

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

2-YT, Hefe Extrakt, Trypton, Select Pepton, Agar	Gibco BRL, Berlin
Ampicillin	Roche, Mannheim
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen
Antibiotika: Kanamycin, Gentamycin, Tetracyclin	Sigma, Deisenhofen
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau, Blue Dextran, Serva Blue G	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue	Serva, Heidelberg
Complete Mini Protease Inhibitor	Roche, Mannheim
Dithiobis[succinimidylpropionat] (DTSP)	Sigma, Deisenhofen
DNA-Marker „Smart Ladder“	Eurogentec, Seraing/Belgien
dNTP-Mix	Invitek, Berlin
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Glukose, Saccharose und Nycodenz	Sigma, Deisenhofen
Glutathion/Glutathion-Agarose	Sigma, Deisenhofen
Imidazol	Serva, Heidelberg
IPTG	Sigma, Deisenhofen
Lipide	Sigma, Deisenhofen
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Nonidet P-40	Roche, Mannheim
Ni ²⁺ NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Oligonukleotidprimer	Invitek, Berlin
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche, Mannheim
Pharmalyte, Servalyte und Harnstoff	Bio-Rad, München
Protein-A-Sepharose	Sigma, Deisenhofen
Salicylat	Sigma, Deisenhofen
Sephacryl, Sephadex	Amersham Pharmacia, UK
TEMED	Bio-Rad, München
Triton X-100, X-114	Sigma, Deisenhofen

Material und Methoden

vorgefärbter Molekulargewichtsmarker

Gibco BRL, Berlin

Isotope

n-9,10-³H-Palmitinsäure

NEN DuPont, Boston, USA

Trans-³⁵S-label

ICN, Irvine, USA

Die verwendeten Lösungsmittel, Säuren und Basen wie auch verwendete Salze und alle nicht erwähnten Chemikalien stammen von der Firma Roth, Karlsruhe.

3.1.2 Enzyme, Proteine, Kits, Zellkultur und Antikörper

Enzyme/Proteine

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP)

NEB, Schwalbach/Taunus

DNase

Roche, Mannheim

InviTaq Polymerase

Invitek, Berlin

Lysozym

Serva, Heidelberg

Restriktionsendonukleasen und Puffer

NEB, Schwalbach/Taunus

Rinderserumalbumin (BSA)

Sigma, Deisenhofen

RNase

Roche, Mannheim

rTEV-Protease und Puffer

Gibco BRL, Berlin

T4 DNA-Ligase und Puffer

NEB, Schwalbach/Taunus

Trypsin

Sigma, Deisenhofen

Kits

BAC-TO-BAC Baculovirus Expression Kit:

Gibco BRL, Berlin

DNA-Präparationskit im Mini- und Maxi-Maßstab

Qiagen, Hilden

ECL-System

Amersham Pharmacia, UK

JetSorb Gel Extraction Kit

Genomed, Bad Oeynhausen

Quik Change™ Site Directed Mutagenesis Kit

Stratagene, Heidelberg

Zellkultur

TC100-Minimalmedium

PAN Biotech, Aidenbach

FKS

Biochrom, Berlin

Penicillin(100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml)

Biochrom, Berlin

DMEM

Bio Whittaker, USA

DMEM ohne Methionin

Bio Whittaker, USA

Lipofektin

Gibco BRL, Berlin

Trypsin/EDTA	Bio Whittaker, USA
Kulturschalen und –flaschen, gammasterilisiert	Greiner, Frickenhausen
Zellschaber, gammasterilisiert	Greiner, Frickenhausen

Antikörper

SNAP-25	polyklonal, Kaninchen
VAMP-II, Klon 69.1	monoklonal, Maus, Edelmann et al., 1995
anti-Kaninchen IgG Peroxidase konjugiert	Sigma, Deisenhofen
anti-Maus IgG Peroxidase konjugiert	Sigma, Deisenhofen

3.1.3 Zelllinien

CV1	Nierenzelllinie aus der afrikanischen Grünen Meerkatze
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> 9 aus dem Ovargewebe der Puppe des „fall army worm“

3.1.4 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> Stamm XL1-Blue	Stratagene, Heidelberg
<i>E.coli</i> Stamm M15[pREP4]	Qiagen, Hilden

3.1.5 Vektoren/Gene

pTM1-SNAP-25 WTb	Veit et al., 1996
pTM1-SNAP-25 Del	Veit et al., 1996
pcDNA3-SNAP-25b-M1+2	Lane und Liu, 1997
pcDNA3-SNAP-25b-M3+4	Lane und Liu, 1997
pFASTBAC HT _{a/b/c} (s. Abb. 3.1)	GIBCO Life Technologies, Eggenstein
pQE9-SNAP-25-WTb	Veit, 2000
pQE30-rat VAMP2	Veit, 2000
pQE9- α -SNAP	Whiteheart et al., 1993
pQE9-NSF	Whiteheart et al., 1993
pGEX-KG rat Syn1B	Veit, 2000

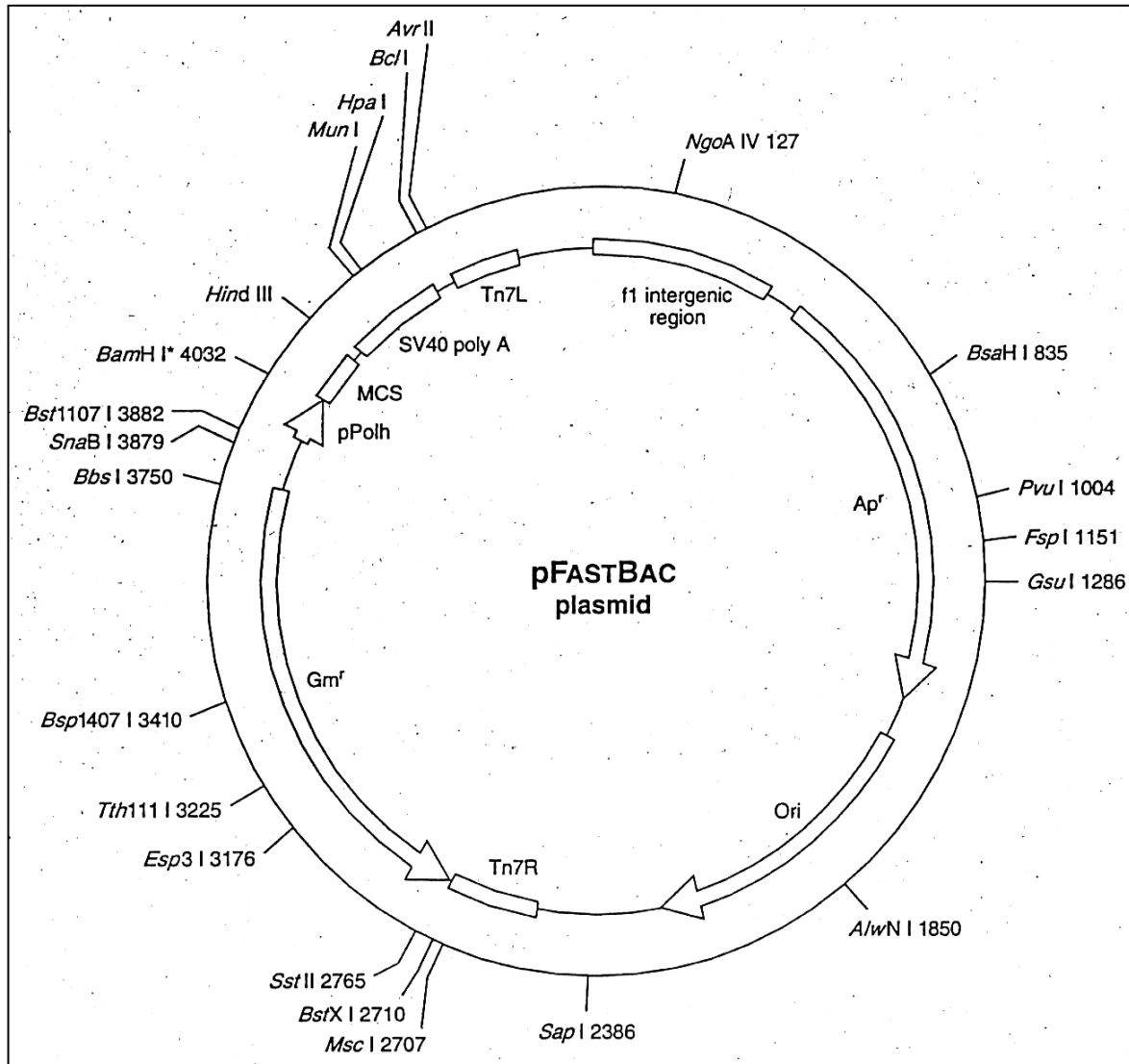


Abb. 3.1: pFASTBAC-Plasmid

Die Abbildung zeigt das pFASTBAC-Donorplasmid, das für die Insektenzelleexpression nach dem BAC-TO-BAC-Expressionskit benutzt wurde, mit der Multiplen Klonierungsstelle (MCS), den Ampicillin- (Ap) und Gentamicin- (Gm) Resistenzgenen und des Polyhedrinpromotors (pPolh).

3.1.6 Geräte/Dokumentation/Zubehör

Apparatur zur Agarose-Gelelektrophorese	Biometra, Göttingen
Apparatur für die 2D-Gelelektrophorese	Bio-Rad, München
Apparatur zur SDS-PAGE	Biometra, Göttingen
Dialyseschläuche	Roth, Karlsruhe
Fastblotter	Biometra, Göttingen
Kodak-Röntgenfilme	Sigma, Deisenhofen
FPLC-Anlage	Amersham Pharmacia, UK
Stromquellen	Biometra, Göttingen

Zentrifugen	Tischzentrifuge 541712 Eppendorf Ultrazentrifuge L7-65 Beckman, Rotor Ti 45, SW 28 Ultrazentrifuge TL-100, Beckman Rotor TLA 100.2/100.3 Vakuumbzentrifuge Univapo 150H, Uniequip
Dokumentation	Kamera Kappa CF 8/1 RCC mit Cosimcar/Pentax-Objektiv Software: ImageP2 Version 8.2 Scanner Epson GT-7000 Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop 4.0 Densitometrie-Software Biometra ScanPack III

3.1.7 Häufig benutzte Puffer

PBS	20 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ pH 7.4, 0,8% NaCl, 0,02% KCl
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 7.6 oder pH 8.0, 1 mM EDTA
TN-Puffer	20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl
TNE-Puffer	TN-Puffer mit 5 mM EDTA

3.1.8 Medien

Luria Agar	1% Select Peptone 140, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, 1,2% Select Agar
Blau-Weiß-Selektion	50 µg/ml Kanamycinsulfat, 7 µg/ml Gentamicin, 10 µg/ml Tetracyclin, 40 µg/ml IPTG, 200 µg/ml X-Gal
LB-Medium	1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, pH 7.0
LB-Agar	LB-Medium mit 2% Agar
SOB	2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄
SOC-Medium	SOB- Medium mit 20 mM Glukose
YT-Medium	1% Hefeextrakt, 1% NaCl, 1,6% Trypton, pH 7.5

3.2 Methoden

3.2.1 Gentechnologische Methoden

3.2.1.1 Umklonierungen

Die Gene von SNAP-25 wurden in verschiedene Vektoren kloniert, in den pTM1- und den pFASTBAC-Vektor. Für die Klonierung in den pFASTBAC-Vektor musste im Vorfeld darauf geachtet werden, dass das SNAP-25 DNA-Fragment mit dem Leserahmen des Zielvektors übereinstimmt, da N-terminal ein Hexahistidinrest an das Protein gehängt wurde. Die Gene des WT und der Deletionsmutante wurden mit den Restriktionsenzymen EcoR1 und Xho1 aus dem Vektor pTM1 geschnitten und in das pFASTBAC HTa-Donorplasmid kloniert. Die SNAP-25-M1+2- und -M3+4-Konstrukte aus dem pCDNA3-Vektor wurden mit EcoRI in den pTM1-Vektor kloniert und dort mittels PCR zwei Restriktionsschnittstellen eingeführt. Auch für das pQE9-SNAP-25-M1-4-Konstrukt musste noch eine Umklonierung mit BamH1 als Restriktionsenzym in das pFASTBAC HTb-Plasmid stattfinden. Die richtige Orientierung des insertierten Fragments wurde mit Sph1 überprüft.

3.2.1.1.1 Restriktionsverdau

Um das DNA-Stück von einem Vektor in einen anderen zu überführen, wurde das Fragment mit geeigneten Restriktionsenzymen aus dem Vektor herausgeschnitten. Der gewünschte Zielvektor wurde mit den gleichen Enzymen behandelt. Der Verdau erfolgte nach den Vorschriften des Herstellers (NEB).

Im Anschluss an den Verdau, sofern dieser nur mit einem Enzym vorgenommen wurde, wurden die Phosphatgruppen des Zielvektors mit alkalischer Phosphatase nach der Vorschrift des Herstellers abgespalten.

3.2.1.1.2 PCR

Um eine Umklonierung der Konstrukte pTM1-SNAP-25b-M3+4 und -M1+2, die ich von Y. Liu erhalten hatte, in den pFASTBAC HTa-Vektor zu ermöglichen, wurden mittels PCR zwei Restriktionsschnittstellen in den pTM1-Vektor eingeführt, nämlich eine Stu1- Schnittstelle am 5'-Ende und am 3'-Ende eine Xba1-Schnittstelle. Als Primer dienen:

5'-CGAGGCCCTCGGCATGGCCGAGGACGCAGACATGCGC-3' und

5'-CGTCTAGAGCTTAACCACTTCCCAGCATCTTTGTTGCACGTTGGTTGGC-3'.

Die Restriktionsschnittstellen sind jeweils unterstrichen. Die PCR wurde unter Standardbedingungen durchgeführt.

3.2.1.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in einem 1%igen Agarosegel bei einer Spannung von 100 V mit TAE (40 mM Tris-HCl pH 8.3, 40 mM Eisessig, 1 mM EDTA) und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid als Lauf- und Gelpuffer. 10 µl Probe wurden mit 2 µl Stopp-Puffer (73 mM Saccharose, 100 mM Tris-HCl pH 7.6, 63 mM EDTA, 1% Bromphenolblau) versetzt, und 5 µl eines DNA-Markers (Smart Ladder) wurden als Konzentrations- und Größenstandard aufgetragen.

3.2.1.1.4 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Die Banden der DNA-Fragmente konnten aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (Jetsorb) aus dem Gel extrahiert werden.

3.2.1.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Die gereinigten DNA-Fragmente wurden mit dem analog geschnittenen, dephosphorylierten Vektor mit 1 µl einer T4-DNA-Ligase im Verhältnis 4:1 von Fragment zu Vektor eingesetzt und über Nacht im vom Hersteller empfohlenen Ligationspuffer bei 4°C ligiert.

3.2.1.1.6 Herstellung kompetenter Zellen

Für die Herstellung der kompetenten Bakterienzellen der *E.coli*-Stämme M15[pREP4] und XL1Blue wurde die Kalziumchlorid-Methode (Mandel&Higa, 1970; Maniatis et al.,1982) eingesetzt. Das pREP4-Plasmid sorgt bei dem M15-Stamm für die Kanamycinresistenz.

100 ml logarithmisch wachsender Zellen (OD_{600nm} von 0,5 in LB-Medium) wurden 30 min auf Eis gekühlt und 15 min bei 1000xg und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 25 ml eiskalter, steril filtrierter $CaCl_2$ -Lösung (50 mM) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie oben zentrifugiert und in 5 ml der eiskalten $CaCl_2$ -Lösung aufgenommen. Durch die anschließende Inkubation auf Eis bis zu 24 h erhöhte sich die Transformationseffizienz (Dagert & Ehrlich, 1979).

3.2.1.1.7 Transformation von *E.coli* Zellen

Sowohl Plasmide als auch Ligationsansätze wurden in kompetente *E.coli*-Zellen transformiert. 100 µl kompetente Zellen wurden mit 1 ng DNA oder 10 µl Ligationsansatz 30 min auf

Material und Methoden

Eis inkubiert, 45 s auf 42°C erhitzt und anschließend für 2 min auf 4°C abgekühlt. Nach Zugabe von 900 µl YT-Medium wurde die Zellsuspension bei 37°C 45 min unter Schütteln inkubiert. 100 µl des Transformationsansatzes wurden auf einer Agarplatte mit YT-Nährmedium und Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.1.2 Transposition

Für die Transposition der rekombinanten Donorplasmide pFASBAC HT_{a/b/c} wurden MAX EFFICIENCY® DH10BAC™-Zellen benötigt, die das Bacmid bMON14272 und das Helferplasmid pMON7124 beinhalten (siehe Abb. 3.2).

Dazu wurde 1 ng der rekombinanten Plasmid-DNA zu 100 µl kompetente DH10BAC-Zellen gegeben und 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 s und eine Abkühlung der Zellen auf Eis für 2 min. Nach Zugabe von 900 µl SOC Medium wurde bei 37°C für 4 h unter Schütteln inkubiert. 100 µl der Kultur wurden auf einer Luria-Agarplatte mit Kanamycin, Gentamycin, Tetracyclin, IPTG und Bluo-Gal verteilt und für mindestens 24 h bei 37°C inkubiert. Die Inkubation wurde beendet, wenn deutlich weiße von blauen Kolonien differenziert werden konnten.

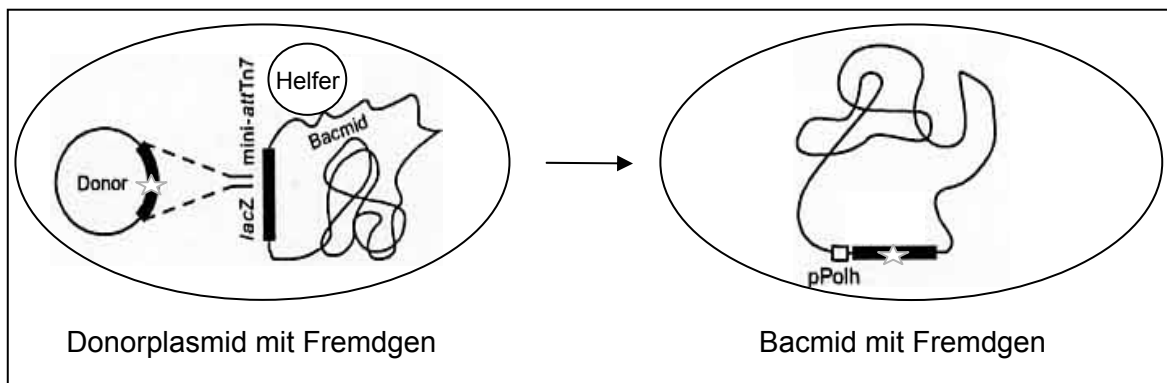


Abb. 3.2: Schema der Transposition (modifiziert aus Bac-To-Bac-Expression-Manual von Gibco)
Das Donorplasmid gibt das Fremdgen (Stern) in den DH10Bac-Zellen an das Bacmid ab, so dass das LacZ α -Gen, das sich in der Transpositionsstelle befindet, unterbrochen wird. Unterstützt wird dieser Vorgang durch ein Helferplasmid, das sich ebenfalls in den Zellen befindet. Das Fremdgen befindet sich unter der Kontrolle eines Polyhedrin-Promotors.

3.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

3.2.1.3.1 Analytischer Maßstab

Diese Minipräparation wurde nach einem Protokoll von Del Sal et al. (1988) durchgeführt und hat den Vorteil, dass alle Arbeitsschritte in einem einzigen Gefäß stattfinden.

In 2 ml LB-Medium mit Antibiotikum wurde eine von einer Platte gepickte Kolonie über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Von dieser Übernachtskultur wurden 1,5 ml in einem Eppendorf-Gefäß zentrifugiert (5 min bei 20.000xg). Die pelletierten Zellen wurden in 200 µl

STET-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 8% Sucrose, 0,1% Triton X-100, 50 mM EDTA) mit 1 mg/ml Lysozym resuspendiert, 5 min inkubiert und 45 s im kochenden Wasserbad erhitzt. Die Zelltrümmer wurden zentrifugiert (20.000xg, 10 min bei RT). Zu dem Überstand wurden 8 µl 37°C warmes Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) gegeben und 5 min bei RT und 20.000xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µl 1,2 M NaCl-Lösung resuspendiert und mit 750 µl eiskaltem absolutem Ethanol präzipitiert. Die gefällte DNA wurde zentrifugiert (20.000xg, 10 min, 4°C), mit 750 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgesaugt und das bei 37°C getrocknete Pellet in 40 µl TE-Puffer mit RNase (20 µg/ml) aufgenommen.

3.2.1.3.2 Präparativer Maßstab

Die Maxi- und Minipräparationen erfolgten mit Kits der Firma Qiagen nach den entsprechenden Protokollen. Der zentrale Schritt in dieser Präparationsmethode ist die Reinigung der DNA über Anionenaustauschersäulen.

Die Plasmid-DNA für die Transfektion in Insektenzellen oder für Sequenzierungen wurde im Minimaßstab präpariert. Eine Maxipräparation der Plasmid-DNA erfolgte bei dem Bedarf von großen DNA-Mengen.

3.2.1.4 **Probeverdau**

Hierzu wurden 5 µl der isolierten DNA mit den Restriktionsenzymen, die zur Ligation verwendet wurden, nach den Vorschriften des Herstellers in dem jeweils erforderlichen Puffer in einem Endvolumen von 10 µl verdaut. Die verdauten und unverdauten Proben wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und die Fragmente verglichen.

3.2.1.5 **Herstellung der Mutante von SNAP-25**

Zur Herstellung der SNAP-25-Mutante M1-4 wurden mit Hilfe des Quik Change™ Site Directed Mutagenesis Kits von der Firma Stratagene mehrere Punktmutationen in das Gen des SNAP-25-WTb mittels PCR eingeführt. Dazu wurden zwei Primer mit den gewünschten Mutationen benötigt: der sense Primer sowie der komplementäre antisense Primer. Folgende Oligonukleotide wurden verwendet:

sense: 5'-GACCTAGGAAAATTCGCCGGGCTTGCTGTGGCTCCCGCTAAC
AAGCTAAAATCCAGTGATGC-3' und

antisense: 5'-GCATCACTGGATTTIAGCTTGTTAGCGGGAGCCACAGCA
AGCCCGGCGAATTTTCCTAGGTC-3'.

Material und Methoden

Die eingeführten Mutationen sind unterstrichen. Um jeweils eine andere Aminosäure einzuführen, mussten immer zwei Nukleotide substituiert werden.

Zur Kontrolle, ob die PCR erfolgt ist, wurde eine stumme Punktmutation eingeführt, mit der eine Restriktionsschnittstelle entfernt wurde (ebenfalls unterstrichen).

Eine PCR wurde mit 50 ng der doppelsträngigen rekombinanten pQE9 SNAP-25-WTb-Plasmid-DNA, je 125 ng der Primer, dem dNTP-Mix, der PfuTurbo-Polymerase und dem Reaktionspuffer nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt (vgl. Abbildung 3.3, Schritt 2+3). Nach der PCR wurde die DNA mit dem Restriktionsenzym DpnI, das aufgrund des Methylierungsmusters der parentalen DNA nur diese schneiden kann, verdaut (Abbildung 3.3, Schritt 4). Anschließend erfolgte eine Transformation der DNA in superkompetente XL1-Blue-Zellen (aus dem Kit) wie in Abb. 3.3, Schritt 5 und eine Selektion auf einer Agarplatte mit Ampicillin. Die präparierte DNA der einzelnen Kolonien wurde einem Probeverdau unterzogen und so kontrolliert, ob das PCR-Produkt die Mutationen trägt.

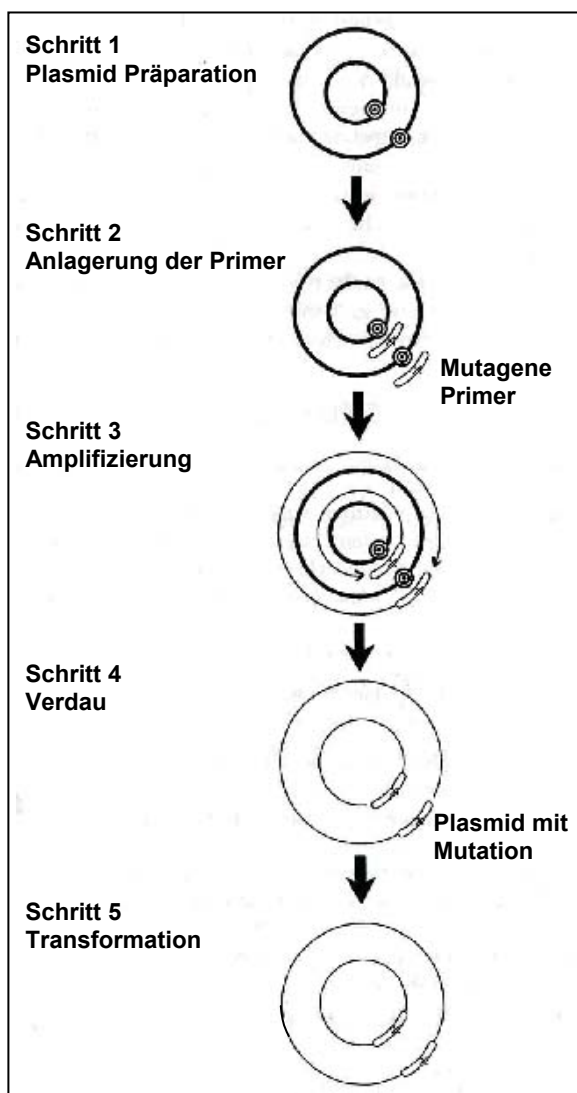


Abb. 3.3: Schema der Quik Change™
Site Directed Mutagenesis
Erläuterungen siehe Text

3.2.1.6 Sequenzierungen

Die Sequenzierungen der mutierten DNA von SNAP-25 wurden von der Firma Invitex (Berlin-Buch) durchgeführt. Dafür wurden jeweils 1 µg über Ionenaustauschersäulen (vgl. 3.2.1.3.2) gereinigte DNA und Primer, die im 5'-Bereich der mutierten Region binden, verwendet. Als Sequenzierungsprimer des SNAP-25-M1-4-Konstruktes im pQE9-Vektor wurde das Oligonukleotid 5'-CGGATAACAATTTTCACACAG-3' verwendet, das in der pQE9-Region bindet, und für die Konstrukte SNAP-25-M1+2 und -M3+4 der Primer 5'-CGAGGCCTCGGCATGGCCGAGGACGCAGACATGCGC-3' (vgl. auch 3.2.1.1.2), der am 5'-Ende des Inserts bindet.

3.2.2 Expressionssysteme

3.2.2.1 Transiente Expression mit Vaccinia Virus

Zur transienten Expression von SNAP-25 in CV1-Zellen wurde ein spezielles rekombinantes Vaccinia Virus, vTF7-3, verwendet (Fuerst et al., 1986), das das Gen für die RNA-Polymerase des T7-Bakteriophagen enthielt. Als Expressionsvektor diente pTM1 (Moss et al., 1990), in dem das SNAP-25-Gen unter der Kontrolle eines T7-Promotors stand. Im Zytoplasma infizierter Zellen wurde die T7-RNA-Polymerase produziert, die den T7-Promotor des pTM1-Vektors erkannte und die Expression des entsprechenden Gens initiierte.

Alle weiteren notwendigen Arbeitsschritte zur Vermehrung und Reinigung des Vaccinia Virus sind nach Weisz und Machamer (1994) durchgeführt und werden hier nicht näher erläutert.

3.2.2.1.1 Zellkultur

CV1-Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit 5% fetalem Kälberserum (FKS) bei 37°C und einer Atmosphäre von 5% Kohlendioxid als Monolayer kultiviert. Eine Zellpassage fand alle 3-4 Tage statt. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit Trypsin/EDTA vom Boden abgelöst und in frischem Medium mit 5% FKS resuspendiert.

3.2.2.1.2 Transfektion

Zur Expression von SNAP-25 wurden CV1-Zellen in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 35 mm so ausgesät, dass sie eine Konfluenz von 70-80% hatten. Die Zellen wurden mit einer Infektionsmultiplizität pro Zelle (MOI) von 10 Plaques formenden Einheiten (PFU) Vaccinia Virus in 500 µl DMEM infiziert und für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte

die Transfektion mit 10 µl Lipofektin und 3 µg DNA, die 30 min bei RT vorinkubiert wurden, in 1 ml DMEM.

3.2.2.1.3 Radioaktive Markierung

Zur Charakterisierung der exprimierten Proteine wurde eine metabolische Markierung mit ³⁵S-Methionin (Trans-³⁵S-Label, ICN) durchgeführt. Nach dem Abpipettieren des Transfektionsgemisches von den CV1-Zellen wurden die Zellen mit DMEM ohne Methionin gewaschen und danach für zwei Stunden mit 30 µCi Trans-³⁵S-Label in 500 µl DMEM ohne Methionin markiert.

Die Zellen wurden mit 1 ml PBS gewaschen und mit Lysispuffer (1% Triton X-100 in 150 mM NaCl und 50 mM Tris-HCl pH 7.4) bei 4°C für 15 min lysiert.

3.2.2.2 **Bac-To-Bac-Expression**

3.2.2.2.1 Zellkultur

Die Insektenzellen *Spodoptera frugiperda* 9 (*Sf9*) wurden in Gewebekulturflaschen oder -schalen bei 27°C als Monolayer kultiviert, wobei die Verdopplungszeit bei etwa 24 Stunden lag und die Zellen zweimal pro Woche passagiert wurden. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers von dem Boden des Gefäßes gelöst, in TC100-Medium mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) resuspendiert und vereinzelt.

3.2.2.2.2 Transfektion der Sf9-Zellen mit rekombinanter Bacmid-DNA

Zur Transfektion wurden 9×10^5 Sf9-Zellen in 35-mm-Kulturschalen ausgesät und nach 1h mit 1 ml des vorbereiteten Transfektionsgemisches versetzt. Die Zellen mit dem Transfektionsgemisch verblieben für 5 h im 27°C-Brutschrank.

Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt, und die Zellen mit 2 ml frischem Nährmedium versehen. Die Ernte der Zellen und des entstandenen Virus, der sich im Zellüberstand befindet, erfolgte nach 72 h mittels Zentrifugation.

Herstellung des Transfektionsgemisches:

5 µl der Bacmid-DNA, die das Konstrukt für SNAP-25 enthält, und 6 µl Cellfectin-Reagens wurden getrennt in jeweils 100 µl TC100-Medium gegeben. Die gründlich gemischten Lösungen wurden vereinigt und bei Raumtemperatur 15 bis 45 min inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit Medium auf 1 ml aufgefüllt.

3.2.2.2.3 Virusvermehrung

Zur Infektion der Sf9-Zellen wurde ein Stock des Baculovirus mit eingeschlossener für das entsprechende Protein kodierende DNA mit konstantem Virustiter hergestellt. Dazu wurden frisch ausgesäte Zellen auf eine 14-cm-Kulturschale mit je 1 ml Virus, wie unter 3.2.2.2.2 hergestellt, infiziert und nach einem Mediumwechsel bis zur Ausbildung eines zytopathischen Effekts (CPE) bei 27°C inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Schalenboden gelöst, resuspendiert und vom Virusüberstand abzentrifugiert (20 min, 1000xg, 4°C).

Das geerntete Virus wurde nun auf ein oder zwei Maxiflaschen mit einer Oberfläche von je 150 cm² gegeben und die Virusvermehrung analog in einem größeren Maßstab wiederholt.

3.2.3 **Reinigung der rekombinanten Proteine**

3.2.3.1 **Proteinreinigung aus Insektenzellen**

3.2.3.1.1 Expression

Zwei 14-cm-Kulturschalen mit einem annähernd konfluenten Zellrasen wurden mit TC100-Medium ohne FKS und P/S gewaschen und mit je 15 ml des gleichen Mediums mit 1,5 ml des Virusstocks versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 27°C wurde das Medium abgenommen, durch virusfreies Medium ersetzt und die Zellen für zwei Tage bei 27°C inkubiert.

3.2.3.1.2 Reinigung

Alle Reinigungsschritte erfolgten bei 4°C. Die zwei Tage zuvor mit dem Virusstock für rekombinantes SNAP-25 infizierten Insektenzellen wurden abgelöst, im Medium resuspendiert und 30 min bei 1000xg zentrifugiert. Die Zellen wurden in Bac-Lysis-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8.5, 100 mM KCl, 1% Nonidet P-40, 1mM PMSF, Proteasen-Inhibitoren-Cocktail) 1 h in einem Über-Kopf-Schüttler lysiert (auf 10⁸ Zellen 1 ml) und die Zelltrümmer anschließend bei 20800xg sedimentiert.

Der Überstand wurde 1 h mit 0,5 ml gepackter, mit Bac-Lysispuffer gewaschener Ni²⁺-NTA-Agarose inkubiert und die Agarose in einer Säule gesammelt. Nach dreimaligem Waschen der Säule mit Bac-Waschpuffer (20 mM Tris-HCl pH 8.5, 500 mM KCl, 20 mM Imidazol, 10% Glycerin) erfolgte die Elution der Proteine von der Nickel-Agarose-Matrix durch dreifache Inkubation der Säule mit je 500 µl Bac-Elutionspuffer (20 mM Tris-HCl pH 8.5, 100 mM KCl, 250 mM Imidazol, 10% Glycerin).

Die drei Eluate sowie Proben aller Zwischenschritte wurden in einem 12%-Acrylamidgel aufgetrennt.

3.2.3.1.3 Dialyse

Um den N-terminalen Hexahistidinrest der Proteine abzuspalten, musste zunächst der Imidazolgehalt im Elutionspuffer der vereinten Eluate durch Dialyse über Nacht reduziert werden.

Dafür wurden Dialyseschläuche von Roth mit einer Ausschlussgröße von 12-14 kDa verwendet, wofür diese vor der Benutzung 30 min in einer 1 mM EDTA-Lösung gekocht und anschließend gewässert wurden. Die Dialysen erfolgten über Nacht bei 4°C gegen 10 mM Tris-HCl pH 8.0 unter ständigem Rühren. Zur Präparation der Proben für die CD-Spektroskopie wurde gegen 10 mM Phosphatpuffer pH 7.4 dialysiert.

3.2.3.1.4 Proteolytische Spaltung

Nach der Dialyse erfolgte die Abspaltung des Hexahistidinrestes der rekombinanten Proteine mit rekombinanter TEV-Protease. Hierzu wurde der Proteinpool (alle Eluate einer Reinigung, bei einem Ausgangsmaterial von 10^8 -Zellen) mit 150 Einheiten rekombinanter TEV-Protease und 10 mM DTT im Puffer des Herstellers für 2 h bei 16°C inkubiert. Nach Inkubation mit Nickel-Agarose für 1 h und Zentrifugation bei 500xg für 5 min befand sich das hexahistidinrestfreie Protein im Überstand.

3.2.3.2 **Proteinreinigung aus Bakterienzellen**

Einige rekombinante Proteine wurden in *E.coli* exprimiert und als Fusionsproteine gereinigt. Die rekombinanten Proteine SNAP-25, VAMP, α -SNAP und NSF wurden durch ihren Hexahistidinrest, Syntaxin durch die Fusion mit Glutathion S-Transferase (GST) jeweils über Affinitätschromatographie gereinigt. Die Hexahistidinrestkonstrukte befanden sich in einem pQE-Vektor und das GST-Syntaxin-Gen in einem pGEX-Plasmid (Smith und Johnson, 1988).

3.2.3.2.1 Überexpression

Nach der Transformation der rekombinanten Plasmide in kompetente *E.coli* Bakterienzellen des Typs M15[pREP4] wurden von einzelnen Klonen Übernachtskulturen angesetzt. Anschließend wurden damit je 100 ml antibiotikahaltiges Medium beimpft und diese Kulturen dann bei 37°C bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,7 inkubiert. Die Expression

des Proteins wurde mit 1 mM IPTG Endkonzentration induziert, und die Kultur bei 37°C für 5 h (Proteine mit Hexahistidinresten) oder bei Raumtemperatur über Nacht (GST-Syntaxin) geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend 10 min bei 5000xg und 4°C zentrifugiert.

3.2.3.2.2 Reinigung

Die Reinigung der rekombinanten Proteine mit Hexahistidinresten erfolgte mit Nickel-NTA-Affinitätschromatographie nach den Protokollen aus „The QIAexpressionist“ der Firma Qiagen und wurde jeweils in den Pufferzusammensetzungen den einzelnen Proteinen angepasst (Tab. 3.1). Im Folgenden wird das Standardreinigungsprotokoll beschrieben. Alle Reinigungsschritte erfolgten bei 4°C.

Das Zellpellet wurde in Sonifikationspuffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF) resuspendiert, mit Ultraschall behandelt und die Zellsuspension mit 5 mg/ml Lysozym und 200 µg/ml DNase I versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurde die Probe erneut mit Ultraschall behandelt und mit einer Triton X-100 Endkonzentration von 0,5% 20 min inkubiert (die letzten beiden Schritte gelten nicht für NSF und α -SNAP). Nach Zentrifugation der Zelltrümmer (20.000xg, 10 min) wurde der Überstand mit 1 ml Ni²⁺-NTA-Agarose, 50%ig in Sonifikationspuffer, für eine Stunde geschüttelt. Diese Emulsion wurde auf eine Säule mit Filter gegeben und dreimal mit Waschpuffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 20 mM Imidazol) gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte mit insgesamt 1,5 ml Elutionspuffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 250 mM Imidazol) in drei Elutionsschritten. Gelagert wurden die Proteine bei -80°C nach Zugabe von 2 mM DTT.

Proteine / Pufferzugaben	Waschpuffer	Elutionspuffer
His₆-SNAP-25	0,5% Triton X-100	0,5% Triton X-100
His₆-VAMP	0,5% Triton X-100	0,5% Triton X-100
His₆-α-SNAP	-----	-----
His₆-NSF	0,5 mM ATP, 2 mM MgCl ₂	0,5 mM ATP, 2 mM MgCl ₂

Tab. 3.1: Pufferzugaben in Abhängigkeit vom Protein für eine effiziente Reinigung

Anpassung des Standard-Wasch- und Elutionspuffers aus dem Protokoll an die Anforderungen der einzelnen rekombinanten Proteine SNAP-25, VAMP, α -SNAP und NSF durch zusätzliche Zugabe geeigneter Detergenzien und Salze.

Die Reinigung von GST-Syntaxin erfolgte nach dem Protokoll des „GST Gene Fusion System“ (Pharmacia) und entsprach bis auf wenige Änderungen dem Standardreinigungsprotokoll.

Änderungen zum Standardprotokoll:

Der lösliche Zellüberstand wurde zum Immobilisieren von GST-Syntaxin mit 500 µl mit Sonifikationspuffer gewaschener Glutathionagarose für 1 h inkubiert.

Waschpuffer: 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100

Elutionspuffer: 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM red. Glutathion, 0,5% Triton X-100

3.2.3.2.3 Dialysen

Zur Entfernung von störenden Salzen mussten Syntaxin, α -SNAP und NSF dialysiert werden. Die Dialyse erfolgte wie oben beschrieben in Schläuchen. Syntaxin wurde gegen TNE mit 0,1% Triton X-100, NSF gegen TN mit 0,5 mM ATP und 2 mM $MgCl_2$ und α -SNAP gegen TN-Puffer dialysiert (Puffer siehe Materialien).

3.2.4 Proteincharakterisierung

3.2.4.1 SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970). Es wurden Sammelgele von 5% und Trenngele von 12% Acrylamid/Bisacrylamid verwendet.

Die Proteinproben wurden mit reduzierendem (31,25 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% Glycerin, 3% SDS, 0,5% Bromphenolblau, 5% Mercaptoethanol) oder nicht reduzierendem (ohne Mercaptoethanol) Probenpuffer versetzt, kurz aufgekocht und störende Feststoffe durch Zentrifugation entfernt.

Zusätzlich zu den Proben lief ein Proteinmarker mit (bei radioaktiven Proben oder Gelen, die geblottet werden sollten, ein vorgefärbter Marker), um die Größen bestimmen zu können. Die Banden wurden anhand verschiedener Methoden sichtbar gemacht: mit Coomassie Brilliant Blue (1 g/l in 50% Methanol und 10% Essigsäure), mit Silberfärbung (Blum et al., 1987) oder bei radioaktiv markierten Proteinen durch Radiographie. Zu letzterem wurden die aufgetrennten Proteine im Gel fixiert (10% Methanol, 10% Essigsäure), gewässert und mit 1 M Salicylat behandelt. Das Gel wurde getrocknet und auf einen Röntgenfilm gelegt.

3.2.4.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Bei der Zweidimensionalen Gelelektrophorese werden Proteine nach zwei unterschiedlichen, voneinander unabhängigen Parametern aufgetrennt. In der ersten Dimension werden die Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Nettoladung, d.h. ihres isoelektrischen Punktes aufgetrennt (Isoelektrische Fokussierung). Die zweite Dimension stellt eine SDS-PAGE dar, bei der die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden (Laemmli, 1970).

Isoelektrische Fokussierung (IEF):

Die Auftrennung der ersten Dimension erfolgte vertikal in einem Kapillargel mit einem pH-Gradienten. Vor der eigentlichen Trennung wurde ein Vorlauf mit Probenpuffer und folgen-

den Parametern durchgeführt: 10 min 200 V, 15 min 300 V und 15 min 400 V. Die Proteinprobe wurde mit Probenpuffer 1:3 verdünnt, Carboanhydrase zugegeben, 10-15 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach Zugabe frischer Pufferlösungen auf das Kapillargel gegeben. Die Proteine wurden in den mit 40 µl Probenüberschichtungspuffer aufgefüllten gekühlten Kapillarröhrchen wie folgt aufgetrennt: 15 min 400 V, 15 min 750 V und 2,5 h 1000 V.

Elektrodenpuffer für die obere Kammer:

0,5 g NaOH in 250 ml destilliertem Wasser auflösen und für 30 min entgasen.

Elektrodenpuffer für die untere Kammer:

0,34 ml 85 % H₃PO₄ in 2 l destilliertem Wasser und für 30 min entgasen.

Probenüberschichtungspuffer:

8 M Harnstoff, 5% Triton X-100, 1% Servalyte 7-9, 10 mM DTT

Probenpuffer:

9,8 M Harnstoff, 2% Triton X-100, 2% Servalyte 7-9, 100 mM DTT
auf 37°C erwärmen, damit sich der Harnstoff auflöst.

Gellösung:

9,2 M Harnstoff, 4% Acrylamid/Bisacrylamid, 2% Triton X-100, 0,6% Pharmalyte 3-10, 0,6% Pharmalyte 4-6.5, 1, 4% Pharmalyte 5-8

als Initiatoren: 0,016% Ammoniumpersulfat und 0,16% TEMED

Nach dem Lauf wurde das Gel aus dem Kapillarröhrchen entfernt und in der Transferlösung (72 mM Tris-HCl, pH 8.8, 3% SDS, 0,001% Bromphenolblau) inkubiert. Das Gel wurde auf ein 8%iges-Trenngel gelegt, und die Proben in der zweiten Dimension analog zur oben beschriebenen Laemmli-Methode aufgetrennt.

3.2.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach Bradford

Die Bestimmung der Konzentrationen der gereinigten Proteine erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford,1976). Hierzu wurden jeweils zweimal 50 µl der Probe in geeigneter Verdünnung und 100 µl der Bradford-Lösung (100 mg Serva Blau G, 50 ml Ethanol (96%), 100 ml Phosphorsäure (85%), auf 1 l mit aqua bidest. aufgefüllt) in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Eine Eichkurve wurde mit Protein-Lösungen von Rinderserumalbumin (BSA) unterschiedlicher Konzentrationen (im Bereich 14-140 µg/ml) erstellt. Die Absorption der Proben wurde nach 5 min bei 620 nm in einem ELISA-Reader gemessen und die Messwerte mit Hilfe des Wincurvefitting-Programms am Computer ausgewertet.

3.2.4.4 Immunologische Untersuchungen

3.2.4.4.1 Western-Blot

Die in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteinproben wurden auf eine präparierte (10 s Methanol, 5 min aqua bidest., 15 min Transferpuffer) PVDF-Membran transferiert. Dieser Transfer erfolgte in einer Fastblot-Apparatur ("semi-dry") mit Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol) innerhalb 30 min bei 25 mA pro cm² Gelfläche. Als Kontrolle für die Vollständigkeit des Transfers diente ein ebenfalls im Gel aufgetrennter vorgefärbter Marker.

Die PVDF-Membran wurde für 1 h mit Blot-Waschpuffer (20% Magermilchpulver in PBS und 0,1% Tween20) abgesättigt und dann 1 h mit Anti-SNAP-25-Antikörper (Kaninchen, 1:2000 in Blot-Waschpuffer verdünnt) oder mit Anti-VAMP-Antikörper (Maus, 1:2000 in Blot-Waschpuffer verdünnt) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 15 min mit dem Blot-Waschpuffer wurde 1h mit einem Anti-Kaninchen(Anti-Maus)-IgG-Peroxidase-Konjugat (1:5000 verdünnt) inkubiert. Es wurde wieder dreimal gewaschen und mit dem ECL-System detektiert. Die Chemilumineszenz wurde auf einem Röntgenfilm nach unterschiedlichen Expositionszeiten sichtbar gemacht.

3.2.4.4.2 Strippen der PVDF-Membran

Um die Membran für verschiedene Analysen verwenden zu können, wurde diese bei 50°C in Tris-Puffer (62,5 mM Tris-HCl pH 6,7, 2% SDS, 100 mM 2-Mercaptoethanol) für 30 min inkubiert und dadurch die Antikörper wieder abgelöst. Anschließend wurde die Membran zweimal mit PBS mit 0,1% Tween20 für jeweils 10 min gewaschen.

3.2.4.4.3 Bindung an Syntaxin und Immunpräzipitation

Um die Bindung von exprimiertem SNAP-25 aus Säugerzellen an Syntaxin zu untersuchen, wurden die transient exprimierenden CV1-Zellen nach der Markierung mit ³⁵S-trans-Label mit PBS gewaschen und lysiert. Die Zelltrümmer wurden bei 20.000xg zentrifugiert und der Überstand mit 10 µg Syntaxin und anschließend mit 1 µl des Syntaxin-Antiserums für jeweils eine Stunde bei 4°C geschüttelt. Nach Zugabe von 30 µl Protein-A-Sepharose (1:1 in Lysispuffer) wurde erneut eine Stunde bei 4°C auf dem Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Die Protein-A-Sepharose wurde danach dreimal mit Lysispuffer gewaschen. Der Überstand aus der Immunpräzipitation mit Syntaxin-Antikörper wurde einer erneuten Immunpräzipitation unterzogen, diesmal mit SNAP-25-Antiserum. Die Protein-A-Sepharose wurde mit Lysispuffer dreimal gewaschen. Nach dem Entfernen des letzten Überstandes wurde reduzierender Probenpuffer auf die Sepharose gegeben, kurz aufgekocht, zentrifugiert und der Überstand

auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das Gel wurde nach der Fixierung mit Salicylat behandelt, nach dem Trocknen auf einen Röntgenfilm gelegt und dieser bei -80°C exponiert.

3.2.4.5 Spektroskopische Methoden

3.2.4.5.1 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. H. Gelderblom, Robert-Koch-Institut Berlin und Dr. D. Riedel, Arbeitsgruppe Neurobiologie des Max-Planck-Instituts für Biophysikalische Chemie, Göttingen, durchgeführt.

Bei allen Aufnahmen handelt es sich um Negativkontrastierungen mit 1% Uranylacetat, für die 5 μg SNAP-25 in 10 mM Phosphatpuffer pH 7.4 auf ein Kupfergitter aufgetragen wurden. Die Proben wurden 5 min auf dem Gitter inkubiert und der Flüssigkeitstropfen entfernt.

Das eingesetzte SNAP-25 wurde vorher gereinigt und nach Abspaltung des Hexahistidinrestes dialysiert.

3.2.4.5.2 CD-Spektroskopie

Die Circular Dichroismus-(CD-)spektroskopischen Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. D. Fasshauer (Arbeitsgruppe Neurobiologie des Max-Planck-Instituts für Biophysikalische Chemie, Göttingen) durchgeführt.

Die Spektren wurden in 5-20 Durchgängen mit 0,2 nm-Stufen im fernen UV-Bereich (240-200 nm) in einem Jasco model J-720 angefertigt. Das Gerät wurde zu einem J-715U aufgerüstet und ist mit einem 6-Positionen Peltiereffekt-Zellenwechsler ausgestattet. Die Messungen fanden in Hellma Quartz Küvetten mit einer Weglänge von 0,1 cm oder in Mixküvetten von 0,437 cm statt.

3.2.4.5.3 MALLS

Mit Hilfe des „Multi-angle Laser Light Scattering“ (MALLS) wurden die Größen der gereinigten Proteine und ihrer Oligomere bestimmt. Diese Messungen wurden von Stefan Pabst (Arbeitsgruppe Neurobiologie des Max-Planck-Instituts für Biophysikalische Chemie, Göttingen) durchgeführt. Hierzu wurde das gereinigte Protein mit rTEV-Protease gespalten und gegen Tris-Puffer wie oben beschrieben dialysiert. Es wurde jeweils 150 μg Protein in 400 μl mit einer HR-10/30 Superdex-200-Gelfiltrationssäule (Pharmacia, Uppsala, Schweden) bei einer Laufgeschwindigkeit von 0,5 ml/min aufgetrennt. Als Puffer diente filtriertes 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA. Die Elutionsprofile ließen sich mit UV-Absorption bei 280 nm, durch Laser Photometrie und durch differentielle

Material und Methoden

Refraktometrie (jeweils Geräte von Wyatt Technology Corporation) visuell verfolgen. Die Analyse erfolgte mit ASTRA für Windows (Wyatt, 1993). Hierzu wurden die drei Elutionsprofile der UV-Absorption, der Laser Photometrie und der Refraktometrie übereinandergelegt und die Peaks, die zusammentrafen, für die Auswertung markiert. Der dn/dc -Wert, der der Änderung des Refraktionsindex in Abhängigkeit von der Änderung der enthaltenen Molekülkonzentration entspricht, ist für Proteine weitestgehend konstant und wurde für die Analyse auf 0,189 festgesetzt.

3.2.4.5.4 FPLC

Für die Auftrennung der gereinigten Proteine nach ihrer Größe wurde eine Gelfiltrations-Chromatographie durchgeführt. Dazu wurde eine FPLC („Fast Performance Liquid Chromatographie)-Apparatur mit integrierter Säule, die mit Sephacryl-S300-HR gepackt war, und integrierter Detektion bei 280 nm verwendet. Das Gelmaterial hatte eine Ausschlussgröße von 1500 kDa, und die Säule ein Bettvolumen von etwa 27 ml bei einer Höhe von 15 cm. Die Eichung der Säule erfolgte mit Blue Dextran, das mit 2000 kDa im Ausschlussvolumen läuft, mit BSA und mit Bromphenolblau zur Endpunkterkennung des Laufs. Die Läufe erfolgten bei konstanten Laufparametern mit 20 mM Tris pH 7.4 als Laufpuffer und 0,5 ml/min Laufgeschwindigkeit.

3.2.4.5.5 Anionenaustauscherchromatographie

Das über Nickelaffinitätschromatographie gereinigte SNAP-25 wurde für manche Anwendungen mittels Anionenaustauscherchromatographie (SMART-System der Firma Pharmacia Biotech) einem weiteren Reinigungsschritt unterzogen. Diese Methode wurde mit Dirk Fasshauer (s.o.) durchgeführt. Als Laufpuffer diente Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA und 1 mM DTT, und das Protein wurde mit einem NaCl-Gradienten von 0 bis 1 M von der Säule (MonoQ) eluiert.

3.2.4.6 Weitere Charakterisierungen

3.2.4.6.1 Chemisches Quervernetzen *in vitro*

Das chemische Quervernetzen der gereinigten Proteine erfolgte mit Dithio-bis[succinimidylpropionat] (DTSP, Lomants Reagenz). Dieses Reagenz ist in der Lage, Proteine homobifunktional mit einem Spacer von 12 Å an Aminogruppen zu vernetzen.

Die gereinigten Proteine wurden gegen Phosphatpuffer dialysiert. Zu 20 µl Protein (200 µg/ml) wurde 1 µl DTSP (10 mM in DMSO) gegeben, wobei als Kontrolle ein weiterer Ansatz

mit 1 µl DMSO diente. Bei Raumtemperatur wurde 45 min unter leichtem Schütteln inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 2 µl eines 1 M Tris-HCl-Puffers (pH 7.4) gestoppt. Die chemische Quervernetzung wurde in Abhängigkeit der Tritonkonzentration untersucht (0-1% Triton X-100).

Die Proben wurden mit nicht reduzierendem Probenpuffer aufgekocht und auf ein SDS-Polyacrylamidgel gegeben.

3.2.4.6.2 Markierung mit ³H-Palmitinsäure und Reinigung der Proteine

Kulturschalen (Durchmesser von 35 bzw. 6 mm) mit SNAP-25 exprimierenden Insektenzellen wurden am Tag nach der Transfektion mit TC100-Medium gewaschen und mit 1 mCi ³H-Palmitinsäure pro ml Medium über Nacht markiert.

Am nächsten Tag wurden die Zellen von der Oberfläche gelöst, mit PBS gewaschen und, wie unter 3.2.3.1.2 beschrieben, lysiert und gereinigt, wobei die einzelnen Reinigungsschritte durch Zentrifugationen ersetzt wurden.

Die Eluate wurden mit nicht reduzierendem Probenpuffer im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend wurde ein Röntgenfilm auf das salicylatgetrocknete Gel gelegt und für verschiedene Expositionszeiten bei -80°C gelagert.

3.2.4.6.3 Phasentrennung mit Triton X-114

Diese Methode, mit der Proteine nach ihrer Hydrophobizität getrennt werden, basiert auf den ungewöhnlichen Eigenschaften von Triton X-114 (Bordier, 1981). Es ist bei 0°C in wässrigen Puffern löslich und trennt sich über 20° C als eine deutliche Detergenzienphase. Im allgemeinen befinden sich hydrophile (z.B. cytosolische) Proteine in der wässrigen und hydrophobe (z.B. integrale Membranproteine) in der Tritonphase.

Zur Phasentrennung wurden jeweils 100 µl der Proteinproben (0,2-1 µg/µl) in der Kälte mit je 100 µl Triton X-114-Lösung (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 300 mM NaCl, 2% Triton X-114) gemischt und 1 h inkubiert. Diese Proben wurden auf ein Saccharosekissen (300 µl 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 6% Saccharose, 0,06% Triton X-114) geschichtet und 5 min auf 30°C erwärmt. Es folgte eine Phasentrennung durch Zentrifugation bei Raumtemperatur (5 min mit 300xg). Die obere Phase über der Saccharoseschicht wurde abgenommen und erneut bei 4°C mit der gleichen Menge Triton X-114-Lösung vermischt und inkubiert. Anschließend wurde wieder erwärmt und erneut zentrifugiert. Die Phasen konnten jetzt abgenommen und für ein Gel präpariert werden. Hierzu wurde das Tritonpellet auf die Menge der wässrigen Phase mit einfachem Probenpuffer aufgefüllt. Von wässriger und Tritonphase wurde die gleiche Menge auf ein 12%-Minigel gegeben. Proben der Zwischen-

schritte wurden ebenfalls im Gel aufgetrennt. Je nach Proteinmenge wurden die Proteine mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt oder im Western Blot detektiert.

3.2.4.6.4 Liposomen Rekonstitution

Um die Bindung der SNAP-25-Proteine an die Membran zu betrachten, wurden künstliche Membranen in Form von Liposomen rekonstituiert (Margittai et al., 1999).

Ein Lipidmix aus folgenden Lipiden in Chloroform/Methanol (2:1) wurde hergestellt:

Phosphatidylcholin (PC)	7,3 µmol
Phosphatidylethanolamin (PE)	2,6 µmol
Phosphatidylserin (PS)	1,3 µmol
Phosphatidylinositol (PI)	1,3 µmol
Cholesterin (Ch)	1,3 µmol
Rhodamin Phosphatidylethanolamin (RhoPE)	0,067 µmol

Dieser Lipidmix wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockenheit eingengt, mit einem inerten Gas überspült (Stickstoff oder Argon) und in 2 ml 5%iger Cholal-Lösung in PBS aufgenommen. Die SNAP-25-Probe wurde mit einem gleichen Volumen an Lipiden in Cholal vermengt, so dass Protein zu Lipid im Verhältnis von 1:1000 vorlag. Das Protein-Lipid-Gemisch wurde auf eine mit PBS äquilibrierte Säule (Sephadex G-20 S) geladen, wo sich durch das Zurückhalten des Detergens die Liposomen rekonstituieren konnten. Aufgrund des farbigen Lipids (RhoPE) konnte das Eluat, in dem sich die Liposomen befanden, gut detektiert werden.

Es folgte eine Stufengradientenzentrifugation. Dazu wurden 400 µl des Eluats mit der gleichen Menge 80%iger Nycodenz-Lösung in PBS vermischt und in einem Zentrifugenröhrchen erst mit 400 µl 30%iger Nycodenz-Lösung in PBS, dann mit 100 µl PBS überschichtet und 4 h bei 55.000xg zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden vorsichtig von oben einzelne Fraktionen entweder von 100 oder 200 µl abgenommen. Von den einzelnen Fraktionen wurden jeweils 20 µl unter reduzierenden Bedingungen für eine 12%iges SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot präpariert.

3.2.4.6.5 Trypsinbehandlung der Liposomenfraktion

Um über die Art der Rekonstitution des Proteins in die Liposomen eine Aussage machen zu können, wurden die Liposomenfraktionen mit Trypsin behandelt.

Dafür wurden 20 µl der Liposomenfraktionen mit 1 µl Trypsin (1 mg/ml) bzw. mit 1 µl Wasser 30 min bei 25°C inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion mit 1 mM PMSF und reduzierendem Probenpuffer. Die Proben wurden gekocht, auf ein SDS-Gel gegeben und als Western Blot detektiert.

3.2.4.7 Wechselwirkungen des gereinigten SNAP-25 mit anderen Proteinen

3.2.4.7.1 SNAP-25 im SNARE-Komplex

Zur Untersuchung, ob aus Insektenzellen gereinigtes SNAP-25 einen binären oder ternären Komplex mit weiteren SNARE-Proteinen bilden kann, wurde das aus *E.coli* gereinigte und dialysierte GST-Syntaxin bei 4°C an Glutathionagarose (in TNE-Puffer mit 0,1% Triton emulgiert) gebunden. Nach vier Stunden wurde die Agarose mit TNE-Puffer (0,1% Triton) dreimal gewaschen, dazu jeweils bei 2000xg für 5 min zentrifugiert. Es folgte eine Übernachtinkubation bei 4°C mit unterschiedlichen Proteinen:

- ◆ als Kontrolle ohne weitere Proteine
- ◆ mit gereinigtem und gespaltenem SNAP-25-WT (im folgenden nur WT genannt) oder SNAP-25-Del (im folgenden nur Del) aus Insektenzellen
- ◆ und mit aus Bakterienzellen gereinigtem VAMP und WT oder Del.

Die Agarose wurde nach der Inkubation mit den Proteinen erneut dreimal mit TNE-Puffer (0,1% Triton) gewaschen. Die Proben wurden mit nicht reduzierendem Probenpuffer versetzt, gekocht und der Überstand nach Zentrifugation auf ein 12% SDS-Polyacrylamidgel gegeben. Das Gel wurde anschließend geblottet. Die Detektion erfolgte im Western Blot mit anti-SNAP-25-Antikörpern und dem ECL-System.

3.2.4.7.2 Bildung eines SDS-resistenten SNARE-Komplexes

Die Bildung des SNARE-Komplexes erfolgte wie oben beschrieben über die Bindung von Syntaxin an Agarose. Über Nacht folgte die Inkubation in der Kälte mit den restlichen SNARE-Proteinen, mit SNAP-25-WT, oder -M1-4 aus *Sf9*, WT aus *E.coli*, sowie Synaptobrevin aus *E.coli* gereinigt. Die Agarose wurde am nächsten Tag dreimal mit TNE-Puffer gewaschen und mit reduzierendem Probenpuffer versetzt. Beide Proben wurden auf ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel gegeben, wobei nur eine vorher aufgeköcht wurde. Es folgte ein Western Blot mit anti-SNAP-25-Antikörpern und nach der Detektion ein Strippen der Membran mit anschließendem Western Blot mit Antikörpern gegen Synaptobrevin.

3.2.4.7.3 Enzymatische Spaltung des SNARE-Komplexes

Die enzymatische Spaltung des SNARE-Komplexes erfolgt mit der ATPase NSF und α -SNAP mit Mg^{2+} -Ionen unter der Spaltung von ATP zu ADP (Söllner et al., 1993).

Der SNARE-Komplex wurde, wie oben beschrieben gebildet. Die Glutathionagarose mit dem gebundenen Ternärkomplex wurde dreimal mit TN-Puffer (0,1% Triton) gewaschen. Zu der gepackten Agarose wurden je 14 μ g dialysiertes α -SNAP, 13 μ g dialysiertes NSF, 1 mM ATP und 10 mM $MgCl_2$ gegeben. Die Kontrolle erfolgte ohne NSF. Die Ansätze wurden zusätzlich

Material und Methoden

mit 300 µl Puffer versetzt und 10 bzw. 60 min bei 28°C geschüttelt. Anschließend wurden die Proben 5 min bei 2000 x *g* zentrifugiert, die Überstände vorsichtig abgenommen und die Proteine mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Hierzu wurden die Überstände auf Eis mit TCA (10%) versetzt, 30 min inkubiert und die gefällten Proteine für 30 min bei 20.000*xg* und 4°C zentrifugiert. Die Proteinpellets wurden mit 1 ml abs. Ethanol gewaschen, um TCA-Spuren zu entfernen. Die Pellets wurden luftgetrocknet und in reduzierendem Probenpuffer aufgenommen. Auch die Agarosepellets wurden in reduzierendem Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden aufgekocht und auf SDS-Polyacrylamidgele geladen. Die Gele wurden geblottet und die Proteine mit verschiedenen Antikörpern detektiert.