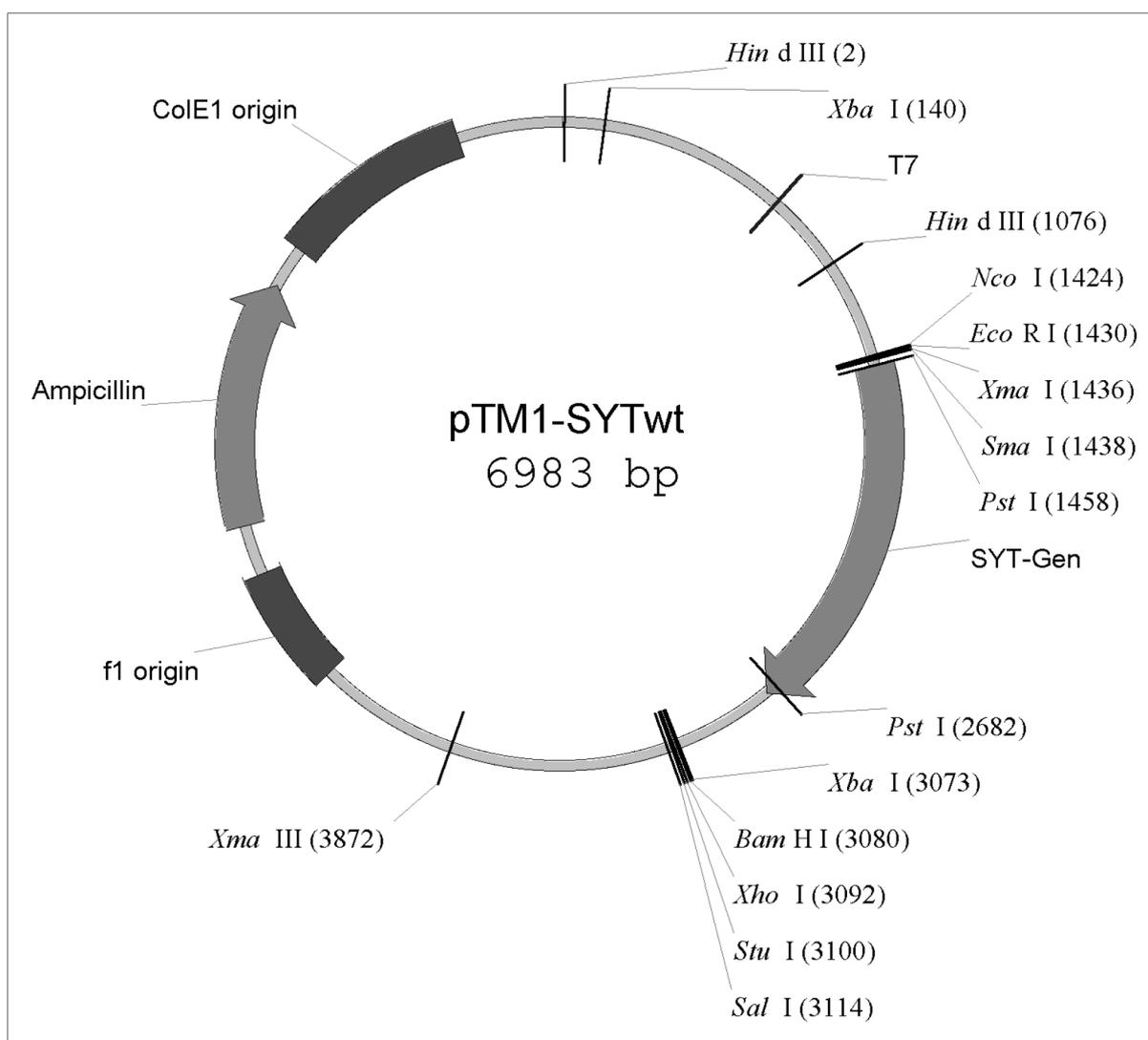


## 4 Ergebnisse

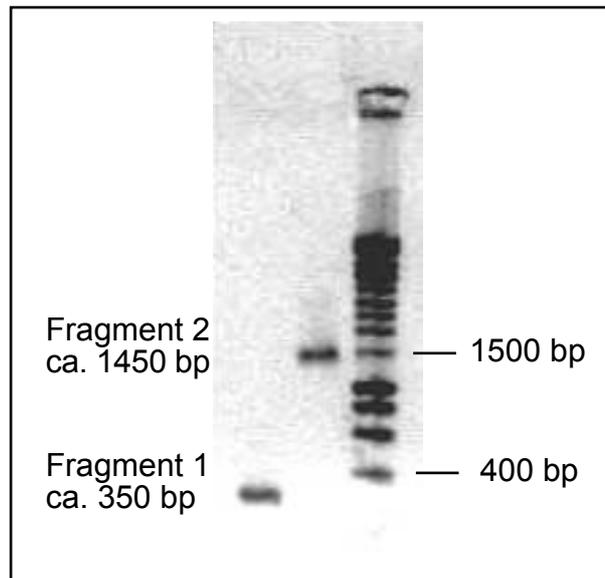
### 4.1 Ortsgerichtete Mutagenese des Synaptotagmin-Gens

Mittels Overlap-Extension-PCR wurden Mutanten des Synaptotagmin-Gens hergestellt, bei denen selektiv Cysteine gegen Serine substituiert und damit potentielle Acylierungsstellen gelöscht wurden. Abbildung 9 zeigt den das Synaptotagmin-I-Gen enthaltenden Vektor pTM-SYTwT. Dabei wurde die Methode der Overlap-Extension-



**Abbildung 9: Schematische Darstellung des Vektors pTM1-SYTwT**

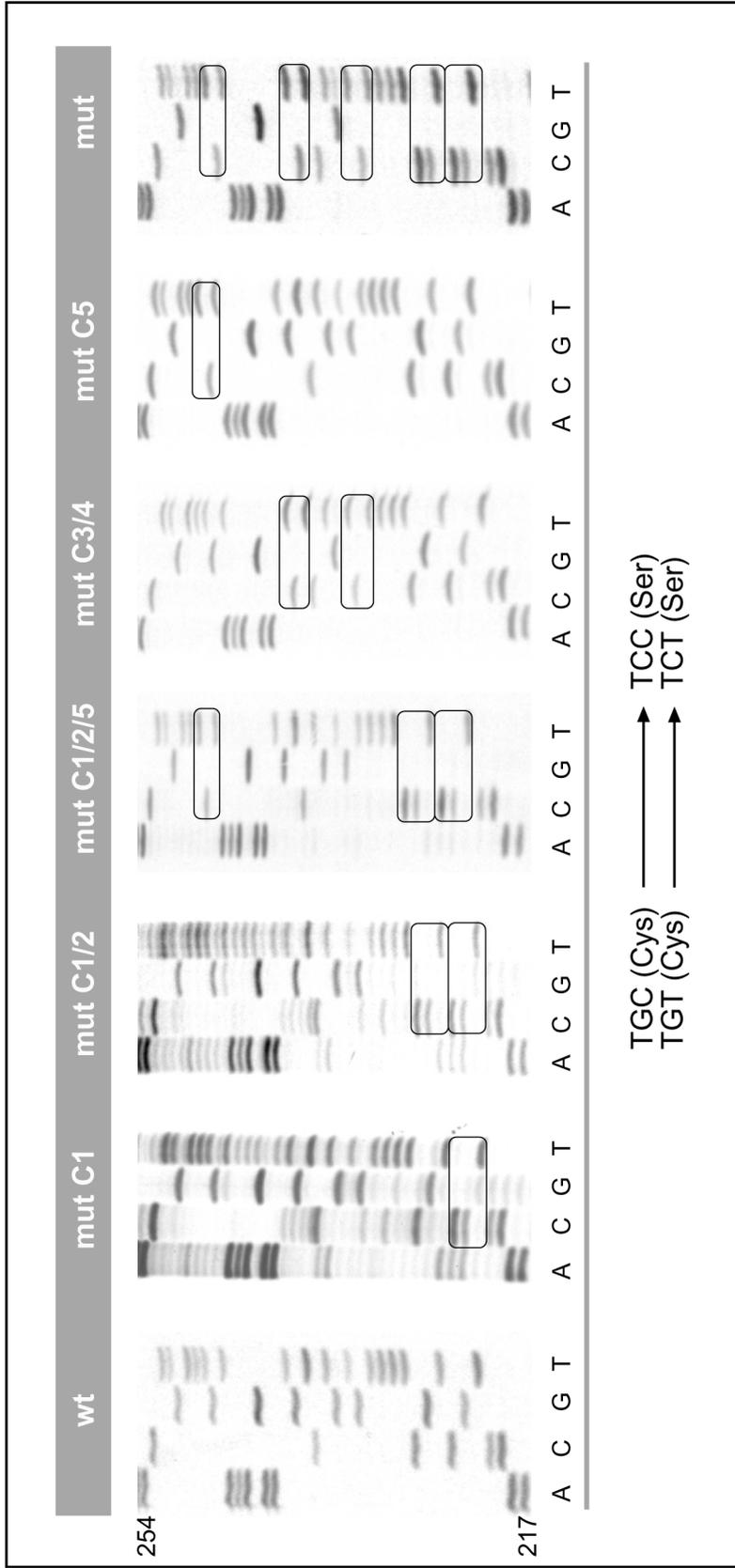
Das Synaptotagmin-Gen steht unter der Kontrolle des T7-RNA-Polymerase Promotors. ColE1: E.coli Replikationsstartpunkt, f1-origin: Startpunkt zur ssDNA-Produktion, Ampicillin-Resistenzgen



**Abbildung 10: Agarosegel-Aufnahme der gereinigten Fragmente nach der 1. PCR der Mutagenese-Overlap-Extension-PCR, Gel invertiert**

PCR angewendet, bei der zwei aufeinander folgende PCR-Reaktionen das mutante DNA-Fragment erzeugen. Durch die erste PCR wurden zwei Fragmente amplifiziert, die in den zueinander komplementären, überhängenden Enden bestimmte Mutationen aufwiesen. Diese DNA-Fragmente (Abbildung 10) wurden mittels JetSorb-Gel-Extraction aus dem Agarose-Gel zurückgewonnen und gereinigt. Nach der zweiten PCR wurde das entstandene Fragment sofort mit den Restriktionsenzymen Xho I und Sac I geschnitten und danach aus dem Gel gereinigt und in den zuvor ebenfalls mit Xho I und Sac I verdauten Vektor pTM1 ligiert.

Nach Transformation und Selektion der transformierten Klone wurden Klone aller Mutationsansätze sequenziert. Abbildung 11 zeigt die Autoradiographien der Sequenziergele in einem bestimmten Größenbereich.



**Abbildung 11: Sequenziergebnisse nach ortsgerechter Mutagenese**  
 Autoradiographien der Sequenzierungen der mutierten Gene, dargestellt sind jeweils die Bereiche der Basen 217 bis 254. Die Positionen der Triplets der neu entstandenen Serine (TCC bzw. TCT) sind jeweils umrahmt.

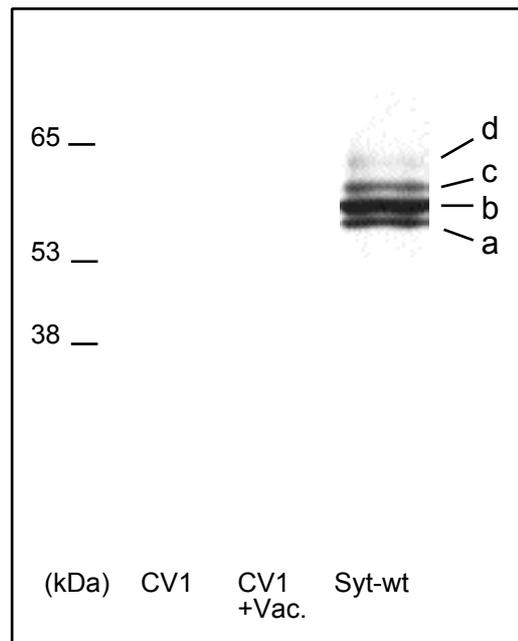
---

## 4.2 Expression des Synaptotagmin-Gens in Säugerzellen

Das Synaptotagmin-Gen sollte mit Hilfe rekombinanter Vaccinia-Viren in Säugerzellen exprimiert werden. Dazu wurde die Zelllinie CV1 ausgewählt, da sich diese im Gegensatz zu den neuroendokrinen PC12-Zellen mit rekombinantem Vaccinia-Virus infizieren ließen. Das Synaptotagmin-Gen lag bereits im Vektor pTM-1 vor, es war also keine Klonierung für diese Expression notwendig.

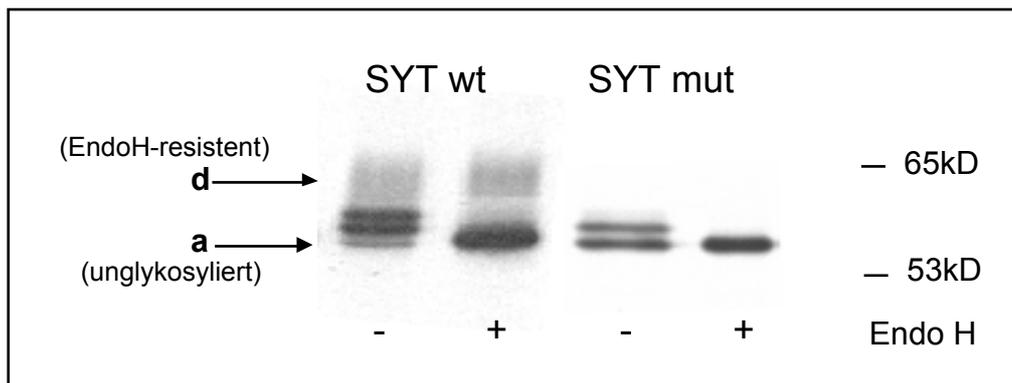
Zur Expression wurden CV-1 Zellen, die zu etwa 80% konfluent gewachsen waren, mit rekombinantem Vaccinia-Virus (vFT7-3, Fuerst et al. 1986) bei einer MOI von 10 PFU pro Zelle infiziert. Zwei Stunden nach der Infektion wurde mit einem Gemisch aus 10 µl Lipofektin und 4 µg pTM-Syt-wt in 1 ml Medium transfiziert. Wiederum zwei Stunden später wurde mit 30 µCi <sup>35</sup>S-Methionin pro ml für zwei Stunden markiert. Als Kontrolle diente eine Kultur mit uninfizierten Zellen sowie eine Zellkultur, die lediglich mit vTF7-3 infiziert und mit 10 µl Lipofektin transfiziert wurde. Auf die zweistündige Markierung folgte die Zellyse mit RIPA-Puffer und die Immunpräzipitation des exprimierten Synaptotagmins mittels monoklonaler anti-Syt-Antikörper. Die Proteintrennung erfolgte in einem 10%igen SDS-Polyacrylamid-Gel, die Detektion mittels Fluorographie.

Die elektrophoretische Auftrennung unter reduzierenden Bedingungen zeigte für das Wildtyp-Synaptotagmin im Molekulargewichts-Bereich von ca. 61 kDa ein Muster von vier Banden (Abbildung 12, a, b, c und d).



**Abbildung 12: Expression des Synaptotagmins in CV-1 Zellen**

Synaptotagmin I (Ratte) wurde mit Hilfe des Vaccinia-T7-Systems in CV-1 Zellen exprimiert und metabolisch mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert. Nach Immunpräzipitation und SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen erfolgte eine Fluorographie. Nach 16stündiger Exposition erschienen vier Banden (a, b, c und d).



**Abbildung 13: Glykosylierung von Synaptotagmin**

Endonuklease-Spaltung von in CV1-Zellen exprimiertem und radioaktiv markiertem Wildtyp-Synaptotagmin und seiner fettsäurefreien Mutante Syt mut, Markierungszeit 2 Stunden.

---

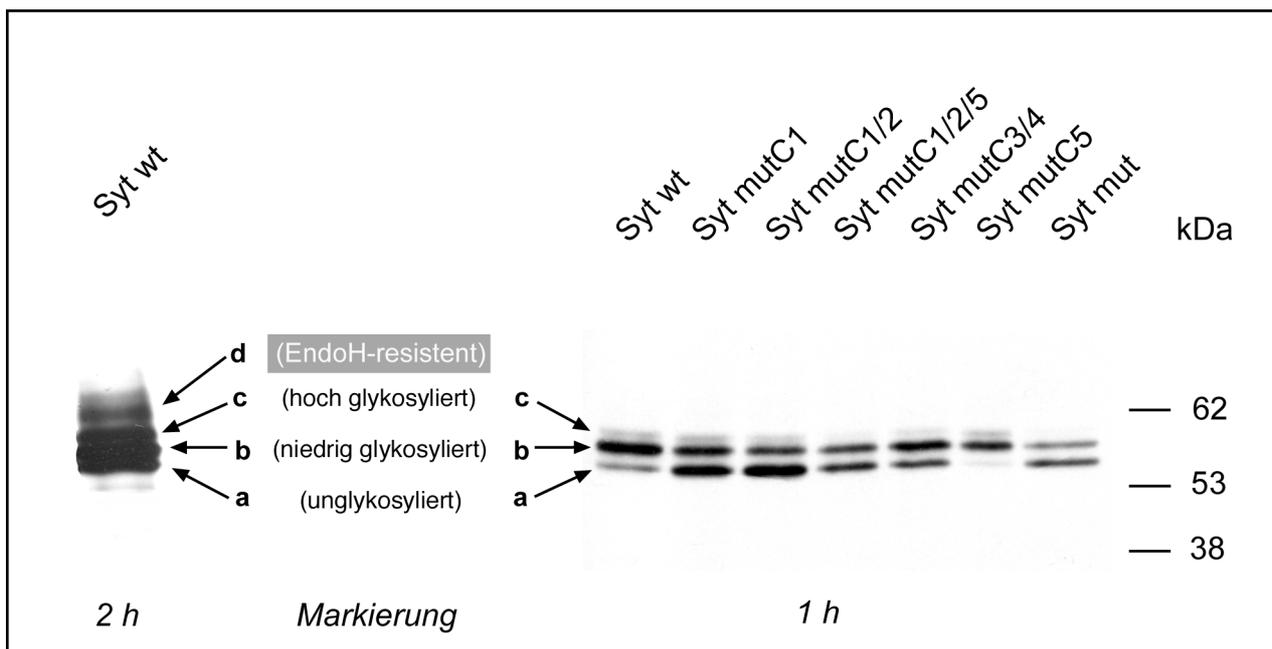
### 4.3 Glykosylierung

Als mögliche Erklärung für das Auftreten verschiedener Synaptotagmin-Spezies mit Molekulargewichten zwischen 60 und 63 kDa (vergl. Abb.12) kommen Unterschiede in der Glykosylierung in Frage. Zur Untersuchung dieses Phänomens wurden erneut CV1-Zellen mit rekombinantem Vaccinia-Virus infiziert, mit dem Synaptotagmin-Gen transfiziert, das exprimierte Protein radioaktiv markiert und immunpräzipitiert. Allerdings erfolgte vor der SDS-PAGE eine Behandlung mit verschiedenen Endonukleasen. Endo-H spaltet nur mannosereiche Seitenketten, während PNGase-F alle glykosidisch gebundenen Zuckerseitenketten entfernt. Nach dem Endonukleaseverdau (1 Stunde bei 37°C entsprechend den Empfehlungen des Herstellers NEB, Schwalbach) erfolgte die Analyse der Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese und Fluorographie.

Abbildung 13 zeigt, daß das exprimierte Wildtyp-Synaptotagmin nach Verdau mit Endo-H nur noch als zwei Proteinbanden bei etwa 61 bzw. 63 kDa (a und d) sichtbar war. Die leichtere Bande (a) entspricht somit der unglykosylierten Form des Synaptotagmins, da die beiden Banden im höheren Gewichtsbereich (b und c) verschwunden waren, die entsprechenden Synaptotagmin-Spezies durch Abspaltung der Zuckerketten also auf die unglykosylierte Form reduziert wurden. Die schwache höhermolekulare Bande (d) stellt Endo-H-resistentes Material dar. Vermutlich handelt es sich dabei um die reife Form des Proteins, die Endo-H-resistente, komplexe Oligosaccharide enthält. Die Spaltung der Wildtyp-Form des Proteins mit PNGaseF führt neben der unglykosylierten Form zum Auftreten einer weiteren Bande (nicht abgebildet), deren Entstehung unklar ist.

#### 4.4 Expression weiterer Synaptotagmin-Mutanten in Säugerzellen

Um zu untersuchen, ob sich auch bei den Cystein-Mutanten mit einer oder mehreren Deletionen von Acylierungsstellen ein verändertes Glykosylierungsmuster im Vergleich zum Wildtyp ergibt, wurden diese ebenfalls in CV1-Zellen exprimiert und mit Glykosidasen verdaut. Die Expression erfolgte analog 4.2, transfiziert wurde mit jeweils 4 µg DNA der Mutanten Syt mutC1, Syt mutC1/2, Syt mutC1/2/5, Syt mutC3/4, Syt mutC5 und der Vollmutante Syt mut, der alle potentiellen Acylierungsstellen fehlen. Nach einstündiger Markierung mit <sup>35</sup>S-Methionin wurde immungefällt und im SDS-Gel aufgetrennt. Zur Überprüfung, ob sich die Zahl der Proteinbanden bei längerer Markierung über die bereits ermittelten vier heraus erhöht, wurde ebenfalls eine zweistündige Markierung durchgeführt.



**Abbildung 14: Expression der Gene von Syt wt und der Mutanten in CV1-Zellen**

Die Zellen wurden mit Hilfe des Vaccinia-T7-Expressionssystems mit den cDNAs von Synaptotagmin Wildtyp und der Mutanten transfiziert, 1 Stunde bzw. 2 Stunden mit <sup>35</sup>S-Methionin markiert und immunpräzipitiert. Abgebildet sind die Fluorographien der elektrophoretischen Auftrennung im 8%igen SDS-Gel. Nach 2 Stunden Markierung wird die Endo-H-resistente Bande sichtbar. Zur Struktur der Mutanten vergleiche Abbildung 7.

---

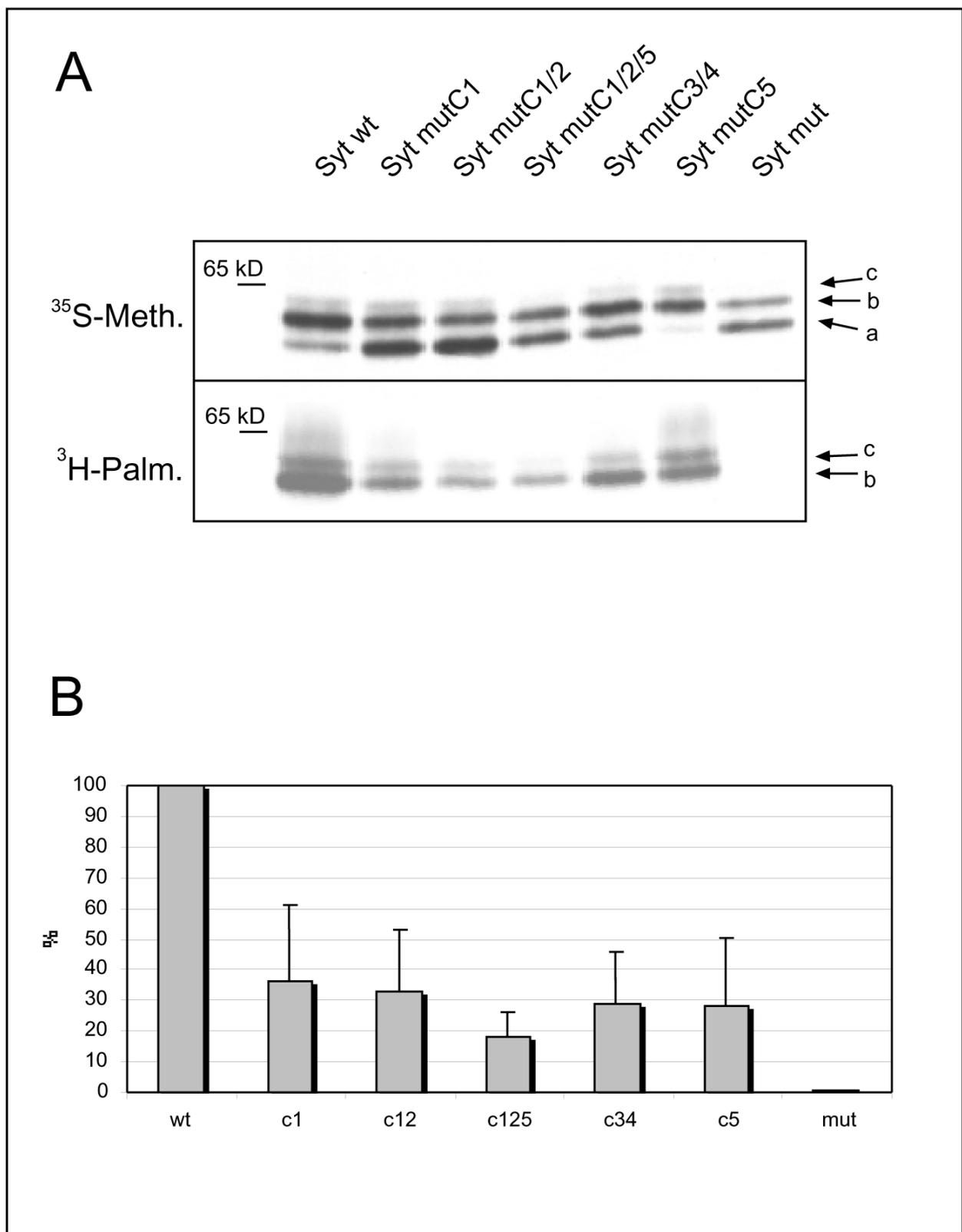
Das in Abbildung 14 gezeigte Ergebnis macht deutlich, daß bei den Mutanten eine deutliche Verschiebung der Bandenintensitäten in Richtung der unglykosylierten Form vorliegt.

#### **4.5 Palmitoylierung der Synaptotagmin-Mutanten**

Wie für andere zelluläre Membranproteine wurde auch für das Synaptotagmin I eine S-Acylierung beschrieben (Veit et al., 1996). Es konnte jedoch noch nicht geklärt werden, welche der Cysteine in der Region zwischen Transmembranbereich und cytoplasmatischer Domäne an der Palmitoylierung direkt beteiligt sind.

Da Palmitoylierungsvorgänge an Cysteinresten stattfinden, sollte untersucht werden, ob alle der fünf vorhandenen Cysteinreste direkt mit Fettsäuren verknüpft sind. Dazu wurden die hergestellten Mutanten in CV1-Zellen exprimiert, mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin und  $^3\text{H}$ -Palmitinsäure metabolisch markiert und nach Immunpräzipitation elektrophoretisch aufgetrennt. Abbildung 15a zeigt die Fluorographien der radioaktiven Markierungen.

Zur Ermittlung der prozentualen Acylierungsrate der einzelnen Mutanten wurden die Fluorographien densitometrisch ausgewertet und die  $^3\text{H}$ -Bandenintensitäten auf die jeweilige  $^{35}\text{S}$ -Methioninmarkierung normiert. Das Ergebnis, das aus 5 unabhängigen Versuchsreihen ermittelt wurde, ist in Abbildung 15b ersichtlich. Es zeigt sich, daß nur bei der Totalmutante Syt mit keinerlei Palmitinsäureeinbau erfolgte, die selektiven Einzelmutanten waren im Vergleich zum Wildtyp-Protein nur zu 20-40% palmitoyliert. Außerdem konnte festgestellt werden, daß nur die Banden 2, 3 und 4 palmitoyliert wurden, die unglykosylierte Form (Bande 1) war in keiner  $^3\text{H}$ -Palmitinsäure-Markierung erkennbar. Die Zuordnung der Banden zu den entsprechenden Glykosylierungsstufen wurde durch gemeinsame elektrophoretische Auftrennung im selben Gel bestätigt (Ergebnis nicht gezeigt).



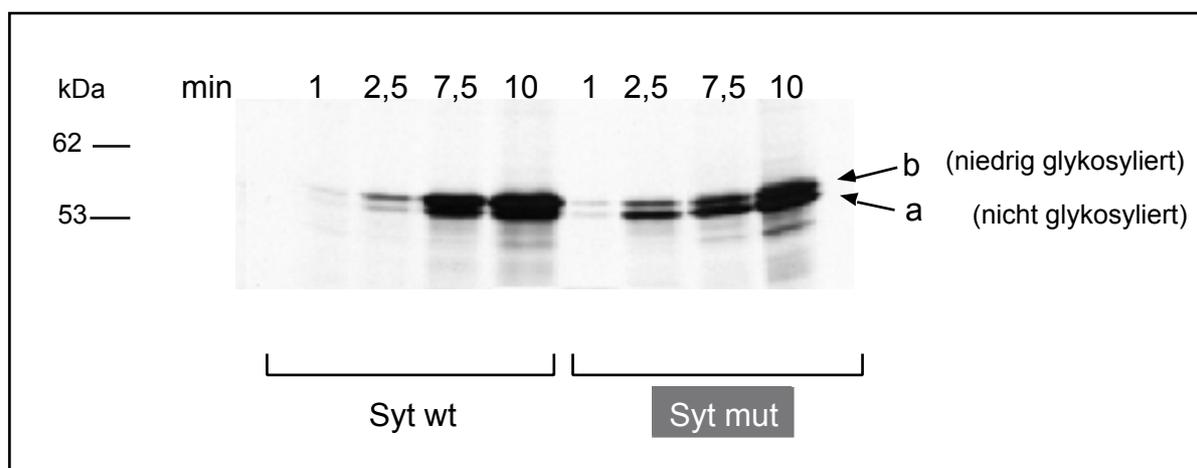
**Abbildung 15: Palmitoylierung der Synaptotagmin-Mutanten**

A: Fluorographien der elektrophoretischen Auftrennungen der metabolischen Markierungen mittels <sup>35</sup>S-Methionin und <sup>3</sup>H-Palmitinsäure für jeweils 2 Stunden. Ausschnitte der Region um 60 kD der beiden Gele werden gezeigt. Bande 1: unglykosyliert, Banden 2+3: glykosylierte Formen; B: Prozentuale Palmitoylierungsrate der Mutanten im Verhältnis zum Wildtyp-Protein (100%), Durchschnitt aus fünf getrennten Untersuchungen.

#### 4.6 Pulse-Chase- Experimente von Wildtyp und Mutante syt mut

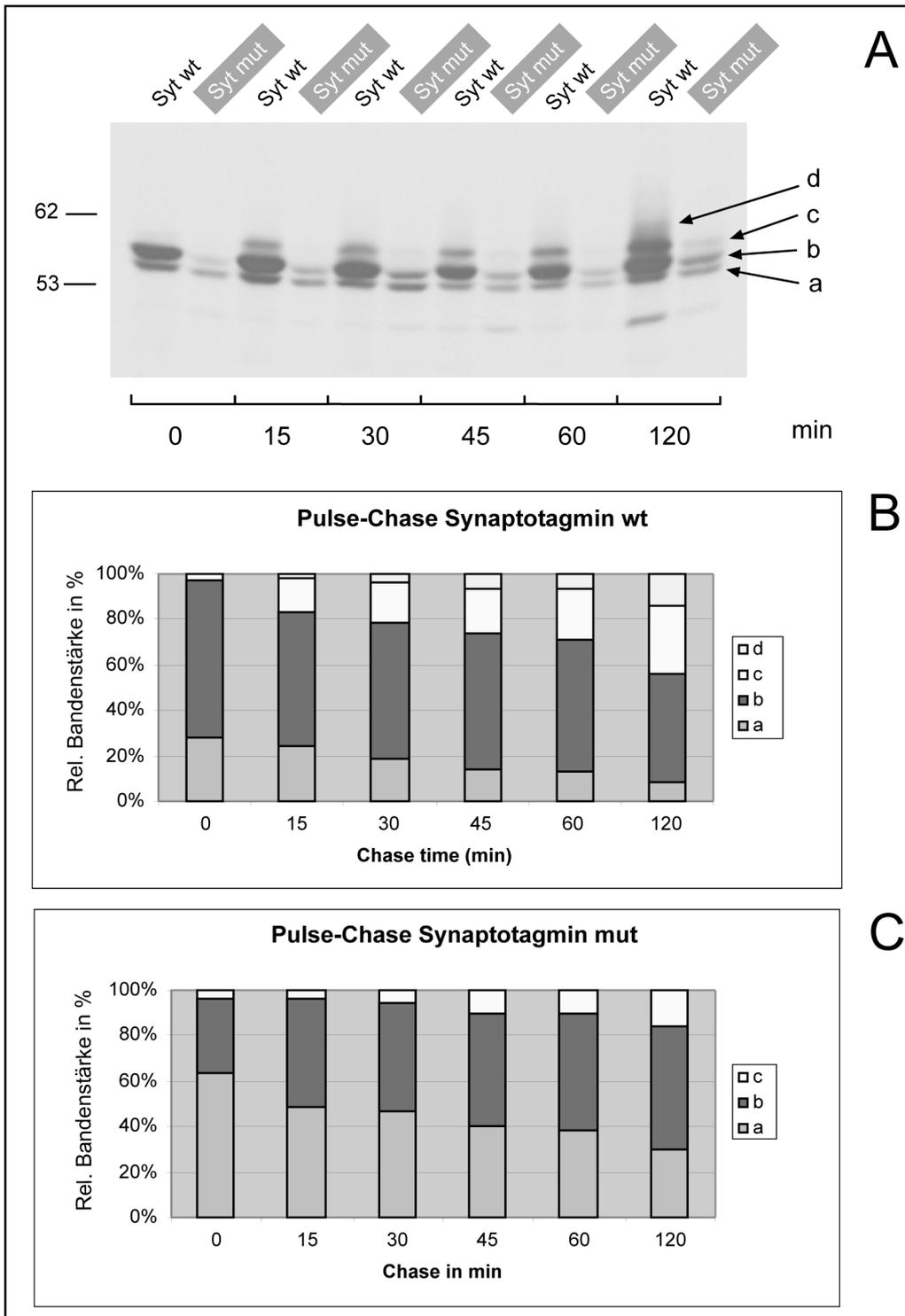
Um die Kinetik des intrazellulären Transportes und der damit verbundenen Reifung des Proteins zu untersuchen, wurden Pulse-Chase-Markierungen durchgeführt. Dafür wurden die infizierten und transfizierten Zellen für kurze Zeit mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert (pulse) und dann entweder sofort lysiert oder vor der Zellyse für verschiedene Zeitspannen (chase) weiter inkubiert. Danach wurde wie üblich immunpräzipitiert und im SDS-Gel aufgetrennt.

Zuerst sollte untersucht werden, ob die Synthese des Proteins mit der unglykosylierten Form beginnt oder ob ein Teil der Glykosylierung schon kotranslational erfolgt. Dazu wurden ansteigende Markierungszeiten (pulse) von 1 - 10 min gewählt und zunächst auf den chase verzichtet. Abbildung 16 zeigt, daß bereits nach einer Minute Markierung die niedrig glykosylierte Form des Proteins vorliegt, sowohl bei Syt-wt als auch bei der Mutante. Die Glykosylierung des Proteins setzt also sowohl bei dem Wildtyp-Protein als auch bei der fettsäurefreien Mutante noch während der Synthese des Proteins ein. Eine hoch glykosylierte Form ist nach 10 min Markierungsdauer noch nicht entstanden. Allerdings bleibt das prozentuale Verhältnis der Banden zueinander während der ersten 10 min nahezu konstant, es verändert sich erst zu einem späteren Zeitpunkt (siehe unten).



**Abbildung 16: Pulse-Chase-Markierung von Synaptotagmin wt und Vollmutante Syt mut**

Es wurde nach der Transfektion der Zellen für einen Zeitraum von 1-10 min mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert und die Zellen danach sofort lysiert. Gezeigt sind die Fluorographien der SDS-elektrophoretischen Auftrennungen im Bereich von ca. 30-70 kDa.



**Abbildung 17: Pulse-chase-Experimente mit Synaptotagmin wt und mut**

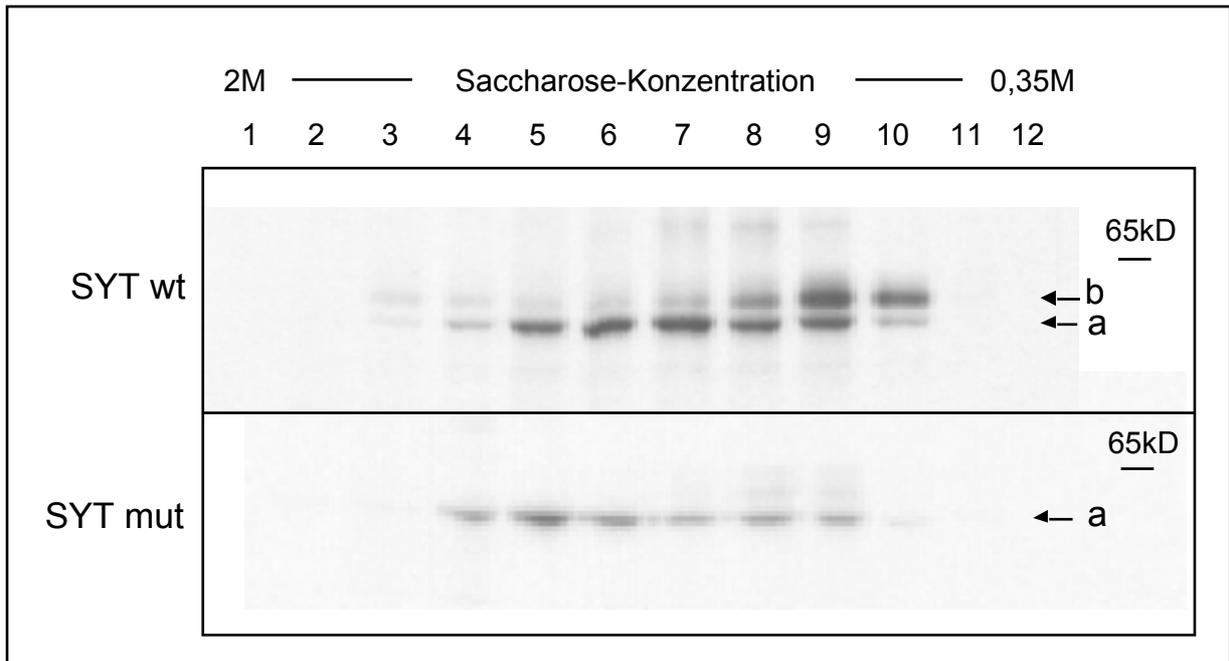
**A:** Es wurde nach der Transfektion der Zellen für einen Zeitraum von 15 min mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert und die Zellen danach sofort lysiert (pulse) oder für 15 -120 min weiter inkubiert (chase). **B** und **C:** Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der Bandenintensitäten von Wildtyp (B) und Vollmutante (C). Summe der Intensitäten aller Banden gleich 100%.

---

Es stellte sich nun die Frage, nach welcher Zeit die EndoH-resistente und vermutlich physiologisch aktive Form des Proteins gebildet wird. Dazu wurde für eine Zeitspanne von 15 min markiert und danach für weitere 15 - 120 min inkubiert (chase). Abbildung 17A zeigt die elektrophoretische Auftrennung von Wildtyp und fettsäurefreier Mutante.

Die Banden wurden densitometrisch ausgewertet und die Bandenstärken der jeweiligen Proteinformen verglichen. Es zeigte sich, daß nach frühestens 60 min der Wildtyp auch in der Endo-H-resistenten Form vorliegt (Abbildung 17B). Dagegen erreicht die Mutante auch nach 120 min chase noch nicht das Endo-H-resistente Stadium. Längere Expositionszeiten der radioaktiv markierten Gele zeigten keine Veränderungen der relativen Bandenintensitäten. Die unglykosylierten Formen der Proteine gehen im Laufe der 120 min prozentual kontinuierlich zurück (Abbildung 17C), was mit einer allmählichen Umwandlung in höherglykosylierte Formen erklärbar ist.

Auch in BON-Zellen, einer humanen Pankreastumor-Zelllinie, die im Gegensatz zu CV1-Zellen sekretorische Eigenschaften besitzt, zeigte sich das gleiche Bandenmuster wie bei CV1-Zellen. Da diese Zellen mit weitaus höherer Effizienz transfiziert werden konnten als PC12-Zellen, wurde für die folgenden Untersuchungen diese Zelllinie ausgewählt.

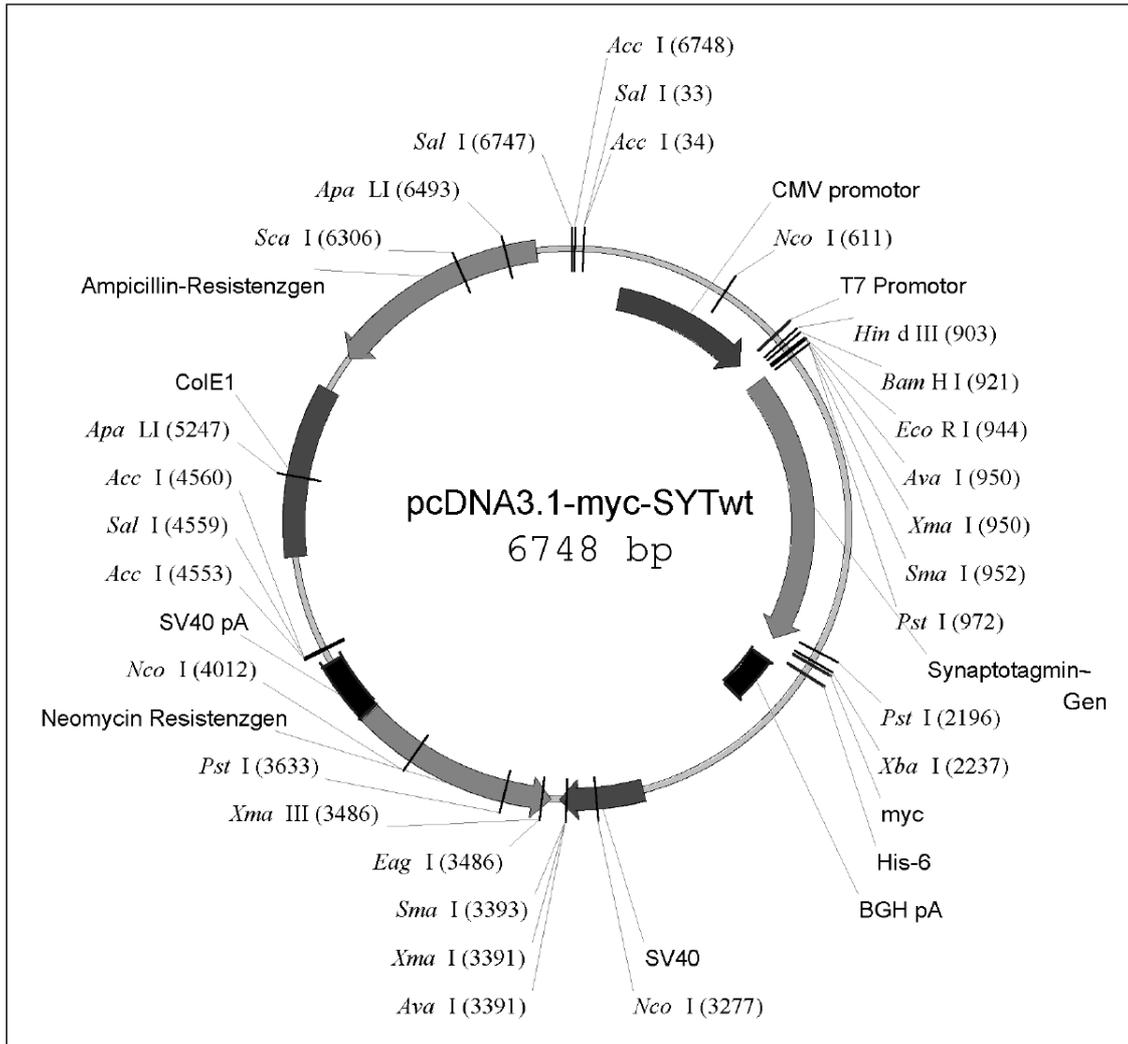


**Abbildung 18: Einfache Zellfraktionierung mittels Saccharosegradienten**  
 Fluorographien der elektrophoretischen Auftrennungen der aufgefangenen Fraktionen nach Immunpräzipitation mit anti-SYT Antikörper. Gezeigt sind Gelausschnitte des Molekulargewichtsbereiches um 60 kD.

#### 4.7 Einfache Zellfraktionierung von BON-Zellen

Zur Klärung der Frage, ob die unterschiedlichen Bandenverteilungen bei Synaptotagmin-wt und der fettsäurefreien Vollmutante primär auf Transport- oder Reifungsvorgängen beruhen, wurde eine einfache Zellfraktionierung von BON-Zellen im Saccharose-Gradienten durchgeführt. Die transfizierten und mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markierten Zellen wurden mechanisch aufgeschlossen und die Membranpartikel in einem Saccharosegradienten (0.35M - 2M) in 12 Fraktionen aufgetrennt. Nach Immunpräzipitation der einzelnen Fraktionen wurde das exprimierte Protein mittels SDS-PAGE und Fluorographie detektiert.

Abbildung 18 zeigt die Fluorographien der Fraktionierungen von Synaptotagmin wt und mut in BON-Zellen. Bei letzterem zeigt sich in den Banden eine leichte Verschiebung in Richtung höherer Dichte, allerdings konnte dies nicht in in jedem Wiederholungsversuch bestätigt werden.



**Abbildung 19: Plasmid pcDNA3.1-myc-SYTwT**

Das Plasmid enthält eine mit einem myc-Epitop (myc) und einem Hexahistidinschwanz (His-6) versehene Form des Synaptotagmin-Gen. BGH pA: poly-Adenylierungssignal des *bovine growth hormone*, SV40:SV40-Promotor, SV40 pA: Polyadenylierungssignal des Simian Virus 40, ColE1: E.coli-Replikationsstartpunkt

---

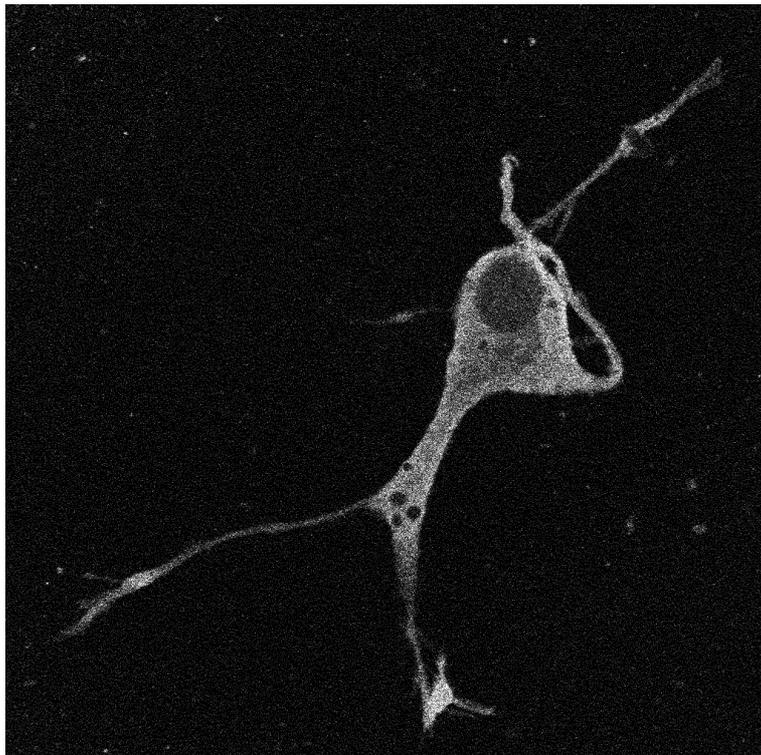
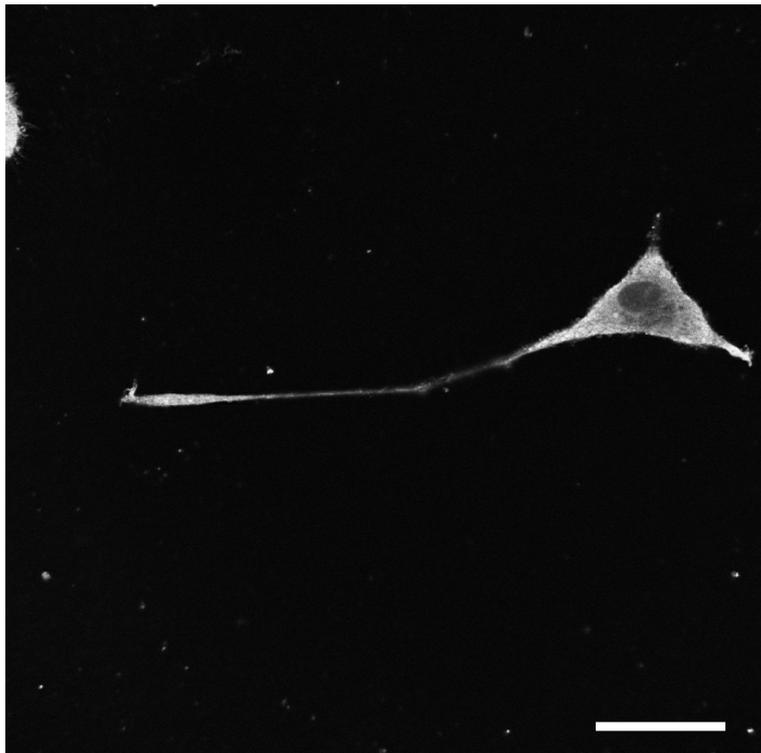
#### **4.8 Umklonierung des Synaptotagmin-Gens**

Da neuroendokrine PC12-Zellen endogenes Synaptotagmin besitzen, kann transfiziertes Synaptotagmin nicht mit dem Anti-Syt-Antikörper detektiert werden. Für die Experimente in diesen Zellen wurde das Synaptotagmin-Gen deshalb in den Vektor pCDNA3.1*myc* umkloniert und dabei am C-terminalen Ende mit je einer Kopie des *myc*-Epitops sowie einer Hexahistidin-Gruppe versehen. Die von diesen Konstrukten exprimierten Proteine können nun von dem endogenen Synaptotagmin mit Hilfe des anti-*myc* Antikörpers unterschieden werden.

Dabei wurde das Synaptotagmin-Gen aus dem Plasmid pTM1-SYTwT per PCR amplifiziert, so daß mit den antisense-Primern das STOP-Codon gelöscht und so die durchgehende Transkription einschließlich des *myc*-Epitops möglich wurde. Nach der Klonierung wird das STOP-Codon des pCDNA3.1-Vektors stromabwärts des Hexahistidin-Tags genutzt. Dieses Amplifikat wurde über die Restriktionsschnittstellen Xba I und EcoR I in den Vektor pCDNA3.1/*myc*-his(+) kloniert. Abbildung 19 zeigt das so entstandene Plasmid pCDNA3.1-*myc*-SYTwT. Auf gleiche Weise wurde das Plasmid pCDNA3.1-*myc*-SYTmut hergestellt, indem das Gen der cysteinfreien Totalmutante per PCR amplifiziert und in den Vektor pCDNA3.1/*myc*-his(+) kloniert wurde.

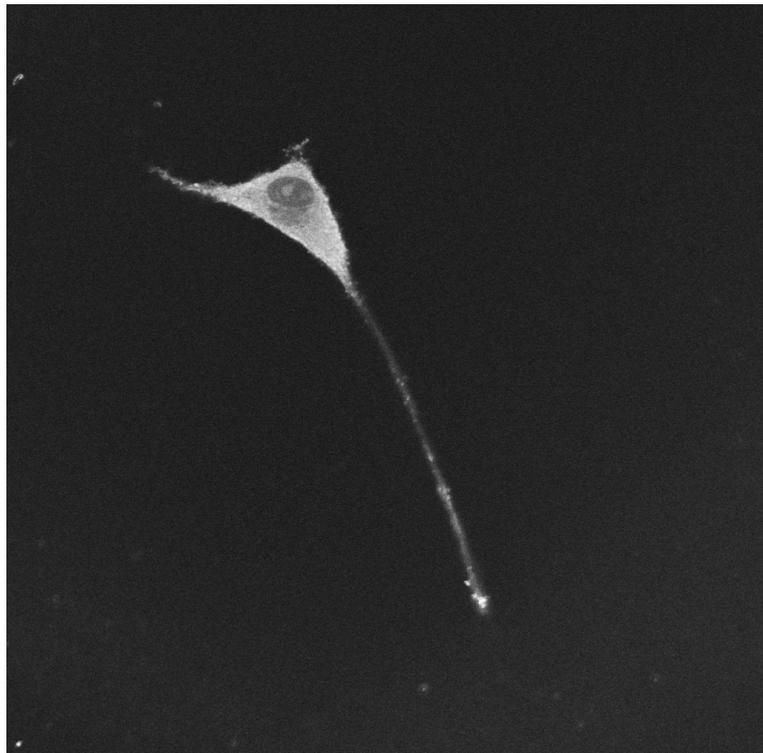
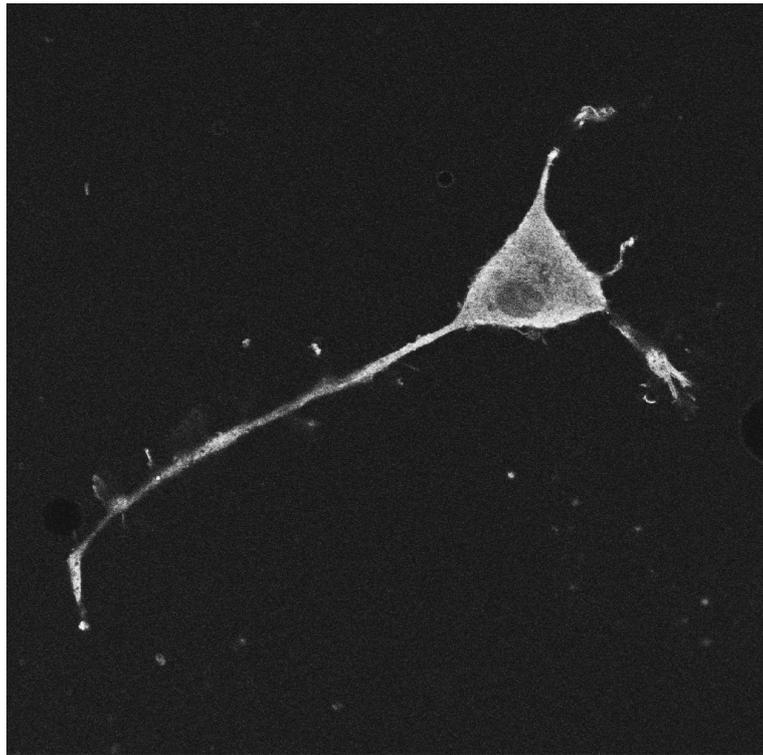
#### **4.9 Indirekte Immunfluoreszenz von transfizierten PC12-Zellen**

Mittels indirekter Immunfluoreszenz und konfokaler Mikroskopie ist es möglich, Unterschiede in der intrazellulären Lokalisation unterschiedlicher Protein-Konstrukte sichtbar zu machen. Die oben beschriebenen Plasmide wurden mittels Lipofektin in differenzierte PC12-Zellen transfiziert und mittels anti-*myc*-AK und TRITC-markiertem anti-Maus-Antikörper detektiert. Die Abbildungen 20 und 21 zeigen fotografische Aufnahmen von transfizierten und differenzierten PC12-Zellen im konfokalen Laserscanning-Mikroskop.



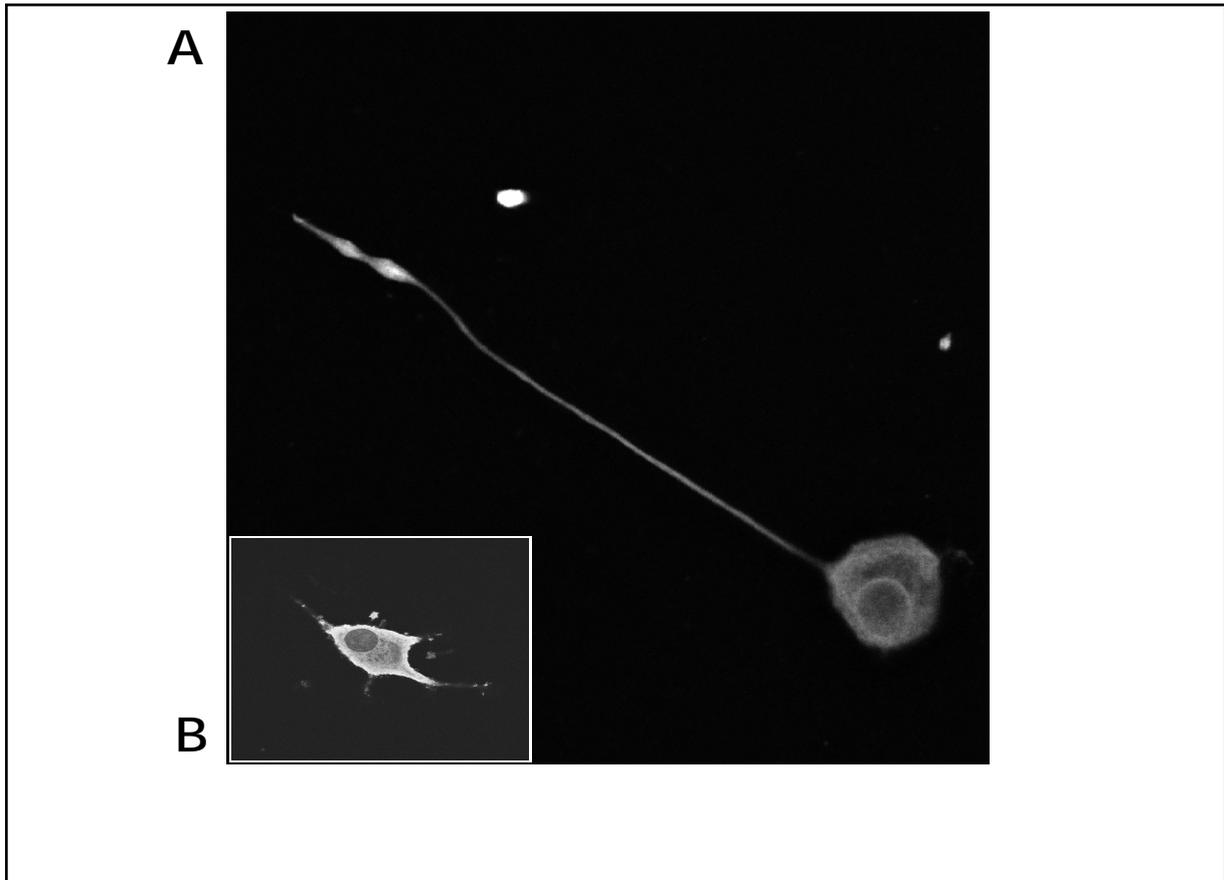
**Abbildung 20: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von differenzierten PC12-Zellen, die mit pcDNA3.1-*myc-SYTw* transfiziert wurden**

Die Zellen wurden mittels Lipofektin mit Wildtyp-Synaptotagmin transfiziert und die exprimierten Proteine mittels TRITC-markiertem AK detektiert. Der Maßstab entspricht 20  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von differenzierten PC12-Zellen, die mit pcDNA3.1-myc-SYTmut transfiziert wurden**

Die Zellen wurden mittels Lipofektin mit mutiertem Synaptotagmin transfiziert und die exprimierten Proteine mittels TRITC-markiertem AK detektiert.



**Abbildung 22: Typisches Bild einer pcDNA 3.1-*myc*-Sytw1-exprimierenden sowie einer GFP-exprimierenden Kontrollzelle**

Die Synaptotagmin-exprimierende Zelle (A) wurde mittels anti-*myc* und TRITC-markiertem anti-Maus-AK detektiert, die Fluoreszenz der GFP-exprimierenden Kontrollzelle (B) wurde direkt aufgezeichnet.

Es konnte festgestellt werden, daß sowohl unverändertes Synaptotagmin (Abbildung 20a und 10b) als auch die nichtpalmitoylierte Form (Abbildung 21A und B) während der Differenzierungsdauer von 2 Tagen bis in die Axonenden transportiert wird. Mit pTM1-Syt transfizierte Kontrollzellen konnten mit dem Anti-*myc*-Antikörper nicht detektiert werden.

Weiterhin war bei Synaptotagmin-transfizierten PC12-Zellen eine sehr starke Induktion des Neuritenwachstums erkennbar. Neuriten wuchsen im Mittel um die mehr als zweieinhalbfache Länge im Vergleich zu GFP-transfizierten Kontrollzellen (Abbildung 22). Allerdings zeigte sich kein Unterschied in der Länge der gebildeten Neuriten zwischen Zellen, die mit Wildtyp-Protein oder Mutante transfiziert wurden (nicht abgebildet).