

Funktionelle Analyse des Rab3/Rabphilin- Zyklus in Maus-Nullmutanten

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Oliver M. Schlüter
geboren am 24.07.1969
in Göttingen

- 2000 -

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1996 bis Oktober 2000 unter der Anleitung
von Dr. M. Geppert und Prof. Dr. T. C. Südhof
am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen,
angefertigt

Referent: Prof. Dr. K. Bauer

Koreferent: Prof. Dr. R. Jahn

Tag der Promotion: 06.12.2000

1	Einleitung.....	1
1.1	Komponenten synaptischer Vesikel.....	2
1.2	Synaptischer Vesikelzyklus	3
1.3	Rab3/Rabphilin-Zyklus.....	5
2	Zielsetzung.....	9
3	Material und Methoden	10
3.1	Geräte.....	10
3.2	Computerprogramme und Internetzugänge	11
3.3	Verbrauchsmaterialien.....	11
3.4	Chemikalien.....	12
3.5	Chemikalien für die Zellkultur	13
3.6	Kits.....	14
3.7	Antikörper.....	14
3.8	Plasmidvektoren	17
3.9	Genbibliotheken.....	17
3.10	Synthetische Oligonukleotide.....	17
3.11	Bakterienstämme	19
3.12	Zelllinien.....	19
3.13	Zuchttiere.....	19
3.14	Medien und Lösungen	20
3.15	Methoden.....	21
3.15.1	DNA-Amplifikation über die Polymerasekettenreaktion	21
3.15.2	Polymerasekettenreaktion für die Genotypisierung.....	21
3.15.3	Subklonierung von Plasmid-DNA.....	22
3.15.3.1	Herstellung elektrokompenter Bakterien	22
3.15.3.2	Transformation von Bakterien.....	22
3.15.3.3	Blau-weiß-Selektionstest.....	22
3.15.3.4	Testung auf gewünschte Klone über radioaktive Sonden.....	22
3.15.3.5	Testung auf gewünschte Klone über PCR	22
3.15.4	Präparation von DNA	23
3.15.4.1	Phenol/Chloroform-Extraktion.....	23
3.15.4.2	DNA-Präzipitation.....	23
3.15.4.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	23

3.15.4.4	Plasmidschnellpräparation.....	23
3.15.4.5	Plasmidpräparation hoher Reinheit	24
3.15.4.6	Präparation genomischer DNA aus Gewebeproben	24
3.15.5	Kurzlyseprotokoll für genomische DNA von Gewebeproben	24
3.15.6	DNA-Analyse	24
3.15.6.1	Konzentrationsbestimmung.....	24
3.15.6.2	Restriktionsverdau von DNA	24
3.15.6.3	DNA-Sequenzierung	25
3.15.7	Modifikation von DNA	25
3.15.7.1	Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA	25
3.15.7.2	Ligation von DNA.....	25
3.15.7.3	Zielgerichtete Mutationen, eingefügt über die Polymerase-Kettenreaktion..	25
3.15.7.4	Auffüllen und Verdau von überstehenden Enden nach Restriktionsverdau..	26
3.15.7.5	Radioaktive Markierung von DNA	26
3.15.8	DNA-Gelelektrophorese.....	26
3.15.9	DNA-Transfer auf Nylonmembranen nach Southern.....	26
3.15.10	Hybridisierung	27
3.15.11	Klonierung aus Phagen-Genbibliotheken.....	27
3.15.11.1	Screening einer Phagen-Genbibliothek	27
3.15.11.2	Phagenamplifikation.....	28
3.15.11.3	Präparation von lambda-Phagen-DNA.....	28
3.15.11.4	Subklonierung der genomischen Klone.....	28
3.15.11.5	Subklonierung der cDNA-Klone.....	28
3.15.12	Sequenzanalyse und Datenbanksuche	28
3.15.13	Gewinnung von Gewebehomogenaten.....	28
3.15.14	Extraktion von Membranproteinen mit Triton X-114.....	29
3.15.15	Subzelluläre Fraktionierung	29
3.15.16	Proteinpräzipitation	30
3.15.17	Präparation von Hexa-Histidin-Fusionsproteinen	30
3.15.17.1	Überexpression von Fusionsproteinen in E. coli.....	30
3.15.17.2	Reinigung von Fusionsproteinen.....	30
3.15.18	Immunisierung von Kaninchen	30
3.15.19	Methoden zur Proteinanalyse	31

3.15.19.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	31
3.15.19.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	31
3.15.19.3	Proteingelfärbung mit Coomassie Brilliant blue	31
3.15.19.4	Immunoblottanalyse.....	31
3.15.19.4.1	Protein-Transfer nach Western	31
3.15.19.4.2	Immunodetektion von Proteinbanden.....	32
3.15.19.4.3	Quantifizierung von Proteinbanden.....	32
3.15.20	Methoden für die Immuncytochemie.....	33
3.15.20.1	Fixierung von Mausgewebe.....	33
3.15.20.2	Bereitstellung von Gewebeschnitten	33
3.15.20.3	Gelatinebeschichtung von Objektträgern.....	33
3.15.20.4	Immunofärbung von Gewebeschnitten.....	34
3.15.21	Heterologe Expression in 293-Zellen	34
3.15.21.1	Einfrieren und Auftauen von eukaryontischen Zellen	34
3.15.21.2	Passagierung von eukaryontischen Zellen	34
3.15.21.3	Kultivierung von 293-Zellen	34
3.15.21.4	Transfektion über Calciumphosphat-Copräzipitate.....	35
3.15.21.5	Gewinnung von Zellhomogenaten.....	35
3.15.22	Herstellung rekombinanter embryonaler Mausstammzellen	35
3.15.22.1	Kultivierung von E14.1-Zellen	35
3.15.22.2	Kultivierung von embryonalen Mausfibroblasten	35
3.15.22.3	Transfektion von E14.1-Zellen.....	36
3.15.22.3.1	Vorbereitung des Rekombinationsvektors.....	36
3.15.22.4	Selektion von homolog rekombinierten E14.1-Zellen.....	36
3.15.22.5	Isolierung der resistenten Klone	36
3.15.22.6	Vorbereitung für die Blastozysten-Injektion	36
3.15.22.7	DNA-Isolierung aus in 96-Lochplatten kultivierten E14.1-Zellen	36
4	Ergebnisse.....	38
4.1	Klonierung und Charakterisierung von Rab3-Genen	38
4.2	Klonierung von Rab3 cDNAs.....	39
4.3	Rab3-Maus-Genstruktur	40
4.4	Charakterisierung von Rab3-Antikörpern	41
4.5	Triton X-114-Anreicherung von Rab3	43

4.6	Gewebeverteilung der Rab3-Isoformen.....	43
4.7	Proteinverteilung im Gehirn und in neuroendokrinen Drüsen	47
4.8	Verteilung der Rab3-Isoformen in der Hypophyse.....	48
4.9	Vergleichende Immunhistochemie der zerebralen Rab3-Verteilung	49
4.10	Subzelluläre Lokalisation der Rab3 Isoformen	52
4.11	Immunoisolation von synaptischen Vesikeln.....	54
4.12	Erzeugung und Phänotyp von Rab3-Nullmutanten.....	55
4.13	Veränderung der Proteinexpression in Rab3-Nullmutanten.....	58
4.14	Untersuchung der Wirkung von Rab3-Mutanten auf die Sekretion.....	59
4.15	Erzeugung und Phänotyp von Rabphilin-Nullmutanten.....	60
4.16	Analyse der synaptischen Komposition in Rabphilin-Nullmutanten	61
4.17	Morphologische Analyse der Rabphilin-Nullmutanten.....	61
4.18	Analyse der Rab3A-Lokalisation in Rabphilin-Nullmutanten	62
4.19	Analyse der Rab3A-Lokalisation in Rabphilin-Nullmutanten	63
4.20	Subzelluläre Lokalisation von Rab3A in Rabphilin-Nullmutanten	66
4.21	Synaptische Funktion in Rabphilin-Nullmutanten	66
4.22	Suche nach Rabphilin-Isoformen	67
5	Diskussion	72
5.1	Untersuchung synaptischer Funktionen über Maus-Nullmutanten	72
5.2	Genstruktur der Rab3-Isoformen.....	73
5.3	Lokalisation der Rab3-Isoformen.....	74
5.4	Die Rolle von Rab3-Isoformen im synaptischen Vesikelzyklus	75
5.5	Die Rolle von Rabphilin als Rab3-Effektor	77
5.6	Calcium-abhängige Funktionen von Rabphilin.....	78
5.7	Redundanz synaptischer Proteine.....	79
5.8	Die Funktion von Rabphilin.....	80
6	Zusammenfassung	81
7	Summary	82
8	Literaturverzeichnis.....	83
9	Anhang	97

Abkürzungen und Anglizismen

Viele wissenschaftliche Begriffe entstammen dem anglizistischen Wortschatz und können nur schwer ins Deutsche übersetzt werden. Die hieraus verwendeten Begriffe und Abkürzungen sind im folgenden erläutert:

3' oder 5'	Bezeichnung des Endes des DNA-Stranges, die die 3'- bzw. 5'-Hydroxylgruppe des Zuckers des DNA-Rückrats enthält.
α -Helix	Sekundärstrukturmotiv eines Proteins
AMBA	Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
BNPI	<i>brain Na⁺-dependent inorganic phosphate transporter</i>
BSA	Rinderserumalbumin
C2-Domäne	Proteindomäne, die erstmals in Proteinkinase C beschrieben worden ist und dort Ca ²⁺ und Phospholipide bindet
cAMP	cyclisches Adenosin-3', 5'-Monophosphat
cDNA	komplementäre DNA, die durch revers transkribierte mRNA erhalten wird
CDR	<i>complementarity-determining region</i>
cfu	<i>colony forming units</i>
<i>coiled coil</i>	Proteinkonformation aus einer Helix von α -Helices
<i>complementarity-determining region</i>	konservierte Proteinstruktur in Rab3-Proteinen, die die Bindungstasche für das SGAWF(F/Y) von Rab3-Effektoren bilden
CSP	<i>cysteine string protein</i>
CTAB	Cetyl-Trimethylammoniumbromid
C-terminal	am Carboxylende eines Proteins gelegen
dCTP	desoxy-Cytidintri-phosphat
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	äquimolare Desoxyribonukleotidtri-phosphatmischung
Doc2	<i>double C2 domain</i>
D-PBS	Dulbecco's PBS
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	<i>expressed sequence tag</i>

<i>frequency facilitation</i>	elektrophysiologisches Stimulationsprotokoll, das in Moosfaser-terminalen zu einer erhöhten Signalantwort nach hochfrequenter Stimulation führt
g	Erdbeschleunigung
GAD65	Glutamatdecarboxylase, 65 kD
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
GDI	GDP <i>dissociation inhibitor</i>
GDP	Guanosin-5'-Diphosphat
GFAP	Saures Glialfilament-Protein
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethylsulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
<i>insert</i>	in einen Vektor klonierte DNA-Sequenz
IPTG	Isopropyl-beta-thiogalactopyranosid
kb	1000 Basenpaare
K _D	Dissoziationskonstante
kD	Kilodalton
KO	Nullmutante
<i>lift</i>	durch Auflegen einer Nylonmembran auf Agar adsorbieren z.B. Phagen an dieser
LTP	<i>long term potentiation</i>
mRNA	<i>messenger-</i> oder Boten-RNA
Munc	<i>mammalian unc (uncoordinated movements) homolog</i>
NEB	New England Biolabs GmbH
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
<i>Northern blot</i>	über Kapillarwirkung erzielter RNA-Transfer vom Gel auf Membranen
NSF	<i>N-ethylmaleimide-sensitive factor</i>
N-terminal	am Aminoende eines Proteins gelegen
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>paired pulse facilitation</i>	Bei definierten Ca ²⁺ -Konzentrationen und bestimmten Synapsentypen ist die zweite Antwort zweier in kurzem Abstand erfolgter Stimulationen gegenüber der ersten erhöht.
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PC12	Tumorzelllinie aus einem Ratten-Phäochromozytom
PCR	Polymerasekettenreaktion
pfu	<i>plaque forming units</i>
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i> , thermophiler Bakterienstamm

pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMSF	Phenyl-Methylsulfonyl-Fluorid
PNS	<i>post nuclear supernatant</i>
<i>post nuclear supernatant</i>	Überstand einer Zentrifugation bei 1000x g eines Gewebehomogenates, durch die Zellkerne und Kern-haltige Zellen sedimentiert werden
PPF	<i>paired pulse facilitation</i>
Primer	synthetisch hergestellte einzelsträngige DNA, die z.B. als Startermoleküle für PCR-Reaktionen verwendet werden
PSD	Postsynaptische Verdichtungszone, die elektronenoptisch unter der postsynaptischen Membran sichtbar wird.
Rim	Rab3 <i>interacting molecule</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
SCAMP	<i>secretory carrier membrane protein</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SNAP	<i>soluble NSF-attachment protein</i>
SNAP-25	<i>synaptosome-associated protein of 25 kD</i>
SNARE	SNAP-Rezeptor
<i>Southernblot tag</i>	über Kapillarkwirkung erzielter DNA-Transfer vom Gel auf Membranen In dieser Arbeit als Bezeichnung für kurze an ein Protein angefügte Aminosäuresequenzen, über die es affinitätschromatographisch gereinigt werden kann oder die als Antigen für die Immunodetektion dienen
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> , thermophiler Bakterienstamm
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin
U	<i>Unit</i>
UTR	5' oder 3' gelegener nicht translatierter Sequenzabschnitt der mRNA
<i>Westernblot</i>	durch ein elektrisches Feld erzielter Protein-Transfer vom Gel auf Membranen
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-beta-Galactosid
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Lipidmembranen kompartimentalisieren eukaryotische Zellen in verschiedene Organellen. Die Kompartimentalisierung erlaubt die spezialisierte Funktion, definiert durch die spezifische Proteinausstattung, verschiedener unabhängiger zellulärer Prozesse. Zwischen den Organellen findet ein reger Stoffaustausch statt. Dabei schnüren sich vom Ursprungsorganell Vesikel ab, werden zum Zielorganell transportiert, um mit diesem zu verschmelzen. Es ist offensichtlich, daß diese Vorgänge reguliert werden müssen. Der großen Familie der Rab-Proteine und deren Effektoren wird eine entscheidende Rolle in der Steuerung dieser Membrantransportprozesse zugeschrieben. Über die Verschmelzung von Vesikeln mit der Plasmamembran (Exozytose) werden Botenstoffe in den Extrazellulärraum freigesetzt und können von anderen Zellen registriert werden. Dieser Vorgang ermöglicht die Kommunikation in vielzelligen Organismen. Der Exozytose entgegengesetzt ist die Endozytose, bei der Stoffe aus dem Extrazellulärraum aufgenommen werden, indem sich Vesikel von der Plasmamembran abschnüren.

Das Zentralnervensystem (Gehirn und Rückenmark) höherer Organismen ist für die Steuerung der Körperfunktionen entscheidend. In ihm hat die Zell-Zell-Kommunikation einen besonderen Stellenwert. Die synaptische Exozytose ist sowohl durch ihre Geschwindigkeit als auch ihre räumliche und zeitliche Präzision ausgezeichnet. Grundlage der funktionellen Vielfalt des ZNS sind die Nervenzellen mit ihrem komplexen Netzwerk an neuronalen Verbindungen und die unterstützenden Gliazellen. Dieses Netzwerk besteht im Menschen aus schätzungsweise 10^{11} Neuronen mit je 1000 synaptischen Kontakten (Kandel et al., 1991; Südhof, 1995). Synapsen sind die Schlüsselemente, über die Nervenzellen mittels Botenstoffen, die Neurotransmitter, kommunizieren. Die insgesamt 10^{14} Synapsen stellen unabhängige Schalteinheiten dar, die in großen Tieren mehrere Meter vom Zellkörper der Nervenzelle (Neuron) entfernt sein können. Diese hoch spezialisierten Strukturen werden aus den Nervenzellendigungen des sendenden Neurons (Axonterminale) und Fortsätzen (Dendriten) bzw. dem Zellkörper des empfangenden Neurons gebildet. Die Verbindungsstelle der Prä- (aktive Zone) und Postsynapse (post-synaptische Verdichtungszone) wird von einem dichten Proteingerüst an der Membran beider Zellen gebildet, die sich elektronenoptisch als synaptische Verdichtungen darstellen lassen. Präsynaptisch findet hier die Neurotransmitterfreisetzung aus synaptischen Vesikeln in den synaptischen Spalt und deren Registrierung an post- und präsynaptischen Rezeptoren statt. Die bisher bekannten Bestandteile der präsynaptischen aktiven Zone bilden Cytoskelettbestandteile, Spannungs-abhängige Ca^{2+} -Kanäle und die erst vor kurzem entdeckten Proteine Bassoon, Piccolo/Azconin, Rim und Munc13-1 (Garner et al., 2000; tom Dieck et al., 1998; Fenster et al., 2000; Wang et al., 1999; Wang et al., 1997; Brose et al. 1995).

Funktionell lassen sich tonisch aktive und phasisch aktive Synapsen unterscheiden. Erstere lassen sich im Gegensatz zu den phasisch aktiven Synapsen elektrophysiologisch durch andauernde Stimulation nicht erschöpfen (synaptische Depression). Ein Beispiel für tonisch aktive Synapsen sind die Verbindungen der Zapfen und Stäbchen der Retina mit den Bipolarzellen. Diese wiederum sind sowohl über phasisch als auch tonisch aktive Synapsen mit dem dritten Neuron, das den Sehnerven bildet, verknüpft. Die Präsynapse der Zapfen und Stäbchen ist über diskoide Proteinstrukturen, die *ribbons*, charakterisiert, die orthogonal zur aktiven Zone in

das Cytosol hineinreichen und als Anheftungsstelle für synaptische Vesikel dienen. Mit dieser Struktur werden die tonisch aktiven Synapsen der Anforderung einer kontinuierlichen Vesikelfreisetzung gerecht.

1.1 Komponenten synaptischer Vesikel

Synaptische Vesikel messen 50 nm im Durchmesser und stellen die häufigste Organellpopulation im Gehirn dar. Eine Synapse enthält im Mittel ca. 500 synaptische Vesikel, woraus sich eine Gesamtzahl von ca. 10^{17} synaptischen Vesikeln im menschlichen Gehirn ergibt (Jahn und Südhof, 1993). Nach Berechnungen enthält jedes einzelne 100 bis 200 Proteine mit einem mittleren Molekulargewicht von 50.000 und 8.000 bis 12.000 Phospholipide neben einem Anteil von 33 % Cholesterin (Jahn und Südhof, 1993; Fernández-Chacón und Südhof, 1999).

Für ihre Funktion benötigen synaptische Vesikel mindestens zwei Gruppen von Proteinen. Die Transportproteine beladen die Vesikel mit Neurotransmittern und die Verkehrsproteine steuern sie durch den synaptischen Vesikelzyklus. Zur Aufrechterhaltung eines elektrochemischen Gradienten für die Beladung und Speicherung von Neurotransmittern enthalten alle synaptischen Vesikel eine aus mindestens 13 Untereinheiten bestehende ATP-abhängige Protonenpumpe (Stevens und Forgac, 1997). Bisher sind vier vesikuläre Neurotransmittertransportergruppen kloniert worden. Der vesikuläre Monoamintransporter befüllt die Vesikel mit den Katecholaminen Noradrenalin und Dopamin, sowie Serotonin und eventuell Histamin (Liu und Edwards, 1997; Erickson et al., 1992). Dabei benutzt jedes Neuron nur einen Neurotransmitter, welcher durch die spezifischen Synthesenzyme und die Plasmamembrantransporter definiert ist. Acetylcholin kommt insbesondere im peripheren Nervensystem vor und wird über einen eigenen Transporter in Vesikeln konzentriert (Roghani et al., 1994). Der häufigste exzitatorische Neurotransmitter Glutamat wird über den Gehirn-spezifischen Phosphattransporter BNPI (VGLUT1) aufgenommen (Bellocchio et al. 1998, 2000; Takamori et al., 2000). Der vesikuläre GABA-Transporter befüllt die Vesikel sowohl mit Glycin als auch GABA, je nach enzymatischem Repertoire des Neurons und der Anwesenheit des plasmamembranständigen Glycintransporters (GlyT2) (McIntire et al., 1997; Jonas et al., 1998). Zusätzlich werden die Vesikel über einen Zn^{2+} -Transporter (ZnT-3) mit Zn^{2+} und über einen ATP-Transporter mit ATP beladen. Chloridkanäle regulieren den Anionenbedarf der Vesikel.

Die Funktion der Verkehrsproteine ist noch größtenteils unbekannt. Man nimmt an, daß der Mechanismus der Membranverschmelzung bei allen Transportwegen prinzipiell identisch ist. Für die Analyse ist somit die Kenntnis von Isoformen auf anderen Transportvesikeln als auch die phylogenetische Konservierung hilfreich.

Es kommen für die Proteine Synaptophysin mit Pantophysin, für Synaptogyrin mit Cellugyrin und für Synaptobrevin mit Cellubrevin ubiquitäre Isoformen vor. Synaptobrevin gehört zur Familie der SNARE-Proteine (Söllner et al., 1993; Rothman, 1994). Diese enthalten jeweils 1 bis 2 SNARE-Motive, eine ca. 60 Aminosäuren lange konservierte α -helikale Domäne (Weimbs et al., 1998). Der SNARE-Komplex ist SDS-stabil (Hayashi et al., 1994) und wird aus vier SNARE-Motiven gebildet (Terrian und White, 1997; Weimbs et al., 1997; Weimbs et al., 1998; Sutton et al., 1999). Dabei entsteht ein 40 nm langes Bündel aus vier α -Helices, die über hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert wird. Das Zentrum, *0-layer*, wird über ionische Wechselwirkungen von drei Glutaminresten und einem Argininrest gebildet. Dieses bildet die

Grundlage für die Klassifikation der SNARE-Proteine in Q-SNARE oder R-SNARE (Jahn und Südhof, 1999). In der Synapse wird der SNARE-Komplex aus den beiden plasmamembranständigen Syntaxin 1 und SNAP-25 und dem Vesikelprotein Synaptobrevin gebildet.

Für Synaptotagmin sind bisher 13 Isoformen bekannt, von denen viele nicht auf synaptischen Vesikeln vorkommen (Südhof und Rizo, 1996). Die SCAMP-Familie (fünf Isoformen) enthält ebenfalls synaptische Vesikel-spezifische als auch ubiquitäre Isoformen (Fernández-Chacón und Südhof, pers. Mitteilung). CSP kommt auf mehreren sekretorischen Vesikeln vor und könnte als vesikuläres Chaperon fungieren (Chamberlain and Burgoyne, 2000). Die Familie der kleinen GTP-Bindungsproteine Rab umfaßt mehr als 40 Isoformen, von denen wahrscheinlich jeweils einzelne auf allen Transportvesikeln zu finden sind. Die drei Isoformen von Synapsin und SV2, als auch SVOP und Rabphilin sind spezifische Marker von synaptischen Vesikeln. Synaptophysin I und II, als auch α -, β - und γ -Synuclein, drei präsynaptische Proteine, die auch an synaptische Vesikel binden, tauchen im Rahmen der Evolution erst bei den Vertebraten auf. Ihre Funktion kann insofern nicht essentiell für den synaptischen Vesikelzyklus sein, was auch in den milden Phänotypen der Synaptophysin I- und α -Synuclein-Maus-Nullmutanten deutlich wird (McMahon et al., 1996; Abeliovich et al., 2000).

1.2 Synaptischer Vesikelzyklus

Der synaptische Vesikelzyklus kann in mehrere Schritte aufgeteilt werden (Südhof, 1995; Fernández-Chacón und Südhof, 1999). 1. Transport der synaptischen Vesikel zur aktiven Zone: Aus einem Reserve-Pool werden einige Vesikel zur aktiven Zone transportiert.

2. Anheftung an die aktive Zone: 5 bis 20 synaptische Vesikel sind an die aktive Zone angeheftet. Studien in Endosomenfusionen und Membrantransport in Hefen lassen vermuten, daß Isoformen der Rab-Familie an diesem Schritt beteiligt sind (Pfeffer, 1999). So häufen Sec4-Mutanten post-Golgi-Vesikel an, die anscheinend nicht an die Plasmamembran anheften können (Salminen et al., 1987; Walworth et al., 1989). Die in analogen Schritten bisher identifizierten Proteine bilden lange *coiled coil*-Strukturen, wie p115 oder Uso1, oder einen großen Proteinkomplex, wie z.B. der Exocyst-Komplex. Auch einige synaptische Vesikel sind über lange Proteinbrücken (~100 nm) an die aktive Zone angeheftet (Landis et al., 1988; Hirokawa et al., 1989), deren Komponenten noch nicht identifiziert sind.

3. Reifung: Die angehefteten Vesikel müssen für die extrem schnelle durch Ca^{2+} -Einstrom-induzierte Transmitterfreisetzung vorbereitet werden. Dieser Zustand wird "fusionskompetent" genannt und definiert die Vesikel im *readily releasable pool*, d.h. die Vesikel, die über hyperosmolare Saccharoselösung freigesetzt werden können (Rosenmund und Stevens, 1996). Es wird vermutet, daß sich dafür der SNARE-Komplex zwischen Synaptobrevin, Syntaxin 1 und SNAP-25 in trans ausgebildet habe, im Gegensatz zum cis-Komplex, in dem alle drei Proteine nach der Fusion in einer Membran lokalisiert sind. Der Fusionsprozeß könnte auf dem Stadium der Hemifusion, der in einem viralen Modellsystem stabil ist, arretiert werden, oder der SNARE-Komplex könnte sich von distal bis zum *layer 0* ausgebildet haben, bevor der Calcium-Trigger die Fusion einleitet (Kemble et al., 1994; Melikyan et al., 1995; Jahn und Südhof, 1999; Chen et al., 1999; Xu et al., 1999).

Ohne Reifung ist die Liposomenfusion in einem *in vitro* Fusionssystem sehr langsam (Weber et al., 1998; Nickel et al., 1999). Die Analyse von Hefemutanten, bei der die Arretierung der Fusion

durch eine Mutation im Ypt1-Gen (Rab-Ortholog) durch die Überexpression von SNARE-Proteinen kompensiert wurde, deutet darauf hin, daß bei der SNARE-Komplexbildung wiederum Proteine aus der Rab-Familie beteiligt sein könnten (Lian et al., 1994; Lupashin and Waters, 1997; Schimmöller et al., 1998). Als Zwischenglied wird auch Munc18-1 diskutiert, welches Syntaxin 1 in der "geschlossenen" Konformation stabilisiert aber auch die SNARE-Komplexbildung unterstützt (Dulubova et al., 1999; Misura et al., 2000). Wiederum Kompensationsstudien von Hefemutanten im Ypt1-Gen zeigten, daß sich der funktionelle Block durch eine Mutation im Munc18-Ortholog Sly1 aufheben läßt (Dascher et al., 1991).

Tomosyn ist ein cytosolisches und Plasmamembran-assoziiertes Protein der Synapse, dessen Hefeisofomen an der Exozytose wesentlich beteiligt sind (Fujita et al., 1998; Lehman et al.; 1999). Dieses Protein kann Munc18-1 aus dem Komplex mit Syntaxin 1 verdrängen und zusammen mit SNAP-25 und Synaptotagmin einen neuen Komplex bilden, der die Bindung von Synaptobrevin und damit die Bildung des SNARE-Komplexes vorbereiten könnte (Fujita et al., 1998; Masuda et al., 1998).

Über Maus-Nullmutanten experimentell belegt ist der entscheidende Einfluß für die Reifung glutamaterger synaptischer Vesikel von dem aktiven Zonen-Protein Munc13-1 (Augustin et al., 1999; Brose et al., 2000).

4. Fusion: Ein Aktionspotential öffnet Spannungs-abhängige Ca^{2+} -Kanäle der aktiven Zone. Dies führt in 0,3 ms zur Neurotransmitterfreisetzung (Südhof, 1995). Die Exozytose in Chromaffin-Zellen ist beispielsweise 10mal langsamer (Chow et al., 1992). Die Vesikel fusionieren dabei mit der Plasmamembran (Heuser et al., 1979) oder bilden nur eine transiente Fusionspore, die jedoch für die komplette Transmitterfreisetzung ausreichen könnte (Chow et al., 1992; Neher, 1993; Alvarez de Toledo et al., 1993; Alés et al., 1999). Die Stimulation selbst ist ineffizient, da von den fusionskompetenten Vesikeln nur eines pro drei bis zehn Aktionspotentialen fusioniert (Hessler et al., 1993; Rosenmund et al., 1993). Elektrophysiologisch lassen sich eine schnelle synchronisierte und eine langsame asynchronisierte Komponente bei der synaptischen Glutamatfreisetzung beobachten (Goda und Stevens, 1994). Über die beteiligten Proteine gibt es noch widersprüchliche Befunde. Die Bildung des SNARE-Komplexes erfolgt derart, daß die Membranverankerungen auf einer Seite zu liegen kommen (Hanson et al., 1997). Die Bildung der stabilen *coiled coil*-Struktur könnte die Energie liefern, um die abstoßenden Kräfte bei der Zusammenführung beider Membranen zu überwinden (Jahn und Hanson, 1998). So könnten die SNARE-Proteine die minimale Fusionsmaschinerie bilden, da sie, eingebracht in unterschiedliche Liposomen, die Membranen, wenn auch nur langsam, fusionieren (Weber et al., 1998; Nickel et al., 1999). Experimente über die homotypische Vakuolenfusion in Hefe und die corticale Vesikelfusion in Seeigelleiern deuten darauf hin, daß die komplette Fusion der Membranen eventuell auch nach Wiederauflösung des SNARE-Komplexes stattfindet (Ungermann et al., 1998; Coorssen et al., 1998).

Als vesikulärer Ca^{2+} -Rezeptor könnte Synaptotagmin I fungieren (Perin et al., 1990; Brose et al., 1992). So fehlt in Maus-Nullmutanten von Synaptotagmin I die synchronisierte schnelle Komponente der Exozytose (Geppert et al., 1994). Andere Versuche deuten darauf hin, daß die SNARE-Komplexbildung selbst Ca^{2+} -abhängig ist, obwohl α -Latrotoxin Tetanustoxin-sensitive Exozytose auch in Abwesenheit von Ca^{2+} auslösen kann (Chen et al., 1999; Stahl et al., 1996). Weiterhin ist bei intrazellulären Membranfusionsprozessen zumindest die Vakuolenfusion in Hefe in einem späten Schritt durch Ca^{2+} /Calmodulin getriggert (Peters und Mayer, 1998).

5. Endozytose: Leere synaptische Vesikel werden wahrscheinlich über "clathrin coated"-Vesikel endozytiert (Heuser und Reese, 1973). Synaptotagmin I interagiert Ca^{2+} -unabhängig über die C2B-Domäne mit AP2 und kann als Rezeptor für den Endozytoseweg dienen (Zhang et al., 1994; Li et al., 1995; Jörgensen et al., 1995). Die kontinuierliche Vesikelfusion in *ribbon*-Synapsen ist mit 500 Quanten pro Sekunde zwanzigmal schneller als an konventionellen Synapsen (von Gersdorff und Matthews, 1999). Die Anheftungszone der Vesikel steht in diesen Synapsen orthogonal zur aktiven Zone, so daß die bei der Fusion freigesetzte Membran lateral zur Exozytosestelle internalisiert werden kann. Im Gegensatz dazu findet in konventionellen Synapsen Anheftung, Exozytose und Endozytose in einer Ebene statt, wodurch eine sterische Behinderung der ankommenden und sich abschnürenden Vesikel in der Nähe der Ca^{2+} -Kanäle vorstellbar ist.

6. Transport in den Reserve-Pool oder das frühe Endosom: Nach Entfernung des "clathrin"-Mantels gelangt ein Großteil direkt wieder in den Reserve-Pool ohne einen früh-endosomalen Zwischenschritt (Murthy und Stevens, 1998; Fischer von Mollard et al., 1994). Der auf synaptischen Vesikeln enthaltene endosomale Marker Rab5 könnte die Fusion mit dem frühen Endosom regeln (Sulzer und Holtzman, 1989; Fischer von Mollard et al., 1994; de Hoop et al., 1994). Bei der Fusion entstehen cis-SNARE-Komplexe, so daß die synaptischen Vesikel entweder mit den Plasmamembranproteinen Syntaxin 1 oder SNAP-25 angereichert werden oder aber Synaptobrevin verlieren, wenn der Komplex nach Endozytose in der Plasmamembran verbleibt. Die Zwischenschaltung des frühen Endosoms könnte auf diese Weise gealterte synaptische Vesikel überholen.

7. Abschnürung synaptischer Vesikel vom frühen Endosom: Neue synaptische Vesikel entstehen durch die Abknospung vom frühen Endosom (Südhof 1995).

Während des Zyklus werden die synaptischen Vesikel mit Neurotransmitter beladen und cis-SNARE-Komplexe über α -SNAP und NSF unter ATP-Verbrauch wieder für eine neue Runde gespalten (Südhof, 1995; Brünger, 2000).

1.3 Rab3/Rabphilin-Zyklus

In den synaptischen Vesikelzyklus ist der Rab3/Rabphilin-Zyklus integriert. Die Rab-Proteine, die, wie in Hefemutanten gezeigt, essentiell für den intrazellulären Membrantransport sind, bilden eine große Familie (Novick and Zerial, 1997). Rab-Proteine binden in ihrer GTP-Form über hydrophobe Modifikationen am C-Terminus an Membranen (Farnsworth et al., 1991; Johnston et al., 1991). Durch GTP-Hydrolyse werden sie inaktiviert und über GDI ins Cytosol transferiert (Matsui et al., 1990; Araki et al., 1990; Ullrich et al., 1993; Chou und Jahn, 2000). Über Austauschfaktoren katalysierter GDP/GTP-Austausch setzt GDI frei, und Rab-Proteine binden an ihre Zielmembran und werden wie im Falle von Rab3 auf diese Weise in die Synapse geleitet (Moya et al., 1993; Wada et al., 1997; Iwasaki et al., 1997). Ihre reversible Bindung an Transportvesikel macht sie zu idealen Kandidaten für die Kennzeichnung der Vesikel für ihren Bestimmungsort (Bourne, 1988; Simons und Zerial, 1993). Chimäre Rab-Proteine funktionieren jedoch in zwei Transportwegen, und auch die Familie der SNARE-Proteine umfaßt eine große Gruppe, so daß Rab-Proteine wohl nicht allein für die Zielbestimmung verantwortlich sein dürften (Brennwald und Novick, 1993; Dunn et al., 1993; Söllner et al., 1993). Analog zum ras/raf-System rekrutieren über GTP aktivierte Rab-Proteine Effektoren an die Organellen (Stahl

et al., 1996). Die bisher identifizierten potentiellen Effektoren der einzelnen Rab-Proteine bilden eine heterogene Gruppe, so daß über sie die speziellen Anforderungen der Rab-Proteine in den einzelnen Membrantransportwegen vermittelt werden.

Die Unterfamilie der Rab3-Proteine umfaßt die Proteine Rab3A, B, C und D (Matsui et al., 1988; Touchot et al., 1987; Baldini et al., 1992), von denen Rab3A und C auf synaptischen Vesikeln vorkommen (Mizoguchi et al., 1990; Fischer von Mollard et al., 1990 und 1994). Rab3D wurde aus einer Adipocyten-Zelllinie kloniert und auf Zymogengranula nachgewiesen, wohingegen die Lokalisation von Rab3B in der Adenohypophyse und nahe den *Zonulae occludens* von Epithelzellen angegeben wird (Baldini et al., 1992; Valentijn et al., 1996; Lledo et al., 1993; Weber et al., 1994). Rab3A bindet sowohl an angeheftete als auch freie synaptische Vesikel. Auf der Plasmamembran und auf *clathrin*-bemantelten Vesikeln ist es jedoch nicht nachweisbar (Matteoli et al., 1991; Maycox et al., 1992). Als potentielle Effektoren für Rab3 wurden Rabphilin, Rim 1 und 2 identifiziert (Shirataki et al., 1993; Li et al., 1994; Wang et al., 1997; Wang et al. 2000). Beide Gruppen enthalten C-terminal ein Doppel-C2-Domänenmotiv wie Synaptotagmin I oder Doc2. Im Gegensatz zu den Rim-Isoformen enthalten sie in Rabphilin die für Ca^{2+} -Bindung konservierten Aspartatreste. Die C2B-Domäne von Rabphilin bindet zwei Ca^{2+} -Ionen mit einer Dissoziationskonstanten von 7 und 11 μ M (Ubach et al., 1999). Die Ca^{2+} -Affinität ist somit 10 bis 100fach höher als die von Synaptotagmin I. Ein weiterer Unterschied ist die Präferenz von Rabphilin für Phosphatidylinositol-4, 5-Bisphosphat im Gegensatz zu negativ geladenen Phospholipiden von Synaptotagmin I. (Chung et al., 1998). Die Bindung an aktiviertes Rab3A verursacht nur geringe Konformationsänderungen in beiden Proteinen (Ostermeier et al., 1999). Die Konformationen der Rab3A *switch I*- und *switch II*-Regionen sind abhängig von der Nukleotidbindung und regulieren darüber die Affinität zu Rabphilin. Eine weitere Region bildet eine hydrophobe Tasche, die sich spezifisch an ein "SGAWF(F/Y)"-Motiv der Rab3-Effektoren anschmiegt. Diese CDR-Region ist für die spezifische Interaktion mit den Rab3-Effektoren verantwortlich und nur in der Rab3-Unterfamilie konserviert.

Rabphilin unterliegt einer Hirnregion-spezifischen Phosphorylierung mit einer Betonung der CA3-Region des Hippocampus über Proteinkinase A und eine Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase II und kommt sowohl auf synaptischen Vesikeln als auch cytosolisch vor (Lonart und Südhof, 1998; Fykse et al., 1995; Li et al., 1994; Shirataki et al., 1994). Die in den Rim-Isoformen vorkommende PDZ-Domäne ist wahrscheinlich für die Lokalisation von Rim 1 an der aktiven Zone verantwortlich, wo es mit aktiviertem Rab3 an angehefteten Vesikeln interagieren kann.

Funktionell dissoziieren Rab3A und C durch Ca^{2+} -Einstrom-induzierte Exozytose von synaptischen Vesikeln (Fischer von Mollard et al., 1991 und 1994). Die Dissoziation wird durch Botulinus- und Tetanustoxin inhibiert und kann nur in Anwesenheit von Ca^{2+} durch α -Latrotoxin getriggert werden. Die Rabphilin-Dissoziation ist ebenfalls von Ca^{2+} getriggert Exozytose abhängig (Stahl et al., 1996). Die erneute Bindung von Rab3 und Rabphilin an synaptische Vesikel findet wahrscheinlich bald nach Abspaltung des *clathrin*-Mantels nach Endozytose statt. In heterologen Expressionssystemen inhibieren konstitutiv GTP-aktivierte Rab3-Mutanten die Exozytose (Brondyk et al., 1993; Chung et al.; 1999). Diese Inhibition ist unabhängig von der Bindung an Rabphilin, wie durch Rab3-Mutanten, die nicht mehr Rabphilin binden, gezeigt wurde (Chung et al., 1999). Calmodulin bindet Ca^{2+} -abhängig an Rab3A und verursacht hierdurch die Dissoziation von synaptischen Vesikeln *in vitro* (Park et al. 1997). Die inhibi-

torische Wirkung von Rab3A in heterologen Expressionssystemen kann durch Mutation der Calmodulin-Bindungsstelle (R66L, R70T) aufgehoben werden (Coppola et al., 1999).

Im Gegensatz zur inhibierenden Wirkung von Rab3A wird in zwei Veröffentlichungen eine stimulierende Wirkung der Exozytose von Rab3B in der Adenohypophyse und in PC12-Zellen aufgezeigt (Lledo et al., 1993; Weber et al., 1996). Durch Injektionen von *antisense*-Oligonukleotiden gegen Rab3B wurde die Ca^{2+} -abhängige Exozytose von laktotropen Zellen der Adenohypophyse inhibiert. Oligonukleotide gegen Rab3A zeigten hingegen keine Wirkung. Der direkte Vergleich der Überexpression von Rab3A und B in PC12-Zellen führte zu entgegengesetzten Effekten (Weber et al., 1996). Rab3A inhibierte die Noradrenalin-Freisetzung, während Rab3B sie verstärkte.

Neben der Interaktion mit Rab3 bindet Rabphilin an α -Actinin, Rabaptin und β -Adducin (Miyazaki et al., 1994; Kato et al., 1996; Ohya et al., 1998). Basierend auf diesen multiplen Interaktionen erzeugte die heterologe Expression von Rabphilin bzw. die Injektion von rekombinanten Proteinen oder von Peptiden in Axonterminale verschiedenste Effekte. So inhibierten die selben N-terminalen Fragmente die Exozytose von corticalen Vesikeln in Seeigel-Oozyten und in Nervenendigungen von *Aplysia* (Masumoto et al., 1996; Burns et al., 1998), während die Exozytose in PC12-Zellen, Chromaffinzellen und pankreatischen β -Zellen gesteigert wurde (Chung et al., 1995; Komuro et al., 1996; Arribas et al., 1997). Weiterhin inhibierte Rabphilin auch die Endozytose (Burns et al., 1998; Ohya et al., 1998).

Im Gegensatz zu Rab-Mutanten in Hefe, die z.B. im Falle von Ypt1 und Sec4 einen Block in dem abhängigen Membrantransportweg verursachen, beeinflusst die Deletion von Rab3A die Vesikelfreisetzung in Mäusen vergleichsweise geringfügig (Geppert et al. 1994). Obwohl Rab3A für 25 % der zerebralen GTP-Bindung verantwortlich ist, überleben Maus-Rab3A-Nullmutanten ohne sichtbare Auffälligkeiten. Unterschiede zeigen sich z. B. erst nach tetanischer Stimulation hippocampaler Nervenverbindungen, in denen die Vesikelfreisetzung der Mutanten schneller erschöpft. Eine detaillierte Analyse ergab, daß in den Mutanten pro erfolgreichem Aktionspotential im Vergleich zu Kontrolltieren doppelt so viele Vesikel fusionieren (Geppert et al., 1997). Dies drückt sich auch in einer im Vergleich zu Kontrolltieren erniedrigten Antwort nach doppelter Stimulation in kurzem Abstand (*paired pulse facilitation*) aus. In den Mutanten ist die Menge von Rabphilin nicht jedoch um 70 % verringert. Rab3A ist für die synaptische Lokalisation von Rabphilin notwendig, da in Synapsen, die Rab3A als einzige Isoform enthalten, Rabphilin nicht mehr nachweisbar ist (Li et al., 1994).

Im Gegensatz zu Synapsen der CA1-Region ist die Induktion der Langzeitpotenzierung (LTP) in den Moosfaserterminalen unabhängig von Glutamatrezeptoren der NMDA-Unterfamilie und hat eine präsynaptische Proteinkinase A-abhängige Komponente (Nicoll und Malenka, 1995; Weisskopf et al., 1994). In den Rab3A-Nullmutanten fehlt bei unveränderter Kurzzeit-synaptischer Plastizität die Langzeitpotenzierung (Castillo et al., 1997). Wie in Synaptosomen gezeigt, könnte mechanistisch hierfür die fehlende cAMP-Verstärkung des Exozytoseapparates eine Rolle spielen (Lonart et al., 1998).

Analog zu den Maus-Nullmutanten zeigen auch Mutanten der einzigen Rab3-Isoform in *Caenorhabditis elegans* nur milde Verhaltensauffälligkeiten (Nonet et al., 1997). Die cholinerge Transmission scheint in diesen Tieren jedoch vermindert zu sein, und auch die Vesikelverteilung

in der Synapse ist verändert. Die Anzahl ist an der aktiven Zone deutlich vermindert, während sie in der Synapsenperipherie gegenüber den Kontrolltieren erhöht ist.

2 Zielsetzung

Die synaptische Neurotransmitterfreisetzung ist eine spezialisierte Form der Exozytose, die durch ihre hohe Geschwindigkeit, die präzise Regulation und die örtliche Spezialisierung charakterisiert ist. Mittlerweile ist ein Großteil der synaptischen Vesikelproteine, die diese Prozesse regulieren, kloniert worden. Hierbei fällt auf, daß für viele dieser Proteine Isoformen auf anderen Membrantransportwegen vorkommen und nur wenige wie z.B. Synapsin oder Rabphilin Synapsen-spezifisch sind.

Die Isoformen Rab3A, B, C und D bilden eine Unterfamilie der kleinen GTP-bindenden Proteine. Für Rab3A und C konnte bisher eine Funktion in der Neurotransmitterfreisetzung gezeigt werden. Rab3A ist mit 25 % der GTP-Bindungskapazität im Gehirn das abundanteste GTP-bindende Protein. Daher war der vergleichsweise geringe Funktionsausfall in Rab3A-defizienten Mäusen überraschend. Mutationen in Rab-Isoformen anderer Membrantransportprozesse führten vornehmlich in Hefe zum kompletten Funktionsverlust. Rab-Proteine rekrutieren Effektoren an die Zielmembran und steuern somit Zeit und Ort ihrer Wirkung. Rabphilin stellt den ersten identifizierten Effektor der gesamten Rab-Familie dar und ist von *Caenorhabditis elegans* bis hin zu den Vertebraten konserviert. Andere Ergebnisse zeigten jedoch, daß Rab3A über Rabphilin rekrutiert wird. Die Menge an Rabphilin war in den Rab3A-Nullmutanten um 70 % reduziert und in den Moosfaserterminalen der CA3-Region überhaupt nicht mehr nachweisbar.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Gewebe- und subzellulären Verteilung der Rab3-Isoformen. Dieses bildete die Basis für die funktionelle Charakterisierung dieser Proteinfamilie. Es stand insbesondere die synaptische Lokalisation im Vordergrund, um mögliche redundante Funktionen identifizieren zu können. Im Vergleich zu *Drosophila melanogaster* und *C. elegans* sind Maus-Nullmutanten einem weiteren Spektrum an biochemischen, morphologischen und elektrophysiologischen Untersuchungsmethoden zugänglich, so daß für diese Untersuchungen Mehrfach-Nullmutanten für die Rab3-Isoformen erstellt wurden.

Verknüpft mit der Funktion von Rab3 ist die der Effektoren, so daß die potentielle Rolle von Rabphilin als Rab3-Effektor untersucht werden sollte. Im Mittelpunkt stand hier die Frage, ob die Defizite der Rab3A-Nullmutanten auf die reduzierte Rabphilin-Menge zurückzuführen waren. Die funktionelle Analyse sollte mit Hilfe von Maus-Rabphilin-Nullmutanten durchgeführt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Agarosegelsysteme	Life-Technologies Gibco-BRL GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen und Kontruktionen der Instituts-werkstatt
Cryostat, Jung CM 3000	Leica, Bensheim
DNA-Sequencer 373 Stretch	Applied Biosystems, Weiterstadt
E. coli Pulser	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Epifluoreszenzmikroskop, Axiophot	Zeiss GmbH, Jena
Filmentwickler Curix 60	Agfa-Gevaert GmbH, Martsel, Belgien
Fluo-Link	Biometra, Göttingen
Flüssigkulturenschüttler Innova 4000	New Brunswick Sience GmbH, Nurtigen
Fujix BAS 5000	Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt
Gefriermikrotom CM 1325	Leica, Bensheim
Gen-Pulser Elektroporationssystem II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Konfokales Mikroskop MRC 1024	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mehrkanalpipette, 12-Pette, 10 – 200 µl	Costar GmbH, Bodenheim
Mehrkanalpipette, zwölf-fach, 1 – 10 µl	Südlaborbedarf GmbH, Gauting
Mikroplattenreplikator	Merk eurolab GmbH, Hannover und Konstruktionen der Instituts-werkstatt
PCR-Maschine Uno II	Biometra, Göttingen
pH-Meter	Knick, Schütt GmbH, Göttingen
Potter Elvehjem, 15 ml	Wheaton, Schütt, Göttingen
Potter Elvehjem, 2 ml	Glas-Col, Schütt, Göttingen
Potter Elvehjem, 30 und 60 ml	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen
Präparierbesteck	martin, Karl Grosse GmbH, Braunschweig
Proteingelsysteme, Mini-PROTEAN II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Spektralphotometer	Beckmann Instruments GmbH, München und Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Sterilwerkbänke	Haereus GmbH, Hanau
Thermomax microplate reader	Molecular Devices, MWG-Biotech AG, Ebersberg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge, Biofuge 13	Haereus GmbH, Hanau
Ultra Turrax, T8	IKA, Schütt GmbH, Göttingen
Ultrafine Juwelier Pinzette 11 cm	Medicon Instrumente, Tuttlingen
Ultraschallbad	Branson, Schütt GmbH, Göttingen
Ultraschall-Homogenisator Labsonic U	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen

Videogeldokumentationsanlage	Intas GmbH, Göttingen
Zentrifuge, 5403	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, Megafuge 3.0R	Haereus GmbH, Hanau
Zentrifuge, Optima TLX und Optima L60	Beckmann Instruments GmbH, München
Zentrifuge, RC-5B Plus	Sorvall GmbH, Bad Homburg

3.2 Computerprogramme und Internetzugänge

Excel	Microsoft, Seattle, USA
LaserGene Navigator	DNA-Star Inc., Madison, USA
MacBas Version 2.3	Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
OligoOrder Vers. 1.0.1	Applied Biosystems, Weiterstadt
Swiss Institute for Experimental Cancer Research (ISREC)	http://www.isrec.isb-sib.ch/

3.3 Verbrauchsmaterialien

Bio Spin P30, Chromatographiesäule	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Biomax-5K, Ultrafiltrationseinheit	Millipore GmbH, Eschborn
Column PD-10, Sephadex G-25 M	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
ECL-Röntgenfilme	Amersham-Buchler GmbH & Co., Braunschweig
Elektroporationsküvetten 1 mm oder 4 mm Elektrodenabstand	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Fettmarkerstift für die Immuncytochemie	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
Hybond-N ⁺ Nylon-Membranen	Amersham-Buchler GmbH & Co., Braunschweig
Kunststoffgefäße	Brandt, Costar, Falcon, Greiner, Sarstedt
Nitrocellulose Transfermembran, Protran 0,2 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
Nitrocellulose-Filter (Durchmesser 137 mm) Typ HA, 0,45 µm	Millipore GmbH, Eschborn
Phase Lock Gel I heavy	5 Prime - 3 Prime, Boulder, Colorado, USA
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme	Kodak, Integra Biosciences GmbH, Fernwald
SuperFrost Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Verstärkerfolie für Autoradiographie-kassetten	Du Pont de Nemours GmbH, Bad Homburg
Whatman 3MM Chr	Whatman International Ltd, Maidstone, England

3.4 Chemikalien

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$	Amersham-Buchler GmbH & Co., Braunschweig
2,2,2-Tribromethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Agarose	Life-Technologies Gibco-BRL GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen
Alkalische Phosphatase	Boehringer Mannheim GmbH
AMBA	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ammoniumperoxodisulfat	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ampicillin	BioMol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Bacto-Agar	Difco Laboratories GmbH, Augsburg
Bacto-Agar	Difco Laboratories GmbH, Augsburg
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories GmbH, Augsburg
Bacto-Trypton	Difco Laboratories GmbH, Augsburg
beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Coomassie Blue R250	BioMol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
DNA-Längenstandard <i>lamda BstE II</i>	New England Biolabs, Schwalbach
dNTP	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
DTT	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
ECL-Reagenzien	Amersham-Buchler GmbH & Co., Braunschweig
Einbettmedium	Jung, Leica, Nussloch
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Extran	Merck, Darmstadt
Ficoll 400	Pharmacia Biotch GmbH, Freiburg
Freud'sches Adjuvans	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Gelatine	DIFCO Laboratories GmbH, Augsburg
IPTG	BioMol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Klenow-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach
Lachsspermien-DNA	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Lysozym	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Molekulargewichtsstandard für SDS-PAGE "low" und "high"	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mung-Bean-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach
Ni^{2+} -NTA-Agarose-Matrix	Qiagen AG, Hilden
N-Lauroylsarkosin	Sigma-Aldrich-GmbH, Deisenhofen
N-Propylgallat	Sigma, Deisenhofen
PBS-Puffertabletten	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
PEG 8000	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
<i>Pfu</i> -Polymerase	Stratagene GmbH, Heidelberg

Phenol, puffergesättigtes Phenol	Life-Technologies Gibco-BRL GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen
Polyvinylpyrrolidon	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Ponceau S	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
PowerScript DNA Polymerase Mix	PAN Systems GmbH, Aidenbach
Proteaseinhibitor-Cocktail-Tabletten	Boehringer Mannheim GmbH
Proteaseinhibitoren: Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin A, PMSF	Boehringer Mannheim GmbH
Proteinase K	Boehringer Mannheim GmbH
Quick clone cDNA aus Rattengehirn	Clontech, Palo Alto, USA
Restriktionsendonukleasen	Boehringer Mannheim GmbH oder New England Biolabs, Schwalbach
RNase DNase free	Boehringer Mannheim GmbH
SDS	Boehringer Mannheim GmbH
T4 DNA Polymerase, 3'-5' ssDNA Exonuklease-, keine 5'-3' Exonuklease-aktivität	Boehringer Mannheim GmbH
T4 DNA-Ligase	Boehringer Mannheim GmbH
T4 DNA-Polymerase	Boehringer Mannheim GmbH
<i>Taq</i> -Polymerase	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
TEMED	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
Triton X-100	Boehringer Mannheim GmbH
Triton X114, 10 %ige Lösung	Pierce, Rockford, Illinois, USA
Trockenmilchpulver	Glücksklee Magermilchpulver, Nestle Deutschland AG, Frankfurt/Main
Tween 20	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
X-Gal	BioMol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Ziegenserum	Life-Technologies Gibco-BRL GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck GmbH (Darmstadt) in p.A. Qualität bezogen.

3.5 Chemikalien für die Zellkultur

2-Mercaptoethanol "cell culture tested"	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
DMEM mit 4,5 g/l D-Glucose	Life-Technologies Gibco-BRL GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen
DMEM/25mM HEPES	Life-Technologies Gibco-BRL GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen

DMEM-Pulvermedium mit L-Glutamin, 4,5 g/l D-Glucose, ohne Natriumpyruvat	Life-Technologies Gibco-BRL GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen
D-PBS	Life-Technologies Gibco-BRL GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen
ESGRO-LIF	Life-Technologies Gibco-BRL GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen
Fötales Rinderserum	HyClone, Erembodegen-Aalst, Belgien
Fötales Rinderserum, hitzeinaktiviert	Life-Technologies Gibco-BRL GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen
Gangciclovir	Roche AG, Basel, Schweiz
L-Glutamin, 100x	Life-Technologies Gibco-BRL GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen
MEM nichtessentielle Aminosäuren, 100x	Life-Technologies Gibco-BRL GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen
Mineralöl	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Mitomycin C	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Neomycin (G418-Sulfat)	Life-Technologies Gibco-BRL GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen
Penicillin/Streptomycin, 500x, 50000 IU/ml	Boehringer Mannheim GmbH
Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin	
Trypsin-EDTA, 1x	Life-Technologies Gibco-BRL GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen

3.6 Kits

BCA Protein Assay-Kit	Pierce, Rockford, Illinois, USA
PCR-Script Klonierungs-Kit	Stratagene GmbH, Heidelberg
Plasmid Mini, Midi und Maxi-Kits	Qiagen AG, Hilden
Prime-It II - Random Primer Labeling-Kit	Stratagene GmbH, Heidelberg
QIAamp Tissue-Kit	Qiagen AG, Hilden
Qiaex II-Kit	Qiagen AG, Hilden
QIAquick PCR Purification-Kit	Qiagen AG, Hilden

3.7 Antikörper

Es wurden die unten angegebenen primären Antikörper verwendet. Die Bezugs- oder Literaturquelle ist angegeben.

Aktin	AC-40	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
α -, β -Synuclein	Q698	Dr. R. Janz, Houston, Texas, USA
α -Actinin	EA-53	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
α SNAP	I373	McMahon und Südhof, 1995

α -Tubulin	DM1 α	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
β -Tubulin	TUB2.1	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Complexin 1	L668	McMahon et al., 1995
Complexin 1 und 2	P942	Synaptic Systems, Göttingen
Complexin 2	L669	McMahon et al., 1995
CSP		Dr. B. Stahl
Doc2A	Maus anti Doc2A	Transduction Laboratories, Lexington, USA
Dynamin	E765	Robinson et al., 1993
GAPDH	6G5	Biotrend, Köln
GDI	CI81.3	Chou und Jahn, 2000
GDI	D633	Shisheva et al., 1994
GFAP	Maus anti GFAP	Boehringer Mannheim GmbH
Glutamatdecarboxylase	Maus anti GAD65	Biotrend, Köln
Hexahistidin	Maus anti Peptide „RGSHHHH“	Qiagen AG, Hilden
IP3-Rezeptor	T210	Mignery et al., 1989
MAP-2	Maus anti MAP-2	Boehringer Mannheim GmbH
Mint	P932	Prof. Dr. T.C. Südhof, Dallas, Texas, USA
mSEC7	SA3613	H. Koch
Munc13-1	3H5	Betz et al., 1998
Munc13-2	SA3452	Augustin et al., 1999
Munc13-3	SA3450	Augustin et al., 1999
Munc18	I370	Prof. Dr. T.C. Südhof, Dallas, Texas, USA
Neurofilament-68	NR4	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Neurologin I	4C12	Song et al., 1999
Neurologin I und III	4F9	Song et al., 1999
NMDA-R1	CI54.1	Brose et al., 1994
NSF	I372	McMahon und Südhof, 1995
PSD95	P918	Synaptic Systems, Göttingen
Rab3	CI42.1	Matteoli et al., 1991
Rab3	SA5838	T. Jo
Rab3	SA5839	T. Jo
Rab3A	583	Synaptic Systems, Göttingen
Rab3A	CI42.2	Matteoli et al., 1991
Rab3B	U953	O.M. Schlüter
Rab3B	U954	O.M. Schlüter
Rab3C	P180	Castillo et al., 1997
Rab3C	P181	Castillo et al., 1997
Rab3C	S9	Prof. Dr. R. Jahn

Rab3D	antiR3D #2	T. Jo
Rab3D	antiR3D #3	T.Jo
Rabaptin	R321	Dr. Y. Wang, Dallas, Texas, USA
Rabphilin	Maus anti RP	Transduction Laboratories, Lexington, USA
Rabphilin (AS 1-360)	Cl76.2	Prof. Dr. R. Jahn
Rabphilin (AS 1-361)	I734	Li et al., 1994
Rabphilin (AS 361-527)	Cl84.2	Prof. Dr. R. Jahn
Rabphilin (AS 366-684)	I731	Li et al., 1994
Rim	Maus anti Rim	Transduction Laboratories, Lexington, USA
Rim	Q703	Wang et al., 1997
SCAMP	P936	Synaptic Systems, Göttingen
SNAP-25	I733	McMahon und Südhof, 1995
Synapsin I	P610	Rosahl et al., 1995
Synapsin I und II	E028	Rosahl et al., 1995
Synaptobrevin 1	P938	Synaptic Systems, Göttingen
Synaptobrevin 2	Cl69.1	Edelmann et al., 1995
Synaptobrevin 2	P939	Synaptic Systems, Göttingen
Synaptogyrin	P925	Synaptic Systems, Göttingen
Synaptophysin I	580	Synaptic Systems, Göttinger
Synaptophysin I	Cl7.2	Prof. Dr. R. Jahn
Synaptophysin I	P611	Fykse et al., 1993
Synaptophysin II	α p37	Fykse et al., 1993
Synaptotagmin I	V216	Perin et al., 1990
Synaptotagmin II	I735	Rosahl et al., 1995
Syntaxin	Cl78.2	Prof. R. Jahn
Syntaxin	I379	McMahon und Südhof, 1995
Tyrosin Hydroxylase	Maus anti TH	Boehringer Mannheim GmbH

Zur Detektion wurden folgende sekundäre Antikörper verwendet:

Affinitätsgereinigter Kaninchen-anti-Maus-IgG (H+L) Antikörper	Jackson ImmunoResearch Lab., West Grove, USA
Affinitätsgereinigter Ziege-anti-Kaninchen-IgG (H&L) konjugiert mit Cy2, λ_{\max} : 489 nm, ϵ_{\max} : 505 nm	Rockland, Gilbertsville, USA
Affinitätsgereinigter Ziege-anti-Maus-IgG (H&L) konjugiert mit Cy3.29, λ_{\max} : 552 nm, ϵ_{\max} : 565 nm	Rockland, Gilbertsville, USA)
Affinitätsgereinigter Ziege-anti-Maus-IgG (H&L) konjugiert mit Cy2	Rockland, Gilbertsville, USA
Affinitätsgereinigter Ziege-anti-Kaninchen-IgG (H&L) konjugiert mit Cy3.29	Rockland, Gilbertsville, USA

Affinitätsgereinigter Ziege-anti-Maus-IgG (H&L) konjugiert mit Cy5.29, λ_{\max} : 650 nm, ϵ_{\max} : 667 nm	Rockland, Gilbertsville, USA
Affinitätsgereinigter Ziege-anti-Maus (H&L) konjugiert mit HRP	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Affinitätsgereinigter Ziege-anti-Kaninchen (H&L) konjugiert mit HRP	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

3.8 Plasmidvektoren

pcDNA3: 5,4 kb (Invitrogen, Groningen, Niederlande). Eukaryontischer Expressionsvektor mit Ampicillin-Resistenz-Gen, einem CMV "promotor/enhancer" Element, einer BGH Polyadenylierungskassette, einem SV40 Replikationsstartelement und einer Neomycinresistenz-Expressionskassette (Neo^R) zur Selektion von stabilen Transfektanten.

pBluescript II SK+: 2,9 kb (Stratagene GmbH, Heidelberg). Klonierungsvektor mit Ampicillin-Resistenz-Gen mit hoher Kopienzahl und der Möglichkeit zur Testung von rekombinanten Klonen über β -Galaktosidase-Expressionstest.

pTK-Neo 3a: ca. 8 kb (Rosahl et al., 1993). Klonierungsvektor zur Klonierung von Rekombinationsvektoren für die homologe Rekombination. In den Mehrfachklonierungsbereich von pBluescript II wurden zwei Thymidinkinase-(TK) und eine Neomycinresistenz-Expressionskassette (Neo^R) mit RNA-Polymerase II-Promoter kloniert. Als singuläre Restriktionsschnittstellen sind zwischen TK und Neo^R *Sall* und *Clal* und 3' von der Neo^R *BamHI*, *SpeI*, *NotI* und *SacII* vorhanden.

pHO2c: 5,7 kb. Bakterieller Expressionsvektor mit Ampicillin-Resistenz-Gen zur Expression von C-terminalen Hexahistidin-Fusionsproteinen. Der Vektor wurde aus einem Expressionsvektor der pET-Familie (Novagen, Madison, USA) kloniert.

3.9 Genbibliotheken

5'-STRETCH plus cDNA-Phagenbibliothek aus Rattenherzgewebe (Chargennummer 3443)	Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg
Lambda FIX II genomische Phagenbibliothek aus der Mauslinie 129SvJ	Stratagene GmbH, Heidelberg

3.10 Synthetische Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden vom institutseigenen Oligosyntheselabor hergestellt und sind anhand der Synthesenummer bezeichnet.

337:	GCGGATCCCATATGAGACACGAAGCTCCC
338:	GCGGATCCAATCTGAAGCTTGATTCT
428:	GAGCGCGCGCGGCGGAGTTGTTGAC
470:	GCGTTTCTGGCAAGGGCA
471:	GCGATCGATGCCAACCGT

475: GGCTTCAGTGACAGATGG
476: GCGCTGCAGCTTCACACG
477: GCGGCATCCGCTAGTGAG
478: GCGGTCATGTCGGTAGACC
500: GCCATCGATATGGCAAGCACCTCCATGTC
501: GCCATCGATACTCAGTTACCAAGGGGCAG
540: CGCATCGATCTCCTACACAGCCATGCAG
541: CGCATCGATGGTACCCTAGTTGTCAATACAAGGTCAAG
569: CCTAAGAATCATGTCCTGAGAGATGCC
570: GCGGGCTTTGCATAGTTCA
571: GCGAGGTCTAACTCAGGT
572: GCGAGTTTGGAGTCACCT
573: GCGCCAGTAGAGCAAACA
637: GGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGA
737: GGGAACAGCAGCGTGGGCAAAC
874: CGCATCGATGAATTCTGCAGCATAAAAATGTAATGCCATTCCATCTCAGCC
931: CATATGGCTTCAGTGACTGATGGTAAGACTGG
932: GAATTCTGCTGCAGCAGAGGTGGGG
978: GGCCGCTCTAGCCCGGGCGGATCCACTAGTCTGCAGG
979: AATTCCTGCAGACTAGTGGATCCGCCCCGGGCTAGAGC
1143: CTGCTCATCATTGGCAACAGCAGCG
1145: CTGAAGGAAGGGGTGCTCCAGAGGG
1147: GGAATCGTCGGCATAACGGAACAGG
1149: GCCATCTCTCCAGCCCTTGTTTGTC
1151: CTCCAGTTATGTAGGCAAGGCTAGCC
1189: GGATGCTGACGTGTAAAACCTGGGATGC
1209: TCAGCAGGCACAATCCTGATGAGG
1212: CTAACAGCTGCAGCTGCTCGGCTG
1213: TTAGCAGCCACAGTTGGGCTGTGG
1236: CGGGATCCGCTTCCGCCACAGACTCTCGC
1237: CGGGATCCGCTTCCGCCACAGACTCTCGC
1238: CGGGATCCGCCTCTGCACAAGATGCCAGG
1239: CGGGATCCGCATCCGCTAGTGAGCCCCC
1673: CTCACAGAGATCTGCCTCCATCTCCC
1674: GGGTCACTGCAAGGCCACTTAGTCAC
1717: GAGCAAGTTCAGCCTGGTTAAGTCC
1724: CAATCGTGAGTCCTCACAAACACCC
2029: CGGGATCCACCATGGCTTCCGCCACAGACTCTCGCTAT
2030: GGGACACAGCAGGTCTAGAGCGGTACCGCACC

2031: GGTGCGGTACCGCTCTAGACCTGCTGTGTCCC
 2037: GGAATTCTCAGCAGGCACAATCCTGATGAGG
 2038: CGGGATCCACCATGGCTTCAGTGACTGATGGTAAGACTGG
 2039: GGAATTCCTAGCAAGAGCAGTTCTGCTGGAG
 2040: CGGGATCCACCATGAGACACGAGGCGCCCATGCAGATGGCCTCTGCACAAG
 ATGCCAGGTTTG
 2041: GGGACACAGCAGGTCTAGAAAGATACAGGACCATC
 2042: GATGGTCCTGTATCTTTCTAGACCTGCTGTGTCCC
 2043: GGAATTCTTAGCAGCCACAGTTGGGCTGTGG
 2044: CGGGATCCACCATGGCATCCGCTAGTGAGCCCCCT
 2047: GGAATTCCTAACAGCTGCAGCTGCTCGGCTG
 2216: GAGGTGGGAACCAGACCCGTCC
 2217: CCTGCCGTGTCCCATATCTGCAG

3.11 Bakterienstämme

Klonierungen und Überexpressionen wurden mit den folgenden *Escherichia coli*-Bakterienstämmen (*E. coli*) durchgeführt:

BB4	Stratagene GmbH, Heidelberg
XL1-Blue	Stratagene GmbH, Heidelberg
BL21(DE3)pLysS	Novagen, Madison, USA
C600hfl	Clontech, Heidelberg
MRA(P2)	Stratagene GmbH, Heidelberg

3.12 Zelllinien

293 Zellen: Diese Zelllinie wurde durch Transfektion von menschlichem embryonalen Nierengewebe mit Adenovirus Typ 5 DNA-Fragmenten immortalisiert (Graham et al., 1977).

MEF: Embryonale Primärkulturen aus Mausfibroblasten (GenomeSystems, St. Louis, USA).

E14.1: Omnipotente embryonale Mausstammzelllinie aus der Mauslinie 129SV (Hooper et al., 1987). Freundlicherweise von Prof. Dr. K. Rajewsky, Köln, zur Verfügung gestellt.

3.13 Zuchttiere

Die Mauslinie C57Black6/J wurden vom Tierzuchtbetrieb Elevage Janvier, Le Genest St Isle, Frankreich, bezogen und im institutseigenen Tierhaus gezüchtet. Sie wurde für die Blastozystengewinnung und Verpaarungen der chimären Mäuse verwendet.

Wistar-Ratten für die Gewinnung von Gewebeproben und Chinchilla-Kaninchen für die Immunisierung wurden ebenfalls aus den institutseigenen Tierställen bezogen.

Die Maus-Rim 1-, Rab3A-, C- und D-Einfach-Nullmutanten wurden von Prof. Dr. T. C. Südhof, Dr. M. Geppert und T. Jo freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.14 Medien und Lösungen

Falls nicht anders angegeben, beziehen sich die Konzentrationsangaben auf wässrige Lösungen, die mit Hilfe von vollentsalztem Wasser (H₂O) hergestellt wurden.

Ampicillin-Stammlösung, 200x:	20 mg/ml
Denaturierungslösung:	1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH.
Denhardt's Lösung, 50x:	1 % Rinderserumalbumin; 1 % Ficoll 400; 1 % Polyvinylpyrrolidon
Homogenisationspuffer	320 mM Saccharose; 10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4; 0,1 mM EDTA
Hybridisierungslösung:	Prähybridisierungslösung mit radioaktiv markierter DNA-Sonde
IPTG-Stammlösung, 1000x:	30 mg/ml
LB-Kulturschalen:	15 g/l Bacto-Agar in LB-Medium, autoklaviert. Bei Selektionsmedien erfolgte die Zugabe der Antibiotika nach Abkühlung auf 50°C.
LB-Medium:	10 g/l NaCl; 10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; autoklaviert.
LB-Selektionsmedium:	LB-Medium mit Antibiotikazugabe direkt vor Gebrauch.
LB-Top-Agar:	LB-Medium mit 0,7 % Agarose
Neutralisierungslösung:	1,5 M NaCl; 1 M Tris/HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA
PBS:	8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na ₂ HPO ₄ *7 H ₂ O, 0,24 g/l KH ₂ PO ₄ *H ₂ O, pH 7,4
Prähybridisierungslösung:	50 % Formamid; 5x Denhardt's; 1,5 % SDS; 5x SSC; 0,1 mg/ml denaturierte Lachsspermien-DNA (Denaturierung durch fünfminütiges Kochen direkt vor Gebrauch der Lösung). Für Northernblotts wurde SSPE anstelle von SSC verwendet.
SDS-Probenpuffer	50 mM Tris/HCl, pH 6,8; 3,3 % SDS; 30 % Glycerin; 0,03 % Bromphenolblau; 50 mM DTT
SM-Puffer	5,8 g/l NaCl; 2 g/l MgSO ₄ *H ₂ O; 50 ml/l 1 M Tris/HCl, pH 7,5; 5 ml/l 2 % Gelatine, autoklaviert
SSC, 20x:	3 M NaCl; 0,3 M Na ₃ -Citrat
SSPE, 20x:	3 M NaCl; 0,2 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,4; 20 mM EDTA
TAE, 50x:	242 g Tris; 57,1 ml Eisessig; 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
TBS, 10x:	0,2 M Tris/HCl, pH 7,4; 1,4 M NaCl

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 8; 1 mM EDTA.
X-Gal-Stammlösung, 1000x: 50 mg/ml in DMF

3.15 Methoden

3.15.1 DNA-Amplifikation über die Polymerasekettenreaktion

Saiki, et al. 1988

Für die Amplifikation von DNA wurden verschiedene Matrizen verwendet: 1 ng revers transkribierter mRNA aus Mausgehirn, 1 µl genomische Maus-DNA oder 1 pg Plasmid-DNA. Für die Gen-Klonierung wurden die *Pfu*-Polymerase oder die Polymerasemischung *PowerScript* verwendet, wobei sich erste durch eine geringere Fehlerrate und zweite durch erhöhte Produktmenge auszeichneten. Die verwendeten Primer wurden auf eine optische Dichte bei 260 nm von 5 eingestellt. Ein typischer PCR-Ansatz hatte folgende Komponenten:

1 µl	Matrizen-DNA
5 µl	10x Reaktionspuffer
10 µl	5x Enhancer (nur <i>PowerScript</i>)
1 µl	50 mM MgCl ₂ (nur <i>PowerScript</i>)
1,4 µl	Primer 1
1,4 µl	Primer 2
1 µl	40 mM dNTP
0,5 µl	<i>Pfu</i> (5 U/µl) bzw. 1 µl <i>PowerScript</i> (2,5 U/µl)
ad 50 µl	H ₂ O.

Initial erfolgte eine Denaturierung für 5 min bei 94°C. Die Zyklenzahl betrug 30 bis 45 Zyklen, wobei die Synthesezeit der letzten 20 Zyklen um je 10 s verlängert wurde. Die Schmelzzeit betrug 30 s, -temperatur 94°C, die Hybridisierungszeit 30 s und die Synthesetemperatur 72°C. Die Synthesezeit betrug zu Beginn 2 min pro 1000 bp. Die Hybridisierungstemperatur wurde 2 bis 10°C unterhalb der mit dem Programm OligoOrder bestimmten Schmelztemperatur gewählt.

3.15.2 Polymerasekettenreaktion für die Genotypisierung

Die Reaktion in 25 µl wurde einem selbst optimierten TNK-Puffer (Blanchard et al., 1993), 0,5 µl 100 mM dNTP und einer 1 U *Taq*-Polymerase verschiedener Hersteller durchgeführt. Die Primer wurden mit Hilfe des OligoOrder-Programms gewählt, so daß der GC-Gehalt ca. 50-60 %, die Länge 24-26 Basen und die Schmelztemperatur 59-64°C betrug. Die Zyklenparameter wurden wie oben angegeben eingestellt.

TNK-Puffer, 10x: 100 mM Tris/HCl pH8,5; 15 mM MgCl₂; 500 mM KCl; 50 mM NH₄Cl

3.15.3 Subklonierung von Plasmid-DNA

3.15.3.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Ein Liter LB-Medium wurden 1:100 mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C im Schüttelinkubator bei 300 rpm kultiviert. Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase bei einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,5 bis 0,7 wurden die Bakterien durch Zentrifugation (15 min, 4000x g, 4°C) geerntet. Die Bakterien wurden nachfolgend mit einem Liter, 0,5 l und 0,25 l eiskalter, steriler 10 %iger Glycerinlösung gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Bakterienpellet in 4 ml 10 %iger Glycerinlösung resuspendiert und in Aliquots auf in einem Trockeneis/Isopropanol-Bad vorgekühlte Reaktionsgefäße verteilt. Über mehrere Monate behielten die Bakterien eine Transformationseffizienz von bis zu 10⁹ cfu/μg pBluescript II SK bei Lagerung bei -80°C.

3.15.3.2 Transformation von Bakterien

Ein Aliquot der elektrokompetenten Zellen wurde auf Eis aufgetaut. 20 bis 40 μl Bakteriensuspension wurden mit bis zu 5 μl Plasmidlösung in H₂O in eine Elektroporationskuvette mit 0,1 cm Elektrodenabstand gefüllt. Die Elektroporation erfolgte bei 1,8 kV im E. coli-Pulser. Unmittelbar anschließend wurden die Zellen in 300 μl LB-Medium aufgenommen und auf LB-Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.15.3.3 Blau-weiß-Selektionstest

Die Multipleklonierungsstelle in den Vektoren pBluescript II SK und pCR-Script war im lacZ-Gen enthalten. Bakterienkolonien, die Vektoren mit in die Multipleklonierungsstelle eingefügter DNA enthielten, ließen sich durch β-Galaktosidase-Expressionstests als weiße Kolonien identifizieren. Vor Ausstreichen der transformierten Bakterien wurden die LB-Selektionsplatten mit 30 μl IPTG-Stammlösung und 30 μl X-Gal-Stammlösung ausgestrichen.

3.15.3.4 Testung auf gewünschte Klone über radioaktive Sonden

Die transformierten Bakterien wurden auf Nylonfiltern auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Filter wurde auf ein Filterpapier gelegt und eine Kopie durch Auflegen eines zweiten Nylonfilters erhalten (*replica*). Nach Markierung der Orientierung wurde die Kopie auf die Selektionsplatte gelegt und für weitere 4 h bei 37°C inkubiert. Zur Lysierung der Bakterien wurde der Originalfilter 5 min auf ein mit 10 %iger SDS-Lösung getränktes Filterpapier gelegt. Die Denaturierung der DNA erfolgte nach Transfer für 5 min auf ein mit Denaturierungspuffer getränktes Filterpapier. Anschließend wurde der Filter 5 min auf einem mit Neutralisierungspuffer getränktem Filterpapier inkubiert und die DNA auf dem noch feuchten Filter bei 1 J/cm² im Fluo-Link vernetzt. Bakterienreste wurden mit 2x SSC abgewaschen. Die Hybridisierung der *Bakterienlifts* erfolgte wie weiter unten beschrieben.

3.15.3.5 Testung auf gewünschte Klone über PCR

Einzelkolonien der LB-Selektionsplatten wurden in 100 μl LB-Selektionsmedium in 96-Lochplatten für mehrere Stunden bei 37°C inkubiert. Der PCR-Reaktionsansatz wurde in 96-Loch-PCR-Reaktionsplatten vorgelegt und die Reaktion nach Zugabe von ca. 1 μl Bakterienlösung über einen Mikroplattenreplikator gestartet. Der PCR-Reaktionsansatz enthielt einen Vektor-spezifischen und einen *insert*-spezifischen Primer.

3.15.4 Präparation von DNA

3.15.4.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Denaturierung von Proteinen wurde die DNA-Lösung mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform-Mischung versetzt. Zur Phasentrennung wurde der Ansatz 5 min bei 15000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde mit gleichem Volumen Chloroform extrahiert und nach Trennung die Phasen durch erneute Zentrifugation getrennt. Die DNA aus der oberen wässrigen Phase wurde gefällt.

Phenol/Chloroform-Mischung: Puffergesättigtes Phenol / Chloroform im Volumenverhältnis von 1:1

3.15.4.2 DNA-Präzipitation

Die DNA-Lösung wurde auf eine NaCl-Konzentration von 200 mM eingestellt und mit zwei Volumina Ethanol gefällt. Die DNA wurde 10 min bei 15000 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in H₂O gelöst, so daß eine DNA-Konzentration von 0,5 bis 1,5 µg/µl resultierte.

3.15.4.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Gelbanden wurden unter der UV-Handlampe (312 nm) ausgeschnitten und mit Hilfe des Qiaex II Kits nach Herstellerangaben isoliert.

Gelstücke mit DNA-Fragmenten größer als 20 kb wurden mit zwei Volumen puffergesättigtem Phenol versetzt und eingefroren. Die Proben tauten während der zehnmütigen Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei 15000 rpm zur Phasentrennung auf. Die DNA aus der oberen wässrigen Phase wurde mit Chloroform extrahiert und gefällt und anschließend in 30 µl H₂O gelöst.

3.15.4.4 Plasmidschnellpräparation

Del Sal et al., 1988

Zur Testung auf den gewünschten Klons nach Ligation wurden 1 ml für Plasmide mit hoher Kopienzahl oder 5 ml LB-Selektionsmedium für Plasmide mit niedriger Kopienzahl in Reaktionsgefäßen bzw. 15 ml Röhrchen mit Einzelkolonien angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden 1 min in Reaktionsgefäßen in der Tischzentrifuge bei 10000 rpm bzw. 10 min bei 3500 rpm in der Schwingrotorzentrifuge geerntet. Das Pellet wurde in 200 µl STET aufgenommen und nach Zugabe von 4 µl Lysozymlösung 5 min unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden anschließend für 1 min bei 100°C behandelt. Zelltrümmer und denaturierte Proteine wurden 5 min bei 15000 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und mit einem Zahnstocher entfernt. Die DNA wurde durch Zugabe von 8 µl 5 %ige CTAB-Lösung präzipitiert und 10 min bei 15000 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde die DNA in 300 µl 1,2 M NaCl-Lösung unter kräftigem Schütteln gelöst und nach Zugabe von 750 µl Ethanol gefällt. Die DNA wurde wie oben erwähnt abzentrifugiert, der Überstand verworfen und nach Trocknung bei Raumtemperatur in 20 bis 30 µl H₂O gelöst. 3 bis 5 µl der Präparation wurden einem analytischen Restriktionsverdau unter Zugabe von 1 µl RNase pro Ansatz unterzogen, um den gewünschten Klon zu identifizieren.

STET: 8 % Sucrose; 0,1 % Triton X-100; 50 mM EDTA; 50 mM Tris/HCl, pH 8

Lysozymbilösung: 50 mg/ml Lysozym

3.15.4.5 Plasmidpräparation hoher Reinheit

Für Sequenzierungen und Transfektion eukaryontischer Zellen wurde Plasmid-DNA hoher Reinheit benötigt. Hierfür wurden die Mini- und Midi-Kits von der Firma Qiagen verwendet und nach Herstellerangaben vorgegangen.

3.15.4.6 Präparation genomischer DNA aus Gewebeproben

5 mm Schwanzspitze von Mäusen wurden in 200 µl SNET mit Proteinase K über Nacht bei 55°C lysiert. Die DNA wurde mit 400 µl Phenol/Chloroform-Gemisch extrahiert. Der Ansatz wurde in ein Phase Lock Gel I heavy-Gefäß überführt und die Phasentrennung nach 10minütiger Zentrifugation bei 15000 rpm in der Tischzentrifuge erreicht. Die wässrige Phase wurde mit 400 µl Chloroform extrahiert und die Phasen durch kurze Zentrifugation getrennt. Die DNA wurde gefällt und in 50 µl H₂O über Nacht gelöst.

SNET: 20 mM Tris/HCl pH 8,0; 5 mM EDTA; 1 % SDS; 400 mM NaCl

Proteinase K: 100 µg/ml frisch eingewogen

3.15.5 Kurzlyseprotokoll für genomische DNA von Gewebeproben

Jackson Laboratory, Main Harbor, USA

2 mm Schwanzspitzen von Mäusen wurden in 1,2 ml fassende collection tubes überführt und in 200 µl PBND mit 5 µl 10 %iger Proteinase K-Lösung über Nacht bei 55°C lysiert. Der Ansatz wurde 10 min im kochenden Wasserbad inkubiert. Ca. 1 µl der Lösung wurde mit einem Mikroplattenreplikator für PCR-Reaktionen verwendet.

PBND: 10 mM Tris/HCl, pH 8,3; 50 mM KCl; 2,5 mM MgCl₂; 0,1 mg/ml Gelatine; 0,45 % (v/v) Nonidet P40; 0,45 % (v/v) Tween 20; autoklaviert.

3.15.6 DNA-Analyse

3.15.6.1 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Plasmid-DNA nach Isolierung über das Plasmid Mini- oder Midi-Kit wurde über die Absorption bei 260 nm im Photometer bestimmt. Dabei entspricht eine DNA-Konzentration von 50 µg/ml einer optischen Dichte von eins. Ansonsten wurde die DNA-Konzentration nach Agarosegelelektrophorese im Vergleich zu der Intensität der Ethidiumbromid gefärbten Banden des Längenstandards λ BstE II ermittelt.

3.15.6.2 Restriktionsverdau von DNA

Für analytische Zwecke wurden 0,5 bis 2 µg Plasmid-DNA in 25 µl Gesamtvolumen über eine Stunde mit 1 bis 5 U eines oder mehrerer Restriktionsendonukleasen verdaut. Der Inkubationspuffer und die Inkubationstemperatur wurden nach Empfehlung des Enzymherstellers gewählt. Die Fragmente wurden durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und das Restriktionsmuster mit Hilfe der Videogeldokumentationsanlage dokumentiert.

Für präparative Zwecke wurden bis zu 10 µg Plasmid-DNA in 50 bis 100 µl Gesamtvolumen verdaut. Die Isolation des Vektors (Fragment, das die Anteile des Plasmides enthält, die für die

Propagation in Bakterien notwendig sind) erfolgte nach Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese mit Hilfe des Qiaex II-Kits oder, falls nur Fragmente kleiner 20 bp abgetrennt wurden, durch Fällung. Die übrigen Fragmente wurden mit Hilfe des Qiaex II-Kits gereinigt.

3.15.6.3 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden nach einer modifizierten Methode nach Sanger et al., 1977 durchgeführt. Die Sequenz aller subklonierten PCR-Produkte, von Teilen aller Rekombinationsvektoren und aller Expressionskonstrukte wurde über die DNA-Sequenzierung überprüft. Plasmid-DNA wurde auf eine Konzentration von 100 ng/µl und PCR-Produkte auf 10-30 ng/µl eingestellt. Die Sequenzierung erfolgte über das institutseigene Sequenzierlabor.

3.15.7 Modifikation von DNA

3.15.7.1 Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA

Nach Restriktionsverdau der Plasmid-DNA wurde der Ansatz vierfach mit H₂O verdünnt. Nach Zugabe des 10fach konzentrierten Inkubationspuffers des Herstellers und 1 U pro µg DNA alkalischer Phosphatase wurde der Ansatz 2-4 h bei 37°C inkubiert. Die Proteine wurden über Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt und die DNA anschließend in H₂O aufgenommen.

3.15.7.2 Ligation von DNA

20 bis 100 ng Vektor-DNA wurden mit ca. der dreifachen molaren Menge der einzufügenden DNA (*insert*) in einem Endvolumen von 30 µl vermischt. Die Reaktion erfolgte im mitgelieferten Puffer mit 1 U T4-DNA-Ligase über Nacht bei 16°C.

Bei der Ligation von nicht kohesiven Enden (*blunt end*) wurde die Reaktion für 2-4 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Ein Teil des Ansatzes wurde in Bakterien transformiert.

Die Ligation von PCR-Produkten mit nicht kohesiven Enden erfolgte in den Vektor pCR-Script II. 25 ng Vektor-DNA verdaut mit *Sma I* wurden mit ca. der fünffachen molaren Menge über das Qiaex II- oder QIAquick PCR Purification-Kit gereinigtem PCR-Produkt in einem Endvolumen von 10 µl vermischt. Nach Zugabe von NEB-Puffer A, 0,5 µl 10 mM ATP, 2 U *Sma I* oder *Srf I* und 1 µl T4 DNA-Ligase wurde die Ligation für 2 h bei Raumtemperatur durchgeführt und ein Aliquot transformiert.

pCR-Script II: In die *EcoR*- und *NotI*-Restriktionsschnittstellen des Vektors pCR-Script (Stratagene, Heidelberg) wurde das Primerpaar 978 und 979 kloniert. Dieser Vektor enthielt nur eine *SmaI*-Restriktionsschnittstelle und konnte sowohl mit *SmaI* als auch *SrfI* verwendet werden.

3.15.7.3 Zielgerichtete Mutationen, eingefügt über die Polymerase-Kettenreaktion

Higuchi, 1990

Zwei Primerpaare, die den gewünschten Genabschnitt flankieren, wurden erstellt. Im Bereich der einzufügenden Mutation wurden zwei gegenläufige Primerpaare generiert, die die Mutation und eine stille Mutation zur Einfügung einer neuen Markierungs-Restriktionsschnittstelle enthielten. Anschließend wurden zwei Polymerase-Kettenreaktionen mit je einem Mutationsprimer und einem flankierenden Primer durchgeführt. Die Sequenz dieser Produkte überlappt sich um ca. 30 bp. Die Produkte wurden 1:100 verdünnt, in einer neuen Reaktion ohne Primer eingesetzt und

über 5-10 Zyklen verschmolzen. Anschließend wurden die flankierenden Primer zugefügt und das gewünschte mutierte Produkt amplifiziert, isoliert und in den gewünschten Vektor kloniert. Der Erfolg konnte über die eingefügte Markierungsschnittstelle überprüft werden.

3.15.7.4 Auffüllen und Verdau von überstehenden Enden nach Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme wie z.B. *KpnI* produzieren 3'-überhängende Enden. Für die Ligation mit nicht kohesiven DNA-Fragmenten wurde die DNA nach Restriktionsverdau gefällt und in 50 µl Endvolumen im mitgelieferten Inkubationspuffer mit 2 U T4-DNA-Polymerase und 0,1 mM dNTP für 1 h bei 37°C inkubiert.

Restriktionsenzyme wie z.B. *EcoRI* produzieren 5'-überhängende Enden. Diese wurden nach 2 U Klenow-DNA-Polymerase mit 1 mM dNTP innerhalb von 1 h bei 37°C aufgefüllt.

Die Entfernung von 5'-überhängenden Enden erfolgte mit der Mung-Bean-Exonuklease nach Herstellerangaben.

Für die partielle Auffüllung von 5'-überhängenden Enden wurden nur die entsprechenden Nukleotide in den Reaktionsansatz gegeben. Das verbleibende 5'-überhängende Ende wurde dann mit Hilfe der Mung-Bean-Exonuklease entfernt.

Falls die DNA nach Modifizierung noch einem weiteren Restriktionsverdau unterzogen wurde, wurde die DNA vorher mit Phenol/Chloroform extrahiert und in dem entsprechenden Puffer wieder gelöst.

Die erhaltenen Fragmente wurden über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

3.15.7.5 Radioaktive Markierung von DNA

Feinberg und Vogelstein, 1983

Die Markierung wurde nach Vorschrift des Prime-IT II Random Primer labeling-Kits durchgeführt und nicht inkorporierte Nukleotide über Bio Spin P30-Säulen abgetrennt.

3.15.8 DNA-Gelelektrophorese

Standardmäßig wurden für Plasmid-DNA 1 %ige Gele und für die Analyse von PCR-Produkten bei der Genotypisierung 1,5 %ige Gele verwendet. Die Analyse von DNA-Fragmenten kleiner als 500 bp wurde mit Hilfe einer Agarosekonzentration von 2 % durchgeführt. Die Agarose wurde unter Kochen in 1x TAE gelöst. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugefügt, das Gel in den Gelträger der Elektrophoresekammer gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Die DNA-Proben wurden mit ca. 0,2 Volumen des Probenpuffers versetzt, bei 150 bis 250 V im Gel aufgetrennt und die Fragmente auf dem UV-Leuchttisch (254 nm) sichtbar gemacht.

6x Probenpuffer: 0,25 % Bromphenolblau, 40 % Saccharose.

3.15.9 DNA-Transfer auf Nylonmembranen nach Southern

Southern, 1975

Für Hybridisierungen wurde die DNA auf einen Nylonträger transferiert. Nach Agarosegelelektrophorese wurde das Gel 20 min im Denaturierungspuffer inkubiert. Das Gel wurde auf

zwei Lagen in Denaturierungspuffer getränktem Whatman 3MM-Filterpapier aufgelegt, deren Enden in Denaturierungspuffer eintauchten. Auf das Gel wurde eine feuchte Nylonmembran, gefolgt von zwei Lagen feuchtem Filterpapier und einem Stapel trockener Papierhandtücher, gelegt. Der Aufbau wurde mit einem Gewicht von ca. 200 bis 500 g beschwert, um eine bessere Kapillarwirkung der Handtücher zu bewirken. Nach zwölfstündigem Transfer wurde die Nylonmembran 5 min im Neutralisierungspuffer und 5 min in 2x SSC inkubiert. Die DNA wurde durch UV-Licht (1 J/cm²) im Fluo-Link kovalent an die Membran gebunden.

Für den zweistündigen Transfer von Plasmid-DNA wurde das Gel auf einen Streifen Frischhaltefolie ohne Denaturierungspuffer-Reservoir gelegt.

3.15.10 Hybridisierung

Nylonmembranen nach *Southernblot*, *Northernblot*, *Bakterienlifts* oder *Phagenlifts* wurden 2 bis 4 h bei 42°C im Prähybridisierungspuffer inkubiert. Die Lösung wurde durch Hybridisierungspuffer ersetzt und über Nacht bei 42°C unter Schwenken inkubiert. Die Membran wurde zweimal 20 min bei 60°C in reichlich Waschlösung I und 20 min bei 60°C in reichlich Waschlösung II gewaschen. Die luftgetrocknete Membran wurde anschließend auf einem Röntgenfilm bei -70°C oder einer Expositionsplatte des FujiBas 5000 exponiert.

Waschlösung I: 2x SSC; 0,1 % SDS

Waschlösung II: 0,1x SSC; 0,1 % SDS

3.15.11 Klonierung aus Phagen-Genbibliotheken

3.15.11.1 Screening einer Phagen-Genbibliothek

Mit Hilfe von DNA-Sonden können über Hybridisierung einzelne Klone einer Genbank identifiziert werden. Überlappende Klone umspannen das gesamte Gen bzw. die cDNA.

50 ml LB-Medium mit 0,2 % Maltose und 10 mM Mg₂SO₄ wurden mit einer Kolonie Bakterien (C600hfl für cDNA-Bibliothek und XL1-Blue MRA(P2) für genomische Bibliothek) über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden pelletiert und nach einmaligen Waschen in SM-Puffer aufgenommen, so daß die Suspension eine optische Dichte bei 600 nm von eins hatte. Zur Titerbestimmung wurde eine Verdünnungsreihe der Bibliothek von 10⁻³ bis 10⁻⁶ hergestellt. 40 µl Phagenverdünnung wurden mit 400 µl Bakterien 20 min bei 37°C inkubiert mit 8 ml 50°C warmem Top-Agar vermischt und auf vorgewärmte LB-Kulturschalen (15 cm Durchmesser) ausgegossen. Nach Erhärten des Agars wurden die Kulturschalen ca. 10 h bei 37°C inkubiert, bis die Lysehöfe konfluent wurden.

Die Genbibliothek wurde mit einem Titer von 50.000 pfu pro Platte auf ca. 20 Platten ausplattiert. Von den erkalteten Platten wurden doppelte Filter-Replikate (*Phagenlifts*) erstellt. Die Phagen auf den Nylonmembranen wurden denaturiert (5 min Denaturierungslösung) und nach Neutralisation (5 min Neutralisierungslösung) und Waschen der Filter (zweimal 5 min 2x SSC) wurde die DNA 2 h im Vakuumofen an der Membran fixiert. Die gesuchten Plaques wurden durch Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde identifiziert und herausgestanzt. Es wurden nur die Signale als positiv bewertet, die auf beiden Duplikaten vorkamen. Die Phagen wurden aus dem Agarblöckchen in SM-Puffer ausgeschwemmt und Einzelplaques durch erneutes Ausplattieren isoliert.

3.15.11.2 Phagenamplifikation

Die Einzelplaques wurden durch Ausplattieren mit 50000 pfu amplifiziert und mit 4 ml SM-Puffer über 5 h heruntergewaschen. Nach Zugabe von 50 µl Chloroform konnte die Lösung für einige Wochen bei 4°C gelagert werden.

3.15.11.3 Präparation von lambda-Phagen-DNA

Für die Isolation von λ-Phagen-DNA wurden 20 bis 100 µl des Amplifikates mit 400 µl Bakterien versetzt und dieser Ansatz in 50 ml LB mit 0,2 % Maltose und 10 mM Mg₂SO₄ über Nacht bei 37°C inkubiert. Je nach Phagen/Bakterien-Verhältnis fand eine vollständige Lyse statt. Diese wurden nach Zugabe von 750 µl Chloroform und Inkubation für 30 min bei 37°C bei 3500 rpm in der Megafuge für 10 min abzentrifugiert. Die Isolation der DNA erfolgte nach einem Protokoll der Firma Qiagen, Hilden: Nach Zugabe von 100 µl Puffer L1 wurde 30 min bei 37°C und nach weiteren 10 ml Puffer L2 60 min bei 0°C inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 10000x g wurde das Sediment in 3 ml L3 aufgenommen, 3 ml L4 hinzugefügt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml Puffer L5 wurde der Ansatz 30 min bei 15000x g zentrifugiert. Die Zentrifugation wurde mit dem Überstand wiederholt und die DNA aus diesem über das Qiagen Midi-Kit nach Herstellerangabe isoliert.

Puffer L1: 300 mM NaCl; 100 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,2 mg/ml BSA; 20 mg/ml RNase A; 6 mg/ml DNase I

Puffer L2: 30 % Polyethylenglykol (PEG 6000); 3 M NaCl

Puffer L3: 100 mM NaCl; 100 mM Tris/HCl, pH 7,5; 25 mM EDTA

Puffer L4: 4 % SDS

Puffer L5: 3 M Natriumacetat, pH 5,5

3.15.11.4 Subklonierung der genomischen Klone

Mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *NotI* und Trennung durch Agarosegelelektrophorese wurde die klonierte genomische DNA isoliert und in das Plasmid pBluescript II kloniert.

3.15.11.5 Subklonierung der cDNA-Klone

cDNA-Klone wurden mit Hilfe eines spezifischen Primers aus der bekannten cDNA-Sequenz und eines Primers benachbart zur Klonierungsstelle im Phagen aus den isolierten Primärplaques durch PCR amplifiziert und kloniert.

3.15.12 Sequenzanalyse und Datenbanksuche

Die computergestützte Sequenzanalyse erfolgte mit dem Programmpaket Lasergene. Domänenstrukturanalyse, Suche nach verwandten Proteinen und Literaturliteraturdatenbanksuche erfolgte über die Internetzugänge bei NCBI und ISREC.

3.15.13 Gewinnung von Gewebehomogenaten

Ratten oder Mäuse wurden durch Genickbruch getötet, die Gewebe entnommen und im Homogenisationspuffer auf Eis gelagert. Gehirnregionen wurden unter dem Binocular auf einem eiskalten mit Homogenisationspuffer getränktem Filterpapier präpariert. Die Hippocampusregionen wurden analog der Vorschrift von Hörtnagl et al., 1991, gewonnen.

3.15.14 Extraktion von Membranproteinen mit Triton X-114

Bordier, 1981

Gewebe wurden in eiskaltem Homogenisationspuffer mit Proteaseinhibitor-Cocktail im Potter Elvehjem homogenisiert und ein PNS gewonnen. Muskel-, Lunge- und Darmgewebe wurden im eiskalten Homogenisationspuffer im Ultra Turrax homogenisiert. Die Proteinkonzentration wurde auf 0,5 mg/ml mit PBS eingestellt und Triton X-114 mit einer Zielkonzentration von 1% zugegeben. Die Extraktion fand für 15 min auf Eis statt. Unlösliche Bestandteile wurden bei 3000x g und 4°C für 5 min abzentrifugiert. Die Phasentrennung des Überstandes erfolgte unter Schütteln für 5 min bei 30°C. Die trübe Lösung wurde auf ein 30°C warmes Sucrosekissen geschichtet und 3 min bei 1000x g abzentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen, nach Zugabe von Triton X-114 analog extrahiert und auf das vorherige Sucrosekissen geschichtet. Nach Zentrifugation wurden der Überstand und das Sucrosekissen verworfen und der ölige Extrakt im Ursprungsvolumen eiskaltem PBS gelöst. Die Proteine wurden mit Aceton gefällt, abzentrifugiert und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Analog wurde das Ausgangsmaterial in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

Sucrosekissen: 6% Sucrose, 0,06% Triton X-114 in PBS.

3.15.15 Subzelluläre Fraktionierung

Jones und Matus, 1974; Huttner et al., 1983

30 Cortices von Mäusen (6-8 Wochen alt) wurden in eiskaltem Homogenisationspuffer gesammelt. Das Gewebe wurde in 80 ml Homogenisationspuffer mit 12 Hüben bei 900 rpm im Potter-Elvehjem homogenisiert. Die Kerne und Zelltrümmer wurden bei 800x g für 10 min abzentrifugiert (P1). Aus dem Überstand (S1) wurden Synaptosomen durch 15minütige Zentrifugation bei 9200x g angereichert (P2). Der Überstand wurde 1 h bei 100.000x g zentrifugiert. Dieses Pellet (P3) enthielt hauptsächlich Mikrosomen, Lysosomen und auch synaptische Vesikel. Der Überstand (S3) war angereichert mit löslichen Proteinen aus dem Cytosol. Das Pellet P2 wurde mit Homogenisationspuffer gewaschen und erneut abzentrifugiert (P2'). Dieses Pellet enthielt die unreine Synaptosomenfraktion und wurde in 13 ml Homogenisationspuffer resuspendiert. Die Synaptosomen wurden durch Zugabe von neun Volumina H₂O und Homogenisation mit fünf Hüben bei 1500 rpm im Potter-Elvehjem lysiert. Der Ansatz wurde 20 min bei 25000x g zentrifugiert, wobei das Pellet (LP1) mit Plasmamembranen aus aufgebrochenen Nervenendigungen angereichert war. Aus dem Überstand wurde durch Zentrifugation für 1 h bei 100.000x g die unreine synaptische Vesikelfraktion (LP2) gewonnen. Der Überstand (LS2), der mit synaptischen cytosolischen Proteinen angereichert war, wurde im Biomax-5K ultrafiltriert oder durch TCA gefällt. Das Pellet LP1 wurde in 45 ml 1,2 M Sucroselösung aufgenommen und aufgeteilt in drei Zentrifugenröhrchen mit 15 ml 0,8 M Sucrose und 0,3 M Sucrose überschichtet. Die Fraktion der synaptischen Plasmamembranen wurde nach Zentrifugation für 150 min bei 19000 rpm im SW28-Rotor (Beckmann Instruments, München) als Bande zwischen den untersten Schichten isoliert mit zwei Volumen H₂O verdünnt und 20 min bei 37000x g abzentrifugiert (SPM).

1,2 M Sucroselösung: 1,2 M Sucrose, 5 mM HEPES/NaOH; pH 7,4

3.15.16 Proteinpräzipitation

Proteine wurden durch die Zugabe von 0,25 Volumenanteilen 50 % TCA ausgefällt und 10 min bei maximaler Umdrehung in der Tischzentrifuge oder 30 min bei 20.000x g in der Sorvall-Zentrifuge abzentrifugiert. Um überschüssige TCA zu entfernen, wurde das Pellet mit Diethylether gewaschen und erneut abzentrifugiert. Nach TCA-Fällung wurde die Probe in der Regel in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

Alternativ wurden Proteine durch Zugabe von zwei Volumina kaltem Aceton gefällt. Die Proben wurden analog abzentrifugiert und in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

3.15.17 Präparation von Hexa-Histidin-Fusionsproteinen

3.15.17.1 Überexpression von Fusionsproteinen in E. coli

LB-Medium wurde 1:100 mit einer Übernachtskultur des gewünschten pHO2c-Konstruktes in BL21(DE3)pLysS angeimpft und unter starkem Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,5-0,8$) wurde die Expression durch Zugabe von IPTG induziert. Die Expressionszeit, IPTG-Menge und Inkubationstemperatur wurden in Vorversuchen für jedes Konstrukt optimiert. Die Bakterien wurden geerntet und eingefroren.

3.15.17.2 Reinigung von Fusionsproteinen

Eingefrorene Bakterienpellets wurden in 10 ml Lysepuffer pro Liter Kultur resuspendiert. Nach Zugabe von 70 µg/ml Lysozym und 1 mM PMSF wurde der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert und die Bakterien durch vier Ultraschallpulse über 30 s (*output level 6, duty 50%*) aufgeschlossen. Nach Zugabe der gleichen Menge PMSF und einer Spatelspitze DNase wurde der Ansatz 20 min auf Eis inkubiert und anschließend 20 min bei 16.500 rpm im SS34-Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 ml Ni^{2+} -NTA-Agarose pro Liter Kultur 1 h bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Das Säulenmaterial wurde 5 min bei 3500 rpm in der Megafuge abzentrifugiert und dreimal mit 50 ml Lysepuffer gewaschen. Anschließend wurde das Säulenmaterial in eine Säule gepackt und das Fusionsprotein durch stufenweise Erhöhung der Imidazolkonzentration bis 400 mM eluiert. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE analysiert und über Biomax-5K konzentriert.

Lysepuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM Imidazol, 300 mM NaCl

3.15.18 Immunisierung von Kaninchen

Die Immunisierung von Kaninchen wurde durch die Applikation von Immunogen mit Adjuvantien an mehreren Stellen subkutan durchgeführt. Vor der Immunisierung wurden 5 ml Präimmunserum abgenommen. 300 µg Hexa-Histidinfusionsprotein in 500 µl PBS wurde mit gleichem Volumen kompletten Freud'schem Adjuvans versetzt. Die Emulsion wurde durch mehrmalige Passage durch eine Kanüle (20 G) homogenisiert. Die folgenden drei Immunisierungen mit inkomplettem Freud'schem Adjuvans erfolgten im Wochenabstand. Einen Tag nach der letzten Immunisierung wurde 10 ml Blut gewonnen. Nach der Gerinnung wurde der Blutkuchen abzentrifugiert und das Serum getestet. In Wochenabständen wurden weitere Seren gewonnen und getestet. Mögliche Boosterimmunisierungen konnten den Titer erhöhen. Bei gutem Titer wurden die Kaninchen ausgeblutet und die Seren in Aliquots eingefroren gelagert.

3.15.19 Methoden zur Proteinanalyse

3.15.19.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Proteinkonzentrationen wurden über das BCA-Kit der Firma Pierce bestimmt. 1 bis 5 µl Probe wurden in 50 µl H₂O aufgenommen. 10 µl wurden mit 200 µl BCA-Reagenz 30 min bei 60°C in einer 96-Lochplatte inkubiert. Nach 10minütigem Abkühlen der Platte wurde die Absorption bei 570 nm im Thermomax microplate reader gemessen. Die Konzentration wurde anhand einer Eichgeraden ermittelt, die über Standardproteinkonzentrationen mit BSA ermittelt wurden.

3.15.19.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Laemmli, 1970

Proteine wurden in diskontinuierlichen 1 mm dicken SDS-Polyacrylamidgelen nach der Proteingröße aufgetrennt. Das Sammel- und Trenngel wurden über Nacht polymerisiert. Bis zu 80 µg Gesamtprotein in SDS-Probenpuffer wurden 10 min auf 60°C erhitzt und in die Proben-taschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde in Mini-PROTEAN II-Gelkammern bei 15 mA pro Gel im Laufpuffer durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Bande das Ende des Gels erreicht hatte. Anschließend wurden die Gele gefärbt oder die Proteine auf Nitrocellulose transferiert.

Laufpuffer: 3 g/l Tris; 14,4 g/l Glycin; 2g/l SDS

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8; 0,4 % SDS

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8; 0,4 % SDS

AMBA: 30 %ige Acrylamid/N,N'-Methylen-bis-Acrylamid-Lösung im Mischungsverhältnis 37,5 zu 1

Sammelgel: für ca. 6 Gele: 5 ml H₂O; 1 ml AMBA; 2 ml Sammelgelpuffer; 20 µl TEMED; 48 µl 10 % APS

Trenngel (5-15 %): für 4 Gele: 10–5 ml H₂O; 5-10 ml AMBA; 5 ml Trenngelpuffer; 25 µl TEMED; 60 µl 10 % APS

3.15.19.3 Proteingelfärbung mit Coomassie Brilliant blue

SDS-Polyacrylamidgele wurden 15 min in 50°C warmer Färbelösung inkubiert. Anschließend wurden sie in reichlich H₂O 10 min bei voller Intensität in der Mikrowelle gekocht. Anschließend wurde das Wasser mehrmals gewechselt, bis der Hintergrund entfärbt wurde. Zur Beschleunigung der Entfärbung wurde Entfärbelösung verwendet.

Färbelösung: 0,15 % Coomassie Brilliant Blue R250; 10 % Eissessig; 25 % Isopropanol

Entfärbelösung: 30 % Methanol; 10 % Eissessig

3.15.19.4 Immunoblottanalyse

Towbin et al., 1979

3.15.19.4.1 Protein-Transfer nach Western

Proteine wurden aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulosemembranen über ein elektrisches Feld transferiert. Dabei wurde die Nitrocellulosemembran auf das Gel gelegt und mit

Filterpapieren und Schwämmen in einem Rahmen fixiert. Der Transfer erfolgte in einer Tankblotchkammer, gefüllt mit Transferpuffer, über Nacht bei 40 mA.

Die Proteinbanden auf den Nitrocellulosemembranen wurden durch Inkubation mit PonceauS-Lösung sichtbar gemacht. Die Hintergrundfärbung wurde mit H₂O abgewaschen.

Transferpuffer: 3 g/l Tris; 14,4 g/l Glycin; 20 % Methanol

Ponceau S-Lösung: 0,1 % Ponceau S; 5 % Eisessig

3.15.19.4.2 Immunodetektion von Proteinbanden

Proteine auf Nitrocellulosemembranen wurden mit spezifischen Antikörpern markiert und mit sekundären Antikörpern detektiert. Nitrocellulosemembranstreifen wurden in 5 % Trockenmilchpulver in TBS-T 30 min unter Schütteln inkubiert. Nach kurzem Waschen mit TBS-T wurden sie mit der Antikörperlösung für 1 h inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen für jeweils 10 min entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit der Detektionsantikörperlösung für ebenfalls 1 h. Nach gründlichem Waschen (dreimal für mehr als jeweils 10 min) wurden die Signale detektiert. Signale von HRP-konjugierten Sekundärantikörpern wurden nach Herstellerangaben über das ECL-Kit, und von jodinierten, radioaktiven Sekundärantikörpern über Exposition auf Detektionsplatten des FujiBas 5000 visualisiert. Bei der Verwendung von murinen Primärantikörpern wurde vor der Inkubation mit den radioaktiven Sekundärantikörpern analog mit einer Brückenantikörperlösung inkubiert.

TBS-T: TBS; 0,1 % Tween 20

Antikörperverdünnungslösung: 1 % Ziegen Serum in TBS-T

Antikörperlösung: Primärantikörper wurden 1:1000 bis 1:10000 in Antikörperverdünnungslösung verdünnt.

Brückenantikörperlösung: Kaninchen-anti-Maus-IgG 1:2000 in Antikörperverdünnungslösung verdünnt.

Detektionsantikörperlösung: HRP konjugierte Sekundärantikörper 1:5000 in Antikörperverdünnungslösung verdünnt bzw. 9 µl jodinierte, radioaktive Sekundärantikörper pro 10 ml Antikörperverdünnungslösung.

3.15.19.4.3 Quantifizierung von Proteinbanden

Signale auf Detektionsplatten des FujiBas 5000 wurden mit der Quantifizierungsoption des Programmes MacBas ausgewertet. Dazu wurde ein Rahmen um die detektierte Bande gezogen und die Summe der Pixelintensitäten gemessen. Gleiche Rahmengrößen wurden für die Quantifizierung der Banden eines Primärantikörpers verwendet. Bandenintensitäten einer Gelspur wurden mit einem Standardprotein dieser Spur (Munc18 oder NMDA-Rezeptoruntereinheit 1) normalisiert, um Beladungs- und Transferschwankungen zu erfassen. Die Mittelwerte und Standardabweichung von Bandenintensitäten von drei verschiedenen Mäusen jeder Analysegruppe wurden berechnet und signifikante Unterschiede über Student's T-test mit dem Programm Excel bestimmt.

3.15.20 Methoden für die Immuncytochemie

3.15.20.1 Fixierung von Mausgewebe

Mäuse wurden über Inhalation mit Ether oder intraperitoneale Applikation von 0,6 ml Avertin pro mouse (Körpergewicht 30 g) narkotisiert. Nach negativem Zwischenzehenreflex wurde die Maus auf der Unterlage fixiert, der Thorax beidseits parasternal eröffnet und der linke Ventrikel des Herzens punktiert. Nach Fixierung der Punktionskanüle und kleiner Inzision im rechten Herzhorn wurde das Tier mit 20 ml PBS gefolgt von 20 ml Fixierlösung perfundiert. Die gewünschten Organe wurden präpariert und 30 min in Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe dreimal mit reichlich eiskaltem PBS gewaschen und in 30 ml eiskalte Gefrierschutzlösung überführt. Nach Absinken der Gewebe (ca. 24 bis 36 h) wurden diese in Einbettmedium auf Trockeneis eingefroren und bei -20°C gelagert.

Avertin: 1 g 2,2,2-Tribrom-Ethanol; 180 µl Amylalkohol; 71,5 ml H₂O; bei 42°C lichtgeschützt gelöst.

Fixierlösung: 4 % Paraformaldehyd in PBS. Das Paraformaldehyd wurde in H₂O unter Erwärmen und der Zugabe von 20 µl 5 M NaOH pro 100 ml gelöst. Nach Zugabe der PBS-Tabletten wurde die Lösung filtriert und innerhalb von zwei Tagen verbraucht.

Gefrierschutzlösung: 30 % Sucrose in PBS.

3.15.20.2 Bereitstellung von Gewebeschnitten

5 bis 15 µm dicke Gewebeschnitte wurden bei -20 bis -25°C Kammer- und Objekttemperatur im Kryostaten angefertigt. Die Schnitte wurden vom Messer auf SuperFrost Plus-Objektträger gezogen und über Nacht getrocknet. Die Objektträger wurden bei -20°C gelagert und vor der Weiterbearbeitung von überschüssigem Einbettmedium befreit.

20 bis 30 µm dicke Gewebeschnitte wurden bei -25°C Objekttemperatur im Gefriermikrotom angefertigt. Die Schnitte wurden bei -20°C in Kryoschutzlösung aufbewahrt. Vor der Immunofärbung wurden die Schnitte mit reichlich PBS gewaschen.

Kryoschutzlösung: 50 % 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,3; 30 % Ethylenglycol; 20 % Glycerin

3.15.20.3 Gelatinebeschichtung von Objektträgern

Die Objektträger wurden 20 min bei 50°C im Ultraschallbad bei voller Intensität mit ca. 2 % Extran-Lösung in Leitungswasser gewaschen. Anschließend wurden sie gründlich unter fließendem Leitungswasser und anschließend deionisiertem Wasser gespült. Die Beschichtung wurde für 2 min in frischer ca. 40°C warmer Eintauchlösung durchgeführt. Anschließend wurden die Objektträger 30 min bei 40°C im Vakuumofen getrocknet und konnten über Monate verwendet werden.

Eintauchlösung: 1 % Gelatine; 0,1 % Chromkaliumsulfat. Die Gelatine wurde bei 50°C gelöst und anschließend Chromkaliumsulfat zugefügt. Nach Filtration war die Lösung warm gebrauchsfertig.

3.15.20.4 Immunofärbung von Gewebeschnitten

Mandell et al., 1990

Schnitte auf Objektträgern wurden mit einem Fettmarkerstift umfahren und die Inkubation der Lösungen erfolgte in einer feuchten Kammer auf dem Objektträger. Die Gewebeschnitte wurden 30 min mit GSDB inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in GSDB verdünnt und die Schnitte über Nacht bei 4°C darin inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Waschlösung wurden die Schnitte in GSDB mit dem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Detektionsantikörper für mindestens 5 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschlösung und PBS für mindestens je 10 min wurden die Schnitte im leicht angetrockneten Zustand mit Antibleichmittel eingedeckelt.

Gewebeschnitte vom Cryomikrotom wurden in 24-Lochplatten analog inkubiert und anschließend auf mit Eintauchlösung vorbehandelte Objektträger gezogen. Die Eindeckelung erfolgte wie oben beschrieben

GSDB: 450 mM NaCl; 17 % Ziegen Serum; 0,3 % Triton X-100; 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4

Waschlösung: 450 mM NaCl; 0,3 % Triton X-100; 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4

Antibleichmittel: 1,5 % N-Propylgallat; 60 % Glycerin; in PBS

3.15.21 Heterologe Expression in 293-Zellen

3.15.21.1 Einfrieren und Auftauen von eukaryontischen Zellen

Zellen einer konfluent bewachsenen 6-Lochplatte wurden in 5 Aliquots eingefroren. Dazu wurden die Zellen mit D-PBS gewaschen und 5 min mit 1x Trypsin-EDTA bedeckt. Nach Zugabe von 2,5 ml Medium wurden die Zellen vereinzelt, mit 2,5 ml 2x Einfriermedium vermischt und in einer Styroporbox bei -80°C eingefroren. Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Die Zellen wurden rasch bei 37°C aufgetaut und mit 10 ml Medium verdünnt. Sie wurden anschließend abzentrifugiert (5 min 800x g) und in frischem Medium auf eine Zellkulturschale mit 25 cm² Fläche ausgesät.

Einfriermedium, 2x: 20 % DMSO; 20 % fötales Kälberserum; 60 % Medium

3.15.21.2 Passagierung von eukaryontischen Zellen

Konfluente Zellrasen wurden mit D-PBS gewaschen und 5 min bei 37°C mit 1x Trypsin-EDTA inkubiert. Nach Zugabe von 4 bis 10fachem Volumen Medium wurden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Zellen wurden auf die drei- (E14.1- und MEF-Zellen) bis 10fache (293-Zellen) Kulturfläche ausgesät.

3.15.21.3 Kultivierung von 293-Zellen

293-Zellen wurden in 10 cm-Rundschalen mit 10 ml 293-Medium bei 37°C, 5 % CO₂ und Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre in Begasungsbrutschränken inkubiert. Sie wurden passagiert, sobald die Schale konfluent bewachsen war.

293-Medium: DMEM-Medium mit 4,5 g/l D-Glucose; 10 % hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum; 2 mM L-Glutamin

3.15.21.4 Transfektion über Calciumphosphat-Copräzipitate

Chen und Okayama, 1987

Das Medium einer semikonfluenten 10 cm-Rundschale wurde 12 h vor Transfektion gewechselt. Zu 20 µg Plasmid-DNA in 50 µl H₂O wurden 500 µl HBS-Puffer gegeben. Der Ansatz wurde mit 32 µl 2 M CaCl₂ versetzt, sorgfältig geschüttelt und tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Einen halben Tag später wurden die Zellen mit D-PBS gewaschen und in frischem Medium weiter kultiviert.

HBS-Puffer: 10 mM HEPES/NaOH, pH 7,15; 137 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 0,7 mM Na₂HPO₄; durch Filter mit 0,22 µm Porengröße filtriert. Der pH-Wert wurden in engen Grenzen variiert und der Puffer mit der höchsten Transfektionseffizienz verwendet.

3.15.21.5 Gewinnung von Zellhomogenaten

Fünf Tage nach Transfektion wurden die Zellen mit Homogenisationspuffer gewaschen und in 2x 1 ml Homogenisationspuffer von der 10 cm-Rundschale geschabt. Nach Homogenisation (10 Hübe) wurden der PNS gewonnen.

3.15.22 Herstellung rekombinanter embryonaler Mausstammzellen

Hooper et al., 1987

3.15.22.1 Kultivierung von E14.1-Zellen

Die E14.1-Zellen wurden auf Mitose-gehemmten embryonalen Mausfibroblasten (MEF) kultiviert. Das Medium wurde jeweils gewechselt, wenn es sich deutlich gelb färbte. Die übrigen Arbeitsschritte und Kultivierungsbedingungen erfolgten analog der Kultivierung von 293-Zellen.

Medium: DMEM-Pulvermedium und 2,3 g NaHCO₃ in 1 l H₂O gelöst und durch Sterilfiltereinheiten filtriert. Pro 500 ml wurden 6 ml Amino Acids, 6 ml frischer Mercaptoethanol-Lösung, 1,2 ml 500x Penicillin/Streptomycin, 50 ml fötales Rinderserum (HyClone) und 60 µl ESGRO-LIF zugefügt.

Mercaptoethanol-Lösung: 14 µl 2-Mercaptoethanol auf 20 ml D-PBS.

3.15.22.2 Kultivierung von embryonalen Mausfibroblasten

MEF-Zellen wurden in dem selben Medium wie E14.1-Zellen über ca. 10 Passagen kultiviert. Die übrigen Bedingungen waren analog der Kultivierung von 293-Zellen.

Zur Vorbereitung der MEF für die Kokultur mit E14.1-Zellen wurde nach Erreichen einer 70 %-igen Konfluenz die Zellteilung durch Mitomycin gestoppt. Die Zellen wurden dafür auf mit Gelatine beschichteten Kulturschalen kultiviert (Schalen 1 h mit Gelatine-Lösung behandelt). Die MEF wurden 2 h mit 10 mg/ml Mitomycin im Medium kultiviert und anschließend viermal mit 10 ml D-PBS gewaschen und entweder in der Schale weiterkultiviert oder auf Mehrlochkulturschalen ausgesät.

Gelatine-Lösung: 0,1 % Gelatine in D-PBS.

Mitomycin-Stammlösung, 50 x: 2 g Mitomycin C in 4 ml D-PBS.

3.15.22.3 Transfektion von E14.1-Zellen

Die ES-Zellen wurden in einer 25 cm²-Kulturflasche angezogen, bis eine Konfluenz von 80 % erreicht wurde. Sie wurden vereinzelt, sorgfältig mit D-PBS gewaschen und in 0,8 ml D-PBS resuspendiert. Nach Zugabe des Rekombinationsvektors wurden die Zellen verteilt auf zwei Elektroporationsküvetten (0,4 cm Elektrodenabstand) mit 500 mF und 23 V elektroporiert. Anschließend wurden sie verteilt auf fünf 5 cm-Rundschalen kultiviert.

3.15.22.3.1 Vorbereitung des Rekombinationsvektors

400 µg des Rekombinationsvektors wurden zur Linearisierung mit *NotI* verdaut. Die Proteine wurden zweimal mit Phenol/Chloroform und Chloroform extrahiert. Die gefällte DNA wurde mit eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen, unter der Sterilwerkbank getrocknet und in 1 ml D-PBS gelöst.

3.15.22.4 Selektion von homolog rekombinierten E14.1-Zellen

Am Tag 1 nach Transfektion wurde das Medium morgens gewechselt. Am Abend wurde die Selektion mit Medium, dem 190 µg/ml Neomycin zugesetzt wurden, über acht Tage begonnen. Die Selektion mit 2 mM Ganciclovir erfolgte zusätzlich von Tag 3 bis Tag 5. Während der Selektion wurde das Medium zweimal täglich gewechselt. Am Tag 9 und 10 wurden resistente Einzelklone isoliert und in 96-Lochkulturschalen kultiviert. Nach ca. drei Tagen wurden die Stammzellen auf zwei 96-Lochkulturschalen passagiert. Nach Erreichen der Konfluenz wurde eine Platte für die DNA-Analyse verwendet und die zweite eingefroren.

3.15.22.5 Isolierung der resistenten Klone

Am 9. und 10. Tag der Selektion wurden die resistenten Klone isoliert. Die Zellen wurden mit D-PBS gewaschen und mit DMEM/25 mM HEPES bedeckt. Die Klone wurden unter dem Mikroskop mit einer ausgezogenen Pasteurpipette angesaugt und in 50 µl 1x Trypsin-EDTA in einer 96-Lochplatte ("U"-förmige Mulden) überführt. Alternativ konnte auch eine 100 µl-Pipettierhilfe verwendet werden. Nachdem über ca. 20 min Kolonien isoliert wurden, wurden diese 5 min bei 37°C inkubiert und nach Zugabe von 100 µl Medium vereinzelt und auf mit 100 µl Medium bedeckten MEF in 96-Lochplatten ausgesät.

3.15.22.6 Vorbereitung für die Blastozysten-Injektion

Rekombinante Klone wurden über 24-, 12- und 6-Lochplatten expandiert und in fünfmal 1 ml Volumen eingefroren. Für die Blastozysteninjektion wurden sie in 12-Lochplatten kultiviert. Am Tag der Injektion wurden die Zellen vereinzelt und als Suspension dem institutseigenen Mikroinjektionslabor bereitgestellt.

3.15.22.7 DNA-Isolierung aus in 96-Lochplatten kultivierten E14.1-Zellen

Die konfluent gewachsenen Zellklone wurden zweimal mit D-PBS gewaschen und in jeweils 50 µl Lysispuffer über Nacht bei 60°C lysiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 100 µl eiskalter Fällungslösung und Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur gefällt. Der Überstand

wurde dekantiert und die DNA dreimal mit eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen. Nach Trocknen der DNA wurde sie über Nacht in 50 µl H₂O gelöst.

Die Analyse der rekombinanten Klone erfolgte über PCR oder über Restriktionsanalyse und radioaktiver Hybridisierung nach *Southernblot*.

4 Ergebnisse

Für die Charakterisierung der Funktion von Rabphilin und Rab3-Isoformen wurden im Rahmen dieser Arbeit Maus-Rabphilin- und Rab3B-Nullmutanten erzeugt. Um auch redundante Rab3-Funktionen zu analysieren, wurden Rab3-Mehrfach-Nullmutanten durch Kreuzung gewonnen. Hierzu wurden die Rab3B-Nullmutanten mit den schon veröffentlichten Rab3A-Nullmutanten (Geppert et al., 1994) und mit den im Rahmen anderer Projekte erstellten Rab3C- und D-Nullmutanten verpaart.

4.1 Klonierung und Charakterisierung von Rab3-Genen

Über homologe Rekombination ließen sich zielgerichtet Mutationen ins Genom einfügen. So genetisch veränderte omnipotente Maus-Stammzellen überführten diese Mutationen in genetisch veränderte Mäuse (Capecchi et al., 1989). Um Teile der Rab3-Gene in Mäusen zu entfernen, wurden die genomischen Sequenzabschnitte benötigt. Über das Primerpaar 337/338 wurde aus einer Ratten-Rab3C-cDNA eine N-terminale Gensonde (349 bp) amplifiziert. Die Hybridisierung mit einer genomischen Phagen-Bibliothek (Stratagene 129SV) ergab 22 positive Klone, die in den Vektor pBluescript II subkloniert wurden. Diese Versuche wurden von T. Jo durchgeführt.

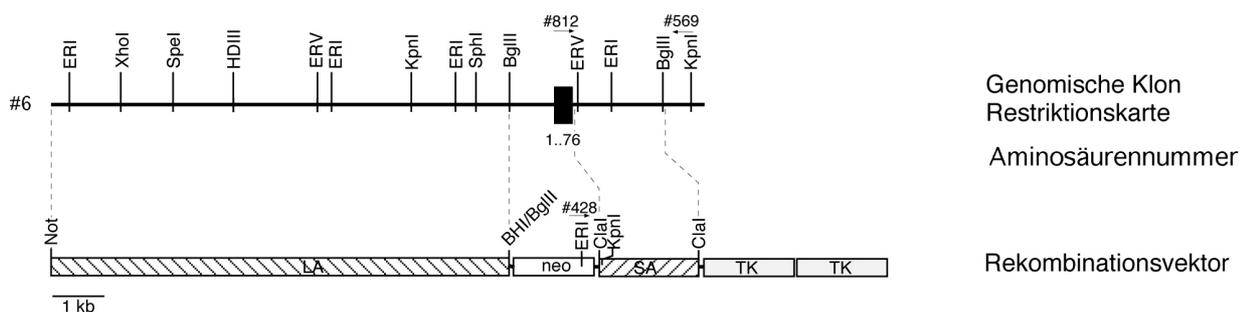


Abb. 1: Darstellung der Struktur eines Anteils des murinen Rab3B-Gen und der Rekombinationsstrategie für die Erzeugung von Rab3B-Nullmutanten. In die Restriktionskarte des genomischen Klons #6 (oben) sind die Erkennungsstellen von Restriktionsenzymen (BHI: *BamHI*; *BglIII*; *ClaI*; ERI: *EcoRI*; ERV: *EcoRV*; Kpn: *KpnI*; Not: *NotI*; *SpeI*; *SphI*; Xho: *XhoI*), sowie die Positionen des ersten codierenden Exons (schwarzes Kästchen) mit den entsprechenden Aminosäurenummern (Mitte) und der Genotypisierungsprimer eingezeichnet. Im Rekombinationsvektor sind die eingefügten genomischen Sequenzen als gestreifte Kästchen (LA und SA) und die Selektionsmarker (neo: Neomycinresistenz-Expressionskassette, TK: Thymidin-Kinase) als offene Kästchen dargestellt. Der Bereich stromabwärts der ersten *BglIII*-Restriktionsschnittstelle wurde sequenziert (*genbank* AF307514). Durch die homologe Rekombination wurde das Exon, das für die Aminosäuren 1 bis 76 codiert und flankierende Bereiche durch ein Neomycinresistenzgen ersetzt.

Durch PCR-Analyse mit spezifischen Primerpaaren konnten die Klone den vier Genen der Rab3-Isoformen zugeordnet werden. Die Genstruktur von Rab3A war bekannt, und es wurde angenommen, daß sie mit der von Rab3B und D identisch wäre (Baumert et al. 1993). Die Amplifikation über die Primerpaare 475/476 für Rab3B und 477/478 für Rab3D im Bereich des ersten codierenden Exons ergab charakteristisch große Fragmente, deren Ursprung über DNA-Sequenzierung verifiziert wurden. Die genomischen Klone für Rab3A und C wurden analog mit den Primerpaaren 500/501 für Rab3A und 470/471 für Rab3C aus Intron-Abschnitten, deren Sequenz vorher durch DNA-Sequenzierung bestimmt worden war, identifiziert. Fünf der 22 Klone entstammten dem Rab3A-Gen, einer dem Rab3B-Gen, zehn dem Rab3C-Gen und fünf

dem Rab3D-Gen. Ein Klon konnte nicht zugeordnet werden. Die Charakterisierung der Rab3C- und Rab3D-Klone wurde durch T. Jo durchgeführt (vgl. Anhang).

Der genomische Rab3B-Klon #6 war 13 kb groß und lag in beiden Orientierungen in die *NotI*-Klonierungsstelle subkloniert des Vektors pBluescript II vor (Abb. 1). Über Restriktionsanalyse und radioaktive Hybridisierung des oben erwähnten Rab3B-Exon-spezifischen PCR-Produktes wurde ein Exon lokalisiert. Die Sequenzierung (*genbank* AF307514) des über die flankierenden Restriktionsschnittstellen *BglIII* und *SpeI* subklonierten Exons zeigte eine zum Rab3A-Gen identische Struktur des ersten codierenden Exons (Baumert et al., 1993). Das Exon (228 bp) codierte für die ersten 76 Aminosäuren der Maus Rab3B-Sequenz. Die 3' gelegenen Exone waren in dem genomischen Klon nicht enthalten.

4.2 Klonierung von Rab3 cDNAs

Die Untersuchungen der Rab3-Funktion erfolgten hauptsächlich an Mäusen, so daß für die heterologen Expressionsstudien und die Antikörpererstellung die Maus-Rab3-cDNAs kloniert wurden. Die Klonierung von Rab3A, B und C erfolgte über PCR aus revers transkribierter mRNA, die aus Mäusegehirnen gewonnen wurde (Abb. 2). Die mit oligo-dT-Primern revers transkribierte mRNA wurde freundlicherweise von F. Benseler und der Maus-Rab3D-cDNA-Klon von H. Lodish (Cambridge, USA) zur Verfügung gestellt. Die cDNA-Sequenzen aus Maus waren für Rab3B und C nicht bekannt, so daß die Primer mit Hilfe der Ratten-Sequenzen bzw. einem Maus-EST-Klon (EST AA270037) erstellt wurden.

Die Einfügung von N-terminalen Markersequenzen (*His-tag*) ermöglichte den Vergleich der Expressionsmengen in heterologen Expressionssystemen. Für die Klonierung wurde das Oligonucleotidpaar 1234/1235 in den mit *HinDIII* und *BamHI* verdauten pBluescript II-Vektor eingefügt. Dieses Oligonucleotidpaar enthielt die Kozak-Nukleotidsequenz "CCACC", gefolgt vom Startcodon "ATG" und den Codons für die Aminosäuresequenz "RGSHHHHHH". In die *BamHI*-Restriktionsschnittstelle wurden die über die Primerpaare 1236/1209 für Rab3A, 1237/874 für Rab3B, 1238/1213 für Rab3C und 1239/1212 amplifizierten cDNAs eingefügt und die Fusionsproteine weiter in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3 über die Restriktionsschnittstellen *HinDIII* für Rab3A, *HinDIII/XhoI* für Rab3B und C und *HinDIII/EcoRI* für Rab3D subkloniert.

Für die Erstellung von Antikörpern gegen Rab3B wurde die Rab3B-cDNA mit dem Primerpaar 931/932 amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *EcoRI* in den bakteriellen Expressionsvektor pHO2c subkloniert. Die Immunisierung von zwei Kaninchen erfolgte mit dem über NTA-Agarose-Säulenchromatographie gereinigtem Maus-Rab3B.

Der Aminosäureaustausch Q81L in Rab3A verringert die GTPase-Aktivität und führt zu einem konstitutiv aktivierten Protein. In heterologen Expressionssystemen inhibiert dieser Aminosäureaustausch die Exozytose (Holz et al., 1994). Um die Wirkung in den analog mutierten Rab3-Isoformen zu testen, wurde das entsprechende Codon in den Rab3-Konstrukten über PCR verändert. Mit den Primern 2029, 2031, 2030 und 2037 wurde die Mutation in Rab3A, mit den Primern 2038, 2031, 2030 und 2039 in Rab3B, mit den Primern 2040, 2042, 2041 und 2043 in Rab3C und mit den Primern 2044, 2031, 2030 und 2047 in Rab3D eingefügt. Die nicht mutierten Kontrollen wurden entsprechend über die N- und C-terminalen Primer amplifiziert und alle über

die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Eco*RI in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3 subkloniert.

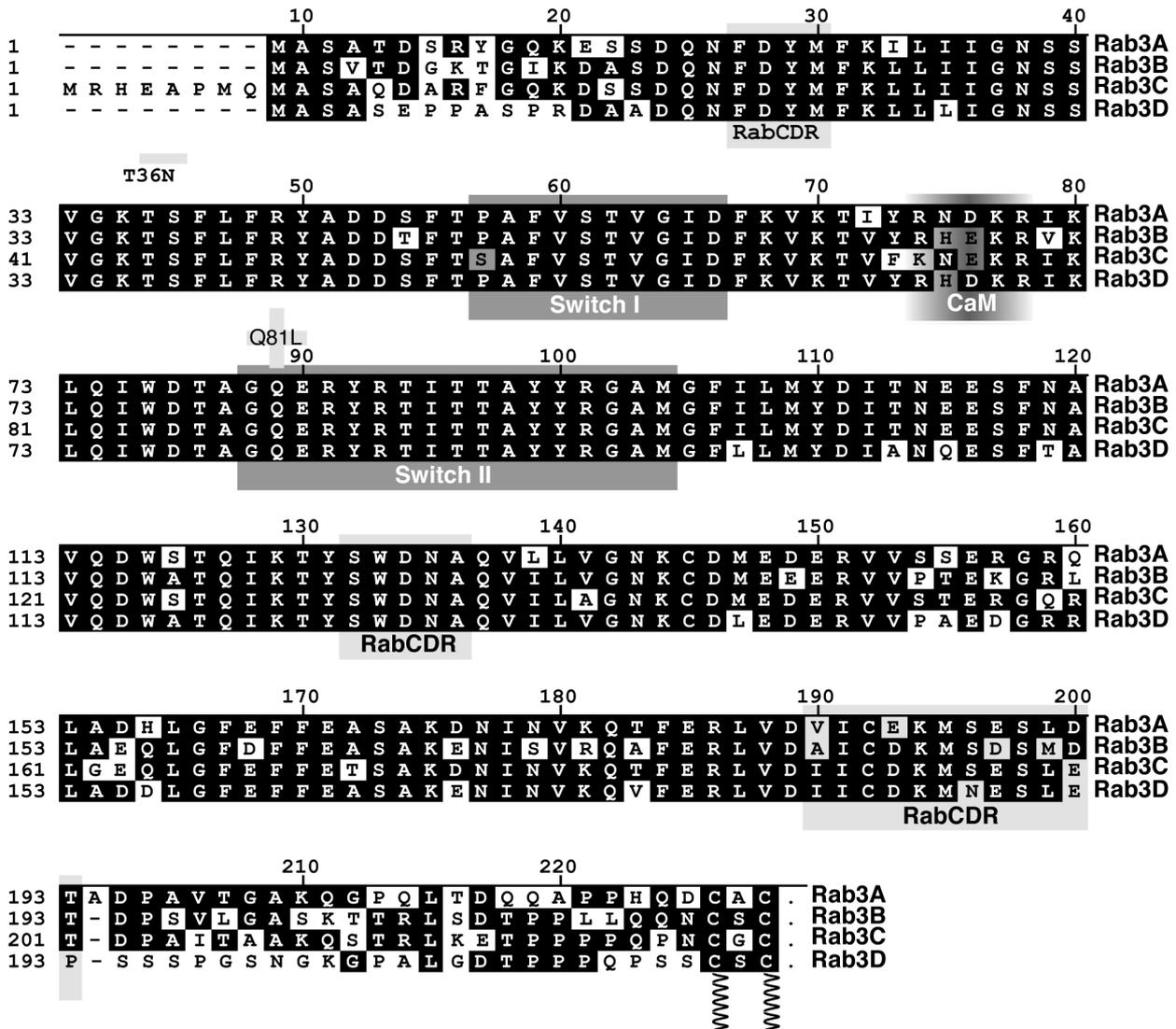


Abb. 2: Die cDNAs von Rab3B und C wurden über PCR aus Erststrang-cDNA aus Mausgehirn amplifiziert und sequenziert (*genbank* AF312036 und AF312037). Die Primärstrukturen wurden mit den von Maus-Rab3A (*genbank* P05713) und Maus-Rab3D (*genbank* M89777) verglichen. Die für die Rabphilin- und Calmodulin-Bindung verantwortlichen Bereiche (RabCDR, Switch und CaM, Ostermeier et al., 1999), sowie die Aminosäureaustausche, die zu dominant inaktiven (T36N) bzw. dominant aktiven Form (Q81L) des Rab3A führten, sind eingezeichnet

4.3 Rab3-Maus-Genstruktur

Die klonierten Maus-Rab3B- und C-Sequenzen waren zu 98,6 % bzw. 100 % gleich den Ratten-Proteinsequenzen und wurden in der Datenbank *genbank* veröffentlicht (*genbank* AF312036 und AF312037). In der Maus war Rab3C wie auch in der Ratte und im Rind am N-terminus um acht Aminosäuren länger als die anderen Rab3-Isoformen. Untereinander verglichen enthielten die vier Maus-Rab3-Isoformen 74,9 bis 81,8 % identische Aminosäuren, wohingegen sie zu anderen mammalier Rab-Proteinen zu weniger als 50 % identisch waren. Die Genstruktur von Rab3A und D in Mäusen war mit vier codierenden Exonen und analogen Intron-Exon-Grenzen identisch (Adachi et al., 2000). Das erste codierende Exon in Rab3D enthielt 5' noch 11 Nukleotide der 5'-

UTR. Im Rab3A- und B-Gen begannen die entsprechenden Exone mit dem Startcodon "ATG" (Baumert et al., 1993; *genbank* AF307514). Das analoge Rab3C-Exon codierte ebenfalls für 76 Aminosäuren. Der Translationsstart lag jedoch in einem 5' gelegenen Exon, welches nicht im sequenzierten Bereich enthalten war und wahrscheinlich für die zusätzlichen acht N-terminalen Aminosäuren codierte (*genbank* AF307515).

4.4 Charakterisierung von Rab3-Antikörpern

Rab3A und Rab3C werden im ZNS und neuroendokrinen Drüsen exprimiert. Beide synaptischen Proteine binden an synaptische Vesikel und dissoziieren von diesen während der Ca^{2+} -getriggerten Exozytose (Fischer von Mollard et al., 1991 und 1993; Stahl et al., 1996). Die Rab3B-mRNA wurde bisher im Gehirn und in der Hypophyse nachgewiesen (Lledo et al., 1993). Der Nachweis des Proteins in diesen Organen, in Epithelzellen als auch Thrombozyten war nicht gesichert (Weber et al., 1994; Karniguian et al., 1993). Rab3D wurde aus einer Adipozytenzelllinie kloniert und weiterhin auf zymogenen Granula nachgewiesen (Valentijn et al., 1996). Für eine systematische Analyse der Gewebeverteilung waren Isoform-spezifische Antikörper notwendig. Spezifische Antikörper, gerichtet gegen Rab3A und C, waren bereits vorhanden. Wie oben beschrieben ergab die Immunisierung von Kaninchen mit rekombinanten Rab3B Isoform-spezifische Antikörper (U953 und U954). Die Antikörper gerichtet gegen Rab3D wurden von T. Jo zur Verfügung gestellt (Abb. 3).

Um die Kreuzreaktion der Antikörper zu überprüfen, wurden die Maus-Orthologe mit N-terminalem Hexa-Histidin-*tag* in 293-Zellen exprimiert. Nach Entfernen der Zellkerne wurden die PNS analysiert. Mit PNS von nicht transfizierten Zellen wurde die Rab3-Konzentration der Proben so eingestellt, daß bei Auftragung der gleichen Proteinmenge das Signal mit einem gegen den Hexa-Histidin-*tag* gerichteten Antikörper gleich stark war (Abb. 3). Hierdurch konnte insbesondere für den Antikörper C142.1, der alle vier Isoformen detektiert, die relative Affinität abgeschätzt werden. Dieser Antikörper zeigte eine hohe Affinität gegenüber Rab3A und eine mäßige gegenüber Rab3C. Rab3B und insbesondere Rab3D wurden nur vergleichsweise schwach gebunden. Die Antikörper C142.2 und 583 waren spezifisch für die Rab3A- und die Antikörper U953 und U954 spezifisch für Rab3B-Detektion. Die Rab3C-spezifischen Antikörper P180 und P181 zeigten eine vergleichsweise geringe Affinität.

Die Antikörper, die über gekoppelte Rab3D-Peptide erstellt wurden, waren ebenfalls spezifisch für diese Isoform. Die Affinität dieser Antikörper war jedoch nicht sehr hoch. Die Antikörper, die über rekombinantes Rab3D erstellt wurden, waren nicht spezifisch. Der Antikörper SA5839 detektierte alle vier Rab3-Isoformen mit ungefähr gleicher Affinität und der Antikörper SA5838 hatte die größte Affinität zu Rab3D, band aber auch die anderen Isoformen.

Die Isoformen A, B und D unterscheiden sich in ihrer Größe nur durch eine Aminosäure. Ihr Migrationsverhalten in der Gelelektrophorese war jedoch signifikant unterschiedlich. Rab3C ist um sieben bis acht Aminosäuren größer als die anderen Isoformen, was sich auch in der langsameren gelelektrophoretischen Mobilität niederschlug. Die Mobilitäten von Rab3A und B waren ungefähr gleich, wobei die Rab3A-Bande ein wenig unterhalb der von Rab3B zu liegen kam. Die Rab3D-Bande lief jedoch ungefähr auf Höhe der von Rab3C und damit zwei bis drei kD oberhalb von den ersten beiden Isoformen. Auch die rekombinant exprimierten Proteine zeigten unterschiedliche Mobilität. Für Rab3A, C und D ließen sich in diesem Fall Doppel-

banden identifizieren, die durch fehlende hydrophobe oder andere posttranslationale Modifikationen zustande gekommen sein könnten.

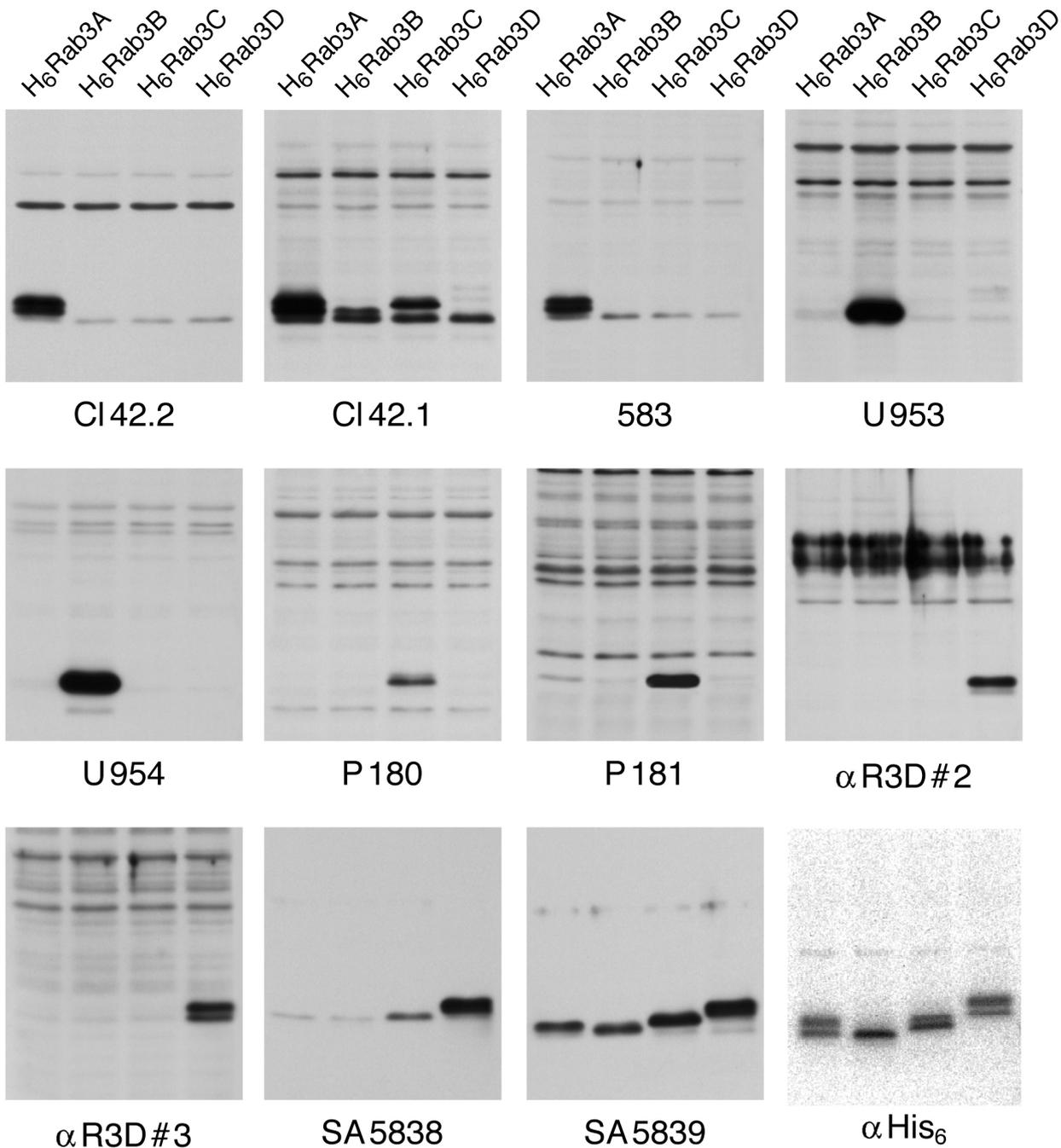


Abb. 3: Die vier Maus-Rab3-Isoformen wurden mit N-terminalem Polyhistidin-Tag in 293-Zellen transient exprimiert. Fünf Tage nach Transfektion wurden postnukleäre Überstände gewonnen und mit untransfizierten Zellen auf gleiche Rab3-Konzentration verdünnt. Die Quantifizierung erfolgte mit einem Antikörper gegen den Polyhistidin-Tag (α His₆) und Detektion mit radioaktiv markiertem Sekundärantikörper. 20 μ g Gesamtprotein wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembranen transferiert und mit monoklonalen Antikörpern (Cl42.1 und Cl42.2) und polyklonalen Antikörpern (583, U953, U954, P180, P181, α R3D#2, α R3D#3, SA5838 und SA5839) gerichtet gegen die Rab3-Isoformen über ECL-Detektion analysiert.

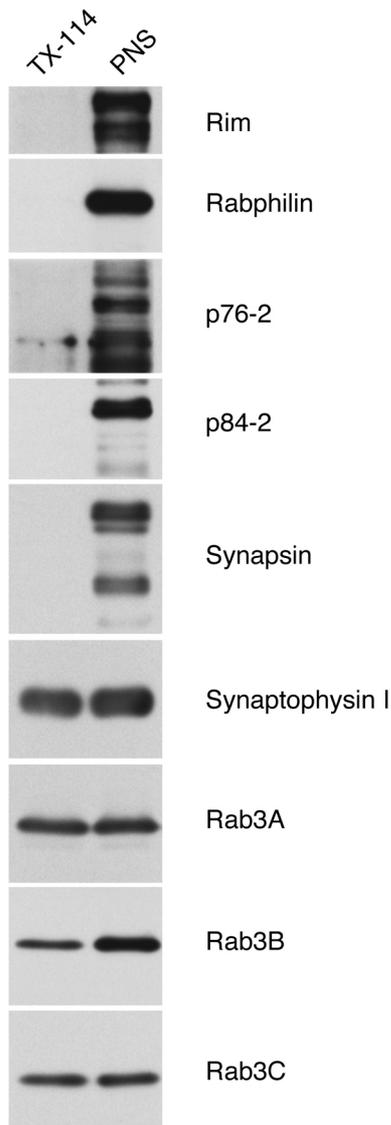


Abb. 4: Über Triton X-114-Extraktionen von PNS aus Maus-Gehirncortex wurden Membranproteine in der Detergenzphase angereichert. 20 µg Gesamtprotein im Ausgangsmaterial (PNS) wurden mit der äquivalenten Menge Extrakt über SDS-PAGE und Immunoblotanalyse mit ECL-Detektion analysiert. Die verwendeten Antikörper waren αRim, I734, C176.2, C184.2, E028, C7.2, C142.2, U954, S9.

4.5 Triton X-114-Anreicherung von Rab3

Triton X-114 bildete unterhalb von 23°C Mizellen. Bei höheren Temperaturen fand eine Phasentrennung statt, bei der sich hydrophobe Proteine in der Detergenzphase und hydrophile in der wässrigen Phase anreicherten. Durch diese Methode ließen sich hydrophobe Proteine unterschiedlichster Gewebetypen anreichern. Als Vorbereitung für die Untersuchung der Gewebeverteilung von Rab3-Isoformen wurde ihr Extrahierbarkeit getestet. In Extrakten aus PNS aus Maus-Gehirncortices reicherten sich Rab3A und Rab3C gleichermaßen wie das vesikuläre Transmembranprotein Synaptophysin I an (Abb. 4). Die Anreicherung von Rab3B fiel etwas geringer aus. Die potentiellen Rab3-Effektoren Rabphilin und Rim, die in subzellulären Fraktionierungen in Membrankompartimenten anreichern, sind nicht in der Detergenzphase nachweisbar.

4.6 Gewebeverteilung der Rab3-Isoformen

Die spezifischen Antikörper und das unterschiedliche Migrationsverhalten der Rab3-Isoformen ermöglichten eine systematische Untersuchung der Gewebeverteilung. Wie oben gezeigt konnten

Rab3-Isoformen über Triton X-114-Extraktionen angereichert werden und somit empfindlicher nachgewiesen werden. Es wurden verschiedene Organe aus zwei Ratten homogenisiert und die Zellkerne abgetrennt. Gewebe wie Herzmuskel, Skelettmuskel und Lunge, die einen hohen Faseranteil hatten, wurden mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Die gleichen Proteinmengen wurden jeweils mit Triton X-114 extrahiert und die im gleichem Volumen aufgenommenen Proben einer quantitativen Immunoblot-Analyse zugeführt (Abb. 5). Durch die Extraktion konnte eine Anreicherung der Membranproteine um das bis zu zehnfache erreicht werden, wie ein Vergleich mit den Ausgangshomogenaten zeigte.

Um die relativen Mengen der Rab3-Isoformen zu vergleichen, wurde auf jedem Blott die gleiche Menge rekombinantes Rab3-Protein aus transfizierten 293-Zellen aufgetragen. Als Kontrolle dienten zwei Membranproteine, das lysosomale LIMP-II und das endosomale Endobrevin, die eine relativ gleichmäßige Verteilung in den meisten untersuchten Geweben aufwiesen. Die Menge von Rab3A im Gehirncortex wurde als Referenzwert gleich 100 % gesetzt.

Rab3A war die häufigste Isoform im ZNS. Die Mengen von Rab3C waren um ca. achtfach und die von Rab3B um ca. 50fach geringer. Rab3A konnte weiterhin in den neuroendokrinen Organen, Hypophyse und Nebenniere, nachgewiesen werden. Geringe Mengen waren auch in den exokrinen Drüsen, Tränendrüse und Parotis sowie im Herzmuskel nachweisbar.

Das Rab3B-Protein wurde bisher in epithelialen Zelllinien und Geweben wie Leber, Niere und Darm nachgewiesen, in denen es den Membrantransport zu den Zonulae occludens steuert (Weber et al., 1994; Sunshine et al., 2000). In den Triton X-114-Gewebefractionen war Rab3B ausschließlich im ZNS, der Hypophyse und der Nebenniere und nicht in den untersuchten epithelialen Geweben nachweisbar. Die Menge von Rab3B war in der Hypophyse am größten und vergleichbar mit denen von Rab3A und D. In Homogenaten vom Mäusedarm und menschlichen Thrombozyten konnte kein Rab3B identifiziert werden. Bei der Auftragung von 250 µg Proteinäquivalent eines postnukleären Überstandes konnte in der Leber eine schwache Bande mit den Rab3B-spezifischen Antikörpern detektiert werden.

Die Verteilung von Rab3C ähnelte sehr stark der von Rab3A, so daß die größten Mengen im ZNS, gefolgt von den neuroendokrinen Organen, vorkamen. Weiterhin wurden geringe Mengen in der Ohrspeicheldrüse und im Skelettmuskel detektiert. Die Menge in der Hypophyse war drei- bis achtfach geringer als die der übrigen drei Isoformen. In der Nebenniere war Rab3C die häufigste Isoform.

Die Verteilung von Rab3D war grundsätzlich verschieden. Besonders in den exokrinen Drüsen Ohrspeicheldrüse, Tränendrüse, Pankreas und Submandibulardrüse waren sehr große Mengen dieser Rab3-Isoform. Sie übertrafen in der Tränendrüse und in der Ohrspeicheldrüse die Referenzmenge von Rab3A im Gehirncortex. In der Hypophyse, im Lymphknoten und Fettgewebe waren ebenfalls deutliche Konzentrationen von Rab3D nachweisbar. In Lungenextrakten, in denen Rab3D in Mastzellen nachgewiesen wurde, konnte jedoch kein Rab3D-Signal detektiert werden (Tuvim et al., 1999).

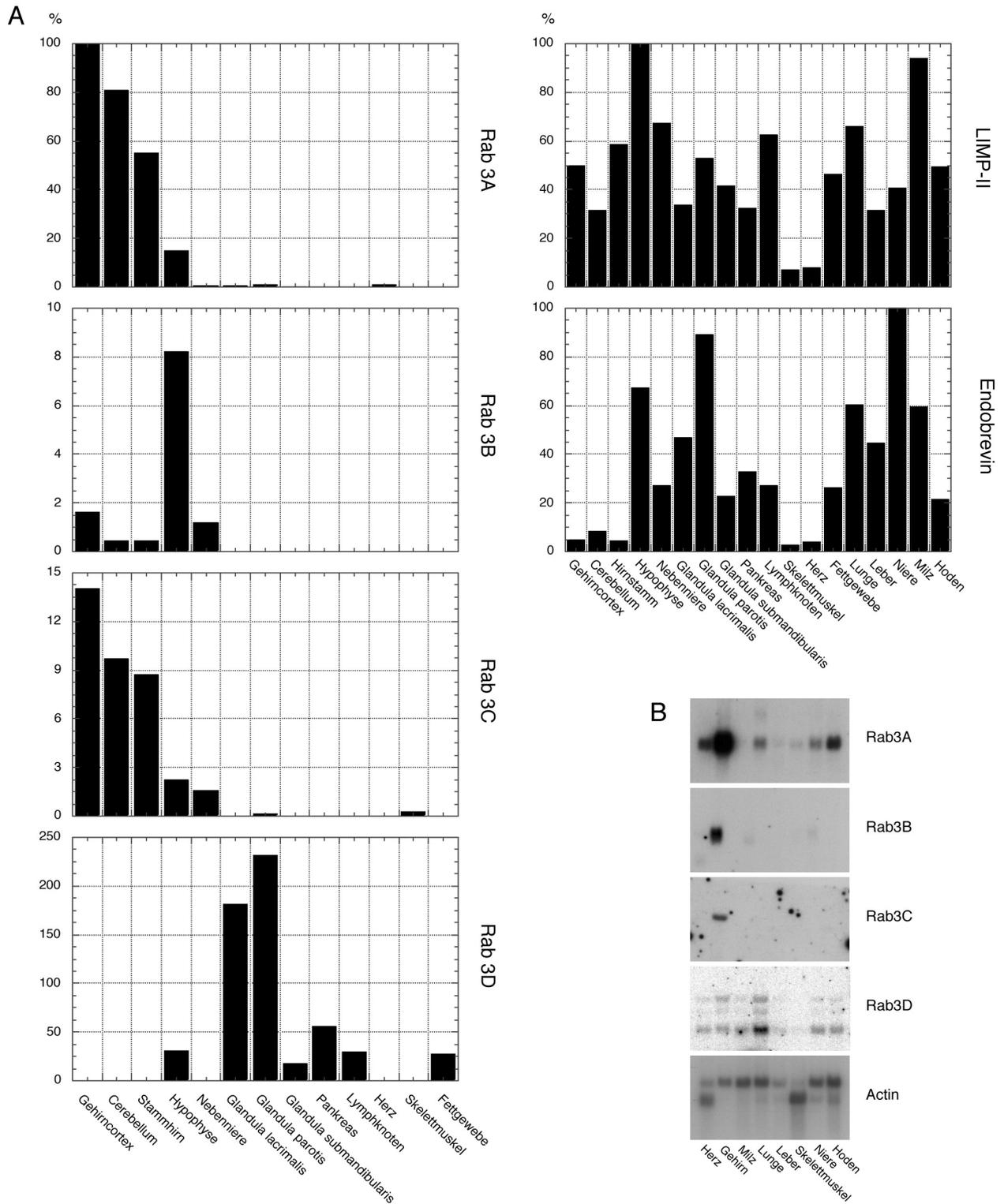


Abb. 5: (A) 18 Gewebehomogenate gleicher Proteinkonzentration aus Ratte wurden mit Triton X-114 extrahiert. Gleiche Mengen der Extrakte, die ca. 75 µg des Ausgangsmaterials entsprachen, wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembranen transferiert und mit den Rab3-Isoform-spezifischen Antikörpern (C142.2, U954, P180, αR3D#2) analysiert. Die Quantifizierung erfolgte über radioaktiv markierte sekundäre Antikörper und FujiBas 5000-Detektion. Die Mengen wurden über auf dem gleichen Blott aufgetragene Rab3-Standards mit N-terminalem Polyhistidin-Tag standardisiert. Die Menge von Rab3A im Gehirncortex wurde gleich 100% und die übrigen Signale dazu ins Verhältnis gesetzt. Als Kontrolle wurden die Mengen von LIMP-II und Endobrevin in den Extrakten bestimmt und im Verhältnis zum Gewebe mit der jeweils größten Menge dargestellt. (B) Northernblots aus Rattengewebe (Clontech) wurden mit Rab3-Isoform-spezifischen Sonden aus Maus-cDNA hybridisiert. Das gleiche Signal wurde für Rab3C mit einer Ratten-Isoform spezifischen Sonde des N-Terminus erhalten. Als Kontrolle wurde ein Blott mit einer Aktin-spezifischen Sonde analysiert.

Untersucht man eine zu 250 µg Gesamtprotein in postnukleären Überständen äquivalente Menge an Triton X-114-Gewebeextrakten, so kann Rab3D sowohl im Bulbus olfactorius als auch im Gehirncortex nachgewiesen werden (Abb. 6). Das Signal war nicht in Rab3BCD-Dreifach-Nullmutanten detektierbar, so daß es spezifisch für Rab3D war. Das analoge Signal in den Stammhirnproben war sehr schwach und konnte nicht eindeutig Rab3D zugewiesen werden, so daß die Mengen hier deutlich geringer ausfielen.

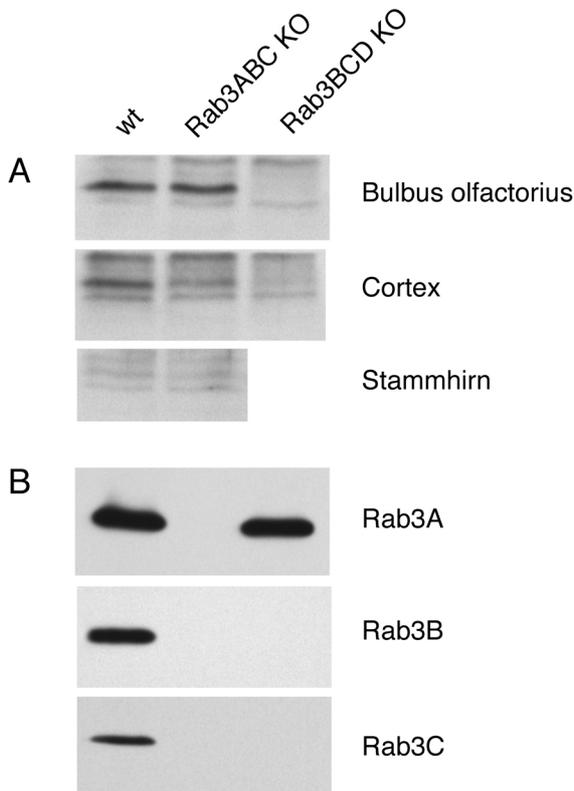


Abb. 6: (A) Triton X-114-Extrakte von postnukleären Überständen aus dem Bulbus olfactorius, dem Gehirncortex und dem Stammhirn einer Wildtyp-Maus, einer Rab3ABC- und einer Rab3BCD-Nullmutante wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und über Immunoblotanalyse (α R3D#2) mit ECL-Detektion analysiert. Die aufgetragene Proteinmenge ist äquivalent zu 250 µg Gesamtprotein aus den PNS. (B) Analoge Analyse von 20 µg Gesamtprotein der kernlosen Gewebekomponenten zur Sicherung des Genotyps. Verwendete Antikörper: C142.2, U954, S9.

Durch den unterschiedlichen Gehalt an Lysosomen und Endosomen der untersuchten Gewebe variierten in diesen die Mengen der verwendeten Markerproteine LIMP-II und Endobrevin. Die Mengen an Endobrevin im ZNS und von Endobrevin und LIMP-II im Muskel waren gering.

Im Vergleich zum Proteinmuster wurde das mRNA-Muster der Rab3-Isoformen untersucht. Standard *Northernblots* aus verschiedenen Rattengeweben (Clontech) wurden mit radioaktiven Sonden, erstellt aus den Maus-Rab3-cDNA-Klonen, hybridisiert (Abb. 5). Eine Kontrollsonde aus Aktin ergab in allen untersuchten Geweben ein vergleichbares Signal. Die Rab3A-spezifische Sonde detektierte eine ca. 1,4 kb große Bande. Die deutlich größte Signalstärke war im Gehirn zu finden. Aber auch im Herz-, Hoden- und Lungengewebe war die Rab3A-mRNA deutlich nachweisbar. Nach längerer Exposition waren auch Banden gleicher Größe in den übrigen Geweben wie Niere, Milz, Leber und Skelettmuskel zu sehen. Im Gegensatz dazu wurde das Protein nur im Gehirn und Herz nachgewiesen. Da der verwendete Rab3A-spezifische Antikörper eine hohe Affinität aufwies, schien die mRNA in diesen Geweben entweder nicht translatiert zu werden oder das Protein wurde wieder degradiert.

Die Verteilung der Rab3B-mRNA glich der von Rab3A. Die Bandenintensität war jedoch schwächer, so daß nur im Gehirn ein Signal deutlich zu sehen war. Nach längerer Exposition waren wie im Falle der Rab3A-mRNA auch für Rab3B in den übrigen Geweben Signale sichtbar.

Mit der Rab3C-spezifischen Sonde wurde eine wesentlich größere Bande bei ca. 9 kb detektiert. Diese mRNA war nur im Gehirn nachweisbar. Bei einem anderen Versuch konnte eine Bande gleicher Größe auch im Hoden nachgewiesen werden.

Das Bandenmuster für Rab3D mit drei Banden der Größe 2, 3 und 4 kb entsprach dem bereits veröffentlichten Muster (Adachi et al., 2000). Die Expression war im Lungengewebe am stärksten und im Skelettmuskel am niedrigsten. Die übrigen Gewebe zeigten eine vergleichbare Expressionsrate. Das mRNA-Muster unterschied sich wesentlich vom Proteinmuster. Rab3D konnte im Gehirn nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden (Abb. 6). Dagegen war das Protein in der Lunge, Leber, Milz und Niere nicht detektierbar. Rab3D wurde in einer Mastzelllinie und in Mastzellen nachgewiesen (Roa et al., 1997; Tuvim et al., 1999). In dieser Arbeit wurden Homogenate von der Gesamtlunge verwendet, so daß die Rab3D-Konzentration aus Mastzellen erniedrigt wurde. Aufgrund der hohen Bandenintensität scheint es jedoch unwahrscheinlich, daß die Rab3D-mRNA nur aus Mastzellen der Lunge entstammte. Die mRNA-Blotts enthielten jedoch keine Proben aus den exokrinen Drüsen, die die höchsten Rab3D-Konzentrationen aufwiesen. Somit war eine umfassende Korrelation der mRNA-Mengen mit den Proteinmengen nicht möglich.

4.7 Proteinverteilung im Gehirn und in neuroendokrinen Drüsen

Mit Hilfe der Gewebeextrakte wurde gezeigt, daß die Rab3-Isoformen A, B und C hauptsächlich in ZNS und neuroendokrinen Drüsen vorkamen. Um die Verteilung im ZNS näher zu untersuchen, wurden verschiedene Hirnregionen, sowie Retina, Hypophyse und Nebenniere präpariert und die Rab3-Proteinmengen in zellkernlosen Homogenaten analysiert (Abb. 7). Die häufigste Isoform Rab3A zeigte die gleichmäßigste Verteilung. Verglichen mit Gesamtgehirnhomogenaten war es nur in den Hippocampusregionen CA3 und CA1/Gyrus dentatus leicht angereichert. Im Hirnstamm und der Retina war die Menge im Vergleich zur Gesamtgehirnprobe geringer.

Die höchsten Rab3B-Mengen waren im Bulbus olfactorius vorhanden. Sie glichen denen in der Hypophyse. Im Cerebellum, im Hirnstamm und in der Retina war Rab3B nicht in den postnukleären Homogenaten nachweisbar. Im Hippocampus war die Menge in der CA1/Gyrus dentatus-Region größer als in der CA3-Region. Die Mengen im Neocortex waren vergleichbar zur Gesamtgehirnprobe.

Rab3C zeigte die höchste Expression im Hippocampus, Neocortex und Bulbus olfactorius. Die übrigen untersuchten Regionen enthielten geringere Mengen.

Zum Vergleich wurde die Verteilung weiterer synaptischer Proteine untersucht. Die Verteilung von Rabphilin und Synaptophysin war homogen und glich der von Rab3A. In den neuroendokrinen Organen konnten beide mit den verwendeten Antikörpern nicht nachgewiesen werden. Mit polyklonalen Antikörpern ist Synaptophysin auch in der Neurohypophyse nachweisbar (Abb. 8). Durch unterschiedliche posttranslationale Glykosylierung war das Molekulargewicht verschieden (Johnston et al., 1989).

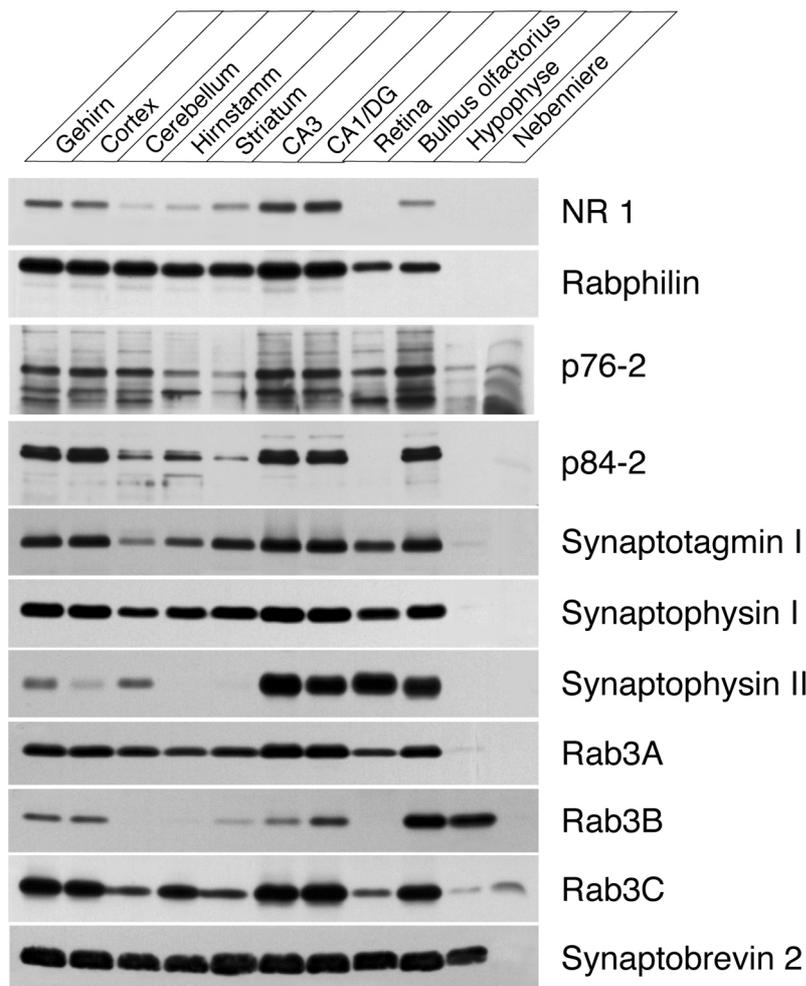


Abb. 7: Immunoblotanalyse mit ECL-Detektion der Verteilung der angegebenen Proteine in verschiedenen Hirnregionen. 30 µg Gesamtprotein von postnukleären Überständen wurden gelektrophoretisch aufgetrennt und transferiert auf Nitrocellulosemembranen analysiert. Verwendete Antikörper: C154.1 (NR1), I734 (Rabphilin), C184.2 (p84-2), V216 (Synaptotagmin I), C17.2 (Synaptophysin I), α p37 (Synaptophysin II), C142.2 (Rab3A), U953 (Rab3B), P180 (Rab3C), C169.1 (Synaptobrevin 2).

Die Verteilung der NMDA-Rezeptoruntereinheit 1 (NR1) war auf den Hippocampus konzentriert. Im Hirnstamm, Cerebellum, Striatum und Bulbus olfactorius waren nur vergleichbar geringe Mengen zu detektieren. In der Retina war sie nicht nachweisbar. Im Vergleich dazu war die Menge an Synaptophysin in der Retina, dem Bulbus olfactorius und dem Hippocampus am größten. Synaptobrevin 2 wurde in allen untersuchten Regionen bis auf die Nebenniere in gleicher Menge exprimiert.

4.8 Verteilung der Rab3-Isoformen in der Hypophyse

Die Hypophyse besteht aus einem Vorder-, Mittel- und Hinterlappen. Den Vorder- und Hinterlappen bezeichnet man auch als Adeno- bzw. Neurohypophyse. Da alle vier Rab3-Isoformen in vergleichbaren Mengen in der Hypophyse gefunden wurden, wurde dieses Organ einer näheren Betrachtung unterzogen. Die Adeno- und Neurohypophyse wurden präpariert und die Verteilung der vier Isoformen mit Immunoblotanalyse untersucht (Abb. 8). Die Mengen an Rab3A und C waren in der Neurohypophyse wesentlich größer als in der Adenohypophyse. Im Gegensatz dazu waren die Rab3B-Mengen in der Adenohypophyse größer als in der Neurohypophyse, und Rab3D war zum weitaus größten Teil in der Adenohypophyse nachweisbar. Von den beiden Rab3-Effektoren war nur Rabphilin ausschließlich in der Neurohypophyse zu detektieren. Die Rim 1-Verteilung war auf das ZNS beschränkt.

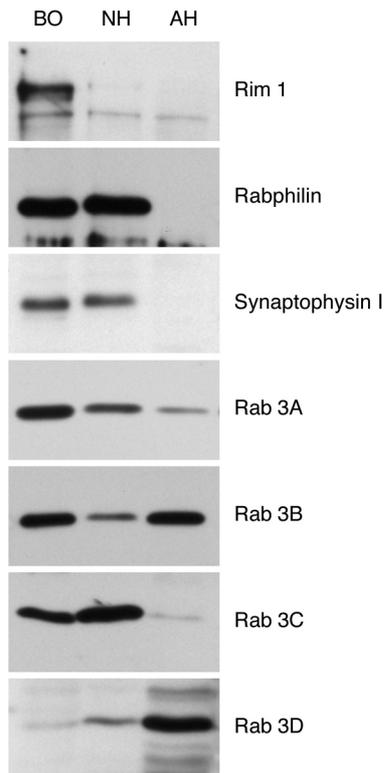


Abb. 8: Immunoblotanalyse mit ECL-Detektion der Rab3-Verteilung in der Ratten-Hypophyse. Der Bulbus olfactorius, die Adeno- und Neurohypophyse aus Ratten wurden präpariert, die postnukleären Überstände (20-30 µg Gesamtprotein) über SDS-PAGE und Transfer auf Nitrocellulosemembranen aufgetrennt und mit den folgenden Antikörpern analysiert: anti-RIM (Rim 1), I743 (Rabphilin), 580 (Synaptophysin I), C142.2 (Rab3A), U954 (Rab3B), S9 (Rab3C) und α R3D#2.

4.9 Vergleichende Immunhistochemie der zerebralen Rab3-Verteilung

Über Immunoblotanalyse ließen sich die Mengen eines Proteins bezogen auf die Gesamtproteinmenge und die Spezifität des Signals gut bestimmen. Die Immunhistochemie zeigte im Vergleich dazu eine höhere örtliche Auflösung. Um die Verteilung der Rab3-Isoformen in einzelnen synaptischen Schichten zu untersuchen, wurden ausgewählte Hirnregionen mit den Rab3-Isoform-spezifischen Antikörpern gefärbt. Die Verteilung von Rab3A im Hippocampus war auch in der Immunhistochemie homogen (Abb. 9; Geppert et al., 1994). Dahingegen wurden Rab3B und C am stärksten in den Axonterminalen des Tractus perforans in der äußeren Schicht des Stratum moleculare des Gyrus dentatus und des Stratum lacunosum moleculare exprimiert. Wie der Vergleich mit den Gewebeschnitten von Rab3B- und C-Maus-Nullmutanten zeigte, ist die Menge in anderen Hippocampusregionen geringer. Der Vergleich mit Maus-Nullmutanten ermöglichte die eindeutige Identifikation von spezifischen Signalen.

Die Verteilung des Rab3-Effektors Rabphilin war im Vergleich differenzierter. Die größte Menge war im Stratum lucidum, in dem die Moosfaserterminalen enden, nachweisbar. Ebenfalls hoch waren die Mengen im Stratum oriens und radiatum sowie in der polymorphen Schicht des Gyrus dentatus. Die Molekularschichten der Region CA1 und des Gyrus dentatus enthielten vergleichsweise geringe Mengen Rabphilin. Somit war Rabphilin im Hippocampus hauptsächlich mit Rab3A colokalisiert und in den Synapsen der höchsten Rab3A- und C-Mengen nur in geringen Mengen vorhanden.

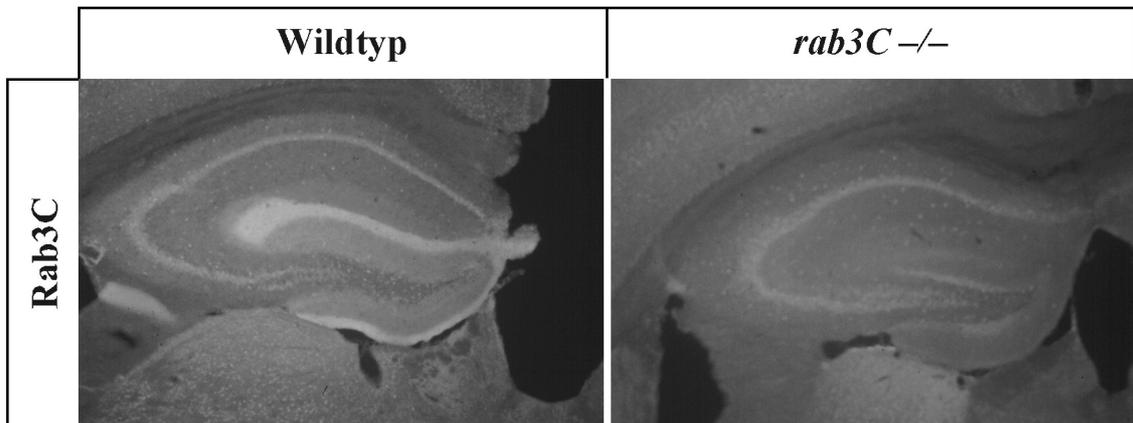
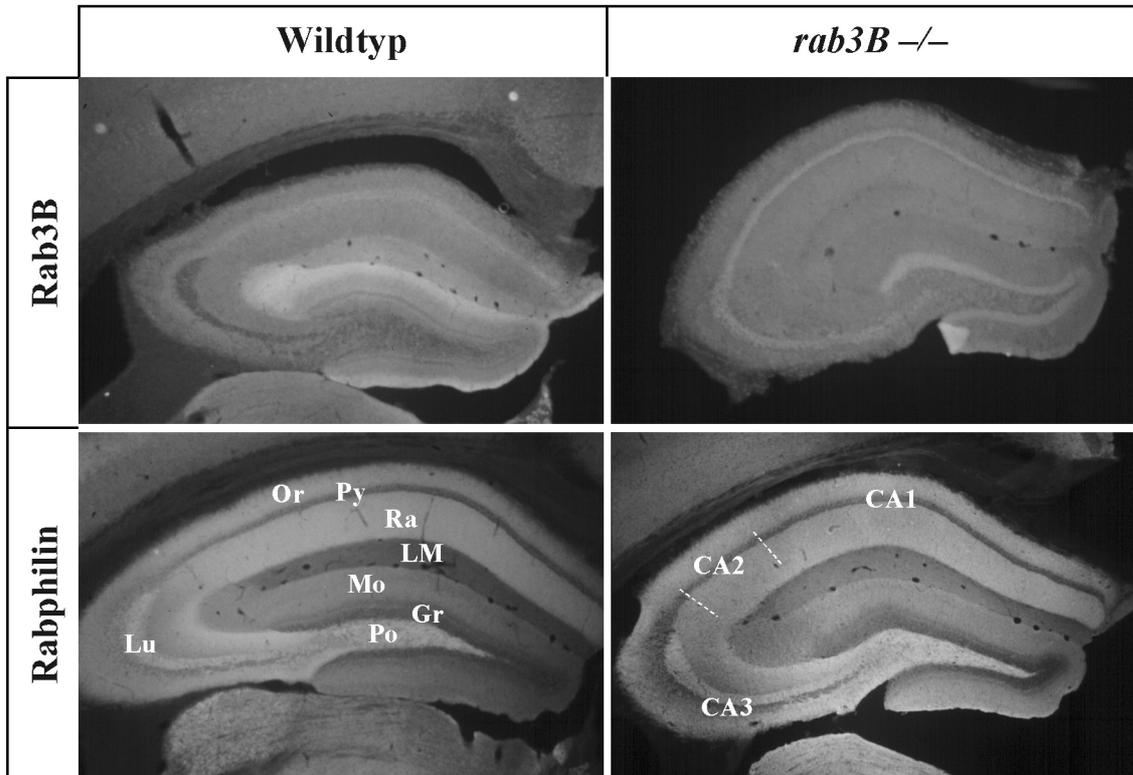
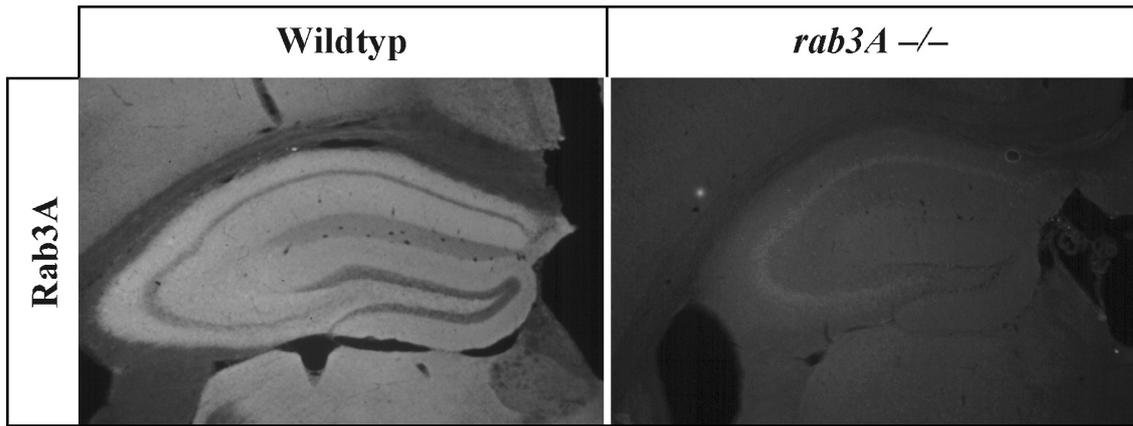


Abb. 9: Immunfluoreszenzanalyse der Verteilung der Rab3-Isoformen im Hippocampus (50fache Vergrößerung). Frontale Gehirngewebeschnitte (20 µm Dicke) aus Wildtyp-Mäusen wurden mit Rab3-Isoform-spezifischen Antikörpern inkubiert und die Signale der Sekundäntikörper mit einem Epifluoreszenzmikroskop visualisiert. Zur Kontrolle der Spezifität der Antikörper wurden Schnitte von Rab3A-, Rab3B- oder Rab3C-Nullmutanten analysiert. Das Rabphilinmuster wurde in Wildtyp-Mäusen und Rab3B-Nullmutanten verglichen. Die Bezeichnung der hippocampalen Schichtung und Regionen ist exemplarisch in den Rabphilin-Färbungen gezeigt. Or: Stratum oriens, Py: Stratum pyramidale, Ra: Stratum radiatum, LM: Stratum lacunosum moleculare, Mo: Stratum moleculare des Gyrus dentatus, Gr: Körnerzellschicht, Po: polymorphe Synapsenschicht des Gyrus dentatus, Lu: Stratum lucidum, Rab3A (C142.2), Rab3B (U954), Rab3C (S9), Rabphilin (I734).

Um die synaptische Lokalisation von Rab3B näher zu analysieren, wurde die Hirnregion mit der größten Rab3B-Konzentration, der Bulbus olfactorius, immunhistochemisch untersucht. Die Färbung von Rab3A war wiederum homogen über die Lamina glomerulosa, die synaptischen Schichten und die Körnerzellschicht verteilt (Abb. 10). Rab3B war hauptsächlich in der externen plexiformen Schicht lokalisiert, wie der Vergleich mit Schnitten von Rab3B-Nullmutanten zeigte. Doppelmarkierungen mit Rab3A- und B-spezifischen Antikörpern ergaben, daß beide Proteine im größten Teil der Synapsen der äußeren plexiformen Schicht colokalisiert waren. Die Überlappung war jedoch nicht vollständig, wie durch die grün und rot gefärbten Bezirke in der überlagerten Darstellung deutlich wurde.

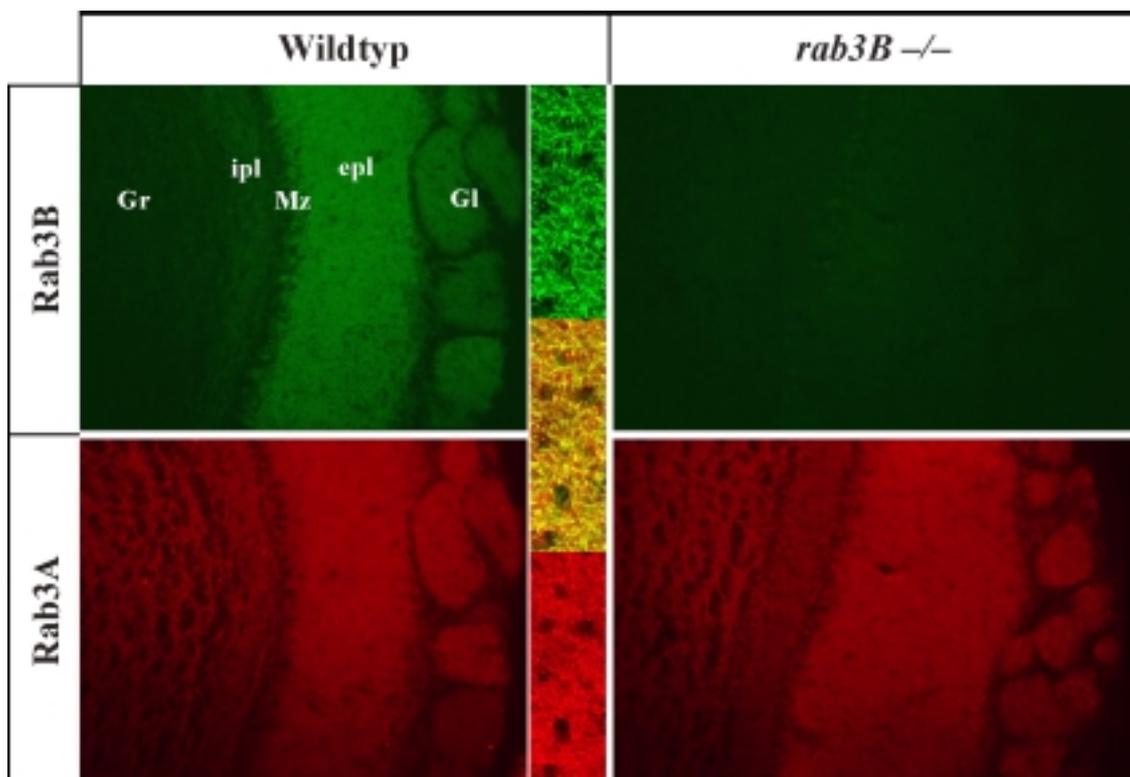


Abb. 10: Vergleichende Immunfluoreszenzanalyse der Verteilung von Rab3A und B im Bulbus olfactorius. Frontale Gehirngewebeschnitte (20 µm Dicke) aus Wildtyp-Mäusen und Rab3B-Nullmutanten wurden mit Antikörpern gerichtet gegen Rab3A (C142.2, rotes Signal) und Rab3B (U954, grünes Signal) inkubiert und die Signale der Sekundäntikörper mit einem Epifluoreszenzmikroskop visualisiert (200fache Vergrößerung). Die Colokalisation (gelbes Signal) in der externen plexiformen Schicht (epl) wurde mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops untersucht (630fache Vergrößerung, Einschub Mitte). Gl: Lamina glomerulosa, Mz: Lamina mitralis, ipl: innere plexiforme Schicht, Gr: Lamina granulosa.

Im Gegensatz zu Rab3B konnten sowohl Rab3A als auch C in der Retina nachgewiesen werden. Rab3A war in den beiden isoliert vorkommenden synaptischen Schichten, innere und äußere

plexiforme Schicht, enthalten (Abb. 21). Rab3C kam hingegen nur in der äußeren plexiformen Schicht vor.

Zusammenfassend ließen sich somit Synapsen identifizieren, die wie die innere plexiforme Schicht in der Retina fast ausschließlich Rab3A oder wie in der externen plexiformen Schicht des Bulbus olfactorius bzw. der äußeren plexiformen Schicht der Retina Rab3A zusammen mit Rab3B oder C oder wie im Hippocampus alle drei Isoformen enthielten.

4.10 Subzelluläre Lokalisation der Rab3 Isoformen

Rab3A und C binden an synaptische Vesikel und dissoziierten von ihnen Ca^{2+} -abhängig während der Exozytose (Fischer von Mollard, 1991 und 1993). Im Gegensatz dazu begleiteten Transmembranproteine wie Synaptobrevin und Synaptophysin synaptische Vesikel durch den gesamten Lebenszyklus wie Biogenese und Wiederverwertung, die die Stationen Plasmamembran, Clathrin-bemantelte Vesikel, endocytotische Intermediate und Endosomen enthielt.

Wie oben gezeigt waren Rab3A und B in einigen Synapsen colokalisiert. Inwieweit Rab3B auch an synaptische Vesikel bindet, wurde mit Hilfe von subzellulären Fraktionierungen untersucht. Durch die große Anzahl von Nervenzellendigungen im Gehirn ließen sich synaptische Vesikel durch subzelluläre Fraktionierungstechniken anreichern. Nach Homogenisation (H) in isotonischen Puffern wurden Zellkerne und Zellen durch Zentrifugation abgetrennt (P1). Aus dem Überstand wurden Synaptosomen (Synapsen, die von den Axonen und Dendriten abgeschert wurden und sich wieder verschlossen haben) durch höhertourige Zentrifugation angereichert (P2). Der Überstand enthielt verdünntes Cytosol und kleine Vesikel wie Mikrosomen, Lysosomen und synaptische Vesikel, die bei der Homogenisation freigesetzt und durch Ultrazentrifugation vom Cytosol (S3) abgetrennt wurden (P3). Nach hypoosmolarer Lyse wurden die aufgeplatzen Synaptosomen abzentrifugiert (LP1) und aus dem Überstand die freigesetzten synaptischen Vesikel durch Ultrazentrifugation pelletiert (LP2). Der Überstand enthielt das stark verdünnte synaptische Cytosol (LS2), das über Protein-Fällung oder Ultrafiltration konzentriert wurde. Die Plasmamembran mit den synaptischen Spezialisierungen, den aktiven Zonen, wurden aus den aufgeplatzen Synaptosomen durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert (SPM, Jones und Matus, 1974). Synaptische Vesikel aus der rohen synaptischen Vesikelfraktion (LP2) wurden nach Dichtegradientenzentrifugation über Gelfiltration mit Glasperlen definierter Porengröße gereinigt (PIII, Nagy et al., 1976; Huttner et al., 1983; Proben freundlicherweise von Dr. S. Takamori zur Verfügung gestellt).

Zur Charakterisierung der Fraktionen wurden spezifische Markerproteine analysiert. Die synaptischen Vesikelproteine Synaptophysin I, Synaptobrevin 2 und Synaptotagmin I waren in der rohen synaptischen Vesikelfraktion und den gereinigten synaptischen Vesikeln angereichert (Abb. 11 und 12). Die löslichen Fraktionen enthielten keine Membranproteine, so daß die Abtrennung quantitativ erfolgt war. GDI, ein cytosolisches Protein, war charakteristisch in den Fraktionen S3 und LS2 angereichert. Die löslichen synaptischen Proteine Complexin I und II und α - und β -Synuclein waren dahingegen hauptsächlich in der synaptischen Cytosolfraktion

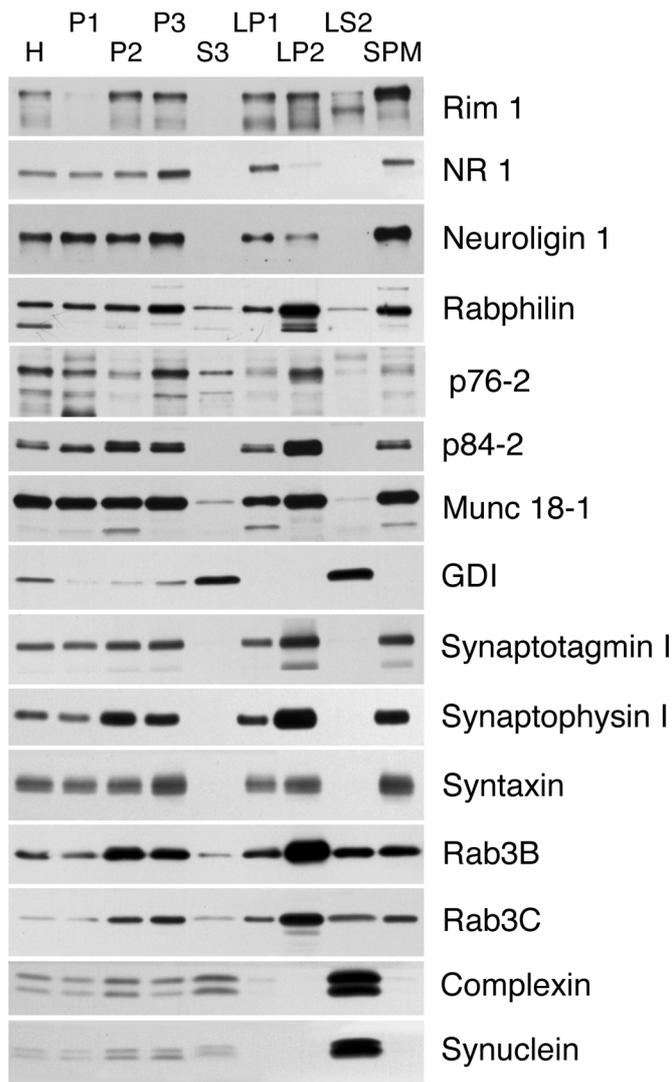


Abb. 11: Immunoblotanalyse mit ECL-Detektion von subzellulären Fraktionierungen aus Mausgehirngewebe. Gehirncortices wurden homogenisiert (H) und in Zellkernsediment (P1), rohe Synaptosomenfraktion (P2), Mikrosomenfraktion (P3) und Cytosol (S3) fraktioniert. Aus den Synaptosomen wurden eine rohe synaptische Plasmamembranfraktion (LP1), eine rohe synaptische Vesikelfraktion (LP2), synaptische Cytosolfraction (LS2) und eine synaptische Plasmamembranfraktion mit angereicherten aktiven Zonen und postsynaptischen Verdichtungen (SPM) erhalten. Die Fraktionen wurden über SDS-PAGE und Transfer auf Nitrocellulosemembranen aufgetrennt und mit folgenden Antikörpern analysiert: anti-RIM (Rim 1), C154.1 (NR1), 4C12 (Neurologin 1), I734 (Rabphilin), C176.2 (p76-2), C184.2 (p84-2), I370 (Munc18-1), C181.1 (GDI), V216 (Synaptotagmin I), C17.2 (Synaptophysin I), HPC-1 (Syntaxin), U954 (Rab3B), P180 (Rab3C), P942 (Complexin 1 und 2) und Q698 (α - und β -Synuclein).

(LS2) lokalisiert. Die Abwesenheit der löslichen Proteine in der synaptischen Vesikelfraktion bestätigte wiederum eine quantitative Trennung. Angeheftete synaptische Vesikel in der synaptischen Plasmamembranfraktion (SPM) wurden durch die synaptischen Vesikelmarker identifiziert. Proteine der aktiven Zone wie z.B. Rim 1 oder der postsynaptischen Verdichtungen wie z.B. NR1 und Neurologin 1 waren in dieser Fraktion angereichert.

Um nun die subzelluläre Verteilung der Rab3-Isoformen in der Maus zu untersuchen, wurden die Fraktionen mit den spezifischen Antikörpern analysiert. Die Lokalisation von Rab3A und C auf synaptischen Vesikeln und im synaptischen Cytosol konnte bestätigt werden. Rab3B zeigte die gleiche Verteilung, so daß auch diese Rab3-Isoform hauptsächlich an synaptische Vesikel gebunden und eine kleinere Fraktion löslich im Cytosol vorkam. Dieses Ergebnis konnte mit den gereinigten synaptischen Vesikeln aus Ratten untermauert werden (Abb. 12). Hier fand sich eine Anreicherung von Rab3B zwischen der unreinen synaptischen Vesikelfraktion (LP2) und dem zweiten Gipfel (PIII) der Säulen-Chromatographie, die zu 90 % synaptische Vesikel enthielt (S. Takamori, persönliche Mitteilung). Als Kontrollen wurden Rab3A und Synaptophysin I untersucht, die ebenfalls im zweiten Gipfel angereichert waren. Die relative Menge an LIMP-II, ein lysosomales Membranprotein, nahm hingegen in den synaptischen Vesikelfractionen ab.

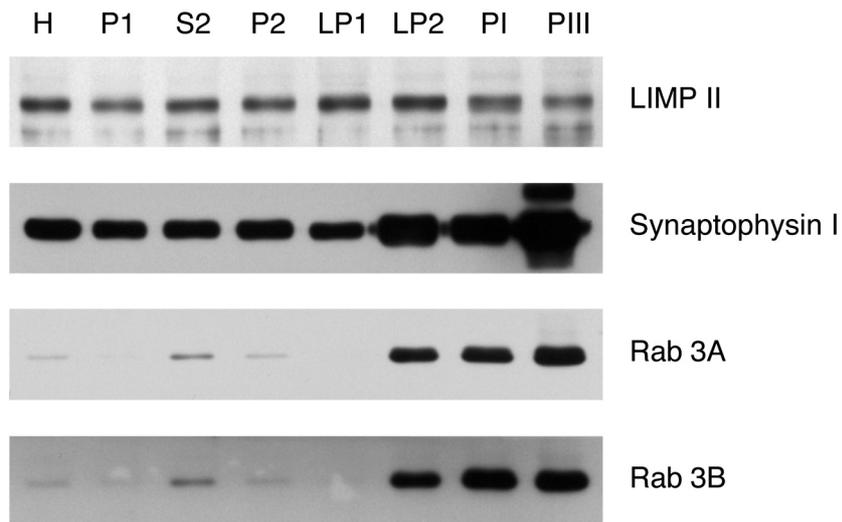


Abb. 12: Immunoblottanalyse mit ECL-Detektion von subzellulären Fraktionierungen und Reinigung synaptischer Vesikel über Säulenchromatographie aus Rattengehirn. Gehirne wurden homogenisiert (H) und in Zellkernsediment (P1), rohe Synaptosomenfraktion (P2), Synaptosomenüberstand (S2) fraktioniert. Aus den Synaptosomen wurden eine rohe synaptische Plasmamembranfraktion (LP1) und eine rohe synaptische Vesikelfraktion (LP2) erhalten. Nach Dichtegradientenzentrifugation wurden die synaptischen Vesikel über Säulenchromatographie gereinigt und die beiden Elutionsgipfel (PI und PIII) gesammelt. Die Fraktionen (5 µg Gesamtprotein) wurden über SDS-PAGE und Transfer auf Nitrocellulosemembranen aufgetrennt und mit folgenden Antikörpern analysiert: anti-LIMP II (LIMP-II), C7.2 (Synaptophysin I), C142.2 (Rab3A) und U954 (Rab3B). (Proben freundlicherweise von Dr. S. Takamori zur Verfügung gestellt).

4.11 Immunoisolation von synaptischen Vesikeln

Um zu untersuchen, ob die gleichen Vesikel alle drei zentralnervösen Rab3-Isoformen, oder ob Subpopulationen nur jeweils eine Rab3-Isoform enthielten, wurde eine Immunoisolierung angewendet. Mit an eine Eupergit C1Z-Methacrylat-Matrix kovalent gebundenen Antikörpern wurden Organellen isoliert (Burger et al., 1989; Antonin et al., 2000). Als Antikörper wurden monoklonale Antikörper, gerichtet gegen die synaptischen Vesikelproteine Rab3A und Synaptobrevin 2 und gegen das endosomale Markerprotein Rab5, verwendet. Die reaktive Gruppe wurde in der Kontrollmatrix mit Glycin abgesättigt. Postnukleäre Überstände aus Rattengehirn wurden hochtourig (50000x g) abzentrifugiert und Vesikel aus dem Überstand mit den verschiedenen Immuno-Matrices isoliert. Die Menge der Matrix wurde so eingestellt, daß 50 % der Immunreaktivität des Proteins des Ausgangsmaterials abgetrennt wurden (Abb. 13). Die Kontroll-Matrices banden unter diesen Bedingungen keine Vesikel, so daß die Immunoisolation spezifisch war. Mit den Synaptobrevin- und Rab3A-Antikörpern wurde die gleiche Menge Rab3A pelletiert. Auch Rab3B und C waren zu je 50 % im Überstand und im Pellet verteilt, so daß sie auf den gleichen Vesikeln wie Synaptobrevin 2 und Rab3A lokalisiert waren. Ein Teil dieser synaptischen Vesikel enthielt auch Rab5, da es in dem Rab3A- und Synaptobrevin-Immuno-Sediment zu einem geringeren Anteil nachweisbar war. Sec61α war in diesen Sedimenten nur in geringen Mengen vorhanden, so daß Vesikel aus endoplasmatischem Retikulum nicht pelletiert wurden.

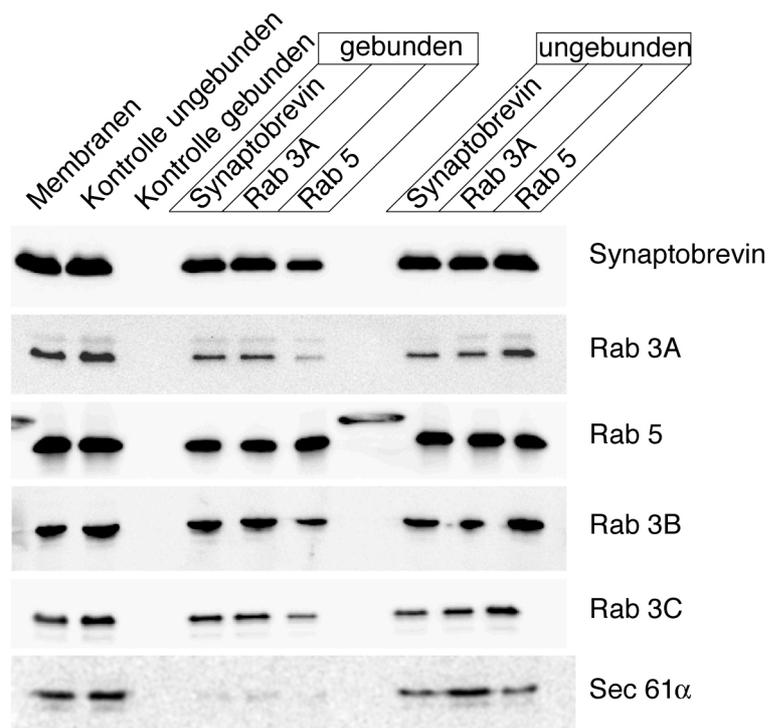


Abb. 13: Colokalisation von Rab3-Isoformen auf immunisolierten synaptischen Vesikeln. Ein 50000x g Überstand von Rattengehirnhomogenaten wurde mit an eine Eupergit-Matrix gekoppelten Antikörpern gerichtet gegen Synaptobrevin (Cl69.1), Rab3A (Cl42.2) und Rab5 (Cl621.3) inkubiert (Antonin et al., 2000). Die reaktive Gruppe der Controlmatrix war mit Glycin abgesättigt. Das gleiche Volumen der gebundenen und ungebundenen Membranfraktion wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit polyklonalen Antikörpern gerichtet gegen Synaptobrevin 2, Rab3A, Rab3B, Rab3C, Rab5 und Sec61 α nach Transfer auf Nitrocellulosemembranen analysiert. Zum Vergleich ist das Signal in der eingesetzten Membranfraktion gezeigt (Proben freundlicherweise von W. Antonin zur Verfügung gestellt).

Rab5 ist ein Endosomen-Marker. Mit Rab5-spezifischen Antikörpern isolierte Vesikel enthielten zu einem geringeren Anteil die synaptischen Vesikel-Marker Synaptobrevin und Rab3A und C sowie Rab3B. Somit wurden mit dem Rab5-Antikörper auch der Teil der synaptischen Vesikel isoliert, der Rab5 enthielt.

Rab3D konnte weder durch die subzellulären Fraktionierungen noch durch die Immunisolierung im Gehirn bzw. synaptischen Vesikeln nachgewiesen werden.

4.12 Erzeugung und Phänotyp von Rab3-Nullmutanten

Die Konstruktion des Rab3B-Rekombinationsvektors erfolgte über Subklonierung des 9,2 kb großen *BglIII/NotI*-Fragment aus dem genomischen Klon #6-1 in den mit *BamHI* und *NotI* verdauten Vektor pTK-Neo 3a (Abb. 1). In diesen wurde der über die Primer 540 und 541 amplifizierte zweite Arm (1,9 kb) in die *Clal*-Restriktionsschnittstelle eingefügt. Der resultierende Rekombinationsvektor ersetzte über die homologe Rekombination das *BglIII/SpeI*-Fragment mit dem ersten kodierenden Exon durch das Neomycin-Resistenzgen. Das Resistenzgen lag in inverser Orientierung zum Rab3B-Gen vor, so daß zusätzlich die Transkription vom Rab3B-Gen behindert wurde. Nach Transformation des linearisierten Rekombinationsvektors in embryonale Stammzellen (E14) wurden diese selektioniert. Die Analyse der homolog rekombinierten Klone erfolgte mit einem Primerpaar, von denen einer 5' zum kurzen Rekombinationsarm (Primer 569) und der andere am Neomycin-Resistenzgen band (Primer 428), über PCR-Analyse. In 56 % der 288 vereinzelt Klone war der Rekombinationsvektor zielgerichtet rekombiniert. Die Identität des PCR-Produktes wurde über das Restriktionsmuster durch Verdau mit den Enzymen *EcoRV*, *BamHI*, *EcoRI* und *HinDIII* und durch dessen Ansequenzierung bestätigt. Aus den Embryonalstammzell-Klonen #2 und #218 wurden durch Blastozysteninjektion über pseudoschwangere Mäuse mehrere chimäre Männchen erhalten, die mit Mäusen der Linie C57Bl6/J verpaart wurden. Die erhaltenen heterozygoten Tiere ergaben in der nächsten Generation die Rab3B-Nullmutanten, deren Anzahl der Mendel'schen Verteilung

entsprach. Sie zeigten keine offensichtlichen Verhaltensauffälligkeiten und konnten wie auch die Rab3A-, C- und D-Nullmutanten als homozygote transgene Linie gehalten werden.

Um zu überprüfen, ob die vorhandenen Rab3-Isoformen den Verlust einer Isoform kompensieren können, wurden Mehrfach-Nullmutanten durch Kreuzung der Einzel-Nullmutanten gewonnen.

Für die zu erwartenden hohen Probenzahlen wurde eine Genotypisierungsstrategie entwickelt, die den Aufwand der Probenbearbeitung minimierte. Die Schwanzbiopsien wurden in 1,2 ml fassenden Reaktionsgefäßen (Collection microtubes, Qiagen) lysiert und die zugegebene Protease durch Kochen inaktiviert. Mit Hilfe eines Replikators wurden die Proben in 96-Loch-PCR-Platten überführt und nach der Reaktion mit 12-Kanalpipetten auf Agarosegele aufgetragen und analysiert. Spezifische Primerpaare für die Wildtyp- und transgenen Allele ergaben PCR-Produkte zwischen 200 bis 700 bp Länge: Rab3A wt: 1674/737; Rab3A KO: 1673/637; Rab3B wt: 1145/1143; Rab3B KO: 1145/428; Rab3C wt: 1189/1147; Rab3C KO: 1189/428; Rab3D wt: 1149/1151; Rab3D KO: 1149/428.

Die Verpaarung von Doppel-Nullmutanten für Rab3A und B und für Rab3C und D resultierte in Nachkommen, die heterozygot für die vier transgenen Rab3-Allele waren. Die Nachkommen der Vierfach-Heterozygoten ergaben Doppel-Nullmutanten und Doppel-Heterozygote unter anderem in den Kombinationen Rab3A $-/-$, B $-/-$, C $+/-$, D $+/-$ und Rab3A $+/-$, B $+/-$, C $-/-$, D $-/-$, woraus geschlossen werden konnte, daß alle vier Gene auf unterschiedlichen Chromosomen lagen. Dies war die Voraussetzung für die Erstellung aller Kombinationen von Dreifach- oder Vierfach-Nullmutanten.

Bis auf die Rab3AC-Doppel-Nullmutanten waren alle übrigen Doppel-Nullmutanten wie auch die Einzel-Nullmutanten in ihrem Verhalten unauffällig. Die Rab3AC-Doppel-Nullmutanten kümmerten sich nicht um ihren Nachwuchs, so daß sie nicht als Zuchtpaare verwendet wurden. Um Dreifach-Nullmutanten mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zu erzeugen, wurden Doppel-Nullmutante, doppel-heterozygote Zuchtpaare angesetzt.

Wie auch bei Wildtyp-Mäusen waren im Alter von fünf Wochen die weiblichen Nachkommen in der Regel 3 bis 5 g leichter als ihre Brüder, die um die 20 g wogen (Tab. 1). Bei der Genotypisierung der drei Wochen alten Mäuse waren keine Vierfach-Nullmutanten mehr vorhanden. Dreifach-Nullmutanten überlebten hingegen in jeder Kombination. Dieses Ergebnis war insbesondere für die Nullmutanten überraschend, die nur das Rab3D-Allel heterozygot oder homozygot exprimierten. Die Dreifach-Nullmutanten, in denen das Rab3A-Gen mitbetroffen war, waren in Bezug auf die errechnete Häufigkeit unterrepräsentiert. Dies verdeutlichte sich insbesondere bei den männlichen Tieren, deren Gewicht gegenüber Geschwistern anderen Genotyps um 4 bis 7 g reduziert war und somit dem der weiblichen Tiere ähnelte. Dreifach-Nullmutanten, die heterozygot oder homozygot für das nicht-mutierte Rab3A-Allel waren, waren nicht von Wildtyp-Mäusen zu unterscheiden. Sie konnten als Zuchtpaare verwendet werden, um die Frequenz von Vierfach-Nullmutanten zu erhöhen.

A

Genotyp A B C D	-/- -/-	+/- -/-	+/+ -/-
Wahrscheinlichkeit [%]	25 0	50 67	25 33
Nachkommen [%]	0	63,1	36,1
Gewicht Männchen	-	19,9 ± 1,9	19,9 ± 2,7
Gewicht Weibchen	-	16,0 ± 1,8	16,1 ± 2,1

B

Genotyp A B C D	-/- -/-	+/- -/-	-/- +/-	+/+ -/-	-/- +/+	+/- +/-	+/- +/+	+/+ +/-	+/+ +/+
Wahrscheinlichkeit [%]	6,25 0	12,5 13,3	12,5 13,3	6,25 6,7	6,25 6,7	25 26,7	12,5 13,3	12,5 13,3	6,25 6,7
Nachkommen [%]	0	11,2	4,7	7,5	5,6	29,4	14,5	19,6	7,5
Gewicht Männchen	-	21,2 ± 2,6	13,7 ± 1,0	20,2 ± 2,7	15,1 ± 3,8	19,4 ± 2,9	20,3 ± 3,0	20,7 ± 1,7	21,9 ± 2,7
Gewicht Weibchen	-	15,5 ± 1,3	15,3 ± 1,8	17,4 ± 1,5	14,1 ± 1,9	15,9 ± 1,9	16,4 ± 1,4	17,0 ± 2,0	17,3 ± 1,5

C

Genotyp A B C D	-/- -/-	+/- -/-	-/- -/-	+/+ -/-	-/- -/-	+/- -/-	+/- -/-	+/+ -/-	+/+ -/-
Wahrscheinlichkeit [%]	6,25 0	12,5 13,3	12,5 13,3	6,25 6,7	6,25 6,7	25 26,7	12,5 13,3	12,5 13,3	6,25 6,7
Nachkommen [%]	0	16,1	4,3	7,5	5,4	28,0	12,9	16,1	9,7
Gewicht Männchen	-	20,8 ± 2,1	16,2 ± 0,8	-	14,4 ± 1,2	19,6 ± 2,9	21,9	21,8 ± 2,1	20,8 ± 1,0
Gewicht Weibchen	-	17,8 ± 1,9	14,2 ± 2,3	16,6 ± 1,5	13,3 ± 2,7	17,6 ± 1,3	16,4 ± 2,6	17,9 ± 2,1	17,7 ± 0,8

D

Genotyp A B C D	-/- -/-	+/- -/-	-/- -/-	+/+ -/-	+/- -/-	+/+ -/-
Wahrscheinlichkeit [%]	12,5 0	25 28,6	12,5 14,3	12,5 14,3	25 28,6	12,5 14,3
Nachkommen [%]	0	37,1	2,9	11,4	27,1	21,4
Gewicht Männchen	-	20,2 ± 1,0	15,1	-	20,9 ± 1,5	-
Gewicht Weibchen	-	16,2 ± 1,5	-	16,4	15,4 ± 1,6	17,6 ± 1,3

E

Genotyp A B C D	-/- -/-	+/- -/-	-/- -/-	+/+ -/-	-/- -/-	+/- -/-	+/- -/-	+/+ -/-	+/+ -/-
Wahrscheinlichkeit [%]	6,25 0	12,5 13,3	12,5 13,3	6,25 6,7	6,25 6,7	25 26,7	12,5 13,3	12,5 13,3	6,25 6,7
Nachkommen [%]	0	20,7	0	10,3	3,4	27,6	6,9	20,7	10,3
Gewicht Männchen	-	22,3 ± 0,8	-	16,7	-	-	-	22,1 ± 4,8	-
Gewicht Weibchen	-	14,5	-	17,0	14,7	18,1 ± 1,3	-	-	18,1 ± 0,1

Tab. 1: Häufigkeit der Genotypen der Rab3-Nachkommen und deren Gewicht nach fünf Wochen. Die Nachkommen von Dreifach- und Zweifach-Nullmutanten wurden drei Wochen nach Geburt genotypisiert und fünf Wochen nach Geburt gewogen. Die prozentuale Wahrscheinlichkeit der Nachkommen bei Mendel'scher Verteilung (obere Zeile) und lethaler Vierfach-Nullmutante (untere Zeile) ist angegeben. Die Anzahl der Nachkommen des angegebenen Genotyps ist in Prozent dargestellt. Die Gewichte für Männchen und Weibchen sind getrennt in Gramm ± Standardabweichung angegeben. A: Eltern: Rab3BCD-Dreifach-Nullmutanten und heterozygot für Rab3A; 83 Nachkommen.

B: Eltern: Rab3CD-Zweifach-Nullmutanten und doppelt heterozygot für Rab3A und B; 214 Nachkommen. C: Eltern: Rab3BD-Zweifach-Nullmutanten und doppelt heterozygot für Rab3A und C; 93 Nachkommen. D: Mutter: Rab3BC-Zweifach-Nullmutante und doppelt heterozygot für Rab3A und D; Vater: Rab3BCD-Dreifach-Nullmutante und heterozygot für Rab3A; 70 Nachkommen. E: Eltern: Rab3BC-Zweifach-Nullmutanten und doppelt heterozygot für Rab3A und D; 29 Nachkommen.

Vierfach-Nullmutanten wurden lebend geboren, wie sich durch Überprüfung des Zustandes der Lungen, die aufgebläht waren, feststellen ließ. Hieraus konnte weiterhin gefolgert werden, daß sie nicht vollständig paralysiert waren, was durch ausgelöste Muskelbewegungen bestätigt wurde. Die Mäuse waren jedoch zyanotisch und verstarben innerhalb von zwei Stunden nach der Geburt ohne gesäugt worden zu sein (Abb. 14).

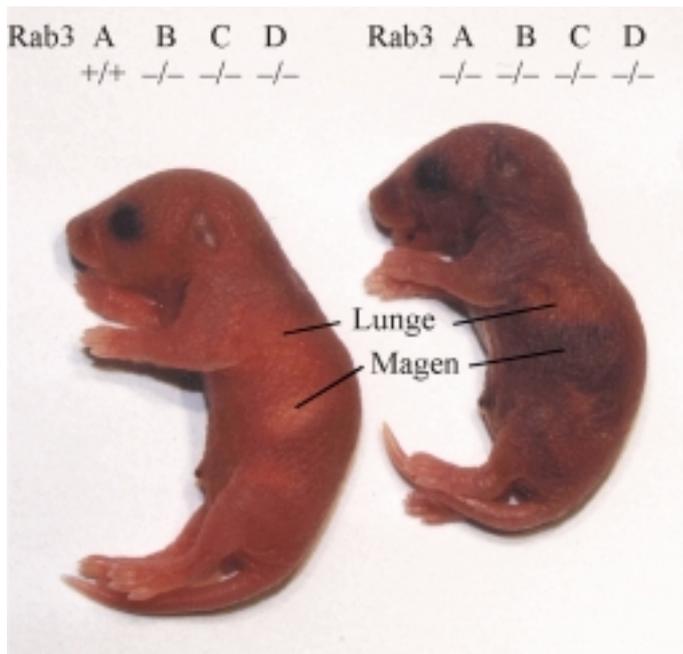


Abb. 14: Zwei der sechs Geschwister wurden eine Stunde nach der Geburt fotografiert. Die Eltern waren Rab3BCD-Dreifach-Nullmutanten und heterozygot für den Rab3A-Lokus. Die linke Maus hatte den Genotyp Rab3A +/+, B -/-, C -/ und D -/-, hatte eine normale Hautfarbe und Milch im Magen. Die Vierfach-Nullmutante (rechts) hatte keine Milch im Magen und wies eine zyanotische Hautfarbe auf.

4.13 Veränderung der Proteinexpression in Rab3-Nullmutanten

Um zu überprüfen, daß die eingefügten chromosomalen Deletionen zum Verlust des Proteins führen, wurden Gewebehomogenate aus Wildtyp-Mäusen mit den Einzel-Nullmutanten verglichen. In Rab3A-Nullmutanten war dieses Protein im Gehirn nicht mehr nachweisbar (Geppert et al., 1994). Auch die Deletion des ersten codierenden Exons von Rab3B und D bzw. des zweiten von Rab3C führte zum Verlust des Proteins, wie mit spezifischen Antikörpern im Bulbus olfactorius, der Hypophyse, der Glandula submandibularis und dem Cortex nachgewiesen wurde (Abb. 6, 15 und 16). Andererseits bestätigte sich das Ergebnis über die Spezifität der Antikörper aus den heterologen Expressionsstudien. Die Immunreaktivität der spezifischen Antikörper war in den entsprechenden Nullmutanten nicht mehr vorhanden, so daß sie nicht mit den anderen Rab3-Isoformen kreuzreagierten. Die Spezifität eines weiteren Rab3C-spezifischen Antikörpers (S9), der gegen den N-terminalen Rest vom Rab3C gerichtet war, konnte so gezeigt werden.

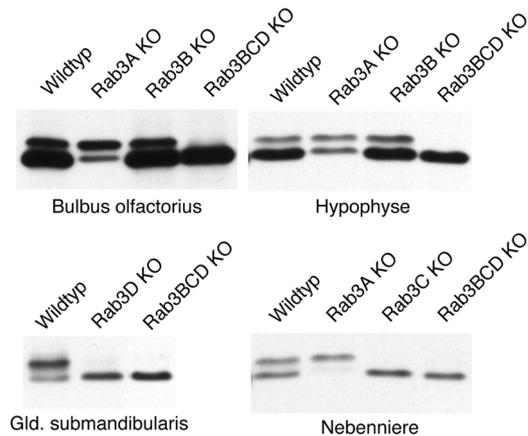


Abb. 15: 20 bis 30 μg Gesamtprotein von postnukleären Organhomogenat-Überständen von Rab3-Einfach- und Dreifach-Nullmutanten wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und über Immunoblottanalyse mit dem Antikörper C142.1 analysiert.

Im Gehirn der Einzel-Nullmutanten waren die Mengen der anderen beiden Isoformen nicht verändert (Tab. 2, Abb. 15). Im Gegensatz dazu waren in der Rab3D-Einzel-Nullmutante die Menge an Rab3A in der Glandula submandibularis erhöht (Abb. 15). Erst bei Unterschreitung einer kritischen Grenze schienen die noch vorhandenen Rab3-Isoformen kompensatorisch erhöht zu werden. Dieses wurde in den Dreifach-Nullmutanten näher untersucht. Hier zeigte sich erst beim Fehlen der häufigsten zerebralen Isoform, Rab3A, eine kompensatorische Erhöhung der übrig gebliebenen Isoform. So war im Bulbus olfactorius der Rab3ACD-Dreifach-Nullmutanten Rab3B, in den Rab3ABD-Dreifach-Nullmutanten Rab3C und in der Hypophyse der Rab3ABC-Dreifach-Nullmutanten Rab3D erhöht (Abb. 16). Auch in der Nebenniere, in der vorher selbst in den Triton X-114-Extrakten kein Rab3D nachzuweisen war, wurden erhöhte Rab3D-Mengen in den Rab3ABC-Dreifach-Nullmutanten gefunden.

In Rab3A-Nullmutanten war die Rabphilin-Menge im Gehirn deutlich reduziert gewesen (Geppert et al., 1994; Li et al., 1994). In Rab3-Mehrfach-Nullmutanten war die Rabphilin-Menge unverändert, solange ein Rab3A-Allel vorhanden war. So blieb in den Rab3BCD-Dreifach-Nullmutanten die Menge beider Rab3-Effektoren, Rabphilin und Rim, unverändert (Abb. 16). Die Menge an Rabphilin war umso geringer, je kleiner die Menge der verbliebenen Rab3-Isoform im Gehirn war. So waren in den Dreifach-Nullmutanten, in denen nur noch Rab3D im Gehirn war, auch noch geringe Rabphilin-Mengen im Bulbus olfactorius zu detektieren (Abb. 16). Die Signale könnten jedoch auch von noch nicht degradiertem Rabphilin aus den Nervenzellkörpern stammen. Im Gegensatz zu Rabphilin waren die Rim-Mengen in den Dreifach-Nullmutanten nicht verändert.

4.14 Untersuchung der Wirkung von Rab3-Mutanten auf die Sekretion

Rab3A inhibiert die stimulierte Wachstumshormon-Sekretion in cotransfizierten PC12-Zellen (Holz et al., 1994). Im Gegensatz dazu wurde für Rab3B ein stimulierender Effekt auf die Sekretion beschrieben (Lledo et al., 1993; Weber et al., 1996). Um den Einfluß der vier Rab3-Isoformen auf die Sekretion zu untersuchen, wurden sie in PC12-Zellen exprimiert (Abb. B, Anhang). Die Sekretion von cotransfiziertem humanen Wachstumshormon wurde durch KCl-induzierte Depolarisation oder α -Latrotoxin stimuliert. Die stimulierte Sekretion war dreifach (KCl) bzw. vierfach (α -Latrotoxin) gegenüber den basalen Bedingungen erhöht. Die Überexpression aller vier Rab3-Isoformen und auch der konstitutiv GTP-bindenden Mutanten inhibierte sowohl die durch KCl als auch α -Latrotoxin stimulierte Sekretion auf Werte der basalen

Sekretion. Durch die Überexpression war das Ausmaß der Inhibition von nicht mutierten und mutierten Konstrukten aller vier Isoformen vergleichbar.

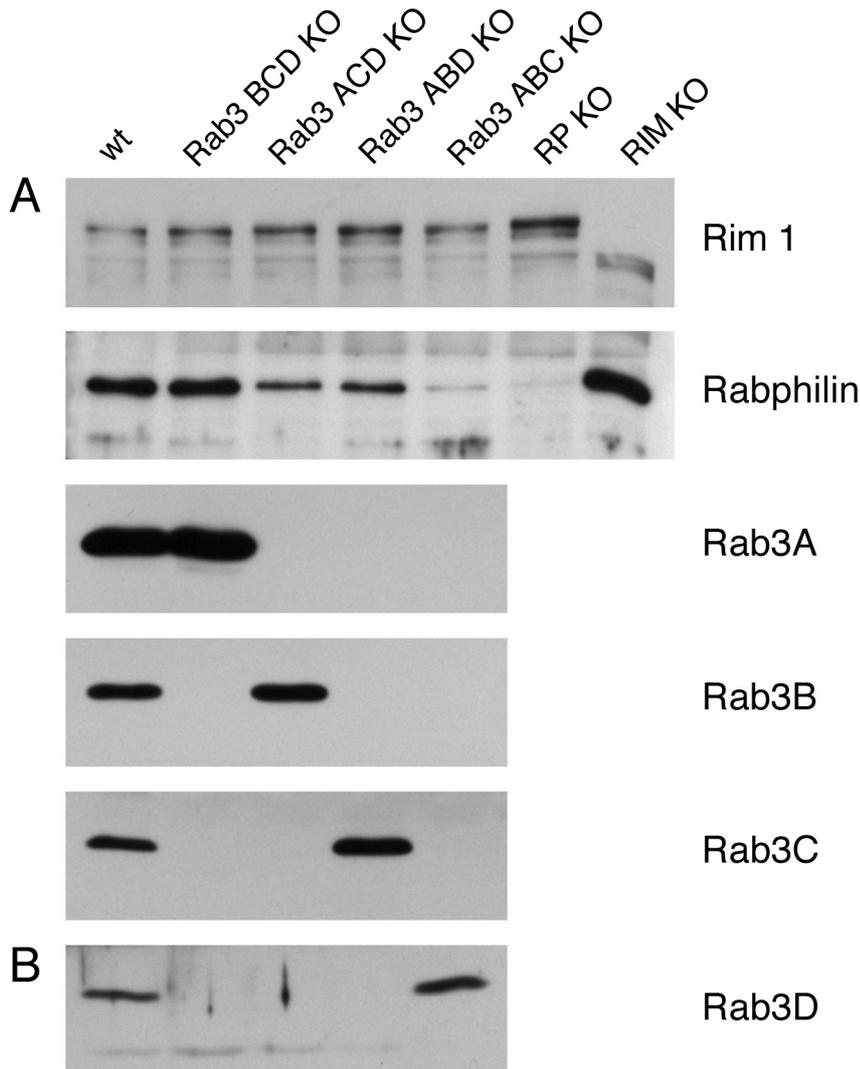


Abb. 16: Immunoblotanalyse mit ECL-Detektion von Rab3-Dreifach-Nullmutanten. Postnukleäre Überstände (20-30 µg Gesamtprotein) von Bulbus olfactorius (A) und Hypophysen-Homogenaten (B) aus Wildtyp-Mäusen, Rab3BCD-, Rab3ACD-, Rab3ABD-, Rab3ABC-Dreifach-Nullmutanten, Rabphilin-Nullmutanten und Rim-Nullmutanten wurden über SDS-PAGE und Transfer auf Nitrocellulosemembranen aufgetrennt und mit den folgenden Antikörpern analysiert: anti-RIM (Rim), I734 (Rabphilin), C142.2 (Rab3A), U954 (Rab3B), S9 (Rab3C) und α R3D#2.

4.15 Erzeugung und Phänotyp von Rabphilin-Nullmutanten

Die Charakterisierung des Rabphilin-Gens, Klonierung des Rekombinationsvektors und Erzeugung von rekombinanten Stammzellen gingen auf Vorarbeiten von Dr. M. Verhage und Dr. M. Geppert zurück. 45 % der 288 analysierten resistenten embryonalen Stammzellklone zeigten ein korrektes Rekombinationsereignis. Die Rekombination ersetzte die beiden Exone, die für die Aminosäuren 74 bis 146 kodierte, durch einen Neomycin-Selektionsmarker (Abb. 17). Über die aus dem Stammzellklon #60 erzeugten chimären Mäuse wurden heterozygote Nachkommen erhalten. Die Anzahl der homozygoten Nachkommen der nächsten Generation entsprach der Mendel'schen Verteilung. Die Überprüfung des korrekten chromosomalen Rekombinationslokus erfolgte über das Primerpaar 685/428. Dabei hybridisierte der Primer 685 außerhalb des kurzen Rekombinationsarmes und der Primer 428 im Neomycin-Resistenzgen (Abb. 18). Für das Wildtyp-Allel wurde der Primer 428 durch den Primer 671 ersetzt. Die erhaltene Bande von 1,4 kb entsprach der aus der Gensequenz vorhergesagten Größe. Die spätere Genotypanalyse erfolgte durch kürzere PCR-Produkte (0,4 kb) mit den Primerpaaren 1108/1107 für das Wildtyp-Allel und 1107/428 für das mutierte Allel. Die Nullmutanten waren ohne offensichtlichen

Phänotyp und konnten als homozygote Linie gehalten werden. Ihr Gewicht und die Überlebenszeit unterschied sich nicht von den heterozygoten und Wildtyp-Geschwistertieren. Die erfolgreiche Rekombinationsstrategie wurde durch die Abwesenheit des Rabphilin-Proteins über Antikörper, die gegen den N- und C-Terminus gerichtet waren, gezeigt (Abb. 18 und 25).

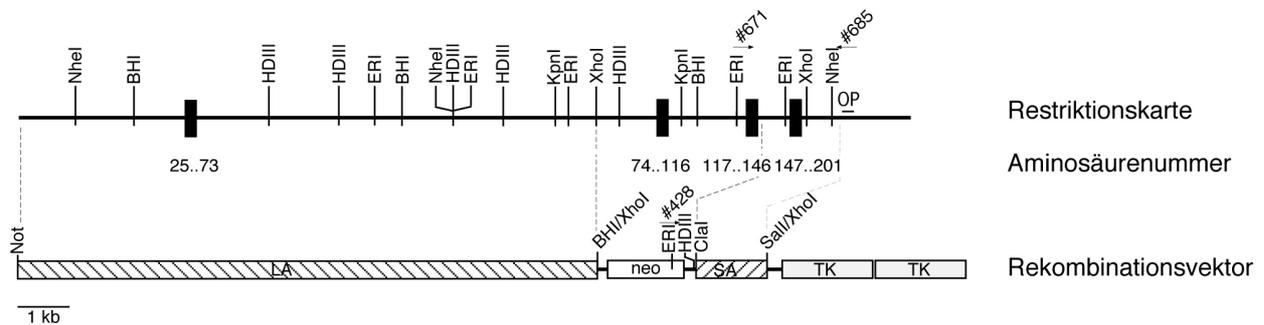


Abb. 17: Darstellung der Struktur eines Anteils des murinen Rabphilin-Gen und der Rekombinationsstrategie für die Erzeugung von Rabphilin-Nullmutanten. In die Restriktionskarte (oben) sind die Erkennungsstellen von Restriktionsenzymen (BHI: *BamHI*; *Clal*; *ERI*: *EcoRI*; HDIII: *HinDIII*; Kpn: *KpnI*; Nhe: *NheI*; Not: *NotI*; *Sall*; *Xho*: *XhoI*), sowie die Positionen der Exone (schwarze Kästchen) mit den entsprechenden Aminosäurenummern (Mitte), der Sonde zur Detektion der homologen Rekombination (OP) und der Genotypisierungsprimer eingezeichnet. Im Rekombinationsvektor sind die eingefügten genomischen Sequenzen als gestreifte Kästchen (LA und SA) und die Selektionsmarker (neo: Neomycinresistenz-Expressionskassette, TK: Thymidin-Kinase) als offene Kästchen dargestellt. Durch die homologe Rekombination werden die Exone, die für die Aminosäuren 74 bis 146 codieren, durch ein Neomycinresistenzgen ersetzt.

4.16 Analyse der synaptischen Komposition in Rabphilin-Nullmutanten

Aufgrund des normalen Phänotyps der Rabphilin-Nullmutanten wurden durch die Deletion keine großen Entwicklungsdefizite und Fehlfunktionen des Gehirns verursacht. Um jedoch Veränderungen der Proteinkomposition in den Synapsen zu untersuchen, wurden die Mengen von 40 synaptischen Proteinen bestimmt (Tab. 2). Zum Vergleich wurden auch die Mengen in Rab3A-Nullmutanten analysiert, da in diesen Mäusen die Rabphilin-Mengen stark reduziert waren (Geppert et al., 1994). Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern wurden die Mengen über Immunoblotanalyse mit radioaktiv markierten Sekundärantikörpern bestimmt. Um die Werte zu standardisieren, wurden sie zu den Signalen der NMDA-Rezeptoruntereinheit 1 oder Munc18 ins Verhältnis gesetzt, deren Mengen, wie auf zahlreichen Immunoblotts gezeigt, unverändert waren. Die Mengen aller analysierten Proteine insbesondere auch derer, die in den Rab3/Rabphilin-Zyklus eingebunden waren wie GDI und Rim, waren unverändert. Auch die Mengen der Proteine, die mit Rabphilin interagierten, wie Rabaptin, α -Actinin waren gleich zu denen in den Wildtyp-Kontrolltieren (Ohya et al., 1998; Kato et al., 1996). In den Rab3A-Nullmutanten konnte die Reduktion der Rabphilin-Mengen um 50 % bestätigt werden. Neben Rabphilin waren auch die Mengen an Munc13-3 reduziert, nicht jedoch die von Munc13-1. Andere Proteinmengen insbesondere von Rab3C waren unverändert.

4.17 Morphologische Analyse der Rabphilin-Nullmutanten

Um mögliche mikroskopische Veränderungen der Hirnarchitektur aufzuzeigen, wurden ausgewählte Regionen über Immunfluoreszenzanalyse untersucht. Die Verteilung des

Dendritenmarkers MAP-2 und des IP3-Rezeptors im Cerebellum unterschied sich in den Rabphilin-Nullmutanten nicht signifikant von der in Wildtyp-Kontrolltieren (Abb. 19). So war die typische Schichtung erhalten und die Verzweigung des Dendritenbaumes der Purkinjezellen erhalten. Auch die Dendritenstruktur und die Verteilung von Synaptopodin im Hippocampus war unauffällig. Synaptopodin wurde unverändert stark in den Moosfaserterminalen exprimiert, in denen auch Rabphilin die größte Konzentration im Hippocampus zeigte (Abb. 9 und 19).

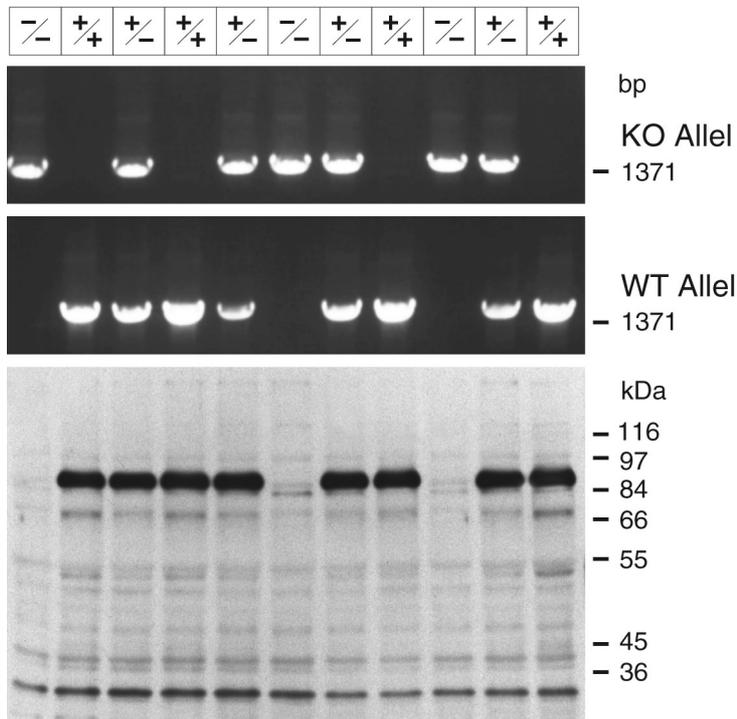


Abb. 18: PCR- und Immunoblot-Analyse von Nachkommen aus heterozygoten Eltern für das Rabphilin-Allel. Genomische DNA wurde mit Wildtyp- (Primer 685/671) und Deletionsallel-spezifischen (Primer 685/428) Primern amplifiziert und aus dem Bandenmuster der Genotyp (oben) bestimmt. Gesamtgehirnhomogenate der selben Tiere wurden über Immunoblotanalyse mit einem Rabphilin-spezifischen Antikörper (I734) und ECL-Detektion analysiert (unten). Um die Abwesenheit weiterer Banden in den Nullmutanten zu zeigen, wurde eine lange Expositionszeit gewählt.

4.18 Analyse der Rab3A-Lokalisation in Rabphilin-Nullmutanten

Die Proteinmengen von Rab3A waren in den Rabphilin-Nullmutanten unverändert, während in den Rab3A-Nullmutanten Rabphilin reduziert war. Dies zeigte, daß die Stabilität von Rab3A nicht von Rabphilin abhing, die von Rabphilin jedoch von Rab3A (Li et al., 1994). In Synapsen ohne Rab3-Isoform wurde Rabphilin nicht transportiert und akkumulierte im Zellkörper, wo es wahrscheinlich verstärkt abgebaut wurde. Rab3A wurde in den Rabphilin-Nullmutanten in die Synapsen transportiert, wie exemplarisch für das Cerebellum und den Hippocampus gezeigt wurde (Abb. 20). In Kontrolltieren waren Rab3A und Rabphilin besonders in Synapsen der Molekularschicht des Cerebellums und in den Moosfaserterminalen des Hippocampus colokalisiert. In der Körnerzellschicht enthielten weitaus mehr Synapsen Rab3A als Rabphilin. Dieser Befund wurde besonders deutlich in der Retina, in der es zwei markante synaptische Schichten, die innere plexiforme Schicht mit mehreren synaptischen Zonen und die äußere plexiforme Schicht mit den Synapsen der Photorezeptorzellen, gab (Abb. 21). Rab3A war gleichmäßig verteilt in beiden plexiformen Schichten zu finden, während Rabphilin wie auch Rab3C nur in der inneren plexiformen Schicht vorkam. Besonders in zwei synaptischen Streifen war die Rabphilin-Menge besonders groß, obwohl die beiden in der Retina vorkommenden Rab3-Isoformen homogen in der inneren plexiformen Schicht verteilt waren. Rabphilin war somit auch nicht in Wildtyp-Mäusen für den Transport von Rab3A in alle Synapsen verantwortlich. In Rab3A-Nullmutanten nahm die Menge an Rabphilin in der Retina deutlich ab

(Abb. 21). Die beiden prominenten synaptischen Streifen blieben jedoch bestehen. Rim, das zweite bekannte Rab3A-Effektorprotein, war nur in der äußeren plexiformen Schicht lokalisiert (Wang et al., 1997).

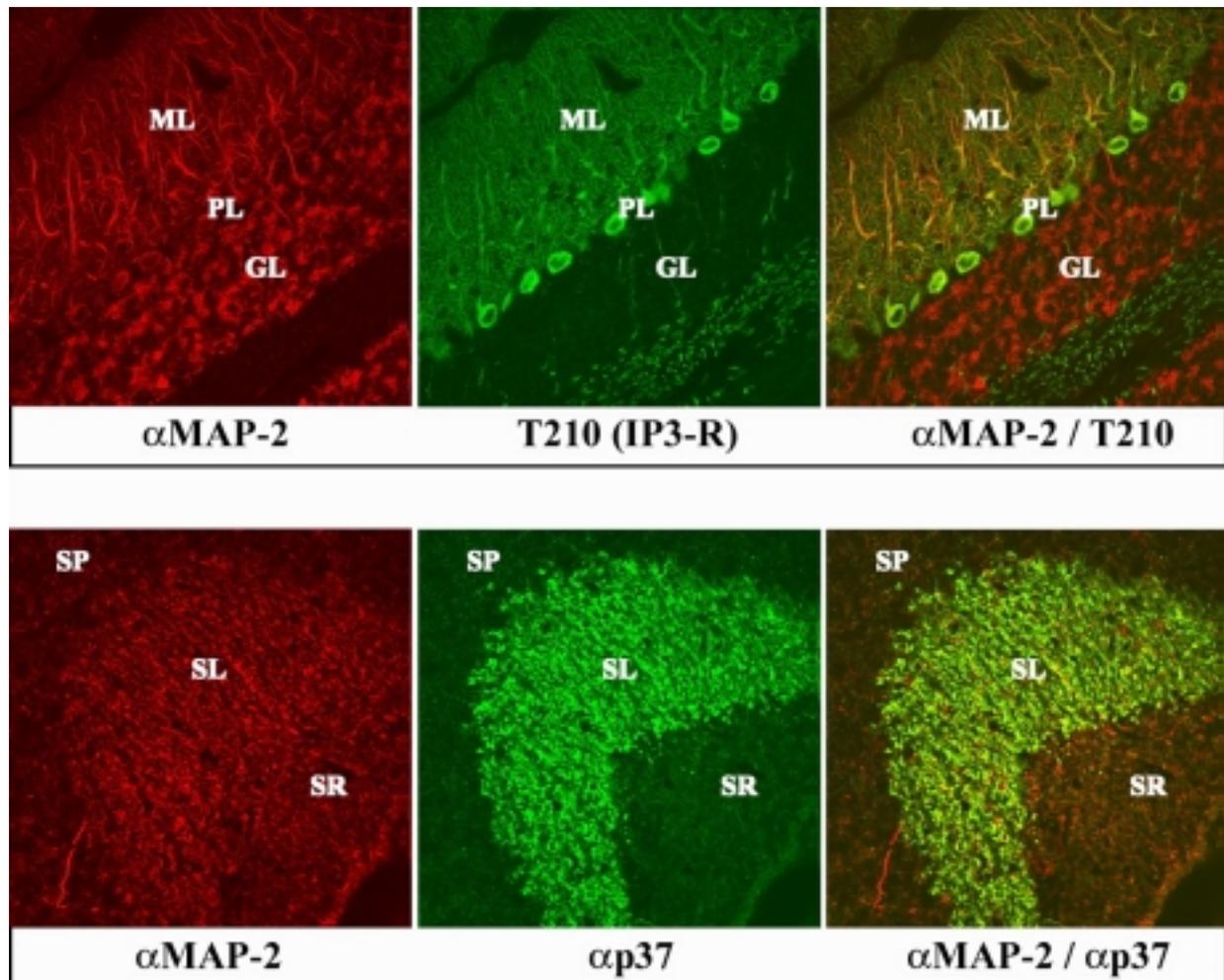


Abb 19: Konfokale Immunfluoreszenzanalyse von Gehirnschnitten aus Raphilin-Nullmutanten (400fache Vergrößerung). Gefrierschnitte (5 μm Dicke) aus dem Cerebellum (oben) und Hippocampus (unten) von adulten Rabphilin-Nullmutanten wurden mit monoklonalen Antikörpern gerichtet gegen MAP-2 (MAP-2, rotes Signal) und polyklonalen Antikörpern gerichtet gegen den IP3-Rezeptor (T210, grünes Signal) oder Synaptophysin II (αp37 , grünes Signal) doppelt markiert. In der Überlagerung erscheinen Bereiche, die von beiden Antikörpern markiert waren in gelb. Die Körnerzellschicht (GL), die Purkinjezellschicht (PL) und die Molekularschicht (ML) des Cerebellum und das Stratum radiatum (SR), das Stratum lucidum (SL) und das Stratum pyramidale (SP) der hippocampalen CA3-Region sind markiert.

4.19 Analyse der Rab3A-Lokalisation in Rabphilin-Nullmutanten

Die Proteinmengen von Rab3A waren in den Rabphilin-Nullmutanten unverändert, wohingegen in den Rab3A-Nullmutanten Rabphilin reduziert war. Dies zeigte, daß die Stabilität von Rab3A nicht von Rabphilin abhing, die von Rabphilin jedoch von Rab3A (Li et al., 1994). In Synapsen ohne Rab3-Isoform wurde Rabphilin nicht transportiert und akkumulierte im Zellkörper, wo es wahrscheinlich verstärkt abgebaut wurde. Rab3A wurde in den Rabphilin-Nullmutanten in die Synapsen transportiert, wie exemplarisch für das Cerebellum und den Hippocampus gezeigt wurde (Abb. 20). In Kontrolltieren waren Rab3A und Rabphilin besonders in Synapsen der Molekularschicht des Cerebellums und in den Moosfaserterminalen des Hippocampus

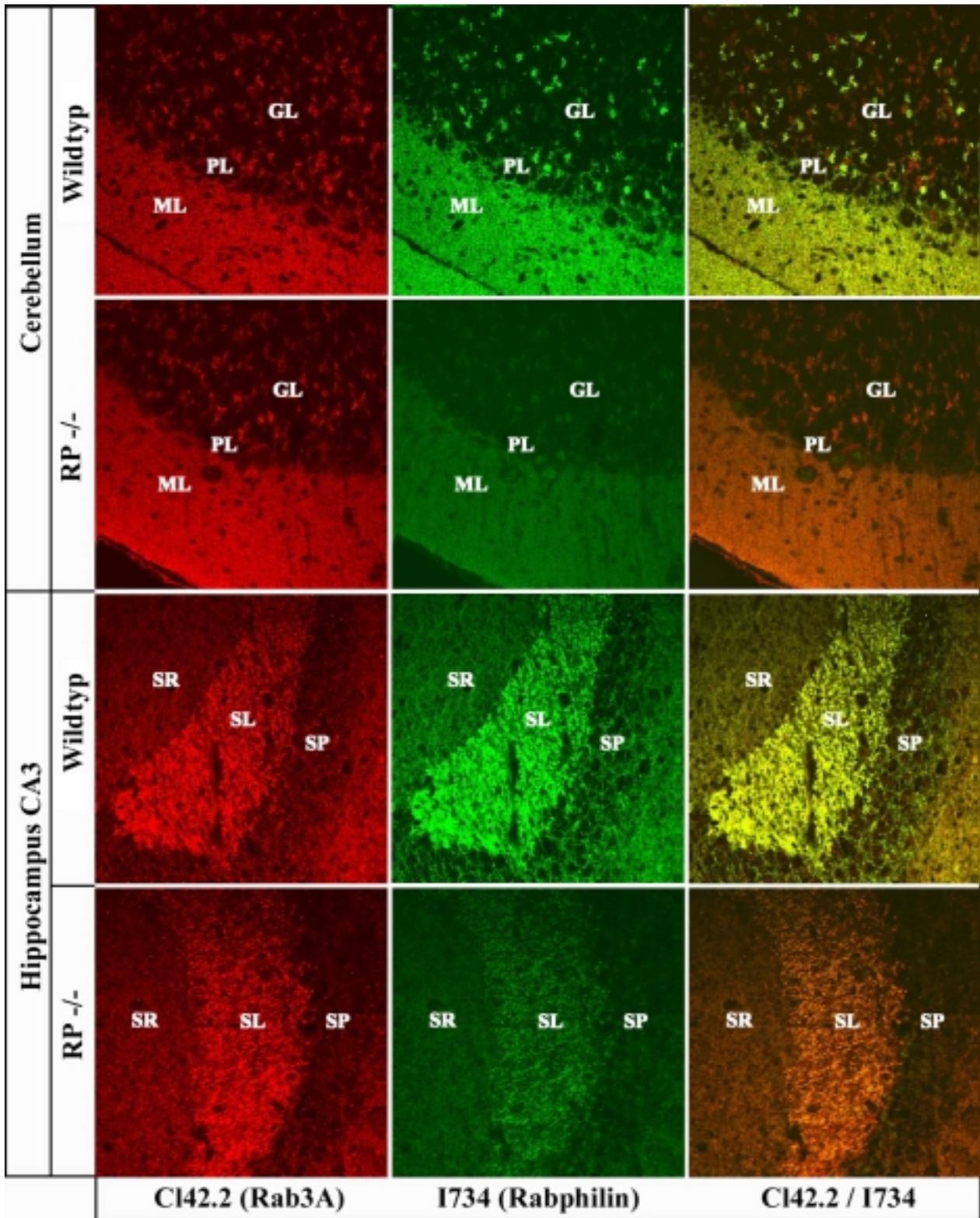


Abb. 20: Vergleichende konfokale Immunfluoreszenzanalyse von Rab3A und Rabphilin in Gehirnregionen von Wildtyp-Mäusen und Raphilin-Nullmutanten (400fache Vergrößerung). Gefrierschnitte (5 µm Dicke) aus dem Cerebellum und der hippocampalen CA3-Region wurden mit monoklonalen Antikörpern gerichtet gegen Rab3A (CI42.2, rotes Signal) und polyklonalen Antikörpern gerichtet gegen Rabphilin (I734, grünes Signal) doppelt markiert. In der Überlagerung erscheinen Bereiche, die von beiden Antikörpern markiert waren, in gelb. Die Körnerzellschicht (GL), die Purkinjezellschicht (PL) und die Molekularschicht (ML) des Cerebellum und das Stratum radiatum (SR), das Stratum lucidum (SL) und das Stratum pyramidale (SP) der hippocampalen CA3-Region sind markiert.

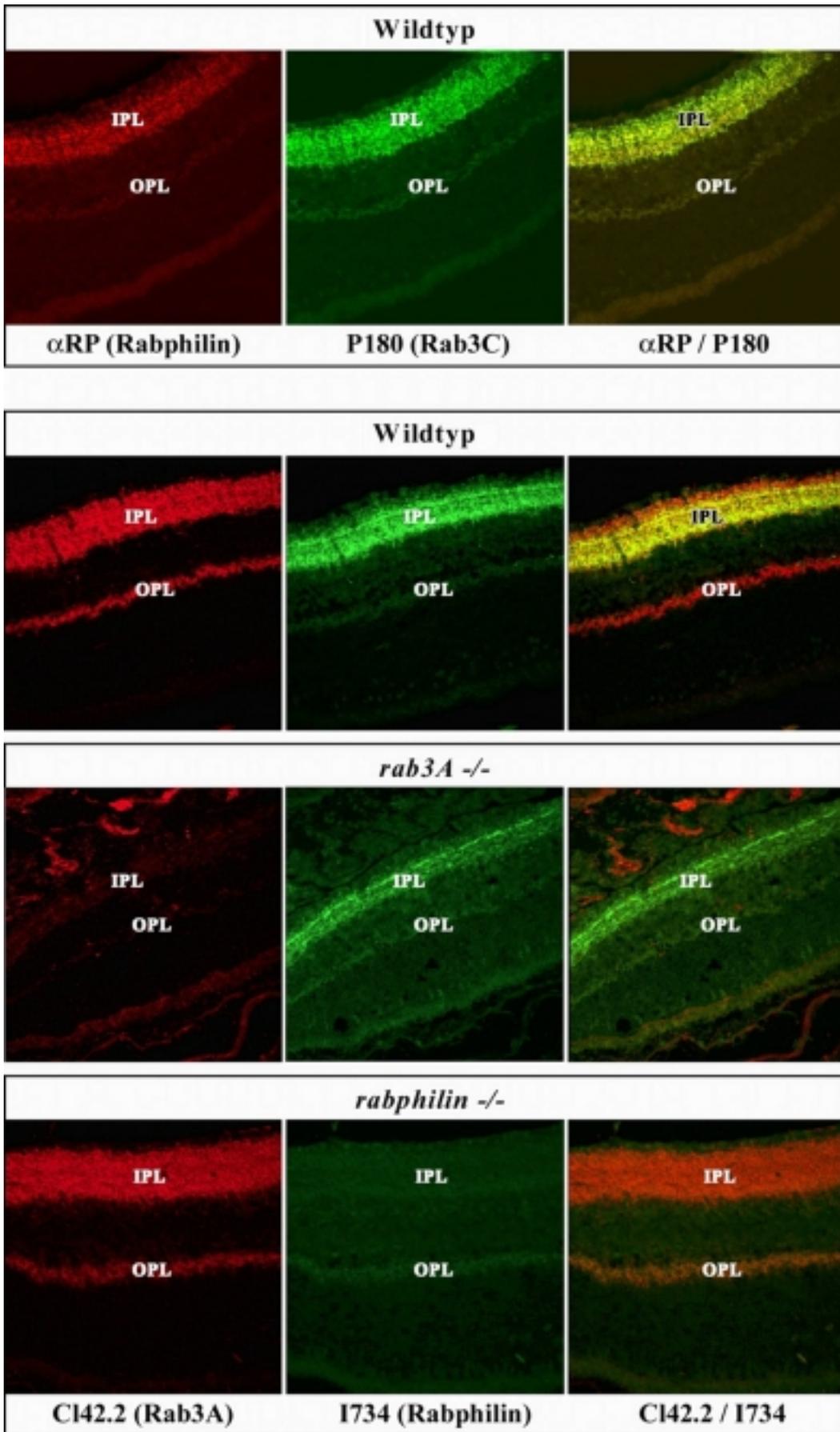


Abb. 21: Vergleichende konfokale Immunfluoreszenzanalyse von Retinaschnitten in Wildtyp-Mäusen und Rab3A- oder Rabphilin-Nullmutanten (400fache Vergrößerung). (A) Gefrierschnitte (5 µm Dicke) von Wildtyp-Mäusen wurden mit monoklonalen Antikörpern gerichtet gegen Rabphilin (α RP, rotes Signal) und polyklonalen Antikörpern gerichtet gegen Rab3C (P180, grünes Signal) doppelt markiert. (B) Analoge Proben aus Wildtyp-Mäusen, Rab3A- und Rabphilin-Nullmutanten wurden mit monoklonalen Antikörpern gerichtet gegen Rab3A (C142.2, rotes Signal) und polyklonale Antikörper gerichtet gegen Rabphilin (I734, grünes Signal) doppelt markiert. Colokalisation der jeweiligen zwei Proteine ist in gelb dargestellt. Die innere plexiforme Schicht (IPL) und äußere plexiforme Schicht (OPL) der Retina sind markiert.

colokalisiert. In der Körnerzellschicht enthielten weitaus mehr Synapsen Rab3A als Rabphilin. Dieser Befund wurde besonders deutlich in der Retina, in der es zwei markante synaptische Schichten, die innere plexiforme Schicht mit mehreren synaptischen Zonen und die äußere plexiforme Schicht mit den Synapsen der Photorezeptorzellen, gab (Abb. 21). Rab3A war gleichmäßig verteilt in beiden plexiformen Schichten zu finden, während Rabphilin wie auch Rab3C nur in der inneren plexiformen Schicht vorkam. Besonders in zwei synaptischen Streifen war die Rabphilin-Menge besonders groß, obwohl die beiden in der Retina vorkommenden Rab3-Isoformen homogen in der inneren plexiformen Schicht verteilt waren. Rabphilin war somit auch nicht in Wildtyp-Mäusen für den Transport von Rab3A in alle Synapsen verantwortlich. In Rab3A-Nullmutanten nahm die Menge an Rabphilin in der Retina deutlich ab (Abb. 21). Die beiden prominenten synaptischen Streifen blieben jedoch bestehen. Rim, das zweite bekannte Rab3A-Effektorprotein, war nur in der äußeren plexiformen Schicht lokalisiert (Wang et al., 1997).

4.20 Subzelluläre Lokalisation von Rab3A in Rabphilin-Nullmutanten

Der Großteil von Rab3A und Rabphilin kam an synaptische Vesikel gebunden und nur ein kleiner cytosolisch vor (Abb. 11 und 22). Andere Experimente implizierten eine Bindung von Rab3A an synaptische Vesikel über Rabphilin (Shirataki et al., 1993, 1994). Oben wurde gezeigt, daß Rab3A unabhängig von Rabphilin in Synapsen transportiert wurde. Um die subzelluläre Lokalisation in der Synapse zu untersuchen, wurden eine rohe synaptische Vesikelfraktion (LP2) und eine synaptische Cytosolfraktion (LS2) von Rabphilin-Nullmutanten mit Kontrolltieren verglichen (Abb. 22). Die Verteilung von Rab3A in allen untersuchten Fraktionen in Rabphilin-Nullmutanten glich der von Wildtyp-Mäusen. Auch der Anteil der angehefteten Vesikel in der synaptischen Plasmamembran (SPM) war vergleichbar. Dies zeigte, daß die Bindung und Dissoziation von Rab3A an synaptische Vesikel unabhängig von Rabphilin geschieht und die Rabphilinfunktion nicht wesentlich für die Anzahl der angedockten Vesikel war.

4.21 Synaptische Funktion in Rabphilin-Nullmutanten

Andere Nullmutanten, wie z.B. die Rab3A-Nullmutanten, zeigten ebenfalls eine normale Gehirnstruktur und eine weitestgehend normale Proteinzusammensetzung der Synapsen. Die Rabphilin-Menge war in den Rab3A-Nullmutanten jedoch reduziert (Geppert et al., 1994; Li et al., 1994). Insbesondere in den Synapsen, die in diesen Mutanten kein Rabphilin enthielten wie die Moosfaserterminalen, war die synaptische Transmission verändert (Castillo et al., 1997). Insofern wurde in Zusammenarbeit mit dem Labor von Dr. R. Malenka (UCSF, San Francisco, USA) die synaptische Funktion elektrophysiologisch untersucht (vgl. Anhang). Zuerst wurden die Moosfaserterminalen in Schnittpräparationen untersucht, die in den Rab3A-Nullmutanten

einen Verlust der Langzeitpotenzierung (LTP) aufwiesen (Castillo et al., 1997). Weiterhin wurden zwei Formen der Kurzzeitplastizität von Synapsen, PPF und *frequency facilitation*, untersucht (Zucker, 1989; Regehr et al., 1994; Salin et al., 1996; Schlüter et al., 1999). Es wurde kein signifikanter Unterschied zu Kontrolltieren bei Interpulsintervallen von 20 und 40 ms bei der PPF und der *frequency facilitation* bei Erhöhung der Stimulationsfrequenz von 0,1 Hz auf 0,2 bzw. 0,33 Hz gefunden. Auch die Langzeitpotenzierung konnte in den Rabphilin-Nullmutanten normal ausgelöst werden. Die untersuchten synaptischen Funktionen waren in den Moosfaserterminalen der Rabphilin-Nullmutanten somit erhalten. Pyramidenzellen der CA1-Region in Rab3A-Nullmutanten zeigten einen verstärkten Signalverlust, sogenannte synaptische Depression, nach wiederholter Stimulation mit 14 Hz der Schaffer-Kollateralen (Geppert et al., 1994). In den Rabphilin-Nullmutanten war die synaptische Depression in CA1 Pyramidenzellen vergleichbar zu Kontrolltieren auslösbar. Auch die untersuchten Kurz- und Langzeitplastizitäten dieser Region, wie PPF, posttetanische Potenzierung und Langzeitpotenzierung, waren von Kontrolltieren nicht unterscheidbar. Somit war die synaptische Funktion in den Rabphilin-Nullmutanten bezüglich der gemessenen Parameter normal.

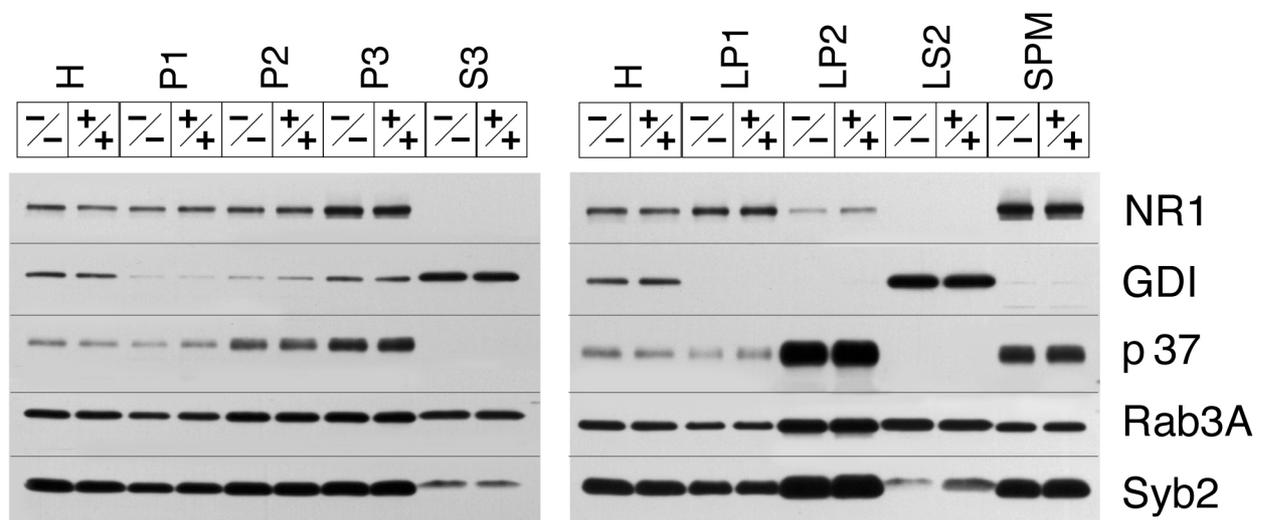


Abb. 22: Immunoblotanalyse mit ECL-Detektion von subzellulären Fraktionierungen aus Gehirngewebe von Rabphilin-Nullmutanten (-/-) und Wildtyp-Mäusen (+/+). Gehirncortices wurden homogenisiert (H) und in Zellkernsediment (P1), rohe Synaptosomenfraktion (P2), Mikrosomenfraktion (P3) und Cytosol (S3) fraktioniert. Aus den Synaptosomen wurden eine rohe synaptische Plasmamembranfraktion (LP1), eine rohe synaptische Vesikelfraktion (LP2), synaptische Cytosolfraktion (LS2) und eine synaptische Plasmamembranfraktion mit angereicherten aktiven Zonen und postsynaptischen Verdichtungen (SPM) erhalten. Die Fraktionen aus Nullmutanten und Wildtyp-Mäusen wurden über SDS-PAGE und Transfer auf Nitrocellulosemembranen aufgetrennt und die Proteinmengen in den einzelnen Fraktionen mit folgenden Antikörpern verglichen: Cl54.1 (NR1), Cl81.1 (GDI), α p37 (Synaptophysin II), Cl42.2 (Rab3A), Cl69.1 (Synaptobrevin 2).

4.22 Suche nach Rabphilin-Isoformen

Umfangreiche Bemühungen mehrerer Labors zur Identifizierung von Isoformen von Rabphilin waren bisher erfolglos. Die Datenbankrecherche in der *genbank*-Datenbank ergab eine genomische Sequenz (*genbank* AC000398) des zu dem Zeitpunkt noch unbekanntes Noc2, welches im N-terminalen Bereich Rabphilin ähnlich war (Kotake et al., 1997). Unter den EST-Klonen fanden sich zwei (EST 214113 aus Ratte und EST 2415326 aus Maus), die Ähnlichkeiten mit dem C-Terminus von Rabphilin aufwiesen. Diese Klone wurden nochmals

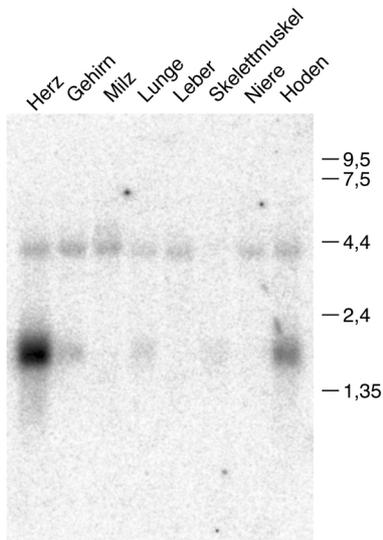


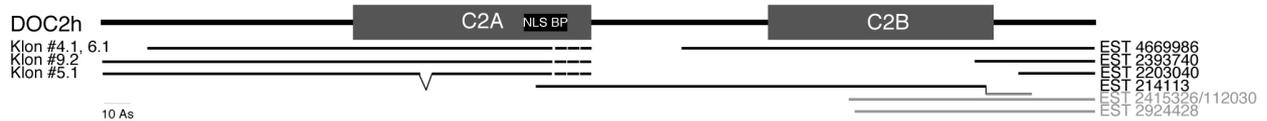
Abb. 23: Northernblot-Analyse des Expressionsmusters von Doc2h. Ein Northernblot (Clontech) wurde mit einer aus dem EST-Klon 214113 hergestellten Sonde hybridisiert und die Signale mit Hilfe des FujiBas 5000 detektiert.

sequenziert und der Ratten-spezifische Klon für die Hybridisierung eines *Northernblots* verwendet (Abb. 23). Die detektierte mRNA-Bande war ca. 1,8 kb groß und im Herz am stärksten exprimiert. Sie war weiterhin im Hoden und in geringen Mengen auch im Gehirn, der Lunge und Skelettmuskulatur nachweisbar. Um zu überprüfen, ob es sich um eine Rabphilin-Isoform, die hauptsächlich im Herz vorkommt, handelte, wurde das Protein kloniert. Die Hybridisierung einer cDNA-Bibliothek aus Rattenherzgewebe ergab mit der oben erwähnten Sonde 12 doppelt positive Klone. Über PCR wurden sie mit Hilfe eines Gen-spezifischen Primers aus dem äußersten 5'-Ende des EST-Klones 214113 (Primer 1724) und einem Primer benachbart zum Polylinker des Phagen λ gt10 (Primer 1717) analysiert. Vier von ihnen enthielten Klone, die zusammen mit den noch zusätzlich identifizierten EST-Klonen die gesamte codierende Sequenz abdeckten (Abb. 24). Die PCR-Produkte wurden sequenziert und die komplette codierende Sequenz zusammengefügt. Die Primärsequenz des bisher unbekannt Proteins war zu 47 % identisch mit der von Doc2A und B. Es enthielt zwei C2-Domänen, die typisch für Doc2A und B waren, als auch eine Kerntransport-Erkennungssequenz, deren Bedeutung unklar blieb. Die in der Datenbank veröffentlichten EST-Klone hatten ihren Ursprung aus dem Herz, dem Auge und dem Bulbus olfactorius. Aufgrund der überwiegenden Expression im Herz nannten wir das Protein Doc2h. Da es sich nicht um eine Rabphilin-Isoform handelte, wurde Doc2h nicht weiter charakterisiert.

Bei der Analyse der Rabphilin-Nullmutanten zeigten zwei monoklonale Antikörper, die gegen einen Bereich des N-Terminus inklusive des Prolin-reichen Sequenzabschnittes (C176.2, Aminosäuren 1-360) bzw. die erste C2-Domäne (C184.2, Aminosäuren 361-527) von Rabphilin gerichtet waren, weiterhin ein Signal (Abb. 25). Zwei polyklonale Antikörper, gerichtet gegen den N- und C-Terminus von Rabphilin, sowie ein weiterer monoklonaler Antikörper detektierten diese Bande in den Proben aus Rabphilin-Nullmutanten nicht. Somit handelte es sich um zwei mögliche unbekannte Proteine, die wir p76-2 bzw. p84-2 nannten, und nicht um alternative Proteinprodukte des Rabphilin-Gens. Um die Proteine näher zu charakterisieren, wurde die zerebrale und subzelluläre Verteilung dieser Proteine untersucht. Im Gegensatz zu Rabphilin war p84-2 nicht gleichmäßig über das Gehirn verteilt (Abb. 7). Die höchsten Konzentrationen kamen im Hippocampus und Cortex vor. In der Retina konnte es nicht nachgewiesen werden. In subzellulären Fraktionen war p84-2 wie Rabphilin in der rohen synaptischen Vesikelfraktion angereichert (Abb. 11). Im Gegensatz zu Rabphilin war es in der synaptischen Cytosolfraktion

nicht nachweisbar. Das Signal war untypisch für ein Transmembranprotein synaptischer Vesikel als scharfe Doppelbande im Immunoblot zu identifizieren, die möglicherweise zwei Isoformen oder Splicevarianten repräsentierten. In Triton X-114-Extrakten wurde es wie auch Rabphilin und p76-2 nicht in der Detergenz-Phase angereichert.

A



B

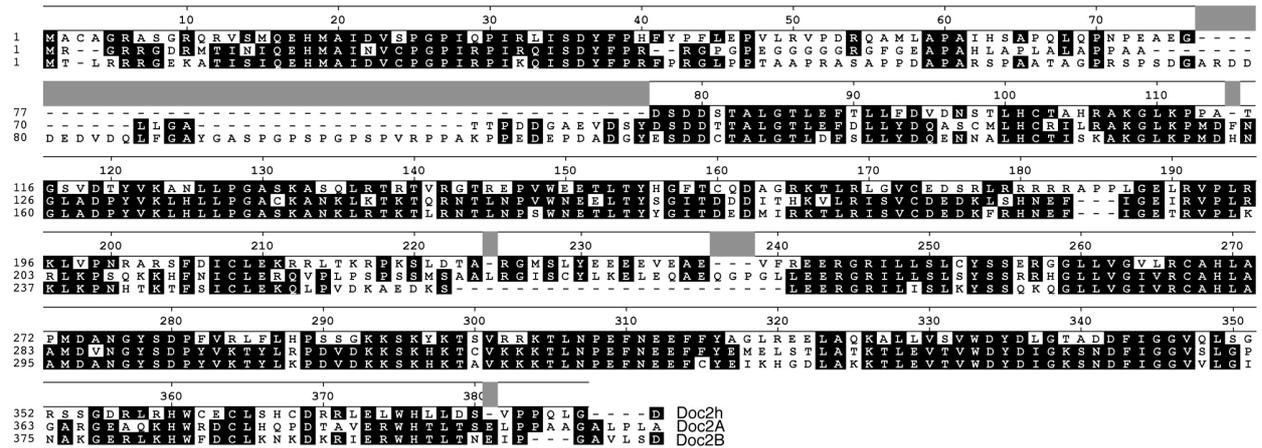


Abb. 24: (A) Domänenstruktur von Doc2h mit zwei C2-Domänen (C2A und C2B) und einer Kernlokalisationserkennungssequenz (NLS BP). Die Position der über PCR amplifizierten Bereiche der codierenden Sequenz der Klongemische #4.1, #5.1, #6.1 und #9.2, sowie die EST-Klone aus Ratte in schwarz und aus Maus in grau sind dargestellt. Der 3'-Bereich des EST-Klones 214113 (*genbank* AI104824) unterscheidet sich an der markierten Stelle von den übrigen Klonen. Der Klon #5.1 ist um 18 Nukleotide kürzer und stellt ein alternatives Spliceprodukt dar. (B) Sequenzvergleich der Ratten-Primärsequenzen von Doc2A (Mitte), B (unten) und H (oben). 47 % der Aminosäuren von Doc2h stimmen mit Doc2A und B überein (schwarz unterlegt). EST4669986 (*genbank* BE113655), EST2393740 (*genbank* AI575409), EST22033040 (*genbank* AA92685), EST2415326 (*genbank* AI596892), EST112030 (*genbank* AA467531), EST2924428 (*genbank* AI836108).

p76-2 zeigte eine homogene zerebrale Verteilung, wobei es im Hirnstamm, Striatum und in der Retina in geringeren Mengen vorkam. Im Gegensatz zu p84-2 und Rabphilin war es auch in der Hypophyse und in der Nebenniere lokalisiert. Die subzelluläre Verteilung glich nicht der von synaptischen Proteinen. Die Mengen in den Synptosomen waren geringer als die des Homogenates. Die größte Anreicherung fand sich in P3, so daß das Signal in LP2 hauptsächlich von kleinen vesikulären Kompartimenten und nicht von synaptischen Vesikeln herrührte.

Die Mengen von p76-2 als auch von p84-2 schienen in den Rabphilin-Nullmutanten erhöht zu sein (Abb. 25). Dies müßte jedoch noch durch weitere Probenpaare quantifiziert werden.

Protein	<i>rabphilin</i> <i>-/-</i>	<i>rab3A</i> <i>-/-</i>	+/+	Antikörper
α -Actinin	95 \pm 13	86 \pm 8	100 \pm 8	EA-53
Complexin 1	93 \pm 14	101 \pm 11	100 \pm 7	P942
	107 \pm 11	104 \pm 11	100 \pm 18	L668
Complexin 2	95 \pm 12	100 \pm 4	100 \pm 7	P942
CSP	95 \pm 7	96 \pm 5	100 \pm 13	α CSP
Doc2A	97 \pm 18	93 \pm 16	100 \pm 12	α DOC2
Dynamin	117 \pm 13	101 \pm 5	100 \pm 12	E765
GDI	117 \pm 16	114 \pm 17	100 \pm 5	D633
Mint	97 \pm 5	91 \pm 6	100 \pm 6	P932
Munc13-1 (Cortex)	92 \pm 3	98 \pm 11	100 \pm 4	3H5
	99 \pm 6	105 \pm 5	100 \pm 7	
Munc13-2	98 \pm 17	91 \pm 11	100 \pm 11	SA3452
Munc13-3	101 \pm 9	83 \pm 4	100 \pm 4	SA3450
Munc18	96 \pm 15	102 \pm 11	100 \pm 6	I370
Neurofilament-68	114 \pm 17	96 \pm 5	100 \pm 2	NR4
Neuroigin I, III	93 \pm 9	91 \pm 9	100 \pm 7	4F9
Neuroigin I	100 \pm 11	98 \pm 10	100 \pm 6	4C12
NMDA-R1	99 \pm 10	101 \pm 12	100 \pm 9	Cl54.1
NSF	97 \pm 9	94 \pm 13	100 \pm 6	I372
PSD95	93 \pm 0	91 \pm 3	100 \pm 10	P918
Rab3A	107 \pm 13	4 \pm 1	100 \pm 11	Cl42.2
	102 \pm 3	10 \pm 3	100 \pm 3	Cl42.1
Rab3C	108 \pm 21	112 \pm 12	100 \pm 16	P180
Rabaptin	107 \pm 9	113 \pm 6	100 \pm 2	R321
Rabphilin	4 \pm 0	52 \pm 6	100 \pm 12	I734
	8 \pm 1	51 \pm 2	100 \pm 7	I731
Rim	98 \pm 7	91 \pm 6	100 \pm 8	Q703
SCAMP	87 \pm 10	97 \pm 17	100 \pm 16	P936
mSEC7	99 \pm 7	98 \pm 6	100 \pm 9	SA3613
α -SNAP	104 \pm 7	103 \pm 4	100 \pm 13	I373
SNAP-25	102 \pm 15	106 \pm 13	100 \pm 10	I733
Synapsin Ia	109 \pm 14	99 \pm 7	100 \pm 12	E028
	100 \pm 9	99 \pm 8	100 \pm 12	P610
Synapsin Ib	110 \pm 16	98 \pm 6	100 \pm 10	E028
	110 \pm 11	102 \pm 8	100 \pm 8	P610
Synapsin IIa, b	108 \pm 17	97 \pm 2	100 \pm 6	E028
Synaptobrevin 1	118 \pm 29	110 \pm 20	100 \pm 13	P938
Synaptobrevin 2	101 \pm 11	104 \pm 16	100 \pm 8	Cl69.1
	97 \pm 17	101 \pm 16	100 \pm 13	P939
Synaptogyrin	94 \pm 15	108 \pm 26	100 \pm 13	P925
Synaptophysin I	106 \pm 12	105 \pm 17	100 \pm 9	580
	99 \pm 17	102 \pm 21	100 \pm 17	P611
Synaptophysin II	114 \pm 4	100 \pm 11	100 \pm 7	α p37
Synaptotagmin I	111 \pm 9	100 \pm 5	100 \pm 9	V216
Synaptotagmin II	102 \pm 4	105 \pm 10	100 \pm 13	I735
α -, β -Synuclein	109 \pm 10	106 \pm 13	100 \pm 6	Q698
Syntaxin (Cortex)	109 \pm 28	103 \pm 16	100 \pm 11	I379
	100 \pm 2	96 \pm 4	100 \pm 8	Cl78.2
α -Tubulin	119 \pm 18	106 \pm 11	100 \pm 14	DM1 α
β -Tubulin	93 \pm 7	98 \pm 2	100 \pm 8	Tub2.1

Tab. 2: Proteinmengen in Gesamtgehirnhomogenaten von Rabphilin- und Rab3A-Nullmutanten und Wildtyp-Mäusen wurden über quantitative Immunoblotanalyse mit radioaktiv markierten Sekundärantikörpern und FujiBas 5000-Detektion bestimmt. Drei Mäuse jedes Genotyps wurden auf dem selben Blott analysiert. Die Signale wurden über interne Standards (NMDA-Rezeptor-Untereinheit 1 und Munc18-1) normalisiert und in Prozent \pm Standardabweichung angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zu Mengen in Wildtyp-Mäusen sind fett gedruckt (Student's *t*-Test, $p < 0,001$). Zusätzlich zu den Mengen in Gesamtgehirnhomogenaten wurden die Mengen von Munc13-1 und Syntaxin im Cortex bestimmt.

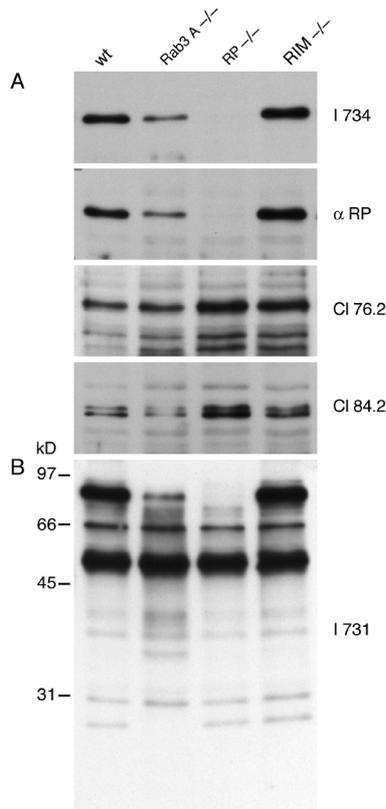


Abb. 25: Immunoblotanalyse mit ECL-Detektion von Antikörpern gerichtet gegen Rabphilin. Postnukleäre Überstände (30 μ g Gesamtprotein) von Bulbus olfactorius- (A) und Gehirncortex-Homogenaten (B) aus Wildtyp-Mäusen und Rab3A-, Rabphilin- und Rim-Nullmutanten wurden über SDS-PAGE und Transfer auf Nitrocellulosemembranen aufgetrennt und mit den folgenden Rabphilin-Antikörpern analysiert: I734 (Immunogen: Aminosäuren 1 bis 361), α RP (Immunogen: Aminosäuren 2 bis 175), CI76.2 (Immunogen: Aminosäuren 1-360), CI84.2 (Immunogen: Aminosäuren 361-527) und I731 (Immunogen: Aminosäuren 366 bis 684).

5 Diskussion

5.1 Untersuchung synaptischer Funktionen über Maus-Nullmutanten

Die Regulation der synaptischen Exozytose geschieht über Kaskaden von Protein-Protein-Wechselwirkungen, die in der Membranfusion synaptischer Vesikel mit der Plasmamembran resultieren (Südhof, 1995). Zu Beginn der molekularen Charakterisierung wurden die Komponenten synaptischer Vesikel identifiziert. Synaptische Vesikel bilden eine homogene und abundante Vesikelpopulation im Gehirn. Daher können sie zu einem hohen Grad angereichert und ihre Zusammensetzung charakterisiert werden. Dieser Prozeß ist nahezu abgeschlossen, und der Großteil der synaptischen Vesikelproteine ist identifiziert. Neben der Klonierung sind eine Vielzahl von Interaktionspartnern auf den synaptischen Vesikeln selbst als auch in anderen synaptischen Kompartimenten gefunden worden (Bennet und Scheller, 1994; Südhof, 1995). Über diese Wechselwirkungen wurden Hypothesen über mögliche Funktionen dieser Proteine im Vesikelzyklus erstellt. Diese Hypothesen müssen jedoch in physiologischen Testsystemen überprüft werden, um die Relevanz dieser Wechselwirkungen und ihre zeitliche Abfolge zu bestimmen. In dieser Hinsicht werden Exozytosesysteme modifiziert, um aus den Veränderungen auf die Funktion des einzelnen Proteins zu schließen. Neben konventionellen Methoden, wie Injektionen von Peptiden, rekombinanten Proteinen oder Antikörpern in lebende Zellen, wird über molekulargenetische Ansätze der Exozytoseapparat von sekretorischen Zellen oder ganzen Organismen modifiziert. Unter anderem hat insbesondere die Hefegenetik und die Verfügbarkeit von *in vitro*-Fusionssystemen einen großen Beitrag zum Verständnis der fundamentalen Prozesse der Membranfusion geliefert.

Mit besonderem Augenmerk auf die neuronale Exozytose werden über molekulargenetische Methoden in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* und Mäusen synaptische Proteine verändert (Chalfie und Jørgensen, 1998; Fernández-Chacón und Südhof, 1999). Von Vorteil sind in den ersten beiden Organismen die kurzen Generationszeiten, so daß sie insbesondere zum Auffinden neuer an der synaptischen Transmission beteiligter Proteine über Zufallsmutagenese eingesetzt wurden. Die Analyse der veränderten Würmer ist durch den einfachen Aufbau des Organismus vergleichsweise einfach.

Die Maus ist der einzige Organismus, bei dem über zielgerichtete Mutagenese der embryonalen Stammzellen Tiere erzeugt werden können, die die eingefügte Mutation an ausgewählter Stelle im Chromosom tragen (Capecchi et al., 1989). Weiterhin kann bei ihrer Analyse auf ein breites Repertoire an Methoden zurückgegriffen werden. So können die für die Analyse von Wildtyp-Mäusen entwickelten biochemischen, morphologischen, elektrophysiologischen, pharmakologischen und verhaltensphysiologischen Versuchsansätze bei Maus-Nullmutanten angewendet werden, um Veränderungen, ausgelöst durch eine Mutation, zu charakterisieren. Die Möglichkeit umfangreichen "joint ventures" macht die Mausgenetik nicht nur in der Neurobiologie zum erfolgreichen Konzept der funktionellen Analyse.

Die ursprünglichste Form besteht in der Einfügung chromosomaler Deletionen, die zum Verlust eines Proteins führt. Wichtig ist auch der Ort der Analyse. So führte die Deletion von Rab3A zu

einem Verlust der Langzeitpotenzierung in der CA3-Region des Hippocampus nicht jedoch in der CA1-Region (Geppert et al. 1994; Castillo et al., 1997).

Zur Komplexität tragen auch die in Säugetieren häufig vorhandenen Isoformen bei. So kommen in *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* nur je ein Rab3-Gen vor. In der Maus wurden bisher vier identifiziert. Isoformen aber auch alternative Reaktionswege können über redundante Funktionen den Phänotyp einer Einzel-Nullmutante verschleiern (Janz und Südhof, 1995). Durch Mehrfach-Nullmutanten lassen sich redundante Funktionen von Isoformen aufklären.

Bei einem Protein mit mehreren essentiellen Funktionen lassen sich durch die Nullmutante die ontogenetisch späten Einflüsse nicht aufdecken. Der Phänotyp einer Nullmutante eines Proteins mit mehreren funktionellen Domänen kann hierdurch so komplex werden, daß die Einzelbeiträge nicht aufgelöst werden können. In diesen Fällen können örtlich oder zeitlich induzierbare Nullmutanten oder die Einfügung von Punktmutationen, die nur eine Domäne betreffen, weiterhelfen.

Das Zentralnervensystem entwickelt sich erst relativ spät in der Ontogenese, so daß die Expressionsmaxima vieler synaptischer Proteine erst nach der Geburt erreicht werden. Andererseits entwickelt sich das ZNS auch ohne synaptische Transmission. Diese ist für die Aufrechterhaltung synaptischer Verbindungen essentiell, da synaptisch stumme Nervenzellen degenerieren (Verhage et al., 2000). In allen bisher generierten Nullmutanten synaptischer Vesikelproteine bildeten sich Synapsen aus und waren somit einer Analyse zugänglich.

5.2 Genstruktur der Rab3-Isoformen

Säugetiere enthalten vier Rab3-Gene. In Mäusen ist die Genstruktur von Rab3A und D identisch (Baumert et al., 1993; Adachi et al., 2000). Jeweils vier Exone codieren für dieselben Proteinabschnitte. Die Sequenzierung genomischer Klone von Rab3B und C zeigte, daß auch diese Gene analog aufgebaut zu sein scheinen. In allen vier Genen codiert ein identisch großes Exon für den N-Terminus mit dem ersten GTP-Bindungsmotiv. Im Rab3C-Gen ist noch ein zusätzliches Exon für den um acht Aminosäuren verlängerten N-Terminus stromaufwärts enthalten, welches in den genomischen Klonen noch nicht identifiziert wurde. Der Aufbau der anderen Rab-Gene unterscheidet sich sowohl in der Exonanzahl als auch der Position der Exon/Intron-Grenzen von den Rab3-Genen. Die Rab11A-, B- und Rab25-Gene bilden unter diesen Kriterien ebenfalls eine eigene Familie (Bhartur et al., 2000). Sie weisen mit 5 codierenden Exonen einen identischen Aufbau auf, während die Rab11-Proteine nur zwischen 62 bis 65 % identisch zum Rab25-Protein sind. Die Proteinsequenzübereinstimmung von Rab33A und B ist ebenfalls nur 55 %. Der identische Genaufbau mit zwei codierenden Exonen definiert sie ebenfalls zu einer Unterfamilie (Zheng et al., 1998). Der Vergleich der Genstrukturen ermöglicht somit die Einteilung der Rab-Proteine in Unterfamilien, die einem Ursprungsgen entstammen. Für die Rab3-Proteine bestätigt sich über die Genstruktur die Zuordnung zu einer Unterfamilie. Sie sind erst phylogenetisch spät von einem Rab3-Urgen durch Genduplikation entstanden. So enthalten *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* nur je ein Rab3-Gen.

5.3 Lokalisation der Rab3-Isoformen

Bisherige Studien haben für Rab3A und C eine Lokalisation in Neuronen und endokrinen Zellen gezeigt. Rab3B hingegen wurde in Epithelzellen, Thrombozyten und in der Adenohypophyse gefunden und Rab3D in einer Fettzelllinie, in Mastzellen und auf zymogenen Vesikeln des Pankreas (Weber et al., 1994; Karniguian et al., 1993; Lledo et al., 1993; Tuvim et al., 1999; Valentijn et al., 1996). Aufgrund fehlender Isoform-spezifischer Antikörper, insbesondere gerichtet gegen Rab3B, waren vergleichende Studien bisher nicht möglich. Für die Untersuchung der Rab3-Funktion ist jedoch die Kenntnis über die Lokalisation der einzelnen Rab3-Isoformen im untersuchten Gewebe notwendig. Mit den generierten und bereits vorhandenen Isoform-spezifischen Antikörpern wurde die Gewebeverteilung der Rab3-Isoformen analysiert. Überraschenderweise stellte sich heraus, daß neben Rab3A und C auch Rab3B vornehmlich im ZNS exprimiert wird. Die detektierten Mengen waren jedoch sehr unterschiedlich. Je nach untersuchter Gehirnregion waren Rab3B und C 10 bis 50fach niedriger als Rab3A repräsentiert.

Die subzellulären Fraktionierungen belegten, daß die Rab3-Isoformen A, B und C synaptische Vesikelproteine sind. Mehr noch, alle drei Isoformen kamen gemeinsam auf denselben Vesikeln lokalisiert vor. Da sich jedoch die relativen Mengen der Rab3-Isoformen in einzelnen Synapsen unterschieden, divergieren die Isoform-Verhältnisse auf Vesikeln aus unterschiedlichen Synapsen stark.

Die Rab3D-mRNA zeigte eine breite Gewebeverteilung. In den auf den Standard-Northernblots analysierten Geweben konnte das Protein durch die Triton X-114-Extraktionen nicht nachweisbar angereichert werden. Nur im Gehirn konnte das Protein durch Auftragung von großen Mengen detektiert werden. Die Gewebe der höchsten Rab3D-Proteinmengen waren durch die Standard-Northernblots nicht erfaßt. Auch wenn die Rab3D-Mengen im Gehirn gering waren, so schien es, daß sie doch soweit ausreichend waren, daß die Rab3ABC-Dreifach-Nullmutanten überlebensfähig waren. Es bleibt jedoch zu zeigen, ob diese Isoform auch synaptisch lokalisiert ist, oder z.B. in Gliazellen exprimiert wird. Die größten Mengen von Rab3D wurden in exokrinen Drüsen exprimiert, wie es für den Pankreas auch schon gezeigt wurde (Valentijn et al., 1996). Rab3A und C konnten ebenfalls in einer exokrinen Drüse, der Ohrspeicheldrüse, detektiert werden, wenn auch in weit geringeren Mengen.

Die Hypophyse bildete das Organ, in dem alle vier Rab3-Isoformen in vergleichbaren Mengen exprimiert wurden. Betrachtete man jedoch die Adenohypophyse, die einer endokrinen Drüse gleicht und die Neurohypophyse, die aus Nervenzellfortsätzen hypothalamischer Neurone gebildet wird, separat, so waren auch hier Unterschiede feststellbar. Insbesondere Rab3C kam nahezu ausschließlich in der Neurohypophyse vor, während Rab3D fast ausschließlich in der Adenohypophyse exprimiert wurde. Rab3A und B nahmen eine Mittelstellung ein, wobei Rab3A in der Neuro- und Rab3B in der Adenohypophyse dominierten. Endokrin aktiv sind in der Adenohypophyse die laktotropen, die corticotropen, somatotropen, thyreotropen und gonadotropen Zellen, die die entsprechenden Hormone sezernieren. Rab3-Isoformen kommen in allen Zelltypen vor, wie über immunhistochemische Studien gezeigt werden konnte (Redecker et al., 1995). Ob jedoch eine bestimmte Isoform einer Zellart zugeordnet werden kann, konnte bisher nicht gezeigt werden. Indirekte Hinweise über Rab3B-Antisense-Experimente deuten darauf hin, daß die Sekretion von Prolaktin und Gonadotropin durch Rab3B reguliert wird (Lledo et al., 1993 und Tasaka et al., 1998). Es war jedoch überraschend, daß die Inhibition der Rab3B-

Expression zur Verringerung der Sekretion führte, da normalerweise Überexpressionen von Rab3A diesen Effekt auslösten (Holz et al., 1994).

5.4 Die Rolle von Rab3-Isoformen im synaptischen Vesikelzyklus

In Hefen führten Mutationen in Rab-Orthologen zum Membrantransportstop im entsprechenden Reaktionspfad. Hieraus wurde eine essentielle Rolle für die Rab-Orthologen in der Steuerung intrazellulärer Membrantransportwege abgeleitet. Rab3A und C werden über synaptische Vesikel an die Plasmamembran transportiert und dissoziieren dort nach Ca^{2+} -induzierter Exozytose (Fischer von Mollard et al., 1991 und 1994). Überraschend war daher, daß in Maus-Rab3A-Nullmutanten und in *Caenorhabditis elegans*-Rab3-Nullmutanten die synaptische Transmission nur geringfügig gestört war (Geppert et al., 1994; Nonet et al., 1997). Erst nach wiederholter Stimulation zeigte sich eine schnellere Erschöpfung der Exozytose in den Schaffer-Kollateralen der Rab3A-Maus-Nullmutanten. Eine detaillierte Analyse dieses Phänomens verdeutlichte, daß pro erfolgreichem Stimulus in den Nullmutanten doppelt so viele synaptische Vesikel fusionierten wie in Kontrolltieren (Geppert et al., 1997).

In heterologen Expressionssystemen inhibiert aktiviertes (GTP-gebundenes) Rab3A die Exozytose (Holz et al., 1994). Andererseits dissoziiert Rab3A durch Ca^{2+} -stimulierte Exozytose von synaptischen Vesikeln (Fischer von Mollard et al., 1991; Stahl et al., 1996). Eine mögliche Funktion von Rab3A könnte daher sein, daß es synaptische Vesikel an der aktiven Zone arretiert und diese Ca^{2+} -vermittelt für die weitere Reifung freigibt. Mehrere neuere Untersuchungen unterstützen diese Hypothese. Das aktive Zonen-Protein und Rab3-Effektor Rim interagiert direkt mit Munc13-1, einem essentiellen Reifungsfaktor glutamaterger Synapsen (Dr. A. Betz, pers. Mitteilung; Augustin et al., 1999). Die Reduktion der Munc13-1-Mengen in Rim 1-Nullmutanten um 50 % zeigte, daß diese Interaktion auch physiologisch relevant ist. Andere Experimente ergaben, daß die Rab3A-Dissoziation im Gegensatz zu anderen Rab-Proteinen durch Ca^{2+} /Calmodulin ausgelöst werden kann (Park et al., 1997; Coppola et al., 1999). Calmodulin interagiert ebenfalls mit Munc13-1 und könnte somit die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Dissoziation vermitteln (Dr. A. Betz, pers. Mitteilung; Xu et al., 1998). Neueste Erkenntnisse in Hirnstammsynapsen zeigten, daß GTP-bindende Proteine direkt an der Wiederauffüllung entleerter Vesikel nach repetitiver Stimulation beteiligt sind (Takahashi et al., 2000). Nicht hydrolysierbare GTP-Analoga inhibierten diese Auffüllung. Es bleibt zu zeigen, inwieweit Rab3-Isoformen diese Rolle übernehmen.

In den *Caenorhabditis elegans*-Rab3-Nullmutanten war die Verteilung der synaptischen Vesikel verändert (Nonet et al., 1997). Die Anzahl der nahe der aktiven Zone lokalisierten Vesikel war reduziert, während in weiter entfernten Regionen die Anzahl erhöht war. Diese Ergebnisse implizieren eine Rolle für Rab3 im Transport synaptischer Vesikel an die aktive Zone. Möglicherweise konnte dieses Phänomen in den Maus-Rab3A-Nullmutanten nicht beobachtet werden, da diese Funktion von den verbliebenen Rab3-Isoformen übernommen werden konnte und nur die fehlende Arretierung an der aktiven Zone durch Fehlen der häufigsten zerebralen Isoform reduziert war.

Um nun die Funktion der Rab3-Isoformen näher zu charakterisieren und auch mögliche redundante Funktionen aufzuspüren, wurden Rab3-Mehrfach-Nullmutanten erzeugt. Die bisherigen Ergebnisse zeigten, daß die Einzel-, Doppel- und Dreifach-Nullmutanten überlebens-

fähig waren. Der Phänotyp der Zweifach- und Dreifach-Nullmutanten war umso ausgeprägter, je weniger Rab3 im Gehirn vorhanden war. So waren die Rab3BCD-Dreifach-Nullmutanten und Rab3A-heterozygoten Mäuse unauffällig, während schon die Rab3AC-Doppel-Nullmutanten Defizite in der Aufzucht der Nachkommen zeigten. Erst die Vierfach-Nullmutanten starben 1-2 h nach der Geburt. Die zyanotische Hautfarbe der Vierfach-Nullmutanten implizierte einen möglichen Defekt im Atemregulationszentrum der *Formatio reticularis*. Auch ein TSH- und ACTH-Mangel führt zu Apathie und Adynamie mit Hypoventilation und kann im Menschen in einem akuten hypophysären Koma enden. Da jedoch erstens alle vier Rab3-Isoformen in der Hypophyse und insbesondere Rab3B und D in der Adenohypophyse exprimiert wurden und zweitens die Rab3BCD-Nullmutanten unauffällig waren, war die Ursache für die Lethalität der Vierfach-Nullmutanten eher zerebral als hypophysär lokalisiert. Eine endokrine Ursache könnte jedoch für den Minderwuchs der männlichen Mäuse der Rab3ABC-, Rab3ACD-, Rab3ABD-Dreifach-Nullmutanten mitverantwortlich gewesen sein.

Maus-Nullmutanten anderer essentieller Proteine wie Synaptotagmin I oder Munc13-1 überlebten mehrere Stunden bis zu einem Tag (Geppert et al., 1994; Augustin et al., 1999). Sie fielen wie auch die Rab3-Vierfach-Nullmutanten durch die fehlende Milch im Magen auf. Munc18-1-Nullmutanten wurden tot geboren und zeigten eine Degeneration der zu diesem Zeitpunkt entwickelten Gehirnregionen (Verhage et al., 2000). Die *Caenorhabditis elegans*-unc13- und unc18-Nullmutanten fielen durch unkoordinierte Bewegungen auf, während Synaptotagmin-Nullmutanten in der Lage waren koordinierte Bewegungen zu vollführen (Richmond et al., 1999; Hosono et al., 1992; Nonet et al., 1993). Der Phänotyp der Rab3-Nullmutante dieses Organismus ist jedoch vergleichsweise mild, so daß das Ausmaß des Phänotyps zwischen diesen beiden Organismen nicht direkt übertragbar ist. So können Würmer auch paralysiert überleben, Säugetiere jedoch nicht.

In allen vier Rab3-Isoformen sind die Strukturabschnitte, die für die spezifische Wechselwirkung mit den Rab3-Effektoren Rim, Rabphilin und Noc2 notwendig sind, konserviert (Ostermeier und Brünger, 1999). Weiterhin binden die vier Isoformen mit vergleichbarer Affinität (10-20 nM) an Rabphilin und inhibieren die Exozytose im heterologen Expressionssystem gleichermaßen, aber unabhängig von Rabphilin (Chung et al., 1999). Die Schwere des Phänotyps in Rab3-Mehrfach-Nullmutanten nahm mit der abnehmenden Rab3-Isoform-Menge zu. Daher scheint es wahrscheinlich, daß die Rab3-Isoformen generell die gleichen Funktionen in Synapsen entfalten und die spezifischen Funktionen über die vorhandenen Effektoren vermittelt werden. So enthalten endokrine Zellen Noc2, Subtypen von Synapsen Rabphilin oder eine der beiden Rim-Isoformen (Kotake et al., 1997; Wang et al., 1997 und 1999).

Die Inhibition der Sekretion ist unabhängig von der Stimulationsart. So führten die Überexpression von allen vier Rab3-Isoformen gleichermaßen zur Inhibition sowohl der KCl-induzierten als auch der durch α -Latrotoxin stimulierten Sekretion. Betrachtet man die Kinetiken der Exozytose in Synaptosomen, so beginnt sie nach Stimulation mit α -Latrotoxin erst nach einer Verzögerung von ca. 1 min, während KCl wie auch Ionomycin unmittelbar zur Exozytose führen (Stahl et al., 1996). Die Exozytose durch α -Latrotoxin kann auch in Abwesenheit von Ca^{2+} stattfinden, während die KCl- als auch Ionomycin-induzierte durch Calcium-Chelatoren blockiert wird. Damit unterscheiden sich die Endstrecken der Mechanismen der Exozytoseinduktion dieser Substanzen, so daß die inhibierende Wirkung der Rab3-Überexpression wahrscheinlich vor dem Calciumeinstrom liegt. Es wäre interessant, ob die Rab3-Überexpression auch die Exozytose

induziert durch hyperosmolare Sucroslösung inhibiert und ob diese auch eine Dissoziation von Rab3 und Rabphilin bewirkt.

Rab3A inhibiert die Sekretion in heterologen Expressionssystemen nur, wenn die Calmodulin-bindungsstelle erhalten ist (Coppola et al., 1999). Rab3A, B und D enthalten die für die Calmodulinbindung wichtigen Argininreste, während in Rab3C ein Arginin durch Lysin ersetzt ist. Eine mögliche Calmodulin-Interaktion wird auch durch die Strukturanalyse gestützt. In Rab3A liegen die Argininreste 66 und 70 exponiert an der Oberfläche des Moleküls, so daß eine Interaktion mit Calmodulin möglich ist (Dumas et al., 1999). Weiterhin sind die Arginin- bzw. Lysinreste in Rab3C in den bisher klonierten Rab3-Orthologen von Mensch, Rind, Ratte, Maus, Seeigel, Rochen, *Loligo pealei*, *Aplysia californica*, *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* konserviert, während sie in anderen Rab-Proteinen fehlen. In den benachbarten Aminosäuren dieses Bereiches hingegen unterscheiden sich die vier Isoformen durch weitere konservierte Aminosäureaustausche, so daß eine unterschiedlich starke Calmodulinbindung möglich ist. Weitere Unterschiede in der GTP-Hydrolyserate und der Affinität zu den einzelnen Effektoren könnten die Funktion der Rab3-Isoformen modulieren. Durch unterschiedliche Anteile der Rab-Isoformen auf Vesikeln kann somit die Funktion den Anforderungen einzelner Synapsen angepaßt werden.

5.5 Die Rolle von Rabphilin als Rab3-Effektor

Spezifische Rab3-Effektoren sind über ein gemeinsames Strukturmotiv (SGAWF(F/Y)) charakterisiert und zeigen keine Sequenzähnlichkeiten zu Effektoren anderer Rab-Proteine (Ostermeier und Brünger, 1999). Rabphilin wurde als das erste Effektorprotein der Rab-Familie kloniert und kommt zum größten Teil gebunden an synaptische Vesikel vor (Shirataki et al., 1993). In Anwesenheit von Ca^{2+} dissoziierte es zusammen mit Rab3A während der Neurotransmitterfreisetzung von der Membran (Stahl et al., 1996). Inwieweit es jedoch vom fusionierenden Vesikel und nicht schon vorher abgelöst wird, ist nicht bekannt. Tetanus- und Botulinustoxin A inhibieren die Ca^{2+} -induzierte Exozytose. Da durch den Ca^{2+} -Einstrom in Synaptosomen die Rab3/Rabphilin-Dissoziation nicht ausgelöst werden kann, ist die Dissoziation zwischen SNARE-Komplexbildung und Membranfusion lokalisiert.

Rabphilin ist sowohl an den angehefteten als auch den entfernt von der aktiven Zone lokalisierten synaptischen Vesikeln gebunden (Li et al., 1994). Somit begleitet Rabphilin synaptische Vesikel von der Entstehung bis zur Membranfusion.

In Rab3A-Nullmutanten wurde Rabphilin in den Neuronen, die Rab3A als die überwiegende Isoform enthielten, nicht in Synapsen transportiert und im Zellkörper degradiert (Li et al., 1994). Die Daten über die Rekrutierung von Rab3A und Rabphilin an synaptische Vesikel sind widersprüchlich. Einerseits wird Rabphilin zusammen mit Rab3A über GDI von den Membranen abgelöst, kann aber in Abwesenheit von Rab3A an diese binden (Shirataki et al., 1994; Stahl et al., 1996). Insbesondere in der Körnerzellschicht des Cerebellums als auch in der äußeren plexiformen Schicht der Retina konnten Synapsen identifiziert werden, die Rab3A aber nicht Rabphilin enthielten. Zusätzlich war die synaptische und auch subzelluläre Lokalisation von Rab3A in Rabphilin-Nullmutanten unverändert, so daß die Bindung von Rab3A an synaptische Vesikel unabhängig von Rabphilin geschieht. Da auch die relative Verteilung zwischen cytosolischem und vesikulärem Rab3A in den Rabphilin-Nullmutanten unverändert war, scheint

der GAP-inhibierende Einfluß von Rabphilin auf den Rab3-Zyklus *in vivo* unter normalen Bedingungen unbedeutend zu sein (Kishida et al., 1993).

In Moosfaserterminalen der hippocampalen CA3-Region wird die LTP durch cAMP ausgelöst und ist von Rab3A abhängig (Castillo et al., 1997). Rabphilin wird Regionen-abhängig im Hippocampus durch Proteinkinase-A (PKA) phosphoryliert (Fykse et al., 1995; Lonart und Südhof, 1998). Da Rabphilin in den Moosfaserterminalen der CA3-Region in Rab3A-Nullmutanten nicht mehr vorhanden war, lag zumindest die Vermutung nahe, daß der Verlust der LTP durch den Verlust an dem PKA-Substrat Rabphilin bedingt war. Dies war jedoch nicht der Fall, wie sich eindeutig in der Rabphilin-Nullmutante zeigte (Schlüter et al., 1999).

cAMP steigerte durch Erhöhung des fusionskompetenten Vesikelpools, vermehrten Ca^{2+} -Einstrom und die erhöhte Effizienz des Fusionsapparates die Transmitterfreisetzung in CA3-Synaptosomen (Lonart et al., 1998). Der letzte Effekt fehlt in den Rab3A-Nullmutanten und könnte für die fehlende Auslösung der LTP verantwortlich sein. Die freigesetzte Transmittermenge ist in den Rab3A-Nullmutanten jedoch erhöht, so daß durch eine basale Überstimulation dieser Synapsen LTP nicht mehr auslösbar sein könnte.

Auch andere synaptische Veränderungen der Rab3A-Nullmutanten, wie die verstärkte synaptische Depression und die erhöhte PPF, konnten in den Rabphilin-Nullmutanten nicht beobachtet werden, so daß die Effekte in den Rab3A-Nullmutanten nicht auf die verminderten Rabphilin-Mengen zurückzuführen sind. Rab3A ist somit in mehrere Regelkreise eingebunden, von denen der Rab3/Rabphilin-Zyklus nicht für die grundlegende synaptische Transmission benötigt wird. Dies ist überraschend, da die Überexpression oder Injektion von Rabphilin-Fragmenten die Sekretion in verschiedenen Systemen sowohl inhibierte als auch stimulierte (Chung et al., 1995; Masumoto et al., 1996; Komuro et al., 1996; Arribas et al., 1997; Burns et al., 1998).

Da die Veränderungen durch den Verlust von Rab3A nahe des Fusionsereignissen selbst stattfanden, könnte auch ein gestörter Rab3/Rim-Regelkreis dafür verantwortlich sein. Rab3A bindet in der aktivierten Form an Rim (Wang et al., 1997). Die Rim-Mengen waren in den Rab3A-Nullmutanten und auch den Rab3-Dreifach-Nullmutanten nicht verändert. Dies ist auch nicht unbedingt notwendig, da Rab3A ein synaptisches Vesikelprotein ist und Rim unabhängig an die aktive Zone binden kann. Die Wechselwirkung zwischen Rab3 und Rim verknüpft synaptische Vesikel mit der aktiven Zone. Ist nun die Menge an Rab3-Proteinen auf synaptischen Vesikeln reduziert, so können auch die von der Rab3/Rim-Interaktion abhängigen Prozesse nicht in normalem Ausmaß stattfinden. Es ist insofern interessant, ob in den Rim-Nullmutanten ähnliche Veränderungen wie in den Rab3A-Nullmutanten gefunden werden können.

5.6 Calcium-abhängige Funktionen von Rabphilin

Rabphilin bindet über seine beiden C2-Domänen Ca^{2+} mit K_D -Werten im unteren micromolaren Bereich (Ubach et al., 1999). Die Proteinwechselwirkungen der C2A-Domäne sind im Gegensatz zur C2B-Domäne Ca^{2+} -abhängig. Die detaillierte Analyse der synaptischen Funktion der Rabphilin-Nullmutanten ergab keine signifikanten Unterschiede Ca^{2+} -abhängiger Prozesse der Kurzzeit- und Langzeit-synaptischen Plastizität (Schlüter et al., 1999). Es bleibt jedoch offen, ob Rabphilin einen Einfluß auf nicht untersuchte synaptische Prozesse wie z.B. die langsame Komponente der Exozytose hat oder weiter entfernt von der aktiven Zone agiert, deren

Veränderungen über die angewendeten elektrophysiologischen Protokolle nicht analysierbar waren. So waren z.B. die Signale nach der synaptischen Depression in den Rabphilin-Nullmutanten gegenüber Kontrollen erhöht. Die Bedeutung dieses Phänomens ist jedoch nicht bekannt, so daß hier noch weitere Untersuchungen notwendig sind.

5.7 Redundanz synaptischer Proteine

Eine Möglichkeit für das Fehlen eines Phänotyps in den Rabphilin-Nullmutanten ist, daß die Rabphilin-Funktionen von anderen Isoformen oder Reaktionswegen kompensiert werden können. Für viele synaptische Vesikelproteine existieren multiple Isoformen. So sind für Synaptotagmin-Isoformen 13 Gene und für Rab3 vier Gene bekannt. Das über die monoklonalen Rabphilin-Antikörper entdeckte p76-2 und p84-2 könnte eine neue Rabphilin-Isoform darstellen. p76-2 hat die gleiche Größe wie Rabphilin. Es ist jedoch kein in Synapsen angereichertes Protein, und der Antikörper bindet viele weitere Proteine, so daß fraglich ist, ob es sich um eine Rabphilin-Isoform handeln könnte.

p84-2 kam nur in einigen Gehirnregionen vor. Die größten Mengen waren im Hippocampus, der Region, in der die synaptische Funktion untersucht wurde, zu finden. Das Bandenmuster und die Verteilung von p84-2 ähnelte sehr stark der von Synapsin I (De Camilli et al., 1983; Mandell et al., 1990). Wie auch p84-2 wurde das monotope Membranprotein Synapsin I nicht in den Triton X-114-Extrakten angereichert. Da mittlerweile die meisten synaptischen Vesikelproteine kloniert wurden, bleibt z.B. über Synapsin I-Nullmutanten zu zeigen, ob p84-2 mit Synapsin I identisch ist. Andererseits könnte eine Veränderung der Proteinmengen von p76-2 und p84-2 in den Rabphilin-Nullmutanten einen Hinweis auf eine direkte Wechselwirkung der Funktionen dieser Proteine geben. Die Datenbanksuche in den bisher veröffentlichten Sequenzen des humanen Genoms ergaben auch keine Hinweise auf einen weiteren Rab3-Effektor oder Rabphilin-Isoform, so daß es momentan unwahrscheinlich ist, daß eine weitere Rabphilin-Isoform existiert.

In den Rab3-Mehrfach-Nullmutanten scheinen redundante Funktionen in der Tat den Phänotyp abzumildern. Inwieweit dies auch für die synaptischen Funktionen gilt, muß noch gezeigt werden.

Die Lokalisation und Eigenschaften der anderen Rab3-Effektoren Rim 1 und 2 unterscheiden sich wesentlich von der von Rabphilin. Rim ist Komponente der aktiven Zone, während Rabphilin auf synaptischen Vesikeln vorkommt. Weiterhin fehlen in den C2-Domänen von Rim, die für die Ca^{2+} -Bindung benötigten Aspartatreste, so daß die Regulation beider Proteine unterschiedlich erfolgt. Die Rabphilin-Mengen waren in Rab3-Mehrfach-Nullmutanten erniedrigt, während die von Rim 1 unverändert waren. Im Gegensatz dazu waren die Munc13-1-Mengen in Rim 1-Nullmutanten reduziert. Rabphilin-Mengen waren in diesen Mäusen normal, so daß beide Proteine auch *in vivo* in unterschiedliche Regelkreise eingebunden sind (Augustin et al., 1999). Daher ist es unwahrscheinlich, daß Rim den Funktionsverlust durch Rabphilin kompensieren kann.

Um andere synaptische Proteine zu identifizieren, die mit dem Rab3/Rabphilin-Zyklus interagieren, wurden die Mengen 40 synaptischer Proteine in den Rab3A- und Rabphilin-Nullmutanten bestimmt. Über diesen Ansatz wurde auch in anderen Nullmutanten die Relevanz der Wechselwirkung von Interaktionspartnern aufgezeigt. So waren in Synaptophysin I-Nullmutanten die Synaptobrevin-Mengen, in Munc13-1-Nullmutanten die Syntaxin- und Rab3A-

Mengen und in Rim 1-Nullmutanten die Munc13-1-Mengen reduziert (McMahon et al., 1996; Augustin et al., 1999). Die Mengen anderer Proteine waren unverändert. In den Rabphilin-Nullmutanten zeigte sich keine Veränderung der untersuchten Proteinnengen, so daß kompensatorische Effekte zumindest über die häufigsten synaptischen Proteine unwahrscheinlich sind.

Aus den normalen Mengen der Transmembranproteine synaptischer Vesikel kann weiterhin geschlossen werden, daß auch die Gesamtzahl synaptischer Vesikel selbst unverändert ist (Rosahl et al., 1995).

5.8 Die Funktion von Rabphilin

Die gesammelten Daten zeigten, daß Rabphilin keine essentielle Rolle bei grundlegenden Prozessen der neuronalen Exozytose spielte. Unabhängig von der Rab3/Rabphilin-Dissoziation von synaptischen Vesikeln kann die Exozytose durch α -Latrotoxin ausgelöst werden. Das Fehlen eines offensichtlichen Phänotyps bedeutet nicht, daß Rabphilin funktionslos ist. Der C-Terminus mit den C2-Domänen von Rabphilin zeigt die größte Sequenzübereinstimmung mit Doc2, das nicht Rab3 bindet (Orita et al., 1995; Verhage et al., 1997). Es ist insofern möglich, daß Rabphilin hierüber eine Rab3-unabhängige Funktion ausübt, die redundant mit der Doc2-Funktion ist.

Die Interaktion von Rabphilin mit mehreren Proteinen impliziert eine Funktion von Rabphilin weiterhin in der Organisation von Actinfilamenten über α -Actinin und in der Endozytose über Rabaptin (Kato et al., 1996; Ohya et al., 1998). So konnten über Injektionsstudien von Rabphilinfragmenten multiple Effekte insbesondere auf die Rekrutierung von synaptischen Vesikeln an die aktive Zone gefunden werden (Burns et al., 1998).

Die Funktion von Rabphilin könnte erst unter bestimmten physiologischen Bedingungen zum Tragen kommen, so daß die Ergebnisse nicht unbedingt im Widerspruch zu den Überexpressionsstudien stehen. So konnte auch in den Rab3A-Nullmutanten eine Veränderung erst bei repetitiver Stimulation der Synapsen beobachtet werden. Die Überexpression kann über Blockierung von Bindungspartnern deren Funktion beeinflussen, so daß sie sekundär zu den beobachteten Effekten führen.

Eine wichtige Funktion von Rabphilin wird auch durch die phylogenetische Sequenzkonservierung unterstützt. Im Gegensatz zu den synaptischen Vesikelproteinen Synuclein, Synaptophysin und SV2 ist Rabphilin im Genom von *Caenorhabditis elegans* bis zum Menschen konserviert enthalten. Daher werden durch Rabphilin Eigenschaften vermittelt, die die natürliche Selektion begünstigen und deren Fehlen unter Laborbedingungen anscheinend nicht zum Tragen kommen.

6 Zusammenfassung

Rab-Proteine bilden eine große Familie kleiner GTP-Bindungsproteine, die intrazelluläre Membrantransportprozesse regulieren. Die Rab3-Unterfamilie besteht aus vier Isoformen, von denen Rab3A an der Regulation der synaptischen Transmission beteiligt ist. Rabphilin, ein potentieller Effektor von Rab3, bindet an synaptische Vesikel. Die Funktion wird über die Bindung von Ca^{2+} an die C-terminalen C2-Domänen moduliert. Rab3A und C dissoziieren zusammen mit Rabphilin von der synaptischen Vesikelmembran bei der Ca^{2+} -getriggerten Exozytose. In Hefe führten Mutationen der Rab3-Orthologe zur Blockierung des Transportes in abhängigen Reaktionswegen. Die Maus-Rab3A-Nullmutante führte jedoch nur zu vergleichsweise geringfügigen Veränderungen der synaptischen Exozytose. Um zu überprüfen, ob Rab3-Isoformen den Rab3A-Verlust kompensieren können, wurde die Gewebe- und subzelluläre Verteilung der Rab3-Isoformen vergleichend analysiert. Rab3A war die dominierende Isoform im ZNS. Rab3B und C kamen ebenfalls hauptsächlich im ZNS und dort gebunden an die gleichen synaptischen Vesikel vor. Die Mengenverhältnisse in einzelnen Synapsen variierte stark, wobei Rab3A im Gegensatz zu den anderen Rab3-Isoformen homogen verteilt war. Rab3D kam in geringen Mengen im ZNS vor und war die dominierende Isoform in exokrinen Drüsen. Alle vier Isoformen wurden in endokrinen und neuroendokrinen Drüsen exprimiert.

Die aktivierten Rab3-Mutanten inhibierten in gleichem Maße die Exozytose in heterologen Expressionssystemen, so daß zumindest eine Funktion redundant war.

Um die Funktion der Rab3-Proteine weiter zu charakterisieren, wurden Maus-Rab3-Mehrfach-Nullmutanten erstellt. Rab3 stellt ein essentielles Protein der synaptischen Transmission dar. Je geringer die verbliebenen zerebralen Rab3-Mengen in den Mehrfach-Nullmutanten waren, desto schwerwiegender war der Phänotyp. Rab3-Vierfach-Nullmutanten starben kurz nach der Geburt.

Die Rabphilin-Mengen nahmen in Rab3-Mehrfach-Nullmutanten parallel zu den verminderten Rab3-Mengen ab. Über Rabphilin-Nullmutanten wurde untersucht, inwieweit die beobachteten synaptischen Alterationen der Rab3A-Nullmutanten auf die reduzierten Rabphilin-Mengen zurückzuführen waren. Rabphilin-Nullmutanten waren lebensfähig und zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp. Die Gehirnstruktur und synaptische Funktion war in ihnen normal. Insbesondere die in Rab3A-Nullmutanten beobachteten Veränderungen waren nicht vorhanden, so daß diese durch Rabphilin-unabhängige Rab3-Funktionen verursacht wurden.

Die synaptische und subzelluläre Lokalisation von Rab3A war in diesen Mäusen unverändert, wodurch die Rekrutierung von Rabphilin über Rab3 an synaptische Vesikel belegt werden konnte. Es fanden sich keine kompensatorischen Veränderungen anderer synaptischer Proteine, insbesondere nicht derer, die Bestandteil des Rab3/Rabphilin-Zyklus sind. Die Suche nach Isoformen ergab eine neue im Herz angereicherte Doc2-Isoform und zwei Proteine, die über kreuzreagierende Rabphilin-Antikörper entdeckt wurden. Die Charakterisierung ihrer zerebralen und subzellulären Verteilung ließen vermuten, daß sie keine Rabphilin-Isoformen darstellten.

Rab3-Proteine bilden ein essentielles Bindeglied mehrerer synaptischer Regelkreise, wobei der Rab3/Rabphilin-Zyklus nicht für basale Prozesse der synaptischen Transmission wichtig ist.

Stichwörter: *Rab3; Rabphilin; Maus-Nullmutanten*

7 Summary

Rab proteins constitute a large family of small GTP binding proteins which regulate intracellular membrane transport processes. Four isoforms belong to the Rab3 subfamily from which Rab3A is involved in regulatory processes of synaptic transmission. Rabphilin, a putative effector of Rab3A, binds to synaptic vesicles. Its function is modulated through the binding of Ca^{2+} to the C-terminal C2-domains. Rab3A and C dissociate together with Rabphilin from synaptic vesicle membranes during Ca^{2+} triggered exocytosis. Mutations in Rab3 orthologs in yeast were responsible for the block of membrane transport in down stream pathways. In this regard, mouse Rab3A deletion mutants caused surprisingly mild changes of synaptic exocytosis. Tissue and subcellular distribution of Rab3 isoforms were analysed to check if other Rab3 isoforms could compensate for the loss of Rab3A. Rab3A was the most abundant isoform in the central nervous system. Rab3B and C were also predominantly expressed in the central nervous system and were bound on the same synaptic vesicles. The relative amounts in individual synapses were very variable, whereas Rab3A distribution was more homogenous compared to the other isoforms. Rab3D was only present in small amounts in the central nervous system and was the dominant isoform in exocrine glands. All four isoforms were expressed in endocrine and neuroendocrine glands.

Constitutive active Rab3 mutants inhibited exocytosis in heterologous expression systems to the same amount, indicating at least one redundant function.

Mouse Rab3 multiple deletion mutants were generated to characterize the function of Rab3 proteins in more detail. Rab3 is an essential protein of synaptic transmission. The less the amounts of cerebral Rab3 protein in multiple mutants were, the more severe was the phenotype. Rab3 quadruple deletion mutants died shortly after birth.

The Rabphilin amounts in Rab3 multiple deletion mutants were decreased in parallel to the reduced Rab3 amounts. By the use of mouse Rabphilin deletion mutants it was investigated to which level the reduced Rabphilin amounts in Rab3A deletion mutants were responsible for the synaptic alterations. Rabphilin deletion mutants were viable and didn't show an obvious phenotype. The brain structure and the synaptic function was normal. Especially the alterations observed in Rab3A deletion mutants were absent, indicating that these were due to Rabphilin independent Rab3 functions.

In these mice the synaptic and subcellular localization of Rab3A was unchanged, proving the recruitment of Rabphilin through Rab3 on synaptic vesicles. No compensatory changes in other investigated protein levels were detected, especially in those which were part of the Rab3/Rabphilin cycle. Searching for isoforms resulted in a Doc2 isoform enriched in the heart and two proteins crossreacting with Rabphilin antibodies. The characterization of their cerebral and subcellular distribution indicated that they didn't constitute new Rabphilin isoforms.

Rab3 proteins are essential proteins connecting multiple synaptic pathways, from which the Rab3/Rabphilin cycle is not important for basal processes of synaptic transmission.

key words: *Rab3; Rabphilin; mouse deletion mutants*

8 Literaturverzeichnis

- Abeliovich, A., Schmitz, Y., Farinas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W. H., Castillo, P. E., Shinsky, N., Verdugo, J. M., Armanini, M., Ryan, A., Hynes, M., Phillips, H., Sulzer, D. und Rosenthal, A. (2000). Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25, 239-52.
- Adachi, R., Nigam, R., Tuvim, M. J., De Mayo, F. und Dickey, B. F. (2000). Genom Organization, Chromosomal Localization, and Expression of the Murine RAB3D Gene. *BBRC* 273, 877-883.
- Alés, E., Tabares, L., Poyato, J. M., Valero, V., Lindau, M. und Alvarez de Toledo, G. (1999). High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism. *Nat Cell Biol* 1, 40-4.
- Alvarez de Toledo, G., Fernandez-Chacon, R. und Fernandez, J. M. (1993). Release of secretory products during transient vesicle fusion. *Nature* 363, 554-8.
- Antonin, W., Riedel, D. und von Mollard, G. F. (2000). The SNARE Vti1a β is localized to small synaptic vesicles and participates in a novel SNARE complex. *J Neurosci* 20, 5724-32.
- Araki, S., Kikuchi, A., Hata, Y., Isomura, M. und Takai, Y. (1990). Regulation of reversible binding of smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein, to synaptic plasma membranes and vesicles by its specific regulatory protein, GDP dissociation inhibitor. *J Biol Chem* 265, 13007-15.
- Arribas, M., Regazzi, R., Garcia, E., Wollheim, C. B. und De Camilli, P. (1997). The stimulatory effect of rabphilin 3a on regulated exocytosis from insulin-secreting cells does not require an association-dissociation cycle with membranes mediated by Rab 3. *Eur J Cell Biol* 74, 209-16.
- Augustin, I., Rosenmund, C., Südhof, T. C. und Brose (1999). Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature* 400, 457-61.
- Baldini, G., Hohl, T., Lin, H. Y. und Lodish, H. F. (1992). Cloning of a Rab3 isotype predominantly expressed in adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5049-52.
- Baumert, M., Fischer von Mollard, G., Jahn, R. und Südhof, T. C. (1993). Structure of the murine rab3A gene: correlation of genomic organization with antibody epitopes. *Biochem J* 293, 157-63.
- Bellocchio, E. E., Hu, H., Pohorille, A., Chan, J., Pickel, V. M. und Edwards, R. H. (1998). The localization of the brain-specific inorganic phosphate transporter suggests a specific presynaptic role in glutamatergic transmission. *J Neurosci* 18, 8648-59.
- Bellocchio, E. E., Reimer, R. J., Fremeau, R. T., Jr. und Edwards, R. H. (2000). Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science* 289, 957-60.
- Bennett, M. K. und Scheller, R. H. (1994). A molecular description of synaptic vesicle membrane trafficking. *Annu Rev Biochem* 63, 63-100.

- Betz, A., Ashery, U., Rickmann, M., Augustin, I., Neher, E., Südhof, T. C., Rettig, J. und Brose, N. (1998). Munc13-1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitter release. *Neuron* 21, 123-36.
- Bhartur, S. G., Calhoun, B. C., Woodrum, J., Kurkjian, J., Iyer, S., Lai, F. und Goldenring J. R. (2000). Genomic structure of murine Rab11 family members. *BBRC* 269, 611-7.
- Blanchard, M. M., Taillon-Miller, P., Nowotny, P. und Nowotny, V. (1993). PCR buffer optimization with uniform temperature regimen to facilitate automation. *PCR Methods Appl* 2, 234-40.
- Bordier, C. (1981). Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol Chem* 256, 1604-7.
- Bourne, H. R. (1988). Do GTPases direct membrane traffic in secretion? *Cell* 53, 669-71.
- Brennwald, P. und Novick, P. (1993). Interactions of three domains distinguishing the Ras-related GTP-binding proteins Ypt1 and Sec4. *Nature* 362, 560-3.
- Brondyk, W. H., McKiernan, C. J., Burstein, E. S. und Macara, I. G. (1993). Mutants of Rab3A analogous to oncogenic Ras mutants. Sensitivity to Rab3A-GTPase activating protein and Rab3A-guanine nucleotide releasing factor. *J Biol Chem* 268, 9410-5.
- Brose, N., Hofmann, K., Hata, Y. und Südhof, T. C. (1995). Mammalian homologues of *Caenorhabditis elegans* unc-13 gene define novel family of C2-domain proteins. *J Biol Chem* 270, 25273-80.
- Brose, N., Huntley, G. W., Stern-Bach, Y., Sharma, G., Morrison, J. H. und Heinemann, S. F. (1994). Differential assembly of coexpressed glutamate receptor subunits in neurons of rat cerebral cortex. *J Biol Chem* 269, 16780-4.
- Brose, N., Petrenko, A. G., Südhof, T. C. und Jahn, R. (1992). Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* 256, 1021-5.
- Brose, N., Rosenmund, C. und Rettig, J. (2000). Regulation of transmitter release by unc-13 and its homologues. *Curr Opin Neurobiol* 10, 303-11.
- Brünger, A. T. (2000). Structural insights into the molecular mechanism of Ca(2+)-dependent exocytosis. *Curr Opin Neurobiol* 10, 293-302.
- Burger, P. M., Mehl, E., Cameron, P. L., Maycox, P. R., Baumert, M., Lottspeich, F., De Camilli, P. und Jahn, R. (1989). Synaptic vesicles immunisolated from rat cerebral cortex contain high levels of glutamate. *Neuron* 3, 715-20.
- Burns, M. E., Sasaki, T., Takai, Y. und Augustine, G. J. (1998). Rabphilin-3A: a multifunctional regulator of synaptic vesicle traffic. *J Gen Physiol* 111, 243-55.
- Capecchi, M. R. (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244, 1288-92.
- Castillo, P. E., Janz, R., Südhof, T. C., Tzounopoulos, T., Malenka, R. C. und Nicoll, R. A. (1997). Rab3A is essential for mossy fibre long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 388, 590-3.

- Chalfie, M. und Jørgensen, E. M. (1998). *C. elegans* neuroscience: genetics to genome. *Trends Genet* 14, 506-12.
- Chamberlain, L. H. und Burgoyne, R. D. (2000). Cysteine-string protein: the chaperone at the synapse. *J Neurochem* 74, 1781-9.
- Chen, C. und Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7, 2745-52.
- Chen, Y. A., Scales, S. J., Patel, S. M., Doung, Y. C. und Scheller, R. H. (1999). SNARE complex formation is triggered by Ca^{2+} and drives membrane fusion. *Cell* 97, 165-74.
- Chou, J. H. und Jahn, R. (2000). Binding of Rab3A to synaptic vesicles. *J Biol Chem* 275, 9433-40.
- Chow, R. H., von Ruden, L. und Neher, E. (1992). Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature* 356, 60-3.
- Chung, S. H., Joberty, G., Gelino, E. A., Macara, I. G. und Holz, R. W. (1999). Comparison of the effects on secretion in chromaffin and PC12 cells of Rab3 family members and mutants. Evidence that inhibitory effects are independent of direct interaction with Rabphilin3. *J Biol Chem* 274, 18113-20.
- Chung, S. H., Song, W. J., Kim, K., Bednarski, J. J., Chen, J., Prestwich, G. D. und Holz, R. W. (1998). The C2 domains of Rabphilin3A specifically bind phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate containing vesicles in a Ca^{2+} -dependent manner. In vitro characteristics and possible significance. *J Biol Chem* 273, 10240-8.
- Chung, S. H., Takai, Y. und Holz, R. W. (1995). Evidence that the Rab3a-binding protein, rabphilin3a, enhances regulated secretion. Studies in adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem* 270, 16714-8.
- Coorsen, J. R., Blank, P. S., Tahara, M. und Zimmerberg, J. (1998). Biochemical and functional studies of cortical vesicle fusion: the SNARE complex and Ca^{2+} sensitivity. *J Cell Biol* 143, 1845-57.
- Coppola, T., Perret-Menoud, V., Luthi, S., Farnsworth, C. C., Glomset, J. A. und Regazzi, R. (1999). Disruption of Rab3-calmodulin interaction, but not other effector interactions, prevents Rab3 inhibition of exocytosis. *Embo J* 18, 5885-91.
- Dascher, C., Ossig, R., Gallwitz, D. und 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, 872-85.
- De Camilli, P., Cameron, R., and Greengard, P. (1983). Synapsin I (protein D), a nerve terminal-specific phosphoprotein. I. Its general distribution in synapses of the central and peripheral nervous system demonstrated by immunofluorescence in frozen and plastic sections. *J Cell Biol* 96, 1337-54.

- de Hoop, M. J., Huber, L. A., Stenmark, H., Williamson, E., Zerial, M., Parton, R. G. und Dotti, C. G. (1994). The involvement of the small GTP-binding protein Rab5a in neuronal endocytosis. *Neuron* *13*, 11-22.
- Del Sal, G., Manfioletti, G. und Schneider, C. (1988). A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing. *Nucleic Acids Res* *16*, 9878.
- Dulubova, I., Sugita, S., Hill, S., Hosaka, M., Fernandez, I., Südhof, T. C. und Rizo, J. (1999). A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *Embo J* *18*, 4372-82.
- Dumas, J. J., Zhu, Z., Connolly, J. L., Lambright, D. G. (1999). Structural basis of activation and GTP hydrolysis in Rab proteins. *Structure Fold Des* *7*, 413-23.
- Dunn, B., Stearns, T. und Botstein, D. (1993). Specificity domains distinguish the Ras-related GTPases Ypt1 and Sec4. *Nature* *362*, 563-5.
- Edelmann, L., Hanson, P. I., Chapman, E. R. und Jahn, R. (1995). Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *Embo J* *14*, 224-31.
- Erickson, J. D., Eiden, L. E. und Hoffman, B. J. (1992). Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 10993-7.
- Farnsworth, C. C., Kawata, M., Yoshida, Y., Takai, Y., Gelb, M. H. und Glomset, J. A. (1991). C terminus of the small GTP-binding protein smg p25A contains two geranylgeranylated cysteine residues and a methyl ester. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 6196-200.
- Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* *132*, 6-13.
- Fenster, S. D., Chung, W. J., Zhai, R., Cases-Langhoff, C., Voss, B., Garner, A. M., Kaempf, U., Kindler, S., Gundelfinger, E. D. und Garner, C. C. (2000). Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to bassoon. *Neuron* *25*, 203-14.
- Fernández-Chacón, R. und Südhof, T. C. (1999). Genetics of synaptic vesicle function: toward the complete functional anatomy of an organelle. *Annu Rev Physiol* *61*, 753-76.
- Fischer von Mollard, G., Mignery, G. A., Baumert, M., Perin, M. S., Hanson, T. J., Burger, P. M., Jahn, R. und Südhof, T. C. (1990). rab3 is a small GTP-binding protein exclusively localized to synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 1988-92.
- Fischer von Mollard, G., Stahl, B., Khokhlatchev, A., Südhof, T. C. und Jahn, R. (1994). Rab3C is a synaptic vesicle protein that dissociates from synaptic vesicles after stimulation of exocytosis. *J Biol Chem* *269*, 10971-4.
- Fischer von Mollard, G., Stahl, B., Walch-Solimena, C., Takei, K., Daniels, L., Khokhlatchev, A., De Camilli, P., Südhof, T. C. und Jahn, R. (1994). Localization of Rab5 to synaptic vesicles identifies endosomal intermediate in synaptic vesicle recycling pathway. *Eur J Cell Biol* *65*, 319-26.
- Fischer von Mollard, G., Südhof, T. C. und Jahn, R. (1991). A small GTP-binding protein dissociates from synaptic vesicles during exocytosis. *Nature* *349*, 79-81.

- Fujita, Y., Shirataki, H., Sakisaka, T., Asakura, T., Ohya, T., Kotani, H., Yokoyama, S., Nishioka, H., Matsuura, Y., Mizoguchi, A., Scheller, R. H. und Takai, Y. (1998). Tomosyn: a syntaxin-1-binding protein that forms a novel complex in the neurotransmitter release process. *Neuron* *20*, 905-15.
- Fykse, E. M., Li, C. und Südhof, T. C. (1995). Phosphorylation of rabphilin-3A by Ca^{2+} /calmodulin- and cAMP-dependent protein kinases in vitro. *J Neurosci* *15*, 2385-95.
- Fykse, E. M., Takei, K., Walch-Solimena, C., Geppert, M., Jahn, R., De Camilli, P. und Südhof, T. C. (1993). Relative properties and localizations of synaptic vesicle protein isoforms: the case of the synaptophysins. *J Neurosci* *13*, 4997-5007.
- Garner, C. C., Kindler, S. und Gundelfinger, E. D. (2000). Molecular determinants of presynaptic active zones. *Curr Opin Neurobiol* *10*, 321-7.
- Geppert, M., Bolshakov, V. Y., Siegelbaum, S. A., Takei, K., De Camilli, P., Hammer, R. E. und Südhof, T. C. (1994). The role of Rab3A in neurotransmitter release. *Nature* *369*, 493-7.
- Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R. E., Li, C., Rosahl, T. W., Stevens, C. F. und Südhof, T. C. (1994). Synaptotagmin I: a major Ca^{2+} sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* *79*, 717-27.
- Geppert, M., Goda, Y., Stevens, C. F. und Südhof, T. C. (1997). The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion. *Nature* *387*, 810-4.
- Geppert, M. und Südhof, T. C. (1998). RAB3 and synaptotagmin: the yin and yang of synaptic membrane fusion. *Annu Rev Neurosci* *21*, 75-95.
- Goda, Y. und Stevens, C. F. (1994). Two components of transmitter release at a central synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 12942-6.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. und Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* *36*, 59-74.
- Guan, K. L. und Dixon, J. E. (1991). Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal Biochem* *192*, 262-7.
- Hanson, P. I., Roth, R., Morisaki, H., Jahn, R. und Heuser, J. E. (1997). Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell* *90*, 523-35.
- Hayashi, T., McMahon, H., Yamasaki, S., Binz, T., Hata, Y., Südhof, T. C. und Niemann, H. (1994). Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *Embo J* *13*, 5051-61.
- Hessler, N. A., Shirke, A. M. und Malinow, R. (1993). The probability of transmitter release at a mammalian central synapse. *Nature* *366*, 569-72.
- Heuser, J. E. und Reese, T. S. (1973). Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* *57*, 315-44.

- Heuser, J. E., Reese, T. S., Dennis, M. J., Jan, Y., Jan, L. und Evans, L. (1979). Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. *J Cell Biol* 81, 275-300.
- Higuchi, R. (1990). Site directed mutagenesis. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, D. Innis, H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White, eds. (New York: Academic Press), pp. 177-183.
- Hirokawa, N., Sobue, K., Kanda, K., Harada, A. und Yorifuji, H. (1989). The cytoskeletal architecture of the presynaptic terminal and molecular structure of synapsin 1. *J Cell Biol* 108, 111-26.
- Holz, R. W., Brondyk, W. H., Senter, R. A., Kuizon, L. und Macara, I. G. (1994). Evidence for the involvement of Rab3A in Ca(2+)-dependent exocytosis from adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem* 269, 10229-34.
- Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S. und Monk, M. (1987). HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* 326, 292-5.
- Hörtnagl, H., Berger, M. L., Sperk, G. und Piffl, C. (1991). Regional heterogeneity in the distribution of neurotransmitter markers in the rat hippocampus. *Neuroscience* 45, 261-72.
- Hosono, R., Hekimi, S., Kamiya, Y., Sassa, T., Murakami, S., Nishiwaki, K., Miwa, J., Taketo, A. und 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, 1517-25.
- Huttner, W. B., Schiebler, W., Greengard, P. und De Camilli, P. (1983). Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. *J Cell Biol* 96, 1374-88.
- Iwasaki, K., Staunton, J., Saifee, O., Nonet, M. und Thomas, J. H. (1997). *aex-3* encodes a novel regulator of presynaptic activity in *C. elegans*. *Neuron* 18, 613-22.
- Jahn, R. und Hanson, P. I. (1998). Membrane fusion. SNAREs line up in new environment. *Nature* 393, 14-5.
- Jahn, R. und Südhof, T. C. (1999). Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem* 68, 863-911.
- Jahn, R. und Südhof, T. C. (1993). Synaptic vesicle traffic: rush hour in the nerve terminal. *J Neurochem* 61, 12-21.
- Janz, R. und Südhof, T. C. (1995). A systematic approach to studying synaptic function in vertebrates. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 60, 309-14.
- Johnston, P. A., Cameron, P. L., Stukenbrok, H., Jahn, R., De Camilli, P. und Südhof, T. C. (1989). Synaptophysin is targeted to similar microvesicles in CHO and PC12 cells. *Embo J* 8, 2863-72
- Johnston, P. A., Archer, B. T. d., Robinson, K., Mignery, G. A., Jahn, R. und Südhof, T. C. (1991). rab3A attachment to the synaptic vesicle membrane mediated by a conserved polyisoprenylated carboxy-terminal sequence. *Neuron* 7, 101-9.

- Jonas, P., Bischofberger, J. und Sandkühler, J. (1998). Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science* 281, 419-24.
- Jones, D. H. und Matus, A. I. (1974). Isolation of synaptic plasma membrane from brain by combined flotation-sedimentation density gradient centrifugation. *Biochim Biophys Acta* 356, 276-87.
- Jørgensen, E. M., Hartweg, E., Schuske, K., Nonet, M. L., Jin, Y. und Horvitz, H. R. (1995). Defective recycling of synaptic vesicles in synaptotagmin mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 378, 196-9.
- Karniguian, A., Zahraoui, A. und Tavitian, A. (1993). Identification of small GTP-binding rab proteins in human platelets: thrombin-induced phosphorylation of rab3B, rab6 und rab8 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7647-51.
- Kato, M., Sasaki, T., Ohya, T., Nakanishi, H., Nishioka, H., Imamura, M. und Takai, Y. (1996). Physical and functional interaction of rabphilin-3A with alpha-actinin. *J Biol Chem* 271, 31775-8.
- Kemble, G. W., Danieli, T. und White, J. M. (1994). Lipid-anchored influenza hemagglutinin promotes hemifusion, not complete fusion. *Cell* 76, 383-91.
- Kishida, S., Shirataki, H., Sasaki, T., Kato, M., Kaibuchi, K. und Takai, Y. (1993). Rab3A GTPase-activating protein-inhibiting activity of Rabphilin-3A, a putative Rab3A target protein. *J Biol Chem* 268, 22259-61.
- Komuro, R., Sasaki, T., Orita, S., Maeda, M. und Takai, Y. (1996). Involvement of rabphilin-3A in Ca^{2+} -dependent exocytosis from PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 219, 435-40.
- Kotake, K., Ozaki, N., Mizuta, M., Sekiya, S., Inagaki, N. und Seino, S. (1997). Noc2, a putative zinc finger protein involved in exocytosis in endocrine cells. *J Biol Chem* 272, 29407-10.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Landis, D. M., Hall, A. K., Weinstein, L. A. und Reese, T. S. (1988). The organization of cytoplasm at the presynaptic active zone of a central nervous system synapse. *Neuron* 1, 201-9.
- Lehman, K., Rossi, G., Adamo, J. E. und Brennwald, P. (1999). Yeast homologues of tomosyn and lethal giant larvae function in exocytosis and are associated with the plasma membrane SNARE, Sec9. *J Cell Biol* 146, 125-40.
- Li, C., Takei, K., Geppert, M., Daniell, L., Stenius, K., Chapman, E. R., Jahn, R., De Camilli, P. und Südhof, T. C. (1994). Synaptic targeting of rabphilin-3A, a synaptic vesicle Ca^{2+} /phospholipid-binding protein, depends on rab3A/3C [published erratum appears in *Neuron* 1995 Jul;15(1):following 239]. *Neuron* 13, 885-98.
- Li, C., Ullrich, B., Zhang, J. Z. underson, R. G., Brose, N. und Südhof, T. C. (1995). Ca^{2+} -dependent and -independent activities of neural and non-neural synaptotagmins. *Nature* 375, 594-9.

- Lian, J. P., Stone, S., Jiang, Y., Lyons, P. und Ferro-Novick, S. (1994). Ypt1p implicated in v-SNARE activation. *Nature* 372, 698-701.
- Liu, Y. und Edwards, R. H. (1997). The role of vesicular transport proteins in synaptic transmission and neural degeneration. *Annu Rev Neurosci* 20, 125-56.
- Lledo, P. M., Vernier, P., Vincent, J. D., Mason, W. T. und Zorec, R. (1993). Inhibition of Rab3B expression attenuates Ca(2+)-dependent exocytosis in rat anterior pituitary cells. *Nature* 364, 540-4.
- Lonart, G., Janz, R., Johnson, K. M. und Südhof, T. C. (1998). Mechanism of action of rab3A in mossy fiber LTP. *Neuron* 21, 1141-50.
- Lonart, G. und Südhof, T. C. (1998). Region-specific phosphorylation of rabphilin in mossy fiber nerve terminals of the hippocampus. *J Neurosci* 18, 634-40.
- Lupashin, V. V. und Waters, M. G. (1997). t-SNARE activation through transient interaction with a rab-like guanosine triphosphatase. *Science* 276, 1255-8.
- Mandell, J. W., Townes-Anderson, E., Czernik, A. J., Cameron, R., Greengard, P. und De Camilli, P. (1990). Synapsins in the vertebrate retina: absence from ribbon synapses and heterogeneous distribution among conventional synapses. *Neuron* 5, 19-33.
- Masuda, E. S., Huang, B. C., Fisher, J. M., Luo, Y. und Scheller, R. H. (1998). Tomosyn binds t-SNARE proteins via a VAMP-like coiled coil. *Neuron* 21, 479-80.
- Masumoto, N., Sasaki, T., Tahara, M., Mammoto, A., Ikebuchi, Y., Tasaka, K., Tokunaga, M., Takai, Y. und Miyake, A. (1996). Involvement of Rabphilin-3A in cortical granule exocytosis in mouse eggs. *J Cell Biol* 135, 1741-7.
- Matsui, Y., Kikuchi, A., Araki, S., Hata, Y., Kondo, J., Teranishi, Y. und Takai, Y. (1990). Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein. *Mol Cell Biol* 10, 4116-22.
- Matsui, Y., Kikuchi, A., Kondo, J., Hishida, T., Teranishi, Y. und Takai, Y. (1988). Nucleotide and deduced amino acid sequences of a GTP-binding protein family with molecular weights of 25,000 from bovine brain. *J Biol Chem* 263, 11071-4.
- Matteoli, M., Takei, K., Cameron, R., Hurlbut, P., Johnston, P. A., Südhof, T. C., Jahn, R. und De Camilli, P. (1991). Association of Rab3A with synaptic vesicles at late stages of the secretory pathway. *J Cell Biol* 115, 625-33.
- Maycox, P. R., Link, E., Reetz, A., Morris, S. A. und Jahn, R. (1992). Clathrin-coated vesicles in nervous tissue are involved primarily in synaptic vesicle recycling. *J Cell Biol* 118, 1379-88.
- McIntire, S. L., Reimer, R. J., Schuske, K., Edwards, R. H. und Jørgensen, E. M. (1997). Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* 389, 870-6.
- McMahon, H. T., Bolshakov, V. Y., Janz, R., Hammer, R. E., Siegelbaum, S. A. und Südhof, T. C. (1996). Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4760-4.

- McMahon, H. T., Missler, M., Li, C. und Südhof, T. C. (1995). Complexins: cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function. *Cell* 83, 111-9.
- McMahon, H. T. und Südhof, T. C. (1995). Synaptic core complex of synaptobrevin, syntaxin und SNAP25 forms high affinity alpha-SNAP binding site. *J Biol Chem* 270, 2213-7.
- Melikyan, G. B., White, J. M. und Cohen, F. S. (1995). GPI-anchored influenza hemagglutinin induces hemifusion to both red blood cell and planar bilayer membranes. *J Cell Biol* 131, 679-91.
- Mignery, G. A., Südhof, T. C., Takei, K. und De Camilli, P. (1989). Putative receptor for inositol 1,4,5-trisphosphate similar to ryanodine receptor. *Nature* 342, 192-5.
- Misura, K. M., Scheller, R. H. und Weis, W. I. (2000). Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. *Nature* 404, 355-62.
- Miyazaki, M., Shirataki, H., Kohno, H., Kaibuchi, K., Tsugita, A., und Takai, Y. (1994) Identification as β -adducin of a protein interacting with rabphilin-3A in the presence of Ca^{2+} and phosphatidylserine. *BBRC* 205, 460-6.
- Mizoguchi, A., Kim, S., Ueda, T., Kikuchi, A., Yorifuji, H., Hirokawa, N. und Takai, Y. (1990). Localization and subcellular distribution of smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein, in rat brain. *J Biol Chem* 265, 11872-9.
- Moya, M., Roberts, D. und Novick, P. (1993). DSS4-1 is a dominant suppressor of sec4-8 that encodes a nucleotide exchange protein that aids Sec4p function. *Nature* 361, 460-3.
- Murthy, V. N. und Stevens, C. F. (1998). Synaptic vesicles retain their identity through the endocytic cycle. *Nature* 392, 497-501.
- Nagy, A., Baker, R. R., Morris, S. J. und Whittaker, V. P. (1976). The preparation and characterization of synaptic vesicles of high purity. *Brain Res* 109, 285-309.
- Neher, E. (1993). Cell physiology. Secretion without full fusion. *Nature* 363, 497-8.
- Nickel, W., Weber, T., McNew, J. A., Parlati, F., Sollner, T. H. und Rothman, J. E. (1999). Content mixing and membrane integrity during membrane fusion driven by pairing of isolated v-SNAREs and t-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12571-6.
- Nicoll, R. A. und Malenka, R. C. (1995). Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 377, 115-8.
- Nonet, M. L., Grundahl, K., Meyer, B. J. und Rand, J. B. (1993). Synaptic function is impaired but not eliminated in *C. elegans* mutants lacking synaptotagmin. *Cell* 73, 1291-305.
- Nonet, M. L., Staunton, J. E., Kilgard, M. P., Fergestad, T., Hartweg, E., Horvitz, H. R., Jorgensen, E. M. und Meyer, B. J. (1997). *Caenorhabditis elegans* rab-3 mutant synapses exhibit impaired function and are partially depleted of vesicles. *J Neurosci* 17, 8061-73.
- Novick, P. und Zerial, M. (1997). The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr Opin Cell Biol* 9, 496-504.

- Ohya, T., Sasaki, T., Kato, M. und Takai, Y. (1998). Involvement of Rabphilin3 in endocytosis through interaction with Rabaptin5. *J Biol Chem* 273, 613-7.
- Orita, S., Sasaki, T., Naito, A., Komuro, R., Ohtsuka, T., Maeda, M., Suzuki, H., Igarashi, H. und Takai, Y. (1995). Doc2: a novel brain protein having two repeated C2-like domains. *Biochem Biophys Res Commun* 206, 439-48.
- Ostermeier, C. und Brunger, A. T. (1999). Structural basis of Rab effector specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of rabphilin-3A. *Cell* 96, 363-74.
- Park, J. B., Farnsworth, C. C. und Glomset, J. A. (1997). Ca^{2+} /calmodulin causes Rab3A to dissociate from synaptic membranes. *J Biol Chem* 272, 20857-65.
- Perin, M. S., Fried, V. A., Mignery, G. A., Jahn, R. und Südhof, T. C. (1990). Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature* 345, 260-3.
- Peters, C. und Mayer, A. (1998). Ca^{2+} /calmodulin signals the completion of docking and triggers a late step of vacuole fusion. *Nature* 396, 575-80.
- Pfeffer, S. R. (1999). Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs. *Nat Cell Biol* 1, 17-22.
- Redecker, P., Cetin, Y. und Grube, D. (1995). Differential distribution of synaptotagmin I and rab3 in the anterior pituitary of four mammalian species. *Neuroendocrinology* 62, 101-10.
- Regehr, W. G., Delaney, K. R. und Tank, D. W. (1994). The role of presynaptic calcium in short-term enhancement at the hippocampal mossy fiber synapse. *J Neurosci* 14, 523-37.
- Richmond, J. E., Davis, W. S. und Jörgensen, E. M. (1999). UNC-13 is required for synaptic vesicle fusion in *C. elegans*. *Nat Neurosci* 2, 959-64.
- Roa, M., Paumet, F., Le Mao, J., David, B. und Blank, U. (1997). Involvement of the ras-like GTPase rab3d in RBL-2H3 mast cell exocytosis following stimulation via high affinity IgE receptors (Fc epsilonRI). *J Immunol* 159, 2815-23.
- Robinson, P. J., Sontag, J. M., Liu, J. P., Fykse, E. M., Slaughter, C., McMahon, H. und Südhof, T. C. (1993). Dynamin GTPase regulated by protein kinase C phosphorylation in nerve terminals. *Nature* 365, 163-6.
- Roghani, A., Feldman, J., Kohan, S. A., Shirzadi, A., Gundersen, C. B., Brecha, N. und Edwards, R. H. (1994). Molecular cloning of a putative vesicular transporter for acetylcholine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10620-4.
- Rosahl, T. W., Geppert, M., Spillane, D., Herz, J., Hammer, R. E., Malenka, R. C. und Südhof, T. C. (1993). Short-term synaptic plasticity is altered in mice lacking synapsin I. *Cell* 75, 661-70.
- Rosahl, T. W., Spillane, D., Missler, M., Herz, J., Selig, D. K., Wolff, J. R., Hammer, R. E., Malenka, R. C. und Südhof, T. C. (1995). Essential functions of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation. *Nature* 375, 488-93.

- Rosenmund, C., Clements, J. D. und Westbrook, G. L. (1993). Nonuniform probability of glutamate release at a hippocampal synapse. *Science* 262, 754-7.
- Rosenmund, C. und Stevens, C. F. (1996). Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron* 16, 1197-207.
- Rothman, J. E. (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372, 55-63.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-91.
- Salin, P. A., Malenka, R. C. und Nicoll, R. A. (1996). Cyclic AMP mediates a presynaptic form of LTP at cerebellar parallel fiber synapses. *Neuron* 16, 797-803.
- Salminen, A. und Novick, P. J. (1987). A ras-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion. *Cell* 49, 527-38.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-7.
- Schimmöller, F., Simon, I. und Pfeffer, S. R. (1998). Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J Biol Chem* 273, 22161-4.
- Schlüter, O. M., Schnell, E., Verhage, M., Tzonopoulos, T., Nicoll, R. A., Janz, R., Malenka, R. C., Geppert, M. und Südhof, T. C. (1999). Rabphilin knock-out mice reveal that rabphilin is not required for rab3 function in regulating neurotransmitter release. *J Neurosci* 19, 5834-46.
- Shirataki, H., Kaibuchi, K., Sakoda, T., Kishida, S., Yamaguchi, T., Wada, K., Miyazaki, M. und Takai, Y. (1993). Rabphilin-3A, a putative target protein for smg p25A/rab3A p25 small GTP-binding protein related to synaptotagmin. *Mol Cell Biol* 13, 2061-8.
- Shirataki, H., Yamamoto, T., Hagi, S., Miura, H., Oishi, H., Jin-no, Y., Senbonmatsu, T. und Takai, Y. (1994). Rabphilin-3A is associated with synaptic vesicles through a vesicle protein in a manner independent of Rab3A. *J Biol Chem* 269, 32717-20.
- Shisheva, A., Südhof, T. C. und Czech, M. P. (1994). Cloning, characterization und expression of a novel GDP dissociation inhibitor isoform from skeletal muscle. *Mol Cell Biol* 14, 3459-68.
- Simons, K. und Zerial, M. (1993). Rab proteins and the road maps for intracellular transport. *Neuron* 11, 789-99.
- Söllner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. und Rothman, J. E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362, 318-24.
- Song, J. Y., Ichtchenko, K., Südhof, T. C. und Brose, N. (1999). Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1100-5.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-17.

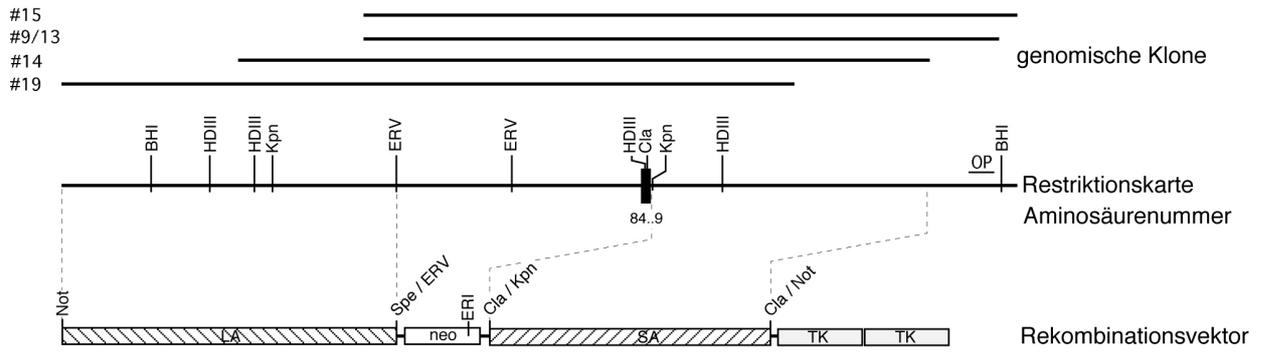
- Stahl, B., Chou, J. H., Li, C., Südhof, T. C. und Jahn, R. (1996). Rab3 reversibly recruits rabphilin to synaptic vesicles by a mechanism analogous to raf recruitment by ras. *Embo J* 15, 1799-809.
- Stevens, T. H. und Forgac, M. (1997). Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 779-808.
- Südhof, T. C. (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375, 645-53.
- Südhof, T. C. und Rizo, J. (1996). Synaptotagmins: C2-domain proteins that regulate membrane traffic. *Neuron* 17, 379-88.
- Sunshine, C., Francis, S. und Kirk, K. L. (2000). Rab3B regulates ZO-1 targeting and actin organization in PC12 neuroendocrine cells. *Exp Cell Res* 257, 1-10.
- Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R. und Brünger, A. T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395, 347-53.
- Takahashi, T., Hori, T., Kajikawa, Y. und Tsujimoto, T. (2000). The role of GTP-binding protein activity in fast central synaptic transmission. *Science* 289, 460-3.
- Tasaka, K., Masumoto, N., Mizuki, J., Ikebuchi, Y., Ohmichi, M., Kurachi, H., Miyake, A. und Murata, Y. (1998). Rab3B is essential for GnRH-induced gonadotrophin release from anterior pituitary cells. *J Endocrinol* 157, 267-74.
- Takamori, S., Rhee, J. S., Rosenmund, C. und Jahn, R. (2000). Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* 407, 189-94.
- Terrian, D. M. und White, M. K. (1997). Phylogenetic analysis of membrane trafficking proteins: a family reunion and secondary structure predictions. *Eur J Cell Biol* 73, 198-204.
- tom Dieck, S., Sanmarti-Vila, L., Langnaese, K., Richter, K., Kindler, S., Soyke, A., Wex, H., Smalla, K. H., Kampf, U., Franzer, J. T., Stumm, M., Garner, C. C. und Gundelfinger, E. D. (1998). Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. *J Cell Biol* 142, 499-509.
- Touchot, N., Chardin, P. und Tavitian, A. (1987). Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 8210-4.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4.
- Tuvim, M. J., Adachi, R., Chocano, J. F., Moore, R. H., Lampert, R. M., Zera, E., Romero, E., Knoll, B. J. und Dickey, B. F. (1999). Rab3D, a small GTPase, is localized on mast cell secretory granules and translocates to the plasma membrane upon exocytosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20, 79-89.
- Ubach, J., Garcia, J., Nittler, M. P., Südhof, T. C. und Rizo, J. (1999). Structure of the Janus-faced C2B domain of rabphilin. *Nat Cell Biol* 1, 106-12.

- Ullrich, O., Stenmark, H., Alexandrov, K., Huber, L. A., Kaibuchi, K., Sasaki, T., Takai, Y. und Zerial, M. (1993). Rab GDP dissociation inhibitor as a general regulator for the membrane association of rab proteins. *J Biol Chem* 268, 18143-50.
- Ungermann, C., Sato, K. und Wickner, W. (1998). Defining the functions of trans-SNARE pairs. *Nature* 396, 543-8.
- Valentijn, J. A., Sengupta, D., Gumkowski, F. D., Tang, L. H., Konieczko, E. M. und Jamieson, J. D. (1996). Rab3D localizes to secretory granules in rat pancreatic acinar cells. *Eur J Cell Biol* 70, 33-41.
- Verhage, M., de Vries, K. J., Roshol, H., Burbach, J. P., Gispen, W. H. und Südhof, T. C. (1997). DOC2 proteins in rat brain: complementary distribution and proposed function as vesicular adapter proteins in early stages of secretion. *Neuron* 18, 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. und Südhof, T. C. (2000). Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* 287, 864-9.
- von Gersdorff, H. und Matthews, G. (1999). Electrophysiology of synaptic vesicle cycling. *Annu Rev Physiol* 61, 725-52.
- Wada, M., Nakanishi, H., Satoh, A., Hirano, H., Obaishi, H., Matsuura, Y. und Takai, Y. (1997). Isolation and characterization of a GDP/GTP exchange protein specific for the Rab3 subfamily small G proteins. *J Biol Chem* 272, 3875-8.
- Walworth, N. C., Goud, B., Kabacoff, A. K. und Novick, P. J. (1989). Mutational analysis of SEC4 suggests a cyclical mechanism for the regulation of vesicular traffic. *Embo J* 8, 1685-93.
- Wang, X., Kibschull, M., Laue, M. M., Lichte, B., Petrasch-Parwez, E. und Kilimann, M. W. (1999). Aczonin, a 550-kD putative scaffolding protein of presynaptic active zones, shares homology regions with Rim and Bassoon and binds profilin. *J Cell Biol* 147, 151-62.
- Wang, Y., Okamoto, M., Schmitz, F., Hofmann, K. und Südhof, T. C. (1997). Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature* 388, 593-8.
- Wang, Y., Sugita, S. und Südhof, T. C. (2000). The RIM/NIM family of neuronal C2 domain proteins. Interactions with Rab3 and a new class of Src homology 3 domain proteins. *J Biol Chem* 275, 20033-44.
- Weber, E., Berta, G., Tousson, A., St John, P., Green, M. W., Gopalokrishnan, U., Jilling, T., Sorscher, E. J., Elton, T. S., Abrahamson, D. R. und et al. (1994). Expression and polarized targeting of a rab3 isoform in epithelial cells. *J Cell Biol* 125, 583-94.
- Weber, E., Jilling, T. und Kirk, K. L. (1996). Distinct functional properties of Rab3A and Rab3B in PC12 neuroendocrine cells. *J Biol Chem* 271, 6963-71.
- Weber, T., Zemelman, B. V., McNew, J. A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Sollner, T. H. und Rothman, J. E. (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92, 759-72.

- Weimbs, T., Low, S. H., Chapin, S. J., Mostov, K. E., Bucher, P. und Hofmann, K. (1997). A conserved domain is present in different families of vesicular fusion proteins: a new superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3046-51.
- Weimbs, T., Mostov, K., Low, S. H. und Hofmann, K. (1998). A model for structural similarity between different SNARE complexes based on sequence relationships. *Trends Cell Biol* 8, 260-2.
- Weisskopf, M. G., Castillo, P. E., Zalutsky, R. A. und Nicoll, R. A. (1994). Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by cyclic AMP. *Science* 265, 1878-82.
- Xu, T., Rammner, B., Margittai, M., Artalejo, A. R., Neher, E. und Jahn, R. (1999). Inhibition of SNARE complex assembly differentially affects kinetic components of exocytosis. *Cell* 99, 713-22.
- Xu, X. Z., Wes, P. D., Chen, H., Li, H. S., Yu, M., Morgan, S., Liu, Y. und Montell, C. (1998). Retinal targets for calmodulin include proteins implicated in synaptic transmission. *J Biol Chem* 273, 31297-307.
- Zhang, J. Z., Davletov, B. A., Südhof T. C. und Anderson, R. G. (1994). Synaptotagmin I is a high affinity receptor for clathrin AP-2: implications for membrane recycling. *Cell* 78, 751-60.
- Zheng, J. Y., Koda, T., Fujiwara, T., Kishi, M., Ikehara, Y. und Kakinuma, M. (1998). A novel Rab GTPase, Rab33B, is ubiquitously expressed and localized to the medial Golgi cisternae. *J Cell Sci* 111, 1061-9.
- Zucker, R. S. (1989). Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 12, 13-31.

9 Anhang

A



B

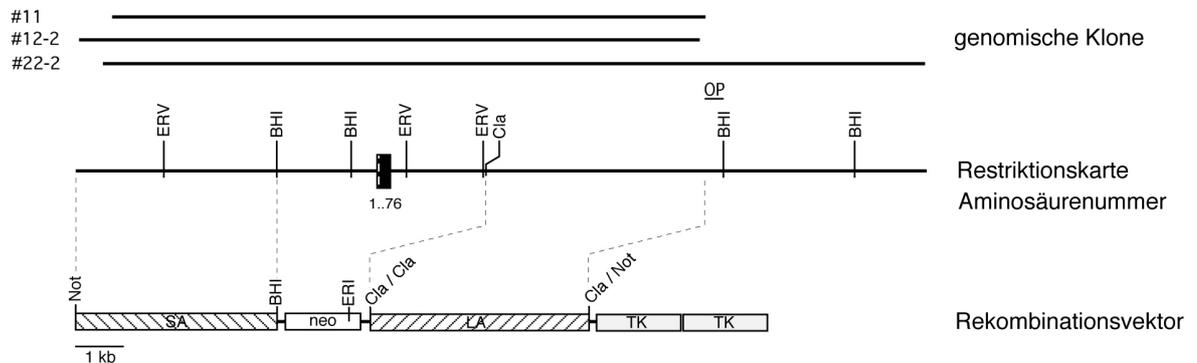


Abb. A: Darstellung der Strukturen eines Anteils der murinen Rab3C- (A) und Rab3D-Gene (B, *genbank* AF263366) und der Rekombinationsstrategien für die Erzeugung von Rab3C- und Rab3D-Nullmutanten. Aus der Analyse der genomischen Klone wurden die Restriktionskarten erstellt. In diese sind die Erkennungsstellen von Restriktionsenzymen (BHI: *Bam*HI; Cla: *Cl*aI; ERI: *Eco*RI; ERV: *Eco*RV; HDIII: *Hin*DIII; Kpn: *Kpn*I; Not: *Not*I; Spe: *Spe*I), sowie die Positionen des ersten codierenden Exons (Rab3D, schwarzes Kästchen) und zweiten codierenden Exons (Rab3C, schwarzes Kästchen) mit den entsprechenden Aminosäurenummern (Mitte) und der Sonde zur Detektion der homologen Rekombination (OP) eingezeichnet. Im Rekombinationsvektor sind die eingefügten genomischen Sequenzen als gestreifte Kästchen (LA und SA) und die Selektionsmarker (neo: Neomycinresistenz-Expressionskassette, TK: Thymidin-Kinase) als offene Kästchen dargestellt. Der Bereich um das zweite codierende Exon des Rab3C-Gens wurde sequenziert. Durch die homologe Rekombination wird das Exon, das für die Aminosäuren 1 bis 76 (Rab3D) bzw. 9 bis 84 (Rab3C) codiert, und flankierende Bereiche jeweils durch ein Neomycinresistenzgen ersetzt.

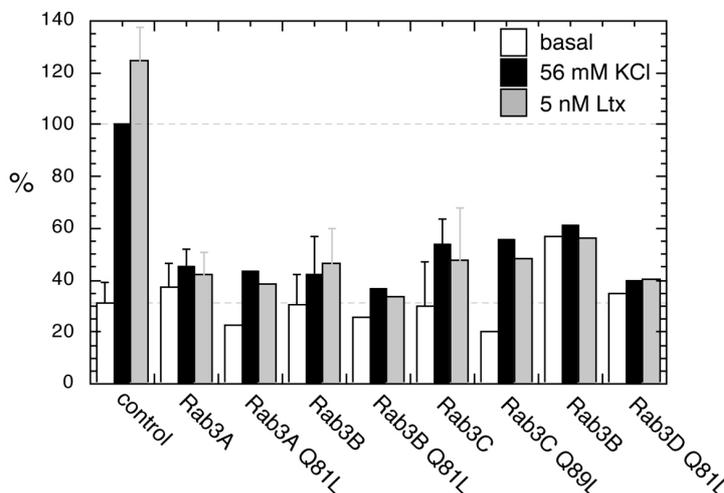


Abb. B: Die Sekretion von humanem Wachstumshormon in PC12-Zellen wurde unter basalen Bedingungen und unter Stimulationsbedingungen durch 56 mM KCl oder 5 nM α -Latrotoxin gemessen. Der inhibierende Effekt von cotransfizierten Rab3-Isoformen (zwei unabhängige Experimente) und konstitutiv GTP-bindenden Rab3-Mutanten (ein Experiment) wurde 6 Tage nach Transfektion bestimmt. Werte wurden als Doppelbestimmung ermittelt und als Mittelwert \pm Standardabweichung zweier unabhängiger Experimente dargestellt. Die Normierung erfolgte relativ zur KCl-stimulierten Sekretion von Control-Zellen, die mit dem Expressionsvektor pcDNA3 transfiziert wurden. (Experimente von Dr. M. Khvotchev, Dallas, USA durchgeführt).

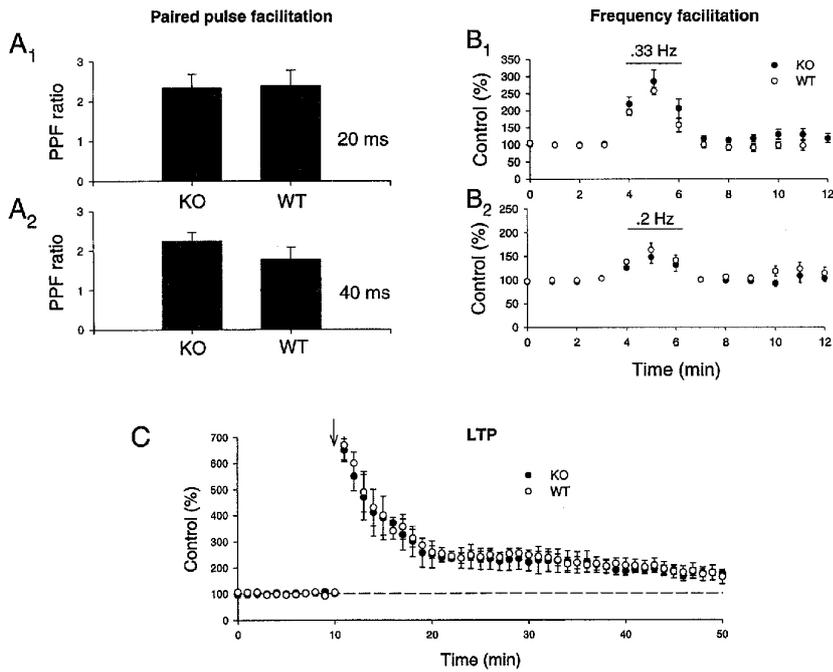


Abb. C: Die Kurzzeit synaptische Plastizität und LTP waren in den Moosfaserterminalen in der hippocampalen CA3-Region in Rabphilin-Nullmutanten unverändert. A₁, A₂: Größe der PPF bei 20 ms (A₁) und 40 ms (A₂) dauernden Interstimulusintervallen in Wildtyp-Mäusen (WT) und Rabphilin-Nullmutanten (KO). B₁, B₂: *frequency facilitation* induziert durch steigende Stimulationsraten von 0,1 bis 0,33 Hz (B₁) oder 0,2 Hz (B₂) in Wildtyp-Mäusen und Rabphilin-Nullmutanten. C: Induzierung der LTP durch einen 5 sekündigen 25 Hz Tetanus (Pfeil) in Wildtyp-Mäusen und Rabphilin-Nullmutanten.

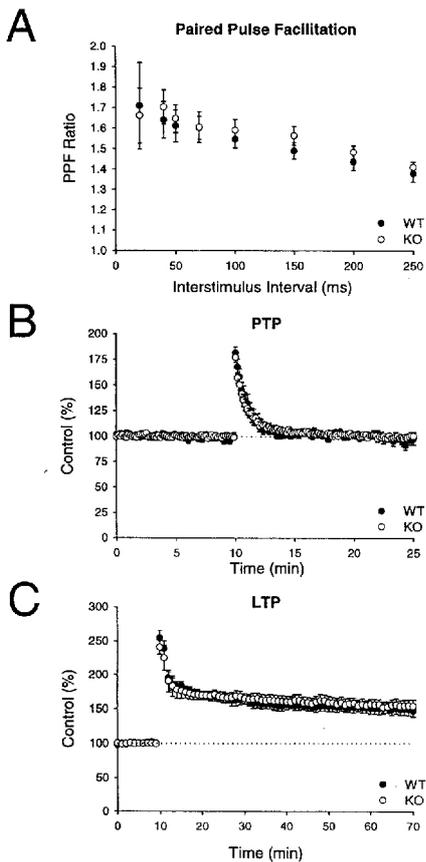


Abb. D: Die Kurzzeit-synaptische Plastizität und LTP waren in excitatorischen Synapsen der hippocampalen CA1-Region in Rabphilin-Nullmutanten unverändert. A: PPF als Funktion der Interstimulusintervalllänge in Wildtyp-Mäusen und Rabphilin-Nullmutanten. B: Der Zeitverlauf der post-tetanischen Potenzierung ausgelöst durch einen einsekündigen 100 Hz Tetanus in Wildtyp-Mäusen und Rabphilin-Nullmutanten. C: Induzierung der LTP durch drei einsekündige 100 Hz Tetani in Wildtyp-Mäusen und Rabphilin-Nullmutanten.

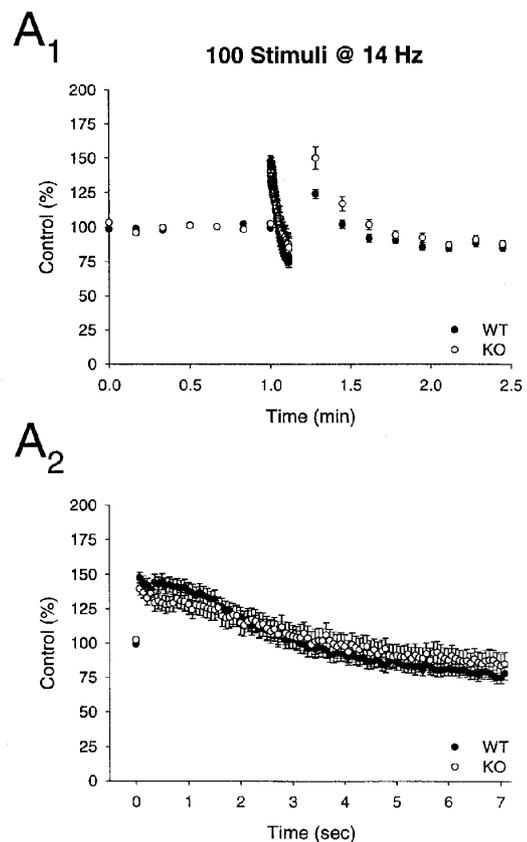


Abb. E: Die synaptische Depression ist in excitatorischen Synapsen der hippocampalen CA1-Region von Rabphilin-Nullmutanten unverändert. Der Zeitverlauf der Effekte einer Stimulationsfolge (100 Stimuli mit 14 Hz) ist in langer (A₁) und kurzer (A₂) Zeitskalierung für Wildtyp-Mäuse (WT) und Rabphilin-Nullmutanten (KO) gezeigt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Schlüter, O. M., Schnell, E., Verhage, M., Tzonopoulos, T., Nicoll, R. A., Janz, R., Malenka, R. C., Geppert, M. und Südhof, T. C. (1999). Rabphilin knock-out mice reveal that rabphilin is not required for rab3 function in regulating neurotransmitter release. *J Neurosci* 19, 5834-46.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Desweiteren versichere ich an Eides statt, daß die vorliegende Arbeit nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Göttingen, den 25.10.2000