
Modulation von Vesikelparametern nach Stimulation und im Rahmen zirkadianer Rhythmik

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

PHILIPP E. W. TREPPMANN

aus Bonn

Berlin, Dezember 2009

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit vom 01. März 2006 bis zum 15. Dezember 2009 am Institut für integrative Neuroanatomie der Charité Universitätsklinik in Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. Gudrun Ahnert-Hilger angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Volker Haucke
Institut für Chemie und Biochemie
Freie Universität Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. Gudrun Ahnert-Hilger
Institut für integrative Neuroanatomie
Charité – Universitätsmedizin Berlin

Disputation am 23.03.2010

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Grundlagen des Nervensystems.....	1
1.2	Grundfunktionen der Synapsen.....	5
1.3	Neurotransmitter und deren Freisetzung	7
1.4	Bedeutung des SNARE-Komplexes.....	9
1.5	Schlüsselproteine synaptischer Vesikel	12
1.5.1	<i>Synaptobrevin</i>	13
1.5.2	<i>Synaptophysin</i>	14
1.5.3	<i>Synaptobrevin-Synaptophysin-Komplex</i>	16
1.5.4	<i>Weitere exozytotische Schlüsselproteine</i>	17
1.6	Vesikuläre Neurotransmitter-Transporter	18
1.7	Präsynaptisch wirkende Neurotoxine	20
1.7.1	<i>Clostridiale Neurotoxine</i>	20
1.7.2	<i>Präsynaptisch wirkende, PLA2-aktive Neurotoxine</i>	21
1.8	Zirkadiane Rhythmik.....	22
2	Zielsetzung.....	25
3	Materialien	26
3.1	Antikörper.....	26
3.1.1	<i>Primärantikörper</i>	26
3.1.2	<i>Sekundärantikörper</i>	27
3.2	Substanzen und Reagenzien	27
3.2.1	<i>Chemikalien</i>	27
3.2.2	<i>Molekulargewichtsstandards</i>	30
3.2.3	<i>Präsynaptische Neurotoxine</i>	30
3.2.4	<i>Radioaktiv markierte Neurotransmitter</i>	30
3.3	Puffer und Lösungen	31
3.4	Verbrauchsmaterial	35

Inhaltsverzeichnis

3.5	Versuchstiere.....	35
3.6	Geräte	36
3.7	Software.....	37
4	Methoden	38
4.1	Proteinreinigung	38
4.1.1	<i>Synaptosomen.....</i>	<i>38</i>
4.1.2	<i>Synaptische Vesikel</i>	<i>40</i>
4.1.3	<i>Aufarbeitung synaptischer Vesikel unter Ca²⁺-Einfluss.....</i>	<i>40</i>
4.2	Proteinbestimmungen	42
4.2.1	<i>Bicinchoninsäure-Assay.....</i>	<i>42</i>
4.3	Neurotransmitter-Aufnahme	43
4.4	Extraktion von Membranproteinen	44
4.5	Immunpräzipitation von Proteinkomplexen	45
4.6	Chemische Quervernetzung	47
4.7	Isolation von Lipid rafts	48
4.7.1	<i>Isolation synaptosomaler Lipid rafts</i>	<i>48</i>
4.7.2	<i>Alkalische Phosphatase Assay</i>	<i>49</i>
4.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	50
4.9	Western Blot Analyse	52
4.9.1	<i>Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran</i>	<i>53</i>
4.9.2	<i>Immundetektion von immobilisierten Proteinen</i>	<i>53</i>
4.9.3	<i>Strippen der Nitrocellulosemembran</i>	<i>54</i>
4.10	Statistik.....	54
4.10.1	<i>t-Test.....</i>	<i>54</i>
5	Ergebnisse.....	55
5.1	Charakterisierung des Syb-Syp-Komplexes	55
5.1.1	<i>Proteinverteilung in subzellulären Kompartimenten</i>	<i>55</i>
5.1.2	<i>Die Synaptobrevin-Synaptophysin Interaktion.....</i>	<i>56</i>

5.1.3	<i>Syb-Syp-Komplex unter Ca²⁺-Einfluss</i>	61
5.1.4	<i>Syb-Syp-Komplex beeinflussender zytosolischer Faktor</i>	65
5.2	SPAN-induzierte Modulation der Syb-Syp-Interaktion	72
5.2.1	<i>SPAN-Wirkung an Synaptosomen</i>	72
5.2.2	<i>SPAN-Wirkung an isolierten synaptischen Vesikeln</i>	76
5.2.3	<i>Analyse der LS1-Fraktion nach SPAN-Behandlung</i>	80
5.2.4	<i>SPAN-Einfluss auf die Syb-Syp-Interaktion</i>	84
5.2.5	<i>SPAN-bedingte Proteinumverteilung</i>	85
5.2.6	<i>SPAN-Einfluss auf die Aufnahme von Neurotransmittern</i>	90
5.2.6.1	Untersuchung der SPAN-Wirkung auf VMAT	90
5.2.6.2	Veränderte Glutamataufnahme nach SPAN-Behandlung	93
5.3	Charakterisierung von Syp-Deletionsmutanten	96
5.3.1	<i>Vergleich von Wildtypmäusen und Syp-Deletionsmutanten</i>	96
5.3.2	<i>Neurotransmitter-Aufnahme von Syp-Deletionsmutanten</i>	99
5.3.2.1	Analyse der Aufnahme von Serotonin	99
5.3.2.2	Analyse der Glutamataufnahme	100
5.4	Zirkadiane Regulation des Syb-Syp-Komplex.....	102
6	Diskussion	108
6.1	Ergebnisse im Überblick.....	108
6.2	Synaptophysin im Fokus	111
6.3	Der Synaptobrevin-Synaptophysin-Komplex	115
6.3.1	<i>Charakterisierung der Regulation</i>	116
6.3.2	<i>SPANs-Wirkung</i>	121
6.4	Synaptophysin-Deletionsmutanten	125
6.5	Zirkadiane Regulation	127
7	Zusammenfassung	130
8	Abstract.....	132
9	Literaturverzeichnis	134
10	Abkürzungsverzeichnis.....	148

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Verteilung der Ionen [mmol/l] im Intra- und Extrazellulärraum	3
Tab. 2	Zusammensetzung der Neurotransmitter-Aufnahmepuffer	44
Tab. 3	Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels	51
Tab. 4	Überblick über die in der Literatur beschriebenen Bedeutung für Syp	114

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung eines Neurons	2
Abb. 2	Aktionspotential	4
Abb. 3	Mechanismus der Transmitterfreisetzung	8
Abb. 4	Schematische Darstellung des SNARE-Komplexes	10
Abb. 5	Synaptisches Vesikel mit integrierten bzw. assoziierten Proteinen	12
Abb. 6	Schematische Darstellung von Synaptobrevin und Synaptophysin	17
Abb. 7	Aktogramme von Wildtypmäusen und Per2 ^{Brdm1} Deletionsmutanten	23
Abb. 8	Schematische Darstellung der subzellulären Fraktionierung	39
Abb. 9	Aufarbeitung synaptischer Vesikel mit und ohne Ca ²⁺ -Ionen	41
Abb. 10	Prinzip der BCA-Proteinkonzentrationsbestimmung	42
Abb. 11	Schematische Darstellung der Immunpräzipitation	46
Abb. 12	Disuccinimidylsuberat (DSS)	48
Abb. 13	Natriumdodecylsulfat	51
Abb. 14	Verteilung einzelner Proteine synaptischer Vesikel	56
Abb. 15	Syb-Syp-/SNARE-Komplex des Rattengehirns	57
Abb. 16	Syb-Syp-/SNARE-Komplex des Mäusehirns	58
Abb. 17	Syb-Syp-Komplex chemisch quervernetzt mit DSS	60
Abb. 18	Immunpräzipitation synaptischer Vesikel aus Ratten/Mäusen	62
Abb. 19	IP: Ca ²⁺ -bedingte Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes	64
Abb. 20	XL: Ca ²⁺ -bedingte Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes	65
Abb. 21	Ca ²⁺ - und Zytosolabhängige Syb-Syp-Komplexdissoziation	67
Abb. 22	Erhalt der Funktionalität des zytosolischen Faktors nach Einfrieren	68
Abb. 23	Hitzebeständigkeit des zytosolischen Faktors	69
Abb. 24	Syb-Syp-Komplexdissoziation nach Behandlung mit LS2 >30kDa	70
Abb. 25	Syb-Syp-Komplexdissoziation nach Behandlung mit LS2 >10kDa	71

Abb. 26 SPAN-Wirkung an Synaptosomen (P2)	73
Abb. 27 SPAN-bedingte Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes	75
Abb. 28 SPAN-Wirkung auf isolierte synaptische Vesikel (LP2)	77
Abb. 29 Toxineffekt auf isolierte synaptische Vesikel (LP2)	78
Abb. 30 Syb-Syp-Komplex nach SPAN-Behandlung an LP2	79
Abb. 31 LS1: SPAN-induzierte Syb-Syp-Komplexdissoziation	81
Abb. 32 SPAN-Einfluss auf synaptische Vesikel nach LS1-Toxinzugabe (LP2*)	83
Abb. 33 SPAN-wirkung auf verschiedene Kompartimente.....	85
Abb. 34 Verteilung verschiedener Proteine nach Triton- bzw. Lubrol-Extraktion ...	87
Abb. 35 SPAN-Wirkung auf „Lipid Rafts“	88
Abb. 36 Serotoninaufnahme	90
Abb. 37 SPANs vermindern die VMAT vermittelte NT-Aufnahme	91
Abb. 38 SPANs vermindern die VMAT-vermittelte NT-Aufnahme	92
Abb. 39 Glutamataufnahme	93
Abb. 40 SPANs vermindern konzentrationsabhängig die Glutamataufnahme	94
Abb. 41 SPANs vermindern die Glutamataufnahme (Ca ²⁺)	95
Abb. 42 Immunpräzipitation von Wildtypmäusen und Syp-Deletionsmutanten.....	97
Abb. 43 Quervernetzung von Syp-Deletionsmutanten bzw. Wildtypmäusen	98
Abb. 44 Vermehrte Serotoninaufnahme Syp-defizienter Mäuse.....	100
Abb. 45 Vermehrte Glutamataufnahme Syp-defizienter Mäuse	101
Abb. 46 Proteinmenge Syb.....	102
Abb. 47 Syb-Analyse zirkadianer Proben aus WT/Per2 ^{Brdm} -Mäusen.....	104
Abb. 48 Proteinmenge Syp	105
Abb. 49 Syp-Analyse zirkadianer Proben aus WT/Per2 ^{Brdm} -Mäusen.....	106
Abb. 50 Schematische Darstellung der Syb-Syp-Interaktion.....	115
Abb. 51 Schematische Darstellung des Zyklus des Syb-Syp-Komplexes	118

1. Einleitung

1.1 Grundlagen des Nervensystems

Je höher ein Lebewesen entwickelt ist, desto dringender bedarf es neben Versorgungs- und Ausscheidungsorganen übergeordneter, leistungsfähiger Informations-, Koordinations- und Steuersysteme. Die Funktionalität des Organismus ist dabei nur dann gegeben, wenn zwischen den verschiedenen Komponenten Nachrichten ausgetauscht und bearbeitet werden können. Dies geschieht mit Hilfe des hormonalen Systems, insbesondere aber des Nervensystems.

Das Nervensystem versetzt den Organismus in die Lage, seine Umwelt wahrnehmen und mit ihr interagieren zu können. Dabei dient es der Aufnahme umweltbedingter oder im Körper entstehender Reize sowie der Umwandlung dieser Reize in nervöse Erregungen, deren Weiterleitung und Verarbeitung. Das Nervengewebe, das sich aus dem Ektoderm entwickelt, ist aus Nervenzellen (Neuronen) und der Neuroglia, einem ektodermalen Stütz- und Hilfgewebe, aufgebaut. Das menschliche Gehirn verfügt schätzungsweise über sieben Billionen Neurone (Webster, 2001).

Die Möglichkeit der Erregbarkeit, d.h. die Fähigkeit bestimmter Zellen, auf einen physikalischen oder chemischen Reiz mit einer spezifischen Reaktion, einer Erregung, zu reagieren, diese Erregung fortzuleiten und damit Organfunktionen zu beeinflussen, stellt also eine wesentliche Eigenschaft lebender Organismen dar. Neben Nervenzellen sind hierauf Sinnes- (=Rezeptor-) und Muskelzellen spezialisiert.

1. Einleitung

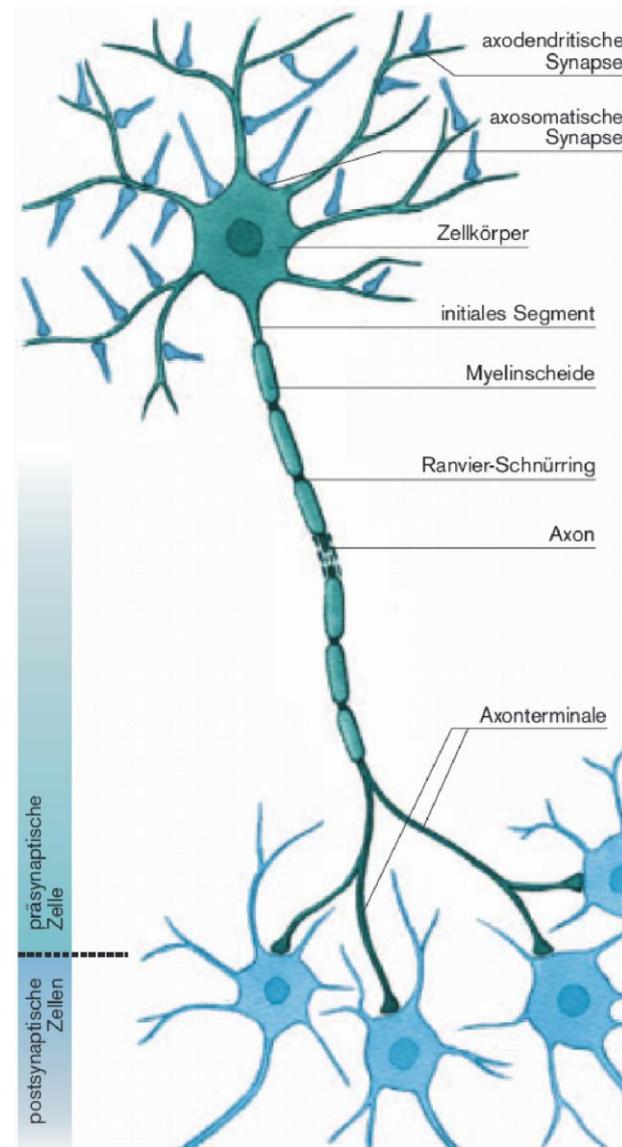


Abb. 1 Schematische Darstellung eines Neurons

Neben einem Zelleib (Soma oder Perikaryon) weist ein Neuron meist mehrere Zellfortsätze auf. Der Fortsatz, mit dem das Neuron Informationen in Form von Aktionspotentialen zu anderen Zellen leitet, ist der Neurit (Axon). Die übrigen, baumartig verzweigten Fortsätze werden Dendriten genannt (Klinke, 2005).

Die Entstehung und Fortleitung einer Erregung in einer Nervenfasern beruht auf ionalen Prozessen, die sich an der die Zelle begrenzenden Zellmembran abspielen. Diese sechs bis zehn Nanometer dicke Lipid-Protein-Membran trennt das Innere der Faser vom extrazellulären Raum. Aufgrund der unterschiedlichen Ionenverteilung in den beiden Medien (siehe Tabelle 1) entsteht zwischen dem Innen- und dem Außenraum eine ständige Potentialdifferenz (Spannung), die als Membranpotential bezeichnet wird. Für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials ist ein aktiver Transport, gewährleistet insbesondere durch die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, notwendig. Das Innere einer erregbaren Zelle weist gegenüber dem Außenraum in Ruhe ein negatives Potential, das Membran-Ruhepotential, von -60 bis -100 mV auf.

Ion	Zytosol	Interstitium
Na ⁺	8-30	145
K ⁺	100-155	4,4
Ca ²⁺	<0,001	1,25
Mg ²⁺	~0,8	0,7
Cl ⁻	4-30	117
HCO ₃ ⁻	8-15	27

Tab. 1 Verteilung der Ionen [mmol/l] im Intra- und Extrazellulärraum

Aufgrund dieser Konzentrationsdifferenz haben K⁺-Ionen das Bestreben, durch die für sie mittels Kaliumkanälen permeable Membran nach außen zu diffundieren. Diese Bewegung wird jedoch dadurch begrenzt, dass die Gegenionen, insbesondere Protein-Anionen, die Membran nicht passieren können. Der Ausstrom einiger positiver Ladungen baut also ein elektrisches Membranpotential auf, das die weitere K⁺-Abdiffusion verhindert. Die Na⁺-Ionen haben dabei kaum einen Einfluss auf das Ruhepotential, weil die nichterregte Membran für sie impermeabel ist. Das Ruhepotential kann demnach im Wesentlichen als ein K⁺-Diffusionspotential charakterisiert werden.

Durch einen chemischen oder physikalischen Reiz kann es zu einer Änderung des Membranpotentials kommen. Wird dieses durch einen derartigen Reiz um einen gewissen Betrag erniedrigt (depolarisiert) und dabei das Schwellenpotential überschritten, nimmt es schlagartig innerhalb sehr kurzer Zeit durch Öffnung spannungsabhängiger Ionenkanäle weiter ab. Vorübergehend wird sogar das Nerveninnere positiv gegen die Außenseite der Membran. Anschließend wird das alte Membranpotential wieder aufgebaut (repolarisiert). Diesen De- und Repolarisationsvorgang nennt man Aktionspotential oder Nervenimpuls.

1. Einleitung

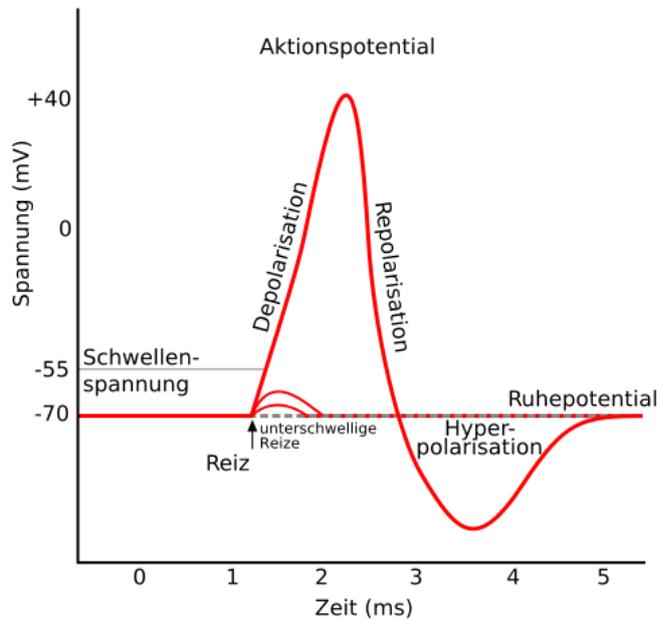


Abb. 2 Aktionspotential

Erregbare Nerven- und Muskelzellmembranen reagieren auf eine Vordepolarisation, wenn diese einen bestimmten Schwellenwert erreicht, mit monotonen Potenzialantworten (= Aktionspotentiale). Diese bestehen in der Regel aus drei Phasen: rasche Depolarisation und Potentialumkehr, langsame Repolarisation und Nachhyperpolarisation. Der Kurvenverlauf kommt dadurch zustande, dass sich in der erregbaren Membran zeit- und potenzialabhängig die Ionenleitfähigkeiten verändern. (<http://pharmakologie.wordpress.com>)

Das Aktionspotential beruht auf einer, durch den Reiz ausgelösten, plötzlichen Veränderung der Membraneigenschaften: Natriumkanäle der Membran werden kurz geöffnet, wodurch Natriumionen passiv, dem Konzentrationsgefälle folgend, in das Axoplasma einströmen. Die Folge ist eine Umkehr der Polarisation (Überschuss). Durch eine unmittelbar sich daran anschließende schnelle Abnahme der Natrium-Permeabilität und einen langsamen Anstieg der Kaliumpermeabilität stellt sich dann das Ruhepotential wieder ein.

Die Aufstrichphase des Aktionspotentials wird somit durch einen steilen Anstieg der Natriumionenpermeabilität, die Repolarisationsphase durch einen raschen Abfall der Na^+ - sowie einen langsamen Anstieg der K^+ -Permeabilität und das hyperpolarisierende Nachpotential durch eine verzögerte Abnahme der K^+ -Permeabilität bewirkt.

Reizt man eine Nervenfasern während des Aktionspotentials oder unmittelbar danach (2 ms), so tritt keine Erregung auf. Dieser Zustand, die Refraktärphase, beruht auf einer Inaktivierung der Natriumkanäle und gliedert sich in eine absolute und relative Refraktärphase.

1.2 Grundfunktionen der Synapsen

Die Kontaktstellen zwischen den Nervenzellen, die Synapsen, spielen bei der Nachrichtenverarbeitung eine große Rolle. An einer Synapse müssen Nachrichten, die als Serien von Aktionspotentialen einlaufen, vom ersten (präsynaptischen) Neuron auf ein zweites (postsynaptisches) Neuron übertragen werden. Dies ist entweder direkt durch Ionenströme (elektrische Synapsen) oder, weit häufiger, indirekt durch chemische Überträgerstoffe (chemische Synapsen) möglich.

Bei der elektrischen Synapse liegen die Zellmembranen benachbarter Neurone eng aneinander, so dass nur ein winziger Spalt von zwei Nanometer Breite verbleibt. Im Bereich dieser Membranannäherungen, die als „Gap Junctions“ bezeichnet werden, sind Proteinkomplexe in jede der beiden Membranen eingelagert. Diese Proteinkomplexe (Konnexone) bilden eine offene Pore bzw. einen Kanal zwischen den benachbarten Zellen und erlauben einen Ionenstrom, wenn ein Potentialgefälle zwischen beiden Zellen besteht.

Anders verhält es sich bei chemischen Synapsen. Sie liegen nicht direkt nebeneinander, sondern werden von dem synaptischen Spalt, einer 10-20 nm großen Lücke, voneinander getrennt. Das Membranpotential einer Zelle ist kein statischer Zustand, sondern beruht auf einem energieabhängigen dynamischen Gleichgewicht. Ioneneinstrom und Ionenausstrom halten sich die Waage. Werden nun vorhandene Ionenkanäle durch chemische Substanzen geöffnet oder geschlossen, so ändern sich das Fließgleichgewicht und damit das Membranpotential. Genau das geschieht an der postsynaptischen Membran einer Synapse. Überträgerstoffe (Neurotransmitter) werden präsynaptisch freigesetzt, diffundieren über den synaptischen Spalt zur subsynaptischen oder auch postsynaptischen Membran und öffnen dort Ionenkanäle. Die Änderung der Leitfähigkeit für bestimmte Ionen ist also Grundlage der Funktion chemischer Synapsen. An chemischen Synapsen erfolgt, anders als an elektrischen Synapsen, die Informationsübertragung hauptsächlich in eine Richtung - von der präsynaptischen auf die postsynaptische Seite. Dies ist ein Vorteil der chemischen gegenüber der elektrischen Synapse. Ein weiterer ist der, dass

1. Einleitung

die Wirkung auf das nachgeschaltete Neuron unterschiedlich, erregend (exzitatorisch) oder hemmend (inhibitorisch), sein kann. Bei einem exzitatorischen postsynaptischen Potential (EPSP) gelangt eine über das Axon geleitete Erregung an die präsynaptische Endigung (Held-Auerbach-Endknopf). Aus den synaptischen Vesikeln werden Neurotransmitter freigesetzt, welche zur subsynaptischen Membran diffundieren und dort mit molekularen Rezeptoren reagieren. Dadurch wird eine kurzzeitige Erhöhung der Permeabilität für kleine Kationen (Na^+ und K^+) ausgelöst. In Folge dessen kommt es zu einem Na^+ -Einstrom und einer Depolarisation an der subsynaptischen Membran. Inhibitorische Synapsen sind unter morphologischen und funktionellen Aspekten den exzitatorischen Synapsen sehr ähnlich. Der freigesetzte Neurotransmitter bewirkt jedoch an der subsynaptischen Membran eine kurzzeitige Erhöhung des Membranpotentials, eine Hyperpolarisation. Diese dem EPSP entgegengesetzte Änderung des Membranpotentials wird als inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP) bezeichnet. Es kommt dadurch zustande, dass der Transmitter die K^+ - und Cl^- -Permeabilität stark erhöht. Insbesondere der verstärkte Cl^- -Einstrom erhöht kurzzeitig das Membranpotential und erzeugt somit das IPSP. Da jede Hyperpolarisation das Membranpotential von der Schwelle für die Auslösung eines Aktionspotentials entfernt und damit die Erregbarkeit eines Neurons vermindert, ist während eines IPSP ein Aktionspotential schwerer auszulösen als im Ruhezustand der Membran.

Die synaptische Aktivität kann im Verlauf von Prozessen des Lernens und Erinnerns stark ansteigen. „Long term potentiation“ (LTP) ist dabei eine Form synaptischer Plastizität, die das Langzeiterinnerungsvermögen initiiert und die Antwortfähigkeit der Synapse auf Signale vergrößert. Die Aktivität der Synapse kann auf verschiedenen Wegen gesteigert werden. Dies kann sowohl durch erhöhte Effizienz der postsynaptischen Rezeptoren erreicht werden, z.B. mittels posttranslationaler Modifikation der Rezeptormoleküle kombiniert mit einer langfristigen Hochregulation der Rezeptorproteintranslation, als auch durch eine erhöhte präsynaptische Freisetzung von Neurotransmittern. Die Modulation der Proteininteraktionen auf der Ebene der synaptischen Vesikel könnte hierbei entscheidende Funktionen haben (Janz & Sudhof, 1999).

1.3 Neurotransmitter und deren Freisetzung

Die meisten Neurotransmitter werden in den Nervenendigungen in Vesikeln, die ähnlich wie die Zellmembran aus einer Phospholipid-Doppelschicht bestehen, gespeichert. Dabei lassen sich sekretorische Vesikel in zwei Klassen unterteilen: Kleine, elektromikroskopisch transparente Vesikel in Neuronen („small synaptic vesicles“ = SSVs) und ihre Analoge in neuroendokrinen Zellen („small synaptic-like microvesicles“ = SLMVs), sowie die großen, elektronenmikroskopisch dichten Vesikel („large dense-core vesicles“ = LDCV). SSV und SLMV speichern nicht-peptidische Substanzen und haben einen Durchmesser von ca. 40-50 nm, LDCVs mit einem Durchmesser von ca. 90 nm speichern zusätzlich verschiedene Neuropeptide als Ko-transmitter. In noradregeren Neuronen findet sich ein weiterer Vesikeltyp, der in der Größe den SSVs entspricht, jedoch nach Behandlung des Gewebes mit Permanganat elektronendicht erscheint. Die Membran dieser SDCVs („small dense core vesicles“) enthält Proteine, die Membrankomponenten sowohl von SSVs als auch von LDCVs darstellen.

Ein Unterschied zwischen LDCVs und SSVs besteht darin, dass LDCVs nach abgeschlossener Exozytose zum Golgi-Apparat zurückkehren und nicht wie SSVs, ohne Kontakt zu intermediären Endosomen-ähnlichen Kompartimenten, wiederbeladen und erneut verwendet werden können (Murthy *et al.*, 1997). SSVs und LDCVs liegen in vielen Neuronen in den Synapsen nebeneinander vor.

Durch die vesikuläre Speicherung steht einerseits bei Bedarf sofort eine ausreichende Menge an Neurotransmittern zur Verfügung, andererseits wird der Neurotransmitter im Vesikel vor dem Abbau geschützt.

Synaptische Vesikel liegen in drei Populationen vor: Zum einen gibt es einen Pool von Vesikeln, die über das Protein Synapsin an das Zytoskelett gebunden sind und eine ruhende Vesikelreserve darstellen (Zucker, 1996), (Wu *et al.*, 1999). Über eine Phosphorylierung können sie im Bedarfsfall mobilisiert und dem zweiten Pool zugeführt werden. Die zweite Population von Vesikeln liegt meistens in unmittelbarer Nähe der aktiven Zone, einem präsynaptischen Membranbezirk, der direkt gegenüber der postsynaptischen

1. Einleitung

Membran liegt. Sie besteht aus Vesikeln, die zwar auch nicht sofort für die Transmitterfreisetzung benutzt, aber sehr kurzfristig dafür bereitgestellt werden können. Der dritte Pool besteht aus Vesikeln, die an die aktive Zone angelagert sind. Nur diese angedockten Vesikel sind der Teil, der unmittelbar für eine Transmitterausschüttung genutzt werden kann.

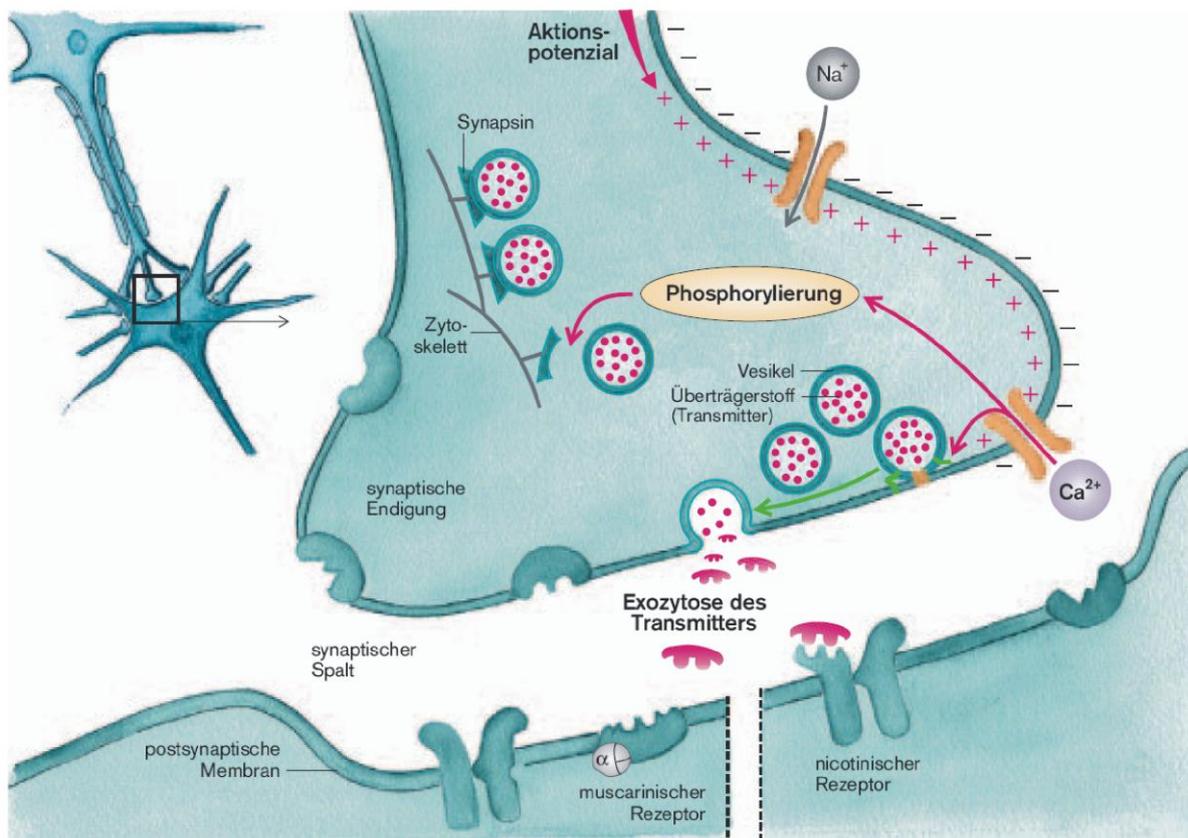


Abb. 3 Mechanismus der Transmitterfreisetzung

Das Einlaufen der Aktionspotentiale am Held-Auerbach Endknopf depolarisiert die präsynaptische Membran. Es werden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle geöffnet, Ca^{2+} strömt ein. Ca^{2+} wird an Synaptotagmin gebunden, wodurch die an der Zellmembran gebundenen, „angedockten“ Vesikel entsperrt werden und es kommt zur Exozytose des Vesikelinhalts in den subsynaptischen Spalt. Bei erhöhtem Bedarf können durch Vermittlung des Ca^{2+} über eine Phosphorylierung aus Vesikel des Reservepools vom Synapsin abgelöst werden (Klinke, 2005).

Der Freisetzung von Neurotransmittern geht ein ankommendes Aktionspotential voraus. Erreicht ein Aktionspotential den Held-Auerbach-Endknopf, kommt es durch Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle im Axolemma zu einem Einstrom von Kalziumionen aus dem Interstitium in das Axoplasma und damit zu einem kurzzeitigen Anstieg der intraaxonalen

Kalziumkonzentration. Dieser Ca^{2+} -Anstieg führt zur Neurotransmitter-Freisetzung durch Exozytose. Dabei wird zunächst, Ca^{2+} -vermittelt, Synapsin phosphoryliert und dadurch die Vesikelbindung an Strukturen des Zytoskeletts aufgehoben. An dem sich anschließenden Andocken des Vesikels an die präsynaptische Plasmamembran sind auf Vesikelseite die Proteine Synaptobrevin, Synaptophysin und Synaptotagmin, auf Membranseite die Proteine Synaptoporin und Syntaxin beteiligt. Durch Interaktion dieser Proteine öffnet sich die Vesikelmembran nach Verschmelzung mit dem Axolemma, und der Vesikelinhalt wird in den synaptischen Spalt abgegeben. Nach Entleerung des Vesikelinhalts wird die Vesikelmembran wieder von der Axoplasmamembran abgetrennt (Cremona & De Camilli, 1997) und das Vesikel steht damit für eine erneute Speicherung des Neurotransmitters zur Verfügung. In der Membran synaptischer Vesikel sitzen hierfür spezifische Transporterproteine, die Transmitter aus Zytoplasma speichern und getrieben durch einen elektrochemischen Protonengradienten, im Vesikellumen konzentrieren (Holtje *et al.*, 2000), (Edwards, 2007).

Die Membran des nach Transmitterausschüttung leeren Vesikels ist ein wertvoller Rohstoff für die präsynaptische Endigung. Daher wird die Vesikelmembran innerhalb weniger Sekunden rezykliert, also einer Endozytose unterworfen. Auch hierbei handelt es sich um einen streng regulierten Vorgang in dem Clathrin eine zentrale Rolle zukommt (Slepnev & De Camilli, 2000), (Galli & Haucke, 2001).

1.4 Bedeutung des SNARE-Komplexes

Bei der Neurotransmitterfreisetzung handelt es sich um einen sorgfältig kontrollierten Vorgang. An dieser Exozytose und der anschließenden Rückgewinnung der Vesikel sind etwa 20 verschiedene Proteine regulatorisch beteiligt, die zum Teil an den Vesikeln anliegen, bzw. in sie integriert sind. Ferner sind energiereiche Verbindungen wie Adenosin-triphosphat (ATP) und Guanosin-triphosphat (GTP) zur Transmitterfreisetzung nötig.

1. Einleitung

Zur Transmitterausschüttung müssen die angedockten Vesikel zunächst vorbereitet werden („Priming“). In diesen Vorgang sind nSec1 (Shen *et al.*, 2009) und Munc13 (Breustedt *et al.*, 2009), zwei Syntaxin bindende Proteine, involviert. Die Vesikel durchlaufen einen Reifungsprozess, in dem aus zwei Proteinen der Plasmamembran (Syntaxin und SNAP-25) und einem Protein der Vesikelmembran (Synaptobrevin) ein Komplex gebildet wird, der als Kernkomplex (SNARE-Komplex) bezeichnet wird. Die einzelnen Proteine des SNARE-Komplexes können in zwei Gruppen unterteilt werden, entsprechend ihrer Lokalisation in den verschiedenen präsynaptischen Membranen. Die Proteine auf der Vesikelmembran, welche mit Synaptobrevin verwandt sind, werden auch als v-SNAREs („vesicle membrane SNARE“) bezeichnet. Die Proteine auf der Plasmamembran, als Zielmembran während der Exozytose, welche mit Syntaxin und SNAP-25 verwandt sind, werden entsprechend als t-SNAREs („target membrane SNARE“) bezeichnet (Jahn *et al.*, 2003).

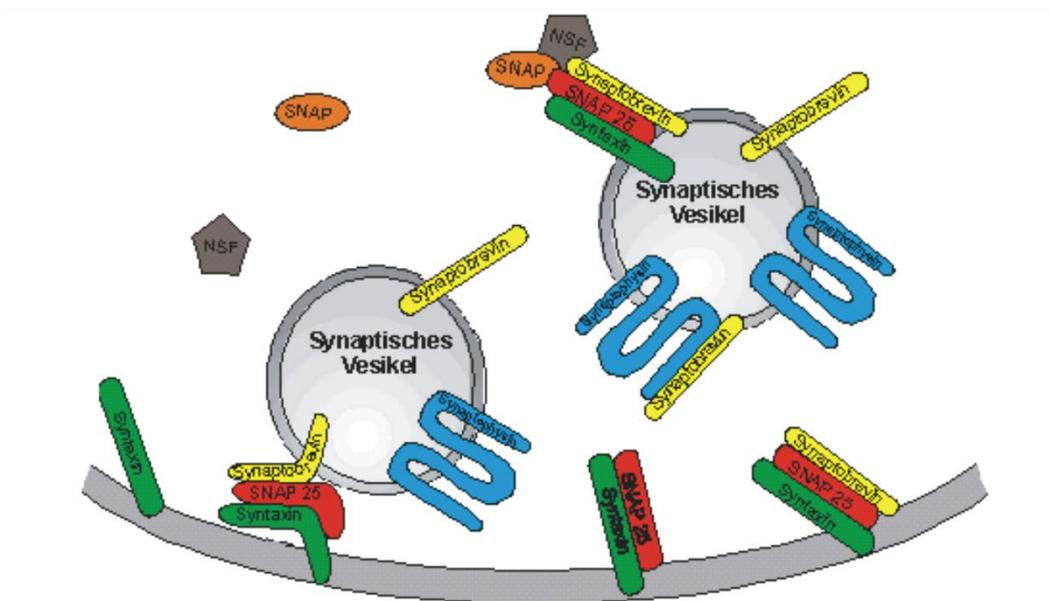


Abb. 4 Schematische Darstellung des SNARE-Komplexes

Der SNARE-Komplex ist essentiell für die Exozytose. Spezifisches Ausschalten der einzelnen SNARE-Partner mit den clostridialen Neurotoxinen Tetanustoxin und Botulinumtoxin führt zur vollständigen Blockade der synaptischen Transmission (Washbourne *et al.*, 1997), (Rossetto & Montecucco, 2008). Dabei wirken die leichten Ketten der Toxine als hochspezialisierte Zink-Proteasen und spalten die jeweiligen SNARE-Proteine an definierten Stellen (Niemann *et al.*, 1994), (Ahnert-Hilger & Bigalke, 1995).

Der SNARE-Komplex wird aufgebaut aus vier miteinander verdrehten α -Helices, wobei je eine Helix von Synaptobrevin und Syntaxin und die anderen zwei Helices von SNAP-25 stammen. Im Komplex sind die Proteine so angeordnet, dass die C-Termini und die N-Termini nach einer Seite ausgerichtet sind. (Hanson *et al.*, 1997), (Sutton *et al.*, 1998), (Lin & Scheller, 2000), (Jahn & Scheller, 2006). Synaptobrevin und Syntaxin stecken mit ihrem C-Terminus in der jeweiligen Membran, wodurch ein membranüberspannender trans-Komplex entsteht, der das Vesikel der Plasmamembran annähert (Jahn & Sudhof, 1999), (Lin & Scheller, 2000), (Jahn & Scheller, 2006), (Stein *et al.*, 2009).

Die drei SNARE-Proteine können sich spontan zu einem Komplex formieren. Jedes der Proteine kann jedoch auch einzeln an einen der beiden anderen Partner binden, wodurch binäre Komplexe entstehen. Dabei bindet SNAP-25 mit sehr hoher Affinität an Syntaxin (Pevsner *et al.*, 1994), (Fasshauer & Margittai, 2004), wohingegen die Bindungsstärke zwischen Syntaxin und Synaptobrevin am geringsten ist. Die H3-Domäne von Syntaxin ist dabei allein ausreichend, um Synaptobrevin zu binden (Calakos & Scheller, 1994), (Kee *et al.*, 1995).

Der SNARE-Komplex wird im Verlauf ATP-abhängiger Hydrolyse durch NSF („Nethylmaleimide sensitive fusion protein“) wieder aufgelöst. NSF, eine zytosolische ATPase, interagiert dabei mit einer Gruppe weiterer Regulationsproteine im Zytosol, den SNAPs („soluble NSF attachment proteins“) (Sollner *et al.*, 1993), (Jahn & Scheller, 2006). Interessanterweise wurden NSF und die SNAPs zuerst, als Voraussetzung für die Bildung des exozytotischen Fusionskomplexes entdeckt, so dass resultierend die erst später identifizierten Proteine der Synaptobrevin-Syntaxin-SNAP25-

1. Einleitung

Familien generell als SNARE-Proteine („*SNAP REceptor proteins*“) bezeichnet wurden.

Bei der Endozytose der synaptischen Vesikel an der Plasmamembran gelangen einzelne SNARE-Komplexe auch auf die Vesikelmembran (Walch-Solimena *et al.*, 1995), (Otto *et al.*, 1997). Sie liegen hier teilweise, wie auch auf der Plasmamembran, in cis-Konfiguration vor (Hinz *et al.*, 2001). Die cis-SNARE-Komplexe sind, im Gegensatz zu den trans-SNARE-Komplexen, vermutlich eine Sackgasse der Fusion, zumindest in schnellen Synapsen mit erhöhtem Endozytose-Exozytose-Durchsatz (Jahn & Sudhof, 1999).

1.5 Schlüsselproteine synaptischer Vesikel

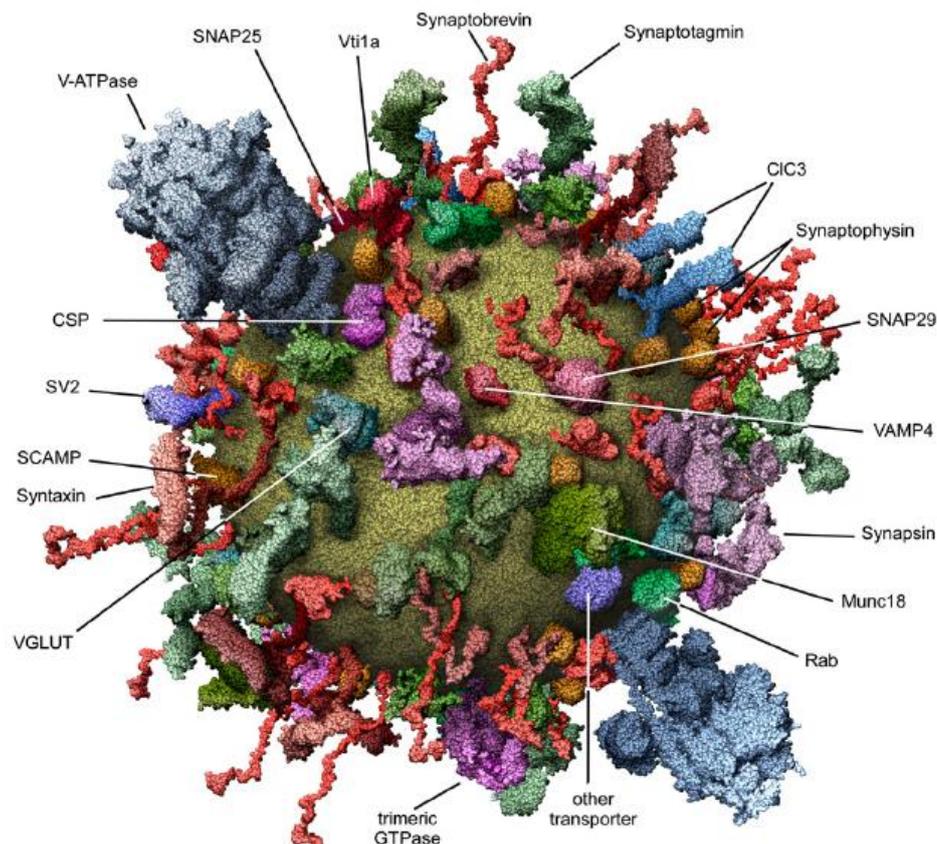


Abb. 5 Synaptisches Vesikel mit integrierten bzw. assoziierten Proteinen
(Takamori *et al.*, 2006)

1.5.1 Synaptobrevin

Synaptobrevin (Syb oder VAMP = „vesicle associated membrane protein“) ist ein in der Membran synaptischer Vesikel lokalisiertes Protein mit einem Molekulargewicht von 18 kDa. Es liegt als Monomer und Dimer vor. Beim Aufbau des Proteins lassen sich vier Domänen unterscheiden: Ein zytoplasmatischer, prolinreicher N-Terminus an den sich ein hoch konservierter, hydrophober Kernteil anschließt. Dieser enthält die Bindungsdomäne für die Fusion mit dem SNARE-Komplex. Es folgt eine kleine Transmembrandomäne, der sich der C-Terminus anschließt.

Synaptobrevin ist ein Bestandteil des für die Membranfusion essentiellen SNARE-Komplexes, der noch die Plasmamembranproteine SNAP-25 und Syntaxin enthält (Jahn & Südhof, 1999). Außerdem bildet es mit Synaptophysin (Syp) den Synaptobrevin-Synaptophysin-Komplex (Syb-Syp-Komplex). SNARE-Komplex und Syb-Syp-Komplex schließen sich aus. Synaptobrevin 2 ist die häufigste Isoform im zentralen Nervensystem (ZNS) und wurde im Nervensystem des Zitterrochens (Trimble *et al.*, 1988) entdeckt, konnte allerdings auch in verschiedenen weiteren Spezies kloniert und sequenziert werden (Elferink *et al.*, 1989), (Südhof, 1989). Es wird in allen Neuronen des Gehirns exprimiert und nimmt mehr als acht Prozent des Proteinanteils in der synaptischen Vesikelmembran ein (Takamori *et al.*, 2006). Synaptobrevin-Deletionsmutanten sind nicht lebensfähig und sterben unmittelbar nach der Geburt. Versuche an diesen Deletionsmutanten belegen, dass Synaptobrevin für die schnelle Membranfusion in der Synapse verantwortlich ist. (Schoch *et al.*, 2001). Allerdings fusionieren synaptobrevinhaltige Lipidvesikel relativ langsam mit Syntaxin/SNAP-25 Vesikeln (Melia *et al.*, 2002), so dass das Vorhandensein weiterer Proteine sowie eine definierte Protein-/Lipidzusammensetzung entscheidend sind, um schnelle Fusionen zu gewährleisten. Weitere Isoformen des Proteins, wie z.B. Synaptobrevin 1, das in großer Menge im Rückenmark und in den Hirnnervenkernen exprimiert wird, oder auch Cellubrevin, welches in allen Zellen vorkommt und in Neuronen am Recycling von Plasmamembranrezeptoren beteiligt ist (McMahon *et al.*, 1993), kommen vor.

1.5.2 Synaptophysin

Synaptophysin (Syn) war das erste integrale Membranprotein synaptischer Vesikel, das isoliert (Wiedenmann & Franke, 1985), (Jahn *et al.*, 1985) und kloniert (Leube *et al.*, 1987) werden konnte. Es hat ein Molekulargewicht von 38 kDa in Neuronen, in neuroendokrinen Zellen variiert das Molekulargewicht in Abhängigkeit der N-Glykosylierung des Moleküls und wird in enormer Quantität exprimiert (Jahn & Sudhof, 1999), (Leube *et al.*, 1987). Neben seiner Anwendung als molekularer Marker für Synapsen dient es vor allem als funktioneller Marker für neuronale Zellen. So hat Synaptophysin im medizinischen Bereich weitreichende Bedeutung bei der Bestimmung der Synapsendichte bei Erkrankungen des Gehirns sowie für die Diagnostik von Tumoren (Morrison & Prayson, 2000), (Wick, 2000).

Der Aufbau (vgl. Abb. 6) stellt sich wie folgt dar: Synaptophysin verfügt über vier Transmembrandomänen, welche durch zwei luminal liegende Schleifen, die durch Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten stabilisiert werden, miteinander verbunden sind (Jahn *et al.*, 1985), (Buckley *et al.*, 1987), (Sudhof *et al.*, 1987). Die terminalen Amino- und Carboxylgruppen weisen beide zur zytoplasmatischen Seite des Vesikels. Der Aminoterminus ist im Vergleich zum Carboxylterminus sehr kurz. Letzterer trägt zehn Kopien einer glyzerinreichen Pentapeptidwiederholung, die der des Rhodopsins ähnelt (Ovchinnikov Yu *et al.*, 1988). Die meisten antigenen Anteile von Synaptophysin sitzen an diesem Terminus.

Synaptophysin kommt auf synaptischen Vesikeln in Form von homo-oligomeren, durch nicht kovalente Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten gebildeten, Komplexen vor (Thomas *et al.*, 1988). Durch chemische Quervernetzung in intakten Zellen konnten Komplexe aus bis zu vier Untereinheiten gefunden werden (Johnston & Sudhof, 1990).

Mehrere Synaptophysin-Interaktionspartner wurden bisher identifiziert. Eine der wichtigsten Interaktionen ist die direkte Assoziation mit Synaptobrevin (Calakos & Scheller, 1994), (Edelmann *et al.*, 1995), (Washbourne *et al.*, 1995). Weitere Interaktionspartner sind z.B. die vesikuläre Protonenpumpe V-ATPase (Thomas & Betz, 1990), (Galli *et al.*, 1996), (Carrion-Vazquez *et*

al., 1998), Myosin V (Prekeris & Terrian, 1997), Dynamin I (Daly *et al.*, 2000), (Daly & Ziff, 2002) und indirekt Synaptotagmin 1. In Neuronen und neuroendokrinen Zellen konnten für Synaptophysin zusätzlich cholesterolassoziierte Regionen nachgewiesen werden, womit Synaptophysin als ein spezifisch cholesterolbindendes Protein in der synaptischen Vesikelmembran charakterisiert wurde (Thiele *et al.*, 2000).

Trotz intensiver Bemühungen bleibt die funktionelle Bedeutung Synaptophysins bis heute unverstanden. Im Gegensatz zu Synaptobrevin-Deletionsmutanten sind Synaptophysin-Deletionsmutanten gesund und zeigen keinen spezifischen Phänotyp (Eshkind & Leube, 1995), (McMahon *et al.*, 1996). Dies indiziert, dass Synaptophysin selbst nicht essentiell ist. Möglicherweise können Synaptophysin-Isoformen, (SCAMPS = „secretory carrier-associated membrane proteins“), Synaptoporin oder Synaptogyrin Aufgaben des Proteins übernehmen. Synaptophysin-Deletionsmutanten von *Caenorhabditis elegans* zeigen, dass Synaptophysin für die Synaptogenese oder grundlegende synaptische Funktionalität nicht notwendig ist (Abraham *et al.*, 2006). Neueste Untersuchungen von Schmitt und Kollegen konnten jedoch Verhaltensänderungen und Lerndefizite bei Synaptophysin-Deletionsmutanten feststellen (Schmitt *et al.*, 2009).

In Sehstäbchen, als Neuronen ohne detektierbaren Anteil an Synaptoporin, konnte in Synaptophysin-defizienten Mäusen eine aktivitätsabhängige Veränderung der Anzahl synaptischer Vesikel und ihrer Morphologie nachgewiesen werden (Spiwox-Becker *et al.*, 2001). Elektrophysiologische Untersuchungen von Synaptophysin-Synaptogyrin-Doppeldeletionsmutanten zeigten eine starke Reduktion von „short-term“- und „long-term“-Plastizität, womit eine Funktion von Synaptophysin bei plastischen Veränderungen im adulten Gehirn aufgezeigt wurde (Janz & Sudhof, 1999). Synaptophysin könnte also in sich entwickelnden und reifen Synapsen innerhalb eines neuronalen Netzwerkes, als essentielles Protein für die Funktion synaptischer Vesikel, eine individuelle Anpassung an erhöhte oder verminderte Transmitterfreisetzung ermöglichen.

1.5.3 Synaptobrevin-Synaptophysin-Komplex

In adulten Neuronen bildet Synaptophysin mit Synaptobrevin einen Komplex (Edelmann *et al.*, 1995). Die Natur der Bindung zwischen Synaptobrevin und Synaptophysin konnte bisher noch nicht geklärt werden. Sicher ist allerdings, wenn auch für die Interaktion nicht entscheidend, dass Synaptobrevin während der neuronalen Entwicklung palmitoyliert wird. Dieser Palmitoylierung liegt eine Modifikation am Synaptophysinmolekül zu Grunde (Becher *et al.*, 1999b), (Becher *et al.*, 1999a), (Veit *et al.*, 2000). Für die Bindung von Synaptophysin an Synaptobrevin ist dessen c-terminaler, membranverankerter Teil verantwortlich (Reisinger *et al.*, 2004), (Yelamanchili *et al.*, 2005). Die Bindung von Synaptobrevin an Synaptophysin wird durch Sept 8 kontrolliert. Sept 8 unterdrückt dabei die Synaptobrevin-Synaptophysin-Interaktion indem es an Synaptobrevin bindet (Ito *et al.*, 2009).

Der Syb-Syp-Komplex ist ein Marker entwicklungs- und stimulations-abhängiger Veränderungen in Synapsen, wobei die Interaktion der beiden Proteine, ihre Regulation und die Rolle von Synaptophysin bisher noch wenig verstanden sind. Während der neuronalen Entwicklung wird der Syb-Syp-Komplex hochreguliert und ist erst postnatal nachweisbar (Becher *et al.*, 1999b), (Becher *et al.*, 1999a). Im adulten Gehirn ist er nach repetitiven elektrischen Stimulationen (Kindling Modell) vermehrt vorhanden, ohne dass die einzelnen Proteinkomponenten verstärkt exprimiert werden (Hinz *et al.*, 2001). Kurzzeitstimulationen im Minutenbereich dissoziieren dagegen den Syb-Syp-Komplex. Die Dissoziation geht der Interaktion von Synaptobrevin mit seinen SNARE-Partnern voraus (Reisinger *et al.*, 2004). Eine Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes nach α -Latrotoxin vor der Membranfusion konnte auch mittels Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) gezeigt werden (Pennuto *et al.*, 2002). In Neuronen hängt die Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes nach Stimulation mit Ca^{2+} -Ionophoren oder Glutamat von der Ca^{2+} -Konzentration ab. Eine Ca^{2+} -abhängige Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes wurde auch bei Verwendung von Tritonextrakten aus Synaptosomen beschrieben (Prekeris & Terrian, 1997), (Daly & Ziff, 2002).

Dagegen lässt sich an isolierten Vesikeln keine direkte Dissoziation durch Gabe von Ca^{2+} erzielen (Reisinger *et al.*, 2004). Wahrscheinlich ist ein zytosolischer Faktor, der auch noch nach Tritonextraktion funktioniert, für die Ca^{2+} -abhängige Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes verantwortlich.

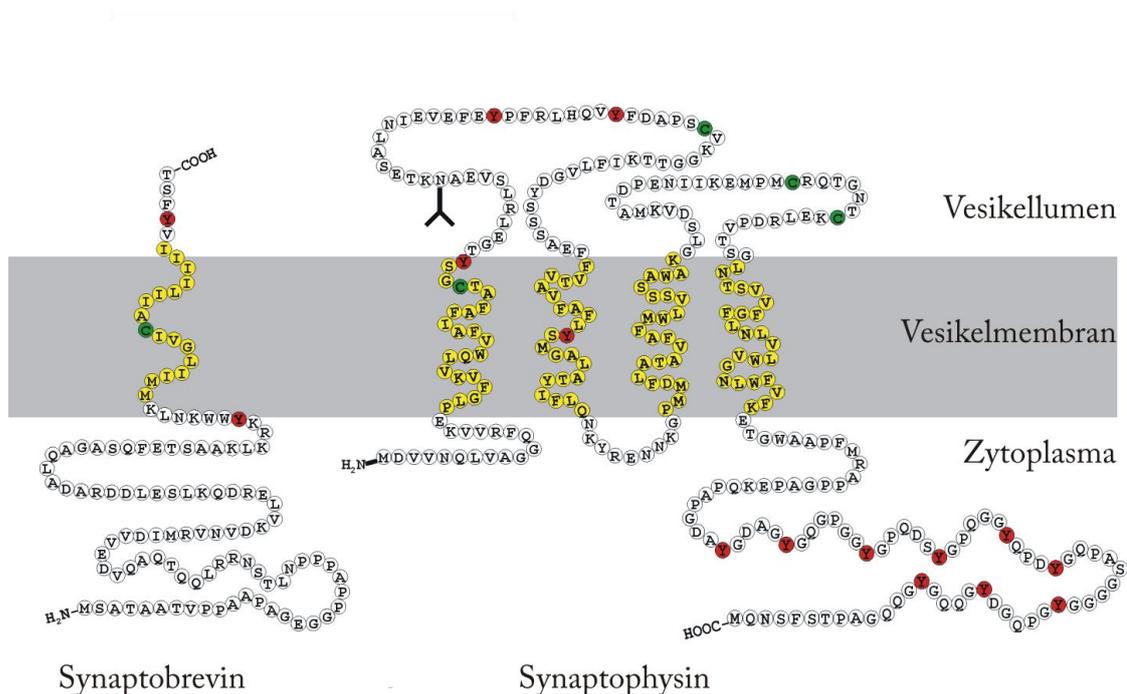


Abb. 6 Schematische Darstellung von Synaptobrevin und Synaptophysin

1.5.4 Weitere exozytotische Schlüsselproteine

SNAP-25: „Synaptosome-associated protein of 25 kDa“ bildet zusammen mit Synaptobrevin und Syntaxin über zwei α -Helices den SNARE-Komplex. SNAP-25 ist ein 25 kDa großes Plasmamembranprotein, das ausschließlich in Neuronen und neuroendokrinen Zellen exprimiert wird. Aufgrund einer fehlenden Transmembrandomäne ist es über eine posttranslationale Fettsäuremodifikation in der Membran verankert (Oyler *et al.*, 1989), (Hess *et al.*, 1992). Bisher wurden von SNAP-25 zwei Isoformen (SNAP-25a und SNAP-25b) identifiziert (Mollinedo & Lazo, 1997).

Syntaxin: Ursprünglich als retinales Antigen HPC-1 (Barnstable *et al.*, 1985) charakterisiert, wurden später in den Membranen der Synapsen zwei Isoformen, Syntaxin 1a und Syntaxin 1b, identifiziert (Bennett *et al.*, 1992), (Leveque *et al.*, 1998). Bei dem, den neuronalen SNARE-Komplex bildenden, Syntaxin handelt es sich um Syntaxin 1a, mit einem Molekulargewicht von 35 kDa. Es ist hauptsächlich in der neuronalen Plasmamembran lokalisiert. An seinem c-terminalen Ende hat es eine Transmembrandomäne; der Carboxylterminus weist eine zytoplasmatische Bindungsdomäne (H3-Domäne) auf. Diese ist notwendig für die Fusion mit dem SNARE-Komplex (Kee *et al.*, 1995).

Synaptotagmin: Synaptotagmin (Syt) ist ein integrales Membranglykoprotein synaptischer Vesikel. Es hat eine variable N-terminale Domäne, eine kurze transmembranäre Verbindung und einen konservativen zytoplasmatischen Schwanz, der zwei Ca^{2+} -bindende C2-Domänen enthält (Perin *et al.*, 1990), (Marqueze *et al.*, 2000), (Sudhof, 2002). Synaptotagmine dienen als Ca^{2+} -Sensoren (Chapman & Jahn, 1994), die die Freisetzung von Neurotransmittern und Hormonen steuern: Ist in der präsynaptischen Endigung wegen vorangegangener Aktionspotentiale die Konzentration von Ca^{2+} in ausreichender Höhe, werden kooperativ Ca^{2+} -Ionen gebunden und Synaptotagmin öffnet unter Vermittlung weiterer Proteine die präsynaptische Membran. Es ist somit ein Regulator der Exozytose (Desai *et al.*, 2000), (Littleton *et al.*, 2001).

1.6 Vesikuläre Neurotransmitter-Transporter

Synaptische Vesikel sind durch eine Reihe integraler und assoziierter Membranproteine charakterisiert. Sie sind zum einen funktionell für die Speicherung sowie Freisetzung von Neurotransmittern, andererseits für die Wiedergewinnung der Membrankomponenten nach erfolgter Exozytose und Umverteilungsprozessen in der Synapse zuständig. Die integralen Membranproteine Synaptobrevin und Synaptophysin sind allen transmitter-speichernden Vesikeln gemein, während sich Vesikel unterschiedlicher

Synapsentypen in ihren Transmittertransporter unterscheiden. Die Neurotransmitterspeicherung erfolgt über vesikuläre Transmitter-Transporter:

Der vesikuläre Azetylcholintransporter (VACHT) ist für den Transport von Azetylcholin (Erickson *et al.*, 1994), der vesikulären inhibitorischen Aminosäuretransporter (VIAAT bzw. VGAT) von GABA und Glyzin in das Vesikellumen verantwortlich. Der Transport von Glutamat wird über vesikuläre Glutamattransporter (VGLUT) gewährleistet. Für Glutamat sind drei Transporteraktivitäten beschrieben: VGLUT1 (Ni *et al.*, 1994), VGLUT2 (Fremeau *et al.*, 2001), (Takamori *et al.*, 2001) und VGLUT3 (Gras *et al.*, 2002), (Takamori *et al.*, 2002), (Fremeau *et al.*, 2002). Sie alle transportieren Glutamat mit ähnlicher Affinität, sind allerdings neuronenspezifisch verteilt (Fremeau *et al.*, 2001), (Takamori *et al.*, 2001), (Gras *et al.*, 2002). Eine weitere Gruppe von Neurotransmittern, die Monoamine (Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin und Serotonin) werden durch die vesikulären Monoamintransporter (VMAT) (McIntire *et al.*, 1997), (Sagne *et al.*, 1997), (Takamori *et al.*, 2000) transportiert, von denen bisher zwei (VMAT1, VMAT2) identifiziert wurden. Sie unterscheiden sich in ihrer zellulären Verteilung (Liu *et al.*, 1992), (Erickson *et al.*, 1992). VMAT2 wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert, tritt aber auch in einer Vielzahl peripherer Zellen (Peter *et al.*, 1995), (Erickson *et al.*, 1996) und Thrombozyten (Lesch *et al.*, 1993), (Holtje *et al.*, 2003) auf. Die VMAT1-Expression ist im Gegensatz dazu überwiegend auf periphere Zellen beschränkt und kommt im Gehirn nur in Neuronen der Epiphyse (Zirbeldrüse) vor (Hayashi *et al.*, 1999). Beide Transporter können durch Inhibitoren blockiert werden. Ein gemeinsamer Inhibitor der VMAT ist Reserpin, das durch Bindung auf zytoplasmatischer Seite der Transporter die Monoaminaufnahme blockiert (Darchen *et al.*, 1989), (Scherman & Henry, 1984). Der Monoamintransport durch die VMAT erfolgt im Austausch gegen zwei Protonen aus dem vesikulären Lumen (Johnson *et al.*, 1981), (Knoth *et al.*, 1981).

Der Transport von Neurotransmittern ist wie der Plasmamembrantransport energieabhängig und wird durch einen Antiport von Protonen aus dem Vesikellumen ins Zytoplasma angetrieben. Der dafür notwendige Protonengradient über die Vesikelmembran wird durch die Aktivität der

vakuolären ATP-abhängigen Protonenpumpe (vATPase) erzeugt. Neben dem Protonengradient (ΔpH) ergibt sich durch Anreicherung positiver Ladungen im Vesikellumen zusätzlich auch ein elektrischer Gradient ($\Delta\Psi$). Beide werden als elektrochemischer Gradient zusammengefasst ($\Delta\mu\text{H}^+$) und bilden gemeinsam die Triebkraft für den Neurotransmitter-Transport entgegen dem Konzentrationsgradienten (Johnson, 1988). Die Aktivität verschiedener vesikulärer Neurotransmitter-Transporter ist in unterschiedlichem Maße von ΔpH und $\Delta\Psi$ abhängig. Die Aktivität der VMAT und VACHT hängt stärker vom ΔpH und die der vesikulären Glutamattransporter stärker von $\Delta\Psi$ ab (Johnson, 1988), (Maycox *et al.*, 1988), (Carlson *et al.*, 1989). Der vesikuläre GABA-Transport ist gleichermaßen von beiden Anteilen abhängig. Neben der Aktivität der vakuolären ATPase wird der elektrochemische Gradient über die Vesikelmembran zusätzlich durch die Anwesenheit von Chloridionen beeinflusst. Isolierte synaptische Vesikel zeigen nach Inkubation mit ATP nur eine geringe Ansäuerung. Fügt man zusätzlich Chloridionen zu, steigt die Ansäuerung stark an. Ursache hierfür ist wahrscheinlich die Tatsache, dass in die Vesikel aufgenommenes Chlorid den elektrischen Anteil des elektrochemischen Potentials $\Delta\Psi$ reduziert und die Protonenpumpe dadurch einen größeren pH-Gradienten aufbauen kann. Somit können beide Anteile des elektrochemischen Gradienten unabhängig voneinander reguliert werden (Johnson, 1988).

1.7 Präsynaptisch wirkende Neurotoxine

1.7.1 Clostridiale Neurotoxine

Den ersten Hinweis auf die Funktion der SNARE-Proteine gaben clostridiale Neurotoxine. Sie spalten spezifisch je nach Toxin eines der drei SNARE-Proteine und bringen damit die Exozytose komplett zum Erliegen (Ahnert-Hilger & Bigalke, 1995). Die clostridialen Neurotoxine, zu denen neben den sieben Botulinumtoxinen (BoNT) auch das Tetanustoxin (TeNT) gehört, sind typische Zwei-Domänen Toxine. Die leichte Kette (LC = „light chain“) enthält die enzymatische Peptidase mit einem der SNARE-Proteine spezifischem Substrat. Die schwere Kette (HC = „heavy chain“) ist für die

Aufnahme des Toxins in das Neuron entscheidend. Diese Toxine wurden schon lange als Werkzeug für die Untersuchung des synaptischen Exozytoseapparates genutzt (Schiavo *et al.*, 1994b).

1.7.2 Präsynaptisch wirkende, PLA2-aktive Neurotoxine

Eine Reihe potenter, präsynaptisch wirkender Neurotoxine mit Phospholipase A2-Aktivität (PLA2-Aktivität) konnte aus Schlangentoxinen isoliert werden (Schiavo *et al.*, 2000), (Kini, 2003). So wurde bereits 1974 aus dem Toxin des *Oxyuranus scutellatus* (Kamenskaya & Thesleff, 1974), (Fohlman *et al.*, 1976) Taipoxin (Tpx), 1979 aus dem Toxin des *Oxyuranus microlepidotus* Paradoxin (Pdx) (Fohlman, 1979) isoliert.

Präsynaptisch wirkende Neurotoxine mit enzymatischer Aktivität (SPANs = „Snake Presynaptic PLA2 Neurotoxins“) weisen eine große Varianz sowohl in ihrem Aufbau als auch in ihrer Phospholipaseaktivität auf. Bisher konnten die Kristallstruktur einiger weniger Toxine gezeigt werden (Singh *et al.*, 2001). Allen ist eine Phospholipase A2-Domäne gemein, die über sechs Disulfidbrücken und einem katalytischen Ca^{2+} -Atom stabilisiert werden. Strukturvergleiche und chemische Modifikationen indizieren die Neurotoxizität der Aminosäurereste 59 bis 100 (Yang *et al.*, 1997). So weist z.B. Taipoxin drei Untereinheiten auf, eine davon mit Phospholipase A2-Aktivität. Die durch SPANs induzierten Veränderungen in Kinetik der Exozytose und Morphologie der präsynaptischen Plasmamembran lässt vermuten, dass sie die Fusion von synaptischen Vesikeln mit der präsynaptischen Membran vermitteln und gleichzeitig ihre Regeneration inhibieren (Montecucco & Rossetto, 2000). Trotz zahlreicher Studien (Kini *et al.*, 1997) bleibt der genaue molekulare Mechanismus der SPANs bis heute unklar. Nach SPAN-Behandlung (*Oxyuranus scutellatus*) konnte allerdings eine Blockade der Freisetzung von Neurotransmittern beobachtet werden, die auf einen Abbau gespeicherter synaptischer Vesikel zurückzuführen ist (Su & Chang, 1984). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Taipoxinbehandelten Neuronen zeigten geschwollene, vergrößerte Axonterminalien mit entleerten synaptischen Vesikeln (Cull-Candy *et al.*, 1976), (Harris *et al.*, 2000). Der

präsynaptische Membranrezeptor für Taipoxin wurde bislang nicht identifiziert.

Neuere Untersuchungen zeigten eine inhibierende Wirkung auf die Acetylcholin-Freisetzung (Rossetto *et al.*, 2006). Es wird angenommen, dass SPANs die Fusion von Acetylcholin enthaltenden Vesikeln mit der präsynaptischen Plasmamembran vermittelt und das Recycling der Vesikel verhindert (Caccin *et al.*, 2006).

1.8 Zirkadiane Rhythmik

Der Schlaf-Wach-Zyklus folgt einer zirkadianen Periodizität, die einen der endogenen Biorhythmen repräsentiert. Hinweise aus der Umgebung, wie z.B. Licht/Dunkelheit, Temperatur und/oder Luftfeuchtigkeit, dienen als Zeitgeber, die diese „biologische Uhr“ synchronisieren. Bei längerem Fehlen dieser Zeitgeber wird der zirkadiane Rhythmus aufrechterhalten, verliert jedoch seine Beziehung zur aktuellen Zeit. Folge ist eine verlängerte oder auch verkürzte, je nach Spezies, Periodizität. Die zellulären Substrate der biologischen Uhr für den Schlaf-Wach-Zyklus sind Neuronengruppen im Nucleus suprachiasmaticus (SCN) des Hypothalamus (Klein, 1991), (Ibata *et al.*, 1999). Mikrostimulation des SCN im Tierexperiment bewirkt eine Phasenverschiebung des zirkadianen Rhythmus, und die bilaterale Entfernung der SCN hat eine Unterbrechung der zirkadianen Periodizität von Wachheit/Schlaf sowie von Nahrungsaufnahme und Grundaktivität zur Folge. Die Neurone des SCN stellen zelluläre Oszillatoren dar, in denen die elektrische Aktivität, der Glukoseverbrauch, die Produktion von Vasopressin und die Proteinbiosynthese mit etwa 24 bis 25-stündiger Periodik oszillieren. Als wichtigster exogener Zeitgeber für die Synchronisation der einzelnen neuronalen Oszillatoren und für die Einstellung eines 24-stündigen Rhythmus gelten Lichtsignale (Colwell & Menaker, 1992). Sie gelangen von den Ganglienzellen der Retina über den Tractus retinohypothalamicus direkt zu den SCN-Neuronen. Die rhythmisch-synchronisierten Aktivitätsmuster aus dem SCN werden in weite Teile des Gehirns vermittelt, u.a. in das System Hirnstamm-Thalamus-Kortex, wobei synaptische Verbindungen efferenter Axone und ggf. auch hormonelle Mechanismen involviert sind. Es

sind verschiedene Gene bekannt, deren Produkte die zirkadiane Rhythmik auf zellulärer Ebene regeln. Allgemein kann man zwischen einem positiven und einem negativen Rückkopplungsweg unterscheiden. Die Heterodimere CLOCK (Gekakis *et al.*, 1998) und BMAL1 (Hogenesch *et al.*, 1998) fördern die Transkription von Period (PER) (Albrecht *et al.*, 1997) und Cryptochrome (CRY) (Okamura *et al.*, 1999). Im Zytoplasma bilden PER und CRY Oligomere, welche, wenn sie wieder in den Kern gelangen, ihre eigene Transkription unterdrücken. Zusätzlich zur transkriptionellen Regulation existieren noch posttranslationale Regulationen. So wird PER von Kinasen phosphoryliert, was einen Abbau beschleunigt. Dies kann wiederum von CRY verhindert werden, indem es PER bindet und im Kern festhält. Zirkadiane Oszillation kommt u.a. durch Verfügbarkeit von PER im Kern zustande (Albrecht & Eichele, 2003). PER kommt in drei Isoformen vor, die unterschiedliche Aspekte zirkadianer Rhythmik und Verhalten regulieren (Toh *et al.*, 2001), (Ebisawa *et al.*, 2001), (Abarca *et al.*, 2002), (Spanagel *et al.*, 2005). So haben Per2-Deletionsmutanten (Per2^{Brdm1}), bei denen die PER2 Expression extrem vermindert ist, die Fähigkeit verloren, die innere Uhr äußeren Einflüssen anzupassen.

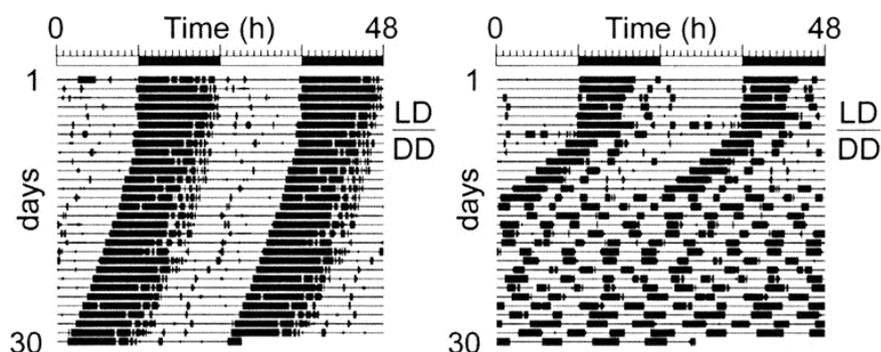


Abb. 7 Aktogramme von Wildtypmäusen und Per2^{Brdm1} Deletionsmutanten

Beide Maustypen verhalten sich während des licht-dunkel Zyklus (12 h Licht und 12 h Dunkelheit) ähnlich und weisen einen gleichmäßigen, periodischen Schlaf-Wachrhythmus auf. Während Wildtypmäuse (links) auch unter dunkel-dunkel Bedingungen (24 h Dunkelheit) ihre Periodizität erhalten, werden Per2^{Brdm1} Deletionsmutanten (rechts) zunehmend arrhythmisch und haben keinen geregelten Schlaf-Wachrhythmus (Oster *et al.*, 2002).

1. Einleitung

Per2^{Brdm1}-Mäuse exprimieren zudem weniger Eaat1, einen der plasmamembranständigen Glutamattransporter, was zu einer Erhöhung der extrazellulären Glutamatmenge und verstärktem Alkoholkonsum führt (Spanagel *et al.*, 2005). Von über 15 000 Genen werden ca. fünf Prozent durch die Tageszeit reguliert, weitere fünf Prozent hängen vom Schlaf/Wachzustand ab.

Inwieweit sich zirkadiane Rhythmik und ihre Störung auf die Funktion präsynaptischer Proteine auswirken, ist bisher wenig untersucht. Die Veränderungen im Glutamatstoffwechsel bei Per2^{Brdm1} Mäusen legen jedoch Unterschiede nahe. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass ein Transport von VGLUT1 von der Vesikelmembran zur Plasmamembran einer zirkadianen Rhythmik unterliegt (Yelamanchili *et al.*, 2006), (Darna *et al.*, 2009).

2 Zielsetzung

Synaptische Vesikel repräsentieren eine sehr heterogene Population. Die Menge einzelner synaptischer Proteine, ihre Interaktionen und die Kompartimentverteilung bestimmen den präsynaptischen Anteil synaptischer Effizienz. Diese Parameter ändern sich im Zuge neuronaler Reifung und plastischer Umbauvorgänge im adulten Gehirn.

Synaptophysin als ubiquitäres Membranprotein synaptischer Vesikel ist mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Aufrechterhaltung der Membranintegrität synaptischer Vesikel und ihrer Abkömmlinge in den verschiedenen Kompartimenten beteiligt. Die Anzahl an Transmittertransportern bestimmt u. a. die Menge an freisetzbarem Transmitter.

Membranverteilungen vesikulärer Neurotransmitter-Transporter erfordern ein hohes Maß an Zuverlässigkeit bei der Membranzusammensetzung vesikulärer Kompartimente in der Synapse, um transportertragende Vesikel schnell in oder aus dem „readily-releasable-pool“ sortieren zu können. Ziel ist es den Synaptobrevin-Synaptophysin-Komplex als Indikator entwicklungs- und aktivitätsabhängiger synaptischer Veränderungen besser zu verstehen. Ein zweiter Aspekt beschäftigt sich mit der stimulationsabhängigen und zirkadianer Rhythmik unterliegenden Assoziation und Umverteilung von Neurotransmitter-Transportern innerhalb verschiedener präsynaptischer Membrankompartimente. Folgende Aspekte sollen bearbeitet werden:

1. Erfassung der Faktoren, die Assoziation und Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes bewirken
2. SPAN-Einfluss auf die Syb-Syp-Interaktion sowie auf die VMAT- bzw. VGLUT-vermittelte Neurotransmitter-Aufnahme
3. Charakterisierung von Synaptophysin-Deletionsmutanten
4. Analyse des Syb-Syp-Komplexes im Rahmen zirkadianer Rhythmik

3 Materialien

3.1 Antikörper

3.1.1 Primärantikörper

Antigen	Spezies	Verdünnung	Herkunft
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	Polyklonal, Kaninchen	1:500	Synaptic Systems
NMDA-Rezeptor 1	Monoklonal, Maus	1:5 000	Synaptic Systems
SNAP-25	Monoklonal, Maus	1:10 000	Sternberger Monoclonals
Synaptobrevin 1 (Klon 69.1)	Monoklonal, Maus	1:10 000	Synaptic Systems
Synaptophysin 1 (Klon 7.2)	Monoklonal, Maus	1:10 000	Synaptic Systems
Synaptophysin 1	Polyklonal, Kaninchen	1:10 000	Synaptic Systems
Synaptotagmin (Klon 41.1)	Monoklonal, Maus	1:5 000	Synaptic Systems
Syntaxin 1A/B (Klon HPC)	Monoklonal, Maus	1:10 000	Synaptic Systems
VGAT	Monoklonal, Maus	1:2 000	Synaptic Systems
VGLUT1	Monoklonal, Maus	1:10 000	Synaptic Systems
VGLUT1	Polyklonal, Kaninchen	1:10 000	Synaptic Systems
VGLUT2	Polyklonal, Kaninchen	1:10 000	Synaptic Systems

3.1.2 Sekundärantikörper

Antikörper/Konjugat	Verdünnung	Herkunft
Pferd anti-Kaninchen, Peroxidasegekoppelt	1:10 000	Vector Laboratories
Ziege anti-Kaninchen, Peroxidasegekoppelt	1:10 000	Vector Laboratories
Ziege anti-Maus, Peroxidasegekoppelt	1:10 000	Vector Laboratories

3.2 Substanzen und Reagenzien

3.2.1 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid, 40 %	Carl Roth
Adenosin-5'-Triphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich
Ammoniumpersulphat (APS)	Sigma-Aldrich
Ascorbinsäure	Sigma
Bafilomycin A1	Sigma-Aldrich
BCA Protein Assay Reagent A	Thermo Scientific
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma
(3-([3-Cholamidopropyl]-Dimethylammonio)-1-Propansulfonat) (CHAPS)	Sigma
Dimethylformamid (DMF)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Disucciminidylsuberat (DSS)	Sigma

3. Material

Dithiothreitol (DTT)	Biomol
Enhanced Chemiluminescence (ECL)	GE Healthcare
Essigsäure	Roth
Ethanol	Herbeta Arzneimittel
Ethylenediaminetetraacetat (EDTA)	Roth
Ethylenglykoltetraacetat(EGTA)	Roth
Ficoll	Pharmacia Biotech
Glukose	Sigma
Glyzin	Carl Roth
n-Hexan	Carl Roth
Nonidet NP40	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumglutamat	Sigma
Kaliumhydroxis	Sigma
Kupfersulfat	Sigma
Lubrol	Merck
Lysozym	Sigma
Magermilchpulver	Molkerei Heideblume
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma
Methanol	Merck
Methyl-β-cyclodextrin (β-MCD)	Sigma
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma
2-Mercaptoethanol	Sigma
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'- 2-ethan-sulfonsäure (HEPES)	Biochrom
Natriumazid	Aldrich
Natriumacetat	Sigma

Natriumbicinchoninate-4,4-Dicarboxy-2,2'-Bichinolin (BCA)	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Nigericin	Sigma
Nitrocellulosemembran für Westernblots	Amersham
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth
Paraformaldehyd	Electron Microscopy
Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure (Pipes)	Sigma
Ponceau S	Sigma
Proteaseinhibitoren (Pi)	Sigma Aldrich
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth
Protein G Sepharose 4 <i>fast flow</i>	Pharmacia Biotech
Reserpin	Sigma
Saccharose	Carl Roth
Salzsäure	Sigma
Silbernitrat	Sigma
1-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol (Tris)	Carl Roth
Trichloressigsäure	Sigma
Triton X-100	Roth
Typan Blau	Sigma
Tween-20	Carl Roth
Valinomycin	Sigma

3. Material

3.2.2 Molekulargewichtsstandards

Marker	Herkunft
Protein Low Molecular weight Marker (LMW)	Fermentas
Molekulargewichte (kDa): 170.0, 130.0, 100.0, 72.0, 55.0, 43.0, 34.0, 26.0, 17.0, 11.0	

3.2.3 Präsynaptische Neurotoxine

Toxin	Spezies	Herkunft
Paradoxin (PdX)	<i>Schlange</i> (<i>Oxyuranus microlepidotus</i>)	Venom Supplies
Taipoxin (TpX)	<i>Schlange</i> (<i>Oxyuranus scutellatus</i>)	Venom Supplies

3.2.4 Radioaktiv markierte Neurotransmitter

Neurotransmitter	Herkunft
L-[3,4- ³ H]-Glutaminsäure	Moravek Biochemicals and Radiochemicals
5-Hydroxy-[³ H]-tryptamintrifluoroacetat	GE Healthcare
4-Amino-n-[2,3- ³ H]buttersäure	GE Healthcare

3.3 Puffer und Lösungen

Antikörper Lösung	1,5 % (w/v) BSA in TBS-Puffer
Ammoniumpersulfat-Stammlösung	10 % in ddH ₂ O
Blocklösung	5 % (v/v) Magermilchpulver 0,1 % (v/v) Tween 20 TS Puffer
Elektrophoresepuffer (10-fach)	250 mM Tris 2 M Glycin 35 mM SDS
Extraktionspuffer	140 mM KCl 20 mM HEPES-KOH, pH 7.3 2 mM EDTA 1 % Triton X-100
Hepes 1M (500 ml)	119,15 g Hepes → pH 7,4 (NaOH)
Homogenisierungspuffer	320 mM Saccharose-Puffer 4 mM HEPES/KOH pH 7,5
KG3-Puffer (pH 7,0)	150 mM Kalium-Glutamat 20 mM Pipes 4 mM EGTA 2 mM ATP (Natriumsalz) 2,87 mM MgCl ₂

3. Material

KGC3-Puffer (pH 7,0)	150 mM Kalium-Gluconat 20 mM Pipes 4 mM EGTA 2 mM ATP (Natriumsalz) 2,87 mM MgCl ₂
KG3-KCL Puffer	KG3 150 mM KCl
Krebs Ringer-Hepes-Puffer	140 mM NaCl 5 mM NaHCO ₃ 1 mM MgCl ₂ 1,2 mM Na ₂ HPO ₄ 10 mM Glucose 20 mM Hepes, pH 7,4
Laemmli (5-fach)	0,1 M Tris-HCl (pH 6,8) 10 % SDS 25 % Glycerin 0,1 M DTT Bromphenolblau
Lösung A (für BCA-Assay)	1 % BCA-Dinatrium 1,7 % NaHCO ₃ 0,16 % Na ₂ -Tartrat 0,40 % NaOH 0,95 % NaHCO ₃ → pH 11,25
Lösung B (BCA-Assay)	4 % (w/v) CuSO ₄

Lubrol Puffer	MBS-Puffer 10 % (v/v) Lubrol
MBS-Puffer (pH 6,5)	25 mM MES 150 mM NaCl
Natriumpuffer (pH 7,4)	10 mM Glucose 5 mM KCl 140 mM NaCl 5 mM NaHCO ₃ 1 mM MgCl ₂ 1,2 mM Na ₂ HPO ₄ 20 mM HEPES
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, pH 7,4)	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄
Ponceau-Lösung	0,5 % (w/v) Ponceau S 3 % (v/v) Trichloressigsäure
Probenpuffer nach Maniatis (4-fach)	200 mM Tris 400 mM DTT 8 % (v/v) SDS 0,4 % (w/v) Bromphenolblau 40 % (v/v) Glycerol

3. Material

Resuspendierungspuffer	15 mM NaCl 10 mM Hepes 2 mM EDTA 2 mM EGTA
Saccharoselösung	0,32 M Saccharose in ddH ₂ O
TBS-T (10-fach)	100 ml Tris-HCl (2M; pH 7,2) 1,25 M NaCl → pH 7,2 0,25 % (v/v) Tween-20
Tris 1 (pH 6,8)	500 mM Tris 0,4 % (w/v) SDS
Tris 2 (pH 8,8)	1,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS
Tris-HCl (pH 7,2)	2 M Tris-HCl → pH 7,2 (HCl)
Triton X-100	MBS-Puffer 10 % (v/v) Triton X-100
TS-Puffer (10-fach, pH 7,5)	200 mM Tris 150 mM NaCl
TS-Puffer	10x TS-Puffer 1:10 mit H ₂ O
TS/Tween-20	TS-Puffer 0,1 % Tween-20

Western Blot-Transferpuffer (Semi-Dry)	48 mM Tris 386 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol 1,31 mM SDS
---	---

3.4 Verbrauchsmaterial

Centricon (30 kDa)	Millipore
Centricon (10 kDa)	Millipore
Filterpapier für Western Blot	VWR International
Nitrocellulose Membran	VWR International

3.5 Versuchstiere

Weibliche Ratten (Stamm: Wistar) wurden von der FEM-Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin, dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), von Charles River oder Harlan Winkelmann bezogen. Sie wurden bis zu den Versuchen bei ca. 22 °C und einem Tag-Nacht-Zyklus (12 h:12 h) gehalten. Das Zucht- bzw. Haltungsfutter stand für die Tiere ad libitum im Tierstall des Instituts zur Verfügung. Für einige Versuche wurden Wildtypmäuse (WT-Mäuse) des Stammes NMRI (Harlan Winkelmann) und für den Vergleich WT gegen Deletionsmutanten wurden WT-Mäuse des Stammes Black 6 (FEM) verwendet. Die Synaptophysin-Deletionsmutanten von Prof. Dr. Thomas Südhoff und die $Period2^{Brdm1}$ -Mäuse ($Per2^{Brdm1}$ -Mäuse) von Prof. Dr. Urs Albrecht freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

3.6 Geräte

Centrifuge 54702	Eppendorf
Centrifuge 5471C	Eppendorf
Entwickler: CAWOMAT 2000IR	CAWO Photochemisches Werk
Gelkammern Mini-PROTEAN 3 Cell	Biorad
Guillotine	Udo Basile, Biological Research
Homogenisator Rotor	Heidolph
Hand-Homogenisator	Wheaton
Optima MAX Ultrazentrifuge	Beckman Coulter
Optimaa TL Ultrazentrifuge	Beckman Coulter
PowerPac HC	Biorad
Rotor Ti 70	Beckman
Rotor TLA 100.4	Beckman
Rotor TLA 120.1	Beckman
Scanner	
- CanoScan 8800F	Canon
- ScanMaker 4800	Microtek
Spektrophotometer HT2	Anthos Mikrosysteme
Spektrophotometer MR5000	Dynatech
Szintillator LS6500	Beckman Coulter
Thermomixer	Eppendorf
Trans-Blot SD, SemiDry-Transfer Cell	Biorad

3.7 Software

LabImage 1D 2006

Kapelan BioImaging GmbH

LabVIEW 6.1

National Instruments

Soft Imaging Viewer

Soft Imaging Systems

4 Methoden

4.1 Proteinreinigung

4.1.1 Synaptosomen

Die Aufarbeitung subzellulärer Kompartimente erfolgte auf Basis der von Huttner beschriebenen Methodik (Huttner *et al.*, 1983). Synaptosomen wurden als isolierte, freie Nervenendigungen aus Gesamtgehirnen adulter Ratten oder Mäusen hergestellt. Die Isolierung der Gehirne sowie alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten stets auf Eis bzw. bei vier Grad Celsius. Dabei unterschieden sich die Arbeitsschritte bei Verwendung von Ratten- oder Mäusegehirnen, soweit nicht besonders erwähnt, nicht voneinander.

Die für die Aufarbeitung benötigten Ratten wurden mit Diethylether anästhesiert und anschließend mit einer Guillotine dekapitiert. Die Mäuse wurden durch Überstreckung mit anschließendem Genickbruch getötet. Die Dekapitierung erfolgte mit Hilfe einer Schere.

Mit zwei Schnitten entlang der Schädelnähte wurde die Schädelkalotte geöffnet und mit Hilfe einer Pinzette nach oben aufgeklappt. Das freiliegende Gehirn wurde in zehn Milliliter eisgekühlten Homogenisierungspuffer, welchem zuvor 45 µl PMSF und zehn Mikroliter Proteaseinhibitoren beigemischt wurden, überführt. Mit Hilfe eines Glaspistill (Dounce-Homogenisator) wurde das Gehirn durch neun Hübe bei 900 rpm solange zerkleinert bis eine homogene Lösung entstand. Das daraus resultierende Homogenat (H) wurde durch Zentrifugation bei 1 200 x g für zehn Minuten von nicht lysierten Zellen, Zellkernen und Membranfragmenten getrennt. Der Überstand („Supernatant 1“ = S1) erfuhr einen zweiten Zentrifugationsschritt bei 13 000 x g für 20 Minuten. Der daraus resultierende Überstand („Supernatant 2“ = S2) wurde vorsichtig vom Sediment abgenommen.

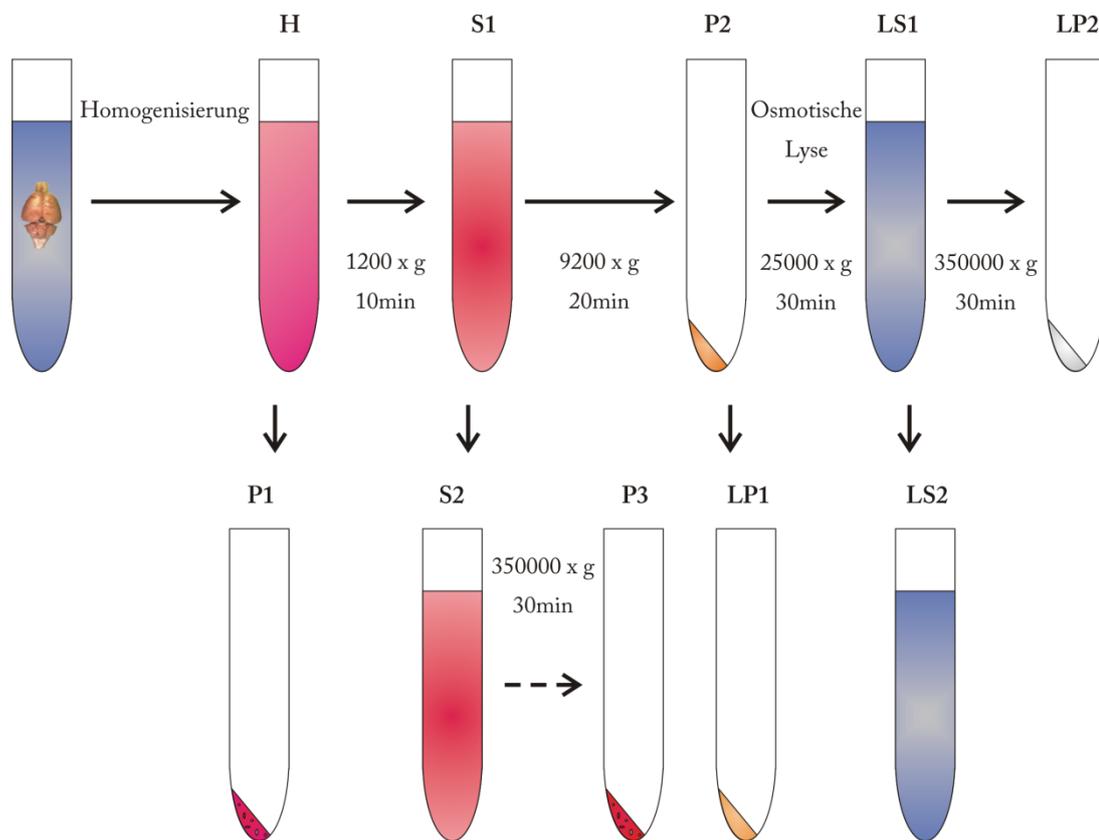


Abb. 8 Schematische Darstellung der subzellulären Fraktionierung

Nach erfolgter Homogenisierung des Ratten-, Mäusegehirns (H) folgte ein erster Zentrifugationsschritt bei 1 200 x g für 10 Min. Der daraus resultierende Überstand (S1) wurde bei 9 200 x g für 20 Min. erneut zentrifugiert. Nach Trennung von dem Überstand (S2) erhielt man ungereinigte Synaptosomen (P2). Zur Gewinnung synaptischer Vesikel wurde dieses Sediment in wenig Homogenisierungspuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Synaptosomen osmotisch aufgebrochen und die Probe bei 25 000 x g für 30 Min. zentrifugiert. Überstand (LS1) und Sediment (LP1) wurden voneinander getrennt. In einem letzten Zentrifugationsschritt bei 350 000 x g für 30 Min. wurde aus LS1 lysierter Überstand 2 (LS2) und die Fraktion ungereinigter synaptischer Vesikel (LP2) gewonnen.

Das isolierte Sediment (P2) stellt die Fraktion ungereinigter Synaptosomen dar. P2 konnte in einem weiteren Schritt, mit zehn Milliliter Homogenisierungspuffer und Proteaseinhibitoren resuspendiert, und erneut für zehn Minuten bei 1 200 x g zentrifugiert werden um, die Synaptosomen weiter aufzureinigen.

Neben P2 enthält S2 ebenfalls ungereinigte Vesikel, die bei der Zentrifugation nicht ins P2 sedimentiert sind. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei höherer g-Zahl (350 000 x g) und längerer Zeit (30 Min.) ist es aber möglich, diese Vesikelfraktion - bei der es sich um das aus der Zentrifugation resultierende Sediment handelt (Pellet 3) - zu isolieren.

4.1.2 Synaptische Vesikel

Nach der Aufreinigung von Synaptosomen (P2; vgl. 4.1.1) erfolgte die Isolation synaptischer Vesikel. Alle Schritte wurden sofern nicht anders angegeben bei vier Grad Celsius durchgeführt.

Das synaptosomale Pellet (P2) wurde mit einem Milliliter Homogenisierungspuffer resuspendiert und mit neun Milliliter eiskaltem, destilliertem Wasser, Proteaseinhibitoren im Verhältnis 1:1 000 und HEPES-NaOH-Puffer (10 mM; pH 7,0) versetzt. Um die osmotische Lyse zu fördern, wurde die Wasserschocklösung in dem Dounce-Homogenisator mit drei Hüben bei 2 200 rpm homogenisiert. Die Lösung wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und bei 25 000 x g für 20 Minuten zentrifugiert. Daraus resultierte das erste Lysesediment (Lyse Pellet 1 = LP1), welches u.a. Plasmamembranen aber auch andere Membrankompartimente enthält. Der lysierte Überstand („lysed Supernatant 1“ = LS1) wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 350 000 x g für 30 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Pellet („lysed Pellet 2“ = LP2) stellt die Fraktion ungereinigter synaptischer Vesikel dar. Bei dem synaptosomalen Überstand („lysed Supernatant 2“ = LS2) handelt es sich überwiegend um das Zytosol der lysierten Synaptosomen.

Die LP2-Resuspendierung erfolgte - soweit nicht anders angegeben - mit 200 µl eigenen Überstandes (LS2). Um eine möglichst homogene Lösung zu erhalten, wurde die Lösung zunächst mit Hilfe einer 23 g Nadel (6 Hübe) und anschließend mit einer 27 g Nadel (9 Hübe) resuspendiert.

4.1.3 Aufarbeitung synaptischer Vesikel unter Ca^{2+} -Einfluss

Die Aufarbeitung synaptischer Vesikel unter Einfluss von Ca^{2+} stellt eine Modifikation zu der Aufarbeitung synaptischer Vesikel dar. Der Ablauf entspricht zunächst dem aus Abschnitt 4.1.2. Das synaptosomale Pellet 2 (P2-Fraktion) wurde in einem Milliliter Homogenisierungspuffer resuspendiert und mit neun Milliliter eiskaltem, destilliertem Wasser,

Proteaseinhibitoren im Verhältnis 1:1 000, HEPES-NaOH-Puffer (10 mM; pH 7,4) sowie je zwei Millimolar EGTA bzw. EDTA versetzt. EDTA bzw. EGTA dienen dabei als Chelatbildner um Ca^{2+} zu komplexieren. Um die osmotische Lyse zu fördern, wurde die Wasserschocklösung mit dem Dounce-Homogenisator mit drei Hüben bei 2 200 rpm homogenisiert. Es folgte die Überführung der Lösung in Zentrifugenröhrchen und die Zentrifugation bei 25 000 x g für 20 Minuten. Die daraus gewonnene LS1-Fraktion wurde mit einer definierten Menge CaCl_2 sowie MgCl_2 versetzt. Dabei wurden die Konzentrationen so gewählt, dass eine bestimmte, definierte freie Ca^{2+} -Konzentration (zwischen 1 μM und 100 μM) erreicht wurde. Diese LS1⁺-Fraktion wurde nach einer halbstündiger Inkubation bei 37 °C in Zentrifugenröhrchen überführt und bei 350 000 x g für 30 Minuten zentrifugiert. Bei der daraus gewonnenen Lösung handelt es sich um synaptosomales Zytosol (LS2⁺-Fraktion). Das erhaltene Pellet stellt die Fraktion isolierter, synaptischer Vesikel (LP2⁺-Fraktion) dar.

Die Berechnung der benötigten CaCl_2 -Konzentration erfolgte mit einem Programm, das es erlaubt die Menge freier, divalenter Ionen in wässriger Lösung in Bezug auf die zugegebene Gesamtmenge zu bestimmen. Dabei werden neben pH-Wert und Temperatur der Lösung ebenfalls die Anwesenheit etwaiger Chelatbildner wie EGTA und/oder EDTA als Parameter berücksichtigt. Berechnet wird die Gesamtmenge an Ca^{2+} , die der Lösung zugesetzt werden muss, um eine definierte Menge freier Ca^{2+} -Ionen zu erhalten.

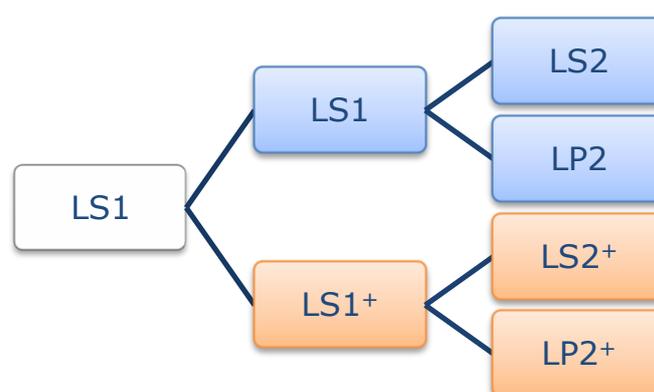


Abb. 9 Aufarbeitung synaptischer Vesikel mit und ohne Ca^{2+} -Ionen

4.2 Proteinbestimmungen

4.2.1 Bicinchoninsäure-Assay

Der Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) (Smith *et al.*, 1985) dient der Bestimmung der Proteinkonzentration. Diese Methode beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch Cystein, Cystin, Tyrosin, Tryptophan und die Peptidbindung. Mit diesem einwertigen Kupferion bildet BCA spezifisch einen Farbkomplex. Dabei hängt die Intensität der Farbstoffbildung, also das Redoxverhalten der beteiligten Gruppen, u.a. von der Temperatur ab. Der BCA-Assay kann somit für eine gewünschte Sensitivität über die Temperatur variiert werden. Auf diese Weise ist ein sensitiver, kolorimetrischer Nachweis von Proteinen möglich.

Das Absorptionsmaximum des Komplexes liegt bei einer Wellenlänge von 562 nm. Als Nachweisgrenze gilt eine Proteinmenge von ca. 0,1-1 μg Protein ml^{-1} . Das Probenvolumen sollte 0,1 ml nicht unterschreiten. Störende Substanzen sind EDTA, Saccharose oder Glucose (>10 mM), Glycin (1 M), Ammoniumsulfat (>5 %), Natriumacetat (2 M), Natriumphosphat (1 M).

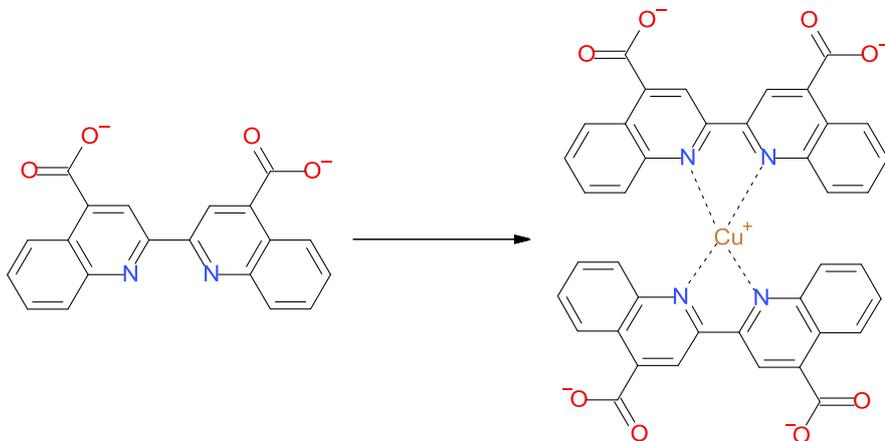


Abb. 10 Prinzip der BCA-Proteinkonzentrationsbestimmung

2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (Bicinchoninsäure, BCA, $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$) reagiert wie Bichinolin mit einwertigen Kupferionen zu einer Komplexverbindung mit violetter Farbe.

Für die Erstellung einer Standardkurve wurden Proben mit BSA-Konzentrationen von 50 µg/ml bis 500 µg/ml hergestellt. Angesetzt wurden diese Konzentrationen in dem entsprechenden Puffer der Proben oder in PBS. Von den Versuchsproben wurden dann 1:20- und 1:50-Verdünnungen hergestellt. Anschließend wurde je zweimal 20 µl der Standards und der Proben in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte vorgelegt. 200 µl der Reaktionslösung (bichinchoninsäurehaltige Lösung A und kupferionenhaltige Lösung B, 50:1 v/v) wurden anschließend nachgelegt und die Reaktion durch Inkubation der Mikrotiterplatte bei 60 °C für ca. 20 Minuten gestartet. Nach der Inkubation ruhte die Mikrotiterplatte für ca. fünf bis zehn Minuten bei Raumtemperatur, dann wurde die Extinktion bei 550 nm am Elisa gemessen. Die Bestimmung der Probenproteinkonzentrationen erfolgte anhand der BSA Standardkurve.

4.3 Neurotransmitter-Aufnahme

Für die Analyse der Neurotransmitter-Aufnahme über Neurotransmitter-Transporter (VGLUT und VMAT2) wurden zuvor präparierte Synaptosomen (P2, vgl. 4.1.1) bzw. synaptische Vesikel (LP2, vgl. 4.1.2) in dem jeweiligen Aufnahmepuffer (Serotonin-Aufnahme: KG3-Puffer; Glutamat-Aufnahme: KGC3-Puffer) resuspendiert. Resuspendiertem P2 bzw. LP2 führte man Neurotransmitter-Aufnahmepuffer entsprechend der Tabelle 2 zu. Nach zehnminütiger Inkubation bei 37 °C und 1 400 rpm im Thermomixer wurde die Neurotransmitter-Aufnahmereaktion mit 380 µl des entsprechenden Aufnahmepuffers gestoppt. Die Ansätze wurden bei vier Grad Celsius für zehn Minuten bei 435 000 x g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde verworfen, und die Pellets erst mit 550 µl, anschließend mit 600 µl Aufnahmepuffer gewaschen, ohne sie zu resuspendieren, um ein Auslaufen der beladenen synaptischen Vesikel zu verhindern.

Auf den Waschschrift folgte die Resuspendierung der Pellets in 200 ml 0,4 Prozent Triton-X 100 und Inkubation für 30 Minuten bei 42 °C und 1 400 rpm im Thermomixer, wodurch der aufgenommene Neurotransmitter (NT) in den Puffer abgegeben wird. 100 µl der Lösung wurden in vier

4. Methoden

Milliliter Szintillatorlösung überführt und die radioaktiven Zerfälle pro Minute mit Hilfe des Szintillationszählers ermittelt. Mit dem Rest der Lösung bestimmte man die Proteinkonzentration (vgl. 4.2.1).

Für die Neurotransmitter-Aufnahme wurden Vierfachbestimmungen und für die Aufnahme in Gegenwart von Inhibitoren des jeweiligen Transporters Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte graphisch als reserpinsensitive (Serotonin-aufnahme) bzw. trypanblausensitive (Glutamataufnahme).

Komponenten	Inhibitor	Konzentration	Spezifität	Literatur
Glutamat-Aufnahme:				
3H-Glutamat		0,5 μ M		
Kaliumglutamat		49,5 μ M		
	Trypan Blau	1 μ M	VGLUT	Roseth et al. (1995)
Serotonin-Aufnahme:				
3H-Serotonin		40 nM		
Ascorbinsäure		1 mM		
	Reserpin	6 μ M	VMAT1/2	Johnson (1988)

Tab. 2 Zusammensetzung der Neurotransmitter-Aufnahmepuffer

4.4 Extraktion von Membranproteinen

Um die Interaktionen zwischen Synaptobrevin mit seinen SNARE-Partnern und Synaptophysin zu analysieren, mussten die Proteine zunächst aus der Membran herausgelöst werden. Als Detergenz diente in der Regel Triton X-100, zehnprozentig in Extraktionspuffer gelöst. Zu 100 μ l dieser zehnprozentigen Detergenzlösung wurde ein Milligramm Proteinlösung (resuspendiertes P2 bzw. LP2) beigemischt und der Ansatz mit Extraktionspuffer auf ein Volumen von einem Milliliter eingestellt. Danach folgte, bei leichter Rotation (ca. 300 rpm), eine einstündige Inkubation.

Zur Abtrennung nicht extrahierbarer Anteile wurden die Proben anschließend zentrifugiert. Dazu sind P2-Proben in der Tischzentrifuge für zehn Minuten bei maximaler Umdrehungszahl, LP2-Proben in der Ultrazentrifuge für 30 Minuten bei 350 000 x g zentrifugiert worden. Der resultierende Überstand entspricht dem Extrakt (E), das Sediment dem Nicht-Extrakt (NE). Jeweils ein Teil des Extraktes und des Nicht-Extraktes wurde in Laemmlipuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE (vgl. 4.8), Westernblot und Immundetektion (vgl. 4.9) analysiert oder der Proteinextrakt wurde weiterführend immunpräzipitiert (vgl. 4.5) und dann als Immunpräzipitat (IP) mit zugehörigem Überstand (SN) untersucht.

4.5 Immunpräzipitation von Proteinkomplexen

Bei der Immunpräzipitation (IP) wird ein Antigen durch einen Antikörper aufkonzentriert. Das Antigen kann dabei ein Protein oder Peptid sein. Der Antikörper ist an ein festes Substrat gekoppelt und bindet über seine Affinität ein spezifisches Antigen in einer Lösung. Ein bestimmtes Protein wird also aus einem Proteingemisch heraus präzipitiert.

Zum Nachweis einer Protein-Protein-Wechselwirkung muss diese Methode erweitert werden. Das Antigen bindet zusätzlich an dessen Interaktionspartner. Auf diese Weise können ganze Proteinkomplexe präzipitiert werden. Dabei bedient man sich in der Regel an spezifischen Eigenschaften von Protein A, aus der Zellwand des Bakteriums *Staphylococcus aureus*, sowie Protein G, welches ein Bestandteil der Zellwand bestimmter Streptokokken-Stämme ist. Protein A und G binden mit hoher Spezifität an die Fc-Region der meisten Säugetier-Immunglobuline. Mit diesen Proteinen werden Kügelchen beschichtet („Sepharose-Beads“), die dann die Antikörper-Protein-Komplexe an sich binden.

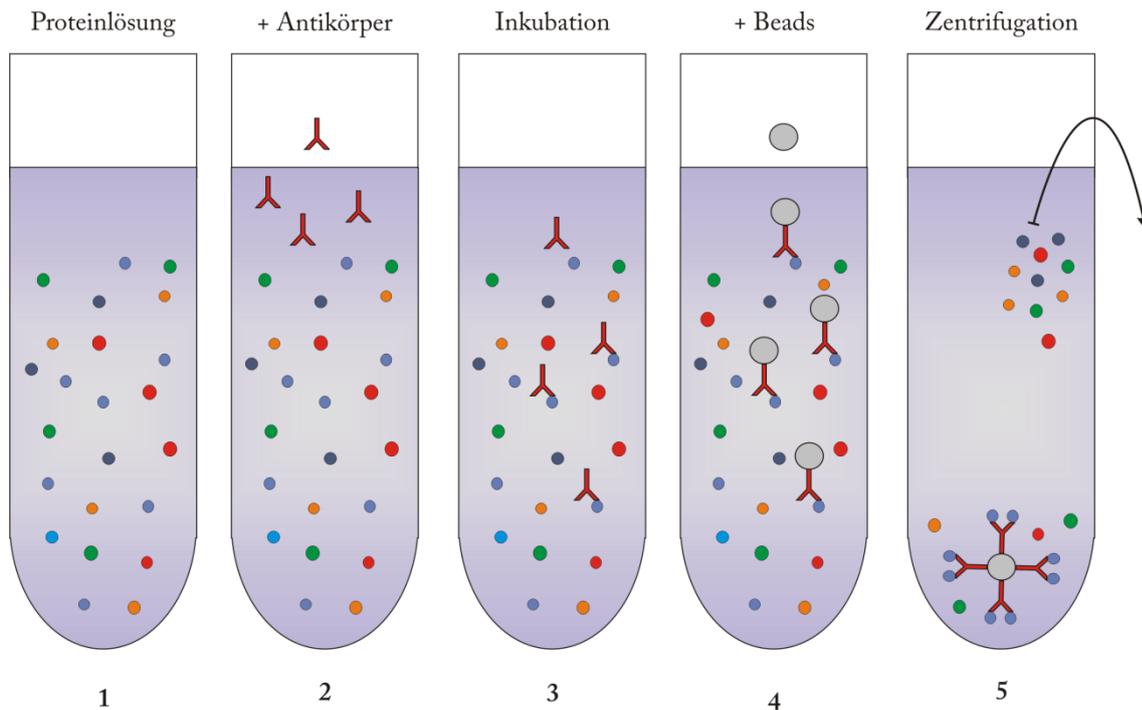


Abb. 11 Schematische Darstellung der Immunpräzipitation

Einer homogenen Lösung (1) wird ein Antikörper gegen das gewünschte Protein zugegeben (2). Nach Inkubation bei 4 °C für 1 h bzw. über Nacht erfolgt die spezifische Bindung des Antikörpers an das Protein (3). Der Lösung werden G-Sepharose Beads zugegeben, welche den Antikörper-Protein-Komplex unlöslich werden lassen (4). Nach Zentrifugation befindet sich der Antikörper-Protein-Bead-Komplex als sichtbares Pellet auf dem Gefäßboden. Der Überstand wird abgenommen und man erhält das gewünschte, aufkonzentrierte Protein (5).

Die Immunpräzipitation zur Analyse von Proteininteraktionen und Komplexbildungen des SNARE-Komplexes als auch des Syb-Syp-Komplexes wurde 1995 erstmals von Edelman und Kollegen beschrieben.

Nach vorangegangener Extraktion (siehe 4.4) wurden 200 µl Proteinextrakt mit zwei Mikroliter Antikörper (Synaptobrevin, Synaptophysin, SNARE-Proteine) versetzt. Dieser Ansatz wurde über Nacht, bzw. für mind. 16-18 Stunden bei vier Grad Celsius unter leichter Rotation (300 rpm) inkubiert.

60 µl zuvor aufgereinigter G-Sepharose-Beads wurden den über Nacht inkubierten Proben zugemengt, dieser Ansatz dann erneut bei vier Grad Celsius, 300 rpm für eine Stunde stehen gelassen. Auf diese Weise können die Antikörper an die Beads binden. Durch mind. dreimaliges Waschen mit

Extraktionspuffer und anschließender Zentrifugation mit der Tischzentrifuge wurden die Beads gereinigt.

Nach erfolgter Inkubation wurde bei 5 000 rpm (Tischzentrifuge) ca. drei Minuten zentrifugiert, dann Überstand und Pellet getrennt. Der Überstand entspricht der Nicht-Präzipitierbaren (SN) Fraktion. Das resultierende Sediment, welches dem Immunpräzipitat (IP) entspricht, wurde vor der weiteren Verarbeitung mind. dreimal mit Extraktionspuffer gewaschen. Immunpräzipitat (IP) und zugehöriger Überstand (SN) wurden in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen – danach erfolgte die Analyse mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (vgl. 4.8), Westernblot und Immundetektion (vgl. 4.9).

4.6 Chemische Quervernetzung

Vernetzungsreagenzien werden zur Analyse räumlicher Verhältnisse in Proteinen, häufiger aber von Interaktionen eines Proteins mit anderen Proteinen, Nucleinsäuren oder Lipiden eingesetzt. Zwei Anwendungsgebiete des chemischen Quervernetzens sind hervorzuheben: Die Messung von Abständen innerhalb eines Moleküls oder zwischen zwei Molekülen durch kovalente Verknüpfung mit einem Vernetzungsreagenz definierter Länge; und die Analyse von Nachbarschaften, d.h. derjenigen Moleküle, die sich in unmittelbarer Nähe eines Proteins befinden und daher vermutlich auch funktionelle Partner sind.

Bei der Auswahl des „Vernetzers“ gilt es neben der Spezifität und Selektivität, Eigenschaften wie die Membrangängigkeit und den Abstand zwischen den beiden reaktiven Gruppen zu beachten. Bifunktionelle Vernetzer können in drei Gruppen unterteilt werden: homobifunktionelle, heterobifunktionelle und Reagenzien ohne eigene Länge.

Das in dieser Arbeit verwendete Vernetzungsreagenz Disuccinimidylsuberat (DSS) gehört zu der Gruppe der homobifunktionellen Reagenzien, d.h. Reagenzien mit zwei identischen funktionellen Gruppen, die durch einen „Spacer“ voneinander getrennt sind (siehe Abb. 13). Mit Hilfe dieser

4. Methoden

Reagenzien kann man vor allem Molekulargewichte und Quartärstrukturen von Proteinen, die aus mehreren Polypeptidketten bestehen, bestimmen. Durch kovalente Verknüpfung wird verhindert, dass ein Proteinkomplex bei der Analyse auseinanderfällt, so dass man das Molekulargewicht des Gesamtkomplexes erhält.

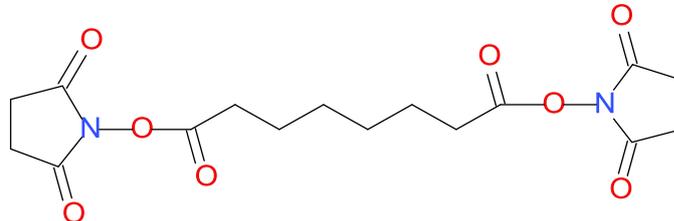


Abb. 12 Disuccinimidylsuberat (DSS)

Ausgangsmaterial für eine chemische Quervernetzung war frisch präpariertes, in PBS oder eigenem Überstand (LS2) resuspendiertes, P2 oder LP2. DSS wurde in DMSO gelöst und dem resuspendierten LP2 in einer finalen Konzentration von einem Millimolar beigefügt. Nach einer Inkubation für 45 Minuten bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von Tris-HCl (pH 7,4; 100 mM) und anschließender Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur gestoppt. Nach Zentrifugation bei 5 000 x g für drei Minuten überführte man den Überstand in ein Eppendorfbehälter und versetzte ihn mit vierfach Laemmli, ohne denaturierendes Reagenz. Die Analyse der Proben erfolgt durch SDS-PAGE und Immunoblotting (siehe 4.8 und 4.9).

4.7 Isolation von Lipid rafts

4.7.1 Isolation synaptosomaler Lipid rafts

Die Isolation von „Lipid rafts“ beruht auf der von Parkin und Kollegen (Parkin *et al.*, 1999) beschriebenen Methode. Die Aufarbeitung der synaptosomalen Fraktion ist in Abschnitt 4.1.1 beschrieben. Das synaptosomale Pellet (P2) wurde mit MBS-Puffer resuspendiert und auf eine

Konzentration von einem Milligramm je Milliliter eingestellt. Dem Ansatz wurde Detergenz in dem Maße zugegeben, so dass die Ansätze ein Prozent Triton bzw. zwei Prozent Lubrol enthielten. Die Extraktion erfolgte bei vier Grad Celsius für 45 Minuten, dann wurden die Ansätze in je einem Milliliter einer 80-prozentigen Sucroslösung überführt.

Einen Tag zuvor wurde ein diskontinuierlicher, mit MBS-Puffer angesetzter, Sucrosegment, mit den Stufen 5, 10, 15, 25 und 30 Prozent Sucrose (je 1 ml), vorbereitet. Jede Stufe enthielt, je nach gewünschter Extraktion, 0,1 Prozent Triton oder 0,2 Prozent Lubrol. Zur Einstellung des Gleichgewichtes wurde dieser diskontinuierliche Gradient über Nacht bei vier Grad Celsius stehen gelassen.

Die extrahierten Proteine wurden anschließend vorsichtig mit einer Pasteurpipette auf den Boden des Gradienten geladen ohne den Gradienten zu vermischen. Der geladene Gradient wurde bei 140 000 x g für 18-24 Stunden zentrifugiert. Fraktionen zu je einem Milliliter wurden von der Oberfläche des Gradienten abgenommen. Einen Teil der gesammelten Fraktionen wurde für den alkalischen Phosphatase-Assay verwendet, der Rest wurde mit vierfach Laemmli versetzt und mittels SDS-Page und „Western Blotting“ analysiert.

4.7.2 Alkalische Phosphatase Assay

Nach erfolgter Herstellung einer Standardlösung von 0,2 mM p-Nitrophenol durch Lösen von 200 µl einer ein millimolaren Stocklösung mit einem Milliliter destilliertem Wasser wurden Aliquods (0, 20, 40, 60, 80, 100 µl) dieser Standardlösung in eine 96-Lochplatte pipettiert. Mit destilliertem Wasser wurden anschließend die Volumina auf 100 µl aufgefüllt. Von den Proben wurden je 100 µl in die 96-Lochplatte vorgelegt und anschließend mit 100 µl destilliertem Wasser überschichtet. Sowohl zu der Standardreihe als auch zu den Proben wurde je 100 µl alkalische Phosphatase zugemengt, dann die Ansätze solange bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Die Überprüfung der Absorption erfolgte mit Hilfe einer ELISA-Apparatur bei einer Wellenlänge von 405 nm.

4.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. SDS ist ein anionisches Detergenz und überdeckt die Eigenladung von Proteinen so effektiv, dass Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen. Bei der Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Überschuss von SDS auf 95 °C erhitzt, und so die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrückenbindungen und durch Streckung der Moleküle aufgelöst. Schwefelbrücken zwischen Cysteinen werden durch die Zugabe einer reduzierenden Thiolverbindung (Dithiothreitol, β -Mercaptoethanol) aufgespalten. Die mit SDS beladenen, gestreckten Aminosäureketten bilden Ellipsoide. Wegen der hohen Auflösung wird standardmäßig für Proteintrennungen ein SDS-haltiges, diskontinuierliches Tris-HCL bzw. Tris-Glycin-Puffersystem eingesetzt.

Dabei bindet SDS an die meisten durch Hitzebehandlung denaturierten Proteine in einem Umfang, der der molaren Masse des Proteins annähernd proportional ist. Ein Molekül SDS bindet in einem konstanten Verhältnis von ca. 1,4 g SDS pro Gramm Protein, wodurch die negative Nettoladung derart erhöht wird, dass die ursprüngliche Ladung des Moleküls vernachlässigbar wird. Weiterhin ändert sich die native Konformation der Proteine, so dass diese eine annähernd ähnliche Struktur annehmen und somit ein ähnliches Verhältnis von Ladung zu Masse besitzen. Die Trennung der Proteine erfolgt dementsprechend überwiegend aufgrund der molaren Masse. Die Molekulargewichtsbestimmung der Polypeptide erfolgt durch Vergleich der Laufstrecke mit der von einem bekannten Marker.

Polyacrylamidgele werden durch Polymerisation von Acrylamid hergestellt. Bei dieser Reaktion handelt es sich um eine Radikalkettenreaktion, bei der Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalstarter fungiert. N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin (TEMED) vermittelt die Quervernetzung.

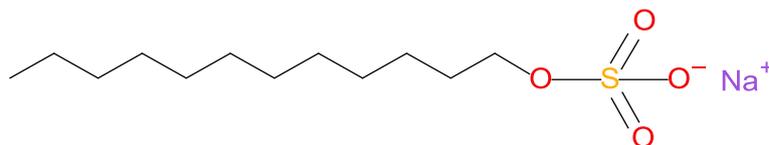


Abb. 13 Natriumdodecylsulfat

Natriumdodecylsulfat ($C_{12}H_{25}NaO_4S$), ein anionisches Tensid, ist ein Monoester der Schwefelsäure, bestehend aus einer langkettigen Alkylgruppe und einem modifizierten Sulfatanion mit einem Natriumkation.

Zunächst wurde das Trenngel gegossen und die Oberfläche durch Überschichten mit Isopropanol geglättet. Nach Polymerisierung des Trenngels (ca. 30 Min. bei RT) entfernte man das Isopropanol und überschichtete das Trenngel mit dem vierprozentigen Sammelgel bis zum oberen Plattenrand, wobei ein eingeführter Kamm Taschen für die Proben aussparte.

Zusätze	Trenngel 10 %	Trenngel 12 %	Trenngel 15 %
Trenngel-Puffer (4x) [0,75 M Tris-HCL pH 8,8]	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Acrylamid [40 %]	2,5 ml	3,0 ml	3,75 ml
H ₂ O (dest.)	5 ml	4,5 µl	3,75 µl
TEMED [10 %]	5 µl	5 µl	5 µl
Ammoniumpersulfat [10 %]	50 µl	50 µl	50 µl

Zusätze	Sammelgel 4 %
Sammelgel-Puffer (4x) [0,625 M Tris-HCL pH 6,8]	1,25 ml
Acrylamid [40 %]	0,5 ml
H ₂ O (dest.)	3,25 ml
TEMED	2,5 µl
Ammoniumpersulfat [10 %]	25 µl

Tab. 3 Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels

Die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel ist in Tabelle 3 einzusehen. Nach dem Polymerisieren des Sammelgels wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt und die Pufferreservoirs für die Kathode und für die Anode mit SDS-Gel-Laufpuffer gefüllt.

Die Proben wurden vor dem Aufbringen zunächst mit vierfach Lämmli-Auftragspuffer versetzt, fünf Minuten bei 95 °C denaturiert, kurz abzentrifugiert und anschließend in die Taschen gefüllt. Mitgeführte Molekulargewichtsstandards dienen dabei der Identifikation. Die Trennung der Proteine erfolgte bei einer Stromstärke von 75 V für ca. 15 Minuten. Der Lauf war beendet, wenn die Farbstofffront die untere Gelkante erreicht hatte. Das Gel wurde anschließend entweder mit Coomassie-Blau gefärbt, um Proteinbanden sichtbar zu machen, oder für einen Western Blot (vgl. 4.9) eingesetzt.

4.9 Western Blot Analyse

Nach der Proteintrennung durch das SDS-Gel können die Proteine mittels Western Blot-Methodik auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden. Als „Western Blotting“ bezeichnet man den Proteintransfer mit anschließender Immundetektion.

Beim Transfer werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus der Polyacrylamidmatrix auf eine Membran aus Nitrocellulose übertragen. Durch die Immobilisierung der Proteine auf der Membran werden diese weiteren Analysen zugänglich gemacht.

Zur Immundetektion eines bestimmten Proteins wird dieses zunächst mit einem spezifischen Primärantikörper markiert. Ein Zweitantikörper, an den das Enzym Peroxidase gekoppelt ist, bindet an den Primärantikörper. Die Detektion erfolgt anhand einer Chemolumineszenz-Reaktion, bei der die Peroxidase die Oxidation von Luminol zu Luminol-Endoperoxid katalysiert. Dessen Zerfall erzeugt ein Lichtsignal, das mit Hilfe von Filmen detektiert und dokumentiert wird.

4.9.1 Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran

Der Proteintransfer erfolgte in einer Semi-Dry-Blotting-Kammer. Nach Trennung der Glasplatten und Entfernung des Sammelgels wurde eine Nitrocellulosemembran sowie acht Lagen Gel-Blotting Papier auf Größe des Gels zugeschnitten. Die Membran wurde zusammen mit den Gel-Blotting-Papieren im Blot-Puffer äquilibriert. Vier getränkte Gel-Blotting-Papiere wurden luftblasenfrei durch Walzen mit der Glaspipette auf die Anode gelegt. Anschließend folgte die Transfermembran, danach das Trenngel. Darüber kamen die restlichen vier getränkten Filterpapiere. Nach 72 Minuten bei konstanten 17 mV war der Proteintransfer abgeschlossen. Die Anfärbung der Nitrocellulose mit Ponceau S-Färbelösung ist eine Möglichkeit den Erfolg des Transfers zu überprüfen. Dazu wurde die Membran für ca. eine Minute in Ponceau S gelegt und dann mit Wasser abgespült. Die Proteine waren als rote Banden zu erkennen. Zur vollständigen Entfärbung wurde die Membran mit TBS-T gewaschen.

4.9.2 Immundetektion von immobilisierten Proteinen

Die Immundetektion von immobilisierten Proteinen erfolgte unter Verwendung von spezifischen Antikörpern nach SDS-PAGE und dem Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran. Die Transfermembran wurde zunächst mit TBS-T gewaschen und anschließend 30 Minuten bei RT in Block-Puffer (5 % Magermilchpulver in TBS-T) inkubiert. Dabei sättigt die Magermilch unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran ab. Die Membran wurde dreimal in TBS-T geschwenkt und im Anschluss mit dem entsprechenden primären Antikörper über Nacht bei vier Grad Celsius inkubiert. Der nicht gebundene Antikörper wurde anschließend in drei Waschschritten mit TBS-T entfernt. Es folgte die Inkubation der Membran mit sekundärem Antikörper für 45 Minuten bei RT. Vor dem Proteinnachweis wurde der Blot erneut dreimal mit TBS-T gewaschen. Die Chemolumineszenz-Reaktion erfolgte durch Zugabe von frisch angesetzter ECL-Lösung (jeweils Lösungen I und II im Verhältnis 1:1) für POD-(Meerrettich-

Peroxidase)-gekoppelte sekundäre Antikörper. Nach ca. einminütiger Inkubation bei RT wurde die Chemolumineszenz detektiert.

4.9.3 Strippen der Nitrocellulosemembran

Bei dem Strippen der Nitrocellulosemembran wird der auf der Membran gebundene Antikörper durch Behandlung mit saurem oder basischem Puffer entfernt. Bei jedem „Stripping“ gehen allerdings Proteine verloren, so dass das Signal nach jedem dieser Vorgänge schwächer wird. Nach der Entfernung des Antikörpers kann die Nitrocellulosemembran mit neuem Antikörper behandelt werden.

Nach dem ersten Entwickeln wurde die Membran zunächst für zehn Minuten in 0,2 M NaOH und anschließend für zehn Minuten in einer 0,02-prozentigen Natriumazid-Lösung behandelt. Dies diente der Inaktivierung der noch gebundenen Peroxidase. Nach dem Waschen mit TBS-T konnte der immunochemische Nachweis wiederholt werden.

4.10 Statistik

4.10.1 t-Test

Der in Microsoft Excel enthaltene „student´s t-Test“ (beidseitig vom Typ 2) erlaubt einen Vergleich zweier Datensätze miteinander. Diese bestehen jeweils aus dem Mittelwert mind. dreier gemessener Werte. Der dabei erhaltene p-Wert gibt Aussage darüber, ob sich die unterschiedlichen Messwerte voneinander in signifikanter Weise unterscheiden. Als signifikant unterschiedlich gelten zwei Werte ab einem p-Wert $<0,05$.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung des Syb-Syp-Komplexes

5.1.1 Proteinverteilung in subzellulären Kompartimenten

Die subzelluläre Fraktionierung stellt eine grundlegende Methode zur Gewinnung und Anreicherung bestimmter Proteine aus verschiedenen Zellkompartimenten dar. Ausgangspunkt der Versuche waren Synaptosomen (P2) oder synaptische Vesikel (LP2), die wie unter 4.1.1 und 4.1.2 beschrieben hergestellt wurden. Bekannt ist, dass im Zuge der Präparation von Synaptosomen oder synaptischer Vesikel mit Hilfe der subzellulären Fraktionierung integrierte bzw. assoziierte synaptische Vesikelproteine, wie z.B. Synaptobrevin, Synaptophysin oder VGLUT2, angereichert werden können (Huttner *et al.*, 1983).

Diese Aussage ist methodischer Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit. Initial wurde die beschriebene Anreicherung anhand der Proteine Synaptobrevin, Synaptophysin und VGLUT2 in Homogenat, Synaptosomen und in synaptischen Vesikeln verfolgt. Für die Untersuchung fanden Gehirne von Ratten Verwendung. Analysiert wurde die membranspezifische Verteilung der jeweiligen subzellulären, synaptischen Membranfraktionen. Hierbei lag der Schwerpunkt der Analyse auf etwaigen Unterschieden in der Proteinverteilung zwischen synaptosomalen Membranen und synaptischen Vesikelmembranen.

Die erhaltenen Fraktionen aus Rattengehirnen (H, P1, P2, LP2) wurden anschließend mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und auf ein zwölfprozentiges SDS-Gel geladen. Nach anschließendem Proteintransfer auf Nitrocellulose erfolgte die Inkubation mit dem jeweils gewünschten Antikörper.

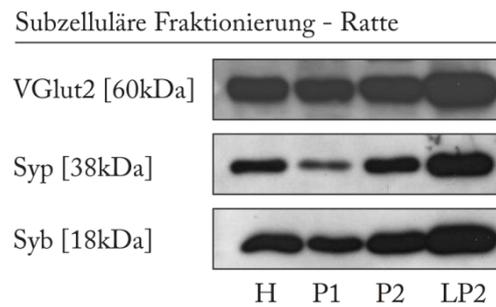


Abb. 14 Verteilung einzelner Proteine synaptischer Vesikel

Homegenat (H), Pellet 1 (P1), synaptosomales Pellet (P2) und synaptische Vesikel (LP2) wurden mittels SDS-Page und anschließendem Western Blot analysiert. Die Gele wurden jeweils mit 5 µg Protein beladen. Nach Transfer wurde die Nitrocellulosemembranen mit Antikörpern gegen VGLUT2, Syp und Syb inkubiert.

Es wurden jeweils fünf Mikrogramm Protein auf zwölfprozentige SDS-Gele geladen. Nach anschließendem „Western Blotting“ wurde die Nitrocellulosemembran mit Antikörpern gegen VGLUT2, Synaptophysin bzw. Synaptobrevin inkubiert. Der Blot aus Abbildung 14 zeigt die Proteinanreicherung von P1 hin zur LP2-Fraktion sowohl für Synaptophysin als auch für Synaptobrevin. Die Anreicherung von VGLUT2 fällt weniger stark aus, wobei die Gesamtproteinmenge an VGLUT2 in allen Fraktionen oberhalb der von Synaptophysin oder Synaptobrevin liegt. Der Anteil von Synaptophysin, Synaptobrevin und VGLUT2 steigt mit zunehmender Aufreinigung im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge an.

5.1.2 Die Synaptobrevin-Synaptophysin Interaktion

Der Nachweis der Syb-Syp-Interaktion erfolgte einerseits mit Hilfe der Immunpräzipitation wie sie unter 4.5 beschrieben wurde. Hierfür wurden zuvor die einzelnen Proteinfractionen mit Detergenz (Triton X-100 oder Lubrol) extrahiert. Anschließend wurde der jeweilige Antikörper für die gewünschte Präzipitation zugesetzt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Proben mitgeführt, um die Spezifität der Bindung der Antikörper an die G-Sepharose-Kügelchen zu zeigen.

Die Immunpräzipitationen wurden mit Antikörpern gegen Synaptophysin, Synaptobrevin, Syntaxin und SNAP-25 bzw. mit Antikörpern gegen Synaptophysin und Synaptobrevin an synaptischen Vesikeln, isoliert aus Ratten- bzw. Mäusegehirnen durchgeführt. Die zugesetzten Antikörper binden ihre Interaktionspartner. Mit der Zugabe von G-Sepharose-Kügelchen wird nun das Protein, gegen das der Antikörper gerichtet ist, samt seiner Interaktionspartner aus der Probe „gezogen“. Eine Detektion von z.B. Synaptobrevin in einer Synaptophysin-Immun-präzipitation zeigt eine mögliche Interaktion beider Proteine. Dabei ist zu beachten, dass die Immunpräzipitation relative Aussagen, jedoch keine Bestimmung absoluter Proteinmengen erlaubt. Grund hierfür ist eine nicht vollständige Präzipitation durch den jeweils verwendeten Antikörper. Anhand der Ergebnisse lassen sich hauptsächlich Verhältnisangaben über die Bildung von Proteinkomplexen im Vergleich zum Nachweis der einzelnen Proteine machen.

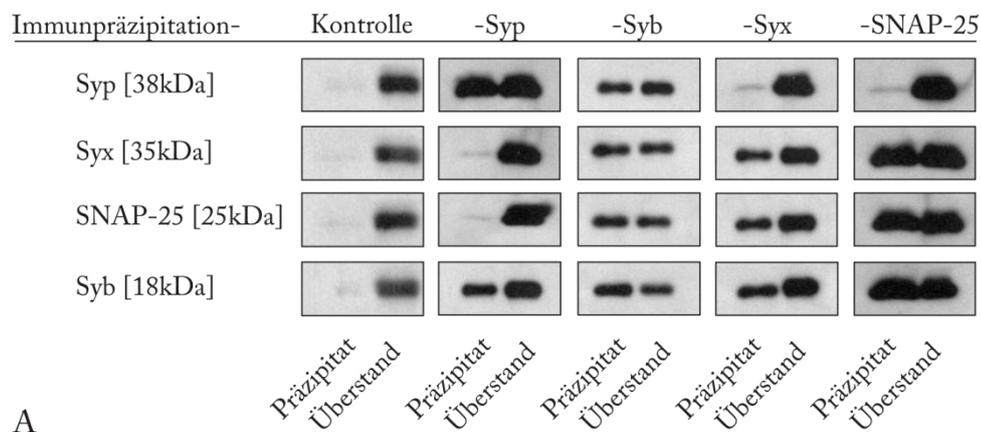


Abb. 15 Syb-Syp-/SNARE-Komplex des Rattengehirns

Neben einer Kontrolle, der kein Antikörper zur Präzipitation zugesetzt wurde, wurden LP2-Fractionen, jeweils in kleinen Mengen eigenem LS2 resuspendiert, mit Antikörpern gegen Syp, Syb, Syx und SNAP-25 präzipitiert. Anschließend wurden die Western Blots mit Antikörpern gegen Syp, Syx, SNAP-25 und Syb entwickelt. Während Syp in der Syb-Präzipitation detektiert werden konnte, zeigten die restlichen SNARE Proteine keine Interaktion mit Syp.

5. Ergebnisse

Abbildung 15 zeigt sowohl für die Präzipitation mit Antikörper gegen Synaptophysin als auch für die mit Antikörper gegen Synaptobrevin im Western Blot ein Signal für das jeweils andere Protein. Dabei ist Synaptobrevin einziger Interaktionspartner für Synaptophysin (vgl. Abb. 15, IP Syp). Synaptobrevin hingegen interagiert, wie in der Literatur beschrieben, nicht nur mit Synaptophysin, sondern auch mit Syntaxin und SNAP-25. Die Immunpräzipitationen mit Syntaxin und SNAP-25 bestätigen dies durch ein jeweils sichtbares Signal für Synaptobrevin.

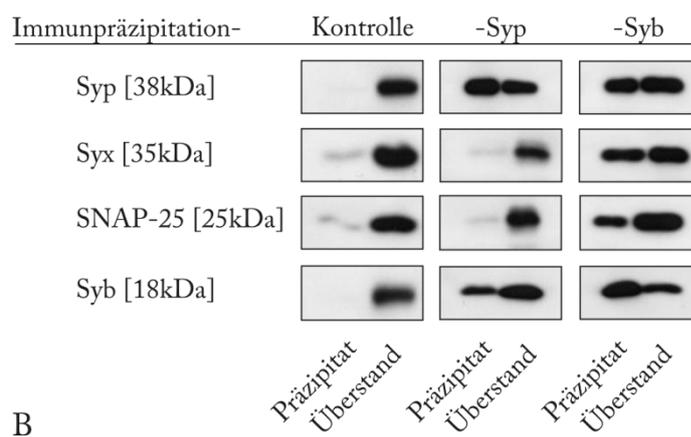


Abb. 16 Syb-Syp-/SNARE-Komplex des Mäusegehirns

Neben einer Kontrolle, der kein Antikörper zugesetzt wurde, wurden LP2-Fractionen, jeweils in kleinen Mengen eigenem LS2 resuspendiert, mit Antikörpern gegen Syb und Syp präzipitiert. Die Western Blots wurden mit Antikörpern gegen die SNARE-Proteine und Syp entwickelt. Es zeigte sich ein analoges Bild zu den Ergebnissen bei Ratten.

Die Analyse synaptischer Vesikel isoliert aus Mäusegehirnen führte zu analogen Ergebnissen (Abb. 16). Neben einer Kontrolle ohne Zugabe eines Antikörpers wurde zum einen mit Antikörper gerichtet gegen Synaptophysin, zum anderen mit Antikörper gegen Synaptobrevin präzipitiert. Während bei der Immunpräzipitation mit Antikörper gegen Synaptophysin neben einer Interaktion mit Synaptobrevin keine weiteren Signale im Western Blot erkennbar sind, zeigt die Immunpräzipitation mit Antikörper gegen Synaptobrevin eine Interaktion mit allen getesteten Antikörpern (Syp, Syx, SNAP-25 und Syb).

Zusätzlich zu den Präzipitaten wurden die jeweiligen Überstände, also nicht präzipitierte Proteine, aufgetragen. Bei der Kontrolle, der kein proteinspezifischer

Antikörper zugesetzt wurde, weswegen die Proteine auch nicht durch Sepharose-G sedimentiert werden, erhält man in diesen Überständen bei allen getesteten Antikörpern ein Signal im Western Blot. Dies unterstreicht die hohe Spezifität der Immunpräzipitation mit den verwendeten Antikörpern.

Die Immunpräzipitation ist eine Möglichkeit, Proteine auf Interaktionspartner zu überprüfen. Eine andere, schnellere Möglichkeit ist die unter 4.6 beschriebene Methode der chemischen Quervernetzung. Der chemische Quervernetzer DSS verknüpft eng benachbarte Proteine in den Membranen. Indem ein Inkubationsansatz für chemisches Quervernetzen keine Extraktion mit Detergenzien erfährt und in nicht denaturierendem Laemmli-Probenpuffer aufgenommen wird, ergibt sich ein relativ genaues, den realen Verhältnissen entsprechendes Bild der intermembranären Proteininteraktionen nach Immundetektion. Allerdings ist bei der chemischen Quervernetzung, anders als bei einer Immunpräzipitation, ein positives Ergebnis, also ein Signal auf dem Western Blot, nicht gleichbedeutend mit einer tatsächlichen Interaktion zweier Proteine. Darum erhält man mit dieser Methode lediglich einen ersten Hinweis, der mit einer weiteren Methode zu überprüfen ist. Chemisch quervernetzt werden Proteine in räumlicher Nachbarschaft. Solche Proteine können, müssen aber nicht miteinander interagieren.

Für die Analyse des Syb-Syp-Komplexes mit Hilfe der chemischen Quervernetzung wurden Synaptosomen (P2-Fraktion) verwendet. Neben unbehandelten Synaptosomen (Kontrolle), wurde ein Teil der Synaptosomen mit Vernetzungsreagenz (DSS) versetzt. Es folgte eine SDS-Gelelektrophorese mit anschließendem Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran mittels „Western Blotting“. Die Membran wurde mit gegen Synaptobrevin und Synaptophysin gerichteten Antikörpern inkubiert. Mit der chemischen Quervernetzung wurden Synaptosomen aus Ratten- und Mäusegehirne miteinander verglichen.

Die Molekulargewichte für die einzelnen Proteine bzw. miteinander vernetzte Proteine sind rechnerisch wie folgt: Syb [18 kDa]; Syb-Syb [36 kDa], Syp [38 kDa], Syp-Syp [76 kDa]. Der Syb-Syp-Komplex hat ein Molekulargewicht von ca. 56 kDa. Ein Vergleich der Ergebnisse von Synaptosomen aus Ratten- und Mäusegehirnen zeigt keinen Unterschied in der Interaktion zwischen Synaptobrevin und Synaptophysin. Abbildungen 17A/B lassen sich deshalb zusammen beschreiben.

5. Ergebnisse

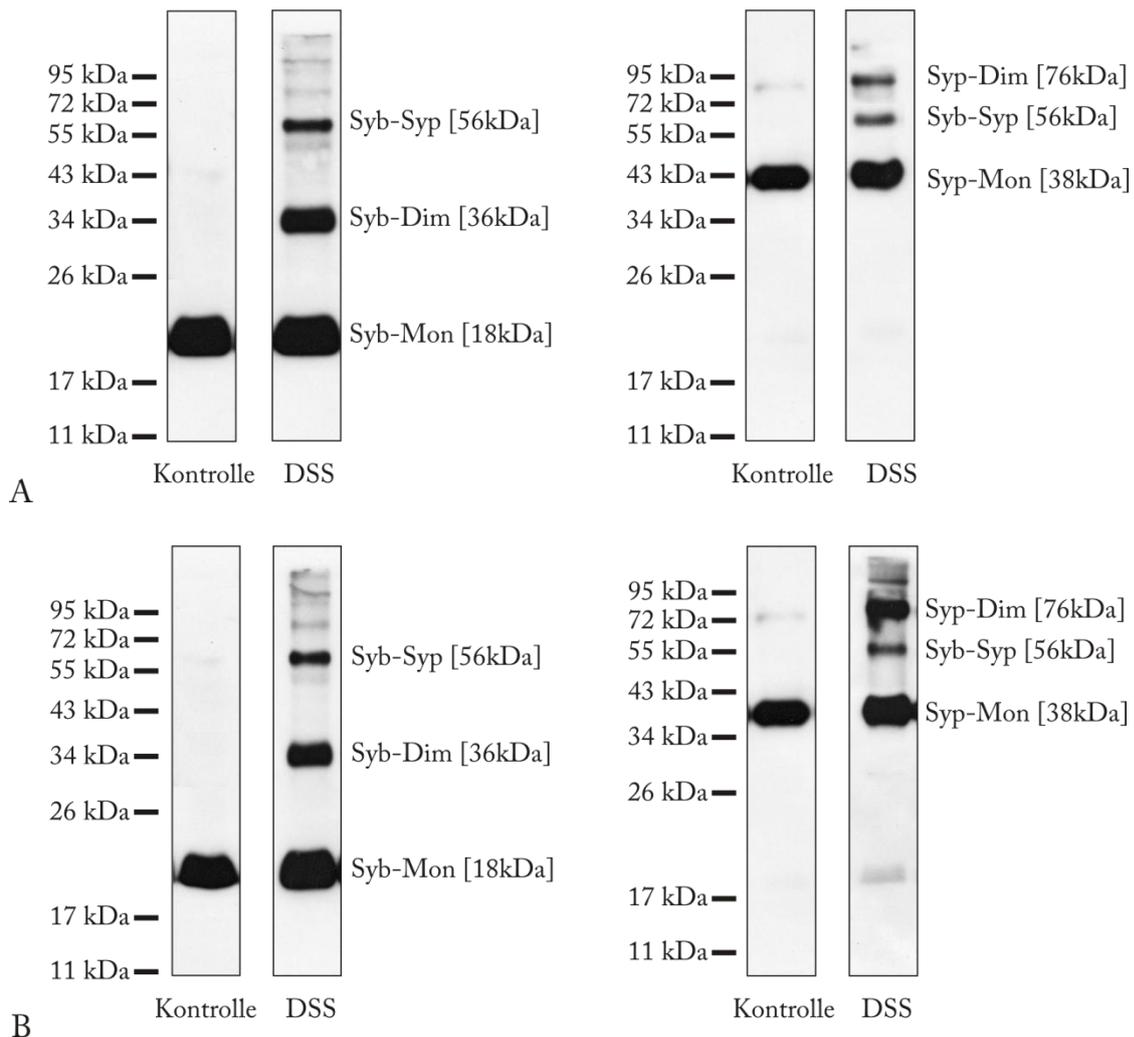


Abb. 17 Syb-Syp-Komplex chemisch quervernetzt mit DSS

Für die Analyse des Syb-Syp-Komplexes mit Hilfe chemischer Quervernetzung wurden Synaptosomen (P2-Fraktion) aus Ratten (A) bzw. Mäusen (B), mit DSS (1 mM) behandelt oder unbehandelt (Kontrolle), in gleichen Mengen auf ein SDS-Gel (12%) aufgetragen. Die Auswertung erfolgte durch Western Blots mit Antikörper gegen Syb (links) oder Syp (rechts). Mit beiden Antikörpern kann in Ratten und Mäusen die Interaktion zwischen Syb und Syp gezeigt werden.

Die Immundetektion mit gegen Synaptobrevin gerichtetem Antikörper zeigt in der Kontrolle das Synaptobrevin-Monomer. Weitere Banden sind nicht zu erkennen. Neben diesem Monomersignal sind in der mit DSS behandelten Probe weitere Signale zu sehen. Erkennbar ist eine Bande auf Höhe der 34 kDa Bande (Syb-Dimer [36 kDa]), eine weitere Bande liegt zwischen 55 kDa und 72 kDa (Syb-Syp-Komplex [56 kDa]).

Mit Antikörper gegen Synaptophysin detektiert zeigen sich neben einer Bande für Synaptophysin-Monomer [38 kDa] ebenfalls zwei weitere Banden. Zwischen der 55 kDa und 72 kDa Bande des Markers ist der Syb-Syp-Komplex [56 kDa] zu erkennen und etwas oberhalb der 72 kDa Bande des Markers läuft das Signal für das Synaptophysin-Dimer [76 kDa].

Mit dem gegen Synaptophysin gerichteten Antikörper ist der Syb-Syp-Komplex schlechter nachzuweisen als mit dem gegen Synaptobrevin gerichteten Antikörper. Ein möglicher Grund hierfür kann darin begründet sein, dass die Bindungsstelle des Synaptophysin Antikörpers nach Komplexbildung zwischen Synaptophysin und Synaptobrevin in chemisch quervernetzten Proben schlechter zugänglich ist.

5.1.3 Syb-Syp-Komplex unter Ca^{2+} -Einfluss

In der Literatur ist eine Ca^{2+} -bedingte Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes in mit Triton extrahierten Synaptosomen des Rattengehirns beschrieben (Prekeris & Terrian, 1997), (Daly & Ziff, 2002). Diese Beobachtung wurde auch an Neuronen des Hippocampus gemacht. Inwiefern diese Ergebnisse auf synaptische Vesikel übertragbar sind, sollte in in einem weiteren Schritt analysiert werden. Die Isolierung von isolierten synaptischen Vesikeln (LP2) nach vorangegangener Ca^{2+} -Behandlung ist unter 4.1.3 beschrieben. Die Zugabe von Ca^{2+} erfolgte zur LS1-Fraktion, die neben synaptischen Vesikeln synaptosomales Zytosol enthält. Ausgangsmaterial waren Ratten- und Mäusegehirne. Die synaptischen Vesikel wurden, nach Bestimmung der Proteinkonzentration (vgl. 4.2.1) und Triton X-100 Extraktion der Membranproteine (vgl. 4.4), mit gegen Synaptophysin oder Synaptobrevin gerichteten Antikörper immunpräzipitiert. Die Analyse erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließendem Proteintransfer auf Nitrocellulose. Untersucht wurden die Proteine des SNARE-Komplexes sowie Synaptophysin.

5. Ergebnisse

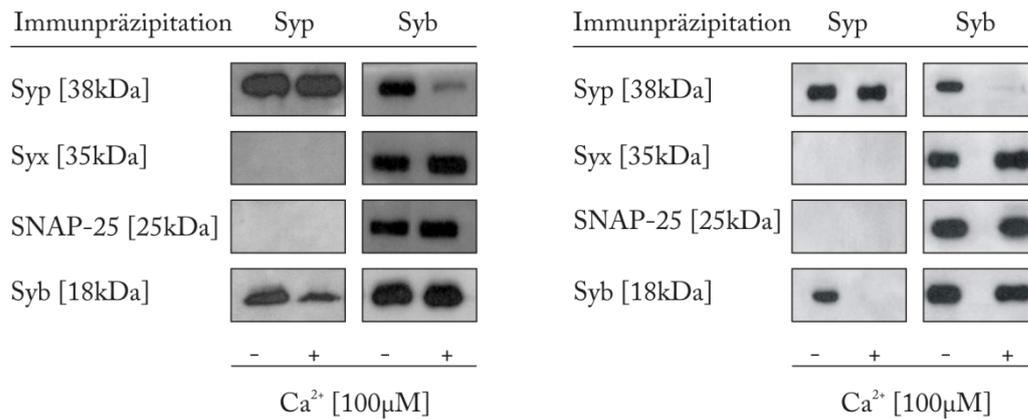


Abb. 18 Immunpräzipitation synaptischer Vesikel aus Ratten/Mäusen

Zur Gewinnung unbehandelter und mit Ca^{2+} -behandelter synaptischer Vesikel wurde die LS1-Fraktion aufgeteilt. Ein Teil blieb unbehandelt, ein zweiter Teil wurde mit Ca^{2+} [100 μM ; frei] behandelt und für 30 Min. zusammen mit dem unbehandelten Teil bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die parallele Aufarbeitung des LS1⁺ und LS1⁻, so dass am Ende LS2⁻, LP2⁻ und LS2⁺ sowie LP2⁺ erhalten wurde. Isolierte synaptische Vesikel (LP2⁺ oder LP2⁻) der Ratte (links) und Maus (rechts) wurden mit ihren jeweiligen eigenen Überständen (LS2⁻ oder LS2⁺) resuspendiert. Nach einer anschließenden Triton X-100-Extraktion der Membranproteine wurde mit Antikörpern gegen Syp und Syb immunpräzipitiert. Nach erfolgter SDS-Gelelektrophorese und „Western Blotting“ wurde mit Antikörpern gegen Syp, Syx, SNAP-25 und Syb entwickelt. Beide Immunpräzipitationen zeigen eine Ca^{2+} -bedingte Syb-Syp-Komplexdissoziation. Synaptische Vesikel aus Ratten und Mäusen liefern gleiche Ergebnisse.

In unbehandelten synaptischen Vesikeln der Ratte (Abb. 18, links) ist die Interaktion Synaptobrevins mit Synaptophysin zu sehen. Beide Immunpräzipitationen zeigen diese Interaktion. Proben, die mit 2,5 mM einer CaCl_2 -Lösung behandelt wurden, zeigen hingegen eine verminderte Interaktion beider Proteine. Die benötigte, einzusetzende CaCl_2 -Konzentration, um eine freie Ca^{2+} -Ionenkonzentration von 100 μM zu erhalten, wurde mit Hilfe eines Computerprogramms bestimmt (vgl. 4.1.3). Dabei war zuvor die Zugabe von EGTA sowie EDTA (je 2 mM) erforderlich, um eine exakte Konzentrationseinstellung gewährleisten zu können. EDTA ist ein Komplexbildner und bildet besonders mit Kationen mit einer Ladungszahl von +2 einen stabilen Chelatkomplex. Ähnlich wirkt auch EGTA, allerdings besitzt es im Vergleich zu EDTA eine höhere Affinität für Ca^{2+} . Diese gewählte Ca^{2+} -Konzentration von 100 μM entspricht einer möglichen intrazellulären, freien Ca^{2+} -Konzentration, wie sie auch nach Stimulation auftereten kann. Die Spezifität dieser Ca^{2+} -bedingten Dissoziation wird durch Vergleich mit anderen SNARE-Proteinen (Syx und SNAP-25) belegt.

Im Gegensatz zu dem Synaptophysin-Signal, welches nach Ca^{2+} -Behandlung schwächer als das der Kontrolle ist, bleibt die Signalstärke für Syntaxin und SNAP-25 unverändert. Synaptophysin interagiert bezogen auf die SNARE-Proteine ausschließlich mit Synaptobrevin. Ca^{2+} dissoziiert den Syb-Syp-Komplex. Dieser Effekt ist bei Ratten und Mäusen zu beobachten, wie in Abbildung 18 zu sehen ist.

Um diesen Effekt auf die Syb-Syp-Interaktion näher zu bestimmen, wurde in einem zweiten Schritt untersucht, inwieweit diese Ca^{2+} -induzierte Dissoziation von der eingesetzten Menge an Ca^{2+} abhängt. Als freie Ca^{2+} -Konzentration wurden folgende Stufen gewählt: 1 mM, 100 μM , 10 μM und 1 μM . Ca^{2+} wurde der LS1-Fraktion zugemengt und die Ansätze für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die weitere Aufarbeitung von LP2. Nach Triton-Extraktion und Immunpräzipitation mit gegen Synaptobrevin gerichtetem Antikörper wurden gleiche Proteinmengen auf ein zwölfprozentiges SDS-Gel aufgetragen. Im Anschluss an die Gelelektrophorese und dem Proteintransfer wurde die Nitrocellulosemembran mit Antikörpern gerichtet gegen eines der SNARE-Proteine bzw. gegen Synaptophysin inkubiert. In weiteren Versuchen wurde ein ähnlicher Versuchsansatz gewählt, allerdings erfolgte hier je eine Immunpräzipitation mit gegen Synaptophysin bzw. Synaptobrevin gerichtetem Antikörper nach Behandlung mit Ca^{2+} -konzentrationen von 100 bzw. 1 μM [frei]. Der Fokus der Auswertung lag auf dem Syb-Syp-Komplex.

Während die Konzentrationsreihe (Abb. 19, links) den Ca^{2+} -Einfluss auf den Syb-Syp-Komplex in Form einer Verminderung der Interaktion von Synaptobrevin und Synaptophysin zeigt, ist ein solcher Einfluss auf Syntaxin und SNAP-25 nicht erkennbar. Bereits geringe Mengen an Ca^{2+} [1 μM ; frei] führen zu einer Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes (Abb.19, rechts). Sowohl Immunpräzipitationen mit Antikörper gegen Synaptobrevin als auch jene mit Antikörpern gegen Synaptophysin zeigen bei beiden Ca^{2+} -Konzentrationen jeweils eine Verminderung der Interaktion zwischen Synaptobrevin und Synaptophysin.

5. Ergebnisse

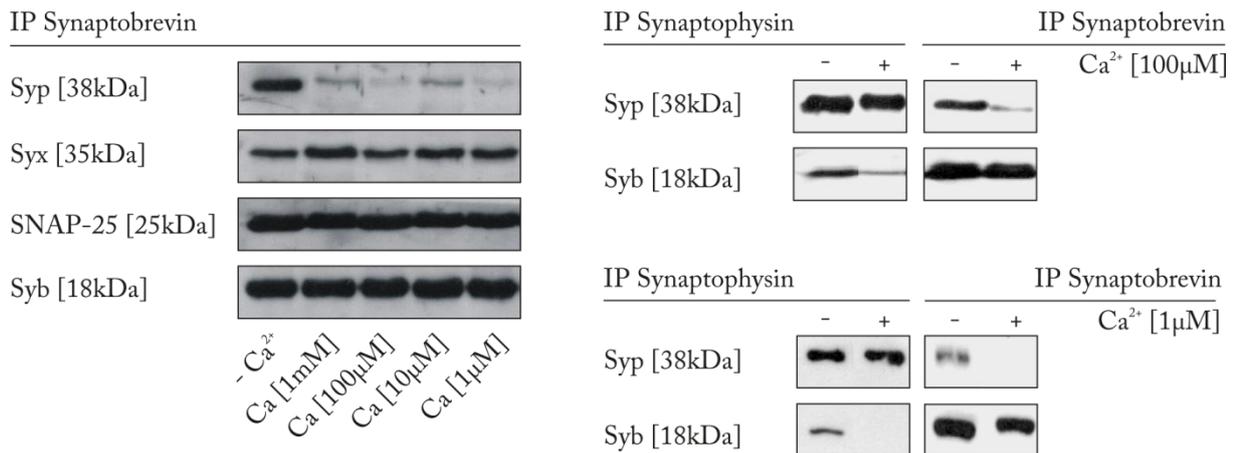


Abb. 19 IP: Ca²⁺-bedingte Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes

Zur Gewinnung unbehandelter und mit Ca²⁺-behandelter synaptischer Vesikel aus dem Rattengehirn wurde die LS1-Fraktion aufgeteilt. Während ein Teil unbehandelt blieb, wurden weitere Teile mit verschiedenen Ca²⁺-Konzentrationen [1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM; jeweils frei] behandelt und für 30 Min. zusammen mit dem unbehandelten Teil bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die parallele Aufarbeitung der Ansätze bis hin zum Erhalt der LP2- bzw. LS2-Fractionen. Mit den jeweiligen eigenen Überständen (LS2) wurden die synaptischen Vesikel (LP2) resuspendiert und anschließend die Membranproteine mit Triton X-100 extrahiert. Dann folgte die Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Syb oder Syp. Nach erfolgter SDS-Gelelektrophorese und „Western Blotting“ wurde mit Antikörpern gegen Syp, Syx, SNAP-25 und Syb entwickelt. Bereits bei niedrigen Ca²⁺-Konzentrationen von 1 µM ist sowohl in der Syb- als auch in der Syp-IP eine Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes zu beobachten.

Neben der Immunpräzipitation wurde der Ca²⁺-Einfluss auf die Interaktion zwischen Synaptobrevin und Synaptophysin auch mit Hilfe der chemischen Quervernetzung dargestellt. Die Versuchsbedingungen entsprachen denen der Immunpräzipitation, d.h. als freie Ca²⁺-Konzentration wurde 100 µM gewählt. Die chemische Quervernetzung wurde mit Antikörpern gegen Synaptobrevin oder Synaptophysin analysiert.

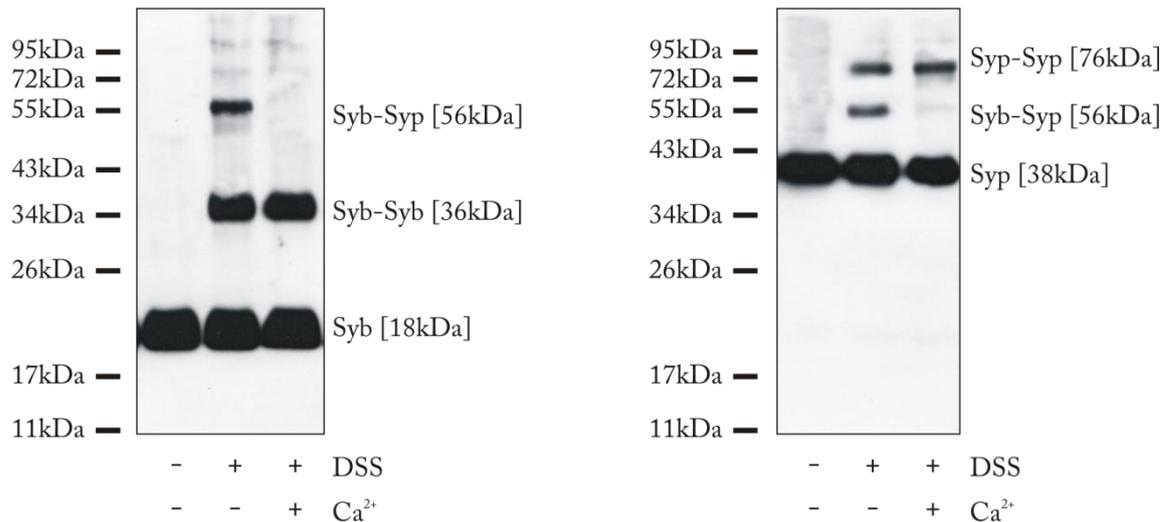


Abb. 20 XL: Ca^{2+} -bedingte Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes

Neben einer Kontrollprobe, d.h. unbehandelter synaptischer Vesikel, wurden zwei weitere Proben mit dem Quervernetzungsreagenz DSS (1 mM) versetzt. Eine dieser zwei Proben wurde zusätzlich noch $100 \mu\text{M}$ Ca^{2+} [frei] behandelt. Die Ca^{2+} -Zugabe erfolgte zur LS1-Fraktion. Es wurden gleiche Mengen an Protein auf ein zwölfprozentiges SDS-Gel geladen. Die Entwicklung des Western Blots mit Antikörper gegen Syb (links) bzw. Syp (rechts) zeigen je den dissoziierenden Ca^{2+} -Effekt auf den Syb-Syp-Komplex. Neben den Kontrollen, bei denen die jeweiligen Monomere zu sehen sind, sind nach Quervernetzung mit DSS sowohl die Banden für den Syb-Syp-Komplex als auch für die jeweiligen Dimere zu erkennen. Nach Ca^{2+} -Behandlung ist für die Bande des Syb-Syp-Komplexes (56kDa) kein Signal mehr erkennbar. Ca^{2+} initiiert eine Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes.

In den Kontrollen sind neben der Bande für das Monomer von Synaptobrevin (Abb. 20, links) bzw. Synaptophysin (Abb. 20, rechts) keine weiteren Banden zu sehen. In den mit DSS behandelten Proben ist dies anders. Zu den Monomerbanden kommt je eine Bande für das Dimer hinzu (Syb-Dimer [36 kDa], Syp-Dimer [76 kDa]) sowie je eine weitere Bande für den Syb-Syp-Komplex. Diese letzte Bande fehlt den Proben, denen für eine halbe Stunde Ca^{2+} zugesetzt wurde. Ca^{2+} initiiert eine Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes.

5.1.4 Syb-Syp-Komplex beeinflussender zytosolischer Faktor

Bei der subzellulären Fraktionierung erfolgt die Aufarbeitung synaptischer Vesikel von der LS0-Fraktion, lysierte Synaptosomen, über die LS1-Fraktion, synaptische Vesikel mit synaptosomalem Zytosol, hin zum LS2, synaptosomales Zytosol. Bei den im vorherigen Abschnitt gezeigten Ergebnissen der Ca^{2+} -induzierten Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes war stets synaptosomales Zytosol

anwesend. Ca^{2+} wurde der LS1-Fraktion zugegeben und die spätere Resuspendierung der isolierten synaptischen Vesikel (LP2) erfolgte mit dem entsprechenden synaptosomalen Zytosol (LS2). Die Notwendigkeit der Anwesenheit synaptosomalen Zytosols wird auch durch Studien an isolierten synaptischen Vesikeln (LP2) belegt, in denen der Syb-Syp-Komplex weder nach alleiniger Ca^{2+} -Zugabe, noch durch zusätzliche Behandlung in Kombination mit Mg^{2+} und/oder EGTA einen Ca^{2+} -abhängigen Effekt zeigt. Somit ist die Wirkung von Ca^{2+} auf die Interaktion von Synaptobrevin mit Synaptophysin indirekt (Reisinger *et al.*, 2004). Weiter konnte gezeigt werden, dass Synaptophysin posttranslational modifiziert wird bevor es Synaptobrevin binden kann (Becher *et al.*, 1999b). In der gleichen Arbeit wurde postuliert, dass ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, wie es während der Neuroexozytose der Fall ist, möglicherweise zu einer Aktivierung eines putativen zytosolischen Faktors führt. Die Aktivierung des Faktors hat die Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes zur Folge. So stünde der Ca^{2+} -abhängige zytosolische Faktor in einem dynamischen Gleichgewicht mit der putativen posttranslationalen Modifizierung Synaptophysins (Becher *et al.*, 1999b).

Um diese postulierte Notwendigkeit der Anwesenheit synaptosomalen Zytosols für die Ca^{2+} -induzierte Syb-Syp-Komplexdissoziation zu überprüfen, wurden synaptische Vesikel, dem Standardprotokoll entsprechend, ohne Ca^{2+} -Behandlung isoliert. Das Pellet (LP2) wurde in vier Proben aufgeteilt, zwei Proben wurden mit je zwei Milliliter Natriumpuffer resuspendiert, die anderen beiden mit je zwei Milliliter des eigenen Überstandes (LS2). Während sowohl eine Probe des mit Natriumpuffer und des mit eigenem LS2 resuspendierten Ansatzes als Kontrolle unbehandelt blieben, wurden die anderen Ansätze mit je $100 \mu\text{M}$ Ca^{2+} [frei] versetzt. Nach erfolgter halbstündiger Inkubation bei 37°C erfolgte die erneute Zentrifugation der Ansätze bei $350\,000 \times g$ um isolierte synaptische Vesikel (LP2) zu gewinnen. Die Pellets wurden mit je $200 \mu\text{l}$ eigenem synaptosomalen Zytosols (LS2) bzw. Natriumpuffer resuspendiert, anschließend wurde mit Triton X-100 extrahiert und mit Antikörper gegen Synaptophysin bzw. Synaptobrevin immunpräzipitiert. Gleiche Mengen Protein wurden auf ein zwölfprozentiges SDS-Gel geladen. Der Gelelektrophorese folgte die Western Blot Analyse.

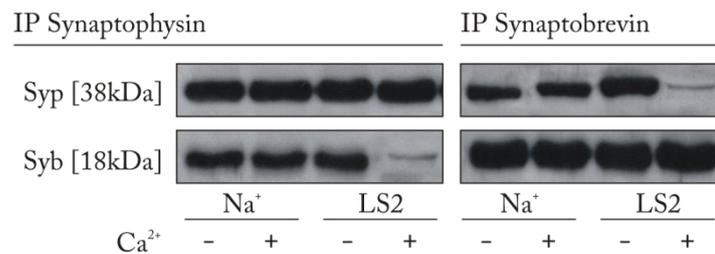


Abb. 21 **Ca²⁺- und Zytosolabhängige Syb-Syp-Komplexdissoziation**

Synaptische Vesikel (LP2) wurden in 2 ml Natriumpuffer oder 2 ml ihres eigenen Überstands (LS2) resuspendiert. Die Ansätze wurden unbelassen oder mit Ca²⁺ [100 µM; frei] behandelt für 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Anschließend stellte man durch Zentrifugation erneut LP2 her und resuspendierte die Pellets jeweils in ihren eigenen Überständen. Nach Triton-Extraktion (1 %) mit einer Proteinkonzentration von 1mg/mL präzipitierte man mit Antikörpern gegen Syp und Syb.

Sowohl die Immunpräzipitation mit gegen Synaptophysin gerichteten Antikörper als auch die mit Antikörper gegen Synaptobrevin zeigen nach Resuspendierung mit dem jeweils eigenen Überstand (LS2) und Ca²⁺-Behandlung eine verminderte Interaktion zwischen Synaptobrevin und Synaptophysin. Bei den mit Natriumpuffer versetzten und Ca²⁺-behandelten Ansätzen ist hingegen keine Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes zu beobachten. Ihre Signalstärke entspricht denen der Kontrollproben. Dieser Versuch belegt die Abhängigkeit der Syb-Syp-Komplexdissoziation von der Anwesenheit synaptosomalen Zytosols.

In anschließenden Versuchen sollte eine nähere Charakterisierung des zytosolischen Faktors erfolgen. Dazu wurde untersucht, inwieweit sich ein Einfrieren des LS2 auf die Funktionalität des Faktors auswirkt. Gleiches gilt für eine Hitzebehandlung.

LS2 aus vorherigen Experimenten, tiefgekühlt bei -80 °C, wurde langsam bei RT aufgetaut. Frisch präpariertes LP2 wurde von dem dazugehörigen frischen LS2 getrennt. In zwei Ansätzen wurde zum einen LP2 mit zwei Millilitern des ehemals gefrorenen LS2, zum anderen mit frischen LS2 resuspendiert. Dann wurde jeder Ansatz nochmals in je zwei Ansätze aufgeteilt und je einer Hälfte 100 µM Ca²⁺ [frei] hinzugefügt. Die anderen Hälften blieben unbehandelt. Nach erfolgter Inkubation aller Ansätze (30 Min., 37 °C) wurde erneut LP2 durch Zentrifugation bei 350 000 x g hergestellt. Im Anschluss an die Proteinextraktion wurde mit Antikörper gegen Synaptobrevin bzw. Synaptophysin immunpräzipitiert. Die Auswertung erfolgte mittels SDS-Page und Western Blot.

5. Ergebnisse

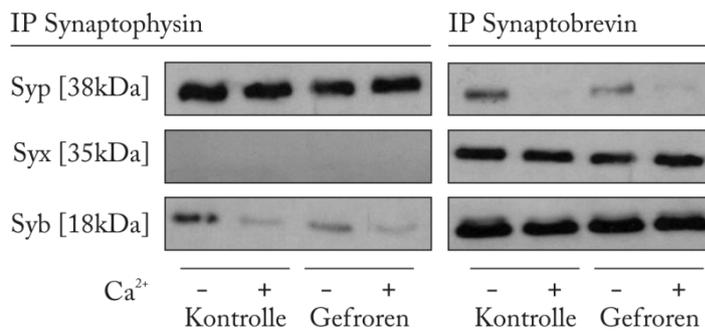


Abb. 22 Erhalt der Funktionalität des zytosolischen Faktors nach Einfrieren

Frisch isolierte, synaptische Vesikel (LP2) wurden mit 2 ml zuvor bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefrorenem (Gefroren) oder mit frischem (Kontrolle) LS2 resuspendiert. Die Ansätze wurden unbehandelt (Kontrolle⁻, Gefroren⁻) oder mit $100\text{ }\mu\text{M}$, freiem Ca^{2+} (Kontrolle⁺, Gefroren⁺) versetzt für 20 Min. bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurde durch Zentrifugation (350000 x g ; 30 Min.) erneut LP2 hergestellt. Die erhaltenen LP2-Fractionen wurden in $200\text{ }\mu\text{l}$ des jeweils eigenen Überstandes (LS2) resuspendiert. Der Tritonextraktion (1 %) folgten Immunpräzipitationen mit gegen Syb bzw. Syp gerichtetem Antikörpern, Gelelektrophorese und Western Blot.

Ein Vergleich der Kontrollen mit Proben, die mit ehemals gefrorenem LS2 behandelt wurden zeigt, dass die Funktionalität des zytosolischen Faktors auch nach Einfrieren und wieder Auftauen erhalten bleibt. Allerdings nimmt die Signalstärke ab. Der verminderten Signalstärke liegt dabei jedoch kein Verlust der Funktionalität des „Faktors“ zugrunde. Vielmehr nehmen die Proteinsignale aller eingefrorenen Proben im Vergleich zu ihren Kontrollproben ab (vgl. Abb. 22, IP Syb, Syx).

In einem weiteren Experiment wurden synaptische Vesikel mit LS2 behandelt, welches vorher für zehn Minuten bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ wärmebehandelt wurde. Einem Teil der Probe wurde dann Ca^{2+} in einer freien Konzentration von $100\text{ }\mu\text{M}$ zugesetzt. Der andere Teil blieb unbehandelt. Die Proben wurden für 20 Minuten bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurde mittels Ultrazentrifugation erneut LP2 hergestellt und in $200\text{ }\mu\text{l}$ eigenem LS2 resuspendiert, dann mit Triton X-100 extrahiert und mit Antikörper gegen Synaptobrevin immunpräzipitiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Gelelektrophorese und „Western Blotting“.

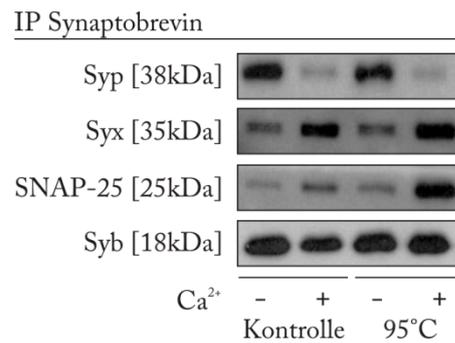


Abb. 23 Hitzebeständigkeit des zytosolischen Faktors

Frisch isolierte, synaptische Vesikel (LP2) wurden in 2 ml ihres eigenen Überstandes (LS2) resuspendiert. Der halbe Ansatz wurde bei 95 °C für 10 Min. inkubiert (95 °C), die andere Hälfte wurde auf Eis stehen gelassen (Kontrolle). Beide Ansätze wurden erneut zweigeteilt und je einer Hälfte Ca²⁺ [100 µM; frei] zugesetzt. Darauf folgte die Inkubation aller Proben (37 °C; 30 Min.) und die Proteinextraktion mit Triton X-100 (1 %). Die Immunpräzipitation erfolgte mit gegen Syb gerichtetem Antikörper. Anschließend folgten SDS-Gelelektrophorese und Western Blot.

Wie Abbildung 23 zeigt, beeinflusst die Wärmebehandlung die Funktionalität des zytosolischen Faktors nicht. Kontrolle und wärmebehandelte Proben entsprechen sich betreffend der Signale für Synaptophysin, Syntaxin und Synaptobrevin.

Weiterführend erfolgte die Analyse der zytosolische Komponente indem LS2 mittels Zentrifugation durch eine in ein Röhrchen eingelassene Membran („Centricon“) laufen gelassen wurde, die für Proteine mit einer molekularen Masse größer als 30 kDa nicht permeabel ist. Somit ergaben sich aus der LS2-Fraktion nach Zentrifugation zwei Fraktionen: LS2 (<30 kDa) und LS2 (>30 kDa). Die LS2-Fraktionen wurden je in zwei gleiche Teile geteilt und je ein Teil wurde mit Ca²⁺ [1 µM; frei] versetzt. Vor Resuspendierung mit je eigenem LS2, wurde die LP2-Fraktion in vier gleiche Teile aufgeteilt. Zwei Teile wurden anschließend ebenfalls mit einem Mikromol Ca²⁺ [frei] versetzt. Der Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten folgte die Immunpräzipitation mit Antikörper gegen Synaptobrevin bzw. Synaptophysin. Dann wurden die Proben mittels SDS-Gelelektrophorese und „Western Blotting“ analysiert.

5. Ergebnisse

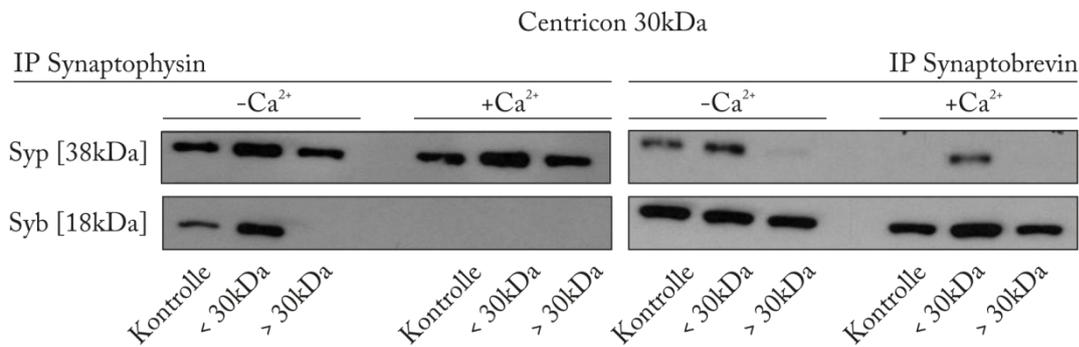


Abb. 24 Syb-Syp-Komplexdissoziation nach Behandlung mit LS2 >30kDa

LS2 wurde 15 Min. in einem Centricon-Röhrchen zentrifugiert, das für Proteine >30 kDa nicht permeabel war. Je ein Teil der erhaltenen Fraktionen (>30 kDa/<30 kDa) wurde mit $1 \mu\text{M}$ Ca^{2+} [frei] versetzt. Dann resuspendierte man mit diesen vier LS2-Fraktionen (<30 kDa +/- Ca^{2+} und >30 kDa +/- Ca^{2+}) je ein Ansatz LP2 und inkubierte 30 Min. bei 37°C . Danach wurde LP2 durch erneute Zentrifugation hergestellt und die Pellets in $200 \mu\text{l}$ des eigenen Überstands resuspendiert. Es folgte die Extraktion der Membranproteine (1 mg/ml) mit 1 %iger Tritonlösung, Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Syp und Syb, SDS-Gelelektrophorese und anschließend „Western Blotting“. Alle mit LS2 (>30 kDa) behandelten Proben zeigen eine Syb-Syp-Komplexdissoziation, unabhängig von der Ca^{2+} -Zugabe.

Für die Kontrollen der Immunpräzipitation mit Antikörper gegen Synaptobrevin bzw. Synaptophysin ist jeweils nach Ca^{2+} -Behandlung die Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes zu sehen. Die mit LS2 (<30 kDa) behandelten Proben ohne Ca^{2+} -Zusatz zeigen jeweils ein verstärktes Signal für den Syb-Syp-Komplex. Im Gegensatz dazu zeigen Proben, die mit LS2 (>30 kDa) behandelt wurden, eine Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes bereits ohne die Zugabe von Ca^{2+} . Interessanterweise ist bei der Immunpräzipitation mit Antikörper gegen Synaptobrevin in der Ca^{2+} -behandelten Probe, die in LS2 (<30 kDa) resuspendiert wurde, lediglich eine schwache Verminderung des Synaptophysin-Signals zu erkennen, während die in LS2 (>30 kDa) resuspendierte Probe mit Ca^{2+} -Zusatz eine vollständige Dissoziation zeigt. Es bleibt festzuhalten, dass in allen >30 kDa-Proben, egal ob Ca^{2+} zugesetzt wurde oder nicht, der Syb-Syp-Komplex nicht mehr nachzuweisen ist. Der mutmaßliche, Ca^{2+} -sensitive, den Syb-Syp-Komplex dissoziierende, zytosolische Faktor ($F_{(D)}$) muss demnach ein Molekulargewicht von weniger als 30 kDa haben.

Der gleiche Versuchsansatz, der der Abbildung 24 zu Grunde liegt, wurde erneut gewählt mit dem Unterschied, dass dieses Mal eine Membran verwendet wurde, die für Proteine >10 kDa nicht permeabel ist.

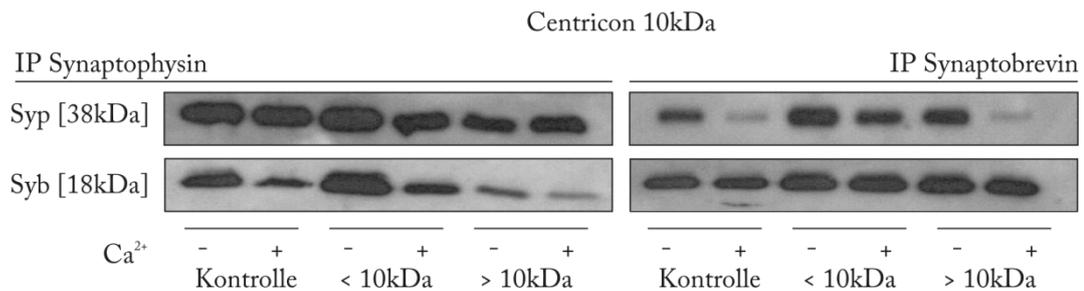


Abb. 25 Syb-Syp-Komplexdissoziation nach Behandlung mit LS2 >10kDa

LS2 wurde 15 Min. in einem Centricon-Röhrchen zentrifugiert, das für Proteine >10 kDa nicht permeabel war. Je ein Teil der erhaltenen Fraktionen (>10 kDa/<10 kDa) wurde mit $1 \mu\text{M}$ Ca^{2+} [frei] versetzt. Dann resuspendierte man mit diesen vier LS2 (<10 kDa +/- Ca^{2+} und >10 kDa +/- Ca^{2+}) je ein Ansatz LP2 und inkubierte 30 Min. bei 37°C . Danach wurde LP2 durch erneute Zentrifugation hergestellt und die Pellets in $200 \mu\text{l}$ des eigenen Überstands resuspendiert. Es folgte die Extraktion der Membranproteine (1 mg/ml) mit 1 %iger Tritonlösung, Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Syp und Syb, SDS-Gelelektrophorese und anschließend „Western Blotting“.

Abbildung 25 zeigt für die Kontrollen beider Immunpräzipitationen die Ca^{2+} -induzierte Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes. Diese Komplexdissoziation ist in mit LS2 (<10 kDa) resuspendierten Proben weniger ausgeprägt im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. Zusätzlich fällt auf, dass die nicht mit Ca^{2+} -behandelte Probe, die mit LS2 (<10 kDa) resuspendiert wurde, ein stärkeres Signal für die Syb-Syp-Interaktion zeigt. Die Proben, die mit LS2 (>10 kDa) resuspendiert wurden, zeigen hingegen im Vergleich zur Kontrolle eine stärkere Verminderung der Interaktion zwischen Synaptobrevin und Synaptophysin (vgl. Abb. 25, links).

Mit Hilfe der „Centricon-Versuche“ konnte gezeigt werden, dass synaptosomales Zytosol den Syb-Syp-Komplex beeinflusst. Ein möglicher, Ca^{2+} -sensitiver, zytosolischer Faktor ($F_{(D)}$) müsste demnach ein Molekulargewicht von mehr als 10 kDa und weniger als 30 kDa aufweisen. In der Literatur ist beschrieben, dass Calmodulin mit Synaptobrevin interagiert (Quetglas *et al.*, 2002). Calmodulin mit einem Molekulargewicht von 17 kDa könnte also entscheidend für die Ca^{2+} -abhängige Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes sein. Für den Ca^{2+} -unabhängigen Effekt der in LS2 >30 kDa resuspendierten Proben könnte ein weiteres Protein verantwortlich sein. Dies müsste in weiterführenden Untersuchungen gezeigt werden. Denkbar wäre dabei eine MALDI-Analyse der verschiedenen zytosolischen Komponenten.

5.2 SPAN-induzierte Modulation der Syb-Syp-Interaktion

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass SPANs („Snake Presynaptic PLA2 Neurotoxins“) eine Änderung der Kinetik der Exozytose induzieren. Ebenso kommt es zu einer Veränderung der Morphologie der präsynaptischen Plasmamembran. Dies lässt vermuten, dass SPANs die Fusion von synaptischen Vesikeln mit der präsynaptischen Plasmamembran vermitteln und gleichzeitig ihre Regeneration inhibieren (Montecucco & Rossetto, 2000). Es ist bekannt, dass Taipoxin die Freisetzung von Neurotransmittern blockiert, was auf einen Abbau gespeicherter synaptischer Vesikel zurückzuführen ist (Su & Chang, 1984).

Im Folgenden sollte die Wirkung zweier SPAN-Mitglieder - Taipoxin und Paradoxin - auf die verschiedenen subzellulären Kompartimente (P2, LS1, LP2) untersucht werden. Ebenso sollte in einem zweiten Ansatz die möglichen Veränderungen in der Aufnahme von Neurotransmittern über die Neurotransmitter-Transporter (VMAT, VGLUT) nach vorangegangener SPAN-Behandlung analysiert werden.

5.2.1 SPAN-Wirkung an Synaptosomen

Für die Untersuchung der SPAN-Wirkung wurde zunächst aus dem Rattengehirn isolierte Synaptosomen (P2; vgl. 4.1.1) präpariert. Anschließend wurde dem in KR-Hepes Puffer resuspendierten Pellet entweder Taipoxin oder Paradoxin in einer definierten Konzentration von 50 nM sowie EGTA (2 mM) zugesetzt und die Probe für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Es folgten Triton X-100-Extraktion und Immunpräzipitation mit gegen Synaptobrevin gerichtetem Antikörper. Nach Laemmli-Zugabe wurde der Ansatz auf ein SDS-Gel geladen und nach dessen Lauf die Proteine auf Nitrocellulose transferiert. Untersucht wurden Synaptobrevin, Synaptophysin, Syntaxin, SNAP-25 sowie als Negativkontrolle Synaptotagmin.

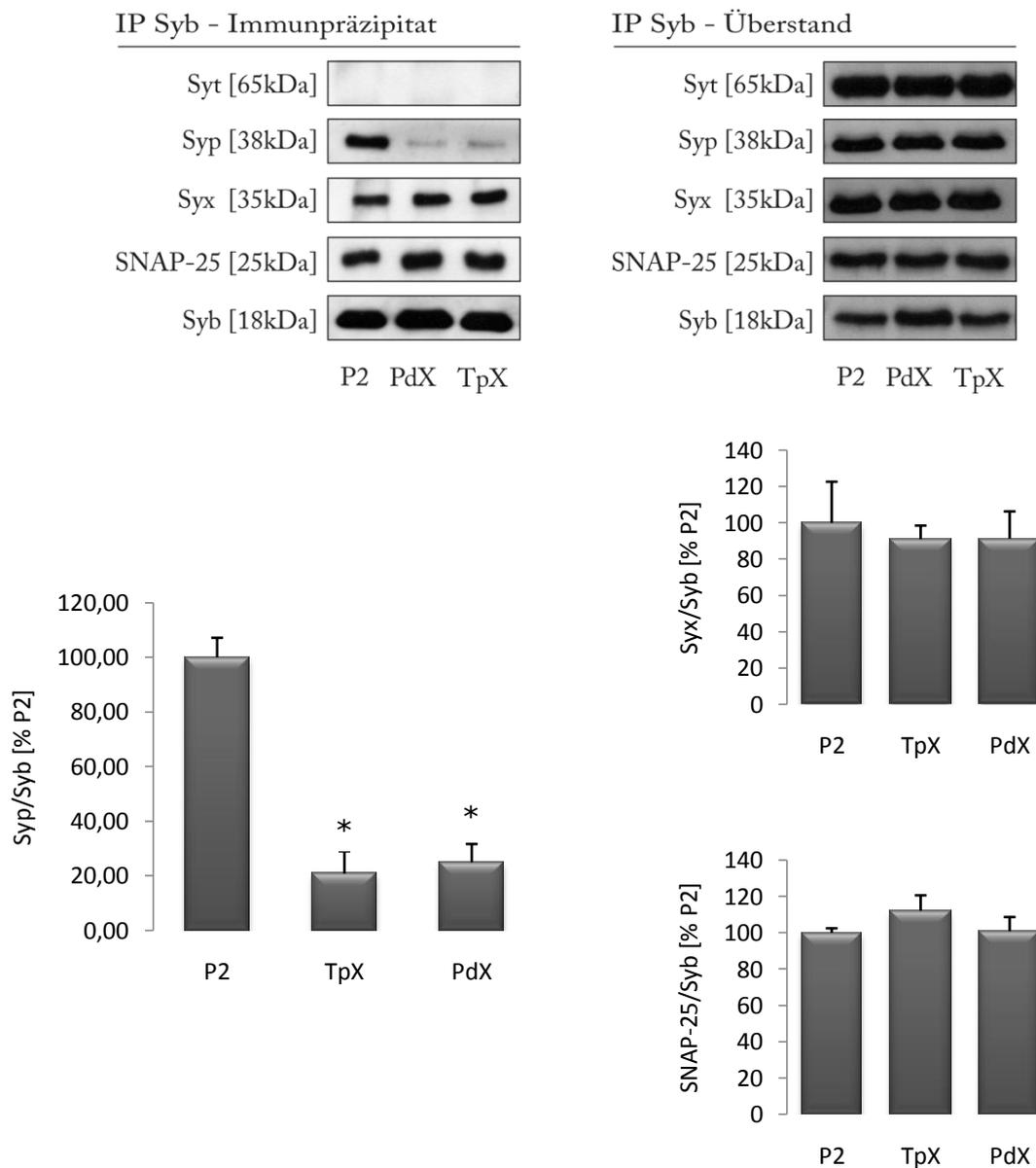


Abb. 26 SPAN-Wirkung an Synaptosomen (P2)

Oben: Nach Resuspendierung mit einer kleinen Menge KR-Hepes Puffer in Gegenwart von 2 mM EGTA wurden die Synaptosomen (P2) unbehandelt (Kontrolle), mit 50nM Taipoxin (TpX) bzw. Paradoxin (PdX) behandelt, 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Nach der Triton X-100-Extraktion erfolgte die Immunpräzipitation mit Antikörper gegen Syp. Anschließend folgte SDS-Gelelektrophorese und Western Blot. Der Western Blot zeigt die durch SPANs induzierte verminderte Interaktion zwischen Syb und Syp. Auf Syx und SNAP-25 haben die Toxine hingegen keinen erkennbaren Einfluss. Die aufgetragenen Überstände (rechts) zeigen keine Schwankungen der Signale. **Unten:** Die Quantifizierung (n=3) zeigt, dass die Wirkung von Taipoxin und Paradoxin signifikant ist (p-Wert<0,05). Syx und SNAP-25 werden durch die Toxine nicht reguliert. Gegenüber der Kontrolle weicht die Proteinmenge nicht signifikant ab.

Abbildung 26 (oben, links) zeigt, dass die untersuchten SNARE-Proteine (Syx, SNAP-25, Syb) nicht durch die verwendeten SPANs beeinflusst werden. Im Gegensatz dazu sind die Western Blot-Signale für Synaptophysin nach SPAN-Behandlung schwächer im Vergleich zur Kontrolle (P2 unbehandelt). SPANs beeinträchtigen demnach die Interaktion zwischen Synaptobrevin und Synaptophysin. In den zugehörigen Überständen sind keine Schwankungen in den Proteinmengen erkennbar. Die Negativkontrolle zeigt kein Signal in dem Synaptobrevin-Präzipitat, dafür aber in dem zugehörigen Überstand (Abb. 26, rechts).

Für die Quantifizierung wurde das Verhältnis von Synaptophysin zu Synaptobrevin gebildet. Der sich daraus ergebende Wert der Kontrolle wurde als 100 Prozent festgelegt (% P2; vgl. Abb. 26) und die SPAN-behandelten Proben darauf bezogen. Wie die Quantifizierung dieser toxinspezifischen Wirkung zeigt, handelt es sich um einen signifikanten Effekt beider Toxine auf die Verminderung der Interaktion zwischen Synaptobrevin und Synaptophysin.

Aufgrund der Phospholipase A2-Aktivität beider Toxine wurde in einem weiteren Schritt eine mögliche Ca^{2+} -Abhängigkeit dieser Toxinwirkung untersucht. Dazu wurden Synaptosomen (P2) des Rattengehirns entweder unbehandelt, mit Ca^{2+} [100 μM ; frei] oder mit Taipoxin bzw. Paradoxin (je 50 nM) oder mit jeweils einem der beiden Toxine unter Ca^{2+} -Zusatz [100 μM ; frei] behandelt. Dann folgte die Inkubation der Proben für 30 Minuten bei 37 °C. Die Membranproteine wurden mit Triton X-100 extrahiert und die Immunpräzipitation mit gegen Synaptobrevin gerichtetem Antikörper durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließendem „Western Blotting“. Entwickelt wurde mit Antikörpern gegen Synaptotagmin, Synaptophysin, Syntaxin, SNAP-25 und Synaptobrevin. Synaptotagmin diente dabei wie auch im vorherigen Abschnitt als Negativkontrolle.

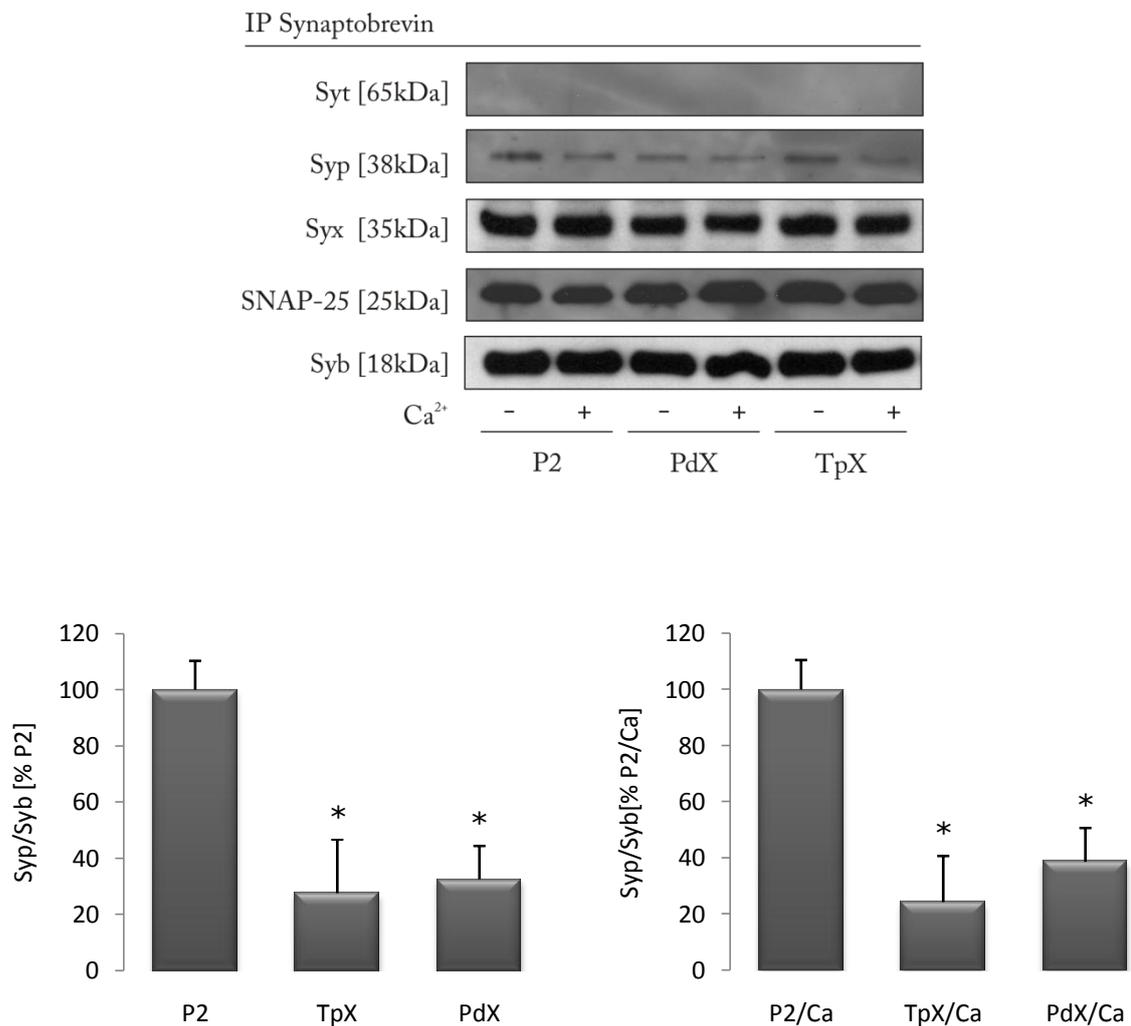


Abb. 27 SPAN-bedingte Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes

Synaptosomales Pellet (P2) wurde mit einer kleinen Menge KR-Hepes Puffer resuspendiert und nach Zugabe von EGTA (2 mM) in sechs Ansätze aufgeteilt. Zwei Ansätze blieben zunächst unbehandelt, je zwei weitere Ansätze wurden mit Taipoxin bzw. Paradoxin (50 nM) versetzt. Anschließend wurde je ein Ansatz der unbehandelten und mit SPAN-behandelten Proben mit Ca^{2+} [100 μM ; frei] versetzt. Alle Proben wurden bei 37 °C für 30 Min. inkubiert, dann folgte die Extraktion mit Triton X-100. Immunpräzipitiert wurde mit gegen Syb gerichtetem Antikörper. Der anschließenden SDS-Gelelektrophorese folgte die Western Blot-Analyse.

Oben: Während keine Veränderung der Signalstärke der SNARE-Proteine zu erkennen ist, wird der Syb-Syp-Komplex toxinbedingt dissoziiert. **Unten:** Die Quantifizierung (n=3) zeigt, dass die SPAN-induzierte Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes signifikant ist. Die Verhältnisse der ohne Ca^{2+} behandelten Proben (P2, TpX, PdX) bleiben auch nach Ca^{2+} -Behandlung (P2/Ca, TpX/Ca, PdX/Ca) unverändert.

Während der Western Blot für Syntaxin und SNAP-25 keine Änderung in den Signalstärken - weder nach Ca^{2+} -Behandlung noch nach SPAN-Behandlung oder nach Kombination von Toxin und Ca^{2+} - zeigt, verstärkt sich die toxinspezifische Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes nach zusätzlicher Ca^{2+} -Zugabe (vgl. Abb. 27, oben). Die Quantifizierung (Abb. 27, unten) unterstreicht dieses Ergebnis. Generell scheint, wenn auch nicht signifikant sondern tendenziell, Taipoxin im Vergleich zu Paradoxin die Syb-Syp-Interaktion stärker zu beeinträchtigen. Die Verhältnisse der ohne Ca^{2+} behandelten Proben (P2, TpX, PdX) bleiben auch nach Ca^{2+} -Behandlung (P2/Ca, TpX/Ca, PdX/Ca) unverändert. Die Toxineffekte sind dabei jeweils gegenüber der unbehandelten Probe (P2 bzw. P2/Ca) signifikant.

5.2.2 SPAN-Wirkung an isolierten synaptischen Vesikeln

Nach Untersuchung an Synaptosomen wurde das gleiche Verfahren (vgl. 5.2.1) für die Analyse einer möglichen SPAN-Wirkung auf die Interaktion von Synaptobrevin und Synaptophysin an isolierten synaptischen Vesikeln (LP2-Fraktion), nach Abtrennung des Zytosols (LS2) der lysierten Zellen, angewendet. Die Aufreinigung synaptischer Vesikel erfolgte gemäß der Beschreibung in 4.1.2. LP2 wurde in einem kleinen Volumen KR-Hepes-Puffer resuspendiert und nach Paradoxin bzw. Taipoxin-Zugabe (50 mM) für 30 Minuten bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Nach der Proteinextraktion mit Triton X-100 wurde mit gegen Synaptobrevin gerichtetem Antikörper immunpräzipitiert. Die weitere Analyse erfolgte mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese und „Western Blotting“.

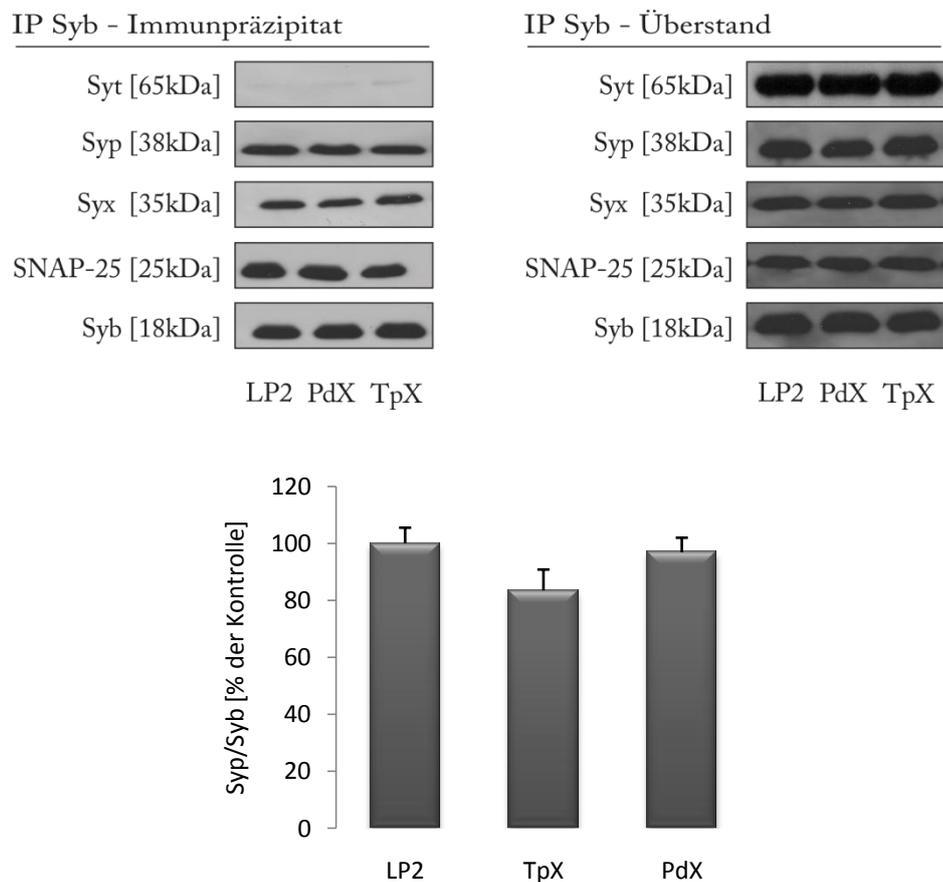


Abb. 28 SPAN-Wirkung auf isolierte synaptische Vesikel (LP2)

Nach Resuspendierung mit KR-Hepes Puffer wurden synaptische Vesikel (LP2) neben einer unbehandelten Kontrolle, mit 50 nM Taipoxin bzw. Paradoxin versetzt und 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Es folgten Triton X-100-Extraktion, Immunpräzipitation mit gegen Syb gerichtetem Antikörper, SDS-Gelelektrophorese und Western Blot. Der Western Blot zeigt weder eine Änderung der Signalstärken der SNARE-Proteine noch der für Syp. Die Überstände (rechts) zeigen die Gleichmäßigkeit der Präzipitation. Eine Quantifizierung der Ergebnisse (n=3) verdeutlicht diesen Befund: Taipoxin und Paradoxin haben keinen signifikanten Einfluss.

Der Western Blot (Abb. 28, oben links) zeigt keine Signale für Synaptotagmin, der Negativkontrolle. In der Kontrolle (unbehandelte LP2-Fraktion) ist die Interaktion Synaptobrevins mit den anderen SNARE-Proteinen (Syx, SNAP-25) sowie mit Synaptophysin zu sehen. Die SPAN-Behandlung führt zu keiner signifikanten Verminderung dieser Interaktionen. Dies gilt sowohl für die SNARE-Proteine, als auch für Synaptophysin. Die in Abbildung 28 (oben rechts) dargestellten, zugehörigen Überstände zeigen keine Schwankungen der Proteinmengen. Die Quantifizierung, angegeben als Verhältnis von Synaptophysin zu Synaptobrevin bezogen auf die jeweilige Kontrolle, zeigt, dass Taipoxin einen tendenziellen, jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die

5. Ergebnisse

Interaktion zwischen Synaptobrevin und Synaptophysin hat. Die mit Paradoxin behandelten Proben zeigen keine Veränderung gegenüber der Kontrolle.

In einer Konzentrationsreihe mit Toxinkonzentrationen von 0,8; 4; 20; 50 und 100 μM Taipoxin bzw. Paradoxin, aufgetragen als Verhältnis von Synaptophysin zu Synaptobrevin, bezogen auf die jeweilige Kontrolle, (vgl. Abb. 29) ist zu sehen, dass sowohl Taipoxin als auch Paradoxin die Interaktion von Synaptobrevin mit Synaptophysin an synaptischen Vesikeln nicht vermindern. Erst bei hohen SPAN-Konzentrationen (100 nM) zeigt sich eine Verminderung der Interaktion zwischen Synaptobrevin und Synaptophysin. SPAN-Konzentrationen die unterhalb 100 nM liegen, bewegen sich im Bereich der Kontrolle. Eine signifikante Abnahme der Syb-Syp-Interaktion ist lediglich bei Taipoxin ab einer Konzentration von 100 nM auszumachen.

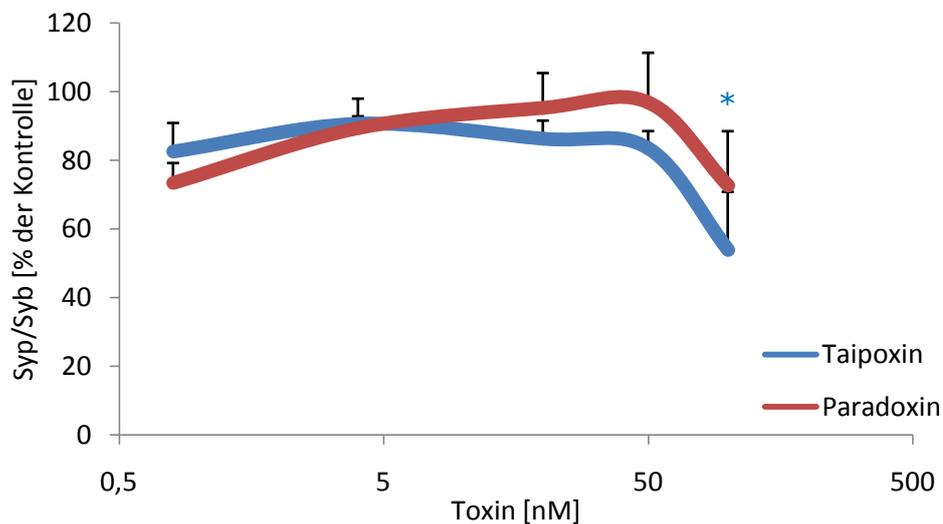


Abb. 29 Toxineffekt auf isolierte synaptische Vesikel (LP2)

Nach Resuspendierung in KR-Hepes Puffer wurden synaptische Vesikel (LP2) mit unterschiedlichen SPAN-Konzentrationen (0,8-100 nM) versetzt und 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Die Extraktion erfolgte mit Triton X-100, die Immunpräzipitation mit gegen Syb gerichtetem Antikörper. Eine Analyse der Proben erfolgte im Western Blot mit Antikörpern gegen Syp und Syb. Die graphische Darstellung (n=3) erfolgte als Verhältnis von Syp zu Syb bezogen auf die Kontrolle. Der Graph zeigt, dass Taipoxin und Paradoxin in Konzentrationen <100 nM keinen signifikanten Einfluss auf die Syb-Syp-Interaktion haben. Die Verminderung der Syb-Syp-Interaktion bei 100 nM Taipoxin ist signifikant.

Im Weiteren wurde untersucht, ob die Behandlung mit Taipoxin bzw. Paradoxin in Kombination mit Ca^{2+} Einfluss auf die Interaktion zwischen Synaptobrevin und Synaptophysin an isolierten synaptischen Vesikeln (LP2) hat. Hierzu erfolgte eine Behandlung analog zu dem vorherigen Abschnitt. Neben einer unbehandelten Probe synaptischer Vesikel wurden weitere Proben mit 50 nM Taipoxin oder Paradoxin, Ca^{2+} [100 μM ; frei] oder aber mit Taipoxin bzw. Paradoxin in Kombination mit Ca^{2+} behandelt.

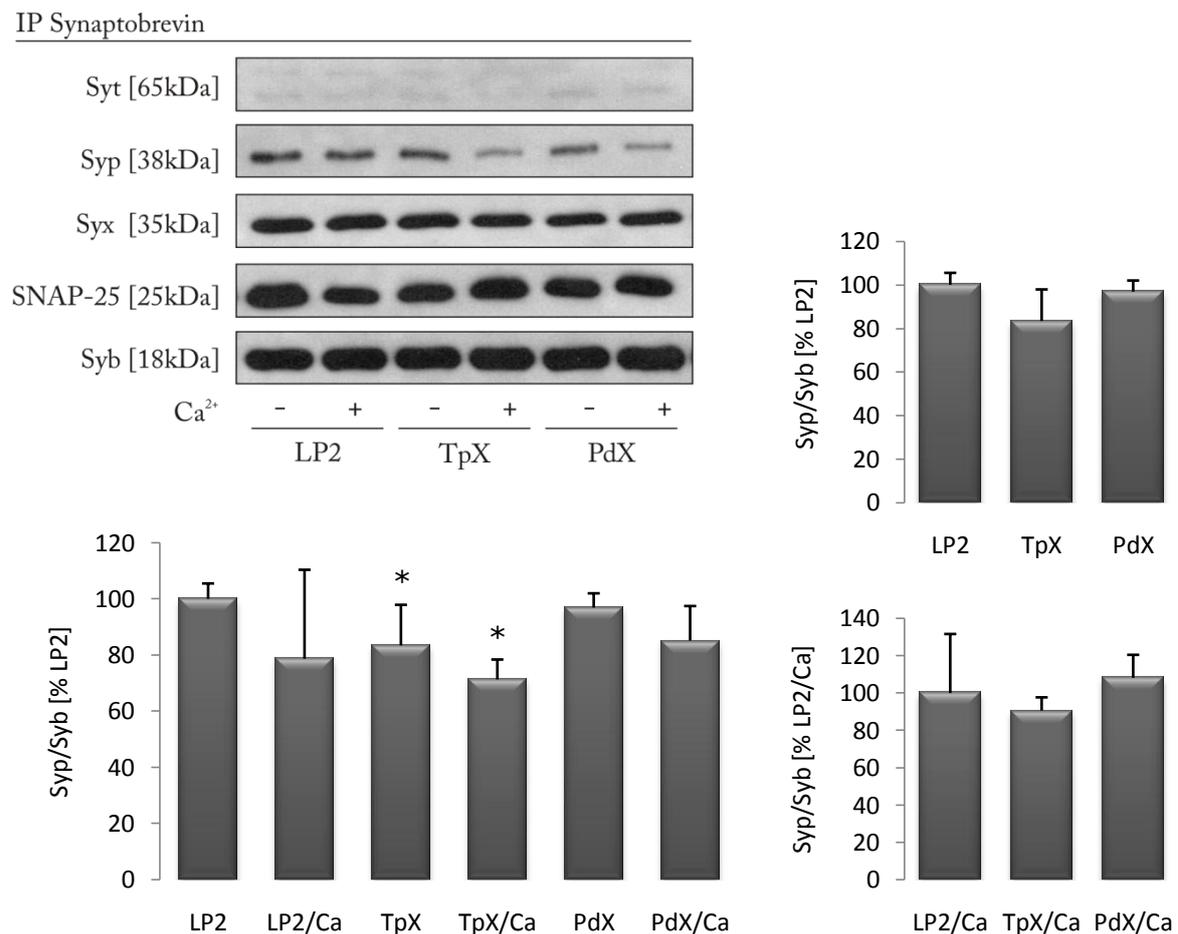


Abb. 30 Syb-Syb-Komplex nach SPAN-Behandlung an synaptischen Vesikeln (LP2)

Isolierte synaptische Vesikel (LP2) wurden mit KR-Hepes Puffer resuspendiert und nach Zugabe von EGTA (2 mM) in sechs Proben aufgeteilt. Zwei Ansätze blieben zunächst unbehandelt, je zwei weitere Ansätze wurden mit Taipoxin bzw. Paradoxin (50 nM) versetzt. Anschließend wurde je ein Ansatz der unbehandelten und der mit SPAN-behandelten Proben mit Ca^{2+} [100 μM ; frei] versetzt. Alle Proben wurden bei 37 °C für 30 Min. inkubiert, dann folgte die Extraktion mit Triton X-100. Immunpräzipitiert wurde mit gegen Syb gerichtetem Antikörper. Der anschließenden SDS-Gelelektrophorese folgte die Western Blot-Analyse. Im Western Blot (oben) ist zu erkennen, dass allein die mit Taipoxin sowie die mit Taipoxin in Kombination mit Ca^{2+} -behandelten Proben eine signifikante Abnahme der Syb-Syp-Interaktion zeigen. Dies wird auch durch die Quantifizierung mehrerer Versuche (n=3) veranschaulicht. Die Verhältnisse der ohne Ca^{2+} behandelten Proben (P2, TpX, PdX) bleiben auch nach Ca^{2+} -Behandlung (P2/Ca, TpX/Ca, PdX/Ca) unverändert.

Betrachtet man die mit Toxin- und Ca^{2+} -behandelten Proben im Western Blot, so ist eine Abnahme des Synaptophysin-Signals erkennbar. Daneben verändern sich die Signale anderer Proteine nicht. Die Quantifizierung dieser Versuchsreihe zeigt, dass lediglich Taipoxin (50 nM) sowie Taipoxin in Kombination mit Ca^{2+} eine signifikante Verminderung der Interaktion zwischen Synaptobrevin und Synaptophysin hat (vgl. Abb. 30, unten). Es bleibt aber festzuhalten, dass diese SPAN-Wirkung im Gegensatz zu jener an Synaptosomen geringer ist. Die Verhältnisse der unbehandelten, bzw. mit Ca^{2+} -behandelten Proben untereinander bleiben gleich, wie in Abbildung 30 (rechts) zu sehen ist.

5.2.3 Analyse der LS1-Fraktion nach SPAN-Behandlung

Sowohl Taipoxin als auch Paradoxin konnte ein die Syb-Syp-Interaktion vermindender Einfluss an Synaptosomen nachgewiesen werden. Dies gelang allerdings nur bedingt an isolierten synaptischen Vesikeln. In einem weiteren Schritt wurde der LS1-Fraktion - synaptische Vesikel (LP2) mit synaptosomalen Zytosol - jeweils Taipoxin bzw. Paradoxin alleine oder aber in Kombination mit Ca^{2+} zugesetzt. Vorherige Versuche zeigen, dass die Ca^{2+} -abhängige Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes in Anwesenheit synaptosomalen Zytosols deutlicher ausfiel (vgl. 5.1.4) und unterstützen diesen Versuchsansatz.

Es wurde die Konzentrationsabhängigkeit mit Taipoxin- bzw. Paradoxin-konzentrationen von je 0,8 bis 50 nM untersucht. Das jeweilige SPAN wurde der LS1-Fraktion zugesetzt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37 °C und 300 rpm erfolgte die Aufreinigung synaptischer Vesikel nach Standardprotokoll (siehe 4.1.2). Die Extraktion erfolgte mit Triton X-100, immunpräzipitiert wurde mit gegen Synaptobrevin gerichtetem Antikörper. Der SDS-Gelelektrophorese folgte die Western Blot-Analyse.

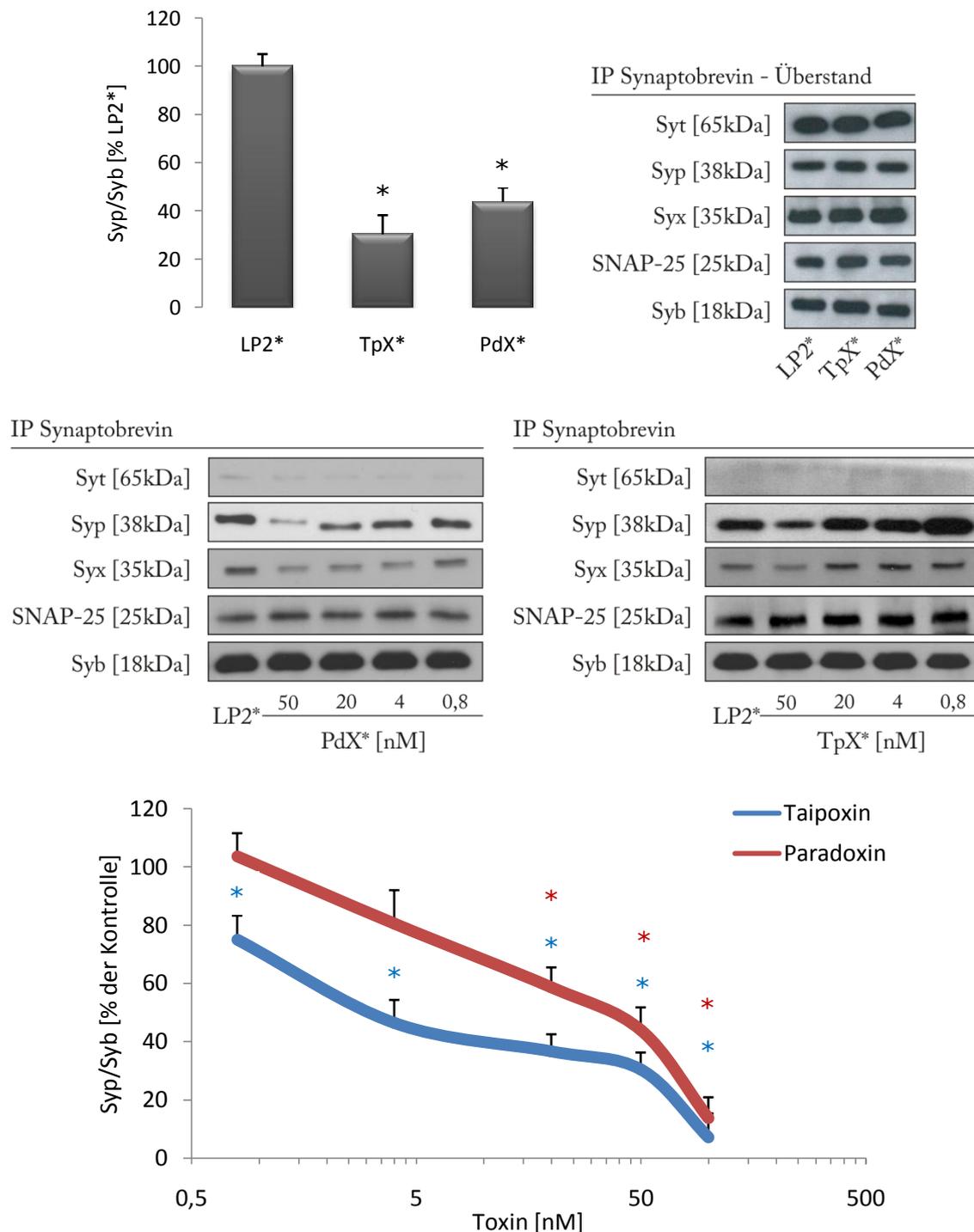


Abb. 31 LS1: SPAN-induzierte Syb-Syp-Komplexdissoziation

Im Zuge der LP2-Präparation wurde die LS1-Fraktion in mehrere Proben aufgeteilt. Neben einer Kontrollprobe (LP2*), welche unbehandelt blieb, wurden die übrigen Proben mit Taipoxin bzw. Paradoxin in Konzentrationen von 0,8 bis 50 nM behandelt. Alle Ansätze wurden bei 37 °C für 30 Min. inkubiert. Anschließend wurde mit der Isolierung synaptischer Vesikel fortgefahren. Die LP2-Pellets wurden in je 200 µl eigenem Überstand resuspendiert. Es folgten Extraktion (Triton X-100), Immunpräzipitation (Syb), SDS-Gelelektrophorese und Western Blot.

Oben: Beide SPANs (je 50 nM) zeigen eine signifikante Beeinträchtigung der Syb-Syp-Interaktion (links). Der Western Blot der Überstände zeigt, dass etwaige Unterschiede nicht methodischen Ursprungs sind (rechts). **Mitte:** Während der Western Blot für Syt keine Signale zeigt, verändern sich die Signalstärken für die SNARE-Proteine nicht. Die Abnahme des Signals für Syp korreliert mit der Erhöhung der SPAN-Konzentration. **Unten:** Die SPAN-induzierte Syb-Syp-Komplexdissoziation ist nur für mit 0,8 bzw. 4 nM Taipoxin behandelten Proben nicht signifikant (n=4 aus 2 Versuchen).

5. Ergebnisse

Bei Betrachtung der Western Blots (Abb. 31, oben) fällt eine Konzentrationsabhängigkeit der SPANs für die Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes auf. Während sich die Signale für Synaptobrevin, SNAP-25 und Syntaxin nicht verändern, korreliert die Abnahme des Synaptophysin-Signals mit der Erhöhung der Toxinkonzentration. Dies zeigen sowohl Proben, die mit Taipoxin behandelt wurden, als auch solche, die eine Paradoxinbehandlung erfuhren. Der Western Blot für die jeweiligen Überstände (Abb. 31, unten links) zeigt keine Schwankungen der Proteinsignale. Die Quantifizierung von Proben, die mit 50 nM SPANs behandelt wurden, zeigt die Signifikanz dieser toxinbedingten Verminderung der Interaktion zwischen Synaptobrevin und Synaptophysin. Taipoxin ist diesbezüglich tendenziell wirksamer als Paradoxin, was durch Ergebnisse aus vorherigen Abschnitten gestützt wird.

Von Proben, die mit verschiedenen Toxinkonzentrationen (0,8 bis 100 nM) behandelt wurden, erfolgte eine graphische Auswertung, dargestellt als Verhältnis von Synaptophysin zu Synaptobrevin, angegeben als Prozent der Kontrolle. Der Graph zeigt, dass die Syb-Syp-Interaktion mit zunehmender SPAN-Konzentration abnimmt. Erneut scheint, bezogen auf die verminderte Interaktion, Taipoxin wirksamer als Paradoxin zu sein.

Ebenso wie im Abschnitt 5.2.2 wurde im Anschluss an diese Versuchsreihe untersucht, ob der SPAN-Effekt durch Zugabe von definierten Mengen Ca^{2+} eine Änderung erfährt. Neben einer unbehandelten Probe als Kontrolle (LP2*) wurde eine weitere mit Ca^{2+} [100 μM ; frei] versetzt. Weitere Ansätze wurden zum einen mit Taipoxin bzw. Paradoxin (50 nM), zum anderen mit je einem der beiden Toxine in Kombination mit Ca^{2+} [100 μM ; frei] versetzt. Der Versuchsablauf entsprach ansonsten dem des vorherigen Abschnitts.

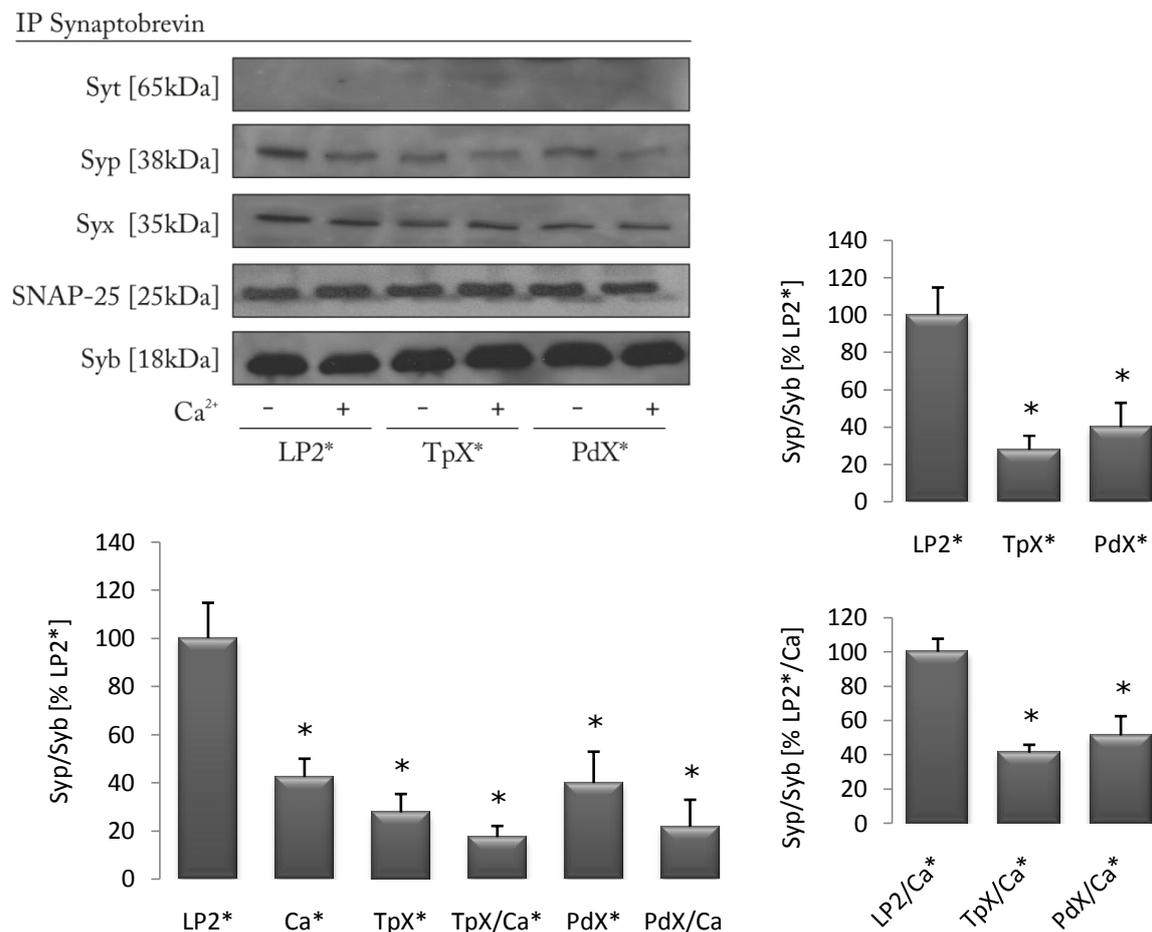


Abb. 32 SPAN-Einfluss auf synaptische Vesikel nach LS1-Toxinzugabe (LP2*)

Im Zuge der Präparation synaptischer Vesikel (LP2) wurde die LS1-Fraktion in mehrere Proben aufgeteilt. Neben einer Kontrollprobe (LP2*), welche unbehandelt blieb, wurden die übrigen Proben mit Ca^{2+} [100 nM; frei], Taipoxin bzw. Paradoxin (50 nM) oder Toxin in Kombination mit Ca^{2+} behandelt. Alle Ansätze wurden bei 37 °C für 30 Min. inkubiert. Anschließend wurde mit der Isolierung synaptischer Vesikel fortgefahren. Die LP2-Pellets wurden in je 200 μl eigenem Überstand resuspendiert. Die Extraktion erfolgte mit Triton X-100, welcher die Immunpräzipitation mit gegen Syb gerichtetem Antikörper folgte. Die weitere Analyse erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot.

Die Westen Blots zeigen eine Verminderung des Signals für Syp nach SPAN-Behandlung. Die Quantifizierung (n=3) zeigt, dass die SPAN-Effekte, sowie die durch Ca^{2+} verursachte Verminderung der Syb-Syp-Interaktion signifikant sind. Die vermindernde SPAN-Wirkung scheint in Kombination mit Ca^{2+} stärker zu sein, allerdings ist dies tendenziell und nicht signifikant.

Der Western Blot (vgl. Abb. 32) zeigt konstante Signale für Synaptobrevin, SNAP-25 und Syntaxin. Für Synaptotagmin als Negativkontrolle sind keine Signale zu erkennen, während die Signalintensitäten für Synaptophysin variieren. Nach Zugabe von Ca^{2+} ist eine Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes um 50 Prozent zu erkennen. Aufgetragen wurde das Verhältnis von Synaptophysin zu Synaptobrevin bezogen auf die Kontrolle in Prozent. Die Behandlung mit 50 nM

Taipoxin vermindert die Syb-Syp-Interaktion um insgesamt ca. 65 Prozent und um ca. 80 Prozent nach Behandlung mit Taipoxin in Anwesenheit von Ca^{2+} . Ähnliches, wenn auch in verminderter Form, gilt für die Wirkung von Paradoxin auf den Syb-Syp-Komplex. Die alleinige Wirkung von Paradoxin auf die Syb-Syp-Interaktion entspricht der Wirkung nach alleiniger Ca^{2+} -Zugabe. Es ist eine Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes von 50 Prozent zu beobachten. In Anwesenheit von Ca^{2+} verstärkt sich dieser Effekt. So nimmt die Interaktion zwischen Synaptobrevin und Synaptophysin um ca. 70 Prozent ab und entspricht in etwa der Wirkung von 50 nM Taipoxin ohne Ca^{2+} -Zusatz. Es bleibt festzuhalten, dass synaptosomales Zytosol für die SPAN-Wirkung auf die Interaktion zwischen Synaptobrevin und Synaptophysin von zentraler Bedeutung ist.

5.2.4 SPAN-Einfluss auf die Syb-Syp-Interaktion

Eine Gegenüberstellung der mit Antikörper gegen Synaptobrevin immunpräzipitierten Proben aus den Abschnitten 5.2.1 bis 5.2.3 unterstreicht zum einen die SPAN-induzierte Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes in der P2- und LS1-Fraktion, andererseits ist dieser Effekt an isolierten synaptischen Vesikeln (LP2-Fraktion) nicht erkennbar. Dies zeigt auch die Quantifizierung der Versuche, bei der das Verhältnis von Synaptophysin zu Synaptobrevin, bezogen auf die jeweilige Kontrolle, dargestellt wurde. Durch SPAN-Behandlung wird sowohl in der P2- als auch in der LS1-Fraktion (LP2*) die Interaktion zwischen Synaptobrevin und Synaptophysin gehemmt. Diese Wirkung ist dabei an Synaptosomen am stärksten ausgeprägt. Auf isolierte synaptische Vesikel (LP2) hingegen haben SPANs keinen Einfluss auf die Syb-Syp-Interaktion. Somit bleibt festzuhalten, dass die Anwesenheit von synaptosomalem Zytosol für die toxininduzierte, verminderte Syb-Syp-Interaktion notwendig ist.

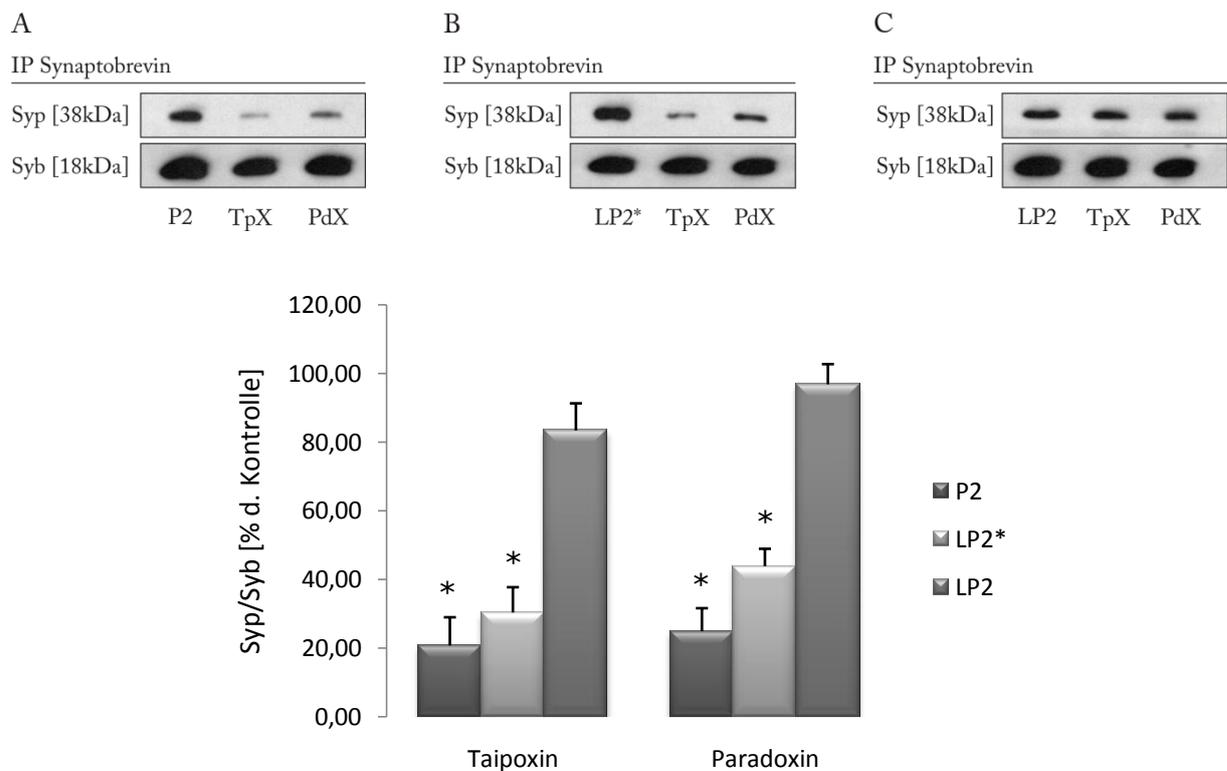


Abb. 33 SPAN-Wirkung auf verschiedene Kompartimente

Die Durchführung der jeweiligen Versuche ist in den Abschnitten 5.2.1-5.2.3 einzusehen. Die Gegenüberstellung der Western Blots der mit Antikörper gegen Syb durchgeführten Immunpräzipitationen zeigt die Syb-Syp-interaktionsmindernde SPAN-Wirkung (je 50 nM) an Synaptosomen (A) und synaptischen Vesikeln mit synaptosomalen Zytosol (B), nicht aber an isolierten synaptischen Vesikel (C). Die Quantifizierung (unten) stellt eine Zusammenfassung der Quantifizierungen der oben genannten Abschnitte dar. Dabei sind die Daten der mit 50 nM behandelten Proben eingegangen. Diese Wirkung ist signifikant (je n=3).

5.2.5 SPAN-bedingte Proteinumverteilung

Die betrachteten präsynaptischen Proteine sind überwiegend integrale Membranproteine und liegen damit eingebettet in die Lipiddoppelschicht der Zellmembranen vor. Andere Proteine sind mit der Membran assoziiert, wie z.B. SNAP-25 und Rab 3. Für das Verständnis der Interaktionen der synaptischen Proteine im SNARE-Komplex und Syb-Syp-Komplex ist es daher wichtig, ihre Wechselwirkungen mit Membranlipiden und ihre Einlagerung in die spezielle Substruktur der Plasmamembran und der synaptischen Vesikelmembran zu kennen.

Zwei verschiedene Mechanismen scheinen für die Verteilung von Membranbestandteilen wichtig zu sein (Thiele *et al.*, 2000). Zum einen basiert der

Sortierungsprozess auf dem Zusammenspiel von zytosolischen Proteinen und den in der Lipiddoppelschicht verankerten transmembranären Proteinen. Zum anderen wird er reguliert durch Lipid-Lipid-Interaktionen und Lipid-Protein-Interaktionen innerhalb und zwischen verschiedenen Membransubdomänen.

Die Lipidstrukturierung der Membranen in Domänen und Subdomänen, welche ganz spezifisch mit verschiedenen Membranproteinen assoziiert sind, hat einen entscheidenden regulierenden Effekt auf die einzelnen Membranprozesse und Proteininteraktionen. Zu den spezialisierten cholesterolreichen Subdomänen zählen „Lipid Rafts“, die möglicherweise auch die Membran synaptischer Vesikel strukturieren und daher hier genauer betrachtet werden sollen (Gee *et al.*, 1999), (Huttner & Schmidt, 2000).

Die Durchführung zur Isolierung von Synaptosomen (P2) erfolgte analog der Beschreibung in 4.7.1. Verglichen wurde die Extrahierbarkeit verschiedener in Abbildung 34 zu sehender Proteine. Als Detergenz wurde zum einen Triton X-100 zum anderen Lubrol verwendet, deren Extrakte unterschiedliche Proteinverteilungen aufzeigten. Während ein Großteil der Proteine (VGLUT 1/2, Na/K-ATPase, Syp) im Triton-Extrakt lediglich in Bodennähe nachweisbar sind, führt die Extraktion mit Lubrol zu einem differenzierten Bild. Hier sind die Proteine neben den Fraktionen in Bodennähe auch in höheren Fraktionen nachweisbar.

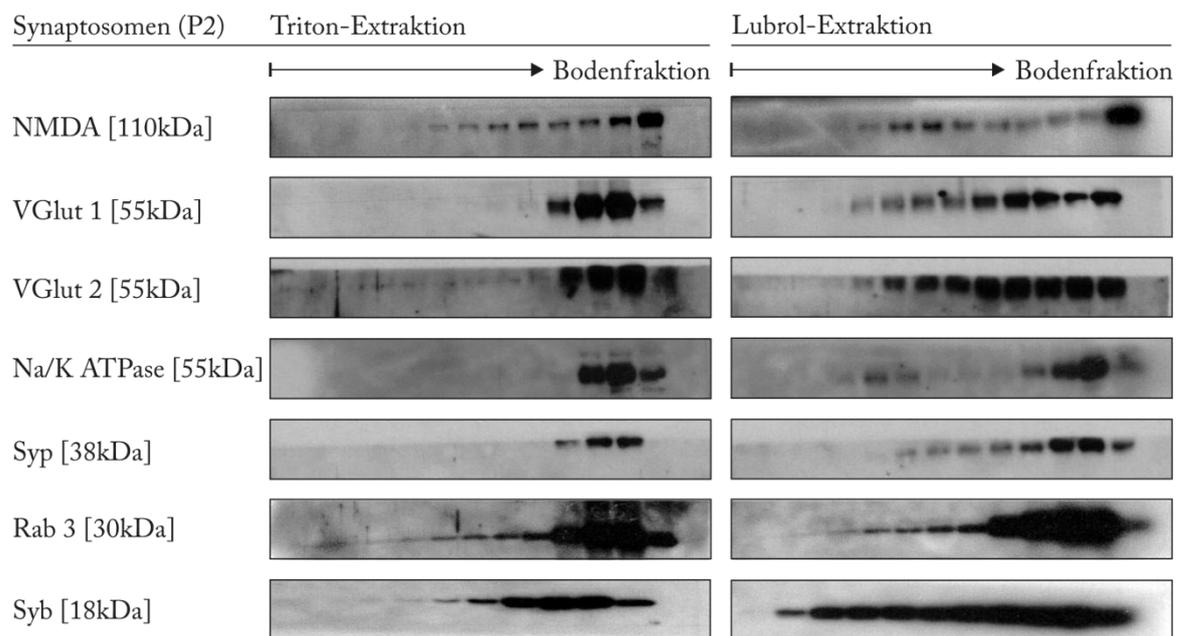


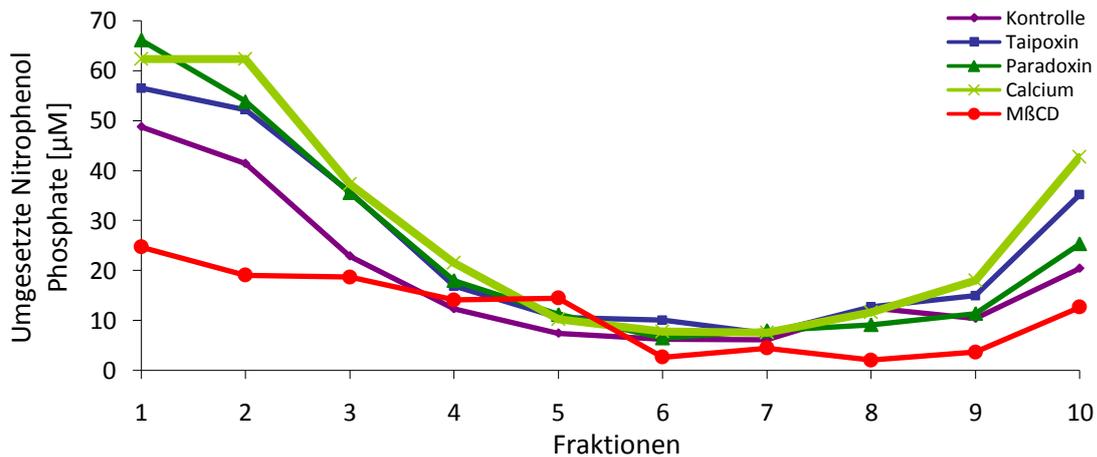
Abb. 34 Verteilung verschiedener Proteine nach Triton- bzw. Lubrol-Extraktion

Synaptosomen (P2) wurden entsprechend 4.1.1 hergestellt und wie unter 4.7 beschrieben auf einen Sucrosegradienten geladen. Die Proben wurden einmal mit Triton X-100 (1 %), ein anderes Mal mit Lubrol (2 %) extrahiert. Die Auswertung der Proteinsignale erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot. Dann wurde die Verteilung verschiedener Proteine der Tritonextraktion mit der Verteilung in der Lubrolextraktion verglichen. Während die Triton-extrahierten Proben vornehmlich in den Bodenfraktionen zu sehen sind, zeigen die mit Lubrol-extrahierten Proben eine breitere Verteilung über die Gradientenfractionen.

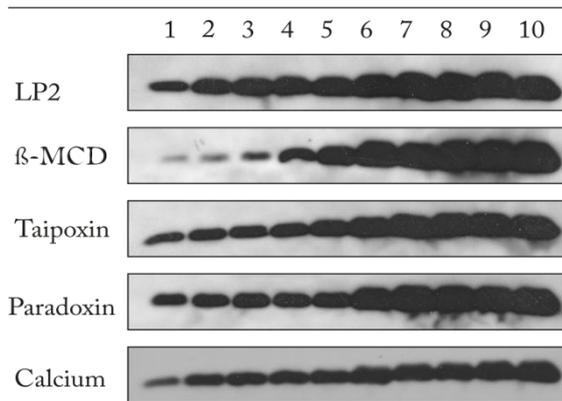
Weitere Analysen der SPAN-Wirkung an isolierten, synaptischen Vesikel (LP2) erfolgten auf Grundlage dieser Ergebnisse mit Hilfe der Lubrol-Extraktion. Zusätzlich zur Western Blot-Analyse erfolgte ein Aktivitätstest der alkalischen Phosphatase (siehe 4.7.2) um die Fraktionen der „Lipid Rafts“ ausfindig zu machen. Die alkalische Phosphatase ist als klassischer „Lipid Raft“-Marker beschrieben.

Für die Untersuchung der SPAN-Wirkung auf die Proteinverteilung in der synaptischen Vesikelmembran wurde der LS1-Fraktion 50 nM Taipoxin bzw. Paradoxin, Calcium oder β -MCD zugefügt und die Ansätze für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mit der der Präparation isolierter, synaptischer Vesikel (LP2-Fraktion) fortgefahren. Frisches LP2 wurde im Folgenden auf einen 30-prozentigen Sucrosegradienten geladen. Die Auswertung erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot.

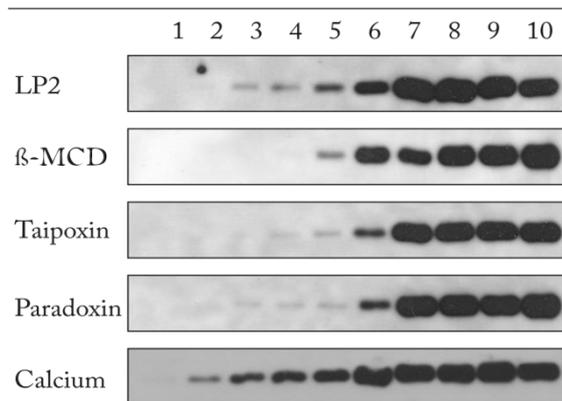
5. Ergebnisse



Synaptobrevin



Synaptophysin



VGlut1

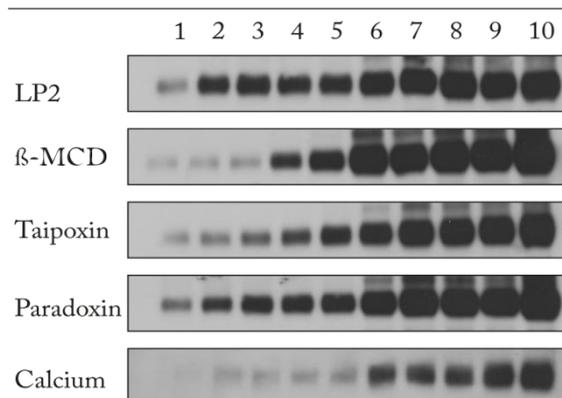


Abb. 35 SPAN-Wirkung auf „Lipid Rafts“

Oben: Alkalische Phosphatase Assay

Dargestellt sind die Aktivitäten der alkalischen Phosphatase von unterschiedlich behandelten Proben. Während in der Kontrolle und in den mit Taipoxin bzw. Paradoxin (je 50 nM) oder Ca^{2+} [100µM; frei] behandelten Proben in den Fraktionen 1-4 „Lipid Rafts“ nachweisbar sind, sind diese in der mit β -MCD behandelten Probe aufgelöst. Die Proteinverteilung zwischen den Proben, ausgenommen der mit β -MCD behandelten, entsprechen sich.

Unten: Western Plot Analyse

Synaptische Vesikel wurden nach Standardprotokoll (vgl. 4.1.2 und 4.1.3) isoliert. Dabei wurden SPANs, Ca^{2+} bzw. β -MCD der LS1-Fraktion zugefügt. Nach 30-minütiger Inkubation (37 °C) wurde mit der Präparation synaptischer Vesikel fortgefahren. Die Durchführung des Sucrose-Gradienten ist unter 4.7.1 beschrieben.

Analyse der Proteinverteilung von Syb, Syp und VGLUT1. Neben der Kontrolle diente eine mit β -MCD behandelte Probe als Negativkontrolle. Während die Analyse für Syb keine Unterschiede nach Toxinbehandlung gegenüber der Kontrollprobe (LP2) zeigen, führt die Behandlung mit Taipoxin bzw. Paradoxin (50 nM) zu einer Proteinumverteilung entsprechend der mit β -MCD behandelten Probe. Für VGLUT1 zeigt sich ein der Kontrollprobe entsprechendes Bild für die mit Paradoxin behandelten synaptischen Vesikel. Taipoxin-behandlung führt hingegen zu einer der Negativkontrolle ähnlichen Proteinverschiebung. Dieser Effekt ist im Vergleich zu den mit β -MCD behandelten Proben weniger stark ausgeprägt.

Der Aktivitätstest der alkalischen Phosphatase zeigt, dass die Struktur der „Lipid Rafts“ durch Behandlung mit Methyl- β -cyclodextrin (β -MCD) eine Änderung erfährt. β -MCD beeinflusst dabei die Membranfluidität sehr stark (Gimpl et al., 1997) und entzieht der Membran direkt Cholesterin. Dies hat eine Auflösung der „Lipid Raft“-Strukturen zur Folge. Nach β -MCD-Behandlung sind die Proteine nicht mehr in „Lipid Raft“-Strukturen angeordnet, sondern verteilen sich über den gesamten Gradienten. Im Vergleich dazu zeigen Proben die unbehandelt blieben, oder mit Taipoxin bzw. Paradoxin oder Ca^{2+} -behandelt wurden, neben einer erhöhten Aktivität nahe der Bodenfraktion, ebenfalls erhöhte Aktivitäten in den oberen Fraktionen (Fraktionen eins bis vier).

Die Analyse der Western Blots (Abb. 35, unten) ergibt Folgendes: Alle Kontrollen zeigen Proteinsignale in nahezu allen Fraktionen. Diese Proteinverteilung wird durch Behandlung mit β -MCD aufgehoben und die Proteine sind vermehrt in Nähe der Bodenfraktion zu finden. Für die Analyse mit Synaptobrevin (Abb. 35, oberster Western Blot) zeigt sich gegenüber der Kontrolle keine Veränderung der Proteinverteilung in den einzelnen Fraktionen. Anders ist dies bei Synaptophysin, wo sowohl Taipoxin als auch Paradoxin einen β -MCD entsprechenden Effekt haben. Eine Behandlung mit Ca^{2+} [100 μM ; frei] hingegen beeinflusst die Proteinverteilung innerhalb der Membran synaptischer Vesikel nicht. Für die Analyse mit gegen VGLUT1 gerichtetem Antikörper ergibt sich ein differenzierteres Bild. Während es nach Behandlung mit Paradoxin (50 nM) zu keinen Veränderungen gegenüber der unbehandelten Probe kommt, führt die Behandlung mit Taipoxin (50 nM) zu einer Umverteilung von VGLUT1 in Richtung Bodenfraktion. Dabei ist der Effekt nicht so stark ausgeprägt wie bei den mit β -MCD-behandelten Proben. Ca^{2+} -behandelte Proben zeigen allerdings ebenfalls eine VGLUT1-Umverteilung. Dabei ist die Verschiebung in Richtung Bodenfraktion im Vergleich zu den mit β -MCD-behandelten Proben stärker ausgeprägt.

Zusammenfassend ist zu bemerken, dass SPANs einen Einfluss auf die membranäre Organisation an synaptischen Vesikeln haben. Allerdings scheint dieser SPAN-Effekt nicht auf alle Proteine der Vesikelmembran gegeben zu sein. Während Synaptobrevin gar nicht beeinflusst zu werden scheint, Synaptophysin hingegen sowohl nach Taipoxin- als auch nach Paradoxin-Behandlung Auffälligkeiten zeigt, erfährt VGLUT1 lediglich nach Behandlung mit Taipoxin, nicht aber nach Behandlung mit Paradoxin, eine membranäre Umverteilung.

5.2.6 SPAN-Einfluss auf die Aufnahme von Neurotransmittern

5.2.6.1 Untersuchung der SPAN-Wirkung auf VMAT

Sowohl Taipoxin als auch Paradoxin induzieren die Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes. Es konnte gezeigt werden, dass es unter SPAN-Einfluss zu Veränderungen der membranären Organisation an synaptischen Vesikeln kommt. Könnten SPANs ebenfalls die Aufnahme von Neurotransmittern beeinflussen? Um dieser Frage nachzugehen verfuhr man wie unter 4.3 beschrieben, mit der Änderung, dass den LS1-Fractionen unterschiedliche SPAN-Konzentrationen (50, 10 2 nM) zugesetzt wurden. Nach halbstündiger Inkubation bei 37 °C wurde mit der Aufarbeitung synaptischer Vesikel (LP2) laut Protokoll (siehe 4.1.2) fortgefahren.

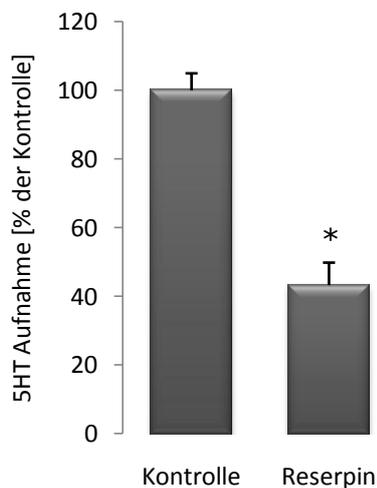


Abb. 36 Serotoninaufnahme

Serotoninaufnahme un behandelter synaptischer Vesikel (Kontrolle; 1,6 pmol/mg Protein) sowie mit Reserpin behandelter synaptischer Vesikel (0,69 pmol/mg Protein). Mit Reserpin behandelte synaptische Vesikel (LP2) zeigen die unspezifische Serotoninaufnahme. (n=3)

Abbildung 36 zeigt die Serotoninaufnahme synaptischer Vesikel. Unbehandelte synaptische Vesikel wurden als 100 Prozent der möglichen Serotoninaufnahme angenommen. Der Wert der mit Reserpin versetzten Probe stellt die unspezifische Aufnahme von Serotonin dar. Dieser unspezifische Wert wurde von den jeweiligen Proben abgezogen. Die Auswertung erfolgte als reserpinabhängige Serotoninaufnahme in Prozent bezogen auf die Kontrolle.

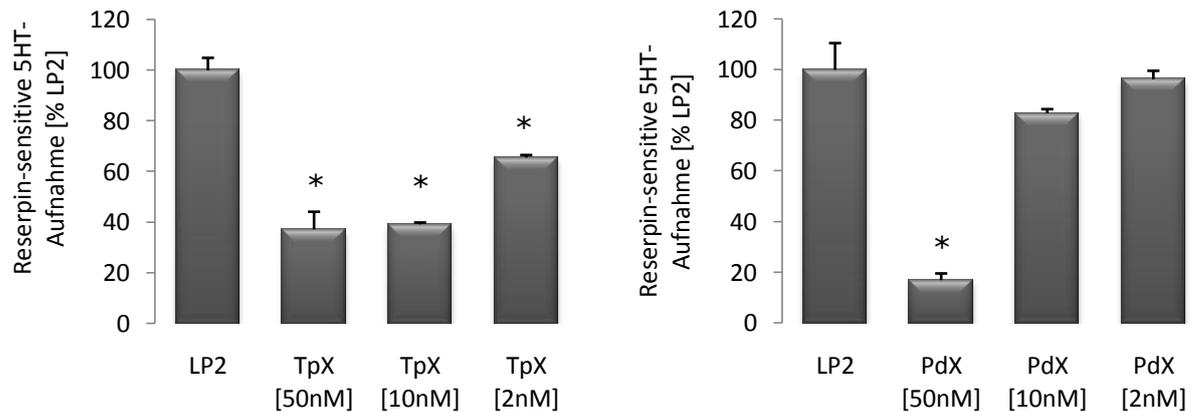


Abb. 37 SPANs vermindern die VMAT vermittelte NT-Aufnahme

Während der Aufreinigung synaptischer Vesikel (LP2) wurde der LS1-Fraktion, neben einer unbehandelten Probe (LP2), Taipoxin bzw. Paradoxin verschiedenen Konzentrationen (50, 10, 2 nM) zugesetzt und bei 37 °C für 30 Min. inkubiert. Anschließend erfolgte die Serotoninaufnahme. Mit 2 nM Taipoxin behandelte synaptische Vesikel (links) zeigt eine verminderte Serotoninaufnahme. Mit steigender Taipoxinkonzentration nimmt die Aufnahme von Serotonin ab. Dieser Effekt ist auch bei den mit Paradoxin behandelten Proben zu sehen, allerdings erst ab Paradoxinkonzentrationen >10 nM. Die Abnahme der Serotoninaufnahme ist bei allen untersuchten Taipoxinkonzentrationen gegenüber der Kontrolle signifikant. Bei den mit Paradoxin behandelten Proben zeigt nur die mit 50 nM Toxin behandelte Probe eine Signifikanz gegenüber der Kontrolle. (je n=3)

Die mit Taipoxin (50, 10 und 2 nM; Zugabe zur LS1-Fraktion) behandelten synaptischen Vesikel (LP2) zeigen bei dieser Reserpin-sensitiven Serotoninaufnahme einen signifikanten Einfluss auf die VMAT-Aktivität. Liegt die Serotoninaufnahme nach Behandlung mit zwei Nanomol Taipoxin noch bei ca. 70 Prozent der Kontrolle, so nimmt sie mit steigender SPAN-Konzentration weiter ab, bis sie bei einer Taipoxin-Konzentration von 50 nM etwa bei 40 Prozent der Kontrolle liegt.

Der Einfluss von Paradoxin auf die Serotoninaufnahme über VMAT ist erst bei höheren Konzentrationen (≥ 50 nM) erkennbar. Nach Behandlung mit zwei Nanomol Paradoxin entspricht die Serotoninaufnahme der Kontrollprobe. Mit zehn Nanomol Paradoxin behandelte synaptische Vesikel zeigen eine um 20 Prozent verminderte Serotoninaufnahme. Dies ist im Vergleich zu der SPAN-Wirkung von Taipoxin bei gleicher Konzentration eine geringere Abnahme der VMAT-Aktivität. Synaptische Vesikel, die 50 nM Paradoxin ausgesetzt waren, nehmen signifikant weniger Serotonin auf, so dass im Gegensatz zur Kontrolle noch ca. 20 Prozent Aufnahmeaktivität besteht.

5. Ergebnisse

In einem weiteren Schritt wurde der Frage nachgegangen, ob und in welchem Ausmaß Ca^{2+} in verschiedenen, definierten Konzentrationen die Neurotransmitteraufnahme über VMAT beeinflusst. Hierzu wurde die LS1-Fraktion der subzellulären Fraktionierung mit Ca^{2+} [10, 100 und 1 000 μM ; frei] versetzt und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde mit der Präparation synaptischer Vesikel (LP2) fortgefahren.

In einem zweiten Schritt wurde die Wirkung von Taipoxin in Kombination mit Ca^{2+} auf VMAT analysiert. Ca^{2+} wurde in einer Konzentration von 100 μM [frei] eingesetzt, Taipoxin wurde in einer Konzentration von zwei Nanomol verwendet. Die Auswertung erfolgte als Reserpin-sensitive Serotoninaufnahme in Prozent, bezogen auf die unbehandelte Probe.

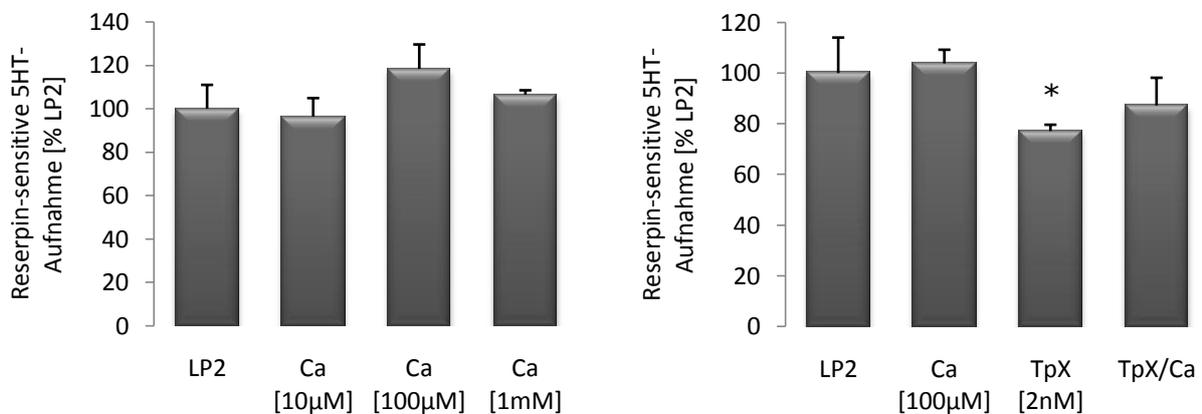


Abb. 38 SPANs vermindern die VMAT-vermittelte NT-Aufnahme

Verschiedene Ca^{2+} -Konzentrationen [10 μM , 100 μM , 1 mM; frei] wurden der LS1-Fraktion zugesetzt. Die Aufarbeitung synaptischer Vesikel (LP2) erfolgte ansonsten nach Standardprotokoll. Anschließend wurde die Neurotransmitteraufnahme (4.3) mit Serotonin durchgeführt. Ca^{2+} hat keinen Einfluss auf die Neurotransmitter-Aufnahme über VMAT. Die Reserpin-sensitive Serotoninaufnahme der mit Ca^{2+} - [100 μM ; frei], Taipoxin- (2 nM) oder Ca^{2+} in Kombination mit Taipoxin behandelten Proben zeigt lediglich für Taipoxin (2 nM) einen signifikanten Effekt. Dieser wird durch Ca^{2+} nicht verstärkt. (je n=3)

In Abbildung 38 ist zu sehen, dass Ca^{2+} alleine keinerlei Einfluss auf die VMAT-Aktivität hat. Die Werte aller mit Ca^{2+} -behandelten Proben schwanken in nicht signifikanter Weise um den Kontrollwert (Abb. 38, links). Ca^{2+} in einer freien Konzentration von 100 μM hat keinen Effekt auf die Serotoninaufnahme. Taipoxin (2 nM) verringert die Serotoninaufnahme um 20 Prozent auf 80 Prozent der Kontrolle. Die Inkubation von Taipoxin mit gleichzeitiger Ca^{2+} -Zugabe vermindert die Transporteraktivität nicht über den Wert der toxinbehandelten Probe hinaus. Die Serotoninaufnahme liegt im Bereich der mit Taipoxin behandelten Proben, d.h. bei ca. 80 Prozent der Kontrolle.

5.2.6.2 *Veränderte Glutamataufnahme nach SPAN-Behandlung*

Analog der Vorgehensweise aus Abschnitt 5.2.6.1 wurde der Einfluss von Taipoxin bzw. Paradoxin auf vesikuläre Glutamat-Transporter (VGLUT1/2) untersucht. Die spezifische VGLUT-Hemmung erfolgte durch Trypanblau-Zugabe.

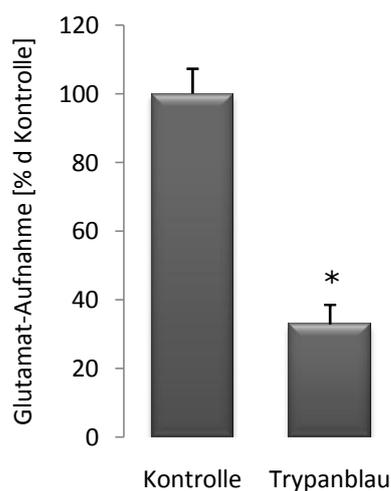


Abb. 39 **Glutamataufnahme**

Glutamataufnahme unbehandelter synaptischer Vesikel (Kontrolle; 0,79 nmol/mg Protein) und mit Trypanblau behandelter synaptischer Vesikel (0,17 nmol/mg Protein). Die unspezifische Glutamataufnahme wird durch die mit Trypanblau behandelte Probe gezeigt. (n=3)

Abbildung 39 zeigt die Glutamataufnahme unbehandelter, sowie mit Trypanblau behandelter synaptischer Vesikel (LP2). Die Glutamataufnahme unbehandelter synaptischer Vesikel entsprach 100 Prozent der Neurotransmitter-Aufnahme. Die Glutamataufnahme der mit Trypanblau behandelten synaptischen Vesikel stellt die unspezifische Neurotransmitter-Aufnahme dar. Die spezifische Glutamat-

5. Ergebnisse

aufnahme ergibt sich als Differenz zu der Kontrolle der Trypanblau-behandelten Probe und wurde als Trypanblau-sensitive Glutamataufnahme dargestellt.

Mit Taipoxin (50, 10 und 2 nM; Zugabe zur LS1-Fraktion) behandelte synaptische Vesikel zeigen bei dieser Trypanblau-sensitiven Aufnahme von Glutamat einen signifikanten Einfluss auf die VGLUT-Aktivität. Bereits eine Behandlung der LP2-Fraktion mit zwei Nanomol Taipoxin bewirkt eine Abnahme der VGLUT-Aktivität von 60 Prozent. Die Abnahme der VGLUT-Aktivität korreliert mit der Toxinkonzentration. Bei 50 nM Taipoxin beträgt die Glutamataufnahme noch ca. zehn Prozent.

Paradoxin, in einer Konzentration von zwei Nanomol, zeigt keine vermindernde Wirkung auf die Glutamataufnahme an synaptischen Vesikeln. Nach Zugabe von zehn Nanomol Paradoxin ist eine tendenzielle Abnahme der Glutamataufnahme erkennbar; nach Zugabe von 50 nM Paradoxin beträgt sie noch ca. 55 Prozent der Kontrolle. Die Verminderung der Glutamataufnahme fällt unter Einfluss von Taipoxin, verglichen mit Paradoxin, deutlicher aus (vgl. Abb. 40). Dies konnte bei allen eingesetzten SPAN-Konzentrationen beobachtet werden.

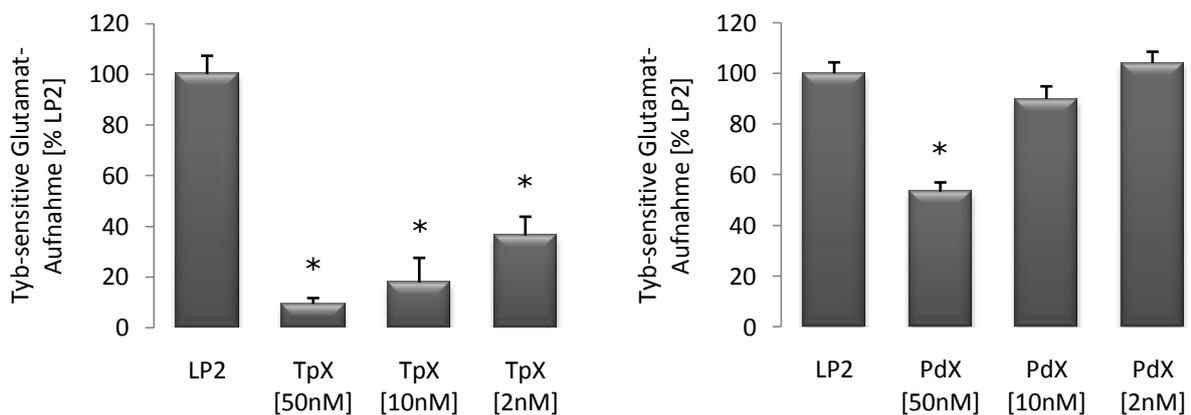


Abb. 40 SPANs vermindern konzentrationsabhängig die Glutamataufnahme

Während der LP2-Aufreinigung wurden die LS1-Fraktionen, mit Ausnahme der Kontrollproben, mit Taipoxin bzw. Paradoxin in verschiedenen Konzentrationen (50, 10, 2 nM) behandelt. Die mit Taipoxin behandelten Proben zeigen bereits bei geringen SPAN-Konzentrationen (2 nM) eine signifikante Abnahme der Glutamataufnahme. Mit Paradoxin behandelte Proben vermindern die Aufnahme von Glutamat erst in Konzentrationen >10 nM. (je n=3)

Analog zum vorherigen Abschnitt wurde anschließend ein möglicher Ca^{2+} -Einfluss auf die Aufnahme von Glutamat untersucht. Hierzu wurde die LS1-Fraktion der subzellulären Fraktionierung mit Ca^{2+} [10, 100 und 1 000 μM ; frei] versetzt. Anschließend wurde mit der Präparation synaptischer Vesikel fortgefahren. In einem zweiten Schritt wurde die Wirkung von Taipoxin (2 nM) in Kombination mit Ca^{2+} [100 μM ; frei] auf VGLUT analysiert. Die Auswertung erfolgte graphisch als Trypanblau-sensitive Glutamataufnahme bezogen auf die Kontrolle in Prozent.

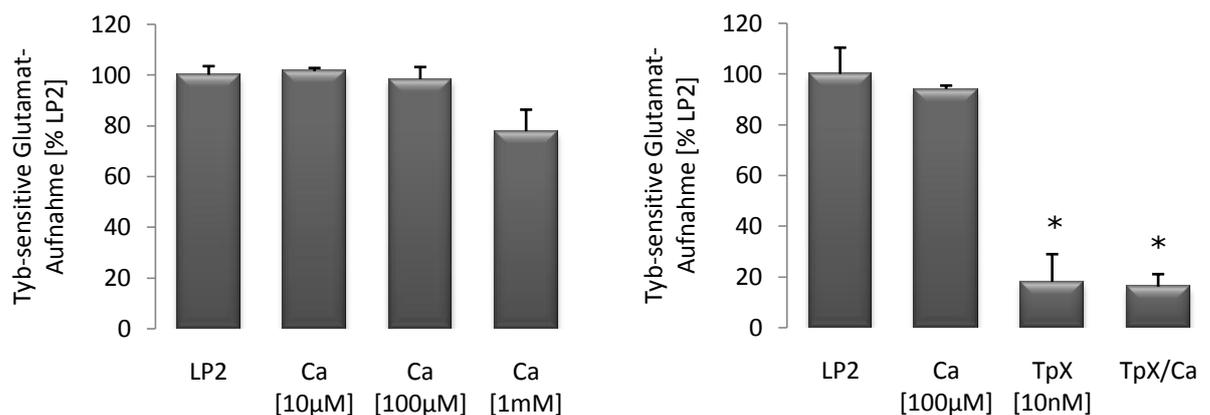


Abb. 41 SPANs vermindern die Glutamataufnahme (Ca^{2+})

Verschiedene Ca^{2+} -Konzentrationen [10 μM , 100 μM , 1 mM; frei] wurden der LS1-Fraktion zugesetzt. Die Aufarbeitung synaptischer Vesikel erfolgte ansonsten nach Standardprotokoll. Anschließend wurde die Neurotransmitteraufnahme (4.3) mit Glutamat durchgeführt. Ca^{2+} bewirkt erst in hohen Konzentrationen (1 mM) eine tendenziell messbare Verminderung der Glutamataufnahme. Die Trypanblau-sensitive Glutamat-Aufnahme mit Ca^{2+} [100 μM ; frei] zeigt keine Veränderungen gegenüber unbehandelten synaptischen Vesikeln. Mit Taipoxin (2 nM) oder Ca^{2+} in Kombination mit Taipoxin behandelte Proben zeigen eine um ca. 80 Prozent verminderte Glutamataufnahme. Ca^{2+} verstärkt die vermindere SPAN-Wirkung nicht. (je n=3)

Die alleinige Gabe von Ca^{2+} hat keinen Einfluss auf die Glutamataufnahme. Bei höheren Ca^{2+} -Konzentrationen (>1 mM) zeigt sich eine tendenzielle, jedoch keine signifikante verminderte Aufnahme von Glutamat. Abbildung 41 (rechts) zeigt, dass die Wirkung von Taipoxin, die sich in einer Verminderung der Glutamataufnahme um 80 Prozent äußert, in Kombination mit Ca^{2+} nicht verstärkt wird.

5.3 Charakterisierung von Syp-Deletionsmutanten

Die funktionelle Bedeutung von Synaptophysin ist bislang noch unbekannt. Synaptophysin-Deletionsmutanten zeigen keinen spezifischen Phänotyp (Eshkind & Leube, 1995), (McMahon *et al.*, 1996). Elektrophysiologische Untersuchungen von Synaptophysin-Synaptogyrin-Doppeldeletionsmutanten zeigten eine starke Reduktion von „short-term“- und „long-term“- Plastizität, womit eine Funktion von Synaptophysin bei plastischen Veränderungen im adulten Gehirn aufgezeigt wurde (Janz & Sudhof, 1999). Synaptophysin könnte also in sich entwickelnden und reifen Synapsen innerhalb eines neuronalen Netzwerkes, als essentielles Protein für die Funktion synaptischer Vesikel, eine individuelle Anpassung an erhöhte oder verminderte Transmitterfreisetzung ermöglichen. Für synaptische Vesikel, die wiederholte Exozytose-Endozytose-Zyklen durchlaufen, ist dabei die Aufrechterhaltung der Membranintegrität von besonderer Bedeutung. Hiervon hängt die Effizienz der Synapse ab. Veränderungen präsynaptischer Vesikelpools beeinflussen die synaptische Plastizität.

Im Zuge der Charakterisierung von Synaptophysin-Deletionsmutanten wurde die Neurotransmitter-Aufnahme von Synaptophysin-Deletionsmutanten im Vergleich zu Wildtypmäusen untersucht.

5.3.1 Vergleich von Wildtypmäusen und Syp-Deletionsmutanten

Entsprechend 4.1.2 wurden synaptische Vesikel (LP2) aus Gehirnen von Synaptophysin-Deletionsmutanten und Wildtypmäusen aufgereinigt. Nach Triton-Extraktion wurde mit Antikörpern gegen Syntaxin bzw. Synaptobrevin immunpräzipitiert. Als Kontrolle wurde eine Probe ohne Antikörperzugabe mitgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels Gelelektrophorese und „Western Blotting“.

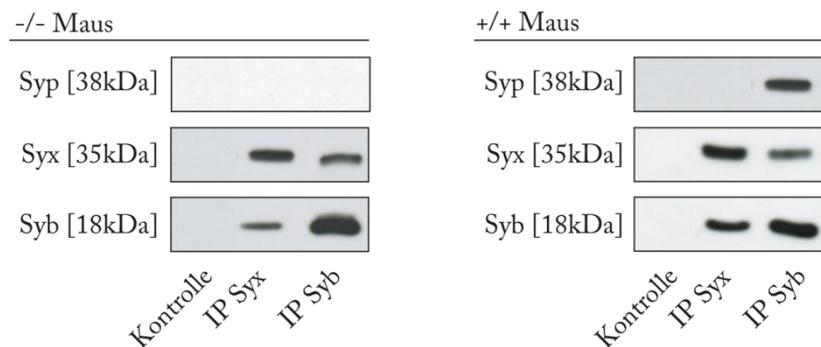


Abb. 42 Immunpräzipitation von Wildtypmäusen und Syp-Deletionsmutanten

Frisch isolierte, synaptische Vesikel (LP2) aus Syp-Deletionsmutanten (-/- Maus) und Wildtypmäusen (+/+ Maus) wurden in je 200 μ l ihres eigenen Überstandes (LS2) resuspendiert. Nach anschließender Extraktion mit Triton X-100 wurden die Ansätze in je drei Proben aufgeteilt. Neben einer unbehandelten Probe (Kontrolle) wurde eine Probe mit Syx-Antikörper (IP Syx), eine weitere mit Syb-Antikörper (IP Syb) präzipitiert. Dann folgte die weitere Analyse mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot.

Die Immunpräzipitationen mit Syntaxin zeigen bei einem Vergleich von Synaptophysin-Deletionsmutanten mit Wildtypmäusen keine Unterschiede. Während die Interaktion von Syntaxin mit Synaptobrevin zu sehen ist, findet zwischen Syntaxin und Synaptophysin keine Interaktion statt. Dies verhält sich für die Immunpräzipitation mit Synaptobrevin anders. Bei Wildtypmäusen interagiert Synaptobrevin neben Syntaxin auch mit Synaptophysin (Abb. 42, rechts). Bei den Synaptophysin-Deletionsmutanten ist diese Interaktion aufgrund der Mutation nicht zu sehen.

Im Nachfolgenden wurde der Versuch mit der Methode der chemischen Quervernetzung (vgl. 4.6) wiederholt. Nach dem Proteintransfer auf Nitrocellulose wurden die Western Blots mit Antikörper gegen Synaptophysin bzw. Synaptobrevin entwickelt.

5. Ergebnisse

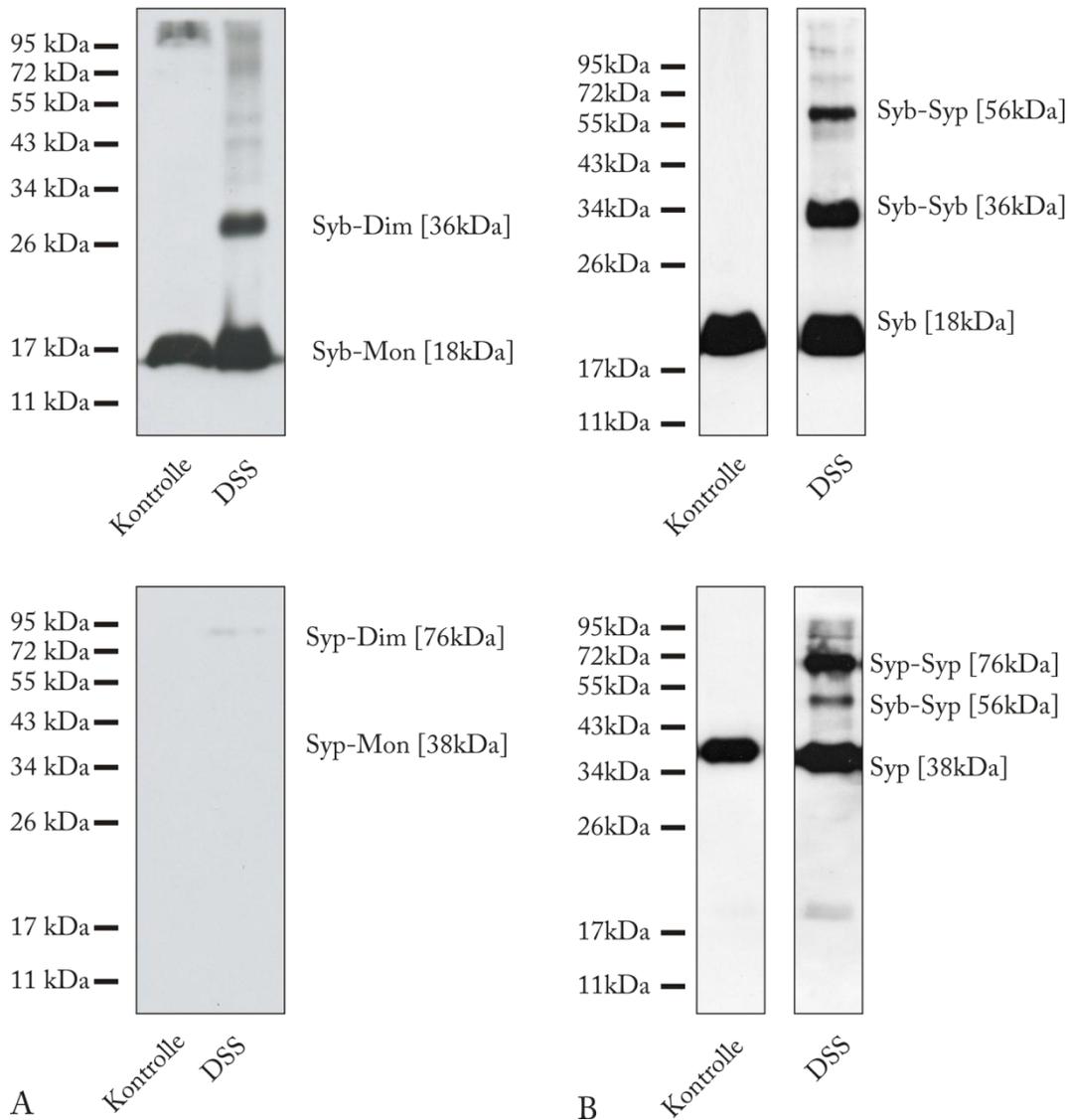


Abb. 43 Quervernetzung von Syp-Deletionsmutanten bzw. Wildtypmäusen

Für die Analyse des Syb-Syp-Komplexes mit Hilfe chemischer Quervernetzung wurden Synaptosomen (P2) aus Syp-Deletionsmutanten (A) bzw. Wildtypmäusen (B), mit DSS (1 mM) behandelt oder unbehandelt (Kontrolle), in gleichen Mengen auf ein zwölfprozentiges SDS-Gel aufgetragen. Die Auswertung erfolgte durch Western Blots mit Antikörpern gegen Syb (links) oder Syp (rechts). **A:** Syp-Deletionsmutanten nach chemischer Quervernetzung. Syp ist im Western Blot nicht nachweisbar. **B:** Wildtypmäuse nach chemischer Quervernetzung. Der Western Blot liefert das aus Abb. 17 B bekannte Bild.

Ein Vergleich der Abbildung 43 B mit Abbildung 17 B zeigt, dass sich die Signale beider Western Blots entsprechen. Ohne Vernetzungsreagenz ist lediglich jeweils das Monomer zu erkennen. Nach „Vernetzung“ mit DSS sind Signale für Dimere (Syb [36kDa], Syp [76kDa]) sowie das Signal für den Syb-Syp-Komplex (76kDa) erkennbar. Synaptophysin-Deletionsmutanten weichen von diesen Ergebnissen ab. Die mit Antikörper gegen Synaptophysin inkubierte Nitrocellulosemembran

zeigt keinerlei Signale, was die erfolgreiche und vollständige Synaptophysin-Deletion belegt. Mit Antikörper gegen Synaptobrevin entwickelt, ergeben sich keine Abweichungen gegenüber der Kontrolle bei Wildtypmäusen. Nach erfolgter Quervernetzung ist ein Signal auf Höhe des Synaptobrevin-Dimers (36kDa) zu sehen; ein Signal auf Höhe des Syb-Syp-Komplexes ist hingegen nicht vorhanden.

5.3.2 Neurotransmitter-Aufnahme von Syp-Deletionsmutanten

5.3.2.1 Analyse der Aufnahme von Serotonin

Die Untersuchung der Neurotransmitteraufnahme bei Wildtyp und Synaptophysin-defizienten Mäusen erfolgte laut Standardprotokoll (vgl. 4.3). Die Aufarbeitung erfolgte dabei parallel. Neben einer unbehandelten Probe (Kontrolle) wurde in einer zweiten Probe Nigericin zugesetzt. Nigericin als K^+/H^+ -Austausch-Ionophor führt zu einer ΔpH -Verminderung. Die Aktivität des VMAT2-Neurotransmitter-Transporters hängt in erster Linie von ΔpH ab (Takamori *et al.*, 2002). Daraus ergibt sich eine verminderte Neurotransmitter-Aufnahme nach Behandlung synaptischer Vesikel mit Nigericin.

In Abbildung 44 ist die Neurotransmitter-Aufnahme in Wildtypmäusen und Synaptophysin-Deletionmutanten als Reserpin-sensitive Serotoninaufnahme dargestellt.

An Wildtypmäusen führt die Nigericin-Behandlung zu einer signifikanten Verminderung der Serotoninaufnahme gegenüber der Kontrolle. Synaptophysin-Deletionsmutanten zeigen unbehandelt gegenüber Wildtypmäusen eine erhöhte Serotoninaufnahme. Nach Zusatz von Nigericin nimmt die Serotoninaufnahme ab, allerdings bleibt sie gegenüber der Aufnahme von Wildtypmäusen erhöht.

In einem zweiten Ansatz wurden zusätzlich zu Wildtyp und Synaptophysin-Deletionsmutante auch heterozygote Mäuse auf ihre Serotoninaufnahme getestet. Die Neurotransmitteraufnahme für Serotonin liegt bei diesen Mäusen im Bereich der Kontrolltiere, d.h. lediglich die Synaptophysin-Deletionsmutanten weisen eine erhöhte Serotoninaufnahme auf.

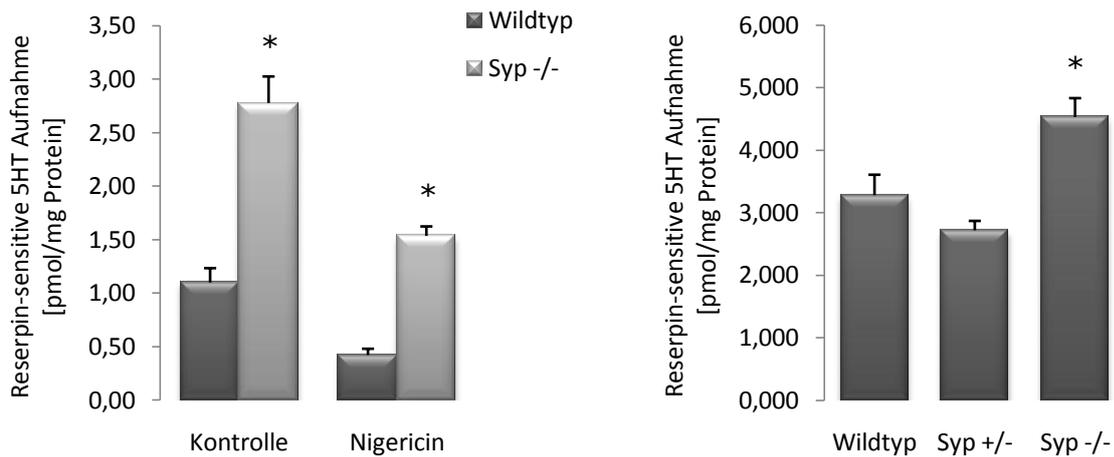


Abb. 44 Vermehrte Serotoninaufnahme Syp-defizienter Mäuse

Reserpinabhängige Serotoninaufnahme von Wildtyp und Syp-defizienten Mäusen (links). Im Vergleich zum Wildtyp zeichnen sich die Deletionsmutanten durch eine signifikante Erhöhung in ihrer Serotoninaufnahme aus. Nach Zugabe von Nigericin ist die Serotoninaufnahme im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen vermindert. Die Serotoninaufnahme ist gegenüber der Vergleichsprobe bei Wildtypmäusen erhöht. Die unspezifische Serotoninaufnahme lag bei der Kontrolle bei 0,48 pmol/mg Protein, bei den mit Nigericin behandelten Proben bei 0,43 pmol/mg Protein. Bei heterozygoten Mäusen (rechts) liegt die Neurotransmitteraufnahme im Bereich der Wildtypmäuse. Die unspezifische Serotoninaufnahme lag für Wildtypmäuse bei 0,68, für heterozygote Mäuse bei 0,77 und für Syp-Deletionsmutanten bei 0,64 pmol/mg Protein. (je n=3)

5.3.2.2 Analyse der Glutamataufnahme

Neben Analyse der Neurotransmitteraufnahme durch VMAT wurden Synaptophysin-Deletionsmutanten hinsichtlich ihrer Neurotransmitteraufnahme über VGLUT untersucht. Die Vorgehensweise entsprach dabei der des vorherigen Abschnitts. Die Aufarbeitung der synaptischen Vesikel erfolgte wie in 4.1.2 beschrieben. Anschließend wurde die Neurotransmitteraufnahme (vgl. 4.3) durchgeführt. Neben unbehandelten Proben (Kontrolle) wurden einige Proben mit Nigericin behandelt. Die durch Nigericin verursachte Verminderung von ΔpH sollte sich schwächer auf VGLUT auswirken, welcher im höheren Maße von $\Delta\Psi$ abhängig ist.

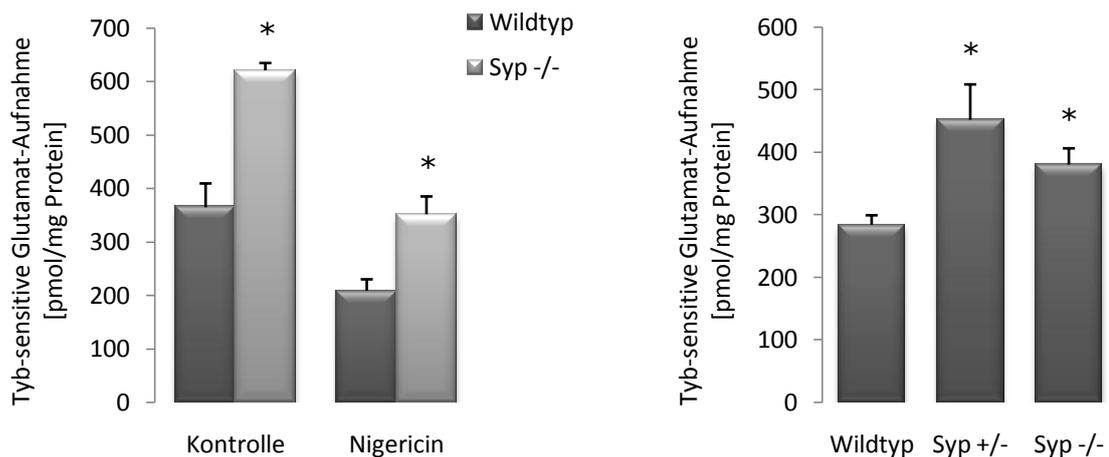


Abb. 45 Vermehrte Glutamataufnahme Syp-defizienter Mäuse

Trypanblau-sensitive Glutamataufnahme von Wildtyp- und Syp-defizienten Mäusen (links). Im Vergleich zum Wildtyp zeichnen sich die Syp-Deletionsmutanten durch eine signifikante Erhöhung in ihrer Glutamataufnahme aus. Nigericin führt zu einer verminderten Neurotransmitteraufnahme, allerdings zeichnen sich auch hier Syp-defiziente Mäuse durch eine erhöhte Glutamataufnahme gegenüber Wildtypmäusen aus. Die unspezifische Glutamataufnahme lag bei der Kontrolle bei 140 pmol/mg Protein, bei den mit Nigericin behandelten Proben bei 70 pmol/mg Protein. Bei heterozygoten Mäusen (rechts) liegt die NT-Aufnahme im Bereich der Syp-Deletionsmutanten. Die unspezifische NT-Aufnahme lag für Wildtypmäuse bei 183,3, für heterozygote Mäuse bei 235,7 und für Syp-Deletionsmutanten bei 175,5 pmol/mg Protein. (je n=3)

Die Graphen zeigen eine verstärkte Glutamataufnahme Synaptophysin-defizienter Mäuse gegenüber Wildtypmäusen. Die Behandlung des synaptischen Vesikel mit Nigericin bewirkt in beiden Spezies eine Verminderung der Glutamataufnahme. Diese Verminderung fällt niedriger aus als bei der Serotoninaufnahme. Im direkten Vergleich der jeweiligen Proben nehmen Wildtypmäuse im Gegensatz zu Synaptophysin-Deletionsmutanten weniger Glutamat auf.

Während heterozygote Mäuse bei der Serotoninaufnahme keinen Unterschied im Vergleich zu Wildtypmäusen zeigen, ist die Glutamataufnahme jener heterozygoten Mäuse erhöht und liegt im Bereich der Synaptophysin-Deletionsmutanten.

Synaptophysin-Deletionsmutanten weisen eine im Vergleich zu Wildtypmäusen erhöhte Aktivität der Neurotransmitter-Aufnahme (VMAT und VGLUT) auf.

5.4 Zirkadiane Regulation des Syb-Syp-Komplex

Synaptische Aktivität wird wahrscheinlich in Abhängigkeit von zirkadianer Rhythmik moduliert. Zudem ist bei Dunkel-adaptierten Synaptophysin-Deletionsmutanten eine Verzögerung endozytotischer Prozesse in der Retina beobachtet worden (Spiwox-Becker *et al.*, 2001). Es ist denkbar, dass auch Veränderungen des Syb-Syp-Komplexes eine Rolle spielen. In einem weiteren Versuchsansatz sollten daher synaptische Vesikel (LP2-Fraktion) Licht-Dunkel-adaptierter Mäuse zu unterschiedlichen Tageszeiten hergestellt, extrahiert und die Menge an Syb-Syp-Komplex durch chemische Quervernetzung mit DSS bestimmt werden. Die Zeiten Licht-Dunkel-adaptierter Versuchsansätze waren Zt (Zeitgeber) 0, 6, 12, 18, wobei Zt 0 sechs Uhr morgens, kurz bevor das Licht angeht, Zt 6 zwölf Uhr mittags, Zt 12 18 Uhr abends, kurz bevor das Licht ausgeht und Zt 18 Mitternacht bedeuten. Vergleichend wurden Per2-Mutanten (*Period2^{Brdm1}*) zu denselben Zt-Zeitpunkten untersucht.

Dabei wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten isolierte synaptische Vesikel (LP2-Fraktion) wie unter 4.1.2 beschrieben präpariert. Anschließend erfolgte die chemische Quervernetzung analog der Beschreibung unter 4.6. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von SDS-Gelelektrophorese und Western Blot.

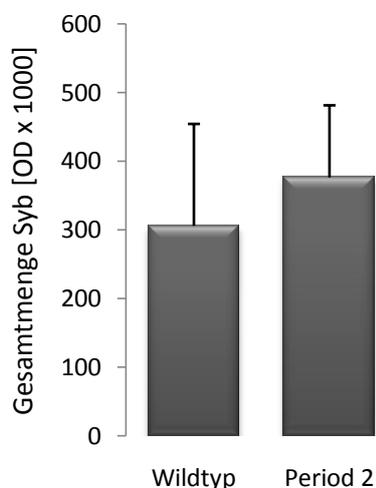
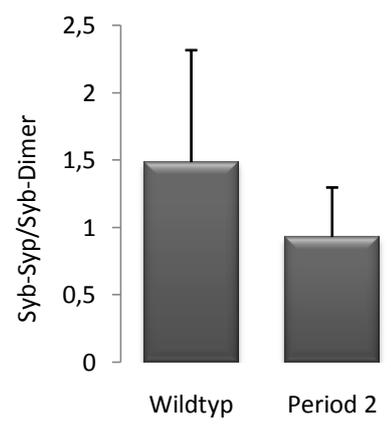
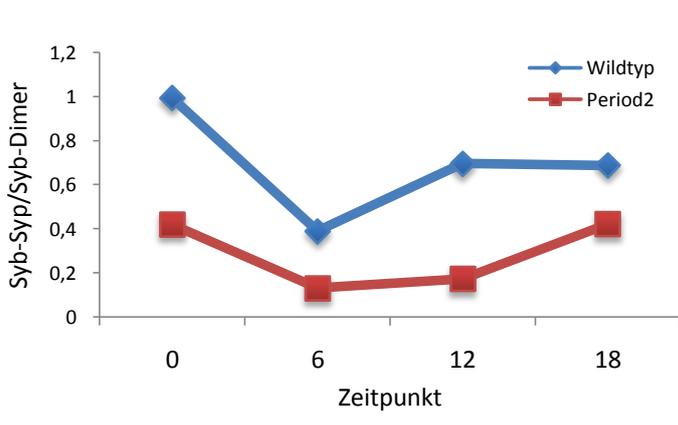
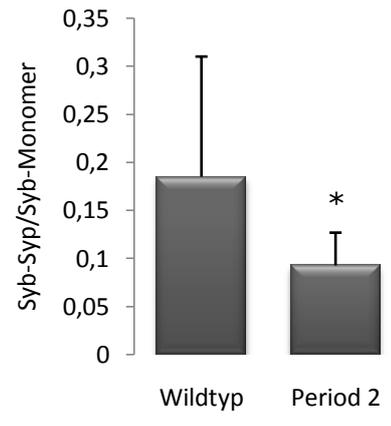
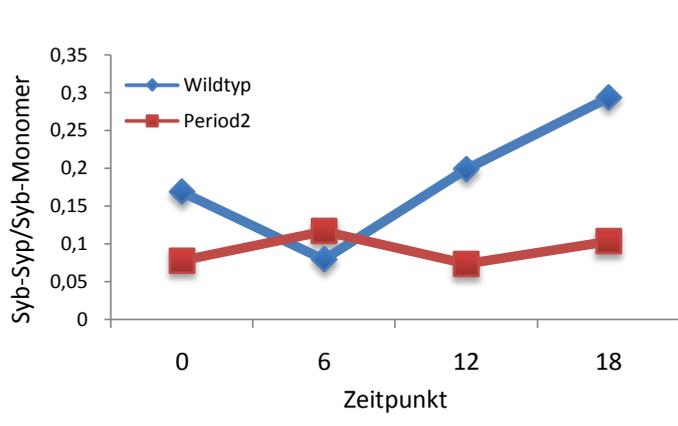
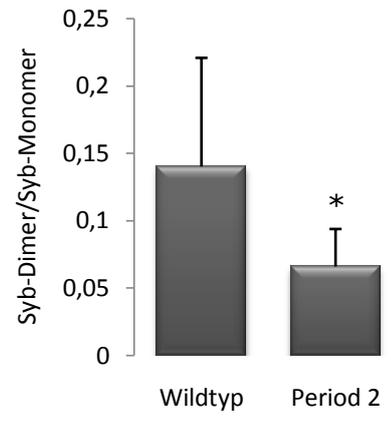
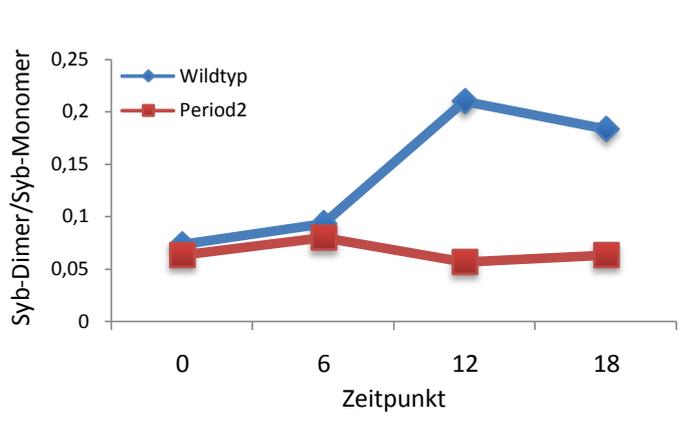
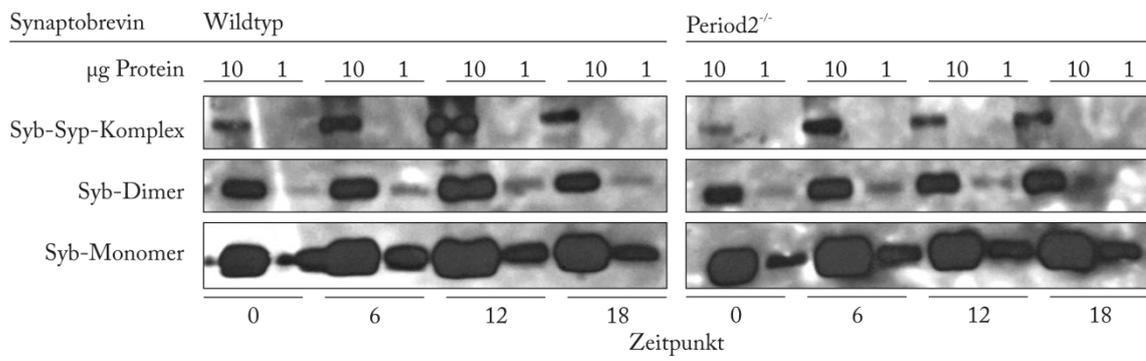


Abb. 46 Proteinmenge Syb

Gezeigt ist die Gesamtproteinmenge Synaptobrevins in Wildtypmäusen und Per2-Deletionsmutanten ($n=3$). Die Gesamtproteinmenge ergibt sich als Summe aus den Lichtintensitäten der Signale (optische Dichte) für Syb-Monomer, Syb-Dimer und Syb-Syp-Komplex.



5. Ergebnisse

Abb. 47 Syb-Analyse zirkadianer Proben aus WT/Per2^{Brdm}-Mäusen

Zu den jeweiligen Tageszeiten (Zt 0, 6, 12 und 18) wurden isolierte synaptische Vesikel aus Wildtypmäusen bzw. Period2^{Brdm}-Mäusen frisch präpariert und in je 100 µl eigenen Überstandes (LS2) resuspendiert. Anschließend wurde mit Hilfe von DSS (1 mM) chemisch quervernetzt. Nach einer Inkubation bei 37°C für 45 Min. wurde die Reaktion mit Tris-HCl-Lösung (100 mM) gestoppt und es erfolgte eine weitere Inkubation für 30 Min. bei Raumtemperatur und 300 rpm. Dann wurden die Proben mit Laemmli-Probenpuffer (ohne DTT-Zusatz) versetzt. Die weitere Analyse erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot.

Bezogen auf die Synaptobrevin-Proteingesamtmenge zeigt sich, dass diese bei Per2-Deletionsmutanten im Gegensatz zu Wildtypmäusen tendenziell erhöht ist (vgl. Abb. 46). Bildet man das Verhältnis von Synaptobrevin-Dimer zu Synaptobrevin-Monomer, so ergibt sich ein signifikant erhöhtes Verhältnis bei Wildtypmäusen gegenüber Per2-Deletionsmutanten (vgl. Abb. 47). Hier scheint eine Regulation zwischen Tag- und Nacht-Rhythmus statt zu finden. Der Graph zeigt einen Anstieg des Verhältnisses an Wildtypmäusen bei Zt 12 und Zt 18. In Per2-Deletionsmutanten findet diese Regulation nicht statt.

Betrachtet man das Verhältnis von Syb-Syp-Komplex zu Synaptobrevin-Monomer, so ist es auch hier in signifikanter Weise in Per2-Deletionsmutanten kleiner gegenüber Wildtypmäusen. Der Graph zeigt zu den Zeitpunkten Zt 12 und Zt 18 einen Anstieg bei Wildtypmäusen, während bei den Per2-Deletionsmutanten keine Regulation erfolgt. Bezieht man den Syb-Syp-Komplex auf das Synaptobrevin-Dimer, so ist auch hier tendenziell zu erkennen, dass dieses Verhältnis bei Wildtypmäusen im Vergleich zu Per2-Deletionsmutanten höher ist.

Die Auswertung für Synaptophysin erfolgte analog der Beschreibung aus dem vorherigen Abschnitt, mit der Ausnahme, dass anstelle von Synaptobrevin Synaptophysin untersucht wurde. Als erstes wurde die Gesamtproteinmenge an Synaptophysin ermittelt.

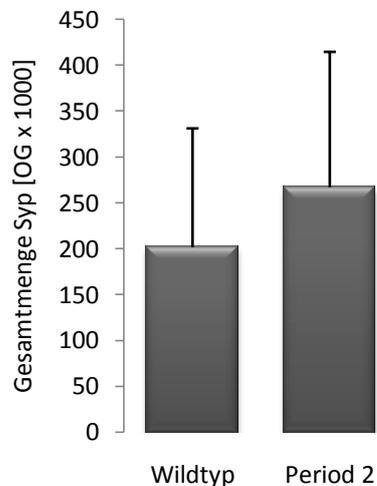


Abb. 48 **Proteinmenge Syp**

Gezeigt ist die Gesamtproteinmenge Synaptophysins in Wildtypmäusen und Period2-Deletionsmutanten (je $n=3$). Die Gesamtproteinmenge ergibt sich als Summe aus den Lichtintensitäten der Signale (optische Dichte) für Syp-Monomer, Syp-Dimer und Syb-Syp-Komplex.

Für die Gesamtproteinmenge an Synaptophysin ergibt sich ein im Vergleich zu Synaptobrevin-Proteing Gesamtmenge umgekehrtes Bild. Es findet sich mehr Synaptophysin in Period2-Deletionsmutanten als in Wildtypmäusen (vgl. Abb. 48). Allerdings ist diese höhere Synaptophysin-Proteinmenge der Per2-Deletionsmutanten nicht signifikant, sondern tendenziell.

Im Folgenden wurden wie bereits für Synaptobrevin im vorherigen Abschnitt geschehen, die Verhältnisse von Synaptophysin-Dimer zu Synaptophysin-Monomer sowie von Syb-Syp-Komplex zu Synaptophysin-Monomer gebildet und quantifiziert.

5. Ergebnisse

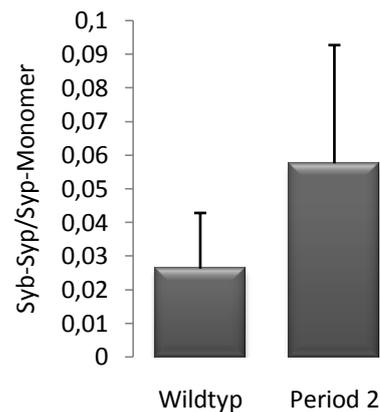
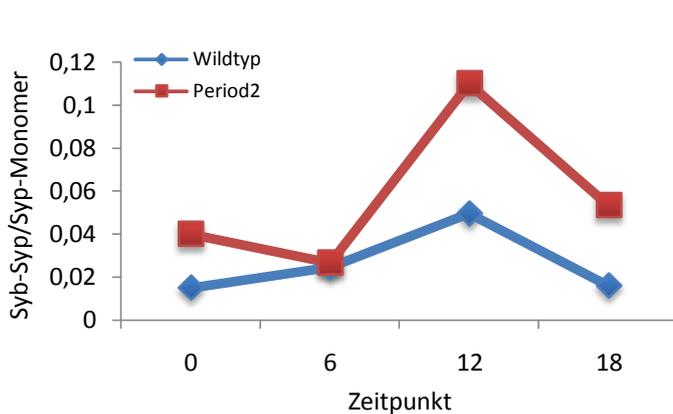
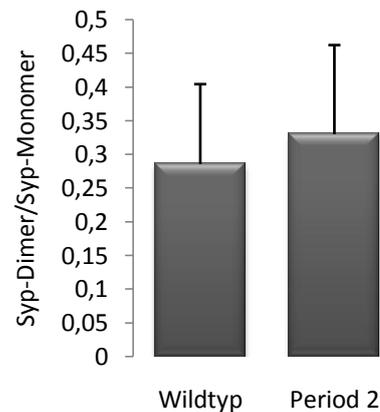
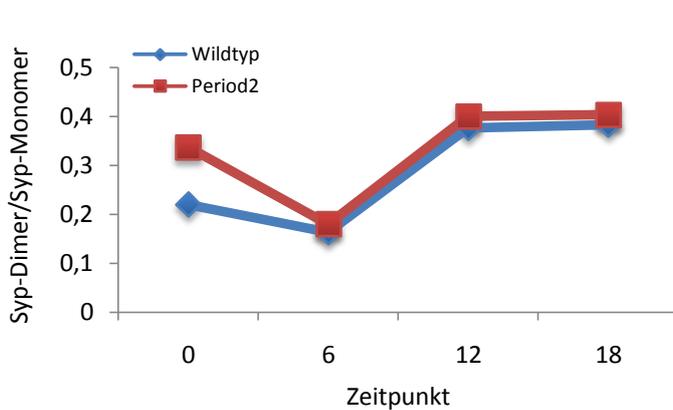
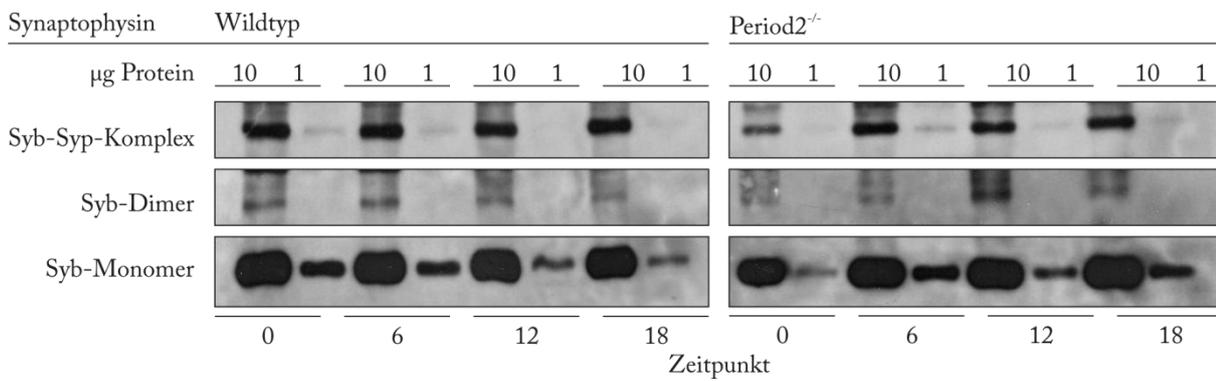


Abb. 49 Syb-Analyse zirkadianer Proben aus WT/Per2^{Brdm}-Mäusen

Zu den jeweiligen Tageszeiten (Zt 0, 6, 12 und 18) wurden synaptische Vesikel (LP2-Fraktion) aus Wildtypmäusen bzw. Period2^{Brdm}-Mäusen frisch präpariert und in je 100 µl eigenen Überstandes (LS2) resuspendiert. Anschließend wurde mit Hilfe von DSS (1 mM) chemisch quervernetzt. Nach einer Inkubation bei 37°C für 45 Min. wurde die Reaktion mit Tris-HCl-Lösung (100 mM) gestoppt und es erfolgte eine weitere Inkubation für 30 Min. bei Raumtemperatur und 300 rpm. Dann wurden die Proben mit Laemmli-Probenpuffer (ohne DTT-Zusatz) versetzt. Die weitere Analyse erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot.

Bei Betrachtung des Verhältnisses von Synaptophysin-Dimer zu Synaptophysin-Monomer fällt auf, dass dieses in Wildtypmäusen gegenüber Per2-Deletionsmutanten höher ist. Allerdings ist dies eher tendenziell und nicht signifikant. Der Graph zeigt einen ähnlichen Verlauf über die Zeitgeben für Wildtypmäuse und Per2-Mäuse. Lediglich bei Zt 0 liegt das Verhältnis Synaptophysin-Dimer zu Synaptophysin-Monomer bei Per2^{Brdm1}-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen höher. Das Verhältnis von Syb-Syp-Komplex zu Synaptophysin-Monomer ist in Per2-Deletionsmutanten höher im Vergleich zu Wildtypmäusen, wenn auch lediglich tendenziell. Besonders bei Zt 12 und Zt 18 liegt das Verhältnis von Syb-Syp-Komplex zu Synaptophysin-Monomer bei Per2^{Brdm1}-Mäusen oberhalb von jenem in Wildtypmäusen.

Diese Untersuchungen zeigen, dass der Syb-Syp-Komplex in Per2-Mutanten einer zirkadianen Rhythmik unterliegt die in den Wildtypmäusen nicht vorhanden ist. Womöglich wird diese Regulation erst durch die Wegnahme eines clock-Gens offensichtlich. Allerdings müssten weiterführende Versuche diese Beobachtungen bestätigen. Zusätzlich könnten dabei Dunkel-adaptierte Mäuse (Wildtypmäuse und Per2-Mutanten) analysiert werden.

6 Diskussion

6.1 Ergebnisse im Überblick

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Frage nach der physiologischen Bedeutung Synaptophysins für die Erhaltung der Vesikelfunktionen, Transmitterspeicherung, Membranfusionen und Endozytose. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand dabei die Interaktion Synaptobrevins mit Synaptophysin. Neben der Erfassung von Faktoren die zu einer Assoziation bzw. Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes führen, sollten auch Synaptophysin-Deletionsmutanten näher charakterisiert werden. Aufgrund eigener Vorarbeiten ergab sich auch die Frage, inwieweit der Syb-Syp-Komplex selbst einer Regulation unterliegt. Hierzu wurde die Interaktion Synaptobrevins mit Synaptophysin im Rahmen zirkadianer Rhythmik in Wildtyp- und *Peroid2^{Bdrn1}*-Mäusen zu unterschiedlichen Zeiten bestimmt und miteinander verglichen.

Methodische Grundlage der vorliegenden Arbeit waren Immunpräzipitation, meist mit gegen Synaptobrevin bzw. Synaptophysin gerichtetem Antikörper und chemische Quervernetzung mit DSS. Synaptosomen (P2-Fraktion) bzw. synaptische Vesikel (LP2-Fraktion) wurden durch subzelluläre Fraktionierung aus Ratten- bzw. Mäusegehirnen isoliert. Bei diesem Vorgang werden synaptische Vesikelproteine, ausgehend vom homogenisierten Gehirn über Synaptosomen hin zu isolierten synaptischen Vesikeln, in den einzelnen subzellulären Kompartimenten angereichert.

Bereits Reisinger und Kollegen konnten eine Ca^{2+} -induzierte Beeinträchtigung der Interaktion Synaptobrevins mit Synaptophysin zeigen (Reisinger *et al.*, 2004). Eine innerhalb dieser Arbeit durchgeführte Dosis-Wirkung-Abhängigkeit zeigte, dass die Verminderung der Interaktion zwischen Synaptobrevin und Synaptophysin unabhängig von der eingesetzten Ca^{2+} -Konzentration ist. Dabei wurden Ca^{2+} -Konzentrationen von 1 μM bis zu 100 μM verwendet. Die Ca^{2+} -abhängige Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes erfolgt indirekt und benötigt stets die Anwesenheit

synaptosomalen Zytosols. An isolierten synaptischen Vesikeln (LP2-Fraktion) ohne synaptosomalem Zytosol erfolgt keine Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes. Wahrscheinlich sind am Dissoziations- wie auch am Assoziationsvorgang zytosolische Faktoren beteiligt (Becher *et al.*, 1999b). Eine genaue Analyse dieser zytosolischen Faktoren gelang in der vorliegenden Arbeit nicht, allerdings erfolgte eine erste Charakterisierung. Hitze (95 °C für mehrere Minuten) und Kälte (einfrieren und wieder auftauen) wirken sich nicht auf die Funktionalität des Syb-Syp-Komplex dissoziierenden, Ca^{2+} -sensitiven, zytosolischen Faktors (F_D) aus. Das Molekulargewicht dieses Faktors beträgt mehr als 10 kDa und weniger als 30 kDa. Bei Anreicherung synaptosomalen Zytosols (>30 kDa) erfolgt eine Ca^{2+} -unabhängige Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes. Vermutlich ist eine weitere, im Zytosol lokalisierte Komponente hierfür verantwortlich.

Mit Hilfe von SPANs („snake presynaptic PLA2 neurotoxins“), kann die Interaktion zwischen Synaptobrevin und Synaptophysin selektiv gehemmt werden. Auf die Interaktion Synaptobrevins mit seinen SNARE-Partnern (SNAP-25, Syntaxin) haben SPANs hingegen keinen Einfluss. Als SPANs wurden bei den Untersuchungen Taipoxin (*Oxyuranus scutellatus*) sowie Paradoxin (*Oxyuranus microlepidotus*) verwendet. Im Laufe der Untersuchungen stellte sich Taipoxin, bezogen auf die Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes, als das potentere SPAN heraus. Die SPAN-bedingte Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes konnte dabei sowohl an Synaptosomen (P2-Fraktion) als auch an synaptischen Vesikeln mit synaptosomalem Zytosol (LS1-Fraktion) gezeigt werden. An isolierten, synaptischen Vesikeln (LP2-Fraktion) hingegen kam es unter SPAN-Einfluss zu keiner Verminderung der Syb-Syp-Interaktion. Dem synaptosomalen Zytosol zugefügte Ca^{2+} -Ionen verstärken den jeweiligen SPAN-Effekt nicht, sondern wirken additiv (vgl. Abb. 27, Abb. 30 und Abb. 32).

Unter Einfluss von Taipoxin bzw. Paradoxin (Intoxikation der LS1-Fraktion) ist die Aufnahme von Neurotransmittern über VMAT und VGLUT signifikant vermindert. Taipoxin hemmt dabei die Neurotransmitter-Aufnahme im Vergleich mit Paradoxin stärker. Ca^{2+} beeinflusst die Taipoxin- bzw. Paradoxin-spezifische Verminderung der Neurotransmitter-Aufnahme nicht und hat somit direkt keinen Einfluss auf die Neurotransmitter-Aufnahme.

Für Synaptophysin und VGLUT1 kommt es unter Taipoxin- bzw. Paradoxin-Einfluss zu einer Umverteilung innerhalb der Vesikelmembran bedingt durch eine Aufhebung der „Lipid Raft“-Strukturen. Ähnliche Effekte können auch mit β -MCD gezeigt werden. Es ist bekannt, dass β -MCD Cholesterol aus der Membran extrahiert (Gimpl et al., 1997) und diese Cholesterolextraktion zu einer Aufhebung von „Lipid Raft“-Strukturen führt. Im Gegensatz zu Synaptophysin und VGLUT1 wird Synaptobrevin in seiner membranären Verteilung weder von Taipoxin noch von Paradoxin beeinflusst. Ca^{2+} -Ionen haben keinen Einfluss auf die membranäre Verteilung von Synaptophysin und Synaptobrevin, für VGLUT1 scheint es allerdings zu einer Umstrukturierung unter Ca^{2+} -Einfluss zu kommen.

Einen Hinweis für eine physiologische Bedeutung von Synaptophysin zeigen Untersuchungen der Neurotransmitter-Aufnahme an Synaptophysin-Deletionsmutanten. So nehmen diese im Vergleich zu Wildtypmäusen vermehrt Serotonin und Glutamat auf.

Anhand zirkadianer Untersuchungen, bei denen neben Wildtypmäusen auch $\text{Period2}^{\text{Brdm1}}$ -Mäuse Verwendung fanden, konnte gezeigt werden, dass der Syb-Syp-Komplex einer Regulation innerhalb des 24-Stunden-Zyklus unterliegt. Besonders die $\text{Period2}^{\text{Brdm1}}$ -Mäuse zeigen Auffälligkeiten in der Regulation des Syb-Syp-Komplexes. Bei einem Vergleich von Wildtypmäusen und $\text{Period2}^{\text{Brdm1}}$ -Mäusen in Bezug auf die Gesamtproteinmenge, zeigt sich, dass $\text{Period2}^{\text{Brdm1}}$ -Mäuse jeweils mehr Synaptobrevin und Synaptophysin haben. In Wildtypmäusen liegt Synaptophysin vermehrt als Monomer, Synaptobrevin vermehrt als Dimer bzw. im Syb-Syp-Komplex vor. In $\text{Period2}^{\text{Brdm1}}$ -Mäusen liegt Synaptophysin vermehrt als Dimer oder im Syb-Syp-Komplex, Synaptobrevin hingegen vermehrt als Monomer und ggf. als Dimer vor. Die Konsequenz dieser Beobachtungen gilt es in weiterführenden Untersuchungen zu analysieren.

6.2 Synaptophysin im Fokus

Synaptische Vesikel sind in eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie z.B. die Speicherung von Neurotransmittern und Membranfusion eingebunden. Für Exo- und Endozytose sind sie von essentieller Bedeutung (Sudhof, 2000). Aufgrund ihrer vielfältigen, wichtigen Funktionen sind synaptische Vesikel immer wieder Bestandteil von Untersuchungen. Aber nicht nur die in synaptischen Vesikeln gespeicherten Neurotransmitter sind für einen Erhalt ihrer Funktionalität von Bedeutung sondern auch die Integrität der Membranzusammensetzung. Im Laufe der Zeit konnten an der Membran synaptischer Vesikel zahlreiche konservierte Proteinfamilien identifiziert werden (De Camilli & Jahn, 1990). Integrale Membranproteine spielen in diesem Zusammenhang eine große Rolle, wie am Beispiel Synaptobrevins (vgl. 1.5.1) zu sehen ist. Ein weiteres, integrales Membranprotein synaptischer Vesikel ist Synaptophysin, das ca. acht Prozent aller synaptischen Vesikelproteine ausmacht (Rehm *et al.*, 1986), (Takamori *et al.*, 2006). Auf jedem synaptischen Vesikel befinden sich durchschnittlich 30 Kopien von Synaptophysin. Lediglich ein Protein kommt mit 70 Kopien häufiger vor – Synaptobrevin (Takamori *et al.*, 2006). Kommt Synaptophysin eine ähnlich wichtige Bedeutung wie z.B. Synaptobrevin zu?

Synaptophysin gehört, wie Synaptoporin (Knaus *et al.*, 1990), (Fykse & Fonnum, 1996), Pantophysin und Mitsugumin (Janz & Sudhof, 1999), (Leube *et al.*, 1994) zu der Familie der Physin-Proteine. Eine genaue Beschreibung Synaptophysins ist unter 1.5.2 zu sehen. Obwohl die Proteine der Physin-Familie seit geraumer Zeit bekannt sind, konnte bis heute keine funktionelle Bedeutung für den Vesikelzyklus (Exozytose und Endozytose) gefunden werden. Allerdings gibt es Anhaltspunkte, dass sie von Bedeutung für den Vesikeltransport sind (Janz & Sudhof, 1999). Physiologische Untersuchungen konnten zeigen, dass Synaptophysin im Rahmen von Schizophrenie beeinflusst und zellulär umverteilt wird (Eastwood & Harrison, 2001). Allerdings konnte kein Zusammenhang zwischen dieser Beobachtung und dem Krankheitsverlauf hergestellt werden.

Untersuchungen an Synaptophysin-Deletionsmutanten zeigten keine nennenswerten phänotypischen Auffälligkeiten. Folglich wurde postuliert,

dass Synaptophysin innerhalb der Endo- bzw. Exozytose keine konkrete Funktion habe (Eshkind & Leube, 1995), (McMahon *et al.*, 1996). Die Untersuchungen an Synaptophysin-Deletionsmutanten belegten weiterhin, dass Synaptophysin selbst nicht essentiell sein kann. Es wurde zunächst angenommen, dass möglicherweise Synaptophysin-Isoformen, (SCAMPS = „secretory carrier-associated membrane proteins“), Synaptoporin (Knaus *et al.*, 1990), (Fykse & Fonnum, 1996) oder Synaptogyrin (Kedra *et al.*, 1998) Aufgaben Synaptophysins übernehmen könnten. Untersuchungen von Bai und Kollegen, die an Synaptophysin-Deletionsmutanten im Vergleich zu Wildtypmäusen keine Veränderungen von Proteinkonzentrationen feststellen konnten, widersprechen allerdings dieser Aussage (Bai *et al.*, 2006). Des Weiteren zeigen Synaptophysin-Deletionsmutanten von *Caenorhabditis elegans*, dass Synaptophysin für die Synaptogenese oder grundlegende synaptische Funktionalität nicht notwendig zu sein scheint (Abraham *et al.*, 2006).

Sollte ein so häufig vorkommendes Protein wie Synaptophysin tatsächlich ohne Relevanz für synaptische Prozesse sein?

Für die Beteiligung Synaptophysins an der Endozytose spricht, dass der größte Synaptophysin-Bindungspartner auf synaptischen Vesikeln, Synaptobrevin, in einen endozytotischen Prozess eingebunden ist, bei dem es zu einer schnellen Rezyklierung synaptischer Vesikel nach vorangegangener Exozytose kommt (Dittman & Kaplan, 2006). Ungeachtet der genauen Funktion Synaptophysins muss es demnach an einigen Vorgängen des vesikulären Zyklus teilhaben. Auch zeigte sich, dass Synaptophysin-haltige Neurone eher in der Lage sind, Synapsen zu bilden als entsprechende Neurone ohne Synaptophysin (Tarsa & Goda, 2002).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Morphologie von retinalen Photorezeptoren bei Synaptophysin-Synaptogyrin-Doppeldeletionsmutanten zeigten einen Defekt in der Endozytose. So konnte in den Sehstäbchen dieser Synaptophysin/Synaptogyrin Deletionsmutanten, als Neurone ohne detektierbaren Anteil Synaptoporins, eine aktivitätsabhängige Veränderung der Anzahl synaptischer Vesikel nachgewiesen werden (Spiwox-Becker *et*

al., 2001), (Valtorta *et al.*, 2004). Des Weiteren wurde ein Anstieg von Clathrin-umhüllten Vesikeln beobachtet, was eine selektive Inhibierung der Clathrin-unabhängigen Endozytose vermuten lässt (Spiwox-Becker *et al.*, 2001).

Die Identifizierung Synaptophysins als ein Mitglied der MARVEL-Familie („MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link“) legt die Vermutung nahe, dass es eine Rolle bei der Fusion und der Rezyklierung haben könnte. Während Synaptophysin physiologisch selbst nicht essentiell ist, so ist es doch für die Feinabstimmung bei der Freisetzung von Neurotransmittern wichtig und steht somit im Zusammenhang mit Erinnerungs- und Lerneffekten wie z.B. LTP. Diese Rückschlüsse zogen Evans und Cousin nach der Beobachtung, dass Synaptophysin nach LTP-Stimulation phosphoryliert wird (Evans & Cousin, 2005). Elektrophysiologische Untersuchungen von Synaptophysin-Synaptogyrin-Doppeldeletionsmutanten zeigten eine starke Reduktion von „short-term“- und „long-term“- Plastizität, womit eine Funktion von Synaptophysin bei plastischen Veränderungen im adulten Gehirn aufgezeigt wurde (Janz & Sudhof, 1999), (Valtorta *et al.*, 2004). Interessanterweise war die Neurotransmitter-Freisetzung dabei nicht beeinflusst. Aktuelle Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Schmitt und Kollegen stellten an Synaptophysin-Deletionsmutanten Verhaltensänderungen und Defizite beim Lernen fest (Schmitt *et al.*, 2009).

Trotz der hohen Gesamtproteinmenge Synaptophysins und eines besseren Verständnisses der Regulation der Exozytose bleibt die konkrete physiologische Bedeutung Synaptophysins weiterhin unklar.

Im Folgenden werden die in der Literatur beschriebenen Untersuchungsergebnisse in einer Tabelle zusammengefasst. Dabei wird lediglich auf eine beschriebene Relevanz Synaptophysins eingegangen.

Quelle	Relevanz	Zusammenhang (Syp)
(Calakos & Scheller, 1994)	+	Assoziation mit Synaptobrevin
(Eshkind & Leube, 1995)	-	Kein essentielles Protein
(McMahon <i>et al.</i> , 1996)	-	Keine phänotypischen Veränderungen in Syp ^{-/-} -Mäusen
(Janz & Sudhof, 1999)	+	Vesikeltransport
(Becher <i>et al.</i> , 1999a)	+	Neuronaler Marker (Syb-Syp-Komplex)
(Thiele <i>et al.</i> , 2000)	+	Cholesterin bindendes Protein
(Spiwox-Becker <i>et al.</i> , 2001)	+	Relevanz für Endozytose
(Eastwood <i>et al.</i> , 2001)	+	Syp im Rahmen von Schizophrenie
(Tarsa & Goda, 2002)	+	Synapsenwachstum
(Hinz <i>et al.</i> , 2001)	+	Modulator der Membranfusion
(Evans & Cousin, 2005)	+	Freisetzung von Neurotransmittern
(Abraham <i>et al.</i> , 2006)	-	Nicht notwendig für Synaptogenese
(Dittman & Kaplan, 2006)	+	Syp mit Beteiligung an Endozytose
(Schmitt <i>et al.</i> , 2009)	+	Verhalten und Lernen
Eigene Untersuchungen	+	Neurotransmitter-Aufnahme bei Syp ^{-/-} -Mäusen erhöht

Tab 4 Überblick über die in der Literatur beschriebenen Bedeutung für Syp

6.3 Der Synaptobrevin-Synaptophysin-Komplex

Die physiologische Relevanz der Interaktion Synaptobrevins mit Synaptophysin ist bislang noch wenig verstanden. Die bedeutendste Frage in diesem Zusammenhang ist, inwiefern der Syb-Syp-Komplex als ein möglicher Modulator der Verfügbarkeit des für den SNARE-Komplex benötigten Synaptobrevins fungieren kann.

Die Interaktion Synaptobrevins mit Synaptophysin erfolgt über dessen c-terminale Transmembranregion (Edelmann *et al.*, 1995), (Yelamanchili *et al.*, 2005). Mit Synaptophysin interagierendes Synaptobrevin steht nicht für den SNARE-Komplex zur Verfügung. Die Dissoziation Synaptobrevins von Synaptophysin könnte ein möglicher Aktivierungsschritt Synaptobrevins für die Bildung des SNARE-Komplexes sein (Edelmann *et al.*, 1995). Die Interaktion zwischen Synaptobrevin und Synaptophysin kann mit Hilfe verschiedenster Reagenzien gehemmt werden. So führen hohe Salzkonzentrationen sowie reduzierende Reagenzien zu einer Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes (Reisinger *et al.*, 2004). Ca^{2+} -Ionen sowie SPANs jeweils in Verbindung mit synaptosomalem Zytosol können ebenfalls die Syb-Syp-Interaktion vermindern (vgl. 6.3.1 und 6.3.2).

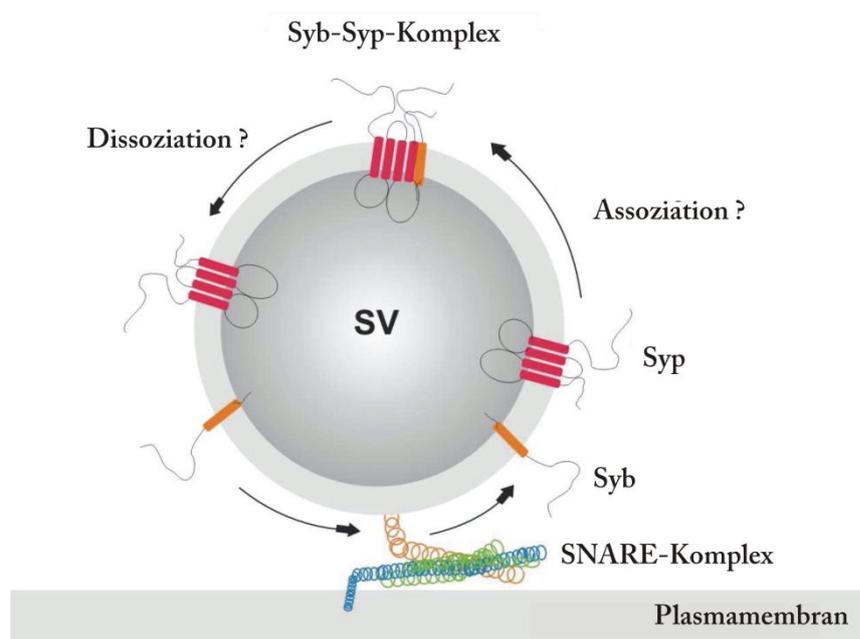


Abb. 50 Schematische Darstellung der Syb-Syp-Interaktion

6.3.1 Charakterisierung der Regulation

Die Interaktion zwischen Synaptobrevin und Synaptophysin ist ein Marker entwicklungs- und stimulationsabhängiger Veränderungen in Synapsen. Auch wenn die Interaktion beider Proteine, ihre Regulation und die Rolle von Synaptophysin bisher noch wenig verstanden sind, so stellt der Syb-Syp-Komplex einen wichtigen, funktionellen Parameter für Synaptogenese und Reifung auf vesikulärer Ebene dar. Bekannt ist, dass der Syb-Syp-Komplex während der neuronalen Entwicklung hochreguliert wird und erst postnatal nachweisbar ist (Becher *et al.*, 1999b), (Becher *et al.*, 1999a). So gelang der Nachweis des Syb-Syp-Komplexes weder im embryonalen Gehirn, noch in neuroendokrinen Zellen. Dies obwohl gezeigt werden konnte, dass Synaptobrevin und Synaptophysin in beiden Geweben auf denselben Vesikeln vorhanden waren. Erst eine Inkubation mit synaptosomalen Zytosol von adulten Gehirnen führte in beiden Geweben zu einer Detektion des Syb-Syp-Komplexes. Es wurde angenommen, dass in adulten Gehirnen eine posttranslationale Modifikation Synaptophysins die Bildung des Syb-Syp-Komplexes induziert (Becher *et al.*, 1999a). Weiterführende Experimente führten zu der Erkenntnis, dass unpalmitoyliertes Synaptobrevin Synaptophysin bindet (Veit *et al.*, 2000). Wahrscheinlich bindet ein kleiner, zytosolischer Faktor (F_A) an Synaptophysin und moduliert sein Bindungsverhältnis mit Synaptobrevin (Becher *et al.*, 1999a). Allerdings waren Versuche mittels MALDI-Analyse nicht in der Lage, zwischen bindendem und nicht-bindendem Synaptophysin zu unterscheiden (Yelamanchili & Ahnert-Hilger, nicht veröffentlicht).

Verschiedenen Arbeitsgruppen gelang es im Laufe der letzten Jahre, Ca^{2+} -Ionen einen Einfluss auf die Interaktion Synaptobrevins mit Synaptophysin nachzuweisen. Dabei induziert Ca^{2+} die Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes. Dies konnte an Synaptosomen (Prekeris & Terrian, 1997), (Daly & Ziff, 2002) und an hippocampalen Neuronen (Reisinger *et al.*, 2004) gezeigt werden. Zu beachten ist, dass bei diesen Versuchen neben Ca^{2+} -Ionen zusätzlich stets synaptosomales Zytosol anwesend war. Diese Beobachtung wurde bedeutend, nachdem es in eigenen Versuchen zunächst nicht gelang, den Syb-Syp-Komplex an isolierten, synaptischen Vesikeln

(LP2-Fraktion) Ca^{2+} -induziert zu dissoziieren. Im Gegensatz dazu führte Ca^{2+} , nach Zugabe zu lysierten Synaptosomen (LS1-Fraktion) zu der in der Literatur beschriebenen Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes. Als möglicher Grund für die unterschiedliche Dissoziierbarkeit des Syb-Syp-Komplexes innerhalb der verschiedenen subzellulären Kompartimente wurde eine zytosolische, Ca^{2+} -abhängige Komponente vermutet. Ca^{2+} beeinflusst folglich nicht direkt die Interaktion zwischen Synaptobrevin und Synaptophysin, sondern aktiviert in einem Ca^{2+} -abhängigen Vorgang einen zytosolischen Faktor, der für die Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes verantwortlich ist (Reisinger *et al.*, 2004). Eigene Untersuchungen bekräftigen diese Aussage. So konnte der Syb-Syp-Komplex an isolierten, synaptischen Vesikeln (LP2-Fraktion) dissoziiert werden, nachdem diese synaptischen Vesikel in ihren eigenen, mit Ca^{2+} -versetzten, Überständen (LS2-Fraktion) resuspendiert wurden. Die Verminderung der Interaktion zwischen Synaptobrevin und Synaptophysin mit physiologischen sowie nicht-physiologischen Ca^{2+} -Konzentrationen waren dabei vergleichbar. Bei der Ca^{2+} -vermittelten Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes handelt es sich demnach nicht um einen disruptiven Mechanismus bedingt durch eine Ionenumverteilung. Ca^{2+} ist demnach eine wichtige Komponente für die Regulation des Syb-Syp-Komplexes.

Die beiden vorherigen Abschnitte zeigen, dass synaptosomales Zytosol sowohl für die Assoziation als auch für die Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes von Bedeutung ist. Für die Assoziation ist ein erst im adultem Gehirn exprimierter, zytosolischer Faktor (F_A) verantwortlich. Dieser bindet an Synaptophysin und ändert vermutlich dessen Bindungsverhältnis mit Synaptobrevin. Aus nicht-bindendem wird bindendes Synaptophysin. Ein weiterer, zytosolischer Faktor (F_D) vermittelt, Ca^{2+} -abhängig, die Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes. In Folge dessen steht frei werdendes Synaptobrevin des Syb-Syp-Komplexes möglicherweise für die Fusion mit seinen SNARE-Partnern zur Verfügung.

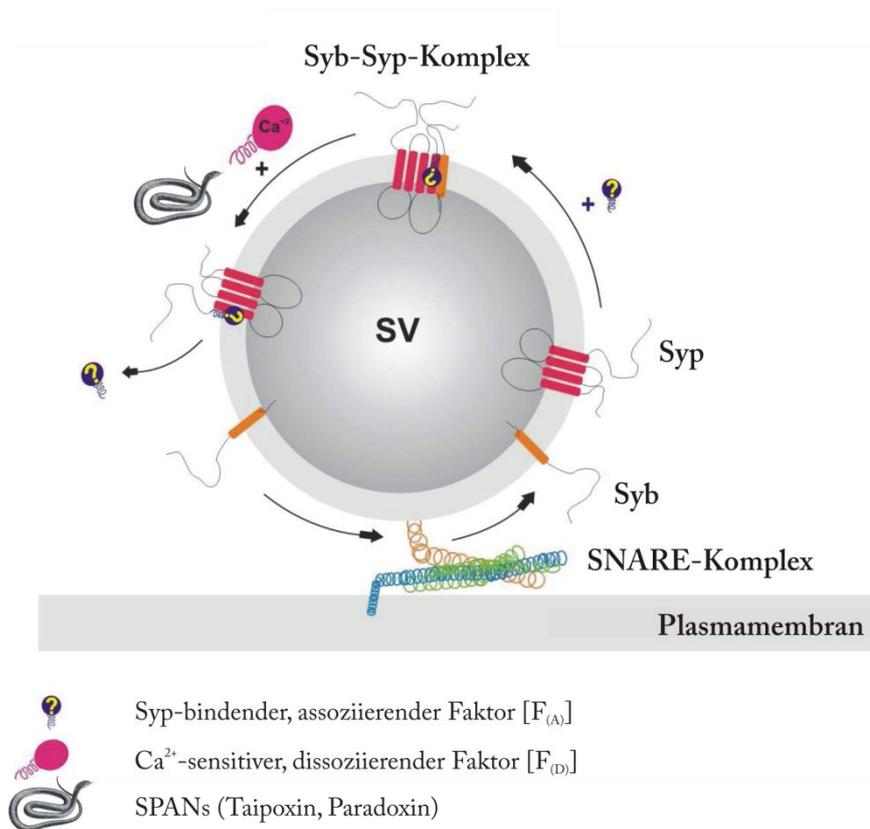


Abb. 51 Schematische Darstellung des Zyklus des Syb-Syp-Komplexes

Sowohl Syb als auch Syp sind eingebettet in die Plasmamembran synaptischer Vesikel. Ein zytosolischer Faktor (F_A) bindet Syp und ändert dessen Bindungsverhältnis. Aus nicht-bindendem Syp wird bindendes Syp. Als Folge dessen kommt es zu einer Assemblierung von Syb und Syp und der Bildung des Syb-Syp-Komplexes. Ein weiterer zytosolischer und Ca^{2+} -sensitiver Faktor (F_D) vermittelt die Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes. In Folge dessen steht freiwerdendes Syb des Syb-Syp-Komplexes für die Fusion mit seinen SNARE-Partnern zur Verfügung. Auch SPANs vermögen den Syb-Syp-Komplex zu dissoziieren. Dieser Vorgang ist Ca^{2+} -unabhängig, benötigt aber die Anwesenheit synaptosomalen Zytosols.

Um was genau könnte es sich bei diesem, den Syb-Syp-Komplex dissoziierenden, zytosolischen Faktor (F_D) handeln? Diese Frage konnte in dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden, allerdings gelang es, mögliche in Frage kommende Proteine einzugrenzen. Die Integrität des zytosolischen Faktors (F_D) wird weder durch Frier- und Auftau-Zyklen noch durch Temperaturen bis zu 95 °C beeinträchtigt (vgl. Abb. 22 und Abb. 23).

In Untersuchungen, in denen LS2 mit Hilfe von „Centricon“-Röhrchen in LS2-Fractionen >30 kDa und <30 kDa (vgl. Abb. 24) bzw. >10 kDa und <10 kDa (vgl. Abb. 25) aufgetrennt wurden, zeigte sich, dass der Ca^{2+} -sensitive, zytosolische Faktor ein Molekulargewicht von mehr als zehn

Kilodalton und weniger als 30 kDa haben muss. Darüber hinaus zeigen diese Analysen, dass durch die „Centricons“ aufkonzentriertes, synaptosomales Zytosol (LS2 >30 kDa bzw. LS2 >10 kDa), Ca^{2+} -unabhängig, die Interaktion zwischen Synaptobrevin und Synaptophysin vermindern. Dabei ist der Syb-Syp-dissoziierende Effekt bei LS2-Fractionen >30 kDa im Vergleich zu denen >10 kDa stärker.

In der Literatur finden sich mehrere postulierte Synaptophysin-Interaktionspartner (vgl. 1.5.2). So sind Interaktionen jeweils zwischen Synaptophysin und der vesikulären Protonenpumpe V-ATPase (Thomas & Betz, 1990), (Galli *et al.*, 1996), (Carrion-Vazquez *et al.*, 1998), Myosin V (Prekeris & Terrian, 1997), Dynamin I (Daly *et al.*, 2000), (Daly & Ziff, 2002) und indirekt mit Synaptotagmin 1 beschrieben worden. In einer aktuellen Studie von Ito und Kollegen wird Sept8 als ein den Syb-Syp-Komplex kontrollierendes Protein beschrieben. So wird durch die Bindung von Sept8 an Synaptobrevin die Interaktion Synaptobrevins mit Synaptophysin unterdrückt (Ito *et al.*, 2009). Septine mit einem Molekulargewicht zwischen 40 und 60 kDa sind Mitglieder der hochkonservierten Septin-Proteinfamilie (Blaser *et al.*, 2003). Die Ergebnisse von Ito und Kollegen in Kombination mit eigenen Untersuchungen synaptosomalen Zytosols lassen den Schluss zu, dass möglicherweise Sept8 für die oben beschriebene, Ca^{2+} -unabhängige Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes an synaptischer Vesikel (LP2) nach Resuspendierung in LS2 >30 kDa (vgl. Abb. 24) verantwortlich sein könnte. Allerdings gelang es innerhalb dieser Arbeit nicht dieses nachzuweisen.

Doch um was könnte es sich bei dem Ca^{2+} -abhängigen, zytosolischen Faktor (F_D) handeln? Könnte Calmodulin (CaM) mit einem Molekulargewicht von 17 kDa entscheidend für die Ca^{2+} -abhängige Syb-Syp-Komplexdissoziation sein? Es ist bekannt, dass Calmodulin Sensor des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels und hitzestabil ist. Steigt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration auf mehr als 500 nM an, so erfolgt die Aktivierung von Calmodulin durch Ca^{2+} -Bindung. Für Calmodulin ist eine Interaktion mit mehreren Partnern in der Literatur beschrieben. So bindet es Ca^{2+} -abhängig an die c-terminale Region des SNARE-Motivs von Synaptobrevin (Quetglas *et al.*, 2002). Diese Bindung könnte ggf. zu einer Modulation im Bindungsverhältnis von

Synaptobrevin führen (de Haro *et al.*, 2004). Allerdings behaupten Siddiqui und Kollegen, dass die Bindung von Ca^{2+} -Calmodulin an Synaptobrevin keinen Einfluss auf die Interaktion Synaptobrevins mit anderen Proteinen habe und schließen somit eine physiologische Bedeutung der Interaktion zwischen Calmodulin und Synaptobrevin aus (Siddiqui *et al.*, 2007).

Ein weiteres Beispiel für eine Calmodulin-Interaktion wäre die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Kinase II (CaM-Kinase II), welche viele Proteine phosphoryliert und u.a. Ionenpermeabilität, Synthese bzw. Freisetzung von Neurotransmittern beeinflusst. Die CaM-Kinase II kommt ubiquititär im Zytosol eukaryotischer Zellen vor (Hemmings *et al.*, 1986), (Leenders & Sheng, 2005). Im Nervensystem stellt diese Kinase 0,5-1 Prozent der Gesamtproteinmenge dar. Die Interaktion zwischen CaM-Kinase II und Synapsin1 ist in der Literatur beschrieben. Synapsin1 ist ein mit der synaptischen Vesikelmembran assoziiertes Protein und in die Langzeitmodulation der synaptischen Effizienz involviert indem es an der Neurotransmitter-Freisetzung während der Neuroexozytose beteiligt ist (Hazuka *et al.*, 1999), (Wang, 2008). Weiterführende Versuche müssen zeigen, ob Calmodulin tatsächlich im Zusammenhang mit der Ca^{2+} -induzierten Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes steht. Dies könnte u.a. mit Hilfe von Calmodulin-Inhibitoren oder einer Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Calmodulin gelingen. Innerhalb dieser Arbeit gelang es nicht, Calmodulin als den beschriebenen zytosolischen Faktor zu identifizieren. Eine weitere Eingrenzung möglicher Kandidaten könnte auch mittels MALDI-Analyse der durch „Centricons“ aufgetrennten LS2-Fractionen erfolgen.

Abschließend gehen wir von einem dynamischen Gleichgewicht zwischen assoziierenden und dissoziierenden Faktoren aus. Der assoziierende Faktor (F_A) bindet und moduliert Synaptophysin, worauf nicht-bindendes Synaptophysin zu bindendem Synaptophysin wird. Es kommt zur Assemblierung des Syb-Syp-Komplexes. Der zytosolische, 10-30 kDa große Dissoziationsfaktor (F_D) erfährt nach Ca^{2+} -Einstrom eine Modulation seiner Aktivität und vermittelt die Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes. In Folge zellulärer Prozesse kann das Gleichgewicht hin zur Bildung des Syb-Syp-Komplexes bzw. zur Dissoziation desselben verschoben werden.

6.3.2 SPANs-Wirkung

Den ersten Hinweis auf die Funktion der SNARE-Proteine gaben clostridiale Neurotoxine, welche je nach Toxin eines der drei SNARE-Proteine spaltet und auf diese Weise die Exozytose zum Erliegen bringen (Montecucco & Schiavo, 1994), (Ahnert-Hilger & Bigalke, 1995). Zu den clostridialen Neurotoxinen zählen neben den sieben Botulinumtoxinen (BoNT) auch das Tetanustoxin (TeNT). Dabei handelt es sich um typische Zwei-Domänen-Toxine. Die leichte Kette („light chain“, LC) enthält die enzymatische Peptidase mit einem der SNARE-Proteine spezifischem Substrat. Die schwere Kette („heavy chain“ HC) ist für die Aufnahme des Toxins in das Neuron entscheidend. Diese Toxine wurden schon lange als Werkzeug für die Untersuchung des synaptischen Exozytoseapparates genutzt (Schiavo *et al.*, 1994a). Es ist bekannt, dass TeNT die Neurotransmitter-Freisetzung an Synapsen des zentralen Nervensystem (ZNS) hemmt, während BoNT die Freisetzung von Acetylcholine (ACh) inhibiert. Beide Toxine beeinflussen eine essentielle neuronale Funktion – die Neuroexozytose (Brooks *et al.*, 1955), (Burgen *et al.*, 1949), (Rossetto *et al.*, 2006), (Schiavo *et al.*, 2000).

Neben den clostridialen Neurotoxinen werden auch präsynaptisch wirkende Neurotoxine mit Phospholipase A₂-Aktivität (SPANs) für die Untersuchung der Neuroexozytose verwendet. SPANs sind die Hauptbestandteile des Giftes der Schlangenfamilien *Crotalidae*, *Elapidae*, *Hydrophiidae* und *Viperidae* und spielen eine entscheidende Rolle bei der Vergiftung der Beutetiere, indem sie die Neurotransmitter-Freisetzung der Nerven-terminalien blockieren (Prasarnpun *et al.*, 2005). Die durch SPANs induzierten Veränderungen in Kinetik der Exozytose und Morphologie der präsynaptischen Plasmamembran lassen vermuten, dass sie die Fusion von synaptischen Vesikeln mit der präsynaptischen Membran vermitteln und gleichzeitig ihre Regeneration inhibieren (Montecucco & Rossetto, 2000). Für Taipoxin ist beschrieben, dass es ein 49 kDa großes Ca²⁺-bindendes Protein bindet. Dieses ist am endoplasmatischen Reticulum lokalisiert (Dodds *et al.*, 1997), (Kirkpatrick *et al.*, 2000) und konnte in chromaffinen Zellen immundetektiert werden (Neco *et al.*, 2003). Unter 1.7.2 ist der

Aufbau von SPANs beschrieben. Mit Hilfe dieser Phospholipase A2-aktiven, präsynaptisch wirkenden Neurotoxine sollte eine Charakterisierung vesikulärer Parameter durchgeführt werden, mit dem Syb-Syp-Komplex als Anzeigesystem.

Der genaue molekulare Mechanismus der präsynaptisch wirkenden Neurotoxine mit Phospholipase A2-Aktivität bleibt bis heute unklar (Kini *et al.*, 1997). Neuere Studien belegen, dass die initiale Phase der Vergiftungsreaktion an der präsynaptischen Plasmamembran verläuft (Montecucco *et al.*, 2009). Dies zeigen auch die in diesem Projekt erzielten Ergebnisse. Beide verwendeten SPANs – Taipoxin und Paradoxin – zeigen eine spezifische Wirkung auf den Syb-Syp-Komplex, die sich in einer Verminderung der Interaktion beider Proteine miteinander feststellen lässt. Die Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes nach Intoxikation mit Taipoxin bzw. Paradoxin konnte sowohl an Synaptosomen (P2-Fraktion) als auch an synaptischen Vesikeln beobachtet werden. Allerdings war für eine den Syb-Syp-Komplex dissoziierende SPAN-Wirkung die Anwesenheit synaptosomalen Zytosols erforderlich (vgl. Abb. 33). An isolierten, synaptischen Vesikeln (LP2-Fraktion) konnte keine signifikante SPAN-Wirkung festgestellt werden.

Als cholesterolbindendes Protein ist Synaptophysin wahrscheinlich direkt beteiligt an der Organisation von Membransubdomänen innerhalb der Vesikelmembran, die in Abhängigkeit vom Membranzvolumen der synaptischen Vesikelmembran als Nanodomänen bezeichnet werden können. Es könnte dadurch entscheidend zur Beschleunigung der Regenerierung synaptischer Vesikel an der Plasmamembran beitragen (Martin, 2000). Die Lipidstrukturierung der Membranen in Domänen und Subdomänen, welche ganz spezifisch mit verschiedenen Membranproteinen assoziiert sind, besitzt einen entscheidenden regulierenden Effekt auf die einzelnen Membranprozesse und Proteininteraktionen. Zu den spezialisierten cholesterolreichen Subdomänen zählen „Lipid Rafts“, die möglicherweise auch die Membran synaptischer Vesikel strukturieren (Gee

et al., 1999), (Huttner & Schmidt, 2000). In den verschiedenen „Lipid Rafts“ findet eine selektive Rekrutierung spezifischer Proteine bei gleichzeitigem räumlichen Ausschluss anderer Proteine statt. Sie sind daher ideal geeignet zur Regulation der spezifischen Proteinverteilung bei der Fusion synaptischer Vesikel mit der Plasmamembran während der Exozytose. Zur Verteilung der verschiedenen Plasmamembranproteine und Vesikelmembranproteine beim Abschnüren der synaptischen Vesikel während der Endozytose sind sie ebenso geeignet.

Durch die Extraktion der präsynaptischen Membranen mit Detergenz kann besonders auch das Verhalten der einzelnen Proteine des Syp-Syb-Komplexes und des SNARE-Komplexes sowie deren Anordnung innerhalb von Membransubdomänen untersucht werden. Ein Nachteil der Detergenzbehandlung besteht jedoch darin, dass Detergenzien hydrophobe Lipid-Protein-Interaktionen zerstören können. Ist ein Protein, wie z.B. Synaptophysin, in Triton X-100 unlöslich, kann dies ein Hinweis darauf sein, dass es mit dem Cholesterin und/oder den Sphingolipiden des „Lipid Rafts“ interagiert. Ist ein Protein jedoch komplett löslich in Triton X-100, kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass das Protein auch mit anderen Membrandomänen horizontal interagiert (Huttner & Schmidt, 2000), (Roper *et al.*, 2000). Die Extraktion mit Lubrol ist dabei eher in der Lage, die „Lipid Raft“-Strukturen von Synaptosomen und synaptischen Vesikeln darzustellen (vgl. Abb. 34).

Innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung synaptischer Vesikel (LP2-Fraktion) mit Taipoxin bzw. Paradoxin Einfluss auf die membranäre Proteinverteilung der synaptischen Vesikel hat. Diese Ergebnisse werden durch die Aussagen von Montecucco und Rosetto unterstützt, die einen präsynaptischen SPAN-Einfluss auf die Plasmamembran festgestellt haben (Montecucco & Rosetto, 2000). So kommt es unter Taipoxin- bzw. Paradoxin-Einfluss zu einer Umverteilung innerhalb der „Lipid Raft“-Strukturen synaptischer Vesikel. Dies konnte sowohl für Synaptophysin als auch für VGLUT1 gezeigt werden (vgl. Abb. 35). Auf die Verteilung von Synaptobrevin innerhalb der „Lipid Raft“-Strukturen dagegen hatten weder Taipoxin noch Paradoxin einen erkennbaren Einfluss. Die SPAN-Effekte waren dabei nicht von der Ca^{2+} -Zugabe abhängig. Lediglich

VGLUT1 erfuhr nach Ca^{2+} -Behandlung eine Umverteilung. Die Bedeutung dieser Umverteilung müssen weitere Analysen zeigen.

Nach Taipoxinbehandlung (*Oxyuranus scutellatus*) konnte eine Blockade der Freisetzung von Neurotransmittern beobachtet werden, die auf einen Abbau gespeicherter synaptischer Vesikel zurückzuführen ist (Su & Chang, 1984). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Taipoxin-behandelten Neuronen zeigten geschwollene, vergrößerte Axonterminalien mit entleerten synaptischen Vesikeln (Cull-Candy *et al.*, 1976); (Harris *et al.*, 2000). Der präsynaptische Membranrezeptor für Taipoxin wurde bislang nicht identifiziert. Neuere Untersuchungen zeigten jedoch eine inhibierende Wirkung auf die Acetylcholin-Freisetzung (Rossetto *et al.*, 2006). Es wird angenommen, dass die Neurotoxine die Fusion von Acetylcholin-enthaltenden Vesikeln mit der präsynaptischen Plasmamembran vermittelt und das Recycling der Vesikel verhindert (Caccin *et al.*, 2006). Diese beschriebene SPAN-Wirkung auf die Neurotransmitter-Freisetzung wird durch eigene Ergebnisse unterstützt. Die Behandlung isolierter, synaptischer Vesikel mit Taipoxin bzw. Paradoxin hatte nämlich ebenfalls einen Einfluss auf die Neurotransmitter-Aufnahme. Dies gilt sowohl für VGLUT1/2 als auch für VMAT. So war nach SPAN-Behandlung die Neurotransmitter-Aufnahme für VGLUT und VMAT signifikant vermindert. Dieser Effekt war abhängig von der gewählten SPAN-Konzentration, nicht aber von einer Zugabe von Ca^{2+} -Ionen. Taipoxin ist in diesem Zusammenhang im Vergleich mit Paradoxin potenter.

In weiterführenden Untersuchungen an isolierten, synaptischen Vesikeln (LP2-Fraktion) ohne synaptosomales Zytosol (LS2-Fraktion) könnte analysiert werden, inwiefern die beobachtete Verminderung der Aufnahme von Neurotransmittern unter SPAN-Einfluss abhängig ist von der Anwesenheit synaptosomalen Zytosols.

6.4 Synaptophysin-Deletionsmutanten

Für eine Analyse der Bedeutung Synaptophysins, Synaptobrevins sowie deren Interaktion innerhalb des Syb-Syp-Komplexes wurden in den letzten Jahren immer wieder Untersuchungen an Synaptobrevin- bzw. Synaptophysin-Deletionsmutanten durchgeführt.

Für Synaptobrevin konnte die physiologische Bedeutung gezeigt werden, indem es als essentieller Bestandteil des SNARE-Komplexes identifiziert wurde (Jahn & Sudhof, 1999). Synaptobrevin-Deletionsmutanten sind nicht lebensfähig und sterben unmittelbar nach der Geburt. Untersuchungen von Schoch und Kollegen an diesen Deletionsmutanten konnten belegen, dass Synaptobrevin für die schnelle Membranfusion in der Synapse verantwortlich ist (Schoch *et al.*, 2001). Allerdings fusionieren Synaptobrevin-haltige Lipidvesikel relativ langsam mit Syntaxin/SNAP-25 Vesikeln (Melia *et al.*, 2002), so dass das Vorhandensein weiterer Proteine sowie eine definierte Protein-/Lipidzusammensetzung entscheidend sind, um schnelle Fusionen zu gewährleisten.

Während also Synaptobrevin als ein essentielles Protein charakterisiert werden konnte, zeigten Synaptophysin-Deletionsmutanten keine wesentlichen phänotypischen Auffälligkeiten (Eshkind & Leube, 1995), (Edelmann *et al.*, 1995). Ist Synaptophysin trotz seiner enormen Menge auf synaptischen Vesikeln demnach kein essentielles Protein? Lediglich Synaptobrevin kommt mit ca. 70 Kopien häufiger als Synaptophysin (30 Kopien) auf synaptischen Vesikeln vor (Takamori *et al.*, 2006). Es ist zu bezweifeln, dass einem solch häufig vorkommenden Protein keine Bedeutung zukommen soll. Die Ergebnisse aus den vorherigen Abschnitten sind ein Indiz dafür, dass Synaptophysin in den Zyklus synaptischer Vesikel involviert ist, wenn auch nicht in direkter Weise an der Exozytose. Hier kommt Synaptophysin ggf. eine modulatorische Bedeutung zu, wie sie in Abbildung 51 dargestellt ist. Schmitt und Kollegen zeigten in einer aktuellen Studie, dass Synaptophysin-Deletionsmutanten auffällige Veränderungen in Bezug auf Verhalten und Lernprozess zeigen (Schmitt *et al.*, 2009).

Elektrophysiologische Untersuchungen von Synaptophysin-Synaptogyrin-Doppeldeletionsmutanten zeigten eine starke Reduktion von „short-term“- und „long-term“- Plastizität, womit eine Funktion von Synaptophysin bei plastischen Veränderungen im adulten Gehirn aufgezeigt wurde (Janz & Sudhof, 1999). Synaptophysin könnte also in sich entwickelnden und reifen Synapsen innerhalb eines neuronalen Netzwerkes als essentielles Protein für die Funktion synaptischer Vesikel, eine individuelle Anpassung an erhöhte oder verminderte Neurotransmitter-Freisetzung ermöglichen. Für synaptische Vesikel, die wiederholte Exozytose-Endozytose-Zyklen durchlaufen, ist dabei die Aufrechterhaltung der Membranintegrität von besonderer Bedeutung. Hiervon hängt die Effizienz der Synapse ab. Veränderungen präsynaptischer Vesikelpools beeinflussen die synaptische Plastizität.

Eigene Untersuchungen zeigten, dass bei einer biochemischen Charakterisierung Synaptophysin-Deletionsmutanten im Vergleich zu Wildtypmäusen keine Abweichungen zeigten (vgl. Abb. 42 und 43). Auch was die Verteilung der membranären Vesikelproteine angeht, konnten zwischen Synaptophysin-Deletionmutante und Wildtypmaus an Synaptosomen (P2-Fraktion) keine Unterschiede festgestellt werden (persönliche Mitteilung von Karin Richter). Allerdings konnte gezeigt werden, dass Synaptophysin-Deletionsmutanten im Vergleich zu Wildtypmäusen reduzierte Proteinmengen von Synaptobrevin haben, während bei den Proteinmengen von VGLUT1/2 keine Unterschiede erkennbar waren (McMahon *et al.*, 1996).

Die Analyse der Aufnahme von Neurotransmittern zeigte weitere signifikante Abweichungen der Synaptophysin-Deletionsmutanten von Wildtypmäusen. Sowohl über VMAT, als auch über VGLUT1/2 nehmen Synaptophysin-Deletionsmutanten vermehrt Neurotransmitter auf (vgl. Abb. 44 und 45). Den Grund für diese vermehrte Neurotransmitter-Aufnahme müssen weitere Untersuchungen an Synaptophysin-Deletionsmutanten aufzeigen. Denkbar wäre, dass es durch die Deletion von Synaptophysin zu Modulationen von endozytotischen Prozessen kommt und in Folge dessen die Regulation der Neurotransmitter-Aufnahme gestört ist.

6.5 Zirkadiane Regulation

Wie in Abschnitt 1.8 beschrieben, folgt der Schlaf-Wach-Zyklus einer zirkadianen Periodizität, die einen der endogenen Biorhythmen repräsentiert. Dabei synchronisieren externe Zeitgeber die „biologische Uhr“. Bei längerem Fehlen dieser Zeitgeber wird der zirkadiane Rhythmus aufrechterhalten, verliert jedoch seine Beziehung zur aktuellen Zeit, was eine Modulation der Periodizität zur Folge hat. Arbeiten von Klein und Kollegen sowie von Ibata und Kollegen konnten Neuronengruppen im Nucleus suprachiasmaticus (SCN) des Hypothalamus als zelluläre Substrate der „biologischen Uhr“ identifizieren (Klein, 1991), (Ibata *et al.*, 1999). Als wichtigster exogener Zeitgeber für die Synchronisation der einzelnen neuronalen Oszillatoren und für die Einstellung eines 24-stündigen Rhythmus gelten Lichtsignale (Colwell & Menaker, 1992).

Es sind verschiedene Gene bekannt, deren Produkte die zirkadiane Rhythmik auf zellulärer Ebene regeln (vgl. Abschnitt 1.8). Als ein Protein von zentraler Bedeutung für den Erhalt der Periodizität konnte Period (PER) identifiziert werden (Albrecht *et al.*, 1997). PER kommt in drei Isoformen vor, die unterschiedliche Aspekte zirkadianer Rhythmik und Verhalten regulieren (Toh *et al.*, 2001), (Ebisawa *et al.*, 2001), (Abarca *et al.*, 2002), (Spanagel *et al.*, 2005). So haben Per2-Deletionsmutanten (Per2^{Brdm1}), bei denen die PER2 Expression extrem vermindert ist, die Fähigkeit verloren, die innere Uhr äußeren Einflüssen anzupassen. Per2^{Brdm1}-Mäuse exprimieren zudem weniger Eaat1, einen der plasmamembranständigen Glutamat-transporter, was zu einer Erhöhung der extrazellulären Glutamatmenge und verstärktem Alkoholkonsum führt (Spanagel *et al.*, 2005). Von über 15 000 Genen werden ca. fünf Prozent durch die Tageszeit reguliert, weitere fünf Prozent hängen vom Schlaf/Wachzustand ab. Ist es also denkbar, dass präsynaptische Vesikelproteine in ihren Expressionen der zirkadianen Regulation unterworfen sind?

Die Menge an Neurotransmitter-Transporter-tragenden Vesikeln im „readily releasable pool“ bestimmt u.a. die gespeicherte Neurotransmittermenge und die postsynaptische Antwort. In Zusammenarbeit mit Urs Albrecht wurde in vorangegangenen Untersuchungen der Einfluss zirkadianer

Rhythmik auf die Expression vesikulärer Proteine untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Menge von VGLUT1 auf synaptische Vesikel (LP2-Fraktion) innerhalb eines 24-stündigen Licht/Dunkel-Zyklus oszillieren. Wurden Mäuse einer permanenten Dunkelperiode unterworfen, änderten sich die Oszillationsmuster der VGLUT-Mengen in der Vesikelfraktion. In *Period2*-Mutanten waren diese Oszillationen gestört, ohne dass sich die vesikulären Standardproteine veränderten. Somit konnte gezeigt werden, dass die Synapse ihre Effizienz über die Verfügbarkeit Neurotransmittertragender Vesikel regulieren kann. Eine solche Regulation konnte auch an stimulationsabhängigen Prozessen gezeigt werden. Dabei handelte es sich mehr um eine Membranamverteilung innerhalb der Synapse und weniger um eine Regulation der Synthese (Yelamanchili *et al.*, 2006), (Darna *et al.*, 2009).

Eigene Untersuchungen nutzten den Syb-Syp-Komplex als Anzeigesystem, um mögliche zirkadiane Oszillationen zu analysieren. Innerhalb dieser Arbeit wurden neben Wildtypmäusen, *Period2^{Brdm1}*-Mäuse verwendet. *Per2^{Brdm1}*-Mäuse zeigen im Vergleich zu Wildtypmäusen eine erhöhte Proteinkonzentration an Synaptobrevin und Synaptophysin. Während in Wildtypmäusen Synaptobrevin vermehrt als Dimer oder im Syb-Syp-Komplex vorzukommen scheint, liegt es in *Per2^{Brdm1}*-Mäusen wahrscheinlich vermehrt als Monomer vor. Für Synaptophysin zeigt sich, dass in Wildtypmäusen vermehrt monomeres Synaptophysin zu finden ist. In *Per2^{Brdm1}*-Mäusen liegt Synaptophysin wahrscheinlich vermehrt als Dimer oder aber im Syb-Syp-Komplex gebunden vor. Diese Ergebnisse sind erste Hinweise, dass in *Per2^{Brdm1}*-Mäusen die Interaktion Synaptobrevins mit Synaptophysin innerhalb der zirkadianen Rhythmik modifiziert wird. Dabei müssen weiterführende Untersuchungen diese Ergebnisse noch bestätigen. Fest steht hingegen, dass es zwischen *Per2^{Brdm1}*- und Wildtypmäusen zu Abweichungen in Bezug auf ihre Gesamtproteinmengen an Synaptobrevin bzw. Synaptophysin kommt. Die zirkadiane Modifizierung des Syb-Syp-Komplexes könnte ein wichtiger Mechanismus zur Gewährleistung einer geregelten Neurotransmission im Sinne der benötigten Anpassung des Organismus an seine Umwelt sein.

In diesem Zusammenhang sind in einem weiteren Schritt Synaptophysin-Deletionsmutanten auf analoge Weise zu analysieren. Erste Versuche an Synaptophysin-Deletionsmutanten zeigten neben der unter 6.4 beschriebenen, erhöhten Neurotransmitter-Aufnahme über VMAT bzw. VGLUT, Auffälligkeiten innerhalb der zirkadianen Rhythmik. Wurden die Tiere über einen längeren Zeitraum in einem 24-Stunden-Dunkelrhythmus gehalten, so starben sie nach einigen Tagen (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Urs Albrecht). Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Aussagen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Leube, die Synaptophysin als einen wichtigen Faktor für die Aufrechterhaltung der Vesikelintegrität beschreiben (Spiwox-Becker *et al.*, 2001).

Weiterführende Versuche an Synaptophysin-Deletionsmutanten im Vergleich zu Wildtyp- und $Per2^{Brdm1}$ -Mäusen müssten zeigen, inwiefern es ggf. zu Auffälligkeiten in Bezug auf die zirkadiane Regulation präsynaptischer Vesikelproteine kommt.

7 Zusammenfassung

Synaptische Vesikel sind durch eine Reihe integraler und assoziierter Membranproteine charakterisiert, die zum einen funktionell für Speicherung und zur Freisetzung von Neurotransmittern, andererseits für die Wiedergewinnung der Membrankomponenten nach erfolgter Exozytose und Umverteilungsprozessen in der Synapse zuständig sind. Die integralen Membranproteine Synaptobrevin und Synaptophysin sind dabei allen Neurotransmitter-speichernden Vesikeln gemeinsam.

In der vorliegenden Studie sollten Faktoren, die zu einer Assoziation bzw. Dissoziation des Syb-Syp-Komplexes führen, erfasst werden sowie eine mögliche zirkadiane Regulation Synaptophysins bzw. Synaptobrevins und ihrer Interaktion analysiert werden. Des Weiteren sollte mit Hilfe von Synaptophysin-Deletionsmutanten die physiologische Bedeutung Synaptophysins näher untersucht werden.

Im ersten Teil der Arbeit erfolgte die Charakterisierung des Syb-Syp-Komplexes. Methodisch bediente man sich der Immunpräzipitation sowie der chemischen Quervernetzung mit DSS. Der Syb-Syp-Komplex wird Ca^{2+} -abhängig und unter Beteiligung eines zytosolischen Faktors ($F_{(D)}$) dissoziiert. Diese Dissoziation ist unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration (1-100 μM), benötigt aber die Anwesenheit synaptosomalen Zytosols und geht dem Exozytoseprozess voraus. Das Molekulargewicht des Faktors $F_{(D)}$ liegt zwischen 10-30 kDa. Seine Integrität wird weder durch Frier- und Auftau-Zyklen noch durch Temperaturen bis zu 95 °C beeinträchtigt. Taipoxin und Paradoxin als Vertreter der SPAN-Familie haben eine spezifische dissoziierende Wirkung auf den Syb-Syp-Komplex an Synaptosomen (P2) sowie an synaptischen Vesikeln mit synaptosomaler, zytosolischer Komponente. An isolierten, synaptischen Vesikeln (LP2) konnte kein spezifischer SPAN-Effekt beobachtet werden. Andere SNARE-Proteine (SNAP-25, Syx) werden durch Taipoxin bzw. Paradoxin nicht beeinflusst. Die SPAN-Wirkung ist dabei Ca^{2+} -unabhängig. Der Syb-Syp-Komplex ist auf synaptischen Vesikeln offenbar in „raft-ähnlichen“ Domänen organisiert. Während SPANs diese Struktur für Synaptobrevin nicht verändern, erfolgt

für Synaptophysin und VGLUT1 eine Umverteilung innerhalb der Vesikelmembran. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass SPANs, Ca^{2+} -unabhängig, die Neurotransmitter-Aufnahme über VMAT sowie über VGLUT vermindern.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Neurotransmitter-Aufnahme von Synaptophysin-Deletionsmutanten untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass diese im Vergleich zu Wildtypmäusen, verstärkt Neurotransmitter über VMAT und VGLUT aufnehmen.

Im letzten Teil der Arbeit wurde der Einfluss der zirkadianen Rhythmik auf den Syb-Syp-Komplex analysiert. $\text{Per2}^{\text{Brdm1}}$ -Mäuse haben im Vergleich zu Wildtypmäusen eine erhöhte Proteinkonzentration an Synaptobrevin und Synaptophysin. Während in Wildtypmäusen Synaptobrevin vermehrt als Dimer oder im Syb-Syp-Komplex vorkommt, liegt es in $\text{Per2}^{\text{Brdm1}}$ -Mäusen vermehrt als Monomer vor. Für Synaptophysin zeigte sich, dass in Wildtypmäusen vermehrt monomeres Synaptophysin zu finden ist, in $\text{Per2}^{\text{Brdm1}}$ -Mäusen liegt es vermehrt als Dimer oder aber im Syb-Syp-Komplex gebunden vor. Die zirkadiane Regulation des Syb-Syp-Komplexes könnte ein wichtiger Mechanismus zur Gewährleistung einer geregelten Neurotransmission im Sinne der benötigten Anpassung des Organismus an seine Umwelt sein.

8 Abstract

Synaptic vesicles are key organelles of neuronal communication. As such they are concentrated in terminals of axonal processes. Synaptic vesicles store neurotransmitters, which are released by action-potential-triggered plasma membrane fusion. Synaptobrevin (syb), the most abundant vesicular protein, participates in two exclusive protein complexes. Beside the SNARE-complex, that is essential for exocytosis and additionally consists of Syntaxin and SNAP-25, synaptobrevin is also involved in the syb-syp-complex, whose function is not well understood yet.

Factors leading to an association or dissociation of the syb-syp-complex were investigated in this study. In addition, a putative circadian regulation of synaptophysin (syp) and synaptobrevin was analyzed. Apart from that the physiological function of synaptophysin was specified by means of syp $-/-$ mice.

The first part of this study discusses the characterization of the syb-syp-complex. Methodically the study applied the immunoprecipitation technique in addition of chemical cross linking with DSS. The syb-syp-complex was dissociated with Ca^{2+} under contribution of a cytosolic factor ($F_{(D)}$). This dissociation is independent of the amount of constituted Ca^{2+} (1-1 000 μM), but requires the presence of synaptosomal cytosol and precedes the process of exocytosis.

In this study, it was shown that the factor $F_{(D)}$ has a molecular weight between 10 to 30 kDa and that its integrity is neither affected by freeze-thaw cycles nor by temperatures up to 95 °C. Snake presynaptic PLA₂ neurotoxins (SPANs) possess a specific decreasing effect on the syb-syp-interaction on synaptosomes, as well as on synaptic vesicles in presence of cytosolic synaptosomal components. No specific effect was perceived on synaptic vesicles lacking cytosolic synaptosomal components. Other SNARE-proteins (SNAP-25, Syntaxin) are not influenced by taipoxin or paradoxin. The SPAN-effect does not depend on Ca^{2+} .

Obviously, on synaptic vesicles synaptobrevin and synaptophysin, as well as VGLUT1 are organized in raft-like domains. SPANs do not modify this structure in respect of syb, whereas syp and VGLUT1 are not longer arranged in lipid rafts after treatment with these neurotoxins. In addition, SPANs decrease the vesicular neurotransmitter uptake by VMAT or VGLUT, independently of Ca^{2+} .

In the second part of this study the vesicular uptake of neurotransmitter in syp $-/-$ mice was investigated. Uptake via VMAT and VGLUT was shown to be enhanced in syp $-/-$ mice compared to wild type animals.

In the last part of this study, the influence of circadian rhythm on the syb-syp-complex was analyzed. In comparison to wild type mice protein levels of synaptobrevin and synaptophysin were increased in $\text{per2}^{\text{Brdm1}}$ mice. While synaptobrevin appears more often as a dimer or in the syb-syp-complex in wild type mice, in $\text{per2}^{\text{Brdm1}}$ mice it is more often present as a monomer. In contrast, the syp monomer is increased in wild type animals, whereas in $\text{per2}^{\text{Brdm1}}$ mice synaptophysin occurs more often as dimer or in the syb-syp-complex. The circadian regulation of the syb-syp-complex could be an important mechanism to guarantee regulated neurotransmission in terms of the required adaption of an organism to its environment.

9 Literaturverzeichnis

Abarca, C., Albrecht, U. & Spanagel, R. (2002). Cocaine sensitization and reward are under the influence of circadian genes and rhythm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9026-9030.

Abraham, C., Hutter, H., Palfreyman, M. T., Spatkowski, G., Weimer, R. M., Windoffer, R., Jorgensen, E. M. & Leube, R. E. (2006). Synaptic tetraspan vesicle membrane proteins are conserved but not needed for synaptogenesis and neuronal function in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8227-8232.

Ahnert-Hilger, G. & Bigalke, H. (1995). Molecular aspects of tetanus and botulinum neurotoxin poisoning. *Prog Neurobiol* **46**, 83-96.

Albrecht, U., Sun, Z. S., Eichele, G. & Lee, C. C. (1997). A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell* **91**, 1055-1064.

Albrecht, U. & Eichele, G. (2003). The mammalian circadian clock. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 271-277.

Bai, L., Spiwox-Becker, I. & Leube, R. E. (2006). Transcriptome comparison of murine wild-type and synaptophysin-deficient retina reveals complete identity. *Brain Res* **1081**, 53-58.

Barnstable, C. J., Hofstein, R. & Akagawa, K. (1985). A marker of early amacrine cell development in rat retina. *Brain Res* **352**, 286-290.

Becher, A., Drenckhahn, A., Pahner, I. & Ahnert-Hilger, G. (1999a). The synaptophysin-synaptobrevin complex is developmentally upregulated in cultivated neurons but is absent in neuroendocrine cells. *Eur J Cell Biol* **78**, 650-656.

Becher, A., Drenckhahn, A., Pahner, I., Margittai, M., Jahn, R. & Ahnert-Hilger, G. (1999b). The synaptophysin-synaptobrevin complex: a hallmark of synaptic vesicle maturation. *J Neurosci* **19**, 1922-1931.

Bennett, M. K., Calakos, N. & Scheller, R. H. (1992). Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* **257**, 255-259.

Blaser, S., Jersch, K., Hainmann, I., Zieger, W., Wunderle, D., Busse, A. & Zieger, B. (2003). Isolation of new splice isoforms, characterization and expression analysis of the human septin SEPT8 (KIAA0202). *Gene* **312**, 313-320.

Breustedt, J., Gundlfinger, A., Varoqueaux, F., Reim, K., Brose, N. & Schmitz, D. (2009). Munc13-2 Differentially Affects Hippocampal Synaptic Transmission and Plasticity. *Cereb Cortex*.

Brooks, V. B., Curtis, D. R. & Eccles, J. C. (1955). Mode of action of tetanus toxin. *Nature* **175**, 120-121.

Buckley, K. M., Floor, E. & Kelly, R. B. (1987). Cloning and sequence analysis of cDNA encoding p38, a major synaptic vesicle protein. *J Cell Biol* **105**, 2447-2456.

Burgen, A. S., Dickens, F. & Zatman, L. J. (1949). The action of botulinum toxin on the neuro-muscular junction. *J Physiol* **109**, 10-24.

Caccin, P., Rigoni, M., Bisceglie, A., Rossetto, O. & Montecucco, C. (2006). Reversible skeletal neuromuscular paralysis induced by different lysophospholipids. *FEBS Lett* **580**, 6317-6321.

Calakos, N. & Scheller, R. H. (1994). Vesicle-associated membrane protein and synaptophysin are associated on the synaptic vesicle. *J Biol Chem* **269**, 24534-24537.

Carlson, M. D., Kish, P. E. & Ueda, T. (1989). Characterization of the solubilized and reconstituted ATP-dependent vesicular glutamate uptake system. *J Biol Chem* **264**, 7369-7376.

Carrion-Vazquez, M., Fernandez, A. M., Chowen, J. & Nieto-Sampedro, M. (1998). Brain Ac39/physophilin: cloning, coexpression and colocalization with synaptophysin. *Eur J Neurosci* **10**, 1153-1166.

Chapman, E. R. & Jahn, R. (1994). Calcium-dependent interaction of the cytoplasmic region of synaptotagmin with membranes. Autonomous function of a single C2-homologous domain. *J Biol Chem* **269**, 5735-5741.

Colwell, C. S. & Menaker, M. (1992). NMDA as well as non-NMDA receptor antagonists can prevent the phase-shifting effects of light on the circadian system of the golden hamster. *J Biol Rhythms* **7**, 125-136.

Cremona, O. & De Camilli, P. (1997). Synaptic vesicle endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* **7**, 323-330.

Cull-Candy, S. G., Lundh, H. & Thesleff, S. (1976). Effects of botulinum toxin on neuromuscular transmission in the rat. *J Physiol* **260**, 177-203.

Daly, C., Sugimori, M., Moreira, J. E., Ziff, E. B. & Llinas, R. (2000). Synaptophysin regulates clathrin-independent endocytosis of synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6120-6125.

Daly, C. & Ziff, E. B. (2002). Ca²⁺-dependent formation of a dynamin-synaptophysin complex: potential role in synaptic vesicle endocytosis. *J Biol Chem* **277**, 9010-9015.

Darchen, F., Scherman, D. & Henry, J. P. (1989). Reserpine binding to chromaffin granules suggests the existence of two conformations of the monoamine transporter. *Biochemistry* **28**, 1692-1697.

Darna, M., Schmutz, I., Richter, K., Yelamanchili, S. V., Pendyala, G., Holtje, M., Albrecht, U. & Ahnert-Hilger, G. (2009). Time of day-dependent sorting of the vesicular glutamate transporter to the plasma membrane. *J Biol Chem* **284**, 4300-4307.

De Camilli, P. & Jahn, R. (1990). Pathways to regulated exocytosis in neurons. *Annu Rev Physiol* **52**, 625-645.

de Haro, L., Ferracci, G., Opi, S., Iborra, C., Quetglas, S., Miquelis, R., Leveque, C. & Seagar, M. (2004). Ca²⁺/calmodulin transfers the membrane-proximal lipid-binding domain of the v-SNARE synaptobrevin from cis to trans bilayers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1578-1583.

Desai, R. C., Vyas, B., Earles, C. A., Littleton, J. T., Kowalchuck, J. A., Martin, T. F. & Chapman, E. R. (2000). The C2B domain of synaptotagmin is a Ca(2+)-sensing module essential for exocytosis. *J Cell Biol* **150**, 1125-1136.

Dodds, D. C., Omeis, I. A., Cushman, S. J., Helms, J. A. & Perin, M. S. (1997). Neuronal pentraxin receptor, a novel putative integral membrane pentraxin that interacts with neuronal pentraxin 1 and 2 and taipoxin-associated calcium-binding protein 49. *J Biol Chem* **272**, 21488-21494.

Eastwood, S. L., Cotter, D. & Harrison, P. J. (2001). Cerebellar synaptic protein expression in schizophrenia. *Neuroscience* **105**, 219-229.

Eastwood, S. L. & Harrison, P. J. (2001). Synaptic pathology in the anterior cingulate cortex in schizophrenia and mood disorders. A review and a Western blot study of synaptophysin, GAP-43 and the complexins. *Brain Res Bull* **55**, 569-578.

Ebisawa, T., Uchiyama, M., Kajimura, N. & other authors (2001). Association of structural polymorphisms in the human period3 gene with delayed sleep phase syndrome. *EMBO Rep* **2**, 342-346.

Edelmann, L., Hanson, P. I., Chapman, E. R. & Jahn, R. (1995). Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *EMBO J* **14**, 224-231.

Edwards, R. H. (2007). The neurotransmitter cycle and quantal size. *Neuron* **55**, 835-858.

Elferink, L. A., Trimble, W. S. & Scheller, R. H. (1989). Two vesicle-associated membrane protein genes are differentially expressed in the rat central nervous system. *J Biol Chem* **264**, 11061-11064.

Erickson, J. D., Eiden, L. E. & Hoffman, B. J. (1992). Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10993-10997.

Erickson, J. D., Varoqui, H., Schafer, M. K. & other authors (1994). Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus. *J Biol Chem* **269**, 21929-21932.

- Erickson, J. D., Schafer, M. K., Bonner, T. I., Eiden, L. E. & Weihe, E. (1996).** Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5166-5171.
- Eshkind, L. G. & Leube, R. E. (1995).** Mice lacking synaptophysin reproduce and form typical synaptic vesicles. *Cell Tissue Res* **282**, 423-433.
- Evans, G. J. & Cousin, M. A. (2005).** Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling. *Biochem Soc Trans* **33**, 1350-1353.
- Fasshauer, D. & Margittai, M. (2004).** A transient N-terminal interaction of SNAP-25 and syntaxin nucleates SNARE assembly. *J Biol Chem* **279**, 7613-7621.
- Fohlman, J., Eaker, D., Karlsoon, E. & Thesleff, S. (1976).** Taipoxin, an extremely potent presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian snake taipan (*Oxyuranus s. scutellatus*). Isolation, characterization, quaternary structure and pharmacological properties. *Eur J Biochem* **68**, 457-469.
- Fohlman, J. (1979).** Comparison of two highly toxic Australian snake venoms: the taipan (*Oxyuranus S. scutellatus*) and the fierce snake (*Parademansia microlepidotus*). *Toxicon* **17**, 170-172.
- Freneau, R. T., Jr., Troyer, M. D., Pahner, I. & other authors (2001).** The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron* **31**, 247-260.
- Freneau, R. T., Jr., Burman, J., Qureshi, T. & other authors (2002).** The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14488-14493.
- Fykse, E. M. & Fonnum, F. (1996).** Amino acid neurotransmission: dynamics of vesicular uptake. *Neurochem Res* **21**, 1053-1060.
- Galli, T., McPherson, P. S. & De Camilli, P. (1996).** The V0 sector of the V-ATPase, synaptobrevin, and synaptophysin are associated on synaptic vesicles in a Triton X-100-resistant, freeze-thawing sensitive, complex. *J Biol Chem* **271**, 2193-2198.
- Galli, T. & Haucke, V. (2001).** Cycling of synaptic vesicles: how far? How fast! *Sci STKE* **2001**, re1.
- Gee, A. J., Groen, L. A. & Johnson, M. E. (1999).** Determination of fatty acid amides as trimethylsilyl derivatives by gas chromatography with mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* **849**, 541-552.
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Wilsbacher, L. D., King, D. P., Takahashi, J. S. & Weitz, C. J. (1998).** Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* **280**, 1564-1569.

Gras, C., Herzog, E., Bellenchi, G. C., Bernard, V., Ravassard, P., Pohl, M., Gasnier, B., Giros, B. & El Mestikawy, S. (2002). A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci* **22**, 5442-5451.

Hanson, P. I., Roth, R., Morisaki, H., Jahn, R. & Heuser, J. E. (1997). Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell* **90**, 523-535.

Harris, J. B., Grubb, B. D., Maltin, C. A. & Dixon, R. (2000). The neurotoxicity of the venom phospholipases A(2), notexin and taipoxin. *Exp Neurol* **161**, 517-526.

Hayashi, M., Haga, M., Yatsushiro, S., Yamamoto, A. & Moriyama, Y. (1999). Vesicular monoamine transporter 1 is responsible for storage of 5-hydroxytryptamine in rat pinealocytes. *J Neurochem* **73**, 2538-2545.

Hazuka, C. D., Foletti, D. L., Hsu, S. C., Kee, Y., Hopf, F. W. & Scheller, R. H. (1999). The sec6/8 complex is located at neurite outgrowth and axonal synapse-assembly domains. *J Neurosci* **19**, 1324-1334.

Hemmings, H. C., Jr., Nairn, A. C. & Greengard, P. (1986). Protein kinases and phosphoproteins in the nervous system. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* **64**, 47-69.

Hess, D. T., Slater, T. M., Wilson, M. C. & Skene, J. H. (1992). The 25 kDa synaptosomal-associated protein SNAP-25 is the major methionine-rich polypeptide in rapid axonal transport and a major substrate for palmitoylation in adult CNS. *J Neurosci* **12**, 4634-4641.

Hinz, B., Becher, A., Mitter, D., Schulze, K., Heinemann, U., Draguhn, A. & Ahnert-Hilger, G. (2001). Activity-dependent changes of the presynaptic synaptophysin-synaptobrevin complex in adult rat brain. *Eur J Cell Biol* **80**, 615-619.

Hogenesch, J. B., Gu, Y. Z., Jain, S. & Bradfield, C. A. (1998). The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5474-5479.

Holtje, M., von Jagow, B., Pahner, I., Lautenschlager, M., Hortnagl, H., Nurnberg, B., Jahn, R. & Ahnert-Hilger, G. (2000). The neuronal monoamine transporter VMAT2 is regulated by the trimeric GTPase Go(2). *J Neurosci* **20**, 2131-2141.

Holtje, M., Winter, S., Walther, D., Pahner, I., Hortnagl, H., Ottersen, O. P., Bader, M. & Ahnert-Hilger, G. (2003). The vesicular monoamine content regulates VMAT2 activity through Galphaq in mouse platelets. Evidence for autoregulation of vesicular transmitter uptake. *J Biol Chem* **278**, 15850-15858.

- Huttner, W. B., Schiebler, W., Greengard, P. & De Camilli, P. (1983).** Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. *J Cell Biol* **96**, 1374-1388.
- Huttner, W. B. & Schmidt, A. (2000).** Lipids, lipid modification and lipid-protein interaction in membrane budding and fission--insights from the roles of endophilin A1 and synaptophysin in synaptic vesicle endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 543-551.
- Ibata, Y., Okamura, H., Tanaka, M. & other authors (1999).** Functional morphology of the suprachiasmatic nucleus. *Front Neuroendocrinol* **20**, 241-268.
- Ito, H., Atsuzawa, K., Morishita, R. & other authors (2009).** Sept8 controls the binding of vesicle-associated membrane protein 2 to synaptophysin. *J Neurochem* **108**, 867-880.
- Jahn, R., Schiebler, W., Ouimet, C. & Greengard, P. (1985).** A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 4137-4141.
- Jahn, R. & Sudhof, T. C. (1999).** Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem* **68**, 863-911.
- Jahn, R., Lang, T. & Sudhof, T. C. (2003).** Membrane fusion. *Cell* **112**, 519-533.
- Jahn, R. & Scheller, R. H. (2006).** SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 631-643.
- Janz, R. & Sudhof, T. C. (1999).** SV2C is a synaptic vesicle protein with an unusually restricted localization: anatomy of a synaptic vesicle protein family. *Neuroscience* **94**, 1279-1290.
- Johnson, R. G., Carty, S. E. & Scarpa, A. (1981).** Proton: substrate stoichiometries during active transport of biogenic amines in chromaffin ghosts. *J Biol Chem* **256**, 5773-5780.
- Johnson, R. G., Jr. (1988).** Accumulation of biological amines into chromaffin granules: a model for hormone and neurotransmitter transport. *Physiol Rev* **68**, 232-307.
- Johnston, P. A. & Sudhof, T. C. (1990).** The multisubunit structure of synaptophysin. Relationship between disulfide bonding and homo-oligomerization. *J Biol Chem* **265**, 8869-8873.
- Kamenskaya, M. A. & Thesleff, S. (1974).** The neuromuscular blocking action of an isolated toxin from the elapid (*Oxyuranus scutellactus*). *Acta Physiol Scand* **90**, 716-724.
- Kedra, D., Pan, H. Q., Seroussi, E. & other authors (1998).** Characterization of the human synaptogyrin gene family. *Hum Genet* **103**, 131-141.

Kee, Y., Lin, R. C., Hsu, S. C. & Scheller, R. H. (1995). Distinct domains of syntaxin are required for synaptic vesicle fusion complex formation and dissociation. *Neuron* **14**, 991-998.

Kini, R. M., Zhang, C. Y. & Tan, B. K. (1997). Pharmacological activity of the interdomain segment between metalloproteinase and disintegrin domains. *Toxicon* **35**, 529-535.

Kini, R. M. (2003). Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon* **42**, 827-840.

Kirkpatrick, L. L., Matzuk, M. M., Dodds, D. C. & Perin, M. S. (2000). Biochemical interactions of the neuronal pentraxins. Neuronal pentraxin (NP) receptor binds to taipoxin and taipoxin-associated calcium-binding protein 49 via NP1 and NP2. *J Biol Chem* **275**, 17786-17792.

Klein, B. G. (1991). Chronic functional consequences of adult infraorbital nerve transection for rat trigeminal subnucleus interpolaris. *Somatosens Mot Res* **8**, 175-191.

Knaus, P., Marqueze-Pouey, B., Scherer, H. & Betz, H. (1990). Synaptoporin, a novel putative channel protein of synaptic vesicles. *Neuron* **5**, 453-462.

Knoth, J., Isaacs, J. M. & Njus, D. (1981). Amine transport in chromaffin granule ghosts. pH dependence implies cationic form is translocated. *J Biol Chem* **256**, 6541-6543.

Leenders, A. G. & Sheng, Z. H. (2005). Modulation of neurotransmitter release by the second messenger-activated protein kinases: implications for presynaptic plasticity. *Pharmacol Ther* **105**, 69-84.

Lesch, K. P., Gross, J., Wolozin, B. L., Murphy, D. L. & Riederer, P. (1993). Extensive sequence divergence between the human and rat brain vesicular monoamine transporter: possible molecular basis for species differences in the susceptibility to MPP+. *J Neural Transm Gen Sect* **93**, 75-82.

Leube, R. E., Kaiser, P., Seiter, A. & other authors (1987). Synaptophysin: molecular organization and mRNA expression as determined from cloned cDNA. *EMBO J* **6**, 3261-3268.

Leube, R. E., Leimer, U., Grund, C., Franke, W. W., Harth, N. & Wiedenmann, B. (1994). Sorting of synaptophysin into special vesicles in nonneuroendocrine epithelial cells. *J Cell Biol* **127**, 1589-1601.

Leveque, C., Pupier, S., Marqueze, B., Geslin, L., Kataoka, M., Takahashi, M., De Waard, M. & Seagar, M. (1998). Interaction of cysteine string proteins with the alpha1A subunit of the P/Q-type calcium channel. *J Biol Chem* **273**, 13488-13492.

Lin, R. C. & Scheller, R. H. (2000). Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 19-49.

- Littleton, J. T., Bai, J., Vyas, B., Desai, R., Baltus, A. E., Garment, M. B., Carlson, S. D., Ganetzky, B. & Chapman, E. R. (2001).** synapto-tagmin mutants reveal essential functions for the C2B domain in Ca²⁺-triggered fusion and recycling of synaptic vesicles in vivo. *J Neurosci* **21**, 1421-1433.
- Liu, Y., Peter, D., Roghani, A., Schuldiner, S., Prive, G. G., Eisenberg, D., Brecha, N. & Edwards, R. H. (1992).** A cDNA that suppresses MPP⁺ toxicity encodes a vesicular amine transporter. *Cell* **70**, 539-551.
- Marqueze, B., Berton, F. & Seagar, M. (2000).** Synaptotagmins in membrane traffic: which vesicles do the tagmins tag? *Biochimie* **82**, 409-420.
- Martin, T. F. (2000).** Racing lipid rafts for synaptic-vesicle formation. *Nat Cell Biol* **2**, E9-11.
- Maycox, P. R., Deckwerth, T., Hell, J. W. & Jahn, R. (1988).** Glutamate uptake by brain synaptic vesicles. Energy dependence of transport and functional reconstitution in proteoliposomes. *J Biol Chem* **263**, 15423-15428.
- McIntire, S. L., Reimer, R. J., Schuske, K., Edwards, R. H. & Jorgensen, E. M. (1997).** Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* **389**, 870-876.
- McMahon, H. T., Ushkaryov, Y. A., Edelmann, L., Link, E., Binz, T., Niemann, H., Jahn, R. & Sudhof, T. C. (1993).** Cellubrevin is a ubiquitous tetanus-toxin substrate homologous to a putative synaptic vesicle fusion protein. *Nature* **364**, 346-349.
- McMahon, H. T., Bolshakov, V. Y., Janz, R., Hammer, R. E., Siegelbaum, S. A. & Sudhof, T. C. (1996).** Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4760-4764.
- Melia, T. J., Weber, T., McNew, J. A., Fisher, L. E., Johnston, R. J., Parlati, F., Mahal, L. K., Sollner, T. H. & Rothman, J. E. (2002).** Regulation of membrane fusion by the membrane-proximal coil of the t-SNARE during zippering of SNAREpins. *J Cell Biol* **158**, 929-940.
- Mollinedo, F. & Lazo, P. A. (1997).** Identification of two isoforms of the vesicle-membrane fusion protein SNAP-23 in human neutrophils and HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **231**, 808-812.
- Montecucco, C. & Schiavo, G. (1994).** Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. *Mol Microbiol* **13**, 1-8.
- Montecucco, C. & Rossetto, O. (2000).** How do presynaptic PLA2 neurotoxins block nerve terminals? *Trends Biochem Sci* **25**, 266-270.

Montecucco, C., Rossetto, O., Caccin, P., Rigoni, M., Carli, L., Morbiato, L., Muraro, L. & Paoli, M. (2009). Different mechanisms of inhibition of nerve terminals by botulinum and snake presynaptic neurotoxins. *Toxicon* **54**, 561-564.

Morrison, C. D. & Prayson, R. A. (2000). Immunohistochemistry in the diagnosis of neoplasms of the central nervous system. *Semin Diagn Pathol* **17**, 204-215.

Murthy, V. N., Sejnowski, T. J. & Stevens, C. F. (1997). Heterogeneous release properties of visualized individual hippocampal synapses. *Neuron* **18**, 599-612.

Neco, P., Rossetto, O., Gil, A., Montecucco, C. & Gutierrez, L. M. (2003). Taipoxin induces F-actin fragmentation and enhances release of catecholamines in bovine chromaffin cells. *J Neurochem* **85**, 329-337.

Ni, B., Rosteck, P. R., Jr., Nadi, N. S. & Paul, S. M. (1994). Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5607-5611.

Niemann, H., Blasi, J. & Jahn, R. (1994). Clostridial neurotoxins: new tools for dissecting exocytosis. *Trends Cell Biol* **4**, 179-185.

Okamura, H., Miyake, S., Sumi, Y., Yamaguchi, S., Yasui, A., Muijtjens, M., Hoeijmakers, J. H. & van der Horst, G. T. (1999). Photic induction of mPer1 and mPer2 in cry-deficient mice lacking a biological clock. *Science* **286**, 2531-2534.

Oster, H., Yasui, A., van der Horst, G. T. & Albrecht, U. (2002). Disruption of mCry2 restores circadian rhythmicity in mPer2 mutant mice. *Genes Dev* **16**, 2633-2638.

Otto, H., Hanson, P. I. & Jahn, R. (1997). Assembly and disassembly of a ternary complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP-25 in the membrane of synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6197-6201.

Ovchinnikov Yu, A., Abdulaev, N. G., Zolotarev, A. S., Artamonov, I. D., Besspalov, I. A., Dergachev, A. E. & Tsuda, M. (1988). Octopus rhodopsin. Amino acid sequence deduced from cDNA. *FEBS Lett* **232**, 69-72.

Oyler, G. A., Higgins, G. A., Hart, R. A., Battenberg, E., Billingsley, M., Bloom, F. E. & Wilson, M. C. (1989). The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J Cell Biol* **109**, 3039-3052.

Parkin, E. T., Hussain, I., Karran, E. H., Turner, A. J. & Hooper, N. M. (1999). Characterization of detergent-insoluble complexes containing the familial Alzheimer's disease-associated presenilins. *J Neurochem* **72**, 1534-1543.

- Pennuto, M., Dunlap, D., Contestabile, A., Benfenati, F. & Valtorta, F. (2002).** Fluorescence resonance energy transfer detection of synaptophysin I and vesicle-associated membrane protein 2 interactions during exocytosis from single live synapses. *Mol Biol Cell* **13**, 2706-2717.
- Perin, M. S., Fried, V. A., Mignery, G. A., Jahn, R. & Sudhof, T. C. (1990).** Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature* **345**, 260-263.
- Peter, D., Liu, Y., Sternini, C., de Giorgio, R., Brecha, N. & Edwards, R. H. (1995).** Differential expression of two vesicular monoamine transporters. *J Neurosci* **15**, 6179-6188.
- Pevsner, J., Hsu, S. C. & Scheller, R. H. (1994).** n-Sec1: a neural-specific syntaxin-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1445-1449.
- Prasarnpun, S., Walsh, J., Awad, S. S. & Harris, J. B. (2005).** Envenoming bites by kraits: the biological basis of treatment-resistant neuromuscular paralysis. *Brain* **128**, 2987-2996.
- Prekeris, R. & Terrian, D. M. (1997).** Brain myosin V is a synaptic vesicle-associated motor protein: evidence for a Ca²⁺-dependent interaction with the synaptobrevin-synaptophysin complex. *J Cell Biol* **137**, 1589-1601.
- Quetglas, S., Iborra, C., Sasakawa, N., De Haro, L., Kumakura, K., Sato, K., Leveque, C. & Seagar, M. (2002).** Calmodulin and lipid binding to synaptobrevin regulates calcium-dependent exocytosis. *EMBO J* **21**, 3970-3979.
- Rehm, H., Wiedenmann, B. & Betz, H. (1986).** Molecular characterization of synaptophysin, a major calcium-binding protein of the synaptic vesicle membrane. *EMBO J* **5**, 535-541.
- Reisinger, C., Yelamanchili, S. V., Hinz, B., Mitter, D., Becher, A., Bigalke, H. & Ahnert-Hilger, G. (2004).** The synaptophysin/synaptobrevin complex dissociates independently of neuroexocytosis. *J Neurochem* **90**, 1-8.
- Roper, K., Corbeil, D. & Huttner, W. B. (2000).** Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane. *Nat Cell Biol* **2**, 582-592.
- Rossetto, O., Morbiato, L., Caccin, P., Rigoni, M. & Montecucco, C. (2006).** Presynaptic enzymatic neurotoxins. *J Neurochem* **97**, 1534-1545.
- Rossetto, O. & Montecucco, C. (2008).** Presynaptic neurotoxins with enzymatic activities. *Handb Exp Pharmacol*, 129-170.
- Sagne, C., Isambert, M. F., Vandekerckhove, J., Henry, J. P. & Gasnier, B. (1997).** The photoactivatable inhibitor 7-azido-8-iodoketanserine labels the N terminus of the vesicular monoamine transporter from bovine chromaffin granules. *Biochemistry* **36**, 3345-3352.

- Scherman, D. & Henry, J. P. (1984).** Reserpine binding to bovine chromaffin granule membranes. Characterization and comparison with dihydro-tetrabenazine binding. *Mol Pharmacol* **25**, 113-122.
- Schiavo, G., Rossetto, O., Benfenati, F., Poulain, B. & Montecucco, C. (1994a).** Tetanus and botulinum neurotoxins are zinc proteases specific for components of the neuroexocytosis apparatus. *Ann N Y Acad Sci* **710**, 65-75.
- Schiavo, G., Rossetto, O. & Montecucco, C. (1994b).** Clostridial neurotoxins as tools to investigate the molecular events of neurotransmitter release. *Semin Cell Biol* **5**, 221-229.
- Schiavo, G., Matteoli, M. & Montecucco, C. (2000).** Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev* **80**, 717-766.
- Schmitt, U., Tanimoto, N., Seeliger, M., Schaeffel, F. & Leube, R. E. (2009).** Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin. *Neuroscience* **162**, 234-243.
- Schoch, S., Deak, F., Konigstorfer, A., Mozhayeva, M., Sara, Y., Sudhof, T. C. & Kavalali, E. T. (2001).** SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice. *Science* **294**, 1117-1122.
- Shen, Y., Heimel, J. A., Kamermans, M., Peachey, N. S., Gregg, R. G. & Nawy, S. (2009).** A transient receptor potential-like channel mediates synaptic transmission in rod bipolar cells. *J Neurosci* **29**, 6088-6093.
- Siddiqui, T. J., Vites, O., Stein, A., Heintzmann, R., Jahn, R. & Fasshauer, D. (2007).** Determinants of synaptobrevin regulation in membranes. *Mol Biol Cell* **18**, 2037-2046.
- Singh, A., Biswal, N., Nalini, P., Sethuraman & Badhe, A. (2001).** Acute pulmonary edema as a complication of anti-snake venom therapy. *Indian J Pediatr* **68**, 81-82.
- Slepnev, V. I. & De Camilli, P. (2000).** Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat Rev Neurosci* **1**, 161-172.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T. & other authors (1985).** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85.
- Sollner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H. & Rothman, J. E. (1993).** A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* **75**, 409-418.
- Spanagel, R., Pendyala, G., Abarca, C. & other authors (2005).** The clock gene *Per2* influences the glutamatergic system and modulates alcohol consumption. *Nat Med* **11**, 35-42.

- Spiwoкс-Becker, I., Vollrath, L., Seeliger, M. W., Jaissle, G., Eshkind, L. G. & Leube, R. E. (2001).** Synaptic vesicle alterations in rod photoreceptors of synaptophysin-deficient mice. *Neuroscience* **107**, 127-142.
- Stein, A., Weber, G., Wahl, M. C. & Jahn, R. (2009).** Helical extension of the neuronal SNARE complex into the membrane. *Nature* **460**, 525-528.
- Su, M. J. & Chang, C. C. (1984).** Presynaptic effects of snake venom toxins which have phospholipase A2 activity (beta-bungarotoxin, taipoxin, crotoxin). *Toxicon* **22**, 631-640.
- Sudhof, T. C., Lottspeich, F., Greengard, P., Mehl, E. & Jahn, R. (1987).** A synaptic vesicle protein with a novel cytoplasmic domain and four transmembrane regions. *Science* **238**, 1142-1144.
- Sudhof, T. C. (1989).** Synaptic vesicles. *Curr Opin Cell Biol* **1**, 655-659.
- Sudhof, T. C. (2000).** The synaptic vesicle cycle revisited. *Neuron* **28**, 317-320.
- Sudhof, T. C. (2002).** Synaptotagmins: why so many? *J Biol Chem* **277**, 7629-7632.
- Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R. & Brunger, A. T. (1998).** Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* **395**, 347-353.
- Takamori, S., Rhee, J. S., Rosenmund, C. & Jahn, R. (2000).** Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* **407**, 189-194.
- Takamori, S., Rhee, J. S., Rosenmund, C. & Jahn, R. (2001).** Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGLUT2). *J Neurosci* **21**, RC182.
- Takamori, S., Malherbe, P., Broger, C. & Jahn, R. (2002).** Molecular cloning and functional characterization of human vesicular glutamate transporter 3. *EMBO Rep* **3**, 798-803.
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K. & other authors (2006).** Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **127**, 831-846.
- Tarsa, L. & Goda, Y. (2002).** Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1012-1016.
- Thiele, C., Hannah, M. J., Fahrenholz, F. & Huttner, W. B. (2000).** Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat Cell Biol* **2**, 42-49.

Thomas, L., Hartung, K., Langosch, D., Rehm, H., Bamberg, E., Franke, W. W. & Betz, H. (1988). Identification of synaptophysin as a hexameric channel protein of the synaptic vesicle membrane. *Science* **242**, 1050-1053.

Thomas, L. & Betz, H. (1990). Synaptophysin binds to physophilin, a putative synaptic plasma membrane protein. *J Cell Biol* **111**, 2041-2052.

Toh, K. L., Jones, C. R., He, Y., Eide, E. J., Hinz, W. A., Virshup, D. M., Ptacek, L. J. & Fu, Y. H. (2001). An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* **291**, 1040-1043.

Trimble, W. S., Cowan, D. M. & Scheller, R. H. (1988). VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 4538-4542.

Valtorta, F., Pennuto, M., Bonanomi, D. & Benfenati, F. (2004). Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays* **26**, 445-453.

Veit, M., Becher, A. & Ahnert-Hilger, G. (2000). Synaptobrevin 2 is palmitoylated in synaptic vesicles prepared from adult, but not from embryonic brain. *Mol Cell Neurosci* **15**, 408-416.

Walch-Solimena, C., Blasi, J., Edelmann, L., Chapman, E. R., von Mollard, G. F. & Jahn, R. (1995). The t-SNAREs syntaxin 1 and SNAP-25 are present on organelles that participate in synaptic vesicle recycling. *J Cell Biol* **128**, 637-645.

Wang, Z. W. (2008). Regulation of synaptic transmission by presynaptic CaMKII and BK channels. *Mol Neurobiol* **38**, 153-166.

Washbourne, P., Schiavo, G. & Montecucco, C. (1995). Vesicle-associated membrane protein-2 (synaptobrevin-2) forms a complex with synaptophysin. *Biochem J* **305 (Pt 3)**, 721-724.

Washbourne, P., Pellizzari, R., Baldini, G., Wilson, M. C. & Montecucco, C. (1997). Botulinum neurotoxin types A and E require the SNARE motif in SNAP-25 for proteolysis. *FEBS Lett* **418**, 1-5.

Webster, R. A. (2001). *Neurotransmitters, Drugs and Brain Function*: John Wiley & Sons Ltd.

Wick, M. R. (2000). Immunohistology of neuroendocrine and neuroectodermal tumors. *Semin Diagn Pathol* **17**, 194-203.

Wiedenmann, B. & Franke, W. W. (1985). Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* **41**, 1017-1028.

Wu, M. N., Fergestad, T., Lloyd, T. E., He, Y., Broadie, K. & Bellen, H. J. (1999). Syntaxin 1A interacts with multiple exocytic proteins to regulate neurotransmitter release in vivo. *Neuron* **23**, 593-605.

Yang, C. H., Liu, C. Z., Huang, T. F., Yang, C. M., Lui, K. R., Chen, M. S. & Hung, P. T. (1997). Inhibition of RPE cell-mediated matrix adhesion and collagen gel contraction by crovidisin, a collagen-binding snake venom protein. *Curr Eye Res* **16**, 1119-1126.

Yelamanchili, S. V., Reisinger, C., Becher, A., Sikorra, S., Bigalke, H., Binz, T. & Ahnert-Hilger, G. (2005). The C-terminal transmembrane region of synaptobrevin binds synaptophysin from adult synaptic vesicles. *Eur J Cell Biol* **84**, 467-475.

Yelamanchili, S. V., Pendyala, G., Brunk, I., Darna, M., Albrecht, U. & Ahnert-Hilger, G. (2006). Differential sorting of the vesicular glutamate transporter 1 into a defined vesicular pool is regulated by light signaling involving the clock gene *Period2*. *J Biol Chem* **281**, 15671-15679.

Zucker, R. S. (1996). Exocytosis: a molecular and physiological perspective. *Neuron* **17**, 1049-1055.

10 Abkürzungsverzeichnis

A

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATPv	Adenosintriphosphat

B

BCA	Bicinchoninsäure
BoNT	Botulinumtoxin
bzw.	Beziehungsweise

C

Ca ²⁺	Kalziumionen
CaCl ₂	Kalziumchlorid
Cl ⁻	Chloridionen
CRY	Cryptochrome
C-terminal	Carboxyl terminal

D

Da	Dalton
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
Dim	Dimer
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSS	Disuccinimidylsuberat
DTT	Dithiothreitol

E

ECL	„Enhanced Chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykolbis(2-aminoethyl-)tetraacetat
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potential

F

FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
------	-------------------------------------

G

g	Gramm
x g	Erdanziehungskraft
GABA	γ-Aminobuttersäure
GTP	Guanosintriphosphat

H

h	Stunde
H	Homogenat
HC	Schwere Kette („Heavy chain“)

I-J

IP	Immunpräzipitation
IPSP	Inhibitorisches postsynaptisches Potential

K

K ⁺	Kaliumionen
KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilo Dalton

L

LDCV	„Large dense core vesicles“
LP1	Lysiertes Pellet 1
LP2	Lysiertes Pellet 2
LS1	Lysierter Überstand 1
LS2	Lysierter Überstand 2

M

m	Milli (10 ⁻³)
mg	Milligram
Mg ²⁺	Magnesiumionen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min.	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mon	Monomer
ms	Millisekunden
mV	Millivolt
MW	Molekulargewicht

N

n	Nano (10 ⁻⁹)
Na ⁺	Natriumionen
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSF	N-ethylmaleimid sensitiver Faktor

10. Abkürzungsverzeichnis

O

OD Optische Dichte

P-Q

PAGE Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS Phosphatgepufferte Salzlösung
PdX Paradoxin
Per 2 Period 2
Pi Proteaseinhibitoren
PLA2 Phospholipase A2
pmol Picomol
PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid
P2 Pellet 2 (Synptosomen)
P3 Pellet 3 (Postsynptosomales Pellet)

R

rpm Umdrehungen pro Minute
RT Raumtemperatur (25 °C)

S

s Sekunde
SCAMPs „Secretory carrier-associated membrane proteins“
SCN Nucleus suprachiasmaticus
SDS Sodiumdodecylsulfat
SLMV „Small synaptic-like microvesicles“
SNAP „soluble NSF attachment protein“
SNAP-25 „Soluble NSF attachment receptor of MW 25kDA“
SNAREs „Synaptosomal associated protein receptors“
SPAN „Snake Presynaptic PLA2 Neurotoxins“
SSV „Small synaptic vesicles“
SV Synaptische Vesikel
Syb Synaptobrevin
Syb-Syp-Komplex Synaptobrevin-Synaptophysin Komplex
Syp Synaptophysin
Syt Synaptotagmin
Syx Syntaxin

I

TEMED N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TeNT Tetanustoxin
TMD Transmembrandomäne
TpX Taipoxin
TRIS Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
t-SNARE „target membrane SNARE“
Tyb Trypanblau

U

üN über Nacht

V

V Volt
 VAcHT Vesikulärer Azetylcholintransporter
 VAMP „Vesicle associated membrane protein“
 VGAT Vesikulärer GABA-Transporter
 VGLUT Vesikulärer Glutamatttransporter
 VMAT Vesikulärer Monoamintransporter
 v-SNARE „vesicle membrane SNARE“
 v/v Volumen pro Volumen

W

WT Wildtyp
 w/w Gewicht pro Gewicht
 w/v Gewicht pro Volumen

XYZ

XL chemische Quervernetzung
 z.B. zum Beispiel
 ZNS Zentrales Nervensystem
 ZT Zeitgeber

Sonderzeichen

β-MCD Methyl-β-cyclodextrin
 $\Delta\mu\text{H}^+$ Elektrochemischer Gradient
 $\Delta\Psi$ Elektrischer Gradient
 ΔpH pH-Gradient
 $^{\circ}\text{C}$ Grad Celsius
 > größer
 < kleiner
 μ Mikro (10^{-6})
 μg Mikrogramm
 μl Mikroliter
 μM Mikromolar
 % Prozent
 5HT Aufnahme Serotonin-Aufnahme