

1 Einleitung

Die Einleitung gibt zunächst einen kurzem Überblick über die Grundlagen der Membranfusion, des intrazellulären Vesikeltransports und die damit verbundene SNARE-Hypothese. Darauf hin werden die drei SNARE-Proteinfamilien vorgestellt, wobei insbesondere auf die in dieser Arbeit untersuchten Fusionsproteine Syntaxin 3, SNAP 23 und Cellubrevin (VAMP 3) eingegangen wird. Schließlich erfolgt eine Zusammenfassung des bisherigen Kenntnisstands der SNARE-Proteine in gastrointestinalen und hepatopankreatischen Geweben mit dem Schwerpunkt neuroendokriner Zellen und Tumoren. Abschliessend wird die Erläuterung der Ziesetzung dieser Arbeit vorgenommen.

1.1 Membranfusion

Zellbiologie und biochemisch-medizinische Grundlagenforschung haben sich seit Jahrzehnten der Erforschung molekularer Strukturen der Zelle und ihrer Organellen zugewandt. Diese Erkenntnisse bilden die Grundlage für das heutige Verständnis subzellulärer Strukturen und ihrer physiologischen Funktion. Membranfusion ist ein fundamentaler zellbiologischer Ablauf. Sie ist die Voraussetzung für intrazelluläre Transportvorgänge, Membranbiogenese und alle Sekretionsabläufe [Jahn & Südhof (1999)]. Biomoleküle können in membranumschlossenen Kompartimenten, sog. Vesikeln oder Granula [Bauerfeind et al. (1996), Rothman & Wieland (1996)] zu unterschiedlichen intrazellulären Organellen oder zur Zellmembran transportiert werden, ohne daß diese ihre Identität verlieren [Scales et al. (2000)]. Die Vesikel werden von einem Donorkompartiment durch Knospung gebildet und gelangen über verschiedene Transportmechanismen innerhalb der Zelle zu ihren Zielorganellen, um mit der entsprechenden Zielmembran zu fusionieren [Jahn et al. (2003)]. Eukaryonten (z.B. Hefen, Säugetiere) und Prokaryonten (z.B. Bakterien) teilen einen gemeinsamen phylogenetisch hoch konservierten Apparat des intrazellulären Proteintransports und der Membranfusion [Ferro-Novick & Jahn (1994), Gerst JE (1999), Bonifacino & Glick (2004)].

1.2 SNARE (SNAP-Rezeptor)-Proteine

Die von Rothman 1994 aufgestellte sog. *SNARE-Hypothese* basierte initial auf Erkenntnissen der Neuroexozytose [Rothman JE (1994)]. Ausgehend von der Charakterisierung der Proteine des vesikulären Apparates an der präterminalen synaptischen Membran [Bauerfeind et al. (1996)] entwickelte sich die Vorstellung, daß die neuronale Exozytose durch spezielle Membranfusionsproteine, die *SNARE-Proteine* (*SNAP-Rezeptorproteine*) [Rothman JE (1994), Südhof TC (1995)], vermittelt wird. Der Vorgang der Neuroexozytose wird durch

Komplexbildung eines *vesikel-assoziierten Membranproteins*, des sog. *v-SNARE* und mindestens zwei entsprechender *Zielfolienproteine*, den sog. *t-(target membrane) SNAREs* eingeleitet [Söllner et al. (1993 a, b), Rothman et Warren (1994), Weber et al. (1998), Ludger et Galli (1998), Scales et al. (2001), Jahn et al. (2003)]. Bei den initial als *neuronal* SNAREs definierten Proteinen handelte es sich um **Syntaxin 1, VAMP 2 und SNAP 25** [Trimble et al. (1988), Oyler et al. (1989), Bennett et al. (1992)]. Im weiteren Verlauf stellte sich heraus, daß das Vorkommen der SNAREs nicht nur auf neuronale Transportprozesse beschränkt ist, sondern nahezu allen *nonneuronalen* Membranfusions- und Sekretionsvorgängen sowie inter- und intrazellulären Membrantransporten zu Grunde liegt [Rothman & Warren (1994), Rothman & Wieland (1996), Galli & Haucke (2004)]. Nonneuronalen Zellen enthalten Homologe der neuronalen SNARE-Proteine [Jahn et al. (2003)]. Die t-SNARE-Fusionsproteine gliedern sich in zwei SNARE-Familien: *Syntaxine* und *SNAP-Proteine (synaptosomal associated proteins)*, während die v-SNAREs aus den *VAMP-Proteinen (vesicle associated membrane proteins)* -auch *Synaptobrevine* genannt- bestehen. Kürzlich gewonnene Erkenntnisse widerlegen jedoch die strenge Unterteilung in v- und t-SNAREs und weisen nach, daß nahezu alle SNARE-Fusionsproteine sowohl an plasmamembranären als auch an vesikulär-zytosolischen Prozessen der Membranfusion beteiligt sein können [Kretschmar et al. (1996), Weimbs et al. (1997), Weber et al. (1998), Galli & Haucke (2004), Band & Kuismanen (2005)]. Eine neue, nach molekularen Eigenschaften entwickelte Terminologie, führt die Bezeichnung *Q-SNARE* (= Glutamin an zentraler Position) für Syntaxine und SNAP-Proteine und *R-SNARE* (= Arginin an zentraler Position) für VAMP-Proteine [Weimbs et al. (1997), Jahn & Südhof (1999)] ein. In dieser Arbeit werden jedoch die ursprünglichen, nach morphologischen Kriterien entwickelten Bezeichnungen v- und t-SNARE verwendet.

1.3 SNARE-Zyklus

Der *SNARE-Zyklus* beschreibt die grundlegenden Vorgänge, die zur Fusion zweier Lipidmembranen führen und *in vivo* eine Membranfusion einleiten können [Rothman (1994), Bock & Scheller (1999), Weber et al. (1998), Carr & Novick (2000)]. Nach Assoziation der entsprechenden *SNARE-Proteine* mit dem Ca^{2+} -Sensorprotein *Synaptotagmin* [Südhof TC (1995, 2004)] und unter Einbeziehung anderer im Zytoplasma vorkommender akzessorischer zytosolischer Proteine wie α , β , γ *SNAPs (soluble NSF attachment proteins)* [Clary et al. (1990)], *NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor)* [Bock et al. (1988)], *Sec1/Munc-Proteinen (SM-Proteine)* [Toonen und Verhage (2003)] und Snapin [Buxton et al. (2003)] wird der in Abb. 1 dargestellte *SNARE (SNAP-Rezeptor)-Komplex* gebildet [Chen & Scheller (2001)].

Diese auch als *core complex* [McMahon & Südhof (1995)] bezeichnete Proteininformation setzt sich nach heutigen Erkenntnissen mindestens aus zwei t-SNARE und einer v-SNARE Komponente zusammen, die eine Proteinstruktur aus vier α -Helices (siehe Abb. 2 A) bilden [Sutton et al. (1998), Fukuda et al. (2000)]. Das jeweilige SNAP-Protein nimmt mit zwei Helices an der Komplexformation teil [Sutton et al. (1998)]. Den initialen Membrankontakt scheint eine Rab-GTPase zu vermitteln [Ungermann & Langosch (2005)]. In sequentieller Reihenfolge [Chen et al. (2001)] wird über den *trans*-SNARE-Komplex in Anwesenheit des *Fusionstriggers Calcium* [Rettig & Neher (2002)] der stabile *cis*-SNARE-Komplex (siehe Abb. 2 B) und der Zustand der sog. *hemifusion* [Chernomordik & Kozlov (2005)] erreicht, der schließlich zur Membranfusion überleitet [Vogel et al. (2000), Jahn et al. (2003), Seong & Almers (2004), Sorensen JB (2005)]. Nach der Vesikelverschmelzung mit der Plasmamembran erfolgt die Exozytose des Vesikelinhalts [Bock & Scheller (1999), Chen & Scheller (2001)]. Die Dissoziation des Komplexes findet mittels der ATP-Hydrolyse durch NSF statt [Banerjee et al. (1996), Puri et al. (2003)]. Stehen entsprechende Fusionsproteine, Fusionstrigger und Energieträger bereit, kann der SNARE-Zyklus wiederholt auftreten [Söllner et al. (1993 a)].

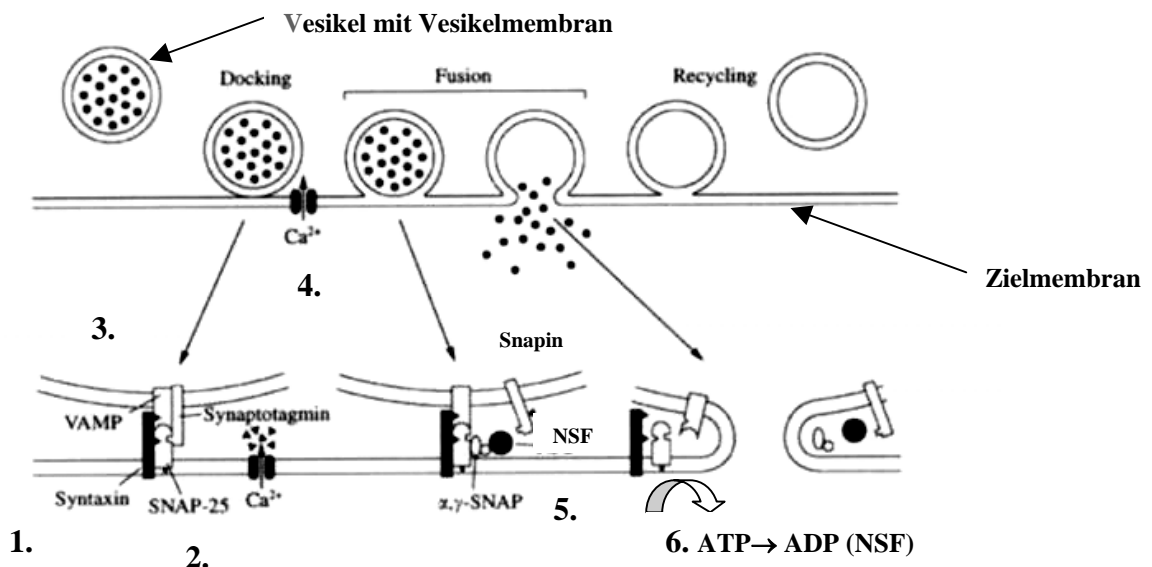
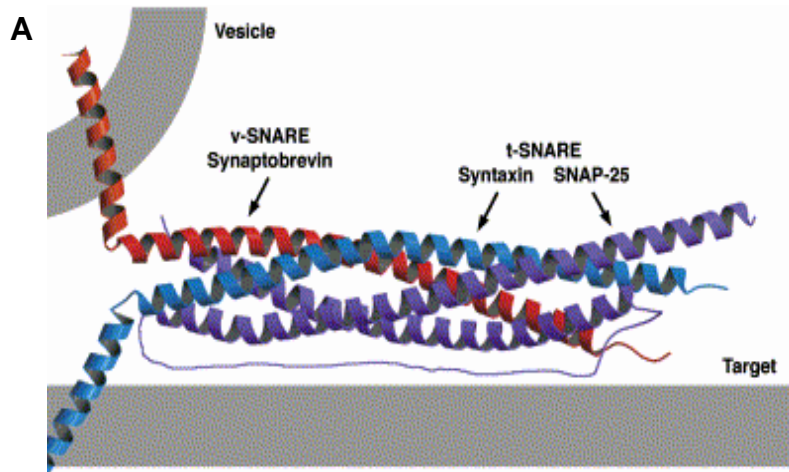


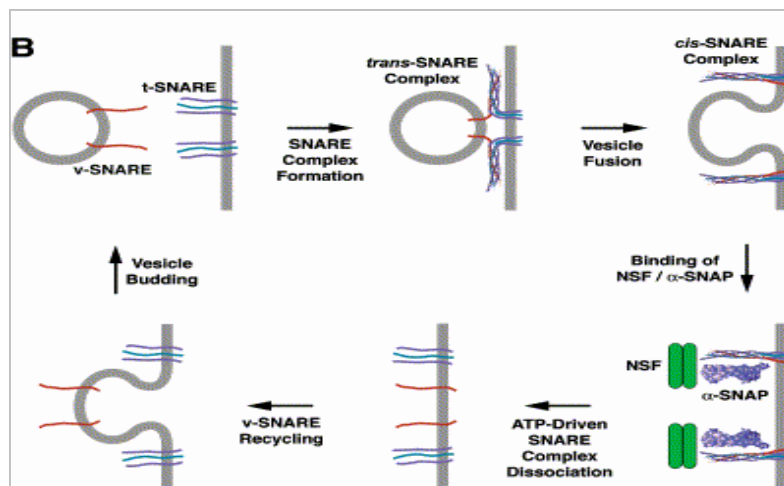
Abb. 1: Vesikeldocking und -fusion im SNARE-Zyklus. [modifiziert nach Shukla et al. (2001)]

Erläuterung der Bestandteile des Membranfusionskomplexes aus Abb. 1:

1. *t*-SNARE der *Syntaxinfamilie* auf der Zielmembran (*target membrane*)
2. *t*-SNARE der *SNAP-Proteinfamilie* auf der Zielmembran (*target membrane*)
3. *v*-SNARE der *VAMPs (Synaptobrevine)* auf der Vesikelmembran
4. **Calcium** (Ca^{2+}) als initiale Triggersubstanz des Fusionsvorgangs
5. *NSF* und α , β , γ -*SNAPs* und *Snapin* als akzessorische Komponenten
6. *ATP* als Energieträger der Membranfusion

**Abb. 2 A:**

Schematische Darstellung der kristalloiden Struktur eines SNARE-Komplexes bestehend aus vier Helices: zwei α -helical gewundenen SNAP-25 Proteinen und jeweils einer coil-coil-Domäne des t-SNARE Syntaxin und v-SNARE Synaptobrevin.
[nach Sutton et al. (1998)]

**Abb. 2 B:**

Sequentielle Formation eines SNARE-Fusionskomplexes.
[nach Sutton et al. (1998)]

Für funktionelle laborchemische Untersuchungen ist die Tatsache von Bedeutung, daß SNARE-Proteine als Substrate für die selektive Inaktivierung durch die Clostridiumtoxine Tetanustoxin (TeTx) [Link et al. (1993), Galli et al. (1994)] und Botulinumtoxin (BoTx) [Schiavo et al. (1995)] dienen und die SNARE-Interaktion dadurch unterbunden werden kann [Hayashi et al. (1994)].

Die vorausgehend erläuterte SNARE-Hypothese macht deutlich, daß das korrekte Zusammenkommen einzelner SNAREs in Assoziation mit den genannten Kofaktoren (s. o.) die Spezifität jedes Docking-Fusionsprozesses determiniert und dadurch die Integrität der Membrankompartimente gewahrt wird [Söllner et al. (1993 a), Calakos et al. (1994), Scales et al. (2000)]. Der beschriebene SNARE-Mechanismus gilt somit für eine Vielzahl an Zellen mit endokriner oder exokriner Aktivität. Der sog. *SNARE-Zyklus* [Jahn et al. (2003)] stellt den fundamentalen zellbiologischen Mechanismus der Fusion von Phospholipidmembranen [Bock & Scheller (1999)] dar, über den fortwährend neue strukturelle Erkenntnisse gewonnen werden und der sich zu einem Dogma der Zellbiologie entwickelt hat [Galli & Haucke (2004)].

1.4 Vesikelzyklus

Vesikuläre Fusionsprozesse sind Grundlage der subzellulären Proteinverteilung, des sog. *protein-sortings* innerhalb der zellulären Kompartimente sowie der endo- und exokrinen Sekretion [Calakos et al. (1994), Chen et al. (2001), Bonifacino & Glick (2004)]. Wie Abb. 3 veranschaulicht, beginnt die chronologische Abfolge des Vesikelzyklus [Bauerfeind et al. (1996), Südhof TC (1995, 2004)] mit der Synthese am *endoplasmatischen Retikulum (ER)*, setzt sich über die Vesikelreifung am *Golgi-Apparat* über das *Trans-Golgi-Netzwerk (TGN)* fort und führt bis zur Transmitterfreisetzung an der *apikalen* oder *basolateralen Domäne* (siehe Kap. 1.5) der Plasmamembran [Calakos & Scheller 1996]. Durch den Vorgang der *Endozytose* erfolgt die Internalisierung der Plasmamembran in Form der *Endosomen* und die damit verbundene konstitutive Regeneration der Vesikelmembran [Grote & Kelley (1996)].

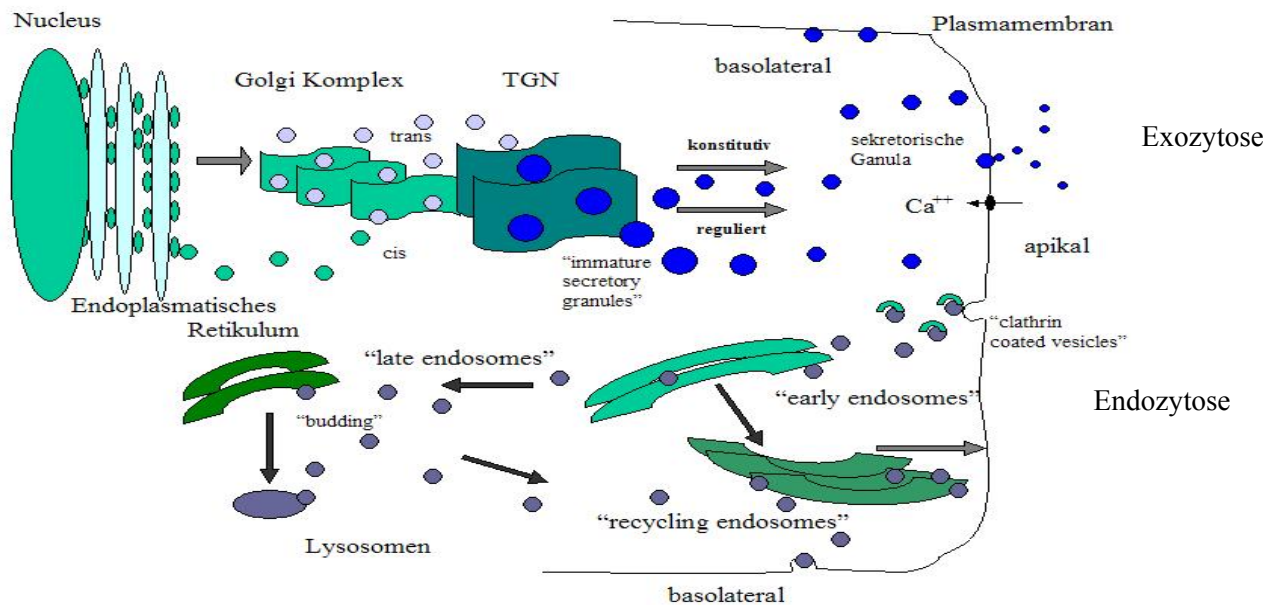


Abb. 3: Schematische Darstellung der intrazellulären Transportrouten von Vesikeln. [eigene Grafik]

1.5 Polarität der Zelle

Eine wichtige Grundlage des gerichteten intrazellulären Membrantransports bildet die sog. *Polarität* der Zelle. Diese entsteht durch die Unterteilung der Zelle in eine *apikale (luminale)* und *basolaterale Domäne* der Plasmamembran (PM) [Ikonen et al. (1995), Low et al. (1996, 1998, 2000, 2006), Steegmaier et al. (2000)]. Der Enterozyt als Epithelzelle des Gastrointestinaltrakts gilt beispielsweise als Prototyp polarisierter Zellen [Galli et al. (1998), Riento et al. (1998), Fujita et al. (1998)]. Demgegenüber existieren auch *nicht-polarisierte Zelltypen* wie beispielsweise Mastzellen, Makrophagen, Bindegewebszellen und Thrombozyten [Yeaman et al. (1999)]. Die Aufteilung in zwei Domänen geht mit einer gezielten intrazellulären

Anordnung von v-SNAREs und t-SNAREs an apikaler und basolateraler Plasmamembran einher [Weimbs et al. (1997), Delgrossi et al. (1997), Lafont et al. (1999)]. Somit bedingt die zelltypspezifische subzelluläre Formierung von SNAREs die Erfüllung unterschiedlichster funktioneller Aufgaben [Yeaman et al. (1999), Zahouri et al. (2000), Kasai & Akagawa (2001), ter Beest et al. (2005)]. Wie in Abb. 4 graphisch dargestellt und in den entsprechenden Kapiteln erläutert, weisen auch die in dieser Arbeit näher untersuchten SNARE-Proteine *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* eine spezifische subzelluläre Lokalisation auf [Zahouri et al. (2000), Low et al. (2006)].

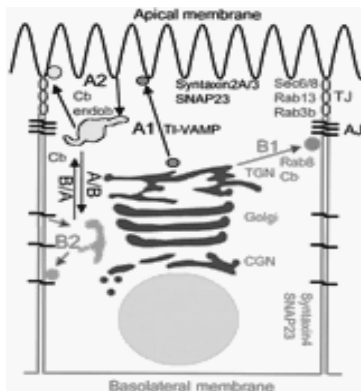


Abb. 4: Verteilung von SNARE-Proteinen im Sekretionsapparat der polarisierten Zelle. [Schema nach Zahouri et al. (2000)]:

- **Syntaxin 3:** vorwiegend an apikaler, selten an basolateraler PM, zudem intrazellulär lokalisiert
- **SNAP 23:** an apikaler, basolateraler PM und intrazellulär lokalisiert
- **Cellubrevin:** intrazellulär, apikal in Endosomen und im TGN lokalisiert

1.6 Regulierter und konstitutiver Membrantransport

Exozytose ist die Fusion synaptischer Vesikel und sekretorischer Granula mit der Plasmamembran. Sie ist das gemeinsame Prinzip aller sezernierenden Zellen [Burgoyne & Morgan (1993)]. Sie kann letztlich durch drei unterschiedliche Mechanismen der Membranfusion erfolgen und wird durch SNARE-Proteine vermittelt [Steggmaier et al. (2000)]:

1. Die *regulierte* Exozytose verläuft *Stimulus-gekoppelt*. Beispielsweise kann hier die Ca^{2+} -induzierte Neurotransmitterausschüttung an der terminalen Nervenendung oder auch die Exozytose der *SSV* (*synaptic-like vesicles*)-*Analoge* (= *SLMV*) in neuroendokrinen Zellen angeführt werden.
2. Die *nicht-Stimulus-gekoppelte konstitutive* Endo- und Exozytose hingegen ist ein basaler Mechanismus im Membranzyklus aller Zellen [Grote & Kelly (1996)]. Konstitutive sekretorische Vesikel sind beispielsweise die Endosomen im Zyklus des Membranrecyclings oder Transportvesikel, welche kontinuierlich aus dem TGN ausknospen.
3. Als *Transzytose* wird die apikale Sekretion von Endosomen bezeichnet, z.B. die Transzytose von IgA in die Gallengänge.
4. Die sog. *Compound Exozytose* [Alvarez de Toledo & Fernandez (1990)] ist die Stimulus-vermittelte *Granula-Granula-Fusion* vor der Exozytose an der Plasmamembran. Sie

wurde zunächst als mastzellspezifisch definiert, wird aber in einer Vielzahl sezernierender Zellen wie Azinus- und B-Zellen vorgefunden [Huang et al. (2002), Pickett & Edwardson (2006)].

Als *heterotypic fusion* wird die Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran, als *homotypic fusion* die Verschmelzung von Vesikeln untereinander vor dem finalen Sekretionsprozess bezeichnet.

1.7 Die SNARE-Proteine Syntaxin 3, SNAP 23 und Cellubrevin

Wie bereits dargestellt, formiert sich der SNARE-Membranfusionskomplex (siehe Abb. 1, 2) aus den drei Komponenten der SNARE-Proteinfamilien [Söllner et al. (1993 a, b)]:

1. *Syntaxine*
2. *SNAP-Proteine*
3. *Vesikel-assoziierten Membranproteine (VAMP)*

Diese SNAREs besitzen aufgrund ihrer multiplen Subtypen die Eigenschaft in unterschiedlichen Konstellationen miteinander spezifisch zu interagieren [Galli et al. (1998), Imai et al. (2003)], wie in den folgenden Abschnitten erläutert wird. Dennoch ist hervorzuheben, daß SNAREs sich teilweise untereinander auf *funktioneller Ebene ersetzen* und zugleich an multiplen Reaktionen beteiligt sein können [Borisovska et al. (2005)]. Die nachfolgende Abb. 5 veranschaulicht schematisch die bislang erforschte Vielzahl der Vesikel- und SNARE-Fusionsproteine [Südhof TC (2004)].

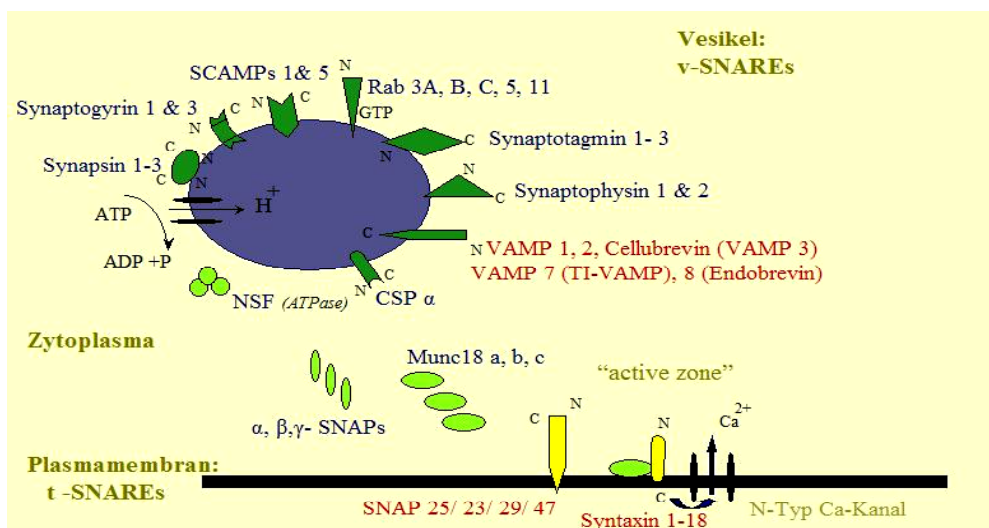


Abb. 5: Schematische Darstellung häufiger Vesikel- und SNARE-Proteine. [eigene Grafik]

Nachfolgend werden die SNARE-Familien näher erläutert und es wird im Speziellen auf die drei Fusionsproteine *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin (VAMP 3)* eingegangen, die Gegenstand der hier vorgestellten Untersuchungen waren.

1.7.1 Syntaxine und Syntaxin 3

Die von *Bennett et al.* 1992 erstmalig beschriebenen *Syntaxine* sind membrangebundene t-SNAREs. Sie gehen während der Bildung des SNARE-Fusionskomplexes eine transiente Bindung mit den zytoplasmatischen Komponenten NSF und α , β , γ -SNAP ein (siehe Kap. 1.3). In der Ausbildung des SNARE-Komplexes nehmen die Syntaxine durch Konformationsänderungen im Prozeß der Membranfusion eine zentrale Position ein [Carr & Novick (2000)]. Die in der Proteintertiärstruktur spiralig gewundene α -helikale Domäne vermittelt Proteininteraktionen, das N-terminale Ende dient als Regulator der SNARE-SNARE-Interaktion und der Bindung akzessorischer Proteine [Fukuda et al. (2000)]. Am hydrophoben, carboxyterminalen Ende sind sie mit der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran verankert und hier mit Synaptotagmin und dem spannungsabhängigen N-Typ Ca^{2+} -Kanal verbunden [Rettig & Neher (2002)]. Bisher sind 18 Mitglieder der Syntaxinfamilie identifiziert und charakterisiert worden [Advani et al. (1998), Teng et al. (2001)]. Die erste Isoform der Syntaxinfamilie, Syntaxin 1, wurde als Komponente der präsynaptischen Plasmamembran in Neuronen identifiziert [Bennett et al. (1992), Söllner et al. (1993 b)].

Das von *Bennett et al.* 1993 beschriebene *Syntaxin 3* ist eines der drei zentralen SNARE-Proteine der vorliegenden Untersuchungen. Es handelt sich um ein membranverankertes Typ IV-Membranprotein, das sich mit einem Molekulargewicht von 35 kD aus etwa 300 Aminosäuren zusammensetzt [Bennett et al. (1993), Ibaraki et al. (1995)]. Die Gewebsexpression für *Syntaxin 3* ist breiter als die des lediglich in neuronalen Geweben enthaltenen Syntaxin 1, jedoch restriktiver als beispielsweise die der nahezu ubiquitär vorkommenden Syntaxine 2 und 5 [Advani et al. (1998)]. So wurde es bereits in Einzelbefunden an neuroendokrinen und epithelialen Zellen des Gastrointestinaltraks vorbeschrieben [Referenzen siehe Tab. 2]. Darüber hinaus ist seine Gewebsexpression z. B. in Myokard, Lunge, Milz, Niere [Bennett et al. (1993), Mandon et al. (1997)] vorliegend. Die subzelluläre Verteilung von *Syntaxin 3* wird

- trotz seiner ursprünglichen Charakterisierung als t-SNARE - nicht nur plasmamembranär, sondern ebenso anteilig intrazellulär in der vesikulär-endomembranären Fraktion vorgefunden [Wheeler et al. (1996), Hansen et al. (1999), Puri et al. (2003), Band & Kuismanen (2005)].

Syntaxin 3 scheint typischerweise in polarisierten Epithelzellen in der apikalen Domäne angeordnet zu sein [Low et al. (2000), Sharma et al. (2006), siehe Abb. 4] und ist dort im Stande einen SNARE-Komplex mit *Cellubrevin* und *SNAP 23* auszubilden [Gaisano et al. (1996 a), Galli et al. (1998)]. Es übernimmt den Proteintransport vom TGN zur apikalen Membran [ter Beest et al. (2005)].

Ebenso wird *Syntaxin 3* im basolateralen Kompartiment polarisierter Zellen vorgefunden [Low et al. (1996, 1998), siehe Abb. 4].

1.7.2 SNAP-Proteine und SNAP 23

Die *SNAP-Familie* (*synaptosomal associated proteins*) setzt sich nach derzeitigen Erkenntnissen aus den Isoformen *SNAP 23*, *25* und *29* und dem erst kürzlich charakterisierten *SNAP 47* zusammen [Ravichandran et al. (1996), Shukla et al. (2001), Su et al. (2001), Holt et al. (2006)]. Neben den Syntaxinen stellen sie ebenfalls ursprünglich zielfembrangebundene t-SNAREs dar. Anstatt einer transmembranären Domäne verfügen sie über Palmitoylgruppen zur Membranbindung, die an den zentralen Cysteinformationen fixiert sind [Veit et al. (2000)]. *SNAP 25* wurde als erstes SNAP-Protein ausschließlich in Neuronen und endokrinen Zellen charakterisiert [Oyler et al. (1989)].

Das Fusionsprotein *SNAP 23*, welches Gegenstand dieser Arbeit ist, wurde initial von *Ravichandran et al.* 1996 in B-Lymphozyten identifiziert und verfügt über ein Molekulargewicht von 23 kD [Ravichandran et al. (1996), Shukla et al. (2001)]. Es stellt im Gegensatz zum erstbeschriebenen *SNAP 25* eine ubiquitär anzutreffende Isoform dar. Sein Vorkommen wurde bislang in der regulierten Exozytose einer Vielzahl von Zellen unterschiedlicher Differenzierung beschrieben [Referenzen siehe Tab. 2]: unter anderem in gastrointestinalen und hepatopankreatischen Epithelzellen, neuroendokrinen Zellen und Mastzellen bis hin zu Fibroblasten [Faigle et al. (2000)] und Gliazellen [Hepp et al. (1999)]. Als potenzielle Bindungspartner für *SNAP 23* im SNARE-Komplex fungieren unter anderem die *Syntaxine 1*, *2*, *3* und *4* sowie *VAMP 1*, *2* und *Cellubrevin (VAMP 3)* [Ravichandran et al. (1996), Galli et al. (1998)]. Wie aus Abb. 4 ersichtlich wird, findet sich die subzelluläre Lokalisation von *SNAP 23* in der apikalen und in der basolateralen Domäne der Plasmamembran [Low et al. (1998)] um dort an regulierten Membrantransportvorgängen zu interagieren. Darüber hinaus kommt es in geringen Anteilen auch intrazellulär im endosomalen und lysosomalen Kompartiment polarisierter Epithelzellen [Leung et al. (1998), Chen & Whiteheart (1999 b), Rao et al. (2004)] vor, wo es zudem in Vorgänge der konstitutiven Exozytose einbezogen sein kann.

1.7.3 VAMP-Proteine und Cellubrevin (VAMP 3)

Die *VAMP-Proteine* (*vesicle-associated membrane proteins*), die auch als *Synaptobrevine* bezeichnet werden, sind niedermolekulare 18 kD-Proteine, deren Primärstruktur sich jeweils aus etwa 120 Aminosäuren zusammensetzt [McMahon et al. (1993)]. Es handelt sich um transmembranäre Typ II-Membranproteine, die mit ihrem hydrophoben Ende in der Plasma-

bzw. Vesikelmembran verankert sind und zwischen Donorkompartiment und Zielmembran zirkulieren. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind folgende VAMP-Isoformen identifiziert worden: *VAMP 1, 2, 3, 7 (TI-VAMP)* und *VAMP 8 (Endobrevin)* [McMahon et al. (1993), Rossetto et al. (1996), Wong et al. (1998) Advani et al. (1998)]. VAMPs weisen eine breite Gewebsverteilung auf und nehmen in sekretorischen und nicht-sekretorischen Zellen an endosomalen Transportvorgängen teil [Söllner et al. (1993)]. *VAMP 2* wurde zuerst als Komponente der synaptischen Vesikelmembran neuronaler und neuroendokriner Zellen identifiziert [Trimble et al. (1988)] und ist vor allem Bestandteil neuronaler Gewebe [Südhof TC (1995), Chilcote et al. (1995)]. Im weiteren Verlauf wurde *VAMP 3 (Cellubrevin)* als homologes SNARE-Protein in *nonneuronalen* Geweben charakterisiert [McMahon et al (1993), Rossetto et al. (1996)].

Zielsetzung dieser Arbeit ist es, insbesondere die *humane* Gewebs- und Zellexpression von ***VAMP 3***, das auch als ***Cellubrevin*** bezeichnet wird, näher zu untersuchen. Das 1993 von *McMahon et al.* beschriebene integrale Membranprotein *Cellubrevin* unterscheidet sich von den Synaptobrevinen *VAMP 1* und *2* durch ein kürzeres, dem Zytoplasma zugewandtes aminotermiales Ende und sein niedrigeres Molekulargewicht von nur 14 kD. Es handelt sich um ein endogenes Vesikelprotein, welches eine breite Gewebsverteilung aufweist [McMahon et al. (1993)]. *Cellubrevin* agiert als v-SNARE in Membranfusionsprozessen mit multiplen Bindungspartnern der t-SNAREs: z. B. *Syntaxin 2, 3, 4, SNAP 25* und *23* [Galli et al. (1998)]. Unter anderem ist sein Vorkommen im SNARE-Komplex von Neuronen [Jurgius et al. (1996)], auf synaptischen Vesikeln und Granula neuroendokriner Zellen [Höhne-Zell et al. (1994), Chilcote et al. (1995)] sowie in multiplen hepatopankreatischen und gastrointestinalen Zellen [Referenzen siehe Tab. 2] bis hin zu den sekretorischen α -Granula der Thrombozyten [Feng et al. (2002)] charakterisiert worden. Subzellulär kommt *Cellubrevin* hauptsächlich auf intrazellulären Vesikel- und Granulamembranen vor [McMahon et al. (1993), siehe Abb. 4]. Da ihm vor allem eine Aufgabe im Vesikelrecycling und Stoffwechselweg der Endozytose zukommt, ist es insbesondere in der apikalen sowie in der basolateralen endosomalen Fraktion [Steggmaier et al. (2000)] aber auch in der Region des Golgi-Apparates und des Endoplasmatischen Retikulums anzutreffen [Galli et al. (1994), Daro et al. (1996), Mallard et al. (2002)]. Es kann durch funktionelle Stimulation z. B. im Rahmen der Insulinsekretion von intrazellulären Kompartimenten auf die Plasmamembran verlagert werden [Omatsu-Kanbe et al. (1997)]. Tierexperimentell wiesen erste Untersuchungen *Cellubrevin*-defizienter Knockoutmäuse keine wesentlichen biologischen Veränderungen der Glukosehomöostase und der intrazellulären Membrantransportprozesse auf [Yang et al (2001)].

1.8.1 Neuroendokrine Zellen (NEZ) und deren Sekretionsapparat

Zwischen einer Nervenzelle und dem sekretorischen Apparat einer sogenannten *neuroendokrinen Zelle (NEZ)* bestehen viele phänotypische Gemeinsamkeiten: beide vermögen durch regulierte Sekretion Neuropeptide, Neurotransmitter, biogene Amine und Hormone in neurosekretorischen Vesikeln und Granula zu speichern und freizusetzen [Ahnert-Hilger et al. (1993), Thomas-Reetz & de Camilli (1994)]. Potenzielle Sekretionsprodukte sind unter anderem Substanzen wie Serotonin, Histamin, Dopamin, Substanz P, Neurotensin und Prostaglandine. Die funktionelle Einheit der NEZ wird auch unter dem Begriff *APUD-System (amine precursor uptake and decarboxylation)* [Pearse AGE (1974)] zusammengefasst. Es gilt mittlerweile als etablierte Erkenntnis, daß neuroendokrine Zellen neuroendokrin-differenzierte endodermale epitheliale Zellen darstellen. Deren postulierte Abstammung aus der Neuralleiste wurde widerlegt [Le Douarin (1995), Andrew et al. (1998)]. Bei lichtmikroskopischer Betrachtung fallen diese sog. *hellen Zellen* durch ein helles Zytoplasma auf. Ultrastrukturell finden sich in typischen neuroendokrinen Zellen zwei Vesikeltypen (siehe Abb 6 a).

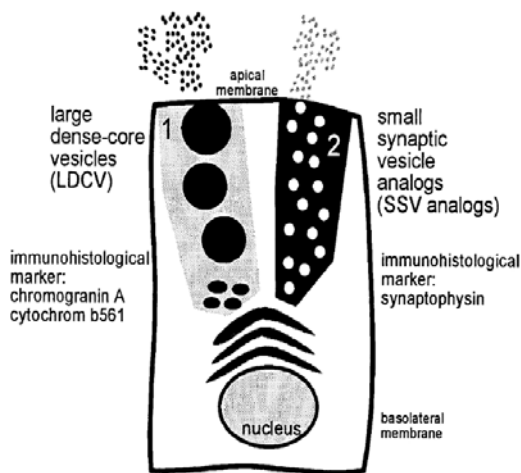


Abb. 6 a:
Die zwei Vesikeltypen -LDCV und SLMV- in neurosekretorischen Zellen.
[Graphik nach Wiedenmann et al. (1998)]

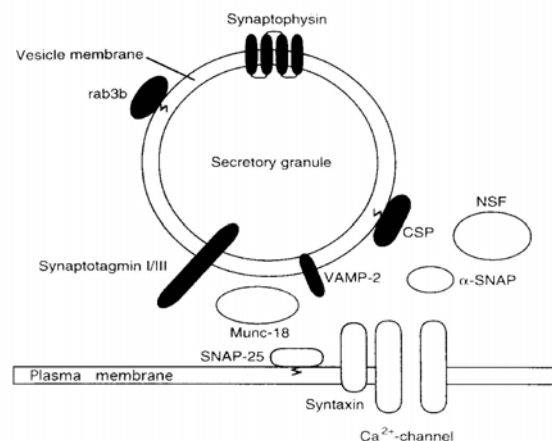


Abb. 6 b:
Verteilung von SNARE-Proteinen auf neurosekretorischen Vesikeln.
[Graphik nach Jacobsson & Meister (1996)]

Einerseits große, membranumgebene Granula mit einem Durchmesser von 80 - 400 nm, die sog. *large dense core vesicles (LDCV)*, welche vorwiegend regulatorische Peptide, Neuropeptide oder Hormone enthalten und sich immunhistochemisch durch das granuläre Matrixprotein Chromogranin A (Cg A) auszeichnen [Moorghen & Carpenter (1991)]. Andererseits kommen kleine, 40- 80 nm große, helle Vesikel, die sog. *synaptic-vesicle-like-microvesicles (SLMV)* als Analoga der neuronalen *small synaptic vesicles (SSV)* zur Darstellung. Sie enthalten keine Proteinmatrix, sezernieren aber niedermolekulare Neurotransmitter wie z. B. Glutamat, Glycin,

GABA und biogene Amine und werden immunhistochemisch durch Synaptophysin (Sy 38), ein integrales Membranprotein der Vesikelmembran, gekennzeichnet [Wiedenmann et al. (1998 a)]. Die Biosynthese von LDCV im Zellzyklus ist analog zu der der SLMV. Beide weisen daher eine ähnliche Zusammensetzung der Vesikel- und Granula-umgebenden Membranproteine (z. B. Synaptotagmin, Synaptophysin und SNARE-Proteine) auf (siehe Abb. 6 b), wenngleich deren Konzentration in LDCV meist geringer ist [Ahnert-Hilger et al. (1996), Winkler H (1997), Schmitt-Gräff et al. (2001)]. Nach bisherigen Erkenntnissen werden die Sekretionsprodukte endokriner und neuroendokriner Zellen, wie Untersuchungen an etablierten Zellmodellen der Betazelllinien, ECL- und PC-12 Zellen *in vitro* belegten, durch SNARE-vermittelte Membranfusion freigesetzt [Zhao et al. (1997), Kang et al. (2002), An & Almers (2004)].

1.8.2 Gastroentero-pankreatisches endokrines System (GEP)

Die vier Epithelzellpopulationen der intestinalen Mukosa gliedern sich in *Enterozyten, schleimproduzierende Becherzellen, Panethsche Körnerzellen und enteroendokrine Zellen* [Brittan & Wright (2004)]. Sie differenzieren sich durch komplexe Genexpressionsmuster aus einer gemeinsamen pluripotenten Stammzelle, der sog. Progenitorzelle [Ponder et al. (1985), Gordon et al. (1993)]. Ihre Regeneration und Differenzierung geschieht - abhängig von lokoregionären Einflüssen im Rahmen der Stammzellplastizität - kontinuierlich aus dem mittleren und basalen Anteil der Drüsen, den sog. Glandulae intestinales, heraus [Brittan & Wright (2004)].

Das speziesübergreifende sog. *enteroendokrine System* oder *diffuse endokrine System (DES)* setzt sich aus heterogenen Subpopulationen neuroendokriner Zellen zusammen [Rindi et al. (2004)], die in der Regel einzeln oder in kleinen Gruppen vorkommen und mit dem Darmlumen in Verbindung stehen (offener Typ) oder alternativ der Basalmembran aufsitzen (geschlossener Typ). Diese *basalgekörnten Zellen* weisen eine basale Anreicherung von Sekretgranula auf, deren Inhalt sie stets basal an benachbarte Gefäße oder Gewebe abgeben (sog. *endokrine* oder *parakrine* Sekretion) [Freyrter F (1953)]. Das humane enteroendokrine System besteht aus 14 endokrin aktiven Zelltypen, die aufgrund morphologischer Kriterien, lokoregionär spezifischer Expression sekretorischer Produkte (siehe Abb. 7 und Tab. 1) und dem Vorhandensein verschiedener Markermoleküle differenziert werden [Solcia et al. (1998), Rindi et al. (2004)]. Das DES repräsentiert anteilig etwa 1% der ausdifferenzierten gastrointestinalen Epithelzellen, stellt das größte endokrine System des Körpers dar und kann sich an physiologische Veränderungen adaptieren (z. B. Hypergastrinämie → ECL-Zellhyperplasie) [Prinz et al. (1993)]. Zusammen mit den endokrinen Zellen des Magens und den Langerhansschen Inseln des

Pankreas stellen sie das *gastroentero-pankreatische endokrine System (GEP)* [Höcker & Wiedenmann (1998)] dar. In Tab. 1 sind die wichtigsten NEZ des Gastrointestinaltrakts in einer Übersicht aufgeführt. Als gemeinsames Kennzeichen weisen sie die für NEZ typischen pleomorphen sekretorischen Granula (LDCV) und synaptischen Vesikel (SLMV) auf (siehe Kap. 1.8.1), die über den SNARE-Mechanismus freigesetzt werden [Zanner et al. (2002)]. Zu ihrer Kennzeichnung werden die neuroendokrinen vesikulären Marker Chromogranin A und Synaptophysin eingesetzt [Wiedenmann et al. (1998 a)].

Die topographische Verteilung enteroendokriner Zellen weist entlang der sog. kraniokaudalen Achse (Duodenum → Kolon) wie auch entlang der Krypte-Villus-Achse (Kryptenbasis → Krypte apikal bzw. Villusspitze) regionale Unterschiede auf [Sjölund et al. (1983), Roth & Gordon (1990)].

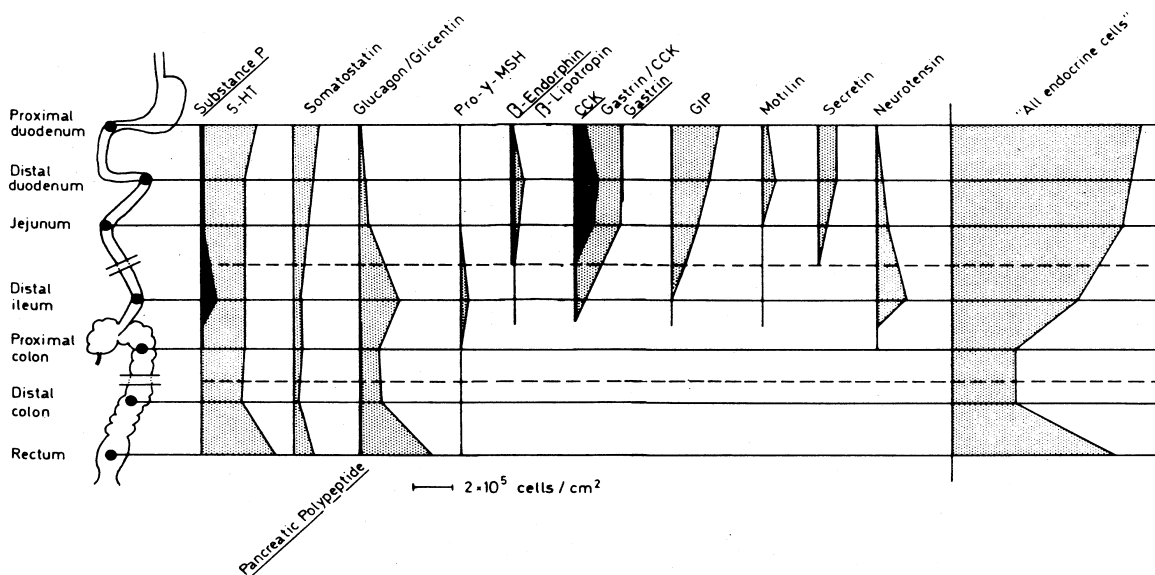


Abb. 7: Graphische Darstellung der Verteilung enteroendokriner Zellen in unterschiedlichen Bereichen des Gastrointestinaltraktes nach Sjölund et al. (1983).

Wie aus Abb. 7 ersichtlich wird, ist die Häufigkeitsverteilung mukosaler endokriner Zellen im Dünndarm am dichtesten, nächstfolgend die des Rektums [Höcker & Wiedenmann (1998), Solcia et al. (1998)]. *Serotonin*-produzierende *EC-Zellen* repräsentieren die *größte Population* enteroendokriner Zellen. Sie sind entlang der gesamten gastrointestinalen Achse mit variierender Häufigkeit vertreten [Wiedenmann (1998 b), Roth et al. (1990)]. So weisen sie ein zahlreiches Vorkommen im Duodenum, terminalen Ileum und Appendix auf. Im Kolon zeigen sie eine eher spärliche Verteilung, wogegen ihre Quantität im Rektum wieder deutlich zunimmt. Somatostatin-sezernierende D-Zellen ebenso wie GLI/PYY-haltige Zellen weisen eine gleichmäßige Verteilung in allen Abschnitten des Intestinums bis hin zum Kolon auf [Rindi et al. (2004)].

Tab. 1: Übersicht der wesentlichen Zellen des gastroentero-pankreatische endokrinen Systems. Modifiziert nach Solcia et al. (1998).

Nr.	Sekretionsprodukt	Zelltyp	Vorkommen
1.	Cholezystokinin	CCK-Zelle	proximaler Dünndarm, Ileum vereinzelt
2.	Gastrin	G-Zelle	Magenantrum, Duodenum
3.	Ghrelin	P/D1-Zelle	Magen, Dünndarm
4.	GIP/Xenin	GIP-Zelle	proximaler Dünndarm, Ileum vereinzelt
5.	Glukagon	A/(α)-Zelle	ca. 15 % der Inselzellen
6.	GLI/PYY	L-Zelle	distaler Dünndarm, Appendix, Kolon, Rektum („hindgut“)
7.	Histamin	ECL-Zelle	Magen (Korpus, Fundus)
8.	Insulin	B/(β)-Zelle	ca. 80 % der Inselzellen
9.	Motilin	M-Zelle	proximaler Dünndarm, Ileum vereinzelt
10.	Neurotensin	N-Zelle	distaler Dünndarm, Duodenum vereinzelt
11.	Pankreatisches Polypeptid	PP-Zelle	vereinzelt in Inselzellen
12.	Sekretin/Serotonin	S-Zelle	Duodenum, Jejunum (nur Villus)
13.	Serotonin	EC-Zelle	gesamtes Intestinum, prox. > dist. (v.a. Duodenum und Appendix)
14.	Somatostatin	D/(δ)-Zelle	ca. 5 - 7 % der Inselzellen, gesamtes Intestinum

Abkürzungen: ECL-Zelle: enterochromaffin-like cell, EC: enterochromaffin cell, GLI: glucagon-like Immunoreactants, PYY: PP-like peptide with N-terminal tyrosine amide, PP: pancreatic polypeptide, GIP: gastric inhibitory peptide

Demgegenüber unterliegen die Cholezystokinin-speichernden CCK-Zellen einem vom proximalen Duodenum zum Ileum in kраниokaudaler Richtung abnehmenden Gradienten. Sekretin-sezernierende Zellen sind wiederum lediglich auf der Villusspitze des Dünndarms zu finden [Roth KA (1992)]. Vorherrschende enteroendokrine Zelle des humanen Magenfundus ist die *histaminhaltige ECL-Zelle*, die etwa ein Drittel der gastralen endokrinen Zellen ausmacht, während im Antrum die gastrinproduzierenden G-Zellen prädominieren [Hakanson et al. (1994), Solcia et al. (1998)]. Neben Histamin enthält die ECL-Zelle Sekretionsprodukte wie Chromogranin A und Pankreastatin [Chen et al. (1998, 1999 a)], welche über den SNARE-Mechanismus sezerniert werden [Zhao et al. (1997), Zanner et al. (2002)]. Lediglich die ubiquitär vorhandenen D-Zellen sind in allen Magenabschnitten anzutreffen.

1.9 SNARE-Proteine in gastrointestinalen und hepatopankreatischen Geweben

Das Vorliegen der SNARE-Proteine in gastrointestinalen und hepatopankreatischen Geweben ist zur Zeit Gegenstand intensiver Forschung und Schwerpunkt dieser Arbeit.

Tabelle 2 stellt einen kursorischen Überblick über vorausgehende Publikationen - mit Schwerpunkt auf den Gastrointestinaltrakt - zusammen.

Tab. 2: Zusammenstellung: SNARE-Nachweis in diversen Zelltypen.

Zelltyp/ Gewebe:	Identifizierte SNAREs:	zentrale Referenzen:
• ZNS & Neuron	Syntaxin 1, 2, 3, 4, 7, 13 SNAP 23, 25, 47 VAMP 1, 2, 3, TI- VAMP, 4, 8	Bennett et al., Söllner et al. (1993), Calakos et al. (1994), Südhof/TC (1995), Bauerfeind et al (1996), Jurgius et al. (1996), Taubenblatt et al. (1999), Holt et al. (2006)
• A-Zelle (Glukagon)	ähnlich der β -Zelle ?	Omatsu-Kanbe et al. (1997)
• B-Zelle (Insulin)	Syntaxin 1A, 2, 3, 4, 5 SNAP 25 VAMP 2, 3 (Cellubrevin)	Jacobsson et al. (1994), Regazzi et al. (1995), Gaisano et al. (1994, 1995, 1999), Wheeler et al., Rossetto et al. (1996), Omatsu-Kanbe et al., Sadoul et al. (1997), Kang et al. (2002), Vikman et al. (2006)
• D-Zelle (Somatostatin)	Syntaxin 1 SNAP 25 VAMP 2	Jacobsson et al. (1994), Wheeler et al. (1996)
• Azinuszelle	Syntaxin 2, 3, 4 SNAP 23, 25 VAMP 1, 2, 3 (Cellubrevin)	Gaisano et al. (1996 a, b, 1997, 1999, 2000) Rossetto et al. (1996), Hansen et al. (1999)
• Hepatozyt	Syntaxin 2, 3, 4 VAMP 3 (Cellubrevin) SNAP 23	Fujita et al., Low et al. (1998), Chen & Whiteheart (1999) Calvo et al. (2000)
• Parietalzelle (Belegzelle)	Syntaxin 1, 2, 3, 4 SNAP 25 VAMP 1, 2	Peng et al. (1997), Jöns et al. (1999), Lehnhardt et al. (2000), Ammar et al. (2002), Karvar et al. (2005)
• ECL-Zelle	Syntaxin 1 VAMP 2 SNAP 25	Zaho et al. (1997), Hoehne-Zell et. al. (1997), Höcker et al. (1999), Zanner et al. (2002)
• Enterozyt	Syntaxin 3 Cellubrevin, TI-VAMP SNAP 23	Delgrossi et al. (1997), Galli et al., Low et al. (1998, 2000, 2006), Riento et al., Breuza et al. (2000), ter Beest et al. (2005), Saxena et al. (2006)
• neuroendokrine Zellen	Syntaxin 1, 3, 6, 13 SNAP 25 VAMP 1, 2, 3 (Cellubrevin), 4	Bennett et al. (1993), McMahon et al. (1993, 1995), Chilcote et al. (1995), Nemoz-Gaillard et al. (1998), Wendler et al. (2001), Ann & Almers (2004)
• neuroendokrine Tumore	Syntaxin 1 SNAP 25 VAMP 2	Ahnert-Hilger et. al. (1993, 1996) Schmitt-Gräff et al. (1997), Glassmeier et al. (1997)
• andere Epithelzellen	Syntaxin 1A, 2, 3, 4, 7 SNAP 23, 25 VAMP 2, 3, 8	Olsen et. al (1997), Ravichandran et al. (1996), Wang et al. (1997), Wong et al. (1998), Low et al. (1998, 2000, 2006), Steegmaier et al. (2000), Band & Kuismann (2005), Sharma et al. (2006)
• Mastzellen/ basophile Granulozyten	Syntaxin 2, 3, 4 VAMP 2, 3 (Cellubrevin), 7, 8 SNAP 23	Mollinedo & Lazo (1997), Guo et al., Baram et al. (1998), Paument et al., Hibi et al. (2000), Blank et al., Shukla et al. (2001), Pombo et al., Puri et al. (2003), Hepp et al. (2005)
• eosinophile Granulozyten	Syntaxin 3, 4 VAMP 2, 7, 8 SNAP 23, 25	Lacy et al. (1995), Hoffmann et al., Shukla et al. (2001), Logan et al. (2002, 2006)
• neutrophile Granulozyten	Syntaxin 4, 6 VAMP 2, 7, 8 SNAP 23	Brunell et al. (1995), Martín- Martín et al. (2000), Shukla et al. (2001), Mollinedo et al. (1997, 2003), Logan et al. (2006)
• Makrophagen	Syntaxin 2, 3, 4 VAMP 3 (Cellubrevin) SNAP 23	Hackam et al. (1996), Bajno et al., Shukla et al. (2000), Yang et al. (2001), Pagan et al. (2003)

So fungieren SNAREs etwa in Hepatozyten [Fujita et al. (1998)], Enterozyten [Delgrossi et al. (1997)], Parietalzellen des Magens [Peng et al. (1997)] sowie im endokrinen und exokrinen Pankreas [Gaisano et al. (1994, 1996 a, 1996 b, 1997)] als zentrale Proteine vesikulärer Fusionsvorgänge. Darüber hinaus weisen aber auch Organsysteme wie hämatopoetische Zellen [Hackam et al. (1998), Bernstein et al. (1999)], Adipozyten [Wang et al. (1997), Wong et al.

(1998)], Sammelrohrzellen der Niere [Mandon et al. (1997)], Fibroblasten [Faigle et al. (2000)], inflammatorisch aktive Zellen [Shukla et al. (2000)] sowie eine Vielzahl anderer Epithel- und Tumorzellen [Low et al. (1998)] eine spezifische Zusammensetzung an SNARE-Proteinen auf. Da die Datenlage zum Nachweis der vielfältigen SNARE-Proteine in *menschlichen* Geweben derzeit jedoch spärlich ist, ist deren Charakterisierung in *humanen Präparaten und Zelllinien* ein zentraler Punkt der vorgenommenen Untersuchungen. Es folgen nun spezifische Erläuterungen zu histologischen Befunden aus den Organsystemen *Leber, Pankreas, Magen, Dünn- und Dickdarm* [Schiebler & Schmidt (1999), Junqueira et al. (2002)]. Einhergehend wird insbesondere die organbezogene Expression der in dieser Dissertation untersuchten SNAREs *Syntaxin 3, SNAP 23* und *Cellubrevin* erläutert.

1.9.1 SNARE-Proteine im endokrinen und exokrinen Pankreas

Das Pankreasgewebe besteht aus *endokrinen und exokrinen* Anteilen [Schiebler & Schmidt (1999)], die sich aus duktalem Precursorzellen entwickeln [Teitelman G (1991)]. Die als *Langerhanssche Inseln* bezeichneten endokrinen Zellinseln machen ca. 2% des Pankreasvolumens aus [Gorelick & Jamieson (1994)] und setzen sich wiederum aus verschiedenen endokrinen Zellsystemen, den A-, B- und D-Zellen zusammen (siehe Tab. 1, 2), wovon die B-Zellen den größten Anteil einnehmen. Sie sezernieren u. a. die für die Glukosehomöostase essenziellen Verdauungshormone *Insulin* (B- bzw. β -Zellen, 80%), *Glukagon* (A- bzw. α -Zelle, 15%), *Somatostatin* (D- bzw. δ -Zellen, 5%) und *Pankreatisches Polypeptid* (PP-Zelle, vereinzelt) [Junqueira et al. (2002)]. Die Inselzellen unterliegen der SNARE-regulierten Sekretion von Vesikeln (SLMV) und Granula (LDCV) [siehe Kap. 1.8.1]. Insulin wird beispielsweise in den LDCV, das biogene Amin GABA in den SLMV der B-Zellen gespeichert [Gonelle-Gispert (1999)]. Den exokrinen Organbestandteil repräsentieren die sog. *Azinuszellen*, die Amylase-enthaltende *Zymogengranula* an der basolateralen und apikalen Plasmamembran durch Compound Exozytose sezernieren [Gaisano et al. (1999), Pickett & Edwardson (2006)]. Das exokrine und endokrine Pankreas enthalten - wie Tab. 2 niedergelegt - eine differenzierte Zusammensetzung an SNARE-Proteinen [Huang et al. 2002].

Die in vorausgehenden Arbeiten erhobenen Befunde der SNARE-Expression im *endokrinen* Pankreas zeigen, daß Syntaxine, SNAP- und VAMP-Proteine in Inselzellgeweben anzutreffen sind [Jacobsson et al. (1994)] und essenzielle funktionelle Aufgaben in der Insulinsekretion übernehmen [Vikman et al. (2006)]. *Syntaxin 3* wurde in insulinproduzierenden Inselzellen und β -Zelllinien der Ratte und Maus (HIT-T15, β -TC6-F7) prädominierend auf perinukleären intrazellulären Granula und in der Plasmamembran exprimiert [Wheeler et al. (1996), Kang et al.

(2002)]. In funktionellen Untersuchungen ist es befähigt, die Insulinsekretion zu inhibieren [Kang et al. (2002)]. *SNAP 23* nimmt in endokrinen HIT-Rattenzelllinien des Pankreas aktiv an der Insulinsekretion teil [Sadoul et al. (1997), Gonelle-Gispert (1999)]. *VAMP-Proteine* wie etwa *Cellubrevin* wurden intrazellulär auf den GABA-enhaltenden SLMV wie auch auf den Insulin-speichernden LDCV der B-Zellen der Ratte nachgewiesen [Gaisano et al. (1994, 1996 b), Regazzi et al. (1995)] und spielen nach bisherigen Erkenntnissen eine Rolle in der Ca^{2+} -abhängigen Insulinsekretion [Regazzi et al. (1995), Gaisano et al. (1999)]. In A- und D-Zellen des Pankreas konnte hingegen sein Nachweis nicht erbracht werden [Omatsu-Kanbe et al. (1997)]. Allerdings treten des öfteren methoden- und speziesabhängige Varianzen in der Analyse der dynamischen SNARE-Proteine in Geweben und Zelllinien auf, die am ehesten durch ihr heterogenes Expressionsmuster zu begründen sind [Weimbs et al. (2003)]: beispielsweise konnten *Jacobsson et al. (1994)* anhand der in-situ-Hybridisierungstechnik in Inselzellen der Maus *Cellubrevin*, jedoch nicht *Syntaxin 3* detektieren, welches in Betazellen mehrfach vorbeschrieben war.

In zentralen Untersuchungen des *exokrinen* Pankreas wurden *Syntaxin 3* und die VAMP-Proteine *VAMP 2* und *Cellubrevin* intrazellulär auf Zymogengranulamembranen vorgefunden [Gaisano et al. (1996 a, b, 1999), Hansen et al. (1999)]. Darüber hinaus wurde *Cellubrevin* in der Immunlokalisation in hohem Anteil in der Region des Golgi-Komplexes [Sengupta et al. (1997)] und auch in geringem Maße plasmamembranär [Gaisano et al. (1996 b)] in Azinuszellen nachgewiesen, wobei ihm möglicherweise eine Rolle in der Translokation der intrazellulären Granula zur Plasmamembran zuzuweisen ist. *SNAP 23* schien demgegenüber lediglich an der basolateralen Plasmamembran der Azinuszellen lokalisiert zu sein [Gaisano et al. (1997)]. Sekretionsassays an einer Rattenazinuszellkultur weisen auf die mögliche funktionelle Eigenschaft von *SNAP 23* hin, die Amylasesekretion zu inhibieren [Huang et al. (2001)].

Zusammenfassend werden sowohl *Syntaxin 3*, *SNAP 23* als auch *Cellubrevin* im endokrinen und exokrinen Pankreas der Spezies Ratte und am Zellmodell vorgefunden, wobei in den vorliegenden Publikationen anhand molekularbiologischer Methoden ein intrazelluläres, mitunter auch plasmamembranäres Expressionsmuster beschrieben wurde.

1.9.2 SNARE-Proteine in der Leber

Das Lebergewebe setzt sich aus den Leberparenchymzellen, den sog. *Hepatozyten* und drei weiteren Zelltypen zusammen, die mit den Leberzellkapillaren, den sog. Sinusoiden assoziiert sind: *Endothelzellen*, *Ito-Zellen* und *Kupffersche Sternzellen* [Schiebler & Schmidt (1999)]. In dieser Arbeit wird die SNARE-Expression in Hepatozyten und Kupffer-Zellen von besonderem

Interesse sein. Hepatozyten besitzen eine polarisierte Anordnung, die dem biosynthetischen Membrantransport, bestehend aus Endozytose, Transzytose und Recyclingvorgängen dient. Sie findet transzellulär gerichtet von der basalen (sinusoidalen) Plasmamembran ausgehend zu der den Gallekanälchen zugewandten apikalen Plasmamembran statt [Calvo et al. (2000)]. Die *Kupfferschen Sternzellen* [Crofton et al. (1978)] sind residente mononukleäre Makrophagen, die kontinuierlich aus dem zirkulierenden Monozytenpool des Blutes an die Sinusoide der Leber gebunden werden, in den Portalfeldern lokalisiert sind und einen Anteil von 15% des Leberparenchyms einnehmen [Hume & Doe (1988)]. Sie stellen die größte Population des *Mononukleären Phagozytose Systemes (MPS)* des Körpers dar.

In den *Hepatozyten* ist *Syntaxin 3* - neben *Syntaxin 2* und *4* - mit der apikalen und basolateralen Domäne der Plasmamembran assoziiert [Fujita et al. (1998)]. *SNAP 23* zeigt sich in der humanen Hepatozytenzelllinie HepG2 im apikalen und basolateralen Kompartiment der Plasmamembran sowie zugleich auch auf intrazellulär-endosomalen Strukturen [Chen & Whiteheart (1999), Low et al. (1998)]. Charakteristischerweise läßt sich *Cellubrevin* in Leberzellen der Ratte intrazellulär im endosomalen Kompartiment [Calvo et al. (2000)] detektieren, wo ihm eine Aufgabe beim Recycling des Transferrin Rezeptors und in der Transzytose von IgA zugeschrieben wird.

Obwohl der Nachweis multipler SNARE-Proteine in Makrophagen gelang [siehe Referenzen Tab. 2], existierten bislang zu deren Präsenz in *Kupfferschen Sternzellen* noch keine histomorphologischen Daten.

1.9.3 SNARE-Proteine in der Magenmukosa

Die Magendrüsen (Foveolae gastricae) bestehen histologisch aus Peptid-produzierenden *Hauptzellen*, säureproduzierenden *Belegzellen*, die auch als *Parietalzellen* bezeichnet werden, schleimproduzierenden *Nebenzellen* und *enteroendokrinen Zellen* [siehe Abb. 8 a, Schiebler & Schmidt (1999)]. Die enteroendokrine Zellpopulation der Magenmukosa wird vor allem durch die *Histamin-sezernierenden ECL-Zellen* des Magenfundus und die pylorusnahen *G-Zellen* repräsentiert [Hakanson et al. (1994), Solcia et al. (1998)] (siehe Tab. 1, Kap. 3.8.2). Klinische Relevanz erlangt das Zusammenspiel von G-Zellen, ECL-Zellen und Belegzellen im Regelkreis der Säuresekretion und -regulation [Prinz et al. (1993), Rindi et al. (2004)]. Die Parietalzellen säumen das Lumen der tubulären Drüsen und sind für die Stimulus-gekoppelte Salzsäuresekretion verantwortlich, die durch die Protonenpumpe H^+/K^+ -ATPase [Smolka et al. (1991)] katalysiert wird. Folglich lag der Untersuchungsschwerpunkt auf der SNARE-Expression in *endokrinen Zellen* und *Belegzellen* des Magens, deren sekretorische Aktivität über den SNARE-Mechanismus vermittelt wird [siehe Referenzen Tab. 2].

Wie aus Abb. 8 b und Tabelle 2 hervorgeht, agieren - dem aktuellen Kenntnisstand zufolge - die drei neuronalen SNAP-Rezeptorproteine Syntaxin 1, VAMP 2 und SNAP 25 als zentrale Fusionsproteine der neuroendokrinen Sekretion der *ECL-Zelle* [Zhao et al. (1997), Höhne-Zell et al. (1997), Höcker et al. (1999), Zanner et al. (2002)]. Weitere SNAREs wurden in ECL-Zellen noch nicht sicher identifiziert.

Ebenso ist die Koexistenz zahlreicher SNAREs (Syntaxin 1 - 4, VAMP 2, SNAP-25) in Belegzellen gesichert worden [siehe Tab. 2]. Verschiedene SNARE-Proteine wie SNAP 25, VAMP 2 [Calhoun & Goldenring (1997), Jöns et al. (1999)] und *Syntaxin 3* [Peng et al. (1997)] sind im tubulovesikulären Kompartiment der Parietalzelle beschrieben worden. Darüber hinaus liegen Hinweise auf die aktive Teilnahme am Mechanismus der Säuresekretion [Lehnardt et al. (2000), Karvar et al (2005)] vor. *Syntaxin 3* soll während der Salzsäuresekretion als Schlüsselprotein der SNARE-assoziierten Translokation der H^+/K^+ -ATPase an die apikale Plasmamembran agieren, wie vorausgehende Studien an Zellpräparationen und die Belegzellkultur der Spezies Kaninchen zeigen [Ammar et al. (2002), Karvar et al (2005)].

Ob die nicht-neuronalen SNARE-Proteine *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* darüber hinaus in den ECL- und Parietalzellen der *humanen* Magenmukosa bedeutsam sein könnten, sollte durch die morphologischen Untersuchungen dieser Arbeit geklärt werden.

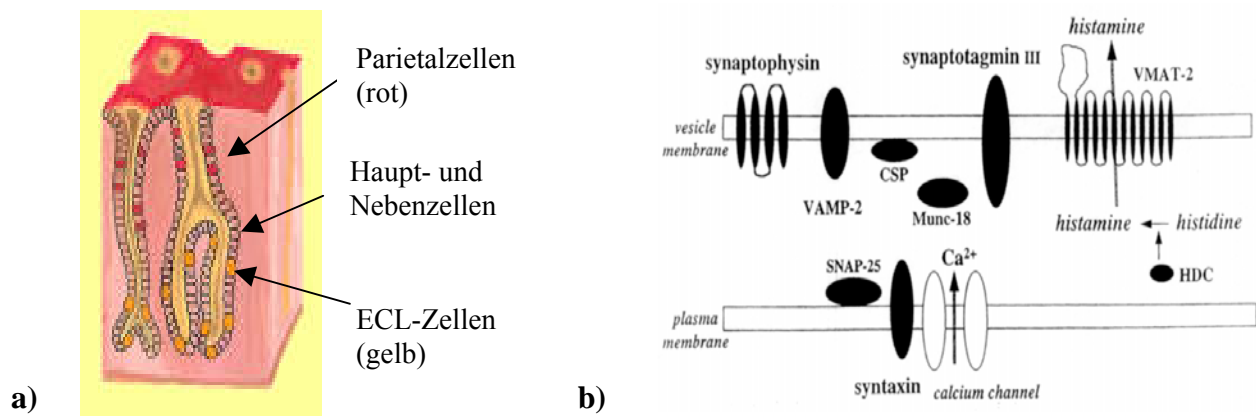


Abb. 8 : a) Foveolae gastricae mit anatomischer Anordnung der Parietal- und ECL-Zellen.

b) Exozytotische Proteine in der neuroendokrinen ECL-Zelle. [nach Zhao et al. (1997)]

1.9.4 SNARE-Proteine in Enterozyten und neuroendokrinen Zellen des Intestinums

Das Darmepithel der intestinalen Drüsen (Glandulae intestinales) setzt sich aus *Enterozyten*, *Becherzellen*, *Panethschen Zellen* und den *neuroendokrinen oder enteroendokrinen Zellen* zusammen (siehe Abb. 9 a, b). In unseren Studien fokussierten wir auf die Verteilung der SNARE-Proteine in *Enterozyten* und *enteroendokrinen Zellen*, welche bereits in Kap. 1.8.2 vorgestellt wurden.

Die Expression von SNAREs im Darmepithel wurde bisher vor allem an der humanen Kolonkarzinomzelllinie CaCo-2 studiert. In dieser transformierten Enterozytenzelllinie wurde *Syntaxin 3* mehrfach in der apikalen Domäne der Plasmamembran vorgefunden [Delgrossi et al. (1997), Riento et al. (1998)] und ist dort möglicherweise an Transportvorgängen funktionell beteiligt [Breuza et al. (2000)]. Ebenso scheinen *SNAP 23* und *Cellubrevin* [Galli et al. (1998)] an der Formation apikaler plasmamembranärer SNARE-Komplexe in CaCo-2 involviert zu sein. Analog zu den endokrinen Zellen des Magens und Pankreas existieren nur spärliche Belege für die Präsenz von SNARE-Fusionsproteinen in enteroendokrinen Zellen des Intestinums. *Cellubrevin* etwa wird - neben den neuronalen Analoga VAMP 2, Syntaxin 1 und SNAP 25 - in den Cholezystokinin-sezernierenden Zelllinien STC-1 und GLUTag vorgefunden [Némoz-Gaillard et al. (1998)]. Darüber hinaus ist erwähnenswert, daß SNAREs außerhalb des Gastrointestinaltrakts z.B. in der Phäochromozytomzelllinie PC-12 - dem Prototyp endokriner Zellen - nachgewiesen wurden [Chilcote et al. (1995), Grote et al. (1995), Seong & Almers (2004)].

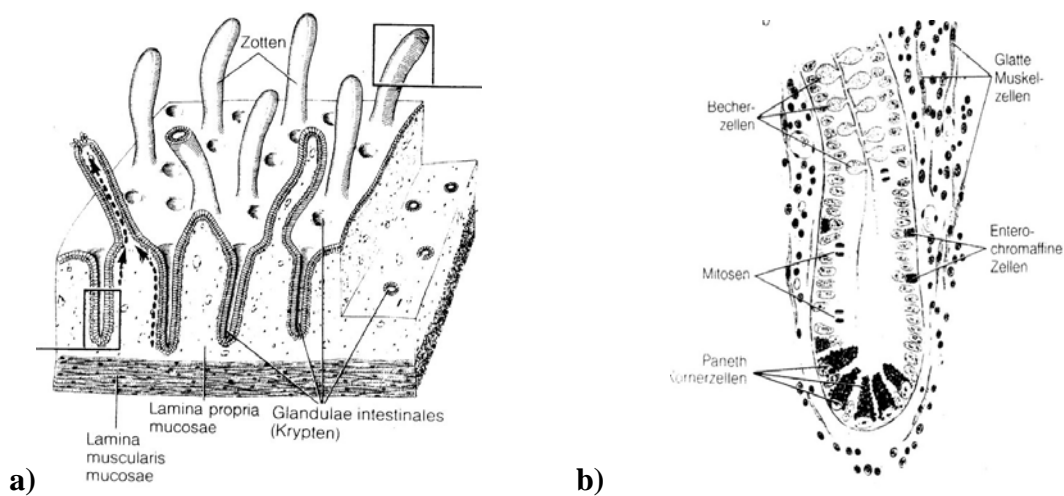


Abb. 9: a) Grundaufbau der intestinalen Mukosa im Dünndarmbereich.

b) Zelluläre Differenzierung des Darmepithels. [beide Abb.: Schiebler & Schmidt (1999)]

1.10 Neuroendokrine Tumore des Gastrointestinaltrakts (NET)

Unter dem Begriff *neuroendokriner Tumor (NET)* wird eine heterogene Gruppe von Neoplasien des Gastrointestinaltrakts und Pankreas zusammengefasst, die sich aus endokrin differenzierten Zellen zusammensetzt [Kulke & Mayer (1999), Schmitt-Gräff et al. (2001), Klöppel et al. (2004)]. Das Auftreten eines NET im Gastrointestinaltrakt ist in nahezu allen topographischen Lokalisationen möglich und dadurch zu erklären, daß nicht nur neuroendokrine Zellen, sondern

jede Epithelzelle während der Onkogenese neuroendokrine Merkmale entwickeln kann [Wick (2000), Brittan & Wright (2004)]. Einige der Neoplasien können durch die sekretorische Freisetzung endokriner Substanzen funktionell aktiv sein. Beispielsweise ist beim Vorliegen des sog. *Karzinoidsyndroms* [Thorson et al. (1954)] die enzymatische Umwandlung von Tryptophan in Serotonin gesteigert und bei einhergehendem Vorliegen von hepatischen Metastasen wird eine klinisch relevante Menge des biogenen Amins *Serotonin* in die Zirkulation freigesetzt [Scherübl et al. (2003)]. Dies kann Symptome bestehend aus Diarrhoe, Flush, Endokardfibrose und Bronchokonstriktion zur Folge haben und tritt in ca. 10 % der NET, vor allem bei Karzinoiden des Jejunums und Ileums auf. [Schmitt-Gräff et al. (2001)].

Der ursprünglich von Oberndorfer für eine spezielle Tumorentität des Gastrointestinaltrakts eingeführte und lange Zeit etablierte Begriff des *Karzinoids* [Oberndorfer S (1907)] spiegelte die Vielfältigkeit des Spektrums neuroendokriner Tumore nicht mehr wieder. Die Bezeichnungen *Karzinoidtumor* und *malignes Karzinoid*, die sich nach der ersten WHO Einteilung der NET 1980 etabliert hatten und vielfach zu histopathologischen sowie konsekutiv zu klinisch-prognostischen Ungenauigkeiten führten, wurde durch den Begriff *neuroendokriner Tumor* abgelöst [Capella et al. (1995), Klöppel et al. (1997)]. Es wurde bestrebt, die Diversität der NET nach folgenden Kriterien zu ordnen: Primärlokalisierung des Ausgangsgewebes (Vorder-, Mittel-, oder Enddarm), histologischen Aspekten (Differenzierungsgrad, sog. Grading), phänotypischen Merkmalen (Sekretion von Hormonen, Neurotransmittern, Neuropeptiden, Expression von Markermolekülen und Regulatorproteinen), biologischem Verhalten (nonfunktionell versus funktionell) und prognostischen Aspekten.

Die WHO sieht seit 2000 eine Neuerung der Klassifikation nach Malignitätsgrad, morphologisch-biologischen Kriterien (Tumorgroße, Angioinvasion, Proliferationsaktivität, Metastasierung, Peptidproduktion) und Lokalisation vor [Solcia et al. (2000)]. Der Malignitätsgrad eines Tumors steht in enger Korrelation mit dem Grad der Dedifferenzierung und Anaplasie mit Verlust der Zellpolarität. Die aktuelle Unterteilung gliedert die NET in: gut-differenzierter neuroendokriner Tumor (= Karzinoid, Typ 1 a), gut-differenziertes neuroendokrines Karzinom (= malignes Karzinoid, Typ 1 b) und schlecht-differenziertes neuroendokrines Karzinom (Typ 2) [Solcia et al. (2000), Klöppel et al. (2003, 2004), Anlauf et al. (2005)]. In der vorliegenden Arbeit wird lediglich eine *Unterteilung nach der Primärlokalisierung* des Ausgangsgewebes vorgenommen.

NET enthalten - analog zu den neuroendokrinen Zellen des GIT - sekretorische Granula (LDCV) und Vesikel (SSV) [Schmitt-Gräff et al. (1997), Wiedenmann et al. (1998 a)] und integrale regulatorische Membranproteine wie beispielsweise die neuronalen SNARE-Proteine Syntaxin 1,

VAMP 2 und SNAP 25 [Ahnert-Hilger et al. (1993, 1996)]. Auch in neuroendokrinen Primärzellkulturen fanden sich neben dem L-Typ Ca^{2+} -Kanal Zytokeratine, Neurofilamente und Schlüsselproteine der neuroendokrinen Sekretion wie SV2, Sy 38, Synaptotagmin und die SNAREs Syntaxin 1, VAMP 2 und SNAP 25 [Glassmeier et al. (1997)].

Zur Expression *nonneuronaler* SNAREs in NET liegen bislang noch keine Daten vor. Möglicherweise könnten sich durch die detaillierte Erforschung der Membranfusionsproteine und neuroendokrinen Differenzierungsmarkern in NET über die zellbiologischen Grundlagen hinausgehende klinisch-therapeutische Perspektiven eröffnen [Grabowski et al. (2000, 2004)]. Somit stand in unseren Untersuchungen die immunhistochemische Detektion von *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* in *humanen neuroendokrinen Tumorgeweben* und diversen *neuroendokrinen Zelllinien* (QGP-1, BON, PC-12) im Vordergrund.

1.11 Neuroendokrine Markerproteine

Neben den histomorphologischen Kriterien ist nach der WHO-Klassifikation zusätzlich der immunhistologische Nachweis zweier neuroendokriner Markermoleküle, die in der Mehrzahl der Tumorzellen exprimiert sein müssen, für die Einordnung als endokriner Tumor entscheidend [Solcia et al. (2000)]. Als Markermoleküle gelten gut charakterisierte Bestandteile diverser zellulärer Kompartimente (z. B. PM, Zytoplasma, Zytoskelett, Vesikel).

In dieser Arbeit wurden folgende *neuroendokrine Differenzierungsmarker* verwandt:

- 1) ***Synaptophysin 38 (Sy 38)***: Es handelt sich um ein transmembranäres, 38 kD schweres Transmembranprotein. Sein Vorkommen ist auf die SSV des Neurons und die neuroendokrinen SLMV beschränkt [Wiedenmann & Franke (1985), Jahn et al. (1985)].
- 2) ***Chromogranin A (Cg A)***: Dieses Protein ist ein Matrixprotein der LDCV [Moorghen & Carpenter (1991)]. Es wird als Markerprotein in der Identifikation der NET wie z. B. Karzinoide oder Phäochromozytome eingesetzt [Scherübl et al. (2003)].
- 3) ***Neuronspezifische Enolase (NSE)***: Sie stellt ein Enzym der Glykolyse dar, das die Umwandlung von 2-Phosphoglycerat zu 2-Phosphoenolpyruvat katalysiert. Eines der fünf Isoenzyme kommt zytoplasmatisch in Neuronen und NEZ vor und wird als *neuronspezifische Enolase* [Shimizu et al. (1983)] bezeichnet.

Es ist zu beachten, daß das neuroendokrine Differenzierungsprofil eine variable Ausprägung in Neoplasien zeigt. Das neuroendokrine Differenzierungsmuster weist in benignen und niedrigmalignen Tumoren eine weitgehende Analogie zu entsprechenden nicht-neoplastisch transformierten Zellen auf. Ebenso kann es in malignen Tumoren nur inkomplett verwirklicht

sein, z. B. können die genannten Marker in niedrig-differenzierten, kleinzelligen Karzinomen herunterreguliert werden [Solcia et al. (2000)].

1.12 SNAREs in mukosaassoziierten Zellen des Immunsystems

Humane basophile, neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie Monozyten und Mastzellen entstammen einer gemeinsamen Progenitorzelle im Knochenmark [Buhring et al. (1999)]. Leukozyten gliedern sich in diverse Subtypen: neutrophile, eosinophile, basophile Leukozyten, Monozyten, die sich im Gewebe zu Makrophagen differenzieren, sowie T- und B-Lymphozyten. Letztgenannte wiederum können zu immunkompetenten Plasmazellen heranreifen [Schiebler & Schmidt (1999)]. Nahezu jeder Subtyp der genannten Zellen enthält in Granula und Vesikeln gespeicherte biogene Amine (Histamin, Serotonin), Proteoglykane (Heparin) oder lysosomale proteolytische Enzyme (siehe Abb. 10) und kann im Rahmen inflammatorischer oder anderer immunologisch vermittelter Kaskaden an der Genese gastrointestinaler Erkrankungen (z. B. chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Mastozytose) aktiv beteiligt sein [Wittig & Zeitz (2003)]. Obwohl es sich um *nicht-polarisierte Zellen* handelt, bedienen sie sich ebenfalls gemeinsam des Grundprinzips der SNARE-vermittelten, regulierten Sekretion [Yeaman et al. (1999), Shukla et al. (2000)]. Jede dieser spezialisierten Zelllinien weist eine charakteristische Zusammensetzung an SNARE-Proteinen auf, die der Aufstellung in Tab. 2 zu entnehmen ist.

SNAREs spielen sowohl bei der Phagozytose durch Makrophagen [Hackam et al. (1998), Coppolino et al. (2001), Mollinedo (2003)], der Leukozytenaktivierung [Brumell et al. (1995)] sowie der Mastzelldegranulation [Moqbel & Lacy (1999), Blank et al. (2001)] eine zentrale Rolle. Zur immunhistochemischen Markierung der Leukozyten dienen Antikörper gegen Oberflächenantigene. Beispielsweise wird in experimentellen Studien für Makrophagen der Antikörper gegen das *CD 68*-Antigen eingesetzt [Pulford et al. (1989)]. Mastzellen sind den basophilen Granulozyten aufgrund ihrer funktionellen und biologischen Eigenschaften sehr ähnlich [Falcone et al. (2000)]. Somit werden die in dieser Arbeit verwandten *basophilen Leukämiezelllinien RBL-2H3* und *KU-812* oft als Äquivalente mukosaler Mastzellen eingesetzt. Mastzellen können anhand des Gehalts spezifischer Marker wie der Serinproteasen *Tryptase* und *Chymase* charakterisiert werden [Schwartz et al. (1987), Xia et al. (1995)]. Allergische Reaktionen können durch Mastzellen sowie basophile und eosinophile Granulozyten initiiert werden, denn diese speichern inflammatorisch wirksame biogene Amine wie Serotonin, Histamin und Heparin in Granula und Vesikeln [Galli & Lantz (1998)]. Im Rahmen der SNARE-vermittelten Compound Exozytose (siehe Kap. 1.6) während der Mastzelldegranulation sind sie

in der Lage, ihre Sekretionsprodukte auf einen exogenen Stimulus hin freizusetzen [Moqbel & Lacy (1999)].

Syntaxin 3 wurde bereits als membranständiges Protein in sekretorischen Granula und Plasmamembranen des Mastzelläquivalentes RBL-2H3 beschrieben [Hibi et al. (2000), Paument et al. (2000), Puri et al. (2003), Pombo et al. (2003)]. Darüber hinaus ist es Bestandteil des Vesikelfusionskomplexes in eosinophilen Granulozyten [Lacy et al. (1995), Hoffmann et al. (2001)] und Makrophagen [Hackam et al. (1996)].

SNAP 23 wird eine Schlüsselposition in der Compound Exozytose der Mastzelle [Guo et al. (1998), Vaidyanathan et al. (2001)] zugewiesen. Es kann potenziell in RBL2-H3-Zellen sowie in humanen KU-812 [Shukla et al. (2001)] *in vitro* und *in vivo* mit anderen SNARE-Proteinen wie Syntaxin 2, 3 und 4 interagieren [Hibi et al. (2000), Paument et al. (2000), Castle et al. (2001)] und wird während der Degranulation phosphoryliert [Hepp et al. (2005)]. Darüber hinaus wurde das initial von *Ravichandran et al.* (1996) in B-Lymphozyten entdeckte *SNAP 23* als zentrales Fusionsprotein in humanen eosinophilen und neutrophilen Granulozyten nachgewiesen [Brumell et al. (1995), Mollinedo & Lazo (1997), Shukla et al. (2001), Logan et al. (2002, 2006)]. Es scheint hier bei der Translokation der intrazellulären Granula zur Plasmamembran [Martín-Martín et al. (2000)] mitzuwirken. Auch während der Makrophagenaktivierung kann es funktionell aktiv sein [Pagan et al. (2003)]. Des weiteren liegen Befunde vor, wonach *SNAP 23* mit anderen SNAREs - unter anderem *Syntaxin 3* und *Cellubrevin* - in Plasmazellen interagiert und dort für die Immunglobulinproduktion und -sekretion von essenzieller Bedeutung zu sein scheint [Reales et al. (2005)].

Cellubrevin dient nachweislich als Mediatorprotein der Mastzellen [Lacy et al. (1995), Paument et al. (2000)] und ist an der endosomalen Funktion phagozytischer Makrophagen [Hackam (1998), Bajno et al. (2000), Coppolino et al. (2001)] maßgeblich beteiligt. Entgegen des homologen VAMP 2 konnte es in eosinophilen und neutrophilen Granulozyten nicht vorgefunden werden [Brumell et al. (1995), Hoffmann et al. (2001), Logan et al. (2006)].

Als weiteres Ziel unserer Untersuchungen galt es, die mukosale und zelluläre Detektion der SNARE-Antigene *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* in mukosaassoziierten Zellen des Immunsystems wie etwa *Mastzellen*, *Makrophagen* und *Plasmazellen* zu ergründen.

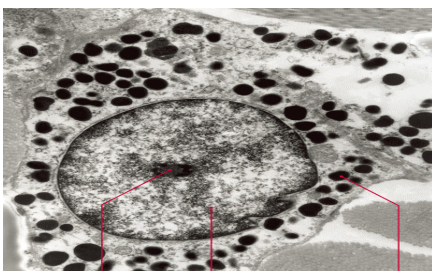


Abb. 10:

Elektronenmikroskopische Aufnahme sekretorischer Granula in einer Mastzelle. [Online-Kurspräparat der Abt. für Histologie, Universität Fribourg, CH]

Nucleolus Zellkern sekretorische Granula

1.13 Zielsetzung dieser Arbeit

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist es, erstmals mittels immunhistologischer und proteinbiochemischer Untersuchungsmethoden die Präsenz der SNARE-Fusionsproteine *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin (VAMP 3)* in **humanen** gastrointestinalen und hepatopankreatischen Geweben, neuroendokrinen Tumoren und Zelllinien zu charakterisieren.

1. Zu Beginn der Studien soll die zelluläre und subzelluläre Expression der nonneuronalen SNARE-Proteine *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* in *humanen* pathologisch unveränderten *hepatopankreatischen Geweben* und der *gastrointestinalen Mukosa* organspezifisch charakterisiert werden. Von besonderem Interesse ist zudem die Untersuchung der Membranfusionsproteine in der *enteroendokrinen Zellpopulation* und *mukosaassoziierten Zellen* des gastrointestinalen Immunsystems wie beispielsweise Mastzellen, Makrophagen und Plasmazellen.
2. Im Anschluss wird das Expressionsverhalten der Vesikelproteine *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* in pathologisch veränderten, *neuroendokrinen Tumorgeweben* untersucht. Diese Tumore sind durch ihre hohe endokrine Sekretionsaktivität von besonderem klinisch-wissenschaftlichem Interesse.
3. Darüber hinaus wird die *subzelluläre Verteilung* dieser drei Fusionsproteine in endokrinen Zellen anhand des Modells der neuroendokrinen Pankreaszelllinie BON studiert. Durch Doppelimmunfluoreszenz mit neuroendokrinen Markern soll geklärt werden, ob diese SNARE-Proteine auf neuroendokrinen *Granula (LDCV)* und *Vesikeln (SLMV)* präsent sind.
4. Abschliessend wird die Proteinexpression von *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* in unterschiedlich differenzierten epithelialen hepatopankreatischen, gastrointestinalen und neuroendokrinen *Zelllinien*, der nicht-transformierten Dünndarmzelllinie IEC-6 und Mastzellen quantifiziert und vergleichend betrachtet.
5. In den experimentellen Untersuchungen werden *drei methodische Ansätze* parallel verfolgt: die APAAP-Methode bietet die „in situ-Lokalisation“ der SNARE-Antigene im Gewebe, die Doppelimmunfluoreszenz dient der zellulären und subzellulären Charakterisierung der Antigene und der Western Blot dem Antigennachweis in Zelllinien.