

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Philipps-Universität Marburg  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. E. Weihe  
Abteilung Molekulare Neurowissenschaften  
Abteilungsleiter: Prof. Dr. E. Weihe

In Zusammenarbeit mit dem  
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie  
(Karl-Friedrich-Bonhoeffer-Institut)  
Göttingen  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. D. Gallwitz  
Abteilung Neurobiologie  
Direktor: Prof. Dr. R. Jahn

---

# **Die Funktion von Munc-18 in der Exozytose sekretorischer Granulen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie

(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Humanmedizin

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Dagmar Schütz**

aus Villingen-Schwenningen

Marburg / Lahn 2003

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am 18. Juli 2003.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. E. Weihe

Korreferent: Prof. Dr. R. Jahn

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Membrantransport in eukaryontischen Zellen	1
1.2	Das Konzept der SNARE-Protein-kontrollierten Membranfusion	1
1.3	Die Sec1/Munc-18-Proteinfamilie als Regulator der SNARE-Komplex-Bildung	3
1.4	Die Struktur des Munc-18/Syntaxin-Komplexes	4
1.5	Physiologische Effekte einer Störung der Munc-18-1-Funktion	6
1.6	Die Interaktion mit dem Mint1-Protein bindet Munc-18 in vielfältige Interaktionen des Exozytoseortes ein	8
1.7	Die Amperometrie erlaubt die Analyse der Funktion von Munc-18-1 in der Fusion einzelner sekretorischer Granulen mit der Plasmamembran	9
1.8	Fragestellungen	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1	Oligonukleotide, cDNAs, Vektoren, Antikörper	17
2.2	Amperometrie	20
2.2.1	Amperometrische Messung und Analyse amperometrischer Signale	20
2.3	Zellkultur, Transfektion, Immunfluoreszenz	21
2.3.1	Zellkultur	22
2.3.2	Transfektion	22
2.3.3	Immunfluoreszenz	23
2.3.4	Bestimmung der Granulenzahl	24
2.4	Subklonierung von Expressionskonstrukten	25
2.4.1	PCR	25
2.4.2	Generation von Punktmutationen nach Higuchi	25
2.4.3	Klonierung von Ratten-Doc2 $\alpha$ aus einer Rattenhirn-cDNA-Bank	26
2.4.4	Amplifikation und Aufreinigung von Plasmid-DNA	27
2.5	Proteinbiochemische Methoden	27
2.5.1	Expression von rekombinanten Proteinen in E. coli	27
2.5.2	TritonX-100-Extraktion von PC12-Zellen	31

2.5.3	Membranfraktionierung von PC12-Zellen _____	31
2.5.4	SDS-PAGE, Western Blot-Analyse und quantitativer Western Blot _____	32
2.5.5	Quantifizierung der Überexpression von Munc-18 über die Immunfluoreszenzfärbung _____	34
2.5.6	Quantifizierung der endogenen Syntaxin- und Munc-18 in PC12-Zellen über den quantitativen Western Blot _____	34
2.5.7	Immunpräzipitation _____	35
2.5.8	Bindungsexperimente mit rekombinanten Proteinen _____	35
2.5.9	„Pull-down“-Experimente mit Rattenhirnhomogenat _____	36
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> _____	<b>38</b>
3.1	Überexpression von Munc-18-1 und Kotransfektion mit EGFP in PC12-Zellen _____	38
3.1.1	Viele Transfektionsprozeduren beeinflussen die exozytische Aktivität von PC12-Zellen _____	38
3.1.2	Die Kotransfektion mit EGFP funktioniert zuverlässig _____	39
3.2	Perturbation der Munc-18-Funktion _____	41
3.2.1	Einführung von Punktmutationen in die Syntaxin-Bindungsregion von Munc-18-1 _____	41
3.2.2	Membran-Cytosol-Verteilung von endogenem und überexprimiertem Munc-18-1 _____	44
3.2.3	Bestimmung des Mengenverhältnisses von Syntaxin1 und Munc-18-1 in Kontrollzellen und Munc-18-1-überexprimierenden Zellen _____	45
3.2.4	Die Behandlung mit Digitonin macht den membranassoziierten Anteil von Munc-18-1 in PC12- Zellen sichtbar _____	47
3.2.5	Die Proteinspiegel anderer synaptischer Proteine bleiben durch die Munc-18-1-Überexpression unverändert _____	48
3.3	Die elektrophysiologische Charakterisierung von Munc-18-WT, -D34N und -R39C _____	50
3.3.1	Munc-18-D34N und -R39C haben gegensätzliche Effekte auf die LDCV-Exozytose _____	50
3.3.2	Die Kinetik der Transmitterfreisetzung wird durch Munc-18-WT, -D34N und -R39C nicht verändert _____	53

3.3.3	Fußereignisse zeigen keine signifikanten Veränderungen	56
3.4	Analyse weiterer Munc-18-1-Bindungspartner	59
3.4.1	Die Mint1-Bindung an Munc-18-1 ist in Anwesenheit von Syntaxin1 in den Munc-18-1-Mutanten verschieden	59
3.4.2	Beeinflußt Mint1 die Exozytose von LDCVs?	60
3.4.3	Die Interaktion von Munc-18-1 und Doc2 $\alpha$	62
3.5	Verändert die Überexpression von Syntaxin-Bindungsmutanten des Munc-18-1-Proteins die Zahl sekretorischer Organellen?	65
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>67</b>
4.1	Die Kotransfektion	67
4.2	Syntaxin1-Bindung und Membranassoziation von Munc-18-1	67
4.3	Ist Munc-18-1 ein Inhibitor der LDCV-Exozytose?	68
4.4	Munc-18-1 und die Fusionspore	70
4.5	Welche Rückschlüsse auf die Munc-18-1-Funktion erlauben die Überexpressionsexperimente mit Wildtypprotein und den Mutanten?	71
<b>5</b>	<b>Literatur</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung / Summary</b>	<b>87</b>
6.1	Zusammenfassung	87
6.2	Summary	90
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>92</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>93</b>
8.1	Anmerkung	93
8.3	Akademische Lehrer	94
8.4	Danksagung	95

## **1 Einleitung**

### **1.1 Membrantransport in eukaryontischen Zellen**

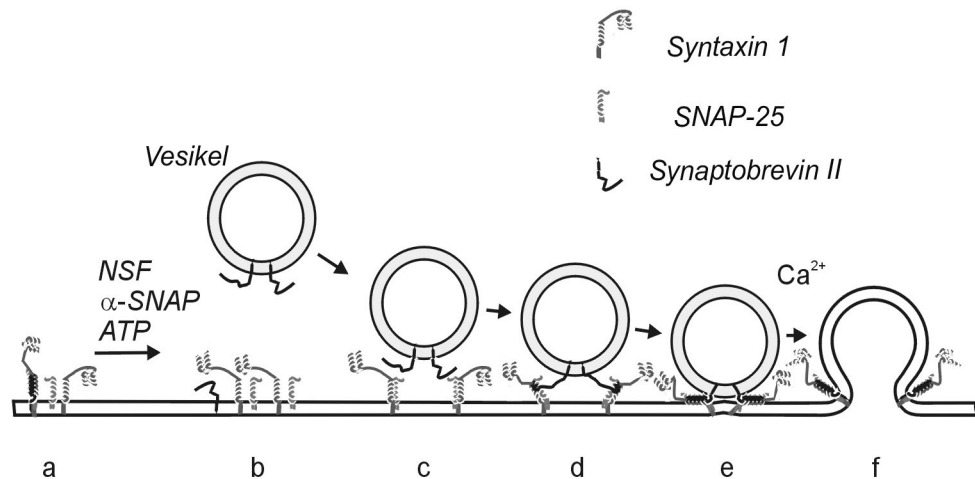
Eukaryontische Zellen sind in subzelluläre Kompartimente unterteilt, die vom Cytosol durch Lipid-Doppelschichtmembranen abgegrenzt werden. Intrazelluläre Transportvorgänge erfordern die Fusion dieser Lipid-Membranen miteinander und müssen zielgerichtet erfolgen, um die Funktionsfähigkeit der Zelle zu erhalten (Palade, 1975). Diese unterschiedlichen Transportschritte werden durch eine Reihe evolutionär konservierter Proteinfamilien gesteuert.

Einer dieser Fusions- oder Transportschritte ist die Fusion der Membranen sekretorischer Vesikel mit der Plasmamembran, die Exozytose. Durch die Exozytose werden die Inhaltstoffe von sekretorischen Vesikeln an der Zelloberfläche freigesetzt. Man unterscheidet hierbei die calciumunabhängige, konstitutive Exozytose, die ständig in jeder Zelle auftritt, von der calciumabhängigen, regulierten Exozytose. Bei dieser werden exozytosebereite sekretorische Organellen an der Plasmamembran bereitgehalten, um erst auf ein bestimmtes äußeres Signal mit der Plasmamembran zu fusionieren und ihren Inhalt in die Umgebung der Zelle abzugeben.

Die Signalübertragung zwischen Nervenzellen an chemischen Synapsen wird durch die regulierte Exozytose synaptischer Vesikel vermittelt, aus denen Neurotransmitter in den synaptischen Spalt freigesetzt wird (Katz, 1971). Dieser Membranfusionsprozeß ist elektrophysiologisch gut charakterisiert, da die elektrische Erregbarkeit der Nervenzellen viele methodische Möglichkeiten bietet. Auch die molekularen Grundlagen der Neuroexozytose sind beschrieben. Eine grundlegende Funktion kommt hierbei den SNARE (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein (SNAP) receptor) -Proteinen zu.

### **1.2 Das Konzept der SNARE-Protein-kontrollierten Membranfusion**

Die fundamentale Bedeutung der synaptischen SNARE-Proteine für die Neuroexozytose wird bei einer Vergiftung von Nervenzellen mit den clostridialen Neurotoxinen Botulinustoxin und Tetanustoxin offensichtlich. Diese Toxine sind Zink-abhängige Proteasen, die, je nach Seroform, spezifisch die synaptischen



**Abb. 1: Hypothetisches Modell zur Membranfusion**

(a) Die Dissoziation von SNARE-Komplexen wird durch die ATPase NSF (*N*-Ethylmaleimide sensitive factor) in Gegenwart des NSF-interagierenden Proteins  $\alpha$ -SNAP ausgelöst (Söllner et al., 1993). (b) Zunächst soll NSF bereits vorhandene cis-SNARE-Komplexe dissoziieren (d.h. SNARE-Komplexe innerhalb derselben Membran) und in einen aktivierten Zustand überführen. (c) Ein Vesikel nähert sich proteinvermittelt, aber SNARE-unabhängig der Membran an („Docking“). (d) Es etabliert sich ein loser Kontakt zwischen den membranfernen Enden der SNARE-Motive von Synaptobrevin auf dem Vesikel und Syntaxin und SNAP-25 auf der Plasmamembran (Xu et al., 1999). SNARE-Motive isolierter SNARE-Proteine sind ohne Sekundärstruktur und bilden erst während der Interaktion mit anderen SNARE-Proteinen  $\alpha$ -helikale Strukturen aus (Fasshauer et al., 1997). (e) Die vollständigen SNARE-Komplexe bilden sich dann reißverschlussartig von ihrem membranfernen Ende zu ihrem membran nahen Ende hin aus, und bilden die sogenannten trans-Komplexe, deren Transmembrandomänen in unterschiedlichen Membranen liegen. Durch die Assoziation der SNAREs in den SNARE-Komplex nähern sich Vesikelmembran und Plasmamembran einander stark an, bilden ein teilweise fusioniertes Membranintermediat und bereiten dadurch die Membranfusion vor („Priming“). (f) Auf einen Calciumeinstrom hin fusionieren die Membranen vollständig miteinander und es kommt zur Ausbildung einer Fusionspore, durch die Neurotransmitter entweichen kann. Die Abbildung wurde modifiziert nach Jahn und Hanson (1998).

SNARE-Proteine Syntaxin1 und SNAP-25 auf der Plasmamembran oder SynaptobrevinII auf der vesikulären Membran schneiden und zu einer starken Inhibition der Neuroexozytose führen (Jahn und Niemann, 1994; Montecucco und Schiavo, 1994). SNARE-Proteine stellen eine Familie meist membranständiger Proteine dar. An jedem intrazellulären Membrantransportschritt ist ein Satz charakteristischer SNARE-Protein-Homologe beteiligt (zur Übersicht: Jahn und Südhof, 1999; Lin und Scheller, 2000). Das gemeinsame Merkmal der SNARE-Proteine ist der Besitz des 60-70 Aminosäuren umfassenden SNARE-Motivs. Wie unter anderem am Beispiel der synaptischen SNARE-Proteine gezeigt wurde, können sich Syntaxin1, SNAP-25 und SynaptobrevinII spontan und irreversibel über die SNARE-Motive zu einem parallelen Vier-Helix-Bündel zusammenlagern, an dessen Ende die Membrananker bzw. Transmembrandomänen herausragen (Sutton et al., 1998; Fasshauer et al., 2002).

Durch die Assoziation von SNARE-Proteinen verschiedener Membranen (z.B. Plasmamembran und Vesikelmembran) in den SNARE-Komplex werden diese Membranen einander stark angenähert und können ein teilweise fusioniertes Membranintermediat bilden (Abb.1). Dies bereitet in der calciumabhängigen Neuroexozytose die vollständige Membranfusion vor, die erst nach einem Calciumeinstrom vollzogen wird (zur Übersicht siehe Chen und Scheller, 2001; Bruns und Jahn, 2002). Faktoren, die die SNARE-Komplex-Bildung steuern, kontrollieren folglich auch die Membranfusion.

### **1.3 Die Sec1/Munc-18-Proteinfamilie als Regulator der SNARE-Komplex-Bildung**

Die Interaktion von Syntaxinen mit den Sec1/Munc-18- (SM-) Proteinen könnte einen derartigen Steuerungsmechanismus für die SNARE-Komplexbildung darstellen. SM-Proteine sind cytosolische Proteine, die in verschiedenen Spezies unabhängig voneinander identifiziert wurden und essentielle Rollen im Membrantransport haben (zur Übersicht siehe Halachmi and Zev, 1996; Pevsner, 1996; Jahn, 2000; Rizo und Südhof, 2002). Vergleichbar den SNARE-Proteinen existieren verschiedene, evolutionär konservierte SM-Protein-Homologe für die einzelnen intrazellulären Membrantransportschritte. In höheren Organismen wurden neben ubiquitär exprimierten an der Exozytose beteiligten SM-Proteinen auch neuronenspezifische, exozytoserelevante Isoformen der SM-Proteine identifiziert, zum Beispiel unc-18 in *C. elegans* (Hosono, 1992; Gengyo-Ando, 1993), Rop in *D. melanogaster* (Salzberg et al., 1993) und Munc-18-1 im Säuger, auch nSec1 oder rbSec1 genannt (Hata et al., 1993; Garcia et al., 1994; Pevsner et al., 1994a). Defekte dieser Gene führen zu einer Blockade der Sekretion bzw. Neurotransmission, und die Ausschaltung des Munc-18-1-Gens (knock out) ist letal (Harrison et al., 1994; Verhage et al., 2000).

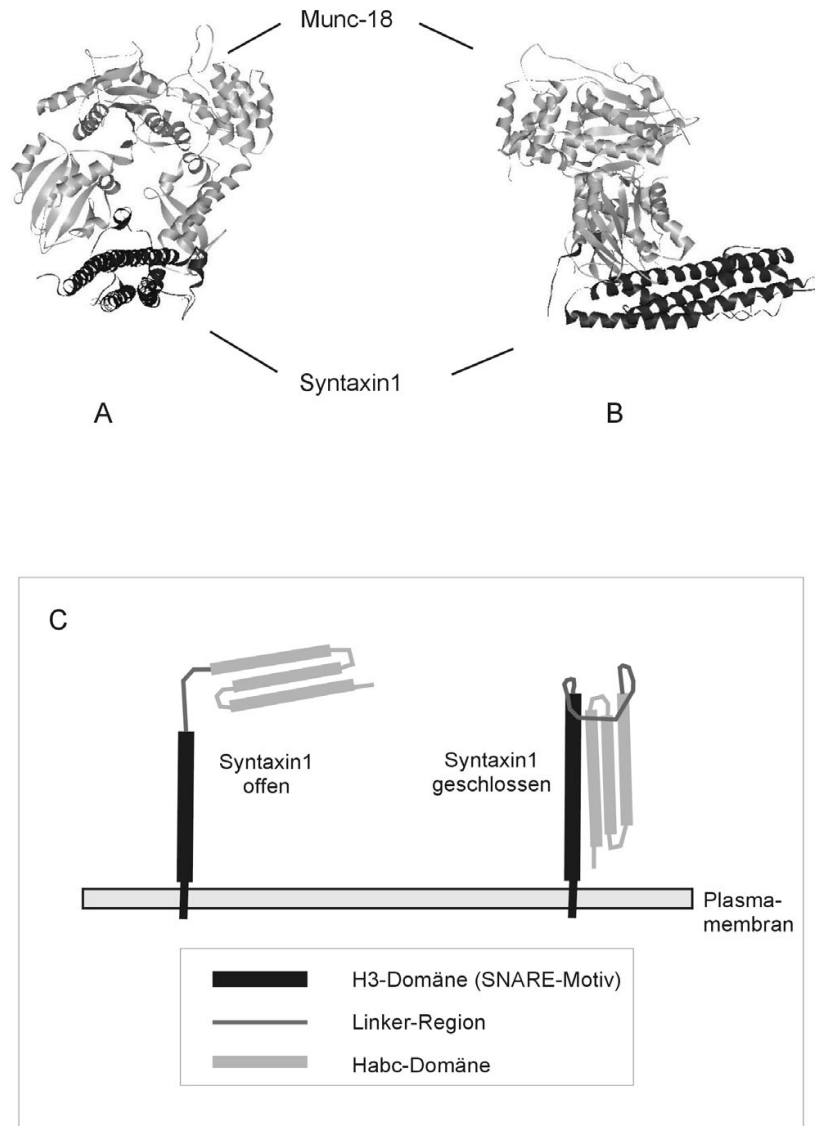
Das Munc-18-1-Protein der Ratte ist ein 66 kDa-Protein ohne erkennbare Transmembrandomäne in der Aminosäuresequenz. Dennoch ist das Protein nicht rein cytosolisch, sondern liegt auch membranassoziiert vor (Schulze et al., 1994; Garcia et al., 1995). Seine hochaffine Interaktion mit Syntaxin1 (Hata et al., 1993) legt die Vermutung nahe, daß die Membranassoziation Syntaxin1-vermittelt ist. Die Dissoziation des hochaffinen Munc-18-1/Syntaxin1-Komplexes könnte durch



das Calcium- und Phorbolster-bindende unc-13-Protein und das SNARE-Motiv tragende Tomosyn vermittelt werden (Fujita et al., 1998 ; Sassa et al., 1999). Rab-Proteine oder Rab-Effektormoleküle könnten ebenso die Dissoziation des Munc-18-1/Syntaxin-Komplexes einleiten (Dascher et al., 1991; Tall et al., 1999; Misura et al., 2000). Die Kontrolle des Munc-18-1/Syntaxin1-Komplexes ist besonders wichtig, da die Bindung von Munc-18-1 an Syntaxin1 die Bindung von SNAP-25 und SynaptobrevinII an Syntaxin1 verhindert (Pevsner et al., 1994b). Dies bedeutet, daß der Munc-18-1/Syntaxin1-Komplex zum SNARE-Komplex in Konkurrenz steht. Umgekehrt verhindert bereits der binäre Komplex zwischen Syntaxin1 und SNAP-25 die Assoziation von Syntaxin1 an Munc-18-1 (Yang et al., 2000). Diese biochemischen Beobachtungen trugen maßgeblich zur Modellvorstellung bei, daß die Verfügbarkeit von Syntaxin1 für SNARE-Komplexe entscheidend über die Interaktion mit Munc-18-1 reguliert wird.

### **1.4 Die Struktur des Munc-18-1/Syntaxin-Komplexes**

Die kürzlich gelöste Kristallstruktur des Munc-18-1/Syntaxin-Komplexes sowie Strukturdaten zu Syntaxin1 erklären die Konkurrenz zwischen Munc-18-1/Syntaxin1-Komplex und SNARE-Komplex (Fernandez et al., 1998; Dulubova et al., 1999; Misura et al., 2000). Die Struktur von Munc-18-1 zeigt keine Ähnlichkeit mit bereits bekannten Strukturen (Abb. 2A). Munc-18-1 bildet mit Syntaxin1 einen Komplex mit einem stöchiometrischen Verhältnis von eins zu eins. Munc-18-1 besitzt eine hufeisenartige Form. Im Inneren dieses Hufeisens liegt Syntaxin1 in der sogenannten „geschlossenen“ Konformation als Bündel aus vier Helices, in dem seine C-terminale H3-Domäne (d.h. das  $\alpha$ -helikale SNARE-Motiv) auf die N-terminale Habc-Domäne, die aus drei  $\alpha$ -Helices besteht, zurückgefaltet ist (Abb. 2B und C). Syntaxin1 bindet sowohl über Aminosäurereste der H3-Domäne als auch der Habc-Domäne an Munc-18-1, was erklärt, daß Munc-18-1 nicht an N- oder C-terminal verkürzte Versionen von Syntaxin1 bindet sondern nur an das vollständige Protein (Hata et al., 1993; Kee et al., 1995). Durch die geschlossene Syntaxin1-Konformation und die Abschirmung des SNARE-Motivs von Syntaxin1 durch Munc-18-1 wird verständlich, warum sich SNARE-Komplex und Munc-18-1/Syntaxin-Komplex ausschließen. Im Gegensatz zu den Ratten-Homologen konnte die Kristallstruktur



**Abb. 2: Der Munc-18/Syntaxin1-Komplex**

**A** Munc-18 (hellgrau) und Syntaxin1 (dunkelgrau) im Komplex. Munc-18 bildet eine bogenförmige Struktur, die Syntaxin1 umschließt. Syntaxin1 liegt hier in der „geschlossenen“ Konformation als Vier-Helix-Bündel vor. Die Blickrichtung geht entlang der Längsachse des Vier-Helix-Bündels. **B** Komplex um neunzig Grad rotiert. **C** Schematische Darstellung der "offenen" und der "geschlossenen" Syntaxin1-Konformationen.

des Tintenfisch-Homologen von Munc-18-1 (s-sec1) ohne assoziiertes Syntaxin1 gelöst werden (Bracher und Weissenhorn, 2001). Hierbei stellte sich heraus, daß in Abwesenheit von Syntaxin keine größeren Konformationsänderungen im s-sec1-Molekül auftreten.

Bereits 1999 hatten Dulubova et al. mit Hilfe der NMR-Spektroskopie gezeigt, daß Syntaxin1 in zwei verschiedenen Konformationen auftreten kann. Als einzelnes Molekül liegt es in der „offenen“ Konformation vor (Fernandez et al.,

1998). Hierbei ist die N-terminale Habc-Domäne von Syntaxin1 in ein Bündel aus drei  $\alpha$ -Helices organisiert, das weiter C-terminal gelegene SNARE-Motiv (H3-Domäne) bleibt unstrukturiert. Durch die Einführung zweier Punktmutationen in die Linker-Region von Syntaxin1, die die Habc- und H3-Domäne verbindet, kann sich die geschlossene Konformation nicht mehr ausbilden und Munc-18-1 nur in geringem Maße binden (Dulubova et al., 1999). Dies führt, zusammen mit den Kristallstrukturdaten, zu der Schlußfolgerung, daß Munc-18-1 nur an die geschlossene Syntaxin1-Konformation bindet, wohingegen Syntaxin1 als Bestandteil des SNARE-Komplexes in der offenen Konformation vorliegt.

Diese Struktur scheint jedoch nicht auf jeden Munc-18-1/Syntaxin1-Komplex anwendbar zu sein. So wurde für bestimmte homologe Proteine der Hefe und des Säugers gezeigt, daß das SM-Protein auch an SNARE-Komplexe binden kann, und daß ein kurzer N-terminaler Abschnitt des Syntaxin-Homologen ausreichend für die Interaktion mit dem entsprechenden SM-Protein sein kann (Carr et al., 1999; Bracher und Weissenhorn, 2002; Dulubova et al., 2002; Yamaguchi et al., 2002) Außerdem wurde gezeigt, daß die Assoziation eines SM-Proteins mit dem SNARE-Komplex bestimmt, welche SNARE-Proteine an diesem Komplex teilhaben, und somit zur Spezifität der SNARE-Komplexbildung beiträgt (Peng und Gallwitz, 2002). Zusammengenommen läßt dies vermuten, daß die oben beschriebene Interaktion von Munc-18-1 und Syntaxin1 in der geschlossenen Konformation eine Spezialisierung der synaptischen Proteine darstellt und womöglich Bestandteil der komplexen regulatorischen Maschinerie der Calcium-abhängigen Exozytose ist.

### **1.5 Physiologische Effekte einer Störung der Munc-18-1 Funktion**

Die Funktion von Munc-18-1 oder seinen Homologen in der Exozytose wurde in unterschiedlichen Modellorganismen gestört. Hierbei zeigte sich in allen untersuchten Spezies, daß die Funktionsfähigkeit des Proteins essentiell für die Exozytose ist. In Hefe zeigen temperatursensitive Mutanten des Munc-18-Homologen Sec1p bei der restriktiven Temperatur kein weiteres Wachstum mehr und akkumulieren sekretorische Vesikel (Novick und Schekman, 1979; Novick et al., 1980; Aalto et al., 1991). Ein ähnlich dramatischer Phänotyp ist in verschiedenen unc-18-Mutanten von *C. elegans* zu beobachten. Hier

akkumulieren die Tiere Acetylcholin in der Präsynapse und sind vollkommen unbeweglich, was auf einen Defekt in der Neurotransmitterfreisetzung hinweist (Hosono et al., 1992; Gengyo-Ando et al., 1993). Eine erste elektrophysiologische Charakterisierung einer gestörten Munc-18-1-Funktion wurde von Harrison et al. (1994) am *D. melanogaster*-Homologen Rop durchgeführt. Temperatursensitive Mutanten von Rop zeigen bei der restriktiven Temperatur eine deutlich reduzierte synaptische Antwort. Rop-Nullmutanten sterben bereits in einem frühen Entwicklungsstadium und können daher nicht elektrophysiologisch charakterisiert werden. Ebenso wie die Reduktion der Menge an funktionellem Munc-18-1 führt auch eine Erhöhung der Munc-18-1-Mengen in Synapsen zu einer Inhibition der synaptischen Transmission, wie zum Beispiel die Mikroinjektion des Tintenfisch-Homologen s-Sec1 in die Riesensynapse des Tintenfischs (Dresbach et al., 1998). Auch die Hitzeschock-induzierte Überexpression von Rop in *D. Melanogaster* verursacht an der Neuromuskulären Endplatte eine dosisabhängig reduzierte Antwort (Schulze et al., 1994). Die unter Rop-Überexpression auftretende Inhibition läßt sich durch eine zeitgleiche Überexpression von Syntaxin1 kompensieren (Wu et al., 1998), was einen funktionellen Hinweis auf eine *in vivo* tatsächlich auftretende Interaktion der beiden Proteine liefert. Ferner unterstützen diese funktionellen Studien an Synapsen die auf biochemischen Befunden basierende Vorstellung, daß die Munc-18-1/Syntaxin1-Interaktion eine inhibierende Wirkung auf die Exozytose ausübt. Eine rein inhibitorische Funktion von Munc-18-1 in der Exozytose ist jedoch angesichts des essentiellen Charakters des Proteins unwahrscheinlich.

Auch im Säugetier ist Munc-18-1 ein essentielles Protein, wie die Analyse der Maus-Nullmutanten zeigt (Verhage et al., 2000). Diese Tiere sterben kurz nach der Geburt und besitzen keinerlei synaptische Aktivität mehr, was auf die herausragende Bedeutung des Proteins für die Neuroexozytose hinweist. Der Phänotyp von Munc-18-1-Nullmutanten ist sehr viel stärker ausgeprägt als zum Beispiel bei SNAP-25- oder SynaptobrevinII-Nullmutanten. Diese SNARE-Protein-Nullmutanten sind nach wie vor zur spontanen, Calcium-unabhängigen Freisetzung von Neurotransmitter fähig und zeigen nur bei evozierten synaptischen Antworten Defekte (Schoch et al., 2001; Washbourne et al., 2002). Dies weist darauf hin, daß im Gegensatz zur Munc-18-Funktion die Funktion der

synaptischen SNAREs zumindest in einer weniger streng kontrollierbaren Form durch andere Mechanismen der Zelle ersetzt werden kann.

Munc-18-1 wird, wie andere synaptische Proteine, auch in neuroendokrinen Zellen exprimiert. In chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks führt der Verlust von Munc-18-1 zu einer starken Abnahme der exozytotischen Aktivität, wenn auch eine minimale Restaktivität bleibt (Voets et al., 2001). Eine Überexpression von Munc-18-1 führt in diesen Zellen zu einer Verstärkung der exozytotischen Antwort, nicht zu einer Inhibition wie in anderen Modellsystemen (Voets et al., 2001). Die Überexpression von Munc-18-1 in der neuroendokrinen Zelllinie PC12 hat ebenfalls keine inhibitorische Wirkung auf die Exozytose (Graham et al., 1997; Fisher et al., 2001).

Die physiologischen Konsequenzen einer gestörten Munc-18-1-Funktion sind also uneinheitlich. Es wäre möglich, daß die widersprüchlichen Befunde auf Unterschiede der Munc-18-1-Funktion zwischen schnell reagierenden Nervenzellen und langsam exozytierenden neuroendokrinen Zellen zurückzuführen sind und daß in unterschiedlichen Zelltypen trotz einer identischen, exozytotischen Proteinmaschinerie verschiedene Faktoren geschwindigkeitsbestimmend sind. Trotz der überragenden Bedeutung des Proteins für die Exozytose in sämtlichen untersuchten Spezies ist die Munc-18-Funktion nach wie vor völlig unverstanden. Zu ihrer Charakterisierung sind weiterführende elektrophysiologische Untersuchungen erforderlich, insbesondere in Kombination mit biochemischen Analysen.

### **1.6 Die Interaktion mit dem Mint1-Protein bindet Munc-18-1 in vielfältige Interaktionen des Exozytoseortes ein**

Abgesehen von weiteren plasmamembranständigen Syntaxinen (Hata und Südhof, 1995) ist für Munc-18-1 nur eine kleine Zahl weiterer Bindungspartner bekannt.

Die funktionelle Bedeutung der beschriebenen Interaktion von Munc-18-1 mit Doc2, einem vesikel-assoziierten Protein der C2-Proteinfamilie (Verhage et al., 1997), ist unklar. Doc2 existiert in zwei Isoformen ( $\alpha$  und  $\beta$ ) und ist nach seinen zwei potentiell Calcium-bindenden C2-Domänen (double C2) benannt. Doc2 interagiert neben Munc-18-1 auch mit Munc-13 (Übersicht in Brose et al., 2000). Munc-13 wurde als wichtiger Faktor für das Priming von großen

elektronendichten Vesikeln (Large Dense Core Vesicles, LDCVs) identifiziert (Ashery et al., 2000), bindet Syntaxin (Betz et al., 1997) und könnte so Munc-18-1 aus dem Munc-18-1/Syntaxin1-Komplex verdrängen (Sassa et al., 1999).

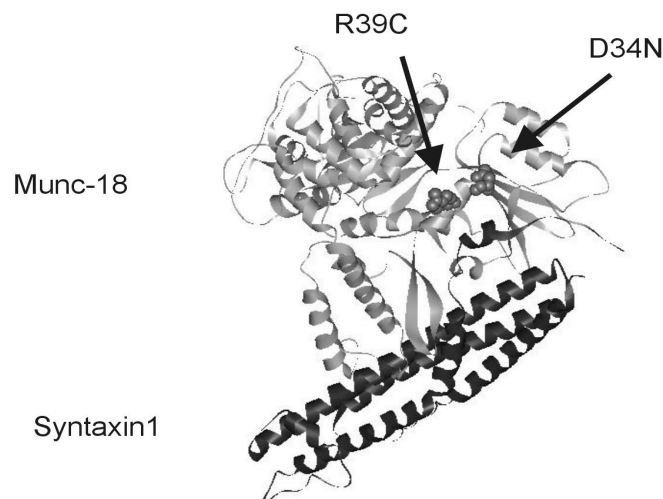
Eine weitere Gruppe von Proteinen, die mit Munc-18-1 interagieren, ist die Familie der Mint-Proteine (Okamoto und Südhof, 1997). Bislang sind drei Isoformen der Mint-Proteine bekannt, von denen jedoch nur Mint1 und Mint2 spezifisch neuronal exprimiert sind und an Munc-18-1 binden. Mint3 ist ubiquitär exprimiert und kein Bindungspartner von Munc-18-1 (Okamoto und Südhof, 1998). Mint1 und Mint2 besitzen neben einer Munc-18-Interaktionsdomäne (MID) eine Phosphotyrosin-Bindungsdomäne (PTB-Domäne) und zwei C-terminale PDZ-Domänen, die die Bindung an die Plasmamembran vermitteln.

Über die MID binden Mint1 und Mint2 an Munc-18-1, das gleichzeitig auch Syntaxin1 binden kann. Es entsteht hierdurch ein Dreierkomplex (Okamoto und Südhof, 1997), der Mint an diese beiden exozytose-relevante Proteine koppelt. Darüber hinaus ist Mint1 Bestandteil eines weiteren Dreierkomplexes, der CASK und Velis umfaßt, zwei synaptische PDZ-Proteine (Butz et al., 1998; Rongo et al., 1998). Dieser Komplex ist zum einen am Kinesin-abhängigen Transport von NMDA-Rezeptoruntereinheiten und am Sorting von EGF-Rezeptoren beteiligt (Borg et al., 1998; Setou et al., 2000). Zum anderen bindet der Dreierkomplex an das präsynaptische Adhäsionsmolekül  $\beta$ -Neurexin und ist dadurch an strukturgebenden Komponenten der Synapse beteiligt (Butz et al., 1998). Munc-18-1 ist damit über seine Interaktion mit dem Mint1-Protein in vielfältiger Weise in präsynaptische Protein-Protein-Interaktionen involviert. Diese Interaktion könnte sich als eine wichtige Schaltstelle zwischen exozytotischen Prozessen und strukturgebenden Proteininteraktionen der Präsynapse erweisen.

### **1.7 Die Amperometrie erlaubt die Analyse der Funktion von Munc-18-1 in der Fusion einzelner sekretorischer Granulen mit der Plasmamembran**

Munc-18-1 ist durch seine Interaktion mit Syntaxin1 ein möglicher Regulator des Membranfusionsvorgangs zwischen sekretorischem Vesikel und Plasmamembran. Störungen der Bindung von Munc-18-1 an Syntaxin1 könnten zum Beispiel die Geschwindigkeit der Neurotransmitterfreisetzung aus der einzelnen sekretorischen

Granule verändern. Den ersten Hinweis auf eine derartige Munc-18-1-Funktion lieferte eine Arbeit von Fisher et al. (2001), in der die Munc-18-R39C-Mutante die Ausdehnungsgeschwindigkeit der Fusionspore zu verändern schien, was auf die gestörte Syntaxin1-Bindung der Mutante zurückgeführt wurde. Bereits 1994 wurde von Harrison et al. beschrieben, daß die D45N-/rop<sup>G11</sup>- und R50C-/ rop<sup>F3</sup>- Mutanten im Munc-18-1-Homologen von *Drosophila melanogaster* Effekte auf die synaptische Transmission haben, ohne daß diese Mutanten biochemisch weiter charakterisiert wurden. Diese ausgetauschten Aminosäuren entsprechen im Rattenhomologen dem D34N- und R39C-Austausch. In der Kristallstruktur des Munc-18-1/Syntaxin-Komplexes (Misura et al., 2000) wird offensichtlich, daß diese Mutanten in der Syntaxin-Bindungsregion des Munc-18-1-Moleküls liegen (Abb. 3).



**Abb. 3: Position der in dieser Studie verwendeten Punktmutationen von Munc-18-1 in der Kristallstruktur des Munc-18/Syntaxin-Komplexes**  
Munc-18 ist hellgrau, Syntaxin1 dunkelgrau dargestellt. Die Aminosäuren R39 und D34 des Munc-18-Moleküls sind hervorgehoben.

Die Punktmutationen betreffen direkte Interaktionen zwischen Aminosäureresten von Munc-18-1 und Syntaxin1 (R39C-Mutante) oder verändern die Architektur der Syntaxin-Bindungsregion des Munc-18-1-Moleküls (D34N-Mutante). Somit haben beide dieser Munc-18-1-Mutanten sehr wahrscheinlich eine gestörte

Syntaxin-Bindung und wurden deshalb in der vorliegenden Studie vergleichend analysiert, um die Bedeutung der Munc-18-1/Syntaxin-Interaktion für die Exozytose zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit der Amperometrie eine hochauflösende elektrophysiologische Methode gewählt, die es erlaubt, die Freisetzung von Neurotransmitter aus einzelnen sekretorischen Organellen direkt zu messen (Wightman et al., 1991). Die Methode beruht auf der Oxidation der freigesetzten Transmittermoleküle an der Oberfläche der Meßelektrode aus Kohlefaser. Die Kohlefaserelektrode wird dazu unmittelbar auf die Zelloberfläche aufgesetzt, ohne die Zelle zu penetrieren (Abb. 4A und B). Ein auf den jeweiligen Transmitter abgestimmtes Oxidationspotential wird an die Elektrode angelegt. Auf die Stimulation hin wird aus einem Vesikel Neurotransmitter freigesetzt, der zur Oberfläche der Elektrode diffundiert, wo die Moleküle sehr rasch oxidiert werden. Der entstehende Oxidationsstrom wird von der Meßapparatur als Stromtransiente aufgezeichnet. Hierbei „verbraucht“ die Kohlefaser durch die Oxidation die Transmittermoleküle, so daß ein steiles Konzentrationsgefälle aufrechterhalten werden kann. Die Oxidationsreaktion ist bei diesem Vorgang nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, vielmehr wird der Signalverlauf wesentlich durch die Dauer der Diffusion der Transmittermoleküle zur Kohlefaseroberfläche und hierbei auftretende Verluste bestimmt. Aus diesem Grund ist eine möglichst starke Annäherung der Kohlefaser an die Zelloberfläche erforderlich.

---

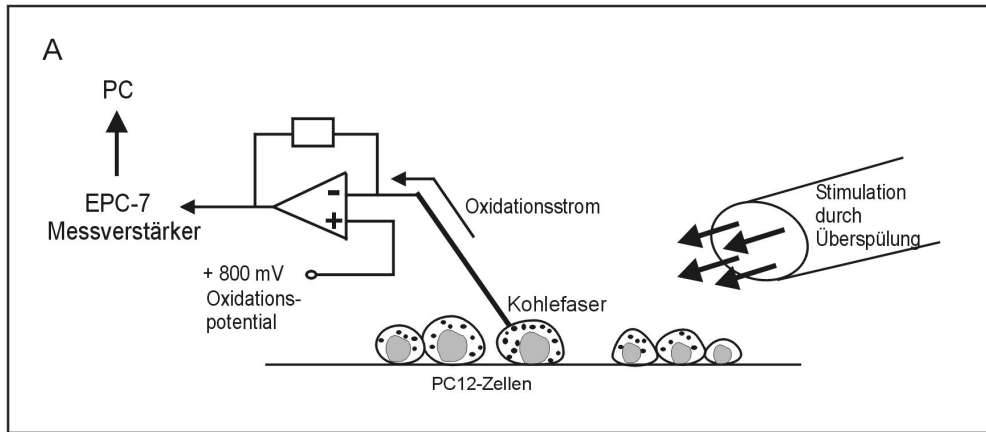
### **Folgende Seite:**

#### **Abb. 4: Experimenteller Aufbau zur Kohlefaseramperometrie an PC12 Zellen**

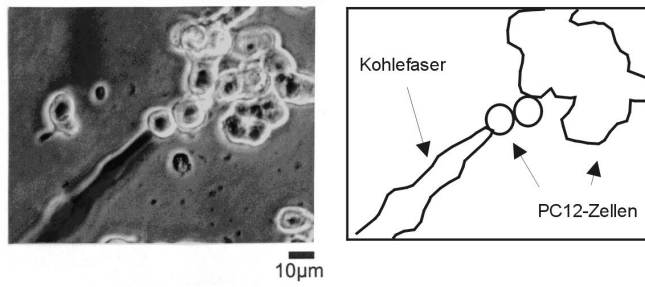
**A** Schematische Darstellung der Meßapparatur: Die Kohlefaser sitzt auf der Oberfläche einer PC12-Zelle auf und ist elektrisch leitend mit dem Verstärker verbunden. Ein Oxidationspotential von +800mV wird an die Elektrode angelegt. Durch Überspülung mit Hochkaliumringer wird die Exozytose in PC12-Zellen ausgelöst, Catecholamine werden freigesetzt und an der Oberfläche der Kohlefaser oxidiert, was als Oxidationsstromtransiente durch den Verstärker gemessen werden kann. **B** Mikroskopische Aufnahme der Meßsituation: PC12-Zelle mit aufgesetzter Kohlefaserelektrode. Die Überspülungseinheit liegt außerhalb des Gesichtsfeldes. **C** Darstellung der exozytotischen Aktivität einer PC12-Zelle über eine amperometrische Messung: Mit Beginn der Stimulation (grauer Balken) erscheinen Stromtransienten, von denen jede einzelne oxidierten Transmitter einer einzelnen sekretorischen Granule repräsentiert. Nach Beendigung der Stimulation kommt die Zelle wieder zur Ruhe. **D** Die Darstellung zweier einzelner Stromtransienten aus C bei stärkerer Streckung zeigt die Kinetik des Einzelereignisses und die hohe zeitliche Auflösung, die die Amperometrie bietet.



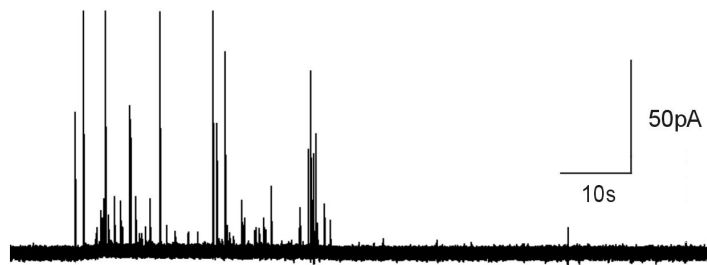
# Einleitung



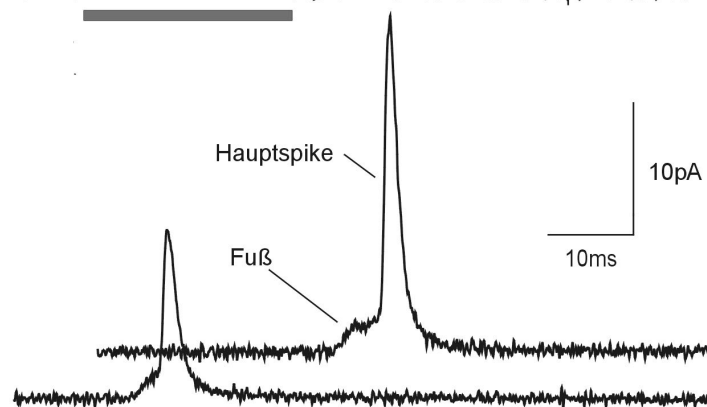
**B**



**C**



**D**



Die Kohlefaseramperometrie erlaubt die Auflösung von Freisetzungsprozessen im Mikrosekundenbereich und ist daher geeignet, die kinetischen Eigenschaften der Neurotransmitterfreisetzung aus der einzelnen Granule zu charakterisieren (Abb. 4C und D). Man kann am einzelnen exozytotischen Ereignis verschiedene Phasen der Neurotransmitterfreisetzung unterscheiden (siehe auch Abb. 15). Bei vielen amperometrischen Signalen wird die Transmitterfreisetzung durch ein initiales, kleines „Fußsignal“ eingeleitet. Dieses spiegelt das Entweichen von Neurotransmitter durch die entstehende Fusionspore wider (Chow et al., 1992; Alvarez de Toledo et al., 1993). An Veränderungen des Fußsignals sind folglich Störungen der Funktion von Proteinen ablesbar, die an der Kontrolle der Fusionsporenbildung beteiligt sind. Das Fußsignal sollte zum Beispiel gegenüber einer veränderten Munc-18-1/Syntaxin1-Interaktion besonders empfindlich reagieren, falls diese Interaktion tatsächlich Einfluß auf die Fusionsporentstehung nimmt. Das amperometrische Hauptsignal reflektiert dagegen die Freisetzung von Neurotransmitter durch die weiter geöffnete Fusionspore. Verschiedenen Faktoren wie z. B. Phorbolestern oder bestimmten Proteinen wird hierbei unterstellt, das Dilatationsverhalten der Fusionspore zu beeinflussen (Übersicht siehe in Burgoyne und Barclay, 2002).

Als Modellsystem wurde in der vorliegenden Studie die neuroendokrine Zelllinie PC12 gewählt (Greene and Tischler, 1976). PC12-Zellen wurden aus einem Phäochromozytom der Ratte isoliert und besitzen somit viele der Eigenschaften chromaffiner Zellen des Nebennierenmarks, ihrer nicht-neoplastischen Gegenstücke. PC12-Zellen sind in der Lage, Katecholamine zu synthetisieren, in großen elektronendichten Vesikeln (LDCVs) zu speichern und auf Stimulation hin freizusetzen (Greene und Rein, 1977a). Die LDCVs enthalten darüber hinaus auch ATP, Chromogranin A und B sowie Neuropeptide (Salton et al., 1983; Wagner, 1985; Margioris et al., 1992). Daneben besitzen PC12-Zellen kleine Vesikel, deren Morphologie synaptischen Vesikeln ähnelt und die vermutlich Acetylcholin speichern und freisetzen (Greene und Rein, 1977b). PC12-Zellen besitzen gegenüber primären chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks alle Vorteile einer Zelllinie, wie zum Beispiel unbegrenzte Verfügbarkeit, eine dauerhafte hohe Homogenität der Kultur oder die Transfizierbarkeit mit konventionellen eukaryontischen Expressionsvektoren. Da PC12-Zellen die an der Exozytose beteiligten synaptischen Proteine exprimieren (zur Übersicht siehe Burgoyne und

Morgan, 1998), stehen überdies sämtliche für die Neurobiologie entwickelten Materialien wie zum Beispiel Antikörper und cDNAs zur Verfügung, was einen unproblematischen experimentellen Zugang erlaubt.

## 1.8 Fragestellungen

Das Munc-18-1-Protein und seine Homologen sind im gesamten Tierreich für die Exozytose essentiell. Dennoch ist die Munc-18-Funktion völlig unklar. Seine hochaffine Interaktion mit dem SNARE-Protein Syntaxin1 läßt vermuten, daß der Munc-18-1/Syntaxin1-Komplex für die Munc-18-1-Funktion eine besondere Rolle spielt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, mit einem kombinierten Ansatz aus biochemischen und elektrophysiologischen Methoden zur Klärung der Bedeutung der Munc-18-1/Syntaxin-Interaktion für die Exozytose von großen elektronendichten Vesikeln in neuroendokrinen Zellen beizutragen.

Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

- 1.) Ist Munc-18-1 ein Inhibitor der Exozytose?
- 2.) Sind die Mengenverhältnisse von Munc-18-1 und Syntaxin1 entscheidend für die LDCV-Exozytose?
- 3.) Welche Auswirkungen hat eine Störung der Munc-18-1/Syntaxin-Interaktion auf die Exozytose? Ist die allgemeine Exozytosekompetenz der Zellen verändert oder hat die Störung der Munc-18-1/Syntaxin-Interaktion Einfluß auf den Membranfusionsvorgang einzelner sekretorischer Organellen? Gibt es Hinweise auf ein verändertes Verhalten der Fusionspore?
- 4.) Sind Interaktionen mit weiteren Bindungspartnern von Munc-18-1 von der gestörten Munc-18-1/Syntaxin-Bindung betroffen?

Vorgehensweise:

Zur Beantwortung dieser Fragen sollten an der neuroendokrinen Zelllinie PC12 die Effekte überexprimierter synaptischer Proteine auf die LDCV-Exozytose mit Hilfe der Amperometrie charakterisiert werden. Gleichzeitig sollten an diesen Zellen auch biochemische Analysen durchgeführt werden.

Zunächst war angestrebt, die Effekte einer Überexpression des Munc-18-Wildtyp-Proteins ausführlich amperometrisch zu analysieren. Weiterhin war eine Störung

der Munc-18-1/Syntaxin1-Interaktion beabsichtigt, die durch die Einführung von Punktmutationen in die Syntaxin1-Bindungsregion des Munc-18-Moleküls erreicht werden sollte. Die Syntaxin1-Bindungseigenschaften der Punktmutanten sollten mit Hilfe bakteriell exprimierter, rekombinanter Proteine sowie durch Bindungsstudien mit Extrakten aus überexprimierenden PC12-Zellen charakterisiert werden. Schließlich war beabsichtigt, die Auswirkungen einer derartig perturbierten Munc-18-1/Syntaxin1-Interaktion auf die LDCV-Exozytose in PC12-Zellen amperometrisch zu charakterisieren. Hierbei sollten besonders die Eigenschaften des individuellen Fusionsereignisses berücksichtigt werden.

Nach der biochemischen Analyse der Interaktion weiterer Munc-18-1-Bindungspartner mit den Munc-18-Mutanten war angestrebt, diese Interaktionspartner ebenfalls in Überexpressionsstudien amperometrisch zu charakterisieren, um Einblicke in eine mögliche, über Syntaxin1 hinausgehende Munc-18-1-Funktion zu erhalten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Oligonukleotide, cDNAs, Vektoren, Antikörper

#### *Verwendete Oligonukleotide*

Alle angegebenen Nukleotidsequenzen stammen aus *Rattus norvegicus*, wenn nicht anders angegeben.

Syntaxin volle Länge mit N-terminalem myc-tag

fsynmc (forward-Primer mit myc-Sequenz), *HindIII*, *EcoRI*

5'-GCG AAG CTT GCC ACC ATG GAA CAG AAA CTG ATC AGC  
GAA GAA GAT CTG AAT TCC AAG GAC CGA ACC CAG GAG-3'

rsynmc, *PstI*

5'-GCG CTG CAG CTA TCC AAA GAT GCC CCC-3'

Munc-18, Klonierung in pBOB1.5-myc

munccecostart, *EcoRI*

5'-CGG AAT TCC GCC CCC ATT GGC CTC AAG G-3'

muncpstop, *PstI*

5'-CGC CTG CAG TTA ACT GCT TAT TTC TTC GTC TG-3'

Munc-18, Klonierung in pET28a

munccecopetstart, *EcoRI*

5'-CCG AAT TCG CCC CCA TTG GCC TCA AGG-3'

munchindstop, *HindIII*

5'-CCC AAG CTT TTA ACT GCT TAT TTC TTC GTC TG-3'

Munc-18-D34N

muncD34Nsense

5'-GTG CTG GTG GTG AAC CAG TTA AGC -3'

muncD34Nantisense

5'-GCT TAA CTG GTT CAC CAC CAG CAC-3'

Munc-18-R39C

muncR39Csense

5'-CCA GTT AAG CAT GTG TAT GCT GTC TTC C-3'

muncR39Cantisense

5'-GGA AGA CAG CAT ACA CAT GCT TAA CTG G-3'

verschiedene Munc-18-Primer

munc475stop

5'-GAG GGC TGT AGA AAC TTT GG-3'

munc261start

5'-CAG TGA TTT TAA GGA CCC GC-3'

munc1133stop2

5'-TCA GCA TCT GTG CCC ATC-3'

Doc2 $\alpha$ , Klonierung in pGEX-4T1

Doc2BamHI

5'-ATC GGA TCC ATG AGG GGC CGC AGG GGC-3'

DocXhoI

5'-GCG CTC GAG TCA GGC CAA CGG CAA CGC-3'

middlestart

5'-GCT GAG TCA CAA TGA ATT TAT TGG-3'

middlestop

5'-CCA ATA AAT TCA TTG TGA CTC AGC-3'

Doc2Ecostop

5'-AAA GAA TTC CTC ATT AAA TTC CGG GTT C-3'

EGFP, Klonierung in pBOB1.5 (*Aequorea victoria*)

EGFPKpnstart, *KpnI*

5'-CGG GGT ACC ATG GTG AGC AAG GGC GAG-3'

EGFPecostop, *EcoRI*

5'-CGC GAA TTC TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT G-3'

***cDNAs***

Syntaxin 1a	R. Scheller, Stanford, CA
Munc-18-1	T. C. Südhof, Dallas, TX
Mint1	T. C. Südhof, Dallas, TX
TeTX leichte Kette	H. Niemann / Th. Binz, Hannover
<i>(Clostridium tetani</i> , modifizierte Codons)	
Rattenhirn-cDNA-Bank	N. Brose, Göttingen

***Expressionsvektoren***

prokaryontische:	pGEX-4T1 (AmershamPharmaciaBiotech)
	pGEX-KG (Labor T.C. Südhof)
	pET-28a (Novagen)
eukaryontische:	pBOB1.5

***Antikörper***

Folgende Antikörper von Synaptic Systems (Göttingen) wurden verwendet: rab3a Cl. 42.2, SynaptobrevinII Cl. 69.1, Synaptotagmin Cl. 41.1, SNAP-25 Cl. 71.1,  $\alpha$ -SNAP Cl. 77.2, GDI Cl. 81.2. sowie das polyklonale Complexin-Antiserum 942. Im Labor stand eine von ATCC (Manassas, VA) erworbene Hybridomazelllinie zur anti-myc-Produktion zur Verfügung. Zur Detektion von Syntaxin1a und 1b wurde der HPC-1-Antikörper verwendet (Barnstable et al., 1985; ebenfalls Synaptic Systems). Kommerziell erhältlich waren außerdem Munc-18- und Mint-1-Antikörper (BD Transduction Laboratories). Des weiteren wurde in Kaninchen ein Antiserum gegen rekombinantes Ratten-GST-Doc2 $\alpha$  (volle Länge) erzeugt. Der Kaninchen-Anti-Maus-Brückenantikörper wurde von Pierce bezogen, sekundäre Antikörper von Jackson-Dianova (fluoreszenzmarkiert) oder Biorad (HRP- konjugiert).



## 2.2 Amperometrie

### *Verwendete Puffer:*

#### **Standard-Ringerlösung**

KCl 4mM / NaCl 130mM / HEPES 10mM / MgCl<sub>2</sub> 1mM / CaCl<sub>2</sub> 5mM / Glukose 44mM, pH 7.3

#### **Hochkaliumringerlösung**

KCl 50mM / NaCl 80mM / HEPES 10mM / MgCl<sub>2</sub> 1mM / CaCl<sub>2</sub> 5mM / Glukose 24mM / TEA 20mM, pH 7.3

#### **Ionomycin-Ringerlösung**

KCl 4mM / NaCl 130mM / HEPES 10mM / MgCl<sub>2</sub> 1mM / CaCl<sub>2</sub> 1mM / Glukose 45mM, pH 7.3 / Ionomycin 5 $\mu$ M

### **2.2.1 Amperometrische Messung und Analyse amperometrischer Signale**

Kohlefaserelektroden mit einem Durchmesser von 5 $\mu$ m wurden von NPI Electronics (Tamm) bezogen. Vor der Messung wurden die Fasern mit einer Skalpellklinge abgeschnitten, die Qualität des Schnitts wurde unter hoher Vergrößerung visuell überprüft. Die Annäherung der Kohlefaserelektrode an die Zelle erfolgte unter 320x-Vergrößerung mittels eines piezogesteuerten Mikromanipulationssystems (Spindler&Hoyer) auf dem Tisch eines Zeiss Axiovert 25. Die Zellen wurden durch Überspülung mit Hochkaliumringer oder Ionomycin stimuliert. Hierfür wurde ein elektronisch gesteuertes Mehrkanal-Perfusionssystem verwendet, das einen gravitationsgetriebenen Flüssigkeitsstrom erzeugte. Für die Oxidation von Dopamin wurde ein Oxidationspotential von +800mV an die Kohlefaser angelegt. Die amperometrischen Signale wurden mit einem EPC-7-Verstärker (HEKA Electronics) aufgenommen, mit 3kHz und 10kHz gefiltert (8-Pol, Bessel) und mit 25kHz digitalisiert. Hierfür wurde die pCLAMP6-Programmreihe eingesetzt (Axon Instruments). Zur Analyse der amperometrischen Daten wurde das Programm AutesW (NPI Electronics) verwendet, dessen durch D. Bruns erstellte Routinen eine semi-automatische Analyse der Signale erlaubt (Bruns et al., 2000). Die ausgelesenen Parameter jedes einzelnen amperometrischen Ereignisses wurden optisch kontrolliert.

Hierbei wurden die amperometrischen Signale mit 3kHz digital nachgefiltert und eine Schwelle von 1.5pA eingeführt. Zusätzlich wurde von mir eine Routine zur Analyse von Fußsignalen integriert. Als Beginn eines Fußsignals wurde der Punkt der Stromkurve festgelegt, an dem die Amplitude die Standardabweichung des mittleren Hintergrundrauschens um das Zweifache überstieg. Das Ende eines Fußsignals wurde als Übergang zwischen dem langsamen Anstieg des Fußsignals und schnellerer Spikephase definiert (siehe auch Abb. 15). Die weitere Bearbeitung der Daten erfolgte in SigmaPlot für Windows, für statistische Auswertungen wurde ArcusQuickStat Biomedical verwendet.

### **2.3 Zellkultur, Transfektion, Immunfluoreszenz**

#### ***Verwendete Puffer und Lösungen:***

##### **Kollagenstammlösung**

Kollagen 1mg/ml in 0.1% Essigsäure, Kollagen Typ VII, aus Rattenschwanz

##### **PC12-Kulturmedium**

RPMI 1640 (LifeTechnologies) / Pferdeserum, hitzeinaktiviert, 10% (v/v) / FCS 5% (v/v) (Sigma) / L-Glutamin 2mg/ml / Pen-Strep 60iu/ml

##### **Cytomix**

HEPES 25mM / KCl 120mM /  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10mM /  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10mM /  $\text{CaCl}_2$  0.15mM / EGTA 2mM /  $\text{MgCl}_2$  5mM, pH 7.7 (KOH)

vor Versuchsbeginn frisch zugesetzt:

ATP 2mM / Glutathion (reduzierte Form) 5mM

##### **10x-HEPES-KCl-Puffer**

HEPES, pH 7.69, 250mM / KCl 1.2M

##### **10x PBS für Immunfluoreszenz (10x PBS-IF)**

NaCl 1.36M / KCl 25mM /  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  15mM /  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  65mM /  $\text{CaCl}_2$  5mM /  $\text{MgCl}_2$  20mM, pH 7.4

##### **PFA-Lösung**

Paraformaldehyd 4% (w/v) in 1x PBS-IF

### **Quenching-Puffer**

NH<sub>4</sub>Cl 50mM in 1x PBS-IF

### **Immunfluoreszenz-Puffer (IF-Puffer)**

Ziegenserum 15% (v/v) / TritonX-100 0.2% (v/v) / in 1x PBS-IF

## **2.3.1 Zellkultur**

PC12-Zellen (Greene and Tischler, 1976) wurden auf kollagenbeschichteten Plastikschaalen kultiviert (Kollagenkonzentration ca. 2 µg/cm<sup>2</sup>). Das PC-12-Kulturmedium wurde alle zwei Tage zu zwei Dritteln ausgetauscht. Die Zellen wurden im Abstand von 6-8 Tagen im Verhältnis 1:5 gesplittet. Hierfür wurden sie mit einer Trypsin-EDTA-Behandlung (LifeTechnologies) von den Schalen abgelöst, durch Zentrifugation pelletiert und vor der erneuten Aussaat mit einer geschmolzenen Pasteur-Glaspipette trituriert. Für elektrophysiologische und biochemische Experimente wurden Zellen aus den Passagen 26 bis 32 eingesetzt.

## **2.3.2 Transfektion**

Als Standard-Transfektionsmethode wurde ein Elektroporationsprotokoll (Lang et al., 1997) gewählt. Zur Überexpression wurden im Regelfall pBOB1.5-Konstrukte verwendet, die einen N-terminalen myc-tag tragen. In einem Kotransfektionsansatz wurden diese Konstrukte zusammen mit pBOB-EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) transfiziert, das als cytosolisches Protein exprimiert wurde. Die hierbei eingesetzten Plasmidmengen betragen für pBOB-EGFP 5-6µg DNA / 1 x 10<sup>6</sup> Zellen, für die anderen Konstrukte 25-70µg DNA / 1 x 10<sup>6</sup> Zellen in Abhängigkeit von der Expressionsstärke des jeweiligen Proteins. Die Plasmid-DNA wurde über Qiagen Maxiprep- oder Megaprep-Säulen aufgereinigt (siehe Abschnitt 2.4.4). Ein typischer Transfektionsansatz in einer 4mm-Elektroporationsküvette (Peqlab) faßte 800µl und beinhaltete 6 x 10<sup>6</sup> Zellen in 300µl Cytomix sowie die Plasmid-DNAs in 500µl 1x HEPES-KCl-Puffer, wodurch die Osmolarität der DNA-Lösung in physiologische Bereiche angehoben

wurde. Die Elektroporation erfolgte in einem Biorad Gene-Pulser bei 1.15kV, 50 $\Omega$  und 50 $\mu$ F. Nach der Elektroporation wurden die Zellen 10min bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann in der gewünschten Menge an Kulturmedium aufgenommen und plattiert. Hierbei wurden pro 10cm-Schale 6 x 10<sup>6</sup> Zellen in 12ml Medium plattiert, pro 35mm-Schale 1- 1.2 x 10<sup>6</sup> Zellen in 2.5ml Medium. Bis zum Experiment wurde täglich die Hälfte des Kulturmediums ausgetauscht.

Als alternative Transfektionsmethoden wurden verschiedene kommerzielle Transfektionsreagenzien ausgetestet (siehe Tab. 1). Hier bei wurden lediglich die Zellzahlen und DNA-Mengen optimiert, ansonsten wurde strikt nach Herstellerangaben verfahren.

### **2.3.3 Immunfluoreszenz**

Als Standard-Fixationsmittel wurde PBS-IF-gepuffertes 4%iges PFA verwendet. Vor der Fixation wurden die Zellen 1x in PBS-IF gewaschen, anschließend für 25min bei RT fixiert. Es wurde einmal mit PBS gewaschen, anschließend wurden die Zellen 10 min in Quenching-Puffer inkubiert und im nächsten Schritt 1h bei RT in IF-Puffer geblockt. Primärantikörper wurden in der jeweils optimierten Verdünnung in IF-Puffer aufgebracht und ebenfalls 1h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Texas Red-markierten Sekundärantikörper in der standardisierten Verdünnung von 1:400 (aus 50%-Glycerol-Stammlösung) 1h bei RT eingesetzt. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit DAKO Fluorescence Mounting Media wässrig eingedeckelt und mit einem 63x / 1.4NA Ölimmersionsobjektiv (DIC-Apochromat) am Zeiss Axiophot2 mit einer TE/CCD-1317-D/1 CCD-Kamera (Princeton Instruments, Trenton, NJ) dokumentiert. Hierbei wurden für die Darstellung von EGFP der Zeiss Filtersatz 10 und für Texas Red der Zeiss Filtersatz 00 verwendet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Metamorph-Bildanalyseprogramms (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA). Für die konfokale Analyse fluoreszenzgefärbter Zellen wurde ein inverses Zeiss Laserscanning LSM-410-Mikroskop verwendet. Zur Darstellung der EGFP-Fluoreszenz wurde ein externer 488nm-Laser und der Filtersatz LP515 verwendet, für die Darstellung des Texas Red-Signals wurde der interne 543nm-Laser und

der Filtersatz LP570 verwendet. Die Scan-Auflösung wurde auf 1024x1024 Pixel eingestellt, das Pinhole wurde auf den Wert 20 gesetzt. Ein 63x / 1.4NA Ölimmersionsobjektiv (DIC-Apochromat) wurde verwendet.

### **2.3.4 Bestimmung der Granulenzahl**

Hierbei wurden NPY-EGFP überexprimierende PC12-Zellen verwendet, die auf auf Deckgläschen kultiviert wurden. Um die exakte Position des Deckglases und damit der adhärennten Plasmamembran zu bestimmen, wurde die Eigenfluoreszenz von Latex-Beads mit einem Durchmesser von 220nm ausgenutzt, die dem Präparat 1:50 verdünnt zugegeben wurden und sich auf der Glasoberfläche absetzten (Tetraspek™ Beads). Das Fluoreszenzsignal der Beads wurde über ihre gesamte Ausdehnung in der z-Achse in Schritten von 100nm (entspricht einer Änderung der fokalen Ebene um 88nm; Majlof und Forsgren, 1993) an einem Zeiss Axiovert100TV über eine CCD-Kamera dokumentiert. Die anschließende Auftragung der Fluoreszenzintensitäten über die fokale Ebene ergab eine Normalverteilung, die über eine Gauss-Funktion annäherungsweise beschrieben werden kann (Gauss-Fit). Der im Gauss-Fit bestimmte Maximalwert wurde zur Ermittlung der entsprechenden fokalen Ebene verwendet (siehe auch Abb. 21A-D). In dieser Ebene hatte das Bead seine maximale Fluoreszenz, also seine maximale Ausdehnung und sein Zentrum. Man konnte somit auf die Position des Deckglases zurückrechnen.

In dreißig Schritten von jeweils 100nm wurde durch die Zellen durchfokussiert und eine Reihe von digitalen Bildern aufgenommen („Stack“). Um eine möglichst objektive Auswahl an fluoreszierenden Granulen zu treffen, wurden diese dreißig Bilder zu einem Mittelwerts-Bild (Abb. 21C) zusammengefaßt und gefiltert. Auf einem solchen gemittelten Bild sind Granulen aus allen fokalen Ebenen des Stacks zu sehen, deren Zentrum innerhalb des Stacks liegt. Dies wird deutlich, wenn man Abb. 21A (Fokus nahe am Glas) mit Abb. 21B (Fokus weiter entfernt vom Glas) und Abb. 21C (Mittelwertsbild) vergleicht.

Zur Auszählung der Granulen wurden die Mittelwerts-Bilder verwendet. Ein Ausschnitt von  $40\mu\text{m}^2$  wurde zur Zählung verwendet. Dieser entspricht einem zellulären Volumen von  $105\mu\text{m}^3$ . Die Granulen wurden von drei Personen unabhängig ausgezählt.

## **2.4 Subklonierung von Expressionskonstrukten**

### **2.4.1 PCR**

Zur Subklonierung von cDNAs in eukaryontische oder prokaryontische Expressionsvektoren wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet. Hierbei wurde routinemäßig als Polymerase Pfu Turbo (Stratagene) eingesetzt, um die zufällige Einführung von Mutationen zu unterbinden. Der Standard-Reaktionsansatz (50µl Gesamtvolumen: 5µl 10x-Pfu-PCR-Puffer, 5µl dNTP-Mix (je 2mM), je 2.5µl Vorwärts- und Rückwärts-Primer (20mM), 1ng Plasmid-Template, 2.5 units Pfu Turbo) wurde nach einer initialen Denaturierung bei 94°C für 2min in 26 bis 30 Zyklen amplifiziert. Hierbei bestand ein Zyklus aus 30s bei 94°C, 30s bei 52-62°C je nach Primerpaar und 1min bei 72°C. Abschließend wurden unvollständige Amplifikate für 10min bei 72°C aufgefüllt.

Die PCR-Produkte wurden nach Herstellerangaben mit Hilfe des PCR-Purification Kits (Qiagen) aufgereinigt, mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen ebenfalls nach Herstellerangaben verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Aufreinigung aus dem Agarosegel erfolgte mit Hilfe des Gelex-Kits (Qiagen).

Vektoren wurden nach dem Verdau durch Restriktionsenzyme ebenfalls gelelektrophoretisch aufgetrennt und über Gelex aufgereinigt.

Die Ligation erfolgte bei 16°C über Nacht. Der individuelle Ligationsansatz entsprach Standardbedingungen und richtete sich nach der Größe der eingesetzten Vektoren und Inserts. Ligationsansätze wurden in elektrokompetente E.coli XL1-Blue transformiert, die Plasmid-DNA amplifiziert, präpariert (s.u.) und sequenziert.

### **2.4.2 Generation von Punktmutationen nach Higuchi**

Diese Methode folgt der von Higuchi et al. (1988) vorgeschlagenen Vorgehensweise. Hierbei wird in zwei aufeinanderfolgenden PCRs eine Punktmutation in die cDNA eingeführt. Es werden vier Primer benötigt, von denen zwei Start- und Stop-Primer der zu amplifizierenden Sequenz darstellen und zwei die gewünschte Mutation tragen und, abgesehen von ihrer gegensätzlichen 5'-3'-Orientierung, völlig identisch sind:

1. PCR:	Ansatz 1	Ansatz 2
	Start-Primer	Mutationsprimer-sense
	Mutationsprimer-antisense	Stop-Primer
Aufreinigung der Fragmente 1 und 2 aus dem Gel		
2. PCR:	Auffüllzyklen (nur Fragment 1 und 2, keine Primer), Hybridisierung im Bereich der Mutations-Primer Amplifikation der Volle-Länge-Sequenz nach Zugabe von Start- und Stop-Primer	

Der Reaktionsansatz der 1. PCR entsprach dem oben beschriebenen Standard-Ansatz.

Die 2. PCR wurde wie folgt angesetzt (45µl Gesamtvolumen): 5µl 10x Pfu-PCR-Puffer, 5µl dNTP-Mix (je 2mM), je 5µl Fragment 1 und 2 (aus Gel), 2.5 units Pfu Turbo Polymerase.

In insgesamt 6 Auffüllzyklen wurden Fragment 1 und 2 zunächst zum Volle-Länge-Produkt verlängert: initiale Denaturierung 2min bei 94°C, gefolgt von sechs Zyklen à 30s bei 94°, 30s bei 48-55°C und 1min bei 72°C. Nach Abkühlung auf 16°C erfolgte die Zugabe von Start- und Stop-Primern (je 2.5µl, 20mM). Die folgende Amplifikation entsprach der PCR-Standard-Prozedur.

Zur weiteren Subklonierung wurde wie oben beschrieben verfahren.

#### **2.4.3 Klonierung von Ratten-Doc2α aus einer Rattenhirn-cDNA-Bank**

Zur Erzeugung einer cDNA, die den vollständigen offenen Leserahmen von Doc2α umfaßte, wurde aufgrund des hohen GC-Gehalts des Templates ein Taq/Pwo-Polymerasegemisch verwendet (Expand High Fidelity PCR Kit, Roche). Die Amplifikation erfolgte wie in Duncan et al. (2000) beschrieben. Zunächst wurden zwei Fragmente generiert, die im Bereich der middlestart/middlestop-Primerregion überlappten (Primerkombinationen für Fragment 1-584: Doc2BamHI und middlestop; für Fragment 561-1212: middlestart und DocXhoI), und somit als Matrize für die Herstellung des Doc2α(1-970)-Fragmentes dienen konnten (Primerkombination: Doc2BamHI und Doc2Ecostop; Higuchi et al., 1988). Zur weiteren Subklonierung benötigte PCR-Fragmente wurden zunächst in den pCR2.1-TOPO-Vektor (Invitrogen) subkloniert. Unter Ausnutzung der

intrinsischen *EcoRI*-Schnittstelle bei bp 970 in Doc2 $\alpha$  wurden dann die Fragmente 1-970 und 970-1212 sequentiell in pGEX-4T1 ligiert, in elektrokompetenten XL-1Blue amplifiziert und nachfolgend sequenziert.

#### **2.4.4 Amplifikation und Aufreinigung von Plasmid-DNA**

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurde ausschließlich der E.coli-Stamm XL-1 Blue verwendet. Zur Aufreinigung der Plasmid-DNA in unterschiedlichen Mengen wurden die Plasmid-Prep Kits der Firma Qiagen verwendet (Spin Mini Prep, Midiprep, Maxiprep, Megaprep). Es wurde nach Herstellerangaben verfahren.

### **2.5 Proteinbiochemische Methoden**

#### **2.5.1 Expression von rekombinanten Proteinen in E.coli**

##### ***Verwendete Puffer und Lösungen:***

##### **GST-Resuspensionspuffer**

Tris-Base, pH 7.4 bei RT, 20mM / NaCl 100mM / DTT 1mM / EGTA 1mM / MgCl<sub>2</sub> 1mM

##### **GST-Waschpuffer**

Resuspensionspuffer plus 1% TritonX-100 (v/v)

##### **GST-Elutionspuffer**

Tris-Base, pH 8 bei 4°C, 50mM / NaCl 100mM / TritonX-100 0.1% (v/v) / Glutathion 30mM

##### **H<sub>6</sub>-Resuspensionspuffer**

Tris-Base, pH 7.8 bei 4°C, 50mM / NaCl 500mM / MgCl<sub>2</sub> 1mM

##### **H<sub>6</sub>-Waschpuffer**

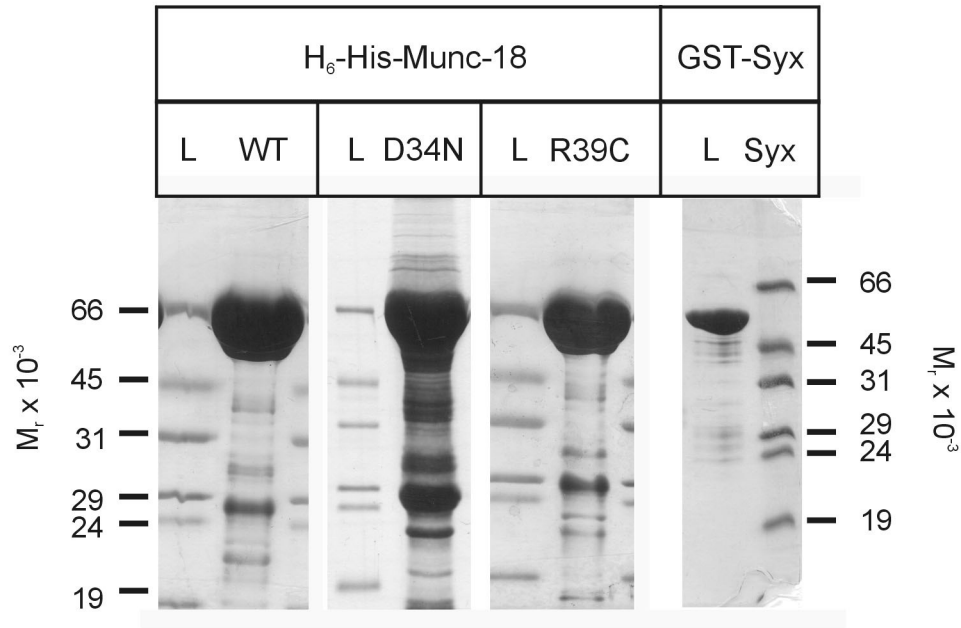
Resuspensionspuffer plus 1% TritonX-100 (v/v) und 20mM Imidazol



### **H<sub>6</sub>-Elutionspuffer**

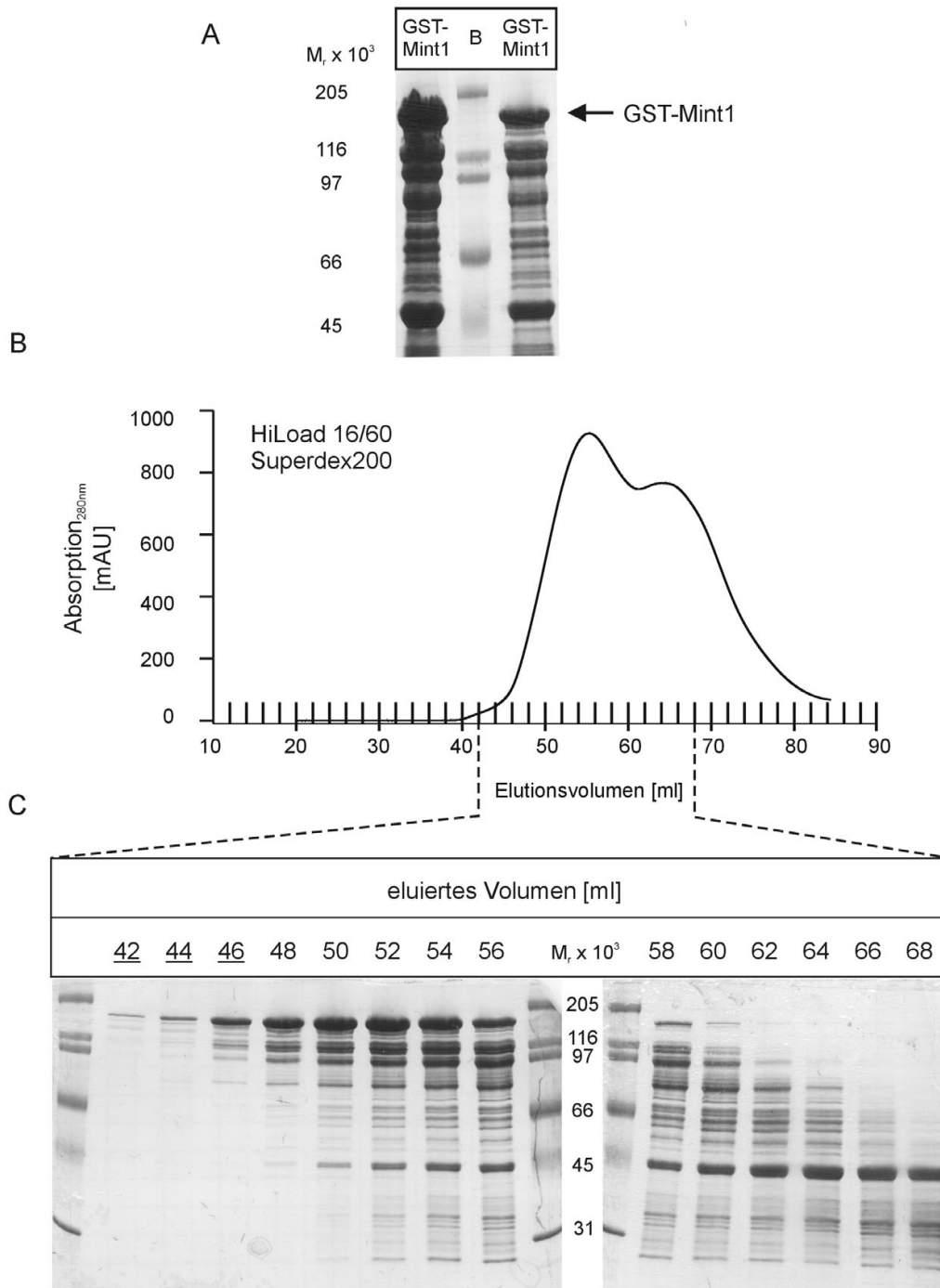
Tris-Base, pH 7.8 bei 4°C, 50mM / NaCl 500mM / Imidazol 500mM /  
TritonX-100 0.1% (v/v)

Zur Expression von rekombinanten Proteinen wurde der proteasedefiziente E.coli-Stamm BL21(DE3) verwendet. Übernachtskulturen wurden 1:50 in das gewünschte Volumen an LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) überimpft. Antibiotika wurden in Standardkonzentrationen zugesetzt. Die Induktion der Expression mit 0.2mM IPTG erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von 0.7 bei 21°C. Die Kulturen wurden 4h weiter inkubiert, abzentrifugiert, die Pellets in GST- oder H<sub>6</sub>-Resuspensionspuffer aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Die Aufreinigung der GST- oder H<sub>6</sub>-Fusionsproteine erfolgte nach Standardprotokollen über GSH-Sepharose (AmershamPharmaciaBiotech) oder Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (Qiagen). Dies beinhaltete eine Behandlung mit Lysozym (1mg/ml), DNaseI (5µg/ml), Ultraschall sowie 1% TritonX-100 (v/v). Es wurde grundsätzlich mit detergentenhaltigen Puffern gewaschen. Die Elution von GST-Fusionsproteinen erfolgte mit GST-Elutionspuffer nach einer zehnmütigen Inkubation, H<sub>6</sub>-Fusionsproteine wurden immer mit H<sub>6</sub>-Elutionspuffer und mit 500mM Imidazol eluiert. Die eluierten Proteine wurden gegen Bindungspuffer (150mM NaCl / 20mM Tris pH 7.5 / 1mM EGTA / 1mM DTT / 0.5% TritonX-100 / 1mM PMSF) dialysiert und in Aliquots bei -80°C eingefroren. Das Ergebnis einer Proteinaufreinigung von H<sub>6</sub>-Munc-18-WT, -D34N und -R39C sowie GST-Syntaxin1a ist in Abb. 5 dargestellt. GST-Mint1 wurde aufgrund der starken Proteolyse des Proteins in den Bakterien zusätzlich über eine HiLoad 16/60 Superdex200 Gelfiltrationssäule bei einer Flußrate von 0.5ml/min aufgereinigt. Als Gelfiltrationspuffer wurde Bindungspuffer ohne TritonX-100 verwendet. Für Bindungsexperimente wurden die Fraktionen 21-23 gegen Bindungspuffer dialysiert und in Aliquots eingefroren (siehe auch Abb. 6).



**Abb. 5: Bakteriell exprimiertes H<sub>6</sub>-Munc-18 und GST-Syntaxin**

SDS-PAGE Analyse (12%-Gele) und nachfolgende Coomassie-Färbung von bakteriell exprimiertem H<sub>6</sub>-Munc-18-WT, -D34N und -R39C nach Elution von der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographiesäule sowie von GST-Syntaxin1a (Aminosäuren 1-265) nach Elution von der GSH- Affinitätschromatographiesäule. H<sub>6</sub>-Munc-18 hat ein apparentes Molekulargewicht von 68kDa. H<sub>6</sub>-Munc-18-WT und -R39C sind ohne Schwierigkeiten zu exprimieren und ohne größere Kontaminationen aufzureinigen. Munc-18-D34N exprimiert nur in geringen Mengen in Bakterien und erforderte große Kulturmengen. Kulturvolumina des hier dargestellten Aufschlusses: GST-Syntaxin1a 3l, H<sub>6</sub>-Munc-18-WT und -R39C 6l, H<sub>6</sub>-Munc-18-D34N 12l. Trotz des unterschiedlichen Kulturvolumens wurden die H<sub>6</sub>-Munc-18-Proteine jeweils über 8ml Nickel-NTA-Agarose-Suspension aufgereinigt. Für GST-Syntaxin1a wurden 4ml GSH-Sepharosesuspension verwendet. Je 12µl des Eluats sind aufgetragen. L = Low Range Molecular Weight Marker (Sigma).



**Abb. 6: Aufreinigung von GST-Mint1**

**A** Analyse von GST-Mint1 nach Elution von der GSH-Affinitätschromatographiesäule über SDS-PAGE und nachfolgende Coomassie-Färbung. Zahlreiche Abbauprodukte sind sichtbar. **B** Weitere Aufreinigung von GST-Mint1 über Gelfiltration. Dargestellt ist das Elutionsprofil von GST-Mint1 von der HiLoad 16/60 Superdex200-Gelfiltrationssäule aufgetragen als Absorption (280nm) über Elutionsvolumen. **C** SDS-PAGE und nachfolgende Coomassie-Färbung der angegebenen GST-Mint1-Fractionen aus der Gelfiltration. Die ersten drei Fractionen (unterstrichen) wurden für Bindungsassays eingesetzt. Intaktes GST-Mint1 ist das Protein mit dem höchstem Molekulargewicht im Gemisch und eluiert zuerst.

### 2.5.2 TritonX-100-Extraktion von PC12-Zellen

#### *Verwendete Puffer:*

#### **Extraktionspuffer**

TBS 1x / TritonX-100 1% (v/v) / complete™-Cocktail 1x

Nach einmaligem Waschen der PC12-Zellen in den Kulturschalen mit 1x TBS wurden die Zellen in TBS mechanisch abgelöst und pelletiert. Je nach Größe der Zellpellets wurden diese in 50-500µl Extraktionspuffer suspendiert und für 45min auf Eis inkubiert.

Zellkerne und nicht lysierte Zellen wurden bei 4000rpm, 5min, 4°C in der Tischzentrifuge abgetrennt. Der Überstand wurde bei 80.000 x g im Beckman TLA100.3 Rotor in der Ultrazentrifuge 45min zentrifugiert, um nicht solubilisierte Bestandteile abzutrennen. Der hierbei gewonnene Überstand wurde für die nachfolgenden Experimente eingesetzt.

### 2.5.3 Membranfraktionierung von PC12-Zellen

#### *Verwendete Puffer:*

#### **Homogenisierungspuffer**

HEPES, pH 7.2, 20mM / Saccharose 250mM / complete™-Cocktail 1x

#### **Membranextraktionspuffer**

HEPES, pH 7.2, 20mM / NaCl 100mM / EDTA 2mM / TritonX-100 1% (v/v) / complete™-Cocktail 1x

PC12-Zellen wurden nach einmaligem Waschen in 1x TBS mechanisch von der Kulturschale (10cm Durchmesser) abgelöst und pelletiert. Das Zellpellet wurde in 500µl Homogenisierungspuffer resuspendiert und die Zellen mit 15 Passagen durch eine 23 Gauge-Kanüle aufgebrochen. Die Suspension wurde zentrifugiert (2500rpm, 10min, 4°C, Tischzentrifuge), das entstehende Zellkernpellet verworfen und der Überstand (=Post-nuclear supernatant, PNS) im Beckman TLA100.3-Rotor bei 120.000 x g für 1h bei 4°C zentrifugiert. Der hierbei gewonnene Überstand repräsentiert die Cytosol-Fraktion. Das verbleibende

Membranpellet wurde einmal mit Homogenisierungspuffer gewaschen, nochmals 20min im TLA100.3 bei 120.000 x g zentrifugiert, anschließend in Membranextraktionspuffer aufgenommen und 25min auf Eis inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden bei 13.000rpm für 20min in der Tischzentrifuge abgetrennt und verworfen. Der gewonnene Detergenzextrakt repräsentiert die Membranfraktion.

#### **2.5.4 SDS-PAGE, Western-Blot-Analyse und quantitativer Western Blot**

##### ***Verwendete Puffer und Lösungen:***

30% Acrylamidstammlösung mit 0.8% Bisacrylamid (Rotiphorese Gel30, Roth)

##### **5x Probenpuffer für Proteine**

Tris-Base, pH 6.8, 60mM / Glycerin 25% (v/v) / SDS 2% (w/v) /

2-Mercaptoethanol 14.4mM / Bromphenolblau 0.1% (w/v)

##### **4x Sammelgelpuffer**

Tris-Base, pH 6.8, 500mM / SDS 0.4% (w/v)

##### **4x Trenngelpuffer**

Tris-Base, pH 8.8, 1.5M / SDS 0.4% (w/v)

##### **1x Laufpuffer**

Tris-Base 25mM / Glyzin 192mM / SDS 0.1% (w/v)

pH ist etwa 8.3, wird nicht eingestellt

##### **Coomassie-Färbelösung**

Coomassie Blue R-250 0.2% (w/v) / Methanol 50% (v/v) / Eisessig 10% (v/v)

##### **Entfärber I**

Ethanol 50% (v/v) / Eisessig 10% (v/v)

##### **Entfärber II**

Ethanol 10% (v/v) / Eisessig 5% (v/v)

**Transferpuffer (Semi-dry-Verfahren)**

Glyzin 192mM / Tris-Base 25mM / Methanol 20% (v/v) / SDS 0.04% (w/v)

pH ist etwa 8.4, wird nicht eingestellt

**Transferpuffer (Wet-Blot-Verfahren)**

Glyzin 192mM / Tris-Base 25mM

pH ist etwa 8.3, wird nicht eingestellt

**PonceauS-Färbelösung**

PonceauS 0.1% (w/v) / Eisessig 1% (v/v)

**Blotto**

TBS 1x / Tween20 0.1% (v/v) / Magermilchpulver (fettfrei) 5% (w/v)

<sup>125</sup>**I-ProteinA**, 30mCi/mg, Blotting Grade (AmershamPharmaciaBiotech) in Blotto

Für die SDS-PAGE nach Laemmli (1970) wurden die Proben mit 5x Probenpuffer versetzt und 5min bei 100°C erhitzt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden die Gele in Transferpuffer inkubiert und im Semi-Dry-Verfahren in 50min bei 1mA/cm<sup>2</sup> (konstant) auf Nitrocellulose (Schleicher&Schuell) geblottet. Für Proteine mit einem höheren Molekulargewicht als ca. 120kDa erfolgte der Transfer im Wet-Blot-Verfahren bei konstanten 30V und 40-90mA über Nacht bei 4°C. Die Effizienz des Transfers wurde über eine PonceauS-Färbung der Membran kontrolliert, diese anschließend 1h bei RT in Blotto geblockt. Primärantikörper wurden in der jeweils optimalen Verdünnung in Blotto über Nacht bei 4°C eingesetzt. Zur Detektion wurden HRP-konjugierte Sekundärantikörper verwendet, die Detektion erfolgte über Chemilumineszenz (Supersignal West Dura, Pierce). Die Signale wurden durch eine CCD-Kamera digitalisiert (LAS-1000, Fujifilm) und gespeichert. Die weitere Dokumentation und Auswertung erfolgte mit der Bildanalyse-Software AIDA2.11 (Raytest, Straubenhardt).

### **2.5.5 Quantifizierung der Überexpression von Munc-18 über die Immunfluoreszenzfärbung**

An Munc-18-1 überexprimierenden Zellen wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben. Die Zellen wurden mit einer TE/CC-1317-K/1 CCD-Kamera (Princeton Instruments, Trenton, NJ) an einem Zeiss Axiophot2 fotografiert, wobei die Expositionszeiten zwischen den Gruppen konstant gehalten wurden. Das Metamorph Imaging Programm wurde für die Quantifizierung der Fluoreszenzsignale verwendet. Hierbei wurden an die einzelne Zelle angepaßte Meßregionen ausgelesen, die den ungefärbten Nucleus der Zelle aussparten. Es wurden ausschließlich einzeln liegende und gut fokussierbare Zellen verwendet. Die Bilder wurden um die Hintergrundfluoreszenz korrigiert und die ausgelesenen mittleren Fluoreszenzintensitätswerte pro Fläche zur weiteren Verarbeitung in SigmaPlot transferiert.

### **2.5.6 Quantifizierung der endogenen Syntaxin- und Munc-18-1-Mengen in PC12-Zellen über den quantitativen Western Blot**

Zur Kalibrierung der Immunsignale des anti-Munc-18-Antikörpers und des HPC1-Antikörpers wurden Western Blots von Verdünnungsreihen von rekombinant exprimiertem H<sub>6</sub>-Munc-18-1 und GST-Syntaxin1 erstellt. Auf den gleichen Membranen wurden TritonX-100-Extrakte von PC12-Zellen geblottet, deren Munc-18- und Syntaxin1-Gehalt ermittelt werden sollte (siehe Abschnitt 2.5.2). Hierbei wurden für Munc-18 5µg Protein aus dem PC12-Zellextrakt geladen, für Syntaxin1 2.5µg. Zur Detektion wurden die entsprechenden monoklonalen Primärantikörper eingesetzt, gefolgt von einem Kaninchen-Anti-Maus-Brückenantikörper und <sup>125</sup>I-ProteinA. Pro 10ml Blotto wurden 20µl <sup>125</sup>I-ProteinA mit einer spezifischen Aktivität von 30mCi/mg eingesetzt (insgesamt 2µCi). Die Signale wurden über einen Fujifilm BAS-2500 Phosphoimager und das Bildanalyseprogramm Aida2.11 (Raytest, Straubenhardt) quantifiziert. Die ausgelesenen Intensitätswerte wurden um die Hintergrundradioaktivität korrigiert und zur weiteren Analyse in SigmaPlot transferiert.

### **2.5.7 Immunpräzipitation**

Zur Immunpräzipitation (IP) wurden die in 2.5.2 beschriebenen Triton-Extrakte verwendet. 400µg Gesamtprotein wurden in 250µl TBS-1% (v/v) TritonX-100 mit 3µg Antikörper (z.B. Protein-G-Sepharose-gereinigter anti-myc-Ascites) für 90min bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. 40µl Protein-G-Sepharose-Suspension (50% Sepharoseanteil) wurden mit TBS-Triton vorgewaschen, zum IP-Ansatz zugegeben und der IP-Ansatz weitere 90min geschüttelt. Die Sepharose mit gebundenem Protein wurde pelletiert, der Überstand mit ungebundenem Protein abgenommen und auf Eis aufbewahrt. Die Sepharose wurde fünf Mal in TBS-Triton gewaschen und anschließend mit TBS-Triton auf das gleiche Volumen wie der Überstand aufgefüllt. Überstand und Sepharosesuspension wurden mit 5x Probenpuffer versetzt und 5min bei 100°C erhitzt. Zur Analyse der Fraktionen im Immunoblot (siehe 2.5.4) wurden gleiche Volumina von Überstand und Sepharosesuspension eingesetzt.

### **2.5.8 Bindungsexperimente mit rekombinanten Proteinen**

Sämtliche Proteine wurden gegen Bindungspuffer (150mM NaCl / 20mM Tris pH 7.5 / 1mM EGTA / 1mM DTT / 0.5% TritonX-100 / 1mM PMSF) dialysiert, bevor sie im Bindungsexperiment eingesetzt wurden. Für die Präzipitation über Ni<sup>2+</sup>-Sepharose wurden Puffer ohne EGTA und DTT verwendet, die zusätzlich 20mM Imidazol enthielten, um unspezifische Bindungen an die Ni<sup>2+</sup>-Sepharose zu unterdrücken. Die Proteine wurden in den Konzentrationen wie in den Abbildungsunterschriften angegeben eingesetzt und zunächst ohne Sepharose für 1-2h bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Für Bindungsexperimente mit GST-Mint1 wurde statt dessen über Nacht bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurden 40µl in Bindungspuffer vorgewaschene Sepharose (50% Sepharoseanteil) dem Ansatz zugesetzt und es wurde für weitere 2h geschüttelt. Die Sepharose mit gebundenem Protein wurde pelletiert, der Überstand mit ungebundenem Protein abgenommen und auf Eis aufbewahrt. Die Sepharose wurde drei Mal mit Bindungspuffer gewaschen und anschließend mit Bindungspuffer auf das gleiche Volumen gebracht wie der Überstand. Überstand und Sepharosesuspension wurden mit 5x Probenpuffer versetzt und 5min bei 100°C erhitzt. Zur Analyse der Proben in der SDS-PAGE wurden gleiche Volumina von Überstand und



Sepharosesuspension eingesetzt, die Acrylamid-Gele mit Coomassie Blue gefärbt und zur Dokumentation eingescannt.

### **2.5.9 „Pull-down“-Experimente mit Rattenhirnhomogenat**

#### *Verwendete Puffer*

##### **Homogenisierungspuffer:**

HEPES 10mM, pH 7.4 / Saccharose 320mM / EGTA 1mM

##### **Bindungspuffer:**

HEPES 20mM, pH 7.4, / NaCl 100mM / EGTA 1mM / DTT 1mM / PMSF 1mM / TritonX-100 1% (v/v)

Zur Gewinnung von Rattenhirnhomogenat wurden ganze Rattenhirne in je 12ml Homogenisierungspuffer im Teflon-Potter homogenisiert (6x800rpm). Das Hirnhomogenat wurde mit 1mM PMSF versetzt (Endkonzentration) und bei 4°C mit 1000xg für 10min zentrifugiert, um nicht homogenisiertes Gewebe und Zellkerne abzutrennen. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand bei 12000xg für 10min erneut zentrifugiert, wodurch zum Beispiel Mitochondrien abgetrennt wurden. Dieses Pellet wurde ebenfalls verworfen, der Überstand mit 150mM NaCl und 1% TritonX-100 (Endkonzentrationen) versetzt und 30min bei 4°C auf einem Drehrad solubilisiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch eine abschließende Zentrifugation bei 100.000xg für 1h abgetrennt. Die Proteinkonzentration im fertigen Hirnhomogenat betrug ungefähr 4mg/ml.

Die im Pull-down-Experiment eingesetzten GST-Fusionsproteine und reines GST (als Kontrolle für unspezifische Bindungen) wurden zunächst gegen 20mM Tris, pH 7.4, 100mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EGTA, 1mM DTT und 1mM PMSF dialysiert. 180µg rekombinantes Protein wurden mit 200µl GSH-Sepharosesuspension in Bindungspuffer auf insgesamt 1.5ml verdünnt und für 1h auf dem Schüttler bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde Hirnhomogenat zugegeben (50mg Gesamtprotein) und die Ansätze für weitere 90min inkubiert. Die Sepharose wurde abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Sepharose-Pellet fünf Mal mit Bindungspuffer gewaschen. Die Sepharose wurde in 200µl Bindungspuffer suspendiert, mit 5x Probenpuffer versetzt und 5min bei

100°C erhitzt. Überstände wurden ebenfalls mit Probenpuffer versetzt und 5min bei 100°C erhitzt. Die Proben wurden im Western Blot wie unter 2.5.4 beschrieben analysiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Überexpression von Munc-18-1 und Kotransfektion mit EGFP in PC12-Zellen

##### 3.1.1 Viele Transfektionsprozeduren beeinflussen die exozytotische Aktivität von PC12-Zellen

Um die Funktion von Munc-18-1 in der Exozytose zu untersuchen, wurde das Protein in PC12-Zellen überexprimiert und die Auswirkungen der Überexpression auf die LDCV-Exozytose amperometrisch charakterisiert.

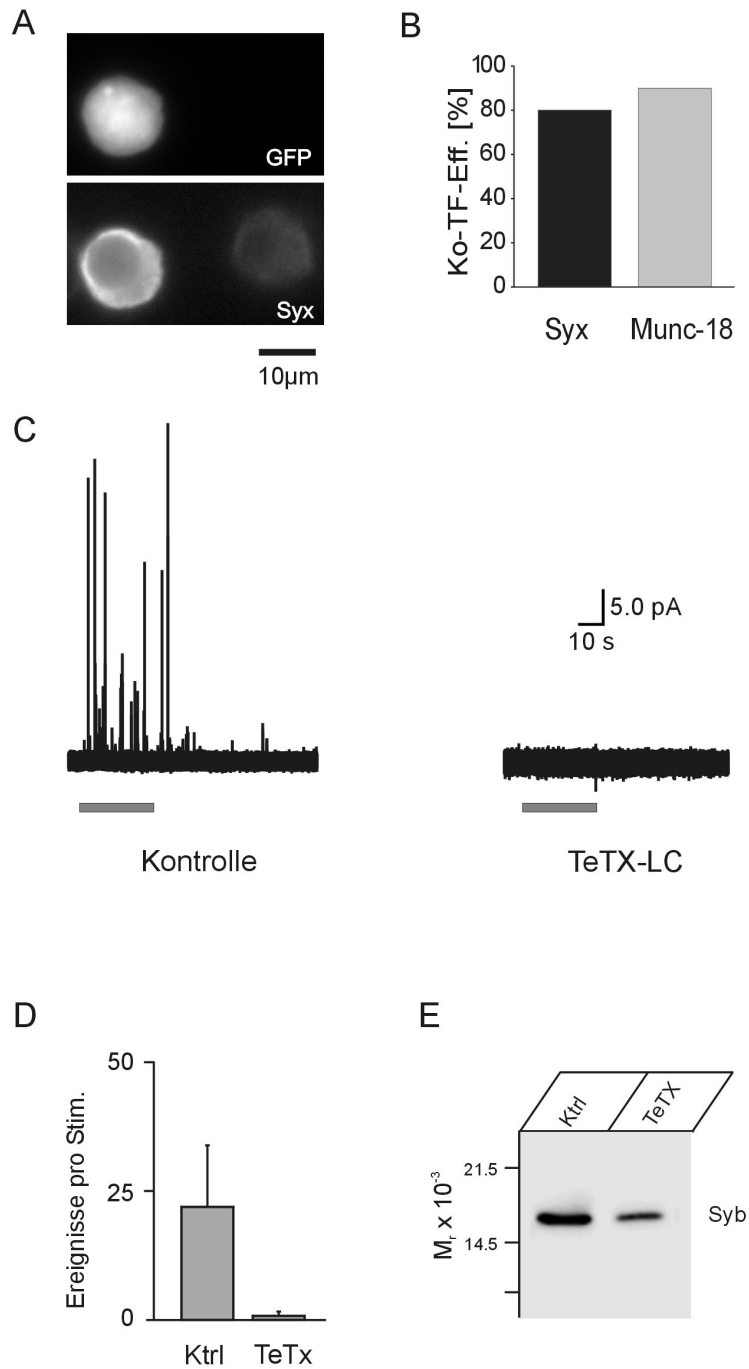
Im Vorfeld der elektrophysiologischen Analyse der PC12-Zellen wurden eine Reihe kommerziell erhältlicher chemischer Transfektionsreagenzien sowie eine Elektroporationsmethode vergleichend getestet und ihre Auswirkungen auf die Exozytose ermittelt (siehe Tab. 1). Sämtliche chemischen Prozeduren erwiesen sich als untauglich. Entweder war die Transfektionseffizienz im Test mit EGFP ('Enhanced Green Fluorescent Protein') sehr niedrig, eine große Zahl der Zellen überlebte die Prozedur nicht oder die Amperometrie ergab, daß die Reagenzien die Exozytose von LDCVs stark beeinträchtigten. Hingegen war die Elektroporation für die Zellen unschädlich und erreichte zudem ausreichend hohe Transfektionseffizienzen für biochemische Untersuchungen. Die Elektroporation ist daher die Transfektionsprozedur der Wahl für PC12-Zellen.

Tab. 1: Vergleich verschiedener Transfektionsmethoden		
Transfektionsmethode	Transfektionseffizienz [%]	exozytot. Aktivität (Ereignisse pro Stim.)
Calciumphosphat	<1	0
Dac30	< 5	0
Lipofectamine	< 5	5 ± 3
Superfect	5	10 ± 7
Effectene	< 30	16 ± 19
Elektroporation	30	29 ± 35
Kontrolle	---	30 ± 24

### **3.1.2 Die Kotransfektion mit EGFP funktioniert zuverlässig**

Um myc-Munc-18-1-überexprimierende Zellen im elektrophysiologischen Experiment identifizieren zu können, wurde als Transfektions-Marker das fluoreszierende Protein EGFP ko-transfiziert. Im Kotransfektionsansatz wird neben dem Expressionskonstrukt für myc-Munc-18-1 gleichzeitig ein zweites, für EGFP kodierendes Expressionskonstrukt angeboten. Wird das für Munc-18-1-kodierende Plasmid hierbei im Überschuß eingesetzt, exprimiert eine EGFP-transfizierte Zelle mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit auch Munc-18-1. Die mit diesem Ansatz erreichte Überlappung des EGFP-Signals mit einem myc-Immunsignal wurde als Vorversuch fluoreszenzmikroskopisch an fixierten und mit einem Antikörper gegen das myc-Epitop gefärbten Kulturen ermittelt. Zwischen 75% und 95% der EGFP-positiven Zellen waren myc-immunreaktiv (siehe Abb. 7A und B).

Die Kotransfektionseffizienz wurde darüber hinaus in einem Ansatz ermittelt, der der Situation im amperometrischen Experiment näher kommt. Die Kotransfektionseffizienz wurde durch die Kotransfektion von EGFP und der leichten Kette des clostridialen Neurotoxins Tetanustoxin und der anschließenden amperometrischen Messung bestimmt. Tetanustoxin ist eine Protease, die durch Spaltung des synaptischen SNARE-Proteins SynaptobrevinII die Exozytose hemmt (Montecucco und Schiavo, 1994). Der starke Rückgang der mittleren Zahl der Ereignisse pro Zelle demonstrierte die hohe Kotransfektionseffizienz von EGFP und Tetanustoxin (Abb. 7C, D). Biochemisch ließ sich der Effekt von Tetanustoxin in PC12-Zellen an einer deutlichen Abnahme von SynaptobrevinII im Tritonextrakt darstellen (Abb. 7E). Diese fluoreszenzmikroskopischen und elektrophysiologischen Daten zeigen, daß die Kotransfektion erfolgreich durchgeführt werden kann.



**Abb. 7: Fluoreszenzmikroskopische und funktionelle Dokumentation der hohen Ko-Transfektionseffizienz in PC12-Zellen**

**A** Ko-Überexpression von GFP und einem myc-tag-Protein in PC12-Zellen am Beispiel von Syntaxin1a (Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme). myc-Syntaxin1a wurde über den anti-myc-Antikörper und einen Texas Red-markierten Sekundärantikörper detektiert (Zeiss Filtersatz 00), EGFP wurde über seine auch nach Fixation erhaltene Eigenfluoreszenz detektiert (Zeiss Filtersatz 10). **B** Dargestellt ist der Anteil EGFP-positiver Zellen einer Ko-Transfektion mit Syntaxin1a und Munc-18-WT, die auch myc-immunreaktiv waren (jeweils n = 32). Die Ko-Transfektionseffizienz lag bei über 80%. **C** Repräsentative amperometrische Messung einer EGFP-transfizierten Kontrollzelle und einer EGFP- und Tetanustoxin-kotransfizierten Zelle (TeTX-LC: Tetanustoxin light chain). **D** Die quantitative Auswertung der Amperometrie zeigt einen starken Rückgang in der mittleren Zahl der Ereignisse pro Stimulation. Ktrl = Kontrolle, TeTx = Tetanustoxinüberexpression. **E** Die begleitende biochemische Analyse zeigt eine deutliche Abnahme des SynaptobrevinII-Signals in den ko-transfizierten Kulturen. Durch die Proteolyse wird das Epitop des hier verwendeten SynaptobrevinII-Antikörpers zerstört, deshalb ist nur eine Abnahme der Bandenstärke, aber keine Abbaubande detektierbar (Syb = SynaptobrevinII).

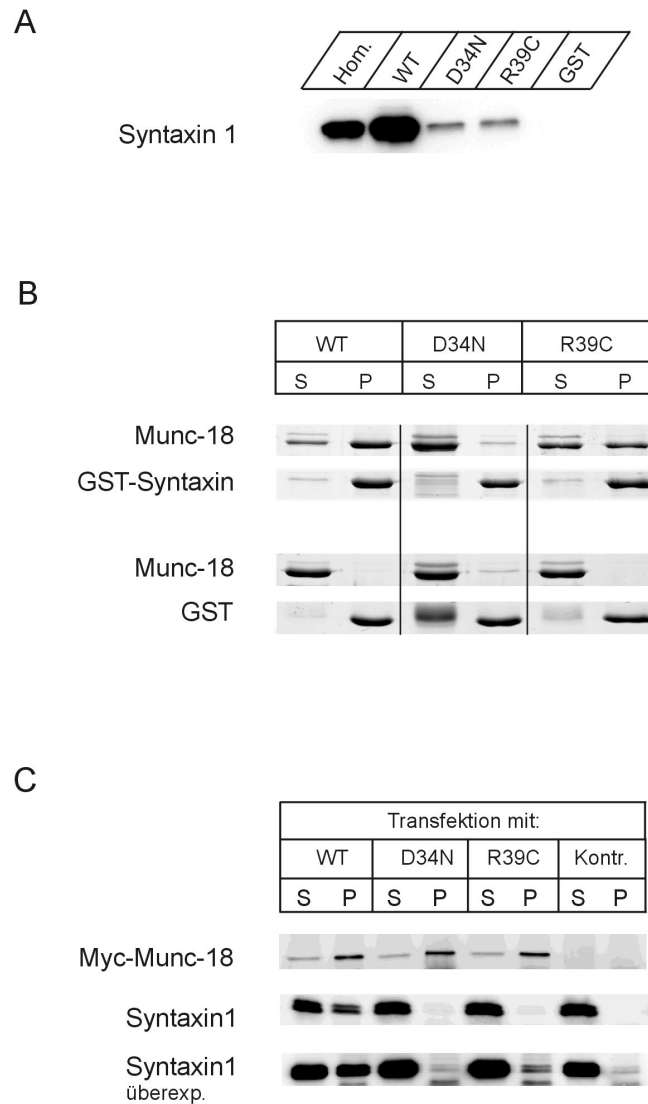
### **3.2 Perturbation der Munc-18-1-Funktion**

Um die Funktion der Munc-18-1/Syntaxin1-Interaktion in der Exozytose zu untersuchen, wurde diese auf zweierlei Weise gestört. Zum einen wurden Syntaxin1-Bindungsmutanten von Munc-18-1 erzeugt und in PC12-Zellen überexprimiert. Darüber hinaus wurde die Munc-18/Syntaxin1-Interaktion gestört, indem die Mengenverhältnisse von Munc-18-1 und Syntaxin1 durch Überexpression von Munc-18 verändert wurden.

#### **3.2.1 Einführung von Punktmutationen in die Syntaxin-Bindungsregion von Munc-18-1**

Um eine Veränderung in der Syntaxin1-Bindung durch den Austausch der beiden ausgewählten Aminosäuren (Munc-18-D34N und Munc-18-R39C) in Munc-18-1 zu zeigen, wurden drei unterschiedliche Bindungsexperimente durchgeführt. Neben einem „GST-pulldown“-Experiment, in dem die Bindung von Syntaxin aus Rattenhirnhomogenat an bakteriell exprimiertes und immobilisiertes GST-Munc-18-1 analysiert wurde, wurden auch Bindungsexperimente mit bakteriell exprimiertem, rekombinantem Munc-18-1 und rekombinantem Syntaxin durchgeführt, in denen mit definierten Proteinkonzentrationen der Bindungspartner gearbeitet werden konnte. Darüber hinaus wurde die Syntaxin-Bindung der in PC12-Zellen überexprimierten Munc-18-1-Proteine analysiert, da dies für die nachfolgenden elektrophysiologischen Experimente von besonderer Relevanz war. Die Bindung von Wildtyp-Munc-18-1 (Munc-18-WT) an Syntaxin1 wurde in allen drei Ansätzen als Referenz mit untersucht.

Zunächst wurden in „GST-pulldown“-Experimenten die bakteriell exprimierten Munc-18-Proteine an GSH-Sepharose gebunden, mit Rattenhirnhomogenat inkubiert und gebundenes Material präzipitiert. Die Präzipitate wurden dann im Immunoblot auf ko-präzipitiertes Syntaxin1 untersucht. Hierbei konnten nur über die hochaffine Bindung von Munc-18-WT und Syntaxin1 nennenswerte Mengen von Syntaxin1 aus dem Rattenhirnhomogenat gebunden werden, wohingegen beide Munc-18-Mutanten eine stark abgeschwächte Syntaxin1-Bindung aufwiesen (siehe Abb. 8A). Dies zeigte, daß bereits durch den Austausch einer Aminosäure die Munc-18-1/Syntaxin1-Interaktion deutlich gestört werden kann.



**Abb. 8: Munc-18-WT, -D34N und -R39C besitzen unterschiedliche Syntaxin-Bindungseigenschaften**

**A** GST-pulldown (Western Blot): Rekombinantes GST-Munc-18-WT, -D34N oder -R39C wurden an GSH-Sepharose gebunden und zusammen mit Rattenhirnhomogenat inkubiert. Die Bindung von Syntaxin1 an die Munc-18-Proteine wurde im Western Blot untersucht. Reines GST wurde als Kontrolle für unspezifische Bindungen eingesetzt und das als Ausgangsmaterial eingesetzte Hirnhomogenat (Hom.) zum Vergleich mit geblotet. Nur über GST-Munc-18-WT kann eine signifikante Menge an Syntaxin1 präzipitiert werden. **B** Bindungsassay mit rekombinanten Proteinen (Coomassie-Färbung): Munc-18-WT, -D34N oder -R39C (1.8µM) und GST-Syntaxin1a (3.2µM) wurden zusammen inkubiert und Komplexe über GSH-Sepharose präzipitiert. Munc-18-WT wird effizient von Syntaxin1a gebunden, D34N ist fast nicht im Pellet zu finden und von R39C wird ungefähr die Hälfte des eingesetzten Proteins durch GST-Syntaxin1a präzipitiert. Als Kontrolle wurden Munc-18-WT, -D34N oder -R39C mit reinem GST inkubiert und das GST präzipitiert (untere zwei Gelausschnitte). Es tritt keine unspezifische Bindung auf. Das bei D34N im Überstand verbleibende Protein stellt eine bakterielle Kontaminante dar. **C** Immunpräzipitationsexperimente mit dem anti-myc-Antikörper aus Tritonextrakten von Kontrollzellen und myc-Munc-18-WT, -D34N oder -R39C überexprimierenden Zellen (Western Blot). Zur Detektion von Munc-18 wurde ebenfalls der anti-myc-Antikörper eingesetzt, Syntaxin1 wurde über den HPC-1-Antikörper detektiert. Syntaxin1 kann nur bei Munc-18-WT überexprimierenden Zellen ko-präzipitiert werden. Die abgeschwächte Bindung von Syntaxin1 an R39C kann nur dargestellt werden, wenn die Waschzeiten der ProteinG-Beads reduziert werden und die Blots überexponiert werden (unterster Blotstreifen). Syntaxin1 wird als Doppelbande detektiert, da PC12-Zellen beide Isoformen von Syntaxin (1a und 1b) exprimieren, die beide durch den HPC-1-Antikörper detektiert werden.

Diese veränderte Syntaxin1-Bindung war auch mit rekombinantem GST-Syntaxin1a (cytosolische Domäne, Aminosäuren 1-265) und rekombinantem H<sub>6</sub>-Munc-18-WT, -D34N und -R39C nachvollziehbar. Munc-18-WT-Protein konnte effizient über GST-Syntaxin1a präzipitiert werden (Abb. 8B), bei Munc-18-R39C war die präzipitierte Menge deutlich geringer als bei WT-Protein und Munc-18-D34N war im Syntaxin-Pellet nicht detektierbar.

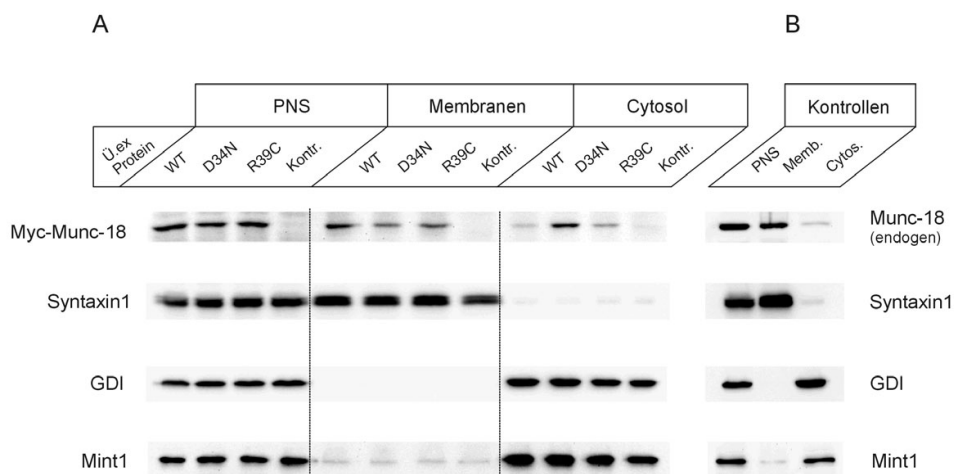
Um die Interaktionen von überexprimiertem Munc-18-1 in PC12-Zellen zu untersuchen, wurden Immunpräzipitationsexperimente aus Munc-18-WT, -D34N oder -R39C überexprimierenden PC12-Kulturen durchgeführt. Hierfür wurden die Munc-18-Proteine mit einem „myc-tag“ exprimiert, mit einem anti-myc-Antikörper immunpräzipitiert und ko-präzipitierte Proteine im Immunoblot detektiert. Über myc-Munc-18-WT-Protein konnte Syntaxin1 ko-präzipitiert werden (Abb. 8C), was zeigt, daß überexprimiertes Munc-18-WT auch in den PC12-Zellen in Syntaxin1-Komplexe eingebunden ist. Eine Bindung von Syntaxin1 an die R39C-Mutante konnte nur nach schnellerem Waschen der Antikörper-bindenden ProteinG-Sepharose und erheblich längeren Expositionszeiten der Immunoblots gezeigt werden, was auf eine abgeschwächte Bindung hinweist. Eine Interaktion zwischen der D34N-Mutante und Syntaxin1 konnte wiederum nicht detektiert werden, was die Ergebnisse der Bindungsstudien mit rekombinanten Proteinen bestätigte.

Zusammengefaßt zeigen diese Experimente, daß Munc-18-WT-Protein in jedem der gewählten Assays effizient von Syntaxin1 gebunden wurde, wohingegen die Munc-18-1-Punktmutanten eine stark abgeschwächte (R39C) oder nicht mehr detektierbare (D34N) Syntaxin1-Bindung aufwiesen.



### 3.2.2 Membran-Cytosol-Verteilung von endogenem und überexprimiertem Munc-18-1

Um die Frage zu klären, ob die Membranassoziation von Munc-18-1 über seine Interaktion mit Syntaxin1 vermittelt wird, wurde die Verteilung der Syntaxin-Bindungsmutanten Munc-18-D34N und -R39C in Membranen und Cytosol überexprimierender PC12-Zellen im Vergleich zu überexprimiertem Wildtyp-Protein untersucht. Von überexprimierenden PC12-Zell-Kulturen wurden eine Cytosol- und eine Membranfraktion hergestellt, in denen Munc-18-1 im Immunoblot über den myc-Antikörper detektiert wurde. Wie die Chemilumineszenzsignale im postnukleären Überstand (PNS) zeigten, waren alle drei Munc-18-1-Proteine ähnlich stark überexprimiert (Abb. 9A). Überexprimiertes Munc-18-WT war vorwiegend in der Membranfraktion zu finden, was der Verteilung von endogen exprimiertem Munc-18-1 entspricht (Abb. 9B). Die R39C-Mutante konzentrierte sich ebenfalls in der



**Abb. 9: Munc-18-WT, -D34N und -R39C zeigen eine unterschiedliche Membran-Cytosol-Verteilung**  
 A und B myc-Munc-18-WT, -D34N oder -R39C überexprimierende Zellen sowie Kontroll-PC12-Zellen wurden einer Zellfraktionierung unterworfen und eine Membran- und eine Cytosolfraction hergestellt. Postnukleärer Überstand (PNS), Membranfraktion und Cytosol wurden vergleichend im Immunoblot analysiert. Der PNS zeigt die vergleichbare Expressionsstärke der drei Munc-18-Proteine. Besonders auffällig ist die Akkumulation von D34N im Cytosol, wohingegen Munc-18-WT und -R39C sowie endogenes Munc-18 (in B) überwiegend in der Membranfraktion auftreten. Syntaxin1 dient als Kontrolle für die Membranfraktion, GDI als Kontrolle für die cytosolische Fraktion. Das Munc-18 bindende Protein Mint1 tritt vorwiegend in Cytosolfractionen auf.

Membranfraktion, aber in geringerem Ausmaß als das WT-Protein. Die D34N-Mutante akkumulierte dagegen deutlich im Cytosol.

Das lösliche Protein GDI (GDP-dissociation inhibitor) wurde zur Kontrolle detektiert und trat nur in der Cytosol-Fraktion auf. Dies zeigte, daß in Membranfraktionen detektiertes Munc-18-1 auch tatsächlich membranassoziiert vorlag, und nicht etwa als lösliches Protein in membranumschlossenen Strukturen verschleppt wurde. Das lösliche, Munc-18-1-bindende Protein Mint1 war nur zu einem Bruchteil in der Membranfraktion zu finden, der Großteil des Proteins wurde im Cytosol detektiert. Dies änderte sich auch nicht bei der Überexpression eines der Munc-18-1-Proteine (Abb. 9A und B). Syntaxin1 wurde als Markerprotein für die Membranfraktionen verwendet.

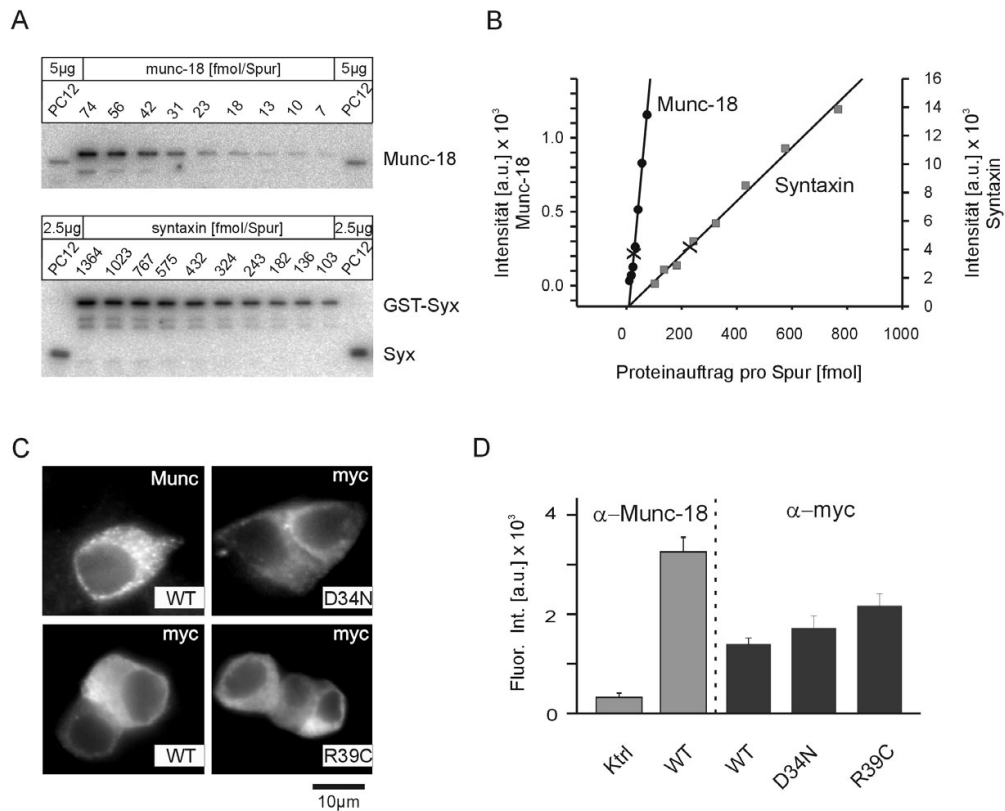
Zusammengefaßt läßt sich feststellen, daß die Fähigkeit der Munc-18-1-Mutanten, Syntaxin1 zu binden, mit dem Ausmaß ihrer Membranassoziation korreliert.

### **3.2.3 Bestimmung des Mengenverhältnisses von Syntaxin1 und Munc-18-1 in Kontrollzellen und Munc-18-überexprimierenden Zellen**

Neben der Verwendung mutierter Munc-18-1-Proteine war beabsichtigt, durch die Überexpression von Munc-18-WT-Protein die Mengenverhältnisse von Munc-18-1 und Syntaxin1 zu verändern. Um die Erfolgsaussichten dieses Ansatzes einzuschätzen, wurden die endogenen Munc-18-1- und Syntaxin1-Proteinmengen ermittelt und der durch die Überexpression erreichte Anstieg der Munc-18-1-Menge bestimmt.

Die endogen vorhandenen Munc-18-1 und Syntaxin1-Mengen wurden berechnet, indem Munc-18- und Syntaxin-Immunsignale aus PC12-Zellextrakten im Western Blot auf der Grundlage einer mit rekombinanten Proteinen erstellten Eichkurve kalibriert wurden. Diese Quantifizierung zeigte, daß in PC12-Zellen Syntaxin1 im Vergleich zu Munc-18-1 in einem ungefähr einundzwanzigfachen Überschuß vorlag (Abb. 10A und B). Die absolut ermittelten Mengen betragen für Syntaxin1 104 fmol pro µg Gesamtprotein und für Munc-18-1 5 fmol pro µg Gesamtprotein. Syntaxin1 ist somit mit ungefähr 0.3% des Gesamtproteins ein abundantes Protein in PC12-Zellen.

Die Überexpressionsspiegel in Einzelzellen wurden fluoreszenzmikroskopisch an fixierten und immungefärbten Zellen ermittelt (Abb. 10C). Dies ergab, daß das Protein im Mittel 10fach überexprimiert wurde (Abb. 10D). Hierfür wurde der



**Abb. 10: Syntaxin1 ist in PC12-Zellen im Überschuß vorhanden, auch wenn Munc-18 überexprimiert wird**

**A** Zur Quantifizierung der Mengen von endogenem Munc-18 und Syntaxin1 in PC12-Zellen wurden Immunoblots von Konzentrationsreihen der jeweiligen rekombinanten Proteine verwendet, die über <sup>125</sup>I-Protein-A detektiert wurden. 5µg Gesamtprotein aus TritonX-100-extrahierten PC12-Zellen wurden geladen, um Munc-18 zu detektieren, 2,5µg Gesamtprotein wurden für die Detektion von Syntaxin geladen. **B** Eichkurven zur Bestimmung der Proteinmengen in PC12-Zellen, abgeleitet aus den Blots in A. Zur Erstellung der Eichkurven wurden die Intensitätswerte für Munc-18 von 13-74 fmol/Spur und für Syntaxin1 von 103-767 fmol/Spur aufgetragen. Die Kreuze markieren die Position der ausgelesenen Intensitätswerte für Munc-18 und Syntaxin in den PC12-Zellextrakten. Die Proteinmengen in PC12-Zellen wurden über eine lineare Regression berechnet. Hierbei ergibt sich ein molarer Überschuß von Syntaxin1 gegenüber Munc-18 von ungefähr einundzwanzigfach. **C** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Munc-18 in überexprimierenden Zellen. WT-Protein wurde sowohl über einen anti-Munc-18-Antikörper detektiert (Munc) als auch über einen anti-myc-Antikörper (myc). **D** Die Quantifizierung der Überexpression auf Einzelzellniveau mit Hilfe der Immunfluoreszenz ergibt eine im Mittel zehnfache Erhöhung der Munc-18-Menge durch die Transfektion mit pBOB-Munc-18. Ausgewertet wurden hierbei Kontrollkulturen und Munc-18 überexprimierende Kulturen, die mit jeweils mit anti-Munc-18 immungefärbt wurden (graue Balken). Außerdem wurde die Überexpressionsstärke von Munc-18-Wildtyp sowie den Munc-18-Mutanten D34N und R39C (s.u.) mit Hilfe einer Immunfärbung über den anti-myc-Antikörper bestimmt (schwarze Balken). Alle drei Munc-18-Proteine sind ähnlich stark überexprimiert.

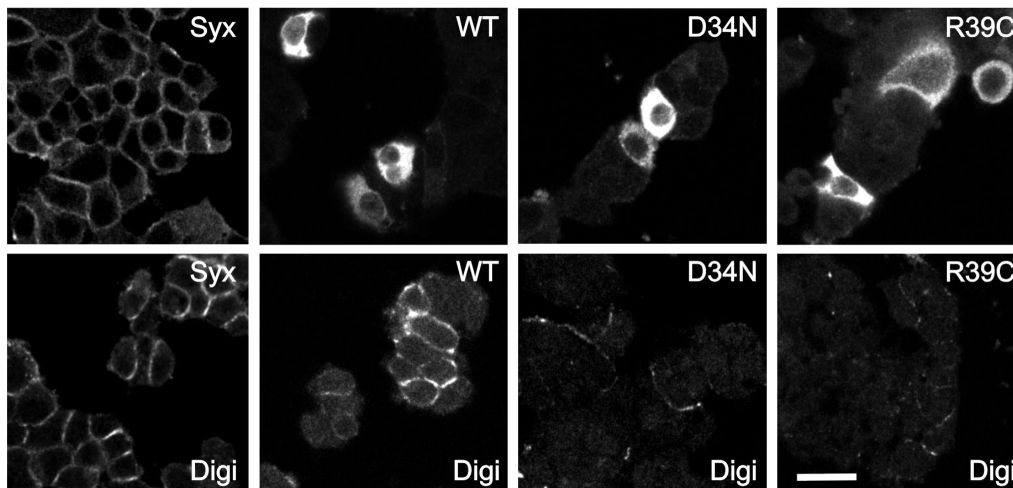
anti-Munc-18-1 Antikörper verwendet, der auch das endogen vorhandene Protein anfärbte. Die Fluoreszenzsignale in überexprimierenden Zellen waren ohne weiteres von nicht-überexprimierenden Zellen in der gleichen Kultur zu unterscheiden, darüber hinaus wurden parallel gefärbte untransfizierte Kontrollkulturen analysiert, die als Referenz quantifiziert wurden. Die

fluoreszenzmikroskopische Quantifizierung der mutierten Munc-18-Proteine im Vergleich zu WT-Protein über den anti-myc-Antikörper ergab, daß Munc-18-D34N und -R39C ähnlich stark überexprimiert wurden wie Munc-18-WT (Abb. 10D). Für unser Überexpressionssystem bedeutete dies, daß auch unter der Überexpression von Munc-18-1 Syntaxin1 weiterhin im Überschuß in den Zellen vorlag.

### **3.2.4 Die Behandlung mit Digitonin macht den membranassoziierten Anteil von Munc-18-1 in PC12-Zellen sichtbar**

Die Immunfluoreszenzanalyse der überexprimierenden PC12-Zellen zeigte auch einen deutlichen cytosolischen Anteil von Munc-18 (Abb. 10C und Abb. 11), der sehr wahrscheinlich verhinderte, daß membranassoziiertes Munc-18 dargestellt werden konnte. Um zu demonstrieren, daß überexprimiertes Munc-18 tatsächlich auch in den Zellen in einer membranassoziierten Form vorlag, wurden lebende, EGFP und Munc-18 ko-transfizierte Zellen mit Digitonin permeabilisiert und lösliche Bestandteile des Zellinnern herausgewaschen. Nach Fixierung und Immunfärbung der Zellen erfolgte die Dokumentation an einem inversen konfokalen Mikroskop. Es zeigte sich durch eine Anfärbung der Zellen mit dem Syntaxin1-Antikörper HPC1, daß auch nach der Digitonin-Behandlung ringförmige, anfärbbare Membranen erhalten bleiben (Abb. 11). EGFP-Signale waren nach der Digitonin-Behandlung nicht zu detektieren, da EGFP als kleines, cytosolisches Protein sehr schnell ausgewaschen wird (nicht gezeigt). Überexprimiertes Munc-18-WT-Protein hingegen konnte nach der Digitonin-Behandlung als ringförmiges Signal dargestellt werden, das dem Syntaxin-Signal sehr stark ähnelte. Bei beiden Munc-18-Mutanten führte die Digitonin-Behandlung hingegen zu einer vollständigen Auswaschung des Signals.

Zusammengefaßt wird bei überexprimiertem Munc-18-WT nach Digitonin-Behandlung eine Verteilung sichtbar, die der Verteilung von Syntaxin1 sehr stark ähnelt und vermutlich membranassoziiertes Munc-18 zeigt. Darüber hinaus konnte auch mit diesem Ansatz gezeigt werden, daß sich die Membranbindungseigenschaften der beiden Munc-18-Mutanten mit gestörter Syntaxin1-Bindung deutlich von den Membranbindungseigenschaften des Wildtypproteins unterscheiden.

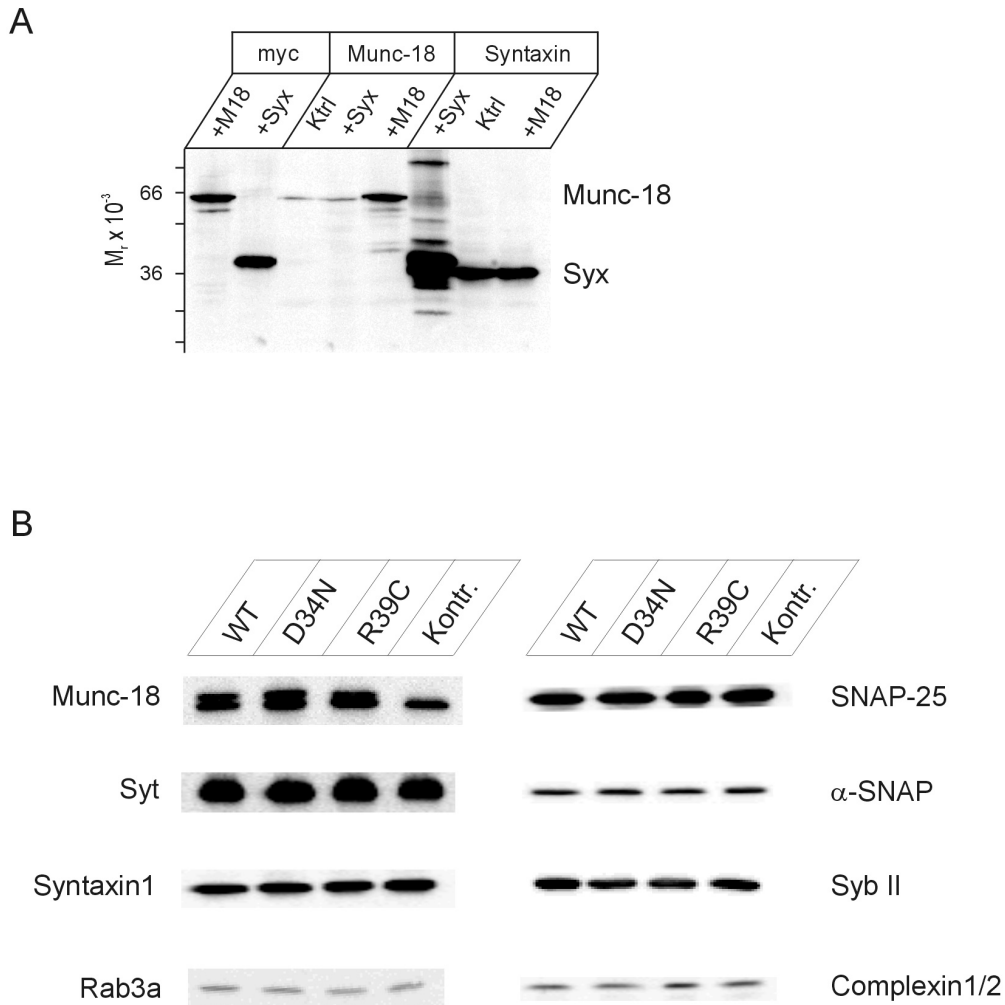


**Abb. 11: Die Digitonin-Permeabilisierung macht den membranassoziierten Anteil von Munc-18 in den PC12-Zellen sichtbar**

**Obere Reihe:** Konfokale Darstellung von endogenem Syntaxin1 (HPC1-Färbung) und überexprimiertem Munc-18-WT, -D34N und R39C (anti-myc-Färbung) in fixierten PC12-Zellen. **Untere Reihe:** Lebende Zellen wurden mit Digitonin permeabilisiert und anschließend fixiert und immungefärbt. Die Markierung von Syntaxin1 (Syx) zeigt, daß auch nach der Digitonin-Behandlung mit Syntaxin1-anfärbbare Plasmamembranbereiche erhalten bleiben. Überexprimiertes Munc-18-WT-Protein wird als ringförmige Struktur anfärbbar, die stark der Syntaxin1-Färbung ähnelt. Beide Mutanten (D34N und R39C) werden fast vollständig ausgewaschen. Größenmarker = 15µm.

### 3.2.5 Die Proteinspiegel anderer synaptischer Proteine bleiben durch die Munc-18-Überexpression unverändert

Die Immunoblotanalyse des überexprimierten myc-Munc-18-WT ergab, daß überexprimiertes Protein in den Zellen intakt vorlag (Abb. 12A). Ergänzend wurde auch myc-Syntaxin1a überexprimiert und seine Integrität in gleicher Weise nachgewiesen. Ferner zeigte sich, daß weder die Überexpression von Munc-18-1 die endogenen Syntaxin-Spiegel veränderte, noch der umgekehrte Fall auftrat. Zum Vergleich wurden Kontrollzell-Extrakte parallel analysiert. Die Expression anderer synaptischer Proteine wurde von der Munc-18-1-Überexpression ebenfalls nicht beeinflusst (siehe Abb. 12B).



**Abb. 12: Die Überexpression von Munc-18 verändert nicht die Expression anderer Proteine**

**A** Die Überexpression von myc-Munc-18 (+M18) sowie myc-Syntaxin1a (+Syx) in PC12-Zellen verändert im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen (Ktrl) nicht die Expression des jeweils anderen Proteins (Western Blot). Zur Detektion wurden anti-myc, anti-Munc-18 und anti-Syntaxin-Antikörper (HPC-1) eingesetzt. Der „myc-tag“ verursacht bei überexprimierten Proteinen eine deutliche Verschiebung der Bande in der SDS-PAGE um ca. 5 kDa. **B** Auch die Expression weiterer synaptischer Proteine wird durch eine Munc-18-Überexpression nicht verändert. Tritonextrakte überexprimierender PC12-Kulturen wurden vergleichend zu Kontrollkulturen (Kontr.; nur EGFP-Überexpression) im Western Blot für die angegebenen synaptischen Proteine untersucht. 30 $\mu$ g Gesamtprotein wurden pro Gelspur geladen. Munc-18 wurde hier mit einem anti-Munc-18-Antikörper detektiert, wodurch im Blot endogenes und überexprimiertes Munc-18 (mit myc-tag) als Doppelbande darstellbar werden. Syt = Synaptotagmin; SybII = SynaptobrevinII.

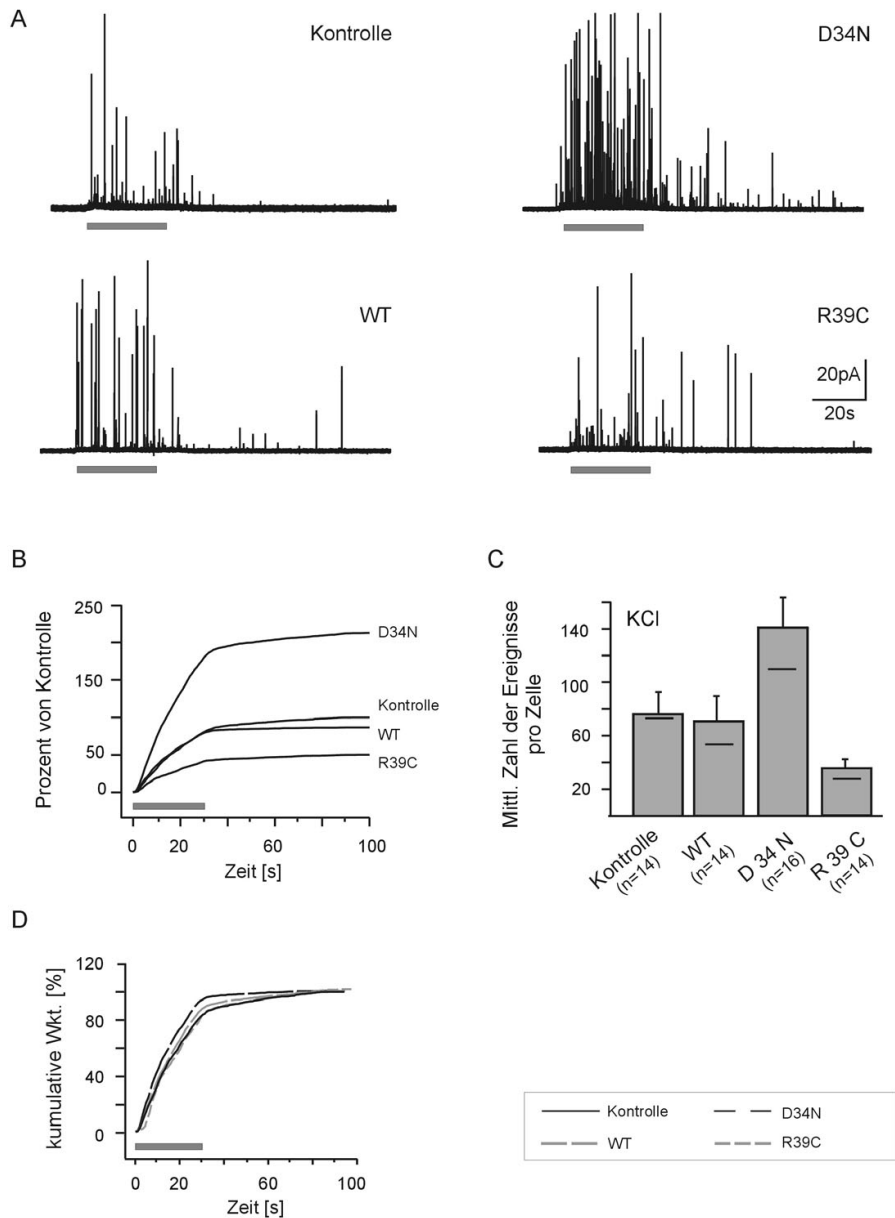
### **3.3 Die elektrophysiologische Charakterisierung von Munc-18-WT, -D34N und -R39C**

#### **3.3.1 Munc-18-D34N und -R39C haben gegensätzliche Effekte auf die LDCV-Exozytose**

Im nächsten Schritt wurden die Auswirkungen der Überexpression sowohl von Munc-18-WT als auch der beiden Syntaxin-Bindungsmutanten elektrophysiologisch mit Hilfe der Amperometrie charakterisiert. In Kontrollzellen rief eine Stimulation mit Hochkaliumringer (50mM KCl) über dreißig Sekunden eine stimulusabhängige, transiente exozytotische Antwort hervor (Abb. 13A), in deren Verlauf die Zellen im Mittel  $72 \pm 12$  exozytotische Ereignisse aufwies (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler; vgl. Abb. 13C). Die Überexpression von Munc-18-WT verursachte keine Veränderung der Häufigkeit exozytotischer Ereignisse in PC12-Zellen ( $65 \pm 13$  Ereignisse). Dies zeigte, daß auch bei einem veränderten Mengenverhältnis von Munc-18-1 und Syntaxin1 keine Änderung des Exozytoseverhaltens der Zellen auftrat. Die Überexpression der Munc-18-R39C Mutante jedoch, deren Bindung an Syntaxin1 abgeschwächt ist, hatte eine Abnahme der Zahl exozytotischer Ereignisse um 50% zur Folge (Abb. 13B, C). Beide Befunde wurden durch die Stimulation mit dem Calciumionophor Ionomycin bestätigt (Abb. 14A, B). Die unter Ionomycin ebenfalls auftretenden Effekte der R39C-Mutante lassen Sekundäreffekte der Mutante durch eine veränderte Syntaxin-abhängige Regulation von Calciumkanälen unwahrscheinlich erscheinen (Atlas, 2001) und deuten auf eine direkte Perturbation der Membranfusionsmaschinerie durch eine veränderte Syntaxin1-Bindung hin.

Im Gegensatz hierzu bewirkte die Überexpression der D34N-Mutante, die über keine nennenswerte Syntaxin-Bindungs-fähigkeit mehr verfügt, eine starke Zunahme der Zahl exozytotischer Ereignisse in PC12-Zellen auf  $138 \pm 21$  pro Stimulation (Abb. 13A, B, C). Dieser Effekt bestätigte sich wiederum unter Ionomycin-Stimulation (Abb. 14A, B). Die zeitliche Kopplung der Ereignisse an den Stimulus war in keinem Fall verändert (Abb. 13D und 14C).

Es läßt sich festhalten, daß trotz einer gleichsinnig veränderten Syntaxin1-Bindungs-fähigkeit der Munc-18-1-Mutanten gegensätzliche Effekte der Mutanten

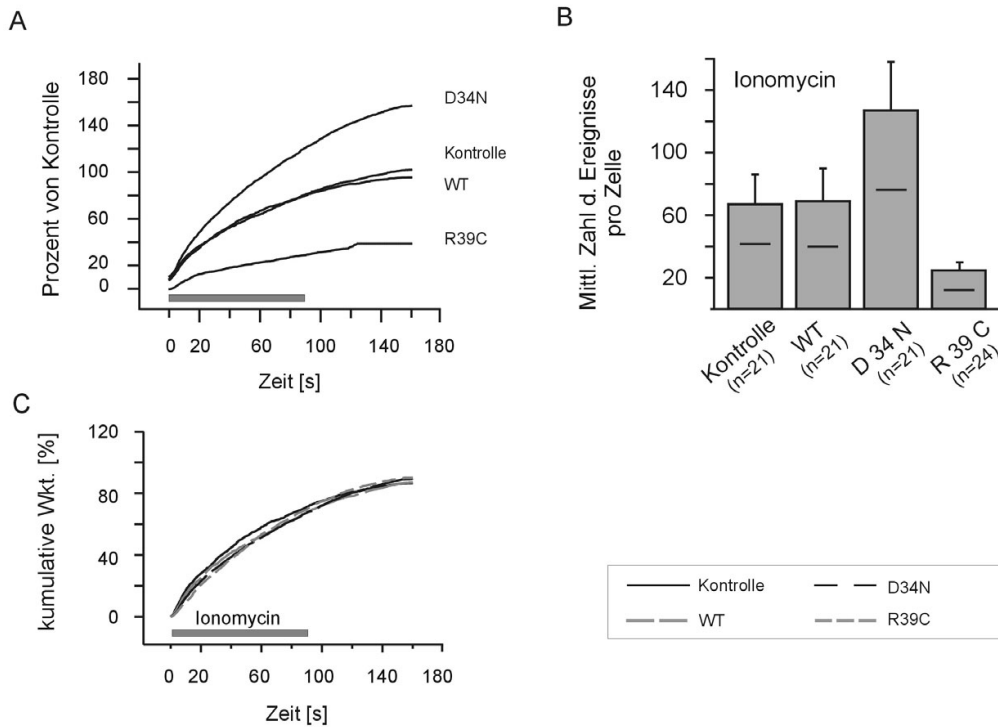


**Abb. 13: Die Syntaxin1-Bindungsmutanten von Munc-18 beeinflussen die LDCV-Exozytose in unterschiedlicher Weise**

**A** Repräsentative amperometrische Messungen von einer Kontrollzelle sowie einer Munc-18-WT, -D34N oder -R39C überexprimierenden Zelle. Hellgraue Balken geben die Dauer der Stimulation mit Hochkaliumringer (50mM KCl) an. Alle Gruppen zeigen transiente, stimulationsabhängige Antworten, lediglich die Häufigkeit der amperometrischen Ereignisse ist verschieden. **B** Kumulative Auftragung der Zahl der Ereignisse pro Stimulation über die Zeit, normiert auf die Kontrollgruppe. Bei D34N-überexprimierenden Zellen ist ein Zuwachs auf 200% im Vergleich zu Kontrolle zu beobachten. Im Gegensatz hierzu ist die Zahl der Ereignisse in R39C überexprimierenden Zellen auf die Hälfte gesunken. Die Munc-18-WT-Überexpression verändert die Häufigkeit der Ereignisse nicht. Die Dauer der Stimulation mit Hochkaliumringer wird durch den grauen Balken dargestellt. **C** Mittlere Zahl der Ereignisse pro Zelle ( $\pm$  S.E.M.). Medianwerte für jede Gruppe sind als dünne Linie innerhalb der Balken angedeutet. **D** Kumulative Wahrscheinlichkeitsauftragung über die Zeit normiert auf die Gesamtzahl der Ereignisse einer Gruppe. Diese Art der Darstellung zeigt den Anteil der Ereignisse eines bestimmten Zeitabschnitts an der Gesamtzahl der Ereignisse und kann Unterschiede in der zeitlichen Kopplung der Ereignisse an den Stimulus darstellen. Die Dauer der Stimulation mit Hochkaliumringer wird durch den grauen Balken dargestellt. Es treten keine signifikanten Unterschiede auf.



auf die LDCV-Exozytose beobachtet wurden. Dies weist darauf hin, daß Munc-18-1 nicht ausschließlich über Syntaxin1 auf das Exozytoseverhalten der PC12-Zellen einwirkt, sondern wahrscheinlich über weitere Protein-Interaktionen wesentlich zur Regulation der LDCV-Exozytose beiträgt.

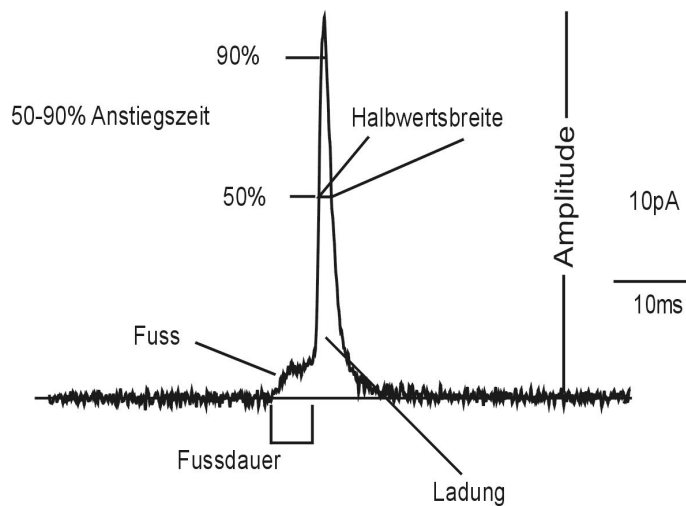


**Abb. 14: Bestätigung der Effekte von Munc-18-D34N und -R39C durch die Stimulation mit dem Calciumionophor Ionomycin**

**A** Kumulative Auftragung der Zahl der Ereignisse pro Stimulation über die Zeit normiert auf die Kontrollgruppe. D34N bewirkt einen starken Anstieg der Zahl der Ereignisse, wohingegen R39C zu einer Abnahme der Zahl führt. Die Dauer der Stimulation mit 5µM Ionomycin wird durch den grauen Balken dargestellt. **B** Mittlere Zahl der Ereignisse pro Zelle (± S.E.M.). Medianwerte für jede Gruppe sind als dünne Linie innerhalb der Balken angedeutet. **C** Kumulative Wahrscheinlichkeitsauftragung über die Zeit normiert auf die Gesamtzahl der Ereignisse einer Gruppe. Auch unter der Stimulation mit Ionomycin ist kein Unterschied zwischen den Gruppen in der zeitlichen Kopplung der Ereignisse an den Stimulus erkennbar. Die Dauer der Stimulation mit 5µM Ionomycin wird durch den grauen Balken angegeben.

### 3.3.2 Die Kinetik der Transmitterfreisetzung wird durch Munc-18-WT, -D34N und -R39C nicht verändert

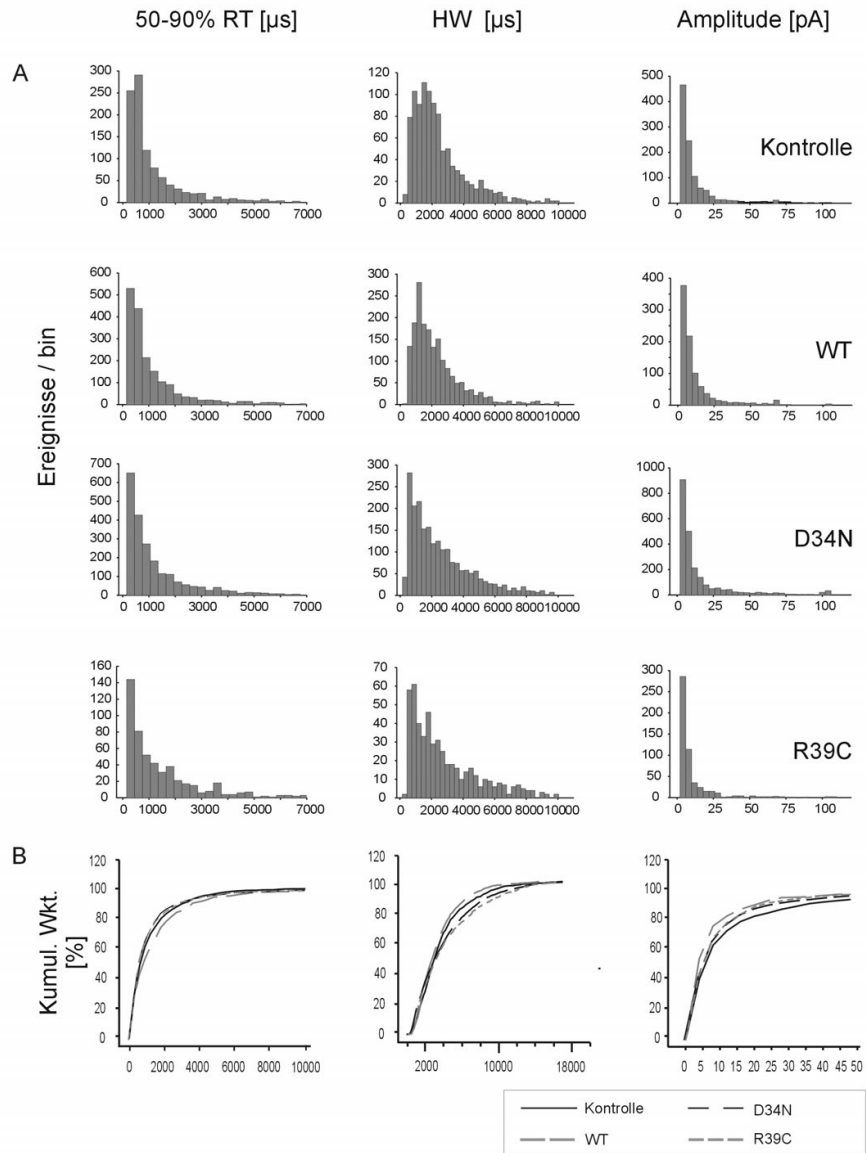
Neuere Befunde von Fisher et al. (2001) lassen vermuten, daß durch eine Störung der Syntaxin1-Bindung von Munc-18-1 die Kinetik der Neurotransmitterfreisetzung variiert werden kann. In der vorliegenden Arbeit konnten zwei unterschiedliche Syntaxin-Bindungsmutanten vergleichend analysiert werden. Hierbei wurden von jedem Einzelereignis Amplitude, Ladung, 50-90%-Anstiegszeit und Halbwertsbreite erfaßt. Darüber hinaus wurden Fußsignale, die dem „Hauptspike“ vorangehen, hinsichtlich ihrer Amplitude, Ladung und Dauer charakterisiert (Abb. 15).



**Abb. 15: Ausgelesene Parameter am Einzelereignis**

Dargestellt ist ein einzelnes amperometrisches Ereignis. Die in der Analyseprozedur ausgelesenen Parameter sind eingezeichnet. Da hier der Stromfluß über die Zeit dargestellt wird, entspricht die Ladung des Ereignisses der Fläche unter der Kurve.

Die Häufigkeitsverteilungen der analysierten Parameter stellen keine Normalverteilungen dar sondern sind stark verzerrt (Abb. 16). Aus diesem Grund wurden die Medianwerte der Verteilungen zur statistischen Analyse herangezogen, da diese im Gegensatz zu Mittelwerten robuster gegenüber stark abweichenden Meßwerten sind. Die jeweiligen Medianwerte einzelner Zellen aus einer Gruppe wurden mit den Medianwerten von Kontrollzellen verglichen und mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests auf statistisch signifikante Unterschiede getestet.



**Abb. 16: Eigenschaften des Einzelereignisses werden durch Munc-18-WT, -D34N und -R39C nicht verändert**

**A** Histogramm-Darstellung der Häufigkeitsverteilungen von 50-90% Anstiegszeit (50-90% RT), Halbwertsbreite (HW) und Amplitude von Kontrollen sowie Munc-18-WT, -D34N und -R39C überexprimierenden PC12-Zellen. Die Histogramme sind typischerweise stark verzerrt, was den Mittelwert der Verteilungen als Lagemaß unbrauchbar macht. Man beachte die unterschiedliche Skalierung der y-Achsen. **B** Kumulative Darstellung von 50-90% RT, HW und Amplitude normiert auf 100%. Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt.

Die Charakterisierung der Eigenschaften der einzelnen Phasen des amperometrischen Hauptspikes in Munc-18-WT, -D34N und -R39C überexprimierenden Zellen ergab weder signifikante Veränderungen in Amplitude und Ladung des Einzelereignisses, noch waren kinetische Eigenschaften wie die

## Ergebnisse

50-90% Anstiegszeit oder die Halbwertsbreite verändert (vgl. Tab. 2). Die Analyse der mit Ionomycin stimulierten Zellen führte zum gleichen Ergebnis (Tab. 3). Dies zeigt, daß Munc-18-1 keinen Einfluß auf die Kinetik der Neurotransmitterfreisetzung hat.

Tab.2: Eigenschaften des Einzelereignisses in KCl-stimulierten Zellen (Mittelwerte über die Mediane $\pm$ Std.Abw.)				
	Kontrolle n=14	WT n=14	D34N n=16	R39C n=14
Ladung [fC]	26.6 $\pm$ 8.6	26.3 $\pm$ 13.3	28.2 $\pm$ 9.4	23.2 $\pm$ 8.6
Amplitude [pA]	4.6 $\pm$ 1.4	4.2 $\pm$ 1.6	5.2 $\pm$ 2.1	4.4 $\pm$ 3.0
50-90% RT [ $\mu$ s]	607 $\pm$ 296	870 $\pm$ 650	730 $\pm$ 456	912 $\pm$ 627
HW [ $\mu$ s]	3078 $\pm$ 1368	3814 $\pm$ 2373	3698 $\pm$ 1843	3824 $\pm$ 2239
Fussampl. [pA]	3.4 $\pm$ 1.4	4.8 $\pm$ 1.5	4.8 $\pm$ 1.7	4.0 $\pm$ 2.0
Fussladung [fC]	5.0 $\pm$ 2.6	8.1 $\pm$ 4.7	7.8 $\pm$ 3.1	4.5 $\pm$ 2.5
Fussdauer [ $\mu$ s]	2421 $\pm$ 830	3207 $\pm$ 1984	2783 $\pm$ 965	2052 $\pm$ 700
Anteil Füße [%] <small>Medianwert</small>	27	21	22	18
rel. Fussladung [%]	13.4 $\pm$ 5.5	13.3 $\pm$ 3.7	14.7 $\pm$ 6.4	13.2 $\pm$ 4.4
Ereignisse/Zelle <small>Mittelw. <math>\pm</math> Std.Abw.</small>	72 $\pm$ 12	65 $\pm$ 13	138 $\pm$ 21	36 $\pm$ 5

Tab. 3: Eigenschaften des Einzelereignisses in Ionomycin-stimulierten Zellen (Mittelwerte über die Mediane $\pm$ Std.Abw.)				
	Kontrolle n=19	WT n=20	D34N n=19	R39C n=24
Ladung [fC]	27.1 $\pm$ 13.7	26.8 $\pm$ 10.7	21.2 $\pm$ 10.2	24.9 $\pm$ 17.4
Amplitude [pA]	4.2 $\pm$ 1.9	4.8 $\pm$ 3.1	4.1 $\pm$ 2.6	3.5 $\pm$ 1.3
50-90% RT [ $\mu$ s]	1081 $\pm$ 269	850 $\pm$ 552	670 $\pm$ 503	853 $\pm$ 456
HW [ $\mu$ s]	3694 $\pm$ 2030	3831 $\pm$ 2097	3102 $\pm$ 1298	3830 $\pm$ 1938
Fussampl. [pA]	4.2 $\pm$ 1.5	3.9 $\pm$ 1.6	4.4 $\pm$ 1.7	4.3 $\pm$ 1.4
Fussladung [fC]	8.1 $\pm$ 4.9	7.8 $\pm$ 5.2	6.9 $\pm$ 3.6	9.2 $\pm$ 4.4
Fussdauer [ $\mu$ s]	2945 $\pm$ 1033	2983 $\pm$ 1435	2847 $\pm$ 993	3540 $\pm$ 989
Ereignisse/Zelle <small>(Mittelw. <math>\pm</math> S.E.M.)</small>	66 $\pm$ 19	69 $\pm$ 21	127 $\pm$ 31	24 $\pm$ 6

Diffusionsverschleifene Einzelereignisse im Datensatz verschleiern unter Umständen den Effekt einer Perturbation. Um den Anteil solcher verschliffener Ereignisse zu reduzieren und nur Ereignisse mit sehr guter kinetischer Auflösung zu betrachten, wurden Analysen mit schärferen Selektionskriterien durchgeführt. Die gemessene Amplitude des Ereignisses nimmt mit dem Quadrat des Abstandes des Freisetzungsorts zur Detektoroberfläche ab. Ein Amplitudenkriterium stellt somit einen wirksamen "Filter" für entfernt auftretende und daher verschliffene Ereignisse dar. Die Einführung einer Amplitudenschwelle von 8pA, was ungefähr 30% der Einzelereignisse umfaßte, ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollzellen, Munc-18-WT und Munc-18-D34N oder -R39C überexprimierenden Zellen (Tab. 4). Ebenso zeigte die Analyse von Ereignissen mit Halbwertsbreiten von weniger als 500 $\mu$ s, was ungefähr 40% der Einzelereignisse umfaßte, keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (siehe Tab. 5). Die Analyse der mit Ionomycin stimulierten Zellen wurde analog durchgeführt und ergab ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (siehe Tab. 6 und 7).

### **3.3.3 Fußereignisse zeigen keine signifikanten Veränderungen**

Das dem Hauptspike vorangehende Fußsignal spiegelt die Frühphase der Ausbildung der Fusionspore wider und sollte daher empfindlich auf Faktoren reagieren, die die Entstehung der Fusionspore beeinflussen. In Kontrollzellen wurden 27% der Ereignisse (Medianwert; n = 272 Fußereignisse) von einem Fußereignis begleitet. In Munc-18-WT, -D34N und -R39C überexprimierenden Zellen wurden zwischen 18% und 22% der Ereignisse von einem Fuß begleitet, was in einer ähnlichen Größenordnung wie in Kontrollzellen liegt (vgl. Tabelle 2). Die beobachteten Erhöhung von Fußladung und Fußamplitude von WT- und D34N-überexprimierenden Zellen war aufgrund der großen Streuung zwischen den Zellen nicht statistisch signifikant. Ionomycin-stimulierte Zellen hatten generell weniger Fußsignale und zeigten keine Veränderung im Fußsignal durch die Überexpression von Munc-18-WT/-D34N/-R39C. Die Überexpression Munc-18-1 oder einer Syntaxin-Bindungsmutante von Munc-18-1 verändert also auch nicht die Frühphase der Fusionsporendilatation.

## Ergebnisse

Zusammengefaßt weisen diese Daten darauf hin, daß eine Funktion von Munc-18-1 eher darin liegt, die Zahl der exozytosebereiten Vesikel zu steuern, als in das eigentliche Membranfusionsereignis einzugreifen.

Tab. 4: Eigenschaften des Einzelereignisses in KCl-stimulierten Zellen, Ereignisse >8pA (Mittelwerte über die Mediane $\pm$ Std.Abw.)				
	Kontrolle n=14 350 Ereig.	WT n=14 326 Ereig.	D34N n=16 852 Ereig.	R39C n=14 134 Ereig.
Ladung [fC]	50.6 $\pm$ 16.4	48.4 $\pm$ 24.7	60.1 $\pm$ 19.9	53.0 $\pm$ 18.1
Amplitude [pA]	16.4 $\pm$ 4.4	16.1 $\pm$ 4.7	18.2 $\pm$ 7.1	16.4 $\pm$ 4.5
50-90% RT [ $\mu$ s]	350 $\pm$ 122	288 $\pm$ 82	381 $\pm$ 197	329 $\pm$ 119
HW [ $\mu$ s]	1900 $\pm$ 925	1556 $\pm$ 536	1963 $\pm$ 972	1450 $\pm$ 553
Fussampl. [pA]	4.6 $\pm$ 2.0	6.1 $\pm$ 1.2	6.4 $\pm$ 1.4	4.7 $\pm$ 2.1
Fussladung [fC]	5.8 $\pm$ 3.4	7.6 $\pm$ 4.4	8.9 $\pm$ 3.3	5.2 $\pm$ 2.6
Fussdauer [ $\mu$ s]	2450 $\pm$ 754	2425 $\pm$ 1022	2433 $\pm$ 620	2000 $\pm$ 614

Tab. 5: Eigenschaften des Einzelereignisses in KCl-stimulierten Zellen, Ereignisse <500 $\mu$ s (Mittelwerte über die Ereignisse $\pm$ Std.Abw.)				
	Kontrolle n=14 463 Ereig.	WT n=14 402 Ereig.	D34N n=16 948 Ereig.	R39C n=14 201 Ereig.
Ladung [fC]	40.8 $\pm$ 38.1	41.1 $\pm$ 43.1	46.1 $\pm$ 42.7	33.1 $\pm$ 35.1
Amplitude [pA]	17.1 $\pm$ 19.1	18.7 $\pm$ 21.1	25.1 $\pm$ 27.3	17.0 $\pm$ 21.8
50-90% RT [ $\mu$ s]	288 $\pm$ 116	262 $\pm$ 106	257 $\pm$ 107	253 $\pm$ 105
HW [ $\mu$ s]	1988 $\pm$ 1168	1857 $\pm$ 937	1668 $\pm$ 1132	1679 $\pm$ 1067
Fussampl. [pA]	5.5 $\pm$ 4.9	7.8 $\pm$ 5.8	7.3 $\pm$ 6.4	5.2 $\pm$ 4.3
Fussladung [fC]	7.8 $\pm$ 8.6	10.0 $\pm$ 10.0	10.0 $\pm$ 9.9	7.7 $\pm$ 8.3
Fussdauer [ $\mu$ s]	3197 $\pm$ 4222	2952 $\pm$ 2895	3519 $\pm$ 3447	3000 $\pm$ 2456

## Ergebnisse

Tab.6: Eigenschaften des Einzelereignisses in Ionomycin-stimulierten Zellen, Ereignisse > 8pA (Mittelwerte über die Ereignisse $\pm$ Std.Abw.)				
	Kontrolle n=19 338 Ereig.	WT n=20 275 Ereig.	D34N n=19 739Ereig.	R39C n=24 373 Ereig.
Ladung [fC]	62.7 $\pm$ 42.8	63.3 $\pm$ 42.1	65.4 $\pm$ 52.6	80.1 $\pm$ 55.0
Amplitude [pA]	23.5 $\pm$ 18.8	26.2 $\pm$ 20.8	26.0 $\pm$ 20.3	23.2 $\pm$ 19.2
50-90% RT [ $\mu$ s]	667 $\pm$ 1253	666 $\pm$ 2633	549 $\pm$ 954	741 $\pm$ 1354
HW [ $\mu$ s]	2287 $\pm$ 2003	2038 $\pm$ 1795	1991 $\pm$ 1524	2922 $\pm$ 2402
Fußampl. [pA]	6.5 $\pm$ 5.0	7.1 $\pm$ 4.6	6.7 $\pm$ 4.3	6.4 $\pm$ 4.4
Fußladung [fC]	15.8 $\pm$ 17.9	13.5 $\pm$ 13.1	14.2 $\pm$ 19.4	16.6 $\pm$ 15.5
Fußdauer [ $\mu$ s]	4596 $\pm$ 3885	4078 $\pm$ 4217	3964 $\pm$ 4159	4813 $\pm$ 3499

Tab.7: Eigenschaften des Einzelereignisses in Ionomycin-stimulierten Zellen, Ereignisse <500 $\mu$ s (Mittelwerte über die Ereignisse $\pm$ Std.Abw.)				
	Kontrolle n=19 452 Ereig.	WT n=20 558 Ereig.	D34N n=19 1004 Ereig.	R39C n=24 192 Ereig.
Ladung [fC]	34.4 $\pm$ 33.6	37.2 $\pm$ 35.1	38.9 $\pm$ 37.3	39.6 $\pm$ 43.0
Amplitude [pA]	16.2 $\pm$ 18.9	18.0 $\pm$ 20.9	18.1 $\pm$ 20.6	12.7 $\pm$ 14.4
50-90% RT [ $\mu$ s]	251 $\pm$ 104	252 $\pm$ 107	249 $\pm$ 108	270 $\pm$ 111
HW [ $\mu$ s]	1736 $\pm$ 1153	1746 $\pm$ 1155	1757 $\pm$ 1170	2345 $\pm$ 1478
Fussampl. [pA]	5.5 $\pm$ 4.1	6.5 $\pm$ 4.6	6.1 $\pm$ 4.3	4.7 $\pm$ 2.6
Fussladung [fC]	9.9 $\pm$ 9.0	10.9 $\pm$ 9.7	10.2 $\pm$ 9.3	10.4 $\pm$ 11.3
Fussdauer [ $\mu$ s]	4225 $\pm$ 4075	3755 $\pm$ 3389	3437 $\pm$ 2882	4099 $\pm$ 3504

### **3.4 Analyse weiterer Munc-18-1-Bindungspartner**

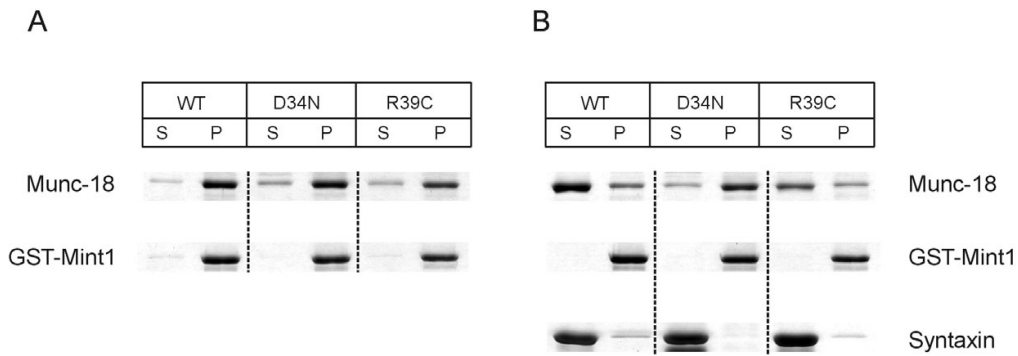
Da die oben aufgeführten Daten darauf hinwiesen, daß die Funktion von Munc-18-1 in der Exozytose nicht auf seine Interaktion mit Syntaxin1 beschränkt ist, wurde überprüft, inwieweit die eingeführten Punktmutationen auch die Interaktion mit anderen Munc-18-1-Bindungspartnern betrafen. Um dies zu erreichen, wurde die Interaktion von Munc-18 und seinen Mutanten mit dem Multidomänen-Protein Mint1 und dem C2-Domänen-Protein Doc2 $\alpha$  in verschiedenen Bindungsassays untersucht.

#### **3.4.1 Die Mint1-Bindung an Munc-18-1 ist in Anwesenheit von Syntaxin1 in den Munc-18-1-Mutanten verschieden**

Zunächst wurde die Fähigkeit von rekombinantem GST-Mint1 untersucht, rekombinantes Munc-18-WT, -D34N oder -R39C zu binden. Im GST-Bindungsassay wurden über GST-Mint1 ähnliche Mengen an Munc-18-WT und den beiden mutierten Munc-18-Proteinen präzipitiert (Abb. 17A). Mint1, Syntaxin1 und Munc-18-1 bilden einen Dreierkomplex (Okamoto und Südhof, 1997). Die Entstehung dieses Dreierkomplexes konnte mit den rekombinanten Proteinen nachvollzogen werden: sowohl im Fall von Munc-18-WT als auch bei der R39C-Mutante trat neben Munc-18-1 auch Syntaxin1 im GST-Mint1-Pellet auf (Abb. 17B). Der Großteil des Munc-18-1-Proteins blieb jedoch zusammen mit Syntaxin1 im Überstand und band nicht an GST-Mint1. Lediglich Munc-18-D34N band in Anwesenheit von Syntaxin1 unverändert an Mint1.

Syntaxin1 konkurriert somit mit Mint1 um die Munc-18-1-Bindung. Die Entstehung des hochaffinen Munc-18/Syntaxin1-Komplexes dominiert hierbei die möglichen Proteininteraktionen. Der Dreierkomplex stellt vermutlich eine Übergangsform zwischen Munc-18-1/Syntaxin1-Komplex und Munc-18-1/Mint1-Komplex dar.





**Abb. 17: Die Bindung von Munc-18-WT, -D34N und -R39C an Mint1 konkurriert mit der Syntaxin1-Bindung**

**A** Bindungsassay mit rekombinantem Munc-18 und GST-Mint1. GST-Mint1 (3 $\mu$ M) wurde an GSH-beads vorgebunden, mit Munc-18 (5 $\mu$ M) über Nacht inkubiert und gebundenes Protein präzipitiert (SDS-PAGE und nachfolgende Coomassie-Färbung). Alle drei Munc-18-Proteine binden in gleichem Ausmaß an GST-Mint1. **B** Bindungsassay wie in A, jedoch in Anwesenheit von Syntaxin1a (10 $\mu$ M). Kleine Mengen von Munc-18-WT und -R39C werden zusammen mit Syntaxin1a von GST-Mint1 präzipitiert, wobei jedoch der Großteil der Proteine im Überstand bleibt. D34N bindet auch in Anwesenheit von Syntaxin1 an Mint1.

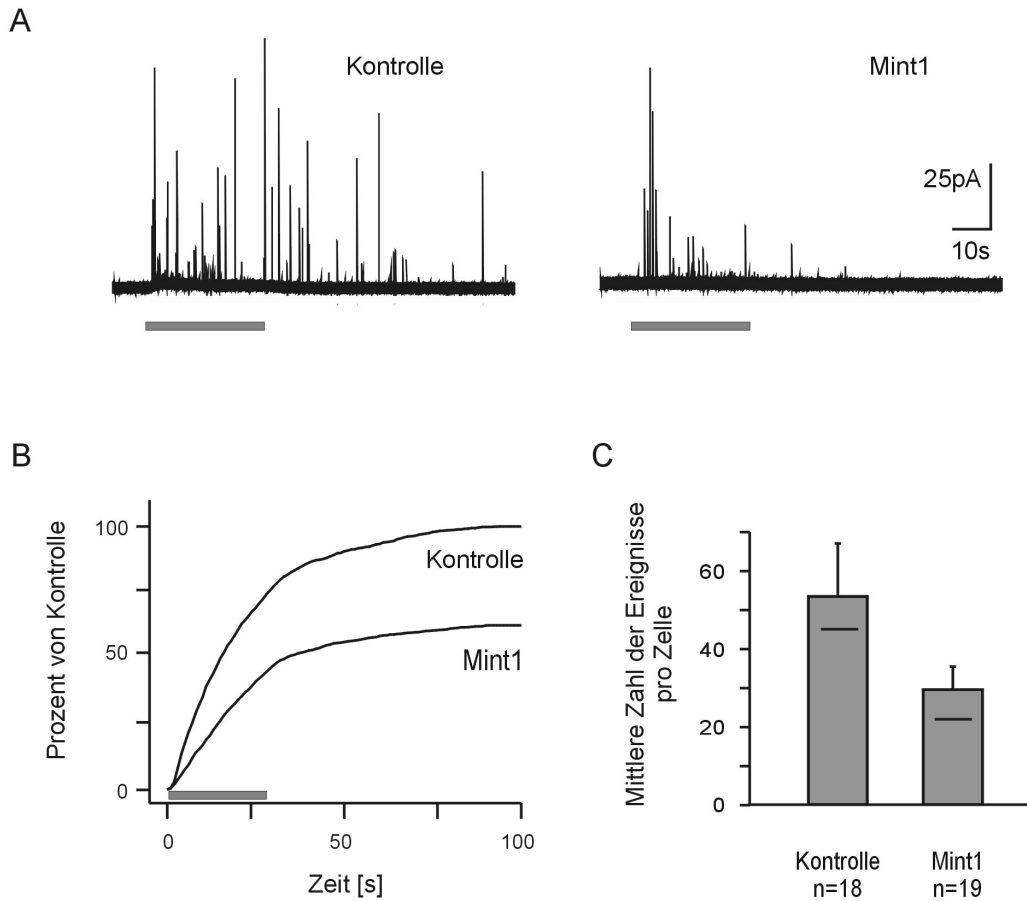
### 3.4.2 Beeinflußt Mint1 die Exozytose von LDCVs?

Die Beobachtung, daß bei gleichzeitiger Anwesenheit von Syntaxin1 und Mint1 die D34N-Mutante und die R39C-Mutante unterschiedliche Proteininteraktionen bevorzugen, führte zu der Hypothese, daß der stimulatorische Effekt der D34N-Mutante durch ihre veränderte Interaktion mit Mint1 verursacht wird. Dies würde bedeuten, daß Mint1 ebenfalls eine regulatorische Rolle in der Exozytose übernimmt.

Um dies zu untersuchen, wurde Mint1 in PC12-Zellen überexprimiert und die Auswirkungen dieser Überexpression mit Hilfe der Amperometrie charakterisiert. Mint1 überexprimierende Zellen zeigten bei Stimulation durch Depolarisation mit Hochkaliumlösung eine um ungefähr 50% reduzierte exozytotische Antwort verglichen mit Kontrollzellen (Abb. 18A, B, C). Die Kinetik der Neurotransmitterfreisetzung war hierbei unverändert, auch der Anteil von Ereignissen mit Fuß unterschied sich nicht zwischen Kontrollzellen und Mint1 überexprimierenden Zellen (Tab. 8).

Diese Befunde unterstützen die vorgeschlagene Wirkweise der D34N-Mutante durch eine vermehrte Bindung an Mint1. Es ist vorstellbar, daß die D34N-

Mutante eine Disinhibition der LDCV-Exozytose verursacht, indem sie das endogene, inhibitorische Mint1-Protein bindet.



**Abb. 18: Mint1 ist ein Regulator der LDCV-Exozytose in PC12-Zellen**

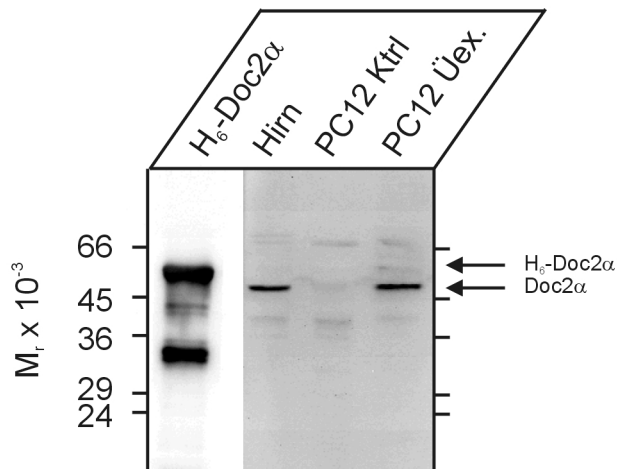
**A** Repräsentative amperometrische Messungen von Mint1-überexprimierenden und Kontroll-PC12-Zellen, die mit Hochkaliumringer stimuliert wurden. Graue Balken deuten die Dauer der Stimulation an. **B** Prozentuale Auftragung der Zahl der Ereignisse pro Stimulation über die Zeit normiert auf die Kontrollgruppe. Die Mint1-Überexpression verursacht einen Rückgang in der Häufigkeit der exozytotischen Ereignisse um ungefähr 50%. Die Dauer der Stimulation ist durch den grauen Balken gekennzeichnet. **C** Mittlere Zahl der Ereignisse pro Zelle ( $\pm$  S.E.M.).

Tab. 8: Eigenschaften des Einzelereignisses in Mint1 überexprimierenden Zellen (Mittelwerte über die Mediane $\pm$ Std. Abw.)		
	Kontrolle n=18	Mint1 n=19
Ladung [fC]	24.9 $\pm$ 12.0	22.5 $\pm$ 10.7
Amplitude [pA]	3.8 $\pm$ 1.4	3.6 $\pm$ 1.4
50-90% RT [ $\mu$ s]	917 $\pm$ 670	897 $\pm$ 579
HW [ $\mu$ s]	4233 $\pm$ 2404	3821 $\pm$ 1984
Fußampl. [pA]	3.8 $\pm$ 1.2	4.7 $\pm$ 3.0
Fußladung [fC]	7.1 $\pm$ 2.8	9.9 $\pm$ 7.7
Fußdauer [ $\mu$ s]	3136 $\pm$ 1310	3325 $\pm$ 1340
Ereignisse/Zelle Mittelw. $\pm$ Std.Abw.	53 $\pm$ 14	30 $\pm$ 5

### 3.4.3 Die Interaktion von Munc-18-1 und Doc2 $\alpha$

Die Interaktion von Munc-18-1 mit dem C2-Domänen-Protein Doc2 $\alpha$  wurde von Verhage et al. (1997) beschrieben. Um zu klären, ob sich die D34N-Mutante und die R39C-Mutante im Hinblick auf ihre Interaktion mit Doc2 $\alpha$  von Munc-18-WT-Protein unterscheiden, wurden Bindungsassays mit rekombinanten und nativen Proteinen durchgeführt. Zunächst wurde der offene Leserahmen des Rattenhomologen von Doc2 $\alpha$  in voller Länge aus einer Rattenhirn-cDNA-Bank kloniert und in verschiedene Expressionsvektoren subkloniert (Details im Methodenteil). Da für die Detektion von Doc2 $\alpha$  kein zuverlässiger, kommerziell erhältlicher Antikörper zur Verfügung steht, wurde in Kaninchen mit GST-

Doc2 $\alpha$ (1-404) ein Antiserum erzeugt, das charakterisiert, affinitätsaufgereinigt und für die weiteren Experimente eingesetzt wurde (vgl. Abb. 19).

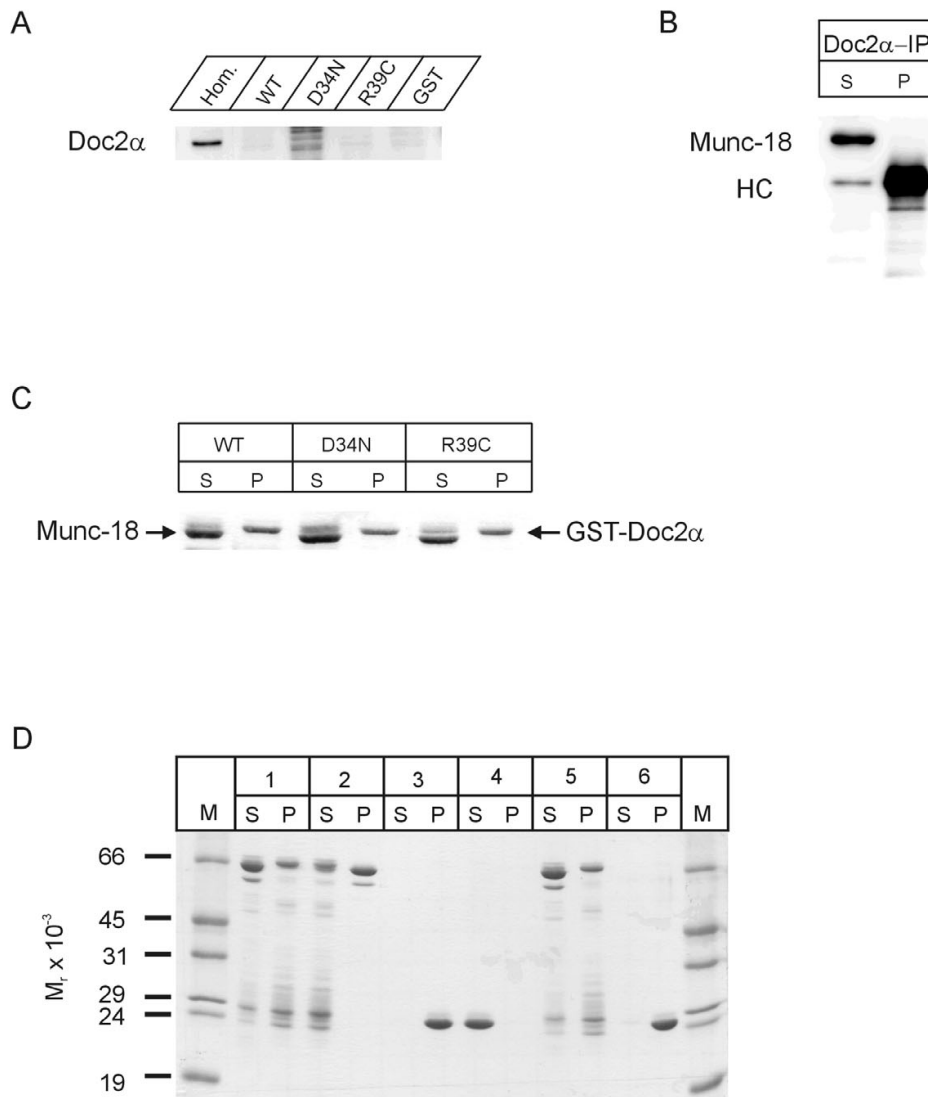


**Abb. 19: Charakterisierung des anti-Doc2 $\alpha$ -Serums**

Western Blots mit rekombinant exprimiertem H<sub>6</sub>-Doc2 $\alpha$  sowie Rattenhirnhomogenat und Tritonextrakten von Kontroll-PC12-Zellen (PC12 Ktrl) und Doc2 $\alpha$  überexprimierenden PC12-Zellen (PC12 Üex.) wurden mit dem affinitätsaufgereinigten Doc2 $\alpha$ -Serum detektiert. Im Rattenhirn wird spezifisch eine 48kDa-Bande erkannt, die in Kontroll-PC12-Zellen nicht vorkommt und erst nach Überexpression von Doc2 $\alpha$  detektiert wird. Rekombinantes Protein wird ebenfalls erkannt, die Verschiebung der Bande zu höheren Molekulargewichten wird durch den Hexa-His-Tag erzeugt. Die Bande mit einem apparentem Molekulargewicht von ca. 50 kDa entspricht der im Coomassie-Gel nach Aufreinigung prominentesten Bande, die 30kDa-Bande stellt eine Abbaubande dar.

In GST-pulldown Experimenten mit GST-Munc-18-WT, -D34N und -R39C konnte keine Bindung von Doc2 $\alpha$  aus Rattenhirnhomogenat an die GST-Munc-18-1-Proteine dargestellt werden. Darüber hinaus wurden mit Rattenhirnhomogenat IP-Experimente mit dem polyklonalen Kaninchenserum gegen Doc2 $\alpha$  durchgeführt, die ebenfalls keine detektierbare Bindung von Munc-18-1 und Doc2 $\alpha$  ergaben (Abb. 20A und B).

Um auszuschließen, daß die im Homogenat auftretenden Proteinkonzentrationen der Bindungspartner zu gering sind, wurden Bindungsexperimente mit bakteriell



**Abb. 20: Munc-18 bindet nicht an das vollständige Doc2α-Protein**

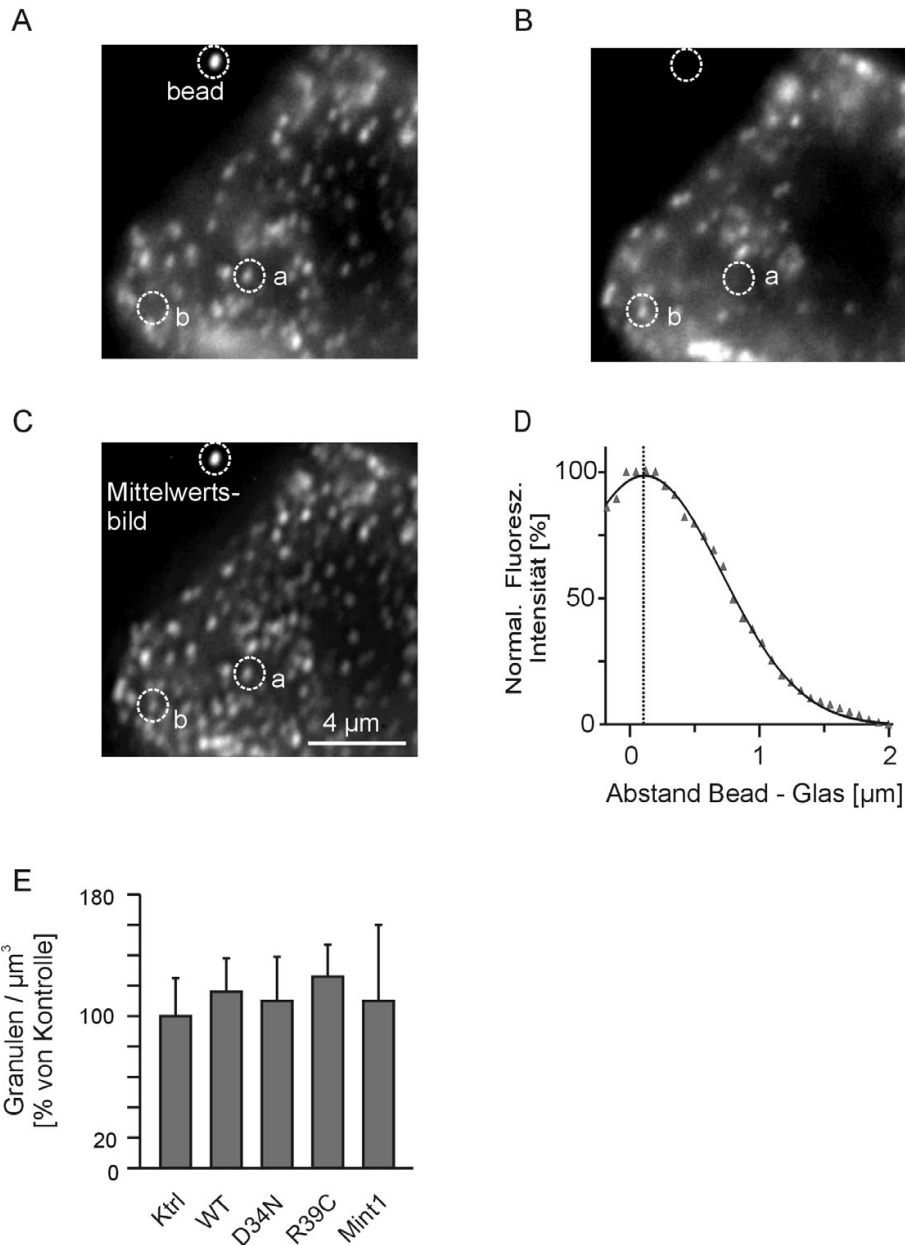
**A** GST-pulldown: Rekombinantes GST-Munc-18-WT, -D34N oder -R39C wurden an GSH-Sepharose gebunden und mit Rattenhirnhomogenat inkubiert. Zur Kontrolle wurde die Bindung an reines GST untersucht. Ko-präzipitiertes Doc2α wurde über Immunoblots nachgewiesen. Keines der Munc-18-Proteine bindet detektierbare Mengen von Doc2α. Zum Vergleich wurde Hirnhomogenat (Hom.) mit aufgetragen und Doc2α immunodetektiert. Signale im D34N-Pellet werden durch kreuzreagierende bakterielle Kontaminanten hervorgerufen und sind nicht Doc2α-spezifisch. **B** Ein Immunpräzipitationsexperiment (Western Blot) mit anti-Doc2α aus Rattenhirnhomogenat zeigt kein detektierbares Munc-18 in der Pelletfraktion (P). HC= Schwere Kette des IgG. **C** Bindungsassay mit rekombinantem GST-Doc2α (1,8μM) und Munc-18-WT, -D34N oder -R39C (je 3μM; Coomassie-Färbung). GST-Doc2α wurde über GSH-Sepharose präzipitiert. GST-Doc2α präzipitiert weder Munc-18-WT noch eine der Mutanten. **D** Calcium verändert nicht das Bindungsverhalten von Doc2α. Coomassie-gefärbtes Gel (12%). Es wurden jeweils H<sub>6</sub>-Munc-18-1 (3μM) und GST-Doc2α (1,8μM) verwendet und ihre Interaktion in Ca<sup>2+</sup>-haltigem oder EGTA-haltigem Puffer untersucht. Die Präzipitation erfolgte je nach Ansatz über den H<sub>6</sub>-tag oder den GST-tag. Reines GST (3μM) wurde als Kontrolle verwendet. Bindungspuffer für die Präzipitation über den H<sub>6</sub>-tag enthielten zusätzlich 20mM Imidazol. In keinem der gewählten Ansätze war eine Bindung zwischen Doc2α und Munc-18 darstellbar. Ansatz 1: Ca<sup>2+</sup>-haltiger Puffer, Präzipitation über GST-Doc2α. Ansatz 2: Ca<sup>2+</sup>-haltiger Puffer, Präzipitation über H<sub>6</sub>-Munc-18. Ansatz 3: GST-Kontrolle zu Ansatz 1. Ansatz 4: GST-Kontrolle zu Ansatz 2. Ansatz 5: EGTA-haltiger Puffer, Präzipitation über GST-Doc2α. Ansatz 6: Kontrolle zu Ansatz 5. S = Überstand; P = Pellet; M = Low Range Molecular Weight Marker (Sigma).

exprimierten Proteinen durchgeführt. Hierbei gelang es nicht, eine Bindung zwischen Munc-18-WT und GST-Doc2 $\alpha$  darzustellen. Eine Bindung an die D34N- und R39C-Mutante konnte ebenfalls nicht gezeigt werden (Abb. 20C). Da es sich bei Doc2 $\alpha$  um ein Protein mit potentiell Ca<sup>2+</sup>-bindenden C2-Domänen handelt, wurden die Aufreinigung des rekombinanten Doc2 $\alpha$  und sämtliche Bindungsassays zusätzlich in Ca<sup>2+</sup>-haltigen Puffern durchgeführt, was jedoch keine Veränderung im Bindungsverhalten zu Munc-18-1 bewirkte (Abb. 20D). Zusammengefaßt läßt sich festhalten, daß die von Verhage et al. (1997) beschriebene Bindung von Doc2 $\alpha$  an Munc-18-WT in dieser Studie nicht nachvollzogen werden konnte. Aus diesem Grund konnte eine Interaktion von Doc2 $\alpha$  mit Munc-18 nicht zur Interpretation der vorliegenden Ergebnisse herangezogen werden.

### **3.5 Verändert die Überexpression von Syntaxin-Bindungsmutanten des Munc-18-1-Proteins die Zahl sekretorischer Organellen?**

Die beobachteten Veränderungen in der Frequenz exozytotischer Ereignisse nach Überexpression der D34N- und R39C-Mutante in PC12-Zellen könnten durch eine veränderte Zahl sekretorischer Organellen in den Zellen hervorgerufen werden. Um dies zu untersuchen, wurden in Zusammenarbeit mit Thorsten Lang PC12-Zellen mit dem fluoreszierenden Granulenmarker NPY-EGFP transfiziert und die Granulenzahl in einem definierten Ausschnitt der Zelle fluoreszenzmikroskopisch ermittelt (Abb. 21A-C).

Die Überexpression von Munc-18-WT, einer der Munc-18-Mutanten oder Mint1 verursachte keine Veränderung der Granulenzahl in den zufällig ausgewählten Ausschnitten der Zellen (Abb. 21E). Dies weist darauf hin, daß beobachtete Effekte nicht auf eine Störung grundlegender Prozesse wie Vesikelbiogenese oder Vesikelreifung zurückzuführen sind sondern eher auf eine Störung der eigentlichen Membranfusionsmaschinerie.



**Abb. 21: Die Granulenzahl in PC12-Zellen ändert sich nicht durch die Überexpression von Munc-18 oder seinen Mutanten**

**A** und **B** NPY-EGFP überexprimierende PC12-Zelle, die auf einem Deckgläschen kultiviert wurde. Zwei Einzelbilder aus dem dreißig Bilder umfassenden „Stack“ sind gezeigt, der über eine Distanz von 2,6  $\mu\text{m}$  vom „Fußabdruck“ ausgehend in die Zelle hineinfokussiert. Die fokale Ebene von **A** liegt nahe an der Plasmamembran. Granule **a** ist im Fokus, Granule **b** ist nicht sichtbar. Das fluoreszierende Tetraspek™ Bead auf der Oberfläche des Deckgläschens ist ebenfalls sichtbar. Die fokale Ebene von **B** liegt tiefer in der Zelle, der Nucleus ist als dunkle Aussparung zu erkennen. Granule **a** und das Bead sind nun nicht mehr fokussiert, Granule **b** ist jetzt sichtbar. **C** Mittelwertsbild des Stacks, das aus allen 30 Einzelbildern des Stacks berechnet wurde. Plasmamembrannahe Granulen wie z.B. **a** und membranferne Granulen wie z.B. **b** sind klar zu erkennen. Auf den Mittelwertsbildern erscheinen nur Granulen, deren Zentrum innerhalb des Stacks liegt. Diese Bilder wurden für die Auszählung verwendet. **D** Auftragung der Fluoreszenzintensität des Tetraspek-Beads über die fokale Ebene und Anwendung des Gauss-Fits zur Illustration der Berechnung der Position des Deckgläschens im Stack. **E** Quantitative Auswertung. Auf den Mittelwertsbildern wurde eine Fläche ausgezählt, die auf den Original-Stack umgerechnet einem zellulären Volumen von  $105\mu\text{m}^3$  entspricht. Die Granulenzahl pro  $\mu\text{m}^3$  ist normiert auf Kontrolle und prozentual ausgedrückt. Kontrollzellen besaßen  $3,3 \pm 0,8$  NPY-EGFP positive Granulen pro  $10\mu\text{m}^3$ . Ausgezählte Zellen pro Gruppe: Kontrolle n = 9; WT n = 8; D34N n = 6; R39C n = 7; Mint1 n = 12.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Die Kotransfektion**

Ziel dieser Arbeit war, Einblicke in den molekularen Mechanismus der Munc-18-1-Funktion zu gewinnen. Durch Überexpression des Wildtypproteins und die Einführung von Punktmutationen wurde die Interaktion mit Syntaxin1 gezielt gestört und anschließend die Auswirkungen der Störung in neuroendokrinen PC12-Zellen elektrophysiologisch charakterisiert.

Der gewählte Kotransfektionsansatz ist der Verwendung von EGFP-Fusionsproteinen überlegen, da durch einen 25kDa großen EGFP-Tag eine Behinderung der zu untersuchenden Proteininteraktionen nicht ausgeschlossen werden kann. Eine weitere Alternative hätte in der Verwendung eines bicistronischen Vektors bestanden, dessen zweites Cistron für EGFP kodierte, dies erwies sich jedoch aufgrund der niedrigen Expressionspiegel von EGFP als nicht brauchbar (unpublizierte Beobachtung). Die angestrebte eingehende Analyse der Neurotransmitterfreisetzung an der Einzelzelle bis hinunter auf die Ebene des einzelnen Fusionsereignisses erforderte eine konstant hohe Qualität der PC12-Zell-Kulturen und damit einhergehend eine Transfektionsprozedur, die die Zellen nicht schädigte. Dies wurde über die Verwendung eines Elektroporationsprotokolls erreicht, das auch gleichzeitig zu einer hohen Kotransfektionseffizienz von Markerkonstrukt (EGFP) und Expressionskonstrukten der synaptischen Proteine führte. Die hohe Kotransfektionseffizienz war entscheidend für den Erfolg des Ansatzes und wurde ausführlich lichtmikroskopisch (Immunfärbung) und funktionell (Ko-Expression von Tetanustoxin und EGFP) dokumentiert.

### **4.2 Syntaxin1-Bindung und Membranassoziation von Munc-18-1**

Die hier durchgeführte biochemische Charakterisierung der Syntaxin1-Bindungseigenschaften der beiden verwendeten Punktmutanten von Munc-18-1 ergab eine unterschiedlich stark abgeschwächte Syntaxin1-Bindungsfähigkeit bei Munc-18-R39C und -D34N. Die Interaktion zwischen Munc-18-D34N und Syntaxin1 ist so stark abgeschwächt, daß sie vernachlässigbar wird. Auffallend



war, daß diese Punktmutante in cytosolischen Fraktionen überexprimierender PC12-Zellen akkumulierte. Im Gegensatz hierzu konzentrierte sich überexprimiertes Munc-18-WT, das Syntaxin1 effizient bindet, in Membranfraktionen. Die Munc-18-R39C-Mutante, die eine Restbindung an Syntaxin1 aufweist, ist ungefähr zu gleichen Teilen auf Membran- und Cytosolfractionen aufgeteilt. Die Syntaxin1-Bindungsfähigkeit von Munc-18-1 und seinen Mutanten korreliert also mit dem Auftreten der Proteine in Membranfraktionen. Unterstützt wird dies durch die Befunde aus Digitonin-permeabilisierten Zellen, in denen ebenfalls demonstriert wurde, daß Munc-18-WT sogar unter Überexpressionsbedingungen an die Plasmamembran assoziiert vorliegt. Graduelle Unterschiede in der Membranassoziation der beiden Mutanten ließen sich mit dieser Methode zwar nicht darstellen, jedoch konnte ein klarer Unterschied zum Verhalten des Wildtypproteins hinsichtlich der Membranassoziation herausgearbeitet werden. Dies weist deutlich darauf hin, daß die Membranassoziation von Munc-18-1 zum Großteil Syntaxin-vermittelt ist, zumal der in dieser Arbeit ermittelte große Überschuß von Syntaxin1 über Munc-18-1 dies auch ermöglicht. Auch Pérez-Brangulí et al. (2002) finden Munc-18-1 nur in Anwesenheit von Syntaxin1 an Membranen, wenn die Proteine heterolog in 29.3T-Zellen exprimiert werden. Andere Familienmitglieder der SM-Familie zeigen jedoch eine nicht streng Syntaxin-abhängige Assoziation an die Membran: So wurde z.B. für Syntaxin-Bindungsmutanten von Munc-18-2 gezeigt, daß sie trotz abgeschwächter Syntaxin-Bindung in Membranfraktionen auftreten (Riento et al., 2000). Auch für Munc-18-1 wurde von Garcia et al. (1995) gezeigt, daß aus Rattenhirnhomogenat nur kleine Mengen des Munc-18-1/Syntaxin-Komplexes immunpräzipitiert werden können und daß die Membranassoziation Eigenschaften einer hydrophoben Interaktion aufweist. Da zum Beispiel Munc-18-D34N trotz vernachlässigbarer Syntaxin1-Interaktion zu einem kleinen Teil in Membranfraktionen detektiert werden kann, wären die hier vorliegenden Daten mit den Befunden von Garcia et al. kompatibel.

### **4.3 Ist Munc-18-1 ein Inhibitor der LDCV-Exozytose?**

Munc-18-1 soll in der Exozytose eine inhibitorische Funktion übernehmen, indem es die Verfügbarkeit von Syntaxin1 für SNARE-Komplexe steuert. Dies wurde

für die Neuromuskuläre Endplatte von *Drosophila* vorgeschlagen, wo die Munc-18-1-Überexpression zu einer Inhibition der Exozytose führte (Schulze et al., 1994). Darüber hinaus konnte diese Inhibition durch die Ko-Überexpression von Syntaxin wieder aufgehoben werden (Wu et al., 1998). Diese inhibitorische Funktion ist jedoch nur schwer mit der essentiellen Rolle von Munc-18-1 für die Neurotransmission in Einklang zu bringen.

Die vorliegende und andere Studien liefern einige Hinweise, daß Munc-18-1 keine inhibitorische Funktion hat. Der in dieser Arbeit ermittelte große Überschuß von endogenem Syntaxin1 im Vergleich zu endogenem Munc-18-1 macht eine einfache Konkurrenz zwischen Munc-18-1/Syntaxin1-Komplex und SNARE-Proteinen um Syntaxin1 unwahrscheinlich, da der Munc-18-1/Syntaxin1-Komplex in einem stöchiometrischen Verhältnis von eins zu eins gebildet wird (Misura et al., 2000). Auch der fehlende Effekt der Munc-18-WT-Überexpression spricht gegen eine Inhibitorfunktion von Munc-18-1. Der fehlende Effekt einer WT-Überexpression könnte grundsätzlich auch mit der moderaten Überexpression des Munc-18-1 erklärt werden, da die im Mittel zehnfache Erhöhung der Munc-18-1-Mengen nicht ausreichen dürfte, das endogene Syntaxin abzusättigen. Auch könnte überexprimiertes Munc-18-WT an eine funktionell nicht relevante Subpopulation der Syntaxin1-Moleküle binden. Jedoch verursacht die vergleichbar starke Überexpression der R39C-Mutante eine deutliche Störung der LDCV-Exozytose. Die Wildtyp-Überexpression verursacht somit grundsätzlich eine ausreichend starke Erhöhung der Munc-18-1-Spiegel, was die Schlußfolgerung erlaubt, daß die Munc-18-1/Syntaxin1-Interaktion keine Inhibition der LDCV-Exozytose vermittelt.

Im Einklang hierzu beobachteten Graham et al. (1997) und Fisher et al. (2001), daß die Munc-18-1-Überexpression keine inhibitorische Wirkung auf die exozytotische Aktivität neuroendokriner Zellen hat. Die sehr starke Überexpression von Munc-18-1 in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks durch ein virales Expressionssystem führte zu einer gesteigerten exozytotischen Antwort der Zellen (Voets et al., 2001), was ebenso gegen eine Inhibitorfunktion von Munc-18-1 spricht.

Eine mögliche Erklärung für die Befunde aus *D. melanogaster* wäre, daß Munc-18-1 in neuroendokrinen Zellen in einer anderen Weise wirkt als in Synapsen, wie dies bereits von Voets et al. (2001) diskutiert wurde. Die stärkste

Unterstützung für diese Hypothese liefern Befunde aus Maus-Nullmutanten: Synapsen dieser Tiere besitzen normale Cluster aus synaptischen Vesikeln, die nicht von Kontrolltieren zu unterscheiden sind. Trotzdem gibt es keinerlei synaptische Aktivität. Die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks der Nullmutanten hingegen haben keine gedockten chromaffinen Granulen mehr, eine gewisse Restaktivität bei der Exozytose bleibt jedoch erhalten (Verhage et al., 2000; Voets et al., 2001). Dies weist auf eine unterschiedliche Funktion von Munc-18-1 in Synapsen und neuroendokrinen Zellen hin.

#### **4.4 Munc-18-1 und die Fusionspore**

Fisher et al. (2001) beschrieben eine Verringerung der freigesetzten Transmittermenge und eine Beschleunigung im Zeitverlauf der Transmitterfreisetzung aus einzelnen Granulen, die nach Überexpression der R39C-Mutante in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks beobachtet wurde. Das Einzelereignis besaß hierbei eine verringerte quantale Größe. Als Ursache wurde ein vorzeitiges Schließen der Fusionspore durch die verminderte Syntaxin-Bindung der R39C-Mutante angegeben („Kiss-and-run“). Ales et al. (1999) konnten jedoch mit einer Kombination aus Kapazitätsmessungen und Amperometrie zeigen, daß auch bei Fusionsereignissen mit sehr kurzzeitig ausgebildeter Fusionspore („fast kiss and run events“) amperometrische Signale meßbar sind, die man von amperometrischen Signalen „normaler“, d.h. permanenter Fusionsereignisse nicht unterscheiden kann, und daß somit die Neurotransmitterfreisetzung auch bei „Kiss-and-run“-Ereignissen vollständig ist. Die Überexpression der R39C-Mutante verursachte in der hier vorliegenden Studie keine Veränderung der kinetischen Eigenschaften des Einzelereignisses, sondern eine reduzierte Häufigkeit exozytotischer Ereignisse. Die von Fisher et al. gefundene Veränderung der Kinetik wurde auf der Grundlage eines verhältnismäßig kleinen Datensatzes ermittelt (53 exozytotische Ereignisse in acht Kontrollzellen, 117 Ereignisse in 19 R39C-überexprimierenden Zellen), ohne daß Schwankungen zwischen den Zellen berücksichtigt wurden. Diese Variabilität kann nach eigenen Erfahrungen jedoch erheblich sein und das Ergebnis maßgeblich beeinflussen. Der durch die R39C-Mutante verursachte Effekt lag dazu in einer Größenordnung, die der Schwankung zwischen den Kontrollgruppen

der Studie entspricht (siehe Fisher et al., 2001, Supplemental Data). Diese technischen Unzulänglichkeiten schränken die Aussagekraft der Studie leider ein. Die in der vorliegenden Studie durchgeführte Analyse einer großen Zahl amperometrischer Einzelereignisse läßt nicht den Schluß zu, daß Munc-18-1 als Regulator der Fusionsporenkinetik fungiert. Unterstützt wird dies auch durch den Befund, daß SNARE-Komplexe wahrscheinlich bereits vor dem Calciumeinstrom entstehen (Xu et al., 1999; Xia et al., 2001). Der Munc-18-1/Syntaxin1-Komplex wäre folglich nicht direkt zeitlich an die Neurotransmitterfreisetzung gekoppelt. Eine Funktion von Munc-18-1 als Regulator der Fusionsporenkinetik ist somit schwierig mit den bisher vorliegenden Erkenntnissen in Einklang zu bringen.

#### **4.5 Welche Rückschlüsse auf die Munc-18-1-Funktion erlauben die Überexpressionsexperimente mit Wildtypprotein und den Mutanten?**

Die Syntaxin1-Bindungsmutanten Munc-18-R39C und -D34N haben einen gegensätzlichen Effekt auf die Exozytose. Die Beobachtung, daß die Effekte auf die Exozytose nicht parallel zu den Veränderungen in der Syntaxin1-Bindung der Mutanten laufen, weist auf grundsätzlich verschiedene Wirkweisen der Munc-18-1-Mutanten hin und damit auch auf verschiedene mögliche Funktionen des Munc-18-Proteins.

Die Störung der Exozytose durch die R39C-Mutante zeigt, daß die Interaktion von Munc-18-1 und Syntaxin1 einen obligatorischen Zwischenschritt in der Exozytose darstellt, der durch die abgeschwächte Proteininteraktion beeinträchtigt wird. Die Interaktion scheint jedoch in PC12-Zellen nicht geschwindigkeitsbestimmend zu sein, da ein Überangebot des Wildtyp-Proteins nicht zu einer gesteigerten Exozytose führt, obwohl Syntaxin1 durch seinen großen Überschuß ausreichend freie Bindungsstellen für überexprimiertes Munc-18-1 zur Verfügung stellen kann.

Wie erklären sich die gegensätzlichen Effekte der D34N- und der R39C-Mutante? Frühere Arbeiten schlugen vor, daß eine Munc-18-1-Funktion nicht einfach darin besteht, Syntaxin1 zu binden und damit der SNARE-Komplexbildung zu entziehen, sondern daß Munc-18-1 auf Syntaxin1 einwirkt und seine Konformation verändert, um dadurch die SNARE-Komplexbildung vorzubereiten (Dulubova et al., 1999; Misura et al., 2000). Dieser Überlegung zufolge kann man

den inhibitorischen Effekt der R39C-Mutante nicht als ausschließliche Folge der abgeschwächten Bindung an Syntaxin1 erklären, sondern als darüberhinausgehende funktionelle Beeinträchtigung des Proteins, die nachgeschaltete Syntaxin1-Funktionen betrifft.

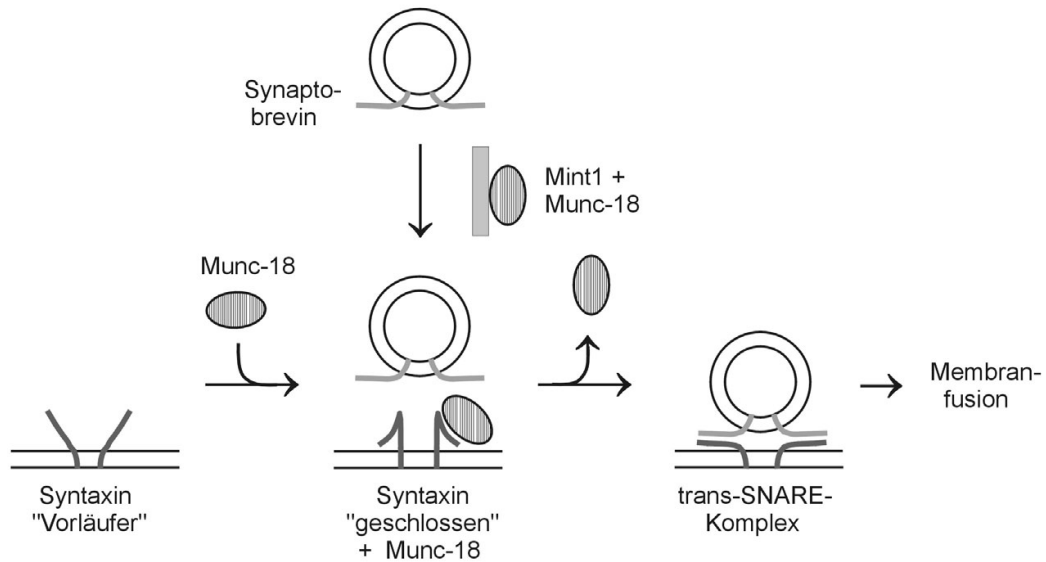
Eine Beeinflussung der Exozytose über Syntaxin1 ist für die D34N-Mutante aufgrund ihrer gezeigten vernachlässigbaren Syntaxin1-Bindung unwahrscheinlich. Die Bindungsstudien mit Mint1 und den Munc-18-1-Proteinen liefern Hinweise auf einen zweiten Weg, über den Munc-18-1 in die Exozytose eingreift. Ob das Mint1-Protein in die Regulation der Exozytose eingreift und wie es dies tun könnte, war bisher nicht bekannt, lediglich die synaptische Lokalisation von Mint1 und seine Bindung an Munc-18-1 und das präsynaptische Adhäsionsmolekül Neurexin weisen auf eine präsynaptische Funktion hin (Okamoto und Südhof, 1997; Biederer und Südhof, 2000; Okamoto et al., 2000). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, konkurriert Syntaxin1 mit Mint1 um die Munc-18-1-Bindung. Erst eine starke Abschwächung der Interaktion von Munc-18-1 und Syntaxin1 wie im Fall der D34N-Mutante ermöglicht eine gehäuft auftretende Interaktion von Mint1 mit Munc-18-1. Wie diese Studie zeigt, hat Mint1 selbst eine regulatorische Funktion in der Exozytose. Der stimulatorische Effekt der D34N-Mutante kann folglich über eine vermehrte Interaktion mit dem inhibitorisch wirkenden Mint1 erklärt werden, die letztlich zu einer Disinhibition führt. Unterstützt wird diese Interpretation durch die Beobachtung, daß Mint1 und die D34N-Mutante gehäuft im Cytosol auftreten und somit sehr wahrscheinlich miteinander interagieren können.

Die Überlegung, daß die cytosolischen Munc-18-1-Konzentrationen für die Regulation der Exozytose eine kritische Größe darstellen, erweitert auch die Interpretationsmöglichkeiten der Ergebnisse anderer Studien. So verursacht zum Beispiel die Überexpression der cytosolischen Domäne eines mutierten Syntaxins in der offenen, nicht-Munc-18-1 bindenden Konformation keinerlei Inhibition der Exozytose in PC12-Zellen (Dulubova et al., 1999). Wird dagegen die cytosolische Domäne des Wildtyp-Syntaxins überexprimiert, tritt eine Inhibition der Exozytose auf. Diese Inhibition könnte unter Einbeziehung der eigenen Befunde darüber erklärt werden, daß dieses überexprimierte Syntaxin die cytosolisch auftretende Interaktion von Munc-18-1 mit Mint1 verhindert, da es sehr effizient mit Mint1 um Munc-18-1 konkurriert. Die bereits erwähnte Stimulation der Exozytose in

chromaffinen Zellen durch die Munc-18-1-Überexpression (Voets et al., 2001) könnte durch sehr hohe Munc-18-1-Spiegel in diesen Zellen erklärt werden, die durch das verwendete virale Überexpressionssystem erzeugt werden können. Hierdurch kann endogenes Syntaxin voll abgesättigt werden. Freies, überexprimiertes Munc-18-1 erscheint dann im Cytosol und kann gehäuft mit Mint1 interagieren.

Doc2 wurde als weiterer Bindungspartner von Munc-18-1 identifiziert (Verhage et al., 1997). In dieser Arbeit konnte keine Interaktion der hirnspezifischen Isoform Doc2 $\alpha$  mit Munc-18-1 detektiert werden, obwohl zahlreiche experimentelle Bedingungen getestet wurden. Bei den hier verwendeten Konstrukten wurde der gesamte offene Leserahmen von Doc2 $\alpha$  exprimiert und nicht lediglich die beiden C2-Domänen wie in der Studie von Verhage et al.. Dies könnte eine erniedrigte Affinität zwischen Doc2 $\alpha$  und Munc-18-1 zur Folge haben. Grundsätzlich wirft dies die Frage auf, ob die von Verhage et al. gezeigte Interaktion zwischen einem Doc2 $\alpha$ -Fragment und Munc-18-1 überhaupt funktionell relevant ist.

Worauf die für die Neurotransmission essentielle Natur des Munc-18-1-Proteins beruht, bleibt weiterhin unklar. Jedoch wird deutlicher, daß sich die Munc-18-1-Funktion nicht auf seine Interaktion mit Syntaxin1 beschränkt und nicht grundsätzlich eine Inhibition vermittelt. Munc-18-1 könnte als dynamisches und hochpräzises Bindeglied zwischen dem Fusionsapparat (Munc-18-1/Syntaxin1-Interaktion) und Proteinen des präsynaptischen Netzwerks (Munc-18-1/Mint1-Interaktion) dienen (Abb. 22). Munc-18-1 kann während der Exozytose von der Munc-18-1/Syntaxin-Interaktion in die Munc-18-1/Mint1-Interaktion überwechseln. Die in dieser Studie beobachtete Konkurrenz zwischen diesen beiden Komplexen schafft hierfür die Voraussetzung. Der Wechsel von der einen Interaktion in die andere könnte durch eine PKC-abhängige Phosphorylierung von Munc-18-1 unterstützt werden, wie sie in Synaptosomen aus Rattenhirn gezeigt wurde (de Vries et al., 2000). Phosphoryliertes Munc-18-1 bindet kein Syntaxin1 mehr (Fujita et al., 1996) und kann durch seine Assoziation an weitere Bindungspartner andere Protein-Interaktionen modifizieren. So verstärkt zum Beispiel die Assoziation von Munc-18-1 an Mint1 dessen Bindung an CASK (Biederer und Südhof, 2000). CASK ist ein MAGUK-Protein



**Abb. 22: Hypothetisches Modell zur Munc-18-Funktion in PC12-Zellen**

Eine hypothetische Vorläuferform von Syntaxin1 verändert durch Munc-18 ihre Konformation und wird dadurch für die SNARE-Komplexbildung vorbereitet. Im Verlauf der Exozytose wechselt Munc-18 vom Munc-18/Syntaxin1-Komplex in den Mint1/Munc-18-Komplex. Zerfällt der Munc-18/Syntaxin-Komplex, geht Syntaxin in den SNARE-Komplex über und das „befreite“ Munc-18 kann andere Interaktionen eingehen. Über die Bindung an Mint1 könnte Munc-18 dann zum Beispiel den Transport eines neuen Vesikels zu der Plasmamembranregion steuern, in der soeben ein Vesikel fusioniert hat und somit lokal als Wegweiser für den Vesikeltransport und Indikator für die eben aufgetretene Exozytose fungieren. Der Munc-18/Syntaxin-Komplex würde dagegen exozytosekompetente Plasmamembranareale definieren und durch seine hohe Affinität die präzise Anlieferung neuer Organellen sichern. Der Mint1/Munc-18/Syntaxin1-Komplex könnte als Übergangszustand durchlaufen werden, der beide Komplexe koppelt und die räumliche Koordination bewirkt. SNAP-25 wurde zur Vereinfachung im SNARE-Komplex nicht dargestellt.

(membrane-associated guanylate kinase domain), das an den cytoplasmatischen Bereich des Adhäsionsmoleküls Neurexin bindet und dort die F-Actin-Polymerisation vermittelt (Hata et al., 1996; Biederer und Südhof, 2001). Desweiteren könnte eine Bindung des Munc-18-1-Proteins an Mint1 zum Beispiel die Rekrutierung neuer sekretorischer Organellen an den Exozytoseort unterstützen. Der Munc-18-1/Syntaxin-Komplex würde exozytosekompetente Plasmamembranareale definieren und durch seine hohe Affinität die präzise Anlieferung neuer Organellen sichern. Der Mint1/Munc-18-1/Syntaxin1-Komplex könnte als Übergangszustand durchlaufen werden, der beide Komplexe koppelt und die räumliche Koordination bewirkt.

## 5 Literatur

**Aalto, M. K., Ruohonen, L., Hosono, K. and Keranen, S.** (1991). Cloning and sequencing of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* SEC1 gene localized on chromosome IV. *Yeast* 7 (6): 643-50.

**Ales, E., Tabares, L., Poyato, J. M., Valero, V., Lindau, M. and Alvarez de Toledo, G.** (1999). High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism. *Nat Cell Biol* 1 (1): 40-4.

**Alvarez de Toledo, G., Fernandez-Chacon, R. and Fernandez, J. M.** (1993). Release of secretory products during transient vesicle fusion. *Nature* 363 (6429): 554-8.

**Ashery, U., Varoqueaux, F., Voets, T., Betz, A., Thakur, P., Koch, H., Neher, E., Brose, N. and Rettig, J.** (2000). Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells. *Embo J* 19 (14): 3586-96.

**Atlas, D.** (2001). Functional and physical coupling of voltage-sensitive calcium channels with exocytotic proteins: ramifications for the secretion mechanism. *J Neurochem* 77 (4): 972-85.

**Barnstable, C. J., Hofstein, R. and Akagawa, K.** (1985). A marker of early amacrine cell development in rat retina. *Brain Res* 352 (2): 286-90.

**Betz, A., Okamoto, M., Benseler, F. and Brose, N.** (1997). Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin. *J Biol Chem* 272 (4): 2520-6.

**Biederer, T. and Sudhof, T. C.** (2000). Mints as adaptors. Direct binding to neurexins and recruitment of munc18. *J Biol Chem* 275 (51): 39803-6.

**Biederer, T. and Sudhof, T. C.** (2001). CASK and protein 4.1 support F-actin nucleation on neurexins. *J Biol Chem* 276 (51): 47869-76.



**Borg, J. P., Straight, S. W., Kaech, S. M., de Taddeo-Borg, M., Kroon, D. E., Karnak, D., Turner, R. S., Kim, S. K. and Margolis, B.** (1998). Identification of an evolutionarily conserved heterotrimeric protein complex involved in protein targeting. *J Biol Chem* 273 (48): 31633-6.

**Bracher, A. and Weissenhorn, W.** (2001). Crystal structures of neuronal squid Sec1 implicate inter-domain hinge movement in the release of t-SNAREs. *J Mol Biol* 306 (1): 7-13.

**Bracher, A. and Weissenhorn, W.** (2002). Structural basis for the Golgi membrane recruitment of Sly1p by Sed5p. *Embo J* 21 (22): 6114-24.

**Brose, N., Rosenmund, C. and Rettig, J.** (2000). Regulation of transmitter release by Unc-13 and its homologues. *Curr Opin Neurobiol* 10 (3): 303-11.

**Bruns, D., Riedel, D., Klingauf, J. and Jahn, R.** (2000). Quantal release of serotonin. *Neuron* 28 (1): 205-20.

**Bruns, D. and Jahn, R.** (2002). Molecular determinants of exocytosis. *Pflugers Arch* 443 (3): 333-8.

**Burgoyne, R. D. and Morgan, A.** (1998). Analysis of regulated exocytosis in adrenal chromaffin cells: insights into NSF/SNAP/SNARE function. *Bioessays* 20 (4): 328-35.

**Burgoyne, R. D. and Barclay, J. W.** (2002). Splitting the quantum: regulation of quantal release during vesicle fusion. *Trends Neurosci* 25 (4): 176-8.

**Butz, S., Okamoto, M. and Sudhof, T. C.** (1998). A tripartite protein complex with the potential to couple synaptic vesicle exocytosis to cell adhesion in brain. *Cell* 94 (6): 773-82.

**Carr, C. M., Grote, E., Munson, M., Hughson, F. M. and Novick, P. J.** (1999). Sec1p binds to SNARE complexes and concentrates at sites of secretion. *J Cell Biol* 146 (2): 333-44.

**Chen, Y. A. and Scheller, R. H.** (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (2): 98-106.

**Chow, R. H., von Ruden, L. and Neher, E.** (1992). Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature* 356 (6364): 60-3.

**Dascher, C., Ossig, R., Gallwitz, D. and Schmitt, H. D.** (1991). Identification and structure of four yeast genes (SLY) that are able to suppress the functional loss of YPT1, a member of the RAS superfamily. *Mol Cell Biol* 11 (2): 872-85.

**de Vries, K. J., Geijtenbeek, A., Brian, E. C., de Graan, P. N., Ghijsen, W. E. and Verhage, M.** (2000). Dynamics of munc18-1 phosphorylation/dephosphorylation in rat brain nerve terminals. *Eur J Neurosci* 12 (1): 385-90.

**Dresbach, T., Burns, M. E., O'Connor, V., DeBello, W. M., Betz, H. and Augustine, G. J.** (1998). A neuronal Sec1 homolog regulates neurotransmitter release at the squid giant synapse. *J Neurosci* 18 (8): 2923-32.

**Dulubova, I., Sugita, S., Hill, S., Hosaka, M., Fernandez, I., Sudhof, T. C. and Rizo, J.** (1999). A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *Embo J* 18 (16): 4372-82.

**Dulubova, I., Yamaguchi, T., Gao, Y., Min, S. W., Huryeva, I., Sudhof, T. C. and Rizo, J.** (2002). How Tlg2p/syntaxin 16 'snares' Vps45. *Embo J* 21 (14): 3620-31.

**Duncan, R. R., Apps, D. K., Learmonth, M. P., Shipston, M. J. and Chow, R. H.** (2000). Is double C2 protein (DOC2) expressed in bovine adrenal medulla? A

commercial anti-DOC2 monoclonal antibody recognizes a major bovine mitochondrial antigen. *Biochem J* 351 (Pt 1): 33-7.

**Fasshauer, D., Otto, H., Eliason, W. K., Jahn, R. and Brunger, A. T.** (1997). Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation. *J Biol Chem* 272 (44): 28036-41.

**Fasshauer, D., Antonin, W., Subramaniam, V. and Jahn, R.** (2002). SNARE assembly and disassembly exhibit a pronounced hysteresis. *Nat Struct Biol* 9 (2): 144-51.

**Fernandez, I., Ubach, J., Dulubova, I., Zhang, X., Sudhof, T. C. and Rizo, J.** (1998). Three-dimensional structure of an evolutionarily conserved N-terminal domain of syntaxin 1A. *Cell* 94 (6): 841-9.

**Fisher, R. J., Pevsner, J. and Burgoyne, R. D.** (2001). Control of fusion pore dynamics during exocytosis by Munc18. *Science* 291 (5505): 875-8.

**Fujita, Y., Sasaki, T., Fukui, K., Kotani, H., Kimura, T., Hata, Y., Sudhof, T. C., Scheller, R. H. and Takai, Y.** (1996). Phosphorylation of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 by protein kinase C: its implication in regulating the interaction of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 with syntaxin. *J Biol Chem* 271 (13): 7265-8.

**Fujita, Y., Shirataki, H., Sakisaka, T., Asakura, T., Ohya, T., Kotani, H., Yokoyama, S., Nishioka, H., Matsuura, Y., Mizoguchi, A., Scheller, R. H. and Takai, Y.** (1998). Tomosyn: a syntaxin-1-binding protein that forms a novel complex in the neurotransmitter release process. *Neuron* 20 (5): 905-15

**Garcia, E. P., Gatti, E., Butler, M., Burton, J. and De Camilli, P.** (1994). A rat brain Sec1 homologue related to Rop and UNC18 interacts with syntaxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (6): 2003-7.

**Garcia, E. P., McPherson, P. S., Chilcote, T. J., Takei, K. and De Camilli, P.** (1995). rbSec1A and B colocalize with syntaxin 1 and SNAP-25 throughout the axon, but are not in a stable complex with syntaxin. *J Cell Biol* 129 (1): 105-20.

**Gengyo-Ando, K., Kamiya, Y., Yamakawa, A., Kodaira, K., Nishiwaki, K., Miwa, J., Hori, I. and Hosono, R.** (1993). The *C. elegans* unc-18 gene encodes a protein expressed in motor neurons. *Neuron* 11 (4): 703-11.

**Graham, M. E., Sudlow, A. W. and Burgoyne, R. D.** (1997). Evidence against an acute inhibitory role of nSec-1 (munc-18) in late steps of regulated exocytosis in chromaffin and PC12 cells. *J Neurochem* 69 (6): 2369-77

**Greene, L. A. and Tischler, A. S.** (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73 (7): 2424-8.

**Greene, L. A. and Rein, G.** (1977a). Release, storage and uptake of catecholamines by a clonal cell line of nerve growth factor (NGF) responsive pheo-chromocytoma cells. *Brain Res* 129 (2): 247-63.

**Greene, L. A. and Rein, G.** (1977b). Synthesis, storage and release of acetylcholine by a noradrenergic pheochromocytoma cell line. *Nature* 268 (5618): 349-51.

**Halachmi, N. and Lev, Z.** (1996). The Sec1 family: a novel family of proteins involved in synaptic transmission and general secretion. *J Neurochem* 66 (3): 889-97.

**Hanson, P. I., Heuser, J. E. and Jahn, R.** (1997). Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes. *Curr Opin Neurobiol* 7 (3): 310-5.

**Harrison, S. D., Broadie, K., van de Goor, J. and Rubin, G. M.** (1994). Mutations in the *Drosophila* Rop gene suggest a function in general secretion and synaptic transmission. *Neuron* 13 (3): 555-66.

**Hata, Y., Slaughter, C. A. and Sudhof, T. C.** (1993). Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. *Nature* 366 (6453): 347-51

**Hata, Y. and Sudhof, T. C.** (1995). A novel ubiquitous form of Munc-18 interacts with multiple syntaxins. Use of the yeast two-hybrid system to study interactions between proteins involved in membrane traffic. *J Biol Chem* 270 (22): 13022-8.

**Hata, Y., Butz, S. and Sudhof, T. C.** (1996). CASK: a novel dlg/PSD95 homolog with an N-terminal calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with neuexins. *J Neurosci* 16 (8): 2488-94.

**Higuchi, R., Krummel, B. and Saiki, R. K.** (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* 16 (15): 7351-67.

**Hosono, R., Hekimi, S., Kamiya, Y., Sassa, T., Murakami, S., Nishiwaki, K., Miwa, J., Taketo, A. and Kodaira, K. I.** (1992). The unc-18 gene encodes a novel protein affecting the kinetics of acetylcholine metabolism in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Neurochem* 58 (4): 1517-25.

**Jahn, R. and Niemann, H.** (1994). Molecular mechanisms of clostridial neurotoxins. *Ann N Y Acad Sci* 733: 245-55.

**Jahn, R. and Hanson, P. I.** (1998). Membrane fusion. SNAREs line up in new environment. *Nature* 393 (6680): 14-5.

**Jahn, R. and Sudhof, T. C.** (1999). Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem* 68: 863-911.

**Jahn, R.** (2000). Sec1/Munc18 proteins: mediators of membrane fusion moving to center stage. *Neuron* 27 (2): 201-4

**Katz, B.** (1971). Quantal mechanism of neural transmitter release. *Science* 173 (992): 123-6.

**Kee, Y., Lin, R. C., Hsu, S. C. and Scheller, R. H.** (1995). Distinct domains of syntaxin are required for synaptic vesicle fusion complex formation and dissociation. *Neuron* 14 (5): 991-8.

**Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (259): 680-5.

**Lang, T., Wacker, I., Steyer, J., Kaether, C., Wunderlich, I., Soldati, T., Gerdes, H. H. and Almers, W.** (1997). Ca<sup>2+</sup>-triggered peptide secretion in single cells imaged with green fluorescent protein and evanescent-wave microscopy [published erratum appears in *Neuron* 1997 Aug;19(2):following 463]. *Neuron* 18 (6): 857-63

**Lang, T., Bruns, D., Wenzel, D., Riedel, D., Holroyd, P., Thiele, C. and Jahn, R.** (2001). SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *Embo J* 20 (9): 2202-13.

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

**Majlof, L. and Forsgren, P. O.** (1993). Confocal microscopy: important considerations for accurate imaging. *Methods Cell Biol* 38: 79-95.

**Margioris, A. N., Markogiannakis, E., Makrigiannakis, A. and Gravanis, A.** (1992). PC12 rat pheochromocytoma cells synthesize dynorphin. Its secretion is modulated by nicotine and nerve growth factor. *Endocrinology* 131 (2): 703-9.

**Misura, K. M., Scheller, R. H. and Weis, W. I.** (2000). Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. *Nature* 404 (6776): 355-62

**Montecucco, C. and Schiavo, G.** (1994). Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. *Mol Microbiol* 13 (1): 1-8.

**Novick, P. and Schekman, R.** (1979). Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (4): 1858-62.

**Novick, P., Field, C. and Schekman, R.** (1980). Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* 21 (1): 205-15.

**Okamoto, M. and Sudhof, T. C.** (1997). Mints, Munc18-interacting proteins in synaptic vesicle exocytosis. *J Biol Chem* 272 (50): 31459-64

**Okamoto, M. and Sudhof, T. C.** (1998). Mint 3: a ubiquitous mint isoform that does not bind to munc18-1 or -2. *Eur J Cell Biol* 77 (3): 161-5.

**Okamoto, M., Matsuyama, T. and Sugita, M.** (2000). Ultrastructural localization of mint1 at synapses in mouse hippocampus. *Eur J Neurosci* 12 (8): 3067-72.

**Palade, G.** (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189 (4200): 347-58.

**Peng, R. and Gallwitz, D.** (2002). Sly1 protein bound to Golgi syntaxin Sed5p allows assembly and contributes to specificity of SNARE fusion complexes. *J Cell Biol* 157 (4): 645-55.

**Perez-Branguli, F., Muhaisen, A. and Blasi, J.** (2002). Munc 18a binding to syntaxin 1A and 1B isoforms defines its localization at the plasma membrane and blocks SNARE assembly in a three-hybrid system assay. *Mol Cell Neurosci* 20 (2): 169-80.

**Pevsner, J., Hsu, S. C. and Scheller, R. H.** (1994a). n-Sec1: a neural-specific syntaxin-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (4): 1445-9.

**Pevsner, J., Hsu, S. C., Braun, J. E., Calakos, N., Ting, A. E., Bennett, M. K. and Scheller, R. H.** (1994b). Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex. *Neuron* 13 (2): 353-61.

**Pevsner, J.** (1996). The role of Sec1p-related proteins in vesicle trafficking in the nerve terminal. *J Neurosci Res* 45 (2): 89-95.

**Riento, K., Kauppi, M., Keranen, S. and Olkkonen, V. M.** (2000). Munc18-2, a functional partner of syntaxin 3, controls apical membrane trafficking in epithelial cells. *J Biol Chem* 275 (18): 13476-83.

**Rizo, J. and Sudhof, T. C.** (2002). Snares and munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat Rev Neurosci* 3 (8): 641-53.

**Rongo, C., Whitfield, C. W., Rodal, A., Kim, S. K. and Kaplan, J. M.** (1998). LIN-10 is a shared component of the polarized protein localization pathways in neurons and epithelia. *Cell* 94 (6): 751-9.

**Salton, S. R., Margolis, R. U. and Margolis, R. K.** (1983). Release of chromaffin granule glycoproteins and proteoglycans from potassium-stimulated PC12 pheochromocytoma cells. *J Neurochem* 41 (4): 1165-70.

**Salzberg, A., Cohen, N., Halachmi, N., Kimchie, Z. and Lev, Z.** (1993). The Drosophila Ras2 and Rop gene pair: a dual homology with a yeast Ras-like gene and a suppressor of its loss-of-function phenotype. *Development* 117 (4): 1309-19.

**Sassa, T., Harada, S., Ogawa, H., Rand, J. B., Maruyama, I. N. and Hosono, R.** (1999). Regulation of the UNC-18-Caenorhabditis elegans syntaxin complex by UNC-13. *J Neurosci* 19 (12): 4772-7.



**Schoch, S., Deak, F., Konigstorfer, A., Mozhayeva, M., Sara, Y., Sudhof, T. C. and Kavalali, E. T.** (2001). SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice. *Science* 294 (5544): 1117-22.

**Schulze, K. L., Littleton, J. T., Salzberg, A., Halachmi, N., Stern, M., Lev, Z. and Bellen, H. J.** (1994). rop, a Drosophila homolog of yeast Sec1 and vertebrate n-Sec1/Munc-18 proteins, is a negative regulator of neurotransmitter release in vivo. *Neuron* 13 (5): 1099-108.

**Setou, M., Nakagawa, T., Seog, D. H. and Hirokawa, N.** (2000). Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science* 288 (5472): 1796-802.

**Sollner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H. and 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 (3): 409-18.

**Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R. and Brunger, A. T.** (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395 (6700): 347-53.

**Tall, G. G., Hama, H., DeWald, D. B. and Horazdovsky, B. F.** (1999). The phosphatidylinositol 3-phosphate binding protein Vac1p interacts with a Rab GTPase and a Sec1p homologue to facilitate vesicle-mediated vacuolar protein sorting. *Mol Biol Cell* 10 (6): 1873-89.

**Verhage, M., de Vries, K. J., Roshol, H., Burbach, J. P., Gispen, W. H. and Sudhof, T. C.** (1997). DOC2 proteins in rat brain: complementary distribution and proposed function as vesicular adapter proteins in early stages of secretion. *Neuron* 18 (3): 453-61

**Verhage, M., Maia, A. S., Plomp, J. J., Brussaard, A. B., Heeroma, J. H., Vermeer, H., Toonen, R. F., Hammer, R. E., van den Berg, T. K., Missler, M.,**

**Geuze, H. J. and Sudhof, T. C.** (2000). Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* 287 (5454): 864-9

**Voets, T., Toonen, R. F., Brian, E. C., de Wit, H., Moser, T., Rettig, J., Sudhof, T. C., Neher, E. and Verhage, M.** (2001). Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking. *Neuron* 31 (4): 581-91.

**Wagner, J. A.** (1985). Structure of catecholamine secretory vesicles from PC12 cells. *J Neurochem* 45 (4): 1244-53.

**Washbourne, P., Thompson, P. M., Carta, M., Costa, E. T., Mathews, J. R., Lopez-Bendito, G., Molnar, Z., Becher, M. W., Valenzuela, C. F., Partridge, L. D. and Wilson, M. C.** (2002). Genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25 distinguishes mechanisms of neuroexocytosis. *Nat Neurosci* 5 (1): 19-26.

**Wightman, R. M., Jankowski, J. A., Kennedy, R. T., Kawagoe, K. T., Schroeder, T. J., Leszczyszyn, D. J., Near, J. A., Diliberto, E. J., Jr. and Viveros, O. H.** (1991). Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (23): 10754-8.

**Wu, M. N., Littleton, J. T., Bhat, M. A., Prokop, A. and Bellen, H. J.** (1998). ROP, the *Drosophila* Sec1 homolog, interacts with syntaxin and regulates neurotransmitter release in a dosage-dependent manner. *Embo J* 17 (1): 127-39.

**Xia, Z., Zhou, Q., Lin, J. and Liu, Y.** (2001). Stable SNARE complex prior to evoked synaptic vesicle fusion revealed by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 276 (3): 1766-71.

**Xu, T., Rammner, B., Margittai, M., Artalejo, A. R., Neher, E. and Jahn, R.** (1999). Inhibition of SNARE complex assembly differentially affects kinetic components of exocytosis. *Cell* 99 (7): 713-22.

**Yamaguchi, T., Dulubova, I., Min, S. W., Chen, X., Rizo, J. and Sudhof, T. C.** (2002). Sly1 binds to Golgi and ER syntaxins via a conserved N-terminal peptide motif. *Dev Cell* 2 (3): 295-305.

**Yang, B., Steegmaier, M., Gonzalez, L. C., Jr. and Scheller, R. H.** (2000). nSec1 binds a closed conformation of syntaxin1A. *J Cell Biol* 148 (2): 247-52.

## 6 Zusammenfassung / Summary

### 6.1 Zusammenfassung

Die Calcium-abhängige Freisetzung von Neurotransmitter aus sekretorischen Organellen wird durch eine Reihe konservierter Proteinfamilien präzise reguliert. Hierzu zählen u.a. SNARE-Proteine (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein (SNAP) receptor ), Rab-GTPasen und SM-Proteine. SNARE-Proteine sind membranständige Proteine der Plasmamembran und der Vesikelmembran, deren gemeinsames Merkmal das 60-70 Aminosäuren umfassende SNARE-Motiv ist. Sie lagern sich spontan und irreversibel zu einem Vier-Helix-Bündel („core complex“) zusammen, wodurch sich die Proteine verkürzen und die Membranen einander angenähert werden, was die Voraussetzung für die Membranfusion darstellt. Die funktionelle Bedeutung von SNARE-Proteinen für die Membranfusion wird durch die Vergiftung von Zellen mit den clostridialen Neurotoxinen Tetanustoxin und Botulinustoxin deutlich, die einzelne SNAREs proteolytisch spalten und die Neurotransmission hemmen.

Das synaptische SM-Protein Munc-18-1 bindet hochaffin an das SNARE-Protein Syntaxin1. Hierbei konkurriert die Bindung von Munc-18-1 an Syntaxin1 mit dessen Einbindung in den *core complex*. Dies führte zu dem Modell, demzufolge Munc-18-1 durch seine Bindung an Syntaxin1 eine inhibitorische Rolle in der Exozytose übernimmt. Eine rein inhibitorische Funktion von Munc-18-1 läßt sich jedoch nicht mit seinem essentiellen Charakter für die Membranfusion in allen Spezies vereinbaren. Diese zentrale Rolle des Proteins im Membranfusionsvorgang ist jedoch weitgehend unverstanden. In jüngerer Zeit wurde vorgeschlagen, daß durch die Bindung von Munc-18-1 die Syntaxin1-Konformation verändert wird und hierdurch Syntaxin1 für den Übergang in den *core complex* vorbereitet wird. In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der Interaktion zwischen Munc-18-1 und Syntaxin1 für die Exozytose von sekretorischen Granulen neuroendokriner Zellen in einem kombinierten Ansatz aus biochemischen und elektrophysiologischen Methoden untersucht. Die Interaktion zwischen Syntaxin1 und Munc-18-1 wurde gestört, indem zum einen Munc-18-1 überexprimiert wurde und zum andern in die Syntaxin1-Bindungsregion des Munc-18-1-Moleküls Punktmutationen eingeführt wurden

(D34N und R39C). Nach der biochemischen Dokumentation der Störung der Syntaxin1-Bindung wurden die Mutanten sowie das Wildtyp- (WT-) Protein in der neuroendokrinen Zelllinie PC12 überexprimiert und die Folgen der Überexpression mit Hilfe der Kohlefaseramperometrie elektrophysiologisch charakterisiert. Die Überexpression des Munc-18-WT-Proteins hatte keinen Effekt, was eine inhibitorische Funktion des Proteins unwahrscheinlich macht. Die R39C-Mutante wies eine gewisse Restbindung an Syntaxin1 auf, wohingegen die Bindung der D34N-Mutante an Syntaxin1 vernachlässigbar war. Trotz dieser gleichsinnig veränderten Syntaxin1-Bindung hatten die Mutanten gegensätzliche Effekte auf die Häufigkeit exozytischer Ereignisse: die Zahl exozytischer Ereignisse war durch R39C vermindert und durch D34N erhöht.

Dies wies auf die Beteiligung eines weiteren Munc-18-1-Bindungspartners an den beobachteten Effekten hin, woraufhin die Interaktion von Mint1 mit Munc-18-WT, -D34N und -R39C charakterisiert wurde. Mint1 ist ein synaptisches PDZ-Domänen-Protein, das mit weiteren präsynaptischen Proteinen interagiert und somit an vielfältigen Protein-Interaktionen teilnimmt. Die Beobachtung, daß bei gleichzeitiger Anwesenheit von Syntaxin1 und Mint1 die D34N-Mutante und die R39C-Mutante unterschiedliche Proteininteraktionen bevorzugten (Mint1/Munc-18-Komplex, bzw. Munc-18/Syntaxin1-Komplex), führte zu der Hypothese, daß der stimulatorische Effekt der D34N-Mutante durch die beobachtete gehäuft auftretende Interaktion mit Mint1 verursacht wird. Eine elektrophysiologische Charakterisierung des Mint1-Proteins in PC12-Zellen zeigte, daß Mint1 eine Inhibition der Exozytose verursacht. Die stimulierende Wirkung der D34N-Mutante könnte somit auf eine vermehrte Interaktion mit Mint1 zurückzuführen sein, wodurch eine Disinhibition verursacht wird. Die R39C-Mutante entfaltete ihre inhibitorische Wirkung vermutlich nicht nur über die abgeschwächte Syntaxin1-Bindung sondern auch aus einer daraus resultierenden fehlenden (hypothetischen) Modifikation der Syntaxin1-Konformation.

Zusammengefaßt hat Munc-18-1 eine förderliche Funktion in der Exozytose sekretorischer Granulen. Diese Arbeit liefert keine Hinweise darauf, daß Munc-18-1 auf die Kinetik der Neurotransmitterfreisetzung aus der einzelnen Granule Einfluß nimmt, vielmehr scheint es die allgemeine Exozytosekompetenz der Granulen und der Zellen zu steuern. Es übt hierbei sowohl über die Interaktion

mit Syntaxin1 als auch mit Mint1 eine regulatorische Funktion in der Exozytose aus. Munc-18-1 ist über die Interaktion mit Mint1 vermutlich in vielfältige präsynaptische Komplexe involviert und könnte während der Membranfusion ein entscheidendes Bindeglied zwischen der Membranfusionsmaschinerie und strukturgebenden Komponenten der Präsynapse darstellen.

## 6.2 Summary

Calcium-dependent neurotransmitter release from secretory vesicles is a highly regulated process involving several evolutionary conserved protein families. These include SNARE-proteins (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein (SNAP) receptor), Rab GTPases as well as the family of cytosolic SM proteins. SNARE proteins are membrane-anchored proteins possessing a characteristic stretch of 60-70 amino acids termed the “SNARE motif”. Specific combinations of SNARE proteins are able to assemble into highly stable complexes of four parallel  $\alpha$ -helices via their SNARE motives, forming the so-called “core complex”. The assembly of SNAREs of vesicular and plasma membranes pulls the membranes in close apposition, a prerequisite for subsequent membrane fusion. The importance of SNARE proteins for membrane fusion becomes obvious when cells are poisoned with clostridial neurotoxins as Tetanus toxin or Botulinum toxin that cleave SNARE proteins proteolytically, eventually leading to the inhibition of neurotransmission.

The synaptic SM protein munc-18-1 has been originally identified by its high affinity interaction with the plasma membrane SNARE protein syntaxin1. The observation that binding of munc-18-1 to syntaxin1 precludes the formation of the core complex contributed substantially to the idea that munc-18 acts as an inhibitor of exocytosis by regulating the availability of syntaxin1 for SNARE complexes. Still, this does not explain why munc-18-1 is essential for membrane fusion. Thus, although munc-18-1 has a central role in membrane fusion, its precise function is little understood.

In this study, the role of the munc-18-1/syntaxin1 interaction in exocytosis of secretory granules in neuroendocrine cells was investigated. To this end, a combined biochemical and electrophysiological approach was chosen. We perturbed the munc-18-1/syntaxin1 interaction by overexpressing wildtype munc-18-1 protein and by introducing point mutations into the syntaxin-binding region of munc-18-1. Syntaxin-binding of the mutants was analysed biochemically in several binding assays followed by overexpression of the mutant proteins as well as the wildtype-protein in the neuroendocrine cell line PC12. The effects of overexpression were subsequently characterised by carbon fibre amperometry.

Overexpression of munc-18-WT protein did not affect exocytosis, making an inhibitory function of munc-18-1 in exocytosis unlikely. The point mutants used (munc-18-D34N and -R39C) showed a differentially reduced syntaxin1 binding. R39C still showed binding to syntaxin1, while D34N could not be detected in a complex with syntaxin1. Surprisingly, although both mutants had a reduced syntaxin1 binding ability, their effects on exocytosis were opposite: R39C caused a decrease in the number of exocytotic events, while D34N caused an increase.

This pointed towards the involvement of a further munc-18-1 binding partner. Thus, we characterised the interaction of munc-18-WT, -D34N, and -R39C with Mint1. Mint1 is a synaptic multidomain protein possessing a phosphotyrosine binding domain (PTB domain) as well as two PDZ domains that bind to further presynaptic proteins connecting Mint1 to numerous presynaptic protein complexes.

The observation that in the presence of syntaxin1 and Mint1, the preferred protein complex of D34N is different from the one preferred by R39C (Mint1/Munc-18 complex and Munc-18/syntaxin1 complex, respectively) led to the hypothesis that the stimulatory effect of the D34N mutant is caused by the more frequent interactions with Mint1 that were observed in this study. The electrophysiological characterization of Mint1 overexpression in PC12 cells showed an inhibitory effect. Thus, the stimulating effect of the D34N mutant may be explained by more frequent interactions with inhibitory Mint1 causing a disinhibition. In contrast, the R39C-mutant presumably exerts its effects via its perturbed syntaxin1-binding.

This study shows that munc-18-1 is not an inhibitory factor in exocytosis. The data presented here do not support a role for Munc-18 in control of kinetics of neurotransmitter release from individual granules, but rather suggest that Munc-18 acts more upstream of membrane fusion and influences exocytosis competence of secretory granules and cells. Munc-18-1 controls exocytosis by interacting with syntaxin1 as well as with Mint1. Munc-18 can be involved in numerous protein interactions at the synapse by its interaction with Mint1 and may represent an important link between the membrane fusion machinery via syntaxin1 and proteins organising the release site via Mint1.



## 7 Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintrisphosphat
complete™	Protease-Inhibitor-Cocktail, Roche (Mannheim)
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
FCS	fetal calf serum
GSH-Sepharose	Glutathion-Sepharose
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HRP	horse radish peroxidase
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktosid
LDCV	Large Dense Core Vesicle, Großes Elektronendichtes Vesikel
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulphat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TAE	Tris-Acetat/EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TE	Tris-EDTA
TEA	Tetraethylammonium
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WT	Wildtyp

## **8 Anhang**

### **8.1 Anmerkung**

Diese Arbeit wurde mit finanzieller Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 406 "Synaptische Interaktionen in Neuronalen Zellverbänden") angefertigt.

## **8.2 Akademische Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren die Damen/Herren in Marburg:

Aurich, Bart, Beato, Elsässer, Feuser, Fruhstorfer, Habermehl, Hartmann, Kern, Knöller, Koolmann, Lill, Lührmann, Müller, Niessing, Risau, Röhm, Schäfer, Schulz, Seitz, Seitz, Steinmetz, von Löw, Weihe.

### 8.3 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinen beiden Chefs, Prof. Reinhard Jahn und Prof. Dieter Bruns danken. Dank an Reinhard Jahn, der dem Projekt immer optimistisch und interessiert gegenüberstand und der in seinem Labor ein hervorragendes Umfeld für erfolgreiches und auch unterhaltsames Arbeiten bietet. Besonderen Dank an Dieter Bruns, denn ohne ihn hätte es dieses Projekt in dieser Form nicht gegeben. Sein Perfektionismus, seine Vielseitigkeit und Glaube an den Erfolg der Arbeit waren vier Jahr lang Motivation und Vorbild.

Herrn Prof. Eberhard Weihe möchte ich für die freundliche Übernahme der Betreuung dieser Doktorarbeit an der Universität Marburg danken.

Gottfried Mieskes sei bedankt für unendliche Geduld und grundsätzliche Gelassenheit im täglichen Laborchaos.

Thorsten Lang und Marcin Barszczewski möchte ich besonders ausdrücklich dafür danken, daß mit ihrer Zusammenarbeit die Analyse der Digitonin-behandelten und der NPY-EGFP überexprimierenden Zellen durchgeführt werden konnte.

Meine vielen Kollegen im Labor seien bedankt für die motivierte Arbeitsatmosphäre, die stetige Hilfsbereitschaft und das tägliche Gelächter. Besonderen Dank für die tatkräftige Unterstützung bei den vielen Alltäglichkeiten durch Matthias Böddener, Dagmar Diezmann, Victoria Dowe, Maria Druminski, Heike Löffler und Ursel Ries.

Besonders erwähnt sein sollen Stefan Pabst und Christina Schütte, die das Korrekturlesen dieser Arbeit übernommen haben.

Meinem Mann Ralf danke ich für seine unendliche, liebevolle Unterstützung, die ausführliche molekularbiologische Beratung, ständige Neugier und die kritische Durchsicht der Arbeit.

Meinen Eltern danke ich für die dreißig Jahre währende permanente Unterstützung, die hoffentlich auch weiterhin anhält.