

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Gewebs- und Zellexpression der SNARE-Proteine Syntaxin 3, SNAP 23 und Cellubrevin anhand immunhistochemischer und proteinbiochemischer Verfahren erstmals in humanen gastrointestinalen, hepatopankreatischen Geweben, neuroendokrinen Zellen und Tumoren sowie in mukosaassoziierten Strukturen untersucht. In der Diskussion werden zunächst die erhobenen histomorphologischen Befunde in organspezifischer Reihenfolge diskutiert und Rückschlüsse auf die SNARE-Expression in humanen Geweben gezogen. Daraufhin folgt die Erläuterung der subzellulären Lokalisation in BON-Zellen sowie die Diskussion der Befunde des Western Blots. Die Erkenntnisse dieser Arbeit werden in der abschließenden Zusammenfassung dargestellt.

4.1 Spezifität der eingesetzten SNARE-Antikörper

Durch den Spezifitätsnachweis der Antikörper wurde die Grundlage für die Verlässlichkeit der weiteren Untersuchungen determiniert. Das Ergebnis des in Kap. 3.1 dargelegten Peptidverdrängungsassays bestätigte die Spezifität der Antigen-Antikörper-Reaktion für die Antikörper *Syntaxin 3* und *Cellubrevin*. Aufgrund mangelnder Verfügbarkeit des SNAP 23-Antigens konnte der Spezifitätsnachweis des *SNAP 23*-Antikörpers in unseren Untersuchungen nicht erbracht werden. Daher wird auf die entsprechenden Publikationen von *Galli* verwiesen [Galli et al. (1998), Faigle et al. (2000)], in denen dieser hinreichend belegt wurde.

4.2 SNARE-Proteine im Pankreasgewebe

Die Präsenz der Vesikelproteine *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* konnte anhand immunhistochemischer Methoden erstmals in *humanen* Insel- und Azinuszellen des Pankreas nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen ergänzen vorausgehende experimentelle Berichte, wonach eine Vielzahl synaptischer Proteine in den insulinproduzierenden Betazellen (B-Zelle) und Azinuszellen verschiedener Spezies nachgewiesen wurde [siehe Referenzen Tab. 2]. Dort kommt ihnen eine entscheidende funktionelle Bedeutung während intrazellulärer Transportmechanismen zu [Gaisano et al. (1999), Kang et al. (2002)].

Viele der bisherigen Untersuchungen beziehen sich auf das Konstrukt eines Zellmodells. Dementgegen stellen die erbrachten Ergebnisse den *ersten in-situ-Nachweis der betrachteten SNARE-Antigene in humanen Geweben* dar und beinhalten somit eine höhere Wertigkeit der proteinbiochemischen Untersuchungen. Da das Pankreasgewebe aufgrund der Nähe des

Inselzellapparates zu den Azinuszellen geeignet ist, eine mögliche Beteiligung der SNARE-Proteine an endokrinen und exokrinen Sekretionsvorgängen genau zu diskriminieren, werden diese Organstrukturen getrennt diskutiert.

4.2.1 Endokrines Pankreasgewebe: Inselzellen

Vorausgehende Beobachtungen wiesen *Syntaxin 3* in Inselzellen der Ratte in situ sowie in den kultivierten Inselzelllinien β -TC6-f7, HIT-T15 und INS-1 nach [Wheeler et al. (1996), Kang et al. (2002)]. Demgegenüber hatten *Jacobsson et al.* 1994 postuliert, daß *Syntaxin 2* und *3* durch die in-situ-Hybridisierung in B-Zellen des Rattenpankreas nicht nachgewiesen werden könnten [Jacobsson et al. (1994)]. Hingegen sind bereits erste Daten zur funktionellen Aktivität neuronaler SNARES wie *Syntaxin 1*, *SNAP 25* und *VAMP 2* in Betazellen bekannt [Vikman et al. (2006)]. Unsere angeführten Daten der APAAP und Doppelfluoreszenz belegen hingegen das postulierte paninsulinäre Vorkommen von *Syntaxin 3* in *humanen* endokrinen Pankreaszellen (siehe Kap. 3.2.1). Zudem konnte eine Spezifizierung dieser Zellen durch die weiterführenden Kolokalisationsexperimente (siehe Kap. 3.3, Tab. 15) vorgenommen werden: *Syntaxin 3* war in insulinproduzierenden B-Zellen, den somatostatinhaltigen D-Zellen und vermutlich - durch den indirekten Nachweis der Kolokalisation *beider* Antigene (*Syntaxin 3* und Glukagon) mit Chromogranin A - auch in glukagonspeichernden A-Zellen nachweislich vorhanden (siehe Abb. 16 – 18). Wie von *Kang et al.* (2002) für *Syntaxin 3* an der transformierten B-Zelllinie des Insulinoms HIT-T15 vorbeschrieben wurde, könnte *Syntaxin 3* möglicherweise ebenso in *humanen* Betazellen auf funktioneller Ebene die endogene Insulinsekretion inhibieren. Ferner scheint *Syntaxin 3* in die endokrine Aktivität der A- und D-Zellen eingebunden zu sein. Es handelt sich um den ersten direkten histologischen Nachweis eines nonneuronalen SNARE-Proteins in diesen beiden Zelltypen. Bislang waren lediglich neuronale SNAREs wie *SNAP 23*, *Syntaxin 1* und *VAMP 2* [Jacobsson et al. (1996), Wheeler et al. (1996)] in D-Zelllinien in vitro detektiert worden. Mit dem vorliegenden immunhistochemischen Nachweis lassen sich jedoch keine funktionellen Aussagen verbinden, so daß ergänzende Untersuchungen notwendig sind, um diese Annahme zu bestätigen.

SNAP 23 konnte bislang durch die Methode der Immunfluoreszenz lediglich fraglich und in geringer Konzentration in Inselzellen des Rattenpankreas [Gaisano et al. (1997)] und nach Transfektion in der endokrinen transformierten B/ (β)-Zelle HIT-T15 identifiziert werden [Sadoul et al. (1997), Gonelle-Gispert et al. (1999)]. Anhand der vorliegenden Untersuchungen ist die Präsenz von *SNAP 23* in *humanen* Inselzellen weiterhin nicht

eindeutig zu klären. Nach histomorphologischen Kriterien könnte es sich bei den in allen APAAP-Präparaten vereinzelt, aber in mittlerer Signalintensität dargestellten *SNAP 23*-haltigen Zellen, die vor allem in der Peripherie der Langerhansschen Inseln lagen, beispielsweise um eine Subpopulation der Inselzellen oder Somatostatin-produzierende D/ (δ)-Zellen handeln (siehe Kap. 3.2.1, Tab. 14, Abb. 13). Nur 2 von 11 Geweben wiesen ein paninsulinäres Vorkommen des Antigens *SNAP 23* auf. Dementgegen lag jedoch in der Immunfluoreszenz keine oder ein nur geringes spezifisches Expressionsniveau für *SNAP 23* im endokrinen Pankreas vor und es konnte folglich keine Kolokalisationen mit entsprechenden Inselzelltypen vorgenommen werden (siehe Kap. 3.3, Abb. 21). Da die APAAP-Methode als ein sensitiveres Verfahren gegenüber der Immunfluoreszenz gilt, vermag man diese divergenten Befunde vorerst nebeneinander stehenzulassen. Zudem zeigte *SNAP 23* im Western Blot in transformierten QGP-1 Inselzellen (siehe Kap. 4.11, Abb. 59) ein deutliches Signal. Ob *SNAP 23* im menschlichen endokrinen Pankreas keine oder nur eine geringe Expression aufweist, bleibt zu klären. Die Befunde deuten möglicherweise jedoch auf die wohl untergeordnete Relevanz dieses t-SNARE-Proteins in endokrinen Sekretionsvorgängen der Insel hin.

Cellubrevin wird in den B-Zellen des Pankreas in den Insulin-enthaltenden secretory granules (LDCV) wie auch den GABA-enthaltenden synaptic-like-microvesicles (SLMV) der Ratte beschrieben [Jacobsson et al. (1994), Wheeler et al. (1996)]. Dies wurde durch histologische Vorbefunde an Geweben von Ratte und Maus ergänzt [Omatsu-Kanbe et al. (1997)]. Ebenso konnte auf funktioneller Ebene gezeigt werden, daß die TeTx-induzierte Spaltung von VAMP-Proteinen wie u. a. *Cellubrevin*, die Insulinsekretion inhibieren kann [Regazzi et al. (1995)]. Durch unsere experimentellen Resultate der APAAP wurde *Cellubrevin* paninsulinär in den *humanen* Pankreasinseln nachgewiesen (siehe Kap. 3.2.1, Tab. 14, Abb. 19, 20). Die genauere subzelluläre Betrachtung anhand der Doppelfluoreszenz zeigte eine Kolokalisation mit Insulin in B-Zellen und bestätigte die morphologischen Vorbefunde für die *humanen* Betazellen der Bauchspeicheldrüse. *Cellubrevin* könnte somit auch während der menschlichen Insulinsekretion von Relevanz sein. Des Weiteren bestand jedoch in den Doppelfluoreszenzexperimenten ebenso eine deutliche Kolokalisation von *Cellubrevin* mit dem Somatostatin-Antigen in D-Zellen. Darüber hinaus konnte durch die gleichzeitige Kolokalisation der zwei Antigene *Cellubrevin* und Glukagon mit Cg A ein indirekter Hinweis auf die Präsenz von *Cellubrevin* in A-Zellen erlangt werden (siehe Tab. 15, Kap. 3.3). Dies ist der erste histomorphologische Nachweis von *Cellubrevin* in D-Zellen und auch möglicherweise in A-Zellen. Wie bereits erwähnt, lag bislang in vorausgehenden

Publikationen noch kein Nachweis eines nonneuronalen SNARE in D-Zellen oder eines SNARE-Proteins überhaupt in A-Zellen vor [siehe Referenzen Tab. 2]. Ein Widerspruch liegt hier zu der Arbeitsgruppe von *Omatsu-Kanbe* vor, die die *Cellubrevin*-Expression im Inselgewebe der Maus differenziert in allen Subtypen untersuchte. Sie fand heraus, daß *Cellubrevin* histologisch auf den B-Zellsubtyp restringiert vorkam und anhand der Doppelfluoreszenz nicht in A- oder D-Zellen des endokrinen Pankreas nachgewiesen werden konnte [Omatsu-Kanbe et al. (1997)]. Es könnte sich hier um eine speziesspezifische Differenz handeln oder die genannten Ergebnisse sind anzuzweifeln, zumal seine Arbeitsgruppe *Cellubrevin*, das bekanntermaßen im exokrinen Pankreas vorzufinden ist, auch in Azinuszellen nicht detektierte.

Auf der subzellulären Ebene wiesen *Syntaxin 3*, *SNAP 23* (nur in APAAP) und *Cellubrevin* in Inselzellen mikroskopisch ein typisches intrazelluläres Expressionsmuster mit Betonung der subplasmamembranären Region auf, wie es für die Compound Exozytose und Betazellsekretion beschrieben wird [Pickett & Edwardson (2006), Vikman et al. (2006)]. Dies legt ihre Assoziation mit sekretorischen Granula und ihre potenzielle Funktion in der Ca^{2+} -induzierten endokrinen Sekretion nahe [Wheeler et al. (1996), Gaisano et al. (1999), Vikman et al. (2006)]. Anhand vorliegender Ergebnisse wird die phylogenetisch konservierte, *essenzielle* Bedeutung der Expression vielfältiger SNARE-Proteinen im endokrinen Pankreas deutlich.

4.2.2. Exokrines Pankreasgewebe: Azinusgewebe

Die vorliegenden Ergebnisse weisen die Präsenz der SNARE-Proteine *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* im *humanen* exokrinen Pankreasgewebe anhand der immunologischen Färbemethoden APAAP und Immunfluoreszenz nach (siehe Kap. 3.2.2, Abb. 14, 15). Subzellulär war *Syntaxin 3* an der apikalen oder luminalen Plasmamembran, *SNAP 23* an der basolateralen Plasmamembran sowie intrazellulär lokalisiert. Der wesentliche Anteil des Antigens *Cellubrevin* kam intrazellulär vor, wies aber darüber hinaus auch eine diskrete plasmamembranäre Betonung auf.

Vorausgehende Publikationen wiesen *Syntaxin 3* in Zelllysaten von Rattenazini und amphikrinen AR-42J-Zellen immunhistochemisch intrazellulär dominierend auf den Zymogengranulamembranen, aber auch auf der Plasmamembran nach [Gaisano et al. (1996 a, 1999)]. Wie funktionelle Untersuchungen belegen, interagiert es dort während der Granula-Granula-Fusion, der sog. Compound Exozytose [Hansen et al. (1999)]. *Syntaxin 3* war in den zur Untersuchung herangezogenen humanen Pankreasgeweben in APAAP und

Immunfluoreszenz übereinstimmend vorwiegend an der *apikalen Plasmamembran* exprimiert (siehe Abb. 14 a, 15 a), ähnlich des von *Gaisano* für Syntaxin 2 in Azini beschriebenen Expressionsmusters [Gaisano et al. (1996 a)] und der in Epithelzellen für *Syntaxin 3* bekannten apikal polarisierten Anordnung [Sharma et al. (2006)]. Es lag, im Unterschied zu den Vorbefunden aus der Literatur, nur eine geringgradige intrazelluläre Färbintensität vor. Diesen widersprüchlichen Daten könnte potenziell eine speziesspezifische Differenz des SNARE-Expressionsmusters zu Grunde liegen. Eine Kreuzreaktivität mit anderen Syntaxinen ist aufgrund des spezifischen Signals mit hoher Intensität unwahrscheinlich. Daher ist die rein apikal-plasmamembranäre Detektion von *Syntaxin 3* in ergänzendem Kontext der Daten zu interpretieren, die *Syntaxin 3* in Lysaten auch in geringen Anteilen im plasmamembranären Kompartiment nachgewiesen haben [Gaisano et al. (1999)]. Dies wurde bislang jedoch immunhistologisch noch nicht belegt. Auch wäre vorstellbar, daß sich die SNAREs - hier beispielsweise Syntaxin 2 und *Syntaxin 3* - auf funktioneller Ebene untereinander ersetzen könnten, so wie es bereits für multiple SNAREs in unterschiedlichen Publikationen angedeutet wurde [Yang et al (2001), Borisovska et al. (2005)]. Am wahrscheinlichsten ist aber anzunehmen, daß die Anordnung der Syntaxine wie *Syntaxin 3*, welches in mehreren subzellulären Kompartimenten anzutreffen ist, sich unter physiologischen Gesichtspunkten innerhalb der Zelle verändern kann [Low et al. (2000, 2006)]. Schließlich ist noch zu erwähnen, daß alle immunhistochemisch erhobenen Befunde vorsichtig betrachtet werden müssen. SNARE-Proteine weisen oftmals ein geringes endogenes Expressionsniveau auf, welches selbst mit geeigneter Methodik in nur ungenügender Signalintensität darzustellen ist [Weimbs et al. (2003)]. Dementsprechend könnte *Syntaxin 3* zwar in humanen Azinuszellen intrazellulär anzutreffen sein, aber durch seine geringe Konzentration sowie durch seine komplexe Bindung mit anderen regulatorischen Proteinen in situ schwer darzustellen sein.

Die basolaterale Detektion von *SNAP 23* (siehe Abb. 14 b, 15 b) steht in Übereinstimmung mit experimentellen Untersuchungen von *Gaisano*, der die Lokalisation von *SNAP 23* basolateral, fraglich auch apikal in Azinuszellen des Rattenpankreas beschrieb [Gaisano et al. (1997, 1999)]. Darüber hinaus wies *SNAP 23* in unseren Untersuchungen jedoch auch eine deutliche intrazelluläre Expression auf, die bislang in der Literatur keine deutliche Erwähnung fand. Bei Überexpression von *SNAP 23* [Huang et al. (2001)] in der primären Rattenazinuszellkultur war dies auf endomembranären Kompartimenten wie den Zymogengranula zu identifizieren und führte in Sekretionsassays zur funktionellen Inhibierung der CCK-induzierten Enzymsekretion. Diese Untersuchung bekräftigt die Annahme, daß die intrazelluläre Anordnung von *SNAP 23* in seiner Assoziation mit der

Compound Exozytose der Zymogengranula [Pickett & Edwardson (2006)] begründet sein könnte.

Cellubrevin wurde bereits als integrales Membranprotein diverser Azinuszellfraktionen der Ratte (Zymogengranulamembran, Plasmamembran) vorgefunden [Gaisano et al. (1996 b)]. *Sengupta et al.* wiederum lokalisierte es primär in Vakuolen und Vesikeln, die sich aus dem TGN formieren, weniger dagegen in den Zymogengranula und gar nicht in der Plasmamembran [Sengupta et al. (1997)]. In den vorliegenden Befunden wies *Cellubrevin* in der APAAP ein rein intrazelluläres Expressionsmuster und in der Immunfluoreszenz ein intrazelluläres Verteilungsmuster mit subplasmamembranärer Betonung auf (siehe Abb. 14 c, 15 c). Diese Lokalisation scheint mit den in der Literatur vorgestellten Befunden vereinbar.

Das in unseren Untersuchungen beschriebene Expressionsmuster der Vesikelproteine *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* scheint vorausgehende Befunde dieser SNARE-Proteine für das *humane* Pankreas *in situ* zu bestätigen und teilweise zu ergänzen.

Die diskutierte SNARE-Präsenz im endokrinen und exokrinen Pankreasgewebe könnte in klinischer Hinsicht auch die Grundlage für die Annahme einer möglichen Beteiligung der SNARE-Proteine an Membranfusionsprozessen im pathologisch veränderten Pankreas [Gaisano HY (2000)] bilden und wird somit auch in Zukunft von großem Interesse sein.

4.3 SNARE-Proteine in Hepatozyten

Es liegt eine Vielzahl an Befunden vor, wonach SNARE-Proteine in der Leberparenchymzellen vorhanden sind, um verschiedene funktionelle Aufgaben zu übernehmen - unter anderem auch die untersuchten Membranfusionsproteine *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* [Fujita et al. (1998), Chen & Whiteheart (1999), Calvo et al. (2000)]. Im Rahmen dieser Arbeit waren die Antigene *SNAP 23* und *Cellubrevin* mit schwacher Signalintensität in *humanen* Hepatozyten immunhistologisch vorzufinden (siehe Kap. 3.3, Abb. 24).

SNAP 23 wurde in 3 von 5 Leberpräparaten intrazellulär und plasmamembranär sowie im Western Blot in der humanen Hepatomzelllinie PLC nachgewiesen. Diese Befunde ergänzen vorausgehende Publikationen, die dieses SNARE sowohl in der apikalen und basolateralen Membran als auch in intrazellulärer endosomal-perinukleärer Anordnung in humanen HepG2 Hepatozyten [Low et al. (1998), Chen & Whiteheart (1999)] lokalisierten.

Auch das intrazelluläre Vorkommen von *Cellubrevin* *in situ* in der Untersuchung des humanen Lebergewebes sowie in PLC Zellen im Western Blot Nachweis bestätigte die bisherigen experimentellen Daten anderer Arbeitsgruppen, wonach *Cellubrevin* als Protein

des endosomalen Kompartiments in der Rattenleber [Calvo et al. (2000)] eine zentrale Stellung zugesprochen wird. Anhand dieser morphologischen und proteinbiochemischen Daten wird bekräftigt, daß *SNAP 23* und *Cellubrevin* Bestandteile des SNARE-Komplexes in *humanen* Hepatozyten sind.

Syntaxin 3 wiederum konnte anhand der APAAP-Methode im autochthonen *humanen* Lebergewebe nicht dargestellt werden. Diesem Ergebnis stehen widersprüchliche Erkenntnisse gegenüber: initial wurde *Syntaxin 3* im Northern Blot der Rattenleber von *Bennett* nicht vorgefunden [Bennett et al. (1993)]. Jedoch erfolgte der Nachweis von *Fujita et al.* in geringen Mengen im plasmamembranären Kompartiment von Hepatozyten der Ratte und ebenfalls in niedriger Konzentration in humanen Leberextrakten [Delgrossi et al. (1997), *Fujita et al.* (1998)]. Interessanterweise wurde *Syntaxin 3* in dieser Arbeit im Proteinnachweis des Western Blot Verfahrens in der humanen Hepatomzellen PLC in geringer Konzentration detektiert (siehe Kap. 3.11). Am wahrscheinlichsten ist als Erklärung für die negative hepatozelluläre Gewebsexpression von *Syntaxin* eine geringe Antigenkonzentration verantwortlich. Die geringe Signalintensität von *SNAP 23* und *Cellubrevin* und die fehlende Antigendarstellung von *Syntaxin 3* vermögen als Ausdruck der - selbst mit geeigneter Methodik wie bereits im Kapitel 2.2.2 ausgeführt - histologisch schwierigen Antigendarstellung der SNARE-Proteine [Weimbs et al. (2003)] interpretiert werden. Sie weisen oftmals ein geringes endogenes Expressionsniveau und einen niedrigen Antigengehalt bei fluktuierender Antigendarstellung während ihrer diversen Proteininteraktionen auf. Erst durch den deutlich sensitiveren Proteinnachweis des Western Blot Verfahrens konnte die Präsenz der drei SNAREs in Hepatozyten in dieser wissenschaftlichen Arbeit erfasst werden.

4.4 SNAP 23 als zentrales SNARE-Protein in Lebermakrophagen

In der eingehenden Untersuchung des Leberparenchyms ergab sich die Beobachtung, daß *SNAP 23* in Kupfferschen Sternzellen mit starker Signalintensität vorhanden sein könnte (siehe Kap. 3.4, Abb. 25).

Bisherige Publikationen wiesen verschiedene SNARE-Proteine wie die Syntaxine 2, 3 und 4, *SNAP 23* und *Cellubrevin* in Makrophagen nach [Hackam (1996), Shukla et al. (2000), Pagan et al. (2003)]. Die Existenz von *SNAP 23* in dieser Zellpopulation wurde bislang nie im humanen Gewebe, jedoch an der Zellkultur in humanen und murinen kultivierten Makrophagen [Hackam et al. (1996), Shukla et al. (2001)] und in Assoziation mit anderen SNAREs bei der funktionellen Makrophagenaktivierung [Pagan et al. (2003)] gesichert.

Die immunhistochemische Kolo-kalisation in Kap. 3.5 und Abb. 26 beweist anschaulich die Koexistenz des Makrophagenmarkers CD 68 [Pulford et al. (1989)] sowie *SNAP 23* in den Kupfferschen Sternzellen der Leber. Sie legt den Schluss nahe, daß *SNAP 23* als integrales Membranprotein des SNARE-Komplexes in diesem speziellen Subtyp residenter, hepatisch lokalisierter Makrophagen involviert sein könnte.

Der in dieser Arbeit geführte Proteinnachweis von *SNAP 23* in Kupfferschen Sternzellen der Leber ist demnach der erste Nachweis von *SNAP 23* in dieser speziellen *humanen* Makrophagenpopulation und zudem das *erste* in den *Kupfferschen Sternzellen* identifizierte SNARE-Protein überhaupt. Im Verlauf der weiteren experimentellen Untersuchungen eröffnete sich die Frage, ob *SNAP 23* ebenso als makrophagenassoziiertes SNARE-Protein in anderen Lokalisationen des Gastrointestinaltrakts vorhanden sein könnte. So wurde es durch die in Kap. 3.8 beschriebene Kolo-kalisation ebenfalls in Makrophagen der gastrointestinalen Mukosa vorgefunden. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist anzunehmen, daß *SNAP 23* als ubiquitär in Makrophagen exprimiertes SNARE-Protein fungieren könnte (siehe hierzu auch Kap. 4.13).

Im Gegensatz dazu sind in unseren Untersuchungen die Antigene *Syntaxin 3* und *Cellubrevin* - obwohl sie bereits in verschiedenen Makrophagenpopulationen in der Zellkultur beschrieben wurden [Hackam et al. (1996), Bajno et al. (2000)] - in den durchgeführten Experimenten durch die APAAP-Methode in den Kupfferschen Sternzellen immunhistologisch nicht detektiert worden. Dies ist möglicherweise darin begründet, daß in jeder Subpopulation der Makrophagen ein *gewebs- und speziesspezifisches Setup* an SNARE-Proteinen im Rahmen entsprechender spezifischer Fusionsereignisse interagiert und *Syntaxin 3* sowie *Cellubrevin* im Gegensatz zu *SNAP 23* möglicherweise *nicht* als ubiquitäre SNAREs in allen Makrophagen fungieren. In den regionären Lebermakrophagen scheint insbesondere *SNAP 23* als Vesikelfusionsprotein präsent und könnte auf funktioneller Ebene eventuell in der Sekretion proinflammatorischer Faktoren und die darauf folgende Makrophagenaktivierung eingebunden sein.

4.5 Lokalisation der SNARE-Proteine in der gastralen Mukosa

Da sich unterschiedliche Epithelzellpopulationen des Gastrointestinaltrakts des SNARE-Mechanismus bedienen, war es sinnvoll, die SNAREs *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* in unterschiedlichen Mukosaabschnitten (Magen, Dünndarm, Dickdarm) näher zu charakterisieren.

Zuerst wurde die Antigendetektion in der gastralen Mukosa vorgenommen. Denn, wie bereits in Kapitel 1.9.3 beschrieben, existierten Beobachtungen, daß die neuroendokrine Histaminsekretion der ECL-Zelle des Magens [Chen et al. (1999)] und die damit verbundene Interaktion mit den Parietalzellen im Regelkreis der gastralen Säuresekretion [Prinz et al. (1993), Zanner et al. (2002)] über die *neuronalen* SNARE-Vesikelproteine Syntaxin 1, SNAP 25 und Synaptobrevin 2 (VAMP 2) reguliert wird [Zhao et al. (1997), Höhne-Zell et al. (1997), Höcker et al. (1999)]. Einhergehend hatten auch Untersuchungen an den Parietalzellen der Magenmukosa verschiedene SNAREs wie Syntaxin 1, *Syntaxin 3*, VAMP 2, *SNAP 23* und rab 3A identifiziert [Calhoun & Goldenring (1997), Peng et al. (1997), Jöns et al. (1999)]. Funktionell können sie dort an der Translokation der H⁺/K⁺-ATPase und Initiierung der regulierten Salzsäuresekretion [Lehnardt et al. (2000), Karvar et al. (2005)] beteiligt sein.

Wie die an der Magenmukosa gewonnenen immunhistochemischen Daten zeigen, waren die im unteren Kryptenabschnitt und am Kryptengrund gelegenen Zellen hoher Signalintensität und basal betonter Anfärbung des Zytoplasmas von besonderem Interesse, da es sich um die typische Anordnung und morphologische Struktur neuroendokriner Zellen handelte (siehe Kap. 3.6.1, Abb. 27 - 29). Innerhalb einer Magendrüse schienen unterschiedliche Zelltypen durch die SNAREs markiert, was die unterschiedliche Morphologie und Charakteristika der Färbeintensität zeigte (siehe Abb. 30). Die vorausgehend erwähnte, in disseminierten Zellen im mittleren und unteren Kryptendrittel verstärkte Antigendarstellung trat für *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* in allen Lokalisationen der Magenmukosa (Fundus, Korpus, Antrum) in heterogener Quantität (siehe Tab. 18) auf. Lediglich *Syntaxin 3* war in allen Magencorpuspräparaten vorhanden und zeigte durchgehend mittelgradige bis starke Signalintensität.

Die subzelluläre Lokalisation der betrachteten SNARE-Antigene war - in diesem Zelltyp hoher Signalintensität - durchgehend intrazellulär mit basaler Betonung (siehe Abb. 28). Diese intrazelluläre Anordnung entsprach dem Muster der sog. *basalgekörnten* neuroendokrinen Zellen (siehe Kap. 1.8.2).

Um eine genauere Spezifizierung der unterschiedlichen SNARE-haltigen mukosalen Zellen (z. B. ECL Zelle versus Parietalzelle) zu erlangen, erfolgten Kolo-kalisationsexperimente in Serienschnitttechnik mit neuroendokrinen Markern (Cg A und Sy 38) sowie dem Belegzellmarker H⁺/K⁺-ATPase [Smolka et al. (1991)] am Magenfundusgewebe. Durch die weiterführenden Doppel-lokalisierungen mit den neuroendokrinen Markern Chromogranin A [Moorghen & Carpenter (1991)] und Synaptophysin 38 [Wiedenmann & Franke (1985)]

konnte die Existenz der Fusionsproteine *Syntaxin 3* und *Cellubrevin* in neuroendokrinen Zellen des *humanen* Magenfundus immunhistologisch bestätigt werden (siehe Kap. 3.7, Tab. 24). Dem entgegen war *SNAP 23* durch serielle Kolokalisation in neuroendokrinen Zellen des Magenfundus nicht nachweislich vorhanden, wobei zu erwähnen ist, daß die Dichte dieser Antigen-repräsentierenden Zellen im Untersuchungsmaterial des Magenfundus gering war.

Wie vorausgehend erwähnt, war bislang in zahlreichen Publikationen die Präsenz neuronaler SNAREs [Söllner et al. (1993 a), Südhof et al. (1993)] wie *Syntaxin 1*, *VAMP 2* und *SNAP 25* auf den Vesikeln der ECL-Zellen berichtet worden [Zhao et al. (1997), Höhne-Zell et al. (1997), Höcker et al. (1999)]. Die Tatsache, daß durch die dargestellten Daten nun die Expression nonneuronaler SNAREs wie *Syntaxin 3* und *Cellubrevin* in gastralen neuroendokrinen Zellen nachgewiesen wurde, *erweitert* das bislang erforschte Spektrum der *neuroendokrinen Schlüsselproteinen* um mindestens *zwei weitere SNAP-Rezeptorproteine*.

Da sie in allen Abschnitten der gastralen Mukosa vorzufinden waren, könnten sie theoretisch in allen vier endokrinen Zelltypen des Magens (ECL-, D-, G-, P/D1-Zellen, siehe Tab. 1, Kap 1.8.2) [Solcia et al. (1998), Rindi et al. (2004), als SNAREs präsent sein.

Überraschenderweise konnten darüber hinaus *keine* spezifischen Doppellokalisierungen für *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* mit dem Belegzellmarker H^+/K^+ -ATPase erzielt werden. Vor allem *Syntaxin 3*, das im tubulovesikulären Membranpool der Ratte in Belegzellen vorbeschrieben wurde [Peng et al. (1997), Ammar et al. (2002), Karvar et al. (2005)], konnte in unseren immunhistologischen Studien anhand der seriellen Schnitttechnik somit *nicht* als belegzelleigenes Protein der *humanen* Magenmukosa detektiert werden. In Parietalzellen gab es bezüglich der Existenz des *SNAP 23* keine Daten. Verschiedene Synaptobrevine wurden mit der Säuresekretion in Verbindung gebracht, *Cellubrevin* aber nie beschrieben. Wenngleich eine Vielzahl an gastralen Zellen positive Signale für die SNAREs aufwies, liess sich in den durchgeführten Untersuchungen durch die Methode der Doppellokalisation kein histomorphologischer Hinweis auf eine Beteiligung der SNAREs *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* an der exokrinen Säuresekretion in der *humanen* Magenmukosa finden. Hierin läge ein speziesspezifischer Unterschied in der Expression von *Syntaxin 3*, welches bereits in Parietalzellen der Ratte vorbeschrieben war [Peng et al. (1997), Jöns et al. (1999)] und dessen funktionelle Aktivität dort belegt wurde [Lehnardt et al. (2000), Ammar et al. (2002), Karvar et al. (2005)]. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß eine methodisch schwierige Darstellung durch serielle Kolokalisation vorlag, denn die niedrige Anzahl der Antigen-repräsentierenden Zellen und die starke panepitheliale Färbeintensität in den Foveolae gastricae erschwerte die Durchführung des spezifischen Antigennachweises.

4.6 Lokalisation von SNARE-Proteinen in der intestinalen Mukosa

Wie anhand der APAAP-Färbungen der Kap. 3.6.2 und 3.6.3 veranschaulicht, wurden *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* in disseminierten Zellen der intestinalen Mukosa des Dünn- und Dickdarms vor allem im unteren Abschnitt der Glandulae intestinales, aber auch vereinzelt auf der Villusspitze mit starker Signalintensität vorgefunden (siehe Abb. 32, 35, 36). Die Annahme lag nahe, daß es sich hierbei um enteroendokrine Zellen handeln könnte.

Präexistente Untersuchungen wiesen die SNAREs Syntaxin 1, SNAP 25 sowie die Synaptobevine VAMP 2 und *Cellubrevin* in enteroendokrinen Cholezystokinin-sezernierenden murinen STC-1 und GLUTag Zellen des Dünndarmes nach [Némoz-Gaillard (1998)]. Durch Einsatz von Tetanustoxin konnte man hier eine Inhibierung der CCK-Sekretion durch einhergehende Spaltung der VAMP-Proteine *Cellubrevin* und VAMP-2 induzieren. Da unklar bleibt, welche SNAREs und vor allem in welcher Zusammensetzung die Formation eines synaptischen *core complexes* (siehe Kap. 1.3) in endokrinen Zellen des Darms bilden, könnten hier diesbezüglich neu erhobene Daten von ausgesprochener Relevanz sein. Demgegenüber sind integrale SNARE-Membranproteine wie beispielsweise *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* auch in nicht-endokrin differenzierten Enterozyten vorhanden. Dies belegen zahlreiche Untersuchungen, die diese SNAREs überwiegend am Zellmodell - wie z. B. an der etablierten Kolonkarzinomzelllinie CaCo-2 [Low et al. (1998), Galli et al. (1998), Breuza et al. (2000)] - lokalisierten.

Somit stand im weiteren Verlauf zur experimentellen Klärung an, welche Art der Differenzierung die in unseren APAAP-Untersuchungen signalpositiven Zellen aufwiesen. Die subzelluläre Expression aller drei Antigene in endokrinen Zellen war durchweg intrazellulär mit basolateraler Betonung. Die nach kaudal für jedes SNARE in der quantitativen Auswertung vom Duodenum zum Kolon hin abnehmende und zum Rektum wiederum zunehmende Häufigkeitsverteilung Antigen-exprimierender Zellen (siehe Tab. 19 – 23) wies starke Ähnlichkeiten mit dem Expressionsmuster neuroendokriner Zellen (Anzahl NEZ Rektum >> Dünndarm > Kolon) auf [Höcker & Wiedenmann (1998)]. Am ehesten entsprach die beobachtete Häufigkeitsverteilung der SNAREs *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin*, wenn man die *graphischen Darstellungen Abb. 7 und 37 vergleichend betrachtet*, die der *Verteilung neuroendokriner serotoninsezernierender EC-Zellen*. Die EC-Zellen stellen quantitativ die größte Population enteroendokriner Zellen des diffusen endokrinen Systems (DES) dar [Solcia et al. (1998)] und sind - analog zu den drei untersuchten SNAREs - entlang der gesamten gastrointestinalen Mukosa (kraniokaudale Achse) und im Dünndarm sowohl in den Krypten als auch auf den Villi (Krypt-Villus-Achse)

vertreten [Wiedenmann et al. (1998 b), Roth et al. (1990 a, b)]. Alternativ könnte es sich um somatostatinhaltige D-Zellen oder GLI/PYY-Zellen handeln, deren Präsenz ebenso bis in die Region der Dickdarmmukosa hinein reicht [Rindi et al. (2004)].

Durch die serielle Kolokalisation mit den bereits vorgestellten neuroendokrinen Markern konnte schließlich *in situ* belegt werden, daß *Syntaxin 3* als integrales Membranprotein in Chromogranin- bzw. Synaptophysin-haltigen neuroendokrinen Zellen *ubiquitär* in der intestinalen Mukosa vorhanden war (siehe Kap. 3.7, Tab. 24, Abb. 38, 39). *SNAP 23* und *Cellubrevin* ließen sich nachweislich in Cg A-exprimierenden Zellen des Duodenums, aber nicht in NEZ des Kolons doppellokalisieren.

War allerdings eine Kolokalisation im entsprechenden Gewebe vorhanden, wies nur eine gewisse Schnittmenge neuroendokrin-markierter Zellen die untersuchten SNARE-Proteine auf (siehe Abb. 38). Somit fanden sich SNARE-markierte Zellen, die nicht mit den genannten neuroendokrinen Markerproteinen kolokalisierten. Daher lässt sich postulieren, daß *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* häufig, aber nicht in allen neuroendokrinen Zellen des Gastrointestinaltrums anzutreffen sind und dementsprechend darüber hinaus auch in nicht von neuroendokrinen Markern erfassten Epithelzellpopulationen vorkommen. Hier ist denkbar, daß es sich um Epithelzellen nicht-neuroendokriner Differenzierung handelt oder etwa eine Expression in NEZ in Abhängigkeit von den Sekretionsstadien oder dem Prozess der *sog. Transdifferenzierung* stattfinden könnte [Brittan & Wright (2004)]. Diese Frage könnte in zukünftigen Untersuchungen an der humanen gastrointestinalen Mukosa vertieft werden. Bei genauer Betrachtung war für *Syntaxin 3* die Antigenpräsenz anhand der quantitativen Auswertung (Tab. 19 – 23, Abb. 35) häufiger als die der zwei anderen Fusionsproteine. Zugleich war dessen neuroendokrine Kolokalisation lokoregionär in allen Abschnitten der gastrointestinalen Mukosa vorhanden. Demnach sind die enteroendokrinen Eigenschaften von *Syntaxin 3* im Vergleich offensichtlich ausgeprägter als die von *SNAP 23* und *Cellubrevin*.

Zusammenfassend erfolgte somit *erstmalig* die unmittelbare *Identifikation* von *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* als SNARE-Proteine im *enteroendokrinen System* der humanen Dün- und Dickdarmmukosa *in situ*. Diese Ergebnisse bekräftigen die bereits im vorausgehenden Kapitel an der Magenmukosa erörterte Existenz *nonneuronaler* SNARE-Fusionsproteine in neuroendokrinen Zellen. Die Befunde eröffnen demnach die histologische Grundlage für die Erforschung weiterer SNARE-Sekretionsproteine im Rahmen der regulierten Exozytose neuroendokriner Zellen des GEP.

Neben den stark signalpositiven Zellen war für *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* entlang der gesamten gastrointestinalen Achse inkonstant eine schwache *panepitheliale* Expression

der SNARE-Marker zu verzeichnen (siehe Abb. 33). Somit konnte also neben der Präsenz in NEZ auch von einer SNARE-Expression in Enterozyten ausgegangen werden. Die Tatsache, daß sich die betrachteten SNAREs nur inkonstant in Epithelabschnitten fanden, könnte in funktionell-physiologischen Zusammenhängen oder in der bereits berichteten methodisch schwierigen Antigendarstellung der SNAREs begründet sein [Weimbs et al. (2003)].

Das subzellulär *polarisierte* Expressionsmuster in *Enterozyten* unterschied sich deutlich von dem *einheitlich intrazellulären* Verteilungsmuster mit vorwiegend *basaler* Intensitätsanreicherung in *neuroendokrinen Zellen*: *Syntaxin 3* war in Enterozyten in der apikalen Domäne und in geringgradigem Anteil intrazellulär, *SNAP 23* basolateral-plasmamembranär mit geringer intrazellulärer Verteilung und *Cellubrevin* vordergründig intrazellulär mit fraglicher plasmamembranärer Signalintensität anzutreffen.

Die vergleichende Betrachtung der Abb. 31 versus Abb. 33 veranschaulicht diese *differente subzelluläre SNARE-Anordnung*. Die berichtete SNARE-Expression in enteralen Epithelzellen könnte dem von verschiedenen Arbeitsgruppen beschriebenem Vorkommen dieser Proteine in kultivierten CaCo-2 Kolonepithelzellen entsprechen [Delgrossi et al. (1997), Riento et al. (1998), Galli et al. (1998), Low et al. (1998), Breuza et al. (2000)].

Sie stellt zugleich den *ersten histologischen* Nachweis in *humanen* Enterozyten in situ dar.

Die beobachtete subzelluläre Lokalisation der drei Vesikelproteine stimmte weitgehend mit dem an der Zellkultur charakterisierten Expressionsmuster der genannten Publikationen überein. *Syntaxin 3* wurde, wie vorbeschrieben, mit *apikaler* und *dezent* intrazellulärer Anreicherung (siehe Abb. 33 a) vorgefunden [Delgrossi et al. (1997), Low et al. (2000, 2006), Sharma et al. (2006)]. Es kann an der apikalen Domäne mit *SNAP 23*, *Cellubrevin* und SM-Proteinen als SNARE-Komplex interagieren [Galli et al. (1998), Riento et al. (1998)] und dort möglicherweise funktionelle Aspekte des Membrantransports wie etwa den Proteintransport vom TGN zur Plasmamembran erfüllen [Breuza et al. (2000), ter Beest et al. (2005)]. Da *Syntaxin 3* vor allem im Kolon und Rektum in dem als *Schlussleistennetz* bezeichneten Bereich vorgefunden wurde, mag es eventuell - über eine apikale sekretorische Funktion hinaus - eine Rolle im sog. *junctional complex*, dem Haftkomplex der Zelle, einnehmen. Möglicherweise könnte es in den darin enthaltenen *tight junctions* Docking-Fusionsprozesse vermitteln oder, wie es für *SNAP 23* vermutet wird, an dieser Stelle mit Ionenkanälen interagieren [Zahouri et al. (2000), Saxena et al. (2006)].

SNAP 23 war fluoreszenzmikroskopisch und anhand der Immunopräzipitation in Komplexen mit *Syntaxin 3* in der apikalen und mit *Syntaxin 4* an der basolateralen Plasmamembran assoziiert [Galli et al. (1998), Low et al. (1998, 2000, 2006)]. In unseren Untersuchungen war

lichtmikroskopisch der dominierende Anteil basolateral-plasmamembranär aber auch intrazellulär exprimiert (siehe Abb. 33 b). Es fand sich demgegenüber in der Histologie keine signifikante apikal-plasmamembranäre Lokalisation wie etwa für *Syntaxin 3*.

Das v-SNARE *Cellubrevin* wurde intrazellulär-vesikulär auf CaCo-2 vorgefunden [Galli et al. (1998)]. In unseren Betrachtungen kam es damit übereinstimmend in überwiegendem Anteil mit intrazellulärem Expressionsmuster vor (siehe Abb. 33 c).

Die vorgelegten Befunde zeigen, daß die SNARE-Proteine in endokrin und nicht-endokrin differenzierten Zellen *ubiquitär* exprimiert werden. Da die Polarisation der SNAREs und ihre damit verbundene Funktion im Stoffwechsel der Exozytose von der Differenzierung einer Zelle abhängt, könnte das unterschiedliche Expressionsmuster zwischen enteroendokrinen Zellen und den Enterozyten hierauf zurückzuführen sein. Vor allem die in Enterozyten plasmamembranär involvierten, membranassoziierten t-SNAREs *Syntaxin 3* und *SNAP 23* scheinen in endokrinen Zellen eine *Umverteilung in das intrazelluläre Kompartiment* zu erfahren, ähnlich wie es durch *Low et al.* für polarisierte Zellen nach Verlust des Zellkontaktes und für nicht-polarisierte Zellen beschrieben wurde [Low et al. (2000, 2006)]. Darüber hinaus ist dies ein weiterer Beleg dafür, daß sich die für den synaptischen Fusionskomplex in Neuronen zunächst beschriebene strenge Unterteilung zwischen vesikel- und zielmembrangebundenen SNAREs in Revision befindet [Kretschmar et al. (1996), Jahn & Südhof (1999), siehe Kap. 1.2]. So nehmen SNAREs vielmehr an transzellulären Stoffwechselwegen teil, die ein *plasmamembranär und intrazellulär überlappendes* Expressionsmuster bedingt [ter Beest et al. (2005)]. Darüber hinaus scheint eine fließende Umverteilung zwischen subzellulären Kompartimenten abhängig von der Zelldifferenzierung möglich zu sein [Zahouri et al. (2000), Jahn et al. (2003)].

4.7 SNARE-Expression in neuroendokrinen Tumoren (NET)

Die Erforschung der pathobiologischen Eigenschaften der *neuroendokrinen Tumore (NET)* [Capella et al. (1995), Kulke & Mayer (1999), Solcia et al. (2000), Klöppel et al. (2004)] sowie die Kenntnis der Physiologie ihrer endokrinen Sekretionsaktivität könnte zukünftig von klinisch-wissenschaftlicher Bedeutung sein. Beispielsweise konnte *Grabowski et al.* eine neuroendokrine Differenzierung in Kolonkarzinomen des Stadium III und IV als unabhängigen negativ-prognostischen Faktor korrelieren [Grabowski et al. (2000, 2004)].

Wie in der Einleitung ausgeführt und anhand der ermittelten Daten dieser Arbeit dargestellt, verfügen multiple (entero-)endokrine Zellen über den SNARE-Fusionskomplex [siehe Referenzen Tab. 2]. Bezüglich der Untersuchung der SNAREs in humanen gastrointestinalen

Tumoren und insbesondere der Entität der neuroendokrinen Tumore lagen bislang spärliche Daten vor. Bekannt ist beispielsweise, daß neuroendokrine Pankreastumore, die Neurotransmitter wie GABA sezernieren, über Analoga der neuronalen Vesikelproteine [Ahnert-Hilger et al. (1993, 1996)] verfügen. Nachweislich sind Schlüsselproteine der regulierten Sekretion wie etwa Synaptophysin, Synaptotagmin und die neuronalen SNARE-Homologa Syntaxin 1/2, VAMP 2 und SNAP 25 auf neuroendokrinen SLMV und LDCG diverser NET [Ahnert-Hilger et al. (1996), Schmitt-Gräff et al. (1997, 2001), Höcker et al. (1999)] sowie auf Primärzellkulturen [Glassmeier et al. (1997)] vorhanden. Ihre Expression kann in diesen Tumoren während der Karzinogenese sowohl herunterreguliert (VAMP, Cg A) oder sogar verstärkt exprimiert werden (SNAP 25, Sy 38) [Schmitt-Gräff et al. (1997)].

Die vorausgehende Datenlage sowie die anhand vorliegender Experimente dargelegte Expression von *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* in endokrinen pankreatischen und gastrointestinalen Zellen veranlassten die fortführende Frage, ob darüber hinaus etwa nicht-neuronal restringierte SNAREs als Schlüsselproteine in neuroendokrinen Tumoren relevant sein könnten.

Die Antigene *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* wurden in sämtlichen neunzehn der zur Untersuchung herangezogenen NET unterschiedlicher Lokalisation unabhängig von der Dignität [Solcia et al. (2000), Klöppel et al. (2004)] immunhistologisch vorgefunden (siehe Kap. 3.9, Tab. 26). Somit konnte das vermutete Vorkommen nonneuronaler SNAREs in NET bestätigt werden. *Erstmals* wurden demnach *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* in dieser Tumorentität nachgewiesen. Dieses Ergebnis lässt darüber hinaus spekulieren, daß ein größeres Spektrum an SNARE-Proteinen als bislang von *Ahnert-Hilger*, *Schmitt-Gräff* und *Glassmeier* beschrieben, als regulatorische Membranfusionsproteine in *humanen* neuroendokrinen Tumoren und neuroendokrinen Karzinomen involviert sein könnte [Ahnert-Hilger et al. (1996), Schmitt-Gräff et al. (1997), Glassmeier et al. (1997)]. Bei 13 der 19 Tumorgewebe trat eine Ähnlichkeit in der Expressionsintensität zwischen den SNARE-Proteinen und den neuroendokrinen Differenzierungsmarkern Synaptophysin und Chromogranin A auf (markierte Präparate). Eine konstante Korrelation zwischen einem der beiden neuroendokrinen Marker und den betrachteten SNAREs (z. B. starke Expression von Sy 38 korreliert immer mit hoher Antigenintensität von SNAP 23) konnte visuell *nicht* festgestellt werden. Die enge Korrelation zwischen NET-Markern und SNAREs in den Tumorpräparaten weist aber darauf hin, daß sie möglicherweise gemeinsame Aufgaben der regulierten neuroendokrinen Sekretion wahrnehmen und in diesen Tumoren vermutlich noch eine weitgehend erhaltene Struktur des Sekretionsapparats vorliegt. Darüber hinaus könnte

die Aktivierung nonneuronaler SNAREs - ähnlich der verstärkten Expression von Synaptophysin in hochmalignen kleinzelligen Tumoren - ebenso als Folge der neoplastischen Transformation zu interpretieren sein [Ahnert-Hilger et al. (1996)]. Während der Onkogenese können nämlich embryonale Differenzierungsstadien der Zellen reaktiviert [Gordon et al. (1993), Wick MR (2000), Brittan & Wright (2004)] und neuroendokrine Eigenschaften in Tumorentitäten wie z. B. kolorektalen Karzinomen vorgefunden werden [Grabowski et al. (2000, 2004)]. Eine Korrelation der SNARE-Expression mit dem Differenzierungsgrad der Tumore [Klöppel G (1997)] anhand der Ki 67 Antigen-markierten Proliferationsfraktion (→ MIB-1 Ak) sowie eine weitere Einordnung der betrachteten Tumorgewebe seitens der WHO-Klassifikation 2000 [Solcia et al. (2000)] erschien aufgrund ihrer geringen Anzahl und Diversität nicht sinnvoll. Zudem entstammten die retrospektiv betrachteten pathologischen Gutachten der NET aus den Jahren 1993 - 2001 größtenteils aus der Zeit vor der Revision der Klassifikation. Die Korrelation von SNARE-Expression mit dem Differenzierungsgrad könnte aber, wie Helpap & Köllermann zeigten, für weiterführende Studien durchaus von Interesse sein. Je höher die MIB-1 Proliferationsaktivität eines NET oder neuroendokrinen Karzinoms, desto niedriger war die Expression des neuroendokrinen Markers Cg A, es lag also eine inverse Beziehung zwischen diesen vor [Helpap & Köllermann (2001)].

In der semiquantitativen Auswertung der histologischen Befunde fiel auf, daß vier NET des Magens und Dünndarms (Nr. 10, 13 - 15) eine überaus starke Antigenintensität (++++) für *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* aufwiesen (siehe Abb. 46). Interessanterweise wurde exakt für diese vier neuroendokrinen Neoplasien in den vorliegenden pathologischen Ausgangsbefunden immunhistologisch eine positive Serotoninexpression gesichert. Neuroendokrine Tumore, vor allem des Jejunums und Ileums, verfügen - im Falle einer hepatischen Metastasierung - über die Fähigkeit, eine klinisch relevante Menge des in SSV-Analoga gespeicherten biogenen Amins *Serotonin* in die Zirkulation freizusetzen. Hierdurch kann bei ca. 10% der Patienten [Schmitt-Gräff (2001), Scherübl et al. (2003)] ein sog. *Karzinoidsyndrom* [Thorson et al. (1954)] verursacht werden (siehe Kap. 1.10).

Die übermäßig starke Expression dieser SNAREs könnte also auch möglicherweise mit einer klinisch evidenten endokrinen Aktivität zusammenhängen. Ein Abgleich mit klinischen Daten wiederum wurde in dieser Dissertation nicht vorgenommen. Es lässt sich nunmehr aufgrund der histologischen Befunde postulieren, daß die nonneuronalen SNAREs *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* speziell an der *regulierten Serotoninsekretion aus SLMV* beteiligt sein könnten. Unter klinischen Gesichtspunkten könnte man die Hypothese aufstellen, daß die inhibitorische Beeinflussung des SNARE-Zyklus einen therapeutischen Ansatz der

Behandlung funktioneller neuroendokriner Tumore und des damit verbundenen Karzinoidsyndroms darstellten könnte. Diesbezüglich wird die Korrelation mit klinischen Daten in Zukunft von großem Interesse sein.

Auf subzellulärer Ebene wiesen die drei SNARE-Proteine in NET einheitlich ein intrazelluläres Verteilungsmuster mit granulär-vesikulären Strukturen und subplasmamembranärer Anreicherung auf. Diese Beobachtung stimmt mit dem in dieser experimentellen Arbeit vorausgehend beobachteten endomembranären Expressionsmuster in anderen endokrinen Zelltypen der Darmmukosa und Inselzellen überein. Das überwiegend vesikelassoziierte *Cellubrevin* sowie auch die integralen Membranproteine *Syntaxin 3* und *SNAP 23* scheinen also in *endokrinen Zellen prädominierend rein intrazellulär* im endomembranären Kompartiment oder zytoplasmatisch lokalisiert zu sein. Hierzu wird auch auf die detaillierte Ausführung in Kap. 4.6 verwiesen. Um die subzelluläre Lokalisation der SNAREs in neuroendokrinen Zellen differenziert zu analysieren, wurden ergänzende Immunfluoreszenzstudien an neuroendokrinen BON-Zellen durchgeführt (siehe Kap. 4.8).

Die folgende Tabelle 31 fasst die immunhistologischen Ergebnisse der in den Kapiteln 3.2 bis 3.9 beschriebenen SNARE-Proteinexpression in hepatopankreatischen und gastrointestinalen Geweben sowie neuroendokrinen Tumoren übersichtlich zusammen.

Tab. 31: Tabellarische Zusammenfassung der immunhistologischen Befunde der Proteinexpression von *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin*.

Zelltyp:	Lokalisation der untersuchten SNAREs:		
	Syntaxin 3	SNAP 23	Cellubrevin
A-Zelle	IZ	∅ / IZ (?)	IZ
B-Zelle	IZ	∅ / IZ (?)	IZ
D-Zelle	IZ	∅ / IZ (?)	IZ
Azinuszelle	PM > IZ	PM > IZ	IZ
Hepatozyt	∅	IZ = PM	IZ
Kupffer-Zelle	∅	IZ	∅
NEZ des GIT	IZ	IZ	IZ
Enterozyt	PM > IZ	IZ = PM	IZ > PM
NET	IZ	IZ	IZ

Erklärung: ∅ → nicht vorhanden, IZ → intrazellulär, PM → plasmamembranär,
(?) → fragliche Expression, > = < → Angabe der subzellulären Signalintensität

4.8 Syntaxin 3, SNAP 23 und Cellubrevin in HT-29 und BON-Zellen

Aufgrund der herausragenden physiologischen Stellung *neuroendokriner Zellen* [siehe Kap. 1.8.1, 1.8.2] ist die Rolle der SNARE-induzierten Membranfusion als Grundlage der

Sekretionsvorgänge von großer Bedeutung [Ludger & Galli (1998), Südhof TC (1995, 2004)]. Lediglich die Expression der Komponenten des *neuronalen* SNARE-Komplexes (Syntaxin 1, SNAP 23 und VAMP 2) wurde in endokrinen PC-12 und enteroendokrinen STC-Zellen bereits gut studiert [Chilcote et al. (1995), Némoz-Gaillard et al. (1998), Wendler et al. (2001), Ann & Almers (2004)]. Zur definierten subzellulären Verteilung der SNAREs *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* in neuroendokrinen Zellen existierten bislang keine fundierten Daten. Neben der in den vergangenen Kapiteln erörterten Detektion dieser SNARE-Antigene im Gewebe, sollte deren subzelluläre Lokalisation in endokrinen Zellen durch weitere Immunfluoreszenzanalysen spezifiziert werden. Hierzu wurde repräsentativ die *humane neuroendokrine Zelllinie BON* ausgewählt. Vergleichend wurde die epitheliale nicht-neuroendokrin differenzierte Kolonkarzinomzelle HT-29 [Fogh et al. (1977)] zur Untersuchung herangezogen. BON-Zellen stellen eine etablierte Zelllinie aus einem funktionell aktiven neuroendokrinen metastasierten Pankreaskarzinoid dar [Evers et al. (1991)] und sind ein geeignetes Modellsystem, um neuroendokrine Eigenschaften zu studieren. Sie sezernieren Synaptophysin- und Serotonin-haltige neuroendokrine Vesikel (SLMV) und Chromogranin A-haltige Granula (LDCV) (siehe Abb. 6 a).

Die vorliegenden Immunfluoreszenzerggebnisse belegen die Präsenz der Fusionsproteine *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* sowohl in HT-29 als auch in BON (siehe Kap. 3.10.1, Tab. 27, Abb. 47). Die Fluoreszenzintensität der SNAREs war in BON-Zellen jedoch deutlich stärker ausgeprägt, was auf deren prädominierend neuroendokrine Eigenschaften verweist.

Ursprünglich wurde *Syntaxin 3* als sog. t-SNARE-Protein eine reine plasmamembranäre Expression zugewiesen [Bennett et al. (1992, 1993)]. Mittlerweile wurde diese Einordnung durch mehrere Autoren revidiert, nachdem *Syntaxin 3* anteilig plasmamembranär aber auch intrazellulär vorzufinden war [Gaisano et al. (1996 a), Low et al. (1996), Hansen et al. (1999), Band & Kuismanen (2005)]. Funktionelle und morphologische Analysen weisen seiner Anordnung auf intrazellulären Strukturen eine Aufgabe im Transport zwischen dem TGN und der Plasmamembran zu [Hansen et al. (1999), Band & Kuismanen (2005)]. Auch in BON-Zellen als Korrelat neneuroendokriner Zellen ließ sich *Syntaxin 3* fluoreszenzmikroskopisch etwa zu gleichen Anteilen im intrazellulären Kompartiment und plasmamembranär identifizieren (siehe Abb. 47 a). Somit findet die in der Literatur erwähnte Anordnung in epithelialen Zellen auch für die neuroendokrin-differenzierte Zelle Bestätigung. In HT-29 war seine intrazellulär-granuläre Verteilung deutlich schwächer.

SNAP 23 war vorbefundlich in Epithelzellen in der apikalen und basolateralen Domäne der Plasmamembran anzutreffen [Low et al. (1998)]. Darüber hinaus fand es sich in geringen

Anteilen auch im endosomalen und lysosomalen Kompartiment polarisierter Epithelzellen [Leung et al. (1998), Chen & Whiteheart (1999), Rao et al. (2004)], wo es an der konstitutiven Exozytose beteiligt sein könnte. Das integrale Membranprotein *SNAP 23* zeigte in neuroendokrin-differenzierten BON-Zellen übereinstimmend mit den genannten Publikationen ein charakteristisches membranständiges Expressionsmuster mit geringeren intrazellulären Anteilen (siehe Abb. 47 b). In HT-29 war *SNAP 23* in deutlich schwächerer Signalintensität als in BON und vornehmlich plasmamembranär anzutreffen. Dabei wurden keine signifikante intrazelluläre Anfärbungen beobachtet.

Subzellulär kommt das v-SNARE *Cellubrevin* nahezu ausschließlich auf intrazellulären Vesikel- und Granulamembranen vor [McMahon et al. (1993)]. Da ihm eine Aufgabe im Vesikelrecycling und in der Endozytose zukommt, ist es insbesondere in der apikalen und basolateralen endosomalen Fraktion [Stegmaier et al. (2000)] aber auch in der Region des Golgi-Apparates und des ER anzutreffen [Galli et al. (1994, 1998), 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)]. *Cellubrevin* war - dieser genannten subzellulären Lokalisation entsprechend - in BON-Zellen mit einer intrazellulär-perinukleär betonten Fluoreszenz vorzufinden, womit sich seine Präsenz im intrazellulären Kompartiment, z. B. den Endosomen des konstitutiven Vesikelzyklus, vermuten lässt. Einhergehend demarkierte es sich dezent plasmamembranär (siehe Abb. 47 c), was für intrazelluläre Transportvorgänge zur Plasmamembran sprechen könnte. Auch für HT-29 ließ sich diese subzelluläre Lokalisation nachvollziehen, allerdings in deutlich schwächerer Signalintensität.

Überraschenderweise wurde in der Immunfluoreszenz an der BON-Zellkultur gegenüber den beobachteten histologischen APAAP-Befunden an enteroendokrinen mukosalen Zellen für *Syntaxin 3* und *SNAP 23* aber auch *Cellubrevin* ein *divergentes Verteilungsmuster* erhoben - siehe Abb. 28 und 31 versus Abb. 47. Immunhistologisch lagen sie nämlich in enteroendokrinen Zellen entlang des gesamten gastrointestinalen Mukosa einheitlich intrazellulär, mit polarisierter Lokalisation im basalen Anteil der Zellen vor. Es traten *keine plasmamembranären* Anfärbungen auf. Möglicherweise geschieht in endokrinen Zellen diese offensichtliche SNARE-Umverteilung nach intrazellulär im Rahmen der Entstehung von Membrankontakten und Polarisierung im Epithelverband sowie einhergehender Aufnahme der endokrinen Sekretion. Wie bereits im Kap. 4.6 erörtert, scheint für *endokrine* Zellen, anders als für nicht endokrin-differenzierte Zellen wie MDCK-Zellen [Low et al. (2000, 2006)], welche SNAREs bei *Zellkontaktverlust* nach intrazellulär verlagern, erst im

endokrinen Epithelverband eine Umverteilung von *Syntaxin 3* und *SNAP 23* und gewissermaßen auch von *Cellubrevin* in basale *intrazelluläre Kompartimente* stattzufinden.

4.9 Subzelluläre Lokalisation der SNAREs in SLMV und LDCV der BON-Zelle

Wie in dieser Arbeit bereits ausgeführt (siehe Kap. 1.8.1, 1.10, 4.7), nehmen die zwei differenten Vesikeltypen SLMV und LDCV mit den auf ihrer umgebenden Membran assoziierten Fusionsproteinen in neuroendokrinen Zellen und neuroendokrinen Tumoren eine zentrale Stellung in der Sekretion von Neuropeptiden, Hormonen und Neurotransmittern ein [Ahnert-Hilger et al. (1996), Höcker & Wiedenmann (1998), Schmitt-Gräff (1997, 2001)].

In der Vergangenheit wurde zunehmend deutlich, daß für die regulierte Sekretion dieser Vesikel und Granula SNARE-Proteine von essentieller Bedeutung sind [Scales et al. (2001), Bonifacino & Glick (2004), Südhof (2004), Vikman et al. (2006)]. Da *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* in den vorgestellten Ergebnissen unter anderem charakteristische endokrine Eigenschaften aufwiesen, war es von Bedeutung, ihre mögliche Assoziation mit neuroendokrinen sekretorischen Vesikeln (SLMV) und Granula (LDCV) in BON-Zellen zu eruieren.

Durch Doppelfluoreszenzuntersuchungen der fokussierten SNARE-Antigene mit dem etablierten neuroendokrinen LDCV-Matrixprotein Chromogranin A [Moorghen & Carpenter (1991)] sowie dem integralen Vesikelmembranprotein Synaptophysin 38 [Wiedenmann & Franke 1985] konnten indirekt Rückschlüsse auf deren Zuordnung zu diesen subzellulären Kompartimenten gezogen werden (siehe Kap. 3.10.2, Abb. 48 – 52, Tab. 28).

Anhand der beobachteten Kolo-kalisation von *Syntaxin 3* und *Cellubrevin* mit Synaptophysin 38 und Chromogranin A (siehe Abb. 48, 49, 52, 53) ließ sich postulieren, daß diese SNARE-Antigene sowohl in den Fusionszyklus der Granula (LDCV) als auch in die Vesikelsynthese der perinukleär lokalisierten SLMV neuroendokriner Zellen integriert zu sein scheinen. Es wäre vorstellbar, daß *Syntaxin 3* - ähnlich wie es für *Syntaxin 6* von *Wendler* beschrieben wurde - eine Aufgabe im Transport unreifer sekretorischer Granula erfüllt [Wendler et al. (2001)] oder bei Vesikeldocking und -fusion zwischen TGN und Plasmamembran interagiert [Hansen et al. (1999), Band & Kuismanen (2005)]. Vorausgehende Untersuchungen lokalisierten *Cellubrevin* subzellulär als Bestandteil der Insulin-enthaltenden *secretory granules* in endokrinen B-Zellen des Rattenpankreas, den GABA-haltigen synaptic-like microvesicles [Jacobsson et al. (1994), Regazzi et al. (1995), Wheeler et al. (1996)] und ebenso auf den LDCV und SLMV der Rattenphäochomozytomzelllinie PC-12 [Chilcote et al. (1995), Ann & Almers (2004)].

Diese Präsenz auf sekretorischen Granula und Vesikeln in endokrinen Zellen lässt sich nun für *Cellubrevin* anhand der vorgelegten Daten in BON-Zellen auch auf *humane* neuroendokrine Zellen erweitern. Es könnte somit postuliert werden, daß die per definitionem nonneuronalen SNAREs *Syntaxin 3* und *Cellubrevin* als Bestandteil der LDCV und SLMV in SNARE-vermittelte endokrine Sekretionsvorgänge einer Vielzahl humaner neurosekretorischer Zellen eingebunden sind.

SNAP 23 wurde mit Synaptophysin 38 in dessen typischem perinukleären Expressionsmuster doppellokalisiert angetroffen und scheint demnach ebenso in den Zyklus neuroendokriner Vesikel eingebunden zu sein (siehe Abb. 51). Mit dem LDCV-Marker Chromogranin A wiederum fand sich *SNAP 23* in ähnlicher regionärer subzellulärer Lokalisation, war aber in der Doppelfluoreszenz nicht auf den Cg A-markierten Granula zu kolokalisieren (siehe Abb. 50). Hieraus resultierend lässt sich ableiten, daß *SNAP 23* offensichtlich in neuroendokrinen Zellen auf den intrazellulären Kompartimenten der SLMV vorzufinden ist, demgegenüber jedoch nicht in die Granulaexozytose der LDCV einbezogen zu sein scheint.

Besonders hervorzuheben ist, daß alle *drei SNAREs gemeinsam auf SLMV präsent sind* und daher vermutlich in der Serotoninsekretion der BON-Zellen eine Rolle spielen. Diese Aussage komplettiert und bestätigt die vorangehenden Befunde, wonach *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* in serotoninsezernierenden EC-Zellen des Darms (siehe Kap. 4.6) wie auch in den serotoninexprimierenden NET (siehe Kap. 4.7) nachgewiesen wurden. Demnach scheinen sie insbesondere in *Sekretionsvorgänge des biogenen Amins Serotonin involviert* zu sein.

4.10 Modell eines SNARE-Fusionskomplexes der SLMV in humanen NEZ

Die in Kapitel 4.5 bis 4.9 ausgeführten Beobachtungen erweitern die bislang vermutete zentrale Stellung *neuronaler* SNARE-Proteine im synaptischen Fusionskomplex der SLMV und LDCG der endokrinen und neuroendokriner Zellen [Nemoz-Gaillard et al. (1998), Schmitt-Gräff et al. (2001), Ann & Almers (2004)]. Zentraler Gesichtspunkt dieser Dissertation war der erstmalige Nachweis der *Existenz drei weiterer, nonneuronaler SNAREs Syntaxin 3, SNAP 23 und Cellubrevin in humanen neuroendokrinen Zellen.*

Die Befunde an BON-Zellen bekräftigen die vorausgehend gelungene Darstellung dieser Antigene in *humanen* endokrinen Inselzellen, neuroendokrinen Zellen entlang der gesamten gastrointestinalen Mukosa und humanen neuroendokrinen Tumorzellen. Demnach sind *Syntaxin 3, SNAP 23 und Cellubrevin (VAMP 3)* offensichtlich in multiple Sekretionsvorgänge endokriner pankreatischer und gastrointestinaler Zellen eingebunden. Beispielsweise können hier die ECL-Zellen oder EC-Zellen [Höhne-Zell et al. (1997), Höcker

et al. (1999)] sowie die Betazellen des Pankreas [Vikman et al. 2006]] angeführt werden, die neben Syntaxin 1, SNAP 25, VAMP 2 zahlreiche weitere SNAREs zu enthalten scheinen. Die Ergründung funktioneller Gesichtspunkte könnte Ziel weiterer Untersuchungen sein. Auf subzellulärer Ebene konnten *die genannten Proteine auf den synaptic-vesicle-like-microvesicles (SLMV) der neuroendokrinen Zelle lokalisiert werden.*

Aufgrund dieser gewonnenen histomorphologischen Erkenntnisse kann das bekannte SNARE-Modell für die neuroendokrine Zelle des *humanen* Gastrointestinaltrakts wie folgt spezifiziert dargestellt werden:

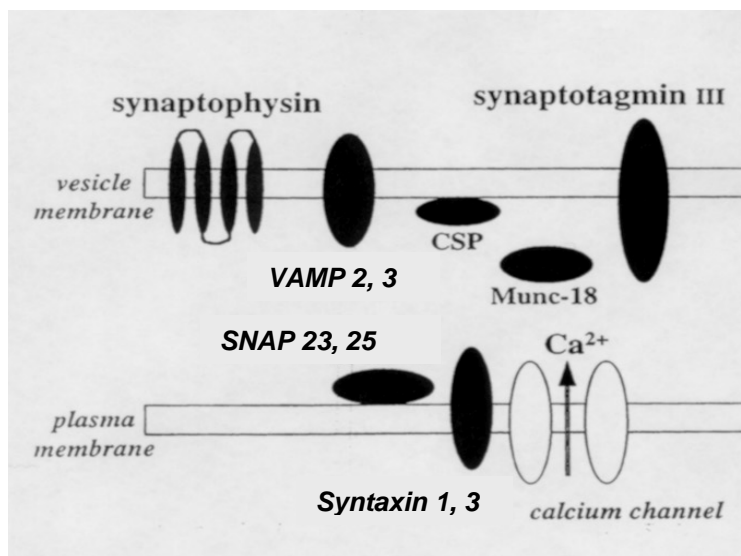


Abb. 61:

Mögliche Zusammensetzung der SNARE-Vesikelproteine auf den SLMV der neuroendokrinen Zellen entlang des humanen Gastrointestinaltrakts. [modifiziert nach Zhao et al. (1997)]

4.11 Proteinexpression der SNAREs in transform. Zelllinien des GIT, IEC-6 und HeLa

Die neun im Western Blot analysierten transformierten *humanen* Adenokarzinomzelllinien des Pankreas (Panc-1, Capan-1), der Leber (PLC), des Magens (MKN-28, MKN-45, AGS, KATO-3) und des Kolons (CaCo-2, HT-29) exprimierten allesamt die SNARE-Antigene *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* in unterschiedlicher Intensität (siehe Kap. 3.11, Tab. 29, Abb. 54 – 56). Darüber hinaus wurden *Syntaxin 3* und *SNAP 23* in der nicht-transformierten Dünndarmepithelzelllinie der Ratte IEC-6 vorgefunden. Der Nachweis von *Cellubrevin* war in IEC-6 aufgrund der Speziesspezifität des Antikörpers nicht möglich.

Diese Ergebnisse bestätigen, daß die Expression der SNARE-Proteine und damit der SNARE-Fusionskomplex nicht auf neuronale Zellen restringiert ist [Bennett et al. (1993), McMahon et al. (1993), Ravichandran et al. (1996)], sondern einen ubiquitären Mechanismus einer Vielzahl gastrointestinaler epithelialer Zellen unterschiedlicher Differenzierung sowie maligner und nicht-maligner Transformation darstellt [Galli et al. (1998), Gaisano et al.

(1999), Jöns et al. (1999), Low et al. (2000)]. Der SNARE-Membrankomplex scheint während der Karzinogenese erhalten zu bleiben [David et al. (1993), Weber et al. (1998)] und es liegen visuell keine signifikanten Unterschiede im Expressionsniveau der SNAREs *Syntaxin 3* und *SNAP 23* in nicht-transformierten IEC-6-Zellen im Vergleich zu den untersuchten transformierten Zelllinien vor. Alternativ gilt es zu berücksichtigen, daß auch infolge der multidirektionalen Zelldifferenzierung während der onkogenen Transformation neuroendokrine Merkmale potenziell wieder auftreten können [Wick MR (2000), Brittan & Wright (2004)]. Neuroendokrine Eigenschaften - wie z. B. die Expression von Vesikelproteinen - sind daher auch in nahezu allen Adenokarzinomen inkonstant anzutreffen [Grabowski et al. (2000)].

In Fibroblasten wurde *SNAP 23* als Bestandteil des Vimentin-assoziierten Membranpools [Faigle et al. (2000)] und *Cellubrevin* in *early endosomes* vorgefunden [Mallard et al. (2002)]. Auch in unserer Western Blot-Analyse wurden *Cellubrevin* und *SNAP 23* in HeLa-Zellen proteinbiochemisch vorgefunden. Dabei war für *Cellubrevin* ein relativ hohes Expressionsniveau zu beobachten (β -Aktinratio 1,0). Ergänzend wiesen unsere immunhistochemischen Befunde diese SNARE-Antigene in Fibroblasten des mukosalen und submukosalen Bindegewebes nach (siehe Kap 3.6.2). *Syntaxin 3* hingegen schien in Fibroblasten in unwesentlicher Proteinkonzentration in HeLa im Western Blot exprimiert und darüber hinaus in der gastrointestinalen Mukosa in keinem signifikanten immunhistochemischen Expressionsniveau vorhanden.

Beim Proteinnachweis im Western Blot Verfahren demarkierte sich für *Cellubrevin* eine *zweite immunreaktive Bande* (siehe Abb. 56). Durch die unterschiedliche Länge der N-terminalen Peptidsequenzen zwischen VAMP 1 und 2 gegenüber dem niedermolekularen *Cellubrevin (VAMP 3)* [McMahon et al. (1993)] ist eine mögliche Kreuzreaktion dieser Proteine nahezu ausgeschlossen. Ebenso ist ein Präparationsartefakt aufgrund der sorgfältigen Behandlung der Zellen unter Kühlung unwahrscheinlich. Aus der vorliegenden Literatur konnte kein evidenter Hinweis zur Klärung herangezogen werden. Da eingangs (siehe Kap. 3.1) die Spezifität für *Cellubrevin* nachgewiesen wurde, gingen wir von einem spezifischen Signal aus. Somit könnte es sich entweder um eine Isoform geringeren Molekulargewichts, eine posttranslationale Modifikation des Proteins wie z. B. durch Palmitoylierung [Veit et al. (2000)] oder etwa um ein proteolytisches Degradationsprodukt handeln.

4.12 Proteinexpression der SNAREs in endokrinen und neuroendokrinen Zelllinien

Bislang erfolgte der Nachweis neuronaler, vereinzelt auch nonneuronaler SNARE-Proteine in endokrinen und neuroendokrinen Zellmodellen wie etwa den Betazelllinien RIN, HIT und QGP-1 der Ratte [Wheeler et al. (1996), Kang et al. (2002), Vikman et al. (2006)], serotonin-speichernden neuroendokrinen BON-Zellen [Ahnert-Hilger et al. (1996)] und STC-Zellen. [Nemoz-Gaillard et al. (1998)] (siehe Tab. 17). Bei den endokrinen chromaffinen PC-12 Zellen des Phäochromozytoms der Ratte handelt es sich um das besterforschte Konstrukt endokriner Zellen. Auch hier sind multiple Vesikelfusionsproteine wie die SNAREs charakterisiert [Banerjee et al. (1996), Wendler et al. (2001)] und deren funktionelle Aktivität in der endokrinen Sekretion in diesen Zellen belegt worden [Ann & Almers (2004)].

Um unsere vorgelegten histologischen Ergebnisse an neuroendokrinen Zellen zu ergänzen, wurde der Proteinnachweis im Western Blot für *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* repräsentativ an drei neuroendokrinen Zelllinien vorgenommen (siehe Abb. 54 – 56, Tab. 30): an transformierten Zellen des humanen Pankreaskarzinoids (BON) (siehe Kap. 4.8, 4.9), des humanen Inselzellkarzinoms (QGP-1) und der vorausgehend erwähnten permanenten Phäochromozytomzelllinie (PC-12). Anschließend wurde der ermittelte Proteingehalt jedes Antigens in Relation zum β -Aktiningehalt quantifiziert und in den graphischen Darstellungen Abb. 58 - 60 für alle untersuchten Zelllinien vergleichend visualisiert.

Die untersuchten SNARE-Antigene wurden allesamt in diesen drei endokrinen Zelllinien proteinbiochemisch identifiziert. In BON-Zellen wurden sie bereits vorausgehend fluoreszenzmikroskopisch in Kap. 4.8 und 4.9 detektiert. Der Western Blot bestätigt ihre Präsenz und somit auch diese vorgelegten Daten. Lediglich der Nachweis von *Cellubrevin* in PC-12 ließ sich aufgrund der humanen Antikörperspezifität nicht führen. Als hervorragender Befund wies *Syntaxin 3* in der Western Blot Analyse gegenüber den gastrointestinalen Adenokarzinomzelllinien und auch im Vergleich zu *SNAP 23* und *Cellubrevin* eine überaus hohe relative Proteinexpression in den funktionellen endokrinen Zellen BON und PC-12 (rel. Proteinexpression 11 bzw. 64) auf. Klonale BON-Zellen [Evers et al. (1991)] synthetisieren Chromogranin A, Pankreastatin und das biogene Amin Serotonin. Neuronale PC-12-Zellen [Greene & Tischler (1976)] sezernieren die Katecholamine und Neurotransmitter Dopamin und Norepinephrin sowie GABA und speichern diese in sekretorischen Granula (LDCV) und Vesikeln (SLMV) [Banerjee et al. (1996), Ahnert-Hilger (1996)]. Die außerordentlich hohe Expression von *Syntaxin 3* in diesen beiden transformierten endokrinen Zellen unterstreicht seine offensichtlich dominierenden neuroendokrinen Eigenschaften. Die nonfunktionelle Inselzellkarzinomzelllinie QGP-1 [Kaku et al. (1980)] produziert Chromogranin A und dessen

Prozessierungsprodukt Pankreastatin, verfügt aber über keine evidente endokrine Sekretion in der Zellkultur. In QGP-1 war im Vergleich zu BON und PC-12 eine deutlich geringere Proteinexpression für *Syntaxin 3* anzutreffen. Aus diesem Grunde könnte man postulieren, daß *Syntaxin 3* vorwiegend in den dynamischen SNARE-Zyklus der aktiven Sekretion biogener Amine wie Serotonin oder Dopamin eingebunden ist. Der Schwerpunkt der Antigenexpression von *Syntaxin 3* scheint anhand unserer Western Blot Untersuchungen in endokrin-differenzierten Epithelzellen zu liegen. Diese Beobachtung wird darüber hinaus durch die vorangehenden immunhistologischen Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit gestützt, wonach dieses *t-SNARE* gegenüber den Antigenen *SNAP 23* und *Cellubrevin* in NEZ des Gastrointestinaltrakts und des Pankreas quantitativ häufiger angetroffen wurde sowie eine stärkere Färbeintensität aufwies und auch zahlreicher mit neuroendokrinen Markern kolokalisierte (siehe Kap. 3.2.1 und Kap. 3.6 - 3.10).

Für *SNAP 23* wurde im Vergleich aller untersuchten Zelllinien im Proteinnachweis in den funktionell aktiven endokrinen Zelllinien BON und PC-12 keine erhöhte relative Expression gegenüber den betrachteten nicht-endokrin differenzierten Epithelzellen nachgewiesen. Vielmehr war die quantitativ größte relative Proteinexpression (rel. Proteinexpression 1,9) für *SNAP 23* in QGP-1 anzutreffen. Diese verfügen, wie bereits erwähnt, über keine wesentliche enteroendokrine Sekretion in der Zellkultur. Somit könnte dieser Befund auch im Rahmen anderer zellphysiologischer Eigenschaften begründet sein.

Die Detektion des endogenen Vesikelproteins *Cellubrevin* erfolgte in BON und QGP-1. Für PC-12-Zellen, deren Cellubrevingehalt bekannt ist [Chilcote et al. (1995)], war aufgrund der humanen Antikörperspezifität keine Western Blot-Analyse möglich.

Für *Cellubrevin* fand sich innerhalb aller zur Untersuchung herangezogenen Zelllinien der höchste Proteingehalt (rel. Proteinexpression 1,18) in BON-Zellen. Hiermit wird nochmals die mögliche zentrale Position des *Cellubrevins* im neuroendokrinen Vesikelzyklus - beispielsweise im Rahmen der Endozytose, des Vesikelrecyclings oder membrangebunden auf SLMV - deutlich, wie sie zum Beispiel für PC-12 beschrieben wurde [Chilcote et al. (1995)]. Der Proteinnachweis von *Cellubrevin* und *SNAP 23* an kultivierten endokrinen Zellen ist kongruent mit ihrem bereits in den vorausgehenden Kapiteln erörterten histologischen Vorkommen in neuroendokrinen Zellen und NET.

Zusammenfassend wurde der Proteinnachweis von *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* in klonalen Zellen humaner und nicht-humaner neuroendokriner Differenzierung erbracht. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse erscheinen die neuroendokrinen Eigenschaften von *Syntaxin 3* am ausgeprägtesten.

4.13 Nachweis der SNAREs in mukosaassoziierten Zellen

Die eingesetzten SNARE-Antigene waren in einer Vielzahl mukosal und submukosal gelegener, interstitieller Zellen anzutreffen (siehe Abb. 34 a, b), deren Spezifizierung ein weiteres Ziel unserer Untersuchungen war und deren Ergebnisse in Kap. 3.8 zusammengefasst wurden.

Die gastrointestinale Mukosa und das darmeigene lymphatische Gewebe stellen ein hoch spezialisiertes Immunsystem des Körpers dar und können folglich an der Genese inflammatorischer und immunologischer gastrointestinaler Erkrankungen pathogenetisch beteiligt sein [Wittig & Zeitz (2003)]. In vielen mukosaassoziierten Zelltypen des Immunsystems interagieren SNAREs als Membranfusionsproteine. Beispielsweise nehmen sie bei der Phagozytose durch Makrophagen [Hackam et al. (1998), Coppolino et al. (2001), Mollinedo (2003)], der Leukozytenaktivierung [Brumell et al. (1995)] oder der regulierten Exozytose im Rahmen der Mastzelldegranulation [Moqbel & Lacy (1999), Blank et al. (2001)] vermutlich eine zentrale Position ein. Jede dieser spezialisierten Zelllinien weist - obwohl es sich hier im Gegensatz zu den im Epithelverband wachsenden Zellen um nicht-polarisierte Zellen handelt - eine charakteristische Zusammensetzung an SNARE-Proteinen auf. Diese ist Tab. 2 zu entnehmen und wurde eingangs in Kap. 1.12 für unsere SNARE-Proteine *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* dezidiert beschrieben. Die Ermittlung weiterer Daten über die Existenz von SNAREs in diesen genannten Zelltypen könnte von außerordentlicher medizinisch-wissenschaftlicher Bedeutung sein, da sie in die Entstehung inflammatorischer und immunologischer Prozesse im Rahmen gastrointestinaler Erkrankungen auf zellulärer Ebene involviert sein könnten.

Gemeinsam ist Mastzellen sowie basophilen und eosinophilen Granulozyten, daß sie inflammatorisch wirksame biogene Amine wie Serotonin, Histamin und Heparin in Granula (LDCG) und Vesikeln (SLMV) enthalten, die sie im Rahmen der SNARE-vermittelten *Compound Exozytose* [Alvarez de Toledo & Fernandez (1990), Pickett & Edwardson (2006)] (siehe Kap. 1.6) auf einen exogenen Stimulus hin freisetzen können [Galli & Lantz (1998), Moqbel & Lacy (1999), Castle et al. (2001)]. Um die SNARE-Expression in Mastzellen zu untersuchen, wurden Gefriergewebe des mastzellreichen Magenfundusgewebes immunhistologisch aufgearbeitet (siehe Kap. 3.8) sowie einhergehend der Proteinnachweis in den basophilen Leukämiezelllinien *RBL-2H3* und *KU-812* (siehe Kap. 3.11) durchgeführt. Die genannten basophilen Zelllinien dienen aufgrund ihrer ähnlichen phänotypischen und zellbiologischen Eigenschaften wie etwa der Sekretion gemeinsamer Mediatoren als etabliertes Mastzelläquivalent [Falcone et al. (2000)]. Insbesondere *SNAP 23* wird

zellexperimentell eine zentrale Position in der regulierten Mastzelldegranulation in RBL2-H3 [Guo et al. (1998), Vaidyanathan et al. (2001), Hepp et al. (2005)] und KU-812 [Shukla et al. (2001)] zugeschrieben. Darüber hinaus liegen auch für *Syntaxin 3* [Hibi et al. (2000), Pombo et al. (2003)] und *Cellubrevin* [Lacy et al. (1995), Paument et al. (2000)] in weiteren Publikationen Anhaltspunkte für die Beteiligung an der Mastzellexozytose vor.

Anhand des Western Blot-Verfahrens (siehe Kap. 3.11, Tab. 30, Abb. 54 - 56) erwies sich die Antigendetektion für *Syntaxin 3* und *SNAP 23* sowohl in der basophilen Leukämiezelllinie RBL-2H3 der Ratte als auch in der *humanen* basophilen Leukämiezelllinie KU-812 als positiv. Darüber hinaus konnte das Antigen *Cellubrevin* mit geringer Intensität in humanen KU-812-Zellen vorgefunden werden. In RBL2-H3 der Ratte konnte es aufgrund der fehlenden Kreuzreaktivität des verwendeten Antikörpers nicht nachgewiesen werden. Somit werden durch unsere Untersuchungen die bereits in der Literatur existierenden Daten über das Vorhandensein von SNARE-Proteinen in RBL-Zellen der Spezies Ratte [Blank et al. (2001), Pombo et al. (2003)] bestätigt und um die Befunde der Präsenz von *Syntaxin 3* und *Cellubrevin* in *humanen* basophilen KU-812 Leukämiezellen [Shukla et al. (2001)] ergänzt.

Der immunhistologische *in-situ-Nachweis* dieser Antigene durch Doppelfluoreszenz mit den Mastzellmediatoren Tryptase und Chymase [Schwartz et al. (1987)] ergab unerwartet, daß sich lediglich *Syntaxin 3* mit den Mastzellproteasen Tryptase und Chymase kolokalisieren ließ. Hierbei war zu beobachten, daß ca. 80-90% der Tryptase-positiven Mastzellen mit *Syntaxin 3* kolokalisierten, jedoch nur etwa 30% der Chymase-markierten (siehe Kap. 3.8, Tab. 25, Abb. 40, 41). Es gab darüber hinaus *Syntaxin 3*-signalpositive interstitielle Zellen, die keine Doppellokalisierung mit diesen Mastzellmarkern erbrachten. Hier ist also anzunehmen, daß es sich um eine weitere Zellpopulation oder um eine nicht durch Tryptase oder Chymase erfasste Mastzellpopulation handelt. *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)]. Dies ist jedoch der erste Nachweis von *Syntaxin 3*, der direkt in *menschlichen* Mastzellen in situ erbracht wurde.

Für *SNAP 23* und *Cellubrevin* konnte der im Western Blot erfolgte Nachweis in humanen Mastzellen *nicht* durch unsere immunhistologischen Daten gestützt werden (siehe Abb. 42). Die unzureichende gewebliche Demaskierung der Antigene *SNAP 23* und *Cellubrevin* in Mastzellen des Magens könnte methodisch bedingt sein [Weimbs et al. (2003)]. Zusätzlich lag eine Interferenz durch die starke Signalintensität der gastralen Mukosa vor.

Die darauffolgenden experimentellen Untersuchungen an Gefriergeweben des Dünndarms dienten der Kolokalisation der SNAREs in vielfältigen Zellen des intestinalen Immunsystems, die durch diverse Oberflächenantigene markiert wurden (siehe Kap. 3.8, Tab. 25, Abb. 43 - 45). Durch die schwache Antigendarstellung der zwei SNAREs *SNAP 23* und *Cellubrevin* in der Immunfluoreszenz war die Sensitivität der Untersuchungen geringgradig beeinträchtigt. *Syntaxin 3* wird in Blutzellen als Bestandteil des Vesikelfusionskomplexes in eosinophilen Granulozyten [Lacy et al. (1995), Hoffmann et al. (2001)] und Makrophagen [Hackam et al. (1996)] angetroffen. *Syntaxin 3* konnte, neben seiner Präsenz in gastralen Mastzellen, in den Doppelfluoreszenzfärbungen der Dünndarmmukosa in Panleukozytenantigen CD 45-markierten Zellen häufig vorgefunden werden, was seinen Nachweis in Leukozyten, welches die Granulozytenpopulation einschließt, bestätigt. Darüber hinaus war es in unseren Befunden weder in ICAM-aktivierten Leukozyten, T-Lymphozyten, noch in Plasmazellen immunologisch vorzufinden (siehe Tab. 25). In den CD 68-markierten Makrophagen war ebenfalls kein geweblicher Nachweis einer Kolokalisation - bei guter Darstellbarkeit - zu führen. Dies steht im Widerspruch zu der in humanen Plasmazellen und Makrophagenzelllinien berichteten Detektion [Hackam et al. (1996), Reales et al. (2005)]. Für *SNAP 23* lag ebenfalls der Nachweis in Leukozyten durch Doppelfluoreszenz mit dem CD 45-Antigen vor. Sein Vorkommen in Leukozyten war jedoch nur in einigen Zellen nachzuweisen und es könnte demnach eine spezifische Subpopulation der Leukozyten markiert sein. Beispielsweise könnte diese in-situ-Identifikation mit Befunden übereinstimmen, wonach *SNAP 23* auf zellulärer Ebene als zentrales Fusionsprotein in humanen eosinophilen und neutrophilen Granulozyten plasmamembranär und in intrazellulären Kompartimenten [Brumell et al. (1995), Mollinedo & Lazo (1997), Shukla et al. (2001), Logan et al. (2002, 2006)] nachgewiesen wurde. Seine Aufgabe könnte hier die Translokation der intrazellulären Granula zur Plasmamembran [Martín-Martín et al. (2000)] sein. Darüber hinaus wurde *SNAP 23* in einigen der CD 54-positiven Zellen, d.h. im Rahmen inflammatorischer Prozesse durch die Stimulation mit IL-1, TNF oder IFN- γ aktivierter ICAM-positiver Leukozyten nachgewiesen (siehe Abb. 43). Hypothetisch könnte *SNAP 23* in aktivierten Leukozyten im Rahmen der Exozytose inflammatorischer Mediatoren involviert sein. Schließlich war *SNAP 23* auch in submukosalen, CD 68-markierten Makrophagen vorhanden. Hiermit werden die Daten vorheriger Publikationen gestützt, wonach *SNAP 23* in Makrophagen [Shukla et al. (2001)] und während deren Aktivierung [Pagan et al. (2003)] nachgewiesen wurde. Im humanen Gastrointestinaltrakt scheint es offensichtlich in diversen Makrophagenpopulationen in die Formation eines SNARE-Komplexes einbezogen zu sein,

denn neben dessen mukosaler Detektion lag es in unseren Vorbefunden bereits in hepatischen Makrophagen vor (siehe Kap. 4.4). Darüber hinaus konnte das Antigen *SNAP 23* weder in T-Lymphozyten noch in Plasmazellen immunhistologisch gesichert werden (siehe Tab. 25). Initial wurde *SNAP 23* von *Ravichandran* in B-Lymphozyten differenziert [Ravichandran et al. (1996)]. Bei den Plasmazellen handelt es sich um einen klonal ausdifferenzierten Subtyp der B-Lymphozyten. In diesen war, nach kürzlich publizierten Daten, *SNAP 23* als zentrales SNARE neben einer Vielfalt anderer SNARE-Fusionsproteine vorhanden [Reales et al. (2005)]. Möglicherweise liegt diesen differenten Befunden ursächlich eine mangelnde Antigenpräsenz der geweblichen Darstellung in den durchgeführten Experimenten zu Grunde [Weimbs et al. (2003)].

Cellubrevin schließlich wurde lediglich in einigen Panleukozytenantigen-präsentierenden CD 45-Zellen und häufig in mit dem CD 138-Antigen gekennzeichneten Plasmazellen doppellokalisiert (siehe Abb. 44, 45). Aus den vorliegenden Publikationen sind keine unmittelbaren Hinweise zu entnehmen, um welche Differenzierung der Leukozyten es sich handeln könnte. Möglicherweise ist es die Plasmazellpopulation selbst. Neben VAMP 2 konnte *Cellubrevin* in eosinophilen und neutrophilen Granulozyten in diversen Publikationen nicht vorgefunden werden [Brumell et al. (1995), Hoffmann et al. (2001)]. Jedoch wurde sein Vorkommen in der Plasmazellkultur und in humanen extrahierten mukosalen Plasmazellen nachgewiesen [Reales et al. (2005)]. Diese Beobachtung wird somit durch den genannten histologischen Nachweis in CD 138 Zellen bekräftigt. Darüber hinaus blieb der immunhistologische Nachweis in aktivierten ICAM-positiven Leukozyten oder T-Lymphozyten aus. Auch Makrophagen, in deren endosomaler Fraktion es identifiziert wurde [Hackam (1998), Bajno et al. (2000), Coppolino et al. (2000)], konnten im humanen Gastrointestinaltrakt in situ nicht mit dem v-SNARE *Cellubrevin* kolokalisiert werden.

Zusammenfassend konnte anhand der vorgelegten Untersuchungsdaten die *Expression der SNAP-Rezeptorproteine Syntaxin 3, SNAP 23 und Cellubrevin in mukosaassoziierten Strukturen* des zellulären gastrointestinalen Immunsystems wie z. B. *humanen* Mastzellen, Makrophagen, Leukozyten und Plasmazellen deutlich gemacht werden. Die sicherlich komplexe Expression von SNAREs in diesen immunologisch aktiven Zelltypen sollte in fortführenden Untersuchungen näher ergründet werden, um mögliche klinisch-pathophysiologische Zusammenhänge zu eruieren. Beispielsweise könnte von Interesse sein, ob *SNAP 23* auf ICAM-aktivierten Leukozyten, so wie es durch unsere Ergebnisse angedeutet wurde, vorhanden ist und ob dieses SNARE beispielsweise im Rahmen dynamischer inflammatorischer Sekretionsprozesse in der gastrointestinalen Mukosa agiert.

5 Zusammenfassung

Die Datenlage bezüglich der SNARE-Expression in **humanen** Zellen, Geweben und Tumoren ist bislang rar. Die in der vorliegenden Dissertation gewonnenen Erkenntnisse konnten erstmals einen wesentlichen Beitrag zur Erforschung der Expression der nonneuronalen SNARE-Proteine *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* in menschlichen gastrointestinalen und hepatopankreatischen Geweben und neuroendokrinen Tumoren *in situ* leisten.

Das ubiquitäre Vorkommen der untersuchten SNAREs unterstreicht die spezieübergreifende, fundamentale zellbiologische Bedeutung dieser vesikel- und granulaassoziierten Membranfusionsproteine.

Im Einzelnen konnten folgende wissenschaftliche Erkenntnisse in dieser Promotionsarbeit gewonnen werden:

- Die SNAREs *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* waren immunhistologisch nachweislich im *humanen* endokrinen Pankreasgewebe vorhanden. Durch Kolokalisationsversuche wurde spezifiziert, daß *Syntaxin 3* und *Cellubrevin* paninsulinär in A-, B- und D-Zellen präsent sind. Für *SNAP 23* bleibt die Datenlage in Inselzellen heterogen, anhand der APAAP-Befunde könnte es in D-Zellen vorhanden sein.
- Darüber hinaus scheinen diese SNAREs mit der Zymogengranulasekretion im exokrinen Pankreas assoziiert zu sein. *Syntaxin 3* weist in Azinuszellen ein apikales, *SNAP 23* ein basolaterales, *Cellubrevin* ein intrazellulär betontes Expressionmuster auf.
- *SNAP 23* und *Cellubrevin* konnten des weiteren in *humanen* Hepatozyten *in situ* nachgewiesen werden. Ferner wurde in der humanen Hepatomzelllinie PLC die Proteinexpression für alle drei untersuchten Vesikelproteine verifiziert.
- Durch immunhistologische Kolokalisationsexperimente konnte *SNAP 23* - als erstes SNARE-Protein überhaupt - in Kupfferschen Sternzellen, den residenten Makrophagen der Leber, vorgefunden werden und nimmt hier möglicherweise eine zentrale Stellung ein.
- Erstmals konnte die Präsenz der untersuchten SNARE-Fusionsproteine in *humanen* enteroendokrinen Zellen durch Doppellokalisierung bestätigt werden. Zudem erfolgte ihr Proteinnachweis in den neuroendokrinen Zelllinien BON, PC-12 und QGP-1.
- Diese Befunde erweiterten das bislang erforschte Spektrum an SNARE-Proteinen in neuroendokrinen Zelltypen um drei weitere, *nonneuronale* SNARE-Membranfusionsproteine. Insbesondere für das SNARE *Syntaxin 3* erschienen die neuroendokrinen Eigenschaften prädominierend.

- In den Zellen des Gastroentero-pankreatischen endokrinen Systems (GEP) wiesen die SNAREs eine konstant intrazelluläre und damit gegenüber der polarisierten Anordnung in nicht-neuroendokrinen Epithelzellen deutlich divergierende subzelluläre Lokalisation auf.
- *Syntaxin 3* und *Cellubrevin* wurden in der Karzinoidzelllinie BON erstmalig durch Kolo-kalisation mit den neuroendokrinen Markern Sy 38 und Cg A angetroffen und schienen demnach mit sekretorischen Vesikeln (SLMV) und Granula (LDCG) assoziiert zu sein. *SNAP 23* wiederum wurde lediglich auf den SSV-Analoga (SLMV) vorgefunden.
- Die neun im Western Blot analysierten *humanen* Adenokarzinomzelllinien und die nicht-transformierte Enterozytenzelllinie IEC-6 exprimierten allesamt die SNARE-Antigene in unterschiedlicher Intensität. Die Expression der SNARE-Proteine ist demnach gemeinsames Merkmal epithelialer Zellen, die während der Karzinogenese erhalten bleibt.
- Die untersuchten Vesikelproteine *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* waren in sämtlichen neunzehn der untersuchten NET vorhanden. Insbesondere waren sie in den serotoninexprimierenden neuroendokrinen Neoplasien mit hoher Intensität vorzufinden, was ihre Integration in den Membranfusionskomplex der Serotoninsekretion nahelegt.
- Die Western Blot-Analyse bestätigte den Proteinnachweis von *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* in den mastzelläquivalenten Zelllinien KU-812 und RBL2-H3. Für *Syntaxin 3* konnte der in-situ-Nachweis in humanen mukosalen Mastzellen erbracht werden.
- Schließlich wurden die in dieser Arbeit erforschten SNAREs in einer Vielzahl weiterer mukosassoziiierter Zellen des Immunsystems detektiert: *Syntaxin 3* in Leukozyten, *SNAP 23* in Leukozyten, ICAM-aktivierten Leukozyten sowie Makrophagen. *Cellubrevin* fand sich wiederum nachweislich in humanen Leukozyten und Plasmazellen.

Die experimentelle Arbeit dieser Dissertation leistet erstmals einen wesentlichen Beitrag zur morphologischen Charakterisierung der untersuchten SNARE-Proteine in humanen Geweben und Zellen. Anhand der vorgestellten Daten wird deutlich, daß diese drei nonneuronalen SNAREs ubiquitär im Gastroenteropankreatischen System, mukosaassoziierten Strukturen sowie in humanen NET und multiplen transformierten Zellen vorkommen. Die SNAREs stellen somit eine speziesübergreifende distale Komponente vieler Membranfusionsvorgänge dar, die weitgehend unabhängig von der Zelldifferenzierung erhalten bleibt. Im Besonderen eröffnen die Befunde Grundlagen für die weitere Erforschung der SNARE-Vesikelproteine im Rahmen der regulierten Sekretion neuroendokriner Zellen. In Zukunft könnten diese Erkenntnisse beispielsweise bei der Behandlung funktioneller neuroendokriner Tumore von klinisch-therapeutischer Relevanz sein.