4 Ergebnisse

4.1 Mutanten

Das SNARE-Protein SNAP-25 ist *in vivo* palmitoyliert (Veit et al., 1996). Da die genaue Funktion dieser Fettsäuren noch nicht geklärt war, wird diese Fragestellung im folgenden untersucht. Die möglichen Fettsäurebindungsstellen sind vier Cysteinreste in der Mitte des Moleküls, in der ein Linker zwei Domänen verbindet (vgl. Abbildung 4.1), die im SNARE-Komplex helikal vorliegen. Insgesamt befinden sich im Molekül drei Bereiche mit Heptad-Wiederholungen (Gonzalo et al., 1999; Chapman et al. 1994). Die Region, in dem sich die vier Cysteinreste befinden, wird als Palmitoylierungsdomäne bezeichnet.

Die Palmitoylierung der SNAP-25-Isoform b wurde charakterisiert, indem Mutationen der Cysteinreste in der Palmitoylierungsregion erfolgten. Zum Einen wurde eine Deletionsmutante (Del) benutzt, deren 13 Aminosäuren im Linker einschließlich der Palmitoylierungsregion gegen Glutamat substituiert wurden und zum Anderen Mutanten mit Punktmutationen der einzelnen Cysteine. Hierbei handelt es sich entweder um Substitutionen von je zwei Cysteinen gegen Serin oder von vier Cysteinen gegen Alanin.

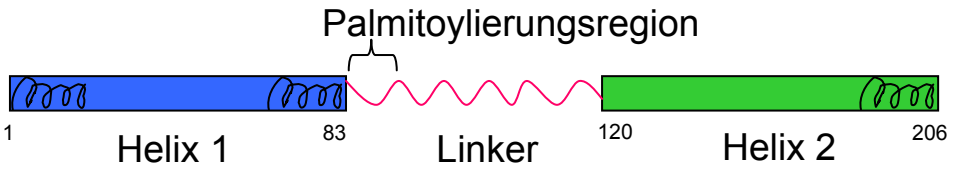

Abb. 4.1: Primärstruktur von SNAP-25
Zwei im SNARE-Komplex helikale Bereiche, Helix 1 und 2, sind über einen unstrukturierten Linker verbunden (Sutton et al., 1998). Alle vier Cysteinreste befinden sich im N-terminalen Bereich des Linkers. Die spiralenförmigen Bereiche kennzeichnen Regionen mit Heptad-Wiederholungen (Gonzalo et al., 1999; Chapman et al. 1994).

Zur Überprüfung der korrekten Mutationen wurden alle Mutanten sequenziert.

Die DNA- und Aminosäuresequenzen der für die Untersuchung relevanten SNAP-25-WT und den Mutanten sind in Abbildung 4.2 zu sehen.

WT	CTA	GGA	AAA	TTC	TGC	GGG	CTT	TGT	GTG	TGT	CCC	TGT	AAC	AAG	CTT
	Leu	Gly	Lys	Phe	Cys	Gly	Leu	Cys	Val	Cys	Pro	Cys	Asn	Lys	Leu
	81				85					90					95
Del	CTA	GAG	___	___	___	___	___	___	___	___	___	___	___	___	CTT
	Leu	Glu													Leu
	81	82													95
M1+2 (85S, 88S)	CTA	GGA	AAA	TTC	AGC	GGG	CTT	AGT	GTG	TGT	CCC	TGT	AAC	AAG	CTT
	Leu	Gly	Lys	Phe	Ser	Gly	Leu	Ser	Val	Cys	Pro	Cys	Asn	Lys	Leu
	81				85					90					95
M3+4 (90S, 92S)	CTA	GGA	AAA	TTC	TGC	GGG	CTT	TGT	GTG	AGT	CCC	AGT	AAC	AAG	CTT
	Leu	Gly	Lys	Phe	Cys	Gly	Leu	Cys	Val	Ser	Pro	Ser	Asn	Lys	Leu
	81				85					90					95
M1-4	CTA	GGA	AAA	TTC	GCC	GGG	CTT	GCT	GTG	GCT	CCC	GCT	AAC	AAG	CTA *
(85A, 88A, 90A, 92A)	Leu	Gly	Lys	Phe	Ala	Gly	Leu	Ala	Val	Ala	Pro	Ala	Asn	Lys	Leu
	81				85					90					95

Abb. 4.2: Sequenzen der Palmitoylierungsdomäne von SNAP-25b-WT und der verwendeten Mutanten.
Die oberste Reihe zeigt jeweils die DNA-, die Reihe darunter die Aminosäuresequenzen des SNAP-25b-WTs und der verwendeten Mutanten. Die Cysteine, die für die Palmitoylierung notwendig sind, sind umrandet. Grau unterlegt sind die Veränderungen (Cys gegen Ser bzw. Ala) zum WT.
WT = Wildtyp; Del = Mutante mit Deletion von 12 Aminosäuren; M = Mutante mit Austausch von je zwei oder allen vier Cysteinen
*Bei M1-4 wurde aus methodischen Gründen eine stumme Mutation eingeführt, so dass ein T gegen A in der DNA-Sequenz ausgetauscht ist, was aber keine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz hat.

4.2 SNAP-25 in Insektenzellen

Die Mehrzahl der Untersuchungen erfolgte an SNAP-25 aus Insektenzellen des Typs *Sf9*, da diese im Gegensatz zu Bakterienzellen in der Lage sind, Proteine mit Fettsäuren zu modifizieren. Ein weiterer Vorteil der Expression in Insektenzellen ist, dass die Proteine mit Hilfe des Bac-To-Bac-Expressionskits rekombinant exprimiert und gereinigt werden können.

Dafür wurden *Sf9*-Zellen mit dem Baculovirus, der die für SNAP-25-kodierende DNA trägt, infiziert. Die geernteten Zellen wurden lysiert, zentrifugiert und die löslichen Zellbestandteile an Ni^{2+}-Agarose gebunden. Die Agarose wurde mehrmals mit geringen Mengen Imidazol gewaschen und das Protein mit 250 mM Imidazol eluiert. Die Reinigung wurde mit SDS-PAGE illustriert, und SNAP-25 im Western Blot nachgewiesen (Abbildung 4.3). SNAP-25 hat zwar ein Molekulargewicht von 25 kDa, ist aber aufgrund seines Hexahistidinrestes, der aus dem Klonierungsvektor stammt, und der Palmitoylierung schwerer. Die Abbildung 4.3 A zeigt das SDS-Gel der einzelnen Reinigungsschritte: das Pellet der Zelltrümmer (P), den löslichen

Zellüberstand (SN), den Durchlauf, der nicht an die Agarose gebunden hat (FT) und die verschiedenen Eluate (E1-3), die auch mit Western Blot (B) untersucht wurden. Es befand sich bereits sehr viel SNAP-25 im Pellet der unlöslichen Zellbestandteile, das der weiteren Reinigung nicht zur Verfügung stand. Im Western Blot sind neben der Hauptbande von SNAP-25 zwei weitere Banden unterschiedlicher Größe zu sehen. Hier wurde möglicherweise SNAP-25 mit Palmitinsäure von unterschiedlichen Stöchiometrien aufgetrennt.
Pro 10^8 Insektenzellen konnte 0,1-1 mg Protein gereinigt werden.

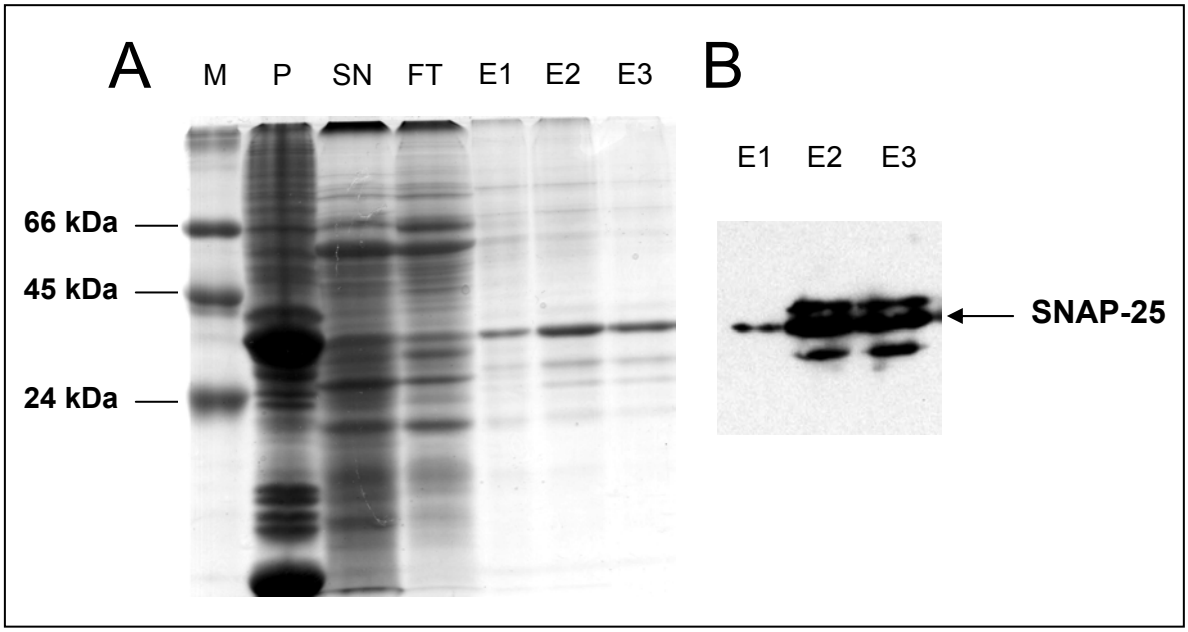

Abb. 4.3: Illustration der Reinigung von SNAP-25b-WT im Gel und Western Blot
A: 12% Coomassie-Polyacrylamidgel der Proteinreinigung von SNAP-25b-WT, jeweils 2% der Eluate aufgetragen, M = Proteinmarker, P = Pellet der Zelltrümmer, SN = lösliche Zellbestandteile, FT = Durchlauf der Säule, E = Eluate
B: Film eines Western Blots der gereinigten Eluate von SNAP-25b-WT, mit ECL-System detektiert jeweils 5µl aufgetragen , Expositionszeit 1 min.

4.3 Proteolytische Spaltung

Weil der Hexahistidinrest, der der Reinigung diente, die Eigenschaften eines Proteins beeinflussen kann, musste dieser für einige Proteincharakterisierungen proteolytisch abgespalten werden. Die rekombinante TEV-Protease spaltet insgesamt 23 Aminosäuren ab: den Startbereich, den Hexahistidinrest, eine Spacerregion und weitere Aminosäuren aus der Spaltstelle (vgl. Abb. 4.4).

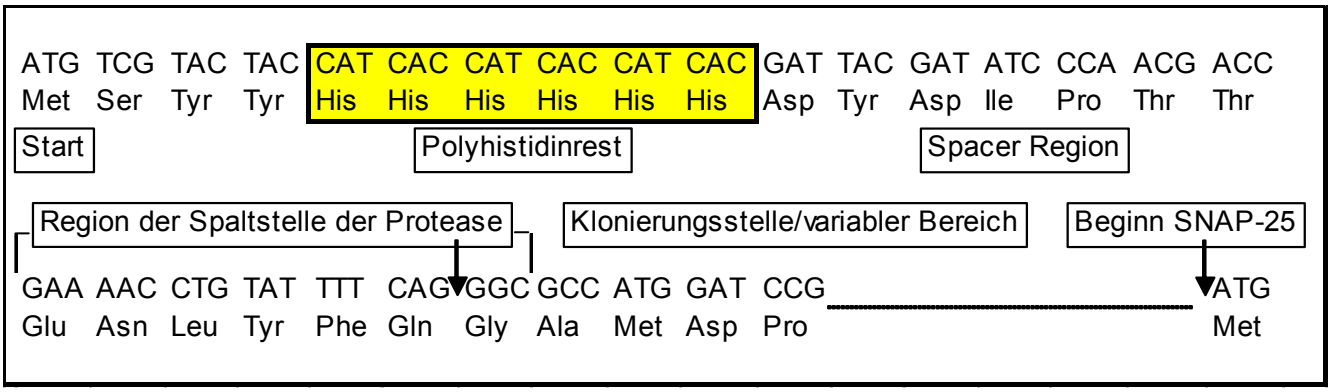

Abb. 4.4: Sequenz des N-terminalen Bereichs des rekombinanten SNAP-25-WT und angrenzender Vektorregion
DNA- und Aminosäuresequenz mit Startcodon, Polyhistidinbereich, der Spacer Region, der Spaltstelle der Protease und der Beginn der Sequenz von SNAP-25

Die Proteine sind nach dem Abspalten des Hexahistidinrestes um etwa 2,5 kDa kleiner, was zu einer Bandenverschiebung im SDS-Polyacrylamidgel führt (Abbildung 4.5). In Abbildung 4.6 sind die einzelnen Proteine mit Hexahistidinresten (links) und ohne (rechts) im Gel aufgetrennt. Offensichtlich gibt es Größenunterschiede zwischen den Mutanten und dem WT aufgrund der Modifizierung mit Palmitinsäure, unterschiedliche Einklonierungsmuster und der Deletion der Aminosäuren. Die Anzahl der Aminosäuren, die sich durch die unterschiedlichen Klonierungsstellen zusätzlich am N-Terminus der Proteine befinden, liegen zwischen fünf (für M1-4) und 16 (für WT und Del). Diese zusätzlichen Aminosäuren bleiben trotz Abspaltung des Histidinrestes vorhanden, da sie C-terminal zur Spaltstelle liegen. Deshalb ist die Deletionsmutante auch nicht wesentlich kleiner als die anderen Mutanten, was bei einer Deletion von 12 Aminosäuren zu erwarten gewesen wäre.

Abb. 4.5: Bandenverschiebung von SNAP-25-WT durch Abspaltung des Hexahistidinrestes

Unter nicht reduzierenden Bedingungen (Abbildung 4.6, links) bilden SNAP-25-WT und eine Mutante mit zwei Cysteinresten (M3+4) Oligomere, während unter reduzierenden Bedingungen (Abbildung 4.6, rechts) im Gel keine weiteren Banden außer denen des Monomers sichtbar sind. Möglicherweise sind die Oligomere durch Disulfidbrücken zweier Cysteinreste entstanden, die von Sadoul et al. (1997) bereits beschrieben wurden. Cysteinreste, die

Disulfidbrücken ausbilden, können aber nicht mit Fettsäuren modifiziert sein. Es wurde untersucht, ob das aus Insektenzellen gereinigte SNAP-25 palmitoyliert ist.

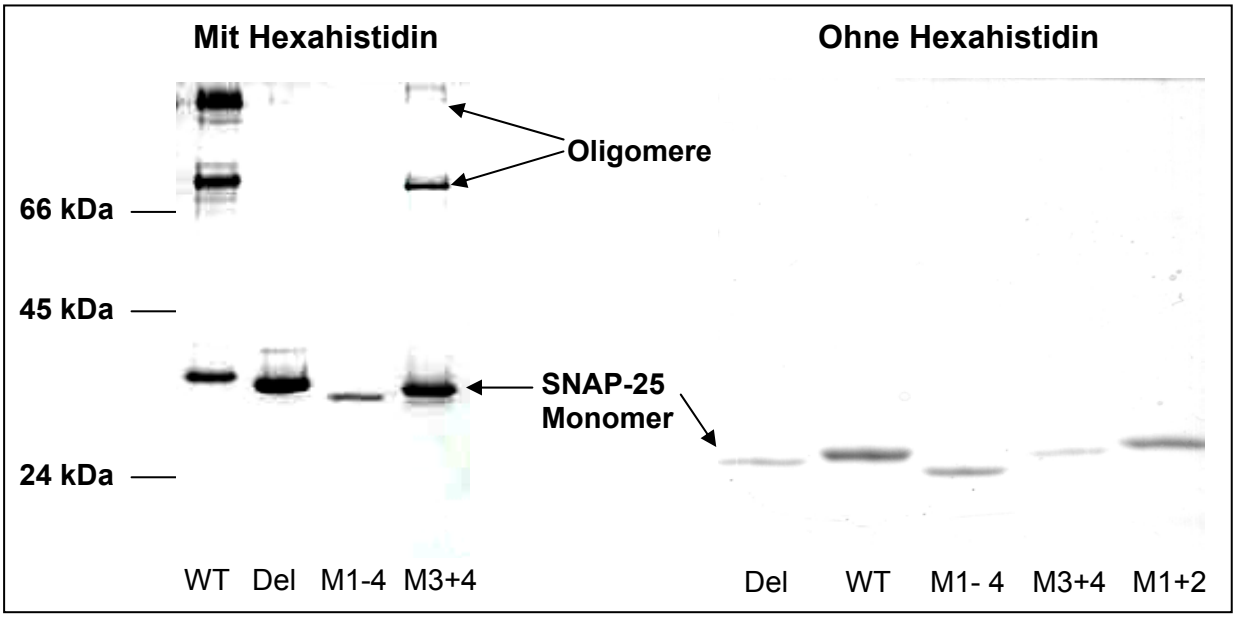

Abb. 4.6: Comassie-Gele von SNAP-25 mit und ohne Hexahistidinrest sowie unter nicht reduzierenden und unter reduzierenden Bedingungen
12% SDS-Polyacrylamidgele, mit Coomassie Brillant Blue gefärbt.
Links: Gereinigte SNAP-25 mit Hexahistidinrest und nicht reduzierendem Probenpuffer
Rechts: Gereinigte SNAP-25 ohne Hexahistidinrest und mit reduzierendem Probenpuffer

4.4 SNAP-25 aus Insektenzellen ist palmitoyliert

Da bei der Expression von Proteinen in Insektenzellen im Vergleich zu Säugerzellen unterschiedliche Syntheseeigenschaften beobachtet wurden, wird hier gezeigt, dass auch in Insektenzellen exprimiertes SNAP-25 palmitoyliert ist und die Fettsäuren bei der Reinigung erhalten bleiben.

Dazu wurden die SNAP-25-WT exprimierenden Insektenzellen metabolisch mit ^{3}H-Palmitinsäure markiert. Das Protein wurde nach der Reinigung mit Chloroform gefällt. Diese Probe wurde unter nicht reduzierenden Bedingungen auf ein Gel aufgetragen, mit dem ein Film exponiert wurde. Wie in Abbildung 4.7 zu sehen ist, sind auf dem Film auf gleicher Höhe mit den Coomassiebanden im Gel radioaktive Banden, die des Monomers und die eines Oligomers (vgl. auch Abbildung 4.6). Die Monomere sind wesentlich stärker acyliert als die Oligomere, da die Cysteine im Oligomer durch Disulfidbrücken blockiert sind. Densitometrische Bestimmungen der Banden des SDS-Gels ergeben ein Verhältnis von Oligomer zu Monomer von 1:4. Ein Viertel aller SNAP-25-Moleküle scheint Oligomere auszubilden. Während die Bandendichte des Oligomers vom Gel zum Film in etwa gleich bleibt, vervierfacht sich die Dichte der Monomerbande des Fluorogramms. Dies deutet darauf hin, dass im

Oligomer ein Cystein mit Fettsäure assoziiert ist, während im Monomer alle vier Cysteine mit Fettsäure assoziiert sind. Aus der Abbildung 4.7 lässt sich entnehmen, dass SNAP-25-WT aus Insektenzellen palmitoyliert vorliegt.

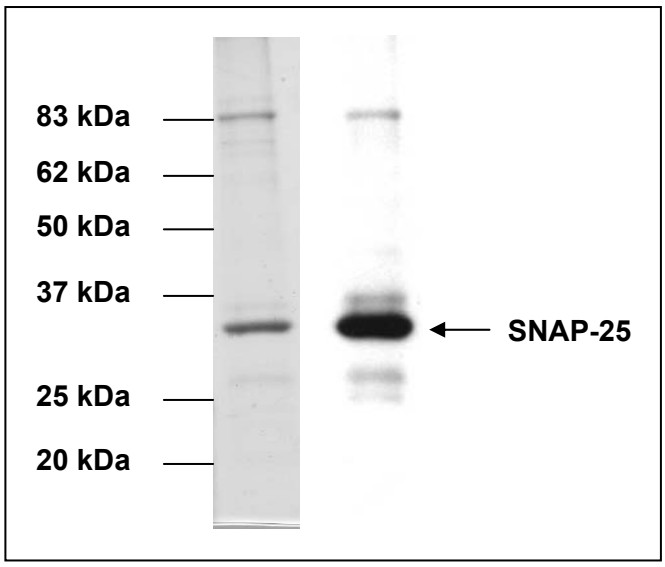

Abb. 4.7: 12%-Coomassie-Gel und Fluorografie von mit ^{3}H-Palmitinsäure markiertem SNAP-25-WT
Links: Coomassie-Gel, etwa 10 µg Protein in nicht-reduzierendem Puffer aufgetragen
Rechts: Fluorogramm desselben Gels, 3 Tage exponiert.

Da es so aussieht, als ob alle Cysteinreste im WT palmitoyliert sind, stellt sich die Frage, ob auch zwei Cysteine für eine Palmitoylierung ausreichen, d.h. ob die beiden Mutanten mit jeweils zwei substituierten Cysteinen auch Fettsäuren binden.

Die mit ^{3}H-Palmitinsäure markierten Eluate der Proteinreinigung wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen auf ein SDS-Gel gegeben. Im Anschluss an die Fluorografie folgte eine Silberfärbung des erneut gewässerten Gels.

Die Banden des Gels und des Fluorogramms wurden eingescannt und densitometrisch quantifiziert. Die Ergebnisse drei verschiedener Versuche mit Expositionszeiten von zwei Monaten wurden ausgewertet und ein Balkendiagramm erstellt, in dem der Wert für SNAP-25 WT gleich 100 gesetzt wurde. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die Banden über den Balken repräsentieren die Proteinbanden der Silbergele (G) und der Fluorogramme (F).

Die Abbildung 4.8 zeigt, dass die SNAP-25-Mutanten M1+2 und M3+4 im Vergleich zum WT nur zwischen 20 und 30% palmitoyliert sind, obwohl jeweils nur die Hälfte der Cysteinreste gegen Serin substituiert ist. Aus diesem Grund mussten die Filme für WT und Mutanten zwei Monate exponieren. Das führte zu einer Schwärzung des Hintergrundes, was bei der Auswertung berücksichtigt werden musste. Deswegen erscheinen die Banden der Mutanten im Fluorogramm relativ stark im Vergleich zum WT. Die beiden Mutanten sind auch palmitoyliert. Scheinbar sind für eine optimale Palmitoylierung alle Cysteinreste notwendig.

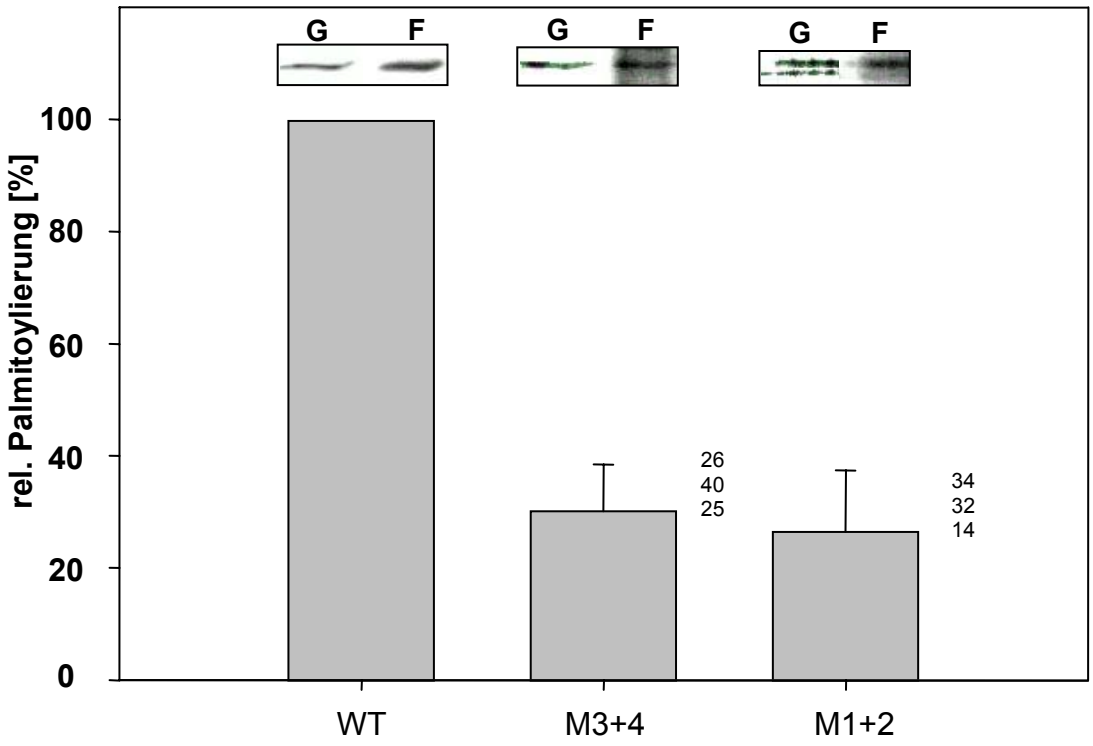

Abb. 4.8: Balkendiagramm zur Quantifizierung der Palmitoylierung
Das Balkendiagramm zeigt die im Vergleich zu SNAP-25-WT rel. Palmitoylierung von M3+4 und M1+2. Über dem jeweiligen Balken sind die Proteinbanden im Silbergel (G) und in dem Fluorogramm (F) abgebildet. Die Fluorogramme wurden 2 Monate exponiert. Es wurden drei unterschiedliche Reinigungen ausgewertet, deren prozentuale Ergebnisse neben den Balken abgebildet sind.

4.5 Hydrophobizität der Proteine

Um eine Aussage über die Hydrophobizität der gereinigten Proteine machen zu können, die möglicherweise Rückschlüsse auf den Grad der Palmitoylierung zulässt, wurde eine Triton X-114-Phasentrennung durchgeführt.

Aufgrund der ungewöhnlichen Eigenschaft von Triton X-114, bei 0°C in wässrigem Puffer löslich zu sein, aber oberhalb von 20°C eine deutlich hydrophobe Phase auszubilden, kann die Hydrophobizität der in dem Versuch eingesetzten Proteine abgeschätzt werden. Das Maß hierfür ist der relative Anteil der Proteinmenge in der Detergenzienphase.

Als Kontrolle dienten VAMP (auch Synaptobrevin genannt), das eine Transmembranregion besitzt und dadurch hydrophobe Bereiche besitzt, und SNAP-25-WT aus *E.coli*, das weniger hydrophob sein sollte, da es keine Transmembranregion besitzt und in Bakterienzellen keine hydrophoben Modifizierungen erfolgen. Ebenfalls war zu erwarten, dass die Deletionsmutante aus Insektenzellen sich dem SNAP-25-WT aus *E.coli* entsprechend verteilen würde, da die Palmitoylierungsregion entfernt war.

Von den unterschiedlichen Phasen wurden Proteinproben in gleicher Menge, jeweils 20% der gesamten Phase, für einen Western Blot eingesetzt. Die Proteinbanden der Western

Blots der wässrigen und der Tritonphase wurden über Densitometrie ausgewertet und ein Balkendiagramm erstellt (Abbildung 4.9). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen aus drei Versuchen.

Es ist zu erkennen, dass VAMP in der hydrophoben Phase und die nicht palmitoylierten Proteine Del und der WT aus *E.coli* in der wässrigen Phase angereichert sind. Interessanterweise zeigen der WT und die beiden Mutanten aus *Sf9* mit jeweils zwei substituierten Cysteinen einen signifikanten Hydrophobizitätsanteil, was die Ergebnisse, die für eine Palmitoylierung dieser Proteine sprechen, unterstützt. Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied in der Hydrophobizität zwischen den Mutanten mit zwei Palmitinsäurebindungsstellen und dem WT gefunden werden. Das liegt eventuell daran, dass diese Methode nicht sensitiv genug ist.

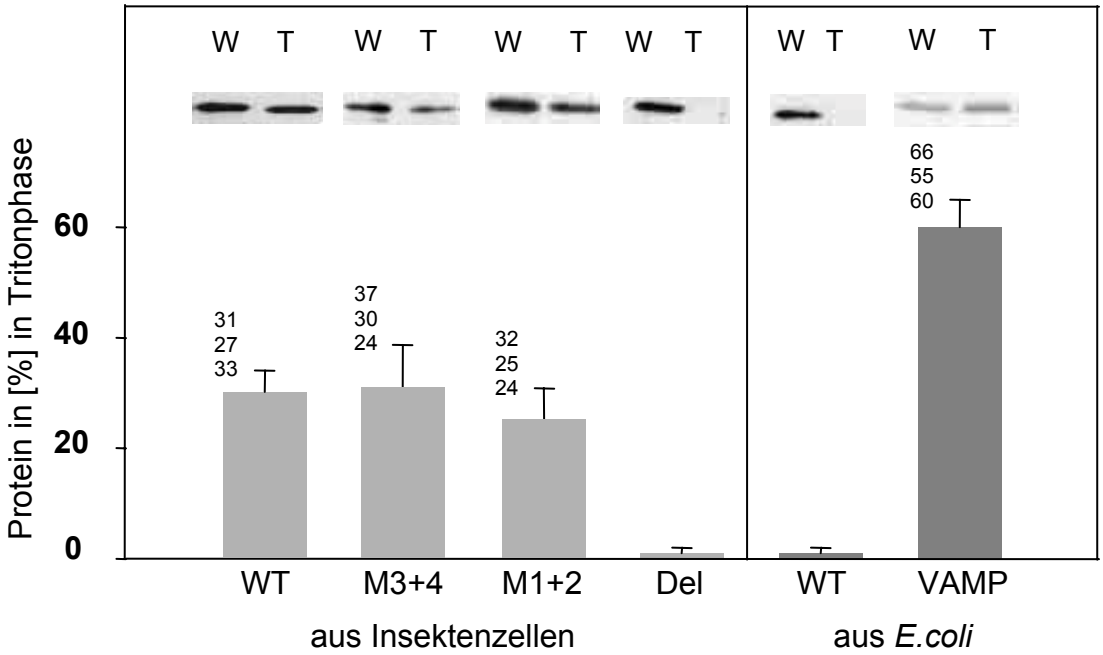

Abb. 4.9: Darstellung der Proteinanteile in der hydrophoben Phase nach Phasentrennung mit Triton X-114
Das Balkendiagramm zeigt den Proteinanteil verschiedener SNAP-25-Proteine aus Insektenzellen *Sf9* oder *E.coli*, der sich in der hydrophoben Phase befindet und entstand über Dichte-Bestimmungen der Gelbanden. Die abgebildeten Banden sind repräsentativ für alle drei Versuche, deren Werte in % neben den Balken zu finden sind. Alle Proteine außer VAMP sind als Western Blot abgebildet, VAMP ist im SDS-Gel mit Coomassie gefärbt.
W = wässrige Phase, T = Tritonphase

4.6 Quartäre Proteinstruktur

Gereinigtes SNAP-25-WT aus Insektenzellen ist palmitoyliert und bildet Oligomere, wie das SDS-Polyacrylamidgel unter nicht reduzierenden Bedingungen in den Abbildungen 4.6 und 4.7 zeigt. Wenn die Ursache der Oligomerbildung Disulfidbrücken sind, dann würde in einem zweidimensionalen Gel (2D-Gel) nur die Monomerbanden vorzufinden sein, da der DTT-

Gehalt bei Zugabe des Probenpuffers bei 67 mM DTT liegt. Für die 2D-Gelelektrophorese wurde gereinigtes SNAP-25 mit Hexahistidinresten verwendet.

Wie in Abbildung 4.10 zu sehen ist, zeigt SNAP-25-WT unter den Bedingungen der 2D-Gelelektrophorese ebenfalls multimere Komplexe, die alle den gleichen isoelektrischen Punkt besitzen, den des Monomers. Die Deletionsmutante zeigt in der zweidimensionalen Gelelektrophorese keine Multimere. Die Multimere des WT existieren trotz einer Harnstoffkonzentration von etwa 6,5 M, 67 mM DTT und 1,3% Triton X-100 im Probenpuffer. Die Oligomere des WT sind von unterschiedlichen Größen und befinden sich auch an der Einlaufgrenze des Gels. Es handelt sich bei diesen hochmolekularen Banden nicht um durch Disulfidbrücken verbundene Oligomere.

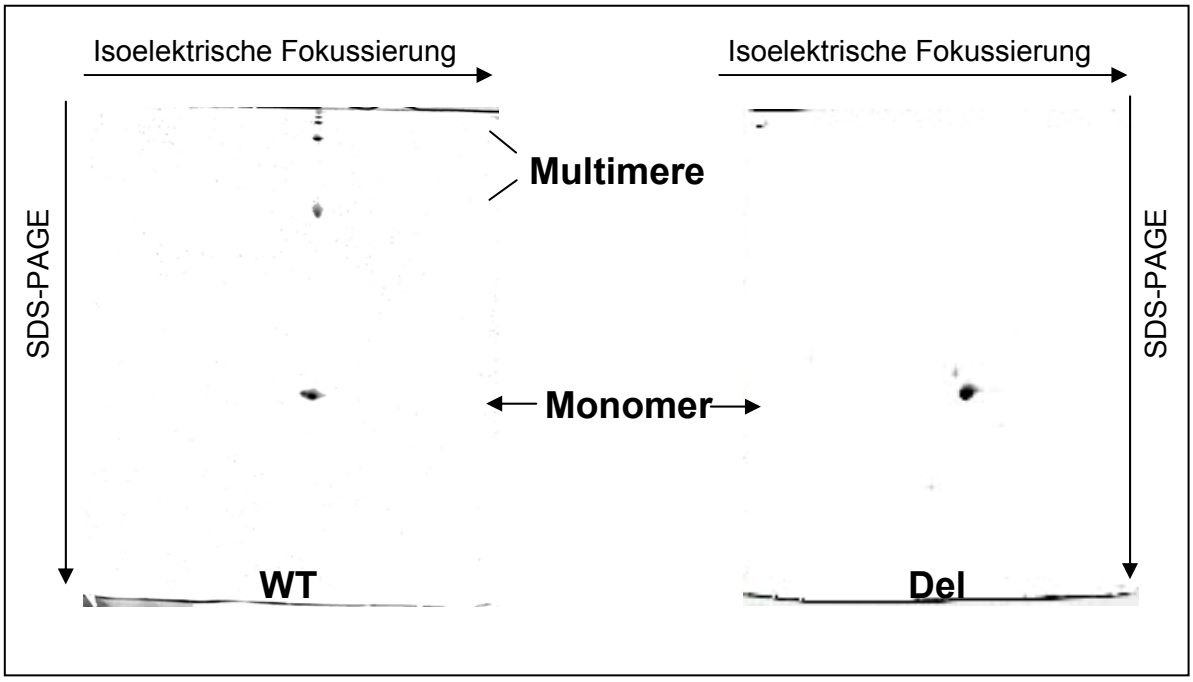

Abb. 4.10: Zweidimensionale Gelelektrophorese
Coomassiefärbung von 2D-Gelen mit SNAP-25 WT und Del. Aufgetragen wurden jeweils 30-50 µg Protein. Horizontal wurde nach der Ladung und vertikal nach der Größe aufgetrennt.

Die hochmolekularen Oligomere des WT sind im 2D-Gel aufgrund ihrer Größe möglicherweise nicht ins Gel eingelaufen. Diese könnten sich eventuell im Elektronenmikroskop betrachten lassen.

Dazu wurden aus Insektenzellen gereinigte SNAP-25-WT, -Del oder -M1-4 ohne Hexahistidinreste auf ein Gitter gegeben und mit Uranylacetat in einer Negativkontrastierung elektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht.

Die Abbildung 4.11 zeigt für SNAP-25-WT, -M1-4 und -Del Proteinakkumulationen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 20-40 nm. Unerwarteterweise bilden auch SNAP-25-Del und die cysteinfreie Mutante große Proteinakkumulationen, die im SDS-PAGE und im 2D-Gel nicht beobachtet wurden.

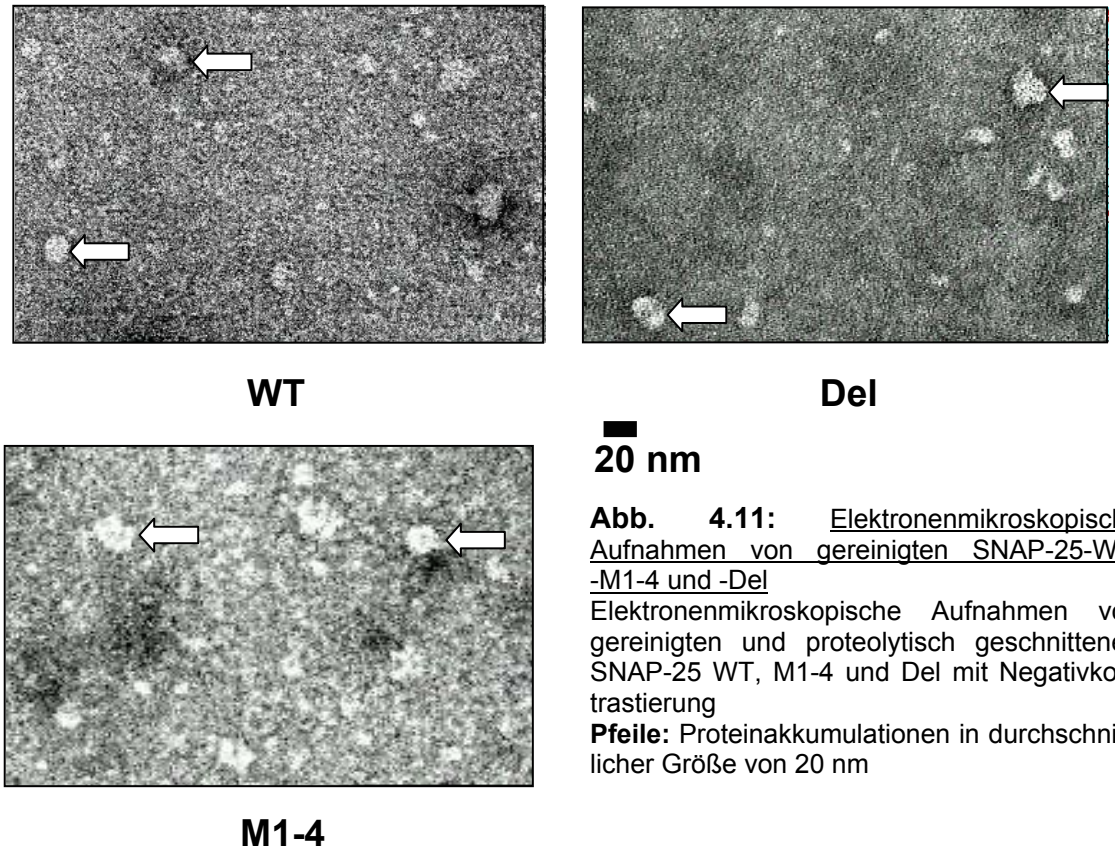

Abb. 4.11: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von gereinigten SNAP-25-WT, -M1-4 und -Del
Elektronenmikroskopische Aufnahmen von gereinigten und proteolytisch geschnittenen SNAP-25 WT, M1-4 und Del mit Negativkontrastierung
Pfeile: Proteinakkumulationen in durchschnittlicher Größe von 20 nm

4.7 Charakterisierung der Oligomergemische

Die Oligomergemische von SNAP-25-WT, die in dem 2D-Gel in Abbildung 4.10 zu sehen sind, müssten sich aufgrund unterschiedlicher Größen auch in der Gelfiltration auftrennen lassen. Ebenfalls müssten die Proteinakkumulationen der Deletionsmutante aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Abbildung 4.11 entweder im Ausschlussvolumen, das bei 1500 kDa liegt, oder in mehreren Fraktionen einer Gelfiltrationssäule eluieren, wenn diese stabil sind.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte über eine FPLC-Anlage mit konstanten Laufparametern und einer integrierten Detektion der eluierten Proteine bei 280 nm. Jeweils gleiche Mengen gereinigter SNAP-25-Del und -WT aus Insekten- und Bakterienzellen wurden per Gelfiltration aufgetrennt. Der Laufpuffer war Tris-HCl pH 8.0 und hatte keine weiteren Zusätze. Die Elutionsprofile des palmitoylierten gereinigten SNAP-25 wurden mit den nicht palmitoylierten SNAP-25 verglichen und sind in Abbildung 4.12 zu sehen.

Das Elutionsprofil der Deletionsmutante zeigt einen einzelnen scharfen Peak, nachdem 22 ml Puffer durch die Säule liefen. Dieser Peak entspricht dem Monomer. Im Anschluss an diesen Peak ist die Basislinie nicht wieder auf der Höhe der Startlinie. Möglicherweise absorbieren Abbauprodukte der Deletionsmutante. Für Del gibt es keinen Peak im Aus-

schlussvolumen, der die Existenz von Multimeren beweisen würde, die in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen sichtbar waren. Das spricht dafür, dass die Multimere aus der Elektronenmikroskopie nur durch schwache Wechselwirkungen zusammenhalten.

Das Elutionsprofil SNAP-25-WT aus *E.coli* besitzt einen Hauptpeak, in dem das Protein nach 20 ml Puffer eluiert. Palmitoyliertes SNAP-25 hingegen eluiert mit zwei Peaks. Ein Peak befindet sich im Ausschlussvolumen, bei dem ein Oligomergemisch nach etwa 10 ml Puffer eluieren muss, und der andere Peak erfolgt nach etwa 20 ml Pufferdurchlauf. Der letzte Peak entspricht vom Laufverhalten in etwa dem des WT aus *E.coli*, während es sich bei dem Peak im Ausschlussvolumen um ein Multimer mit mehr als 60 SNAP-25-Molekülen handeln muss, da es größer als 1500 kDa ist.

Wurde palmitoyliertes SNAP-25 in einer NaCl-Lösung mit hoher Salzkonzentration durch Gelfiltration aufgetrennt, reduzierte sich der Peak im Ausschlussvolumen, und der Peak bei 20 ml Pufferdurchlauf wurde breiter. Es scheint, als hätten sich die großen Multimergemische durch den Salzgehalt teilweise aufgelöst. Der verbreiterte Peak ist in Richtung geringeren Pufferdurchlaufs verschoben. Das bedeutet, dass es sich bei dem Peak um ein Gemisch aus Monomeren und unterschiedlichen Oligomeren, bestehend aus weniger als 60 Molekülen, handeln könnte.

Möglicherweise entsteht also die Proteinakkumulation, die auch in der Elektronenmikroskopie beobachtet wurde, durch ionische Wechselwirkungen und lässt sich durch einen hohen Salzgehalt zu niedermolekularen Oligomeren reduzieren, die u. a. durch Disulfidbrücken entstehen.

Die palmitoylierten Proteine besitzen im Unterschied zu den nicht palmitoylierten einen Hauptpeak mehr, der bei einem hohen Salzgehalt reduziert werden kann und zu einer Verbreiterung des Hauptpeaks zu größerem Molekulargewicht führt. Dies legt den Schluss nahe, dass es elektrostatische Wechselwirkungen der WT-Moleküle untereinander gibt, die einen Anteil an der Proteinakkumulation aus Abbildung 4.11 haben.

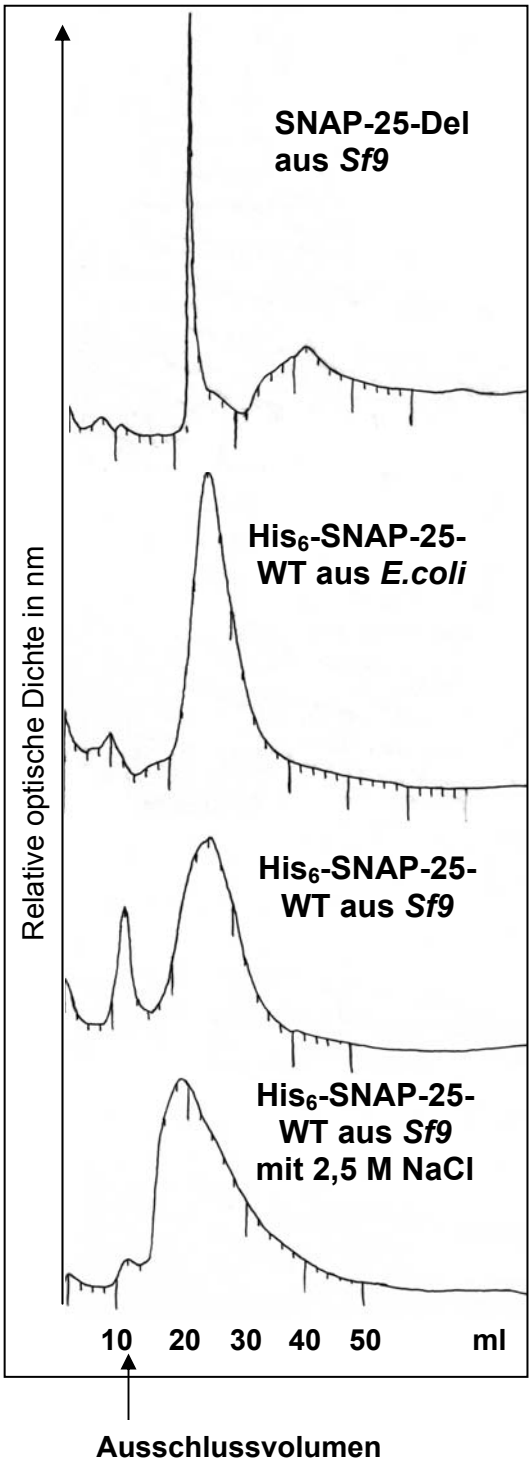

Abb. 4.12: Elutionsprofile der FPLC-Läufe über Gelfiltration von SNAP-25-Del, -WT aus *E.coli* und *Sf9* und der Einfluß von 2,5 M NaCl
Etwa 15-20 µg der gereinigten SNAP-25 wurden analysiert. Als Laufpuffer wurde Tris-HCl pH 8.0 verwendet.
Die Abbildung zeigt die Elutionsprofile von Del ohne Hexahistidinreste, His$_6$-SNAP-25-WT aus *E.coli*, His-SNAP-25-WT aus *Sf9* und die gleiche Probe mit 2,5 M NaCl.

Nachdem festgestellt wurde, dass bei der Gelfiltration die Oligomere von SNAP-25-WT im Ausschlussvolumen sind, ist die Frage nach dessen Molekulargewicht interessant. Dieses wurde von den gereinigten SNAP-25-WT und -Mutanten ohne Histidinreste über Multi angle Laser Light Scattering (MALLS) bestimmt (Wyatt, 1993).

150 µg Protein wurden mit Tris-Puffer mit physiologischem Kochsalzgehalt, DTT und EDTA über Gelfiltration aufgetrennt und mit UV-Absorption, Laser-Photometrie und Refraktometrie optisch verfolgt.

Die kalkulierten Massen lagen für palmitoyliertes SNAP-25 (WT, M1+2, M3+4) zwischen 10 bis 750 Molekülen, während die Deletionsmutante mit genau einem Molekül kalkuliert wurde (Abbildungen werden nicht gezeigt). Da DTT im Laufpuffer ist, entstehen die durch MALLS kalkulierten Proteinzusammenballungen nicht durch Disulfidbrücken.

Selbst unter Zusatz unterschiedlichster Detergenzien und Salze besitzt gereinigter SNAP-25-WT eine quartäre Struktur, während die Deletionsmutante nur im Puffer ohne weitere Zusätze als Multimer erscheint (elektronenmikroskopische Untersuchungen), deren Wechselwirkungen nicht einer Gelfiltration standhalten. Die Oligomere des WT sind im zweidimensionalen Gel trotz hohem Triton-, Harnstoff- und DTT-Gehalt sichtbar, aber im SDS-Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen nicht. Daraus folgt, dass die Proteinkluster weder vollständig durch hydrophobe Wechselwirkungen noch durch Disulfidbrücken ausgelöst werden. Es scheint, dass sowohl hydrophobe als auch elektrostatische Wechselwirkungen neben kovalenten Bindungen durch die Schwefelgruppen der freien Cysteinreste zu einer Akkumulation der Proteine beitragen. Einen Überblick über die Bedingungen, unter denen SNAP-25 WT oder Del eine quartäre Struktur besitzen, gibt die Tabelle 5.1 in der Diskussion.

Um den endgültigen Beweis zu haben, dass sich die palmitoylierten Moleküle in Puffer tatsächlich räumlich näher sind als die nicht palmitoylierten, wurde die Methode des chemischen Quervernetzens gewählt. Das Reagenz Dithiobis[succinimidylpropionat] (DTSP) kann in Abwesenheit von Tris Proteine an freien Aminogruppen (Lysinreste), die nicht weiter als 12 Å voneinander entfernt sind, quervernetzen.
Die gereinigten, gegen Phosphatpuffer dialysierten SNAP-25-Proben ohne Hexahistidinreste wurden quervernetzt. Die Doppelproben wurden jeweils mit DTSP oder nur mit dem Lösungsmittel DMSO versetzt.
Die Abbildung 4.13 zeigt die chemische Quervernetzung von SNAP-25-WT und -Del. Bei Zugabe des Quervernetzungsreagenz ist die Bande für SNAP-25-Del diffus. Der WT wird durch Lomants Reagenz quervernetzt und läuft auf Grund der Größe des gebildeten Oligomers nicht in das Gel hinein.
Gereinigtes SNAP-25-WT lässt sich also im Vergleich zur Deletionsmutante besser quervernetzen. Das bedeutet, dass die WT-Moleküle des gereinigten Proteins einen deutlich geringeren Abstand voneinander besitzen als die der Deletionsmutante. Für den WT ist demnach tatsächlich eher eine Aggregation zu erwarten als für die Mutante.

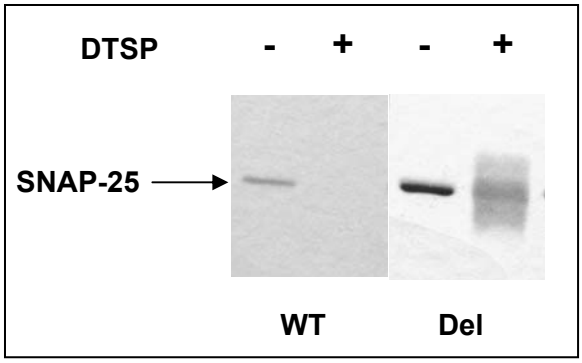

Abb. 4.13 Silbergele der quervernetzten gereinigten SNAP-25-WT- und -Del-Proben
Jeweils 5 µg der gereinigten proteolytisch geschnittenen SNAP-25-WT (linkes Gel) und -Del (rechtes Gel) wurden entweder mit DTSP oder DMSO versetzt und unter nicht reduzierenden Bedingungen im 12%-Gel aufgetrennt und silbergefärbt.

4.8 Charakterisierung der Struktur

Aus Bakterienzellen gereinigtes SNAP-25-WT-Protein ist unstrukturiert (Fasshauer et al., 1997a), während es im Komplex mit den anderen SNARE-Proteinen eine α-helikale Struktur besitzt (Sutton et al., 1998). Für diese Versuche wurde SNAP-25 ohne Fettsäuren eingesetzt.

Ein möglicher Grund für die Induktion einer geordneten Proteinstruktur, unabhängig von der Bindung von SNAP-25 im Komplex, könnten Fettsäuren sein. Um diese Fragestellung klären zu können, wurde die Konformation von SNAP-25 mit hydrophober Proteinmodifikation unter Anwendung der CD-Spektroskopie analysiert.

Für die CD-Spektroskopie wurden gereinigte und dialysierte SNAP-25-Proteine ohne Hexahistidinreste verwendet, die in Insektenzellen exprimiert worden waren.

SNAP-25-WT und die Mutanten wurden jeweils einzeln und in ihrer Bindung im SNARE-Komplex nach 16 h Inkubationszeit gemessen. Von Syntaxin und VAMP wurden zur Bindung jeweils ihre Bindungsdomänen eingesetzt, d. h. für Syntaxin die Aminosäuren 180-262 und für VAMP die Aminosäuren 1-96 (Fasshauer et al., 1998a). Ebenfalls wurde SNAP-25-WT thermisch denaturiert und die Struktur vor und nach der Denaturierung (sofort und nach 16 h), und bei 80°C gemessen.

Ein α-helikaler Strukturanteil zeichnet sich im Spektrum u.a. durch zwei Minima aus, die sich bei 207 und bei 222 nm Wellenlänge befinden. Die Abbildung 4.14 A zeigt die Einzelspektren von SNAP-25 und den Mutanten. Es ist zu sehen, dass alle gemessenen Proteine außer SNAP-25 Del (grüne Kurve) einen α-helikalen Strukturanteil besitzen. Obwohl für M1+2 (blau) weniger Protein eingesetzt wurde, lässt sich trotzdem noch erkennen, dass auch dieses einen helikalen Anteil besitzt. Bei der Messung stieg der elektrische Widerstand der

Probe bei allen SNAP-25-Proben stark an und war unterhalb von 200 nm extrem hoch (nicht gezeigt), so dass in dem Bereich kein Spektrum aufgenommen werden konnte. Je höher der elektrische Widerstand ist, desto stärker schwankt die Basislinie, und das Spektrum lässt sich nicht mehr auswerten.

Alle SNAP-25-Proben, sogar Del, besitzen im SNARE-Komplex eine α-helikale Struktur (Abbildung 4.14 B), abzüglich der theoretisch addierten Einzelspektren. Auch hier ist der elektrische Widerstand bei den Messungen sehr hoch (nicht gezeigt).

Die Abbildung der Messung von SNAP-25-WT (Abbildung 4.14 C) bei der thermischen Denaturierung zeigt die native Struktur (grün), die denaturierte, ungeordnete Struktur bei hohen Temperaturen (rot) und die langsame Rückfaltung in die helikale Struktur nach 30 min (pink) und 16 h (blau).

Das in *Sf9* exprimierte, gereinigte SNAP-25 besitzt also einen α-helikalen Strukturanteil, der reversibel ist. Alle Mutanten liegen im SNARE-Komplex α-helikal vor. Möglicherweise wird durch die Oligomerisierung der Proteine eine Strukturbildung ausgelöst, die allerdings auch für die Erhöhung des Widerstandes unterhalb von 200 nm verantwortlich sein kann.

Es bleibt die Frage, warum die Proteine bei der CD-Spektroskopie einen so hohen elektrischen Widerstand haben (Daten nicht gezeigt). Um zu klären, ob es sich um Verunreinigungen der Proben handeln könnte, wurden die gereinigten Proteine einer Anionenaustauscherchromatographie unterzogen.

Gereinigtes SNAP-25-WT wurde deshalb in einem SMART-System an eine MonoQ-Säule gebunden und mit einem NaCl-Gradienten von der Säule eluiert. Das Elutionsprofil, das die Absorption bei 280 nm Wellenlänge wiedergibt (Abbildung 4.15), zeigt zwei Hauptpeaks bei den Fraktionen 20/21 und 23. Nur bei den Fraktionen 20+21 war in einer Gelelektrophorese mit Coomassiefärbung die 25 kDa-Bande von SNAP-25 sichtbar (nicht gezeigt), während für Fraktion 23 im Gel keine Bande zu sehen war, obwohl ein Peak bei 280 nm mit dem UV-Gerät detektiert werden konnte. Möglicherweise besteht die detektierte Fraktion aus zu kleinen Peptiden, die aus dem Gel ausliefen oder aber zu große, die gar nicht erst hineinliefen. Der Fraktionspool (20+21) wurde für eine CD-spektroskopische Messung und elektronenmikroskopische Aufnahmen eingesetzt.

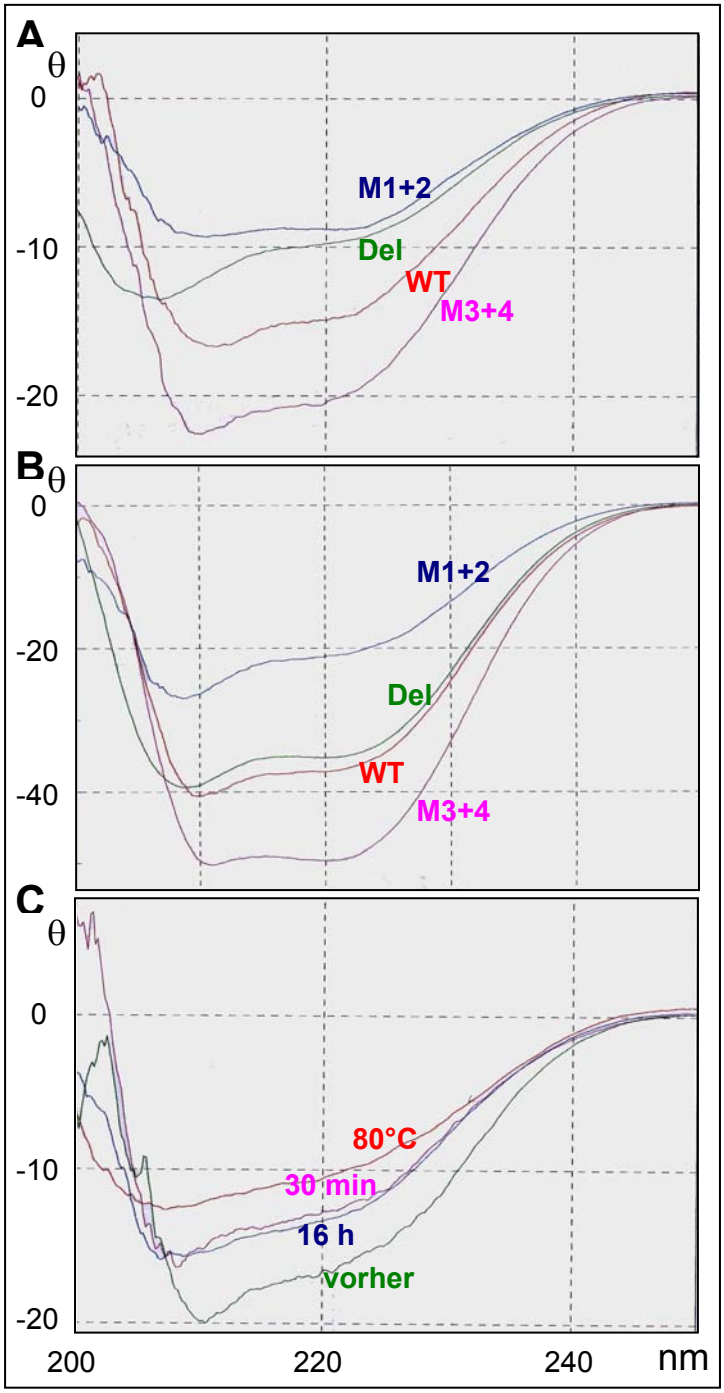

Abb. 4.14: CD-Spektren von SNAP-25-WT und -Mutanten, einzeln und im Komplex, De- und Renaturierung des WT

A: Einzelspektren von je etwa 50 µg SNAP-25-WT (rot), -M3+4 (pink), -M1+2 (blau) und -Del (grün) in 0,437 Mixküvetten.

B: Spektren des SNARE-Komplexes mit je 40 nM VAMP- und Syntaxindomäne (s. Text) und je etwa 50 µg SNAP-25-WT (rot), -M3+4 (pink), -M1+2 (blau) und -Del (grün) in Mixküvette.

C: Spektrum der thermalen Denaturierung von SNAP-25-WT, vor der Denaturierung bei 25°C (grün), bei 80°C (rot), bei 25°C nach der Denaturierung: nach 30 min (pink) und nach 16 h (blau).

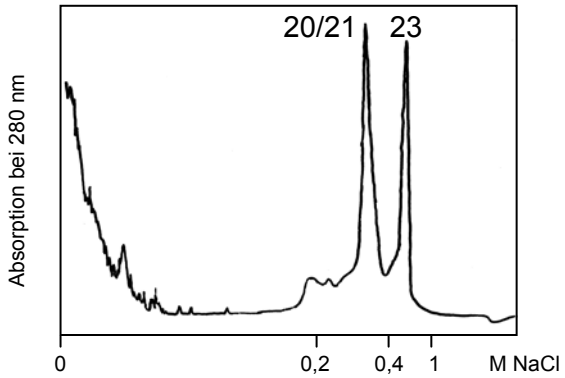

Abb. 4.15: Elutionsprofil der SMART-Anionenaustauscherchromatographie von SNAP-25-WT
Absorption des UV-Meters bei 280 nm und einem Gradienten bis 1 M NaCl. Laufpuffer war Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA, 1 mM DTT

In Abbildung 4.16 sind die CD-Spektren des gereinigten SNAP-25-WT vor und nach der Anionenaustauscherchromatographie im Vergleich zu sehen. Der WT hat nach dem Chromatographieschritt keinen α-helikalen Anteil. Ebenfalls sind auch keine multimeren Zusammenballungen im Elektronenmikroskop zu sehen (nicht gezeigt). Nach der Chromatographie sind also sowohl die Oligomere als auch die helikale Struktur von SNAP-25-WT verschwunden. Mögliche Ursachen könnten sein, dass durch die Anionenaustauscherchromatographie strukturinduzierende Verunreinigungen aus der Probe entfernt wurden und durch die Zugabe von DTT im Laufpuffer die Disulfidbrücken reduziert sind. Ob SNAP-25 in den Fraktionen 20/21 noch palmitoyliert ist, muss leider unbeantwortet bleiben. Allerdings wurden den Proteinproben auch für die zweidimensionale Gelelektrophorese und für das MALLS DTT zugesetzt, was keinen Einfluss auf eine oligomere Struktur hatte und für die Abtrennung einer strukturinduzierenden Verunreinigung spricht.

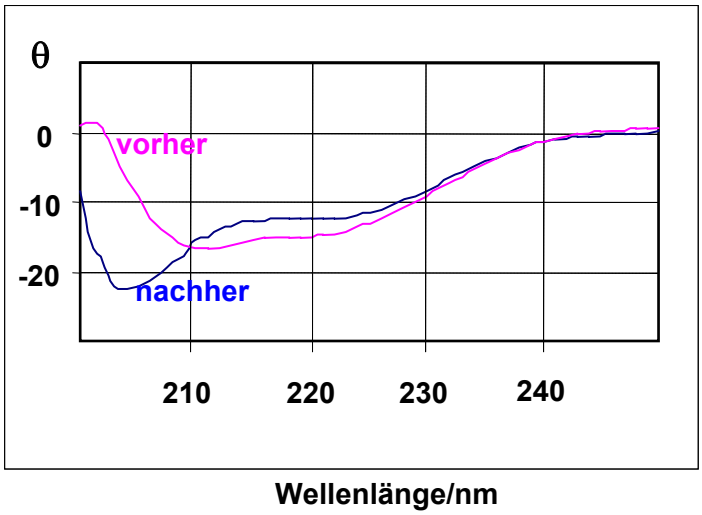

Abb. 4.16: CD-Spektren vor und nach der Anionenaustauscherchromatographie
SNAP-25 WT Fraktionspool 20/21 der Anionenaustauscherchromatographie, CD-Spektren vorher und nachher aufgenommen

4.9 SNAP-25 im SNARE-Komplex

Die Proteine SNAP-25, Syntaxin und VAMP bilden an der präsynaptischen Plasmamembran nach dem Andocken eines synaptischen Vesikels einen sogenannten SNARE-Komplex aus (Übersichtsartikel von J. E. Rothman, 1994), der für die Fusion des Vesikels mit der Membran notwendig ist. Dieser ternäre Komplex kann auch *in vitro* aus rekombinanten SNARE-Proteinen, gereinigt aus *E.coli*, gebildet werden (Hayashi et al., 1994). Syntaxin und SNAP-25 *in vitro* können einen binären Komplex eingehen (Pevsner et al., 1994).

Es wurde nun untersucht, ob palmitoyliertes SNAP-25 aus Insektenzellen ebenfalls an Syntaxin und VAMP binden kann. Dies ist von Interesse, da die bisher *in vitro* untersuchten SNARE-Komplexe SNAP-25 ohne Proteinmodifikation enthielten. Möglicherweise könnte die hydrophobe Proteinmodifikation eine Auswirkung auf die Bindung von SNAP-25 im SNARE-Komplex haben. Um den Binär- und den Ternärkomplex zu bilden, wurde GST-Syntaxin an Glutathionagarose immobilisiert. Die Agarose wurde mit SNAP-25-WT oder Del und mit oder ohne VAMP inkubiert. Danach wurde ungebundenes Protein entfernt, die an die Agarose gebundenen Proteine im Probenpuffer auf ein Gel gegeben und dieses mit SNAP-25-Antikörper im Western Blot detektiert. Die Abbildung 4.17 zeigt schematisch die oben beschriebene SNARE-Komplexbildung, die auch weiteren Charakterisierungen des SNARE-Komplexes (weiter unten) zugrunde liegen.

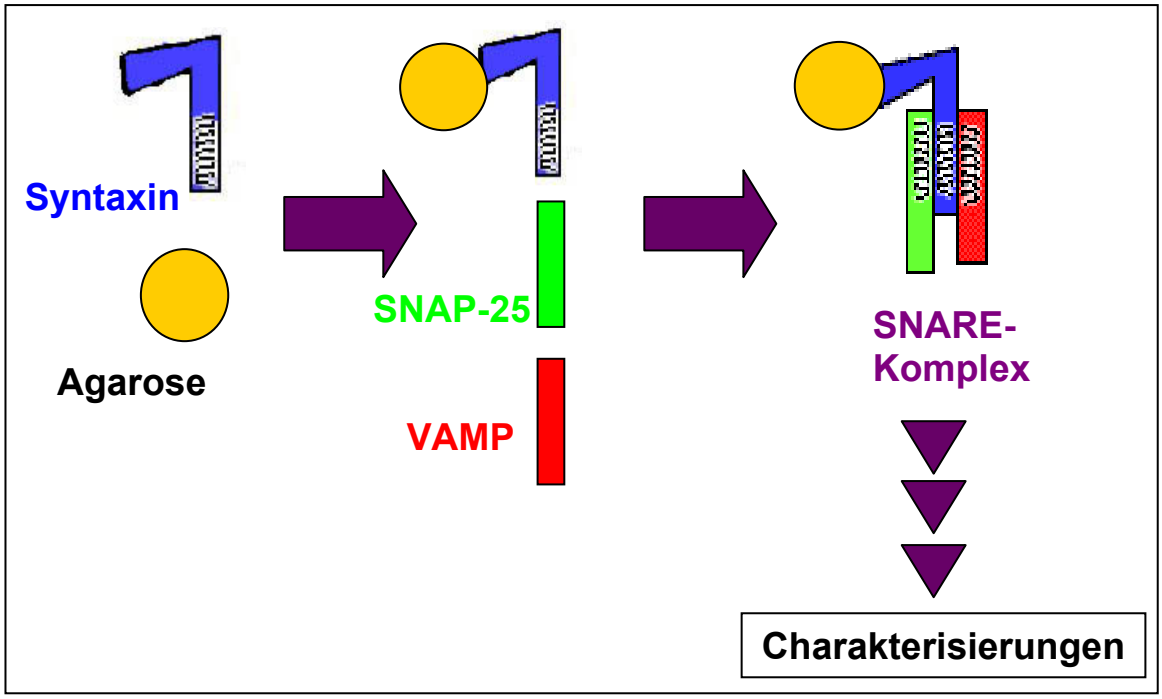

Abb. 4.17: Bildung des ternären SNARE-Komplexes
GST-Syntaxin wird an Glutathion-Agarose gebunden, gewaschen und mit SNAP-25 und VAMP inkubiert. Der entstandene SNARE-Komplex wird wieder gewaschen und steht weiteren Charakterisierungen zur Verfügung

Die Abbildung 4.18 dokumentiert die Bildung des binären und ternären SNARE-Komplexes von palmitoyliertem und nicht palmitoyliertem SNAP-25 via Western Blot. In der ersten Spur des Gels wurde als Kontrolle das an die Agarose gebundene Syntaxin aufgetragen, das keine SNAP-25-Bande zeigt. Die Spuren daneben zeigen die Bindung vom WT an Syntaxin, dann die von Del an Syntaxin. In den letzten beiden Bahnen ist die Ternärkomplexbildung zu sehen, die Bindung von SNAP-25-WT und -Del an jeweils Syntaxin und VAMP. Die Binär- und Ternärkomplexe werden durch Aufkochen der Proben mit Probenpuffer zerstört, so daß in jeder Spur jeweils die SNAP-25-Monomerbande zu sehen ist. Beim WT sind zusätzlich zur Monomerbande die unter nicht reduzierenden Bedingungen erscheinenden Oligomerbanden (vgl. auch Abbildung 4.5) zu sehen, die Del, wie bereits erwähnt, nicht ausbildet.

Das verdeutlicht, dass sowohl der Binär- als auch der Ternärkomplex mit SNAP-25-WT und auch mit SNAP-25-Del gebildet werden können. Hier wird erstmalig gezeigt, daß aus Insektenzellen gereinigtes und palmitoyliertes SNAP-25 ebenfalls in der Lage ist, einzeln an Syntaxin (Binärkomplex) und an Syntaxin und VAMP gemeinsam (Ternärkomplex) zu binden.

Da für SNAP-25-WT und -Del circa gleiche Mengen Protein auf gleiche Mengen der restlichen SNARE-Proteine eingesetzt wurde, scheint der WT besser zu binden als Del. Die Oligomere sind aber fast nicht palmitoyliert (Abb. 4.7). Aus diesem Grund reduziert sich der Vergleich auf die Monomerbanden. Demnach ist der Einfluß der Palmitoylierung auf die Bindung von SNAP-25 wenig ausschlaggebend.

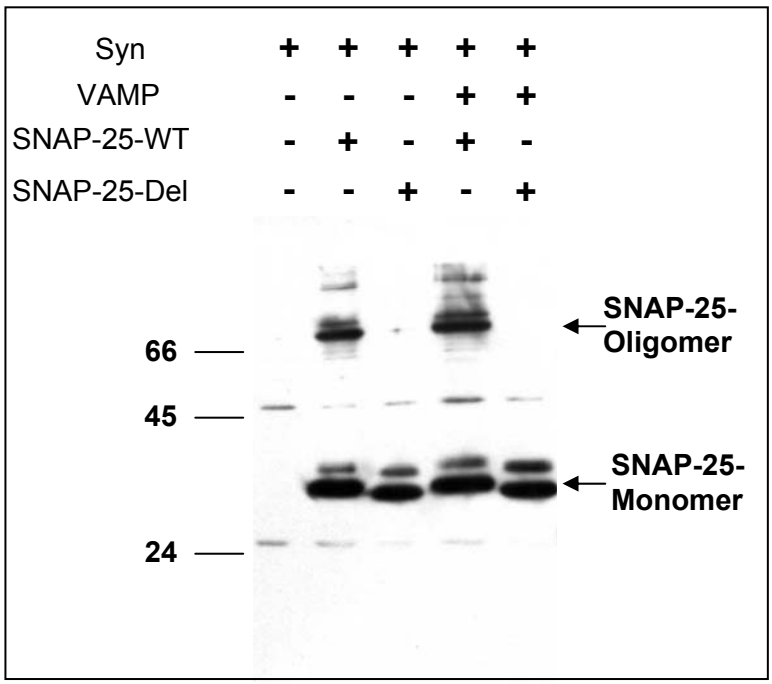

Abb. 4.18: Western Blot der SNAP-25-WT und -Del im Binär- und Ternärkomplex
Western Blot eines 12% SDS-Polyacrylamidgels unter nicht reduzierenden Bedingungen. Dokumentation der Bindung von Syntaxin an SNAP-25-WT und -Del (*Sf9*) und von Syntaxin an VAMP und jeweils SNAP-25-WT und -Del (*Sf9*). Als Kontrolle dient immobilisiertes Syntaxin in der ersten Spur. Die Detektion erfolgte mit SNAP-25-Antikörper und dem ECL-System. Eingesetzt wurden für SNAP-25 und VAMP je 20 µg Protein, Syntaxin dagegen im Überschuß

4.10 Quantifizierung der Bindung von SNAP-25 zu Syntaxin

Da es in der Bindungsintensität zwischen SNAP-25-Del und -WT sowohl zu Syntaxin als auch zu Syntaxin und VAMP leichte Unterschiede gab (siehe Abbildung 4.18), wurde die Bindung von SNAP-25-WT und der Mutanten zu Syntaxin quantifiziert, um eventuelle Korrelationen zwischen Bindung und Palmitoylierung zu finden. SNAP-25-WT und die Mutanten wurden in Säugerzellen mit Hilfe des Vaccinia-Virus-Systems exprimiert, in dem SNAP-25 ebenfalls palmitoyliert wird (Veit et al., 1996), und die Bindungen zu Syntaxin untereinander verglichen.

Dazu wurden SNAP-25 exprimierende und mit ^{35}S-radioaktiv markierte CV1-Zellen lysiert und der Zellextrakt mit 10 µg gereinigtem Syntaxin über Nacht in der Kälte geschüttelt. Es folgte eine Inkubation mit Syntaxin-Antikörper und Protein-A-Sepharose, um Syntaxin und an Syntaxin gebundenes SNAP-25 abzutrennen. Der nicht an die Sepharose gebundene Überstand wurde einer weiteren Immunfällung mit SNAP-25-Antikörper und Protein-A-Sepharose unterworfen, um nicht an Syntaxin gebundenes SNAP-25 zu immobilisieren. Die Protein-A-Sepharose mit den gebundenen Proteinen wurde jeweils drei mal gewaschen, mit reduzierendem Probenpuffer aufgekocht und auf ein 12% SDS-Polyacrylamidgel gegeben. Es folgte eine Fluorographie. Die Banden der Fluorographie wurden densitometrisch ausgewertet und ein Balkendiagramm erstellt.

Die Abbildung 4.19 zeigt, daß die Bindung an Syntaxin beim WT und den Mutanten in etwa gleichem Maße erfolgt. In den meisten Versuchen war die Bindung vom WT an Syntaxin ein wenig stärker als die der anderen Mutanten. Auch variierte das allgemeine Verhältnis von an Syntaxin gebundenem SNAP-25 zu nicht gebundenem bei jedem Versuch. Die Verhältnisse untereinander jedoch blieben gleich, wie das Balkendiagramm widerspiegelt.

Es wurde in der Literatur bereits die Palmitoylierung von SNAP-25 und der Mutanten in Säugerzellen beschrieben und quantifiziert (Lane und Liu, 1997, Veit et al., 1996). Die Autoren fanden eine fast vollständig verhinderte Palmitoylierung für M1+2 und M3+4 bzw. keine Palmitoylierung für SNAP-25-Del.

Demzufolge hat das Maß der Palmitoylierung von SNAP-25 auf die Bindung zu Syntaxin keinen Einfluss.

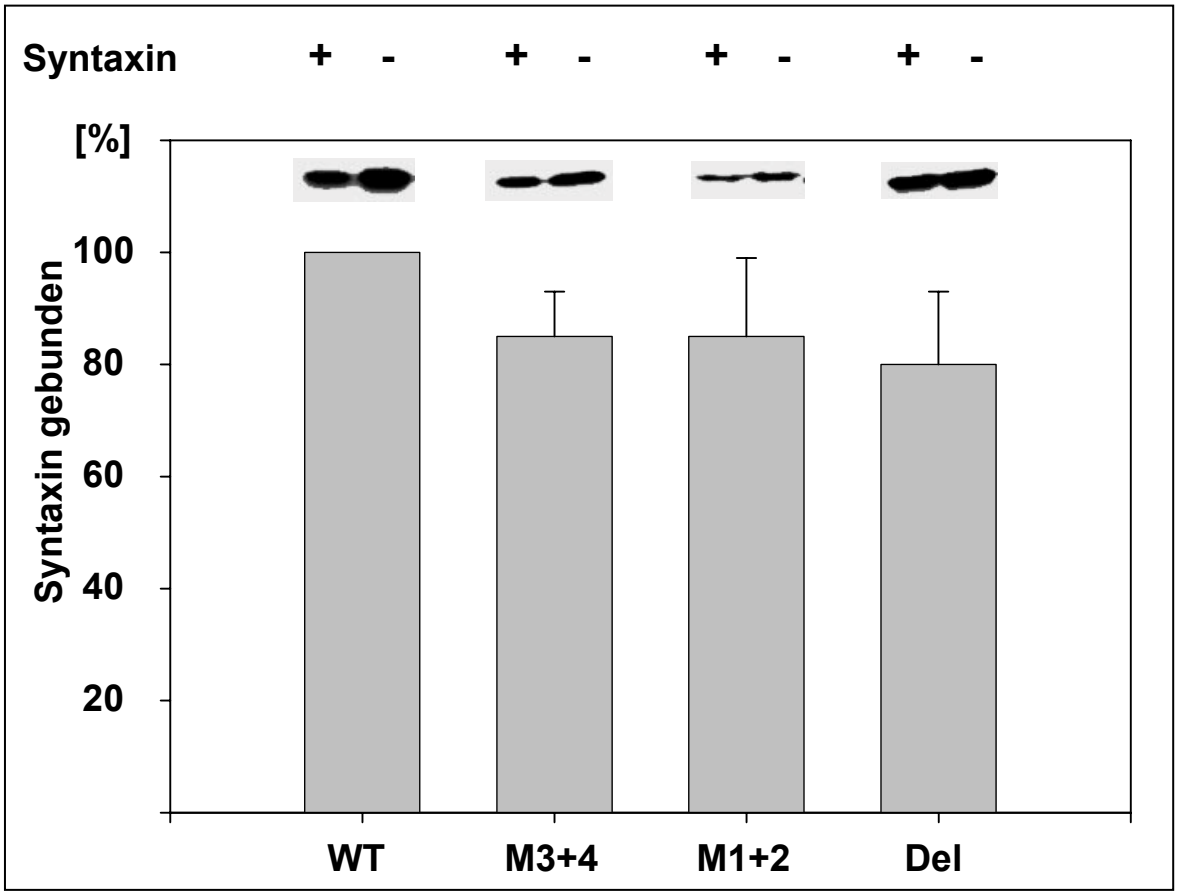

Abb. 4.19: Balkendiagramm der an Syntaxin gebundenen relativen Menge von SNAP-25
Die Fluorogramme über den Balken illustrieren die Bindung von SNAP-25 an Syntaxin (jeweils rechte Bande) und nicht an Syntaxin gebundenes SNAP-25 (jeweils linke Bande). Im Fluorogramm werden die mit ^{35}S radioaktiv markierten Proteinbanden der Immunfällungen gezeigt. Die Banden wurden densitometrisch quantifiziert und die Menge des WT, der an Syntaxin gebunden hat, 100% gesetzt. Die densitometrischen Berechnungen vier unabhängiger Experimente wurden im Balkendiagramm aufgetragen.

4.11 Eigenschaften des SNARE-Komplexes

Auch wenn das Bindungsmaß von SNAP-25 an die anderen SNARE-Proteine nicht von seinem Palmitoylierungsgrad beeinflusst wird, ist nicht auszuschließen, dass die Eigenschaften und die biologischen Funktionen des SNARE-Komplexes davon abhängig sind. Eine der Eigenschaften des SNARE-Komplexes ist seine in der Literatur beschriebene SDS-Resistenz (Hayashi et al., 1994), d.h. dieser ternäre Komplex ist bei Zugabe von SDS bei Temperaturen bis etwa 65 °C stabil.

Um dieses zu untersuchen, wurden, wie unter 4.9 bereits beschrieben, in Doppelansätzen der ternäre SNARE-Komplex gebildet. Die Proben wurden mit reduzierendem Probenpuffer, der 3% SDS enthielt, versetzt und diese, bevor sie auf ein Gel aufgetragen wurden, entweder auf 95°C erhitzt oder direkt aufgetragen, um die Resistenz des Komplexes zu überprüfen. Die Auswertung des Versuchs erfolgte via Western Blot mit zwei verschiedenen Antikörpern, gegen SNAP-25 (nicht gezeigt) und gegen VAMP.

Die Abbildung 4.20 zeigt den Western Blot mit dem VAMP-Antikörper. In den Bahnen 2 und 4 sind die SDS-resistenten SNARE-Komplexe zu sehen. Die gleichen SNAP-25-Proben wurden jeweils nebeneinander aufgetragen, in den Spuren 1 und 2 die Proben mit WT und in den Spuren 3 und 4 mit M1-4.

Sowohl palmitoyliertes als auch nicht palmitoyliertes SNAP-25 bilden mit Syntaxin und VAMP SDS-resistente SNARE-Komplexe, die durch Erhitzen zerfallen (Spuren 1 und 3). Da rekombinantes Syntaxin eine Größe von etwa 60 kDa, rekombinantes SNAP-25 von 28 kDa und rekombinantes VAMP von etwa 17 kDa besitzen, haben die Komplexe eine Größe von 105 kDa (siehe Abbildung 4.20). Zusätzliche sichtbare Banden sind Oligomerbanden von VAMP, die nach Laage und Langosch (1997) in Abhängigkeit von der Proteinmenge und in Anwesenheit der Transmembranregion beobachtet werden. Das VAMP-Monomer ist im Blot nicht sichtbar, da es bei einer Größe von 17 kDa aus dem Gel ausgelaufen war.

Die SDS-resistenten Komplexe waren auch mit SNAP-25 Antikörper detektierbar (nicht gezeigt).

Die SDS-Resistenz des SNARE-Komplexes wird durch den Grad der Palmitoylierung von SNAP-25 nicht beeinflusst.

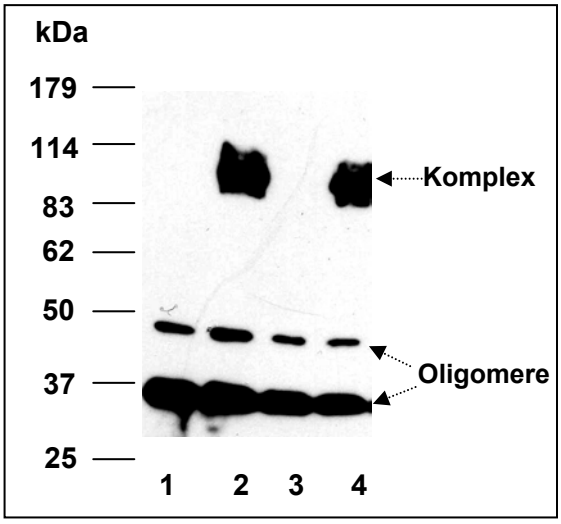

Abb. 4.20: Western Blot der SDS-resistenten SNARE-Komplexe
Auftrennung der Proben von SNARE-Komplexen mit SNAP-25-WT (Spuren 1+2) und -M1-4 aus *Sf9* (Spuren 3+4), von denen die Spuren 1 und 3 erhitzt und 2 und 4 nicht erhitzt wurden, im 8%igen SDS-Polyacrylamidgel mit Western Blot mit VAMP-Antikörper. Von SNAP-25 wurde jeweils 15 µg Protein eingesetzt, während Syntaxin und VAMP im Überschuß angeboten wurden.

Möglicherweise hat die Palmitoylierung von SNAP-25 eine Auswirkung auf andere Eigenschaften des SNARE-Komplexes, der sich laut Söllner et al. (1993) enzymatisch spalten lässt, was auch als “Disassembly” bezeichnet wird. Die Spaltung erfolgt mit der ATPase NSF und α-SNAP. Für die Enzymaktivität notwendig sind Magnesiumionen und ATP.

Um zu untersuchen, ob es bei der enzymatischen Spaltung des SNARE-Komplexes einen Unterschied in Abhängigkeit von der Palmitoylierung gibt, wurde wie oben beschrieben, GST-Syntaxin und die anderen SNARE-Proteine an Glutathionagarose in Doppelansätzen

gebunden. Die Agarose mit dem gebundenen Komplex wurde gewaschen, zur Kontrolle mit α-SNAP, $MgCl_2$ und ATP und zur enzymatischen Spaltung zusätzlich mit NSF versetzt. Die Reaktion wurde nach 10 oder 60 min gestoppt, indem die Agarose abzentrifugiert und der Überstand mit TCA gefällt wurde. Die TCA-Pellets wurden unter reduzierenden Bedingungen und Erhitzen auf ein SDS-Gel geladen und dieses mit SNAP-25- und VAMP-Antikörpern im Western Blot detektiert.

Auf dem Western Blot mit VAMP-Antikörper in Abbildung 4.21 ist zu sehen, daß die SNARE-Komplexe mit SNAP-25-WT und -M1-4 enzymatisch gespalten vorlagen. Densitometrische Berechnungen der Proteinbanden ergaben, dass nach 10 min beim WT 30% und bei M1-4 50% der Proteinmenge im Vergleich zu 60 min (100%) frei geworden waren. Bei den Negativkontrollen, bei denen keine enzymatische Spaltung stattfand, ist im Blot keine VAMP-Bande zu sehen, d.h. das gesamte VAMP ist im Komplex an der Glutathionagarose geblieben. Im Blot sind von VAMP wie bereits in Abbildung 4.20 zusätzlich zu den Monomer-Oligomerbanden zu sehen. Da für alle Spaltungen die gleiche Menge an SNAP-25 eingesetzt wurde, müssten die abgespaltenen Proteinmengen auch gleich sein. Die Abbildung 4.21 zeigt jedoch, dass bei der Spaltung des Komplexes mit der cysteinfreien Mutante größere Proteinmengen abgespalten werden als beim WT, etwa die doppelte Menge von VAMP. Der SNARE-Komplex mit nicht palmitoyliertem SNAP-25 ist folglich enzymatisch weniger stabil als der mit palmitoyliertem SNAP-25.

Allerdings lässt sich der SNARE-Komplex sowohl mit palmitoyliertem als auch nicht palmitoyliertem SNAP-25 enzymatisch spalten, wobei aber die Spaltung des SNARE-Komplexes mit nicht palmitoyliertem im Vergleich zu palmitoyliertem SNAP-25 deutlich schneller und möglicherweise auch vollständiger erfolgt.

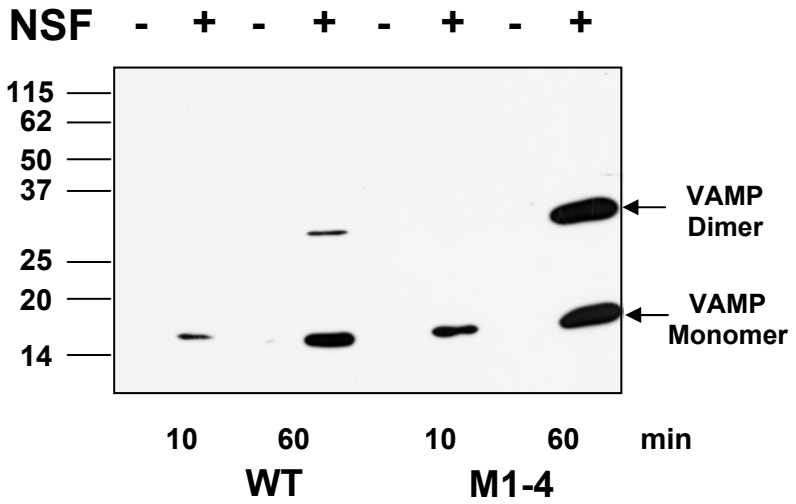

Abb. 4.21: Western Blot der Überstände der enzymatischen Spaltung des SNARE-Komplexes
Western Blot mit VAMP-Antikörper. Die Überstände der enzymatischen Spaltung (+NSF) und der Kontrollreaktion (-NSF) des SNARE-Komplexes mit SNAP-25-WT oder -M1-4 (je etwa 15 µg Protein) wurden nach 10 oder 60 min konzentriert auf ein 12% SDS-Polyacrylamidgel gegeben.

4.12 SNAP-25 bindet an Membranen

Eine der vermuteten Funktionen der Fettsäuren ist die Verankerung von SNAP-25 mit der Membran (Lane und Liu, 1997). Allerdings kann auch nicht palmitoyliertes SNAP-25 über die Bindung mit Syntaxin an der Membran verbleiben (Gonzalo und Linder, 1998).

Bisher gibt es keine Veröffentlichungen über SNAP-25 an künstlichen Membranen, aber Forschungsergebnisse, in denen nicht palmitoyliertes SNAP-25 gemeinsam mit Syntaxin in Liposomen rekonstituiert wurde (Weber et al., 1998 und Margittai et al., 1999). Es ist relativ einfach, künstliche Lipidvesikel (Liposomen) herzustellen, deren Eigenschaften biologischen Membranen ähneln.

Zur Untersuchung der Membranbindung von SNAP-25 mit und ohne Fettsäuren wurden aus einem Lipidmix hergestellte künstliche Membranen verwendet. Dieser Mix bestand aus Cholesterin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin und einem Farbstoff, an Phosphatidylethanolamin gekoppelt, das nur in Spuren vorhanden war. SNAP-25 wurde mit dem cholathaltigen Lipidmix in einem molaren Verhältnis von 1:1000 gemischt. Proteoliposomen formten sich durch Entfernen des Detergenz mittels Gelfiltrationschromatographie. Das farbige, die Liposomen enthaltende Eluat wurde aufgefangen, im Stufengradienten zentrifugiert und die Probe fraktioniert. Die farbigen Liposomen flotierten nach oben und wurden in einer Fraktion abgenommen. Die verwendeten Proteine besaßen keine Hexahistidinreste mehr, da diese eventuell zu einer Bindung an die Lipide führen und somit die Ergebnisse verfälschen könnten. Sowohl SNAP-25-WT als auch -M1-4 und -M1+2 ließen sich in Liposomen rekonstituieren, d.h. eine große Proteinmenge befand sich in der Liposomenfraktion, wie die Western Blot-Filme in Abbildung 4.22 deutlich zeigen. Doch ist bei SNAP-25-WT im Unterschied zu den Mutanten der Proteinanteil in der Liposomenfraktion deutlich größer als in den restlichen Fraktionen. Die Proteinmenge in den Liposomen im Vergleich zur Gesamtmenge bei SNAP-25-WT liegt bei 74% und bei SNAP-25- M1-4 nur bei etwa 11% bzw. bei -M1+2 bei etwa 19%. Das bedeutet, dass die Membranbindung von SNAP-25 an Liposomen stärker ist je mehr Cysteinreste palmitoyliert sind. Obwohl das cysteinfreie SNAP-25-M1-4 nicht palmitoyliert ist, bindet es leicht an die Lipidmembran, was möglicherweise durch leichte hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkungen mit hydrophoben oder polaren Aminosäuren induziert wird. Bei dieser Mutante ist zusätzlich zu der monomeren Proteinbande noch eine weitere kleinere Bande im Western Blot mit anti-SNAP-25-Antikörpern detektiert worden, bei der es sich möglicherweise um ein Abbauprodukt handelt, was des öfteren nach häufigem Frieren und Tauen beobachtet wurde.

Es stellt sich nun die Frage, ob SNAP-25 in die Liposomen eingeschlossen oder an der Außenseite gebunden ist. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden die Liposo-

menfraktionen mit der Protease Trypsin behandelt und das Resultat mit einem Western Blot untersucht.

Die Abbildungen (Abb. 4.22, jeweils rechts) zeigen, daß sowohl SNAP-25 WT als auch M1-4 und M1+2 durch Trypsin (Spuren mit „+“) gespalten werden, sich also vollständig außerhalb der Liposomen befinden.

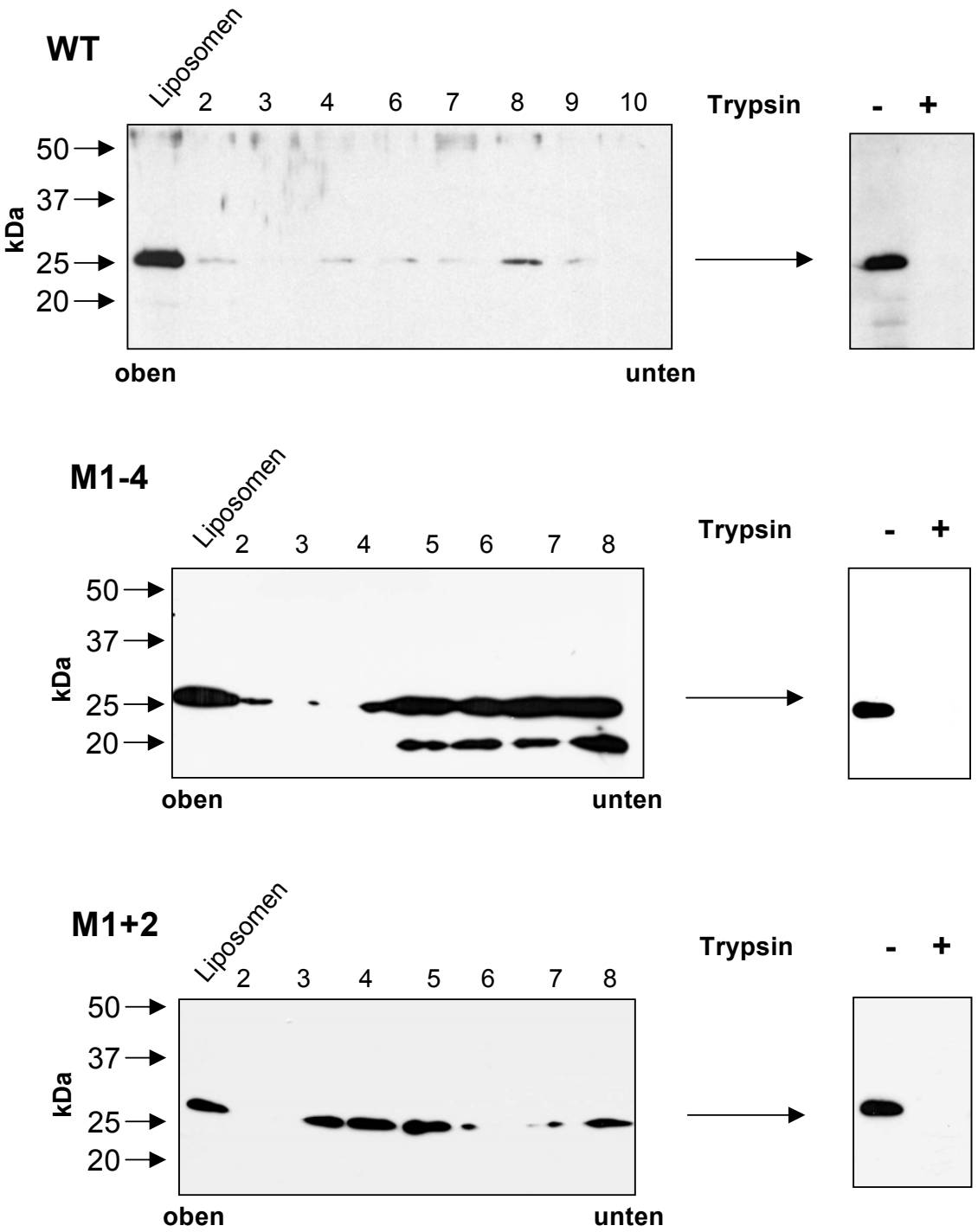

Abb. 4.22: SNAP-25 in Liposomen rekonstituiert
Links: Western Blots der Gradientenfraktionen von der oberen Schicht im Röhrchen bis nach unten in 100- 200 µl-Schritten fraktioniert
Rechts: Western Blots der Liposomenfraktionen mit (+) oder ohne (-) Trypsin behandelt