrine cells | 35 |
| 4.2.1 The synaptophysin-synaptobrevin complex and the SNARE complex in embryonic rat brain | 35 |
| 4.2.2 The synaptophysin-synaptobrevin complex and the SNARE complex in embryonic mouse brain | 44 |
| 4.2.3. The synaptophysin-synaptobrevin complex and the SNARE complex in neuroendocrine cells | 48 |
| 4.3 Localisation of synaptophysin and synaptobrevin in embryonic and adult brain | 49 |
| 4.4 Posttranslational modifications | 53 |

| | page |
|---|-------------|
| 4.4.1 Palmitoylation | 54 |
| 4.4.2 Reduced and oxidised forms of synaptophysin | 56 |
| 4.4.3 Recombinant synaptobrevin | 57 |
| 4.5 A factor that induces binding | 60 |
| 4.6 Physiological / pathophysiological relevance | 65 |

Section 5

| | |
|--|----|
| Discussion | 67 |
| 5.1 The SNARE proteins and synaptophysin | 67 |
| 5.2 Developmental upregulation of the synaptophysin-synaptobrevin complex | 68 |
| 5.2.1 Control experiments verify the developmental upregulation of the synaptophysin-synaptobrevin complex | 68 |
| 5.2.2 Cross-linking of the synaptophysin-synaptobrevin complex in adult but not in embryonic brain | 69 |
| 5.2.3 Regional differences in synaptophysin-synaptobrevin complex formation with respect to development? | 70 |
| 5.3 Possible factors regulating the developmental upregulation of the synaptophysin-synaptobrevin complex | 71 |
| 5.3.1 Synaptophysin and synaptobrevin occur on the same vesicle population during development | 71 |
| 5.3.2 Observed differences in lipid modification of synaptobrevin cannot explain the developmental upregulation of the synaptophysin-synaptobrevin complex | 72 |
| 5.3.3 Synaptophysin from embryonic brain, from PC 12 cells and from transfected CHO cells does not bind to recombinant synaptobrevin | 73 |
| 5.3.4 Disulphide bridges in synaptophysin from adult and embryonic brain | 73 |
| 5.3.5 Possible binding partners for the synaptophysin-synaptobrevin complex | 74 |
| 5.3.6 A small peptide from adult cytosol induces formation of the synaptophysin-synaptobrevin complex | 75 |
| 5.4 Possible functions of synaptophysin and the synaptophysin-synaptobrevin interaction | 76 |
| 5.4.1 Synaptophysin probably plays a role in the genesis and stabilisation of synaptic vesicles | 77 |

| | page |
|---|-------------|
| 5.4.2 Synaptophysin may provide a readily available pool of synaptobrevin for exocytosis | 77 |
| <u>Section 6</u> | |
| References | 81 |
| <u>Section 7</u> | |
| Summary | 89 |
| Zusammenfassung | 91 |
| Lebenslauf | 93 |

SUMMARY

The integral synaptic vesicle protein synaptobrevin occurs in two mutually exclusive complexes in the adult brain. One of these complexes is formed between synaptobrevin and the synaptic vesicle protein synaptophysin. The majority of synaptobrevin is found in this complex. The second complex is formed between synaptobrevin and the plasma membrane proteins SNAP 25 and syntaxin. This so-called SNARE complex is a prerequisite for exocytotic membrane fusion. Synaptobrevin that is bound to synaptophysin is not available for SNARE complex formation. The aim of the current study was to determine whether these two complexes are differentially regulated during neuronal development. A combination of immunoprecipitation and chemical cross-linking experiments shows that the synaptophysin-synaptobrevin complex is upregulated during neuronal development. In embryonic brain, the synaptophysin-synaptobrevin complex is not detectable, although synaptophysin and synaptobrevin are both clearly expressed. In contrast, the ability of synaptobrevin to participate in the SNARE complex exists as early as embryonic day 14. The developmental upregulation of the synaptophysin-synaptobrevin complex can also be observed in hippocampal primary tissue culture, where the two proteins do not interact at day 6 in culture but clearly form a complex by day 13 in culture. In neuroendocrine cells and tissues, the synaptophysin-synaptobrevin complex is always absent, although the SNARE complex is present. Immunoprecipitation of intact vesicles shows that synaptophysin and synaptobrevin are localised to the same vesicle pool in embryonic brain. Therefore, a differential sorting process cannot account for their lack of interaction. Synaptobrevin is palmitoylated in adult but not in embryonic brain. However, experiments using recombinant synaptobrevin, which is not palmitoylated, indicate that palmitoylation of synaptobrevin appears not to be a prerequisite for its binding to synaptophysin. Rather, a posttranslational modification of synaptophysin is responsible for the developmental changes in the synaptophysin-synaptobrevin interaction. The nature of this posttranslational modification of synaptophysin still remains to be elucidated. It does, however, not seem to involve rearrangement of disulphide bonds in synaptophysin. The posttranslational modification of synaptophysin is caused by a factor residing in the synaptic cytosol. When embryonic vesicles are incubated with synaptic cytosol isolated from adult brain, formation of the synaptophysin-synaptobrevin complex is induced. Cytosol from embryonic brain, however, cannot induce complex formation on embryonic vesicles. Neither does it inhibit complex formation on adult vesicles. These results indicate that synaptic cytosol from adult but not embryonic brain contains a factor that is required for the posttranslational modification of synaptophysin. This active factor appears to be a short

peptide of less than 3 kDa in size. It is probable that synaptophysin fine-tunes synaptic responses by regulating the availability of synaptobrevin to the SNARE complex in a positive manner. According to this view, synaptophysin binds to synaptobrevin subsequent to endocytosis and SNARE disassembly, thereby preventing the re-association of synaptobrevin with vesicle-associated syntaxin and SNAP 25. In this way, synaptophysin may provide a reserve pool of synaptobrevin that can be recruited during periods of high synaptic activity. Experiments performed for this study using kindled rats seem to support such a role for synaptophysin. Kindled rats, which serve as a model for epilepsy, show an increase in synaptophysin-synaptobrevin complex formation compared to unstimulated controls. Although these results are preliminary, they tentatively suggest that increased synaptic activity is associated with increased complex formation.

In conclusion, the current study shows that the synaptophysin-synaptobrevin interaction represents a component of synaptic plasticity that acts at the level of the synaptic vesicle during development as well as in the adult brain.

ZUSAMMENFASSUNG

Das synaptische Vesikelprotein Synaptobrevin geht im adulten Gehirn zwei verschiedene, einander ausschließende Interaktionen ein. Zum einen bildet Synaptobrevin mit dem Vesikelprotein Synaptophysin einen Komplex, in dem sich der Großteil des Synaptobrevins befindet. Zum anderen geht Synaptobrevin zusammen mit den Plasmamembranproteinen SNAP 25 und Syntaxin den SNARE Komplex ein, der eine Voraussetzung für die exozytotische Membranfusion ist. Synaptobrevin im Komplex mit Synaptophysin steht nicht für den SNARE Komplex zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit sollte ermittelt werden, ob diese beiden Komplexe während der Entwicklung unterschiedlich reguliert werden. Mit Hilfe der Immunpräzipitation und der chemischen Quervernetzung wurde gezeigt, daß der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex während der neuronalen Entwicklung hochreguliert wird. Im embryonalen Gehirn kommt kein Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex vor, obwohl beide Proteine vorhanden sind. Dagegen ist der SNARE-Komplex schon am Embryonaltag 14 nachweisbar. Das entwicklungsabhängige Auftauchen des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes läßt sich auch in neuronalen Primärkulturen des Hippocampus verfolgen. Während am sechsten Tag in Kultur der Komplex noch nicht vorhanden ist, kann er am Tag 13 deutlich nachgewiesen werden. In neuroendokrinen Zellen und Geweben kommt der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex nicht vor. An immunisolierten, intakten synaptischen Vesikeln konnte gezeigt werden, daß Synaptophysin und Synaptobrevin im embryonalen Gehirn auf derselben Vesikelpopulation lokalisiert sind. Eine Sortierung der beiden Proteine auf unterschiedliche Vesikelpopulationen kann daher die fehlende Interaktion nicht erklären. Synaptobrevin wird im adulten, aber nicht im embryonalen, Gehirn palmitoyliert. Experimente mit rekombinantem, nicht palmitoyliertem Synaptobrevin deuten jedoch darauf hin, daß für die Komplexbildung mit Synaptophysin keine Palmitoylierung des Synaptobrevins notwendig ist. Für die entwicklungsabhängigen Veränderungen der Synaptophysin-Synaptobrevin Interaktion ist wahrscheinlich eine posttranslationale Modifikation des Synaptophysins und nicht des Synaptobrevins verantwortlich. Die Beschaffenheit dieser posttranslationalen Modifikation von Synaptophysin muß noch analysiert werden. Eine Veränderung der Disulfidbrücken im Synaptophysinmolekül scheint nicht verantwortlich zu sein. Die posttranslationale Modifikation des Synaptophysins läßt sich durch einen zytosolischen Faktor hervorrufen. Die Inkubation von embryonalen Vesikeln mit adultem synaptischen Zytosol induziert die Interaktion von Synaptophysin mit Synaptobrevin. Zytosol von embryonalem Gehirn induziert dagegen keine Komplexbildung bei embryonalen Vesikeln aber hemmt auch nicht die Komplexbildung bei adulten Vesikeln. Diese Ergebnisse

zeigen, daß nur adultes Zytosol einen Faktor enthält, der eine posttranslationale Modifikation des Synaptophysin bewirkt. Weiterführende Versuche haben ergeben, daß es sich bei diesem Faktor um ein kurzes Peptid von weniger als 3 kDa handelt. Es ist wahrscheinlich, daß Synaptophysin eine Feinabstimmung der synaptischen Antwort ermöglicht, indem es die Verfügbarkeit des Synaptobrevins für den SNARE Komplex positiv reguliert. Nach der Endozytose kommt es zu einer Dissoziation der vesikulären SNARE Komplexe. Bindung des Synaptophysins an Synaptobrevin könnte die unerwünschte Komplexbildung von Synaptobrevin mit Vesikel-assoziierten Syntaxin und SNAP 25 verhindern. Das an Synaptophysin gebundene Synaptobrevin könnte so eine Reserve darstellen, die bei hoher synaptischer Aktivität rekrutiert werden kann. Erste Experimente an gekindelten Ratten unterstützen eine solche Hypothese. Gekindelte Ratten, die als ein Epilepsiemodel gelten, weisen eine Erhöhung des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes im Vergleich zu unstimulierten Kontrolltieren auf. Diese vorläufigen Ergebnisse weisen darauf hin, daß eine gesteigerte synaptische Aktivität mit einer erhöhten Synaptophysin- Synaptobrevin-Komplexbildung einhergeht.

Der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex ist wahrscheinlich ein Indikator auf der Ebene des Vesikels für entwicklungsabhängige synaptische Plastizität. Zusätzlich kann er aber auch zu synaptischer Plastizität im adulten Gehirn beitragen.

LEBENS LAUF

Anja Becher

- 16.3.1969 geboren in Much, Rhein-Sieg-Kreis, Deutschland
- 1976 Deutsche Schule zu Johannesburg, Südafrika
- 1977 Grundschule Erlangen, Deutschland
- 1978-1979 Deutsche Schule Tokio, Japan
- 1980-1982 Deutsche Schule zu Johannesburg, Südafrika
- 1983 St. Antonius Kolleg Neunkirchen, Deutschland
- 1984-1988 Deutsche Schule zu Johannesburg, Südafrika
- 1988 Abitur
- 1989-1991 Bachelor of Science majoring in General Biochemistry
University of the Witwatersrand, Johannesburg, Südafrika
- 1992 Bachelor of Science with Masters in Medical Biochemistry
University of the Witwatersrand Medical School, Johannesburg, Südafrika
- 1993-1995 Master of Science in Medical Biochemistry
University of the Witwatersrand Medical School, Johannesburg, Südafrika
- 1996-1999 Doktorarbeit am Institut für Anatomie, Universitätsklinikum Charité der
Humboldt-Universität zu Berlin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Ahnert-
Hilger unter der Mitbetreuung von Prof. Dr. F. Hucho, Institut für Chemie,
Freie Universität Berlin, Deutschland