

Aus der Klinik für Innere Medizin
Abteilung für Hepatologie und Gastroenterologie
der Medizinischen Fakultät der
Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Immunhistochemische und molekularbiologische
Identifikation der SNARE-Proteine
Syntaxin 3, SNAP 23 und Cellubrevin (VAMP 3)
in gastrointestinalen sowie hepatopankreatischen Geweben und
neuroendokrinen Tumoren**

Zur Erlangung
des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Frau Stephanie Kämper
aus Paderborn

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. B. Wiedenmann

2. Prof. Dr. med. M. Zeitz

3. Prof. Dr. med. G. Klöppel

Datum der Disputation: 13.07.2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	3
1.1	Membranfusion.....	3
1.2	SNARE (SNAP Rezeptor)-Proteine.....	3
1.3	SNARE-Zyklus.....	4
1.4	Vesikelzyklus.....	7
1.5	Polarität der Zelle.....	7
1.6	Regulierter und konstitutiver Membrantransport.....	8
1.7	Die SNARE-Proteine Syntaxin 3, SNAP 23 und Cellubrevin.....	9
1.7.1	Syntaxine und Syntaxin 3.....	10
1.7.2	SNAP-Proteine und SNAP 23.....	11
1.7.3	VAMP-Proteine und Cellubrevin (VAMP 3).....	11
1.8.1	Neuroendokrine Zellen (NEZ) und deren Sekretionsapparat.....	13
1.8.2	Gastroentero-pankreatisches endokrines System (GEP).....	14
1.9	SNARE-Proteine in gastrointestinalen und hepatopankreatischen Geweben.....	16
1.9.1	SNARE-Proteine im endokrinen und exokrinen Pankreas.....	18
1.9.2	SNARE-Proteine in der Leber.....	19
1.9.3	SNARE-Proteine in der Magenmukosa.....	20
1.9.4	SNARE-Proteine in Enterozyten und neuroendokrinen Zellen des Intestinums.....	21
1.10	Neuroendokrine Tumore des Gastrointestinaltrakts (NET).....	22
1.11	Neuroendokrine Markerproteine.....	24
1.12	SNAREs in mukosaassoziierten Zellen des Immunsystems.....	25
1.13	Zielsetzung dieser Arbeit.....	27
2	Material und Methoden.....	28
2.1	Material.....	28
2.1.1	Chemikaliennachweis für die Immunhistochemie.....	28
2.1.2	Chemikaliennachweis für Zellkultur und Western Blot.....	29
2.1.3	Bezugsquellen verwendeter Materialien und Geräte.....	30
2.1.4	Antikörper.....	31
2.1.4.1	Primäre Antikörper.....	31
2.1.4.2	SNARE-Antikörper: Syntaxin 3, SNAP 23 und Cellubrevin.....	32
2.1.4.3	Sekundäre Antikörper.....	32
2.1.5	Puffer und Lösungen der Immunhistochemie.....	33
2.1.6	Puffer und Lösungen des Western Blots.....	34
2.1.7	Gewebe.....	35
2.1.8	Zelllinien.....	36
2.2	Methoden.....	37
2.2.1	HE-Färbung.....	37
2.2.2	Prinzip der Antigen-Antikörperreaktion der Immunhistochemie.....	37
2.2.3.1	Immunfluoreszenz an Zelllinien.....	38
2.2.3.2	Immunfluoreszenz an Geweben.....	38
2.2.4	Einfach- und Doppelfluoreszenz.....	39
2.2.5	APAAP-Methode.....	39
2.2.6	Auswertung der immunhistochemischen Befunde.....	41
2.2.7	Fotografische Dokumentation.....	42
2.2.8	Zellkultur.....	42
2.2.9	Herstellung der Proteinlysate und Proteinbestimmung.....	43
2.2.10	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	43
2.2.11	Western Blot.....	44
2.2.12	Proteinstripping der Blotmembran.....	45

2.2.13	Peptidverdrängungsassay.....	45
2.2.14	Quantitative Auswertung der Proteinbanden.....	46
3	Ergebnisse.....	47
3.1	Spezifitätsnachweis der SNARE-Antikörper.....	47
3.2	Lokalisation der SNARE-Proteine im Pankreas.....	48
3.2.1	Endokrines Pankreas: Inselzellen.....	48
3.2.2	Exokrines Pankreas: Azinuszellen.....	50
3.3	Doppelfluoreszenz mit endokrinen Markern am Pankreasgewebe.....	51
3.4	Lokalisation der SNARE-Proteine im Lebergewebe.....	57
3.5	Kolokalisation von SNAP 23 in Kupfferschen Sternzellen der Leber.....	58
3.6	Lokalisation der SNARE-Proteine in der gastrointestinalen Mukosa.....	59
3.6.1	Magenmukosa.....	59
3.6.2	Dünndarmmukosa.....	63
3.6.3	Dickdarmmukosa.....	67
3.7	Kolokalisation gastrointestinaler NEZ mit neuroendokrinen Markerproteinen.....	70
3.8	Doppellokalisierung zur Charakterisierung mukosaassoziierter Zellen	73
3.9	Präsenz der SNAREs in neuroendokrinen Tumoren (NET).....	77
3.10	Immunfluoreszenz an Zelllinien.....	80
3.10.1	Einzelfluoreszenz an BON und HT-29-Zellen.....	80
3.10.2	Doppelfluoreszenz an BON-Zellen.....	81
3.11	SNARE-Proteinnachweis an Zelllinien im Western Blot.....	85
3.12	Bestimmung der Nettointensität und β -Aktin Ratio.....	89
3.13	Graphische Darstellung der relativen Proteinexpression.....	90
4	Diskussion.....	93
4.1	Spezifität der eingesetzten SNARE-Antikörper.....	93
4.2	SNARE-Proteine im Pankreasgewebe.....	93
4.2.1	Endokrines Pankreasgewebe: Inselzellen.....	94
4.2.2	Exokrines Pankreasgewebe: Azinuszellen.....	96
4.3	SNARE-Proteine in Hepatozyten.....	98
4.4	SNAP-23 als zentrales SNARE-Protein in Lebermakrophagen.....	99
4.5	Lokalisation der SNARE-Proteine in der gastralen Mukosa.....	100
4.6	Lokalisation der SNARE-Proteine in der intestinalen Mukosa.....	103
4.7	SNARE-Expression in neuroendokrinen Tumoren (NET).....	106
4.8	Syntaxin 3, SNAP 23 und Cellubrevin in HT-29 und BON-Zellen.....	109
4.9	Subzelluläre Lokalisation der SNAREs in SLMV und LDCV der BON-Zelle.....	112
4.10	Modell eines SNARE-Fusionskomplexes der SLMV in humanen NEZ.....	113
4.11	Proteinexpression der SNAREs in transform. Zelllinien des GIT, IEC-6 und HeLa	114
4.12	Proteinexpression der SNAREs in endokrinen und neuroendokrinen Zelllinien.....	116
4.13	Nachweis der SNAREs in mukosaassozierten Zellen.....	118
5	Zusammenfassung.....	122
6	Abkürzungsverzeichnis.....	124
7	Literaturverzeichnis.....	126
8	Danksagung.....	146
9	Publikationen.....	146
10	Lebenslauf.....	147
11	Eidesstattliche Erklärung.....	148

6 Abkürzungsverzeichnis

#	Markierung für Zelllinie der Spezies Ratte
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
AS	Aminosäure(n)
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BoNT	Botulinumneurotoxin
BSA	bovine serum albumin
BF	Blickfeld
Cb	Cellubrevin (VAMP 3)
Cg A	Chromogranin A
CCK	Cholezystokinin
DES	diffuses endokrines System
DL	Doppellokalisierung
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
ECL-Zelle	enterochromaffin-like-cell
einz.	einzelne
EL	Einfachlokalisierung
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fa.	Firma
FKS	Fetales Kälberserum
goat	Spezies Ziege
g	Gravidation
GABA	γ -Aminobuttersäure
GEP	Gastroentero-pankreatisches endokrines System
GIP	Gastric inhibitory peptide
GIT	Gastrointestinaltrakt
GLI	glucagon-like immunoreactants
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde(n)
IF	Immunfluoreszenz
ICAM	human intercellular adhesion molecule-1
IH	Immunhistochemie
I	Intensität
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL-1	Interleukin-1
IZ	intrazellulär
IZL	intrazelluläre Lokalisation
kD	Kilodalton
k. A.	keine Angabe
LDCV	large dense core vesicles
Lok.	Lokalisation
M/ mM	Mol pro Liter/ Millimol pro Liter
mAb	monoklonaler Antikörper

m(ouse)	Spezies Maus
MDCK	Madin- Darby canine kidney
MG	Molekulargewicht
MGM	Molekulargewichtsmarker
Min.	Minute(n)
NEAA	non essential amino acids
NET	Neuroendokriner Tumor
NEZ	Neuroendokrine Zelle
NP-40	Nonidet P-40
NSE	Neuronspezifische Enolase
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive factor
PBS	phosphate buffered saline
PM	Plasmamembran/ plasmamembranär
PMSF	Phenylmethylsulfonylfourid
PYY	PP-like peptide with N-terminalem tyrosine amide
PP	Pankreatisches Polypeptid
r(a)b(bit)	Spezies Kaninchen
rat	Spezies Ratte
rel.	relativ
rpm	rotations per minute
RPMI-Medium	Rosewell Park Memorial Institute-Medium
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLMV	synaptic-like microvesicles (entsprechen den SSV-Analoga)
SNAP(s)	soluble NSF attachment protein(s)
SNAP 25	Synaptosomal-associated protein of 25 kD
SNAP 23	Synaptosomal-associated protein of 23 kD
SNARE(s)	soluble NSF attachment protein (= SNAP) receptor(s)
v-SNARE	vesicular SNARE
t-SNARE	target membrane SNARE
SSV	small synaptic vesicles
SV	synaptic vesicle
Sy 38	Synaptophysin
Sx 3	Syntaxin 3
SZL	subzelluläre Lokalisation
Tab.	Tabelle
TBS	Tris buffered saline
TeTx	Tetanustoxin
TEMED	N.N'.N.N'.- Tetramethylethylendiamin
TI-VAMP	Tetanustoxin-insensitives VAMP
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TNF	tumor necrosis factor
VAMP	Vesicle associated membrane protein (= Synaptobrevin)
WB	Western Blot
ZP	Zytoplasma/ zytoplasmatisch

8 Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Wiedenmann danken, der mich während meiner gesamten Dissertation kontinuierlich unterstützt und gefördert hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Carsten Grötzinger, der mit seiner ruhigen, freundlichen Art, wissenschaftlichen Kompetenz, beständigen Motivation und vielfältigen Anregungen diese Promotionsarbeit begleitet und betreut hat.

Einen ganz herzliches Dankeschön möchte ich an Yvonne Giesecke und Ines Eichhorn richten, die mir durch ihre engagierten methodischen Einweisungen die Möglichkeit zum experimentellen Arbeiten eröffneten und damit wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. med. Michael Höcker (Fa. Astra Zeneca) bin ich für seine fachliche Unterstützung sowie sein freundliches Entgegenkommen zu Dank verpflichtet.

Aus dem pathologischen Institut der Charité standen mir Dr. Martin Koch und Prof. M. Dietel bei histopathologischen und morphologischen Fragestellungen hilfreich zur Seite.

Allen namentlich nicht erwähnten Mitarbeitern der AG Prof. Wiedenmann und der ehemaligen AG Prof. Rosewicz, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben, danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Schließlich möchte ich aber vor allem meiner Familie danken:

Seid umarmt, denn durch Eure beständige emotionale und geistige Unterstützung habt Ihr den ganz wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet!

9 Publikationen

Anteile dieser Arbeit wurden publiziert in:

- ✓ **Grötzinger C, Kämper S, Eichhorn I, Giesecke Y, Mergler S, Wiedenmann B**
Regulation of secretion in neuroendocrine cells and tumors.
Eur Journal of Cell Biology, Vol. 85S1, Suppl. 56, March 2006, p. 11
- ✓ **Grötzinger C, Kämper S, Eichhorn I, Giesecke Y, Mergler S, Wiedenmann B**
Regulation of neuropeptide secretion in neuroendocrine cells and tumors.
Poster, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, März 2006

10 Lebenslauf

„Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.“

11 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Stephanie Kämper, erkläre, daß ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: *Immunhistochemische und molekularbiologische Identifikation der SNARE-Proteine Syntaxin 3, SNAP 23 und Cellubrevin (VAMP 3) in gastrointestinalen sowie hepatopankreatischen Geweben und neuroendokrinen Tumoren* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 11. August 2006

Stephanie Kämper