

Proteomanalyse synaptischer Vesikel und Charakterisierung neuer Proteine

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Jacqueline Burré
aus Darmstadt

Frankfurt 2006

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:	Prof. Dr. H. Schwalbe
Gutachter:	Prof. Dr. W. Volknandt
	Prof. Dr. B. Ludwig
Datum der Disputation:	06. Oktober 2006

INHALT

1	EINLEITUNG	5
1.1	Synaptische Transmission	5
1.2	Synaptische Vesikel und Vesikelpopulationen	5
1.3	Eintransport der Neurotransmitter	7
1.4	Regulierte Exozytose	7
1.5	Membranfusion	8
1.6	Endozytose	9
1.7	Proteine und Strukturen synaptischer Vesikel	9
1.7.1	SNARE-Proteine.....	10
1.7.2	SM-Proteine.....	11
1.7.2.1	Munc13.....	11
1.7.2.2	Munc18.....	12
1.7.3	Complexine.....	12
1.7.4	Synaptotagmin.....	12
1.7.5	Synaptophysin.....	13
1.7.6	Rab-Proteine.....	14
1.7.7	NSF.....	15
1.7.8	Exozystenkomplex.....	15
1.7.9	Zytoskelettmatrix an der aktiven Zone (CAZ).....	15
1.8	Membrane Proteomics	16
1.9	Zielsetzung der Arbeit	17
2	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	Präparation synaptischer Vesikel aus dem Gehirn der Ratte	18
2.1.1	Standardpräparation.....	18
2.1.2	Präparation zur Analyse funktioneller Proteinmodifikationen.....	19
2.2	Immunreinigung synaptischer Vesikel	19
2.2.1	Versuchsbedingungen.....	19
2.2.2	Immunreinigung über SV2.....	20
2.2.3	Immunreinigung über vGat und vGlut1.....	21

2.2.4	Kontrollen.....	21
2.3	Elektrophorese.....	21
2.3.1	Gelelektrophoretische Systeme.....	21
2.3.2	SDS-PAGE.....	21
2.3.3	Tris-Acetat-PAGE.....	22
2.3.4	Isoelektrische Fokussierung / SDS-PAGE.....	22
2.3.5	BAC / SDS-PAGE.....	23
2.3.6	dSDS-PAGE.....	24
2.4	Methoden zur Anfärbung von Proteinen.....	26
2.4.1	Silberfärbung nach Koepsell <i>et al.</i>	27
2.4.2	Silberfärbung nach Shevchenko <i>et al.</i>	28
2.4.3	Silberfärbung nach Rais <i>et al.</i>	28
2.4.4	Coomassie Brilliant Blue-Färbung.....	28
2.4.5	Kolloidale Coomassie Brilliant Blue-Färbung.....	28
2.5	Immunassays.....	29
2.5.1	Dot Blot.....	29
2.5.2	Western Blot.....	29
2.5.3	Detektion per Chemilumineszenz.....	30
2.6	Färbetechniken für Nitrozellulosemembranen.....	30
2.6.1	Ponceau S.....	31
2.6.2	India Ink.....	31
2.6.3	Silber.....	31
2.7	Dephosphorylierung.....	31
2.8	Phasentrennungen und Fraktionierungstechniken.....	31
2.8.1	Phasentrennung mit Triton X-114.....	32
2.8.2	ProteoPrep Universal Extraction Kit.....	33
2.8.3	ProteoPrep Membrane Extraction Kit.....	33
2.8.4	Phasentrennung mit Digitonin und PEG-6000.....	34
2.8.5	Phasentrennung mit Methanol und Chloroform.....	34
2.8.6	Phasentrennung mit PEG-40000 und Dodecylmaltosid in Anwesenheit von SDS.....	35
2.8.7	Phasentrennung mit PEG-6000 und NP-40 mit/ohne SDS.....	36
2.8.8	Phasentrennung mit PEG-40000 und NP-40.....	36

2.9	Techniken zur Konzentrierung von Proteinen.....	36
2.9.1	Präzipitation mit Trichloressigsäure	36
2.9.2	Aceton-Präzipitation	36
2.9.3	Ethanol- Präzipitation	37
2.9.4	Methanol/Chloroform- Präzipitation	37
2.9.5	Vakuumzentrifuge	37
2.9.6	Ultrazentrifugation.....	37
2.10	Proteinquantifizierungen	37
2.10.1	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Spector	37
2.10.2	Photometrische Quantifizierung von Western Blots.....	38
2.10.2.1	Quantifizierung über fluoreszenzgekoppelte Zweitantikörper	38
2.10.2.2	Quantifizierung über Kodak V 1.0.....	39
2.11	Difference gel electrophoresis (DIGE)	39
2.11.1	Versuchsdesign	39
2.11.2	Vorbereitung der CyDyes	40
2.11.3	Markierung	40
2.11.4	Elektrophorese	41
2.11.5	Analyse	41
2.11.5.1	Scan und statistische Auswertung.....	41
2.11.5.2	Anfärbung und Massenspektrometrie	42
2.12	Massenspektrometrie.....	42
2.12.1	Grundlagen	42
2.12.2	Keratinfreies Arbeiten.....	43
2.12.3	Verdau in Lösung.....	43
2.12.4	Probenvorbereitung für den Verdau im Gel.....	44
2.12.5	Proteinverdau im Gel	44
2.12.6	Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry	45
2.12.7	Nanoscale-liquid chromatography electrospray ionization-tandem mass spectrometry	45
2.13	Arbeiten mit Bakterien.....	46
2.13.1	Steriles Arbeiten	46
2.13.2	Nährmedien.....	46
2.13.3	Anzucht von Bakterien	47
2.13.3.1	Animpfen von Flüssigkulturen	47
2.13.3.2	Ausplattieren von Flüssigkulturen	47
2.13.3.3	Vereinzelungsausstrich	47

2.13.4	Anlegen von Dauerkulturen.....	47
2.13.5	Herstellung elektrokompetenter Zellen.....	48
2.13.6	Plasmidpräparation durch alkalische Lyse.....	48
2.13.7	Konzentrationsbestimmung	48
2.13.8	Polymerase-Kettenreaktion.....	49
2.13.9	Präzipitation von DNA	50
2.13.10	Restriktion.....	50
2.13.11	Agarose-Gelelektrophorese	51
2.13.12	DNA-Isolation aus Agarosegelen	51
2.13.13	Ligation.....	52
2.13.14	Transformation.....	52
2.13.15	Sequenzierung.....	53
2.14	Arbeiten mit eukaryontischen Zellen.....	53
2.14.1	Steriles Arbeiten	53
2.14.2	Medien	53
2.14.3	Zelllinien.....	53
2.14.3.1	CHO-Zellen	53
2.14.3.2	PC12-Zellen.....	54
2.14.4	Kultivierung.....	54
2.14.5	Passagieren	54
2.14.6	Transfektion über Elektroporation.....	55
2.14.7	Transfektion mit Dreamfect.....	55
2.14.8	Zellzahlbestimmung.....	55
2.14.9	Anlegen von Dauerkulturen.....	56
2.15	Membranfraktion	56
2.16	Immunzytochemie.....	57
2.16.1	Beschichten von Deckgläsern	57
2.16.2	Fixierung, Antikörperinkubation und Einbetten	57
2.16.3	Permeabilisierung mit flüssigem Stickstoff.....	57
2.16.4	Dokumentation.....	58
2.17	Immunhistochemie.....	58
2.17.1	Beschichten von Objektträgern.....	58
2.17.2	Perfusion	58
2.17.3	Einbetten.....	59
2.17.4	Anfertigung von Gefrierschnitten.....	59

2.17.5	Antikörperinkubation.....	59
2.18	Arbeiten mit RNA	60
2.18.1	Präparation von RNA aus frischem Gewebe	60
2.18.2	Konzentrationsbestimmung	61
2.18.3	Reinigung der RNA	61
2.18.4	RT-PCR	62
2.18.5	Denaturierende RNA-Gelelektrophorese.....	63
2.19	Materialien	64
2.19.1	Chemikalien.....	64
2.19.2	Kits.....	65
2.19.3	Tiere und Zellen.....	65
2.19.4	Plasmide.....	65
2.19.5	Oligonukleotide	65
2.19.6	Antikörper.....	66
2.19.7	Anderes Zubehör und Geräte	68
2.19.8	Datenbanken & Programme.....	69
3	ERGEBNISSE	71
3.1	Analyse des Saccharosegradienten.....	71
3.1.1	Abbé-Refraktometer	71
3.1.2	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	72
3.1.3	Proteinverteilung über den Saccharosegradienten.....	72
3.1.4	Reproduzierbarkeit der Präparation	73
3.1.5	Immunanalysen über Western Blot und Dot Blot.....	74
3.1.6	Quantifizierungsstudien	80
3.2	Immunreinigung synaptischer Vesikel	89
3.2.1	Optimierung der Immunreinigung	89
3.2.2	Kontrollen	91
3.2.3	Vesikelpopulationen	92
3.2.4	Analyse der ungebundenen Probe und der abgelösten Proteine	93
3.2.5	Färbetechniken für Nitrozellulosemembranen.....	94
3.2.6	IEF/SDS-PAGE	95
3.2.7	BAC/SDS-PAGE.....	97
3.2.8	dSDS-PAGE	100

3.2.9	Subpopulationsanalyse.....	103
3.2.9.1	Analyse des Gesamtproteinmusters.....	103
3.2.9.2	Immunanalysen.....	103
3.3	An-/Abreicherungsanalysen.....	104
3.3.1	Überblick der Proteinkomplexität.....	104
3.3.2	Western Blot Analysen.....	105
3.3.3	Quantifizierung der Immunanalysen.....	110
3.4	Phasentrennungen und andere Separationstechniken	117
3.4.1	Triton X-114.....	117
3.4.2	Phasenseparation mit Chloroform und Methanol	119
3.4.2.1	Mischungsverhältnis 1:1.....	119
3.4.2.2	Verschiedene Mischungsverhältnisse	120
3.4.3	ProteoPrep Universal Extraction Kit	123
3.4.4	ProteoPrep Membrane Extraction Kit.....	124
3.4.5	Phasenseparation mit Digitonin und PEG-6000	124
3.4.6	Phasentrennung mit Dodecylmaltosid und PEG-6000 in Anwesenheit von SDS	125
3.4.7	Phasentrennung mit NP-40 und PEG-6000 bei pH 7,4.....	125
3.4.8	Phasentrennung mit NP-40 und PEG-6000 in Anwesenheit von SDS bei pH 9	126
3.4.9	Phasentrennung mit NP-40 und PEG-6000 in Anwesenheit von SDS bei pH 10	126
3.5	Massenspektrometrie.....	127
3.5.1	Techniken zur Proteinkonzentrierung.....	127
3.5.2	Einfluß von Färbemethoden.....	129
3.5.3	Verdau in Lösung.....	131
3.5.4	BAC/SDS-PAGE.....	131
3.5.5	dSDS-PAGE	133
3.5.6	Eindimensionale SDS-PAGE	137
3.5.7	Auflösung der eindimensionalen Elektrophorese	141
3.5.8	Vergleich der drei gelbasierenden Systeme.....	144
3.5.9	Einteilung identifizierter Proteine nach Funktion und Lokalisation.....	144
3.5.10	Vor- und Nachteile der angewandten Systeme.....	145
3.5.11	Hydrophobizitätsplot	146
3.5.12	Verteilung identifizierter Proteine nach molekularer Masse	147
3.5.13	Verteilung identifizierter Proteine nach isoelektrischem Punkt	148
3.6	Difference Gel Electrophoresis.....	148
3.6.1	Evaluation der Präparationen.....	148

3.6.2	DIGE-Analyse	149
3.6.3	Analyse der Phosphorylierung.....	152
3.7	Charakterisierung neuer Proteine.....	154
3.7.1	Svap30	154
3.7.1.1	Klonierung	155
3.7.1.2	Immunzytochemie	158
3.7.1.3	Membranassoziation	164
3.7.1.4	Gewebespezifität.....	165
3.7.2	SV35	169
3.7.2.2	Immunzytochemie	174
3.7.2.3	Membranassoziation	181
3.7.2.4	Gewebespezifität.....	182
3.8	Charakterisierung neuer Proteine über Peptid-Antikörper	182
3.8.1	Antigenitätsanalyse des Proteins Svap30.....	182
3.8.1.1	Verteilung im Saccharosegradienten	183
3.8.1.2	BAC/SDS-PAGE	183
3.8.1.3	An/Abreicherung	184
3.8.1.4	Membranassoziation	185
3.8.1.5	Immunzytochemie an PC12-Zellen	186
3.8.1.6	Immunhistochemie an Gewebeschnitten	186
3.8.2	Antigenitätsanalyse des Proteins SV35.....	190
3.8.2.1	Verteilung im Saccharosegradienten	190
3.8.2.2	BAC/SDS-PAGE	191
3.8.2.3	An/Abreicherung	192
3.8.2.4	Membranassoziation	192
3.8.2.5	Immunzytochemie an PC12-Zellen	193
3.8.2.6	Immunhistochemie an Gewebeschnitten	193
4	DISKUSSION.....	203
4.1	Evaluation der Analyse des Saccharosegradienten	203
4.2	Evaluation der Analyse der Immunreinigung.....	204
4.3	Analyse von Vesikelsubpopulation.....	206
4.4	Evaluation der Analyse des Präparationsverlaufes	206
4.5	Evaluation der angewandten Phasentrennungen	207

4.6	Massenspektrometrie.....	209
4.6.1	Evaluation der Proteinseparation über verschiedene Elektrophoresetechniken.....	211
4.6.2	Evaluation der Effizienz verschiedener Elektrophoresetechniken.....	212
4.6.3	Identifizierung von Proteinen	213
4.6.3.1	Integrale synaptische Vesikelproteine	213
4.6.3.2	Der SNARE-Komplex	224
4.6.3.3	Rab-Proteine	228
4.6.3.4	Synapsine	234
4.6.3.5	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Kinase II.....	235
4.6.3.6	Septine	236
4.6.3.7	Thy-1.....	238
4.6.3.8	Sarkoglykane	239
4.6.3.9	Endozytose.....	239
4.6.3.10	Zytoskelett	245
4.6.3.11	G-Proteine.....	252
4.6.3.12	Chaperone	256
4.6.3.13	Metabolische Enzyme.....	257
4.6.3.14	Putative Kontaminationen.....	262
4.6.3.15	Putativ neue Proteine	270
4.6.3.16	Vergleich mit anderen Arbeiten.....	273
4.6.3.17	Evaluation der gereinigten Organellen	274
4.7	Stimulation synaptischer Vesikel und Analyse über DIGE	275
4.7.1	Analyse der Qualität der Stimulation.....	275
4.7.2	Detektierte Abundanzänderungen.....	275
4.7.2.1	SNAP-25	276
4.7.2.2	VAMP-2 und Synaptophysin.....	276
4.7.2.3	VAMP-2, Synaptophysin und vATPase V ₀ d	277
4.7.2.4	Rab-Proteine und Dynein.....	278
4.7.2.5	Svap30	279
4.7.2.6	Weitere Proteine	279
4.7.3	Zusammenfassung	279
4.7.4	Evaluation des DIGE-Systems.....	280
4.8	Charakterisierung ausgewählter neuer Vesikelproteine.....	281
4.8.1	Svap30	281
4.8.2	SV35	283
4.9	Ausblick	285

5	ZUSAMMENFASSUNG	286
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	287

Abkürzungen

A	Abb.	Abbildung
	AMP	Adenosinmonophosphat
	AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
	AP	Adaptorprotein
	APS	Ammoniumpersulfat
	ATP	Adenosintriphosphat
B	BAC	Benzyldimethyl-n-Hexadecylammoniumchlorid
	BAPTA-AM	1,2-Bis(2-amino-5-fluorophenoxy)ethan- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure Tetra(acetoxymethyl)ester
	BiP	Bindeprotein
	BNPI	Brain-specific Na ⁺ -dependent inorganic phosphate transporter
C	BSA	Rinderserumalbumin
	CaMK	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase
	CAT	Calcium Transportprotein 1
	CAZ	Cytomatrix at the active zone
	CBB	Coomassie Brilliant Blue
	CCP	Clathrin coated pit
	CCV	Clathrin coated vesicle
	CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat-hydrat
	CHO	Chinese hamster ovary
	CIAP	Calf intestine alkaline phosphates
	D	DABCO
DAPI		4',6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid
DDM		<i>N</i> -Dodecyl- β -D-Maltosid
DEAE		Diethylaminoethyl
DEPC		Diethylpyrocarbonat
DIGE		Difference gel electrophoresis
DMEM		Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF		<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO		Dimethylsulfoxid
DNA		Desoxyribonukleinsäure

	DNPI	Differentiation-associated BNPI
	dNTP	Desoxyribonukleotid
	DOC	3 α ,12 α -Dihydroxy-5 β -cholansäure
	dSDS	Double SDS
	DTT	Dithiothreitol
E	EAAC1	Excitatory amino acid carrier 1
	ECL	Enhanced chemiluminescence
	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
	EGTA	Ethylenglykol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure
	ESI	Electrospray ionization
F	FCS	Fötale Kälberserum
G	GABA	γ -Aminobuttersäure
	GAP	GTPase-activating protein
	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
	GAT	GABA-Transporter
	GDI	Guanine nucleotide dissociation inhibitor
	GDP	Guanosindiphosphat
	GEF	Guanine nucleotide exchange factor
	GFAP	Glial fibrillary acidic protein
	GK	Guanylat-Kinase
	Gravy	Grand average of hydrophobicity index
	GTP	Guanosintriphosphat
H	HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
	HRP	Meerrettich-Peroxidase (horse raddish peroxidase)
I	IAA	Iodacetamid
	IEF	Isoelektrische Fokussierung
	Ig	Immunglobulin
L	LAMP	Lysosome-associated membrane protein
	LB	Luria-Bertani
	LC	Liquid chromatography
	LTP	Long term potentiation
M	MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
	MAPK	Mitogen-activated protein kinase

	MilliQ	Reinstwasser
	MLCK	Myosin light chain kinase
	MMP	Magermilchpulver
	MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
	mRNA	Messenger RNA
	MS	Massenspektrometrie
N	NGF	Nerve growth factor
	NP-40	Nonidet [®] P40, Nonylphenyl-polyethylenglykol
	NSF	N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein
O	OD	Optische Dichte
P	PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
	PBS	Phosphate buffered saline
	PC12	Pheochromocytoma cells 12
	PCR	Polymerase Kettenreaktion
	PEG	Polyethylenglykol
	PH-Domäne	Pleckstrin Homologie-Domäne
	PI	Proteaseinhibitor
	PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
	PKA	cAMP dependent protein kinase
	PKC	Protein Kinase C
	PMP70	Peroxisomal membrane protein of 70 kDa
	PRA1	Prenylated rab acceptor 1
	PSD	Postsynaptic density
	PVP40	Polyvinylpyrrolidin
R	RIM	Rab-interacting molecule
	RIM-BP	RIM Bindeprotein
	RNA	Ribonukleinsäure
	RRP	Readily releasable pool
	RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
S	SAP	Synapse-associated protein
	SCAMP	Secretory carrier-associated membrane protein
	SDS	Natriumdodecylsulfat
	SM-Protein	Sec1/Munc18-like protein
	SNAP	Soluble NSF attachment protein

	SNAP-25	Synaptosome-associated protein of 25 kD
	SNARE	SNAP receptor
	SV2	Synaptic vesicle protein 2
T	TBS	Tris buffered saline
	TBE	Tris-Borat-EDTA
	TCA	Trichloressigsäure
	TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetraethylendiamin
	TFA	Trifluoressigsäure
	TOF	Time of flight
	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
	Tween [®] 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
V	vAChT	Vesikulärer Acetylcholintransporter
	VAMP	Vesicle-associated membrane protein
	VDAC	Voltage-dependent anion channel
	vGat	Vesikulärer GABA-Transporter
	vGlut	Vesikulärer Glutamatttransporter
Z	ZNS	Zentrales Nervensystem
	g	durchschnittliche Zentrifugalbeschleunigung
	bp	Basenpaar
	kDa	Kilodalton
	M	Molar
	A	Ampère
	m	Meter
	U	Unit
	V	Volt
	v/v	Volumen pro Volumen
	w/v	Gewicht pro Volumen

1 EINLEITUNG

1.1 Synaptische Transmission

Die neuronale Kommunikation wird durch die regulierte Freisetzung von Neurotransmittern aus synaptischen Vesikeln vermittelt und liegt nahezu allen Funktionen des Nervensystems zugrunde (Allen *et al.*, 2003). In der präsynaptischen Nervenendigung zirkulieren synaptische Vesikel durch eine Serie von Schritten. Mit Neurotransmitter gefüllte Vesikel sind an spezialisierte Regionen der präsynaptischen Plasmamembran andockt (aktive Zone) (Dresbach *et al.*, 2001). Diese Zone ist sehr präzise mit dem synaptischen Spalt und der Postsynaptischen Verdichtung (PSD) ausgerichtet und bildet den synaptischen Signalkomplex (Peters, 1991). Angedockte Vesikel durchlaufen einen Reifungsprozeß, genannt Priming, und werden fusionskompetent (Klenchov und Martin, 2000). Nach Induktion eines Aktionspotential-getriebenen Ca^{2+} -Einstroms durch spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle in der präsynaptischen Plasmamembran gehen geprimte Vesikel in die Exozytose und entlassen die Neurotransmitter in den synaptischen Spalt, was in der Aktivierung postsynaptischer Rezeptoren resultiert. Nach der Exozytose werden synaptische Vesikelmembranen und Proteinbestandteile von der Plasmamembran durch Endozytose für weitere Exozytoserunden rezirkuliert (Südhof, 2000).

1.2 Synaptische Vesikel und Vesikelpopulationen

Synaptische Vesikel sind sekretorische Organellen präsynaptischer Nervenendigungen mit einem Durchmesser von ca. 45 nm. Sie reichern hohe Konzentrationen an Neurotransmittern an und sezernieren diese durch Fusion mit der präsynaptischen Plasmamembran (Katz, 1969). Die gesamte Vesikelpopulation in Neuronen besteht aus durchschnittlich 200 bis 300 Vesikeln pro aktiver Zone (Schikorski und Stevens, 1997). Je nach Synapsentyp sind fünf bis 20 gedockte synaptische Vesikel an die aktive Zone gebunden. Hunderte Vesikel liegen gehäuft in der Nähe der aktiven Zone. Die Vesikel lassen sich demnach in verschiedene Populationen einteilen, den Readily Releasable Pool (RRP), den Recycling Pool und den Reservepool (Zucker und Regehr, 2002).

Das klassische Modell sieht die Vesikelpools als drei räumlich voneinander getrennte Gruppen. Die Vesikel des RRP (~1%) sind in der aktiven Zone an die präsynaptische Plasmamembran gedockt und geprimt. Daher werden deren Neurotransmitter sehr schnell

nach Stimulation freigesetzt - der RRP wird normalerweise durch 5 bis 15 Stimulationen entleert. Der Recycling Pool (10-15%) ist in geringer Entfernung von der Plasmamembran lokalisiert und durch eine intermediäre Mobilisierungsgeschwindigkeit gekennzeichnet, wird vor dem Reservepool mobilisiert (Rizzoli und Betz, 2005) und ist für die Transmitterfreisetzung bei moderater Stimulation zuständig. Physiologische Stimulationsfrequenzen resultieren in dessen dauerhaftem Rezirkulieren (Richards *et al.*, 2003). Der große Reservepool (80-90%) reagiert langsamer als die beiden anderen Vesikelpopulationen und stellt die Transmitterfreisetzung bei anhaltender Stimulation sicher. Bei moderater Stimulation ist der in deutlichem Abstand von der Plasmamembran befindliche Pool inaktiv. Ein Durchmischen zwischen RRP und dem Recycling Pool erfolgt relativ schnell, während Recycling und Reservepool nur sehr langsam Vesikel austauschen. Neuere Studien legen nahe, daß gedockte Vesikel nicht mit dem RRP korrespondieren (Rizzoli und Betz, 2004), sondern daß Vesikel in die Exozytose eintreten, die in einiger Entfernung von der Plasmamembran liegen. Eine räumliche Einteilung der Vesikel in verschiedene Populationen ist demnach nicht möglich. Vielmehr liegen alle Vesikel durchmischelt in einem Pool vor, aus dem bestimmte Vesikel für die Fusion bevorzugt werden. Dies könnte durch einen selektiven Vesikelkäfig entstehen, der die Mobilität einiger Vesikel einschränkt und anderen bei Stimulation die freie Bewegung zur Plasmamembran erlaubt (Rizzoli und Betz, 2005). Dieser Käfig könnte aus Aktin und Synapsin bestehen. Dies geht konform mit Beobachtungen, daß die eingeschränkte Beweglichkeit der Vesikel durch Phosphorylierung und Reorganisation des Aktinzytoskeletts moduliert werden kann (Jordan *et al.*, 2005). Eine weitere Möglichkeit liegt in einer molekularen Diversität der synaptischen Vesikel. Für diese Heterogenität gibt es Hinweise (Duncan *et al.*, 2003; Sara *et al.*, 2005).

Gereinigte synaptische Vesikel besitzen ein Protein/Phospholipid-Verhältnis von 1:3 (Lipidzusammensetzung: 40% Phosphatidylcholin, 32% Phosphatidylethanolamin, 12% Phosphatidylserin, 5% Phosphatidylinositol, 10% Cholesterin (Benfenati *et al.*, 1989b)). Die Organellen enthalten zwei Klassen obligatorischer Komponenten: Transporter für den Neurotransmitterimport und Proteine, die in die Exo- und Endozytose involviert sind. Letztere beinhalten intrinsische Membranproteine, über posttranslationale Lipidmodifikationen assoziierte Proteine und peripher gebundene Proteine (Südhof, 2004). Viele der bekannten Proteine synaptischer Vesikel interagieren mit Proteinen vesikulären und nicht vesikulären Ursprungs.

1.3 Eintransport der Neurotransmitter

Synaptische Vesikel akkumulieren und speichern Neurotransmitter in hoher Konzentration durch aktiven Transport, getrieben durch eine vakuoläre Protonenpumpe, deren Aktivität einen elektrochemischen Gradienten über die Vesikelmembran generiert (Maycox *et al.*, 1988). Die vATPase ist ein großer Multiproteinkomplex (~1 Mio. Da), der mindestens 13 Untereinheiten enthält und etwa 10% des Vesikelvolumens füllt. Sie besteht aus einem großen peripheren V₁-Teil, der die ATPase-Aktivität enthält, und einem integralen V₀-Teil, durch den die Protonen gepumpt werden (Forgac, 1999). Die Aufnahme der Neurotransmitter wird durch nur sieben verschiedene Transporter gewährleistet, wobei für einige Neurotransmitter Isoformen von Transportern beschrieben sind. Glutamat wird durch drei Transporter in synaptische Vesikel importiert (Fremeau *et al.*, 2002; Gras *et al.*, 2002), die Monoamine werden durch zwei Transporter aufgenommen (Erickson *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1992). Transporter für GABA und Glycin (Sagne *et al.*, 1997) sowie für Acetylcholin (Roghani *et al.*, 1994; Varoqui *et al.*, 1994) sind ebenfalls identifiziert. Einige Transportaktivitäten hängen ausschließlich vom Membranpotential ab, andere nutzen sowohl die Potentialdifferenz als auch den Protonengradienten (Fykse und Fonnum, 1996). Zwischen Exozytose und Endozytose ist die Pumpe wahrscheinlich deaktiviert, um keine Energie durch Pumpen von Protonen in den synaptischen Spalt zu vergeuden. Die Schnelligkeit der Neurotransmitteraufnahme dürfte aufgrund der geringen Größe der synaptischen Vesikel hoch sein, da nur wenige Protonen und Neurotransmitter nötig sind, um die Vesikel zu füllen (Südhof, 2004).

1.4 Regulierte Exozytose

Die spezifische Fusion synaptischer Vesikel mit der präsynaptischen Plasmamembran wird durch eine Kaskade von Protein-Protein-Interaktionen reguliert. Die Depolarisation der präsynaptischen Nervenendigung durch ein Aktionspotential verursacht den Einstrom extrazellulären Calciums über spannungsgesteuerte Calcium-Kanäle. Dies geschieht in den meisten Synapsen über Ca²⁺-Kanäle des P/Q- (Ca_v2.1) oder N-Typs (Ca_v2.2) (Südhof, 2004). Die lokale Erhöhung intrazellulären Calciums auf 10 bis 100 µM in einer begrenzten Mikrodomäne um geclusterte Ca²⁺-Kanäle wirkt als Trigger für die Exozytose von Neurotransmittern (Augustine, 2001). Es gibt mindestens zwei Zeitkomponenten für die Exozytose: Eine synchrone schnelle Komponente (0,1 bis 5 ms), die 5 bis 25 µM Ca²⁺ benötigt (Goda und Stevens, 1994; Bollmann *et al.*, 2000), und eine asynchrone langsamere Komponente (Alturi und Regehr, 1998), die bei geringeren Ca²⁺-Konzentrationen aktiviert

wird. Die schnelle Komponente dominiert bei geringen, die langsamere Komponente bei hohen Stimulationsfrequenzen (Hagler und Goda, 2001).

Ein Aktionspotential induziert im Mittel innerhalb von 400 μs Calcium-Einstrom und Exozytose (Wölfel und Schneggenburger, 2003). Diese Geschwindigkeit legt nahe, daß Calcium nicht eine komplexe Reaktionskaskade initiiert, sondern lediglich ein Öffnen der Fusionspore einleitet (Südhof, 2004). Zusätzlich werden Moleküle, die als Ca^{2+} -Sensoren arbeiten und Calcium vermutlich schnell, aber wenig affin binden, in der Nähe der Ca^{2+} -Kanäle vermutet, was für die Geschwindigkeit der Fusion essentiell ist.

1.5 Membranfusion

Die Fusion von Vesikeln beinhaltet drei kritische Schritte. Die Membranen müssen in räumliche Nähe gebracht werden, um elektrostatische abstoßende Kräfte zu überwinden, bevor die Lipide der zwei Membranen interagieren können. Anschließend müssen die Grenzen der hydrophilen und hydrophoben Membranteile für die Initiierung der Membranfusion und Öffnung einer wäßrigen Fusionspore destabilisiert werden. Alle Übergangsstadien umfassen Kräfte, die unpolare Oberflächenkontakte mit Wasser minimieren (Jahn *et al.*, 2003). Triebkraft ist der hydrophobe Effekt (Groot und Rabone, 2001).

Intrazelluläre Fusionsmaschinerien sind dynamische supramolekulare Strukturen, die nach Bedarf zusammengebaut und nach der Fusion sofort wieder abgebaut werden, um schnell wiederverwendet werden zu können. Bis auf die membranverankerten SNAREs müssen alle Komponenten aus dem Zytoplasma rekrutiert werden. Einige Proteine sind spezifisch für die Fusionsreaktion bei der Exozytose, andere sind ubiquitär involviert (Jahn *et al.*, 2003).

Nach der Membrananheftung wird die Fusion durch die konzertierte Aktion von SNARE- und SM-Proteinen (Sec1/Munc18-like proteins) initiiert. SNAREs sind Membranproteine, die auf beiden Fusionspartnern vorhanden sind. Bei SM-Proteinen handelt es sich um lösliche Proteine, die häufig mit Syntaxin-ähnlichen SNAREs assoziieren. Während der Einleitung der Fusion finden sich die SNAREs in einem *trans*-Komplex zusammen, der die fusionierenden Membranen verbindet. Diese Reaktion wird möglicherweise durch SM-Proteine kontrolliert. Bei Fusion der Membranen richten sich die SNAREs zu einem *cis*-Komplex aus, der nach der Fusion dissoziiert. Individuelle SNARE-Proteine werden mit ihren angehörigen Membranen rezirkuliert. Neben diesen Schritten sind viele transiente oder stabile Proteinkomplexe und

essentielle Kofaktoren wie rab-Proteine, SM-Proteine und SNAREs involviert (Jahn *et al.*, 2003).

1.6 Endozytose

Nach Öffnung der Fusionspore erfolgt die Endozytose der synaptischen Vesikel, und sie werden vermutlich über drei Wege regeneriert: (a) Synaptische Vesikel werden angesäuert und mit Neurotransmitter befüllt, ohne sich von der Plasmamembran abzulösen (*kiss and stay*) (Pyle *et al.*, 2000a), (b) synaptische Vesikel lösen sich ab, rezirkulieren lokal (*kiss and run*) (Ceccarelli *et al.*, 1973), werden angesäuert und mit Neurotransmitter befüllt, (c) synaptische Vesikel endozytieren über Clathrin Coated Pits, werden angesäuert und mit Neurotransmitter befüllt, entweder direkt oder nach Passage durch ein endosomales Kompartiment (Südhof, 2004). Warum gibt es eine langsamere, über Clathrin Coat-vermittelte Endozytose (> 10 sec (Gersdorff und Matthews, 1994)), wenn die anderen Mechanismen schneller ablaufen (~1 sec) und ebenso effizient sind? Eine Möglichkeit besteht darin, daß die Kapazität für eine schnelle, lokale Wiederverwertung zu gering ist, um ein kontinuierliches Gleichgewicht bei hohen Übertragungsfrequenzen aufrechtzuerhalten. So verläuft der endosomale Weg zwar langsamer, hat aber eine wesentlich höhere Kapazität. Zweitens dienen Endosomen als Sortierstationen, um defekte von funktionsfähigen Vesikeln zu trennen. Dies ist besonders wichtig, wenn die Synapse unter starker Belastung steht (Südhof, 2004). Welche Mechanismen diese verschiedenen Möglichkeiten regulieren, unter welchen Bedingungen die Wege genutzt werden und welche Moleküle verantwortlich sind, wird kontrovers diskutiert.

Obwohl Phosphatidylinositide nur eine geringe Fraktion der Membranphospholipide darstellen, besitzen sie eine Schlüsselfunktion in der Regulation des Membranverkehrs und der Signalereignisse an der Synapse (Cremona und De Camilli, 2001). PIP₂ ist an nahezu allen Clathrin-vermittelten Endozytoseschritten beteiligt. Hierzu zählen die Membranrekrutierung des Clathrin Coats und der Coat-assoziierten Proteine AP2 (Gaidarov und Keen, 1999), AP180 (Ford *et al.*, 2001) und Epsin (Itoh *et al.*, 2001).

1.7 Proteine und Strukturen synaptischer Vesikel

Synaptische Vesikel enthalten eine Vielzahl von Proteinen, die in die regulierte Exozytose involviert sind. Einige davon sind essentiell für den korrekten Ablauf der Neurotransmitterfreisetzung, andere haben Proteinpartner redundanter Funktion oder sind für

die eigentlichen Schritte nicht nötig. Im Folgenden wird auf einige der wichtigen und am besten untersuchten Proteine eingegangen.

1.7.1 SNARE-Proteine

SNAREs bilden eine Superfamilie membranassoziierter Proteine, die durch das SNARE-Motiv, eine etwa 60 Aminosäure lange, α -helikale Coiled-Coil Domäne charakterisiert sind (Rothman, 1994; Jahn und Südhof, 1999). Diese Proteine können entweder in v- und t-SNAREs gemäß ihrer Lage auf dem Vesikel (v-SNARE) oder der Zielmembran (t-SNARE) (Rothman, 1994) oder in R- und Q-SNAREs eingeteilt werden, nach dem konservierten Arginin oder Glutamin im Zentrum des SNARE-Motivs (Fasshauer *et al.*, 1998). Die SNAREs liegen in bestimmten Membrankompartimenten des sekretorischen und endozytotischen Weges vor und haben Anteil an der Spezifität der intrazellulären Membranfusionsprozesse (Jahn und Südhof, 1999; Rizo und Südhof, 2002). So vermitteln nur wenige Paarungen der ca. hundert möglichen, verschiedenen SNARE-Proteinkombinationen die Vesikelfusion. Die meisten anderen Paarungen resultieren in einer ineffizienten oder keiner Fusion (Weber *et al.*, 1998).

Die Exozytose synaptischer Vesikel benötigt drei neuronale SNAREs: VAMP-2, Syntaxin 1 und SNAP-25. VAMP-2 ist ein R- oder v-SNARE und integrales Membranprotein synaptischer Vesikel (Südhof *et al.*, 1989). Bei Syntaxin 1 handelt es sich um ein neuronales Plasmamembran Q- oder t-SNARE, welches als Bindepartner für Synaptotagmin und den Ca^{2+} -Kanal des N-Typs fungiert (Bennett *et al.*, 1992b; Yoshida *et al.*, 1992). SNAP-25 ist ein weiteres Q- oder t-SNARE auf der zytosolischen Seite neuronaler Plasmamembranen und ist über einen Palmitoylrest, welcher über Thioester an vier Cysteine im Zentrum des Proteins gebunden ist, an der Membran verankert (Oyler *et al.*, 1989). VAMP-2 und Syntaxin 1 enthalten je ein SNARE-Motiv, während SNAP-25 zwei enthält, die durch eine Linkerregion mit den palmitoylierten Cysteinen verbunden sind. Die vier SNARE-Motive bilden ein paralleles Vier-Helix-Bündel, einen stabilen ternären SNARE-Komplex (Sutton *et al.*, 1998). Die Bildung des SNARE-Komplexes in *trans*-Position führt die beiden fusionierenden Membranen in enge Apposition. Die resultierende freigesetzte Energie wird vermutlich zur Überwindung der Energiebarriere der Lipidumstrukturierung während der Fusion genutzt. Ob dieser Komplex essentiell für die eigentliche Fusionsreaktion ist, wird kontrovers diskutiert. So scheint die *trans*-Komplexbildung vor der eigentlichen Fusion stattzufinden (Ungermann *et al.*, 1998). Die Fusion selbst erfordert verschiedene zusätzliche Proteine wie Calmodulin

(Peters und Mayer, 1998), Protein Phosphatase I (Peters *et al.*, 1999) und den V_0 -Sektor der vATPase (Peters *et al.*, 2001). Neuronale SNAREs interagieren mit einer Vielzahl anderer Proteine wie Munc18 (Hata *et al.*, 1993), Munc13 (Betz *et al.*, 1997), Synaptotagmin (Bennett *et al.*, 1992a) und Complexin (McMahon *et al.*, 1995).

1.7.2 SM-Proteine

SM-Proteine sind hydrophile Proteine und spielen eine wichtige Rolle in der Vesikelfusion (Jahn und Südhof, 1999). Die Deletion eines SM-Proteins stoppt das Fusionsereignis. Es gibt deutlich weniger SM-Proteine (4 in Hefe, 7 in Säugetieren) als Fusionsreaktionen zwischen unterschiedlichen Organellen, wonach die Proteine an mannigfachen Reaktionen beteiligt sein dürften. SM-Proteine interagieren mit SNARE-Proteinen über verschiedene Mechanismen. Die Art der Interaktion korreliert mit der topographischen Lokalisation der Fusionsreaktion in der Zelle. Dies impliziert, daß verschiedene subzelluläre Domänen durch verschiedene Fusionsmechanismen gekennzeichnet sind. Bei dem am meisten verbreiteten Mechanismus bindet das SM-Protein direkt an die 20 N-terminalen Reste des Syntaxin (Jahn *et al.*, 2003).

1.7.2.1 Munc13

Ein essentieller Schritt der Exozytose synaptischer Vesikel ist das Priming, das die Fusionskompetenz gedockter Vesikel erzeugt und eine schnelle Exozytose nach Ca^{2+} -Einstrom sicherstellt (Klenchin und Martin, 2000). Priming benötigt Munc13 (Tokumaru und Augustine, 1999). Die drei Munc13-Isoformen der Säuger sind im Gehirn differentiell exprimiert und spezifisch an den aktiven Zonen lokalisiert (Brose *et al.*, 1995; Brose *et al.*, 2000). Die Bindung von Diacylglycerol und analoger Phorbolster aktiviert die Priming-Aktivität von Munc13 und resultiert in einem verstärkten Wiederauffüllen des RRP und einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Vesikelexozytose (Rhee *et al.*, 2002). Munc13-1 interagiert mit der N-terminalen Coiled-Coil Domäne von Syntaxin 1 in dessen offener Konformation. Diese Interaktion ist kompatibel mit der SNARE-Komplexbildung. In *C. elegans* kann Munc13 das Munc18 ersetzen, Syntaxin 1 auf diese Weise in die offene Konformation überführen (Sassa *et al.*, 1999) und die Bildung des SNARE-Komplexes erleichtern. Munc13 interagiert zusätzlich mit weiteren Proteinen wie Calmodulin (Xu *et al.*, 1998a) und der gehirnspezifischen Spektrinisoform beta-3 (Sakaguchi *et al.*, 1998). Munc13 könnte demnach eine chaperonähnliche Funktion haben, um den Übergang des Syntaxin 1 von der

geschlossenen in die offene Konformation und damit die Bildung des SNARE-Komplexes zusammen mit anderen regulatorischen Proteinen zu erleichtern (Li und Chen, 2003).

1.7.2.2 Munc18

Munc18 gehört zu einer Familie hydrophiler Proteine ohne erkennbare spezifische Domänen oder Motive (Halachmi und Lev, 1996; Jahn, 2000). Das Protein ist in Neuronen angereichert, absolut notwendig für die synaptische Vesikelexozytose und vermutlich an einem Schritt nach dem Andocken der Vesikel an die Plasmamembran beteiligt (Verhage *et al.*, 2000), möglicherweise an der Regulation der Fusionsporendynamik (Fisher *et al.*, 2001). Andere Studien sprechen für eine Rolle beim Andocken an die Plasmamembran (Voets *et al.*, 2001).

1.7.3 Complexine

Die Complexine I und II (Synaphin I und II) sind zwei nahe verwandte, kleine zytosolische Proteine von etwa 15 kDa (Ishizuka *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 1995), können an SNARE-Komplexe binden und sind in Synapsen angereichert (Takahashi *et al.*, 1995; Yamada *et al.*, 1999). Sie könnten nach dem Priming wirken, als Ca^{2+} -Sensor dienen oder zusammen mit den Sensoren fungieren, um die Fusionsreaktion effizienter zu gestalten (Reim *et al.*, 2001). Sie könnten auch die Oligomerisierung der *trans*-Komplexe für eine effiziente, Ca^{2+} -regulierte Fusion fördern (Tokumaru *et al.*, 2001), den metastabilen Zustand stabilisieren, um die schnelle Freisetzung von Neurotransmittern zu sichern (Chen *et al.*, 2002), sowie während oder nach der Fusion wirken, indem sie das Schließen der Fusionspore kontrollieren und so die Endozytose der Vesikel nach *kiss and run* erlauben (Archer *et al.*, 2002). Knockout-Studien legen nahe, daß Complexine nicht essentiell für die SNARE-Funktion oder die synaptische Vesikelfusion (Reim *et al.*, 2001) sind, aber die Wirkung von Synaptotagmin 1 fördern.

1.7.4 Synaptotagmin

Der am besten charakterisierte Ca^{2+} -Sensor ist Synaptotagmin, ein integrales Membranprotein synaptischer Vesikel mit zwei Ca^{2+} -bindenden C_2 -Domänen (Augustine, 2001; Chapman, 2002). Die C_2A -Domäne bindet drei (Ubach *et al.*, 1998), C_2B zwei Ca^{2+} -Ionen (Fernandez-Chacon *et al.*, 2001). Über die C_2 -Domänen bindet das Protein ferner Ca^{2+} -abhängig an Phospholipide (Lagnado *et al.*, 1996). Dies könnte implizieren, daß Synaptotagmin Ca^{2+} -abhängig die zwei gegenüberliegenden Membranen in große Nähe bringt oder die Spannung

im metastabilen, geprimten Zustand herabsetzt (Fernandez-Chacon *et al.*, 2001; Bai *et al.*, 2002).

Synaptotagmin bildet Homooligomere (Sugita *et al.*, 1996; Desai *et al.*, 2000) und bindet an Syntaxin 1 (Bennett *et al.*, 1992a; Li *et al.*, 1995a), SNAP-25 (Gerona *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002), den SNARE-Komplex (Davis *et al.*, 1999; Gerona *et al.*, 2000), Ca²⁺-Kanäle (Sheng *et al.*, 1997), SV2 (Schivell *et al.*, 1996), Calmodulin (Perin, 1996) und Phosphoinositide (Schiavo *et al.*, 1996) sowie an AP2 (Zhang *et al.*, 1994). Die meisten der Interaktionen werden über die C₂B-Domäne vermittelt und sind Ca²⁺-abhängig.

1.7.5 Synaptophysin

Synaptophysin gehört zu einer Familie von Proteinen, zu denen auch Synaptoporin und Synaptogyrin gezählt werden. Diesen Proteinen sind vier Transmembranhelices und kurze N- und C-terminale Sequenzen eigen (Südhof *et al.*, 1987; Stenius *et al.*, 1995). Synaptophysin und Synaptogyrin enthalten tyrosinphosphorylierte C-Termini, die Substrate für src-Kinasen sind. Synaptoporin wird wahrscheinlich nicht phosphoryliert (Fernandez-Chacon und Südhof, 1999). Doppelknockouts implizieren einen funktionellen Zusammenhang in synaptischer Plastizität (Janz *et al.*, 1999). Synaptophysin und Synaptoporin binden VAMP-2 (Becher *et al.*, 1999), welches in dieser Form nicht in den SNARE-Komplex eingehen kann (Calakos und Scheller, 1994; Edelmann *et al.*, 1995). Synaptophysin dient daher als Kontrollprotein für die Assemblierung des SNARE-Komplexes und damit für die Vesikelfusion. Es könnte synaptische Antworten auf diese Weise sehr fein modulieren. Das Protein verhindert zusätzlich die Assoziation von VAMP-2 mit SNAP-25 und Syntaxin 1, die in geringen Mengen auf synaptischen Vesikeln gefunden werden (Walch-Solimena *et al.*, 1995) und Komplexe bilden könnten (Otto *et al.*, 1997). Solche vesikulären SNARE-Komplexe bräuchten ATP für die Herstellung der Monomere und wären eine Energieverschwendung für die Zelle. Die relative Instabilität der Interaktion zwischen Synaptophysin und VAMP-2 stellt hierbei sicher, daß sie schnell reversibel ist (Becher *et al.*, 1999).

Synaptophysin ist das Hauptphosphoprotein synaptischer Vesikel (Pang *et al.*, 1988) und enthält putative Phosphorylierungsstellen für Serin/Threonin- und Tyrosin-Kinasen. Der C-Terminus enthält zehn Pentapeptidwiederholungen, die reich an Prolin und Glycin sind. Neun davon beginnen mit einem Tyrosin (Südhof *et al.*, 1987). Die Tyrosinphosphorylierung

erfolgt intravesikulär und wird durch Kinasen vermittelt, die mit synaptischen Vesikeln assoziiert sind (Pang *et al.*, 1988; Onofri *et al.*, 1997). Synaptophysin wird unter physiologischen Bedingungen zusätzlich über CaMKII an Serin-Resten phosphoryliert (Pang *et al.*, 1988; Rubenstein *et al.*, 1993).

1.7.6 Rab-Proteine

Rab-Proteine sind Mitglieder der Ras-Superfamilie monomerer, kleiner GTPasen, die im Vesikelverkehr agieren (Pfeffer, 2001; Segev, 2001a; Zerial und McBride, 2001). Mehr als 60 rab-Proteine sind in Säugerzellen exprimiert (Pereira-Leal und Seabra, 2001). Rabs interagieren mit Membranen über C-terminale Geranylgeranylgruppen und zirkulieren zwischen einem membranassoziierten, GTP-gebundenen aktiven Zustand und einer zytosolischen, GDP-gebundenen inaktiven Form (Geppert und Südhof, 1998; Segev, 2001b). Ein einzelnes rab-Protein kann verschiedene Stufen des vesikulären Transportes regeln wie Vesikelabschnürung, Transport, Andocken und die Fusion. Rab-Proteine rekrutieren integrale und periphere Membranproteine in spezifische Domänen auf einem Organell (Zerial und McBride, 2001) und regeln die Interaktion von Transportvesikeln mit ihren Zielmembranen durch Kontrolle von Protein-Protein-Interaktionen (Pfeffer, 1999). Verschiedene rab-Proteine markieren unterschiedliche subzelluläre Kompartimente (Zerial und McBride, 2001). Einige befinden sich jedoch auch auf mehr als einem Organell (Gorvel *et al.*, 1991; Bucci *et al.*, 1992; Ullrich *et al.*, 1996).

Trotz ihrer festen Membranassoziation über die C-terminale Prenylierung werden rab-Proteine durch das Zytoplasma rezirkuliert. Dies geschieht in einem Komplex mit dem Chaperon GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor), welches an GDP-gebundenes rab von der Membran extrahiert und die Dissoziation des GDP verhindert (Schimmoller *et al.*, 1998; Gonzalez und Scheller, 1999). Trifft ein GDP-rab auf seine Zielmembran, wird die Dissoziation des GDP durch einen GEF (guanine nucleotide exchange factor) erreicht (Schimmoller *et al.*, 1998). Da die intrazelluläre Konzentration von GTP höher als die des GDP ist, bindet das rab gewöhnlich GTP und wird dadurch resistent gegenüber einer Extraktion durch GDIs. Es gibt Indizien dafür, daß die Bindung von rab an die Membran eine Voraussetzung für die Vesikelfusion ist, gefolgt von der Rekrutierung eines Tethering-Proteins, welches SNAREs und andere Proteine an die Membran führt (Schimmoller *et al.*, 1998; Allan *et al.*, 2000; Cao und Barlowe, 2000; Reigada *et al.*, 2003). Dies erfolgt nach der GTP-Hydrolyse, katalysiert durch GAP (GTPase activating protein) (Pfeffer, 2003). Das

Transportvesikel mit gebundenem rab wandert zur Zielmembran und bindet dort. Nach Hydrolyse, Nukleotidaustausch und Fusion wird das rab durch ein GDI wiederum von der Membran gelöst (Tuvim *et al.*, 2001). Die diversen Wirkungen der rab-Proteine werden über ihre Effektoren vermittelt, die normalerweise mit der GTP-gebundenen Form interagieren.

1.7.7 NSF

NSF ist ein hexameres Protein, das zur Superfamilie der Triple A-ATPasen gehört (Hanson *et al.*, 1997; Zinsmaier und Bronk, 2001). NSF bindet an den SNARE-Komplex über SNAPs und bildet einen 20S-Komplex (Clary *et al.*, 1990). Die Hydrolyse von ATP durch NSF zerlegt diesen Komplex in individuelle Komponenten (Söllner *et al.*, 1993a; Söllner *et al.*, 1993b).

1.7.8 Exozystenkomplex

Das spezifische Andocken der Transportvesikel an die Zielmembran spielt eine wichtige Rolle im Fusionsprozeß. An der Plasmamembran ist der Exozystenkomplex hierfür verantwortlich (Hsu *et al.*, 1996; Grindstaff *et al.*, 1998; Lipschutz *et al.*, 2000). Der Exozystenkomplex interagiert mit Syntaxin 1 (Hsu *et al.*, 1996) und bindet die GTP-gebundene Form von Ral, einer kleinen GTPase (Brymora *et al.*, 2001; Moskalenko *et al.*, 2002; Sugihara *et al.*, 2002). Ral hat zwei Isoformen A und B, von denen RalA im Gehirn angereichert und mit synaptischen Vesikeln assoziiert ist (Ngsee *et al.*, 1991; Bielinski *et al.*, 1993; Volkandt *et al.*, 1993). Der Exozystenkomplex agiert nach der Bindung von RalA, da der Aufbau in Abwesenheit von RalA inhibiert wird (Augustine, 2001; Moskalenko *et al.*, 2002), und der vesikuläre Transport von Vesikeln an die Oberfläche in PC12-Zellen bei Störungen der RalA-Funktion inhibiert ist (Moskalenko *et al.*, 2002). Die Interaktion zwischen dem Exozystenkomplex und Ral könnte die Rekrutierung der synaptischen Vesikel an die exozytischen Fusionsstellen vermitteln oder regulieren (Brymora *et al.*, 2001; Polzin *et al.*, 2002). Nachfolgende Schritte beinhalten wahrscheinlich die Interaktion mit Bassoon (Dieck *et al.*, 1998) und Piccolo (Fenster *et al.*, 2000).

1.7.9 Zytoskelettmatrix an der aktiven Zone (CAZ)

Die präsynaptische Endigung besteht aus einer Zytoskelettmatrix, der CAZ (cytomatrix assembled at the active zone), die ein Gerüst aus vielen verschiedenen Proteinen bildet (Südhof, 2004) und mit Proteinen wie Clathrin, Dynamin und NSF zusammenhängt. Die CAZ

selbst enthält Aktin und Tubulin sowie die für Synapsen einzigartigen Proteine Bassoon, Piccolo und RIM (rab-interacting molecule) (Wilson, 2003). Bassoon und Piccolo, zwei Proteine enorm großer molekularer Masse mit hoher Sequenzähnlichkeit, liegen oftmals, aber nicht immer zusammen an inhibitorischen und excitatorischen Synapsen vor (Cases-Langhoff *et al.*, 1996). Bassoon wirkt als Gerüst für die Assemblierung der CAZ. Da Bassoon-Mutanten normale Synapsen entwickeln (Altrock *et al.*, 2003), der Vesikelzyklus jedoch verhindert wird, scheint Bassoon auch für einen Schritt im Vesikelzyklus zuständig zu sein. Auch andere CAZ-Proteine interagieren mit vesikulären Proteinen: Piccolo mit PRA1 (Fenster *et al.*, 2000) und RIM mit rab3A (Wang *et al.*, 1999). Andererseits könnte die Funktion von Bassoon in solchen Synapsen auch von Piccolo übernommen werden. Die CAZ arbeitet vermutlich eng mit dem Zytoskelett zusammen, was die Basis für eine dynamische und schnelle Reorganisation der präsynaptischen Nervenendigung liefert (Gundelfinger *et al.*, 2003).

1.8 Membrane Proteomics

Membranen spielen eine kritische Rolle in zellulären Strukturen als physische Barriere zwischen Zellen und der Umgebung und verschiedener subzellulärer Kompartimente innerhalb eukaryotischer Zellen. Die vielfältigen Funktionen innerhalb und an der Membran werden durch Proteine und Lipide wahrgenommen. Integrale Membranproteine sind amphipatisch. Dies macht das Studium der Proteine sehr schwierig. Obwohl in den letzten Jahrzehnten neue Proteomtechniken entwickelt wurden, eignen sich diese meist nur für die Analyse löslicher Proteine. In Eukaryoten kodieren etwa 20% bis 30% der offenen Leserahmen für Membranproteine (Wallin und Heijne, 1998). Deren Repräsentation in bereits existierenden Analysen ist aber nur sehr gering (Santoni *et al.*, 2000). Die Identifizierung von Membranproteinen, insbesondere von Rezeptoren, wird daher in Zukunft außerordentlich wichtig sein, zumal 70% der pharmazeutischen Angriffspunkte Membranproteine darstellen (Wu und Yates, 2003). Neben den Rezeptoren sind Transporter und Kanäle von großem Interesse, weil sie in verschiedene Funktionen wie die zelluläre Signalgebung über Membranen und im Vesikelverkehr involviert sind.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Beschreibung des Proteoms synaptischer Vesikel, insbesondere von Proteinen, deren Vorkommen an oder auf synaptischen Vesikeln bisher nicht bekannt war. Bis heute sind viele Vesikelproteine identifiziert und funktionell charakterisiert worden (Lin und Scheller, 2000; Li und Chen, 2003; Südhof, 2004). Dazu zählen integrale und peripher assoziierte synaptische Vesikelproteine, die als Transporter, Signalmoleküle, strukturelle Moleküle und/oder als Bindepartner für andere Proteine wirken. Trotz der bisherigen umfangreichen Beschreibung des Vesikelproteoms liefern beispielsweise das Vorkommen von ATP und von Chloridionen im Lumen synaptischer Vesikel (Westfall *et al.*, 2002; Faundez und Hartzell, 2004; Pankratov *et al.*, 2006) Indizien für die Existenz weiterer Proteine. Neueste Befunde legen sogar den Transport von GTP in synaptische Vesikel dar (Santos *et al.*, 2006), was die Hypothese von Nukleotiden als Neurotransmitter oder Neuromodulatoren weiter bestärkt. Die hierfür verantwortlichen Transporter sind jedoch bisher nicht identifiziert worden. Daher ist ein Proteomansatz, speziell für die Identifizierung hydrophober Membranproteine, essentiell für die Charakterisierung weiterer synaptischer Vesikelproteine, die eine Funktion im Organellzyklus übernehmen.

Für die Proteomanalyse wurden immungereinigte synaptische Vesikelproteine mittels ein-dimensionaler Gelelektrophorese und verschiedener zweidimensionaler Gelelektrophoresetechniken aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert. Nach Identifikation putativ neuer Vesikelproteine wurden diese nach Klonierung immunzytochemisch und immunhistochemisch untersucht. Zusätzlich wurde die gewebespezifische Expression der entsprechenden Gene analysiert und Studien zur Membranassoziation der Proteine durchgeführt.

Neben der reinen Proteinanalyse sollten Unterschiede im Proteinmuster synaptischer Vesikel nach Stimulation von Neuronen analysiert werden. Hierzu wurde erstmals DIGE mit der zweidimensionalen Elektrophoresetechnik BAC/SDS-PAGE kombiniert. Für die Darstellung der Art der Unterschiede wurden anschließend Studien der Proteinphosphorylierung durchgeführt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Präparation synaptischer Vesikel aus dem Gehirn der Ratte

Die Präparation synaptischer Vesikel erfolgt durch Homogenisierung kompletter, frisch präparierter Rattenhirne und subzelluläre Fraktionierung über diverse Zentrifugationsschritte (Morciano *et al.*, 2005).

2.1.1 Standardpräparation

Adulte Ratten werden mit CO₂ betäubt und dekapitiert. Die frisch präparierten Hirne werden von myelinreichem Stammhirn befreit und auf Eis gelagert. Zur Reduktion von Proteaseaktivität werden alle nachfolgenden Schritte bei 4°C durchgeführt sowie die Puffer mit Ausnahme des Saccharosepuffers mit Proteaseinhibitoren versetzt (je 2 µg/ml Antipain, Leupeptin und Chymostatin, 1 µg/ml Pepstatin, 1 mM Benzamidin). Zu jedem Gehirn gibt man 10 ml Präparationspuffer (5 mM Tris-HCl, 320 mM Saccharose, pH 7,4) und homogenisiert mit Hilfe eines Elvehjem-Homogenisators in 12 Durchgängen. Es folgt eine 10-minütige Zentrifugation bei 3.600 g. Die Überstände werden abgesammelt, die Bodensätze mit Präparationspuffer auf 10 ml aufgefüllt, in 5 Durchgängen homogenisiert und erneut zentrifugiert. Nach Vereinigung der Überstände füllt man mit Präparationspuffer auf 15 ml auf und pipettiert je 7,5 ml auf einen diskontinuierlichen Percollgradienten, bestehend aus je 7,5 ml 23%, 10% und 3% Percoll-Lösung in Präparationspuffer. Nach einem Zentrifugationsschritt für 7 min bei 31.400 g sammelt man synaptosomenhaltige Fraktionen an den Grenzschichten zwischen der 23- und 10%igen sowie der 10- und 3%igen Percoll-Lösung ab. Die Fraktionen werden mit dem vierfachen Volumen Präparationspuffer aufgefüllt und für 35 min bei 20.000 g zentrifugiert. Die Bodensätze werden im Anschluß in je 30 ml Lysispuffer (5 mM Tris-HCl, pH 7,4) resuspendiert sowie zu Ansätzen à 60 ml in einem 250 ml-Erlenmeyerkolben vereinigt. Es folgt die osmotische Lyse, die durch Erwärmen des Erlenmeyerkolbenbodens mit der Handfläche sowie durch 20-maliges Auf- und Abpipettieren unter Schwenken des Gefäßes durchgeführt wird. Die geplatzen Synaptosomenstrukturen werden für 60 min bei 188.000 g zentrifugiert. Zu den Bodensätzen gibt man jeweils 4 ml Saccharosepuffer (0,2 M Saccharose, 0,1 mM MgCl₂, 0,5 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7,4), homogenisiert mit einem Elvehjem-Homogenisator in 5 Durchgängen und schichtet diese Lösung auf lineare, kontinuierliche Saccharosegradienten, bestehend aus 32 ml 0,3 M bis 1,2 M Saccharose in 0,5 mM EGTA und 10 mM HEPES, pH 7,4. Um die verschiedenen

Vesikelpopulationen aufzutrennen, zentrifugiert man für 120 min bei 85.000 g. Die 36 ml des Saccharosegradienten werden zu je 1 ml abgesammelt.

2.1.2 Präparation zur Analyse funktioneller Proteinmodifikationen

Adulte Ratten werden kurz mit CO₂ betäubt und anschließend mit 3 ml Narcoren intraperitoneal narkotisiert (Burré *et al.*, 2006). Man perfundiert die Tiere anschließend intrakranial mit einer hohen Kaliumkonzentration zur Induktion der Exozytose oder mit dem membrangängigen Calcium-Chelator BAPTA-AM (1,2-Bis-(*o*-Aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure Tetraacetoxy-Methylester), welcher die Synapse im Ruhezustand hält. Für die Kontrollbedingung werden die Tiere 3 min mit eiskaltem Waschlösungspuffer (116 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 1,5 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 0,5 mM EDTA, 11 mM Glucose, 20 U/ml Heparin, pH 7,4) perfundiert. Anschließend spült man für 20 min mit BAPTA-AM-haltigem Puffer (116 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 10 mM HEPES, 11 mM Glucose, 3% BSA, 0,03 mM BAPTA-AM, pH 7,4). Die Induktion der Depolarisation wird nach der 3-minütigen Perfusion mit Waschlösung durch Spülen für 10 min mit 37°C-warmem Depolarisationspuffer (20,7 mM NaCl, 100 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 1,5 mM CaCl₂, 11 mM Glucose, 3% BSA, pH 7,4) und für weitere 10 min mit eiskaltem Depolarisationspuffer erreicht. Im Anschluß werden die synaptischen Vesikel gemäß des Standardprotokolls präpariert (siehe 2.1.1).

2.2 Immunreinigung synaptischer Vesikel

Mit Hilfe der Immunpräzipitation lassen sich synaptische Vesikel unter Zuhilfenahme eines ausschließlich auf synaptischen Vesikeln lokalisierten Proteins spezifisch aufreinigen (Morciano *et al.*, 2005). Zunutze macht man sich hierbei die vesikulären Proteine SV2 sowie die Neurotransmittertransporter vGat und vGlut1, die mit ihren zwölf bzw. putativen elf Transmembranhelices integraler Bestandteil der Vesikelmembran sind. Ferner kommen Magnetbeads zum Einsatz, deren Verwendung schnell und unkompliziert ist sowie eine hohe Spezifität erlaubt.

2.2.1 Versuchsbedingungen

Um optimale Bedingungen für die spezifische Aufreinigung synaptischer Vesikel zu erhalten, werden kritische Schritte wie die Wahl der Magnetbeads, die Verhinderung unspezifischer Wechselwirkungen, die Zeitdauer der Antikörper- und Probeninkubation sowie verschiedene

Elutionsbedingungen getestet. Verwendete Magnetbeads beinhalten Qiagen BioMag (goat anti-mouse IgG), Pierce (goat anti-mouse IgG) und Dynal M-280 (sheep anti-mouse IgG). Als Elutionsmittel kommen SDS-Probenpuffer mit 500 mM DTT, 2% NP-40 in TBS (tris-buffered saline), 100 mM DTT in TBS, 500 mM DTT in TBS, 6 M Harnstoff in TBS, 12% SDS in TBS, IEF-Rehydrierungspuffer, Methanol, Aceton, Proteinase K mit 10 mM CaCl₂ in TBS, Trypsin mit 2 mM CaCl₂ und 100 mM Tris-HCl pH 8,5, Erhitzen für 5 min bei 95°C in TBS und 1 M NaOH zum Einsatz. Bis auf die Elution mit NP-40 für 30 min auf Eis und den 95°C-Ansatz werden die Elutionen für 30 min bei 37°C durchgeführt. Jeder Versuchsansatz wird nach der Elution mit dem entsprechenden Elutionsmittel nochmals für 30 min bei 37°C mit 500 mM DTT in SDS-Probenpuffer eluiert (zweite Elution).

2.2.2 Immunreinigung über SV2

Unter Zuhilfenahme eines Antikörpers gegen das integrale Vesikelprotein SV2 läßt sich die komplette synaptische Vesikelpopulation von Nervenendigungen aufreinigen. Zur Verhinderung unspezifischer Wechselwirkungen der Magnetbeads mit synaptischen Vesikeln werden die Beads nach dreimaligem Waschen mit TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4) für 30 min in Blockpuffer S (2% Glycin, 2% Lysin, 0,5% Saponin in TBS) und anschließend zweimal für 10 min in Blockpuffer (2% Glycin, 2% Lysin in TBS) inkubiert. Vor der 60-minütigen Inkubation mit α -SV2-haltigem Hybridoma-Überstand (3 μ g Antikörper auf 10⁷ Magnetbeads bzw. 200 μ g/ml Magnetbeadsuspension) werden die Magnetbeads für 10 min mit TBS gewaschen. Im Anschluß wäscht man dreimal für 10 min mit TBS und vernetzt die zugegebenen Antikörper mit bereits an die Oberfläche der Magnetbeads gekoppelten Antikörpern durch 5-minütige Inkubation in 0,1% Glutaraldehyd. Überschüssiges Glutaraldehyd wird durch viermaliges Waschen in Waschpuffer (1% Glycin, 1% Lysin in TBS) und einem kurzen Waschschrift in TBS entfernt. Anschließend inkubiert man die vorbereiteten Magnetbeads mit der Vesikelfraktion (~0,5 mg Protein/ml Magnetbeads) in Anwesenheit von 2% Glycin und Lysin für 90 min bei 4°C. Ungebundene Probe wird aufbewahrt und einer TCA-Präzipitation unterzogen. Die Magnetbeads werden mehrere Male in TBS gewaschen und anschließend für 2 min in 1 M Tris pH 7,3 sowie für 15 min auf Eis in 0,1 M Na₂CO₃ pH 11 inkubiert. Vor der Elution der Vesikel von den Magnetbeads werden diese nochmals kurz mit TBS gewaschen. Die Elution erfolgt je nach weiterer Verfahrensweise mit BAC-Probenpuffer für 30 min bei 37°C, mit SDS-Probenpuffer für 30 min bei 37°C oder mit 2% NP-40 in TBS für 30 min auf Eis. Eluierte Proteine können anschließend mit Aceton präzipitiert oder direkt für die Gelelektrophorese eingesetzt werden.

2.2.3 Immunreinigung über vGat und vGlut1

Für die Analyse von Vesikelsubpopulationen, die sich aufgrund der Präsenz bestimmter Neurotransmittertransporter unterscheiden können, verwendet man anstelle der Antikörper gegen SV2 solche gegen die vesikulären Neurotransmittertransporter vGat und vGlut1. Das Protokoll der Immunreinigung kann hierbei übernommen werden (siehe 2.2.2).

2.2.4 Kontrollen

Für die Analyse der Spezifität der Aufreinigung über den SV2-Antikörper und die Spezifität der Bindung der Vesikelprobe an den Magnetbead-Antikörper-Komplex werden Magnetbeads mit TBS, einem unspezifischen Maus-Immunglobulin sowie mit dem SV2-Antikörper gekoppelt und anschließend mit oder ohne Vesikelprobe inkubiert.

2.3 Elektrophorese

2.3.1 Gelelektrophoretische Systeme

Im Folgenden beschriebene Elektrophoresetechniken umfassen ein- und zweidimensionale Techniken. Während eindimensionale Systeme den Vorteil besitzen, schneller zu einem Ergebnis zu führen und in keinen Proteinverlusten beim Transfer auf die nächste Dimension zu resultieren, besitzen zweidimensionale Systeme eine höhere Trennkapazität und damit eine bessere Auflösung. Dies ist insbesondere für die Detektion gering abundanter Proteine essentiell.

2.3.2 SDS-PAGE

Alle durchgeführten gelelektrophoretischen Trennungen per SDS-PAGE basieren auf 15%igen Biometra-Gelen, wenn nicht gesondert darauf hingewiesen wird. Als Detergenz kommt SDS zum Einsatz, das die Eigenladung von Proteinen effektiv überdeckt. Es entstehen Mizellen konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit. Die elektrophoretische Trennung beruht daher einzig auf molekularer Masse. Die SDS-Gele setzen sich wie in Tabelle 1 dargestellt zusammen.

In SDS-Probenpuffer (1% Glycerin, 2% SDS, 0,08 M Tris-HCl pH 6,8, 0,0012% Bromphenolblau, 100 mM DTT) resuspendierte Proben werden bei 5 mA aufgetrennt, bis die Lauffront das Trenngel erreicht hat. Die weiterführende Elektrophorese wird bei 20 mA

durchgeführt. Als Elektrophoresepuffer wird 100 mM Tris, 100 mM Glycin und 70 mM SDS verwendet. Der durch Mischung der Komponenten erreichte pH-Wert von 8 sollte nicht korrigiert werden.

	Trenngel	Sammelgel
30% Acrylamid	7,5 ml	835 µl
1% Bisacrylamid	1,3 ml	650 µl
1 M Tris-HCl pH 8,7	5,6 ml	-
0,25 M Tris-HCl pH 6,8	-	2,5 ml
H ₂ O	0,5 ml	975 µl
20% SDS	75 µl	25 µl
TEMED	15 µl	5 µl
10% APS	75 µl	25 µl

Tabelle 1. Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für eine 15%ige SDS-PAGE nach Biometra.

2.3.3 Tris-Acetat-PAGE

Für die Auftrennung von Proteinen hoher molekularer Masse (100 bis 1000 kDa) hat sich das Tris-Acetat-System als geeignet erwiesen. Man verwendet hierzu ein Gradientengel von 3,5 bis 8%, dessen Zusammensetzung in Tabelle 2 dargestellt ist.

	Trenngel		Sammelgel
	8%	3,5%	3%
0,5 M Tris-HCl, 2,5% HAc, pH 7,0	3,25 ml	3,25 ml	2,5 ml
30% Acrylamid:Bisacrylamid (37,5:1)	3,47 ml	1,52 ml	1 ml
H ₂ O	3,28 ml	7,48 ml	4,2 ml
Glycerin	3 ml	0,75 ml	2,3 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl
10% APS	50 µl	50 µl	60 µl

Tabelle 2. Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für ein 3,5 bis 8%iges Tris-Acetat-Gradientengel.

Die in SDS-Probenpuffer aufgenommenen Proben werden bis zum Erreichen des Trenngels bei 10 mA aufgetrennt. Anschließend trennt man bei 15 mA auf. Als Elektrophoresepuffer wird 50 mM Tris, 50 mM Tricin und 3,5 mM SDS verwendet. Der durch Mischung der Chemikalien erreichte pH-Wert von 8,2 sollte nicht korrigiert werden. Zusätzlich fügt man kurz vor der Elektrophorese zum Kathodenpuffer 1 mM Glutathion hinzu.

2.3.4 Isoelektrische Fokussierung / SDS-PAGE

Die am häufigsten eingesetzte Technik unter den zweidimensionalen Elektrophoresesystemen besteht aus der Kombination von isoelektrischer Fokussierung und SDS-PAGE (O'Farrell, 1975). Während die Proteine in der ersten Dimension gemäß ihrer isoelektrischen Punkte und

damit entsprechend ihrer Ladung separiert werden, trennen sich die Proteine in der zweiten Dimension aufgrund ihrer unterschiedlichen molekularen Massen auf.

Die erste Dimension führt man mit immobilisierten pH-Gradienten durch (Görg *et al.*, 1988). Hierbei handelt es sich um auf Plastikstreifen fixierte Gele, die pH-Gradienten unterschiedlicher Breite besitzen. Für die Beladung des Streifens mit Probe gibt man in einem Keramikschieffchen auf einen 7 cm-Gelstreifen in IEF-Rehydrierungspuffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4% CHAPS, 60 mM DTT, 2% Pharmalyte pH 3-10, 0,002% Bromphenolblau) solubilisierte Proteine und läßt diesen über Nacht bei 30 V quellen. Das Anlegen eines Stroms hat gegenüber dem Quellen durch reine Diffusion den Vorteil, daß auch Proteine hoher molekularer Masse in den Streifen eindringen können. Um eine Evaporation der Lösung zu verhindern, überschichtet man mit Immobiline DryStrip Cover Fluid. Für die eigentliche isoelektrische Fokussierung wählt man ein Programm, dessen Spannung zeitabhängig ansteigt und die Endspannung für mehrere Stunden hält. Die geringe Anfangsspannung verhindert eine Proteinaggregation, die graduelle Spannungszunahme empfiehlt sich für größere aufzutrennende Proteinkonzentrationen. Das verwendete Programm für einen 7 cm-Gelstreifen pH 3-10 ist in Tabelle 3 dargestellt.

Schritt	Spannung [V]	Zeit [h]	Voltstunden	Programm
1	30	12	360	Step-n-hold
2	500	1	500	Step-n-hold
3	1000	0,5	500	Gradient
4	1000	0,5	500	Gradient
5	5000	0,5	2500	Gradient
6	5000	1,5	7500	Step-n-hold
Gesamt		16	11860	

Tabelle 3. IEF-Programm für die Fokussierung eines 7 cm-Gelstreifens pH 3-10.

Nach der IEF kann der Gelstreifen direkt weiterverwendet oder bei -70°C gelagert werden. Vor der zweiten Dimension ist eine Äquilibration des Gelstreifens nötig, um den Streifen an Puffer- und Detergenzbedingungen für die SDS-PAGE anzupassen. Hierfür inkubiert man 15 min in 2% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30% Glycerin, 0,002% Bromphenolblau und 650 mM DTT. Der äquilibrierte Streifen wird im Anschluß auf ein 15%iges SDS-Gel gelegt und die Proteine in der zweiten Dimension separiert.

2.3.5 BAC / SDS-PAGE

Für die Auftrennung hydrophober Proteine hat sich das BAC/SDS-System gegenüber der isoelektrischen Fokussierung als besser geeignet erwiesen (Hartinger *et al.*, 1996). Die

Auftrennung der Proteine beruht in beiden Dimensionen auf molekularer Masse. Da jedoch zwei unterschiedliche Detergenzien eingesetzt werden und in der ersten Dimension Harnstoff verwendet wird, weichen die Trenneigenschaften leicht voneinander ab. Daraus ergibt sich nach zweidimensionaler Elektrophorese eine Diagonale, auf der die Proteine zu liegen kommen. Zur Trennung der Vesikelproteine wird ein 8%iges Trenngel verwendet (Tabelle 4). Nach Fertigstellung des Trenngels überschichtet man zum Erhalt einer glatten Geloberfläche mit 75 mM Kaliumphosphatpuffer pH 2,1.

	Trenngel	Sammelgel
Harnstoff	7,5 g	1 g
40% Acrylamid:Bisacrylamid (29:1)	8 ml	1 ml
1% Bisacrylamid	10 ml	-
300 mM Kaliumphosphatpuffer pH 2,1	-	2,5 ml
500 mM Kaliumphosphatpuffer pH 4,1	11 ml	3 ml
H ₂ O	2,4 ml	2,4 ml
80 mM Ascorbinsäure	2 ml	0,5 ml
5 mM Eisen-II-Sulfat	64 µl	8,5 µl
250 mM BAC	400 µl	70 µl
0,025% H ₂ O ₂	1,6 ml	-
0,04% H ₂ O ₂	-	500 µl

Tabelle 4. Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für die BAC-PAGE.

Die in BAC-Probenpuffer (2,95 M Harnstoff, 5% 16-BAC, 5% Glycerin, 37,5 mM DTT, 0,025% Pyronin Y) resuspendierten Proben werden für 5 min bei 60°C inkubiert. Es sollte nicht länger und nicht bei höheren Temperaturen inkubiert werden, da insbesondere Membranproteine schnell aggregieren. Für die Elektrophorese legt man für 30 min einen Strom von 10 mA sowie 20 mA für weitere 2,5 h an. Als Elektrophoresepuffer wird 2,5 mM BAC, 150 mM Glycin und 50 mM *o*-Phosphorsäure verwendet. Nach der ersten Dimension wird das Gel für 30 min in 35% Isopropanol und 10% Essigsäure fixiert. Man färbt das Gel anschließend mit Coomassie Brilliant Blue an und äquilibriert die gewünschte Anzahl an Gelstreifen durch dreimaliges Waschen für je 10 min in 100 mM Tris-HCl pH 6,8. Die Streifen werden anschließend durch 5-minütige Inkubation in SDS-Probenpuffer für die zweite Dimension vorbereitet. Nach der SDS-PAGE kann der Gelstreifen aus der ersten Dimension mit Silber gefärbt werden, um die Transfereffizienz der Proteine aus der ersten in die zweite Dimension zu überprüfen.

2.3.6 dSDS-PAGE

Als neueste Technik auf dem Gebiet der 2D-Elektrophorese wird die dSDS-PAGE (double SDS-PAGE) verwendet, deren Trennprinzip in beiden Dimensionen auf molekularer Masse

beruht (Rais *et al.*, 2004). Wie bereits für die BAC/SDS-PAGE beschrieben, trennen sich auch hier die Proteine entlang einer Diagonalen auf. Das anomale Laufverhalten hydrophober Proteine in Gelen geringer Acrylamidkonzentration führt zu einem Dispersionseffekt um die Diagonale. Sehr hydrophobe Proteine wandern in Gelen geringer Acrylamidkonzentration schneller als wasserlösliche Proteine gleicher molekularer Masse, erreichen aber in Gelen höherer Acrylamidkonzentration normale elektrophoretische Mobilitäten. Aus diesem Grund befinden sich sehr hydrophobe Proteine über der Diagonalen. Dieses Laufverhalten läßt sich durch eine erhöhte SDS-Bindung der sehr hydrophoben Proteine erklären, da ein erhöhtes Ladung/Masse-Verhältnis die elektrophoretische Mobilität insbesondere in Gelen geringer Acrylamidkonzentration erhöht. In Gelen hoher Acrylamidkonzentration ist dieser Einfluß aufgrund des dominierenden Siebeffektes geringer. Dem System ist demnach eigen, daß durch das anomale Migrationsverhalten hydrophober Proteine diese direkt visuell ausgemacht werden können, wenn zwischen der ersten und zweiten Dimension eine Differenz von 5 bis 6% in der Acrylamidkonzentration vorliegt. Mehrere Ansätze stehen hierbei zur Wahl. Gele mit oder ohne Harnstoff sowie die Kombination verschiedener Acrylamidkonzentrationen für die erste und zweite Dimension. Zusätzlich kann die Applikation verschiedener elektrophoretischer Systeme (Laemmli, 1970; Schägger und Jagow, 1987) sowie die Reihenfolge der Anwendung von hoch- und niederprozentiger Acrylamidkonzentration Einfluß auf die Qualität der elektrophoretischen Separation nehmen. Die Zugabe von Harnstoff kann die SDS-Bindung schwächen, was zu einer verstärkten Proteinaggregation führt. 6 M Harnstoff ist die maximale Konzentration, bei der dieser Effekt noch nicht zu beobachten ist. Allerdings kommt es aufgrund der Carbamoylierung zu Problemen in der Wärmeentwicklung. Dies kann durch Verwendung des Tris-Tricin-Systems umgangen werden, dessen Zusammensetzung saurer als die der Laemmli-Gele ist. Die Carbamoylierungsreaktion findet vorwiegend im Alkalischen statt.

Das optimale System für synaptische Vesikelproteine besteht aus einem 9%igen Tricin-SDS-Gel (Tabelle 5) für die erste und einem 15%igen Laemmli-Gel für die zweite Dimension.

	Trenngel	Sammelgel
40% Acrylamid:Bisacrylamid (29:1)	1,4 ml	318 µl
3 M Tris-HCl, 0,3% SDS, pH 8,45	2 ml	750 µl
Glycerin	0,6 g	-
H ₂ O ad	6 ml	3 ml
TEMED	3 µl	2,3 µl
10% APS	30 µl	23 µl

Tabelle 5. Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für ein 9%iges Tricin-SDS-Gel.

Die Proben werden vor dem Auftragen für 10 min bei 40°C inkubiert. Höhere Temperaturen sollten aufgrund der Gefahr von Proteinaggregation vermieden werden. Als Elektrophoresepuffer verwendet man 100 mM Tris pH 8,9 für die Anode sowie 100 mM Tris, 100 mM Tricin und 0,1% SDS pH 8,25 für die Kathode. Nach beendeter Elektrophorese werden entsprechende Gelstreifen für die zweite Dimension in 100 mM Tris, 150 mM HCl und 10% Glycerin für 30 min äquilibriert. Der Zusatz von Glycerin verhindert, daß der Gelstreifen aufquillt und erleichtert das Einfügen des Streifens auf das Gel für die zweite Dimension. Durch die Inkubation im Sauren verliert SDS seine Lösungswirkung, fixiert die Proteine im Gel und resultiert dadurch in einer verminderten Diffusion und schärferen Banden. Auf eine Anfärbung des Gelstreifens der ersten Dimension wird verzichtet, da dies den Transfer in die zweite Dimension aufgrund langer Äquilibrierungszeiten sehr in die Länge zieht und die Transfereffizienz herabsetzt. Das 15%ige Laemmli-Gel für die zweite Dimension setzt sich wie in Tabelle 6 beschrieben zusammen. Als Elektrophoresepuffer verwendet man 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1% SDS. Für die Auftrennung der Proteine werden die unter 2.3.1.1 beschriebenen Parameter verwendet.

	Trenngel	Sammelgel
40% Acrylamid:Bisacrylamid (29:1)	11,5 ml	1,4 ml
1,5 M Tris pH 8,8, 0,4% SDS	15 ml	-
100 mM Tris, 150 mM HCl, pH 7,0	-	2 ml
H ₂ O ad	30 ml	6 ml
TEMED	15 µl	3 µl
10% APS	150 µl	30 µl

Tabelle 6. Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für ein 15%iges SDS-Gel nach Laemmli.

2.4 Methoden zur Anfärbung von Proteinen

Um Proteine in Gelen sichtbar zu machen, stehen diverse Techniken zur Verfügung. Am sensitivsten haben sich hierbei die Färbungen mit Silber erwiesen, die jedoch zum großen Teil inkompatibel mit der Massenspektrometrie sind. Obwohl Färbungen wie die nach Shevchenko (Shevchenko *et al.*, 1996) oder Rais (Rais *et al.*, 2004) für eine spätere massenspektrometrische Analyse einsetzbar sind, entstehen diverse Probleme. All diese Färbetechniken verzichten auf Quervernetzer wie Glutaraldehyd, enthalten jedoch Schritte mit Formaldehyd, welches zwar in sehr geringer Konzentration eingesetzt wird, aber dennoch in einer Vernetzung der Proteine über Methylenbrücken resultiert, wenn auch deutlich langsamer als bei Verwendung von Glutaraldehyd. Es empfiehlt sich daher, die silbergefärbten Gele schnell weiterzuverarbeiten. Im Allgemeinen ist die Peptidausbeute dennoch geringer als aus

coomassiegefärbten Gelen. Zusätzlich ist Silberfärbungen eine fehlende Proportionalität zwischen Signalintensität und Proteinkonzentration eigen.

Während der Silberfärbung erfolgt nach Fixierung der Proteine im Gel die Sensitivierung mit Natriumthiosulfat, welches durch Komplexbildung mit unspezifisch gebundenem Silber die Hintergrundfärbung der Gele reduziert und dadurch unlösliche Präzipitate auf dem Gel verhindert. Es verlangsamt zudem die Kinetik der Silberreduktion. Während der anschließenden Inkubation mit Silber werden Silberionen von den Proteinen gebunden und durch funktionelle Gruppen und die Peptidbindung zu Silberkeimen reduziert. Durch starke Reduktionsmittel werden alle Silberionen zu metallischem Silber reduziert. Dies geschieht in der Nähe der Silberkeime schneller als im übrigen Gel, so daß sich die Proteine schnell anfärben. Gestoppt wird die Reaktion durch starke pH-Änderung ins Saure oder durch Zugabe von EDTA, welches freies Silber komplexiert.

Dagegen führen coomassiebasierende Techniken zu keinerlei Problemen bei der Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie. Die Anfärbung beruht auf der unspezifischen Bindung des Farbstoffes an kationische und nichtpolare, hydrophobe Aminosäuren. Allerdings ist diese Färbemethode trotz verbesserter Protokolle weniger sensitiv als die Silberfärbung. Kolloidale Färbemethoden basieren auf den kolloidalen Eigenschaften des Coomassie G-250 in wäßrigen oder methanolischen Lösungen, die anorganische Säuren und hohe Salzkonzentrationen enthalten. Der freie Farbstoff in Lösung wird aufgrund des hydrophoben Effektes dramatisch reduziert und resultiert in einer geringen Hintergrundfärbung und hohen Affinität des Farbstoffes für die Proteine im Gel.

2.4.1 Silberfärbung nach Koepsell *et al.*

Nach beendeter Gelelektrophorese inkubiert man das Gel für 1 h oder über Nacht in 50% Methanol und 10% Essigsäure (Koepsell *et al.*, 1984). Man wäscht zweimal für 30 min in 10% Isopropanol und 10% Essigsäure und inkubiert anschließend für 30 min in 10% Glutaraldehyd. Es folgen vier 15-minütige Waschschrte in H₂O. Man inkubiert für 30 min in 10 mM DTT, wäscht kurz mit H₂O und gibt anschließend die frisch angesetzte ammoniakalische Silberlösung (60 mM AgNO₃, 20 mM NaOH, 0,35% NH₃) für 3,5 min zu. Man wäscht viermal mit H₂O und reduziert mit 0,019% Formaldehyd und 24 mM Citratimid. Gestoppt wird die Reaktion durch 5-minütiges Waschen in 5%iger Essigsäure. Diese Färbung wurde überall dort eingesetzt, wo nicht explizit auf andere Färbetechniken hingewiesen wird.

2.4.2 Silberfärbung nach Shevchenko *et al.*

Nach beendeter Gelelektrophorese fixiert man die Proteine im Gel für 30 min in 50% Methanol und 10% Essigsäure (Shevchenko *et al.*, 1996). Man wäscht für 18 h in H₂O und sensitiviert das Gel anschließend für 2 min in frisch angesetztem, 0,02%igen Natriumthiosulfat. Es folgen zwei einminütige Waschschrte in H₂O und eine Inkubation für 30 min in kaltem, 0,1%igen Silbernitrat. Entwickelt wird nach zweimaligem Waschen in H₂O mit 0,04% Formaldehyd und 2% Na₂CO₃. Die Reaktion wird durch Inkubation in 5%iger Essigsäure gestoppt.

2.4.3 Silberfärbung nach Rais *et al.*

Nach beendeter Gelelektrophorese fixiert man für 15 min in 50% Methanol und 10% Essigsäure, wäscht zweimal für 15 min mit H₂O und sensitiviert anschließend für 15 min in 0,005%igem Natriumthiosulfat (Rais *et al.*, 2004). Das Gel wird für 15 min in 0,1%igem, kaltem Silbernitrat inkubiert und kurz mit H₂O gewaschen, bevor die Entwicklung erfolgt. Hierzu inkubiert man in 0,036% Formaldehyd und 2% Na₂CO₃. Gestoppt wird die Reaktion durch 10-minütiges Waschen in 50 mM EDTA. Gefärbte Gele werden in H₂O gelagert.

2.4.4 Coomassie Brilliant Blue-Färbung

Das Gel wird für 15 min in 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250, 7,5% Essigsäure und 50% Methanol inkubiert (Meyer und Lamberts, 1965). Anschließend entfärbt man dreimal für je 20 min in 50% Methanol, 7,5% Essigsäure und 5% Glycerin. Bis zur hinreichenden Entfärbung des Gels folgen weitere Waschschrte mit 5% Methanol, 7,5% Essigsäure und 5% Glycerin. Das Gel wird in 5%iger Essigsäure gelagert.

2.4.5 Kolloidale Coomassie Brilliant Blue-Färbung

Das Gel wird für 3 h in 40% Methanol und 10% Essigsäure fixiert und zweimal für 10 min mit H₂O gewaschen (Neuhoff *et al.*, 1988). Man färbt für ein bis sieben Tage in 0,08% Coomassie Brilliant Blue G-250, 8% Ammoniumsulfat, 0,96% *o*-Phosphorsäure und 20% Methanol. Das Gel wird bis zur hinreichenden Entfärbung in H₂O inkubiert.

2.5 Immunassays

2.5.1 Dot Blot

Der Dot Blot eignet sich besonders als Schnelltest, da auf eine elektrophoretische Trennung des Proteingemisches verzichtet wird. Von Nachteil ist jedoch die Möglichkeit der Entstehung von Immunsignalen aufgrund unspezifischer Reaktionen der Antikörper. Diese können im Vergleich zu einer gelelektrophoretischen Analyse nicht durch Inspektion der molekularen Masse ausgeschlossen werden. Hat man jedoch die Antikörper bereits einem Immunassay nach Elektrophorese unterzogen und konnte gezeigt werden, daß keine unspezifischen Signale entstehen, so kann der Dot Blot problemlos eingesetzt werden.

Von proteinhaltigen Lösungen wird 1 µl auf eine Nitrozellulosemembran getropft. Nachdem die Membran getrocknet ist, blockiert man unspezifische Bindungen durch Inkubation für 30 min in 3% Magermilchpulver (MMP) in TBS. Die Membran wird dreimal kurz mit TBS gewaschen und im Anschluß über Nacht bei 4°C mit dem Erstantikörper inkubiert. Vor Applikation des entsprechenden Zweitantikörpers in 3% MMP in TBS für 1 h bei Raumtemperatur wäscht man für 10 min in 3% MMP in TBS, zweimal für je 10 min in 3% MMP und 0,05% NP-40 in TBS sowie zweimal für je 5 min in 3% MMP in TBS. Vor der Detektion wird die Membran nochmals für 10 min in TBS, zweimal für je 10 min in 0,1% Tween-20 in TBS sowie zweimal für 5 min in TBS gewaschen. Anschließend erfolgt die Proteindetektion mittels Chemilumineszenz.

2.5.2 Western Blot

Proteingemische werden nach elektrophoretischer Auftrennung mit einer Semidry-Apparatur auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Towbin *et al.*, 1979). Für den Blotvorgang werden hierfür von unten nach oben eine Lage Whatman-Papier, eine Nitrozellulosemembran, das Gel und nochmals eine Lage Whatman-Papier übereinandergelegt und in Transferpuffer (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,05% SDS, 1 mM EDTA, 20% Methanol) eingeweicht. Geblottet wird bei 0,8 mA/cm² für 95 min. Das Gel kann anschließend zur Überprüfung der Transfereffizienz angefärbt werden. Die Nitrozellulosemembran wird wie unter 2.5.1 beschrieben behandelt.

Für den Einsatz von Phosphoantikörpern empfiehlt sich ein abweichendes Protokoll. Da Magermilchpulver phosphorylierte Proteine enthält und zu einer starken Hintergrundfärbung

führen würde, wäscht man die Membran nach dem Blotten für 10 min in TBS und blockiert anschließend für 1 h in 5% BSA und 0,1% Tween-20 in TBS. Vor Applikation des ersten Antikörpers bei 4°C über Nacht wäscht man zweimal für 10 min mit TBS-TT (0,05% Tween-20 und 0,2% Triton X-100 in TBS). Es schließen sich zwei Waschschriffe für je 10 min in TBS-TT sowie ein Waschschriff für 10 min in TBS an. Der zweite Antikörper wird 1:2000 in 5% MMP und 0,1% Tween-20 in TBS verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur appliziert. BSA würde an dieser Stelle für die anschließende sensitive Chemilumineszenz nicht ausreichen. Anschließend wäscht man viermal für 10 min mit TBS-TT.

2.5.3 Detektion per Chemilumineszenz

Die Detektion per Chemilumineszenz beruht auf der Emission von Licht, das durch die Oxidation des zyklischen Diacylhydrazids Luminol in Gegenwart von H₂O₂ und der Meerrettich-Peroxidase entsteht. Das Emissionsmaximum liegt bei 428 nm, so daß mit einem blaulichtsensitiven Autoradiographiefilm detektiert werden kann.

Nitrozellulosemembranen werden unter Schwenken für 1 min in Lösung A und nach Zugabe von Lösung B für eine weitere Minute inkubiert (Vettermann *et al.*, 2002). Das Chemilumineszenzsignal wird anschließend auf Röntgenfilm detektiert.

Lösung A 1 ml 1 M Tris-HCl pH 8,5
 100 µl 250 mM Luminol in DMSO
 45 µl 90 mM Coumarinsäure in DMSO
 ad 10 ml H₂O

Lösung B 3.75 µl 30% H₂O₂
 ad 10 ml H₂O

2.6 Färbetechniken für Nitrozellulosemembranen

Die Möglichkeit, Nitrozellulosemembranen anfärben und im Anschluß ungehindert eine Immundetektion mittels Chemilumineszenz durchführen zu können, erlaubt eine direkte Zuordnung detektierter Immunsignale mit dem korrespondierenden Proteinmuster auf der Membran. Auch hier stehen wie schon bei den Gelfärbemethoden verschiedene Techniken zur Wahl.

2.6.1 Ponceau S

Nitrozellulosemembranen werden nach dem Blotten für 10 min in der Färbelösung (0,2% Ponceau S, 3% Trichloressigsäure, 3% Sulfosalicylsäure) geschwenkt (Salinovich und Montelaro, 1986). Entfärbt wird durch dreimaliges Waschen mit 5% Essigsäure.

2.6.2 India Ink

Die Färbung mit India Ink beruht auf einer nicht kovalenten Wechselwirkung kolloidaler Kohlenstoffpartikel mit immobilisiertem Protein (Klarskov und Naylor, 2002). Nach erfolgtem Blotten werden Nitrozellulosemembranen für je 5 min nacheinander in 20% Methanol und Wasser gewaschen und für 10 min in 0,5% Polyvinylpyrrolidin-40 in 0,1%iger Essigsäure geblockt. Anschließend färbt man für 30 min bis 3 h in 0,05% Tween-20, 1% Essigsäure und 0,1% India Ink in PBS (150 mM M NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄, pH 7,2). Nach Dokumentation entfärbt man die Membran durch Waschen mit H₂O.

2.6.3 Silber

Nach erfolgtem Blotten werden Nitrozellulosemembranen kurz in H₂O gewaschen und anschließend mit frisch angesetzter Silberlösung (2% Natriumcitrat-Dihydrat, 0,8% Eisen-II-Sulfat-Heptahydrat, 0,2% Silbernitrat) unter Schwenken für 10 min inkubiert (Vettermann *et al.*, 2002). Zum Stoppen der Reaktion wäscht man die Membranen unter fließendem Wasser. Man entfärbt im Anschluß zweimal für je 5 min mit 15 mM Kaliumhexacyanoferrat-(III) und 50 mM Natriumthiosulfat und wäscht dreimal für je 5 min in Wasser. Die Membran wird vor dem Blocken in Magermilchpulver nochmals für 5 min in 0,1% Tween-20 in TBS inkubiert.

2.7 Dephosphorylierung

Für die Dephosphorylierung von Proteinen aus Gesamthirnhomogenat solubilisiert man 30 µg Protein in Lambda Protein Phosphatase (λPP)-Puffer und teilt den Ansatz in gleiche Volumina auf. Ein Volumen wird mit 1200 U λPP für 4 h bei 30°C, die Kontrolle unter gleichen Bedingungen ohne Phosphatase inkubiert.

2.8 Phasentrennungen und Fraktionierungstechniken

Aufgrund der Probleme in der Identifizierung von Membranproteinen über Gelelektrophorese und Massenspektrometrie sowie der Komplexität des Proteinmusters eines Organells sind

weitere Subfraktionierungstechniken von Vorteil. Insbesondere Techniken, die auf temperaturinduzierten Phasentrennungen und/oder auf Gemischen aus Detergenz und Polymeren beruhen, haben sich als geeignet erwiesen. Zusätzlich können organische Lösungsmittelsysteme sowie Behandlung mit Salz und extreme pH-Werte zur Subfraktionierung eingesetzt werden.

2.8.1 Phasentrennung mit Triton X-114

Die Phasentrennung mittels Triton X-114 basiert auf einer mikroskopischen Phasenseparation am Wolkenpunkt (22°C) des Detergenz (Bordier, 1981), die sich als sekundäre Assoziationen kleiner Detergenzmizellen in große Mizellenaggregate manifestiert. Mit erhöhter Temperatur schreitet die Separation voran, bis sich zwei klare Phasen gebildet haben, eine reich und eine arm an Detergenz. Die Temperatur des Wolkenpunktes hängt hierbei stark von der Zahl der hydrophilen Oxyethyleneinheiten am hydrophoben Octylphenylrest ab. Triton X-114 hat gegenüber Triton X-100 demnach den entscheidenden Vorteil, daß der Wolkenpunkt bereits bei niedrigeren Temperaturen erreicht wird.

Vor Verwendung von Triton X-114 muß es zur Entfernung von Oxidationsprodukten präkonditioniert werden. Hierzu löst man 1,5 g Triton X-114 auf Eis in 50 ml TBS. Man erwärmt zum Überschreiten des Wolkenpunktes auf 37°C, was in einer Zweiphasenbildung resultiert. Zur Trennung der Phasen zentrifugiert man für 10 min bei 10.000 g. Die wäßrige Phase wird dekantiert, die Detergenzphase auf Eis mit TBS auf 50 ml aufgefüllt. Man wiederholt Aufwärmen, Zentrifugation und erneute Inkubation auf Eis für weitere zwei Male und erhält als resultierende Detergenzphase eine ~12%ige Triton X-114-Lösung, die dunkel und unter möglichst geringer Sauerstoffzufuhr gelagert werden sollte.

Zur Elution synaptischer Vesikelproteine von den Magnetbeads inkubiert man für 1 h bei 0°C in 1% Triton X-114 in TBS pH 7,4. Nach diesem Schritt eluiert man unter Standardbedingungen, um zu überprüfen, wie effizient die Elution per Triton verläuft. Vom Triton-Eluat gibt man 200 µl auf ein 300 µl Saccharosekissen (6% Saccharose, 0,06% Triton X-114 in TBS), das in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß vorgelegt wurde. Während der anschließenden zehnmütigen Kondensation bei 30°C trübt sich die Lösung ein. Durch Zentrifugation für 5 min bei 12.000 g erhält man die Detergenzphase als öligen Tropfen im Boden des Reaktionsgefäßes und die wäßrige Phase als Überstand. Die wäßrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5% Triton X-114 supplementiert. Das Tensid

wird für 2 min bei 0°C aufgelöst und auf ein frisches Saccharosekissen gegeben. Man kondensiert erneut für 5 min bei 30°C und zentrifugiert im Anschluß für 5 min bei 12.000 g. Die Detergentropfen werden vereinigt und mit Aceton präzipitiert. Die wäßrigen Phasen werden nach Vereinigung mit 2% Triton X-114 versetzt. Man inkubiert für 2 min bei 0°C sowie für 5 min bei 30°C. Nach Zentrifugation für 5 min bei 12.000 g verwirft man die restliche Detergenzphase und präzipitiert die wäßrige Phase mit Aceton. Um Triton X-114 möglichst vollständig zu entfernen, wird die Acetonfällung mehrmals wiederholt.

2.8.2 ProteoPrep Universal Extraction Kit

Das Universal Extraction Kit basiert auf der Trennung löslicher zytoplasmatischer Proteine von Membranproteinen mittels Tris (Molloy *et al.*, 1998). Prinzipiell beruht die Technik auf der hochsalzinduzierten Schwächung elektrostatischer Wechselwirkungen, über die Proteine peripher mit Membranen assoziiert sind. Die Anwendung des Kits resultiert in zwei Fraktionen, die in Membranproteinen bzw. löslichen Proteinen angereichert sind. Im Vergleich zum ProteoPrep Membrane Extraction Kit (siehe 2.8.3) enthält die Probe mit den Membranproteinen zusätzlich membranassoziierte Proteine.

Vor Elution der synaptischen Vesikelproteine von den Magnetbeads wäscht man zweimal mit TBS und gibt anschließend das *Soluble Cytoplasmic Extraction Reagent* zu. Man inkubiert für 15 min bei Raumtemperatur unter Schwenken des Reaktionsgefäßes. Der Extrakt wird in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, die Vesikelproteine anschließend mit 2% NP-40 in TBS von den Magnetbeads eluiert.

2.8.3 ProteoPrep Membrane Extraction Kit

Das Membrane Extraction Kit basiert auf einer alkalischen Natriumcarbonatbehandlung, die membranassoziierte Proteine entfernt und dadurch eine klassische Membranfraktion kreiert (Fujiki *et al.*, 1982), die im Gegensatz zum ProteoPrep Universal Extraction Kit ausschließlich integrale Membranproteine enthält. Natriumcarbonat pH 11 führt hierbei zu einer pH-abhängigen Schwächung elektrostatischer Wechselwirkungen, die die Grundlage der peripheren Assoziation von Proteinen an Membranen bilden.

Ausgangsmaterial sind an Magnetbeads gebundene synaptische Vesikel. Vor der Elution der synaptischen Vesikelproteine wäscht man zweimal mit TBS und gibt anschließend das

Soluble Cytoplasmic and loosely-bound Membrane Protein Extraction Reagent zu. Man inkubiert für 1 h bei 4°C unter Schwenken. Der Überstand wird abgenommen und in einer Vakuumentrifuge getrocknet. Die Magnetbeads mit den verbliebenen gebundenen Vesikeln werden anschließend mittels Zugabe von 2% NP-40 in TBS voneinander getrennt.

2.8.4 Phasentrennung mit Digitonin und PEG-6000

Das sehr milde Detergenz Digitonin führt in Kombination mit Polyethylenglykol 6000 (PEG-6000) bei 0°C zu einer Phasenseparation in Detergenz- und Polymerphase (Prehm *et al.*, 1996). Die untere Detergenzphase enthält hierbei Membranproteine, die obere Polymerphase lösliche Proteine.

Synaptische Vesikelproteine werden durch Zugabe von 2% Digitonin in TBS von den Magnetbeads eluiert. Man inkubiert unter gelegentlichem Schwenken für 2 h auf Eis. Um die Effizienz der Elution des sehr milden Detergenz zu überprüfen, schließt sich eine Elution unter Standardbedingungen mit 2% NP-40 in TBS an. Zu den digitoninhaltigen Proben gibt man auf Eis PEG-6000 in einer Endkonzentration von 13%. Nach Vortexen trübt sich die Probe ein. Zur Induktion der Phasentrennung zentrifugiert man für 30 min bei 100.000 g und 4°C. Sowohl Überstand als auch Pellet werden mit 50% Aceton präzipitiert.

2.8.5 Phasentrennung mit Methanol und Chloroform

Die Methanol/Chloroform-Phasenseparation basiert auf der von Yerushalmi entwickelten Technik (Yerushalmi *et al.*, 1995). Die Zugabe von Chloroform führt zur Auflösung von Membranen, Methanol eignet sich als organisches Lösungsmittel für die Lösung hydrophober Proteine. Die Phasentrennung wird durch Zugabe von Wasser induziert. Die erhaltene obere wässrige Phase enthält hierbei lösliche Proteine, die untere organische Phase Membranproteine.

Die Elution der Vesikelproteine von den Magnetbeads erfolgt durch Zugabe eines 1:1-Gemisches Methanol/Chloroform und 30-minütiger Inkubation auf Eis. Zur Überprüfung der Elutionseffizienz eluiert man ein zweites Mal mit 2% NP-40 in TBS. Der Methanol/Chloroform-Extrakt wird mit einem halben Volumen Wasser versetzt und gut gemischt. Man inkubiert für 5 min bei 25°C und induziert die Phasentrennung durch Zentrifugation für 10 min bei 12.000 g und 4°C. Sowohl die obere wässrige Phase als auch die

untere organische Phase wird in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Wahlweise werden mittels SDS-Probenpuffer eluierte synaptische Vesikelproteine wie folgt behandelt: Zu 100 µl Probe gibt man langsam 900 µl eiskalte Chloroform/Methanol-Lösung verschiedener Mischungsverhältnisse (0:9 bis 9:0) und inkubiert die Mischung für 15 min auf Eis (Seigneurin-Berny *et al.*, 1999). Die Phasentrennung wird durch Zentrifugation für 20 min bei 12.000 g und 4 °C induziert. Beide Phasen werden in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

2.8.6 Phasentrennung mit PEG-40000 und Dodecylmaltosid in Anwesenheit von SDS

Eine weitere Möglichkeit, Proteine über Phasentrennungen selektiv anzureichern, bildet das Zweiphasensystem aus *n*-Dodecyl-β-D-Maltosid (DDM) und Polyethylenglykol 40000 (PEG-40000), wobei das Polymer die Phasentrennung induziert. Membranproteine werden hierbei selektiv in der Detergenzphase, lösliche Proteine in der Polymerphase angereichert (Everberg *et al.*, 2004). Die Einführung von SDS unterhalb dessen kritischer Mizellarkonzentration stellt sicher, daß SDS nicht solubilisierendes Detergenz ist und resultiert in einer effizienteren Entfernung löslicher Proteine durch Bildung gemischter SDS/Detergenz-Mizellen und einer damit einhergehenden elektrostatischen Potentialdifferenz zwischen den beiden Phasen. Hierfür sollte das System auf pH 9 oder höher eingestellt werden, da ein basischer pH-Wert eine negative Nettoladung der Proteine bewirkt. Folglich wandern aufgrund der SDS-Komplexierung durch Repulsion der negativ geladenen Mizellen in der Detergenzphase mehr lösliche Proteine in die Polymerphase. Proteinkomplexe bleiben intakt, da SDS in der eingesetzten Konzentration nicht denaturierend wirkt. Im Gegensatz zu Triton X-114 kann bei 0°C und mit milden Detergenzien gearbeitet werden kann, was vorteilhaft für die Proteinstabilität ist. Die Polymere stabilisieren zusätzlich die Proteine, und die verwendeten Polymer/Detergenz-Systeme besitzen eine hohe Ladungskapazität.

Synaptische Vesikelproteine werden unter Schwenken durch Inkubation mit 16,6% Dodecylmaltosid in 10 mM Tris pH 9 für 30 min bei 4°C von den Magnetbeads eluiert. Die Effizienz der Elution mit Dodecylmaltosid wird durch Elution mit 2% NP-40 in TBS überprüft. Der Extrakt wird mit 4% PEG-40000 und 3 mM SDS in 10 mM Tris pH 9 versetzt und unter Schwenken für 15 min bei 4°C inkubiert. Durch Zentrifugation für 10 min bei 1600 g und 4°C wird die Phasentrennung in Pellet und Überstand induziert. Beide Phasen werden mit Aceton präzipitiert.

2.8.7 Phasentrennung mit PEG-6000 und NP-40 mit/ohne SDS

Synaptische Vesikelproteine werden durch Zugabe von 2% NP-40 in TBS pH 9 bzw. pH 10 und 30-minütige Inkubation auf Eis unter Schwenken von den Magnetbeads eluiert. Man supplementiert anschließend mit 13% PEG-6000 und 3 mM SDS und inkubiert für 15 min bei 4°C. Die Phasentrennung wird durch Zentrifugation für 30 min bei 100.000 g und 4°C induziert. Pellet und Überstand werden mit Aceton präzipitiert.

2.8.8 Phasentrennung mit PEG-40000 und NP-40

Man eluiert unter Schwenken synaptische Vesikelproteine von den Magnetbeads durch Zugabe von 2% NP-40 in TBS pH 7,4 für 30 min auf Eis. Auf Eis gibt man anschließend 13% PEG-40000 zu und vortext, bis sich die Probe eintrübt. Die Phasentrennung wird durch 30-minütige Zentrifugation bei 4°C und 100.000 g induziert. Das zähe Pellet und der Überstand werden mit Aceton präzipitiert.

2.9 Techniken zur Konzentrierung von Proteinen

Für die Massenspektrometrie ist es unerlässlich, Proben mit synaptischen Vesikelproteinen sehr konzentriert gelelektrophoretisch aufzutrennen, um insbesondere gering abundante Proteine detektieren zu können. Verschiedene Konzentrierungsmethoden stehen hierbei zur Wahl: Proteinpräzipitation, Eintrocknen in der Vakuumzentrifuge oder Ultrazentrifugation.

2.9.1 Präzipitation mit Trichloressigsäure

Zu einer proteinhaltigen Probe gibt man 0,0015% Desoxycholsäure und inkubiert nach gutem Mischen für 10 min bei Raumtemperatur. Nach Addition von 10% Trichloressigsäure präzipitiert man über Nacht bei 4°C. Das Präzipitat wird für 45 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert und anschließend mit einem kalten Aceton/HCl-Gemisch (200:1) gewaschen. Nach Zentrifugation für 30 min bei 12.000 g und 4°C dekantiert man den Überstand und trocknet das Pellet.

2.9.2 Aceton-Präzipitation

Für eine 50%ige Fällung mit Aceton mischt man Probe und Aceton 1:1 (v/v) und inkubiert die Mischung über Nacht bei -20°C. Die Proteine werden durch 15-minütige Zentrifugation bei 16.000 g und 4°C pelletiert.

2.9.3 Ethanol- Präzipitation

Für eine 50%ige Fällung mit Ethanol mischt man Probe und Ethanol 1:1 (v/v) und inkubiert die Mischung über Nacht bei -20°C. Die Proteine werden durch 15-minütige Zentrifugation bei 16.000 g und 4°C pelletiert.

2.9.4 Methanol/Chloroform- Präzipitation

Zu 100 µl Probe gibt man 400 µl Methanol und mischt durch Vortexen. Es folgt ein Zentrifugationsschritt für 1 min bei 9.000 g. Man gibt 200 µl Chloroform zu der Suspension, mischt durch Vortexen und zentrifugiert erneut. Zur Induktion der Phasentrennung gibt man 300 µl Wasser zu, mischt durch Vortexen und zentrifugiert erneut. Die methanolhaltige Oberphase wird verworfen. Zu der verbliebenen Lösung, bestehend aus der unteren Chloroformphase und der proteinhaltigen Interphase, gibt man 300 µl Methanol und mischt durch Vortexen. Nach Zentrifugation für 10 min bei 9.000 g entfernt man den Überstand und trocknet das Proteinpellet.

2.9.5 Vakuumzentrifuge

Proteinhaltige Proben werden bei Raumtemperatur in einer Vakuumzentrifuge bis zur Trockne eingeengt.

2.9.6 Ultrazentrifugation

Für die Konzentrierung von Proteinen mittels Ultrazentrifugation zentrifugiert man für 2 h bei 4°C und 100.000 g.

2.10 Proteinquantifizierungen

2.10.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Spector

Die Konzentrationsbestimmung nach Spector basiert auf der von Bradford entwickelten Technik (Spector, 1978). Die Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine verschiebt das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm. Die Eichreihe wird ausgehend von 100 µg/ml BSA wie in Tabelle 7 dargestellt angefertigt.

BSA [μ l]	H ₂ O [μ l]	Spector [μ l]
0	100	900
10	90	900
20	80	900
30	70	900
40	60	900
50	50	900
60	40	900
70	30	900
80	20	900

Tabelle 7. Verdünnungsreihe für die Standardreihe der Proteinbestimmung nach Spector.

Proteinhaltige Lösungen werden in 100 μ l Wasser verdünnt, zu 900 μ l Spectorlösung (0,01% CBB G-250, 5% Ethanol, 8,5% Phosphorsäure) pipettiert und vor der Messung für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Technik läßt keine Messung detergenzhaltiger Proben zu, da Detergenzien mit der Bindung des Coomassie an das Protein interferieren. Proteinpräzipitation sollte hier der erste Schritt sein, um das Detergenz zu entfernen.

2.10.2 Photometrische Quantifizierung von Western Blots

2.10.2.1 Quantifizierung über fluoreszenzgekoppelte Zweitantikörper

Die Firma LICOR Biosciences bietet ein System an, über das mit Hilfe von fluoreszierenden Zweitantikörpern und dem Odyssey-Scanner über einen breiten Konzentrationsbereich lineare Messungen von Immunsignalen möglich sind. Hierbei können durch Einsatz fluoreszierender Zweitantikörper aus verschiedenen Spezies zeitgleich zwei unterschiedliche Proteine detektiert werden.

Nach dem Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen werden diese mehrere Minuten in TBS gewaschen. Blockieren der unspezifischen Bindungen erreicht man durch einstündige Inkubation in Odyssey Blocking Puffer. Die Mischung von Erstantikörpern (je 1:1000 in Odyssey Blocking Puffer) wird für 1 h bei Raumtemperatur appliziert. Zur Herabsetzung des Hintergrundes empfiehlt sich die Verwendung von 0,1% Tween-20. Im Anschluß erfolgt viermaliges Waschen für je 5 min in 0,1% Tween-20 in TBS. Die fluoreszierenden Zweitantikörper werden 1:10.000 in Odyssey Blocking Puffer verdünnt und für 60 min im Dunkeln appliziert. Auch hier hilft die Verwendung von 0,1% Tween-20 sowie zusätzlich der Einsatz von 0,01% SDS. Vor dem Scanvorgang werden die Nitrozellulosemembranen viermal für je 5 min in 0,1% Tween-20 in TBS gewaschen und in TBS gelagert.

2.10.2.2 Quantifizierung über Kodak V 1.0

Die Kodak-Software ist dafür ausgerichtet, Signale auf Röntgenfilm zu quantifizieren. Zu beachten ist hierbei, daß ausgewählte Röntgenfilme keine Überexposition zeigen dürfen, so daß im linearen Bereich gemessen werden kann. Die Signale werden hierbei im Modus „Summe“ analysiert.

2.11 Difference gel electrophoresis (DIGE)

Das DIGE-System (Ünlü *et al.*, 1997) eignet sich für eine vergleichende Proteomanalyse wie die Analyse zweier funktionell unterschiedlicher Zustände. Der Vorteil des Systems gegenüber anderen verfügbaren Techniken liegt darin, daß in einem einzigen Gel verschiedene Proben direkt miteinander verglichen werden können. Durch die Einführung eines internen Standards, einem Gemisch aller an einem Versuch beteiligter Proben, und die dadurch stattfindende Normalisierung ist zudem ein Vergleich verschiedener Präparationen möglich, was den Einfluß biologischer Variationen und Gel-zu-Gel-Variationen minimiert. Die Proben werden hierbei vor der elektrophoretischen Trennung mit drei Farbstoffen gelabelt, die in Ladung und Masse identisch sind und dadurch zu keiner ungleichen Beeinflussung des Laufverhaltens gleicher Proteine führen. Die Farbstoffe zeigen große Sensitivität – bis zu 125 pg Protein können detektiert werden. Die kovalente Markierung der Proteine findet über die ϵ -Aminogruppe der Lysine statt. Da nur etwa 1 bis 2% der Lysine über die aktivierten Ester der CyDyes markiert werden (Minimallabeling) und einem tryptischen Verdau damit nicht mehr zur Verfügung stehen, können die Proben direkt für eine massenspektrometrische Analyse eingesetzt werden.

2.11.1 Versuchsdesign

Für die funktionelle Analyse zweier physiologisch unterschiedlicher Zustände synaptischer Vesikelproteine werden pro Zustand drei biologische Replikate generiert (Burré *et al.*, 2006). Jede der sechs Präparationen à 75 μ g wird zu zwei Dritteln mit Cy3 bzw. Cy5 markiert. Ein Drittel aller Probenvolumina wird für die Bildung des internen Standards verwendet und mit Cy2 gelabelt (Tabelle 8). Für jedes DIGE-Gel werden anschließend jeweils 50 μ g Cy3-gelabelte Kontrolle, 50 μ g Cy5-gelabelte Depolarisation und 50 μ g Cy2-gelabelter interner Standard vereinigt.

	Probe	einzusetzendes Protein	Labeling mit	aufgetrennt auf
K1	Kontrolle 1	50 µg	400 pmol Cy3	DIGE-Gel 1
K2	Kontrolle 2	50 µg	400 pmol Cy3	DIGE-Gel 2
K3	Kontrolle 3	50 µg	400 pmol Cy3	DIGE-Gel 3
D1	Depolarisation 1	50 µg	400 pmol Cy5	DIGE-Gel 1
D2	Depolarisation 2	50 µg	400 pmol Cy5	DIGE-Gel 2
D3	Depolarisation 3	50 µg	400 pmol Cy5	DIGE-Gel 3
IS	Interner Standard	Σ 25 µg (K1+K2+K3+D1+D2+D3)	1200 pmol Cy2	DIGE-Gele 1, 2 bzw. 3

Tabelle 8. Design des DIGE-Versuches.

2.11.2 Vorbereitung der CyDyes

Die Rekonstitution der CyDyes findet in frischem DMF statt. Nach Auftauen der Dyes für 5 min bei Raumtemperatur werden diese auf eine Konzentration von 1 mM eingestellt. Man mischt 30 Sekunden durch starkes Vortexen. Die Dyes können nun direkt verwendet oder bei -15°C bis -30°C gelagert werden. Diese Stock-Solution muß jedoch vor Verwendung verdünnt werden. Die Herstellung der 400 µM Arbeitslösung besteht in der Mischung eines Volumens Stock-Solution und 1,5 Volumen DMF. In der Regel werden für die weitere Anwendung 2 µl CyDye und 3 µl DMF zu 400 pmol/µl gemischt. Die Labeling-Reaktion erfolgt dann durch Zugabe von 1 µl CyDye.

2.11.3 Markierung

Das Markieren der Proteine findet während der Immunpräzipitation nach Kopplung der synaptischen Vesikel an die Magnetbeads statt (Burré *et al.*, 2006). Nach dreimaligem Waschen mit TBS pH 7,4 wird der pH-Wert der Lösung durch erneutes Waschen mit TBS pH 8,5 auf den erforderlichen Wert für die Labeling-Reaktion gebracht. Alle nachfolgenden Schritte werden im Dunkeln durchgeführt, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden. Man markiert 50 µg Protein mit 400 pmol CyDye in TBS pH 8,5 für 30 min auf Eis. Fraktionen aus Synapsen unter Ruhebedingung werden mit Cy3 markiert, solche aus depolarisierten Synapsen mit Cy5. Eine gemischte Probe aus allen experimentellen Ansätzen wird mit Cy2 markiert und dient als interner Standard. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 µl 10 mM Lysin für 10 min auf Eis gestoppt. Im Anschluß wäscht man erneut mit TBS pH 7,4 und eluiert mit 2% NP-40 in TBS für 30 min auf Eis. Die Eluate werden anschließend mit 50% Aceton präzipitiert.

2.11.4 Elektrophorese

Als Elektrophoresesystem wird das BAC/SDS-System verwendet. Hierzu wird auf jedes der drei BAC-Gele eine Mischung aus je 50 µg Cy2-, Cy3- und Cy5-gelabelter Probe aufgetragen (Tabelle 8). Es ist darauf zu achten, daß während der Elektrophorese und der Äquilibrationsschritte kein Licht an die Proben dringt, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern.

2.11.5 Analyse

2.11.5.1 Scan und statistische Auswertung

Jedes Gel wird mittels des Typhoon 9400-Scanners gescannt: ein Scan für jeden der drei CyDyes bei 100 µm Auflösung (Tabelle 9). Die Anwendung des Exclusion-Filters erlaubt die Entfernung aller Spots, die keine Proteine darstellen. Die gescannten Bilder werden anschließend von der DeCyder Image-Software übereinandergelegt und verglichen.

Fluorophor	Emissionsfilter (nm)	Laser
Cy2	520	blau 488
Cy3	580	grün 532
Cy5	670	rot 633

Tabelle 9. CyDye-Fluorophore und Wellenlänge der Laser und Emissionsfilter.

Um Proteinspotvolumina über eine experimentelle Reihe und mehrere Gele miteinander vergleichen zu können, sind zwei Schritte nötig: Die Detektion des internen Standards und der Probe innerhalb eines Gels und das Angleichen der internen Standardspots auf allen Gelen des Experimentes. Die Proteinabundanz eines jeden Proteins wird angegeben als Verhältnis relativ zum internen Standard (Cy3: Cy2 und Cy5: Cy2). Um mehrere Gele miteinander vergleichen zu können, muß sichergestellt sein, daß gleiche Spots miteinander verglichen werden. Durch die Verwendung des internen Standards werden die Gele aufeinander abgestimmt und ein direkter Gelvergleich möglich. Nach Anpassen der internen Standards können die Spotvolumina der Proben verschiedener Gele miteinander verglichen werden. Als statistische Analyse kommt der T-Test zur Anwendung, eine quantitative Evaluierung jedes Spotpaares durch Vergleich der Durchschnittswerte und der Standardabweichung der Proteinabundanz zwischen den beiden funktionellen Zuständen.

2.11.5.2 Anfärbung und Massenspektrometrie

Die Einführung der Farbstoffe durch das Minimallabeling führt zu einem leicht veränderten Laufverhalten der Proteine. Die Position des markierten Proteins auf dem 2D-Gel unterscheidet sich daher leicht von der des nicht markierten Proteins. Um diesem Verhalten Rechnung zu tragen, werden die DIGE-Gele mit Coomassie angefärbt. Durch Mustervergleich der CyDye-Fluoreszenzbilder mit dem der coomassiegefärbten Gele können die Positionen der fraglichen Proteine identifiziert werden. Die entsprechenden Proteinspots werden anschließend ausgeschnitten und nach tryptischem Verdau im Gel einer massenspektrometrischen Analyse zugeführt.

2.12 Massenspektrometrie

2.12.1 Grundlagen

In der Massenspektrometrie werden im Hochvakuum erzeugte Ionen hinsichtlich ihrer Molekülmassen analysiert. Unterschiedliche Methoden können hierbei eingesetzt werden. In der MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry) werden auf einem Proben-teller Probe und Matrix in großem Überschuss kokristallisiert und im Hochvakuum der Ionenquelle eines Massenspektrometers mit einem Laserimpuls weniger Nanosekunden beschossen (Karas und Hillenkamp, 1988). Die Anregungsenergie führt vor Erreichen eines thermischen Gleichgewichtes zu einem Phasenübergang, der Matrix- und Probenmoleküle in die Gasphase freisetzt. Die Ionen werden durch eine Elektrode durch das Flugrohr beschleunigt, in dem sie sich nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis auftrennen. Die Masse läßt sich bei Erreichen des Detektors über die Flugzeit errechnen. Demgegenüber bedient sich die ESI-MS (electrospray ionization mass spectrometry) der elektrisch induzierten Desolvatisierung, dem Transfer von Ionen aus der Lösung in die Gasphase (Banks *et al.*, 1994). Der bei Atmosphärendruck stattfindende Transfer gliedert sich in verschiedene Phasen. Zunächst bilden sich kleine geladene Tröpfchen aus Elektrolyten, was von einem kontinuierlichen Lösungsmittelverlust durch Verdampfen und einer Erhöhung der Ladungsdichte an der Tropfenoberfläche begleitet wird. Die Tröpfchen zerfallen weiter in Mikrotröpfchen (Coulomb-Explosionen), bis die Analytmoleküle beim Transfer in das Massenspektrometer komplett desolvatisiert sind. Dort werden die Ionen im Hochvakuum hinsichtlich ihrer Masse gefiltert und zum Detektor gelassen. Dies wird durch den Einsatz eines Quadrupols erreicht, der Ionen eines definierten

m/z-Verhältnisses unter dem Einfluß eines Wechsel- und Gleichspannungsfeldes von anderen Ionen trennt. Alternativ oder zusätzlich zu den Quadrupolen kann eine Ionenfalle zur Massenanalyse verwendet werden. Hierbei werden Ionen in einem geeigneten elektrischen Feld eingefangen, in dem sie für variable Zeiten auf stabilen Bahnen gehalten und hinsichtlich ihrer Masse analysiert werden können. Während eines Zyklus werden Ionen für eine begrenzte Zeit in der Falle akkumuliert und die Falle für den Eintritt weiterer Ionen blockiert. Zur Detektion werden die Ionen mit ansteigendem Molekulargewicht aus der Falle ejiziert und mit einem Sekundärelektronenvervielfacher nachgewiesen.

2.12.2 Keratinfreies Arbeiten

Die Massenspektrometrie beruht auf dem Nachweis enzymatisch gespaltener Proteine. Daher ist steriles Arbeiten von größter Wichtigkeit. Insbesondere für die Detektion niedrig abundanter Proteine erweisen sich Kontaminationen wie Keratin als sehr störend. Um diese Kontamination auszuschließen, werden sterile Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und Lösungen verwendet, die man durch Filtrieren (Maschengröße 0,45 µm) von Keratinkomplexen befreit.

2.12.3 Verdau in Lösung

Als Proteasen für den Verdau in Lösung werden Trypsin und Chymotrypsin eingesetzt. Für den Trypsin-Verdau werden mit Aceton präzipitierte, immungereinigte Proben zweier Saccharosegradienten in 10 µl 300 mM Harnstoff in 50 mM NH₄HCO₃ pH 8,5 resuspendiert und für 1 h unter Schütteln inkubiert. Man gibt 1 mM DTT in 50 mM NH₄HCO₃ zu und reduziert bei 37°C für 45 min unter Schütteln. Die Alkylierung erfolgt durch Zugabe von 10 mM IAA in 50 mM NH₄HCO₃ und Schütteln für 1 h im Dunkeln. Für den Verdau gibt man 5 µg Trypsin in 1 mM HCl und 2 mM CaCl₂ zu. Inkubiert wird bei 37°C für 18 h. Die Proteolyse wird durch Azidifizierung auf pH 3 gestoppt. Hierzu fügt man 2 µl 1:10-verdünnte Ameisensäure zu und trocknet den Ansatz in der Vakuumzentrifuge. Man wäscht durch Resuspension in 50 mM NH₄HCO₃ und trocknet die Suspension in der Vakuumzentrifuge.

Für die Proteolyse mittels Chymotrypsin ist darauf zu achten, daß das pH-Optimum des Enzyms von pH 7,8 durch Verwendung eines geeigneten Puffers erreicht wird. Eine identische Probe wird in 10 µl 300 mM Harnstoff in 100 mM Tris-HCl pH 7,8 resuspendiert und für 1 h unter Schütteln inkubiert. Man fügt 1 mM DTT zu und inkubiert für 45 min bei

37°C. Die Alkylierung wird durch Zugabe von 10 mM IAA und einstündige Inkubation im Dunkeln erreicht. Für die Proteolyse gibt man 5 µg Chymotrypsin in 1 mM HCl und 10 mM CaCl₂ zu und verdaut bei 25°C für 18 h. Die nötige Ansäuerung auf pH 3 findet durch Zugabe von 1,5 µl 1:10-verdünnter Ameisensäure statt. Die Suspension wird in der Vakuumzentrifuge getrocknet, mit 100 µl 50 mM NH₄HCO₃ gewaschen und nochmals in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

2.12.4 Probenvorbereitung für den Verdau im Gel

Mit Hilfe eines Skalpell oder einer gekürzten Pipettenspitze werden Banden oder Spots aus einem Gel ausgeschnitten und in 1 mm³-große Würfel zerlegt. Diese werden mit 100 µl einer Mischung aus 15 mM Kaliumhexacyanoferrat-(III) und 50 mM Natriumthiosulfat für 10 min bei Raumtemperatur entfärbt. Die Gelstücke werden anschließend dreimal für 15 min mit je 400 µl MilliQ-Wasser gewaschen. Man wiederholt dies dreimal für je 15 min mit 400 µl 50% Acetonitril und 25 mM Ammoniumbicarbonat pH 8,0 sowie zweimal für je 10 min mit 100 µl Acetonitril. Die Gelstücke werden vor der Reduzierung und Alkylierung in einer Vakuumzentrifuge für 15 min getrocknet. Die Reduktion findet für 1 h bei 56°C mit 100 µl frisch angesetztem 10 mM DTT in 100 mM NH₄HCO₃ statt. Man läßt die Proben abkühlen und alkyliert bei Raumtemperatur für 45 min im Dunkeln mit 100 µl 55 mM Iodacetamid in 100 mM NH₄HCO₃. Die Proben werden dreimal für je 5 min mit 100 µl 100 mM NH₄HCO₃ gewaschen, gefolgt von 5 min mit 100 µl Acetonitril, 5 min mit 100 µl 100 mM NH₄HCO₃ und erneut 5 min mit 100 µl Acetonitril.

2.12.5 Proteinverdau im Gel

Die Gelstücke werden 15 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und auf Eis für 45 min in Verdau-Puffer (50 mM NH₄HCO₃, 5 mM CaCl₂, 12,5 ng/ml Trypsin) quellen gelassen. Man entfernt den Überstand, gibt 10 µl Verdau-Puffer ohne Trypsin zu und inkubiert über Nacht bei 37°C. Der peptidhaltige Überstand wird anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt, die Gelstücke einer organischen Extraktion unterzogen. Hierfür werden diese nacheinander mit 100 µl 50% Acetonitril und 0,5% Trifluoressigsäure sowie zweimal mit je 50 µl 100% Acetonitril und 0,1% Trifluoressigsäure inkubiert. Alle Überstände werden vereinigt und in der Speed Vac getrocknet.

2.12.6 Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry

Die MALDI-TOF-Experimente werden auf einem Voyager-DE STR oder einem Ultraflex-TOF/TOF-Massenspektrometer durchgeführt. Die getrockneten Proben werden hierzu in 5 µl Wasser/Acetonitril/Trifluoressigsäure (TFA) (29/70/1 (v/v/v)) gelöst. Als Matrix werden 2 mg/ml α -Cyanohydroxymizinsäure in Wasser/Acetonitril/TFA (50/50/0,5 (v/v/v)) gelöst. Probe und Matrix werden nacheinander 1:1 auf einen Stahlteller pipettiert und zum Kristallisieren trocknen gelassen. Vor der Analyse wird die getrocknete Probe mit eiskalter 5%iger Ameisensäure gewaschen, um Salzkontaminationen zu reduzieren.

Die Massenspektren werden extern mittels des Sequazyme Peptide Mass Standards Kits und intern auf ein tryptisches Autolysepeptid (m/z 2163,06) kalibriert. Alle auf dem Voyager-DE STR aufgenommenen Spektren werden mit Data Explorer Version 4.3 prozessiert. Dies beinhaltet ein Filtern des Rauschens (Korrelationsfaktor 0,7) und Korrektur der Basislinie (Peakbreite 32; Flexibilität 0,5; Grad 0,1). Für die Datenbanksuche werden deisotopierte Peaks mit einem Signal/Rausch-Verhältnis von mindestens 5 verwendet. Spektren, die auf dem Ultraflex-TOF/TOF-Massenspektrometer aufgenommen wurden, werden mit flexAnalysis Version 2.2 und dem SNAP-Algorithmus prozessiert (Signal-zu-Rauschen-Verhältnis 3, maximale Peakzahl 150, Qualitätsfaktorschwelle 80). Die Proteine werden mittels Mascot und der CDS-Datenbank identifiziert (Peptidmassentoleranz Ultraflex TOF/TOF 30 ppm, Voyager-DE STR 50 ppm, maximale ausgelassene Spaltung 1). Proteine mit einem Score von 67 oder höher werden als signifikant gewertet ($p < 0,05$). Die wenigen Proteine mit niedrigerem Score werden durch Bestätigung über Western Blot Analysen, aufgrund der Identifikation über mehrere Ansätze oder durch die Detektion als Proteinmischung dazugenommen. Letzteres reduziert den Score der Einzelproteine, obwohl das Protein als solches signifikant identifiziert worden wäre.

2.12.7 Nanoscale-liquid chromatography electrospray ionization-tandem mass spectrometry

Die Nanoflüssigkeitschromatographie wird auf einer 1100-Nanoflow-Proteomics-Solution mit einer PepMap nanoscale C18-Säule durchgeführt. Wasser/Acetonitril/Ameisensäure (97/3/0,1 (v/v/v)) wird als Solvent A und Wasser/Acetonitril/Ameisensäure (3/97/0,1 (v/v/v)) als Solvent B verwendet. Die Proben werden in 20 µl Solvent A gelöst und 5 µl mit einer Fließrate von 20 µl/min auf einer Zorbax 300 SB-Vorsäule (0,3 x 5 mm, 5 µm) adsorbiert. Die Separation wird bei einer Fließrate von 20 µl/min mit einem linearen Gradienten

durchgeführt (3% - 40% Solvent B für 30 min, 40% - 80% Solvent B für 10 min, 80% Solvent B für 3 min, 80% - 3% Solvent B für 1 min, 3% Solvent B für 12 min). Die massenspektrometrische Analyse erfolgt online mit einem Qtrap 2000-Hybridtandemmassenspektrometer.

Die MS/MS-Daten werden mit Mascot Daemon extrahiert, die Datenbanksuche auf einem Mascot Server (Peptidtoleranz 0,5 Da; MS/MS-Toleranz 0,3 Da; maximale ausgelassene Spaltung 1) mit der CDS-Säugerdatenbank durchgeführt. Proteine mit einem Score von 37 oder höher werden als signifikant gewertet ($p < 0,05$).

2.13 Arbeiten mit Bakterien

2.13.1 Steriles Arbeiten

Im Umgang mit Bakterien ist auf steriles Arbeiten zu achten, um Kontaminationen mit anderen Bakterien, Pilzen und Hefen zu vermeiden. Ergriffene Maßnahmen umfassen die Verwendung von Antibiotika, Reinigung aller Arbeitsflächen mit 70% Ethanol und Arbeiten neben laufendem Bunsenbrenner. Die verwendeten Geräte und Lösungen werden durch Autoklavieren für 20 min bei 121°C oder durch Heißluft (3 h bei 180°C) sterilisiert.

2.13.2 Nährmedien

LB-Agar, pH 7,5 1% Casein
 0,5% Hefeextrakt
 0,5% NaCl
 1,5% Agar
 100 µg/ml Ampicillin

LB-Medium, pH 7,5 1% Casein
 0,5% Hefeextrakt
 0,5% NaCl
 100 µg/ml Ampicillin

SOB-Medium 2% Casein
 0,5% Hefeextrakt
 10 mM NaCl

2,5 mM KCl

Nach Autoklavieren gibt man 10 mM sterilfiltrierte MgSO₄-Lösung zu.

SOC-Medium SOB-Medium plus 20 mM sterile Glucose

2.13.3 Anzucht von Bakterien

2.13.3.1 Animpfen von Flüssigkulturen

Für Kleinkulturen werden 5 ml Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Für größere Kulturen werden 200 ml Medium mit 2 ml einer Minikultur angeimpft und für etwa 8 h bei 37°C inkubiert.

2.13.3.2 Ausplattieren von Flüssigkulturen

Mit Hilfe eines Drigalsky-Spatels wird eine Bakteriensuspension in kreisenden Bewegungen auf LB-Agar ausgebracht. Die Suspension muß hierbei so lange ausplattiert werden, bis die Flüssigkeit komplett in den Agar eingedrungen ist. Die Agarplatten werden anschließend im Brutschrank bei 37°C für 16 h inkubiert.

2.13.3.3 Vereinzlungsausstrich

Man streicht Bakterien mit Hilfe einer abgeflamnten Impföse aus. Hierzu zieht man drei parallele Striche auf der Platte, die man anschließend senkrecht dazu kreuzt, bis ein Viereck ausgestrichen ist. Die Dichte der Bakterien nimmt mit jedem weiteren Ausstrich durch die Impföse ab und erreicht gegen Ende Einzelkolonien. Die Agarplatten werden anschließend im Brutschrank bei 37°C für 16 h inkubiert.

2.13.4 Anlegen von Dauerkulturen

Bakterienkulturen werden bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,6 kultiviert und anschließend mit 20% Glycerin versetzt, um ein Aufbrechen der Membran durch Entstehen von Eiskristallen zu verhindern. Aliquotierte Kulturen werden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.13.5 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Bakterien des Stammes *Escherichia coli* XL10 Gold werden in SOB-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,6 kultiviert und anschließend für 15 min auf Eis gestellt. Die Zellen werden für 15 min bei 2.600 g zentrifugiert, in 150 ml 10% Glycerin resuspendiert und erneut zentrifugiert. Diesen Waschschrift wiederholt man zweimal. Nach erfolgter Zentrifugation wird das Glycerin dekantiert und die Bakterien im verbliebenen Glycerin resuspendiert. Man aliquotiert die Kultur à 70 µl, friert die Bakterien in flüssigem Stickstoff ein und lagert diese bei -80°C.

2.13.6 Plasmidpräparation durch alkalische Lyse

Bakterienkulturen werden pelletiert und in EDTA- und RNase-haltigem Puffer resuspendiert. EDTA komplexiert zweiwertige Kationen (Mg^{2+} , Ca^{2+}), die für die Stabilität der Zellwand unerlässlich sind. Die Bakterien werden anschließend durch Zugabe von NaOH und SDS lysiert. SDS löst die Phospholipid- und Proteinkomponenten der Zellwände, Natronlauge denaturiert DNA und Proteine. Die Dauer der Inkubation ist hierbei entscheidend, da möglichst viel Plasmid-DNA, aber wenig chromosomale DNA freigesetzt werden und die Plasmid-DNA nicht irreversibel denaturiert werden soll. Das Lysat wird mit saurem Kaliumacetatpuffer neutralisiert. Das sich bildende Präzipitat aus Kaliumdodecylsulfat und Proteinen, chromosomaler DNA und bakterieller Zellreste wird abzentrifugiert. Die Plasmide bleiben in Lösung und renaturieren durch Neutralisieren der Lösung. Anschließend gibt man die Plasmidsuspension auf eine Anionenaustauschersäule (DEAE), an die negativ geladene DNA bei niedrigen Salzkonzentrationen bindet. Man wäscht mit hohen Salzkonzentrationen, um Spuren von RNA und Proteinen zu entfernen und eluiert die DNA bei noch höheren Salzkonzentrationen. Für präparative DNA-Präparationen wird die DNA anschließend für 1 h mit 0,75 Volumen Isopropanol präzipitiert. Der durch Zentrifugation (11.000 g, 4°C) erhaltene Bodensatz wird für 15 min mit 75%igem Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert, das getrocknete Präzipitat in MilliQ resuspendiert.

2.13.7 Konzentrationsbestimmung

Für die Konzentrationsbestimmung von DNA eignen sich prinzipiell zwei Methoden. Eine der Methode beruht auf der Mengenabschätzung von Banden im Agarosegel, wobei ein Marker mit definierter Konzentration als Referenz dient. Die zweite Möglichkeit macht sich die Absorption der Purine und Pyrimidine bei 260 nm zunutze. Auch die Reinheit der DNA läßt

sich photometrisch bestimmen. Die aromatischen Aminosäuren der Proteine (Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan) absorbieren bei 280 nm. Setzt man die Meßwerte von 260 nm und 280 nm ins Verhältnis, so ergeben sich für reine DNA-Lösungen Werte von 1,8 bis 2.

2.13.8 Polymerase-Kettenreaktion

Ein typischer PCR-Verlauf besteht aus drei unterschiedlichen Temperaturstufen. Man startet die Reaktion durch eine Temperaturerhöhung auf 94°C, um die doppelsträngig vorliegende DNA zu denaturieren. Da die DNA zu Beginn in einer noch recht komplexen, hochmolekularen Struktur vorliegt, wählt man einen längeren Zeitraum als für die Folgeschritte, um insbesondere GC-reiche Abschnitte zu denaturieren. Der zweite Schritt umfaßt eine Temperaturreduktion auf die für das Annealing der Primer festgelegte Temperatur. Diese Temperatur ist entscheidend für die Spezifität der PCR. Nach dem Anlagern der Primer erhöht man die Temperatur, um der Polymerase optimale Bedingungen für die Verlängerung der DNA-Sequenzen zu geben. Diese Schritte werden für 30 bis 35 Zyklen wiederholt. In der Regel liegt dann genügend Produkt für weitere Analysen vor. Die verwendete Pwo-Polymerase besitzt neben der 5'→3'-Polymeraseaktivität zusätzlich eine 5'→3'-Exonukleaseaktivität, die inkorrekte Nukleotide erkennt, entfernt und durch eine erneute Polymerisation ersetzt. Zusätzlich muß auf die Pufferbedingungen geachtet werden, die Spezifität und Prozessivität der Reaktion stark beeinflussen. Ferner können Glycerin und DMSO bei GC-reichen DNA-Sequenzen zugesetzt werden. Glycerin verlangsamt die Diffusionsgeschwindigkeit. Die Polymerase fällt normalerweise nach 100 bis 200 Nukleotiden ab, diffundiert aber aufgrund des Glycerins nicht weit weg und kann sich daher sehr schnell wieder an die zu amplifizierende DNA-Sequenz anlagern. DMSO destabilisiert GC-Brücken über Veränderung der Dielektrizitätskonstanten der Lösung.

Volumen	Komponente	Endkonzentration
2 µl	10 mM each dNTP-Mix	200 µM
3 µl	10 µM forward Primer	300 nM
3 µl	10 µM reverse Primer	300 nM
x µl	DNA	
10 µl	10x Reaktionspuffer	1x
ad 98 µl	MilliQ-Wasser	
2 µl	Pwo-Polymerase	2 U

Tabelle 10. Zusammensetzung des PCR-Gemisches für eine Hot-Start-PCR

Man mischt auf Eis die in Tabelle 10 gegebenen Komponenten in der angegebenen Reihenfolge und führt mit diesem Ansatz eine Hot-Start-PCR durch (Tabelle 11), die unspezifische Amplifikationen dadurch verhindert, daß die Amplifikation der Polymerase erst

bei hohen Temperaturen einsetzt und dadurch die Polymerisation von unspezifisch hybridisierten Primern bei niedrigen Temperaturen vermieden wird. Bei kleineren Ansätzen überschichtet man mit Chill-Out-Wachs, um ein Verdampfen der Lösung während der PCR zu vermeiden.

Schritt	Temperatur	Dauer
0)	Block auf 94°C vorheizen	Pause
1)	94°C	2 min
2)	94°C	30 sek
	45°C	30 sek
	72°C	1 min
3)	72°C	5 min
4)	4°C	Pause

} 35 Zyklen

Tabelle 11. PCR-Programm für eine Hot-Start-PCR

2.13.9 Präzipitation von DNA

Die zu präzipitierende DNA-Lösung wird auf 0,3 M Natriumacetat pH 5,2 eingestellt. Man gibt das 2,5-fache Volumen Ethanol zu und fällt bei Raumtemperatur für 30 min. Geringe DNA-Konzentrationen können für längere Zeiträume bei 4°C oder -20°C präzipitiert werden. Anschließend zentrifugiert man für 30 min bei 11.000 g und 4°C. Das Pellet wird mit 75%igem Ethanol gewaschen und für 10 min bei 11.000 g und 4°C zentrifugiert. Man trocknet das Pellet und resuspendiert in einem entsprechendem Volumen MilliQ-Wasser.

2.13.10 Restriktion

Die Restriktionsanalyse verwendet man zur Charakterisierung, Identifizierung und Isolierung doppelsträngiger DNA-Moleküle. Restriktionsenzyme binden und spalten doppelsträngige DNA-Moleküle sequenzspezifisch. Die entstandenen Fragmente können im Agarosegel über Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht und für Ligationsreaktionen aus dem Gel isoliert werden. Die zu analysierende DNA wird mit dem/n Restriktionsenzym/en unter definierten Pufferbedingungen und bei definierter Temperatur für eine bestimmte Zeit inkubiert. Reaktionspuffer enthalten in der Regel einen Tris-Puffer, MgCl₂, NaCl oder KCl, ein Sulfhydrylreagenz zur Stabilisierung des Enzyms sowie ein divalentes Kation wie Mg²⁺, das für die Enzymaktivität nötig ist. Der pH-Wert des Puffers liegt meist zwischen pH 7,5 und pH 8. Man wählt gewöhnlicherweise Ansätze von 20 µl mit 10x Restriktionspuffer, der für die eingesetzte DNA-Konzentration empfohlenen Restriktionsenzymkonzentration und füllt mit Wasser auf. Der Restriktionsansatz wird für mindestens 2 h bei 37°C inkubiert. Beste Ergebnisse erzielt man über Nacht. Hierbei ist wichtig zu überprüfen, daß das Enzym keine

Staraktivität besitzt. Ist diese vorhanden, so muß die Inkubationszeit verkürzt werden, da das Restriktionsenzym bei längerer Anwendung unspezifisch schneidet.

Für präparative Restriktionen ist die Verwendung von CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) von Vorteil. Dieses Enzym katalysiert die Abspaltung von Phosphatgruppen, was die Ligationseffizienz durch Reduktion unerwünschter Ligationsprodukte und Religation erhöht. Zu einem 20 µl-Restriktionsansatz gibt man hierzu 1 U CIAP.

2.13.11 Agarose-Gelelektrophorese

Gelelektrophoretische Auftrennungen von Nukleinsäuren können prinzipiell in Polyacrylamid- als auch Agarosegelen durchgeführt werden. Die Wahl des Trägermaterials wird von der Größe der zu analysierenden Nukleinsäure bestimmt. Für gängige Nukleinsäuregrößen ist Agarose das gängige Trägermaterial.

Für die Herstellung eines Agarosegels wiegt man Agarose ein, füllt mit 0,5x TBE-Puffer (50 mM Tris, 41,5 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA) auf ein definiertes Volumen auf und erhitzt die Mischung in der Mikrowelle, bis sich eine klare Lösung gebildet hat. Man setzt 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zu und gießt die Lösung in eine vorbereitete Gelkammer. Ethidiumbromid ist ein organischer Farbstoff, dessen aromatische Ringe mit den heteroaromatischen Ringen der Basen der Nukleinsäuren interagieren. Die Bindung an DNA bewirkt eine Verstärkung der Fluoreszenz im Vergleich zur Hintergrundfärbung des Gels. Restringierte Proben oder supercoiled DNA werden mit DNA-Ladepuffer (50% Glycerin, 10 mM EDTA pH 8,0, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol FF) supplementiert und im Agarosegel bei 75 mA aufgetrennt. Als Elektrophoresepuffer wird 0,5x TBE-Puffer mit 1 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die DNA-Banden können an einem UV-Tisch durch Anregung des Ethidiumbromids bei 254 bis 366 nm und Emission bei 590 nm sichtbar gemacht werden.

2.13.12 DNA-Isolation aus Agarosegelen

Banden von Interesse werden mit einem Skalpell aus einem Agarosegel ausgeschnitten. Man gibt 0,5 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung pH 5,2 und 4,5 Volumen 6 M NaI-Lösung zu und inkubiert für 2 bis 5 min bei 55°C, bis das Agarosegel komplett aufgelöst ist. Anschließend gibt man Glaspuderlösung zu: 6 µl für die ersten 2 µg sowie zusätzlich 1 µl Lösung für weitere 0,5 µg DNA. Man mischt gut und inkubiert für 5 min bei

Raumtemperatur. Sind die Fragmente kleiner als 1.000 bp, inkubiert man bei 55°C, um die Bindeeffizienz zu erhöhen. Man zentrifugiert 10 sek bei 16.000 g und wäscht das Glaspuderpellet viermal mit dem 50-fachen Volumen Waschpuffer (10 ml Waschkonzentrat in 50% Ethanol) des ursprünglich eingesetzten Glaspudervolumens. Die Elution findet durch Resuspension und Inkubation des Pellets in einem Volumen Tris-Puffer (10 mM Tris pH 8,0) des ursprünglichen Glaspudervolumens bei 55°C für 5 min statt. Nach erneuter Zentrifugation wird der DNA-haltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

2.13.13 Ligation

Unter Ligation versteht man die kovalente Verknüpfung zweier oder mehr DNA-Fragmente über die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxylgruppe eines Nukleotids mit der 5'-Phosphatgruppe eines anderen Nukleotids. Zum Einsatz kommt die T4-DNA-Ligase aus dem T4-Bakteriophagen. Das für die Reaktion nötige ATP stammt aus dem Reaktionspuffer. Die Reaktion verläuft über die Bildung eines Enzym-Nukleotid-Intermediats durch Transfer des AMP-Anteils von ATP auf die Aminogruppe einer Lysinseitenkette des Enzyms. Der AMP-Rest wird anschließend auf das 5'-Phosphatende der DNA übertragen und die Phosphodiesterbindung über den Angriff der 3'-OH-Gruppe auf das aktivierte 5'-Phosphat unter Freisetzung des AMP-Restes und des Enzyms geknüpft.

2.13.14 Transformation

Das Einbringen von DNA über Elektroporation beruht auf einer transienten Permeabilität der Zellmembranen, die durch Applikation eines kurzen elektrischen Pulses hoher Feldstärke erreicht wird. Für die Transformation taut man benötigte Zellaliquots elektrokompenter *E. coli* auf Eis auf. Den zu transformierenden Ligationsansatz inkubiert man bei 65°C für 10 min, um die T4-DNA-Ligase von der DNA zu lösen, da diese die Transformationseffizienz herabsetzt. Man versetzt eiskaltes Glycerin mit 1 µg des Ligationsansatzes auf ein Endvolumen von 10 µl und gibt dies zu den aufgetauten *E. coli* zu. Der Ansatz wird in vorgekühlte Elektroporationsküvetten pipettiert und anschließend transformiert (1,4 kV, 50 µF, 125 Ω). Erreichte Pulsdauern sollten bei 5 bis 6 ms liegen. Nach der Elektroporation gibt man 800 µl SOC-Medium zu und inkubiert für 90 min unter gelegentlichem Schwenken bei 37°C. Variable Volumina werden auf Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.13.15 Sequenzierung

Zu sequenzierende Nukleinsäuren werden zusammen mit entsprechenden Primern der Firma SRD (Oberursel, Deutschland) übergeben. Für eine größtmögliche Sicherheit werden beide Sequenzenden ansequenziert. Die Sequenzierung beruht auf einem gelgestützten Verfahren nach Erzeugung basenspezifisch endender DNA-Populationen, die in einer nachfolgenden denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese nach ihrer Größe getrennt werden. Die Beendigung der Synthese des in die Reaktion gegebenen DNA-Stranges wird hierbei durch Zufügen von Didesoxynukleotiden erreicht, deren Einbau in die DNA zu einem Kettenabbruch aufgrund der fehlenden 3'OH-Gruppe führt.

2.14 Arbeiten mit eukaryontischen Zellen

2.14.1 Steriles Arbeiten

Alle Arbeiten mit eukaryontischen Zellen finden unter sterilen Bedingungen statt. Medien und Puffer werden vor Gebrauch auf 37°C vorgewärmt, um die Zellen keinem unnötigen Streß auszusetzen. Alle nicht käuflich erworbenen sterilen Lösungen werden vor Gebrauch für 20 min bei 120°C autoklaviert oder bei Unverträglichkeit gegenüber Hitze sterilfiltriert.

2.14.2 Medien

PC12-Zellen	DMEM "15%" (DMEM mit Glutamax-I (L-Alanyl-L-Glutamin), 4,5 g/l Glucose, mit Pyridoxin) mit 10% Pferdeserum, 5% fötalem Kälberserum, 50 U Penicillin und 50 µg Streptomycin
CHO-Zellen	Ham's F12 Medium mit 10% fötalem Kälberserum, 50 U Penicillin und 50 µg Streptomycin

2.14.3 Zelllinien

2.14.3.1 CHO-Zellen

Die epithelienähnliche CHO-Zelllinie (Chinese Hamster Ovary) entstammt einer Ovarbiopsie an einem adulten Hamster. Die CHO-K1-Zelllinie wurde ursprünglich von der American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) bezogen. Die Zelllinie zeigt Verdopplungsraten von vier Stunden, läßt sich auf unbeschichteten Plastikschalen gut kultivieren und zeigt nach Elektroporation Transfektionseffizienzen von 50 bis 80%.

2.14.3.2 PC12-Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten PC12-Zellen (Phäochromocytoma) entstammen einem Tumor des Nebennierenmarks und ähneln daher Neuronen. Embryonal gehen sie aus dem Gewebe der Neuralleiste hervor. Sie besitzen die charakteristischen Eigenschaften von Neuronen wie die Synthese, Speicherung, Freisetzung und Aufnahme von Catecholaminen (Greene und Rein, 1977) und differenzieren unter Gabe von NGF (neural growth factor) in sympathische Neuronen aus, die unter anderem durch Proliferationsstopp, die Ausbildung langer Neuriten sowie das Erscheinen elektrischer Erregbarkeit charakterisiert sind. PC12-Zellen kommen aus diesem Grund als Modellsystem für Neuronen zum Einsatz. Dennoch sollte bei Verwendung der Zelllinie klar sein, daß PC12-Zellen einem Tumor abstammen und sich daher von nicht-transformierten Zellen unterscheiden. Zusätzlich durchlaufen sie spontane Mutationen und führen daher zu abweichenden Zellvarianten.

Die Behandlung mit NGF führt zu einer verschlechterten Adhäsion der Zellen aufgrund der durch die Neuritenbildung eingeführten lateralen Spannung. Die Ausbildung langer Neuriten benötigt in der Regel eine bis zwei Wochen. Für eine schnellere Neuritenbildung nach Elektroporation der Zellen ist es daher ratsam, die Zellen mit NGF vorzubehandeln (Priming).

2.14.4 Kultivierung

Eukaryontische Zellen werden bei 37°C zügig aufgetaut und anschließend in 10 ml Medium aufgenommen. Man zentrifugiert bei 300 g für 5 min, um DMSO zu entfernen, das als Frostschutzmittel zu den Dauerkulturen gegeben wird. Das Zellpellet wird anschließend in 5 ml Medium aufgenommen und in einer Petrischale (Ø 15 cm) ausplattiert. Man kultiviert bis zu einer hinreichenden Konfluenz bei 37°C und 10% CO₂.

2.14.5 Passagieren

80 bis 90% konfluente Platten werden zwei Mal mit 37°C PBS gewaschen. Anschließend löst man im Falle der CHO-Zellen diese durch zweiminütige Inkubation mit Trypsin von der Oberfläche der Petrischale und stoppt die Reaktion durch Zugabe von 5 ml Kulturmedium und Resuspension. CHO-Zellen werden alle zwei bis drei Tage 1:12 passagiert. PC12-Zellen werden ohne Trypsin von der Petrischale abgelöst. Hierzu spült man mit 5 ml Kulturmedium mehrmals über die Platte und passagiert alle zwei bis drei Tage 1:3.

2.14.6 Transfektion über Elektroporation

Mittels Elektroporation lassen sich eukaryontische Zellen leicht und effizient transfizieren. Die Zellen in Elektroporationspuffer werden hierbei in ein elektrisches Feld gebracht und kurzen elektrischen Pulsen hoher Feldstärke ausgesetzt. Dabei entstehen kurzzeitig Poren in den Zellmembranen, durch die Makromoleküle wie DNA in die Zelle gelangen können.

PC12- oder CHO-Zellen werden von 80 bis 90% konfluenten Platten abgelöst. Man pelletiert durch Zentrifugation für 5 min bei 300 g. Die Zellpellets werden in 10 ml Elektroporationspuffer (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na₂HPO₄, 6 mM D-Glukose, 20 mM HEPES pH 7,05) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Man resuspendiert in 800 µl Elektroporationspuffer, überführt in eine Elektroporationsküvette, in die bereits 50 µg zu transfizierende DNA vorgelegt wurden, und transfiziert die Zellen nach zweiminütiger Inkubation. Zu wählende Parameter sind 500 µF, 310 V und 129 Ω im Falle der PC12-Zellen bzw. 250 µF, 420 V und 129 Ω für die CHO-Zellen. Nach der Elektroporation werden die Zellen sofort in aufgewärmtes Recovery-Medium (Kulturmedium mit 3 mM EGTA) überführt und für 45 min im Brutschrank bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert. Anschließend zentrifugiert man für 5 min bei 300 g, resuspendiert in 3 ml Kulturmedium und überführt die Zellen auf Kulturschalen.

2.14.7 Transfektion mit Dreamfect

PC12-Zellen lassen sich über Elektroporation nur unzureichend transfizieren. Ein Großteil der Zellen stirbt ab oder zeigt minimale Transfektionsraten. Aus diesem Grund wurde Dreamfect (OZ Bioscience) verwendet. Man verdünnt hierzu 0,5 µg DNA und 2 µl Dreamfect in jeweils 50 µl Medium ohne Serum und Antibiotika. Beide Lösungen werden innerhalb von 5 min durch vorsichtiges Pipettieren gemischt und für 15 bis 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Man gibt den Ansatz von 100 µl zu 400 µl in Vollmedium befindlichen PC12-Zellen (25.000 Zellen pro Well einer 24-Multiwellplate) und inkubiert für 48 h bei 37°C.

2.14.8 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgt mit Hilfe eines Hämozytometers. Hierzu werden 50 µl einer Zellsuspension mit 50 µl Medium verdünnt. Anschließend verdünnt man diese Lösung nochmals 1:2 mit Trypanblau und füllt die Lösung in die Neubauer-Zählkammer ein. Das Deckglas sollte hierbei so angedrückt werden, daß sich Newtonsche Ringe bilden, da nur dann

gewährleistet ist, daß der verbleibende Zwischenraum einem Volumen von 10^{-4} ml entspricht. Aufgrund der angefertigten 1:4-Verdünnung summiert man vier Quadrate und erhält so die Zellzahl pro ml nach Multiplikation mit 10^4 .

2.14.9 Anlegen von Dauerkulturen

Zellen werden von einer konfluenten Platte abgelöst und durch Zentrifugation für 5 min bei 300 g pelettiert. Man resuspendiert in einem kleinen Volumen Komplettmedium, das mit 10% DMSO supplementiert ist und aliquotiert in Kryoröhrchen. Die Zellen werden im Anschluß mit einer Geschwindigkeit von 1°C pro Minute auf mindestens -60°C abgekühlt oder wahlweise über Nacht in eine Gefriertruhe von -70 bis -80°C gestellt. Im Anschluß werden die Kulturen in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.15 Membranfraktion

Zur Herstellung einer groben Membranfraktion kultivierter CHO- oder PC12-Zellen werden Kulturplatten auf Eis gestellt, das Kulturmedium entfernt und zweimal mit eiskaltem Waschpuffer (150 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7,4) gewaschen. Anschließend gibt man 3 ml Homogenisationspuffer (Waschpuffer plus je $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ Antipain, Leupeptin und Chymostatin, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ Pepstatin, 1 mM Benzamidin) zu und löst die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von der Oberfläche der Kulturschale. Mit weiteren 3 ml Homogenisationspuffer spült man restliche Zellen ab und sedimentiert die Zellen durch Zentrifugation für 5 min bei 370 g und 4°C . Das Pellet wird in 1 ml Homogenisationspuffer resuspendiert und in 15 Durchgängen mit einem Elvehjem-Homogenisator homogenisiert. Zur gründlichen Resuspension wird die Suspension auf Eis mit Ultraschall behandelt. Zellkerne und andere große Zelltrümmer werden durch Zentrifugation für 10 min bei 300 g und 4°C abgetrennt. Der Überstand wird zur Trennung der Membranfraktion von löslichen Proteinen für 45 min bei 100.000 g und 4°C zentrifugiert. Für eine gründliche Trennung wiederholt man die Zentrifugation nach Resuspension des Pellets in Homogenisationspuffer.

Eine differentielle Analyse erhält man durch Ablösen peripher assoziierter Proteine. Membranfraktionen werden hierzu entweder in 1 M NaCl in PBS, in 100 mM Glycinpuffer pH 2,8 oder in 100 mM Na_2CO_3 pH 11 resuspendiert und für 60 min auf Eis inkubiert. Die Trennung der Membranfraktion von den abgelösten Proteinen erfolgt mittels Zentrifugation für 60 min bei 100.000 g und 4°C .

2.16 Immunzytochemie

Mittels Immunzytochemie lassen sich Proteine an fixierten Zellen nachweisen und subzelluläre Lokalisationen untersuchen. Hierfür werden Zellen auf Deckgläschen kultiviert und fixiert. Im Anschluß sind die Zellen für Inkubationen mit Antikörpern zugänglich.

2.16.1 Beschichten von Deckgläschen

Für die Beschichtung von Deckgläschen werden 100 µl Poly-L-Lysin (4 µg/100 µl) auf Deckgläschen (Ø 10 mm) pipettiert und für 30 min inkubiert. Im Anschluß wäscht man dreimal für 5 min mit Wasser und läßt die Deckgläschen anschließend trocknen.

2.16.2 Fixierung, Antikörperinkubation und Einbetten

Zellen lassen sich mit einer Vielzahl von Substanzen fixieren. Für PC12- und CHO-Zellen hat sich die Fixierung mit eiskaltem Methanol als geeignet erwiesen. Hierzu werden auf Deckgläschen befindliche Zellen dreimal mit 37°C-warmem PBS gewaschen und anschließend für 7 min bei -20°C mit eiskaltem Methanol fixiert. Vor der Inkubation mit dem ersten Antikörper wäscht man dreimal mit PBS, um überschüssiges Methanol zu entfernen und inkubiert anschließend für 20 min mit 5% BSA zur Blockierung unspezifischer Wechselwirkungen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper findet über Nacht statt. Für Kolokalisationsstudien können verschiedene Erstantikörper gemeinsam appliziert werden. Vor Inkubation mit dem zweiten Antikörper wird dreimal mit PBS gewaschen und erneut für 20 min mit 5% BSA blockiert. Der Zweitantikörper wird gleichzeitig mit DAPI für 20 min appliziert. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der besonders an AT-reiche Bereiche der DNA bindet und somit selektiv den Nukleus markiert. Bei Doppelmarkierungen erfolgt die Inkubation mit den Zweitantikörpern nacheinander. Zwischen deren Applikation werden die Deckgläschen dreimal mit PBS gewaschen sowie für 20 min mit 5% BSA inkubiert. Die Deckgläschen werden anschließend viermal mit PBS gewaschen und mit einem Tropfen Slow-Fading (25% Glycerin, 10% Mowiol, 2,5% DABCO, pH 8,5) eingedeckt. Nach 20 min ist das Polymer getrocknet, und die Deckgläschen können mit Lack umrandet werden.

2.16.3 Permeabilisierung mit flüssigem Stickstoff

Um Zellen von löslichen zytosolischen Bestandteilen vor der Fixierung zu befreien, werden diese mit eiskaltem PBS und anschließend mit eiskaltem Glutamatpuffer (25 mM HEPES pH 7,4, 25 mM KCl, 2,5 mM Mg(OAc)₂, 5 mM EGTA, 150 mM K-Glutamat) gewaschen.

Man entfernt alle Flüssigkeit vom Deckgläschen und hält es in flüssigen Stickstoff. Das Deckgläschen wird für 1 min in Glutamatpuffer gewaschen, bevor die Fixierung mit Methanol erfolgt.

2.16.4 Dokumentation

Die immunzytologischen Markierungen werden mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Anregungs- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind in Tabelle 12 wiedergegeben.

Farbstoff	Anregung	Emission
DAPI	358	461
Cy3	550	570
Alexa 488	495	519

Tabelle 12. Anregungs- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.

2.17 Immunhistochemie

Über Immunhistochemie läßt sich die Lokalisation von Proteinen in Gewebeschnitten untersuchen. Hierfür werden Ratten mit Paraformaldehyd perfundiert, die benötigten Gewebe anschließend mit einem Gefriermikrotom geschnitten und mit Antikörpern inkubiert.

2.17.1 Beschichten von Objektträgern

Objektträger werden für 1 min in Aceton inkubiert und anschließend mit einem fusselfreien Tuch gesäubert. Man inkubiert für 5 bis 10 sek in 0,01% Poly-L-Lysin und läßt die Lösung trocknen. Beschichtete Objektträger werden bei 4°C gelagert.

2.17.2 Perfusion

Man betäubt Ratten zunächst mit 2 ml Forene und spritzt im Anschluß intraperitoneal 2,5 ml Narcoren sowie nach wirkender Betäubung 0,5 ml einer Mischung aus Ketavet, Rompun und isotonischer NaCl-Lösung (4/1/3). Die Ratte wird für 3 min mit 20 U/ml Heparin in PBS und für weitere 30 min mit 3% Paraformaldehyd (PFA) in PBS bei 40 rpm perfundiert. Die entnommenen Gewebe werden in 3% PFA in PBS für 2 h bei 4°C inkubiert und anschließend für weitere 2 h in 30% Saccharose in PBS überführt. Die Saccharoselösung wird nach 4 h, 24 h und 48 h durch frische Lösung ersetzt.

2.17.3 Einbetten

Gewebe werden nach Entfernung der Zuckerlösung für 20 min in Tissue-Tek inkubiert, anschließend auf Trockeneis in Tissue-Tek eingebettet und bei -80°C gelagert.

2.17.4 Anfertigung von Gefrierschnitten

Auf -27°C äquilibrierte Gewebe werden zunächst mit einer Rasierklinge so zurechtgeschnitten, daß möglichst wenig Tissue-Tek um das Gewebe herum vorhanden ist. Anschließend fertigt man $10\ \mu\text{m}$ -dicke Schnitte an und überführt diese auf beschichtete Objektträger. Die Objekte werden für mindestens 30 min auf einer Heizplatte bei 30°C getrocknet und anschließend bei 4°C gelagert.

2.17.5 Antikörperinkubation

Man umrundet die Gewebeschnitte auf Objektträgern mit einem Fettstift und wäscht kurz in PBS. Anschließend inkubiert man für 10 min in 0,1% Triton X-100 in PBS. Das Triton wird gründlich entfernt und die Gewebe für 30 min in 5% BSA in PBS zur Blockierung unspezifischer Bindungen inkubiert. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper und alle weiteren Schritte erfolgen wie für die Immunzytochemie beschrieben. Inkubiert man mit zwei Erstantikörpern aus gleichen Spezies wird wie folgt verfahren: Im Anschluß an die Applikation des ersten Erstantikörpers inkubiert man nach gründlichem Waschen mit PBS für 1 h mit 5% BSA in PBS. Anschließend inkubiert man mit Cy3-gekoppelten F_{ab} -Fragmenten (1:50) für 1 h und wäscht für 90 min in PBS durch mehrmaliges Wechseln der Lösung. Es wird nochmals für 1 h mit 5% BSA in PBS inkubiert und das Prozedere anschließend für den zweiten Erstantikörper wie beschrieben wiederholt.

Für eine Lokalisationsanalyse über alkalische Phosphatase (AP) wäscht man nach Inkubation mit dem Erstantikörper über Nacht dreimal mit TBS und inkubiert anschließend für 1 h mit der Zweitantikörper-konjugierten alkalischen Phosphatase in 1% BSA in TBS (1:50). Nach dreimaligem Waschen mit TBS blockiert man für 30 min die endogene, gewebsunspezifische alkalische Phosphatase durch Inkubation in 2 mM Levamisol. Man entwickelt mit NBT/BCIP (0,15 mg/ml BCIP und 0,3 mg/ml NBT in 100 mM Tris und 5 mM MgCl_2 pH 9,5) in Anwesenheit von 2 mM Levamisol bis zur hinreichenden Färbung. Die Reaktion wird durch dreimaliges Waschen mit TBS gestoppt.

2.18 Arbeiten mit RNA

Beim Arbeiten mit RNA ist darauf zu achten, RNasen inaktiv zu halten und zügig zu arbeiten. Insbesondere bei der RNA-Präparation aus frischem Gewebe muß die Probe schnell weiterverarbeitet werden. Hierfür geeignet ist sofortiges Einfrieren in flüssigem Stickstoff oder Homogenisieren in denaturierendem Agens. Eingefrorene Proben können später verarbeitet werden, müssen aber unbedingt kalt gehalten werden. Zudem ist es nötig, RNase-freie Labormaterialien und Puffer zu verwenden. Bis auf primäre Amine-enthaltende Puffer können alle Lösungen durch Behandlung mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) von RNasen befreit werden. Die Wirkung des DEPC liegt in der Zerstörung enzymatischer Aktivität durch Modifikation von -NH, -SH und -OH-Gruppen. Da DEPC jedoch auch mit RNA reagieren kann, muß es vor Verwendung autoklaviert werden. DEPC zersetzt sich hierbei zu CO₂ und Wasser. DEPC-unverträgliche Substanzen werden erst nach der DEPC-Behandlung zugegeben, DEPC-inkompatible Lösungen mittels eines 0,45 µm-Sterilfilters von RNase befreit. Alle verwendeten Glasgeräte können durch Erhitzen für 3 h bei 180°C sterilisiert werden. Plastikgeräte wäscht man mit 1 M Natronlauge und 0,1 M SDS aus und entfernt die basische Detergenzlösung anschließend durch Waschen mit RNase-freiem Wasser.

2.18.1 Präparation von RNA aus frischem Gewebe

Das Prinzip der RNA-Aufreinigung basiert auf der Isolierung nichtdegraderter Nukleinsäuren mit Guanidiniumsalzen und Phenol (Chomczynski, 1993). Die RNA wird hierbei durch die saure Guanidiniumthiocyanat/Phenol-Extraktion selektiv in der wäßrigen Phase zurückgehalten, während DNA und Proteine in der organischen Phase bzw. Interphase verbleiben.

Die Aufreinigung der RNA erfolgt mittels TRIidty. Gewünschte Gewebe werden zügig präpariert und auf Eis gelagert. Auf 100 mg Naßgewicht gibt man 1 ml TRIidty und homogenisiert mit Hilfe eines Ultraturrax 1 bis 2 min auf Eis. Bildet sich Schaum, so stellt man die Probe für einige Zeit auf Eis und fährt dann mit der Homogenisierung fort. Die Proben werden anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Pro ml TRIidty gibt man 200 µl Chloroform zu und schüttelt nach kurzem Schwenken einige Male. Man inkubiert für 10 min bei Raumtemperatur und zentrifugiert anschließend für 15 min bei 12.000 g und 4°C. Der RNA-haltige Überstand wird in ein neues Röhrchen überführt und mit 0,5 ml Isopropanol pro ml TRIidty für mindestens 1 h bei -20°C präzipitiert. Man zentrifugiert für 45 min bei 12.000 g und 4°C, wäscht das Pellet mit 1 ml 75%igem Ethanol pro ml TRIidty

und zentrifugiert für 5 min bei 7.500 g und 4°C. Das Pellet wird anschließend für 1 h getrocknet, in RNase-freiem Wasser resuspendiert und die erhaltene Suspension bei -80°C eingefroren.

2.18.2 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von RNA wird photometrisch bei 260 nm bestimmt. Einer optischen Dichte von 1 entspricht hierbei eine RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Diese Beziehung gilt für die Messung bei neutralem pH aufgrund der Bestimmung des RNA-Extinktionskoeffizienten bei pH 7. Die Reinheit der isolierten RNA bezüglich Proteinkontaminationen bestimmt man durch das Verhältnis der Werte für 260 und 280 nm. Das Verhältnis wird stark durch den pH-Wert beeinflusst. Geringe pH-Werte resultieren in einer reduzierten Sensitivität für Proteinkontaminationen (Wilfinger *et al.*, 1997). Daher sollte die Reinheit der RNA in 10 mM Tris pH 7,5 bestimmt werden. Reine RNA besitzt Werte zwischen 1,9 und 2,1.

2.18.3 Reinigung der RNA

In aus Geweben isolierter RNA sind trotz der Entfernung von Proteinen und DNA durch TRItidy in den meisten Fällen DNA-Kontaminationen enthalten. Daher ist es unumgänglich, Proben dieser Gewebe einem DNase I-Verdau zu unterziehen. Die Endonuklease führt zur Spaltung der DNA über Bruch der Phosphodiesterbindungen. Um die potentielle Aktivität von RNasen gering zu halten, was insbesondere auf RNase-reiche Gewebe zutrifft, werden gleichzeitig RNase-Inhibitoren appliziert. Im Anschluß an diese Behandlung muß zur Entfernung der DNase I eine Nukleinsäurepräzipitation durchgeführt werden, da deren Anwesenheit während der RT-PCR störend wäre. Hierzu verwendet man Lithiumchlorid, das selektiv RNA, nicht aber DNA, Proteine und Kohlenhydrate präzipitiert.

Auf 5 µg RNA gibt man 10 U DNase I, 6,25 mM MgCl₂ und 5 U RNase-Inhibitor, füllt mit TE-Puffer auf 10 µl auf und inkubiert für 30 min bei Raumtemperatur. Der Reaktionsansatz wird durch Zugabe von 2,5 M LiCl für 4 h bei 20°C gefällt. Durch Zentrifugation für 30 min bei 16.000 g und 4°C pelletiert die RNA, die nach Waschen in 70%igem Ethanol nochmals für 5 min zentrifugiert wird. Das Pellet wird in DEPC-behandeltem Wasser gelöst.

2.18.4 RT-PCR

RNA, insbesondere mRNA, liegt in Zellen in sehr geringen Mengen vor. Der mRNA-Anteil einer Zelle bei Vergleich des gesamten RNA-Gehalts liegt bei etwa 1 bis 2%. Daher ist es unerlässlich, die RNA in DNA umzuschreiben und die erlangte cDNA zu amplifizieren. Diese Umschreibung erfolgt über reverse Transkriptasen (RNA-abhängige DNA-Polymerasen) und findet idealerweise in zwei Gefäßen statt, da auf diese Weise die Reaktionsbedingungen für die einzelnen Schritte optimal angepaßt werden können. Nach dem RT-Schritt wird ein Aliquot entnommen und dem PCR-Ansatz zugefügt. Für die Amplifikation von mRNA wählt man Oligo(dT)-Primer, die spezifisch an den poly(A)-Schwanz der mRNA binden und nur für den RT-Schritt zur Verfügung stehen. Für eine weitere Amplifikation müssen sequenzspezifische Primer eingesetzt werden. Interne Standardisierungen lassen sich über Amplifikation von Haushaltsgenen erreichen, die theoretisch in allen Zellen und Geweben und zu jeder Zeit in gleichem Ausmaß exprimiert werden. Hierzu zählen die Gene für die GAPDH oder das ER-Bindeprotein BiP.

Für die RT-PCR wird ein Mastermix angesetzt, welcher zunächst vor Zugabe der entsprechenden Primer und anschließend vor Zugabe von 0,5 µg der jeweiligen RNA aliquotiert wird (Tabelle 13).

Volumen [µl]	Komponente
2	10x RT-Puffer
2	dNTP, 5 mM each
2	Oligo-dT, 10 µM
1	RNase-Inhibitor, 10 U/µl
x	RNA, 0,5 µg
1	Reverse Transkriptase
ad 20	H ₂ O

Tabelle 13. Ansatz für den RT-Schritt der RT-PCR.

Der Ansatz wird für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend entnimmt man 1 µl cDNA für die Primer-spezifische PCR (Tabellen 14 und 15).

Volumen	Komponente	Endkonzentration
5 µl	10x taq-Puffer (NH ₄)SO ₄	1x
1 µl	10 mM each dNTP-Mix	200 µM
4 µl	25 mM MgCl ₂	2 mM
2,5 µl	DMSO	5%
2,5 µl	Glycerin	5%
31 µl	H ₂ O	
1,5 µl	10 µM forward Primer	300 nM
1,5 µl	10 µM reverse Primer	300 nM
1 µl	cDNA	
0,5 µl	taq Polymerase	

Tabelle 14. Zusammensetzung des PCR-Gemisches zur primerspezifischen Amplifizierung von cDNA.

Schritt	Temperatur	Dauer	
0	Block auf 94°C vorheizen	Pause	
1	94°C	2 min	
2	94°C	30 sek	} 45 Zyklen
	55°C	1 min	
	72°C	2 min	
3	72°C	5 min	
4	4°C	Pause	

Tabelle 15. PCR-Programm für die primerspezifische Amplifizierung von cDNA.

2.18.5 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

Ebenso wie DNA bildet auch einzelsträngige RNA durch inter- und intramolekulare Basenpaarungen Sekundärstrukturen und Aggregate aus. Eine exakt reproduzierbare Analyse ist jedoch nur im ausgestreckten Zustand möglich, weswegen denaturierende Agarosegele verwendet werden müssen. Als Denaturierungsmittel wird Formaldehyd verwendet, dessen Aldehydgruppe mit den Aminogruppen von Adenin, Guanin und Cytosin Schiff'sche Basen bildet. Die Aminogruppen stehen dadurch nicht mehr zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken und damit zur Bildung von Sekundärstrukturen und Aggregaten zur Verfügung. Aufgrund der Reaktion von Formaldehyd mit Tris wird als Puffersystem ein Gemisch aus MOPS und Natriumacetat verwendet. Die RNA wird vor dem Auftragen in Gegenwart von MOPS, Formaldehyd und Formamid denaturiert. Formaldehyd und Formamid müssen vor Verwendung mit einem Ionenaustauscherharz deionisiert werden. Hierzu werden 1g des Resin AG 501-X8 auf 10 ml Lösung gegeben und über Nacht gerührt. Das Resin wird über Filtration entfernt, die deionisierte Lösung dunkel gelagert.

Für die Trennung in einem Bereich von 0,5 bis 8 kb verwendet man ein 1,5%iges Agarosegel (0,625 g Agarose auf 40 ml) mit 1,1% Formaldehydkonzentration. Die Agarose wird in der Mikrowelle in DEPC-behandeltem Wasser gelöst und auf 55°C im Wasserbad abgekühlt. Anschließend gibt man 4 ml 10x MOPS-Puffer (0,2 M MOPS pH 7,0, 20 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA pH 8,0) und 758 µl deionisiertes Formaldehyd zu und läßt das Gel für mindestens 1 h aushärten. Für die Probenvorbereitung mischt man 5 µg RNA mit 2 µl 10x MOPS-Puffer, 4 µl Formaldehyd und 10 µl Formamid und inkubiert für 20 min bei 65°C. Anschließend gibt man 2 µl 10x Ladepuffer (50% Glycerin, 10 mM EDTA pH 8,0, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol FF) zu und lagert die Probe auf Eis. Die Elektrophorese findet in 1x MOPS-Puffer für 5 min bei 40 V und für den Rest der Elektrophorese bei 75 V statt. Das Gel wird anschließend mit 5 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt und in DEPC-behandeltem Wasser entfärbt.

2.19 Materialien

2.19.1 Chemikalien

Acetonitril	Carl-Roth, Karlsruhe
BAPTA-AM	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bio-Safe Coomassie	Bio-Rad, München
CyDyes	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
α -Cyanohydroxymizsäure	Bruker Daltonics Inc, Manning Park Billerica, MA, USA
DABCO	Fluka, Neu-Ulm
DAPI	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Digitonin (wasserlöslich)	Serva, Heidelberg
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
Dreamfect	OZ Bioscience, Marseille
Dynabeads M-280	Dynal, Hamburg
Fetal Calf Serum	Invitrogen, Karlsruhe
Forene	Abbott AG, Cham, Schweiz
Horse Serum	Invitrogen, Karlsruhe
India Ink	Pelikan, Hannover
Ketavet	Pfizer, Zürich, Schweiz
Mowiol	Aventis, Frankfurt
Narcoren	Merial GmbH, Hallbergmoos
NBT/BCIP	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
NGF- β	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Percoll	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Rompun	Bayer AG, Leverkusen
Sawady Pwo-Polymerase	peqlab, Erlangen
Simply Blue	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Tissue-Tek	Sakura, Zoeterwoude, Holland
TRItidy G	AppliChem, Darmstadt
Trypsin	Roche Applied Science, Mannheim
Trypsin/EDTA-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe

Alle anderen verwendeten Chemikalien sind von höchster Reinheit und wurden bei AppliChem (Darmstadt), Calbiochem (Schwalbach), Carl-Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) und Merck (Darmstadt) bestellt. Alle Puffer, Restriktionsenzyme und Größenstandards für molekularbiologisches Arbeiten stammen von MBI Fermentas (St. Leon-Rot).

2.19.2 Kits

DNA Isolation Kit	AppliChem, Darmstadt
EZNA Miniprep Kit	peqlab, Erlangen
Nucleobond AX-500	Macherey & Nagel, Düren
Omniscript RT-PCR	Qiagen, Hilden
ProteoPrep Membrane Extraction Kit	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
ProteoPrep Universal Extraction Kit	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Sequazyme Peptide Mass Standard Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

2.19.3 Tiere und Zellen

Ratten	Charles River, Sulzfeld
CHO-Zellen	ATCC, Rockville, Maryland, USA
PC12-Zellen	DSMZ, Braunschweig
<i>E.coli</i> XL10 Gold	Invitrogen, Karlsruhe

2.19.4 Plasmide

pcDNA3.1(+)	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3.1 B(-)myc/His	Invitrogen, Karlsruhe

2.19.5 Oligonukleotide

Alle aufgeführten Oligonukleotide wurden bei der Firma Biospring (Oberursel) bestellt.

PCR RIKEN cDNA 1200015A19

Primer 1 (reverse) 5'-AGT CTC GAG CTA ATT AGG CCT ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAC AAG-3'

Primer 2 (forward) 5'-CGG GAT CCG CGA AGC CTA TCT TGC CCC TGG T-3'

Sequenzierung RIKEN cDNA I200015A19 bzw. DKFZp566N034 in pcDNA3.1 B(-)myc/His

Primer 3 (forward) 5'-CCT ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAC-3'

Primer 4 (reverse) 5'-CAG ATC CTC TTC TGA GAT GAG-3'

Sequenzierung DKFZp566N034 in pcDNA3.1(+)

Primer 5 (forward) CAAT-Box Primer

Primer 6 (reverse) BGH Reverse Primer

myc-Epitop

forward 5'-AGC TTG GGC ATG GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG CGG-3'

reverse 5'-GAT CCC GCA GAT CCT CTT CTG AGA TGA GTT TTT GTT CCA TGC CCA-3'

RT-PCR

Oligo(dT) 18-mer

DKFZ RT-reverse 5'-CTC AAA CAT TTC ATA ATG ACG CG-3'

DKFZ RT-forward 5'-CGG GCA GCG AGC GCC GCA G-3'

RIKEN RT-reverse 5'-GAA GCC TAT CTT GCC CCT GGT-3'

RIKEN RT-forward 5'-CAG CTG CGG GAC ACG GTG-3'

BiP RT-forward 5'-TAC ACT TGG TAT TGA AAC TG-3'

BiP RT-reverse 5'-GGT GGC TTT CCA GCC ATT C-3'

2.19.6 Antikörper

Für die Immunzytochemie und Immunhistochemie werden die Antikörper im Vergleich zu den Immunblots zehnfach konzentriert eingesetzt, die generierten Peptidantikörper und korrespondierenden Präimmunsereen in einer Verdünnung von 1:2000 verwendet.

Antikörper	Western Blot	Hersteller		Epitop	gegen	M _r
58k Golgi	1:2000	abcam	ab6284		mouse	58
αβ-SNAP	1:1000	Synaptic Systems	IgG2b, #77.1		mouse	25
Aktin	1:250	Sigma-Aldrich	A2066	C-11 aa	rabbit	42
AMPA-2,3	1:500	Chemicon	Ab 1506	C-13 aa	rabbit	100
Bassoon	1:500	Tom Dieck	IgG2	aa 755-1001	mouse	433
Calnexin	1:1000	Sigma-Aldrich	C4731	aa 573-592	rabbit	64
CAT1	1:500	BioTrend	IgG, #CAT11-A		rabbit	57
Ca _v 2.1 α1A	1:1000	Alomone Labs	#ACC-002	aa 851-867	rabbit	190
Ca _v 2.2	1:100	Chemicon	IgG, #AB5154-50UL	aa 851-867	rabbit	210 und 250
Cellubrevin	1:500	Synaptic Systems	IgG1, #104001, cl. 10.1	zytoplasmatisch	rabbit	14
Clathrin Heavy Chain	1:1000	abcam	ab11331		mouse	180
Complexin 1,2	1:500	Synaptic Systems	#122002	aa 122-134	rabbit	10 und 12
Dynamin I	1:500	Dianova	IgG1, PA1660	aa 45-358	rabbit	100
EAAC1	1:500	BioTrend	IgG, #EAAC11-A		rabbit	69

EEA1	1:1000	abcam	ab2900	aa 1350-1480	rabbit	65
ER60	1:1000	abcam	IgG, ab17012		rabbit	60
F1-ATPase $\alpha\beta$	1:10000	Dr. Hermann Schagger	Serum		rabbit	55
Flotillin-1/Reggie-2	1:500	BD Transduction	IgG1, clone 18		mouse	48
GAPDH	1:250	Chemicon	MAB374		mouse	36
GAT1	1:500	BioTrend	Serum, #GAT11-A		rabbit	70
GFAP	1:1000	Sigma	G-A-5		mouse	50
Glast	1:1000	Chemicon	Serum, #AB1782	C-Terminus	guineapig	65
GM130	1:250	BD Transduction	IgG1, clone 35		mouse	130
H ⁺ -Pumpe V ₀ a1	1:500	Synaptic Systems	#109002	aa 826-838	rabbit	120
IP ₃ -Rezeptor	1:1000	Synaptic Systems	#117002	aa 2731-2749	rabbit	140
LaminB	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	IgG, sc-20682	aa 401-490	rabbit	60
Lamp1	1:1000	Sigma-Aldrich	L1418		rabbit	120
MAPK p44/42	1:1000	Cell Signaling	#9102		rabbit	42 und 44
Munc13	1:1000	Synaptic Systems	IgG, #126001	aa 1399-1736	mouse	200
Munc18	1:1000	Synaptic Systems	Serum, #116002	aa 580-594	rabbit	68
Na,K-ATPase α 5	1:500	D. M. Fambrough	IgG, clone alpha5		mouse	100
β -NAP	1:250	BD transduction laboratories	IgG1, #610892		mouse	145
NSF	1:1000	Synaptic Systems	#123002	aa 733-744	rabbit	80
Piccolo	1:1000	Synaptic Systems	#142002	aa 4439-4476	rabbit	559
PMP70	1:500	abcam	IgG, ab3421		rabbit	70
PSD-95	1:500	Synaptic Systems	Serum, #124002	aa 18-32	rabbit	95
Pyruvat Kinase	1:250	Chemicon	#AB1235		goat	58
rab3A	1:500	Santa Cruz Biotechnology	IgG, sc-308	aa 202-217	rabbit	25
rab3B	1:500	Santa Cruz Biotechnology	IgG, sc-305	aa 195-209	rabbit	25
rab4	1:1000	Ira Mellman	#10502		rabbit	24
rab5	1:1000	Synaptic Systems	IgG2a, #621.3		mouse	24
Rabphilin3A	1:500	Synaptic Systems	Serum, #118002	aa 671-684	rabbit	75
SAP102	1:400	Synaptic Systems	Serum, # 124202	aa 14-26	rabbit	102
ϵ -Sarcoglykan 11b	1:100	Dr. Michihiro Imamura			rabbit	49
ϵ -Sarcoglykan cyto	1:100	Dr. Michihiro Imamura			rabbit	47
SCAMP 1	1:1000	Synaptic Systems	#121002	aa 2-15	rabbit	38
SNAP-25	1:1000	Synaptic Systems	#111002	aa 192-206	rabbit	25
SV2	1:1000	clone from Dr. R. Kelly	Hybridomauberstand		mouse	80 und 100
Synapsin I	1:1000	Synaptic Systems	IgG2, #106001		rabbit	72 und 74
Synapsin II	1:1000	Calbiochem	IgG, 574779-100UL	aa 52-65	rabbit	54 und 74
Synaptogyrin	1:1000	Synaptic Systems	Serum, #103002		rabbit	29
Synaptophysin	1:1000	Dr. Reinhard Jahn	G63	aa 220-234	rabbit	38
Synaptoporin	1:1000	Synaptic Systems	Serum, #102002	aa 250-263	rabbit	29
Synaptotagmin 1	1:1000	Synaptic Systems	#105002	aa 121-133	rabbit	68
Syntaxin-1	1:1000	Synaptic Systems	IgG2a, #110111	N-terminus	mouse	35
TGN38	1:250	BD transduction laboratories	IgG1, clone 2		mouse	38
β -Tubulin	1:1000	Sigma	IgG1, clone TUB2	C-Terminus	mouse	50
vAChT	1:1000	Synaptic Systems	Serum, #139002	aa 475-530	rabbit	70
VAMP-2	1:1000	Synaptic Systems	IgG1, #104211	N-Terminus	mouse	14
VDAC1	1:500	abcam	ab15895	aa 150-250	rabbit	31
vGaT	1:1000	Synaptic Systems	Serum, #131002	aa 75-87	rabbit	57
vGluT1	1:1000	Synaptic Systems	Serum, #135002	aa 456-561	rabbit	60
vMaT2	1:1000	Synaptic Systems	Serum, #138302	C-Terminus	rabbit	70

Phospho-Tyrosin	1:100	Santa Cruz Biotechnology	IgG2b, PY20	mouse
Phospho-Serin	1:100	Sigma-Aldrich	IgG1, #P5747	mouse
Phospho-Threonin	1:500	abcam	IgG, ab9337	rabbit
LICOR goat Alexa 680	1:10000	LICOR Bioscience		mouse
LICOR goat IRDye 800	1:10000	LICOR Bioscience		rabbit
goat Ig-AP	1:100	Sigma-Aldrich		rabbit
rabbit Ig~HRP	1:1000	Dako Cytomation		goat
goat Ig~HRP	1:1000	Sigma-Aldrich		rabbit
rabbit Ig~HRP	1:1000	Dako Cytomation		mouse
Cy3	1:400	Dianova		rabbit
Cy3-F _{ab}	1:400	Dianova		rabbit
Alexa488	1:200	Molecular Probes		mouse
myc Ig	5 µg/ml	Hybridoma-Überstand	Dr. Frank Bonzelius	mouse
<i>Peptid-Antikörper</i>				
RIKEN1	1:100	Pacific Immunology Corp. Ramona, USA		rabbit 30
RIKEN2	1:100	Pacific Immunology Corp. Ramona, USA		rabbit 30
DKFZ	1:100	Pacific Immunology Corp. Ramona, USA		rabbit 30

2.19.7 Anderes Zubehör und Geräte

Electro Cell Manipulator	ECM630, BTX, San Diego, CA, USA 600, BTX, San Diego, CA, USA
Elektroporationsküvetten	Ecu101, EQUIBIO, Ashford, UK 4 mm, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Axiophot, Jena
Konfokales Laserscanmikroskop	Leica TCS SP5, Bensheim
Magnetbeadständer	Promega, Mannheim
Minigelsystem	Biometra, Göttingen
Nanoflow Proteomics Solution	Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA
Nitrozellulosemembranen	Protran Nitrocellulose Transfer Membrane, Schleicher & Schüll, Dassel
Odyssey	LICOR Bioscience, Bad Homburg
PepMap nanoscale C18 Säule	Dionex, Sunnyvale, CA, USA
Photometer	LKB Biochrom, GE Healthcare, Uppsala, Schweden
QTrap 2000 Hybrid Tandem-MS	ABI MDS Sciex, Concord, ON, USA
Röntgenfilme	Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Semidry-Blotkammer	Bio-Rad, München

Sonifier 250	Branson, Heusenstamm
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Typhoon	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Ultraflex TOF/TOF MS	Bruker Daltonics Inc, Manning Park Billerica, MA, USA
Ultraturrex	Jahnke & Kunkel, Staufen
UV-Tisch	Biometra, Göttingen
Vakuummzentrifuge	Bachofer, Reutlingen
Voyager-DE STR	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Whatman-Papier	Gel-blotting paper GB005, Schleicher & Schüll Biosciences, Drassel
Zentrifugen & Rotoren	Centrikon H-401, Kontron Instruments, Eching <i>A 8.24, Kontron Instruments, Eching</i> <i>A 6.14 Kontron Instruments, Eching</i> Centrikon T-1180, Kontron Instruments, Eching <i>TFT 70.38, Kontron Instruments, Eching</i> <i>TST 28.38, Kontron Instruments, Eching</i> Optima TLX Ultracentrifuge, Beckman, Krefeld <i>TLA-45, Beckman, Krefeld</i> Z 360 K, Hermle, Wehingen <i>Zytopsystem, Hermle, Wehingen</i> Centrifuge 5451C, Eppendorf, Hamburg <i>Sigma 2K15, Rotor 12148</i> Hettich Universal 25, Hettich, Tutlingen <i>Rotor 1323, Hettich, Tutlingen</i>
Zorbax 300 SB Vorsäule	Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA

2.19.8 Datenbanken & Programme

CDS Säugerdatenbank	Celera Genomics, Rockville, MD, USA
Data Explorer Version 4.3	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
DeCyder Software	Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden
flexAnalysis Version 2.2	Bruker Daltonics Inc, Manning Park Billerica, MA, USA
Kodak 1D Image Analysis Software	Eastman Kodak Company
Mascot Daemon	Matrix Science, Boston, MA, USA
NCBI-BLAST	Bethesda, MD, USA

PredictProtein	Columbia University, USA
SOSUI	TUAT, Tokyo University of Agriculture & Technology
TMHMM	CBS, Dänemark
TMpred	EMBnet-CH, Schweiz

3 ERGEBNISSE

3.1 Analyse des Saccharosegradienten

Ausgangsmaterial für die Analyse des synaptischen Vesikelproteoms sind die Fraktionen des Saccharosegradienten. Es ist daher von besonderer Wichtigkeit, den Gradienten gut zu charakterisieren. Im Rahmen dieser Analysen wurde die Proteinverteilung über Gelelektrophorese und Western Blot mit anschließender Quantifizierung der Immunsignale sowie über Messung der Proteinkonzentration in den jeweiligen Fraktionen bestimmt.

3.1.1 Abbé-Refraktometer

Die Vermessung des Saccharosegradienten hinsichtlich der Zuckerkonzentration mittels Abbé-Refraktometer erlaubt die gleichzeitige Analyse mehrerer Faktoren. Zum einen läßt sich anschaulich zeigen, daß die gegossenen Gradienten linear sind (Abb. 1). Zum anderen erlaubt die Vermessung die Charakterisierung der verschiedenen Vesikelfraktionen hinsichtlich ihrer Dichte.

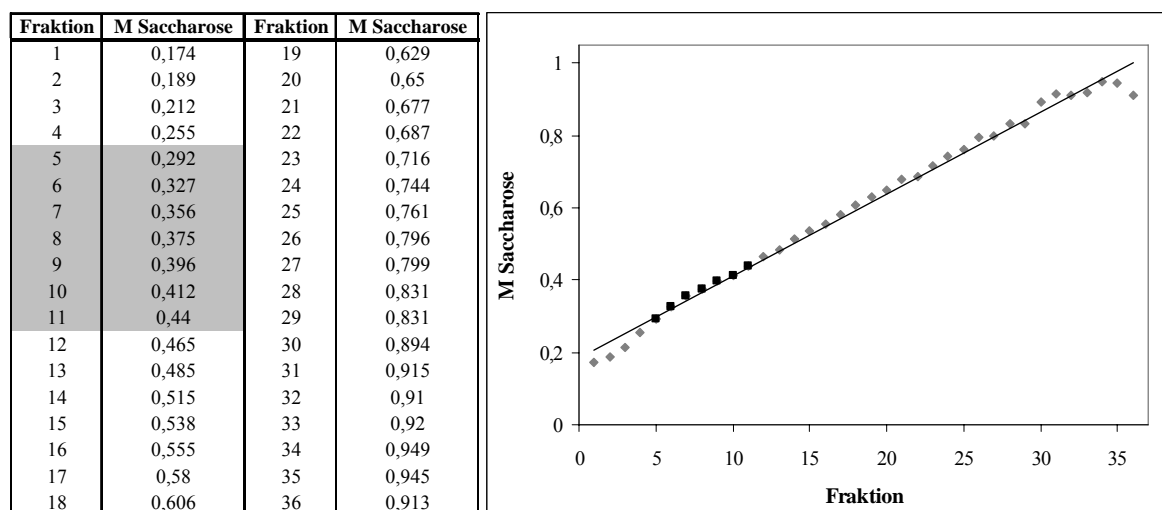


Abb. 1. Analyse des Saccharosegradienten mittels Abbé-Refraktometer hinsichtlich der Zuckerkonzentration.

Die Fraktionen 5 bis 11, die aufgrund der durchgeführten Immunanalysen für die weiteren Versuche ausschlaggebend sind, befinden sich im Saccharosegradienten bei einer Zuckerkonzentration von 0,29 M bis 0,44 M Saccharose.

Der Saccharosegradient zeigt eine hohe Linearität, die nur in den obersten und untersten Fraktionen vom Idealwert leicht abweicht.

3.1.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Analyse der Proteinkonzentration in den Fraktionen des Saccharosegradienten demonstriert die hohe Proteinabundanz in den mittleren und insbesondere den unteren Gradientenfraktionen (Abb. 2). In den Fraktionen 5 bis 11 sind dagegen nur etwa 5% des Gesamtproteins enthalten. Ferner ist ersichtlich, daß die Proteinverteilung einem trimodalen Verlauf folgt. Peaks maximaler Intensität findet man in den Fraktionen 3 bis 8, 15 bis 20 sowie 28 bis 34. Die Fraktionen 15 bis 20 enthalten gegenüber den oberen Fraktionen etwa die 2,5-fache Proteinkonzentration, die Fraktionen 28 bis 34 etwa die 6-fache Konzentration.

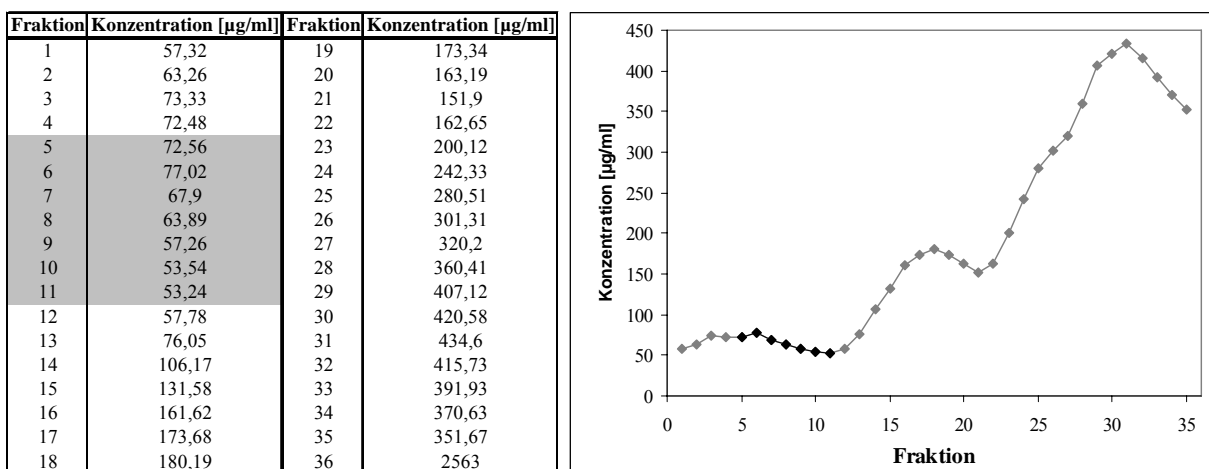


Abb. 2. Bestimmung der Proteinkonzentration der Fraktionen des Saccharosegradienten.

3.1.3 Proteinverteilung über den Saccharosegradienten

Um einen Eindruck von der Proteinkonzentration und der Abundanz unterschiedlicher molekularer Massen in den jeweiligen Fraktionen des Saccharosegradienten zu erhalten, wurde jede zweite Probe des Gradienten per SDS-PAGE und Tris-Acetat-PAGE aufgetrennt. Die Anfärbung beider Gelsysteme mit Silber ist in Abbildung 3 dargestellt. Unterschiede im Trennverhalten der beiden Systeme werden durch die Ziffern 1 und 2 belegt, die jeweils identische Proteinbanden bezeichnen.

Die Anwendung der SDS-PAGE (Abb. 3A) resultiert in einer Proteindetektion über die gesamte Trennstrecke. Der Großteil der Proteine befindet sich in den unteren Fraktionen des Gradienten (Fraktionen 17 bis 35). In diesen Fraktionen zeigt sich die größte Proteinabundanz in einem Bereich molekularer Masse von 15 bis 120 kDa. Die oberen Fraktionen (Fraktionen 5 bis 11) zeigen demgegenüber ein abweichendes Muster. Der Großteil der Proteine besitzt molekulare Massen von 30 bis 55 kDa. Einige Proteine lassen sich jedoch bis zu einer molekularen Masse von 10 kDa bzw. 150 kDa detektieren. Die ausgeprägten Banden der

unteren Fraktionen finden sich im Allgemeinen in abgeschwächter Form auch in den oberen Fraktionen wieder. Zwei Proteine sind bei 10 kDa und 15 kDa lokalisiert, deren Gradientenverteilung gegenüber den anderen Proteinen abweicht. Beide Proteine akkumulieren vorwiegend in den Fraktionen 17 bis 23 und zeigen sowohl in den oberen als auch unteren Fraktionen eine geringe Abundanz. Durch Verwendung des Tris-Acetat-Systems (Abb. 3B) wird deutlich, daß insbesondere die unteren Gradientenfraktionen Proteine hoher molekularer Masse enthalten. Proteine bis zu 200 kDa und höher sind detektierbar.

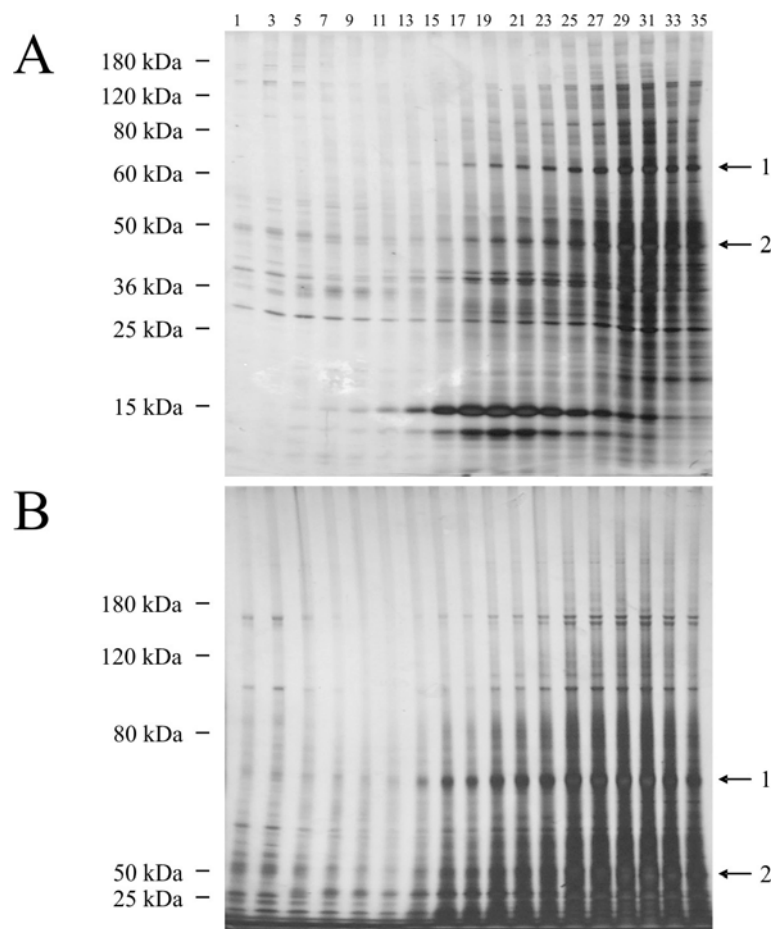


Abb. 3. Analyse des Saccharosegradienten mittels SDS-PAGE (A) und Tris-Acetat-PAGE (B). Von jeder zweiten Fraktion wurden 5 μ l elektrophoretisch aufgetrennt. Die Ziffern 1 und 2 kennzeichnen identische Banden in beiden Gelsystemen.

3.1.4 Reproduzierbarkeit der Präparation

Die Reproduzierbarkeit der Präparationen ist von entscheidender Wichtigkeit. Diese wird durch Western Blot Analysen vier verschiedener Präparationen anhand des Verlaufes des integralen synaptischen Vesikelproteins Synaptophysin untersucht (Abb. 4).

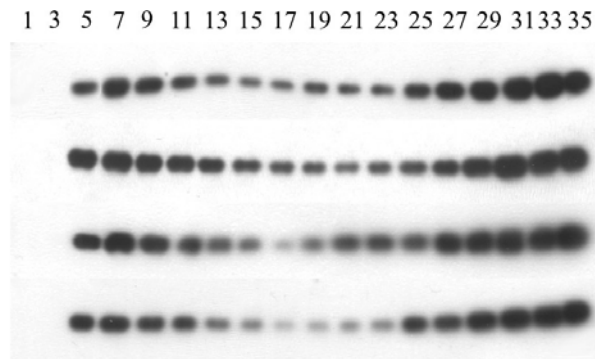


Abb. 4. Analyse verschiedener Saccharosegradienten hinsichtlich der Verteilung von Synaptophysin. Von jeder zweiten Fraktion wurden 5 μ l Probe elektrophoretisch aufgetrennt.

In allen vier Präparationen ist eine hohe Proteinabundanz in den oberen und unteren Fraktionen (Fraktionen 5 bis 11 und 27 bis 35) detektierbar. Der dazwischen liegende Bereich ist durch eine geringere Konzentration an Synaptophysin gekennzeichnet. Die Fraktionen 1 bis 3 enthalten in allen analysierten Saccharosegradienten kein Synaptophysin. Das Muster der Synaptophysin-Verteilung ist in den analysierten Proben sehr ähnlich. Eine genauere Betrachtung der Immunsignalabfolge ergibt jedoch leichte Abweichungen, insbesondere in den Fraktionen 15 bis 21, in denen leicht variable Signalstärken beobachtbar sind.

3.1.5 Immunanalysen über Western Blot und Dot Blot

Als Schnelltest für die Analyse des letzten Schrittes der subzellulären Fraktionierung wurde der Dot Blot eingesetzt, um die Qualität der Präparation schnellstmöglich überprüfen und die Proben der Immunreinigung zuführen zu können. Die Ergebnisse des Dot Blots (Abb. 5) demonstrieren, daß SV2 als integrales Vesikelprotein ab Fraktion 4 bis hin zu Fraktion 36 zu detektieren ist, wobei in Fraktion 4 nur ein sehr schwaches Immunsignal vorhanden ist. Die Fraktionen 5 bis 11 weisen bei Vergleich mit den Fraktionen 12 bis 27 eine höhere Konzentration an SV2 auf. Ab Fraktion 28 nimmt die Konzentration an SV2 wieder zu und erreicht in den Fraktionen 28 bis 34 ein Maximum.

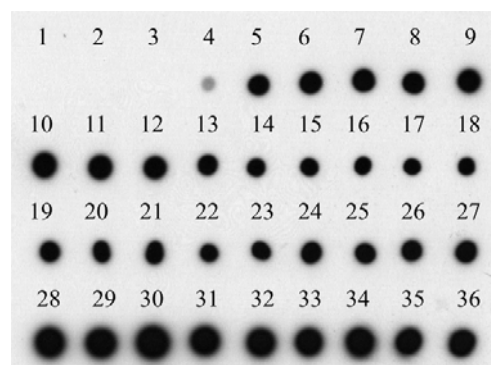


Abb. 5. Analyse des Saccharosegradienten mittels Dot Blot. Pro Fraktion wurde 1 μ l Probe gespottet.

Aussagekräftigere Ergebnisse erhält man durch Auswertung der Western Blot Analysen. Hierfür werden Antikörper gegen integrale Vesikelproteine, vesikelassoziierte Proteine, gegen Proteine des Zytoskeletts, der präsynaptischen Plasmamembran als auch gegen Proteine der Postsynapse angewendet. Ferner werden Analysen mit Antikörpern gegen Markerproteine anderer Organellen durchgeführt. Zusätzlich wird der Saccharosegradient hinsichtlich metabolischer Enzyme analysiert.

Die Analyse der integralen synaptischen Vesikelproteine SV2, Synaptophysin, Synaptotagmin, Synaptogyrin, VAMP-2, SCAMP 1, vGat, vGlut1 und vAChT ergibt sehr ähnliche Muster (Abb. 6). Hohe Proteinkonzentrationen finden sich in den Fraktionen 5 bis 11 wieder. Dies gilt für alle analysierten Proteine bis auf SCAMP 1, welches in den Fraktionen 7 bis 11 besonders prominent ist. Die Fraktionen 1 bis 3 enthalten wie schon bei der Analyse des Dot Blots gezeigt kein Vesikelprotein. Der mittlere Teil des Gradienten zeigt im Vergleich mit den oberen und unteren Fraktionen eine geringere Konzentration an synaptischen Vesikelproteinen. Ab Fraktion 23 läßt sich eine allgemeine Zunahme der Proteinkonzentration erkennen, die mit Ausnahme des vesikulären Acetylcholin-Transporters, VAMP-2, SCAMP 1 und vGlut1 bis in die unterste Fraktion anhält. Diese Proteine zeigen in den unteren Fraktionen eine Konzentrationsabnahme.

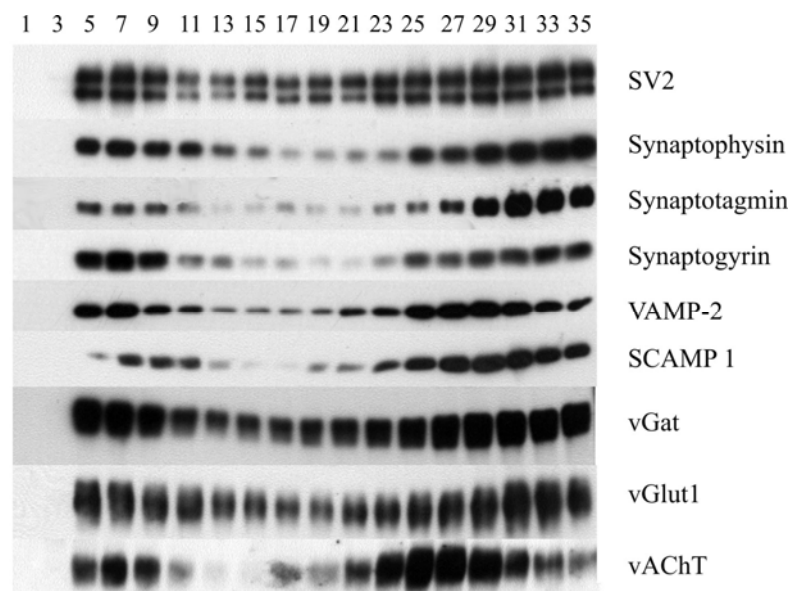


Abb. 6. Analyse des Saccharosegradienten mittels Western Blot. Detektierte integrale Vesikelproteine beinhalten SV2 (80 und 100 kDa), Synaptophysin (38 kDa), Synaptotagmin (68 kDa), Synaptogyrin (29 kDa), VAMP-2 (14 kDa), SCAMP 1 (38 kDa), vGat (57 kDa), vGlut1 (60 kDa) und vAChT (70 kDa). Analysiert wurden 5 μ l Probe jeder zweiten Fraktion.

Neben integralen Membranproteinen ist eine Reihe von Proteinen peripher an Vesikel assoziiert. Ob diese bei der Präparation verloren gehen oder sich in den Fraktionen des

Saccharosegradienten wiederfinden, wird per Western Blot überprüft. Analyisierte Proteine umfassen rab3A und die Synapsine I und II (Abb. 7). Rab3A läßt sich ausschließlich in den Fraktionen 17 bis 33 detektieren. Dagegen findet man Synapsin I in den Fraktionen 5 bis 35 in annähernd gleicher Konzentration. Eine geringfügige Konzentrationsabnahme läßt sich in den Fraktionen 13 bis 21 ausmachen. Synapsin II zeigt eine abweichende Verteilung. Das Muster der Isoform Synapsin IIa ähnelt stark dem Muster der integralen Vesikelproteine. Hohe Proteinkonzentrationen sind in den Fraktionen 5 bis 11 sowie 27 bis 35 detektierbar. Die Isoform Synapsin IIb hingegen ist ausschließlich in den unteren Fraktionen (Fraktion 25 bis 35) detektierbar.

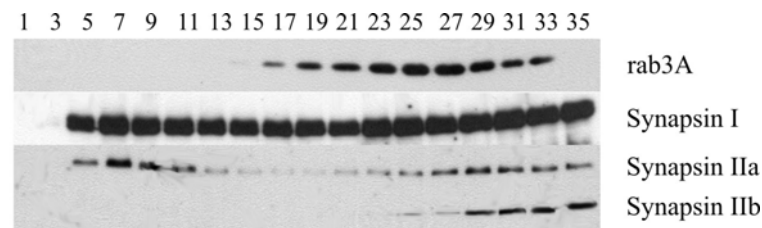


Abb. 7. Analyse des Saccharosegradienten mittels Western Blot. Detektierte vesikelassoziierte Proteine beinhalten rab3A (25 kDa), Synapsin I (74 und 72 kDa) und Synapsin II (74 und 54 kDa). Analysiert wurden 5 µl Probe jeder zweiten Fraktion.

Das t-SNARE SNAP-25 läßt sich ab Fraktionen 19 und nimmt bis zu den unteren Fraktionen an Konzentration zu (Abb. 8). Auch Syntaxin 1 weist hohe Proteinkonzentrationen in den unteren Fraktionen auf, ist jedoch gegenüber SNAP-25 bereits in den oberen Fraktionen enthalten. Ab Fraktion 11 nimmt die Konzentration bis zu Fraktion 19 zu und bleibt ab Fraktion 21 annähernd konstant. Ähnliche Muster lassen sich für die Regulatorproteine Complexin 1 und 2, Munc18, $\alpha\beta$ -SNAP und NSF erkennen. Allen Proteinen ist gemein, daß sie in den oberen Fraktionen fehlen und eine hohe Abundanz in den unteren Fraktionen aufweisen. Proteine der präsynaptischen Plasmamembran beinhalten Flotillin-1, die Na₃K-ATPase sowie den Calcium-Kanal Ca_v2.2. Wie bereits für die Regulatorproteine beschrieben, fehlen diese Proteine in den oberen Fraktionen und reichern sich ab Fraktion 15 bzw. 19 an.

Untersuchte Proteine des Zytoskeletts umfassen Aktin und Tubulin (Abb. 9). Aktin zeigt eine Verteilung über den Gradienten, die dem Profil integraler Vesikelproteine entspricht. Es akkumuliert insbesondere in den Fraktionen 7 bis 11 sowie ab Fraktion 25. Tubulin hingegen läßt sich erst ab Fraktion 19 detektieren und zeigt ein Maximum in den Fraktionen 27 bis 31.

Die Analyse des glykolytischen Enzyms GAPDH zeigt eine Abundanz in den Fraktionen 3 bis 7 sowie ab Fraktion 17 (Abb. 9). Die Pyruvat Kinase hingegen läßt sich in allen Fraktionen

detektieren und weist Maxima in den Fraktionen 1 bis 5 sowie 23 bis 35 auf. Das Muster der Kinase Erk-1/2 läßt sich mit dem integraler Vesikelproteine vergleichen. Das Enzym akkumuliert in den Fraktionen 3 und 5 sowie 17 bis 35. Die beiden ϵ -Sarkoglykanisoformen cyto und 11b fehlen in den oberen Fraktionen und weisen beide eine hohe Proteinkonzentration in den Fraktionen 17 bis 35 auf.

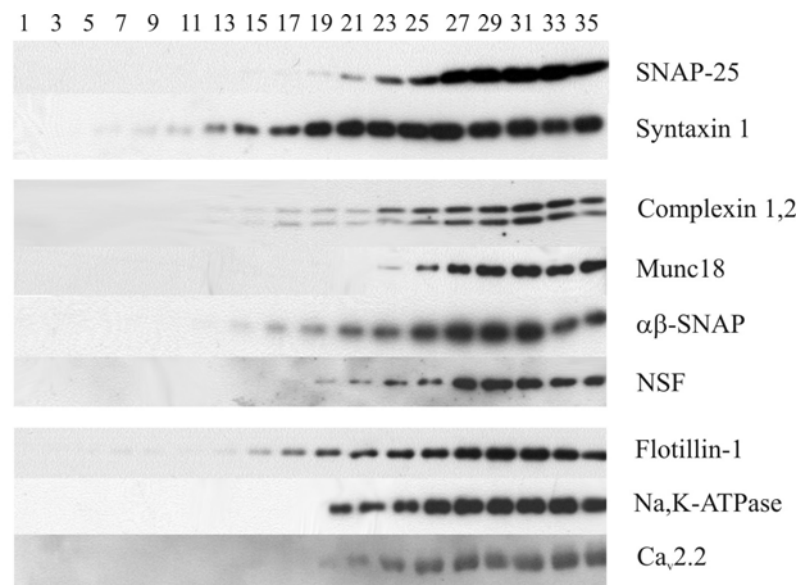


Abb. 8. Analyse des Saccharosegradienten mittels Western Blot. Detektierte Proteine beinhalten SNAP-25 (25 kDa), Syntaxin 1 (35 kDa), Complexin 1 und 2 (10 und 12 kDa), Munc18 (68 kDa), $\alpha\beta$ -SNAP (25 kDa), NSF (80 kDa), Flotillin-1 (48 kDa), Na,K-ATPase $\alpha 5$ (100 kDa) und Ca_v2.2 (210 kDa). Analysiert wurden 5 μ l Probe jeder zweiten Fraktion.

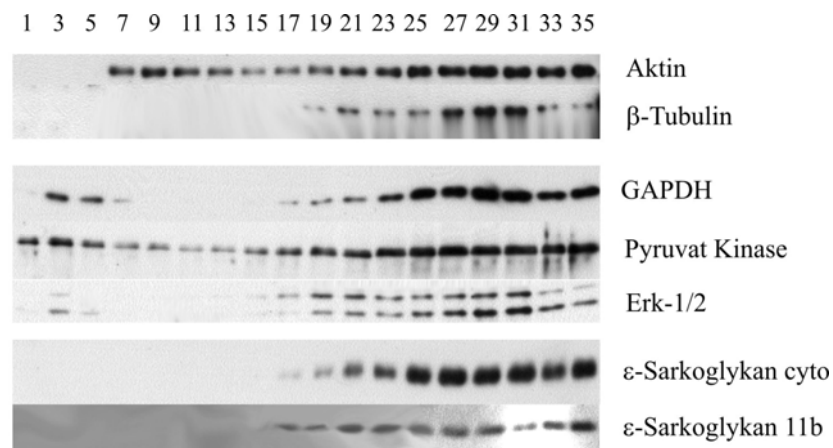


Abb. 9. Analyse des Saccharosegradienten mittels Western Blot. Detektierte Proteine beinhalten Aktin (42 kDa), β -Tubulin (50 kDa), GAPDH (36 kDa), Pyruvat Kinase (58 kDa), MAPK1/2 (42 und 44 kDa) und die ϵ -Sarkoglykane cyto und SG 11b (47 bzw. 49 kDa). Analysiert wurden 5 μ l Probe jeder zweiten Fraktion.

Untersuchungen hinsichtlich möglicher Kontaminationen (Abb. 10) umfassen Analysen des sekretorischen Weges und beinhalten die ER-Proteine Calnexin und den IP3-Rezeptor als auch das trans-Golgi Protein TGN38 sowie das frühe Endosomenprotein EEA1. Calnexin ist ein lösliches Protein des ER-Lumens und läßt sich ab Fraktion 3 detektieren. Es akkumuliert

insbesondere in den Fraktionen 25 bis 35. Der membranständige IP3-Rezeptor akkumuliert ebenfalls in den Fraktionen 25 bis 35 und weist eine geringe Abundanz in den oberen Fraktionen auf. TGN38 zeigt ein abweichendes Muster. Das Protein ist ausschließlich in den Fraktionen 21 bis 29 zu detektieren. EEA1 hingegen akkumuliert in den Fraktionen 21 bis 35.

Andere getestete Organellen beinhalten Peroxisomen, Mitochondrien und Nuclei (Abb. 10). Das Peroxisomenprotein PMP70 ist ausschließlich in den unteren Fraktionen (29 bis 35) detektierbar und nimmt zu Fraktion 35 hin an Intensität zu. Die mitochondriale F_0F_1 -ATPase hingegen läßt sich bereits ab Fraktion 19 detektieren. Hohe Konzentrationen befinden sich in den Fraktionen 25 bis 35. Analysen hinsichtlich Lamin B als Kernprotein resultieren in keinem Immunsignal (Daten nicht gezeigt).

Weitere Immundetektionen beinhalten Analysen der Postsynapse (Abb. 10). Der AMPA-Rezeptor ist in den Fraktionen 17 bis 35 detektierbar und weist eine hohe Abundanz ab Fraktion 29 auf. PSD95 ist erst ab Fraktion 29 nachweisbar, zeigt aber keine Intensitätszunahme zu den tieferen Fraktionen hin.

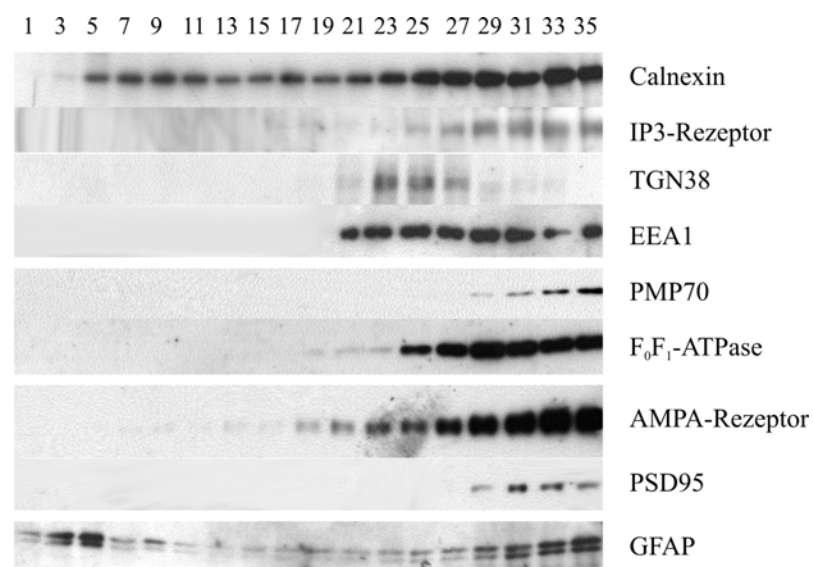


Abb. 10. Analyse des Saccharosegradienten mittels Western Blot. Detektierte Proteine beinhalten Calnexin (64 kDa), IP3-Rezeptor (140 kDa), TGN38 (38 kDa), EEA1 (65 kDa), PMP70 (70 kDa), F_0F_1 -ATPase α (55 kDa), AMPA-Rezeptor Untereinheiten 2 und 3 (100 kDa), PSD95 (95 kDa) und GFAP (50 kDa). Analysiert wurden 5 μ l Probe jeder zweiten Fraktion.

Analysen des sauren glialen Filamentsproteins (GFAP) resultieren in Immundetektionen in allen Fraktionen des Saccharosegradienten (Abb. 10). Hohe Proteinkonzentrationen lassen sich in den Fraktionen 3 und 5 sowie 31 bis 35 nachweisen. Das Protein ist als Doppelbande mit molekularen Massen von 50 und 52 kDa detektierbar.

Proteine der CAZ beinhalten Bassoon und Piccolo. Beide Proteine besitzen hohe molekulare Massen (Bassoon 433 kDa, Piccolo 559 kDa). Versuche, die Proteine über Western Blot nachzuweisen, verliefen erfolglos. Daher wurde in diesem Fall eine Analyse per Dot Blot durchgeführt (Abb. 11). Bassoon ist bis auf Fraktion 1 ubiquitär vorhanden. Es weist ab Fraktion 3 eine stetige Konzentrationszunahme auf, die ihr Maximum in den Fraktionen 25 bis 35 erreicht. Piccolo ist ab Fraktion 5 detektierbar und zeigt eine maximale Abundanz in den Fraktionen 25 bis 35.

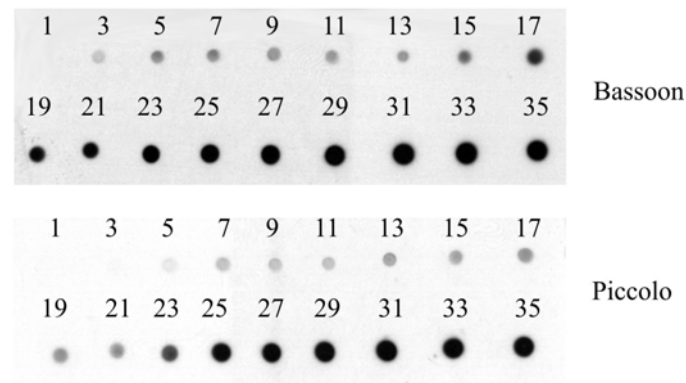


Abb. 11. Analyse des Saccharosegradienten mittels Dot Blot. Detektierte Proteine umfassen Bassoon und Piccolo. Analysiert wurde 1 µl Probe jeder zweiten Fraktion.

Eine zusammenfassende Darstellung der Charakterisierung des Saccharosegradienten (Abb. 12) macht deutlich, daß in den oberen Fraktionen bis auf hier nicht eingeflossene Verunreinigungen durch Calnexin und GFAP ausschließlich integrale synaptische Vesikelproteine sowie deren assoziierte Proteine vorzufinden sind.

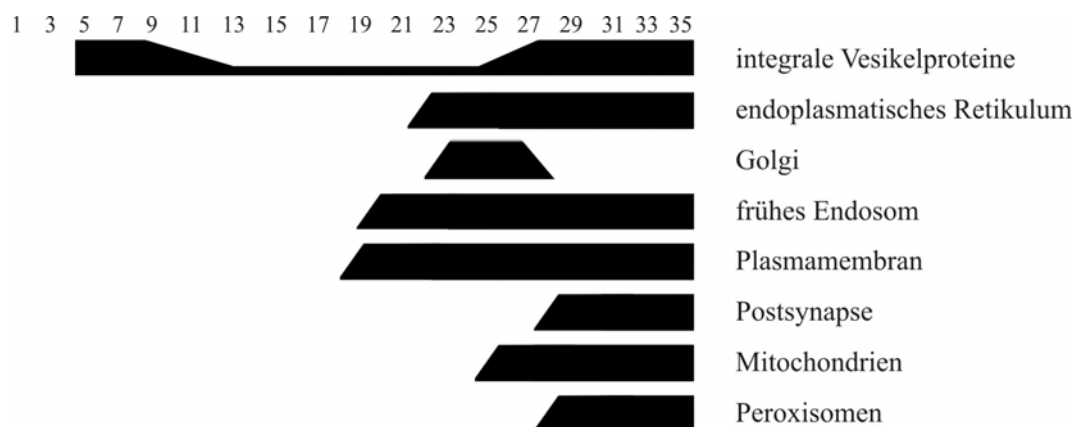


Abb. 12. Zusammenfassung der Immunanalysen des Saccharosegradienten. Dargestellt sind die Konzentrationsprofile integraler synaptischer Vesikelproteine, der Proteine des ER, Golgi und frühen Endosoms, der Plasmamembran und Postsynapse sowie mitochondrialer und peroxisomaler Proteine.

Proteine der Plasmamembran und Postsynapse sowie Kontaminationen durch ER, Golgi, frühe Endosomen und Mitochondrien sind ausschließlich in den unteren Fraktionen detektierbar.

3.1.6 Quantifizierungsstudien

Die Proteinkonzentrationsbestimmung einzelner Fraktionen erlaubt zwar eine Abschätzung und einen Vergleich des Gesamtproteins, läßt aber keine Aussage darüber zu, wie sich die Konzentration der Vesikelproteine in den einzelnen Fraktionen verhält. Um die Konzentrationsverteilung einzelner Proteine zu bestimmen, wird das Quantifizierungssystem der Firma LICOR verwendet. Dem System ist eigen, daß bei Wahl von Erstantikörpern aus verschiedenen Spezies und durch Verwendung fluoreszenzgekoppelter Zweitantikörper gleichzeitig zwei Proteine analysiert werden können. Durchgeführte Kodetektionen beinhalten SV2 und Synaptophysin, Synaptoporin und SNAP-25 sowie Syntaxin 1 und Synaptogyrin (Abb. 13).

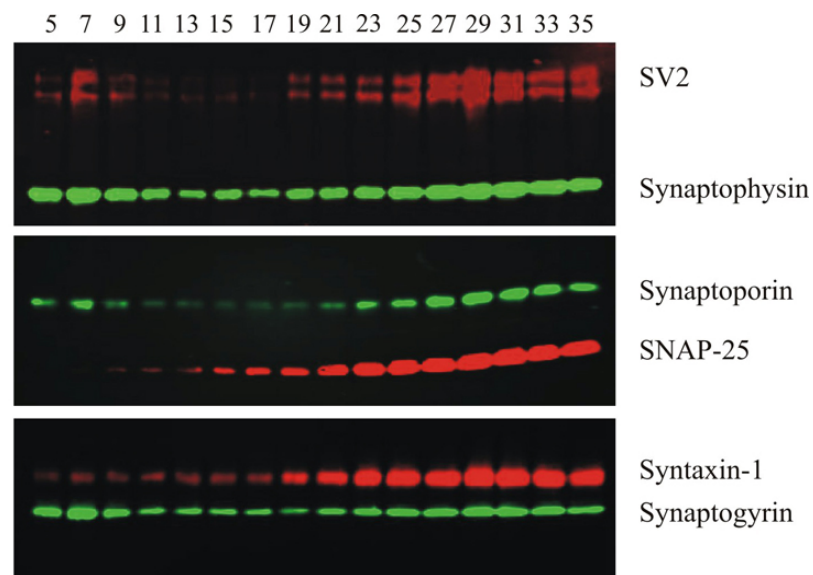


Abb. 13. Quantifizierungsstudien über fluoreszenzgekoppelte Zweitantikörper über den Saccharosegradienten: SV2 (80 und 100 kDa), Synaptophysin (38 kDa), Synaptoporin (29 kDa), SNAP-25 (25 kDa), Syntaxin 1 (35 kDa) und Synaptogyrin (29 kDa). Analysiert wurden 5 µl Probe jeder zweiten Fraktion.

Die Analyse der Signalintensitäten resultiert für die synaptischen Vesikelproteine SV2, Synaptophysin, Synaptogyrin und Synaptoporin in identischen Mustern (Abb. 14). Die Proteinkonzentration dieser Vesikelproteine ist in den Fraktionen 5 bis 11 sowie in den Fraktionen 25 bis 35 erhöht. Dies spiegelt die Ergebnisse der Western Blot Analysen wider. Auch das t-SNARE Syntaxin-1 zeigt einen sehr ähnlichen Verlauf wie die Vesikelproteine und bestätigt die Ergebnisse der Western Blot Analyse. SNAP-25 zeigt demgegenüber ein abweichendes Migrationsverhalten. Es akkumuliert in den unteren Fraktionen (21 bis 35) und ist in den oberen Fraktionen nur schwach präsent. Betrachtet man das prozentuale Vorkommen der Proteine in den einzelnen Fraktionen, so ergeben sich für die Fraktionen 5 bis 11 folgende Werte: SV2 13%, Synaptophysin 21%, SNAP-25 3%, Syntaxin 1 5%, Synaptogyrin 27% und Synaptoporin 16%.

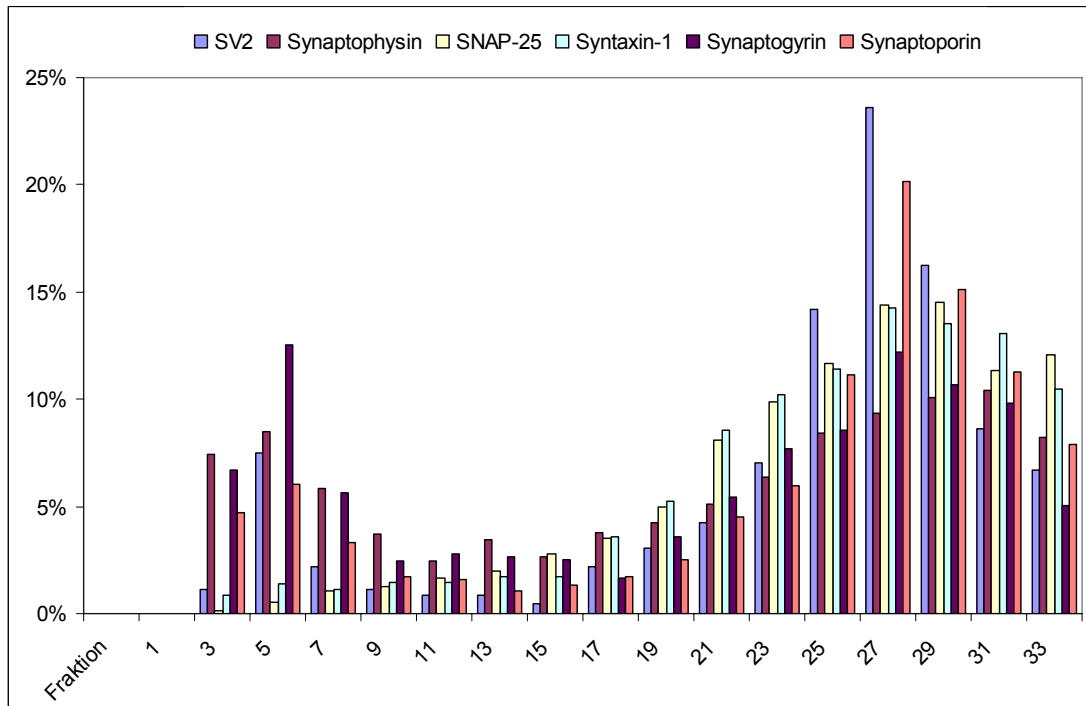


Abb. 14. Quantifizierung der über fluoreszenzgekoppelte Zweitantikörper erhaltenen Resultate. Die quantifizierten Signale sind in Prozent des jeweiligen Gesamtproteins gegen die Fraktionen des Gradienten aufgetragen. Analytierte Proteine umfassen SV2, Synaptophysin, SNAP-25, Syntaxin 1, Synaptogyrin und Synaptoporin.

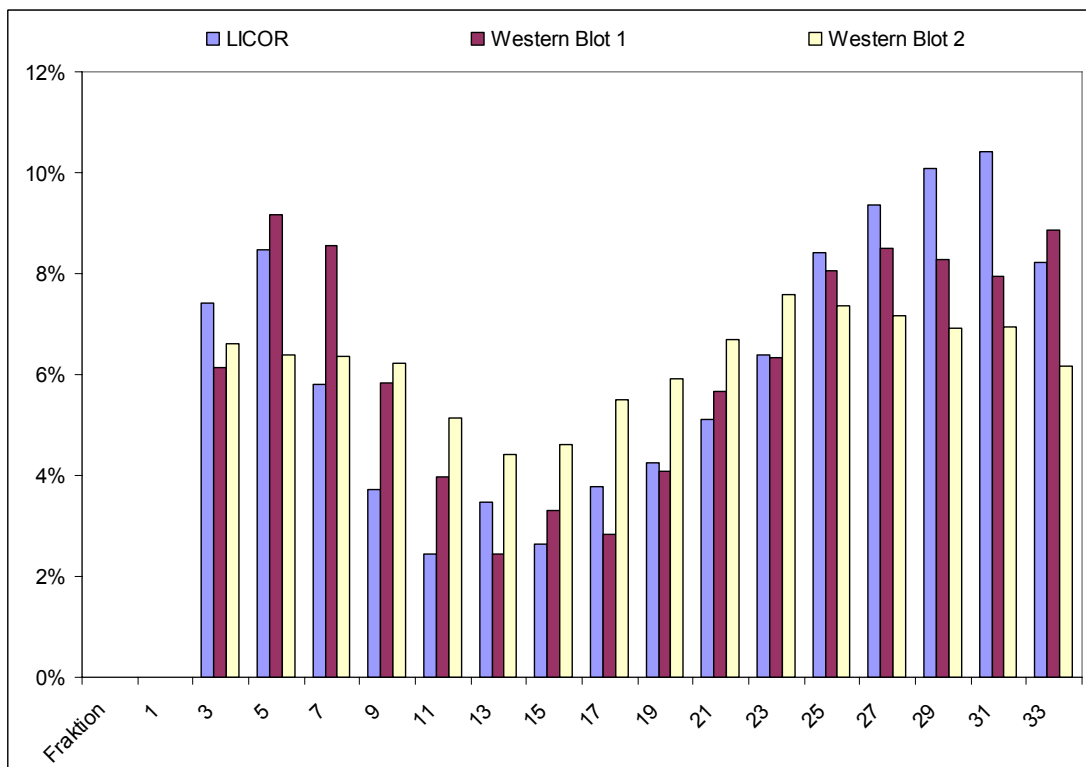


Abb. 15. Vergleich der Quantifizierungen der Verteilung von Synaptophysin, die mittels LICOR und zweier Western Blot Analysen erhalten wurden. Quantifizierte Signale sind in Prozent des jeweiligen Gesamtproteins gegen die Fraktionen des Gradienten aufgetragen.

Da das LICOR-System nur im Rahmen eines Workshops zur Verfügung stand, wurde überprüft, ob über photometrische Auswertung der mittels ECL entwickelten Western Blots vergleichbare Ergebnisse erzielt werden können. Exemplarisch ist der Vergleich für Synaptophysin demonstriert (Abb. 15). Die Ergebnisse sind unter Berücksichtigung einer Fehlertoleranz und der gegebenen biologischen Variation verschiedener Präparationen mit denen des LICOR-Systems vergleichbar. Sowohl Profil als auch relative prozentuale Werte spiegeln sich in beiden verwendeten Ansätzen wider. Aufgrund der demonstrierten Vergleichbarkeit beider Systeme werden im Folgenden die Ergebnisse der photometrischen Quantifizierungen für die Western Blot Analysen dargestellt, die unter 3.1.5 beschrieben sind.

Den integralen synaptischen Vesikelproteinen SV2, Synaptophysin, Synaptotagmin, Synaptogyrin, VAMP-2, SCAMP 1, vGat, vGlut1 und vAChT (Abb. 16) ist ein annähernd identisches Profil über den Saccharosegradienten gemeinsam. Sehr hohe Proteinkonzentrationen lassen sich in den Fraktionen 5 bis 11 nachweisen, die für die Immunreinigung verwendet werden. Die Fraktionen 12 bis 22 zeigen für alle analysierten Proteine eine sehr geringe Abundanz. Ab Fraktion 23 nimmt in allen Immunanalysen die Proteinkonzentration zu und erreicht in den unteren Fraktionen erneut einen Konzentrationsgipfel. Bis auf die Analysen für Synaptotagmin liegt die Proteinkonzentration in den oberen Fraktionen in etwa so hoch wie in den unteren Fraktionen. Zehn bis 14% der Gesamteinkonzentration ist in den Fraktionen 5 bis 11 enthalten. Nur Synaptotagmin zeigt in den oberen Fraktionen mit ~5% Gesamtprotein gegenüber 15% Gesamtprotein eine abweichende Verteilung.

Die vesikelassoziierten Proteine Synapsin I und Synapsin II ähneln der Verteilung der integralen Vesikelproteine (Abb. 17). Dies trifft insbesondere für Synapsin II zu, dessen maximale Konzentration mit 16% des Gesamtproteins in den oberen und unteren Fraktionen gleichermaßen hoch ist. Synapsin I hingegen zeigt einen leichten Gipfel in den oberen Fraktionen und nimmt dann annähernd linear an Konzentration zu. In den Fraktionen 5 bis 9 lassen sich 6% des gesamten Proteins detektieren, in Fraktion 35 erreicht die Proteinkonzentration mit 10% ihren Maximalwert. Rab3A ist in den oberen Fraktionen nicht detektierbar. Nachzuweisen ist es erst ab Fraktion 15 und nimmt dann bis Fraktion 24 an Konzentration zu. Die maximale Abundanz liegt in den Fraktionen 24 bis 26 mit 14% des Gesamtproteins. Ab Fraktion 27 fällt die Konzentration stetig ab und erreicht in Fraktion 35 einen Wert von 2%.

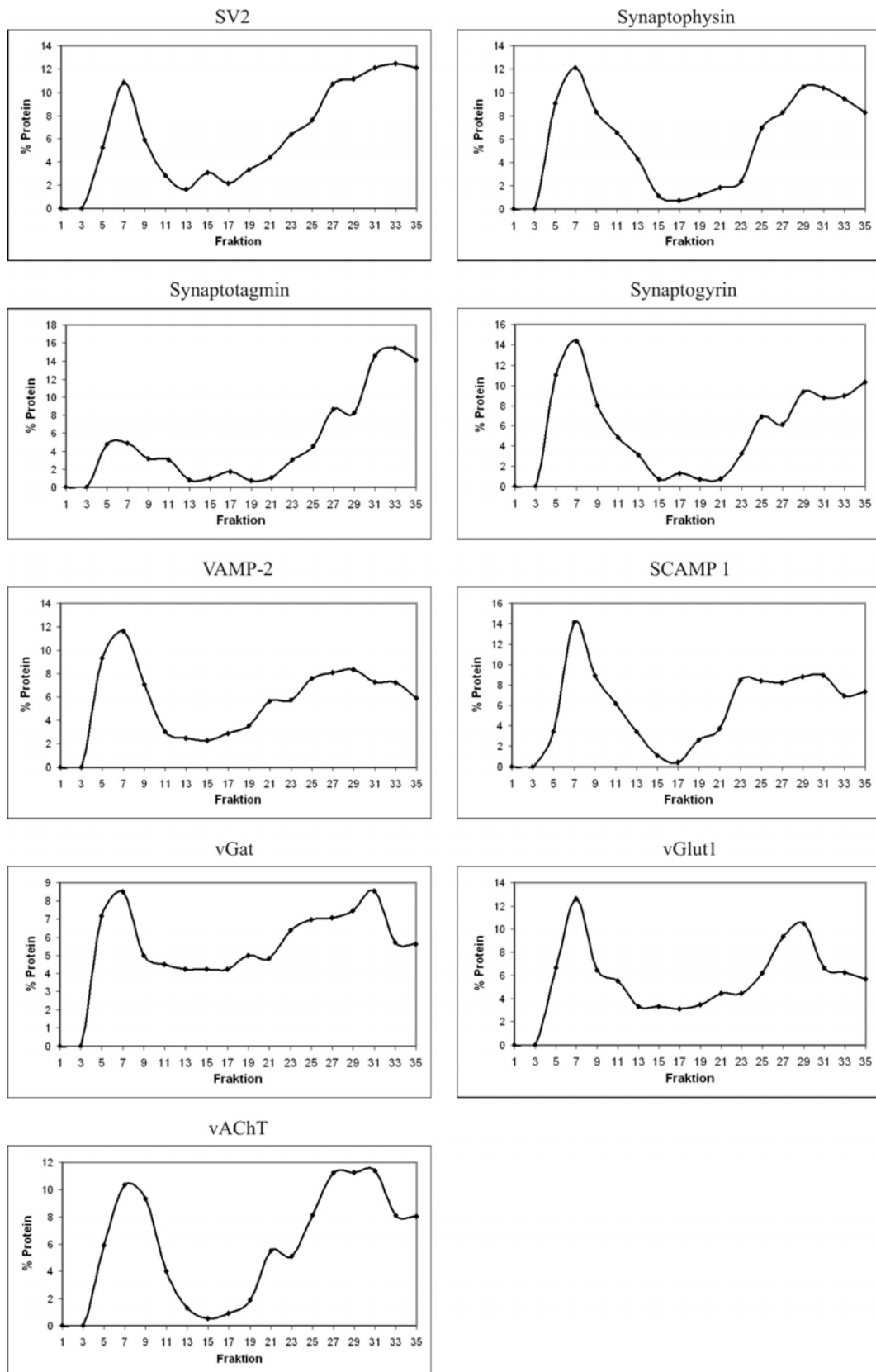


Abb. 16. Photometrische Quantifizierung der Immunsignale für die integralen synaptischen Vesikelproteine SV2, Synaptophysin, Synaptotagmin, Synaptogyrin, VAMP-2, SCAMP 1, vGat, vGlut1 und vAChT. Aufgetragen ist das prozentuale Vorkommen des jeweiligen Proteins in jeder zweiten Fraktion des Saccharosegradienten.

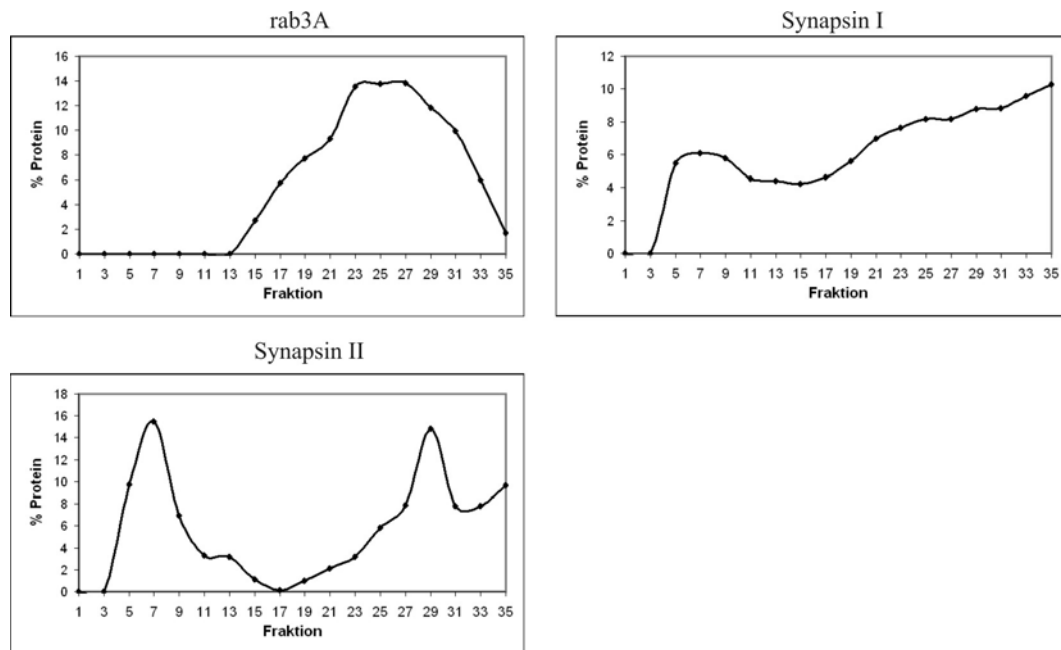


Abb. 17. Photometrische Quantifizierung der Immunsignale für die vesikelassoziierten Proteine rab3A, Synapsin I und Synapsin II. Aufgetragen ist das prozentuale Vorkommen des jeweiligen Proteins in jeder zweiten Fraktion des Saccharosegradienten.

Das Vorkommen des t-SNAREs SNAP-25 beschränkt sich auf die unteren Fraktionen (Abb. 18). Eine hohe Proteinkonzentration ist in den Fraktionen 27 bis 35 mit jeweils 17% des Gesamtproteins zu detektieren. Demgegenüber ist für das t-SNARE Syntaxin 1 in den vorderen Fraktionen kein Protein detektierbar. Die Proteinkonzentration steigt ab Fraktion 9 an und gipfelt in Fraktion 27 mit 12% des Gesamtproteins.

Die Verteilung von Complexin ähnelt dieser Verteilung (Abb. 18). Neben dem kleinen Gipfel in den Fraktionen 18 und 19 mit 4% Gesamtprotein ist der Hauptteil des Proteins in Fraktion 29 zu detektieren (17%). Munc18 läßt sich ab Fraktion 21 detektieren, nimmt bis Fraktion 26 linear an Konzentration zu und endet in einer gleichbleibenden Konzentration von 17% der Gesamtproteinkonzentration in den unteren Fraktionen. Der Verlauf von $\alpha\beta$ -SNAP ähnelt dem für Complexin. Bis auf den kleinen Hügel in den Fraktionen 13 bis 17 mit 4% der Gesamtproteinkonzentration liegt die Hauptabundanz in den Fraktionen 27 bis 29 (17% des Gesamtproteins). NSF zeigt bis auf den Hügel für die Fraktionen 23 bis 25 ein identisches Muster. Die höchste Konzentration des Proteins ist mit 17% des Gesamtproteins in Fraktion 29 detektierbar.

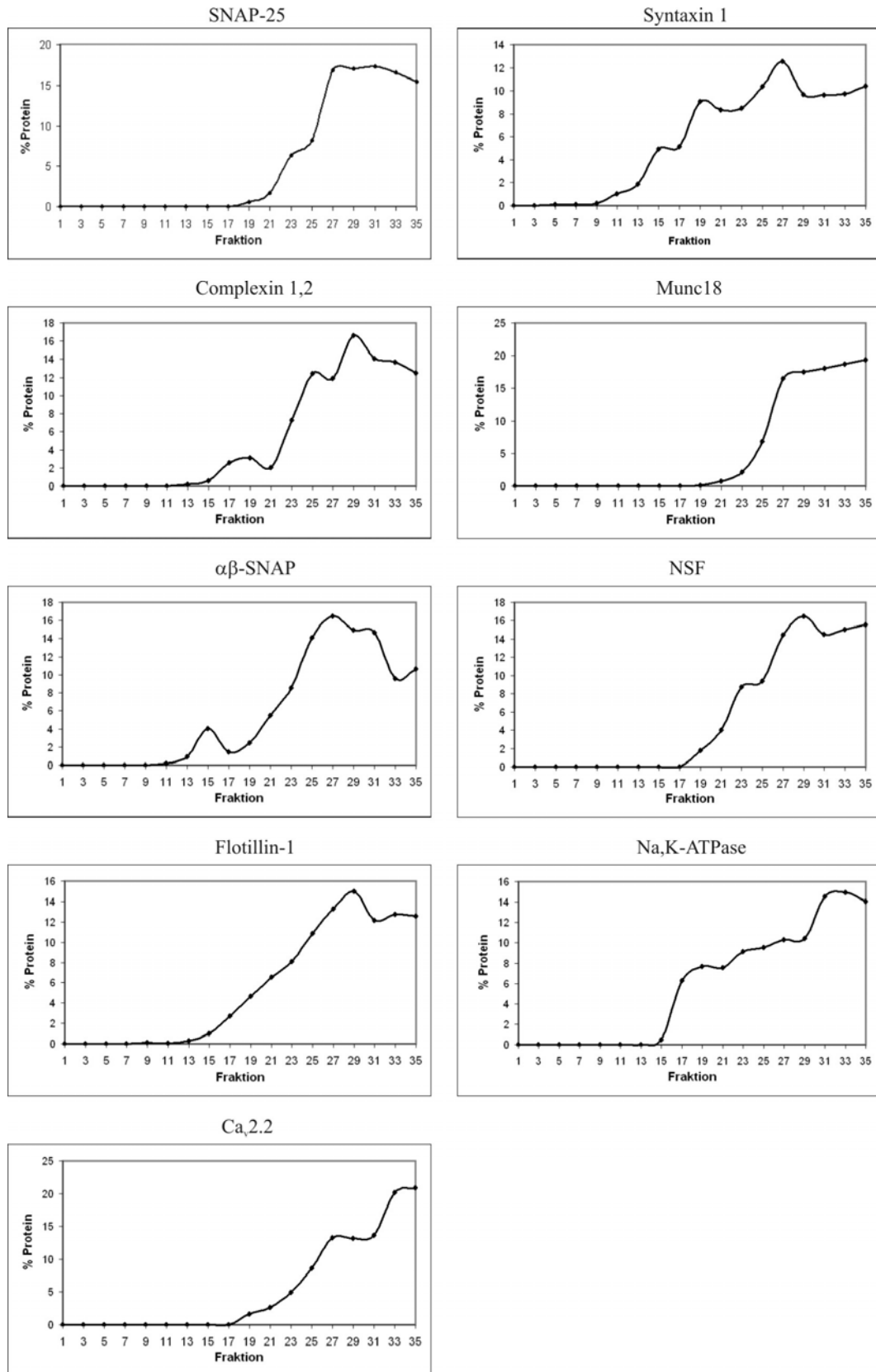


Abb. 18. Photometrische Quantifizierung der Immunsignale für die Proteine SNAP-25, Syntaxin 1, Complexin, Munc18, $\alpha\beta$ -SNAP, NSF, Flotillin-1, Na,K-ATPase und Ca_v2.2. Aufgetragen ist das prozentuale Vorkommen des jeweiligen Proteins in jeder zweiten Fraktion des Saccharosegradienten.

Flotillin-1/Reggie-2 ist in den Fraktionen 7 bis 11 in minimaler Konzentration detektierbar, nimmt dann annähernd linear an Abundanz zu und weist ein Maximum in Fraktion 29 mit 17% des Gesamtproteins auf (Abb. 17). Die Na,K-ATPase ist ab Fraktion 15 detektierbar und nimmt bis zu Fraktion 33 an Konzentration zu, in der sie eine maximale Konzentration von 17% erreicht. Gleiches gilt für den Calcium-Kanal $Ca_v2.2$, der ab Fraktion 18 detektierbar ist, bis hin zu Fraktion 35 an Konzentration zunimmt und dort einen Wert von 21% des Gesamtproteins erreicht.

Das Zytoskelettprotein Aktin ähnelt in seiner Verteilung dem Muster integraler Vesikelproteine (Abb. 19). Eine hohe Konzentration ist in den Fraktionen 5 bis 11 detektierbar, ebenso wie in den Bereichen ab Fraktion 19. Die höchste Konzentration wird in Fraktion 35 mit 11% des Gesamtvorkommens erreicht. Im Gegensatz dazu ist β -Tubulin in den oberen Fraktionen nicht detektierbar. Es zeigt einen bimodalen Verlauf mit einer maximalen Konzentration in Fraktion 31 mit 24% des Gesamtvorkommens.

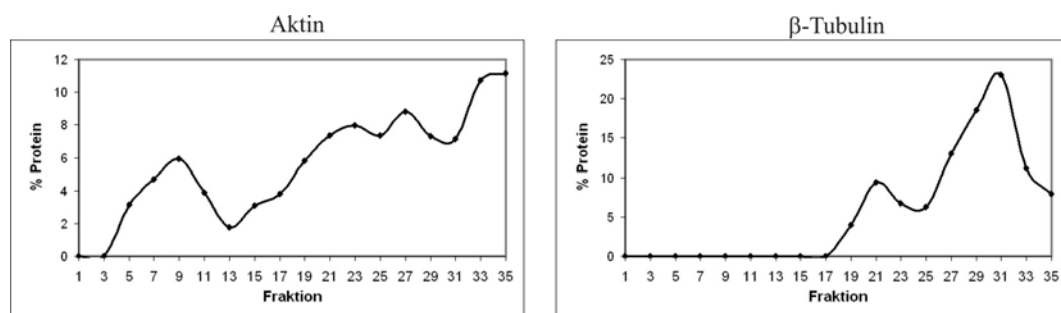


Abb. 19. Photometrische Quantifizierung der Immunsignale für die Proteine Aktin und β -Tubulin. Aufgetragen ist das prozentuale Vorkommen des jeweiligen Proteins in jeder zweiten Fraktion des Saccharosegradienten.

Die Analysen der Glykolyse-Enzyme GAPDH und Pyruvat Kinase ergeben ähnliche Profile (Abb. 20). Beide zeigen einen bimodalen Verlauf mit Maxima in den Fraktionen 3 und 4 sowie in den Fraktionen 27 bis 29. Die höchsten Konzentrationen liegen in den unteren Fraktionen mit 15% und 11% des Gesamtvorkommens. Die Kinase Erk-1/2 zeigt ebenfalls in Fraktion 3 einen leichten Gipfel (4%), ist jedoch in den Fraktionen 19 bis 21 sowie 31 in höherer Konzentration vorhanden. Fraktion 31 enthält mit 22% die maximale Proteinkonzentration. Die untersuchten ϵ -Sarkoglykanisofomen cyto und 11b sind beide ausschließlich in den unteren Fraktionen detektierbar, cyto ab Fraktion 17, 11b ab Fraktion 19. Die cyto-Isoform weist hierbei eine stärkere Konzentrationszunahme auf und erreicht in Fraktion 35 mit 19% ihr Maximum. Die 11b-Isoform nimmt weniger an Konzentration zu und erreicht mit 32% ebenfalls ein Maximum in Fraktion 35.

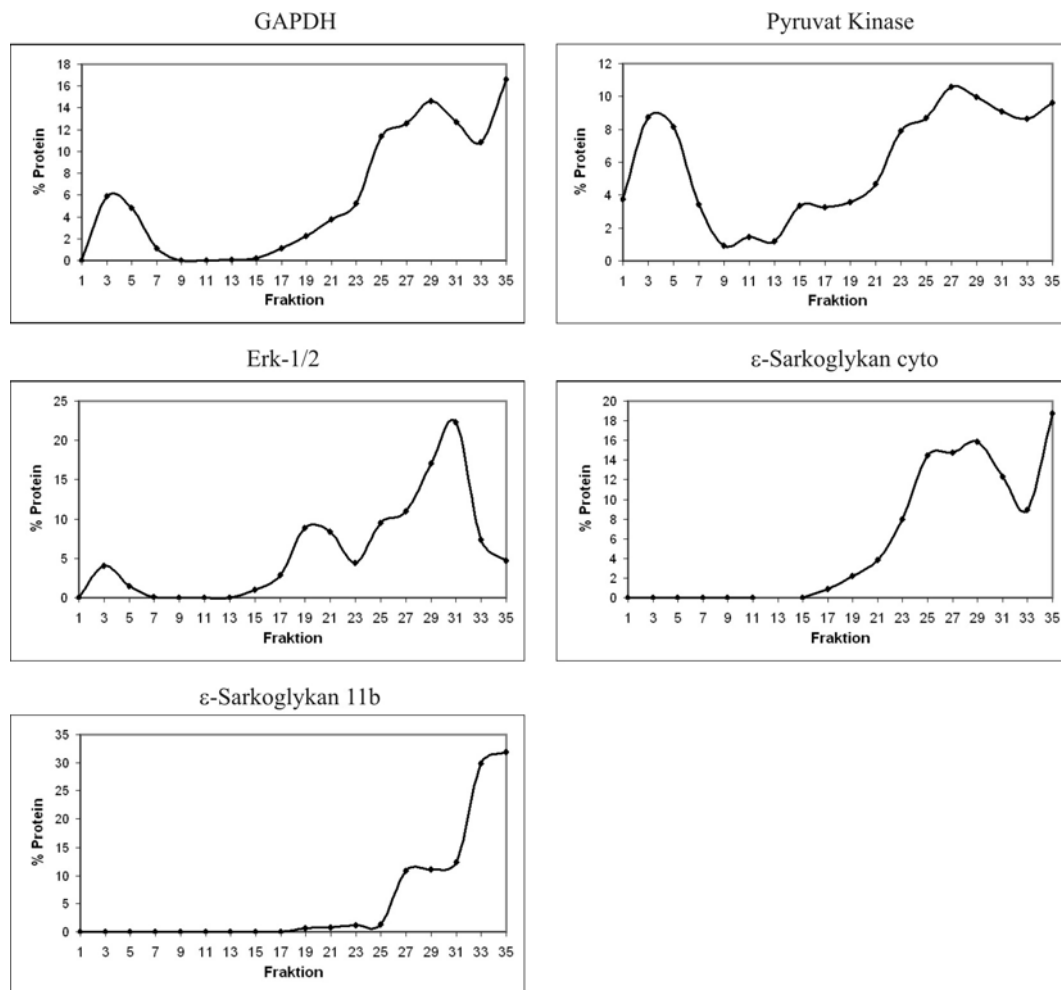


Abb. 20. Photometrische Quantifizierung der Immunsignale für die Proteine GAPDH, Pyruvat Kinase, Erk-1/2, ε-Sarkoglykan cyto und ε-Sarkoglykan 11b. Aufgetragen ist das prozentuale Vorkommen des jeweiligen Proteins in jeder zweiten Fraktion des Saccharosegradienten.

Das ER-Chaperon Calnexin ist ab Fraktion 5 detektierbar und erreicht in Fraktion 31 mit 11% Gesamtvorkommen sein Maximum (Abb. 21). Das trans-Golgi-Protein TGN38 hingegen läßt sich erst ab Fraktion 21 nachweisen und erreicht in Fraktion 25 mit 36% Gesamtprotein ein Maximum. In den Fraktionen 31 bis 35 ist es mit 5% nur marginal vorhanden. Der Endosomenmarker EEA1 ist ebenfalls ausschließlich in den unteren Fraktionen nachzuweisen und erreicht in Fraktion 25 mit 18% sein Maximum. PMP70 ist hauptsächlich in Fraktion 33 bis 35 detektierbar und erreicht in Fraktion 35 mit 57% die maximale Konzentration. Die Resultate der F_0F_1 -ATPase spiegeln die Ergebnisse des EEA1 wider. Das Protein läßt sich ab Fraktion 21 detektieren und erreicht einen maximalen Wert in Fraktion 29 mit 21% des Gesamtproteins. Der AMPA-Rezeptor ist bereits in Fraktion 17 detektierbar und nimmt in seiner Konzentration bis zu Fraktion 33 zu. Dort erreicht das Protein mit 21% eine maximale Konzentration. Das postsynaptische Protein PSD-95 ist in den Fraktionen 29 bis 35 wiederzufinden und erreicht in Fraktion 31 mit 41% des Gesamtproteins seine höchste

Konzentration. GFAP ist sowohl in den oberen als auch in den unteren Fraktionen detektierbar und erreicht in Fraktion 5 mit 13% des Gesamtproteins sein Maximum. Diese Verteilung ist für alle analysierten Proteine einzigartig.

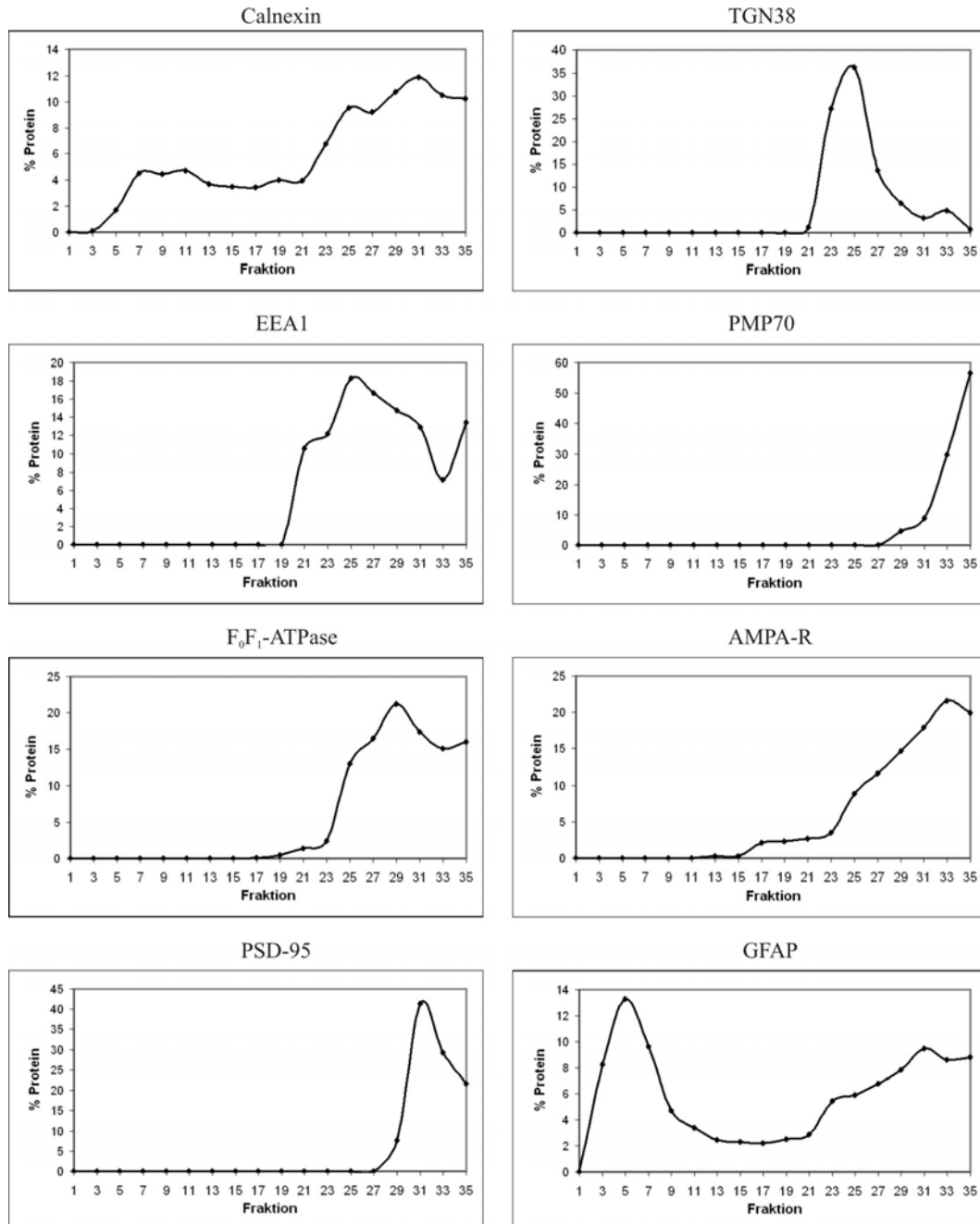


Abb. 21. Photometrische Quantifizierung der Immunsignale für die Proteine Calnexin, TGN38, EEA1, PMP70, F₀F₁-ATPase, AMPA-Rezeptor, PSD-95 und GFAP. Aufgetragen ist das prozentuale Vorkommen des jeweiligen Proteins in jeder zweiten Fraktion des Saccharosegradienten.

Die beiden CAZ-Proteine Bassoon und Piccolo sind vorwiegend in den unteren Fraktionen detektierbar (Abb. 22). Bassoon zeigt einen kleinen Gipfel in Fraktion 7 mit 2% des Gesamtproteins, erreicht aber in Fraktion 31 mit 12% seine maximale Konzentration. Piccolo

weist in den Fraktionen 11 bis 15 einen kleinen Gipfel mit 2,5% auf und erreicht in Fraktion 35 seinen Maximalwert mit 10% des Gesamtproteins.

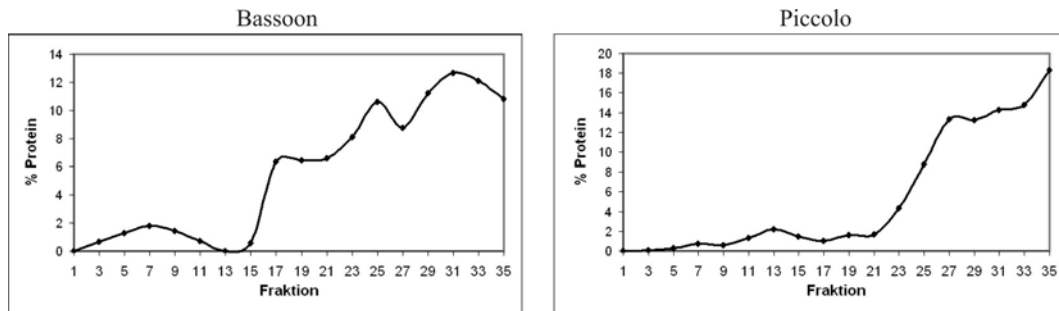


Abb. 22. Photometrische Quantifizierung der Immunsignale für die Proteine Bassoon und Piccolo. Aufgetragen ist das prozentuale Vorkommen des jeweiligen Proteins in jeder zweiten Fraktion des Saccharosegradienten.

3.2 Immunreinigung synaptischer Vesikel

Synaptische Vesikel des Saccharosegradienten sind präparationsbedingt durch präsynaptische Plasmamembrantrümmer und nicht vesikelständige Proteine kontaminiert. Um eine reine Vesikelpopulation zu erhalten, wird im Anschluß an die Dichtegradientenzentrifugation eine Immunreinigung durchgeführt. Durch die Verwendung des SV2-Antikörpers lassen sich synaptische Vesikel sehr spezifisch anreichern. Das Prinzip der Immunreinigung erlaubt ferner die Analyse des Proteoms von Vesikelsubpopulationen.

3.2.1 Optimierung der Immunreinigung

Die zur Wahl stehenden Magnetbeads der Firmen Pierce, Dynal und Qiagen wurden unter gleichen Bedingungen hinsichtlich ihrer Spezifität und Potenz zur Immunreinigung analysiert (Daten hier nicht gezeigt). Hierbei erwiesen sich die Magnetbeads der Firma Dynal als am besten geeignet und wurden daher für die weiterführenden Versuche verwendet. Ebenso kritisch wie die Wahl der Magnetbeads ist die Auswahl der Elutionsmittel, deren Resultate nach Western Blot Analysen gegen SV2 und Synaptophysin in Abbildung 23A wiedergegeben sind. Gezeigt sind jeweils die Ergebnisse der ersten und zweiten Elution. Die erste Elution und Applikation des SV2-Antikörpers führt zu der Detektion eines Immunsignals für SDS-Probenpufferungspu

Natronlauge sowie der Temperaturschritt führen zu keiner Elution der Probe von den Magnetbeads.

Analysen hinsichtlich Synaptophysin zeigen abweichende Ergebnisse. Die erste Elution führt zur Detektion des integralen Vesikelproteins in den Ansätzen mit SP/DTT, NP-40, DTT, Harnstoff, SDS und Trypsin. Keine Resultate werden für den Rehydrierungspuffer, Methanol, Aceton, Proteinase K, Natronlauge und den Temperaturschritt erhalten. Das stärkste Immunsignal ist hierbei für SP/DTT, NP-40 und SDS zu detektieren. Schwächere Signale lassen sich für 100 mM DTT, Harnstoff und Trypsin nachweisen. Ein sehr schwaches Signal ist zudem für 500 mM DTT detektierbar. Nach der zweiten Elution zeigt sich erneut die Potenz des SP/DTT als Elutionsmittel. Immunsignale werden für SP/DTT, NP-40, beide DTT-Ansätze, Harnstoff, SDS, Methanol, Aceton und den Temperaturschritt erhalten. Wiederum keine Signale sind in den Ansätzen mit Rehydrierungspuffer, Proteinase K und Natronlauge detektierbar.

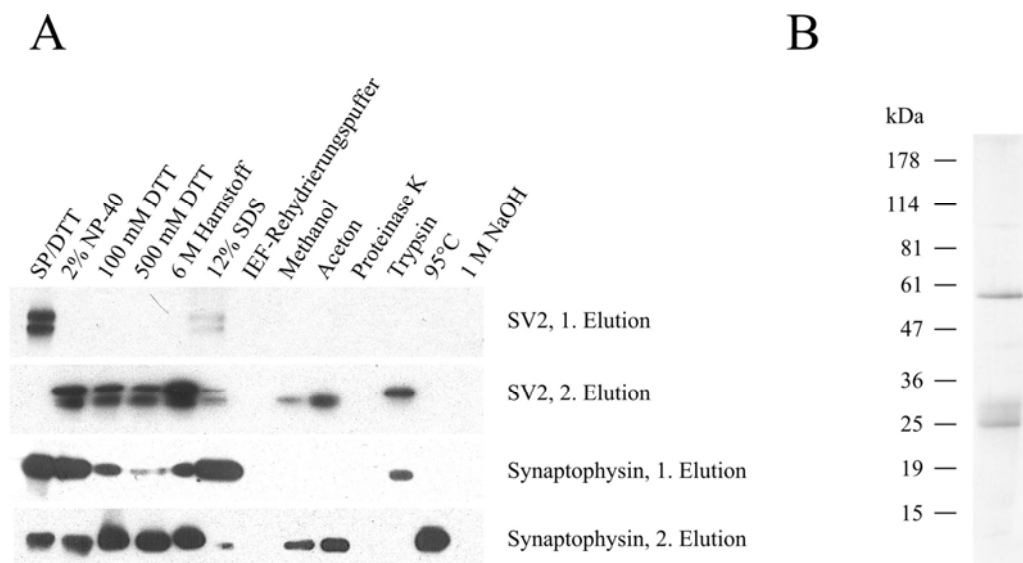


Abb. 23. (A) Analyse der Effizienz verschiedener Elutionsmittel zur Separation synaptischer Vesikelproteine von den Magnetbeads. Aufgetragen wurden jeweils 5 μ l Eluat. (B) Analyse der zweiten Elution mittels NP-40 eluierter Proben über Silberfärbung.

Die Elution mit NP-40 ist aufgrund der Durchführbarkeit bei 4°C sehr schonend für die Proteinstabilität. Um die Potenz des Elutionsmittel hinsichtlich einer Gesamtproteinanalyse nachzuweisen, wurde die zweite Elutionsfraktion mit SP/DTT elektrophoretisch aufgetrennt und einer Silberfärbung unterzogen (Abb. 23B). Es sind zwei definierte Banden bei 25 kDa und 50 kDa zu erkennen, welche die leichten und schweren Ketten der verwendeten Immunglobuline darstellen. Zusätzlich läßt sich zwischen 25 und 30 kDa ein leicht verschmiertes Band nachweisen.

3.2.2 Kontrollen

Für die Immunreinigung synaptischer Vesikel müssen Protokolle entwickelt werden, welche spezifisch synaptische Vesikel anreichern. Um dies zu demonstrieren, werden Kontrollen durchgeführt, in denen anstelle des SV2-Antikörpers ein unspezifisches Maus-Immunglobulin verwendet wird (Abb. 24). Ferner kommen Kontrollen zum Einsatz, in denen kein Antikörper und/oder keine Probe an die Magnetbeads gekoppelt werden. Alle Elutionen wurden mit BAC-Probenpuffer durchgeführt, die Auftrennung der Proben über BAC/SDS-PAGE durchgeführt.

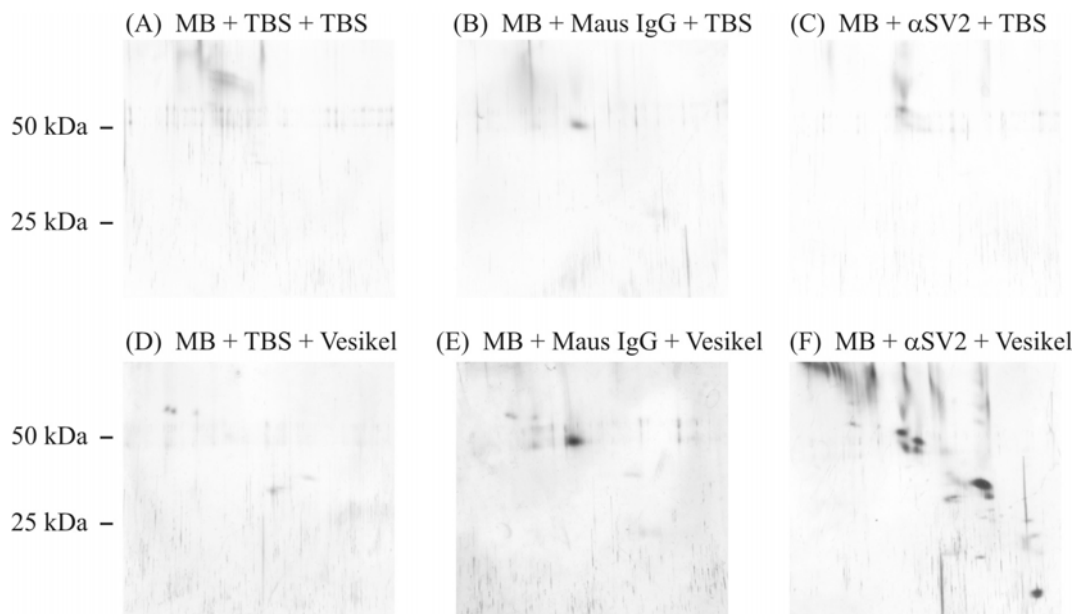


Abb. 24. Kontrollversuche für die Immunreinigung. Nach Elution der Proteine mittels BAC-Probenpuffer von den Magnetbeads wurden eluierte Proben mittels BAC/SDS-PAGE separiert. Versuchsbedingungen umfassen die Inkubation von Magnetbeads mit (A) TBS, (B) unspezifischen Maus-Immunglobulinen und TBS, (C) SV2-Antikörper und TBS, (D) TBS und synaptischer Vesikelprobe, (E) unspezifischen Maus-Immunglobulinen und Vesikelprobe sowie (F) SV2-Antikörper und Vesikelprobe.

Die Inkubation der Magnetbeads mit TBS liefert nach Elution mit BAC-Probenpuffer zwei sehr schwache Spots bei 25 und 50 kDa, welche die leichten und schweren Ketten der Immunglobuline darstellen (Abb. 24A). Koppelt man unspezifische Maus-Antikörper an die Magnetbeads und inkubiert diesen Komplex mit Vesikelprobe, so führt dies zur Anfärbung von Proteinen gleicher molekularer Masse, aber in höherer Konzentration als bei dem TBS-Ansatz (Abb. 24B). Gleiche Ergebnisse werden für den Versuchsansatz mit SV2-Antikörper und TBS erhalten (Abb. 24C). Inkubiert man hingegen Magnetbeads ohne Applikation eines Antikörpers mit synaptischer Vesikelprobe, so lassen sich neben den zwei erwähnten Immunglobulin-Spots zusätzliche Proteine detektieren (Abb. 24D). Insbesondere bei ~70 kDa sind zwei ausgeprägte Proteinspots nachweisbar. Das gleiche Proteinmuster findet man im Ansatz mit Maus-Antikörper und Vesikelprobe wieder (Abb. 24E). Wie bereits für die beiden

Proteinspots aus den Ansätzen ohne Probeninkubation beschrieben, sind hier die IgG-Spots stärker ausgeprägt als im Ansatz ohne Antikörper. Der eigentliche Versuchsansatz zur Reinigung synaptischer Vesikel besteht in der Kopplung von SV2-Antikörper und synaptischer Vesikelprobe an die Magnetbeads. Nach Elution lassen sich neben den IgG-Spots eine Reihe weiterer Proteine detektieren (Abb 24F).

3.2.3 Vesikelpopulationen

Um einen ersten Eindruck von der Proteinkomplexität immungereinigter synaptischer Vesikel und von den Unterschieden verschiedener Vesikelpopulationen zu erhalten, wurden immungereinigte Proben mittels BAC/SDS-PAGE zweidimensional aufgetrennt und einer Silberfärbung unterzogen (Abb. 25). Die Elution erfolgt hierbei unter nichtreduzierenden Bedingungen mit NP-40, um den Einfluß der Immunglobuline auf das Gesamtproteinmuster auszuschließen, die andere Proteine im Bereich von 25 und 50 kDa überlagern.

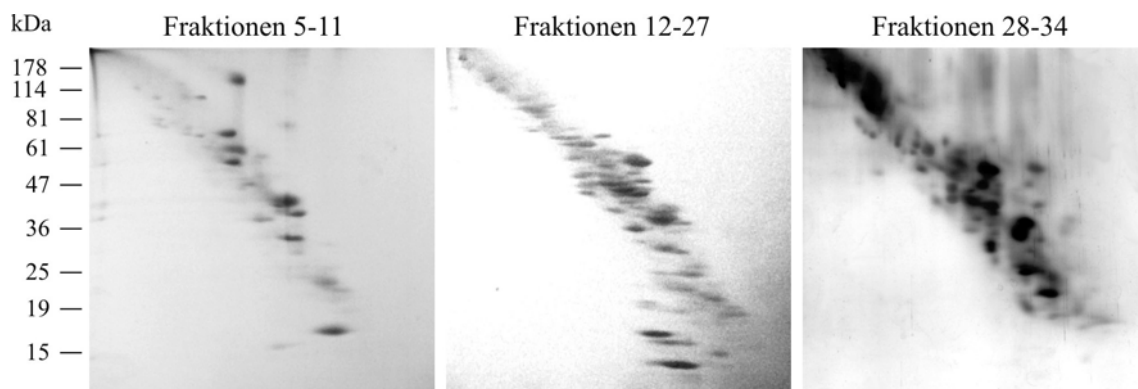


Abb. 25. Analyse des Proteinmusters verschiedener Vesikelpopulationen mittels BAC/SDS-PAGE und Silberfärbung. Pro Gel sind 100 µg immungereinigte synaptische Vesikelproteine der Fraktionen 5 bis 11, 12 bis 27 und 28 bis 34 aufgetrennt worden.

Das Proteinmuster der drei Populationen ist insgesamt sehr unterschiedlich, weist jedoch eine Reihe von Gemeinsamkeiten auf. Die Fraktionen 5 bis 11 sind die proteinärmsten der drei Ansätze. Die Fraktionen 12 bis 27 weisen deutlich mehr Protein auf. Einige Spots sind in beiden Populationen vorhanden. Dazu gehören beispielsweise Spots bei 17 und 30 kDa. Die Analyse der Fraktionen 28 bis 34 resultiert in einem vergleichbaren Muster. Spots der Fraktionen 12 bis 27 können bei etwa 40 und 50 kDa ausgemacht werden. Ähnlichkeiten zu den Fraktionen 5 bis 11 sind beispielsweise auf der linken Seite der Diagonalen bei ~75 kDa nachweisbar. Den Fraktionen 28 bis 34 ist eigen, daß sie im Bereich niedriger molekularer Masse im Gegensatz zu den anderen Fraktionen kaum Protein enthalten. Zusätzlich ist im Bereich hoher molekularer Masse (80 bis 180 kDa) eine starke Unschärfe erkennbar, die in den beiden anderen Populationen fehlt. Der Bereich hoher molekularer Masse ist in den

Fraktionen 5 bis 11 nicht sehr stark ausgeprägt. Die Fraktionen 12 bis 27 hingegen weisen vergleichsweise mehr Protein in diesem Bereich auf.

3.2.4 Analyse der ungebundenen Probe und der abgelösten Proteine

Neben den Kontrollen muß für eine eingehende Betrachtung der Immunreinigung auch die ungebundene Probe nach der Probeninkubation sowie die Überstände nach der zwei- und fünfminütigen Inkubation mit Tris bzw. Natriumcarbonat betrachtet werden. Dies wurde sowohl per Silberfärbung (Abb. 26A) als auch per Western Blot (Abb. 26, B-G) analysiert. Ferner wurde der eingesetzte α -SV2-haltige Hybridoma-Überstand vor und nach der Immunreinigung über Silberfärbung, Western Blot und Proteinbestimmung untersucht.

Die Silberfärbung eindimensional aufgetrennter Proben (Abb. 26A) demonstriert, daß nach Inkubation der Magnetbeads mit der Probe und Analyse der ungebundenen Probe (P) eine Vielzahl von Proteinen detektierbar ist. Demgegenüber weisen die 2- und 15-minütigen Stripping-Schritte (2, 15) nur wenige Proteinbanden auf, die sich im Bereich niedriger molekularer Masse befinden. Die Anfärbung der Proteine des Hybridoma-Überstandes vor (V) und nach (N) der Immunreinigung ergibt für beide Proben identische Resultate hinsichtlich Muster und Intensität der Proteinbanden.

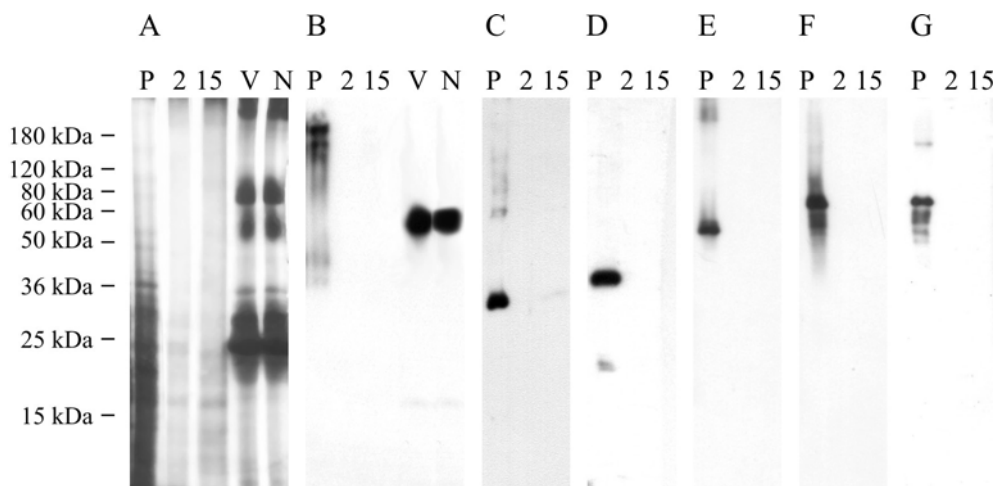


Abb. 26. Analyse der ungebundenen Probe (P), des 2-minütigen Tris-Schrittes (2), des 15-minütigen Na₂CO₃-Schrittes (15), des Hybridoma-Überstandes vor (V) und nach (N) der Immunreinigung. (A) Silberfärbung nach Koepsell, (B-G) Immundetektionen von SV2 (80 und 100 kDa), Synaptogyrin (29 kDa), Synaptophysin (38 kDa), GFAP (50 kDa), Synapsin I (72 und 74 kDa) und Synapsin II (54 und 74 kDa). Analysiert wurden 50 µg Protein pro Spur.

Die gleichen Proben wurden mittels Western Blot und Applikation des Antikörpers gegen SV2 analysiert (Abb. 26B). SV2 ist in der ungebundenen Probe (P) in geringen Mengen nachweisbar. Die 2- und 15-minütigen Stripping-Schritte haben keinen Einfluß auf die

Bindung des SV2 an die Magnetbeads. Die Detektion des Antikörpers per Western Blot vor und nach der Immunreinigung belegt die Ergebnisse der Silberfärbung. Die Immunsignale beider Banden sind vergleichbar an Intensität. Gemäß einer Proteinbestimmung befinden sich vor der Antikörperbindung 94,55 µg/ml Protein im Hybridoma-Überstand, nach der Immunreinigung 79,9 µg/ml. Dies entspricht 14,65 µg/ml oder 15,5% gebundenem Protein während der Immunreinigung.

Analysen der ungebundenen Probe (P), des 2-minütigen Tris-Schrittes (2) und des 15-minütigen Na₂CO₃-Schrittes (15) sind zusätzlich durch Western Blot Analysen für Synaptogyrin (Abb. 26C), Synaptophysin (D), GFAP (E), Synapsin I (F) und Synapsin II (G) dargestellt. Für alle untersuchten Proteine zeigen sich identische Ergebnisse. Sie lassen sich in der ungebundenen Probe nachweisen, fehlen jedoch in beiden Stripping-Schritten.

3.2.5 Färbetechniken für Nitrozellulosemembranen

Für die spätere Zuordnung von Immunsignalen aus Western Blot Analysen ist es unerlässlich, Nitrozellulosemembranen anfärben und entfärben zu können und im Anschluß daran ungehindert eine Immundetektion durchführen zu können. Diverse Techniken stehen hierfür zur Verfügung. Die Färbung mit Ponceau S, die laut Hersteller eine Nachweisgrenze von 500 ng besitzt, führt zu keinem Ergebnis (Daten hier nicht gezeigt). Die Färbetechniken mit India Ink und Silber hingegen sind deutlich sensitiver und können Proteine bis in den 40 bzw. 5 ng-Bereich detektieren.

Beide Techniken resultieren in einer intensiven Anfärbung (Abb. 27, A-C). Bei Vergleich der beiden mit India Ink gefärbten Membranen (A, B) ergibt sich kein Unterschied, so daß auf die weitere Verwendung des aufwendigeren Protokolls mit PBS zugunsten der Verwendung von TBS verzichtet werden kann. Ein Vergleich der Silberfärbung (C) mit der India Ink-Färbung resultiert in erheblichen Unterschieden im Muster. Dies trifft insbesondere auf den Bereich niedriger molekularer Masse zu. Aber auch im Bereich zwischen 40 und 80 kDa sind deutliche Unterschiede detektierbar. Beide Techniken färben demnach unterschiedliche Proteine an. So ist bei Vergleich der beiden Membranen kaum ein identisches Proteinband zu finden. Die wenigen Proteinbanden, die durch beide Techniken angefärbt werden, zeigen zudem erhebliche Unterschiede in der Intensität.

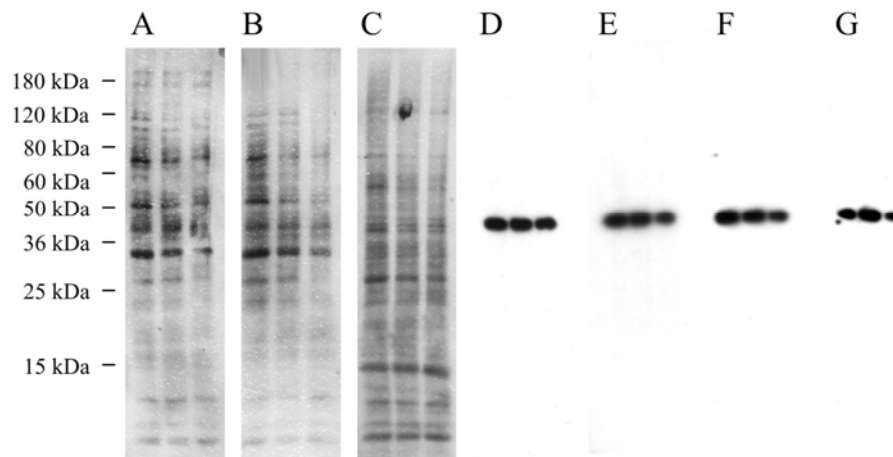


Abb. 27. Techniken zur Anfärbung von Nitrozellulosemembranen und im Anschluß an die Färbung durchgeführte Immunanalysen. (A) Anfärbung mit India Ink in PBS, (B) mit India Ink in TBS und (C) mit Silber. (D) Western Blot Analyse von Synaptophysin (38 kDa) nach Anfärbung mit India Ink in PBS, (E) nach Anfärbung mit India Ink in TBS, (F) nach Anfärbung mit Silber und (G) ohne Anfärbung. Analysiert wurden von links nach rechts je 5 µl der Fraktionen 7, 9 und 11 des Saccharosegradienten.

Von besonderem Interesse ist die Kompatibilität der Färbetechnik mit einer späteren Immundetektion (Abb. 27, E-G). Erhaltene Immunsignale für Synaptophysin nach Anfärbung mit India Ink in PBS (D), mit India Ink in TBS (E), mit Silber (F) als auch ohne Anfärbung (G) führen zu keinem Unterschied in der Signalintensität. Aus diesem Grund werden für weitere Anwendungen Nitrozellulosemembranen vor der Immundetektion einer Silberfärbung unterzogen, da das Protokoll zeitliche Vorteile gegenüber der India Ink-Färbung hat und die Membran physikalisch weniger beansprucht.

3.2.6 IEF/SDS-PAGE

Die am häufigsten verwendete Technik zur zweidimensionalen Proteinseparation besteht aus isoelektrischer Fokussierung in der ersten Dimension, in der die Polypeptide gemäß ihres isoelektrischen Punktes aufgetrennt werden, und einer Trennung nach molekularer Masse in der zweiten Dimension über SDS-PAGE.

Immungereinigte synaptische Vesikelproteine (Fraktionen 5 bis 11) werden gemäß der Standard 2D-Elektrophorese aufgetrennt und anschließend Western Blot Analysen bzw. einer Silberfärbung zugeführt. Die Analyse des Gesamtproteinmusters ist in Abbildung 28 gezeigt. Die meisten Proteine sind in einem Bereich molekularer Masse von 15 bis 100 kDa detektierbar. Der Großteil der Proteine zeigt eine Unschärfe über einen breiten pH-Bereich, was insbesondere Proteine molekularer Massen von 50 bis 100 kDa betrifft. Nur wenige Proteine zeigen eine gute Fokussierung bzw. scharfe Spots. Diese Proteine finden sich vor allem im Bereich niedriger molekularer Masse wieder.

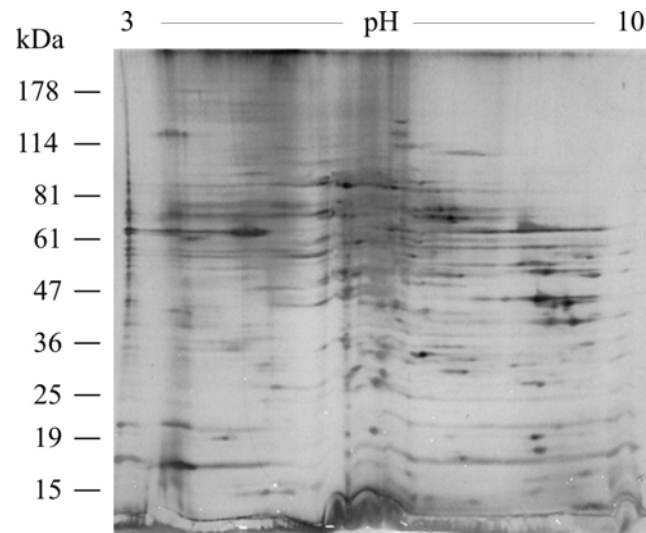


Abb. 28. Silberfärbung mittels IEF/SDS-PAGE aufgetrennter synaptischer Vesikelproteine der Fraktionen 5 bis 11. Für die erste Dimension wurde ein pH-Gradient von pH 3 bis 10 verwendet. Die zweite Dimension basiert auf einem 15%igen SDS-Gel. Analysiert wurden 60 µg Protein.

Um die Anwendbarkeit des zweidimensionalen Systems für die massenspektrometrische Analyse zu belegen, wurden IEF/SDS-Gele Immunanalysen unterzogen (Abb. 29). Dies umfaßt Western Blots für die vesikulären Proteine Synaptophysin, Synaptotagmin, VAMP-2, vGlut1, SNAP-25 und Syntaxin 1.

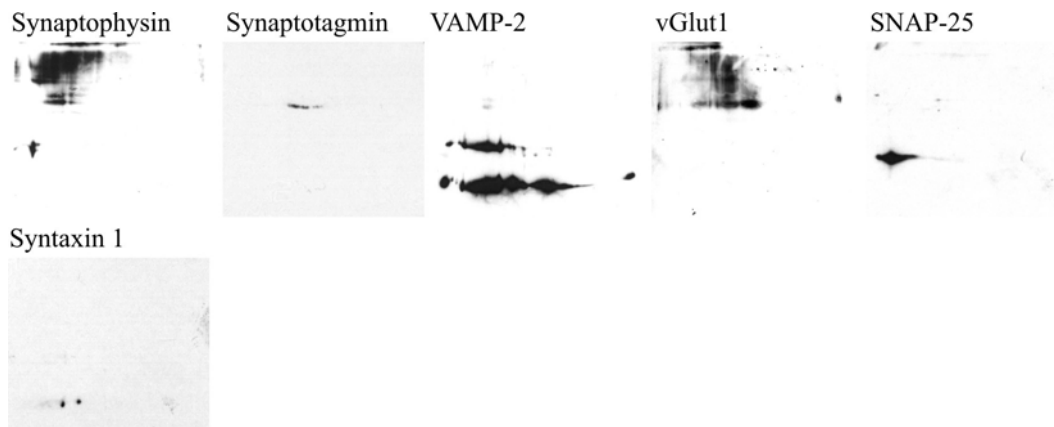


Abb. 29. Western Blot Analysen per IEF/SDS-PAGE aufgetrennter, immungereinigter synaptischer Vesikelproteine. Detektierte Proteine beinhalten Synaptophysin (38 kDa), Synaptotagmin (68 kDa), VAMP-2 (14 kDa), vGlut1 (60 kDa), SNAP-25 (25 kDa) und Syntaxin 1 (35 kDa). Analysiert wurden 10 µg Probe.

Für die integralen Membranproteine Synaptotagmin und Syntaxin 1 und auch für das membrangebundene SNAP-25 ist die Auflösung hinreichend gut. Synaptotagmin erscheint in drei, Syntaxin 1 in zwei posttranslational modifizierten Isoformen. SNAP-25 ist im Wesentlichen als ein breiter Spot detektierbar. Demgegenüber weisen Synaptophysin, VAMP-2 und vGlut1 eine sehr schlechte Fokussierung auf. Synaptophysin und vGlut1 zeigen Probleme beim Transfer von der ersten in die zweite Dimension. Zusätzlich zeigen beide Proteine eine große Unschärfe über einen breiten pH-Bereich. VAMP-2 zeigt ferner

Dimerbildung und ist in multiplen Varianten vorhanden, so daß das Protein über nahezu den gesamten analysierten pH-Bereich detektiert werden kann.

Die Fokussierung der integralen Vesikelproteine über IEF/SDS-PAGE ist zusammenfassend nicht optimal. Insbesondere für eine Analyse mittels Massenspektrometrie und für die Detektion niedrig abundanter Proteine muß die Auflösung deutlich verbessert werden.

3.2.7 BAC/SDS-PAGE

Für die Etablierung des BAC/SDS-Systems wurden zunächst Western Blot Analysen der oberen Fraktionen des Saccharosegradienten durchgeführt. Diese machen deutlich, daß das Gelsystem für die Trennung hydrophober, aber auch hydrophiler Proteine geeignet ist (Abb. 30). Integrale Membranproteine bis zu 12 Transmembranhelices wie SV2, vGlut1 oder vGat fokussieren optimal und erscheinen als definierte Spots auf der Nitrozellulosemembran. Im Gegensatz zur IEF/SDS-PAGE ist keine Unschärfe oder Wolkenbildung beobachtbar. Weitere, gut fokussierte integrale Vesikelproteine beinhalten Synaptophysin, Synaptotagmin, Synaptogyrin, VAMP-2, SCAMP 1, vAChT, Synaptoporin, SNAP-25 und Syntaxin 1. Auch vesikelassoziierte Proteine wie rab3A, Synapsin I, Rabphilin3A, rab5, β -Tubulin, GAPDH und GFAP lassen sich als fokussierte Spots nachweisen.

Neben den Immunanalysen wurde die Transfereffizienz von der ersten in die zweite Dimension untersucht. Der Gelstreifen der ersten Dimension wird hierfür nach der Auftrennung in der zweiten Dimension mittels Silber gefärbt. Die Entwicklung des Silbergels mußte hierbei sehr lange erfolgen, bis Spuren von Protein detektiert werden konnten (Daten hier nicht gezeigt).

Über die Western Blot Analysen immungereinigter synaptischer Vesikel wurden eine Reihe integraler Vesikelproteine, peripher assoziierter Proteine und Proteine des Zytoskeletts detektiert. Aufgrund der durch Reduktion der an die magnetischen Beads gekoppelten Antikörper lassen sich bei Verwendung von Antikörpern aus Maus zusätzliche Spots bei 25 und 50 kDa detektieren (vergleiche Immunblots für SV2, rab5, β -Tubulin und GFAP). Diese Spots entsprechen der leichten und schweren Ketten, wie eine Western Blot Analyse ohne Applikation des Erstantikörpers demonstriert (vergleiche Immunblot mit anti-Maus IgG). Weitere Analysen umfassen Western Blots gegen das ER-Protein Calnexin, die Golgi-Proteine GM130 und TGN38, den frühen Endosomenmarker EEA1, das nukleäre Protein

Lamin B, das lysosomale Protein LAMP1, das peroxisomale PMP70 sowie gegen die mitochondrialen Proteine VDAC1 und F₀F₁-ATPase. Diese Analysen führten zu keinem Ergebnis und demonstrieren die Reinheit der synaptischen Vesikelpräparation.

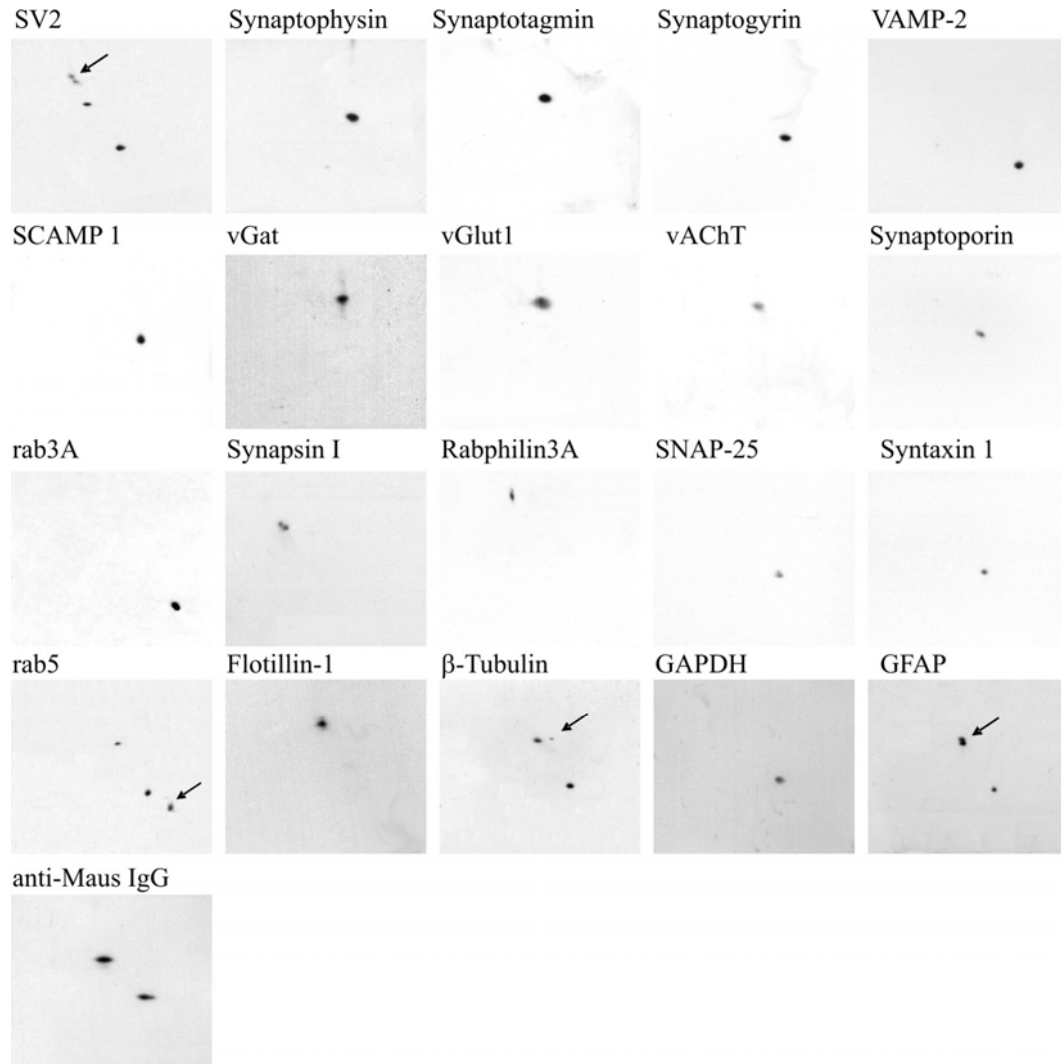


Abb. 30. Western Blot Analysen per BAC/SDS-PAGE aufgetrennter immungereinigter synaptischer Vesikelproteine. Detektierte Proteine beinhalten SV2 (80 und 100 kDa), Synaptophysin (38 kDa), Synaptotagmin (68 kDa), Synaptogyrin (29 kDa), VAMP-2 (14 kDa), SCAMP 1 (38 kDa), vGat (57 kDa), vGlut1 (60 kDa), vAChT (70 kDa), Synaptoporin (29 kDa), rab3A (25 kDa), Synapsin I (72 und 74 kDa), Rabphilin3A (75 kDa), SNAP-25 (25 kDa), Syntaxin 1 (35 kDa), rab5 (25 kDa), Flotillin-1 (48 kDa), β -Tubulin (50 kDa), GAPDH (36 kDa), GFAP (50 kDa), leichte und schwere Ketten des α -Maus Immunglobulins (25 und 50 kDa). Analysiert wurden 10 μ g Probe. In Blots mit monoklonaler Immundetektion kennzeichnen Pfeile das detektierte Vesikelprotein. Die restlichen Spots stellen die leichten und schweren Ketten der verwendeten Immunglobuline dar.

Die Anfärbung der Nitrozellulosemembran mit Silber macht es möglich, erhaltene Immunsignale direkt mit dem Proteinmuster zu korrelieren. Durch Markierung der Membran und des korrespondierenden Röntgenfilmes mit Punkten kann die Lage der Immunsignale zweifelsfrei zugeordnet werden (Abb. 31).

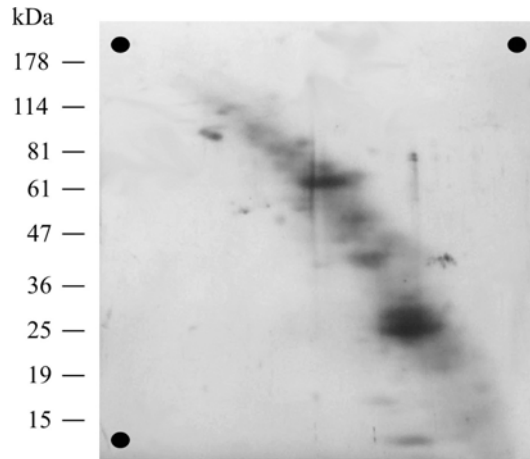


Abb. 31. Silbergefärbte Nitrozellulosemembran nach BAC/SDS-PAGE. Die Membran wird mit drei Punkten markiert, um Proteinspots mit Immunsignalen auf Röntgenfilmen zu korrelieren.

In Abbildung 31 zeigt sich erneut die Sensitivität der Silberfärbung für Nitrozellulosemembranen. Das Muster ist trotz geringer Sensitivitätsverluste identisch mit dem gefärbter Gele. Zu beachten sind hierbei die starken Spots bei 25 kDa und 50 kDa, welche die leichten und schweren Ketten der in der Probe enthaltenen Immunglobuline darstellen. Dieses System erlaubt die Anfertigung einer Proteinkarte (Abb. 32), die für die Analyse per Massenspektrometrie sehr wichtig ist. Durch die Tatsache, daß einige Proteinspots bekannt sind, lassen sich tryptischer Verdau und Extraktion auf die Bedürfnisse der Probe anpassen und optimieren. Zusätzlich läßt sich die Effizienz der Massenspektrometrie hinsichtlich der Identifizierung hydrophober Membranproteine überprüfen.

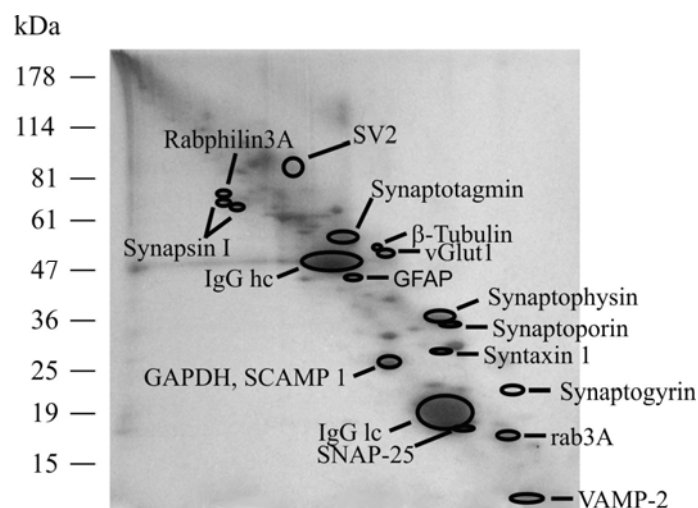


Abb. 32. Darstellung synaptischer Vesikelproteine, die mittels Western Blot und Korrelation der Immunsignale über gefärbte Nitrozellulosemembranen detektiert werden können.

Mit Sicherheit zugeordnet werden können die Proteine SV2, Synaptophysin, Synaptotagmin, Synaptoporin, Synaptogyrin, SNAP-25, Syntaxin 1, VAMP-2, vGlut1, rab3A, GAPDH, SCAMP 1, GFAP, Synapsin I, β -Tubulin und Rabphilin3A. Ferner sind die Positionen der leichten und schweren Immunglobulin-Ketten (IgG lc und hc) eingezeichnet. Die über Immunblot detektierten Proteine vGat, vAChT, Flotillin-1 und rab5 können keinen definierten Punkten auf der Nitrozellulosemembran zugeordnet werden.

3.2.8 dSDS-PAGE

Neben der Verwendung der IEF/SDS- und BAC/SDS-PAGE wurde die dSDS-PAGE eingesetzt. Für den Einsatz der dSDS-PAGE müssen vorab verschiedene Systeme getestet werden, um einen optimalen Auftrennungsbereich festlegen zu können. Angewandte Systeme sind in Abbildung 33 dargestellt. Hierzu zählen Systeme bestehend aus einer 9% Tricin- und 14% Tricin-PAGE (A), 9% Tricin-PAGE mit 6 M Harnstoff und 15% Laemmli-PAGE mit doppelter Salzkonzentration (B), 9% Tricin- und 15% Laemmli-PAGE mit doppelter Salzkonzentration (C) sowie 10% Laemmli-PAGE mit 6 M Harnstoff und 15% Laemmli-PAGE (D).

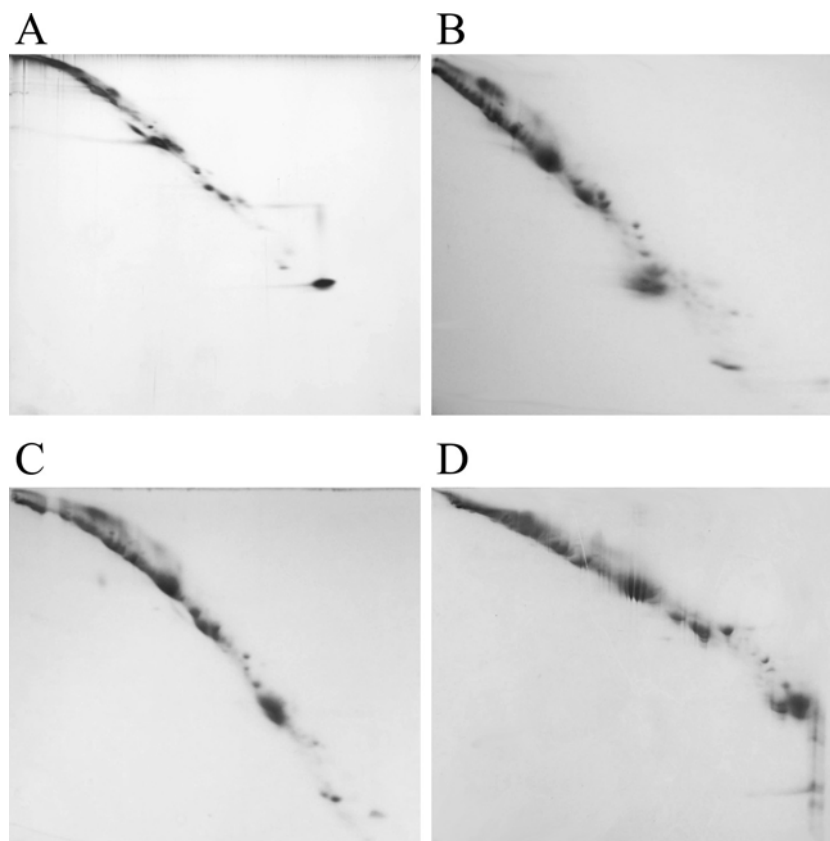


Abb. 33. dSDS-PAGE. 50 μ g synaptische Vesikelproteine der Fraktionen 5 bis 11 des Saccharosegradienten wurden mittels folgender 2D-Systeme aufgetrennt: (A) 9% Tricin- und 14% Tricin-PAGE, (B) 9% Tricin-PAGE mit 6 M Harnstoff und 15% Laemmli-PAGE mit 2x Salz, (C) 9% Tricin- und 15% Laemmli-PAGE mit 2x Salz, (D) 10% Laemmli-PAGE mit 6 M Harnstoff und 15% Laemmli-PAGE.

Bei Vergleich der Abbildungen A-D zeigt sich, daß A und D für eine optimale Auftrennung nicht geeignet sind. Die Auftrennung in A ist für kleine molekulare Massen zwar optimal, trennt aber unzureichend im höheren Massenbereich. In D ist die Trennkapazität in der zweiten Dimension unzureichend genutzt. Wie bereits für A beschrieben, ist die Trennung ausschließlich im niedrigen Massenbereich optimal. Die Systeme B und C trennen in Bereichen hoher molekularer Masse besser auf. Bei Vergleich der Proteinspots beider Systeme zeigt sich in C die etwas bessere Auflösung. Daher wird im weiteren Verlauf mit diesem System gearbeitet.

Wie bereits für das BAC/SDS-System beschrieben, wurden vor einem präparativen Gel für die Massenspektrometrie zunächst Western Blot Analysen durchgeführt, um die Effizienz der Auftrennung hydrophober Vesikelproteine zu überprüfen. Die Ergebnisse der Analysen sind exemplarisch an einigen Immunblots gezeigt (Abb. 34) und in Abbildung 35 zusammengefaßt.

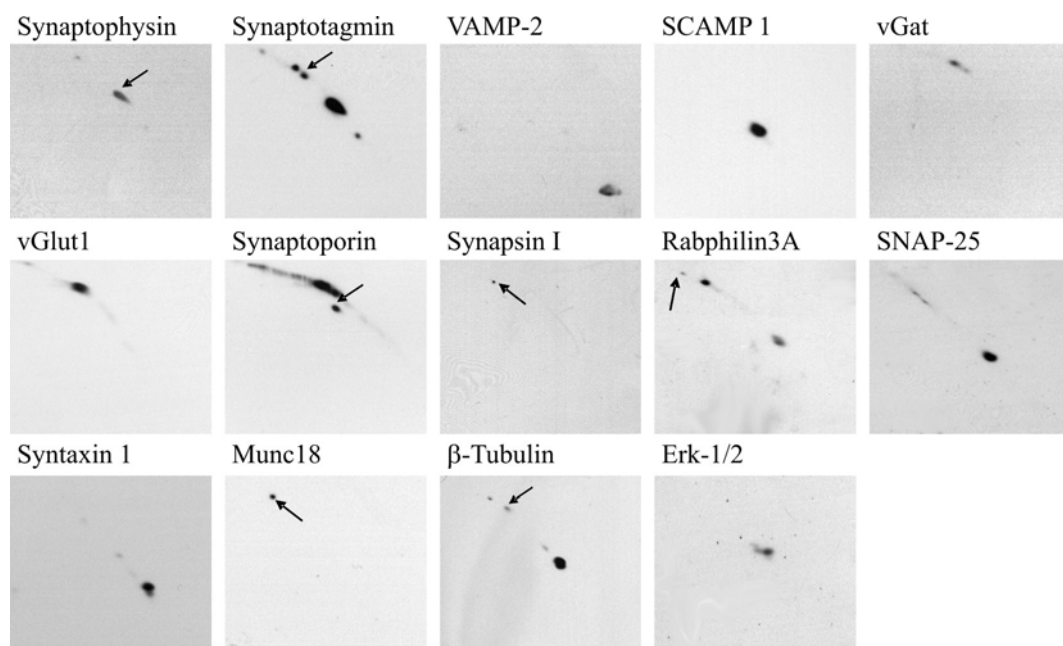


Abb. 34. Western Blot Analysen per dSDS-PAGE aufgetrennter immungereinigter synaptischer Vesikelproteine (Fraktionen 5 bis 11). Detektierte Proteine beinhalten Synaptophysin (38 kDa), Synaptotagmin (68 kDa), VAMP-2 (14 kDa), SCAMP 1 (38 kDa), vGat (57 kDa), vGlut1 (60 kDa), Synaptoporin (29 kDa), Synapsin I (72 und 74 kDa), Rabphilin3A (75 kDa), SNAP-25 (25 kDa), Syntaxin 1 (35 kDa), Munc18 (68 kDa), β -Tubulin (50 kDa) und Erk-1/2 (42 und 44 kDa). 10 μ g Probe wurden elektrophoretisch aufgetrennt. In Blots mit monoklonaler Immundetektion kennzeichnen Pfeile das detektierte Vesikelprotein - die restlichen Spots stellen die leichten und schweren Ketten der verwendeten Immunglobuline und andere unspezifische Signale dar.

Detektiert wurden die integralen Vesikelproteine Synaptophysin, Synaptotagmin, VAMP-2, SCAMP 1, vGat, vGlut1, Synaptoporin, SNAP-25 und Syntaxin 1. Membranassoziierte Proteine umfassen Synapsin I, Rabphilin3A, Munc18, β -Tubulin und Erk-1/2. Die meisten

Proteine kommen in der dSDS-PAGE auf einer Diagonalen zu liegen. Einige Proteine brechen jedoch aus diesem Laufverhalten aus. Bei diesen Proteinen handelt es sich gemäß der Immunanalysen um besonders hydrophobe Proteine. Dies veranschaulicht die Nützlichkeit des dSDS-Systems für die Analyse des Vesikelproteoms. Sehr hydrophobe Proteine können nach Färbung des Gels direkt durch visuelle Inspektion identifiziert werden. Die Anfärbung der Nitrozellulosemembran der per dSDS-PAGE aufgetrennten Proteine demonstriert die beschriebene Diagonale, auf der die Proteine zu liegen kommen und ähnelt den in Abbildung 33 dargestellten Gelbildern (Abb. 35).

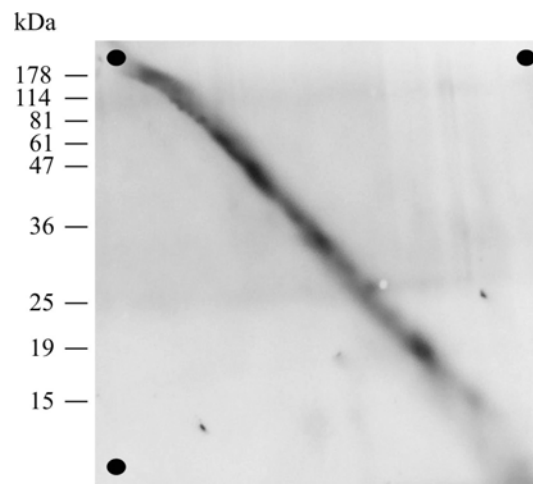


Abb. 35. Silbergefärbte Nitrozellulosemembran nach IEF/SDS-PAGE. Die Membran wurde mit drei Punkten markiert, um Proteinspots mit Immunsignalen auf Röntgenfilmen zu korrelieren.

Die durch Anfärbung der Nitrozellulosemembran mögliche Zuordnung der Immunsignale ist in Abbildung 36 gezeigt.

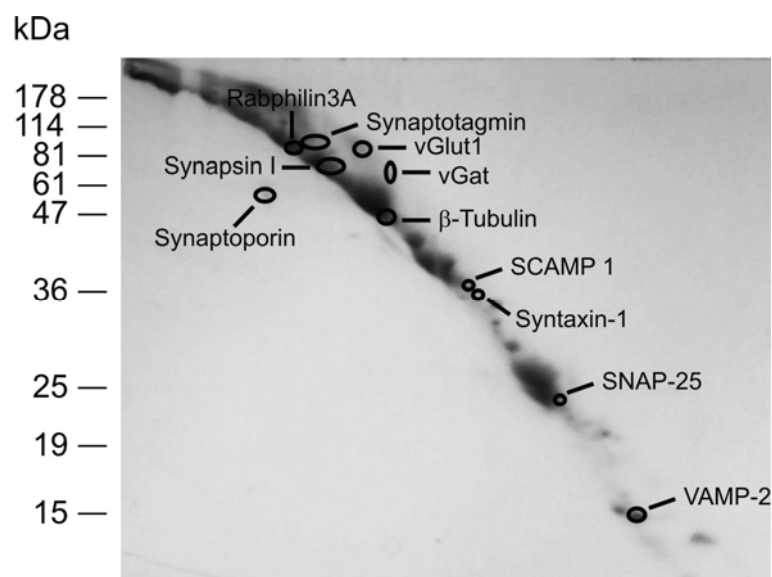


Abb. 36. Darstellung synaptischer Vesikelproteine (Fraktionen 5 bis 11), die mittels Western Blot und Korrelation der Immunsignale über gefärbte Nitrozellulosemembranen detektiert werden können.

Mit Sicherheit zugeordnet werden können die Proteine Synaptotagmin, Synaptoporin, SNAP-25, Syntaxin 1, VAMP-2, vGlut1, vGat, SCAMP 1, Synapsin I, β -Tubulin und Rabphilin3A. Die über Immunblot detektierten Proteine Munc18 und Erk-1/2 können hingegen keinen definierten Punkten zuwiesen werden.

3.2.9 Subpopulationsanalyse

3.2.9.1 Analyse des Gesamtproteinmusters

Die über BAC/SDS-PAGE aufgetrennten Eluate der Immunreinigungen mit Antikörpern gegen vGat und vGlut1 sind in Abbildung 37 dargestellt.

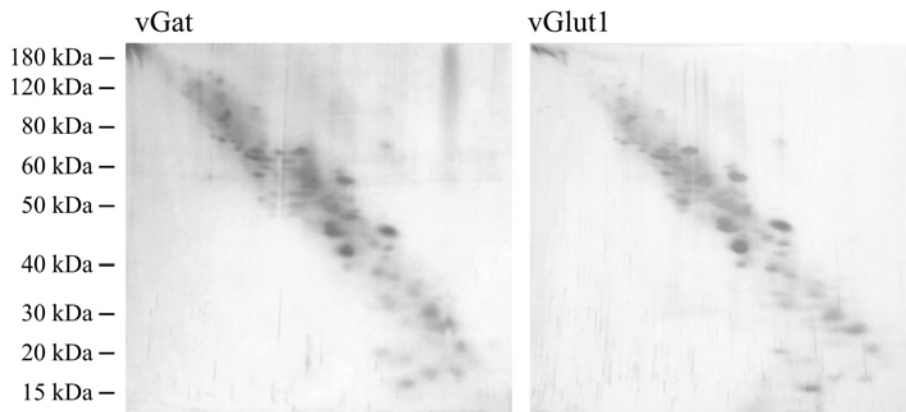


Abb. 37. Silberfärbung über BAC/SDS-PAGE aufgetrennter Proteine. vGat kennzeichnet die synaptischen Vesikelproteine, die über den vesikulären GABA-Transporter aufgereinigt wurden. vGlut1 bezeichnet entsprechend die Aufreinigung synaptischer Vesikelproteine über den vesikulären Glutamatttransporter. Pro Gel wurden 40 μ g Protein elektrophoretisch aufgetrennt.

Bei Betrachtung des Polypeptidmusters der beiden silbergefärbten Gele wird deutlich, daß unter Berücksichtigung einer nicht zu 100% vergleichbaren Färbung keine nennenswerten Unterschiede im Vesikelproteom zu detektieren sind. Beide Ansätze weisen Polypeptide zwischen 10 und 200 kDa auf. Die Komplexität des Proteinmusters zwischen 40 und 80 kDa ist sehr vergleichbar.

3.2.9.2 Immunanalysen

Für die Veranschaulichung der Effektivität der Immunreinigung in Bezug auf die Trennung von Vesikelsubpopulationen wurden neben der dargestellten Silberfärbung Immunanalysen durchgeführt (Abb. 38). Diese beinhalten die Applikation von Antikörpern gegen vGat und vGlut1 nach zweidimensionaler Auftrennung über BAC/SDS-PAGE. Analysen nach Immunreinigung der vGat-enthaltenden Vesikel (A) ergeben sowohl für vGat als auch für

vGlut1 Signale. Dies ist ebenfalls für die Subpopulation der mit dem Antikörper gegen vGlut1 aufgereinigten Vesikel zu beobachten (B).

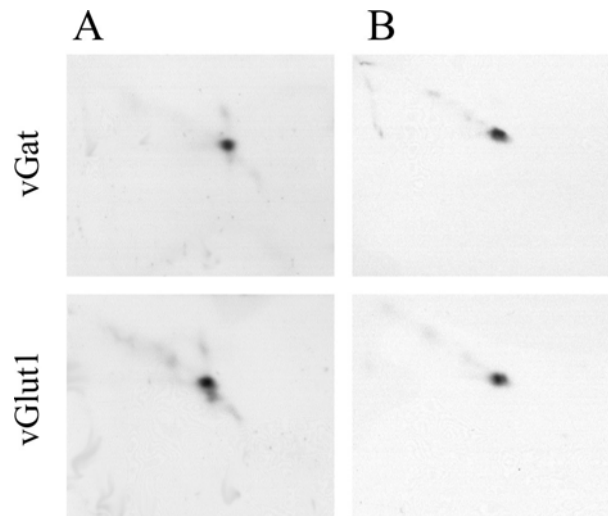


Abb. 38. Western Blot Analysen über BAC/SDS-PAGE aufgetrennter Proteine. Applikation von Antikörpern gegen vGat und vGlut1 der über (A) vGat oder (B) vGlut1 aufgereinigten synaptischen Vesikelproteine. Pro Gel wurden 10 µg Protein elektrophoretisch aufgetrennt.

3.3 An-/Abreicherungsanalysen

Um identifizierte Proteine zweifelsfrei synaptischen Vesikeln zuordnen zu können, wurde eine Evaluation über An- bzw. Abreicherungsstudien durchgeführt. Hierbei werden während jeden Schrittes der Präparation synaptischer Vesikel Proben entnommen. Bei Auftragen gleicher Konzentrationen der jeweiligen Proben und Immunanalyse wird deutlich, welche Proteine sich anreichern und damit spezifisch mit synaptischen Vesikeln assoziiert sind.

3.3.1 Überblick der Proteinkomplexität

Für eine erste Analyse wurde jede Probe mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und einer Silberfärbung unterzogen. Um einen größtmöglichen Massenbereich abzudecken, kommen sowohl die SDS-PAGE als auch die Tris-Acetat-PAGE zum Einsatz (Abb. 39). Als Proben dienen Gesamthirnhomogenat (1), die grobe Synaptosomenfraktion (2), mittels Percollgradienten aufgereinigte Synaptosomen (3), pelletierte Synaptosomen (4), der Überstand der Synaptosomen-Pelletierung (5), die grobe Vesikelfraktion nach osmotischer Lyse (6), die Fraktionen 5 bis 11 des Saccharosegradienten (7) und immungereinigte synaptische Vesikelproteine (8).

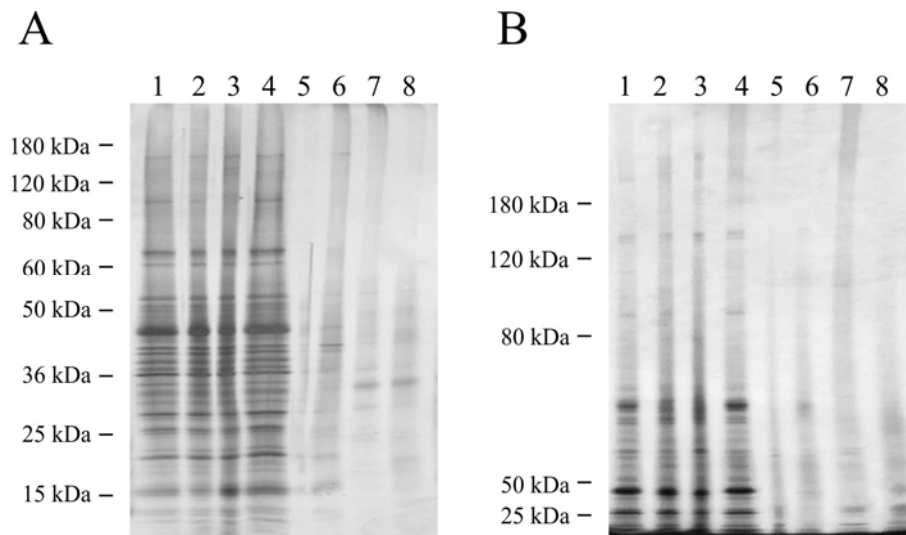


Abb. 39. An-/Abreicherungsanalyse von Proben während der Präparation. (A) SDS-PAGE, (B) Tris-Acetat-PAGE. (1) Gesamthirnhomogenat, (2) grobe Synaptosomenfraktion, (3) Percoll-Gradienten entstammende Synaptosomen, (4) pelletierte Synaptosomen, (5) Überstand der Synaptosomen-Pelletierung, (6) grobe Vesikelfraktion nach osmotischer Lyse, (7) Fraktionen 5 bis 11 des Saccharosegradienten, (8) immungereinigte Vesikel. Pro Spur wurden 10 µg Protein elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Probenkomplexität nimmt mit zunehmender Aufreinigung drastisch ab. Dies ist insbesondere ab der groben synaptischen Vesikelprobe (6) ersichtlich. Probe 5 ist erwartungsgemäß proteinarm. Die Proteinkomplexität der Fraktionen 5 bis 11 des Saccharosegradienten (7) als auch der immungereinigten Probe (8) ist vergleichsweise gering. Insbesondere Proteine hoher molekularer Masse (> 120 kDa) sind in den Proben 7 und 8 nicht als individuelle Banden erkennbar (B).

3.3.2 Western Blot Analysen

Aufgrund der geringen Aussagekraft silbergefärbter Gele bezüglich spezifischer Vesikelproteine und der nicht vorhandenen Linearität zwischen Proteinkonzentration und Bandenintensität wurde die Western Blot Analyse zur Untersuchung der An- bzw. Abreicherung verwendet. Untersucht wurden hierbei integrale Vesikelproteine, vesikelassoziierte Proteine, Proteine des Zytoskeletts, Proteine der prä- und postsynaptischen Plasmamembran als auch Komponenten der Postsynapse. Zusätzlich wurden Analysen bezüglich organellärer Kontaminationen durchgeführt.

Untersuchte integrale Vesikelproteine beinhalten SV2, Synaptophysin, Synaptotagmin, Synaptogyrin, Synaptoporin, VAMP-2, SCAMP 1 und die vesikulären Neurotransmittertransporter vGat, vGlut1 und vAChT (Abb. 40). Allen Proteinen ist gemein, daß sie während der Präparation an Konzentration zunehmen. Die intensivsten Immunsignale

lassen sich in den immungereinigten Fraktionen nachweisen. Insbesondere Synaptoporin und der vesikuläre Acetylcholin-Transporter liegen im Saccharosegradienten und in den immungereinigten Fraktionen in vergleichsweise sehr hoher Konzentration vor.

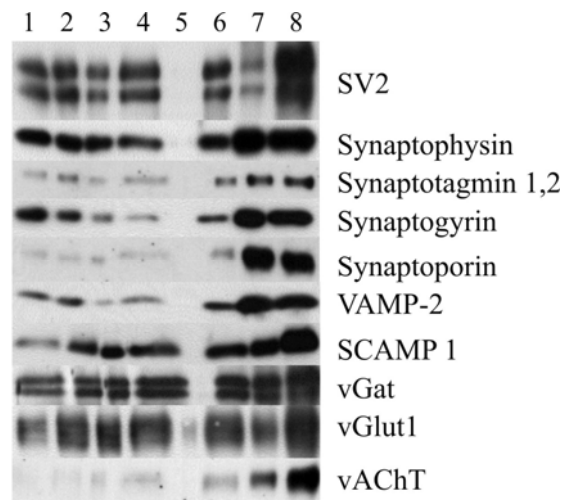


Abb. 40. An-/Abreicherungsanalyse der mit Western Blot detektierten integralen Vesikelproteine SV2, Synaptophysin, Synaptotagmin, Synaptogyrin, Synaptoporin, VAMP-2, SCAMP 1, vGat, vGlut1 und vAChT. (1) Gesamthirnhomogenat, (2) grobe Synaptosomenfraktion, (3) Percoll-Gradienten entstammende Synaptosomen, (4) pelletierte Synaptosomen, (5) Überstand der Synaptosomen-Pelletierung, (6) grobe Vesikelfraktion nach osmotischer Lyse, (7) Fraktionen 5 bis 11 des Saccharosegradienten, (8) immungereinigte Vesikel. Pro Spur wurden 5 μ g Protein elektrophoretisch aufgetrennt.

Untersuchte peripher assoziierte Vesikelproteine umfassen rab3A und dessen Effektor Rabphilin3A, die beiden Synapsin-Isoformen sowie β -Tubulin (Abb. 41). Rab3A zeigt eine Konzentrationsabnahme nach Immunreinigung und ist im Gegensatz zu den integralen Vesikelproteinen in hoher Konzentration im Überstand der Synaptosomen-Pelletierung (5) nachweisbar. Rabphilin3A weist im gesamten Präparationsverlauf eine gleichbleibende bis zunehmende Konzentration auf. Synapsin I zeigt in den Proben 4, 7 und 8 die höchste Abundanz. Im Gegensatz dazu weist Synapsin II die höchste Konzentration in den Fraktionen 5 bis 11 des Saccharosegradienten auf. In der immungereinigten Probe sind lediglich Spuren an Protein vorhanden. β -Tubulin reichert während der Präparation bis hin zur Synaptosomenpelletierung (4) an, ist wie rab3A in Fraktion 5 detektierbar und danach nicht weiter nachweisbar.

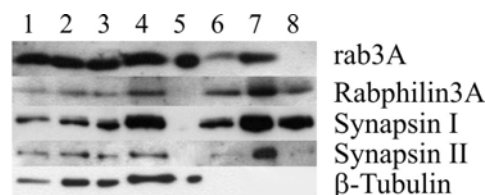


Abb. 41. An-/Abreicherungsanalyse der mit Western Blot detektierten vesikelassoziierten Proteine rab3A, Rabphilin3A, Synapsin I, Synapsin II und β -Tubulin. (1) Gesamthirnhomogenat, (2) grobe Synaptosomenfraktion, (3) Percoll-Gradienten entstammende Synaptosomen, (4) pelletierte Synaptosomen, (5) Überstand der Synaptosomen-Pelletierung, (6) grobe Vesikelfraktion nach osmotischer Lyse, (7) Fraktionen 5 bis 11 des Saccharosegradienten, (8) immungereinigte Vesikel. Pro Spur wurden 5 μ g Protein elektrophoretisch aufgetrennt.

Die t-SNAREs SNAP-25 und Syntaxin 1 nehmen während der Vesikelaufräumung an Konzentration ab und zeigen ihre geringste Abundanz in der immungereinigten synaptischen Vesikelprobe (8) (Abb. 42). SNAP-25 kann in geringer Konzentration im Überstand der Synaptosomen-Pelletierung (5) detektiert werden. Die mit Syntaxin 1 assoziierten Proteine Complexin, Munc13 und Munc18 weisen eine dem Syntaxin 1 entsprechende Verteilung auf. Ihre Abundanz nimmt im Verlauf der Präparation ab und ist in der immungereinigten Probe nicht bzw. nur sehr schwach zu detektieren. Die mit dem SNARE-Komplex interagierenden Proteine NSF und $\alpha\beta$ -SNAP ähneln dieser Verteilung. Beide Proteine nehmen während der Präparation an Konzentration ab und lassen sich in den Proben des Saccharosegradienten und der immungereinigten Fraktion nicht detektieren. Die in der Endozytose involvierten Proteine Clathrin und Dynamin-1 zeigen ebenfalls eine Abreicherung. Clathrin ist in der groben Vesikelfraktion und allen nachfolgenden Schritten nicht mehr nachweisbar, Dynamin-1 hingegen läßt sich in geringen Spuren in den Fraktionen des Saccharosegradienten detektieren. Die Proteine rab4 und rab5 weisen eine geringfügige Konzentrationsabnahme auf. Rab5 ist in geringen Mengen in den Fraktionen des Saccharosegradienten vorhanden, fehlt aber in der immungereinigten Probe.

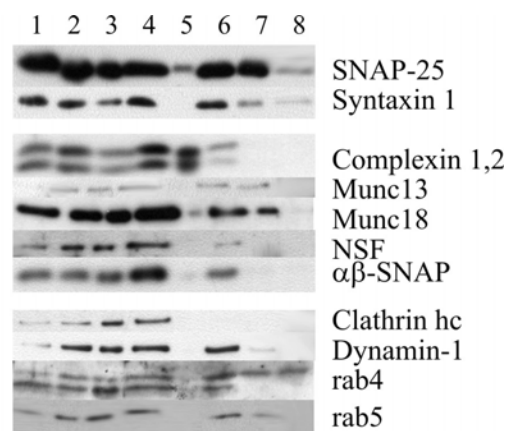


Abb. 42. An-/Abreicherungsanalyse der mit Western Blot detektierten Proteine SNAP-25, Syntaxin 1, Complexin 1 und 2, Munc13, Munc18, NSF, $\alpha\beta$ -SNAP, Clathrin, Dynamin-1, rab4 und rab5. (1) Gesamthirnhomogenat, (2) grobe Synaptosomenfraktion, (3) Percoll-Gradienten entstammende Synaptosomen, (4) pelletierte Synaptosomen, (5) Überstand der Synaptosomen-Pelletierung, (6) grobe Vesikelfraktion nach osmotischer Lyse, (7) Fraktionen 5 bis 11 des Saccharosegradienten, (8) immungereinigte Vesikel. Pro Spur wurden 5 μ g Protein elektrophoretisch aufgetrennt.

Aufgrund der hohen molekularen Masse und der Problematik des Transfers der beiden Proteine Bassoon und Piccolo auf Nitrozellulosemembranen wurden für diese Proteine Dot Blots durchgeführt (Abb. 43). Beide Proteine reichern zu Beginn der Präparation an und sind in hoher Konzentration in der reinen Synaptosomenfraktion setektierbar. Nach Lyse der

Synaptosomen nimmt ihre Konzentration ab. Beide Proteine sind in der immungereinigten Vesikelfraktion nachweisbar.

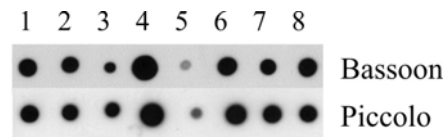


Abb. 43. An-/Abreicherungsanalyse der mit Dot Blot detektierten Proteine Bassoon und Piccolo. (1) Gesamthirnhomogenat, (2) grobe Synaptosomenfraktion, (3) Percoll-Gradienten entstammende Synaptosomen, (4) pelletierte Synaptosomen, (5) Überstand der Synaptosomen-Pelletierung, (6) grobe Vesikelfraktion nach osmotischer Lyse, (7) Fraktionen 5 bis 11 des Saccharosegradienten, (8) immungereinigte Vesikel. Pro Dot wurde 1 µg Protein gespottet.

Untersuchte Proteine der präsynaptischen Plasmamembran umfassen die Na,K-ATPase, den Ca²⁺-Kanal des N-Typs Ca_v2.2, CAT1 (Calcium Transportprotein 1), GAT1 (GABA-Transporter 1), EAAC1 (Glutamat-Transporter) und Flotillin-1 (Abb. 44). Alle Proteine reduzieren in ihrer Abundanz nach der groben Vesikelpräparation (6) und können bis auf GAT1 und Flotillin-1 in den Proben des Saccharosegradienten (7) nicht weiter detektiert werden. GAT1 und Flotillin-1 weisen dort geringe Konzentrationen auf, sind aber in der immungereinigten Probe (8) nicht detektierbar.

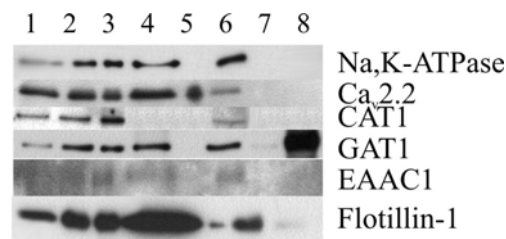


Abb. 44. An-/Abreicherungsanalyse der mit Western Blot detektierten Proteine Na,K-ATPase, Ca_v2.2, CAT1, GAT1, EAAC1 und Flotillin-1. (1) Gesamthirnhomogenat, (2) grobe Synaptosomenfraktion, (3) Percoll-Gradienten entstammende Synaptosomen, (4) pelletierte Synaptosomen, (5) Überstand der Synaptosomen-Pelletierung, (6) grobe Vesikelfraktion nach osmotischer Lyse, (7) Fraktionen 5 bis 11 des Saccharosegradienten, (8) immungereinigte Vesikel. Pro Spur wurden 5 µg Protein elektrophoretisch aufgetrennt.

Die glykolytischen Enzyme GAPDH und Pyruvat Kinase lassen sich in den immungereinigten Fraktionen (8) nachweisen, jedoch in deutlich geringerer Konzentration als in den anderen Proben (Abb. 45). Beide Proteine weisen im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Proteinen eine hohe Konzentration im Überstand der Synaptosomen-Pelletierung (5) auf und zeigen bis auf die Immunisolate eine insgesamt gleichbleibende Abundanz während der Präparation. Die Kinase Erk-1/2 läßt bis zu den pelletierten Synaptosomen eine gleichbleibende Abundanz erkennen, ist aber in nur sehr geringer Konzentration in der groben Vesikelpräparation (6) nachweisbar und fehlt in allen nachfolgenden Schritten.

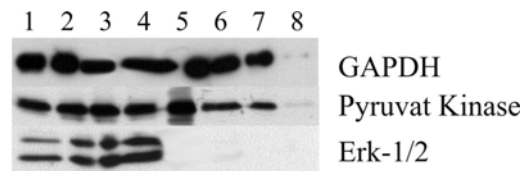


Abb. 45. An-/Abreicherungsanalyse der mit Western Blot detektierten Proteine GAPDH, Pyruvat Kinase und Erk-1/2. (1) Gesamthirnhomogenat, (2) grobe Synaptosomenfraktion, (3) Percoll-Gradienten entstammende Synaptosomen, (4) pelletierte Synaptosomen, (5) Überstand der Synaptosomen-Pelletierung, (6) grobe Vesikelfraktion nach osmotischer Lyse, (7) Fraktionen 5 bis 11 des Saccharosegradienten, (8) immungereinigte Vesikel. Pro Spur wurden 5 µg Protein elektrophoretisch aufgetrennt.

Neben der Präsynapse wurden zusätzlich Proteine der Postsynapse untersucht. Dazu zählen der AMPA-Rezeptor, PSD-93, PSD-95 und SAP102 (Abb. 46). Der AMPA-Rezeptor nimmt während der Präparation bis zur groben Vesikelpräparation (6) an Konzentration zu, ist aber in den Fraktionen des Saccharosegradienten (7) und den immungereinigten Proben (8) nur in Spuren nachweisbar. Im Gegensatz dazu sind die Proteine PSD-93, PSD-95 und SAP102 im Saccharosegradienten und den immungereinigten Proben nicht detektierbar. Die höchste Abundanz zeigen die Proteine in der reinen Synaptosomenfraktion (4).

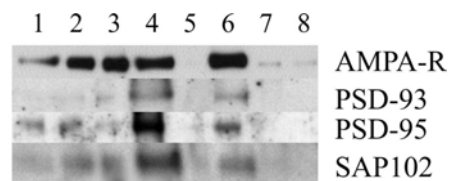


Abb. 46. An-/Abreicherungsanalyse der mit Western Blot detektierten Proteine AMPA-R, PSD-93, PSD-95 und SAP102. (1) Gesamthirnhomogenat, (2) grobe Synaptosomenfraktion, (3) Percoll-Gradienten entstammende Synaptosomen, (4) pelletierte Synaptosomen, (5) Überstand der Synaptosomen-Pelletierung, (6) grobe Vesikelfraktion nach osmotischer Lyse, (7) Fraktionen 5 bis 11 des Saccharosegradienten, (8) immungereinigte Vesikel. Pro Spur wurden 5 µg Protein elektrophoretisch aufgetrennt.

Für die Analyse von Kontaminationen wurden Immunanalysen verschiedener organellärer Markerproteine durchgeführt (Abb. 47). Das Gliaprotein GFAP ist in allen Fraktionen detektierbar, nimmt aber während der Präparation an Konzentration ab. Die geringste Konzentration ist in der immungereinigten Probe (8) nachweisbar. Das ER-Chaperon Calnexin ist in allen Proben bis auf den Überstand der Synaptosomen-Pelletierung in gleichem Maß detektierbar. Glast nimmt an Abundanz während der Präparation ab und ist in den Fraktionen des Saccharosegradienten und der immungereinigten Probe nicht detektierbar. Die mitochondriale F_0F_1 -ATPase nimmt ebenfalls an Konzentration ab und fehlt in den Proben des Saccharosegradienten und der Immunreinigung. Gleiches gilt für den Peroxisomenmarker PMP70.

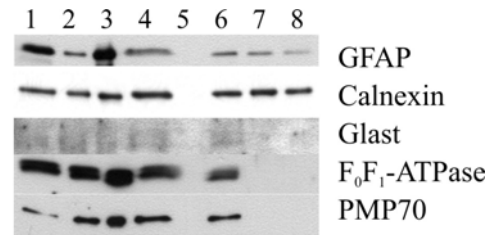


Abb. 47. An-/Abreicherungsanalyse der mit Western Blot detektierten Proteine GFAP, Calnexin, Glast, F₀F₁-ATPase und PMP70. (1) Gesamthirnhomogenat, (2) grobe Synaptosomenfraktion, (3) Percoll-Gradienten entstammende Synaptosomen, (4) pelletierte Synaptosomen, (5) Überstand der Synaptosomen-Pelletierung, (6) grobe Vesikelfraktion nach osmotischer Lyse, (7) Fraktionen 5 bis 11 des Saccharosegradienten, (8) immungereinigte Vesikel. Pro Spur wurden 5 µg Protein elektrophoretisch aufgetrennt.

3.3.3 Quantifizierung der Immunanalysen

Die Analysen der integralen synaptischen Vesikelproteine SV2, Synaptophysin, Synaptotagmin, Synaptogyrin, Synaptoporin, VAMP-2, vGat, vGlut1 und vAChT ergeben ein sehr ähnliches Muster (Abb. 48). Allen Proteinen ist gemein, daß die höchste Konzentration in der immungereinigten Vesikelfraktion zu finden ist. Die Anreicherung gegenüber anderen Proteinen läßt sich hierdurch gut demonstrieren. Besonders stark ausgeprägt zeigt sich die Anreicherung für Synaptotagmin, Synaptoporin, Synaptogyrin, VAMP-2 und vAChT mit jeweils 42%, 58%, 38%, 22% und 69% des Gesamtproteins. Eine Ausnahme bildet das Protein SCAMP 1, für das eine Konzentrationsabnahme nach Herstellung der groben Vesikelfraktion zu verzeichnen ist. Die immungereinigte Vesikelfraktion enthält 14% des Gesamtproteins, während in der groben Synaptosomenprobe 20% detektiert werden können.

Untersuchte vesikelassoziierte Proteine umfassen rab3A, Rabphilin3A, Synapsin I und II sowie β-Tubulin (Abb. 49). Rab3A zeigt eine schwankende Konzentration während des Präparationsverlaufs. Es läßt sich in der höchsten Konzentration mit jeweils 24% in der groben Synaptosomenprobe (4) und den Fraktionen des Saccharosegradienten (7) detektieren. In immungereinigten Proben ist kein Protein detektierbar. Das rab3A-Effektorprotein Rabphilin3A zeigt demgegenüber eine abweichende Verteilung, nimmt aber ebenso wie rab3A drastisch in den immungereinigten Proben ab (10% des Gesamtproteins). Die höchste Konzentration an Rabphilin3A läßt sich mit 28% in der groben Vesikelfraktion (6) detektieren. Synapsin I läßt sich in hoher Konzentration in der groben Synaptosomenprobe (4) und in den immungereinigten Proben (8) wiederfinden (23% und 20%), während Synapsin II neben der ebenfalls hohen Abundanz in Probe 4 (37%) nicht mit Vesikeln assoziiert ist. Dies spiegelt sich in den Ergebnissen für β-Tubulin wider, dessen maximaler Wert mit 40% in Probe 4 detektiert wird.

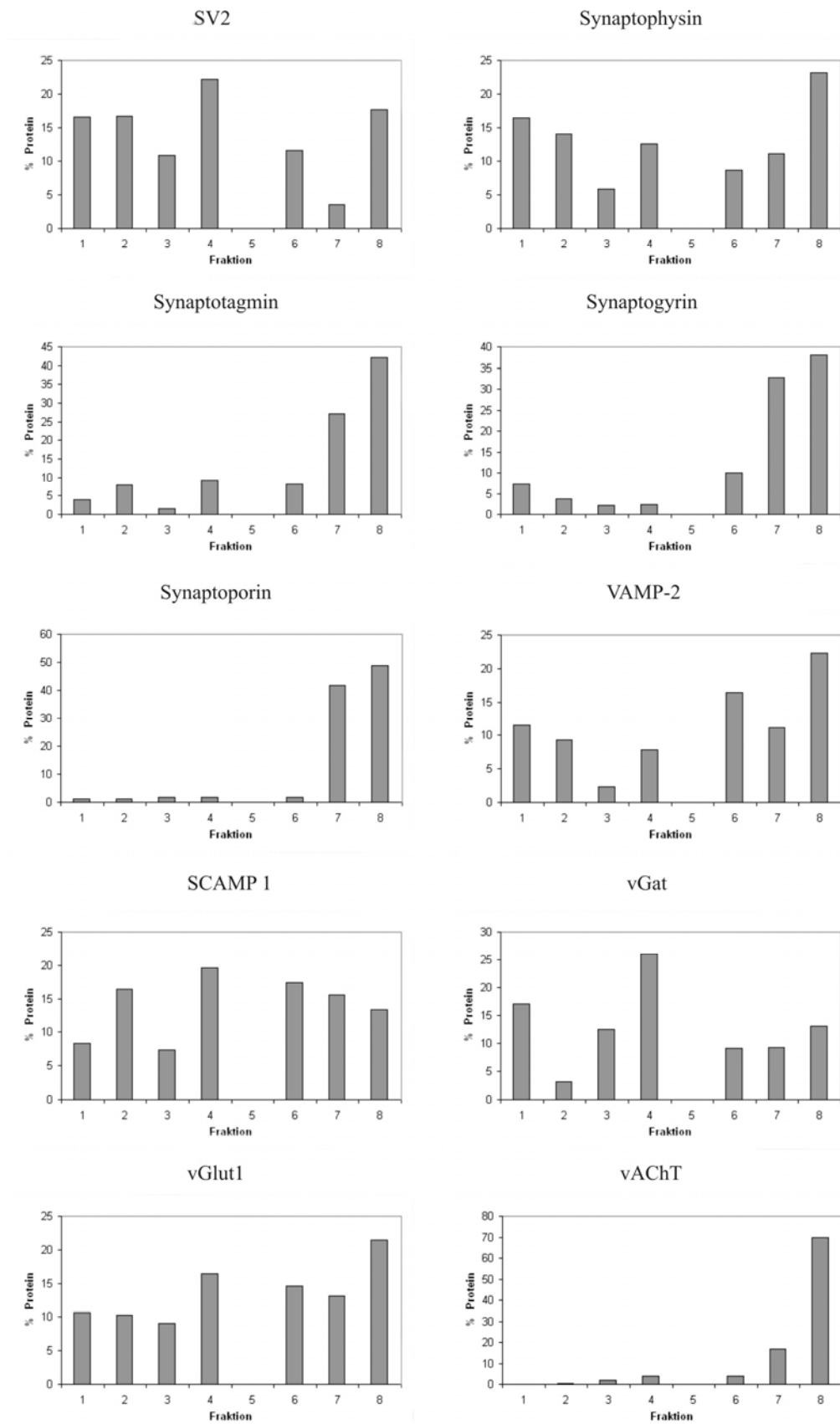


Abb. 48. Quantifizierung der An-/Abreicherungsanalyse der mit Western Blot detektierten Proteine SV2, Synaptophysin, Synaptotagmin, Synaptogyrin, Synaptoporin, VAMP-2, SCAMP 1, vGat, vGlut1 und vAChT. (1) Gesamthirnhomogenat, (2) grobe Synaptosomenfraktion, (3) Percoll-Gradienten entstammende Synaptosomen, (4) pelletierte Synaptosomen, (5) Überstand der Synaptosomen-Pelletierung, (6) grobe Vesikelfraktion nach osmotischer Lyse, (7) Fraktionen 5 bis 11 des Saccharosegradienten, (8) immungereinigte Vesikel.

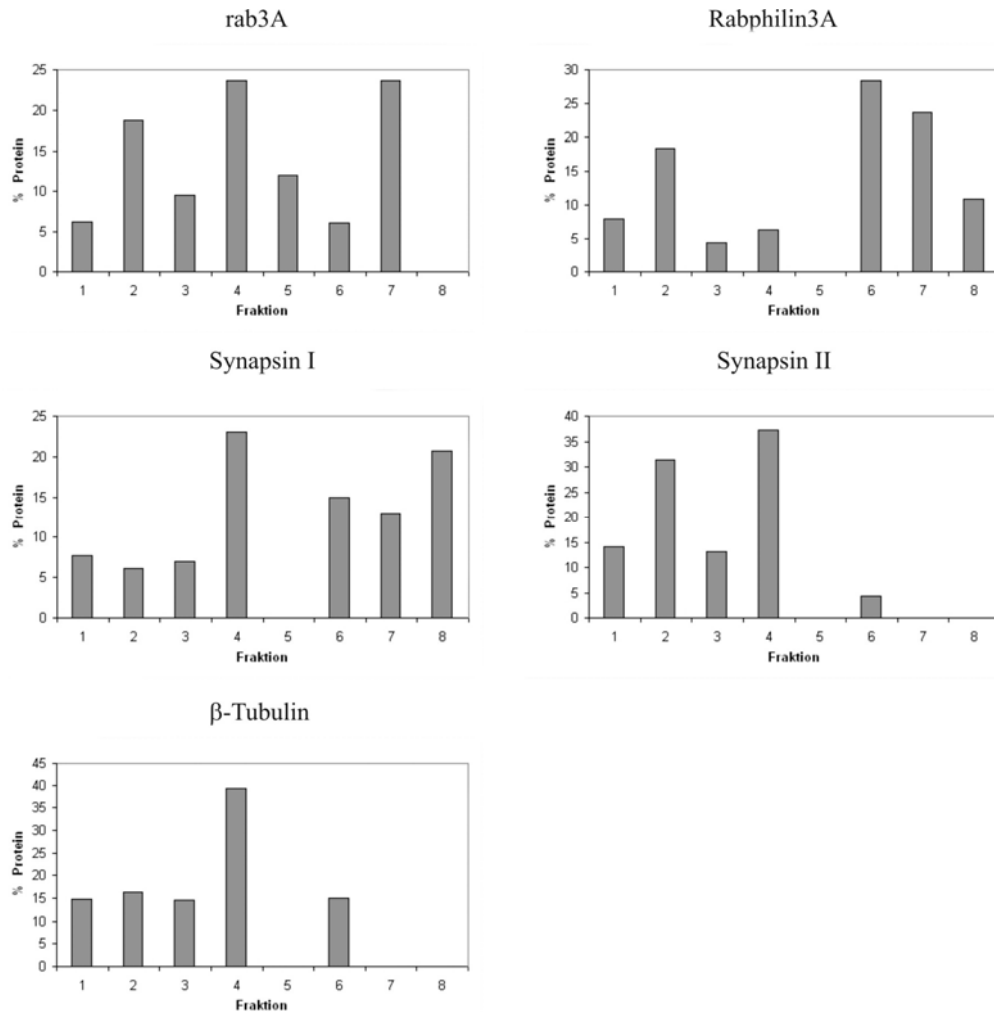


Abb. 49. Quantifizierung der An-/Abreicherungsanalyse der mit Western Blot detektierten Proteine rab3A, Rabphilin3A, Synapsin I, Synapsin II und β -Tubulin. (1) Gesamthirnhomogenat, (2) grobe Synaptosomenfraktion, (3) Percoll-Gradienten entstammende Synaptosomen, (4) pelletierte Synaptosomen, (5) Überstand der Synaptosomen-Pelletierung, (6) grobe Vesikelfraktion nach osmotischer Lyse, (7) Fraktionen 5 bis 11 des Saccharosegradienten, (8) immungereinigte Vesikel.

Die t-SNAREs SNAP-25 und Syntaxin 1 zeigen mit 3% und 2% eine sehr geringe Abundanz in der immungereinigten Vesikelprobe (Abb. 50). SNAP-25 nimmt zunächst linear an Konzentration ab, zeigt aber sowohl in der unreinen Vesikelfraktion (11%) als auch in den Fraktionen des Saccharosegradienten (15%) eine hohe Abundanz. Demgegenüber nimmt die Konzentration des Syntaxin-1 ab Probe 4 (22%) ab und erreicht in der immungereinigten Probe 2% des Gesamtproteins. Die mit dem SNARE-Komplex assoziierten Proteine Munc13 und Complexin zeigen ein ähnliches Muster. Hohe Proteinkonzentrationen sind in Probe 3 bzw. 4 (32%, 23%) zu verzeichnen, die in den folgenden Schritten sinken. Complexin ist bereits in den Fraktionen des Saccharosegradienten nicht mehr detektierbar, Munc13 in den immungereinigten Proben nicht nachweisbar. Die Ergebnisse für Munc18 gleichen denen des Syntaxin 1. Maximale Konzentrationen befinden sich mit 27% in der groben Synaptosomenprobe (4) und mit 20% in der groben Vesikelprobe (6). Das Chaperon NSF ist

in Probe 4 in der höchsten Konzentration (45%) vorhanden und nimmt ab diesem Schritt immens an Konzentration ab. Die detektierbaren Mengen in der unreinen Vesikelfraktion und allen nachfolgenden Proben sind marginal (< 3%). Die Proteine $\alpha\beta$ -SNAP ergeben sehr ähnliche Resultate. 47% sind in der groben Synaptosomenprobe, 15% in der groben Vesikelfraktion detektierbar. Die nachfolgenden Schritte enthalten weniger als 1% der Proteine.

Die in der Endozytose involvierten Proteine Clathrin und Dynamin-1 sind in sehr hohen Konzentrationen in Probe 4 vorhanden (45% bzw. 30%). Dynamin-1 ist in der unreinen Vesikelfraktion (6) mit 23% detektierbar, ist aber in allen nachfolgenden Schritten nicht mehr nachweisbar. Auch Clathrin fehlt in diesen Proben völlig. Rab5 ist mit 36% in seiner höchsten Konzentration in der groben Synaptosomenprobe (4) zu detektieren und nimmt in den nachfolgenden Schritten an Abundanz ab. In der immungereinigten Probe fehlt es völlig.

Die beiden CAZ-Proteine Bassoon und Piccolo sind in der groben Synaptosomenfraktion in ihrer höchsten Konzentration vorhanden (43% bzw. 28%) (Abb. 51). Bassoon reichert ab der unreinen Vesikelfraktion bis hin zu der immungereinigten Probe an (18%). Piccolo verzeichnet hingegen eine Abreicherung zwischen Probe 6 und 7, ist aber in der immungereinigten Probe wieder in höherer Konzentration detektierbar (13%). Die Na,K-ATPase der präsynaptischen Plasmamembran weist eine sehr hohe Konzentration in der unreinen Vesikelprobe auf (40%) und ist in den nachfolgenden Schritten nicht mehr detektierbar (Abb. 51). Gleiches gilt für den Ca^{2+} -Kanal $\text{Ca}_v2.2$. Nach Abreicherung zu Beginn der Präparation verzeichnet er seine höchste Abundanz mit 28% in Probe 4 und nimmt danach in seiner Konzentration stark ab. In den freien Vesikelfractionen ist das Protein nicht detektierbar.

Der Transporter GAT1 verhält sich ähnlich wie der Calcium-Kanal (Abb. 51). Die höchste Konzentration liegt mit 37% des Gesamtproteinvorkommens in der unreinen Vesikelfraktion vor. Das Protein ist in Fraktion 7 nur noch in geringen Mengen (< 1%) und in Fraktion 8 nicht mehr nachweisbar. Flotillin-1 nimmt an Konzentration während der Präparation ab. Die höchsten Konzentrationen befinden sich im Gesamthirnhomogenat mit 32% und in Probe 4 mit 25%. Enthält die grobe Vesikelfraktion noch 10% des Proteins, ist es in synaptischen Vesikelproben nicht mehr detektierbar.

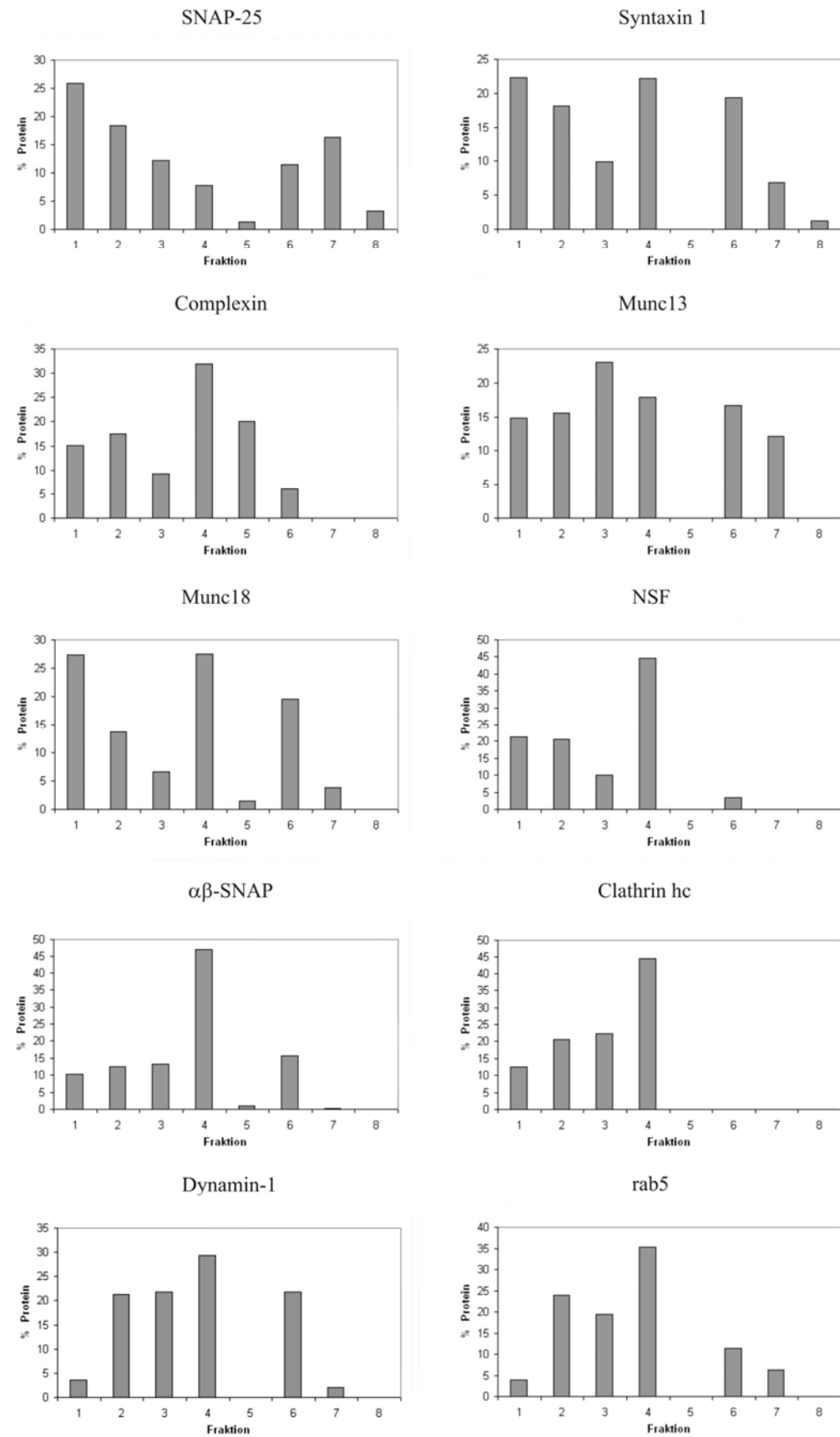


Abb. 50. Quantifizierung der An-/Abreicherungsanalyse der mit Western Blot detektierten Proteine SNAP-25, Syntaxin-1, Complexin, Munc13, Munc18, NSF, $\alpha\beta$ -SNAP, Clathrin, Dynamin-1 und rab5. (1) Gesamthirnhomogenat, (2) grobe Synaptosomenfraktion, (3) Percoll-Gradienten entstammende Synaptosomen, (4) pelletierte Synaptosomen, (5) Überstand der Synaptosomen-Pelletierung, (6) grobe Vesikelfraktion nach osmotischer Lyse, (7) Fraktionen 5 bis 11 des Saccharosegradienten, (8) immungereinigte Vesikel.

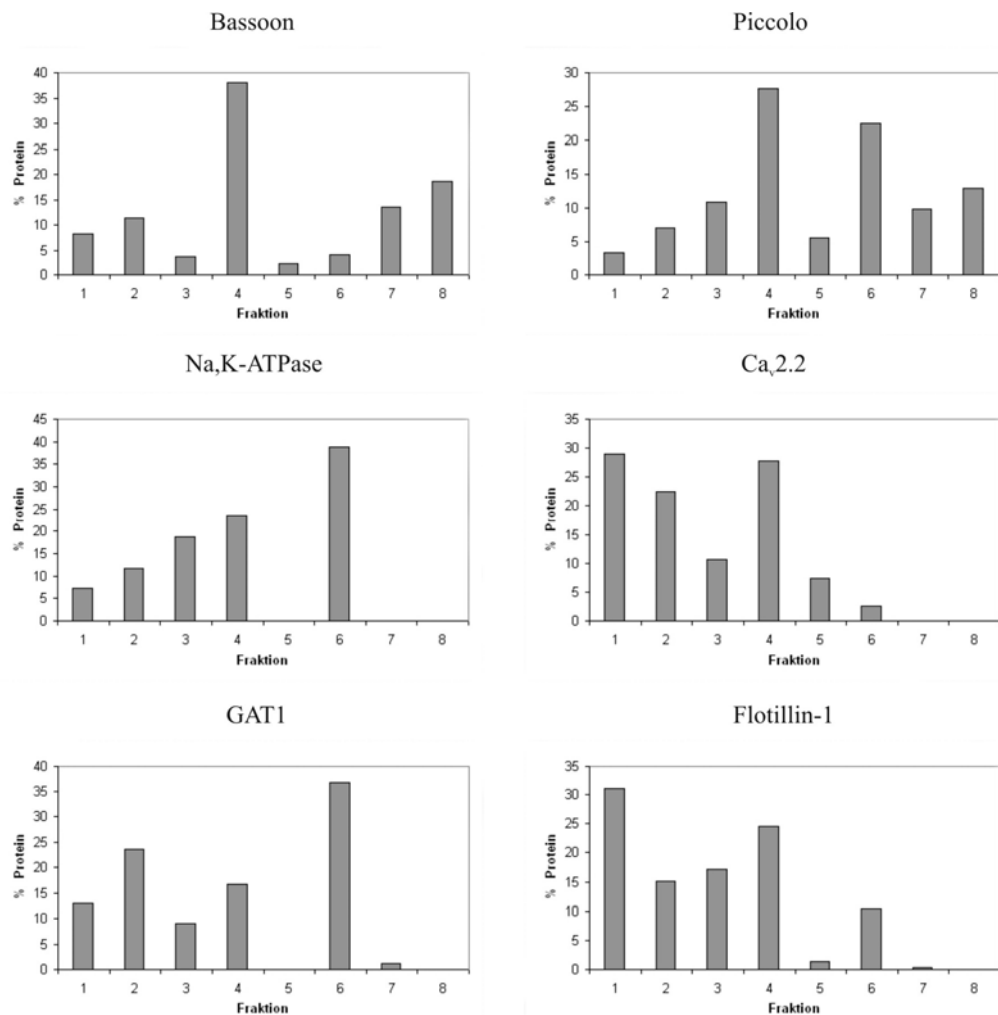


Abb. 51. Quantifizierung der An-/Abreicherungsanalyse der mit Western Blot detektierten Proteine Bassoon, Piccolo, Na_vK-ATPase, Ca_v2.2, GAT1 und Flotillin-1. (1) Gesamthirnhomogenat, (2) grobe Synaptosomenfraktion, (3) Percoll-Gradienten entstammende Synaptosomen, (4) pelletierte Synaptosomen, (5) Überstand der Synaptosomen-Pelletierung, (6) grobe Vesikelfraktion nach osmotischer Lyse, (7) Fraktionen 5 bis 11 des Saccharosegradienten, (8) immungereinigte Vesikel.

Das Glykolyse-Enzym GAPDH ist im Überstand der Synaptosomenpelletierung in der höchsten Konzentration nachweisbar (24%) und nimmt zu Beginn der Präparation von 17% auf 3% in der groben Synaptosomenfraktion an Konzentration ab (Abb. 52). Enthalten die Fraktionen des Saccharosegradienten noch 12% des Proteins, sind in den immungereinigten Proben weniger als 1% detektierbar. Die Pyruvat Kinase besitzt im Gesamthirnhomogenat ihre größte Abundanz (28%). Alle folgenden Werte bis zu den Fraktionen des Saccharosegradienten sind mit 8 bis 15% annähernd äquivalent. Immungereinigte Vesikel enthalten hingegen nur sehr geringe Spuren dieser Kinase (< 1%). Die Kinase Erk-1/2 zeigt ihr letztes Vorkommen während der Aufreinigung in gereinigten Synaptosomen mit 16% des Gesamtproteins. Der Maximalwert von 30% ist in den Percoll-Gradienten abstammenden Synaptosomenfraktionen detektierbar. Nach Lyse der synaptosomalen Strukturen ist das Enzym nicht mehr nachweisbar.

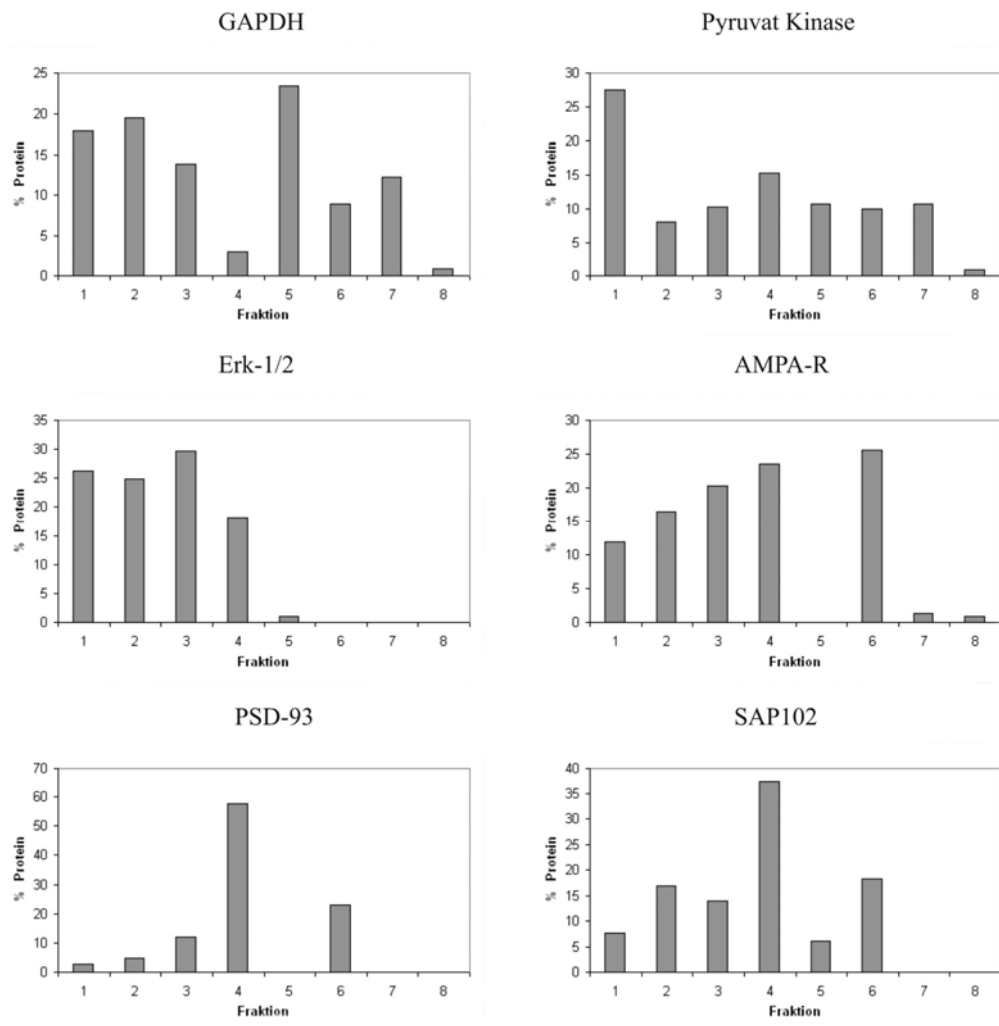


Abb. 52. Quantifizierung der An-/Abreicherungsanalyse der mit Western Blot detektierten Proteine GAPDH, Pyruvat Kinase, Erk-1/2, AMPA-Rezeptor, PSD-93 und SAP102. (1) Gesamthirnhomogenat, (2) grobe Synaptosomenfraktion, (3) Percoll-Gradienten entstammende Synaptosomen, (4) pelletierte Synaptosomen, (5) Überstand der Synaptosomen-Pelletierung, (6) grobe Vesikelfraktion nach osmotischer Lyse, (7) Fraktionen 5 bis 11 des Saccharosegradienten, (8) immungereinigte Vesikel.

Der AMPA-Rezeptor reichert während der Präparation an und weist die höchste Konzentration in der groben Vesikelfraktion auf (25%) (Abb. 52). Die Fraktionen des Saccharosegradienten als auch die immungereinigten Fraktionen enthalten minimale Spuren (< 1%) des Proteins. Die beiden postsynaptischen Proteine PSD-93 und SAP102 weisen ein sehr ähnliches Profil auf. Beide besitzen ihre höchste Konzentration mit 58% bzw. 38% in den gereinigten Synaptosomen. Mittlere Konzentrationen sind in der unreinen Vesikelfraktion mit 23% bzw. 18% detektierbar, während die nachfolgenden Proben keines beider Proteine enthalten.

Untersuchte putative Kontaminationen umfassen GFAP, Calnexin, die F_0F_1 -ATPase und PMP70 (Abb. 53). GFAP zeigt eine drastische Konzentrationsabnahme nach Isolierung der Synaptosomen. Im Gesamthirnhomogenat befinden sich 70% des Proteins, während isolierte

Synaptosomen (4) nur noch 10% des Proteins enthalten. Ausgehend von der groben Vesikelfraktion mit 7% Protein reichert GFAP auf weniger als 1% in der immungereinigten Fraktion ab. Das ER-Chaperon Calnexin zeigt mit durchschnittlich 14% Protein während der gesamten Präparation eine annähernd gleiche Proteinabundanz, wenn man von dem annähernd proteinfreien Überstand der Synaptosomen-Pelletierung (5) absieht. Die mitochondriale F-ATPase weist im Gesamthirnhomogenat mit 35% die höchste Abundanz auf und nimmt in den nachfolgenden Schritten an Konzentration ab. Die grobe Vesikelfraktion enthält nur noch 12% des Proteins. In den Fraktionen des Saccharosegradienten (7) und der immungereinigten Vesikelfraktion (8) ist die ATPase nicht detektierbar. Ähnlich verhält es sich mit dem peroxisomalen Membranprotein PMP70, dessen Konzentration nach Isolation der Synaptosomen von 23% auf 16% für die grobe Vesikelfraktion abnimmt und in den reineren Vesikelfraktionen der Proben 7 und 8 fehlt.

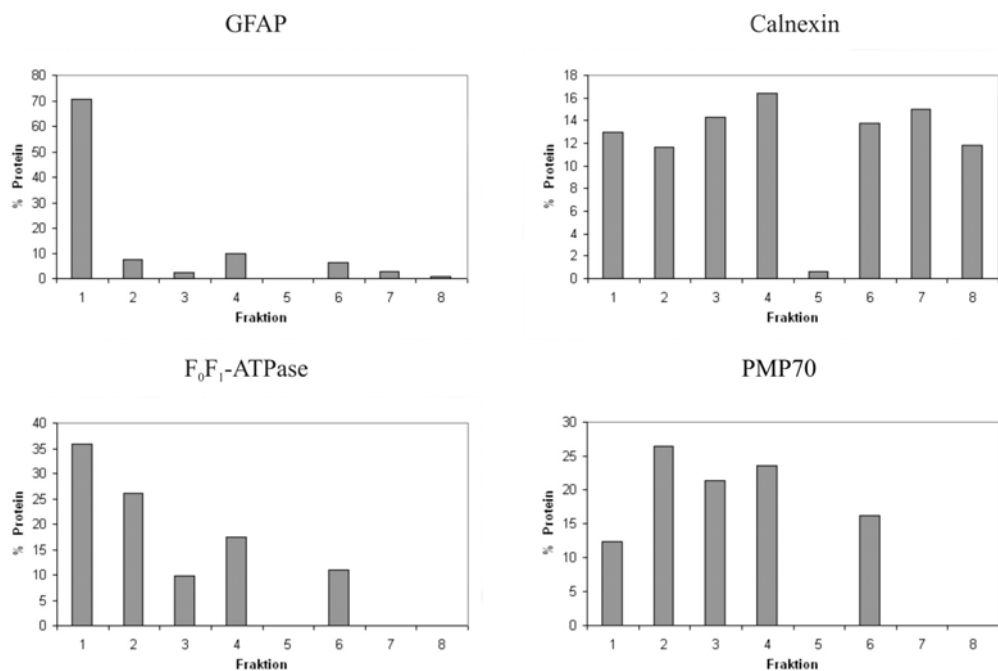


Abb. 53. Quantifizierung der An-/Abreicherungsanalyse der mit Western Blot detektierten Proteine GFAP, Calnexin, F₀F₁-ATPase und PMP70. (1) Gesamthirnhomogenat, (2) grobe Synaptosomenfraktion, (3) Percoll-Gradienten entstammende Synaptosomen, (4) pelletierte Synaptosomen, (5) Überstand der Synaptosomen-Pelletierung, (6) grobe Vesikelfraktion nach osmotischer Lyse, (7) Fraktionen 5 bis 11 des Saccharosegradienten, (8) immungereinigte Vesikel.

3.4 Phasentrennungen und andere Separationstechniken

3.4.1 Triton X-114

Die Anwendung von Triton X-114 zur Phasentrennung resultiert in zwei Proteinpopulationen: eine mit Membranproteinen und eine mit löslichen Proteinen angereicherte Phase. Beide Populationen werden mittels BAC/SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und

anschließend einer Silberfärbung unterzogen (Abb. 54). Vergleicht man das Proteinmuster beider Gele, so lassen sich kaum Gemeinsamkeiten erkennen. Nur eine kleine Anzahl an Proteinen ist in beiden Phasen detektierbar. Die Technik ist daher sehr gut für die Trennung hydrophober von hydrophilen Proteinen geeignet.

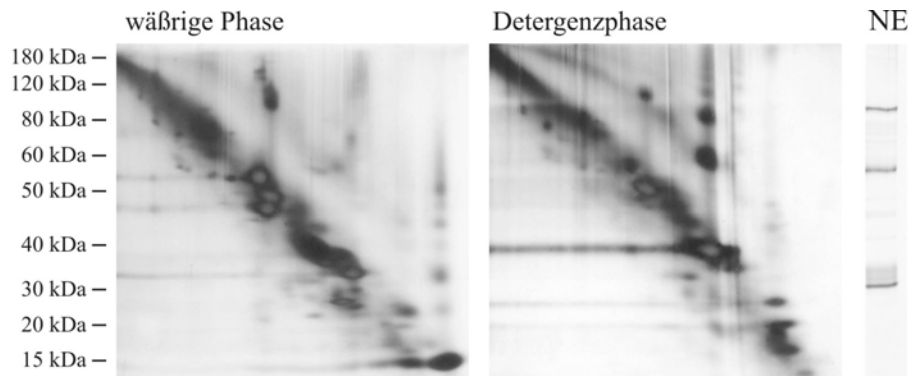


Abb. 54. Per BAC/SDS-PAGE aufgetrennte Proteine der mittels Triton X-114 induzierten Phasenseparation in wäßrige Phase und Detergenzphase. Pro Gel wurden 150 µg Protein elektrophoretisch aufgetrennt. NE kennzeichnet die Nachelution mit SDS-Probenpuffer.

Die mit SDS-Probenpuffer durchgeführte Nachelution (NE) der mit Triton X-114 eluierten Magnetbeads zeigt im Wesentlichen drei prominente Proteinbanden mit einer molekularen Masse von 25 kDa, 50 kDa und 100 kDa, welche Untereinheiten bzw. Dimere der Untereinheiten der an die Magnetbeads gekoppelten Immunglobuline darstellen. Keine weiteren Proteine sind in nennenswerter Menge detektierbar, so daß sichergestellt ist, daß Triton X-114 die Vesikelproteine komplett von den Magnetbeads eluiert.

Um die Effektivität der Phasentrennung zu untermauern und Sicherheit vor dem Einsatz in der Massenspektrometrie zu erhalten, wurden phasenseparierte integrale und peripher assoziierte synaptische Vesikelproteine zweidimensionalen Immunanalysen unterzogen (Abb. 55). Zu den integralen Membranproteinen zählen Synaptophysin, Synaptotagmin, VAMP-2, SCAMP 1, vGat, vGlut1, Synaptoporin und Syntaxin 1 sowie SNAP-25. Analysen löslicher Proteine umfassen GFAP.

Eine starke Anreicherung in der Detergenzphase findet man für Synaptophysin, Synaptotagmin, VAMP-2, vGat und vGlut1. Keines der Proteine läßt sich in der wäßrigen Phase detektieren. Immunanalysen für SCAMP 1 resultieren in einer Akkumulation des Proteins in der Detergenzphase. Nur ein geringer Anteil an SCAMP 1 ist in der wäßrigen Phase vorhanden. Identische Ergebnisse liegen für Synaptoporin vor. Neben dem Hauptvorkommen in der Detergenzphase ist eine geringere Konzentration in der wäßrigen

Phase nachweisbar. Im Gegensatz dazu akkumuliert das t-SNARE Syntaxin 1 in der wäßrigen Phase. Kleinere Mengen können jedoch in der Detergenzphase detektiert werden. Gleiches gilt für die Analyse von SNAP-25, dessen Großteil in der wäßrigen Phase detektierbar ist. Das lösliche Protein GFAP hingegen läßt sich ausschließlich in der wäßrigen Phase detektieren.

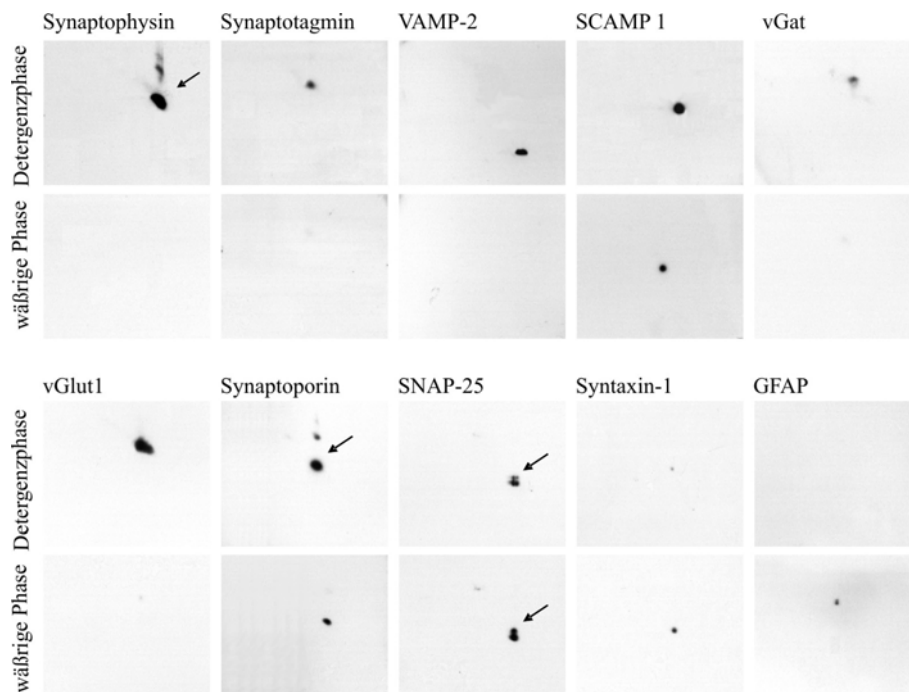


Abb. 55. Western Blot Analysen Triton X-114 phasenseparierter synaptischer Vesikelproteine. 15 µg Protein der wäßrigen Phase und Detergenzphase wurden mittels BAC/SDS-PAGE aufgetrennt und per Immunblot analysiert. In Blots mit mehreren Immunsignalen kennzeichnen die Pfeile das detektierte Vesikelprotein - die restlichen Spots stellen die leichten und schweren Ketten der verwendeten Immunglobuline und Dimere der jeweiligen Proteine dar.

Im Zuge der Probenvorbereitungen für die Massenspektrometrie traten bei der Kristallisation der Probe beider Phasen mit Matrix erhebliche Probleme auf. Die Proben kristallisierten aufgrund des eingesetzten Detergenz sehr schlecht und resultierten in einem hohen Hintergrundrauschen in den Massenspektren. Keines der tryptisch verdauten Proteine konnte per Massenspektrometrie signifikant nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.4.2 Phasenseparation mit Chloroform und Methanol

3.4.2.1 Mischungsverhältnis 1:1

Nach Phasentrennung mittels Chloroform und Methanol reichern sich in beiden Phasen unterschiedliche Proteine an (Abb. 56). In der organischen Phase lassen sich insbesondere Proteine molekularer Massen zwischen 15 und 50 kDa detektieren, während die wäßrige Phase einen größeren Massenbereich abdeckt, die Proteinabundanz jedoch generell geringer ausfällt als in der organischen Phase. Bei genauerer Betrachtung der beiden Phasen fällt auf,

daß annähernd keine Überlappung zwischen den Proteinen der beiden Phasen auftritt. Nur wenige der Proteine sind in beiden Phasen detektierbar.

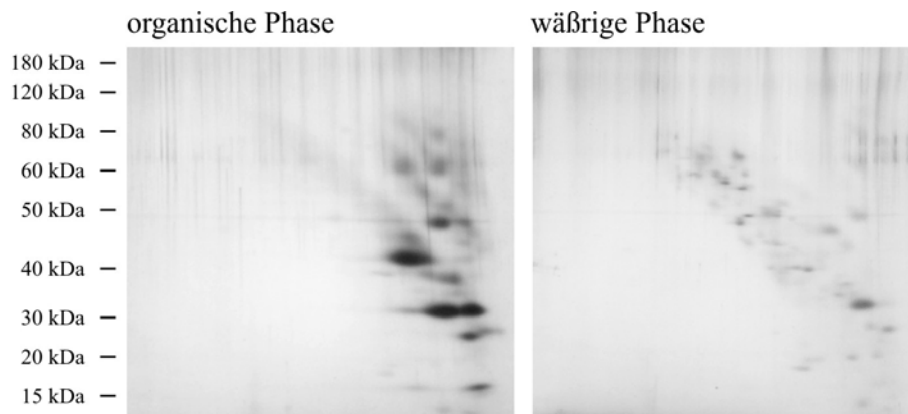


Abb. 56. Chloroform/Methanol-phasenseparierte synaptische Vesikelproteine. Gleiche Konzentrationen der organischen und wäßrigen Phase wurden mittels BAC/SDS-PAGE aufgetrennt und per Silberfärbung analysiert.

Da die Elution über das Chloroform/Methanol-Gemisch von den Magnetbeads nur unzureichend erfolgte, in der Nachelution mittels NP-40 ebenfalls kaum Protein detektierbar war (Daten hier nicht gezeigt) und die erreichte Proteinkonzentration für einen Einsatz in der Massenspektrometrie zu gering ausfiel, wurde trotz der erfolgreichen Phasentrennung auf eine weitere Anwendung verzichtet.

3.4.2.2 Verschiedene Mischungsverhältnisse

Die Mischungsverhältnisse Chloroform/Methanol von 1:8 bis 5:4 resultieren in einem Bodensatz und Überstand, die Verhältnisse 6:3 bis 8:1 in einer organischen Unter- und wäßrigen Oberphase (Abb. 57).

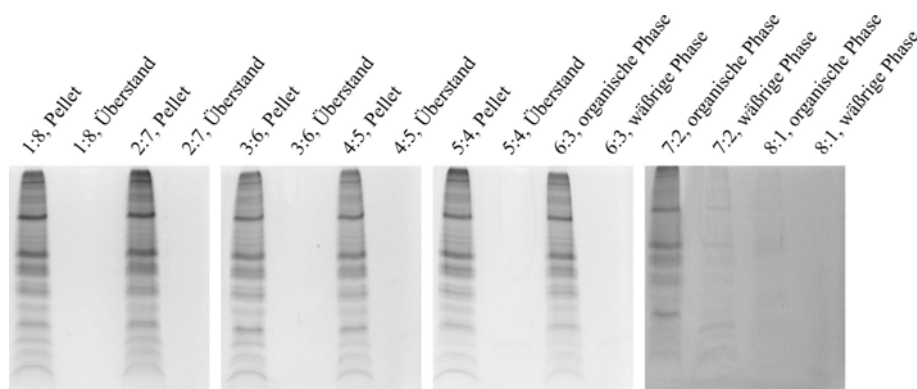


Abb. 57. Chloroform/Methanol-phasenseparierte synaptische Vesikelproteine. Äquivalente Volumina der beiden Phasen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per Coomassiefärbung analysiert.

Die Anwendung des Lösungsmittelgemisches führt jedoch nur zu einer schlechten Trennung löslicher Proteine von Membranproteinen. Der Großteil der Proteine ist im Pellet detektierbar. Nur in den Ansätzen der Mischungsverhältnisse 7:2 und 8:1 ist eine wäßrige Separation erkennbar. Im Fall der 7:2-Mischung ist die Proteinkonzentration in der organischen Phase

deutlich höher als in der wäßrigen Phase. Beide Phasen lassen jedoch Unterschiede im Proteinmuster erkennen, die insbesondere im Bereich geringer molekularer Masse auftreten. Das Mischungsverhältnis 8:1 resultiert in einer insgesamt geringen Proteinkonzentration. Jedoch sind in beiden Phasen Proteine detektierbar, wobei die organische Phase eine höhere Proteinkonzentration aufweist.

Aufgrund einer möglichen schlechten Solubilisierung der Vesikelmembran durch Chloroform wurde die Versuchsdurchführung modifiziert. Nach Elution und Zugabe des Chloroform/Methanol-Gemisches werden die Proben durch einstündige Inkubation im Ultraschallbad sowie durch gutes Mischen in Abständen von 5 Minuten behandelt und auf Eis gelagert. Die durch Zentrifugation induzierten Phasen werden in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Das modifizierte Protokoll resultiert in einem abweichenden Phasenverhalten (Abb. 58).

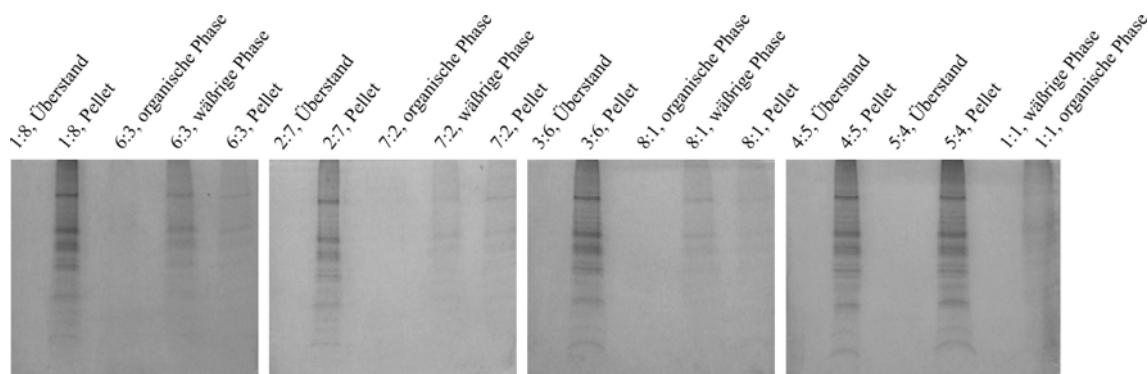


Abb. 58. Chloroform/Methanol-phasenseparierte synaptische Vesikelproteine. Gleiche Volumina der beiden Phasen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per Coomassiefärbung analysiert.

Für die Mischungsverhältnisse 1:8 bis 5:4 werden wiederum Pellets und Überstände erhalten, jedoch trennen sich die Verhältnisse 6:3 bis 8:1 in drei Phasen auf (obere wäßrige Phase, untere organische Phase und Pellet). Die Anwendung des 1:1-Gemisches resultiert in einem wäßrigen Zweiphasensystem, wobei die höchste Proteinkonzentration in der organischen Phase nachweisbar ist. In den Zweiphasensystemen aus Pellet und Überstand ist dagegen ausschließlich im Pellet Protein detektierbar. Den Dreiphasensystemen ist eigen, daß sich die höchste Proteinkonzentration in den wäßrigen Phasen wiederfinden läßt. Geringere Proteinkonzentrationen lassen sich in den Pellets, Spuren von Protein in den organischen Phasen detektieren. Musterunterschiede zwischen den Phasen ergeben sich für alle verwendeten Systeme nur in sehr geringem Maße.

Um den Einfluß von Aceton als Präzipitans zu untersuchen und gegebenenfalls auszuschließen, wurden Gradientenproben direkt für die Phasentrennung eingesetzt oder einer Acetonpräzipitation unterzogen und in TBS resuspendiert. Die Proben wurden wie für Abbildung 58 beschrieben behandelt. Als Phaseninduktoren kamen Mischungsverhältnisse von 9:0 bis 0:9 zum Einsatz (Abb. 59).

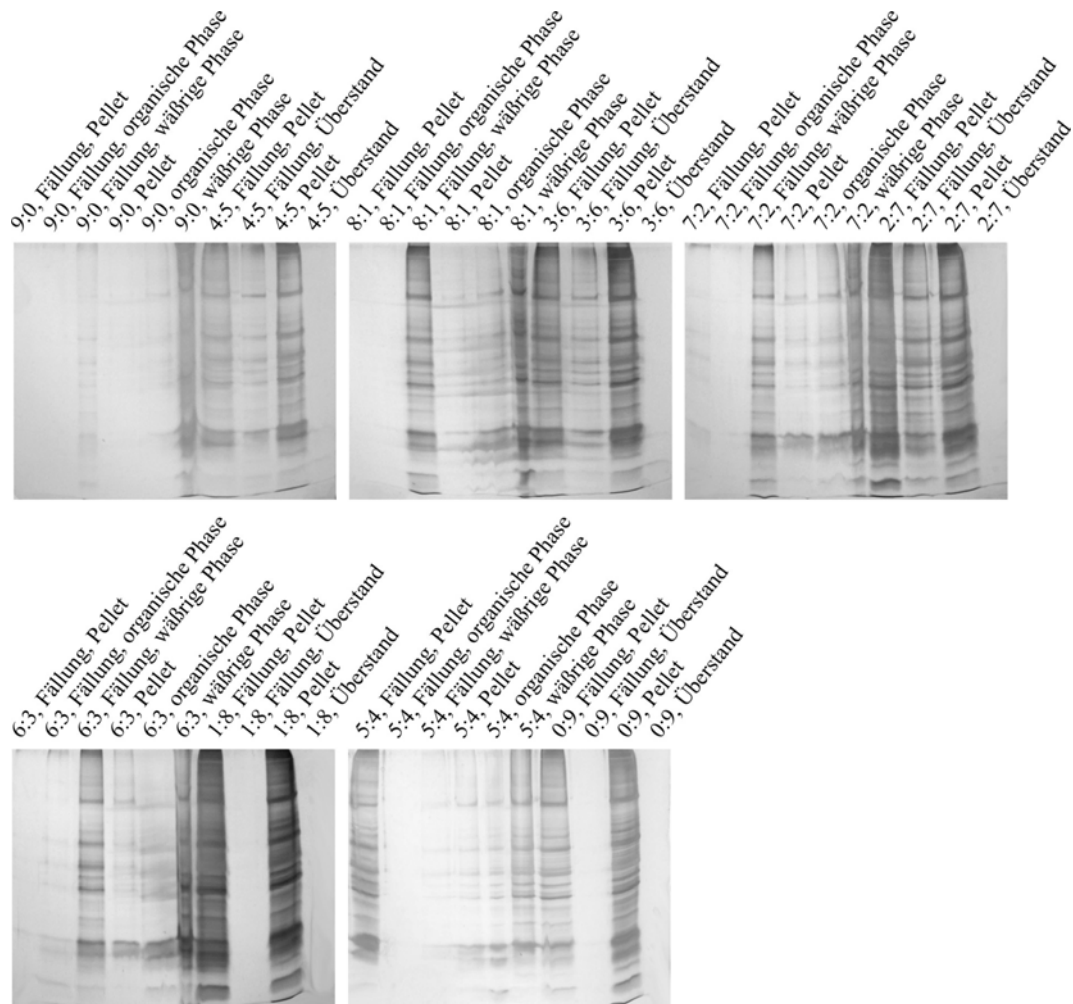


Abb. 59. Chloroform/Methanol-phasenseparierte synaptische Vesikelproteine. Gleiche Volumina der Phasen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per Coomassiefärbung analysiert.

Allen Mischungsverhältnissen zwischen 9:0 und 5:4 ist eigen, daß sie in drei Phasen resultieren (Pellet, organische Unterphase und wäßrige Oberphase). Die Mischungsverhältnisse 4:5 bis 0:9 führen zu einem heterogenen Zweiphasensystem bestehend aus Pellet und Überstand. Ferner läßt sich bei Vergleich der Dreiphasensysteme und der mit Aceton präzipitierten Probe und nicht präzipitierten Probe feststellen, daß bis auf die Ergebnisse für das Mischungsverhältnis 5:4 die Fällung zu Proteinverlusten führt. Besonders ausgeprägt zeigt sich dieser Unterschied bei Vergleich der Pellets und der organischen Phasen. Im Fall der Anwendung 5:4 ist dies nur für die organische Phase gegeben. Auch die wäßrige Phase resultiert nach Anwendung der Präzipitation in einer sehr geringen

Proteinkonzentration. Für die Zweiphasensysteme zeigen sich hinsichtlich der Pellets ähnliche Ergebnisse. Auch hier liegt die Proteinkonzentration der nicht gefällten Probe höher als die der präzipitierten Probe. Die Überstände der Mischungsverhältnisse 4:5, 3:6 und 2:7 weichen von diesem Verhalten ab. In diesem Fall detektiert man in der präzipitierten Probe Protein, während der nicht gefällte Ansatz kein Protein aufweist. Bezüglich der Separationseigenschaften der verschiedenen getesteten Systeme resultieren die Mischungsverhältnisse 9:0, 1:8 und 0:9 in keiner Phasentrennung. Geringe Trennleistungen zeigen die Dreiphasensysteme 8:1, 7:2, 6:3 und 5:4, in denen sich der Großteil an Protein im Pellet detektieren läßt. Die Zweiphasensysteme 4:5, 3:6 und 2:7 weisen für die präzipitierten Proben die beste Phasenseparation aller Systeme auf. Interessanterweise lassen sich für die nicht präzipitierten Proben keine Separationen detektieren. Bezüglich des Proteinmusters verschiedener Phasen sind keine Unterschiede detektierbar. Es sind lediglich Unterschiede in der Proteinkonzentration vorhanden, die jedoch nicht in Änderungen der relativen Abundanz einzelner Proteinbanden resultieren.

3.4.3 ProteoPrep Universal Extraction Kit

Nach Anwendung des Tris-basierenden Systems ist der Großteil der Proteine im Eluat zu detektieren (Abb. 60).

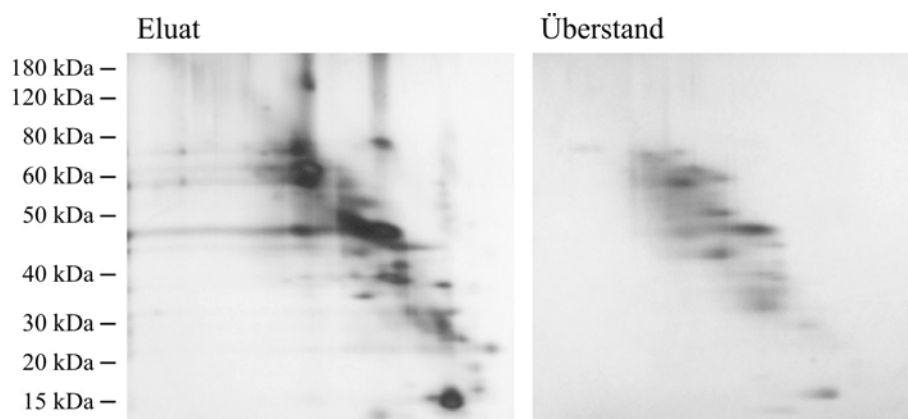


Abb. 60. Tris-basierende Extraktion peripher assoziierter Proteine. Dargestellt sind die Proteinmuster von Eluat und Überstand der mittels BAC/SDS-PAGE aufgetrennter und mit Silber gefärbter Proteine. Pro Gel wurden äquivalente Volumina aufgetrennt.

Die Verteilung der Proteine erstreckt sich über einen Bereich molekularer Masse von 15 kDa bis 80 kDa. Der Bereich molekularer Masse, in dem Proteine im Überstand detektiert werden können, ähnelt dem des Eluats. Allerdings ist die Gesamtkonzentration an Protein hier deutlich geringer. Bei Vergleich der beiden Gele zeigen sich keine nennenswerten Unterschiede im Proteinmuster. Bis auf wenige Ausnahmen bildet der Überstand lediglich ein schwächeres Abbild des Eluats.

3.4.4 ProteoPrep Membrane Extraction Kit

Die Anwendung des Natriumcarbonat-basierenden Systems resultiert im Fall des Eluats in einer Detektion von Proteinen in einem Bereich molekularer Masse von 15 kDa bis ~70 kDa (Abb. 61). Das Muster der Proteinverteilung ähnelt hierbei den bereits beschriebenen Mustern, die über die anderen Techniken erzielt wurden. Im Vergleich zu den anderen Subfraktionierungstechniken läßt sich jedoch nur sehr wenig Protein detektieren. Im Überstand ist kein Protein detektierbar.

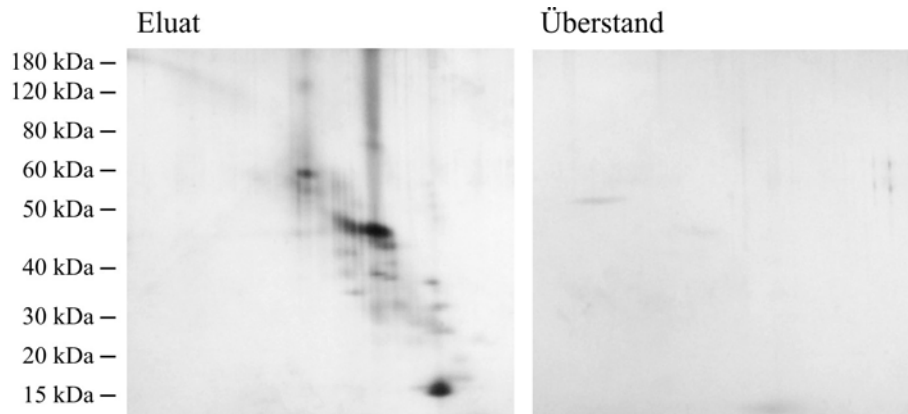


Abb. 61. Natriumcarbonat-basierende Extraktion peripher assoziierter Proteine. Dargestellt sind die Proteinmuster von Eluat und Überstand der mittels BAC/SDS-PAGE aufgetrennten und mit Silber gefärbten Proteine. Pro Gel wurden äquivalente Volumina aufgetrennt.

3.4.5 Phasenseparation mit Digitonin und PEG-6000

Die Elution mit Digitonin und Anwendung von PEG-6000 mit den Fraktionen 18 bis 27 des Saccharosegradienten resultiert in einer Phasentrennung in Pellet und Überstand (Abb. 62). Das detergenzreiche Pellet enthält hierbei den Großteil des für die Trennung eingesetzten Proteins. Der Überstand ist deutlich proteinärmer, weist jedoch leichte Unterschiede im Proteinmuster auf. Die Phasenseparation resultiert für einige Proteine in einer An- bzw. Abreicherung in der entsprechenden Phase.

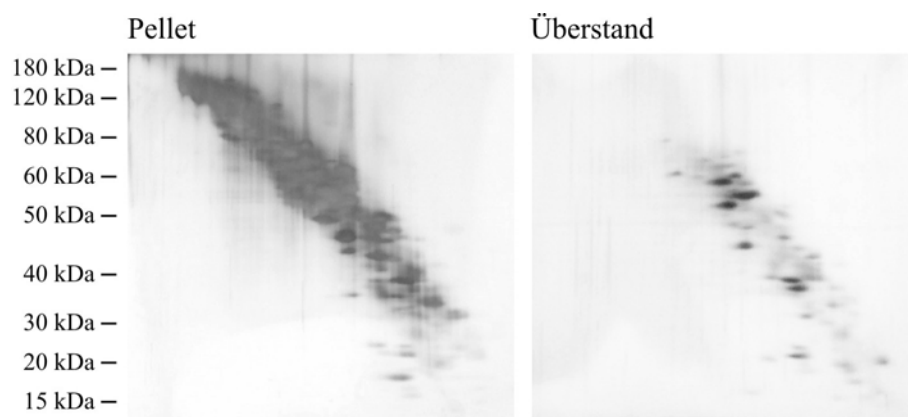


Abb. 62. PEG-6000 induzierte Phasenseparation nach Digitonin-Elution. Dargestellt sind die Proteinmuster von Pellet und Überstand der mittels BAC/SDS-PAGE aufgetrennter und mit Silber gefärbter Proteine. Pro Gel wurden äquivalente Volumina aufgetrennt.

3.4.6 Phasentrennung mit Dodecylmaltosid und PEG-6000 in Anwesenheit von SDS

Die Anwendung von Dodecylmaltosid und PEG-6000 in Kombination mit SDS resultiert in einer Phasentrennung in Pellet und Überstand (Abb. 63). Bei Betrachtung beider Phasen ist ersichtlich, daß lediglich quantitative Unterschiede existieren. Qualitativ sind keine Unterschiede im Proteinmuster detektierbar. Zusätzlich wurden durch Nachelution der Magnetbeads mit NP-40 hohe Konzentrationen an Vesikelproteinen detektiert (Daten hier nicht gezeigt). Die Auflösung der Vesikelmembran durch Dodecylmaltosid ist demnach unzureichend und wird für weitere Arbeiten zugunsten potenterer Detergenzien verworfen.

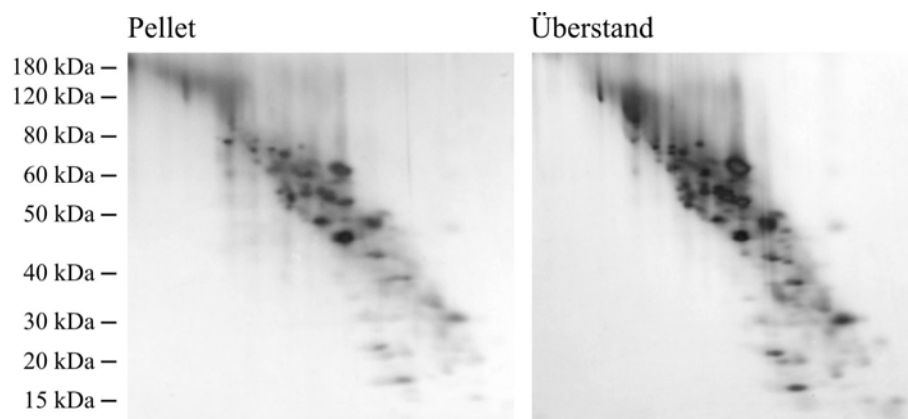


Abb. 63. PEG-6000 induzierte Phasenseparation in Anwesenheit von SDS nach Dodecylmaltosid-Elution. Dargestellt sind die Proteinmuster von Pellet und Überstand der mittels BAC/SDS-PAGE aufgetrennter und mit Silber gefärbter Proteine. Pro Gel wurden äquivalente Volumina aufgetrennt.

3.4.7 Phasentrennung mit NP-40 und PEG-6000 bei pH 7,4

Die mit PEG-6000 in TBS bei pH 7,4 induzierte Phasenseparation NP-40 eluierter Vesikelproteine ist in Abbildung 64 wiedergegeben.

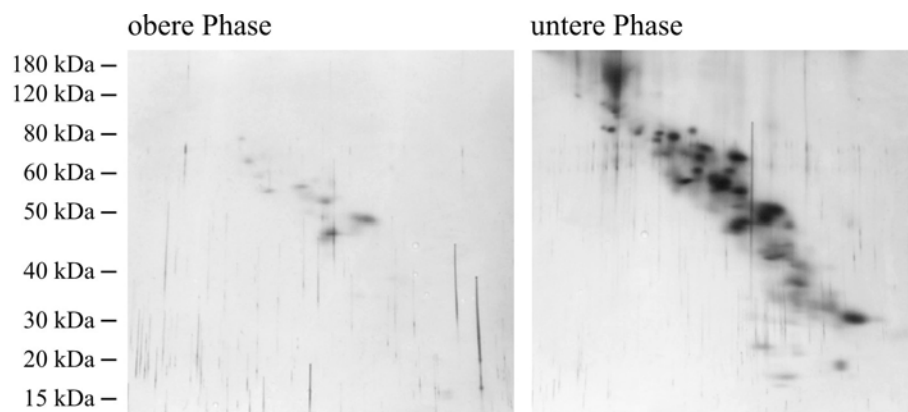


Abb. 64. PEG-6000 induzierte Phasenseparation nach Elution mit NP-40. Dargestellt sind die Proteinmuster der oberen Polymerphase und unteren Detergenzphase der mittels BAC/SDS-PAGE aufgetrennter und mit Silber gefärbter Proteine. Pro Gel wurden äquivalente Volumina aufgetrennt.

Die obere Phase weist hierbei nur Spuren an Protein auf, die in der unteren Detergenzphase ebenfalls detektiert werden können. Die untere Phase ist reich an Protein und zeigt das

charakteristische Muster der gesamten Proteinpopulation synaptischer Vesikel wie sie in den präparativen Ansätzen über BAC/SDS-PAGE beschrieben wurde.

3.4.8 Phasentrennung mit NP-40 und PEG-6000 in Anwesenheit von SDS bei pH 9

Die Änderung des pH-Wertes auf pH 9 und die Einführung des Detergenz SDS unter dessen kritischer Mizellarkonzentration resultiert in den in Abbildung 65 dargestellten Phasen. Die beiden Phasen zeigen insbesondere im Bereich molekularer Masse von 60 bis 120 kDa ausgeprägte Unterschiede. Membranproteine sollten hierbei vorwiegend in der unteren Detergenzphase zu detektieren sein. Unterschiede umfassen das völlige Fehlen bestimmter Proteine in einer der beiden Phasen als auch Ab- und Anreicherungen in einer der Phasen. Der Bereich niedriger molekularer Masse hingegen ist bezüglich des Proteinmusters sehr ähnlich.

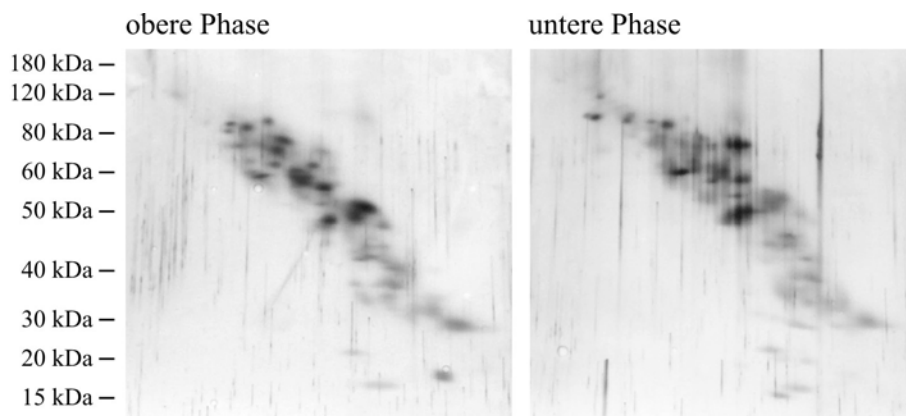


Abb. 65. PEG-6000 induzierte Phasenseparation in Anwesenheit von SDS bei pH 9 nach Elution mit NP-40. Dargestellt sind die Proteinmuster von oberer Polymerphase und unterer Detergenzphase der mittels BAC/SDS-PAGE aufgetrennter und mit Silber gefärbter Proteine. Pro Gel wurden äquivalente Volumina aufgetrennt.

3.4.9 Phasentrennung mit NP-40 und PEG-6000 in Anwesenheit von SDS bei pH 10

Die Änderung des pH-Wertes auf pH 10 und die damit verbundene Einführung weiterer negativer Ladungen, die zu einer erhöhten elektrostatischen Abstoßung zwischen den beiden Phasen führen sollten, resultiert in den in Abbildung 66 gezeigten Phasen.

Die Ergebnisse sind identisch wie die für pH 9 beschriebenen Resultate. Unterschiede im Proteinmuster lassen sich insbesondere für den Bereich hoher molekularer Masse festhalten. Auch dort fehlen einige Proteine in einer der beiden Phasen völlig bzw. zeigen intensive An- und Abreicherungen.

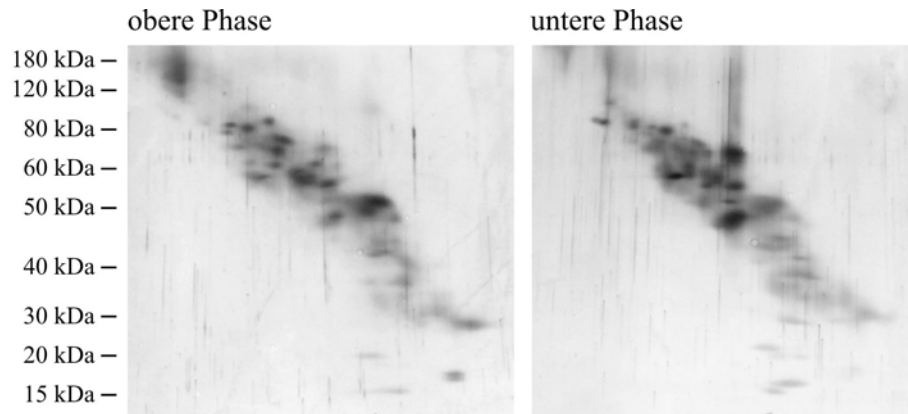


Abb. 66. PEG-6000 induzierte Phasenseparation in Anwesenheit von SDS bei pH 10 nach Elution mit NP-40. Dargestellt sind die Proteinmuster von oberer Polymerphase und unterer Detergenzphase der mittels BAC/SDS-PAGE aufgetrennter und mit Silber gefärbter Proteine. Pro Gel wurden äquivalente Volumina aufgetrennt.

3.5 Massenspektrometrie

3.5.1 Techniken zur Proteinkonzentrierung

Da die Vesikelproteine nach Elution von den Magnetbeads in einem für den Einsatz per Minigelsystem zu hohen Volumen vorliegen, müssen die Proben präzipitiert werden. Verschiedene Methoden stehen hierbei zur Wahl. Welche Methode die effektivste in der Fällung synaptischer Vesikelproteine darstellt, wurde mittels BAC/SDS-PAGE analysiert. Präzipitiert wurde mit Methanol/Chloroform, Ethanol und Aceton. Neben der Präzipitation wurden zusätzlich Proben in einer Vakuumzentrifuge getrocknet sowie mittels Ultrazentrifuge pelletiert (Abb. 67).

Anhand der dargestellten Silberfärbungen ist erkennbar, daß sich die Methanol/Chloroform-Fällung sowie die Einengung in der Vakuumzentrifuge nicht für die Konzentrierung synaptischer Vesikelproteine eignen. Im Fall der Vakuumzentrifuge sind wenige bis keine Proteine mittlerer molekularer Masse zu erkennen. Proteine lassen sich ausschließlich im Bereich niedriger Masse detektieren. Demgegenüber weist die Methanol-Chloroform-Fällung zwar deutlich mehr Proteine auf, ist jedoch weniger zur Präzipitation geeignet als die Aceton- und Ethanol-Fällung sowie die Konzentrierung per Ultrazentrifuge. Vergleicht man diese drei Techniken, so läßt sich ein sehr ähnliches Proteinmuster erkennen. Jedoch ist die Abundanz der Proteine in den mit Aceton und Ethanol gefällten Ansätzen ausgeprägter. Zudem zeigt sich in Bereichen hoher molekularer Masse eine größere Anzahl an Proteinen in der mit Aceton gefällten Probe. Daher wurde diese Präzipitationstechnik im weiteren Verlauf für die Konzentrierung synaptischer Vesikelproteine verwendet.

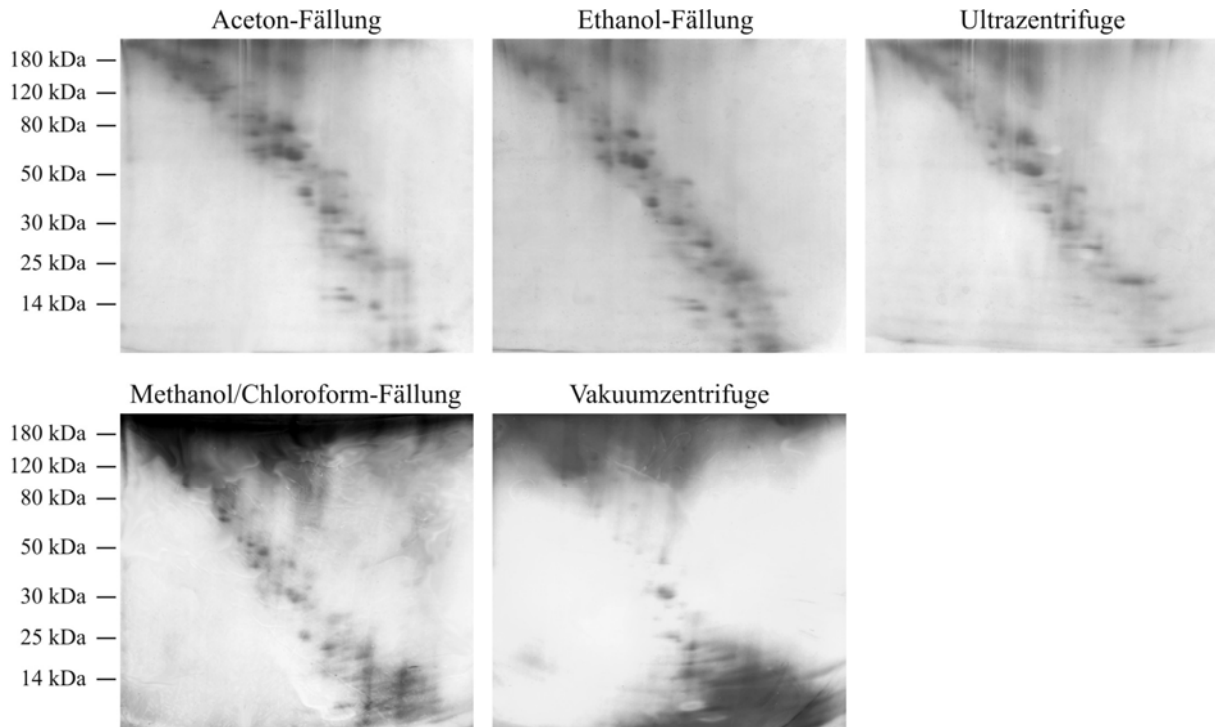


Abb. 67. Vergleichende Darstellung verschiedener Proteinkonzentrierungstechniken (30 μ g Protein Ausgangskonzentration). Gleiche Volumina wurden per BAC/SDS-PAGE aufgetrennt. Analysiert wurden Aceton-, Ethanol und Methanol/Chloroform-Präzipitation sowie Konzentrierungen per Ultra- und Vakuumentrifuge.

Um den Einfluß der Präzipitation auf die Abundanz bestimmter Proteine zu untersuchen, wurden gleiche Volumina gefällter und nicht gefällter Probe untersucht. Ein Vergleich der beiden Ansätze ergibt für die nicht präzipitierte Probe (Abb. 68A) höhere Proteinkonzentrationen als für die mit Aceton gefällte Probe (Abb. 68B). Bei Betrachten des Proteinmusters hat die Fällung jedoch keinen Einfluß auf das relative Vorkommen bestimmter Vesikelproteine. Der Unterschied ist lediglich quantitativer Natur.

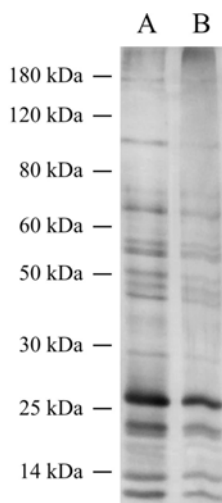


Abb. 68. Vergleich nicht präzipitierter (A) und mit Aceton präzipitierter Probe (B) auf einem SDS-Gel. Aufgetragen wurden gleiche Ursprungsvolumina Proteinsuspension.

3.5.2 Einfluß von Färbemethoden

Ein weiterer kritischer Parameter für eine Proteomanalyse ist die Wahl der Gelfärbemethode. Verschiedene Techniken mit unterschiedlichen Sensitivitäten wie Silber- und Coomassiefärbungen stehen zur Auswahl. Auf Fluoreszenzfärbetechniken wurde aus Gründen des späteren Spotpickens per Hand verzichtet.

Vergleichende Darstellungen für Coomassiefärbungen entsprechend dem Standardprotokoll und dem Protokoll für die kolloidale Coomassiefärbung sind in Abbildung 69 wiedergegeben. Beide Färbungen wurden an Proben des Saccharosegradienten durchgeführt. Zusätzlich sind die Ergebnisse der Silberfärbungen nach Rais *et al.* (2004) und Shevchenko *et al.* (1996) gezeigt. Für die Silberfärbungen wurden lediglich die Fraktionen 5 bis 11 des Saccharosegradienten verwendet, da diese zur Veranschaulichung der Färbetechnik ausreichen. Für die mit Coomassie gefärbten Gele enthalten diese Fraktionen für eine eindeutige Aussage zu geringe Proteinkonzentrationen.

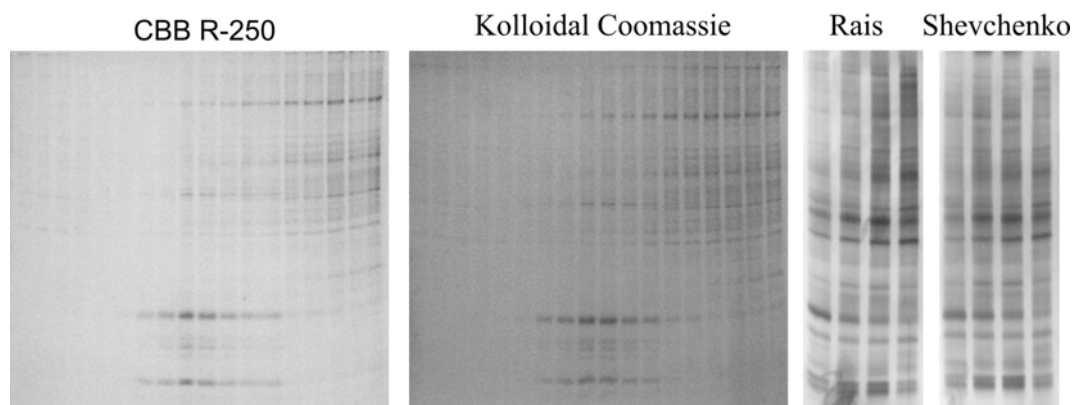


Abb. 69. Vergleichende Darstellung verschiedener Gelfärbemethoden. Für die Färbungen mittels CBB R-250 und Kolloidal Coomassie wurden 5 μ l jeder zweiten Fraktion des Saccharosegradienten analysiert. Für die Silberfärbungen nach Rais *et al.* (2004) und Shevchenko *et al.* (1996) wurden 5 μ l der Gradientenproben 5, 7, 9 und 11 verwendet.

Die Analysen der Färbetechniken lassen den Schluß zu, daß die Sensitivität der Standardfärbung mit Coomassie und die der kolloidalen Coomassiefärbung gleichzusetzen ist. Leichte Unterschiede lassen sich ausschließlich in der Intensität sehr schwacher Banden finden, die in der kolloidalen Technik ausgeprägter sind. Erwartungsgemäß zeigen die Silberfärbungen eine höhere Sensitivität als die Färbungen mit Coomassie. Die beiden mit der Massenspektrometrie kompatiblen Färbetechniken mit Silber sind hierbei annähernd identisch. Da die Färbung nach Rais *et al.* jedoch im Bereich höherer molekularer Masse leicht höhere Intensitäten aufweist und zudem schneller durchzuführen ist, wird diese Technik im Folgenden verwendet.

Um zu überprüfen, ob die Silberfärbung bei einer massenspektrometrischen Analyse hinderlich ist und wie unterschiedlich die Proteinmuster synaptischer Vesikelproteine nach Anfärbung mit Silber und Coomassie sind, wurden gleiche Konzentrationen immungereinigter Fraktionen 12 bis 27 des Saccharosegradienten mittels BAC/SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Ausschneiden identischer Spots mit Trypsin verdaut und analysiert (Abb. 70).

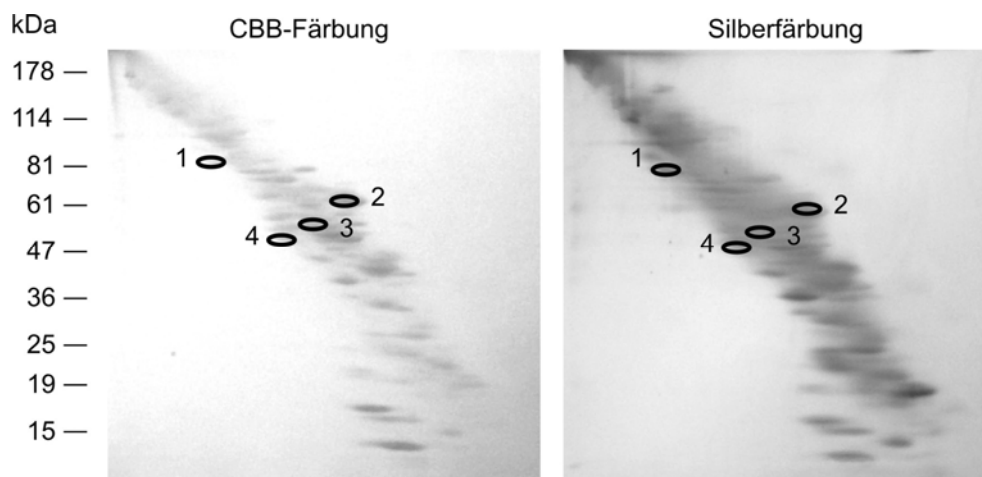


Abb. 70. Immungereinigte synaptische Vesikelproteine der Fraktionen 12 bis 27. Pro Gel wurden 100 µg Protein mittels BAC/SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie oder Silber gefärbt.

Die Analyse der Proteinspots ergibt die in Tabelle 16 beschriebenen Identifikationen. Für beide Färbetechniken wurden jeweils die gleichen Proteine identifiziert. Unterschiede liegen in der Sequenzabdeckung, die ausgehend von den mit Coomassie gefärbten Proben in allen vier Fällen höher liegt als die der mit Silber gefärbten Proben. Insgesamt wurden ausschließlich lösliche Proteine identifiziert. Da hier bereits ein Einfluß durch die Färbetechnik vorhanden und nicht absehbar ist, wie dies bei Membranproteinen Einfluß nimmt und zudem das Proteinmuster beider Gele keine nennenswerten Unterschiede zeigt, wird im Folgenden für massenspektrometrische Analysen ohne Ausnahme die Coomassiefärbung eingesetzt.

Spot	Färbung	Protein	Score	Sequenzabdeckung	Mr
1	CBB R-250	vATPase V ₁ Untereinheit A	248	61%	68564
1	Silber	vATPase V ₁ Untereinheit A	193	58%	68564
2	CBB R-250	β-Tubulin	210	69%	50255
2	Silber	β-Tubulin	224	59%	50255
3	CBB R-250	GAPDH	196	66%	36090
3	Silber	GAPDH	163	61%	36090
4	CBB R-250	FBP Aldolase A	197	73%	39652
4	Silber	FBP Aldolase A	191	66%	39652

Tabelle 16. Proteinidentifizierungen der mit Silber und Coomassie gefärbten Gele aus Abbildung 70.

3.5.3 Verdau in Lösung

Immungereinigte synaptische Vesikelproteine wurden einem tryptischen und chymotryptischen Verdau in Lösung unterzogen. Aufgrund der Komplexität der Probe und der unzureichenden Auflösung einzelner Proteine wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt. Nach massenspektrometrischer Analyse lassen sich nur die in hohen Konzentrationen vorliegenden Proteine detektieren. Die Signale der in niedrigen Konzentrationen vorliegenden Proteine werden durch die Signale der hoch abundanten Proteine überlagert und können daher nicht aufgelöst werden (Daten nicht gezeigt).

3.5.4 BAC/SDS-PAGE

Für die Proteomanalyse synaptischer Vesikel mittels BAC/SDS-PAGE wurden 300 µg Protein elektrophoretisch separiert (Abb. 71). Nach Färbung des Gels mit Coomassie Brilliant Blue sind Proteine zwischen 10 und 120 kDa detektierbar, die auf einer Diagonalen zu liegen kommen. Ferner läßt sich im Bereich höherer molekularer Masse eine Anfärbung erkennen, die sehr diffus und unzureichend aufgelöst ist.

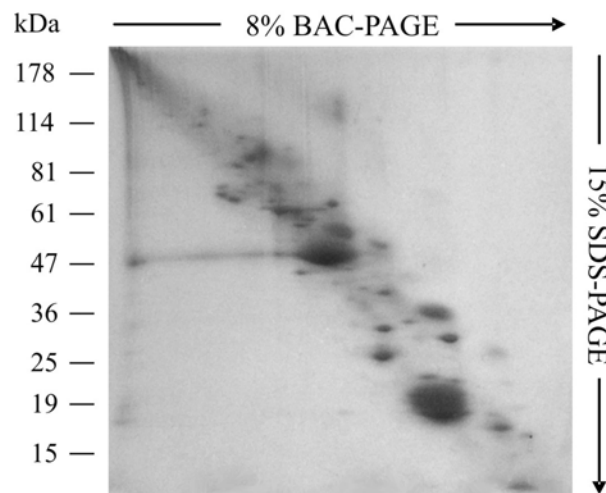


Abb. 71. Präparatives BAC/SDS-Gel für eine Analyse mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie. 300 µg Protein wurden elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Applikation dieses Systems in Kombination mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie resultiert in der Auswahl von 161 Proteinspots, die nach tryptischem Verdau massenspektrometrisch analysiert wurden. Vier Prozent der Spots konnten nicht signifikant identifiziert werden. Die Proteinidentifikationen sind in Tabelle 17 wiedergegeben und gemäß ihrer Lokalisation und/oder Funktion in folgende Klassen sortiert: integrale Vesikelproteine, vesikelassoziierte Proteine, endozytototische Proteine, Zytoskelettproteine, G-Proteine, Chaperone, metabolische Enzyme, neue Proteine und putative Kontaminationen, die in

Plasmamembrankonstituenten, mitochondriale und andere, weiter nicht definierte Verunreinigungen eingeteilt sind.

Protein	Zugangsnummer / Datenbankquelle	Score	Sequenz- Abdeckung	Anzahl zu- geordneter Peptide	Gravy Score (Protein)	Relative molekulare Masse (Da)	pI	Gel- Systeme
Integrale synaptische Vesikelproteine:								
SV2	pir A43344	80	24%	22	0,022	83406	5,37	3
Ssynaptophysin	spt P07825	53	24%	4	-0,09	33574	4,91	3
Synaptotagmin I	rf XP_343206.1	190	50%	8	-0,472	50541	8,96	3
Synaptotagmin II	spt P29101	71	34%	18	-0,514	47692	8,18	2
Syntaxin 1B2	rf NP_036832.1	125	45%	17	-0,694	33452	5,25	2
VAMP-2	rf NP_036795.1	98	71%	12	0,004	12740	7,85	2
vATPase V ₀ Untereinheit a1	spt P25286	227	32%	23	0,025	97063	6,04	3
vATPase V ₀ Untereinheit d	rf XP_214672.2	250	48%	29	-0,032	54479	5,3	3
vATPase V ₁ Untereinheit A1	rf XP_340988.1	185	50%	26	-0,19	68564	5,42	3
vATPase V ₁ Untereinheit B2	rf NP_476561.1	327	77%	7	-0,176	56857	5,57	3
vATPase V ₁ Untereinheit C	rf XP_216940.2	220	56%	18	-0,305	44044	7,02	2
vATPase V ₁ Untereinheit D	rf XP_216742.1	90	56%	14	-0,453	28291	9,44	3
vATPase V ₁ Untereinheit E1	rf XP_216251.1	137	73%	17	-0,523	26184	8,44	3
vATPase V ₁ Untereinheit G2	trm Q8R2H0	94	65%	16	-1,143	13716	10,25	2
ZnT-3	rf XP_345643.1	112	35%	17	0,169	46873	6,42	2
Vesikelassoziierte Proteine:								
rab1A	spt P05711	116	55%	13	-0,294	22977	5,95	3
rab1B	rf XP_229035.1	140	77%	16	-0,305	22334	5,55	3
rab2A	spt P05712	78	55%	13	-0,377	23692	6,08	2
rab3A	sp P05713	174	72%	15	-0,49	25182	4,86	3
rab3B	spt Q63941	89	39%	13	-0,329	24997	4,85	2
rab3C	dbj BAA11302.1	128	57%	14	-0,523	26084	5,1	3
rab6B	rf XP_343460.1	88	61%	14	-0,003	23561	5,41	3
rab11A	rf NP_112414.1	174	69%	21	-0,421	24492	6,12	2
rab11B	trm Q9ET14	176	61%	20	-0,435	24588	5,64	2
rab14	pir E42148	164	77%	19	-0,408	24078	5,85	3
rab18	rf XP_225453.1	50	36%	8	-0,308	23247	5,11	2
Rabphilin-3A	spt P47709	115	40%	17	-0,869	76640	8,55	2
Synapsin I	spt P09951	216	40%	21	-0,575	74114	9,81	3
Synapsin Ib	gb AAA42148.1	142	47%	24	-0,571	70038	9,84	2
Synapsin II	spt Q63537	155	38%	17	-0,449	63702	8,73	3
Syntaxin binding protein 1	rf NP_037170.1	133	47%	29	-0,41	67925	6,49	2
Endozytose:								
AP2 alpha 1	rf XP_218624.2	138	35%	33	-0,063	104929	6,27	3
AP2 alpha 2	spt P18484	106	37%	31	-0,095	104760	6,54	3
AP2 beta	pir C35553	124	33%	33	-0,095	105398	5,22	3
AP2 mu	pdb 1GW5_M	146	41%	26	-0,246	50006	9,6	2
Clathrin heavy chain	spt P11442	82	27%	42	-0,24	193187	5,5	3
Dynamamin-1	spt P21575	229	47%	47	-0,525	96209	6,32	3
NSF	trm Q9QUL6	107	34%	29	-0,22	83170	6,55	3
Zytoskelett:								
Aktin beta	pir S11222	160	57%	25	-0,2	42108	5,31	3
Alpha-Internexin	spt P23565	313	72%	42	-0,649	56253	5,2	3
NF triplet M protein	rf NP_058725.1	142	38%	35	-1,182	95706	4,76	3
Tubulin alpha 1	gb AAH60572.1	122	47%	21	-0,23	50804	4,94	3
Tubulin beta 2	gb AAH60597.1	114	46%	25	-0,357	50225	4,79	2
Tubulin beta 15	rf XP_346523.1	150	48%	27	-0,4	50361	4,79	2
G-Proteine:								
GAP1 like	spt Q9Z268	71	27%	22	-0,319	90285	5,95	
Metabolische Enzyme:								
2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase	trm Q64575	193	59%	25	-0,443	47638	9,03	3
Fructose Bisphosphat Aldolase A	spt P05064	74	49%	15	-0,279	39656	8,39	3
GAPDH	trm Q9QWU4	208	77%	27	-0,089	36090	8,14	3
Glutamin Synthetase	spt P09606	207	44%	24	-0,595	42982	6,64	3
L-Lactat Dehydrogenase A	spt P04642	79	36%	20	0,064	36712	8,45	3
MAPK1	rf NP_446294.1	98	35%	20	-0,293	41648	6,5	2
Pyruvat Kinase, M2 Isozym	spt P11981	107	41%	24	-0,094	58183	7,4	3
Neue Proteine:								
I200015A19Rik protein	trm Q9DBS2	67	45%	10	-0,222	30023	6,92	3
Putative Kontaminationen:								
Plasmamembran:								
Myelin basic protein	emb CAA10804.1	36	46%	6	-1,116	14184	11,75	3
Na,K-ATPase beta 1	spt P07340	30	22%	7	-0,548	35578	8,83	2
Mitochondriale Proteine:								
Aspartat Transaminase Precursor, mitoch.	spt P00507	166	41%	28	-0,23	47683	9,13	2
Creatin Kinase, mitochondrial I	rf XP_342506.1	86	29%	12	-0,422	43064	8,74	3

Proteinverteilung im Bereich molekularer Masse wie bereits für die BAC/SDS-PAGE beschrieben wurde (Abb. 73). Die Proteine zeigen jedoch ab 200 kDa systembedingt eine schlechte Auflösung.

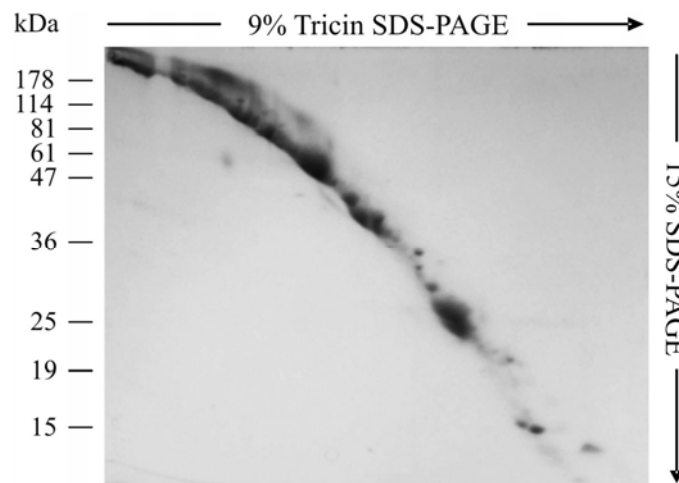


Abb. 73. Präparatives dSDS-Gel für eine Analyse mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie. 300 µg Protein wurden elektrophoretisch aufgetrennt.

117 Proteinspots wurden ausgeschnitten und nach tryptischem Verdau mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert. Vier Prozent der ausgeschnitten Spots konnten nicht signifikant identifiziert werden. Die Proteinidentifikationen sind in Tabelle 18 wiedergegeben und gemäß ihrer Lokalisation und/oder Funktion in folgende Klassen sortiert: integrale Vesikelproteine, vesikelassoziierte Proteine, endozytotische Proteine, Zytoskelettproteine, G-Proteine, Chaperone, metabolische Enzyme, neue Proteine und putative Kontaminationen, die in Plasmamembrankonstituenten, mitochondriale und andere, weiter nicht definierte Verunreinigungen eingeteilt wurden.

Protein	Zugangsnummer / Datenbankquelle	Score	Sequenz- Abdeckung	Anzahl zu- geordneter Peptide	Gravy Score (Protein)	Relative molekulare Masse (Da)	pI	Gel- Systeme
Integrale synaptische Vesikelproteine:								
SV2	spt Q02563	81	26%	15	0,022	83393	5,37	3
SV2B	trm Q63564	52	15%	11	0,079	78249	5,4	2
Synaptogyrin I	prf 2205313A	22	13%	3	0,009	25953	4,49	2
Synaptophysin	spt P07825	46	21%	9	-0,09	33574	4,91	3
Synaptotagmin I	rf XP_343206.1	66	33%	8	-0,472	50541	8,96	3
Synaptotagmin XII	spt P97610	42	23%	9	-0,185	46636	5,54	2
Syntaxin 1A	gb AAA42195.1	68	41%	11	-0,591	32844	5,54	2
Syntaxin 1B2	rf NP_036832.1	54	33%	10	-0,694	33452	5,25	2
VAMP-1	trm Q8CH14	92	62%	10	-0,309	12664	6,26	2
VAMP-B	spt Q9Z269	28	28%	5	-0,325	27127	7,64	
vATPase V ₀ Untereinheit a1	spt P25286	171	31%	30	0,025	97063	6,04	3
vATPase V ₀ Untereinheit c	rf NP_570836.1	34	51%	8	1,075	15798	9,1	
vATPase V ₀ Untereinheit d	rf XP_214672.2	165	43%	18	-0,032	54479	5,3	3
vATPase V ₁ Untereinheit A1	rf XP_340988.1	111	37%	20	-0,19	68564	5,42	3
vATPase V ₁ Untereinheit B2	rf NP_476561.1	65	36%	12	-0,176	56857	5,57	3
vATPase V ₁ Untereinheit D	rf XP_216742.1	158	57%	18	-0,453	28291	9,44	3
vATPase V ₁ Untereinheit E1	rf XP_216251.1	177	69%	25	-0,523	26184	8,44	3
vATPase V ₁ Untereinheit F	spt P50408	168	73%	11	-0,258	13362	5,52	2
vATPase V ₁ Untereinheit G2	trm Q8R2H0	96	64%	10	-1,143	13716	10,25	2
vATPase V ₁ Untereinheit H	rf XP_216326.2	39	38%	9	-0,344	35228	5,83	2
vGat	spt O35458	128	35%	18	0,464	58339	6,19	2

vGlut1	trm Q62634	50	16%	12	0,225	62310	6,96	2
SCAMP 1	spt P56603	106	37%	10	-0,073	38373	7,62	2
SCAMP 3	rf XP_342280.1	34	22%	5	0,042	38743	6,33	2
SCAMP 5	trm Q91KE3	30	19%	4	0,4	26366	8,8	2
Reticulon 1	gb AAC53045.1	102	39%	10	0,405	23657	9	2
Reticulon 4	gb AAF01564.1	77	27%	7	0,371	22389	9,4	2
Vesikelassoziierte Proteine:								
rab1A	spt P05711	74	50%	9	-0,294	22977	5,95	3
rab1B	rf XP_229035.1	76	53%	8	-0,305	22334	5,55	3
rab2B	rf XP_223991.1	54	35%	9	-0,355	24355	6,31	
rab3A	rf NP_037150.1	58	42%	7	-0,465	25198	4,86	3
rab3C	dbj BAA11302.1	38	39%	7	-0,523	26084	5,1	3
rab5C	rf XP_213463.1	46	44%	7	-0,309	23639	8,64	2
rab14	rf NP_446041.1	109	67%	15	-0,411	24140	5,85	3
rab30	rf XP_218916.1	33	33%	5	-0,236	23386	4,91	
β -SNAP	rf XP_345448.1	44	33%	8	-0,315	39397	5,81	
Synapsin I	spt P09951	215	55%	25	-0,575	74114	9,81	3
Synapsin Ib	gb AAA42148.1	151	52%	11	-0,571	70038	9,84	2
Synapsin II	spt Q63537	113	48%	19	-0,449	63702	8,73	3
Synapsin IIb	pir D30411	36	31%	6	-0,299	52822	7,62	
Thy1 antigen	prf 0902236A	48	37%	6	-0,307	14019	9,45	2
Endozytose:								
AP2 alpha 1	rf XP_218624.2	172	43%	28	-0,063	104929	6,27	3
AP2 alpha 2	spt P18484	163	40%	28	-0,095	104760	6,45	3
AP2 beta	pir C35553	110	25%	21	-0,095	105398	5,22	3
Clathrin assembly protein AP180	spt Q05140	36	16%	13	-0,095	93745	4,76	2
Clathrin coat assembly protein AP17	rf XP_346535.1	52	35%	8	-0,052	17178	5,82	
Clathrin heavy chain	spt P11442	140	26%	32	-0,24	193187	5,5	3
Dynamin-1	spt P21575	92	35%	18	-0,525	96209	6,32	3
EH-domain containing 1	rf XP_215154.2	39	17%	9	-0,339	62939	6,35	
NSF	trm Q9QUL6	175	43%	30	-0,22	83170	6,55	3
Zytoskelett:								
Aktin beta	rf NP_112406.1	137	64%	21	-0,2	42052	5,29	3
ARP2/3 Untereinheit 2	rf XP_217432.2	205	75%	23	-0,439	34440	6,84	
ARP2/3 Untereinheit 4	rf XP_238365.2	34	23%	4	-0,133	19768	8,53	
Alpha-Internexin	spt P23565	176	49%	23	-0,649	56253	5,2	3
NF triplet M protein	spt P12839	212	33%	26	-1,189	95717	4,77	3
E-STOP protein	trm O88748	86	35%	13	-1,112	70807	9,68	
Tubulin alpha 1	gb AAH60572.1	74	37%	12	-0,23	50804	4,94	3
Tubulin beta 2	spt P05217	146	51%	27	-0,362	50255	4,79	2
Tubulin beta 15	spt P04691	117	38%	6	-0,408	50387	4,79	2
G-Proteine:								
v-ral simian leukemia viral oncogene homolog A (ral A)	rf NP_112355.1	61	40%	9	-0,621	23709	6,66	2
Chaperone:								
Calnexin Precursor	spt P35565	80	21%	12	-0,896	67612	4,49	
Hitzeschockprotein 8	rf NP_077327.1	141	36%	21	-0,452	71055	5,37	
Hitzeschockprotein HSP 90-beta (HSP 84)	spt P34058	34	17%	10	-0,684	83475	5,06	
Metabolische Enzyme:								
Aldose reductase-like protein	trm Q91W30	41	15%	5	-0,379	36510	7,08	
Chromaffine granule ATPase II homolog	rf XP_223390.2	38	20%	10	-0,103	69263	5,97	2
2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase	trm Q64575	179	54%	23	-0,443	47638	9,03	3
Cyclin-abhängige Kinase 6	rf XP_342639.1	30	11%	5	-0,475	57481	8,42	
Fructose Bisphosphat Aldolase A	spt P05065	70	47%	13	-0,279	39652	8,39	3
GAPDH	trm Q9QWU4	91	46%	17	-0,089	36090	8,14	3
Glutamin Synthetase	rf NP_058769.1	91	39%	15	-0,598	43001	6,83	3
L-Lactat Dehydrogenase A	spt P06151	82	44%	14	0,064	36686	7,77	3
MAPK1	rf NP_446294.1	197	52%	19	-0,293	41648	6,5	2
Monoglycerid Lipase	trm Q8R431	100	49%	13	-0,013	33820	6,92	2
Pyruvat Kinase, M2 Isozym	spt P11981	53	30%	13	-0,094	58183	7,4	3
Neue Proteine:								
I200015A19Rik protein	trm Q9DBS2	100	52%	8	-0,222	30023	6,92	3
Da1-10	trm Q7TP09	39	24%	7	-0,774	45306	5	
Hypothetisches Protein DKFZp566N034	rf XP_341115.1	85	28%	12	0,384	34535	8,65	2
Hypothetisches Protein	rf XP_342338.1	58	15%	15	-0,155	171034	7,38	
KIAA0587 Protein	rf XP_230038.2	64	15%	14	-0,105	127757	6,22	
Leucine zipper domain protein	rf XP_213213.2	144	51%	9	-0,102	32413	8,32	
Putative Kontaminationen:								
Plasmamembran:								
Contactin Precursor	spt Q63198	172	34%	27	-0,309	114278	5,77	
Myelin basic protein	trm Q8R4K6	138	61%	14	-1,101	17230	10,88	3
Na,K-ATPase alpha3	spt P06687	30	14%	11	-0,007	113045	5,26	2
Mitochondriale Proteine:								
Creatin Kinase, mitochondrial 1	rf XP_342506.1	105	41%	13	-0,422	43064	8,74	3
Andere:								
Brain acid soluble protein 1	spt Q05175	53	57%	5	-1,151	21646	4,5	
Interleukin enhancer binding factor 2	rf XP_227385.2	42	35%	6	-0,172	30994	4,85	
Matrin 3	rf XP_212889.2	80	27%	18	-0,936	94957	5,87	2
NADPH-Cytochrom P450 Reduktase	spt P00388	243	52%	33	-0,436	77182	5,3	
Postsynaptic density protein	trm Q9QX19	30	10%	16	-0,765	187578	6,32	

Analysen eingefügt worden. Schwarze Angaben beziehen sich hierbei auf Proteine, die ausschließlich über Massenspektrometrie identifiziert wurden, während in rot die Proteine gekennzeichnet sind, die nach MS und Immunanalyse in einer überlappenden Identifizierung resultierten. Nicht signifikante, aber dennoch möglicherweise an synaptischen Vesikeln vorhandene Proteine, sind in blau wiedergegeben. Teilweise konnten diese Proteine durch Immunanalysen bestätigt werden. In orange ist zusätzlich die Lage der beiden Proteine wiedergegeben, die für eine weitere Charakterisierung ausgewählt wurden.

Anhand Abbildung 74 ist erneut ersichtlich, daß besonders hydrophobe Proteine über der Diagonalen zu liegen kommen. Hierzu zählen die α 1-Untereinheit der Protonenpumpe, SV2, vGlut1, vGat, DKFZp566N034 und die c-Untereinheit der Protonenpumpe als hydrophobstes Protein.

3.5.6 Eindimensionale SDS-PAGE

Für die eindimensionale gelelektrophoretische Analyse wurden 300 μ g Vesikelprotein über ein 15%iges SDS-Gel aufgetrennt (Abb. 75). Die mit Coomassie Brilliant Blue angefärbte Spur wurde in 238 horizontale Abschnitte gleicher Größe zerteilt, die nach tryptischem Verdau der massenspektrometrischen Analyse zugeführt wurden.

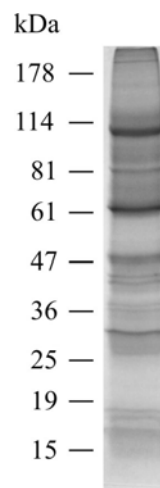


Abb. 75. Präparatives eindimensionales SDS-Gel für eine Analyse mittels nano-LC ESI-MS/MS. 300 μ g Protein wurden elektrophoretisch aufgetrennt.

Proteinidentifizierungen nach Auswertung über MALDI-TOF-MS führten zu keinen zufriedenstellenden Ergebnissen. Der Großteil der Proteine wurde als Gemisch identifiziert, worunter insbesondere die signifikante Identifizierung niedrig abundanter und hydrophober Proteine litt. Der mangelnden Separation durch die eindimensionale Elektrophorese wurde

durch Anwendung einer weiteren Trennung der Peptide mittels nano-Flüssigkeitschromatographie Rechnung getragen.

Die Proteinidentifikationen nach Anwendung der Electrospray-Massenspektrometrie sind in Tabelle 19 wiedergegeben und wurden gemäß Lokalisation und/oder Funktion in folgende Klassen sortiert: integrale Vesikelproteine, vesikelassoziierte Proteine, endozytotische Proteine, Zytoskelettproteine, G-Proteine, Chaperone, metabolische Enzyme, neue Proteine und putative Kontaminationen, die in Plasmamembranbestandteilen, mitochondriale und andere weiter nicht definierte Verunreinigungen eingeteilt wurden.

Protein	Zugangsnummer / Datenbankquelle	Score	Sequenz- Abdeckung	Anzahl zu- geordneter Peptide	Gravy Score (Protein)	Relative molekulare Masse (Da)	pI	Gel- Systeme
Integrale synaptische Vesikelproteine:								
SV2	spt Q02563	656	21%	15	0,0216	83392	5,37	3
SV2A	trm Q9JIS5	275	11%	21	0,022	82647	5,37	
SV2B	trm Q63564	643	26%	17	0,079	78249	5,4	2
Synaptogyrin 1	spt Q62876	143	10%	11	-0,006	25880	4,49	2
Synaptogyrin 3	rf XP_220220.2	238	23%	7	0,292	24725	7,63	
Synaptophysin	spt P07825	256	19%	12	-0,09	33574	4,91	3
Synaptotagmin I	spt P21579	767	40%	63	-0,43	47885	8,26	3
Synaptotagmin II	rf NP_796376.2	420	19%	9	-0,514	47692	8,18	2
Synaptotagmin V	spt P47861	79	6%	2	-0,38	43385	9,43	
Synaptotagmin XII	spt P97610	355	18%	7	-0,185	46636	5,54	2
Syntaxin 1A	gb AAB22526.1	605	32%	9	-0,591	32844	5,54	2
VAMP-1	trm Q8CH14	164	39%	8	-0,309	12664	6,26	2
VAMP-2	rf NP_036795.1	334	43%	7	0,004	12740	7,85	2
vATPase V ₀ Untereinheit a1	spt P25286	1163	34%	37	0,025	97063	6,04	3
vATPase V ₀ Untereinheit d	rf XP_214672.2	627	38%	78	-0,093	54479	5,3	3
vATPase V ₁ Untereinheit A1	rf XP_340988.1	1095	44%	29	-0,19	68564	5,42	3
vATPase V ₁ Untereinheit B2	rf NP_476561.1	1152	55%	23	-0,176	56857	5,57	3
vATPase V ₁ Untereinheit C	rf XP_216940.2	651	31%	14	-0,305	44044	7,02	2
vATPase V ₁ Untereinheit D	rf XP_216742.1	317	42%	7	-0,453	28291	9,44	3
vATPase V ₁ Untereinheit E1	rf XP_216251.1	709	35%	13	-0,523	26184	8,44	3
vATPase V ₁ Untereinheit F	spt P50408	170	28%	6	-0,258	13362	5,52	2
vATPase V ₁ Untereinheit H	trm Q8BVE3	661	32%	16	-0,38	56275	6,18	2
vGat	spt O35458	387	12%	6	0,464	58339	6,19	2
vGlut1	trm Q62634	440	16%	10	0,2252	62310	6,96	2
vGlut2	trm Q9J112	98	11%	3	0,107	65218	6,4	
ZnT-3	rf XP_345643.1	307	12%	5	0,169	46873	6,42	2
SCAMP 1	spt P56603	276	18%	4	-0,073	38373	7,62	2
SCAMP 3	rf XP_342280.1	171	8%	3	0,042	38743	6,33	2
SCAMP 5	trm Q9JKD3	96	20%	8	0,41	26336	8,8	2
Reticulon 1	spt Q64548	312	15%	7	-0,377	83350	4,53	2
Reticulon 3b	trm Q8VBU0	95	8%	2	0,502	25529	8,66	
Reticulon 4	spt Q9JK11	390	12%	8	-0,406	126766	4,41	2
NTT4	gb AAB24776.1	135	15%	7	0,321	81801	6,01	
Vat1 protein	rf XP_213484.2	242	17%	4	-0,048	43319	6,17	
Vesikelassoziierte Proteine:								
CaMKII alpha	spt P11275	333	17%	6	-0,386	54651	6,61	
Cystein String Protein	rf NP_077075.1	124	37%	10	-0,483	22885	4,93	
rab1	trm Q7TPK7	359	28%	9	-0,522	33985	9,72	
rab1A	rf XP_229263.2	73	18%	6	-0,088	22991	5,93	3
rab1B	rf XP_229035.1	315	42%	8	-0,305	22334	5,55	3
rab1C	rf NP_937806.1	195	21%	4	-0,473	23296	8,52	
rab2A	spt P05712	286	38%	7	-0,377	23692	6,08	2
rab3A	sp P05713	552	46%	12	-0,49	25182	4,86	3
rab3B	spt Q63941	222	24%	6	-0,329	24997	4,85	2
rab3C	dbj BAA11302.1	349	35%	7	-0,523	26084	5,1	3
rab4A	gb AAH62016.1	71	18%	6	-0,313	24678	5,82	
rab5	trm O88565	328	33%	7	-0,417	23828	8,32	
rab5B	rf XP_213824.2	293	17%	5	-0,265	35216	6,6	
rab5C	rf XP_213463.1	384	42%	8	-0,309	23639	8,64	2
rab6	rf XP_344926.1	223	27%	6	-0,358	26712	5,46	

rab7	pir S01934	438	39%	8	-0,341	23075	5,21	
rab8	trm Q8K3X5	88	9%	7	-0,463	23058	9,47	
rab10	pir B42148	319	27%	7	-0,346	22827	8,26	
rab11A	rf NP_112414.1	160	14%	3	-0,421	24492	6,12	2
rab11B	trm Q9ET14	359	33%	8	-0,435	24588	5,64	2
rab14	pir E42148	393	45%	8	-0,408	24078	5,85	3
rab16	pir G42148	110	28%	3	-0,295	22249	5,53	
rab18	rf XP_225453.1	105	16%	3	-0,308	23247	5,11	2
rab33B	rf XP_345209.1	93	9%	2	-0,232	26192	7,62	
Rabconnectin-3β	trm Q9ERH3	507	10%	11	-0,085	165595	6,58	
Rabphilin-3A	spt P47709	315	15%	7	-0,869	76640	8,55	2
Septin 2	trm Q91Y81	77	7%	2	-0,539	41737	6,15	
Septin 5	rf XP_359275.1	165	17%	5	-0,609	44244	6,21	
Septin 7	spt Q9WVC0	248	16%	7	-0,781	50818	8,82	
Septin 11	rf XP_223227.2	83	4%	2	-0,56	59136	6,47	
SNAP-25	rf NP_112253.1	116	20%	3	-0,865	23228	4,66	
Synapsin I	spt P09951	888	42%	20	-0,575	74114	9,81	3
Synapsin II	spt Q63537	249	23%	7	-0,449	63702	8,73	3
Syntaxin-binding protein 1	gb AAA96350.1	889	33%	17	-0,414	69091	6,32	2
Thy1 antigen	prf O902236A	121	29%	3	-0,307	14019	9,45	2
Endozytose:								
AP2 alpha 1	spt P17426	557	17%	14	-0,075	108679	6,63	3
AP2 alpha 2	gb AAH58099.1	170	12%	7	-0,093	104849	6,4	3
AP2 beta	rf XP_214419.2	153	6%	5	-0,067	105088	5,16	3
AP2 mu	rf NP_446289.1	483	28%	14	-0,246	49965	9,57	2
AP2-associated kinase	rf XP_232172.2	152	6%	4	-0,297	63195	5,63	
Clathrin assembly protein AP180	pir S36326	254	11%	7	-0,094	91601	4,75	2
Clathrin heavy chain	spt P11442	448	6%	8	-0,24	193187	5,5	3
Dynamamin-1	spt P21575	126	12%	6	-0,525	96209	6,32	3
NSF	trm Q9QUL6	274	9%	6	-0,22	83170	6,55	3
Synaptojanin 1	trm Q8CHC4	139	4%	5	-0,399	174776	6,53	
Syntaxin 7	spt O70257	173	14%	3	-0,555	29888	5,43	
Syntaxin 12	trm O88385	99	14%	3	-0,582	31204	5,45	
Zytoskelett:								
Aktin alpha	rf XP_215801.2	287	20%	26	-0,228	58217	6,79	
Aktin beta	pir ATRTC	514	28%	11	-0,194	42066	5,29	3
Capping protein alpha 2	rf XP_347257.1	159	14%	3	-0,586	33118	5,57	
EF1 alpha 1	rf XP_227080.2	276	14%	6	-0,224	46820	9,19	
EF1 alpha 2	rf XP_227080.2	305	15%	6	-0,3	50764	9,11	
Alpha-Interexin	spt P23565	177	8%	4	-0,694	56253	5,2	3
MAL2A	trm Q7TPB7	75	18%	9	0,833	19468	6	
Myosin Va	spt Q9QYF3	402	6%	11	-0,544	213283	8,87	
NF triplet M protein	spt P12839	318	9%	6	-1,189	95717	4,77	3
Spectrin alpha 2	rf NP_741984.2	1079	14%	27	-0,7892	285261	5,2	
Spectrin beta 1	rf XP_240072.2	545	8%	14	-0,726	279162	5,48	
Suppressor of profilin/p41 of ARP2/3	trm Q99PD4	116	4%	2	-0,312	42143	8,46	
Tubulin alpha	prf O812252A	403	28%	9	-0,231	50894	4,94	3
Tubulin beta 5	rf NP_775125.1	196	12%	4	-0,348	50095	4,78	
G-Proteine:								
ARF-like 10B	trm Q8VEH3	101	9%	3	-0,232	21604	7,63	
ARF-like 10C	trm Q9CQW2	145	20%	4	-0,272	21753	8,67	
Atlastin	spt Q8WXF7	124	14%	6	-0,317	63845	5,82	
Guanine nucleotide-binding protein G(O), alpha2	spt P30033	215	14%	6	-0,347	40568	5,69	
Guanine nucleotide-binding protein G(O), beta 1	rf XP_213170.2	154	8%	3	-0,292	37393	8,19	
Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rac 1)	trm Q9D859	281	34%	7	-0,101	21849	8,77	
v-ral simian leukemia viral oncogene homolog A (ral A)	rf NP_112355.1	107	12%	3	-0,621	23709	6,66	2
RAP2B	rf NP_596901.1	108	26%	3	-0,202	20719	4,73	
rasGAP-activating-like protein 1	spt Q9Z268	219	5%	5	-0,319	90285	5,95	
Transforming protein p21 (K-Ras)	spt P46203	162	20%	3	-0,581	21709	8,25	
Chaperone:								
CCT eta	rf XP_216180.1	146	18%	5	-0,211	60133	8,21	
CCT delta (chaperonin delta)	trm Q7TPB1	73	11%	3	-0,003	58576	8,24	
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 13	rf XP_135146.4	152	5%	4	-0,156	156901	5,9	
Heat shock cognate 71 kDa protein	rf XP_212758.2	144	6%	4	-0,503	64116	5,45	
Metabolische Enzyme:								
Chromaffin granule ATPase II homolog	rf XP_223390.2	376	13%	12	-0,148	69263	5,97	2
2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase	trm Q64575	540	26%	11	-0,443	45966	9,03	3
Dihydroipoamid Acetyltransferase	dbj BAA01504.1	128	5%	3	0,042	57645	5,53	
Dipeptidyl Aminopeptidase-verwandtes Protein	gb AAC42062.1	126	5%	3	-0,424	91891	5,96	
Fructose Bisphosphat Aldolase A	spt P05065	270	26%	9	-0,279	39652	8,39	3
GAPDH	trm Q9QWU4	708	51%	18	-0,089	36090	8,14	3
Glutamin Synthetase	spt P09606	548	35%	12	-0,595	42982	6,64	3
Lactat Dehydrogenase A	spt P06151	348	29%	9	0,064	36686	7,77	3
Lactat Dehydrogenase B	rf XP_129164.2	99	10%	2	-0,001	32578	8,07	
Monoglycerid Lipase	trm Q8R431	155	12%	4	-0,013	33820	6,92	2
6-Phosphofruktokinase Typ C	spt P47860	198	10%	6	-0,132	86517	6,76	
Protein Kinase C alpha	pir KIMSCA	147	5%	4	-0,508	77915	6,61	
Protein Kinase C beta 1	pir KIRTC1	169	5%	3	-0,506	77873	6,57	
Potential phospholipid-transporting ATPase IA	spt P70704	864	16%	18	-0,0072	130938	6,93	

Pyruvat Kinase 3	rf NP_445749.1	86	7%	3	-0,093	58294	6,63	3
Neue Proteine:								
Hypothetisches Protein DKFZp566N034	rf XP_341115.1	198	13%	5	0,384	34535	8,65	2
RIKEN cDNA 1200015A19	trm Q9DBS2	126	16%	4	-0,222	30023	6,92	3
Testis-specific adriamycin sensitivity protein	rf XP_216158.2	171	24%	3	-0,404	20830	8,16	
WD repeat and FYVE domain containing 1 isoform 1	rf XP_237323.2	215	11%	4	-0,245	49846	7,25	
Putative Kontaminationen:								
Plasmamembran:								
Glycoprotein m6a	trm Q812E9	82	7%	2	0,44	31916	5,17	
LSAMP	spt Q62813	81	9%	3	-0,248	37814	6,26	
Myelin basic protein	spt P02688	223	23%	6	-1,032	21415	11,25	3
Na,K-ATPase alpha 3	trm Q8VCE0	260	9%	6	0,008	117548	5,44	2
Na,K-ATPase beta 1	spt P07340	177	15%	4	-0,548	35578	8,83	2
NCAM140	spt P13596	148	5%	4	-0,433	95398	4,83	
Proteolipid Protein	rf NP_112252.1	303	20%	5	0,55	30855	8,71	
VILIP-1	rf NP_036818.1	158	16%	3	-0,502	22299	5,01	
VILIP-3	rf NP_059052.1	79	23%	3	-0,618	22438	5,23	
Mitochondriale Proteine:								
Aspartat Aminotransferase, mitochondriale Precursor	pir S01174	329	17%	6	-0,236	48123	9,05	2
Creatin Kinase, ubiquitous mitochondrial precursor	spt P30275	172	13%	5	-0,406	47373	8,39	3
F ₁ -ATPase A Chain	pdb 1MAB_A	205	14%	5	-0,118	55361	8,28	
F ₁ -ATPase B Chain	pdb 1MAB_B	194	14%	5	0	51321	4,95	
Andere:								
Hämoglobin alpha 2	spt P01966	127	28%	3	0,014	15044	8,19	
Hämoglobin beta 2	prf 0408174A	121	22%	3	-0,056	15938	7,98	

Tabelle 19. Proteinidentifikationen nach Anwendung von 1D SDS-PAGE und nano-ESI LC-MS/MS. Die Proteine sind geordnet nach Lokalisation und Funktion. Zusätzlich sind Angaben zu Datenbanknummer, Score, Sequenzabdeckung, Anzahl identifizierter Peptide, Gravy-Score, molekularer Masse, isoelektrischem Punkt sowie zur Anzahl der Gelsysteme, mit denen diese Proteine identifiziert wurden.

Neben diesen Proteinen sind in Tabelle 20 weitere Proteine aufgelistet, die nach beiden massenspektrometrischen Analysen nur in einem der beiden Läufe gefunden wurden, aber in mehreren der analysierten Banden detektiert werden konnten. Aufgrund der strengeren Kriterien bei Verwendung von ESI-MS/MS sind diese nicht in die Statistik mit einbezogen worden. Unter diesen Proteinen finden sich jedoch einige wieder, die bereits auf oder an synaptischen Vesikeln beschrieben sind. Andere sind bisher unbeschriebene Proteine, deren Funktion und/oder Lokalisation an oder auf synaptischen Vesikeln unbekannt ist.

Protein	Zugangsnummer / Datenbankquelle	Score	Sequenz-Abdeckung	Anzahl zugeordneter Peptide	Gravy Score (Protein)	Relative molekulare Masse (Da)	pI	Gel-Systeme
Integrale synaptische Vesikelproteine:								
Synaptopodin	spt Q8TBG9	133	12%	4	0,13	29489	6,07	
VAMP-A	gb AAH61875.1	118	22%	4	-0,43	27476	8,59	
vATPase Untereinheit S1 precursor	spt Q9R1Q9	74	3%	2	0,212	51089	5,57	
Polyposis locus protein 1 homolog (GP106)	rf XP_344662.1	89	5%	2	0,095	21285	8,26	
Vesikelassoziierte Proteine:								
CaMKII beta	trm Q63094	76	5%	2	-0,346	65847	6,85	
rab2	gb AAH58382.1	197	31%	5	-0,368	23703	6,6	
rab2B	rf XP_223991.1	156	22%	4	-0,527	24355	6,31	2
rab3D	spt P35276	104	24%	7	-0,387	24629	4,76	
rab5A	trm O88565	247	33%	5	-0,417	23828	8,32	
rab8B	spt P70550	213	15%	4	-0,372	23759	9,15	
rab15	spt P35289	83	15%	9	-0,534	24610	5,36	
rab30	rf XP_218916.1	77	16%	3	-0,236	23886	4,91	2
rab37	rf XP_343984.1	82	10%	4	-0,27	22744	6,15	
Septin 3 alpha	trm Q9WU34	119	8%	3	-0,491	40928	6,74	
Septin 3 beta (Fragment)	trm Q9WU35	113	12%	4	-0,598	39996	6,21	
Endozytose:								
API beta 1	rf NP_001118.2	117	4%	2	-0,054	105482	4,94	
Amphiphysin	spt O08838	222	10%	5	-0,678	74946	4,57	
Zytoskelett:								
Tubulin beta 2	rf XP_216012.1	595	33%	11	-0,362	50255	4,79	3
Tubulin beta 15	pir A25113	247	27%	8	-0,4	50361	4,79	3
NF triplet L protein	spt P19527	167	10%	4	-0,916	61224	4,63	

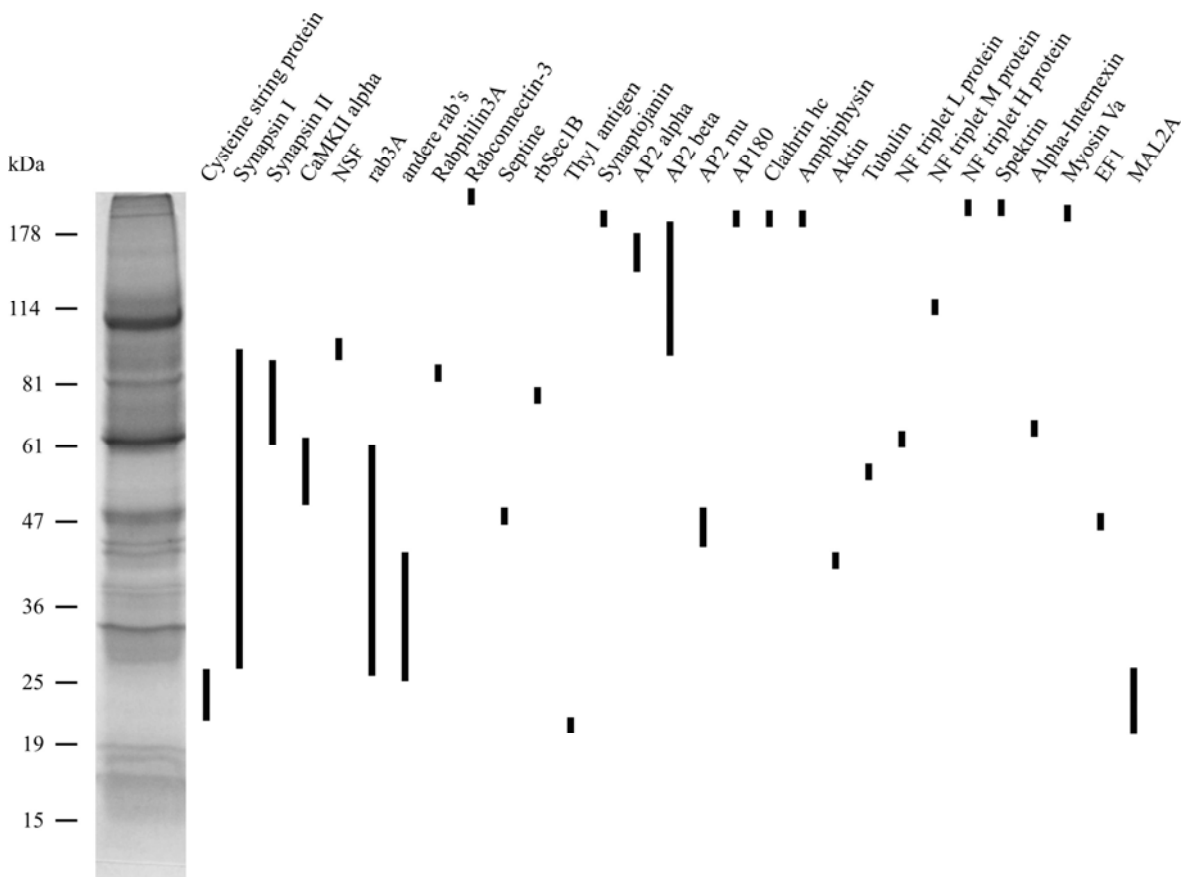
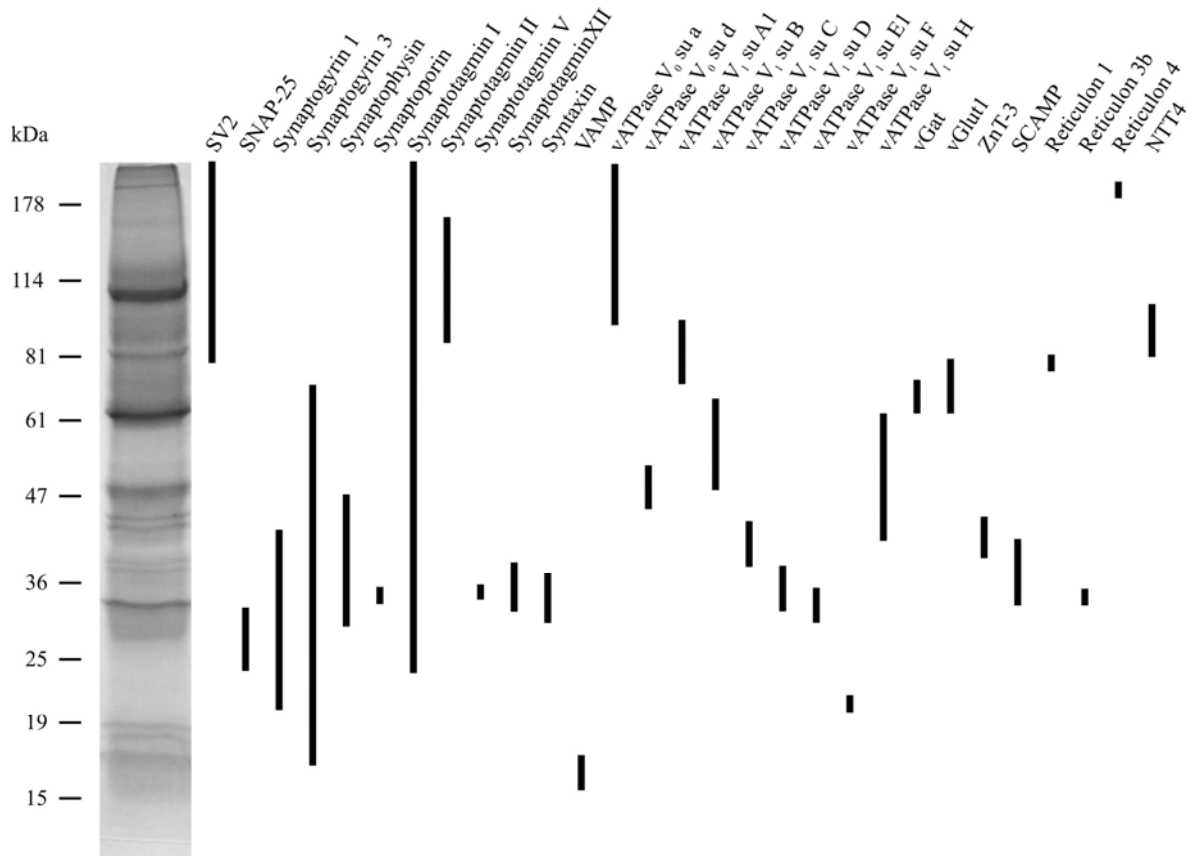
NF triplet H protein	trm O35482	102	3%	3	-1,042	115564	5,81	
ARP1A	rf NP_058556.1	133	6%	2	-0,285	42701	6,19	
ARP1B	rf XP_237097.2	161	13%	4	-0,251	45016	6,04	
ARP2/3 Untereinheit 2	rf XP_217432.2	156	15%	4	-0,315	34440	6,84	2
ARP2/3 Untereinheit 3	rf XP_213782.1	75	8%	2	-0,649	19864	8,8	
ARP2/3 Untereinheit 4	rf XP_238365.2	138	16%	3	-0,133	19768	8,53	2
ARP3 homolog	rf XP_341113.1	68	4%	2	-0,359	55766	8,85	
Spectrin beta 3	rf NP_062040.1	236	2%	6	-0,643	272023	5,61	
Capping protein beta 2	rf XP_216562.2	69	13%	5	-0,554	30952	5,69	
STOP protein	trm Q63560	168	12%	8	-0,928	100651	9,45	2
EF1 gamma	rf XP_215165.2	135	3%	3	-0,485	153695	6,37	
p25-alpha (Tubulin polymerization-promoting protein)	rf XP_341747.1	113	11%	2	-0,748	31041	9,56	
G-Proteine:								
Guanine nucleotide-binding protein G(O), beta 2	rf NP_112299.1	100	8%	3	-0,177	38048	5,6	
GAP1 like	rf XP_341089.1	132	3%	3	-0,311	102701	6,05	2
Transforming protein N-Ras	spt Q04970	103	12%	2	-0,317	21515	5,02	
Transforming protein P21/H-Ras	spt P20171	97	12%	2	-0,388	21643	5,16	
RAP2A	trm Q7TSK4	110	27%	3	-0,295	20857	4,73	
Chaperone:								
Dnaj homolog, subfamily C, member 6	rf XP_233231.2	70	2%	2	-0,473	106436	6,84	
Metabolische Enzyme:								
Adenylosuccinat Lyase	rf XP_235496.2	90	4%	2	-0,259	55768	6,3	
Fructose Bisphosphat Aldolase C	prf 750308A	98	10%	3	-0,294	39449	9,06	
CDP-DAG-Inositol 3-phosphatidyltransferase	spt P70500	67	9%	2	0,604	23939	8,56	
Hexokinase Typ I (Gehirn)	pdb 1BG3_A	68	2%	2	-0,198	103653	6,29	
Protein Tyrosin Phosphatase, non-receptor type 9	trm Q7TSK0	69	6%	3	-0,349	68554	8,34	
Protein Phosphatase 1H	rf XP_235200.2	73	9%	4	-0,285	60128	6,58	
Neue Proteine:								
RIKEN cDNA 1110031B06 (SVAP1-Homolog)	rf XP_220560.2	130	10%	3	-0,329	47241	6,49	
Putative Kontaminationen:								
Plasmamembran:								
Na,K-ATPase alpha 2 precursor	spt P06686	71	2%	2	-0,007	113457	5,39	
Contactin Precursor	pir A57112	215	14%	7	-0,309	114301	5,8	2
Andere:								
GFAP	spt P47819	134	8%	3	-0,826	49970	5,35	2
Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase	spt Q91XR8	136	11%	3	-0,886	29969	10,31	
BIT	dbj BAA20368.1	91	8%	3	-0,402	56297	7,16	
Ca ²⁺ transporting ATPase RS8-17	pir B31982	76	5%	4	0,085	111093	5,27	
Proteasom 26S non-ATPase Regulatoruntereinheit 14	trm Q9CSU2	74	18%	2	-0,133	28868	6,55	
sER / rER Calcium-ATPase 2	spt Q00779	77	5%	3	0,085	111124	5,3	
Transkriptionsfaktor NRF	rf XP_233308.2	74	1%	2	-0,645	152461	8,4	

Tabelle 20. Proteinidentifikationen nach Anwendung von 1D SDS-PAGE und nano-ESI LC-MS/MS. Die Proteine sind geordnet nach Lokalisation und Funktion. Zusätzlich sind Angaben zu Datenbanknummer, Score, Sequenzabdeckung, Anzahl identifizierter Peptide, Gravy-Score, molekularer Masse, isoelektrischem Punkt sowie zur Anzahl der Gelsysteme, mit denen diese Proteine identifiziert wurden.

3.5.7 Auflösung der eindimensionalen Elektrophorese

Obwohl die Analyse über eindimensionale SDS-PAGE in Kombination mit nano-LC ESI-MS/MS zu den meisten Proteinidentifikationen führte, ist ein großer Nachteil dieser Technik die schlechte Auflösung der Proteine. In Abbildung 76 ist dies für ausgewählte Proteine veranschaulicht.

Viele der integralen synaptischen Vesikelpoteine wie SV2, Synaptogyrin, Synaptophysin, einige Untereinheiten der vesikulären Protonenpumpe und insbesondere Synaptotagmin zeigen eine hohe Unschärfe in einem weiten Bereich des SDS-Gels. Diese Unschärfen decken Bereiche von 25% bis 75% des Gelstreifens ab. Extreme Resultate ergeben sich für Synaptotagmin, welches zwischen 23 kDa und dem maximalen Massenbereich detektiert werden kann.



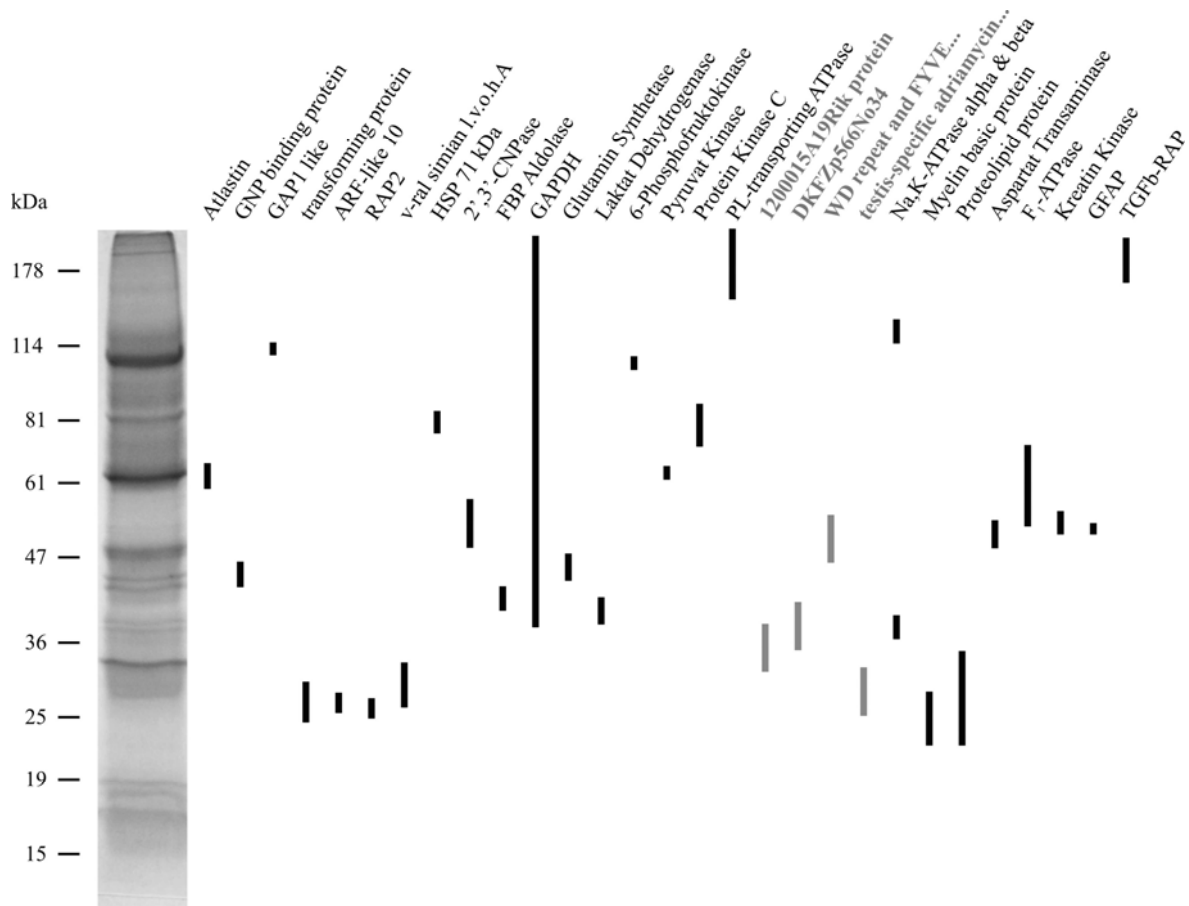


Abb. 76. Migrationsverhalten der über 1D SDS-PAGE identifizierte Proteine innerhalb des Gelstreifens. Die Balken geben die Position der jeweiligen Proteine im Gel wieder.

Dagegen sind andere integrale synaptische Vesikelproteine wie VAMP-2, Syntaxin, Synaptoporin, die Neurotransmittertransporter vGat und vGlut1 sowie der Zinktransporter ZnT-3 nur über einen kleinen Bereich molekularer Masse detektierbar, der etwa 10 bis 15 kDa umfaßt. Aber auch peripher assoziierte Vesikelproteine ohne Transmembranhelices wie Synapsin I, rab3A und das Glykolyse-Enzym GAPDH fokussieren sehr schlecht. Sie sind über die Hälfte der Trennstrecke des Gels detektierbar. Die meisten anderen löslichen oder membranassoziierten Proteine fokussieren hingegen sehr gut und sind in einem Massenbereich von 5 bis 10 kDa nachweisbar. Die in der Liste unter „neu“ geführten Proteine fokussieren ebenfalls in einem engen Bereich von ~10 kDa. Hierzu zählen auch die zwei für weitere Analysen ausgewählten Proteine RIKEN cDNA1200015A19 und DKFZp566N034, die im Folgenden mit Svap30 (synaptic vesicle-associated protein of 30 kDa) und SV35 (synaptic vesicle protein of 35 kDa) bezeichnet werden.

Insgesamt zeigen die Daten, daß eine Zerteilung des Gels in größere Abschnitte nachteilig für die massenspektrometrische Analyse gewesen wäre, da einige Proteine mit großer Unschärfe gering abundante Proteine massiv überdeckt hätten. Möglicherweise empfiehlt sich an dieser

Stelle eine weitere Unterteilung der ausgeschnittenen Banden, um die Auflösung weiter zu erhöhen.

3.5.8 Vergleich der drei gelbasierenden Systeme

Die Anwendung der drei gelbasierenden elektrophoretischen Systeme resultiert in der Identifizierung von 185 Proteinen (Abb. 77). 143 Proteine wurden über eindimensionale SDS-PAGE, 96 Proteine über dSDS-PAGE und 59 Proteine über BAC/SDS-PAGE identifiziert. Interessanterweise liegt die überlappende Identifizierung aller drei Systeme mit 35 Proteinen sehr niedrig (19% des Gesamtproteins). Zusätzlich resultiert die Anwendung der 1D SDS-PAGE und dSDS-PAGE in einer überlappenden Identifizierung von 22 Proteinen, die der dSDS- und BAC/SDS-PAGE in 7 und die der 1D SDS- und BAC/SDS-PAGE in 14 Proteinen. Proteine, die ausschließlich durch eines der drei Systeme identifiziert wurden, summieren sich zu 72 Proteinen für die eindimensionale SDS-PAGE, zu 32 Proteinen für die dSDS-PAGE und zu 3 Proteinen für die BAC/SDS-PAGE.

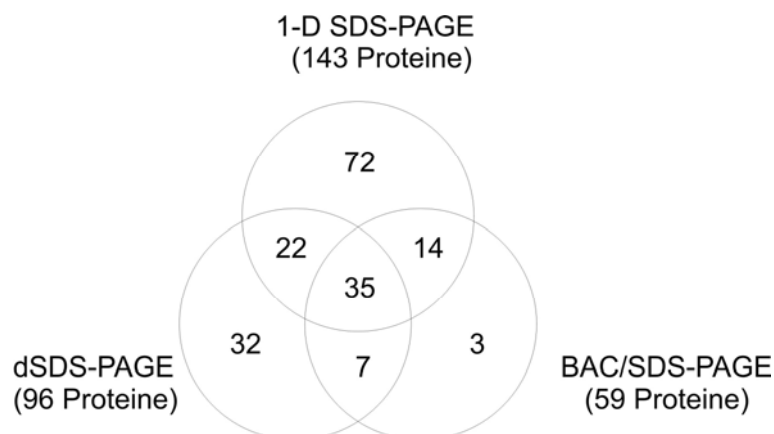


Abb. 77. Schnittdiagramm der Proteinidentifizierungen mittels der drei verwendeten Techniken.

3.5.9 Einteilung identifizierter Proteine nach Funktion und Lokalisation

Die identifizierten Proteine lassen sich aufgrund von Funktion und/oder Lokalisation in verschiedene Kategorien unterteilen (Abb. 78). Integrale Vesikelproteine und vesikelassoziierte Proteine bilden mit 43% einen großen Anteil identifizierter Proteine. 7% der Proteine gehören zur Endozytosemaschinerie, 10% sind zytoskelettären Ursprungs. G-Proteine bilden 6%, Chaperone 4% und metabolische Enzyme 10% der Proteinidentifikationen. An der Plasmamembran lokalisierte Proteine tragen zu 6% zu den Identifizierungen bei. 2% der Proteine sind mitochondrialen Ursprungs, weitere 8% nicht weiter definierte Kontaminationen. Hierzu zählen Proteine wie GFAP, Myelin Basic Protein

und Proteine der Postsynapse. 4% der Proteinidentifizierungen wurden als neue Proteine gewertet, da über diese nach *in silico*-Analyse bisher weder Lokalisations- noch Funktionsdaten vorliegen.

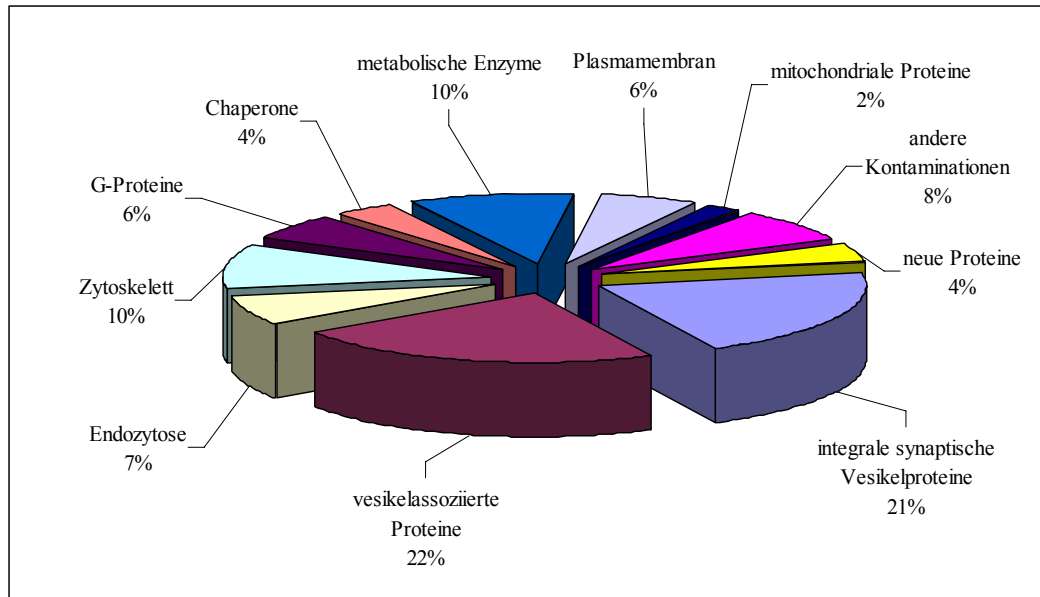


Abb. 78. Verteilung der identifizierten Proteine gemäß Lokalisation und/oder Funktion.

3.5.10 Vor- und Nachteile der angewandten Systeme

Für die Identifizierung hydrophober Proteine wurden spezielle zweidimensionale Gelelektrophoretetechniken eingesetzt. Zur Visualisierung der Effizienz jeden Systems wurden für alle Techniken die relativen Anteile der Identifizierungen von Membranproteinen, löslichen Proteinen sowie membranassoziierten Proteinen gegenübergestellt (Abb. 79). Betrachtet man den relativen Anteil der identifizierten integralen Membranproteine, so ist ersichtlich, daß die eindimensionale SDS-PAGE und dSDS-PAGE am effektivsten sind. Beide Techniken führten zu einer Identifizierung integraler Membranproteine von 29% bzw. 25%. Dagegen erweist sich die BAC/SDS-PAGE als weniger effektiv – nur 19% der identifizierten Proteine stellen integrale Membranproteine dar. Die Identifizierung zyttoplasmatischer Proteine ergibt 28% für die 1D SDS-PAGE, 39% für die BAC/SDS-PAGE und 48% für die dSDS-PAGE. Große Unterschiede treten bei Betrachtung der membranassoziierten Proteine auf. Während die 1D SDS-PAGE und BAC/SDS-PAGE zu einer Identifizierung von 43% respektive 42% führen, lassen sich nach dSDS-PAGE nur 27% membranassoziierte Proteine nachweisen.

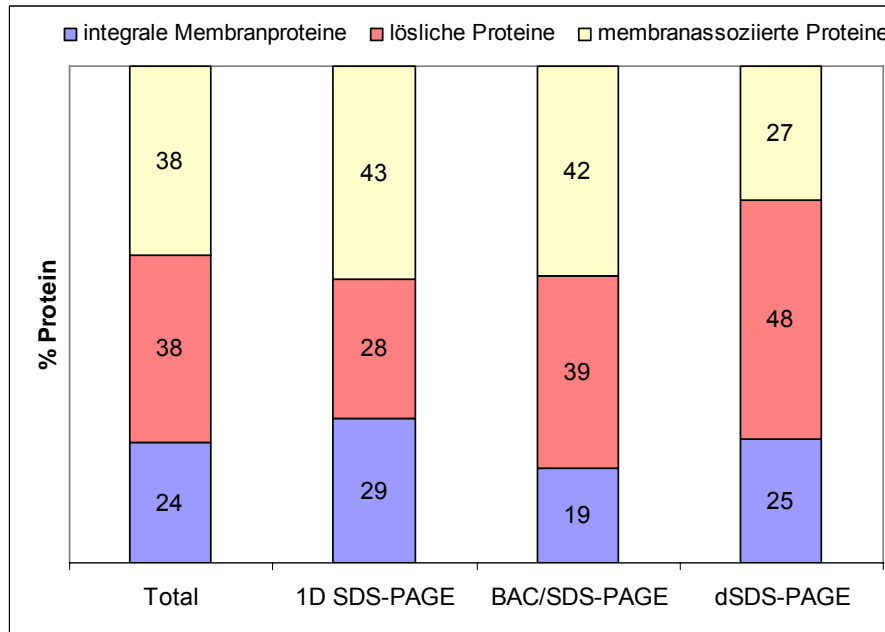


Abb. 79. Darstellung der prozentualen Anteile an integraler Membranproteine, löslicher Proteine und membranassoziierter Proteine für 1D SDS-PAGE, BAC/SDS-PAGE, dSDS-PAGE sowie für die Zusammenfassung aller Proteinidentifikationen (total).

3.5.11 Hydrophobizitätsplot

Für die Demonstration der Effektivität der verwendeten Systeme bezüglich der Identifizierung hydrophober Proteine wurde der relative Anteil der Proteine gegen deren Gravy-Score aufgetragen (Abb. 80). Der Gravy-Score (grand average of hydrophobicity index) ist das arithmetische Mittel der Summe der Hydrophobie-Indizes der einzelnen Aminosäuren (Kyte und Doolittle, 1982) und gibt die Gesamthydrophobizität eines Proteins wieder. Negative Gravy-Scores entsprechen hydrophilen Proteinen, positive Werte hydrophoben Proteinen.

Der Großteil der identifizierten Proteine besitzt Gravy-Scores zwischen -0,6 und 0,1. Die meisten Proteine sind demnach hydrophil bis mäßig hydrophob. Auf beiden Seiten der Skala lassen sich zudem Extrema beobachten. So besitzen die hydrophilsten Proteine Gravy-Scores bis -1,2, die hydrophobsten Werte bis 1,1. In Bezug auf hydrophile Proteine unterscheiden sich die drei angewandten gelektrophoretischen Systeme nur unwesentlich, auch wenn die 1D SDS-PAGE in Bezug auf die Identifizierung sehr hydrophiler Proteine Nachteile zu haben scheint. Die Analyse identifizierter hydrophober Proteine resultiert jedoch in auffälligen Unterschieden. Das hydrophobste Protein, das mittels BAC/SDS-PAGE nachgewiesen werden konnte, besitzt einen Gravy-Score von 0,169 (ZnT-3). Die anderen verwendeten Techniken besitzen gemäß dieser Analyse Vorteile in der Identifizierung hydrophober Membranproteine. Die Anwendung der eindimensionalen SDS-PAGE läßt die Identifizierung

eines Proteins mit einem Gravy-Score von bis zu 0,9 (MAL2A) zu, während nach Verwendung der dSDS-PAGE die vATPase-Untereinheit c mit einem Wert von 1,075 nachgewiesen werden konnte.

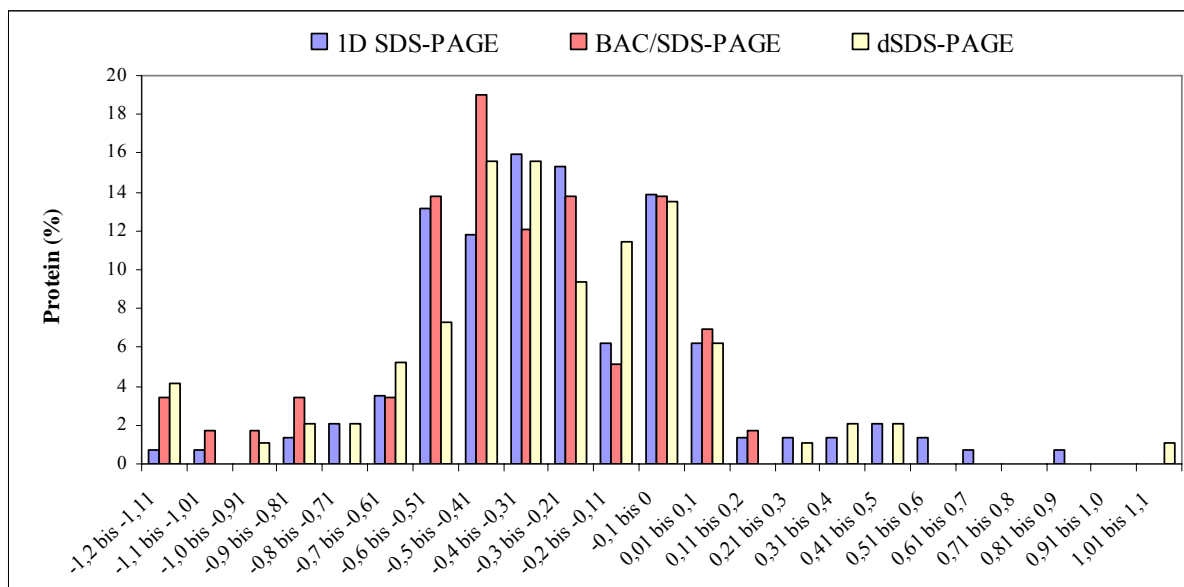


Abb. 80. Darstellung der Gravy-Scores der mittels 1D SDS-PAGE, BAC/SDS-PAGE und dSDS-PAGE identifizierter Proteine. Gravy-Scores wurden in Schritte von 0,1 eingeteilt und gegen die prozentuale Häufigkeit der Proteine aufgetragen.

3.5.12 Verteilung identifizierter Proteine nach molekularer Masse

Die Analyse der relativen Anteile identifizierter Proteine bestimmter molekularer Massen ist in Abbildung 81 wiedergegeben. Allen drei Systemen ist eigen, daß die meisten Proteine in einem Massenbereich zwischen 20 und 110 kDa identifiziert wurden. Proteine der Masse kleiner als 10 kDa wurden von keinem der Systeme identifiziert.

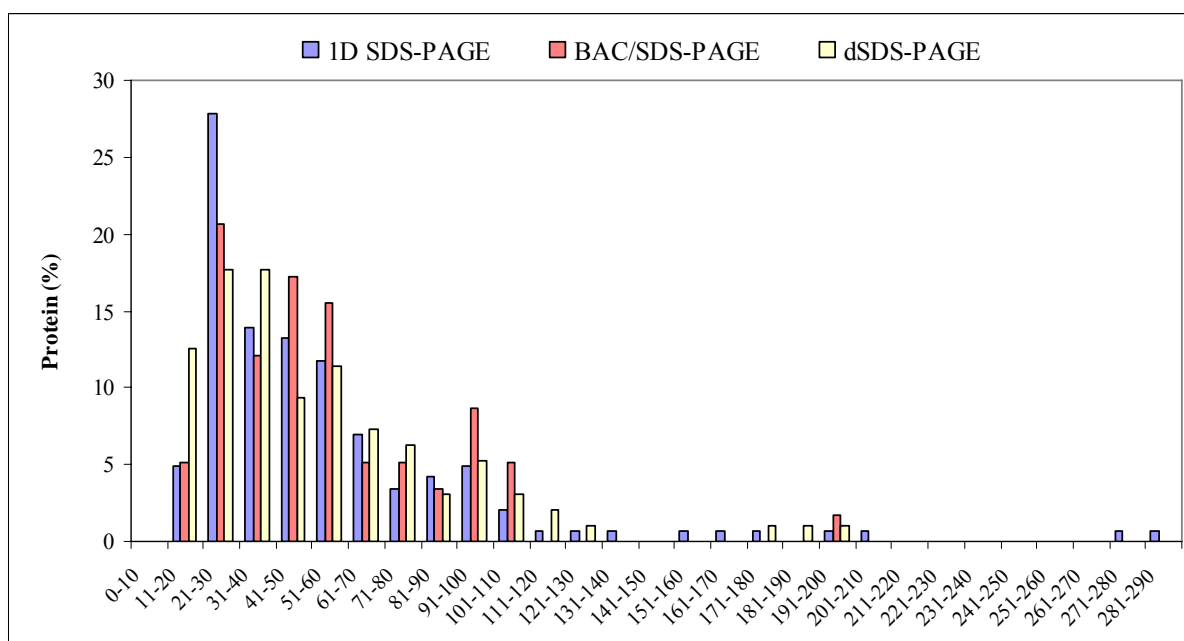


Abb. 81. Verteilung der molekularen Massen der mittels der drei Systeme identifizierten Proteine.

Proteine höherer Massen als 110 kDa resultieren für das BAC/SDS-System in drei Identifikationen zwischen 191 und 200 kDa. Gleichmaßen zeigt die Anwendung der dSDS-PAGE Proteinidentifizierungen bis maximal 200 kDa, führt aber im Gegensatz zur BAC/SDS-PAGE auch zu Proteindetektionen im Bereich zwischen 120 und 190 kDa. Die beste Technik für die Identifizierung von Proteinen hoher molekularer Masse ist die 1D SDS-PAGE (Abb. 81), die den Nachweis von Proteinen bis 290 kDa zuläßt.

3.5.13 Verteilung identifizierter Proteine nach isoelektrischem Punkt

Die Verteilung der isoelektrischen Punkte der über die drei Systeme identifizierten Proteine ist in Abbildung 82 wiedergegeben. Die Resultate sind für alle Techniken sehr ähnlich, wenn man von der basischen Seite der Skala absieht, die leichte Inhomogenitäten aufweist. Insgesamt besitzen die identifizierten Proteine isoelektrische Punkte zwischen 4 und 12, wobei der Hauptanteil für alle drei Systeme zwischen 5 und 7 liegt.

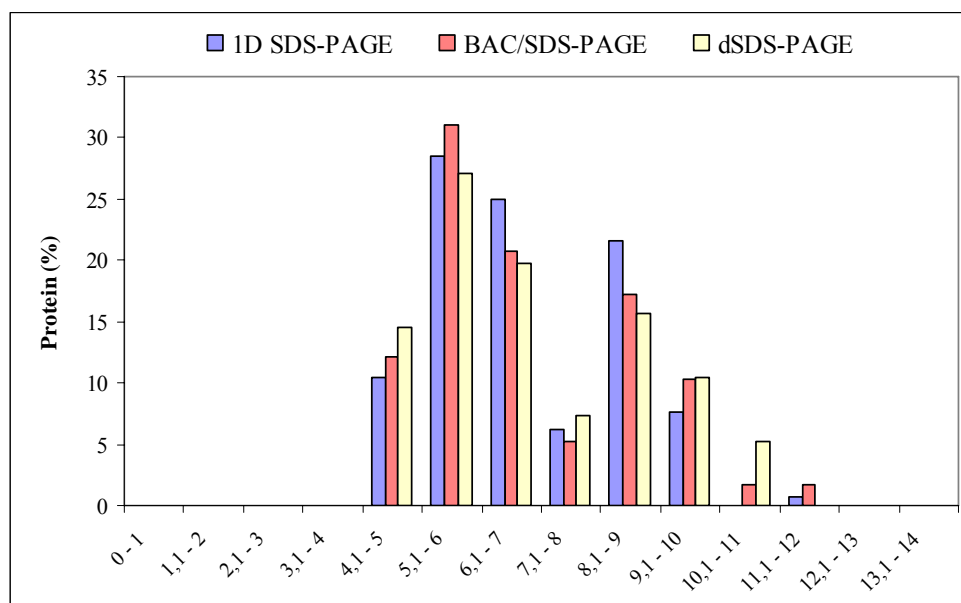


Abb. 82. Verteilung der isoelektrischen Punkte der über die drei verschiedenen Gelsysteme identifizierten Proteine.

3.6 Difference Gel Electrophoresis

3.6.1 Evaluation der Präparationen

Das DIGE-System wurde für die Analyse des Proteinmusters synaptischer Vesikel unter Ruhe und nach Stimulation von Neuronen eingesetzt. Um darzulegen, daß sich durch Stimulation der Nervenendigung Unterschiede in der synaptischen Vesikelpopulation ergeben, wurden Immunanalysen des Saccharosegradienten jeweils zweier Präparationen durchgeführt.

Eingesetzte Antikörper umfassen solche gegen SV2 und den Endosomenmarker EEA1. Während die Analysen von SV2 keine Unterschiede im Migrationsverhalten über den Saccharosegradienten in stimulierten versus nicht stimulierten Proben ergaben (Daten hier nicht gezeigt), führen die Analysen von EEA1 zu Unterschieden (Abb. 83).

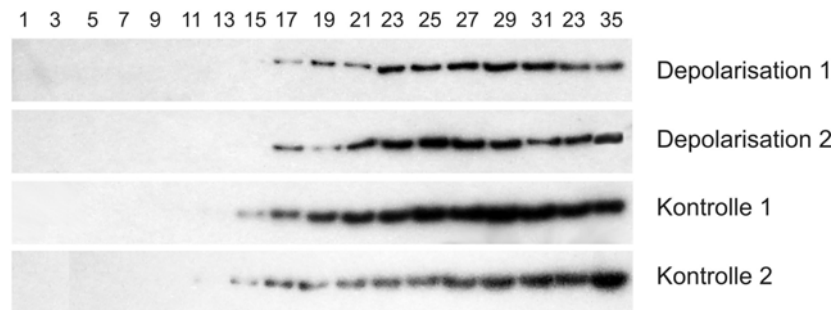


Abb. 83. Evaluation der Qualität der Stimulation über Analyse des endosomalen Proteins EEA1 im Saccharosegradienten. Analysiert wurden 5 μ l jeder zweiten Fraktion.

Die Immunanalysen geben wieder, daß durch Stimulation Änderungen der Endosomengröße auftreten, was in der Verschiebung des Organells in dichtere Fraktionen resultiert. In den depolarisierten Proben ist EEA1 ab Fraktion 17 detektierbar, während das endosomale Protein in nicht stimulierten Gehirnen ab Fraktion 15, in geringen Spuren in Kontrolle 2 bereits ab Fraktion 13 nachzuweisen ist.

3.6.2 DIGE-Analyse

Der Scan für jeden der drei Farbstoffe sowie der Overlay der drei Kanäle ist nach Separation der markierten Proteine mittels BAC/SDS-PAGE an einem Beispiel in Abbildung 84 gezeigt.

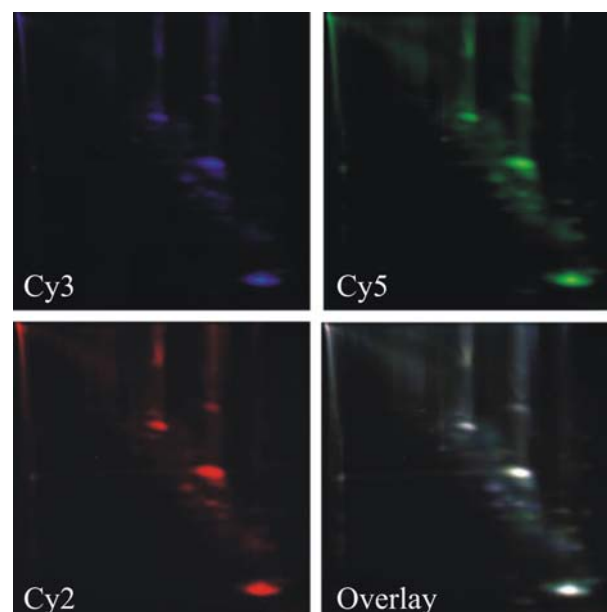


Abb. 84. Scan der DIGE-Gele für die drei verschiedenen CyDyes Cy3 (blau, nicht stimuliert), Cy5 (grün, stimuliert) und Cy2 (rot, interner Standard) sowie die Überlagerung der drei Kanäle.

Die Proteinmuster aller Gele sind identisch mit denen, die mittels Coomassie Brilliant Blue-Färbung erhalten wurden. Die Farbstoffe sind demnach geeignet, die Proteine synaptischer Vesikel durch das angewandte Minimallabelling zu markieren.

Die Anwendung der DeCyder-Software ergibt für acht Proteine signifikante Abundanzänderungen ($p < 0,05$) zwischen den beiden funktionellen Zuständen. Die Lage der Proteine im Gel ist in Abbildung 85 gezeigt.

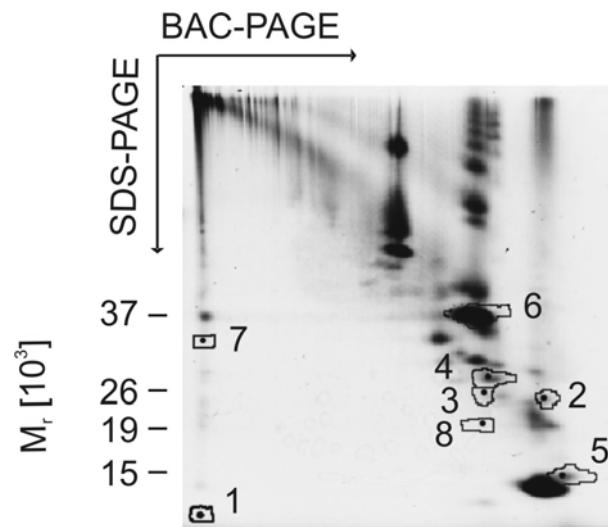


Abb. 85. Auswertung der drei DIGE-Gele mittels DeCyder Software. Die acht Abundanzänderungen sind im Gel durch die Ziffern 1 bis 8 gekennzeichnet.

Um die Unterschiede zwischen nicht stimulierter und stimulierter Vesikelprobe besser darstellen zu können, empfiehlt sich die Analyse der Fluoreszenzoberfläche (Abb. 86). Die Position des entsprechenden Unterschiedes ist hierbei durch die weißen Markierungen wiedergegeben. Bei Betrachtung des eingeschlossenen Bereiches wird deutlich, wie ausgeprägt die Abundanzänderung ist. Teilweise handelt es sich um Verschiebungen der Spot-Position innerhalb des Gels, teilweise um Abundanzänderungen bei gleichbleibender Lage im Gel. Zusätzlich sind Daten zur Größe der Abundanzänderung sowie der p-Wert gegeben. Die Abundanzänderungen bewegen sich in einem Bereich von -1,53 bis 1,96. Positive Werte kennzeichnen hierbei Proteine, deren Abundanz in der stimulierten Probe höher ist. Negative Werte stehen für eine Abundanzabnahme nach Stimulation. Die Proteine 1 bis 6 sind demnach in der stimulierten Probe stärker vertreten, die Proteine 7 und 8 in der unstimulierten Probe.

Spot	Verhältnis stim./unstim.	p-Wert	unstimuliert	stimuliert
1	1.96	0.003		
2	1.57	0.0054		
3	1.38	0.03		
4	1.36	0.0063		
5	1.3	0.038		
6	1.21	0.025		
7	-1.25	0.016		
8	-1.53	0.029		

Abb. 86. Analyse der acht Spots mit signifikanter Abundanzänderung. Die Spotnummern verweisen auf Abbildung 85. Die Intensität der Abundanzänderung, der p-Wert sowie die Areale der Änderung sind wiedergegeben.

Die massenspektrometrische Analyse der tryptisch verdauten Proteinspots resultiert in den in Tabelle 22 dargestellten Proteinidentifikationen. Zu den Proteinen gehören die SNAREs SNAP-25 und VAMP-2, die vATPase V_0 -Untereinheit d, das integrale Vesikelprotein Synaptophysin, die peripher assoziierten Proteine rab3A und rab2, die Motorprotein-Untereinheit Dynein light chain 2B sowie Svap30 (RIKEN cDNA 1200015A19).

Spot	Protein	Sequenzabdeckung	M_r [Da]	Datenbank-Nummer
1	Dynein light chain 2B	83%	9568	gi 28913654
2	rab3A	52%	25198	gi 6981452
3	SNAP-25	45%	20800	gi 1314856
4	Svap30 (RIKEN cDNA 1200015A19)	58%	30023	gi 21312776
5	VAMP-2	94%	12740	gi 5981614
6	Synaptophysin	30%	34288	gi 41019466
7	vATPase V_0 Untereinheit d	38%	40749	gi 3955100
8	rab2B	47%	24355	gi 27675132

Tabelle 22. Ergebnisse nach Analyse der tryptisch verdauten Spots mit MALDI-TOF-MS. Aufgelistet sind die identifizierten Proteine, die Sequenzabdeckung, die molekulare Masse sowie die Datenbank-Nummer.

Alle Proteine bis auf die vATPase-Untereinheit und rab2B weisen eine Abundanzhöhung nach Stimulation auf. SNAP-25 und VAMP-2 zeigen Abundanzänderungen von 1,38 und 1,3, Synaptophysin von 1,2. Dynein light chain 2B weist eine annähernd verdoppelte Abundanz in der stimulierten Probe auf. Rab3A erreicht einen Wert von 1,38. Svap30 zeigt mit 1,36 eine

leicht erhöhte Abundanz in der stimulierten Probe. Die d-Untereinheit der Protonenpumpe sowie rab2 weisen Abundanzänderungen von -1,25 bzw. -1,53 auf.

3.6.3 Analyse der Phosphorylierung

Die Abundanzänderungen der identifizierten Proteine können durch posttranslationale Modifikationen zustande kommen, die das elektrophoretische Migrationsverhalten der Proteine beeinflussen. Daher wurden nach zweidimensionaler Elektrophorese über BAC/SDS-PAGE Immunanalysen mit Antikörpern gegen Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin durchgeführt (Abb. 87, A-D). Analysen hinsichtlich Phosphothreonin resultieren in keinem Immunsignal (Daten hier nicht gezeigt). Zusätzlich wurden individuelle Immunanalysen für identifizierte Proteine durchgeführt (Abb. 87, E-I). Vor der Immundetektion wurden die Nitrozellulosemembranen einer Silberfärbung unterzogen (J), um detektierte Signale einwandfrei dem Proteinmuster eines BAC/SDS-Gels zuordnen zu können. Die Anwendung dieser Technik erlaubt die Identifizierung der Positionen von Synaptophysin, rab3A, SNAP-25 und VAMP-2 auf dem BAC/SDS-Gel. Zusätzlich enthält die Probe eine hohe Konzentration an Immunglobulinen, bedingt durch die Elution der Proteine von den Magnetbeads. Da diese Immunglobuline mit den aus Maus stammenden Phosphoserin- und Phosphotyrosin-Antikörpern reagieren, werden Immunanalysen nur mit dem sekundären Anti-Maus-Antikörper durchgeführt (I), um die Lage der Immunglobulinketten zuordnen zu können.

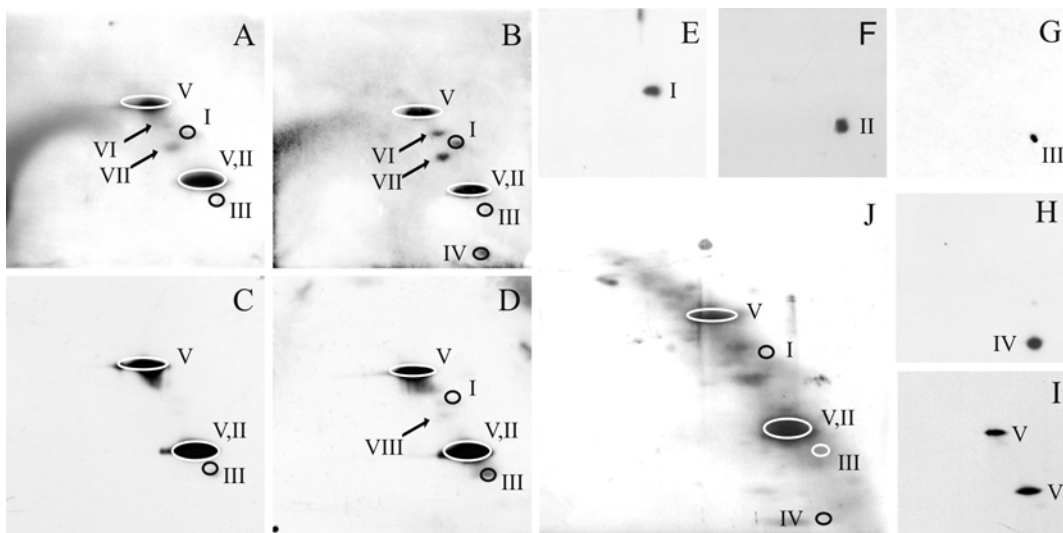


Abb. 87. Phosphostudien stimulierter (B, D) und nicht stimulierter (A, C) Proben. BAC/SDS-Gele wurden auf Nitrozellulosemembranen transferiert und hinsichtlich Phosphoserin (A, B), Phosphotyrosin (C, D), Synaptophysin (E), SNAP-25 (F), rab3A (G), VAMP-2 (H) und Immunglobulinen (I) analysiert. Die Silberfärbung der Nitrozellulosemembran (J) erlaubt die Zuordnung der Immunsignale aus E bis I auf der Membran sowie auf den Phosphoblots: (I) Synaptophysin, (II) SNAP-25, (III) rab3A, (IV) VAMP-2, (V) schwere und (VI) leichte Immunglobulin-Ketten. VII (A, B) und VIII (D) kennzeichnen Proteine, deren Phosphorylierungsstatus sich während der Stimulation ebenfalls ändert.

Abbildung 87 demonstriert, daß die Phosphorylierung in der stimulierten Probe generell stärker vorhanden ist (B, D) als in der nicht stimulierten Probe (A, C). Die Analyse der Serinphosphorylierung (A, B) legt Unterschiede zwischen den beiden funktionellen Ansätzen dar, die sowohl das Muster der Phosphorylierung als auch die Intensität der Signale betreffen. Sechs Spots können in der nicht stimulierten Probe detektiert werden im Vergleich zu sieben Spots in der stimulierten Probe. Die Applikation des Phosphotyrosin-Antikörpers führt zur Detektion von fünf Spots in der stimulierten (D) und drei Spots in der nicht stimulierten Probe (C). Ein Vergleich des Phosphorylierungsmusters mit dem Muster synaptischer Vesikelproteine (J) läßt erkennen, daß einige der über DIGE identifizierte Proteine nach Stimulation phosphoryliert werden. Hierzu zählen Synaptophysin (I), SNAP-25 (II), rab3A (III) und VAMP-2 (IV). Zusätzlich konnten Immunsignale für die schweren (V) und leichten (VI) Ketten der Maus-Immunglobuline detektiert werden.

Synaptophysin zeigt ausschließlich in der stimulierten Probe eine Tyrosinphosphorylierung und zusätzlich eine Zunahme der Serinphosphorylierung nach Stimulation. Eine Quantifizierung der Immunsignale ergibt eine Steigerung der Serinphosphorylierung um Faktor 1,9. Rab3A wird in allen Analysen nachgewiesen und zeigt eine geringe Zunahme der Tyrosin- (Faktor 1,4) und Serinphosphorylierung (Faktor 2,4) in der stimulierten Probe. VAMP-2 zeigt eine Serinphosphorylierung nach Aktivierung der Synapse. Kein Signal kann in den Phosphotyrosin-Analysen detektiert werden. Die Phosphorylierung von SNAP-25 kann nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden, da es partiell mit der leichten Kette der Immunglobuline kolokalisiert. Zusätzlich werden weitere Proteine nach Stimulation serin- (VII) und tyrosinphosphoryliert (VIII). Vergleiche mit den über Western Blot und MALDI-TOF-MS erhaltenen Daten lassen Rückschlüsse auf diese unbekannt Proteine zu. Bei Protein VII handelt es sich vermutlich um Aktin, bei VIII um GAPDH.

Um die Spezifität der Antikörper für die jeweiligen phosphorylierten Aminosäuren darzulegen und die Funktionalität des Phosphothreonin-Antikörpers zu verifizieren, wurden Dephosphorylierungsstudien mittels Lambda-Protein Phosphatase (λ PPase) durchgeführt (Abb. 88A) sowie der Phosphothreonin-Antikörper an Gesamthirnhomogenat getestet (Abb. 88B). Nach Dephosphorylierung sind im Fall des Phosphoserin-Antikörpers zwei Banden erkennbar, die eine molekulare Masse von 10 bzw. 20 kDa besitzen. Alle anderen Banden aus dem unverdauten Ansatz sind nicht mehr nachweisbar. Die Bande bei 20 kDa entspricht hierbei der λ PPase, die für ein 23 kDa Protein kodiert - Analysen über den PredictProtein-

Algorithmus geben fünf mögliche Serinphosphorylierungsstellen wieder. Die Anwendung des Phosphotyrosin-Antikörpers resultiert in einer Bande, deren molekulare Masse und vermutlich auch Identität mit der 10 kDa-Bande des Phosphoserin-Immunblots identisch ist. Die Evaluation des Phosphothreonin-Antikörpers resultiert für das Gesamthirnhomogenat in einer Reihe von Banden und demonstriert dessen Funktionalität.

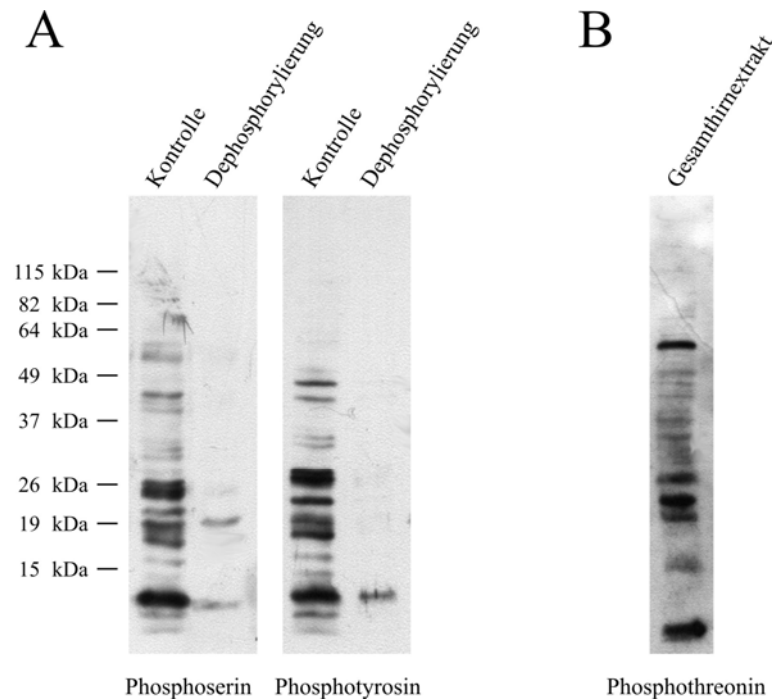


Abb. 88. (A) Dephosphorylierungsstudien für Phosphoserin- und Phosphotyrosinantikörper an Gesamthirnhomogenat. Die Kontrolle wurde ohne λ PPase inkubiert. (B) Immundetektion der Phosphoproteine nach Anwendung des Phosphothreoninantikörpers an Gesamthirnhomogenat. Pro Spur wurden 15 μ g Protein elektrophoretisch aufgetrennt.

3.7 Charakterisierung neuer Proteine

Für die Analyse und Charakterisierung identifizierter neuer Vesikelproteine wurden ausgehend von der Liste aller neuen Proteinidentifikationen die zwei hypothetischen Proteine Svap30 (RIKEN cDNA 1200015A19) und SV35 (DKFZp566N034) ausgewählt. Für das Svap30-Gen war hierbei über RZPD (Deutsches Zentrum für Genomforschung GmbH) ein Klon kommerziell erwerblich (IRAVp968E0734D6). Das SV35-Gen wurde von Epoch Biolabs (Texas, USA) synthetisiert.

3.7.1 Svap30

Das abgeleitete Protein ist aus 266 Aminosäuren aufgebaut, die eine errechnete molekulare Masse von 30023 Da ergeben. Der isoelektrische Punkt liegt bei 6,92, der Gravy-Score beträgt -0,222. Das Protein ist aufgrund fehlender vorhergesagter Transmembranhelices

vermutlich löslich und laut Recherche der Signalsequenzen zytoplasmatisch lokalisiert. Eine vergleichende Analyse der Proteinsequenz läßt keine Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion des Proteins zu. Keine bekannten Domänen oder Membrananker wurden aufgrund von Ähnlichkeiten mit anderen Proteinen identifiziert. Nach Anwendung des Psi/Phi-Algorithmus werden schwache Ähnlichkeiten mit der Inositol-Polyphosphat-5-Phosphatase deutlich. Der SMART-Algorithmus gibt unter der Signifikanzschwelle Ähnlichkeiten mit der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Domäne wieder. PredictProtein (Columbia University, USA) sagt mögliche Phosphorylierungsstellen für die Protein Kinase C an den Aminosäuren 49 und 205, für die Casein Kinase II an den Resten 91, 132, 138 und 181 voraus. Vorhergesagte Myristoylierungen beinhalten die Reste 12 und 225. Disulfidbrücken können zwischen den Aminosäuren 121 und 200 sowie zwischen 112 und 139 ausgebildet werden. Das putative Protein ist in den Datenbanken für 24 Metazoa beschrieben. Darunter zählen Ratte, Maus, Mensch, Schimpanse, Hund, Rind und Hahn.

3.7.1.1 Klonierung

3.7.1.1.1 Klonierungsstrategie

Der Klon IRAVp968E0734D6 enthält die genetische Information für Svp30 in dem Vektor pCMV-SPORT6. Für die Einfügung eines C-terminalen myc-Tags an den proteinkodierenden Teil wird das Insert in pcDNA3.1 B(-)myc/His kloniert. Hierfür werden nach Amplifikation des Inserts unter Aussparen des Stopp-Codons und Einfügen geeigneter Restriktionsschnittstellen sowohl Vektor als auch Insert mittels XhoI und BamHI restringiert. Die verdauten Produkte werden per Gelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Gel isoliert und anschließend ligiert.

3.7.1.1.2 PCR-Amplifikat

Die Amplifikation des proteinkodierenden Inserts mittels PCR führt zu einem Amplifikat von ~950 bp (Abb. 89).

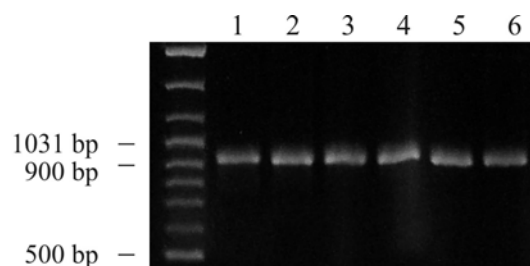


Abb. 89. PCR zur Amplifizierung und Einführung von Restriktionsschnittstellen mittels Pwo-Polymerase und verschiedener $MgCl_2$ -Konzentrationen: (1) 1,5 mM, (2) 2 mM, (3) 2,5 mM, (4) 3 mM, (5) 3,5 mM, (6) 4 mM. Aufgetragen wurden 4 μ l des PCR-Ansatzes.

Da die Amplifikation über Taq-Polymerase in Punktmutationen resultierte, wurde die Pwo-Polymerase mit verschiedenen $MgCl_2$ -Konzentrationen eingesetzt. Alle eingesetzten Salzkonzentrationen führen zum gleichen Ergebnis. Das Amplifikat von ~ 950 bp entsteht unter allen Bedingungen.

3.7.1.1.3 Restriktion des Vektors und Inserts für die Ligation

Für ein erfolgreiches Umklonieren müssen sowohl das per PCR amplifizierte Insert als auch der Zielvektor mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten werden. Um die wenigen Basenpaare, die durch die Restriktion des Inserts entfernt wurden, von der restlichen DNA zu trennen und eine Religation zu verhindern, wurden die Ansätze elektrophoretisch aufgetrennt. Das Insert besitzt hierbei eine Größe von ~ 930 bp (1, 2), der Vektor $\sim 5,5$ kb (3, 4). Nach präparativer Restriktion wurde die DNA aus dem Gel isoliert und für eine Konzentrations- und Reinheitsbestimmung erneut gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 90).

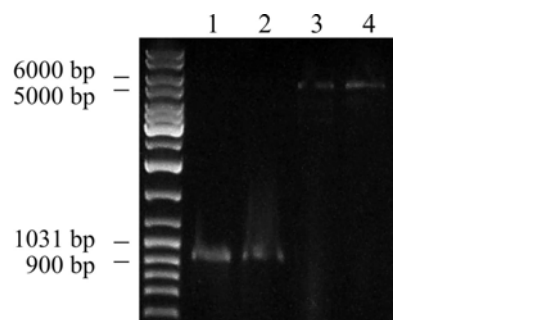


Abb. 90. Gelelektrophoretische Auftrennung der präparativen Restriktion des per PCR amplifizierten Produktes (1, 2) und des Vektors pcDNA3.1 B (-) myc/His (3, 4). Pro Spur wurden $0,5 \mu\text{l}$ der aus dem präparativen Gel isolierten DNA aufgetragen.

3.7.1.1.4 Ligation

Obwohl für eine Ligation ein molekulares Verhältnis von Insert zu Vektor von 3:1 als optimal gilt, wurden für optimale Versuchsbedingungen verschiedene Verhältnisse getestet (1:1, 2:1, 3:1, 4:1).

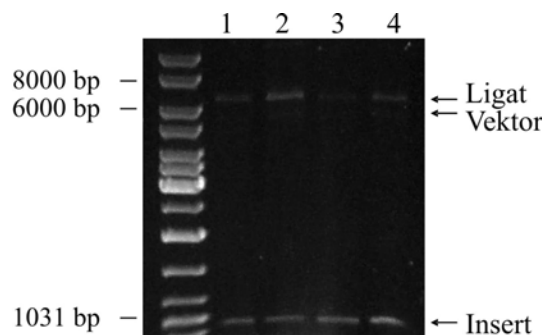


Abb. 91. Gelelektrophoretische Auftrennung des mit *NheI* linearisierten Ligationsansatzes. Neben dem Ligationsprodukt von $\sim 6,5$ kb sind zusätzlich unligierter Vektor bei $5,5$ kb und unligiertes Insert bei 930 bp erkennbar. Pro Spur wurden $2 \mu\text{l}$ des restringierten Ligationsansatzes aufgetragen. Die Spuren 1 bis 4 stellen vier verschiedene Ligationsansätze dar (Verhältnis Insert/Vektor: (1) 1:1, (2) 2:1, (3) 3:1, (4) 4:1).

Die über Nacht ligierten Ansätze werden nach Linearisierung mit *NheI* gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 91). Erkennbar sind neben dem Ligationsprodukt bei 6,4 kb der unligierte Vektor (5,5 kb) und unligiertes Insert (930 bp). Es zeigt sich, daß für die Ligation das Verhältnis von Insert zu Vektor von 2:1 zu den besten Resultaten führt. Auch der 4:1-Ansatz erweist sich als geeignet. Dagegen resultieren die Ansätze 1:1 und 3:1 in einer nicht zufriedenstellenden Ligation.

3.7.1.1.5 Transformation

Nach Transformation elektrokompenter *E.coli* XL10-Gold über Elektroporation werden nach Anlegen von Flüssigkulturen Plasmidpräparationen durchgeführt. Screening der Kolonien findet durch Restriktion mit *PstI* statt. Erwartete Massen betragen hierbei 2229 bp und 4058 bp (Abb. 92). Ausgewählte Klone werden zum Sequenzieren gegeben und nach Übereinstimmung mit der Originalsequenz sowie des korrekten Leserahmens für weitere Arbeiten verwendet.

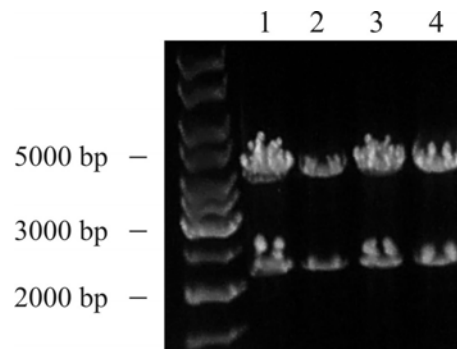


Abb. 92. Gelelektrophoretische Auftrennung der mit *PstI* restringierten Klone nach Transformation. Pro Spur wurden 10 µl des Restriktionsansatzes aufgetragen.

3.7.1.1.6 Vektorkarte

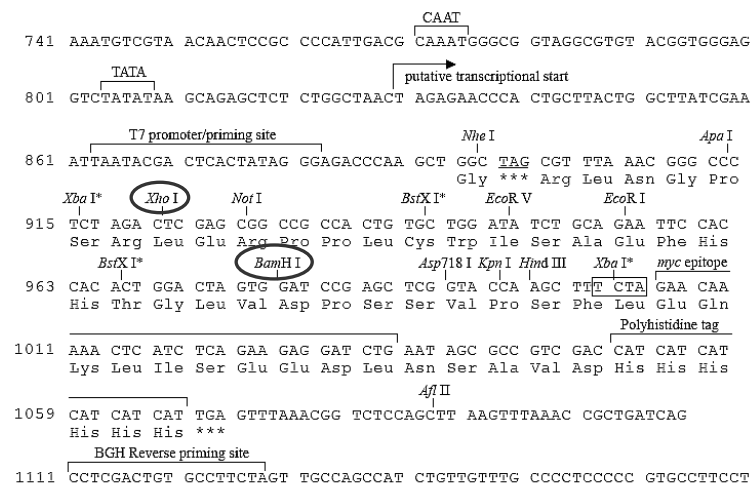


Abb. 93. Multiple Cloning Site des Vektors pcDNA3.1 B(-)myc/His. Die genetische Information für *Svap30* wurde 5' über *XhoI* und 3' über *BamHI* inseriert.

Die Multiple Cloning Site des Vektors pcDNA3.1 B(-)myc/His ist in Abbildung 93 wiedergegeben. Verwendete Restriktionsschnittstellen zum Einfügen der proteinkodierenden Sequenz des Svap30 sind die für XhoI und BamHI. Der myc-Tag befindet sich C-terminal von der inserierten proteinkodierenden Information.

3.7.1.2 Immunzytochemie

3.7.1.2.1 CHO-Zellen

Eine erste immunzytochemische Analyse wurde in CHO-Zellen durchgeführt, da dieser Zelltyp leichter zu transfizieren ist als die im Folgenden beschriebenen PC12-Zellen.

Die Transfektion von CHO-Zellen und anschließende Immunfärbung mit einem Antikörper gegen den myc-Tag ist in Abbildung 94 dargestellt. Die Immunfärbungen lassen erkennen, daß das myc-getagte Protein mit retikulären Strukturen assoziiert ist und eine punktuelle Verteilung besitzt, die sich bis auf den Kern im gesamten Zytoplasma nachweisen läßt. Entgegen der Lokalisationsvorhersage, wonach es sich um ein zytoplasmatisch lokalisiertes, lösliches Protein handeln soll, deutet die Immunfärbung auf eine Membranassoziation hin.

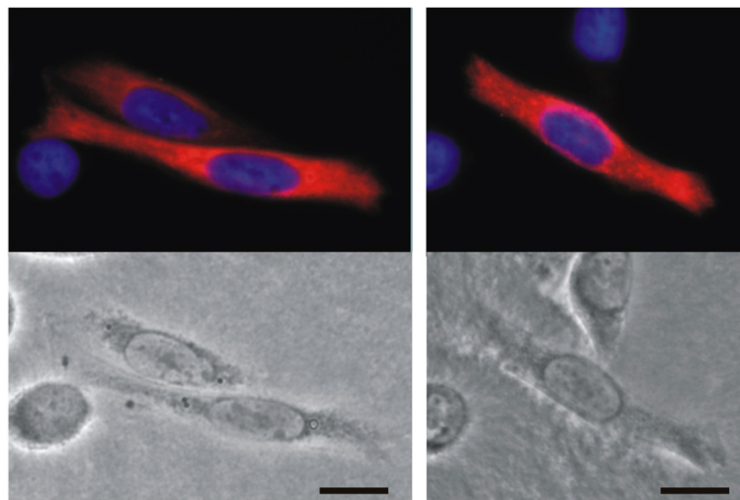


Abb. 94. Immunzytochemische Analyse des rekombinant exprimierten Proteins Svap30 in CHO-Zellen. Rot, myc-getagtes Svap30; blau, DAPI-Färbung. Es sind zwei transfizierte Zellen gezeigt. Balken: 10 µm.

Da aufgrund der Ergebnisse der Lokalisationsalgorithmen davon ausgegangen werden muß, daß das Protein zusätzlich zytosolisch lokalisiert ist, wurden die Zellen vor der Fixierung mit Stickstoff behandelt. Dadurch lassen sich die löslichen zytosolischen Proteinbestandteile auswaschen. Nach der Stickstoff-Behandlung ergibt sich eine deutlichere punktuelle Verteilung für Svap30 (Abb. 95). Die retikulären Strukturen sind nun klar erkennbar und

besser aufgelöst. Insbesondere um den Zellkern lassen sich diese Strukturen deutlich nachweisen.

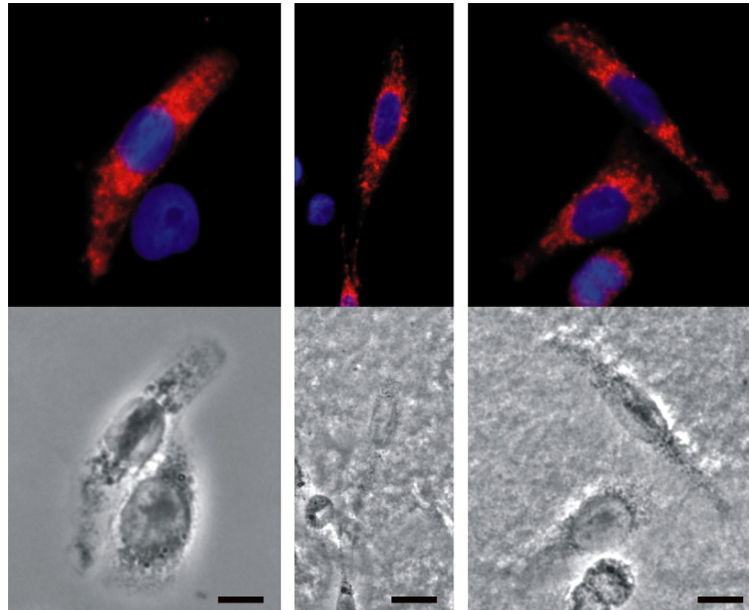


Abb. 95. Immunzytochemische Analyse des rekombinant exprimierten Proteins Svap30 in CHO-Zellen nach Stickstoff-Behandlung. Rot, myc-getagtes Svap30; blau, DAPI-Färbung. Es sind mehrere transfizierte Zellen gezeigt. Balken: 10 μm .

3.7.1.2.2 PC12-Zellen

Als Modell differenzierter, neuronaler Zellen kommen PC12-Zellen zum Einsatz, die mit NGF stimuliert wurden. In Abbildung 96 sind mehrere Svap30-exprimierende PC12-Zellen gezeigt.

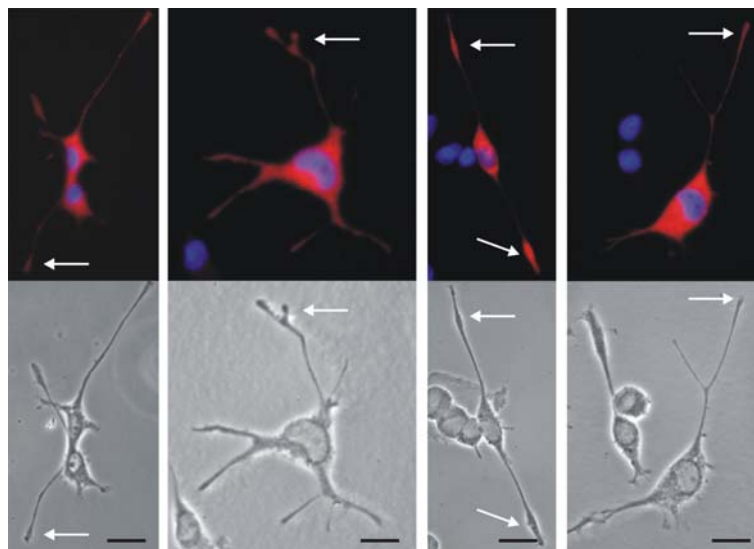


Abb. 96. Immunzytochemische Analyse des rekombinant exprimierten Proteins Svap30 in PC12-Zellen. Rot, myc-getagtes Svap30; blau, DAPI-Färbung. Es sind mehrere transfizierte Zellen gezeigt. Die Pfeile kennzeichnen Wachstumskegel der PC12-Zellen. Balken: 10 μm .

Wie bereits für die CHO-Zellen beschrieben, ergibt sich erneut das punktuelle Muster für Svap30, das sich neben dem Zytoplasma auch in den Neuriten und kräftig in den Wachstumskegeln der Zellen nachweisen lässt, die synaptischen Endigungen ähneln.

Als Kontrolle wurden PC12-Zellen mit dem leeren Vektor transfiziert (mock-Transfektion). Die Resultate sind in Abbildung 97 dargestellt. Bis auf die DAPI-Färbung wurde kein Signal nach Applikation des Antikörpers erhalten.

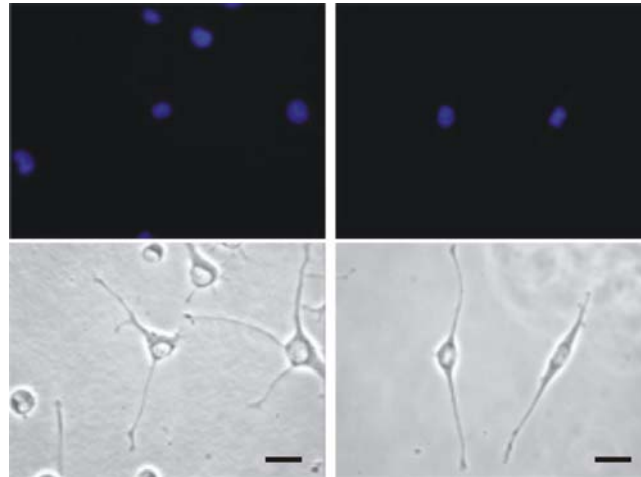


Abb. 97. Immunzytochemische Analyse mock-transfizierter PC12-Zellen. Blau, DAPI-Färbung. Balken: 10 µm.

3.7.1.2.3 Studien zur Kolo-kalisation mit endogenen Vesikelproteinen

Um Kolo-kalisationen des unbekanntes Proteins mit endogen exprimierten Vesikelproteinen zu untersuchen, wurden neben dem Nachweis des rekombinanten Svap30 Immunfärbungen von Synaptophysin (Abb. 98), Synaptoporin, Synaptotagmin und SCAMP 1 (Abb. 99) durchgeführt.

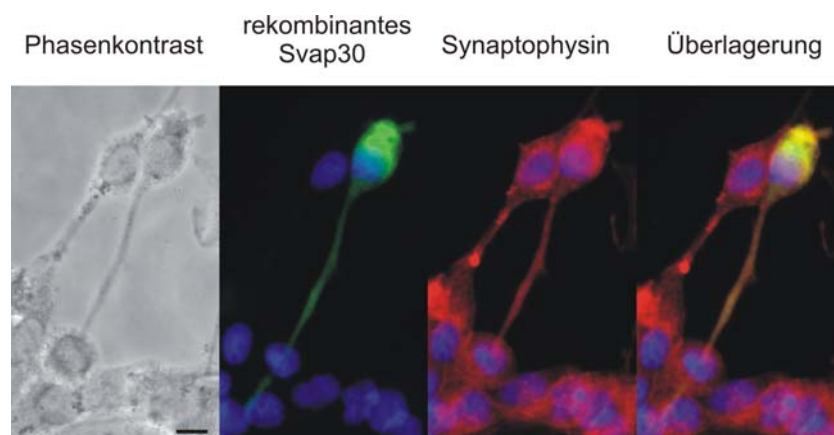


Abb. 98. Immunzytochemische Analyse der Lokalisation des rekombinant exprimierten Proteins Svap30 und des endogenen Synaptophysins mit Überlagerung beider Expressionsmuster in PC12-Zellen. Grün, myc-getagtes Svap30; rot, Synaptophysin; blau, DAPI-Färbung. Balken: 10 µm.

Die Analyse der intrazellulären Verteilung des endogen exprimierten integralen synaptischen Vesikelproteins Synaptophysin legt dar, daß Synaptophysin wie auch Svap30 ein punktuelltes Muster aufweist, das im gesamten Zytoplasma detektierbar ist und bis in die Neuriten und Wachstumskegel reicht. In diesen Bereichen zeigen beide Proteine eine hohe Abundanz und eine ähnliche Verteilung.

Die Analyse der integralen Vesikelproteine Synaptoporin, Synaptotagmin und SCAMP 1 (Abb. 99) ergibt für alle Proteine eine Überlappung bezüglich der intrazellulären Lokalisation der Vesikelproteine mit rekombinant exprimiertem Svap30. Es fällt auf, daß die endogen exprimierten Proteine neben der Lokalisation im Soma und den Wachstumskegeln auch in den Neuriten eine starke Präsenz zeigen, während Svap30 in den Neuriten weniger ausgeprägt lokalisiert ist. Zudem zeigen sich für Synaptoporin Zonen um den Zellkern, die vermutlich dem ER zuzuordnen sind, vergleichsweise intensiver markiert als für Svap30. Demgegenüber ist Svap30 in den ER-angrenzenden Zonen stärker vertreten als Synaptoporin, was in der dargestellten Überlagerung resultiert, die im Soma eine geringe Übereinstimmung zeigt, während in den Wachstumskegeln eine sehr ähnliche Verteilung nachzuweisen ist (siehe Pfeile).

Auch die somatische Verteilung des Synaptotagmins weicht von der des Svap30 ab. So sind zwar beide Proteine im Soma stark vertreten, jedoch reicht das Vorkommen von Svap30 bis zur Plasmamembran, während Synaptotagmin diesen Bereich weitestgehend ausspart. Auch in den Wachstumskegeln variiert die Proteinexpression (siehe Pfeile). Synaptotagmin ist im gesamten Wachstumskegel detektierbar, während Svap30 lediglich am Ende der Neuriten und schwach in der Bouton-Struktur nachweisbar ist. Die für Synaptotagmin ausgeprägte Verteilung innerhalb des Wachstumskegels zeigt sich für Svap30 nicht. Dennoch weisen beide Proteine im Neuritenende eine hohe Präsenz und eine sehr ähnliche Verteilung auf.

SCAMP 1 zeigt eine im Soma gleichmäßig verteilte Expression, die für die Zonen rund um den Zellkern für Svap30 nicht wiederzufinden ist. Wie bereits für Synaptoporin beschrieben, ist diese Zone ausgespart. Dafür weist Svap30 eine hohe Abundanz in der Nähe der Plasmamembran auf, die für SCAMP 1 nicht gegeben ist. Bezüglich der Neuriten und Wachstumskegel der Zellen läßt sich ein sehr vergleichbares Muster erkennen.

Einige Unterschiede in der zellulären Lokalisation von Svap30 im Vergleich zu endogenen integralen Vesikelproteinen können auf die Zelltransfektion zurückzuführen sein. Die Überproduktion von Svap30 könnte die subzelluläre Verteilung insbesondere im Soma beeinflussen.

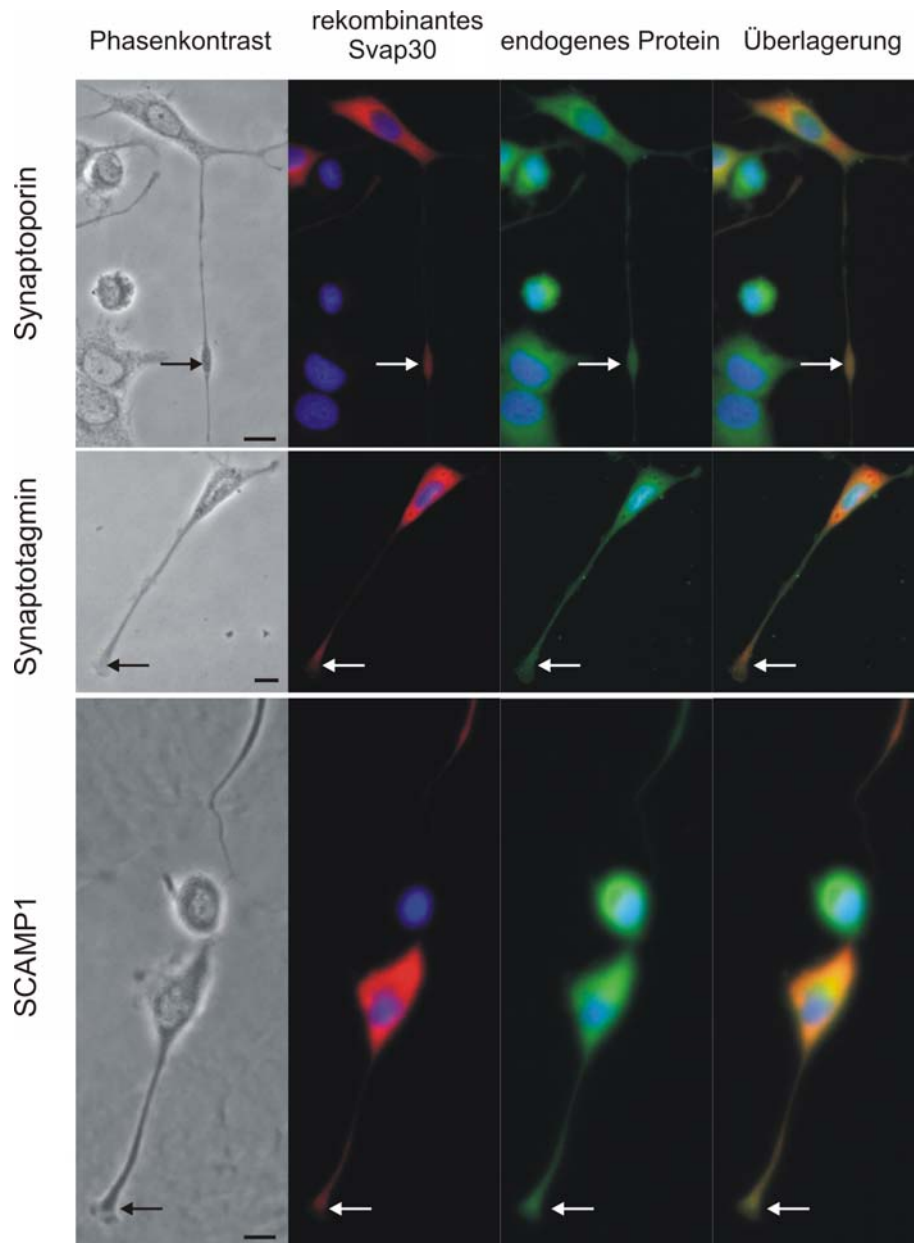


Abb. 99. Immunzytochemische Analyse der Lokalisation des rekombinant exprimierten Proteins Svap30 sowie der endogenen Proteine Synaptoporin, Synaptotagmin und SCAMP 1 mit Überlagerung der jeweiligen Expressionsmuster in PC12-Zellen. Rot, myc-getagtes Svap30; grün, endogene synaptische Vesikelproteine; blau, DAPI-Färbung. Die Pfeile kennzeichnen Wachstumskegel der PC12-Zellen. Balken: 10 μ m.

Zu den untersuchten nicht integralen synaptischen Vesikelproteinen gehören SNAP-25, die mitochondriale F-ATPase, das endoplasmatische Retikulumprotein ER60 und das peroxisomale Protein PMP70 (Abb. 100). SNAP-25 ist hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert und nur in geringen Mengen intrazellulär vorzufinden. Die Immunmarkierung

bestätigt dies. Demgegenüber ist Svap30 ausschließlich intrazellulär vorzufinden und zeigt daher auch nur in diesen Bereichen ein ähnliches Expressionsmuster wie SNAP-25.

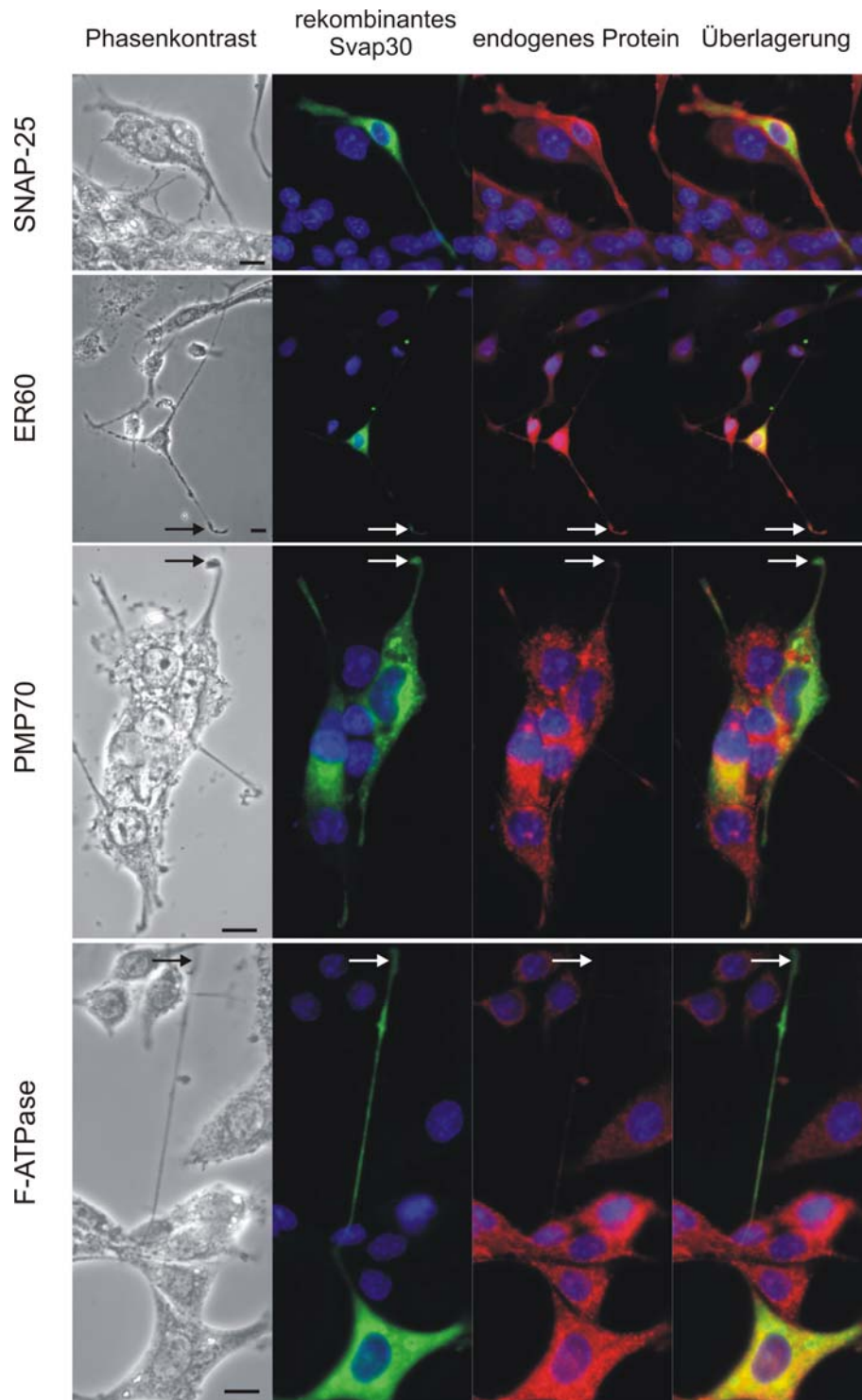


Abb. 100. Immunzytochemische Analyse der Lokalisation des rekombinant exprimierten Proteins Svap30 sowie der endogenen Proteine SNAP-25, ER60, PMP70 und der F-ATPase mit Überlagerung der jeweiligen Expressionsmuster in PC12-Zellen. Grün, myc-getagtes Svap30; rot, endogene Proteine; blau, DAPI-Färbung. Die Pfeile kennzeichnen Wachstumskegel der PC12-Zellen. Balken: 10 μ m.

ER60 ist in der gesamten Zelle lokalisiert und auch kräftig in den Neuriten und Wachstumskegeln nachweisbar. Demgegenüber zeigt Svap30 eine weniger starke Präsenz in den Neuriten, ist jedoch auch im Soma und in den Wachstumskegeln (siehe Pfeile) stark vorhanden. In diesen Zonen ergibt sich für beide Proteine eine ähnliche Verteilung.

Das Peroxisomenprotein PMP70 zeigt ein sehr punktuelltes Muster im Soma mit geringer Präsenz in den Neuriten und Wachstumskegeln. Die Verteilung von Svap30 im Soma ist dagegen auf andere Bereiche beschränkt und zeigt keine Ähnlichkeit mit dem Muster von PMP70. Die mitochondriale F-ATPase ist im Soma stark vertreten und zeigt insbesondere in der Nähe der Plasmamembran eine punktuelle Verteilung. Die Neuriten enthalten kaum F-ATPase. Die Verteilung von Svap30 im Soma ist zwar wie die der F-ATPase ubiquitär, weist aber deutliche Unterschiede im Muster auf, die in der Nähe der Plasmamembran besonders deutlich werden.

3.7.1.3 Membranassoziation

Mit Hilfe der Herstellung einer Membranfraktion transfizierter CHO-Zellen kann untersucht werden, inwieweit das Protein zytosolisch oder membranassoziiert vorliegt. Da die Immunzytologie bereits Indizien dafür geliefert hat, daß das Protein in zwei zellulären Lokalisationen vorliegt, wurde die Membranfraktion zusätzlich mit Salz und hohem bzw. niedrigem pH-Wert inkubiert, um mit den elektrostatischen Interaktionen des Proteins mit der Membran zu interferieren und das Protein gegebenenfalls von der Membran abzulösen.

Um die Spezifität der Membranfraktion hinsichtlich der Unterscheidung löslicher und integraler Membranproteine darzulegen, wurden mit Homogenat, Überstand und Membranpellet Immunanalysen gegen das lösliche Protein Erk-1/2 und das Transmembranprotein Synaptophysin durchgeführt (Abb. 101).

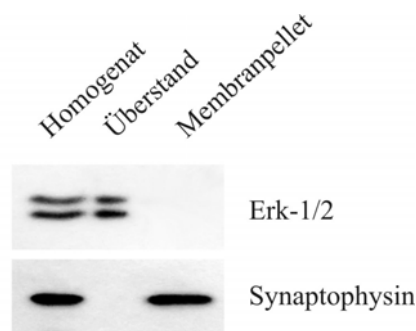


Abb. 101. Immunanalyse der Membranfraktion transfizierter CHO-Zellen für Erk-1/2 (42 und 44 kDa) und Synaptophysin (38 kDa). Pro Spur wurden äquivalente Volumina elektrophoretisch aufgetrennt.

Das lösliche Protein Erk-1/2 kann erwartungsgemäß ausschließlich in Homogenat und Überstand nachgewiesen werden. Demgegenüber findet sich das integrale Vesikelprotein Synaptophysin in Homogenat und Membranpellet wieder, während der lösliche Überstand frei von Protein ist.

Die Ergebnisse der Membranfraktion Svap30-exprimierender CHO-Zellen sind in Abbildung 102 dargelegt. Svap30 läßt sich sowohl im Membranpellet als auch im zytoplasmatischen Überstand des Zellextraktes bei ~30 kDa detektieren und bestätigt damit die Ergebnisse der Immunzytochemie. Zudem scheint es in nahezu äquimolaren Verhältnissen zytosolisch und membranassoziiert vorzuliegen. Beeinträchtigungen der Membranbindung durch Interferenz mit der elektrostatischen Bindung führen im Fall von hohen Konzentrationen an Salz zu keiner Dissoziation von der Membran. Gleiches gilt für niedrige pH-Werte. In beiden Fällen sind ausschließlich im Membranpellet Immunsignale detektierbar. Demgegenüber führt die Behandlung mit hohen pH-Werten zu einer Dissoziation des Proteins von der Membran.

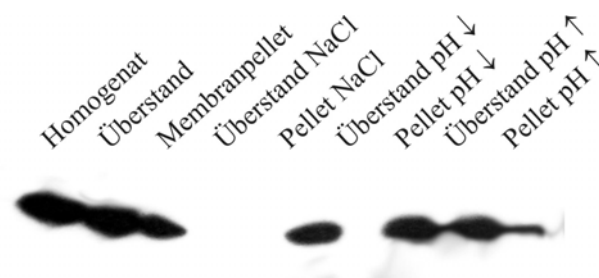


Abb. 102. Analyse der Membranfraktion Svap30-transfizierter CHO-Zellen. Pro Spur wurden äquivalente Volumina aufgetragen.

3.7.1.4 Gewebespezifität

Gewebespezifische Analysen lassen sich nach Aufreinigung von RNA aus diversen Geweben erzielen. Da die Konzentration der spezifischen, zu untersuchenden mRNA jedoch in den meisten Fällen unzureichend für direkte Analysen per Gelelektrophorese oder Hybridisierungen ist, folgt im Anschluß an die RNA-Isolation meist ein Umschreiben der mRNA in DNA über RT-PCR, die als Methode zur quantitativen Analyse von Genexpressionen einsetzbar ist.

Vor Durchführung der Reaktion ist es jedoch nötig, die Integrität der aufgereinigten RNA zu überprüfen. Dies geschieht durch gelelektrophoretische Auftrennung der RNA im denaturierenden Agarosegel (Abb. 103). Da mindestens 200 ng RNA aufgetragen werden müssen, um durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden zu können,

erweisen sich lediglich die RNA-Isolate aus Milz, Lunge und Niere nach spektrometrischer Konzentrationsabschätzung als hinreichend konzentriert und wurden als Referenzdaten für die RNA-Integrität aller isolierten Ribonukleinsäuren verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung läßt in allen Proben zwei deutliche Banden bei 5 kb und 2,5 kb erkennen. Diese entsprechen der 28S und 18S rRNA. Zusätzlich sind im niedrigen Molekulargewichtsbereich viele verschiedene Banden erkennbar, die die heterogene mRNA sowie andere Ribonukleinsäurespezies wiedergeben. Die Unschärfe im unteren Gelbereich stellt vermutlich degradierte RNA dar. Zusammenfassend ist die Qualität der RNA für die RT-PCR ausreichend.

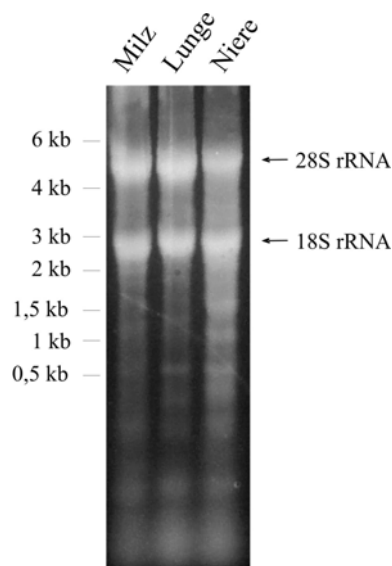


Abb. 103. Gelelektrophoretische Überprüfung der RNA-Integrität. 25 µg der aufgereinigten RNA von Milz, Lunge und Niere wurden pro Spur elektrophoretisch getrennt. Die Banden für 18S und 28S rRNA sind markiert.

Ist die RNA-Integrität gewährleistet, wird die gereinigte Ribonukleinsäure auf genomische DNA-Kontaminationen untersucht, da diese neben der RNA Quelle für Amplifikationen per PCR bilden und die Analyse der Gewebeexpression verfälschen können. Für diese Analyse wurde 1 µg RNA über BiP-Primer amplifiziert (Abb. 104).

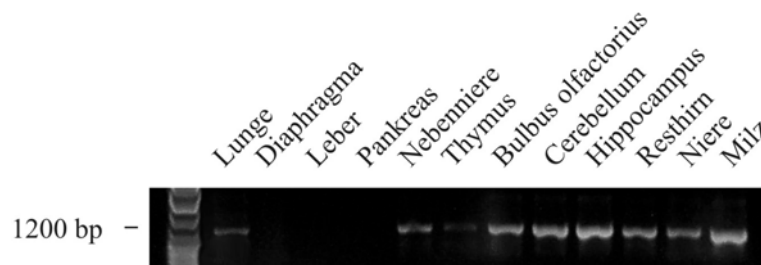


Abb. 104. PCR vor DNase I-Behandlung. 1 µg RNA wurde über BiP-Primer amplifiziert. Pro Spur wurden 4 µl des Reaktionsansatzes elektrophoretisch aufgetrennt.

Die BiP-Primer sind so gewählt, daß sie durch Überspannung von Introns zwischen genomischer DNA und cDNA differenzieren können. Genomische DNA führt zu einem

Amplifikat von 1200 bp, cDNA zu 500 bp. In neun der zwölf RNA-Isolaten werden Amplifikate von 1200 bp erhalten, die aufgrund von Verunreinigungen mit genomischer DNA entstehen. Lediglich Diaphragma, Leber und Pankreas erweisen sich als DNA-frei.

Zur Entfernung der genomischen DNA-Kontaminationen werden die RNA-Isolate einer DNase I-Behandlung in Anwesenheit von RNase-Inhibitoren unterzogen. Um die DNase I aus der Probe zu entfernen, werden die Proben anschließend mit LiCl präzipitiert und nach Konzentrationsbestimmung (Tabelle 25) einer Amplifikation über BiP-Primern zugeführt.

Gewebe	Reinheit	Konzentration [ng/ μ l]
Lunge	1,83	264
Diaphragma	1,81	304
Leber	1,75	488
Pankreas	1,65	56
Nebenniere	1,8	72
Thymus	1,56	1208
Bulbus olfactorius	1,98	64
Cerebellum	1,67	1800
Hippocampus	1,63	208
Resthirn	1,85	192
Niere	1,82	248
Milz	1,69	216

Tabelle 25. Reinheits- und Konzentrationsbestimmung für die zwölf präparierten Ribonukleinsäuren.

Die PCR-Resultate der DNase I-behandelten und mit Lithiumchlorid präzipitierten RNA-Proben erweisen sich als frei von DNA (Abb. 105). In keinem der zwölf Gewebe wurden Amplifikate für das ER-Bindeprotein BiP erhalten. Daß die ausbleibende Amplifikation kein Fehler des PCR-Programms oder des Reaktionsansatzes war, läßt sich dadurch zeigen, daß ausgehend von genomischer DNA mit dem gleichen Versuchsansatz und dem gleichen PCR-Programm ein Amplifikat von 1200 bp erhalten wurde (Abb. 106). Die RNA-Isolate können daher als Vorlage für die RT-PCR eingesetzt werden.

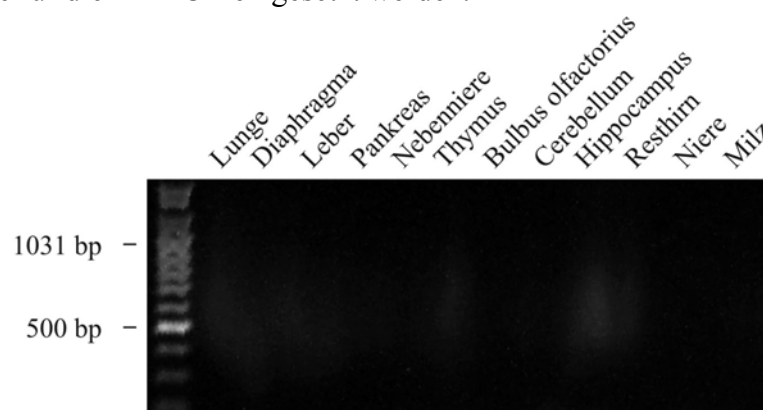


Abb. 105. Kontroll-PCR zur Überprüfung der Effizienz der DNase I-Behandlung mit BiP-Primern ausgehend von RNA-Proben verschiedener Gewebe. Pro Spur wurden 4 μ l des PCR-Absatzes elektrophoretisch aufgetrennt.

Für eine quantitative Analyse der Genexpression ist es unerlässlich, interne Kontrollen zur Normierung durchzuführen. Dies wird durch Einsatz gleicher Ausgangskonzentrationen an RNA, Amplifikation und Umschreiben der mRNA für das Haushaltsprotein BiP erreicht, dessen Expression in allen Geweben annähernd gleiche Werte aufweisen sollte. Um die Vergleichbarkeit zwischen den Amplifikationen für BiP und der gewünschten mRNA zu gewährleisten, werden alle Reaktionen ausgehend von einem Mastermix durchgeführt. Als zusätzliche Kontrollen werden eine Amplifikation mit Wasser sowie PCR-Reaktionen ausgehend von cDNA und genomischer DNA durchgeführt, die die Durchführbarkeit des PCR-Programms und des Reaktionsansatzes demonstrieren.

Die Amplifikationsreaktionen für das Bindeprotein BiP sind in Abbildung 106 wiedergegeben. Die Expressionslevel des Haushaltsgens sind in allen analysierten Geweben nahezu identisch und können daher als Referenz verwendet werden. Die RNA aus Pankreas resultiert in keinem Produkt und ist daher vermutlich degradiert worden. Die Wasserkontrolle führt erwartungsgemäß zu keinem Amplifikat. Zusätzlich zeigen die erhaltenen Banden der Amplifikationsreaktionen ausgehend von cDNA (576 bp) und genomischer DNA (1144 bp), daß das PCR-Programm sowie die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes korrekt waren.

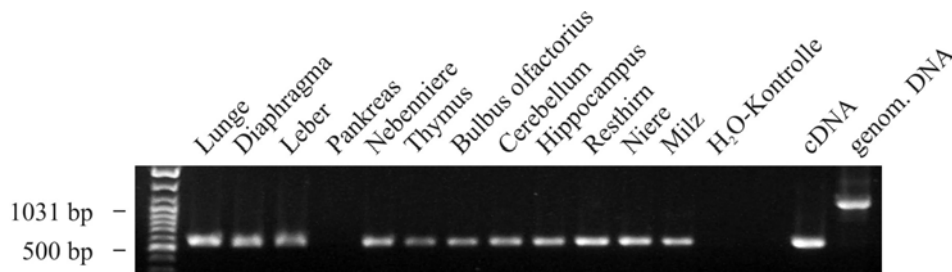


Abb. 106. RT-PCR der isolierten Ribonukleinsäuren aus 12 verschiedenen Geweben, der Wasserkontrolle sowie PCR-Reaktionen ausgehend von cDNA und genomischer DNA mit BiP-Primern. Pro Spur wurden 4 μ l des PCR-Ansatzes elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Ergebnisse der Amplifikationen für das Svap30-Gen (RIKEN cDNA 1200015A19) demonstrieren, daß es sich um ein ubiquitär exprimiertes Gen handelt (Abb. 107).

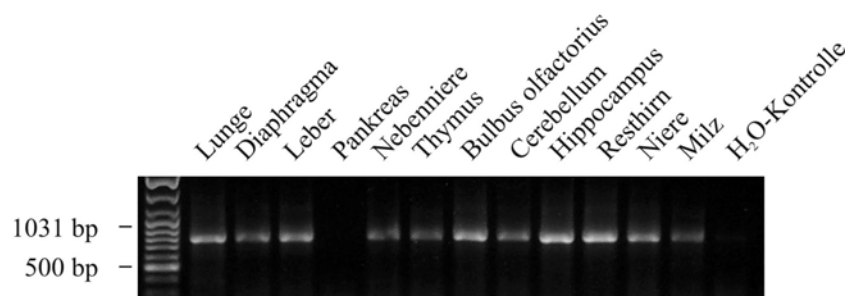


Abb. 107. RT-PCR der isolierten Ribonukleinsäuren aus 12 verschiedenen Geweben und der Wasserkontrolle mit RIKEN-Primern. Pro Spur wurden 4 μ l des PCR-Ansatzes elektrophoretisch aufgetrennt.

Ein Vergleich der Expressionen resultiert in leicht schwankenden Werten für die getesteten Gewebe. Genexpressionen sind stärker in Lunge, Leber, Bulbus olfactorius, Hippocampus, Resthirn und Niere nachweisbar. Diaphragma, Nebenniere, Thymus, Cerebellum und Milz zeigen demgegenüber niedrigere Expressionen. Im Pankreas ist durch die bereits beschriebene RNA-Degradation keine Expression nachweisbar. Die Wasserkontrolle resultiert erwartungsgemäß in keiner Amplifikation.

3.7.2 SV35

Das abgeleitete Protein ist aus 288 Aminosäuren aufgebaut, die eine errechnete molekulare Masse von 34535 Da ergeben. Der isoelektrische Punkt liegt bei 8,65, der Gravy-Score beträgt 0,384. Die Ergebnisse verschiedener Algorithmen zur Vorhersage von Transmembranhelices sind in Abbildung 108 gezeigt.

SOSUI	TMpred		TMHMM
	N-Terminus außen	N-Terminus innen	N-Terminus innen
088 - 110	087 - 110	089 - 111	089 - 111
115 - 137	115 - 136	118 - 136	116 - 138
152 - 174	151 - 170	151 - 170	151 - 173
188 - 210	187 - 210	187 - 205	188 - 210
222 - 244	222 - 242	222 - 242	223 - 242
254 - 276	246 - 268	250 - 268	246 - 268

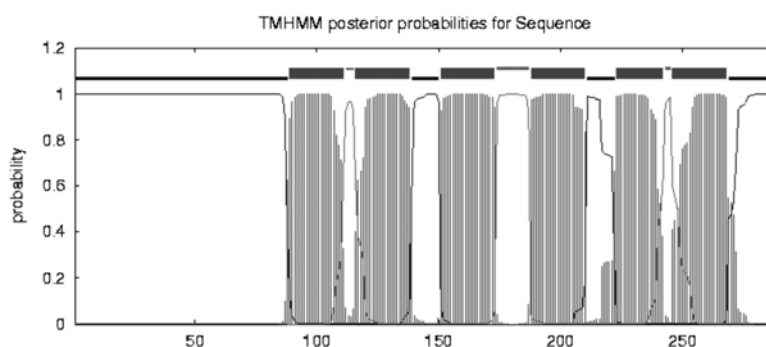


Abb. 108. Ergebnisse der Algorithmen SOSUI, TMpred, TMHMM und PredictProtein für die Vorhersage von Transmembranhelices. N-Terminus innen kennzeichnet einen zytoplasmatisch lokalisierten Terminus, N-Terminus außen entsprechend einen intravesikulären Terminus.

Allen Vorhersagen ist das Vorhandensein von sechs Transmembranhelices eigen, die im C-terminalen Teil des Proteins liegen. Die Algorithmen liefern unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Topologie des Proteins. TMpred (EMBNET-CH) führt zu einer gleichen Wahrscheinlichkeit der Lokalisation des N-Terminus innen oder außen. TMHMM (CBS, Dänemark) und PredictProtein (Columbia University, USA) präferieren hingegen das Modell mit einem zytoplasmatisch lokalisierten N-Terminus. SOSUI (TUAT, Japan) liefert keine Topologie-Daten. Die Motivsuche über PredictProtein ergibt mögliche

Serinphosphorylierungsstellen für Protein Kinase C an Serin 7, 72, 177 und 214 sowie Tyrosinphosphorylierungsstellen an Position 76. Vorhergesagte Myristoylierungsstellen umfassen die Aminosäuren 67, 196, 228 und 256.

```

Rattus      MEGEVARSQLESLNSVSSWCLLCLLCHQHFGSDAPRTDIYVPCLPDGGHGWPQQGSNA
Mus        -----
Bos        -----
Homo       -----

Rattus      KVLQVSVLSVNVSCDAVSFSGVLLRTPPEEKCVADDLLRSRREVAENTSTPTMQALLTAE
Mus        -----
Bos        -----
Homo       -----

Rattus      RTPRSLAKRNPERKPTGYCRKKTGRIPLNNEGIGMLERPVCPPWFPSGSWDKVAASLGSPD
Mus        -----
Bos        -----
Homo       -----

Rattus      PPCKCGKLAGSEVKNRALSPPRSLALRTRVSIIVRFASGRICSPGTMERAPGSERRSPP
Mus        -----MEPALGSERRSPP
Bos        -----METAAGSERRSTP
Homo       -----MEPAAGIQRSSQ
                ** * * :***.

Rattus      GPGVPRPPPRGHAPSTAAPAPNP--APLSSSMQPDEERQPRISESGQFSDGFEDRGLLES
Mus        GPGVPRPPPRGHAPSTAAPAPSP--APMSSSVQSDEERQPRISESGQFSDGLEDRGLLES
Bos        GPAPV-PPPRGHAPLATASG--PLSSPAREPPQPEEERQLRISESGQFSDGLEDRGLLES
Homo       GPTVP-PPPRGHAPPAAPGPAPLSSPVREPPQLEEEERQVRISESGQFSDGLEDRGLLES
                ** * * ***** :*. . * :* . . * :*** *****:*****

Rattus      STRLKPHEAQNYRKKALWVSWLSIIIVTLALAVAAFTVSMRYASAFGFADFDAILDVLSS
Mus        STRLKPHEAQNYRKKALWVSWLSIIIVTLALAVAAFTVSMRYASAFGFADFDAILDVLSS
Bos        STRLKPHEAQNYRKKALWVSWFSIIIVTLALAVAAFTVSMRYASAFGFADFDAILDVLSS
Homo       STRLKPHEAQNYRKKALWVSWFSIIIVTLALAVAAFTVSMRYASAFGFADFDAILDVLSS
                *****:*****

Rattus      AIVLWRYSNAAAVHSAHREYIACVILGVIFLLSSICIVVKAIHDLSTRLLPEVDDFLFSV
Mus        AIVLWRYSNAAAVHSANREYIACVILGVIFLLSSICIVVKAIHDLSTRLLPEVDDFLFSV
Bos        AIVLWRYSNAAAVHSAHREYIACVILGVIFLLSSVICIVVKAIHDLSTKLLPEVDDFLFSV
Homo       AIVLWRYSNAAAVHSAHREYIACVILGVIFLLSSICIVVKAIHDLSTRLLPEVDDFLFSV
                *****:*****:*****:*****

Rattus      SILSGILCSVLAVLKFMLGKVLTSRALITDGFNSLVGGVMGFSILLSAEVFKHNAAVWYL
Mus        SILSGILCSVLAVLKFMLGKVLTSRALITDGFNSLVGGVMGFSILLSAEVFKHNAAVWYL
Bos        SILSGILCSILAVLKFMLGKVLTSRALITDGFNSLVGGVMGFSILLSAEVFKHNSAVWYL
Homo       SILSGILCSILAVLKFMLGKVLTSRALITDGFNSLVGGVMGFSILLSAEVFKHNSAVWYL
                *****:*****:*****

Rattus      DGSIGVLIGLTIFAYGVKLLIDMVPRVRQTRHYEMFE
Mus        DGSIGVLIGLTIFAYGVKLLIDMVPRVRQTRHYEMFE
Bos        DGSIGVLIGLTIFAYGVKLLIDMVPRVRQTRHYEMFE
Homo       DGSIGVLIGLTIFAYGVKLLIDMVPRVRQTRHYEMFE
                *****

```

Abb. 109. Sequenzvergleiche des SV35-Gens für *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Bos taurus* und *Homo sapiens*. Identische Aminosäuren sind durch Sterne gekennzeichnet, ähnliche durch einen Doppelpunkt.

Studien zur putativen Funktion über Psi/Phi-Blast weisen Ähnlichkeiten mit bakteriellen Cobalt/Zink/Cadmium-Kationentransportern auf. Man vermutet, daß diese Proteine Effluxpumpen darstellen, die Kationen aus der Zelle befördern. Der SMART-Algorithmus resultiert in der Identifikation einer PH-Domäne unter der Signifikanzschwelle. Analysen hinsichtlich der zellulären Lokalisation des Proteins ergeben keine signifikanten Aussagen.

Ähnliche Sequenzen sind in Archaea, Bacteria, Metazoa und Fungi bekannt. In Abbildung 109 sind Sequenzvergleiche mit *Mus musculus*, *Bos taurus* und *Homo sapiens* dargestellt. Diese Daten sind Ausgangspunkt für das Design des zu synthetisierenden Gens.

Die Sequenz des putativen Proteins aus Ratte ist deutlich länger als die korrespondierenden Sequenzen aus Maus, Rind und Mensch. Aufgrund der großen Ähnlichkeit der Sequenzen ab Aminosäure 227 wurde dieser Teil zum Gendesign verwendet.

3.7.2.1.1 Design des synthetischen Gens

Die Amplifikation des SV35-Gens (DKFZp566N034) ausgehend von RNA-Isolationen hat sich als sehr problematisch und letztendlich als nicht durchführbar erwiesen. Daher wurde die Firma Epoch Biolabs (Texas, USA) zu einer Synthese des Gens herangezogen. Eine Analyse der Genstruktur ist in Abbildung 110 gezeigt. Insbesondere der N-terminale Teil des Proteins weist starke Haarnadelstrukturen auf. Das Design des Gens ist zusammen mit der Klonierungsstrategie in Abb. 111 wiedergegeben.

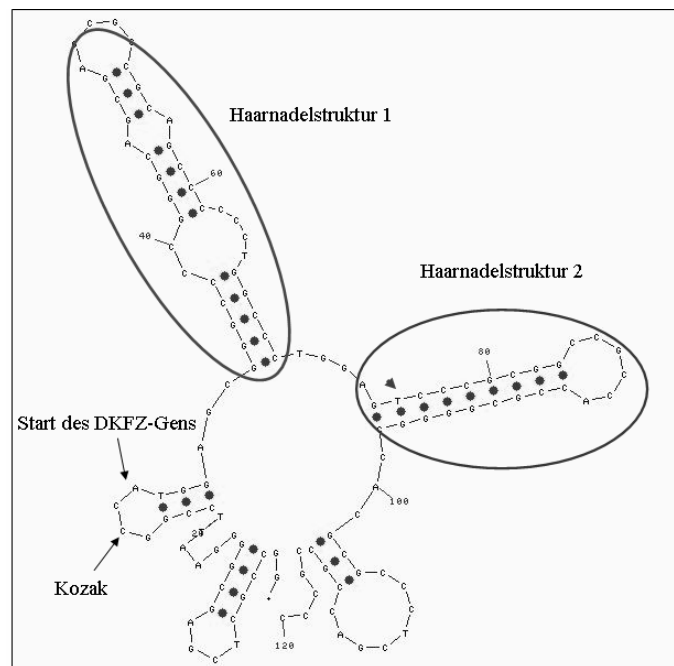


Abb. 110. Strukturanalyse des SV35-Gens.

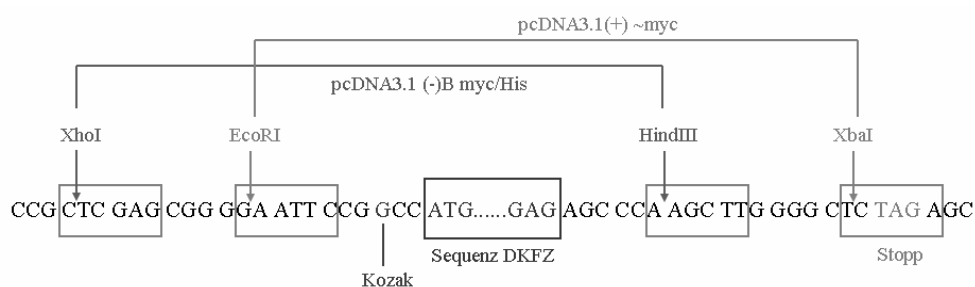


Abb. 111. Klonierungsstrategie und Gendesign für die Synthese des SV35-Gens.

3.7.2.1.2 Einfügen eines N-terminalen myc-tags in pcDNA3.1(+)

Der Vektor pcDNA3.1(+) enthält keinen Marker für eine spätere Detektion des Proteins. Da ein Vektor mit N-terminalem Tag für das SV35-Gen benötigt wird, wird der vorhandene Vektor mit HindIII und BamHI restringiert und das Myc-Epitop über Oligonukleotide eingefügt. Der modifizierte Vektor wird mit pcDNA3.1(+)-myc bezeichnet.

3.7.2.1.3 Klonierung in Vektoren mit N- und C-terminalem Tag

Für die Klonierung in den Vektor pcDNA3.1(+)-myc werden die DNA und das synthetische Gen mit EcoRI und XbaI restringiert. Für die Verwendung des Vektors pcDNA3.1 B(-) myc/His wird mit XhoI und HindIII geschnitten. Die ligierten Konstrukte werden nach Transformation elektrokompenter *E. coli* und Restriktion der DNA kultivierter Kolonien hinsichtlich des Vorhandenseins des gewünschten Konstruktes analysiert (Abb. 114). In Spur 1 bis 4 sind die analytischen Restriktionen von vier Klonen des pcDNA3.1 B(-) myc/His~SV35-Vektors, in Spur 5 bis 8 von vier Klonen des pcDNA3.1(+)-myc~SV35-Vektors dargestellt. Nach Restriktion mit MluI werden Banden bei ~1580 bp und ~4760 bp erwartet, die in den Spuren 2, 5, 6 und 8 wiederzufinden sind. Die Klone 2 und 8 wurden zum Sequenzieren gegeben und anschließend für die Transfektion von PC12- und CHO-Zellen eingesetzt.

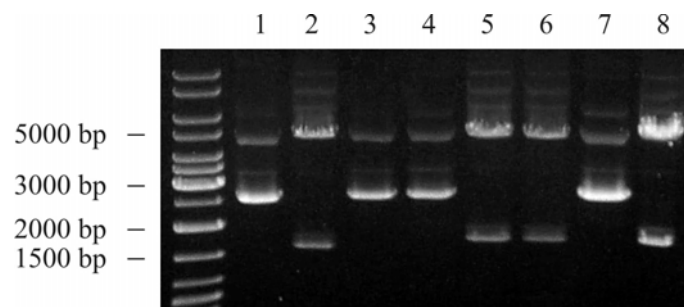


Abb. 114. Screen transformierter *E. coli* hinsichtlich der Plasmide nach Restriktion mit MluI. Spuren 1 bis 4 enthalten pcDNA3.1 B(-)myc/His~SV35, Spuren 5 bis 8 pcDNA3.1(+)-myc~SV35.

3.7.2.1.4 Vektorkarte

Die Multiple Cloning Site des Vektors pcDNA3.1(+) ist in Abbildung 115 dargestellt. Der myc-Tag wurde über HindIII und BamHI eingefügt. Die genetische Information für SV35 ist durch Restriktion mit EcoRI und XbaI inseriert worden.

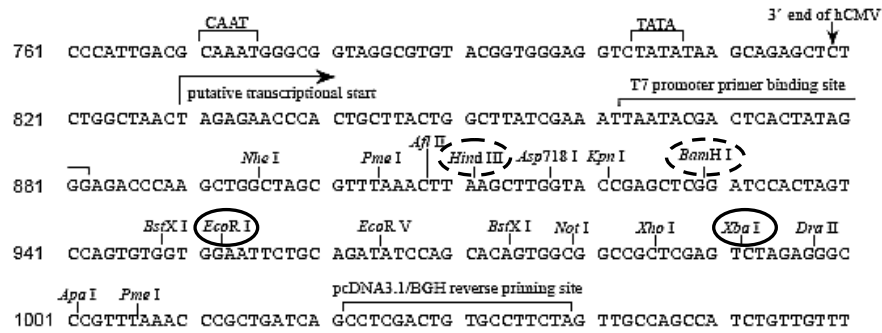


Abb. 115. Multiple Cloning Site des Vektors pcDNA3.1 (+). Der myc-Tag wurde 5' über HindIII und 3' über BamHI, das SV35-Gen 5' über EcoRI und 3' über XbaI inseriert.

Die Multiple Cloning Site des Vektors pcDNA3.1 B(-)myc/His ist in Abbildung 116 wiedergegeben. Verwendete Restriktionsschnittstellen zum Klonieren des SV35-Gens sind die für XhoI und HindIII. Der myc-Tag befindet sich C-terminal von der inserierten proteinkodierenden Information.

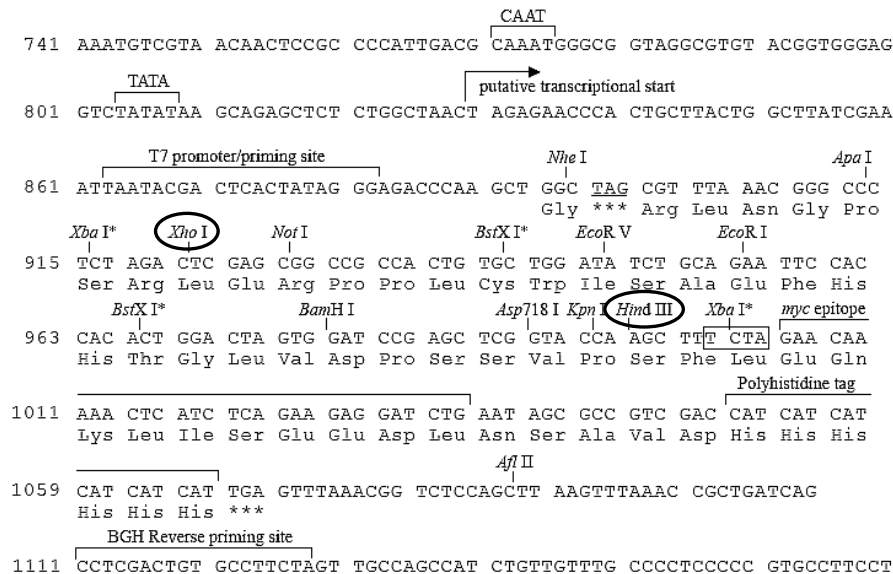


Abb. 116. Multiple Cloning Site des Vektors pcDNA3.1 B(-)myc/His. Das SV35-Gen wurde 5' über XhoI und 3' über HindIII inseriert.

3.7.2.2 Immunzytochemie

3.7.2.2.1 CHO-Zellen

Die Transfektion von CHO-Zellen mit dem C-terminal (Abb. 117) bzw. N-terminal markierten SV35 (Abb. 118) und anschließende Immunmarkierung über einen myc-Antikörper demonstriert eine Assoziation beider Konstrukte mit retikulären Strukturen. Die punktuelle Verteilung des Proteins erstreckt sich bis auf den Zellkern über das gesamte Zytoplasma. Eine geringfügig höhere Abundanz läßt sich um den Kern nachweisen.

Vergleicht man beide Konstrukte, so sind bezüglich des Proteinmusters keine Unterschiede erkennbar.

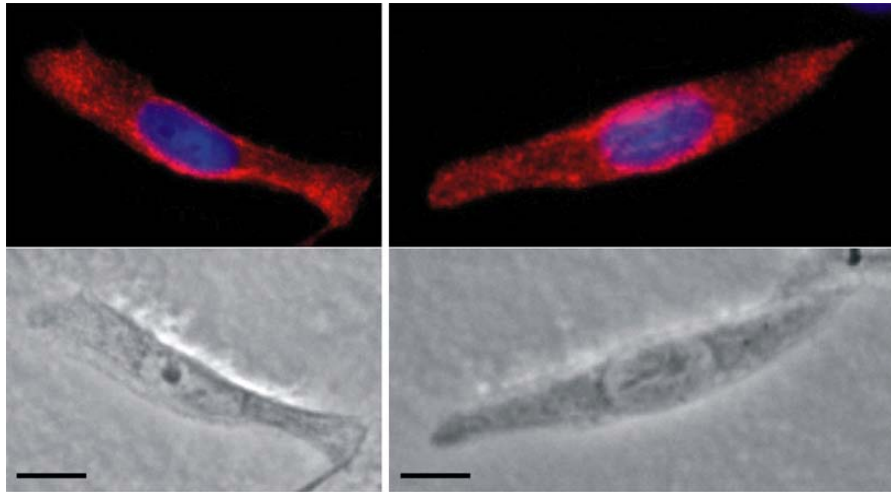


Abb. 117. Immunocytochemische Analyse des rekombinant exprimierten Proteins SV35 in CHO-Zellen. Rot, C-terminal myc-getagtes SV35; blau, DAPI-Färbung. Es sind zwei transfizierte Zellen gezeigt. Balken: 20 μm .

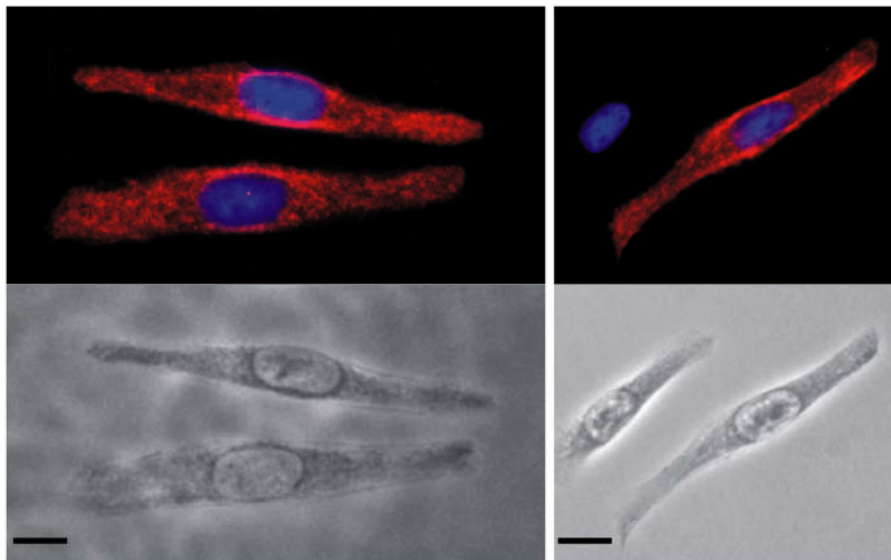


Abb. 118. Immunocytochemische Analyse des rekombinant exprimierten Proteins SV35 in CHO-Zellen. Rot, N-terminal myc-getagtes SV35; blau, DAPI-Färbung. Es sind drei transfizierte Zellen gezeigt. Balken: 20 μm .

3.7.2.2.2 PC12-Zellen

Die Transfektion von PC12-Zellen ergibt die in Abbildung 119 dargestellten Resultate. Wie bereits für die CHO-Zellen beschrieben, zeigt sich erneut das punktuelle Muster des Proteins, das sich neben der Lokalisation im Zytoplasma auch in den Neuriten und kräftig in den Wachstumskegeln (siehe Pfeile) der Zellen nachweisen läßt, die synaptischen Endigungen ähneln. Die Lokalisation im Zytoplasma beschränkt sich besonders auf die Regionen um den Zellkern. In der Nähe der somatischen Plasmamembran ist deutlich weniger Protein nachweisbar.

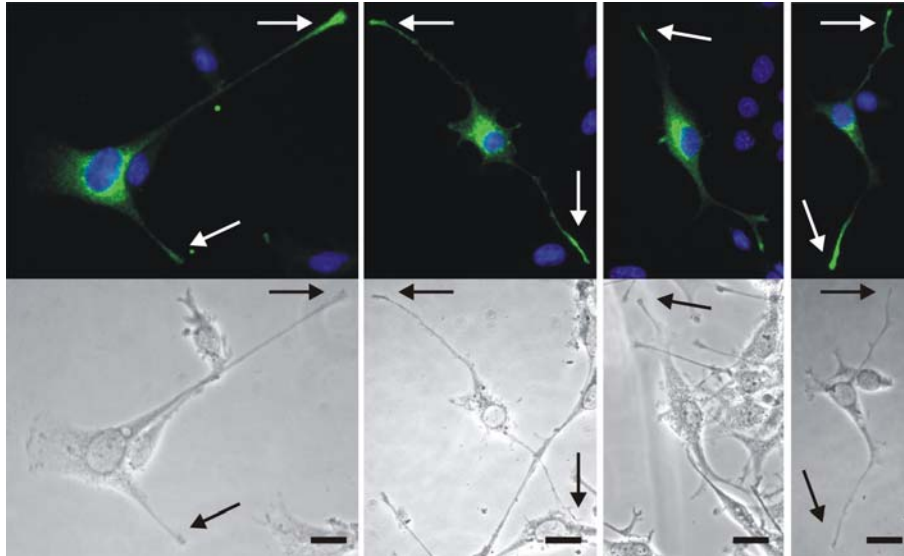


Abb. 119. Immunzytochemische Analyse des rekombinant exprimierten Proteins SV35 in PC12-Zellen. Grün, myc-getagtes SV35; blau, DAPI-Färbung. Es sind vier transfizierte Zellen gezeigt. Pfeile kennzeichnen Wachstumskegel der PC12-Zellen. Balken: 10 μ m

Als Kontrolle werden PC12-Zellen mit dem leeren Vektor transfiziert (mock-Transfektion) (Abb. 120). Bis auf die DAPI-Färbung ist nach Applikation des Antikörpers kein Signal detektierbar.

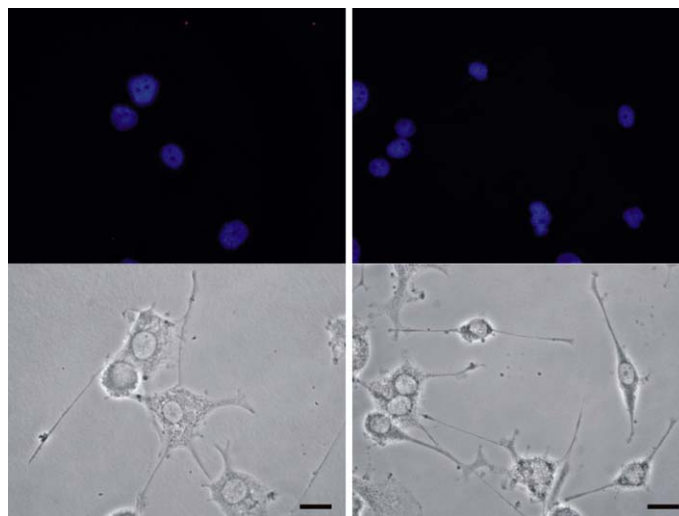


Abb. 120. Immunzytochemische Analyse mock-transfizierter PC12-Zellen. Blau, DAPI-Färbung. Balken: 10 μ m.

3.7.2.2.3 Studien zur Kollokalisierung mit endogenen Vesikelproteinen

Untersuchungen des nach Transfektion exprimierten Proteins SV35 hinsichtlich der intrazellulären Verteilung und Überlappung mit endogen exprimierten synaptischen Vesikelproteinen umfassen Analysen der Proteine Synaptoporin, Synaptotagmin und des vesikulären Neurotransmittertransporters vAChT (Abb. 121). Endogen exprimiertes Synaptoporin ist gleichmäßig in der gesamten Zelle detektierbar. Demgegenüber weist SV35

eine eingeschränkte Verteilung auf, die sich insbesondere auf Bereiche um den Zellkern und die Wachstumskegel (siehe Pfeile) beschränkt. Weniger kräftig ist es auch in anderen intrazellulären Bereichen nachweisbar und zeigt insgesamt eine sehr punktuelle Verteilung.

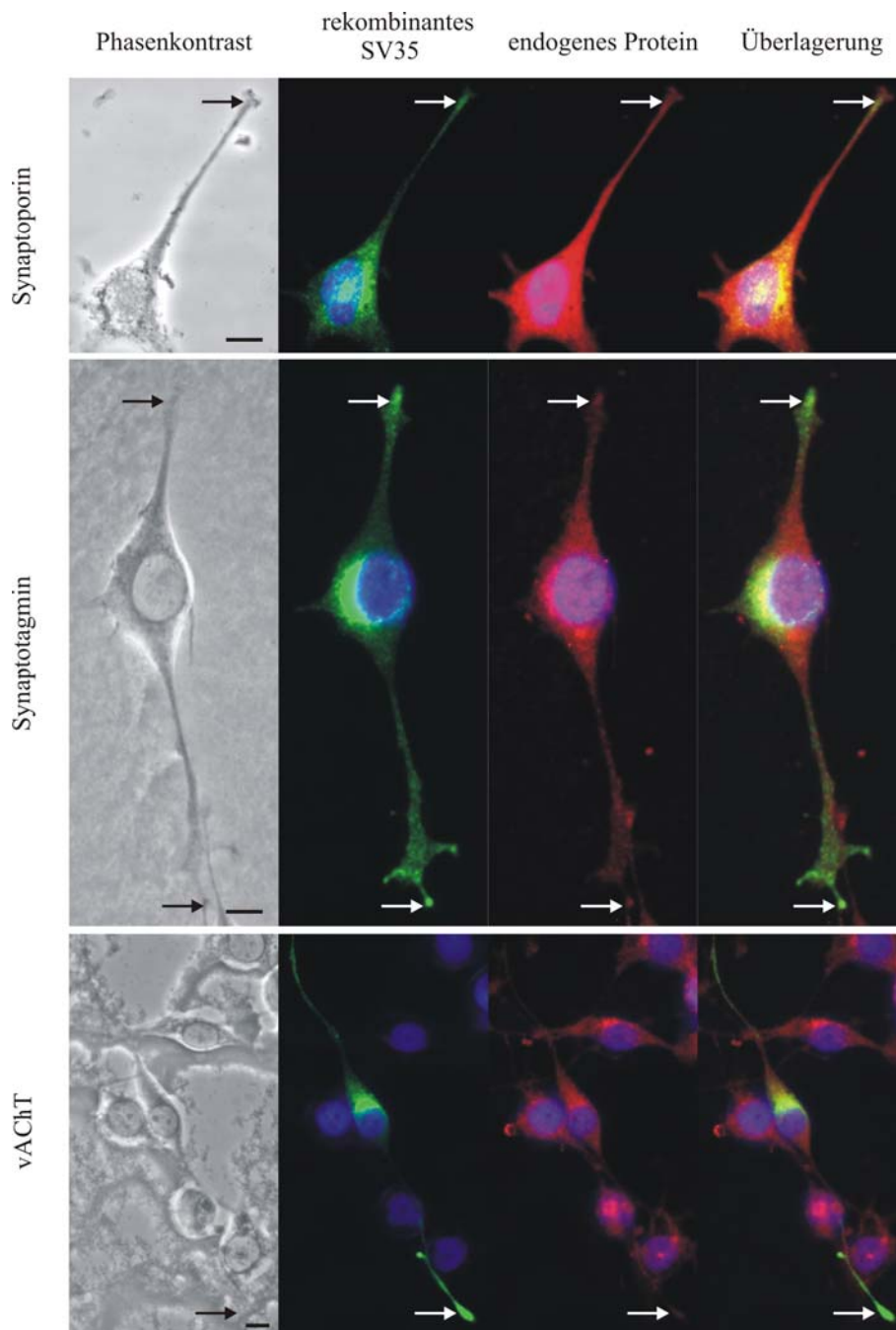


Abb. 121. Immunzytochemische Analyse der Lokalisation des rekombinant exprimierten Proteins SV35 sowie der endogenen Proteine Synaptoporin, Synaptotagmin und vAChT mit Überlagerung der jeweiligen Expressionsmuster. Grün, myc-getagtes SV35; rot, endogen exprimierte Proteine; blau, DAPI-Färbung. Pfeile kennzeichnen Wachstumskegel der PC12-Zellen. Balken: 10 μ m.

Gleiches gilt für die Analysen von SV35 und Synaptotagmin (Abb. 121). Charakteristisch für Synaptotagmin ist eine punktuelle Verteilung, die sich über das gesamte Zytoplasma erstreckt. Kräftige Markierungen sind in den Zonen am Zellkern detektierbar. SV35 zeigt ein

intensiveres Vorkommen in den Wachstumskegeln als die endogenen integralen synaptischen Vesikelproteine (siehe Pfeile). In den Zonen um den Zellkern und in den Wachstumskegeln zeigen beide Proteine eine hohe Präsenz. Diese Beobachtungen lassen sich auch auf die Analyse des vAChT übertragen.

Die Analyse der vesikulären Neurotransmittertransporter vGat und vGlut1 ergeben ähnliche Resultate (Abb. 122). SV35 zeigt eine sehr eingeschränkte, punktuelle Verteilung, die sich vorwiegend auf Zonen um den Zellkern und die Wachstumskegel (siehe Pfeile) beschränkt. Die Analysen des GABA-Transporter vGat resultieren in einer nahezu identischen Verteilung. Auch hier sind die Zonen am Zellkern sehr stark markiert, während im restlichen somatischen Zytoplasma nur wenig Protein erkennbar ist. Jedoch zeigt vGat eine deutlich weniger stark ausgeprägte Abundanz in den Wachstumskegeln. Diese Beobachtungen treffen auch für die Analyse des Glutamattransporters vGlut1 zu. Das Protein zeigt leicht erhöhte Abundanzen um den Zellkern, ist aber darüber hinaus homogen in der gesamten Zelle nachweisbar. Demgegenüber steht die sehr eingeschränkte Verteilung des SV35, das um den Zellkern und sehr kräftig in den Wachstumskegeln akkumuliert.

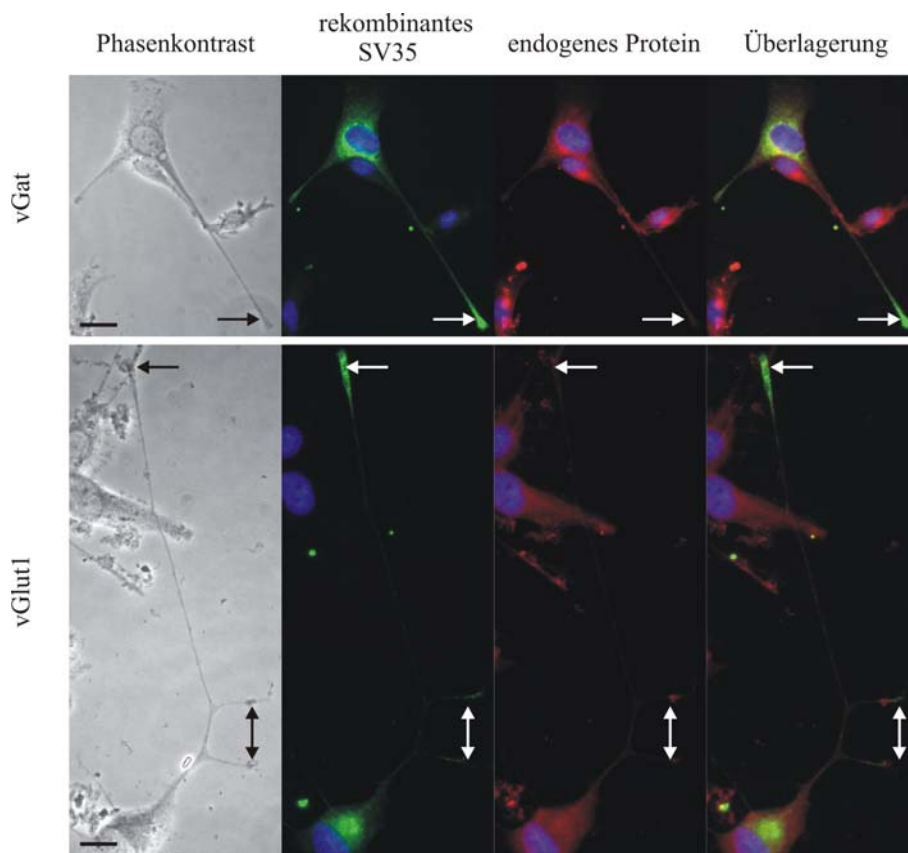


Abb. 122. Immunocytochemische Analyse der Lokalisation des rekombinant exprimierten Proteins SV35 sowie der endogenen Proteine vGat und vGlut1 mit Überlagerung der jeweiligen Expressionsmuster. Grün, myc-getagtes SV35; rot, endogen exprimierte Proteine; blau, DAPI-Färbung. Pfeile kennzeichnen Wachstumskegel der PC12-Zellen. Balken: 10 μ m.

Das t-SNARE SNAP-25 ist hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert, während SV35 ausschließlich intrazellulär vorliegt (Abb. 123). Dies findet sich in der Überlagerung bestätigt. Synaptogyrin ist im gesamten Zytoplasma vorzufinden und zeigt eine punktuelle Markierung, die in die Neuriten und Wachstumskegel reicht. SV35 zeigt ein sehr ähnliches Muster, ist aber um den Zellkern und in den Wachstumskegeln (siehe Pfeile) vergleichsweise deutlich abundanter. Die beschriebenen Bereiche zeigen eine ähnliche Verteilung für beide Proteine.

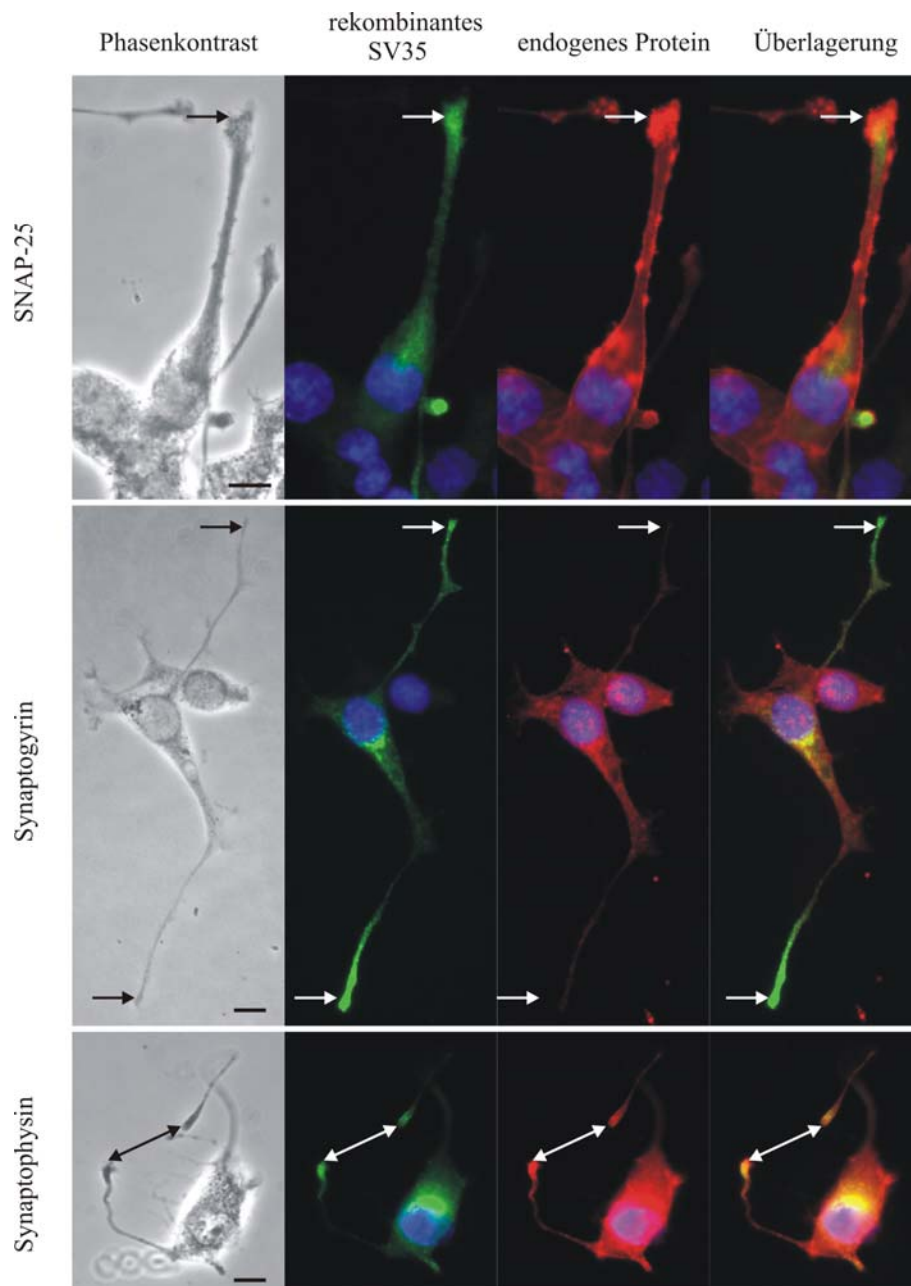


Abb. 123. Immunocytochemische Analyse der Lokalisation des rekombinant exprimierten Proteins SV35 sowie der endogenen Proteine SNAP-25, Synaptogyrin und Synaptophysin mit Überlagerung der jeweiligen Expressionsmuster. Grün, myc-getagtes SV35; rot, endogen exprimierte Proteine; blau, DAPI-Färbung. Pfeile kennzeichnen Wachstumskegel der PC12-Zellen. Balken: 10 μ m.

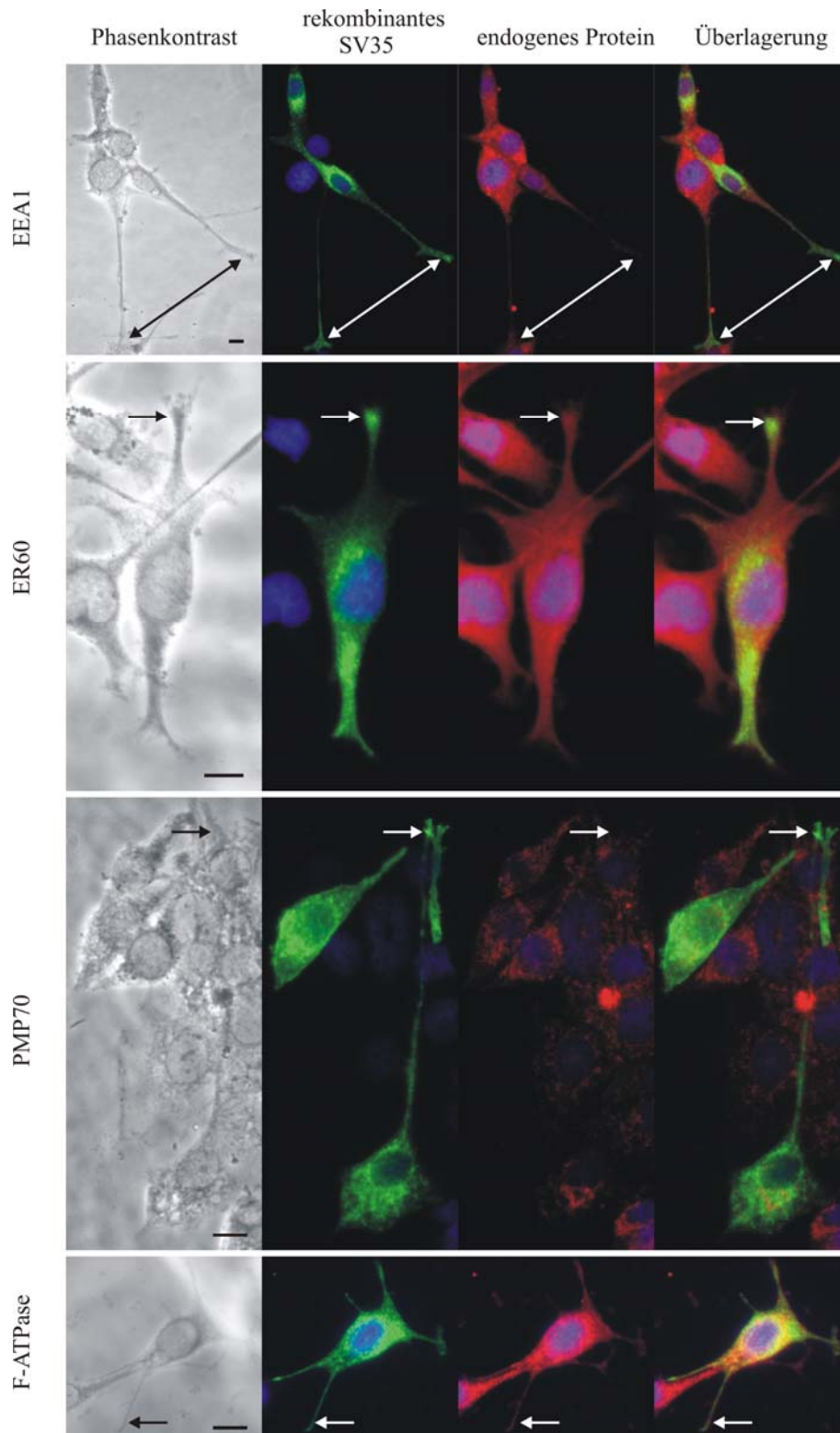


Abb. 124. Immunzytochemische Analyse der Lokalisation des rekombinant exprimierten Proteins SV35 sowie der endogenen Proteine EEA1, ER60, PMP70 und F-ATPase mit Überlagerung der jeweiligen Expressionsmuster. Grün, myc-getagtes SV35; rot, endogen exprimierte Proteine; blau, DAPI-Färbung. Pfeile kennzeichnen Wachstumskegel der PC12-Zellen. Balken: 10 μ m.

Gleiches gilt für die Analyse von Synaptophysin (Abb. 123), dessen Verteilung wie die des Synaptogyrin einzuschätzen ist, aber in den Wachstumskegeln kräftiger ist. Synaptophysin ist

zudem stark im Soma nachweisbar, während SV35 dort schwach ausgeprägt ist. Nur die Zonen direkt am Zellkern sind kräftig markiert, während das restliche somatische Zytoplasma sehr wenig Protein enthält. Beide Proteine zeigen in diesen Bereichen und in den Wachstumskegeln eine sehr ähnliche Verteilung.

Analysen nicht vesikelständiger Proteine sind in Abbildung 124 wiedergegeben. Das endosomale integrale Membranprotein EEA1 ist im gesamten Zytoplasma vorhanden, mit minimaler Übereinstimmung mit SV35, welches vorwiegend in den Zonen um den Zellkern und in den Wachstumskegeln (siehe Pfeile) der Zelle zu finden ist. Das ER-Protein ER60 hingegen läßt sich in den für das ER typischen subzellulären Bereichen zusammen mit SV35 detektieren. Dies ist insbesondere um den Zellkern und in den Wachstumskegeln gegeben. Andere subzelluläre Bereiche zeigen nur wenig Übereinstimmung. Die Immunmarkierung des peroxisomalen Proteins PMP70 ergibt keine Übereinstimmung mit der von SV35. PMP70 ist sehr punktuell verteilt, insbesondere um den Zellkern. Dies stimmt jedoch nicht mit der punktuellen Lokalisation des SV35 überein. Zudem läßt sich PMP70 nicht in den Neuriten und Wachstumskegeln der Zellen nachweisen. Die mitochondriale F-ATPase ist bis auf den Zellkern im gesamten Zytoplasma und den Neuriten nachweisbar und zeigt ebenso wie SV35 eine Markierung punktueller Strukturen. Detaillierte Mustervergleiche ergeben jedoch keine Übereinstimmung in der Verteilung der beiden Proteine.

3.7.2.3 Membranassoziation

In Abbildung 125 ist die membranäre Lokalisation des SV35 sowie die Lokalisation nach Behandlung mit Salz und hohem bzw. niedrigem pH dargestellt. Die Funktionalität der Membranfraktion wurde bereits unter 3.7.1.3 beschrieben. Wie anhand der Vorhersagen zu erwarten ist, ist das Protein ausschließlich in den Membranfraktionen vorhanden und kann weder durch pH-Änderung noch durch Behandlung mit Salz aus der Membran entfernt werden.

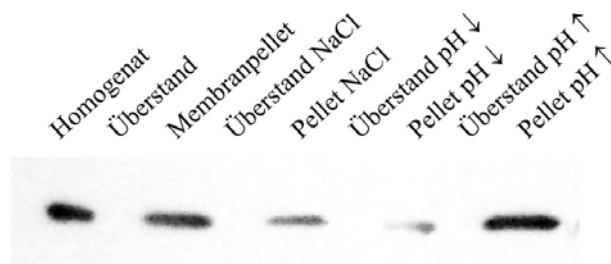


Abb. 125. Analyse der Membranfraktion transfizierter CHO-Zellen. Pro Spur wurden äquivalente Volumina aufgetragen

3.7.2.4 Gewebespezifität

Die für die RT-PCR durchgeführten Kontrollen sowie die Analyse der RNA-Integrität und der genomischen Kontamination sind unter 3.7.1.4 beschrieben. Die Ergebnisse der RT-PCR für SV35 lassen erkennen, daß das Gen gewebespezifisch exprimiert wird (Abb. 126). Die höchsten Expressionen sind in Lunge und Leber sowie in den Gehirnregionen Bulbus olfactorius, Cerebellum, Hippocampus und im Resthirn nachweisbar. Geringere Expressionswerte sind in Niere und Milz detektierbar. Im Diaphragma sind Spuren der mRNA nachweisbar. Keine Expressionen sind in Pankreas, Nebenniere und Thymus sowie in der Wasserkontrolle detektierbar.

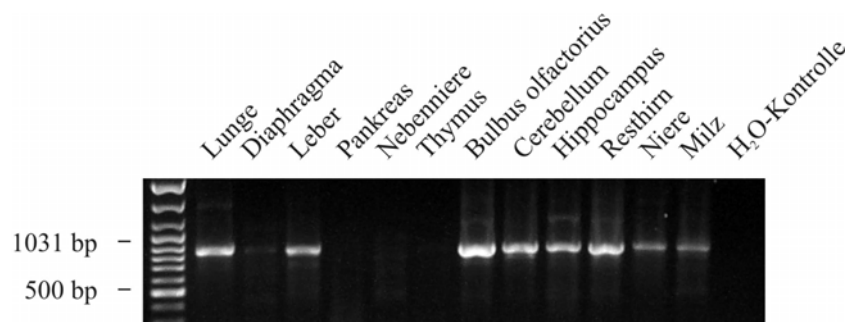


Abb. 126. RT-PCR der isolierten Ribonukleinsäuren aus 12 verschiedenen Geweben und der Wasserkontrolle mit DKFZ-Primern. Pro Spur wurden 4 µl des PCR-Ansatzes elektrophoretisch aufgetrennt.

3.8 Charakterisierung neuer Proteine über Peptid-Antikörper

Die Auswahl der Peptide für die Immunisierung von Kaninchen wurde aufgrund von Vorhersagen der Antigenizität nach Parker (Parker *et al.*, 1986) und Hopp/Woods (Hopp und Woods, 1981) sowie nach Analyse der Hydrophobizität per Kyte-Doolittle-Plot (Kyte und Doolittle, 1982) getroffen. Hierbei werden Sequenzabschnitte gewählt, die möglichst hydrophil und nicht in der Nähe stark hydrophober Sequenzen liegen. Die Immunogene werden mit einem Cystein gekoppelt, um das Peptid an das Trägerprotein zu koppeln. Dies erlaubt eine bessere Präsentation des Peptids für das Immunsystem.

3.8.1 Antigenizitätsanalyse des Proteins Svap30

Die Analyse der Antigenizität für Svap30 (Abb. 127) resultiert in der Auswahl der Peptide 66 bis 80 (C-EQAVEEIRAVVRPVE) und 149 bis 164 (NKREGFGVRIQWDKQ-C) für die Immunisierung. Der erste Antikörper wird im Folgenden mit Svap30(1), der zweite mit Svap30(2) bezeichnet.

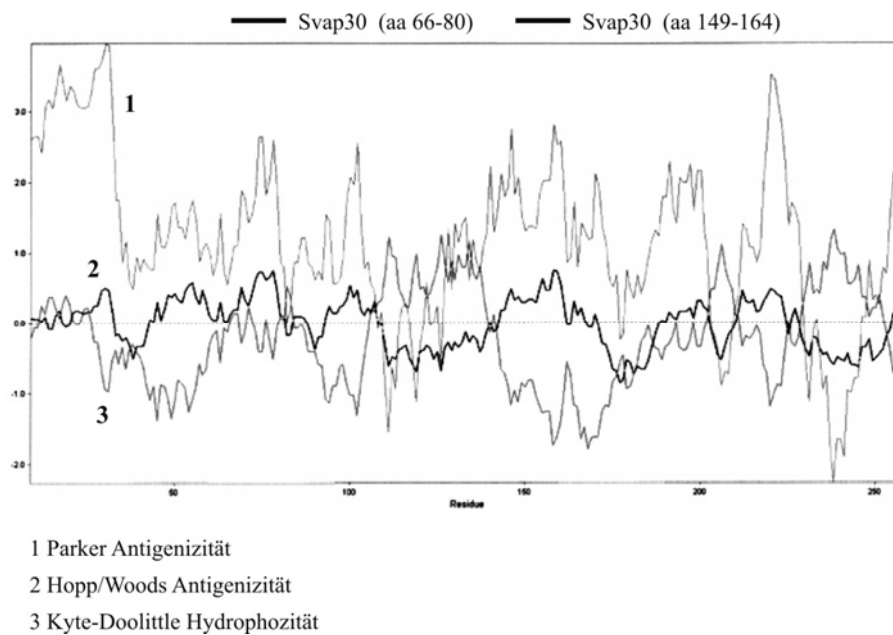


Abb. 127. Analyse der Hydrophobizität und Antigenizität des Svap30. Für die Immunisierung von Kaninchen ausgewählte Peptide sind mit Svap30 (aa 66-80) und Svap30 (aa 149-164) markiert.

3.8.1.1 Verteilung im Saccharosegradienten

Bei der Immunanalyse von Svap30 über den Saccharosegradienten traten mit beiden Peptidantikörpern Probleme auf. Die Immunsignale befinden sich nicht bei der erwarteten molekularen Masse von ~30 kDa, sondern sind nahe dem Sammelgel lokalisiert (Abb. 128). Auch nach mehrmaliger Wiederholung war es nicht möglich, das Protein elektrophoretisch aufzutrennen. Ein Großteil des Proteins liegt in den oberen Fraktionen vor. Das Protein schmiert aber bis in die untersten Fraktionen, in denen es in geringer Konzentration vorliegt. Die Resultate sind zusammengefaßt als nicht reell zu werten.

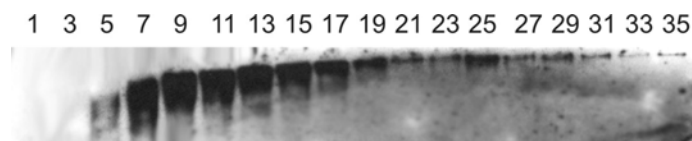


Abb. 128. Analyse von Svap30 über den Saccharosegradienten. Analysiert wurden 5 µl Probe jeder zweiten Fraktion.

3.8.1.2 BAC/SDS-PAGE

Die elektrophoretische Trennung immungereinigter synaptischer Vesikel und der Transfer auf Nitrozellulosemembranen resultiert nach Applikation des Svap30(2)-Peptidantikörpers sowohl eindimensional (A) als auch zweidimensional über BAC/SDS-PAGE (B) in einem Immunsignal bei 30 kDa (Abb. 129). Die Anwendung des Svap30(1)-Peptidantikörpers resultierte in keinem Immunsignal.

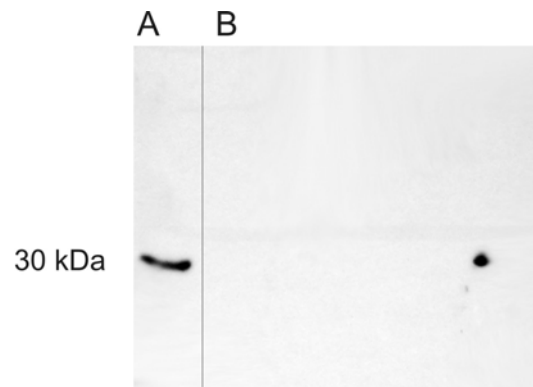


Abb. 129. Ein- (A) und zweidimensionale (B) Immunanalyse von Svap30 über SDS- und BAC/SDS-PAGE und Applikation des Svap30(2)-Peptidantikörpers. 10 μ g Protein wurden jeweils elektrophoretisch getrennt.

Neben den Peptidantikörpern wurden auch die Präimmunsereen analysiert. Diese resultierten weder für die ein- noch zweidimensionalen Auftrennungen in einem Immunsignal.

3.8.1.3 An-/Abreicherung

Die Analyse der Svap30-Konzentration im Verlauf der Präparation ist in Abbildung 130 wiedergegeben. Das Protein zeigt eine Anreicherung während des Präparationsverlaufes, die in der immungereinigten Probe (8) ihr Maximum erreicht. Starke Immunsignale sind ferner im Gesamthirnhomogenat (1) und der Synaptosomenfraktion (3) vorhanden, die sich in den Schritten dazwischen und danach nicht in dieser Konzentration wiederfinden lassen.

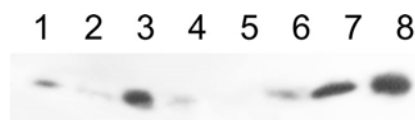


Abb. 130. An-/Abreicherungsanalyse des mit Western Blot detektierten Svap30. (1) Gesamthirnhomogenat, (2) grobe Synaptosomenfraktion, (3) Percoll-Gradienten entstammende Synaptosomen, (4) pelletierte Synaptosomen, (5) Überstand der Synaptosomen-Pelletierung, (6) grobe Vesikelfraktion nach osmotischer Lyse, (7) Fraktionen 5 bis 11 des Saccharosegradienten, (8) immungereinigte Vesikel. Pro Spur wurden 5 μ g Protein elektrophoretisch getrennt.

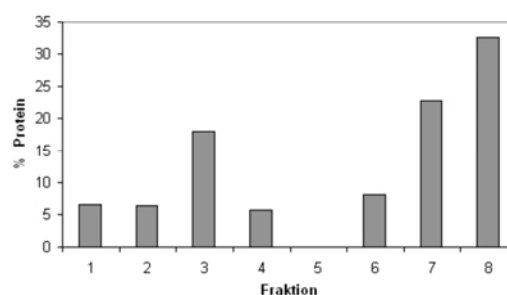


Abb. 131. Quantifizierung der An-/Abreicherungsanalyse des mit Western Blot detektierten Svap30. (1) Gesamthirnhomogenat, (2) grobe Synaptosomenfraktion, (3) Percoll-Gradienten entstammende Synaptosomen, (4) pelletierte Synaptosomen, (5) Überstand der Synaptosomen-Pelletierung, (6) grobe Vesikelfraktion nach osmotischer Lyse, (7) Fraktionen 5 bis 11 des Saccharosegradienten, (8) immungereinigte Vesikel.

Die Quantifizierung der Immunsignale (Abb. 131) ergibt mit 33% des Gesamtproteins eine Maximalkonzentration in der immungereinigten Vesikelfraktion. Die Fraktionen 5 bis 11 des Saccharosegradienten und die aufgereinigte Synaptosomenfraktion ergeben mit 24% und 18% des Gesamtproteins ebenfalls hohe Konzentrationen.

3.8.1.4 Membranassoziation

Die Membranfraktion transfizierter CHO-Zellen und Anwendung beider Peptidantikörper mit Membranpellet und zytosolischem Überstand resultieren in beiden Phasen in Immunsignalen (Abb. 132). Das Protein läßt sich wie bereits mit dem myc-Antikörper nachgewiesen als membranassoziierte und lösliche Form detektieren. Zusätzlich bestätigen die Antikörper das nachgewiesene Molekulargewicht von ~30 kDa.

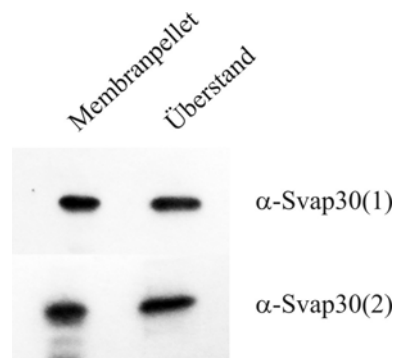


Abb. 132. Immunanalyse der Membranfraktion transfizierter CHO-Zellen. Pro Spur wurden 5 µg Protein elektrophoretisch getrennt.

Membranfraktionen von PC12-Zellen bestätigen diese Resultate (Abb. 133). Beide Peptidantikörper erkennen das endogene Protein einer molekularen Masse von ~30 kDa in der Membranfraktion und dem zytosolischen Überstand. Zusätzlich zu den gezeigten Banden sind schwächere Signale anderer molekularer Massen nachweisbar (Daten hier nicht gezeigt).

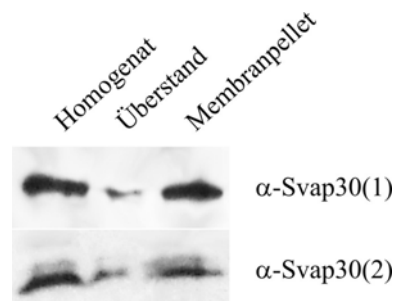


Abb. 133. Immunanalyse des endogenen Svap30 in der PC12-Membranfraktion. Pro Spur wurden 5 µg Protein elektrophoretisch getrennt.

3.8.1.5 Immunzytochemie an PC12-Zellen

Immunzytochemische Analysen an PC12-Zellen zur Darstellung des endogenen Svp30 mit Hilfe der generierten Peptidantikörper führten auch nach Anwendung verschiedener Seren aus Rind, Kalb, Schaf und Ziege sowie einer Kombination aller Seren zur Blockierung unspezifischer Bindungen zu keinen zufriedenstellenden Ergebnissen. Die Applikation des Präimmunserums ergab identische Muster und Intensitäten wie die des generierten Immunserums.

3.8.1.6 Immunhistochemie an Gewebeschnitten

Immunhistochemische Untersuchungen an verschiedenen Geweben ergeben lediglich für Lunge, Milz, Niere und Thymus zuverlässige Immunsignale. Die Analysen von Leber, Herz und Diaphragma resultieren sowohl für die Peptidantikörper als auch die Präimmunserum in identischen Signalen.

Das Innere der Lunge ist durch ein luftführendes System von Röhren (Bronchien) gekennzeichnet, die in den Lungenbläschen (Alveolen) enden. Dazwischen liegende Bereiche werden durch Bindegewebe und die Verzweigungen der Lungenarterien und -venen gefüllt. Die Verzweigungen der Lungenarterie führen das Blut zu den Alveolen, wo es oxygeniert wird. Die histologische Färbung des Schnittes der Lunge mit dem Svp30(2)-Antikörper zeigt den schwammartigen Aufbau des Gewebes (Abb. 134). Gut erkennbar sind die Alveoli, die kleinen, miteinander verbundenen Hohlräume (1), und die größeren Hohlräume, die Bronchien (2). Jeder Alveolus ist von Epithelzellen umgeben, die durch den Svp30(2)-Antikörper intrazellulär angefärbt werden. Auch die Epithelien der Bronchien enthalten Svp30.

Die Milz vereint in Bau und Struktur zwei Organe. Die rote Pulpa (Pulpa rubra) ist das blutreiche Gewebe zwischen den Milzknötchen und bildet ca. 75% des Milzvolumens. Das Hohlraumssystem aus schwammartig angeordneten Pulpasträngen und großen Bluträumen besteht aus einem dichten Netzwerk von Fibroblasten, retikulären Fasern, Makrophagen und Blutzellen. Hier werden alte und nicht mehr funktionsfähige Erythrozyten und Thrombozyten ausgefiltert und entsorgt sowie weiße Blutkörperchen und Blutplättchen für die Ausschüttung gespeichert. Der Svp30(2)-Antikörper markiert intensiv Zellen dieses Bereiches (3). Das dichtmaschige Retikulum der weißen Pulpa (Pulpa alba) ist in die rote Pulpa der Milz eingelagert, rund um die Arteriolen der Milz angeordnet, besteht aus Milzfollikeln und

Milzknötchen (Malpighi-Körperchen) und bildet die Gesamtheit der lymphoretikulären Arterienscheiden aus folgenden Bestandteilen: (i) PALS (periarterielle lymphatische Scheide), welche die Zentralarteriolen umgibt und vorwiegend aus T-Lymphozyten und interdigitierenden, dendritischen Zellen für die Antigenpräsentation besteht, (ii) Lymphfollikeln aus B-Lymphozyten und retikulärem Bindegewebe und (iii) der Marginal- oder Durchmischungszone der weißen und roten Pulpa. Auch die Zellen der weißen Pulpa(4) enthalten das RIKEN-Protein in hoher Konzentration.

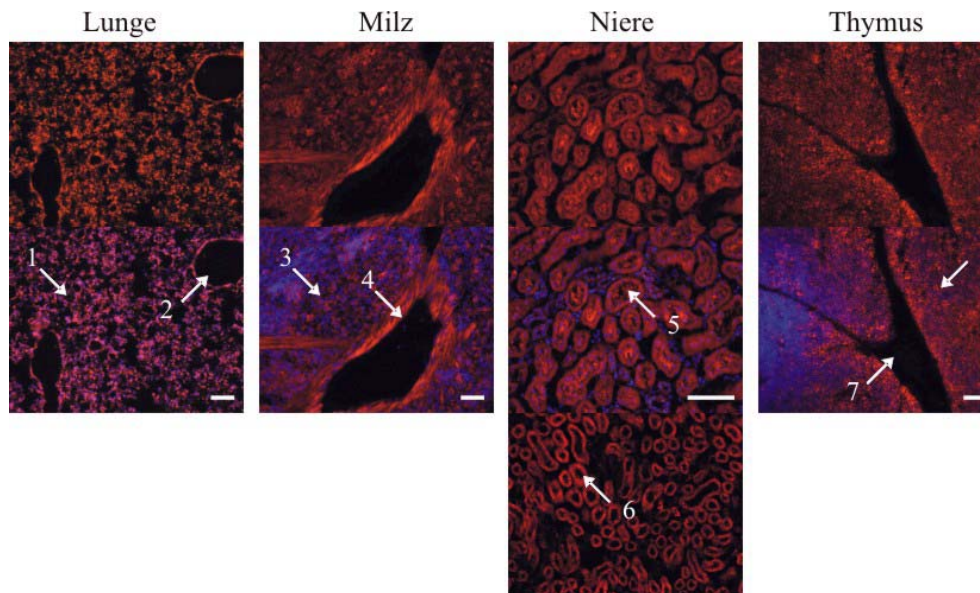


Abb. 134. Immunhistologische Analyse von Svap30 in Schnitten der Lunge, Milz, Niere und Thymus. 1, Alveoli; 2, Bronchien; 3, rote Pulpa; 4, weiße Pulpa; 5, Bürstensaum proximaler Tubuli; 6, Epithel proximaler Tubuli; 7, interlobuläres Septum; 8, Thymusrinde. Rot, Svap30; blau, DAPI-Färbung. Balken: 200 µm.

Der Großteil der abgebildeten Nierenrinde (Cortex renalis) besteht aus proximalen Tubuli im Rindenlabyrinth der Niere (Pars convoluta). Die markierten proximalen Tubuli der Pars convoluta sind durch einen hohen apikalen Bürstensaum aus Mikrovilli charakterisiert, der das Innere der Tubuli ausfüllt. Die Markierung der Epithelschicht (6) ist als unspezifisch zu werten, da identische Färbungen auch mit dem Präimmunserum erhalten wurden. Die Färbung des Bürstensaums (5) hingegen ist ausschließlich bei Anwendung des Peptidantikörpers vorhanden. Der Bürstensaum wird für die Rückresorption von Wasser und Kochsalz, Bicarbonat sowie Glukose und Aminosäuren benötigt und dient der Vergrößerung der luminalen Oberfläche der Epithelzellen.

Die Funktion des Thymus liegt in der Bildung, Vermehrung und Prägung der T-Lymphozyten aus großen blastischen Stammzellen. Die Proliferation und Differenzierung der Lymphozyten wird hierbei u.a. durch Faktoren geregelt, die von den Thymusepithelzellen gebildet werden.

Der Thymus besteht aus Makrophagen und verzweigten Epithelzellen, zwischen denen sich in der Rinde dicht, im Mark locker angeordnete T-Lymphozyten befinden, die in verschiedenen Stadien der Differenzierung und Reifung existieren. Die Epithelzellen der Rinde besitzen zahlreiche Fortsätze, über die sie mit anderen Epithelzellen das Grundgerüst des Thymus und die Blut-Thymus-Schranke bilden und mit denen sie Lymphozyten umfassen. Svap30 ist in der Thymusrinde (8) und auch im Mark (hier nicht gezeigt) vorhanden. Die interlobulären Septen (7) durchziehen die Rinde, zeigen aber keine Markierung. Welcher Zelltyp des Thymus Svap30 enthält, kann an dieser Stelle nicht festgestellt werden.

Immunhistochemische Untersuchungen an Gehirnschnitten wurden durch den Nachweis von Svap30 zusammen mit SV2, GFAP und VAMP-2 durchgeführt. Die Resultate sind am Beispiel des Kleinhirns dargelegt (Abb. 135). Analysen des integralen synaptischen Vesikelproteins SV2 und Svap30 ergeben für beide Proteine völlig unterschiedliche Muster. SV2 zeigt in der Molekularschicht des Kleinhirns (2) eine sehr starke Präsenz und ist auch in den Zellkörpern der Körnerzellschicht (3) vertreten. Svap30 hingegen ist in den dendritischen Ausläufern in der Molekularschicht und in einigen Zellkörpern der Körnerzellschicht vorhanden. Eine starke Immunfluoreszenz findet sich in den Zellkörpern der Purkinjezellen (1). Auch im Bereich der Pons zeigt sich keine Übereinstimmung beider Muster. SV2 ist in den Fasern des Hirnstamms stark vertreten (4), während Svap30 ausschließlich in großen Neuronen der Pons lokalisiert ist (5).

Untersuchungen des Gliaproteins GFAP und Svap30 resultieren in einem hohen Grad an Überlappung. GFAP ist in der faserigen Bergmannglia der Molekularschicht (2) lokalisiert, die auch durch den Svap30-Antikörper markiert wird. Svap30 ist zudem in den Somata der Purkinjezellen (1) vorhanden. Die Fasertrakte in der Körnerzellschicht (3) werden von beiden Antikörpern gleich markiert.

Analysen des integralen synaptischen Vesikelproteins VAMP-2 ergeben nur für wenige Bereiche eine Überlappung mit Svap30. VAMP-2 ist stark in der Körnerzellschicht (3) des Kleinhirns vertreten und zeigt eine geringe Präsenz in den Purkinjezellkörpern (1). Auch Svap30 ist in den Zellkörpern der Purkinjezellen lokalisiert, ergibt dort aber deutlich stärkere Immunfärbung als VAMP-2. Nur in diesen Bereichen ergibt sich eine Gleichverteilung.

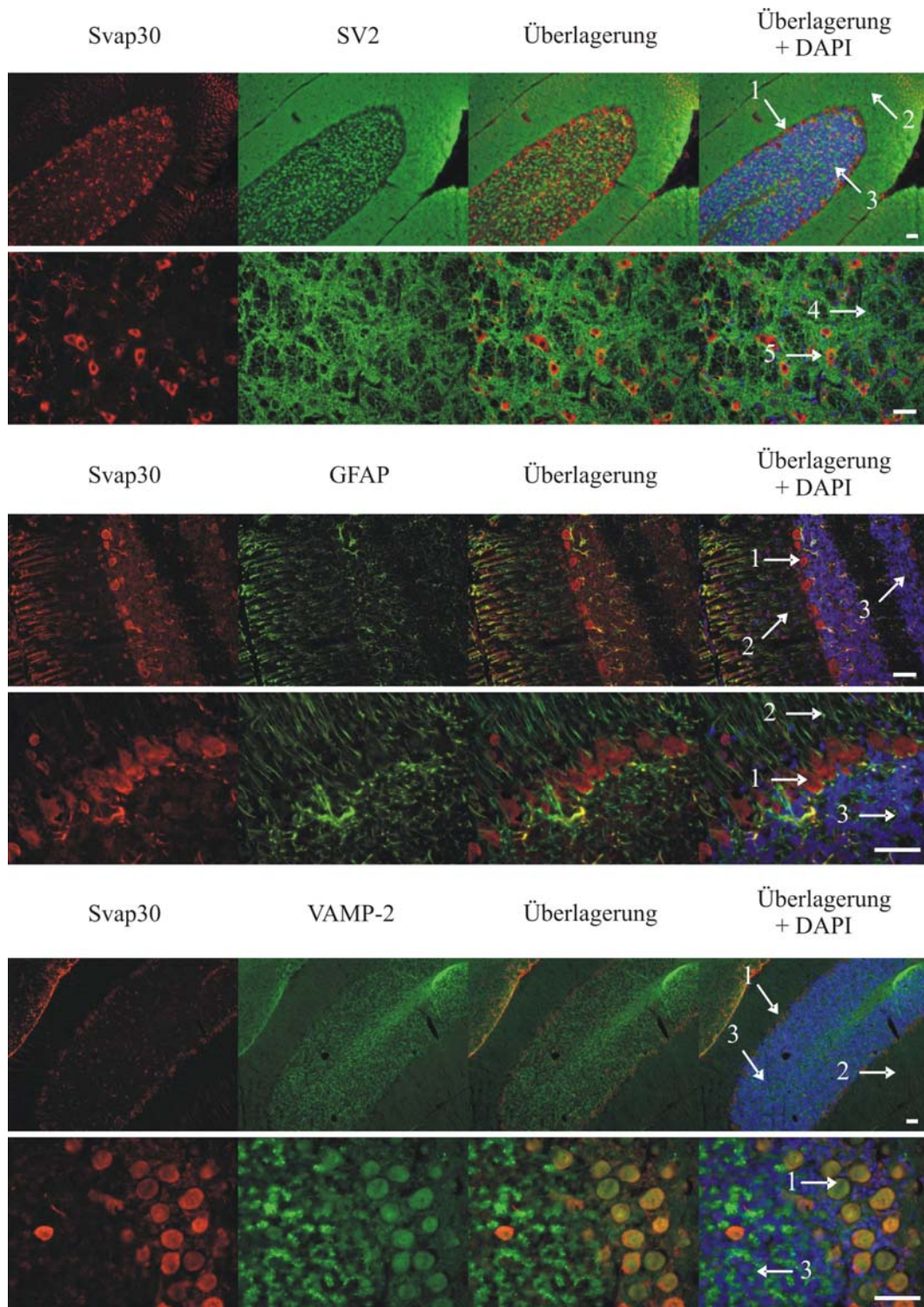


Abb. 135. Immunhistologische Analyse von Schnitten des Kleinhirns und der Pons. Untersucht wurden die Lokalisation von Svap30, SV2, GFAP und VAMP-2. Gezeigt sind die Einzelmarkierungen und die Überlagerung mit und ohne DAPI-Färbung. 1, Purkinjezellschicht; 2, Molekularschicht; 3, Körnerzellschicht; 4, Fasern im Hirnstamm; 5, große Neuronen in der Pons. Rot, Svap30; grün, SV2, GFAP oder VAMP-2; blau, DAPI-Färbung. Balken: 200 μ m.

Alle anderen untersuchten Gehirnschnitte ergeben vergleichbare Resultate - eine hohes Maß an Überlappung mit GFAP und eine sehr eingeschränkte Gleichverteilung mit VAMP-2. Mustervergleiche mit SV2 ergeben keine Übereinstimmung. Im Bulbus olfactorius ist Svap30

sehr stark in der Körnerzellschicht vorhanden, zeigt aber auch in der äußeren Mitralzellschicht und in der inneren plexiformen Schicht eine starke Abundanz. Außerdem befindet sich Svap30 im Cortex (Schicht 1), wo es sehr stark in Fasern angereichert ist und eine starke Überlappung mit GFAP aufweist. Diese Fasertrakte enthalten teilweise auch VAMP-2. Svap30 zeigt zudem starke Präsenz in den Pyramidalzellen des Gyrus dentatus. Auch Bereiche der Habenula zeigen eine Markierung. Wiederum ergibt sich keine Übereinstimmung mit SV2.

3.8.2 Antigenizitätsanalyse des Proteins SV35

Die Analyse der Antigenizität und Hydrophobizität für die Auswahl der immunogenen Peptide für SV35 ist in Abbildung 136 dargestellt. Der Bereich der für die Immunisierung ausgewählten Sequenz umfaßt die N-terminalen Aminosäuren 48 bis 63 (RQPRIESGQFSDGF-C).

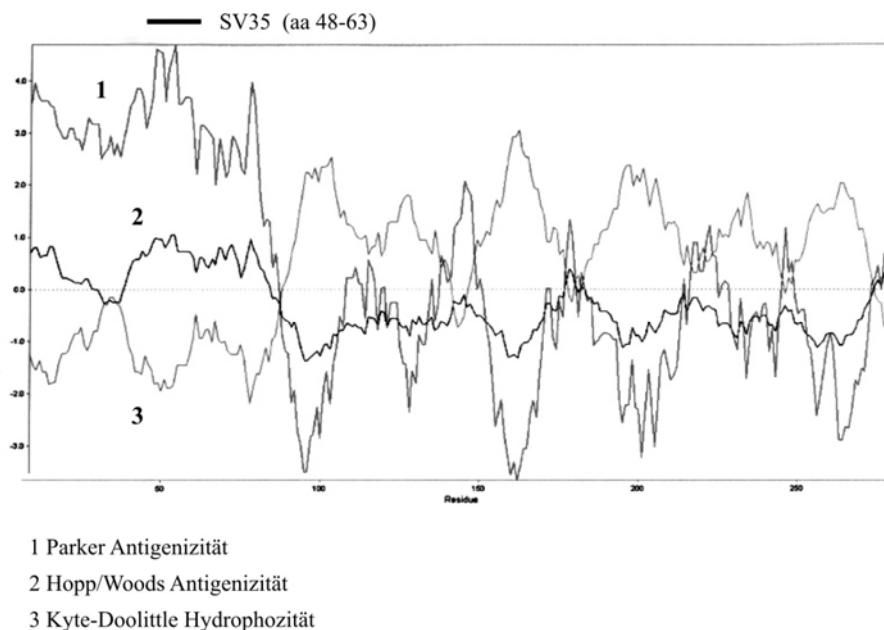


Abb. 136. Analyse der Hydrophobizität und Antigenizität des SV35. Das für die Immunisierung von Kaninchen ausgewählte Peptid ist mit SV35 (aa 48-63) markiert.

3.8.2.1 Verteilung im Saccharosegradienten

Die Analyse von SV35 über den Saccharosegradienten ist in Abbildung 150 wiedergegeben. Das Protein zeigt wie alle anderen integralen synaptischen Vesikelproteine eine bimodale Verteilung und ist in den oberen und unteren Fraktionen detektierbar. In den unteren Fraktionen zeigt sich neben dem intensiven Immunsignal bei 30 kDa zusätzlich ein Band mit einem schwächeren Immunsignal bei 32 kDa.

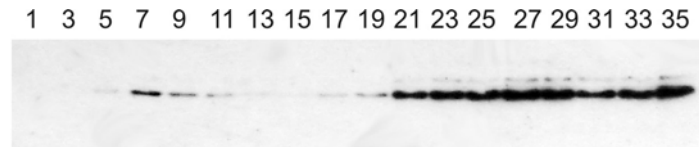


Abb. 137. Analyse von SV35 über den Saccharosegradienten. Analysiert wurden 5 µl Probe jeder zweiten Fraktion.

Nach Quantifizierung weist das Protein bezüglich der oberen Fraktionen mit 7% in Fraktion 7 die höchste Konzentration auf (Abb. 138). Die unteren Fraktionen sind proteinreicher und bilden in Fraktion 35 mit 14% des Gesamtproteins die höchste Konzentration im Gradienten.

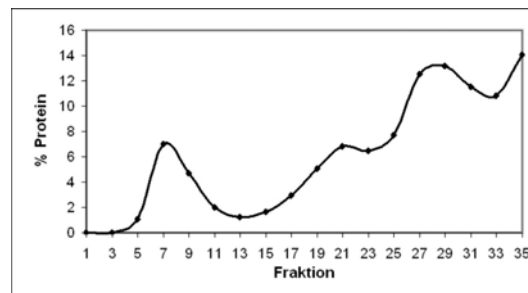


Abb. 138. Photometrische Quantifizierung der Immunsignale für SV35. Aufgetragen ist das prozentuale Vorkommen des jeweiligen Proteins in jeder zweiten Fraktion des Saccharosegradienten.

3.8.2.2 BAC/SDS-PAGE

Die Trennung immungereinigter synaptischer Vesikelproteine und Applikation des SV35-Peptidantikörpers nach eindimensionaler (Abb. 139A) und zweidimensionaler (B) Elektrophorese über BAC/SDS-PAGE resultiert in zwei Immunsignalen. Ein stärkeres bei 30 kDa und ein schwächeres bei 32 kDa. Neben dem eigentlichen Peptidantikörper wurde auch das Präimmenserum analysiert. Dies resultierte weder für die ein- noch zweidimensionale Auftrennung in einem Immunsignal.

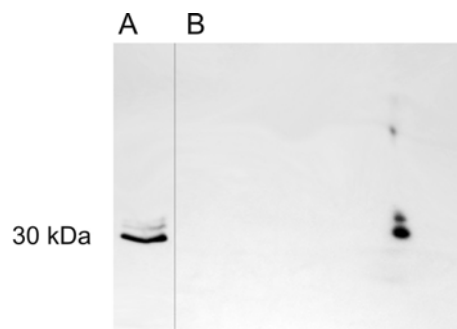


Abb. 139. Ein- (A) und zweidimensionale (B) Immunanalyse von SV35 über SDS- und BAC/SDS-PAGE und Applikation des SV35-Peptidantikörpers. Elektrophoretisch aufgetrennt wurden jeweils 10 µg Protein.

3.8.2.3 An-/Abreicherung

Die Analyse der SV35-Konzentration im Verlauf der Präparation ergibt eine Anreicherung, die in der immungereinigten Probe (8) gipfelt (Abb. 140). Für die Bande höherer molekularer Masse ist dies besonders ausgeprägt.

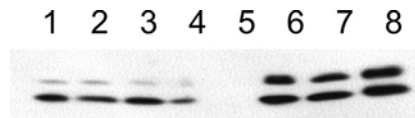


Abb. 140. An-/Abreicherungsanalyse des mit Western Blot detektierten SV35. (1) Gesamthirnhomogenat, (2) grobe Synaptosomenfraktion, (3) Percoll-Gradienten entstammende Synaptosomen, (4) pelletierte Synaptosomen, (5) Überstand der Synaptosomen-Pelletierung, (6) grobe Vesikelfraktion nach osmotischer Lyse, (7) Fraktionen 5 bis 11 des Saccharosegradienten, (8) immungereinigte Vesikel. Pro Spur wurden 5 µg Protein elektrophoretisch getrennt.

Eine Quantifizierung der Immunsignale ergibt das in Abbildung 141 dargestellte Konzentrationsprofil. Für die Intensitätsanalyse wurden hierbei beide Signale summiert. Die höchste Proteinkonzentration ist mit 33% in der immungereinigten Vesikelprobe (8) detektierbar. Höhere SV35-Konzentrationen lassen sich zudem erst ab der groben Vesikelfraktion (6) nachweisen. Die Schritte davor haben annähernd äquivalente Proteinkonzentration mit ~6% des Gesamtproteins.

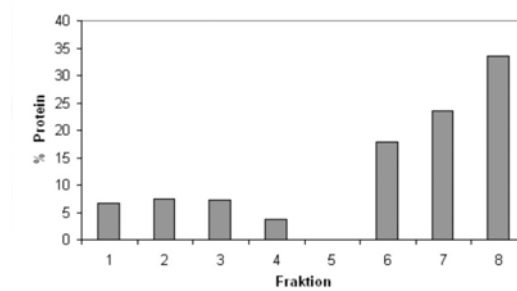


Abb. 141. Quantifizierung der An-/Abreicherungsanalyse des mit Western Blot detektierten SV35. (1) Gesamthirnhomogenat, (2) grobe Synaptosomenfraktion, (3) Percoll-Gradienten entstammende Synaptosomen, (4) pelletierte Synaptosomen, (5) Überstand der Synaptosomen-Pelletierung, (6) grobe Vesikelfraktion nach osmotischer Lyse, (7) Fraktionen 5 bis 11 des Saccharosegradienten, (8) immungereinigte Vesikel.

3.8.2.4 Membranassoziation

Wie nach Analyse der Membranextrakte mittels des myc-Antikörpers gezeigt wurde, ist SV35 in transfizierten CHO-Zellen ausschließlich im Membranpellet vorhanden (Abb. 142).

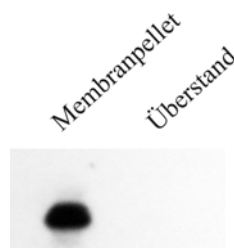


Abb. 142. Immunanalyse der Membranfraktion transfizierter CHO-Zellen. Pro Spur wurden 5 µg Protein elektrophoretisch getrennt.

Um für SV35 die Möglichkeit einer endogenen Expression in PC12-Zellen zu überprüfen, wurden Membranextrakte mit dem Peptidantikörper inkubiert (Abb. 143). Das Protein läßt sich wie bereits in den Versuchen mit den transfizierten CHO-Zellen nur in den membranhaltigen Fraktionen detektieren. Der zytosolische Überstand ist proteinfrei. Auch hier zeigt sich die bereits beschriebene Doppelbande von 30 kDa und 32 kDa.

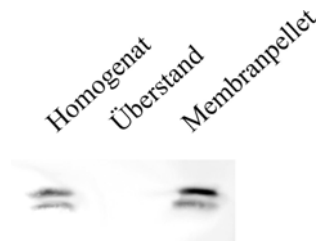


Abb. 143. Immunanalyse des endogenen SV35 in der PC12-Membranfraktion. Pro Spur wurden 5 μ g Protein elektrophoretisch getrennt.

3.8.2.5 Immunzytochemie an PC12-Zellen

Immunzytochemische Analysen an PC12-Zellen zur Darstellung des endogenen SV35 mit Hilfe des generierten Peptidantikörpers führten auch nach Anwendung verschiedener Seren aus Rind, Kalb, Schaf und Ziege sowie einer Kombination aller Seren zur Blockierung unspezifischer Bindungen zu keinen zufriedenstellenden Ergebnissen. Applikation des Präimmunerums resultierte in identischen Mustern und Intensitäten wie die generierten Antikörper.

3.8.2.6 Immunhistochemie an Gewebeschnitten

Immunhistochemische Untersuchungen von SV35 an verschiedenen Geweben resultieren lediglich für die Lunge in einem zuverlässigen Immunsignal (Abb. 144).

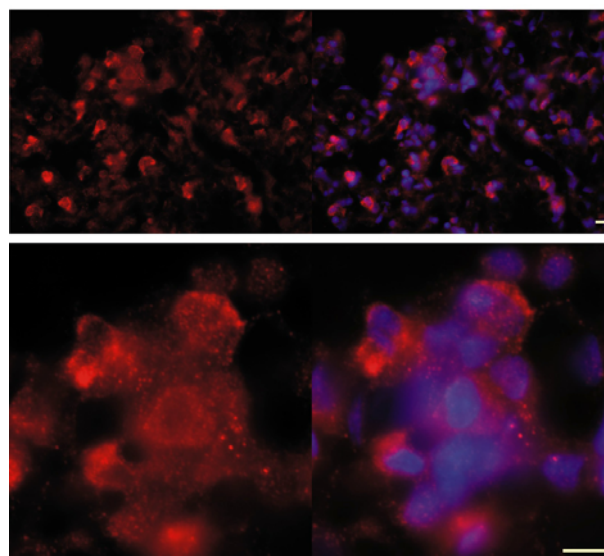


Abb. 144. Immunhistologische Analyse von SV35 in Schnitten der Lunge. Rot, SV35; blau, DAPI-Färbung. Balken: 200 μ m.

SV35 läßt sich in den Epithelzellen der schwammartig angeordneten Alveoli der Lunge nachweisen und zeigt dort ein sehr punktuelltes Muster, das sich nicht auf alle Zellen erstreckt. Die Epithelien der Bronchien zeigen hingegen keine Markierung. In Milz, Niere, Thymus, Leber, Herz und Diaphragma ergeben sich sowohl für den Peptidantikörper als auch das Präimmunserum identische Signale bzw. keine Proteindetektion.

Die Verteilung von SV35 wurde in verschiedenen Gehirnbereichen hinsichtlich der Lokalisation und der Koloalisation mit den integralen synaptischen Vesikelproteinen VAMP-2 und SV2 untersucht. Ferner wurden Studien mit den vesikulären Neurotransmittertransportern für Glutamat, GABA/Glycin und mit der Tyrosinhydroxylase durchgeführt, um gegebenenfalls die Koloalisation von SV35 in bestimmten Subtypen von Neuronen nachzuweisen.

Eine Übersicht der Verteilung von SV35 in Querschnitten des Gehirns im Bereich des Hippocampus ergibt eine starke Immunfärbung (alkalische Phosphatase) in der Habenula, im dorsolateralen geniculaten und lateralen thalamischen Kern sowie im piriformen Cortex (Abb. 145). Weniger intensive Färbungen sind im gesamten Schnitt nachweisbar, auf die im Folgenden jedoch nicht eingegangen wird, da diese Areale keine signifikanten Aussagen hinsichtlich einer Überlappung zulassen.

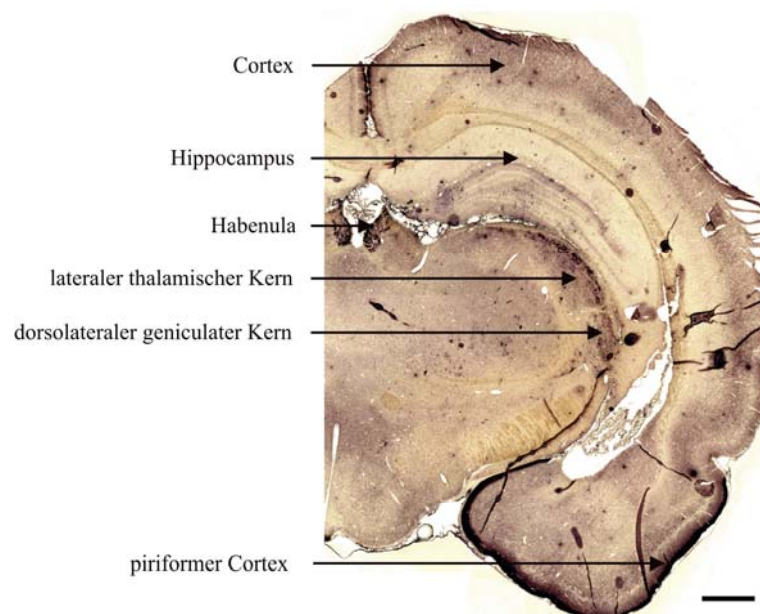


Abb. 145. Übersicht der Immunfärbung für SV35 (Querschnitt, alkalische Phosphatase). Balken: 1 mm.

VAMP-2 ist entgegen dem Vorkommen von SV35 ubiquitär präsent und zeigt in der Habenula (Abb. 146) sowie im Cortex eine Überlappung mit SV35. Gleiches gilt für SV2,

dessen ubiquitäres Vorkommen in der Habenula, im Cortex und im dorsolateralen geniculaten und lateralen thalamischen Kern mit SV35 überlappt. Die Überlappung ist insgesamt für SV2 stärker ausgeprägt als für VAMP-2.

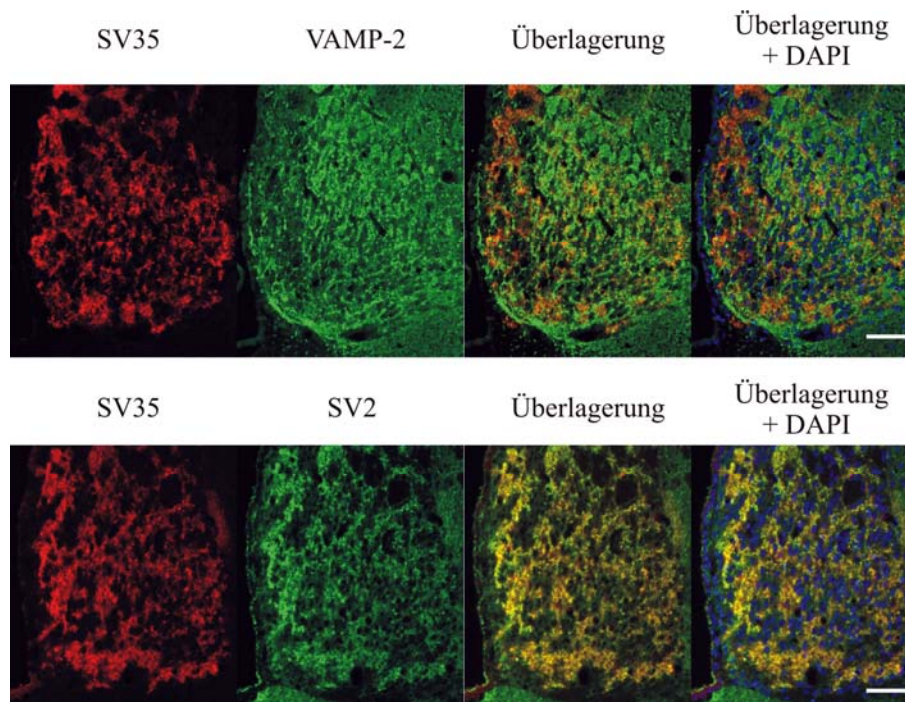


Abb. 146. Studie zur Kolokalisation von SV35 mit den integralen synaptischen Vesikelproteinen VAMP-2 und SV2 in der Habenula. Rot, SV35; grün, VAMP-2 bzw. SV2; blau, DAPI-Färbung der Nuklei. Balken: 100 μ m.

Der vesikuläre GABA/Glycintransporter vGat weist eine weite Verbreitung auf. In verschiedenen Gebieten ergibt sich eine Überlappung mit SV35. In der Habenula ist SV35 homogen vertreten, während vGat eine gradientenähnliche Verteilung besitzt (Abb. 147). Die vGat-haltigen Bereiche zeigen eine partielle Kolokalisation mit SV35, wie nach konfokaler Analyse bestätigt werden kann (Abb. 147). Im geniculaten Kern läßt sich eine teilweise Überlappung beider Proteine nachweisen, wobei SV35 in diesem Bereich gegenüber vGat eine eingeschränktere Verteilung aufweist. Im piriformen Cortex findet sich eine geringe bis teilweise Überlappung beider Proteine.

Für den vesikulären Glutamattransporter vGlut1 ergeben sich ähnliche Resultate. In der Habenula kolokalisieren beide Proteine, wie nach konfokaler Analyse bestätigt werden kann (Abb. 147). vGlut1 zeigt hier im Gegensatz zu vGat eine homogene Verteilung in der gesamten Habenula. Im geniculaten Kern sind beide Proteine vorhanden. Die konfokale Analyse ergibt jedoch keine Kolokalisation.

Für die Tyrosinhydroxylase ergeben sich keine Übereinstimmungen mit SV35, obwohl die Proteine teilweise in identischen Arealen vorhanden sind.

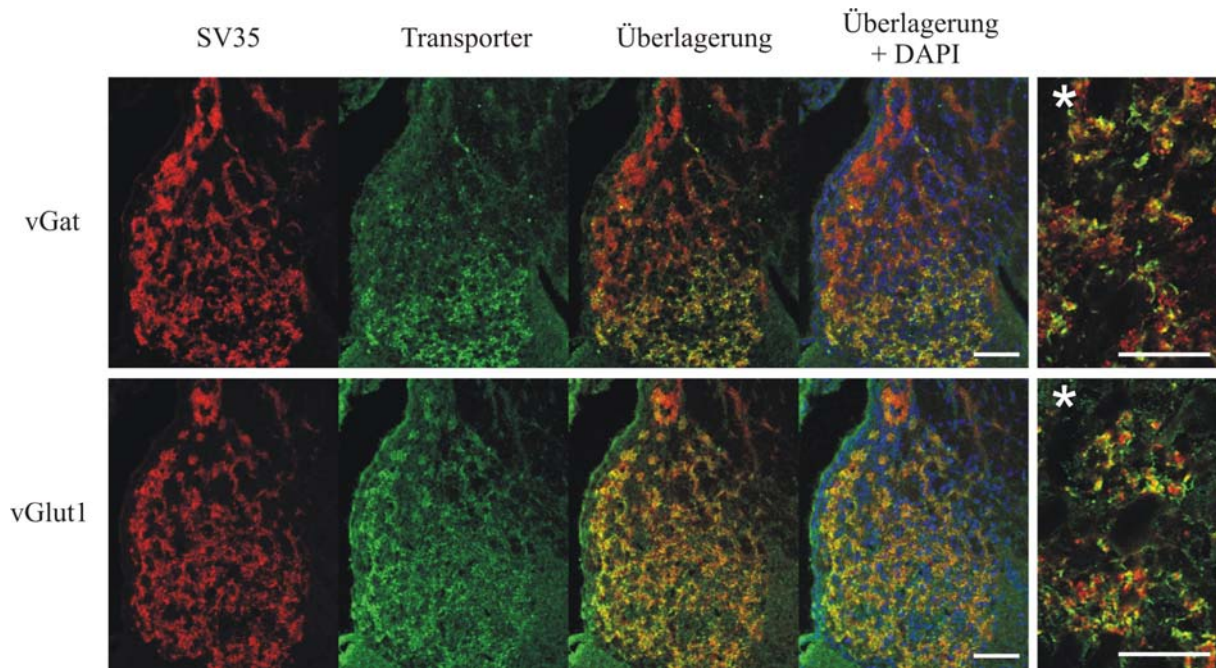


Abb. 147. Studie zur Kolokalisation von SV35 mit den vesikulären Neurotransmittertransportern vGat und vGlut1 in der Habenula. Sterne kennzeichnen konfokale Analysen. Rot, SV35; grün, Neurotransmittertransporter; blau, DAPI-Färbung der Nuklei. Balken: 100 μ m.

Weiter rostral findet sich für SV35 eine intensive Markierung, insbesondere im piriformen Cortex (Abb. 148). Immunmarkierungen lassen sich auch für die olfaktorischen Tuberkel erkennen. Die übrigen, schwach markierten Bereiche lassen sich für Aussagen bezüglich einer Kolokalisation nicht verwenden.

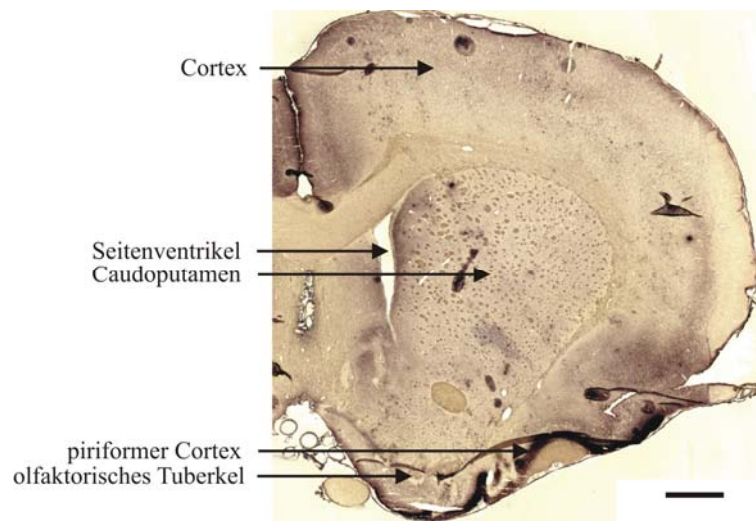


Abb. 148. Übersicht der Immunfärbung für SV35 im Bereich des Caudoputamen (Querschnitt, alkalische Phosphatase). Balken: 1 mm.

VAMP-2 und SV2 kommen auch im Bereich des Caudoputamen ubiquitär vor. Beide Proteine überlappen mit SV35 im piriformen Cortex und den olfaktorischen Tuberkeln, in denen SV35 sehr abundant ist (Abb. 149).

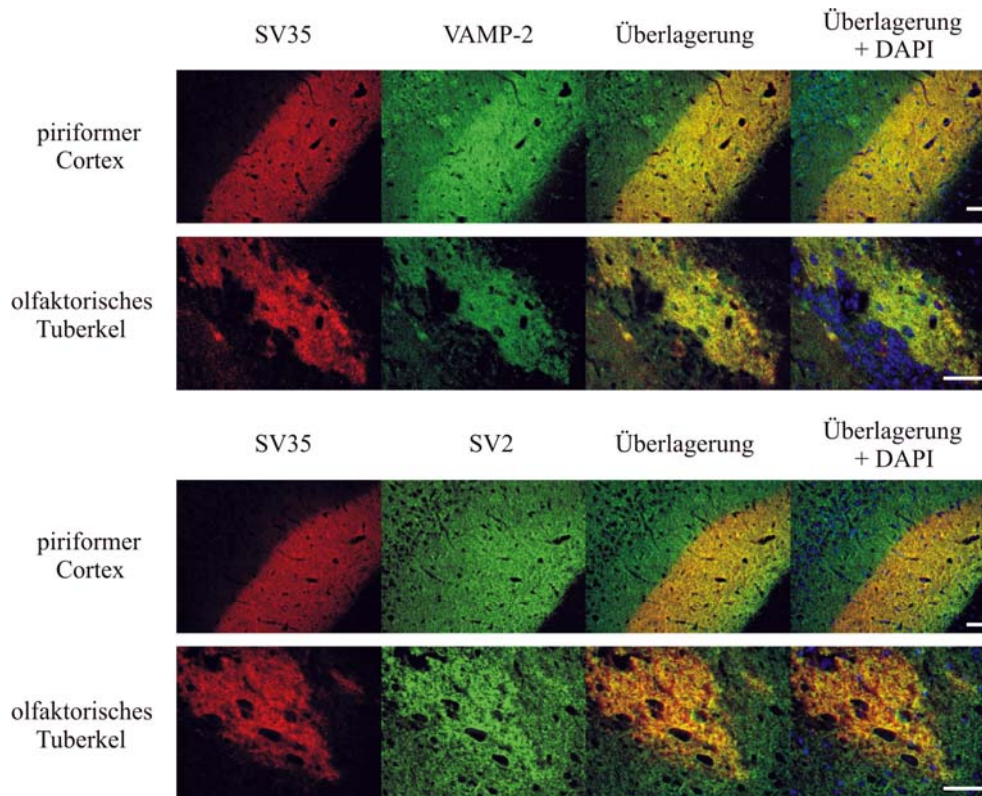


Abb. 149. Studie zur Kolo­kalisierung von SV35 mit den integralen synaptischen Vesikelproteinen VAMP-2 und SV2 im piriformen Cortex und den olfaktorischen Tuberkeln. Rot, SV35; grün, VAMP-2 bzw. SV2; blau, DAPI-Färbung der Nuklei. Balken: 10 µm.

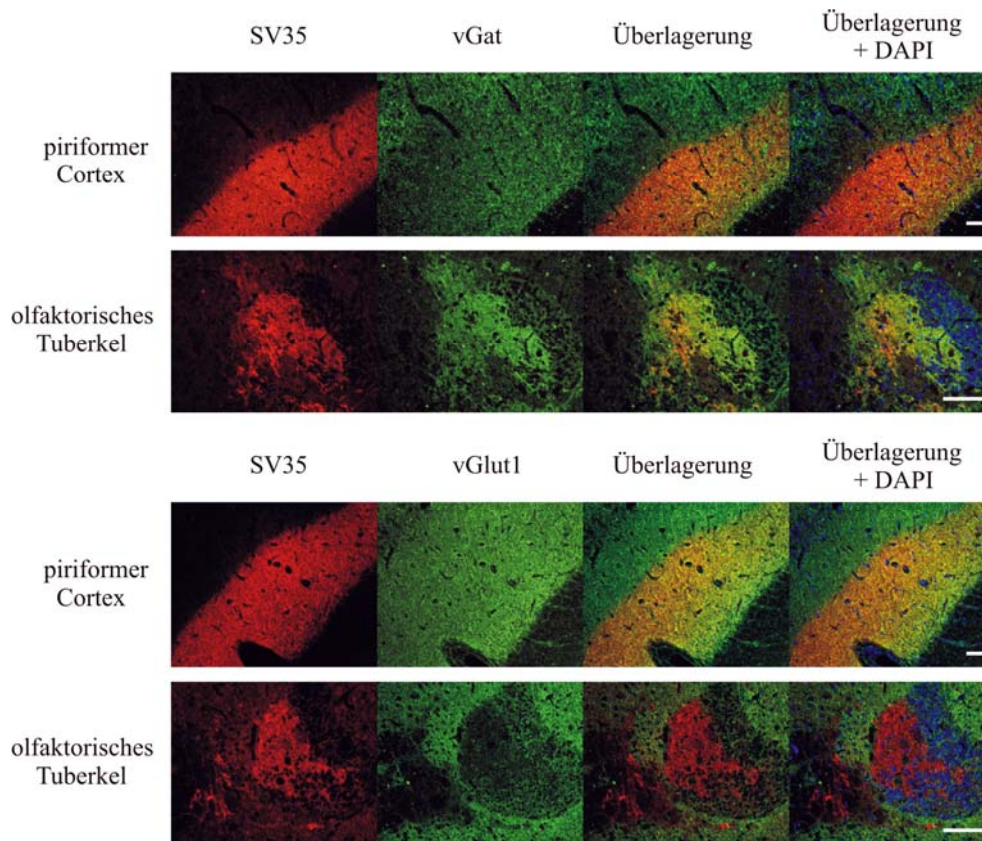


Abb. 150. Studie zur Kolo­kalisierung von SV35 mit den vesikulären Neurotransmittertransportern vGat und vGlut1 im piriformen Cortex und den olfaktorischen Tuberkeln. Rot, SV35; grün, Neurotransmittertransporter; blau, DAPI-Färbung der Nuklei. Balken: 10 µm.

Auch für vGat und vGlut1 ist eine Kolo-kalisation im piriformen Cortex nachweisbar (Abb. 150), die nach konfokaler Analyse für vGlut1 prägnant und für vGat weniger deutlich ausfällt (hier nicht gezeigt). In den olfaktorischen Tuberkeln ist im Gegensatz dazu nur für den GABA/Glycintransporter eine hohe Übereinstimmung nachweisbar. Analysen hinsichtlich der Tyrosinhydroxylase ergeben für diesen Gehirnbereich keine Markierung.

Im Bulbus olfactorius ergeben sich Markierungen in der äußeren plexiformen Schicht sowie schwache Markierungen in den Glomeruli, der Mitralzellschicht und der inneren plexiformen Schicht (Abb. 151). Die innere Körnerzellschicht bleibt ausgespart.

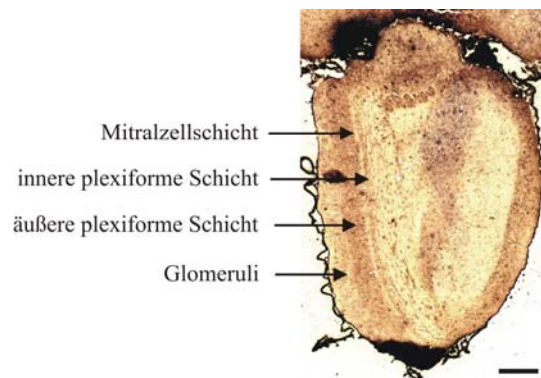


Abb. 151. Übersicht der Immunfärbung für SV35 im Bulbus olfactorius (Querschnitt, alkalische Phosphatase). Balken: 0,1 mm.

Wie in den anderen Gehirnbereichen zeigen VAMP-2 und SV2 auch im Bulbus olfactorius eine ubiquitäre Präsenz (Abb. 152). SV35 ergibt in der äußeren plexiformen Schicht mit beiden Vesikelproteinen eine eingeschränkte Überlappung. In den Glomeruli, der Mitralzellschicht und in der inneren plexiformen Schicht lassen sich aufgrund der zu geringen Abundanz von SV35 keine schlüssigen Aussagen treffen.

Für die vesikulären Transporter für GABA/Glycin und Glutamat sind Überlappungen nachweisbar, die für vGat vergleichsweise geringer ausfallen (Abb. 152). So bestätigen konfokale Analysen die Kolo-kalisation von vGlut1 mit SV35 in der äußeren plexiformen Schicht (Abb. 152). Für vGat und SV35 ergibt sich in diesem Bereich nur eine geringe bis keine Überlappung. In den Glomeruli hingegen ist der Anteil übereinstimmender Markierungen für vGat höher.

Die Tyrosinhydroxylase ist im Bulbus olfactorius nicht nachweisbar.

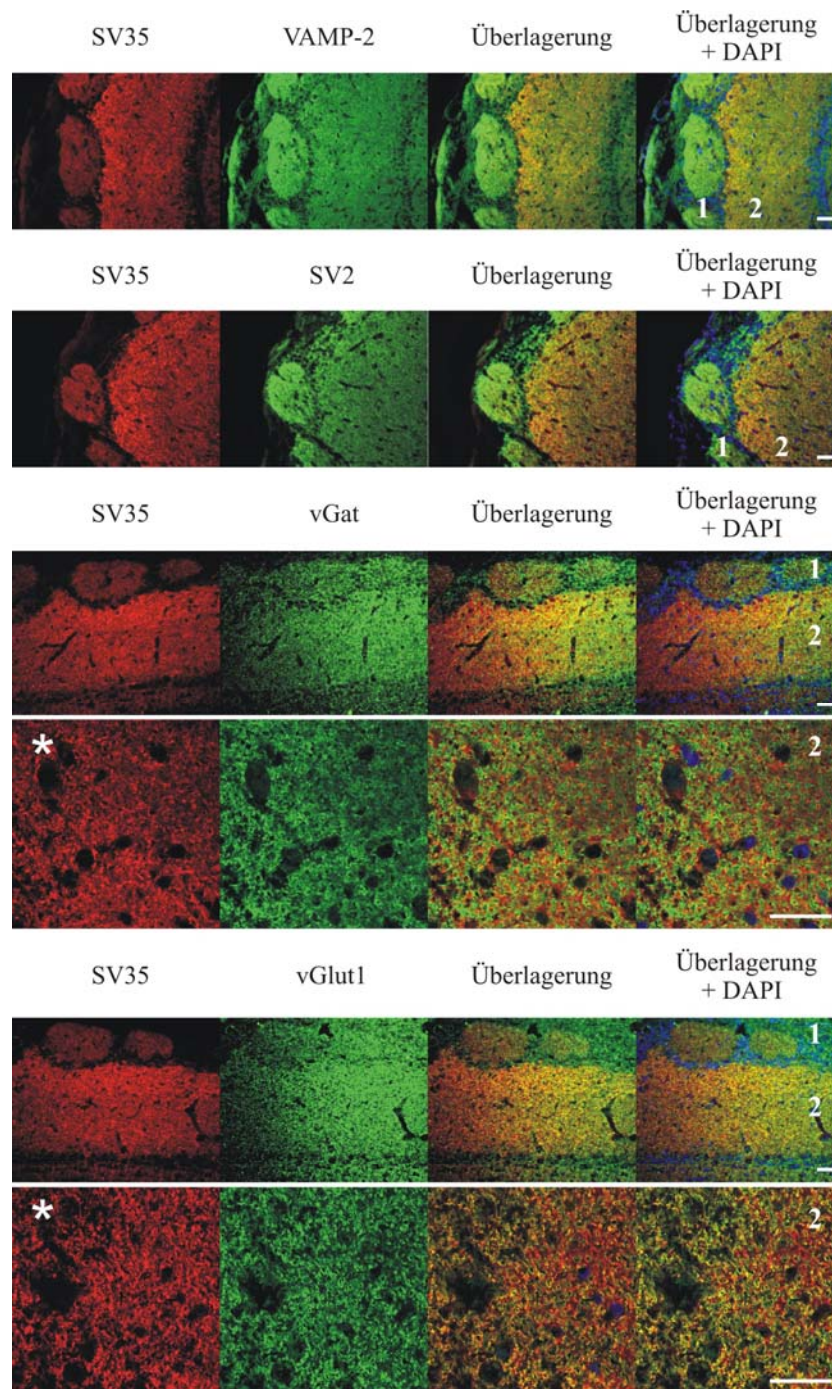


Abb. 152. Studie zur Kolokalisation von SV35 mit den integralen synaptischen Vesikelproteinen VAMP-2 und SV2 und mit den vesikulären Neurotransmittertransportern vGat und vGlut1 in den Glomeruli (1) und der äußeren plexiformen Schicht (2) des Bulbus olfactorius. Sterne kennzeichnen konfokale Analysen. Rot, SV35; grün, VAMP-2, SV2 bzw. Neurotransmittertransporter; blau, DAPI-Färbung der Nuklei. Balken: 10 μ m.

Im Cerebellum ergibt sich eine sehr ausgeprägte SV35-Präsenz in der Molekularschicht (Abb. 153). Zudem können schwächere Signale in der Körner- und Purkinjezellschicht nachgewiesen werden. Im Hirnstamm zeigt sich hingegen keine intensive Markierung. Fluoreszenzuntersuchungen bestätigen das starke Vorkommen von SV35 in der Molekularschicht (Abb. 154-156). Dies gilt auch für das geringe Vorkommen in der

Körnerzellschicht und in den Purkinjezellen. Der Hirnstammbereich zeigt eine sehr ausgeprägte intensive Markierung, die in dieser Stärke in Abbildung 153 nicht erkennbar ist.

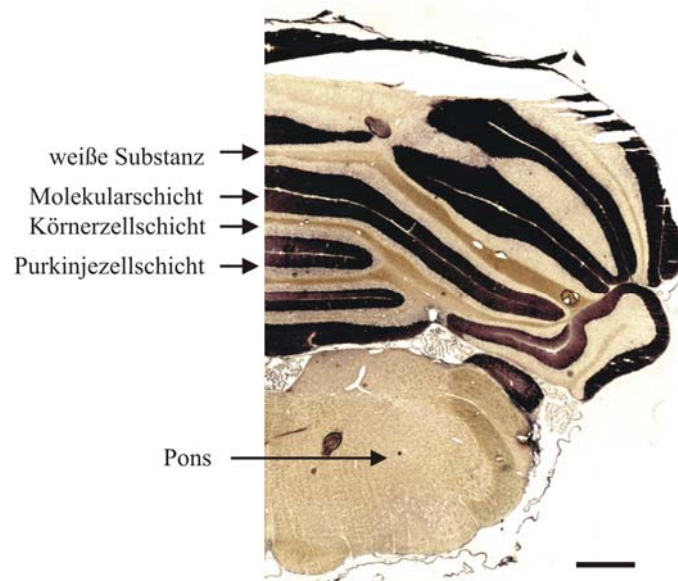


Abb. 153. Übersicht der Immunfärbung für SV35 im Cerebellum und der Pons (Querschnitt, alkalische Phosphatase). Balken: 1 mm.

Das Vesikelprotein VAMP-2 ist in der Molekularschicht, der Körnerzellschicht und in den Purkinjezellen nachweisbar, zeigt aber in der Molekularschicht nur ein geringes Vorkommen (Abb. 154).

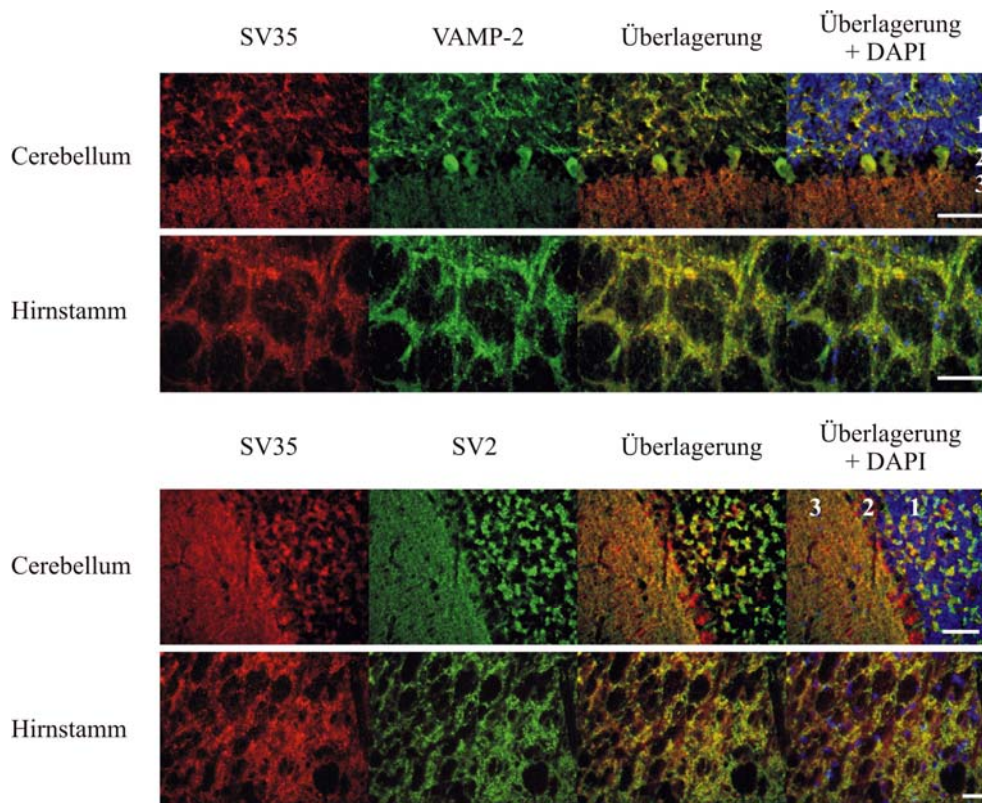


Abb. 154. Studie zur Kolo-kalisation von SV35 mit den integralen synaptischen Vesikelproteinen VAMP-2 und SV2 in Cerebellum und Hirnstamm. (1) Körnerzellschicht, (2) Purkinjezellschicht, (3) Molekularschicht. Rot, SV35; grün, VAMP-2 bzw. SV2; blau, DAPI-Färbung der Nuklei. Balken: 10 µm.

Für SV35 ergibt sich hingegen eine starke Markierung in der Molekularschicht, die teilweise mit der von VAMP-2 überlappt. Die Überlappung beider Proteine ist jedoch in der Körner- und auch in der Purkinjzellschicht deutlich ausgeprägter. In der inferioren Olive des Hirnstamms zeigt sich eine Gleichverteilung, die auch für SV2 nachweisbar ist. Im Cerebellum überlappen SV2 und SV35 in der Molekularschicht und der Körnerzellschicht, wobei die SV35-haltigen Fasertrakte in der Molekularschicht nicht immer mit SV2-haltigen Fasertrakten kolokalisieren.

Der vesikuläre GABA/Glycintransporter ist insbesondere in der Körner- und Purkinjzellschicht vorhanden, aber auch in der Molekularschicht präsent (Abb. 155). Für die Molekular- und Körnerzellschicht ergibt sich bei konfokaler Analyse eine Kolokalisation, während in den Purkinjzellen keine bis wenig Überlappung nachweisbar ist (Abb. 155). Eine genaue Untersuchung des Verlaufes der Fasertrakte in der Molekularschicht ergibt abweichende Muster für beide Proteine. In der inferioren Olive des Hirnstamms ist eine partielle Kolokalisation erkennbar.

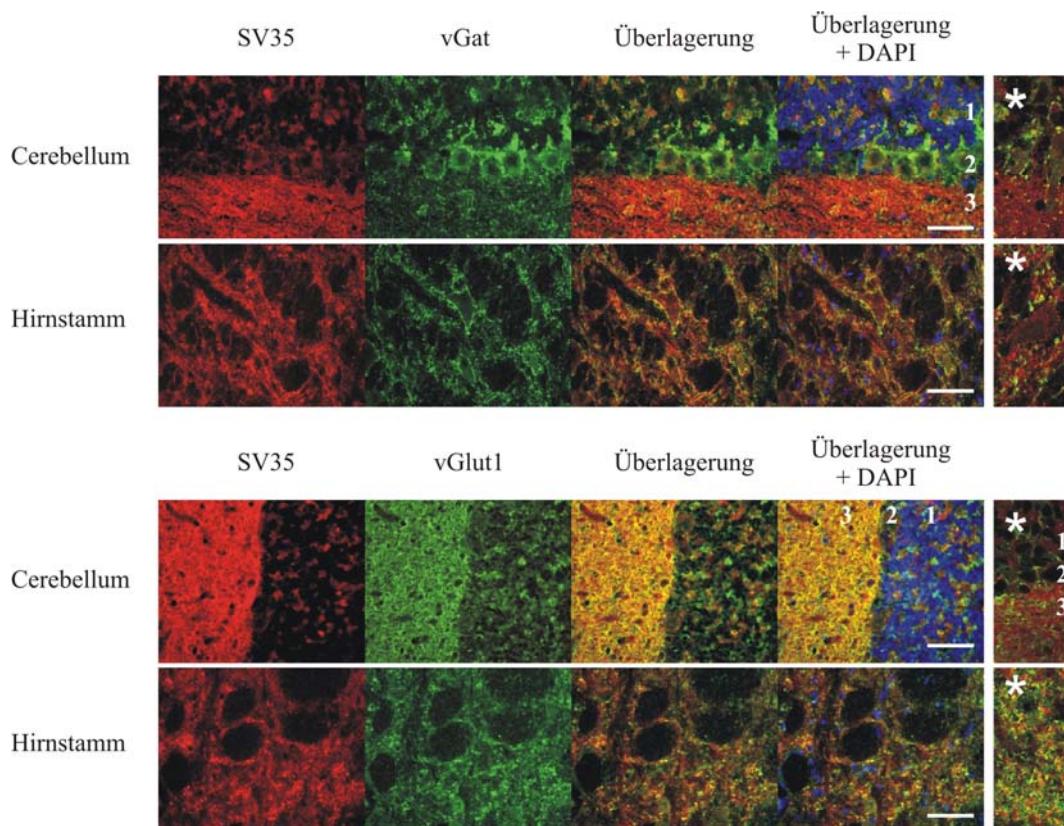


Abb. 155. Studie zur Kolokalisation von SV35 mit den Neurotransmittertransportern vGat und vGlut1 in Cerebellum und Hirnstamm. (1) Körnerzellschicht, (2) Purkinjzellschicht, (3) Molekularschicht. Sterne kennzeichnen konfokale Analysen. Rot, SV35; grün, VAMP-2 bzw. SV2; blau, DAPI-Färbung der Nuklei. Balken: 10 μ m.

Analysen des Glutamattransporters vGlut1 ergeben eine Kolo-kalisation mit SV35 in der Molekularschicht (Abb. 155). Dies wird durch durch konfokale Untersuchungen bestätigt. Die SV35-haltigen Fasertrakte bleiben jedoch von vGlut1 ausgespart, das zudem eine deutlich punktuellere Markierung aufweist als SV35. Auch die Körnerzellschicht läßt Übereinstimmungen erkennen. Konfokale Untersuchungen des Hirnstamms ergeben wie für vGat beschrieben eine partielle Überlappung von vGlut1 mit SV35.

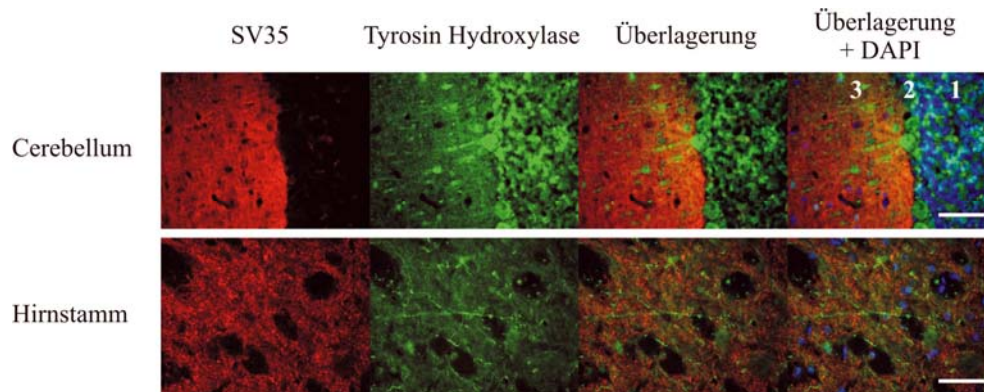


Abb. 156. Studie zur Kolo-kalisation von SV35 mit der Tyrosin Hydroxylase in Cerebellum und Hirnstamm. 1, Körnerzellschicht; 2, Purkinjezellschicht; 3, Molekularschicht. Rot, SV35; grün, Tyrosin Hydroxylase; blau, DAPI-Färbung der Nuklei. Balken: 10 µm.

Die Tyrosinhydroxylase ist in allen drei Schichten des Kleinhirns vertreten und liegt in Fasertrakten der Molekularschicht vor, die jedoch keine Übereinstimmung mit SV35 ergeben (Abb. 156). Auch im Hirnstamm findet sich keine Übereinstimmung des Enzyms mit SV35 wieder.

Zusätzlich zu den besprochenen Markern wurden Antikörper gegen die vesikulären Neurotransmittertransporter vAChT und vMaT2 eingesetzt. Die Applikation dieser Antikörper am Gewebeschnitt ergab jedoch keine zufriedenstellenden Immunfärbungen.

4 DISKUSSION

4.1 Evaluation der Analyse des Saccharosegradienten

Für eine Proteomanalyse ist die Reproduzierbarkeit und damit die Vergleichbarkeit der Präparation essentiell. Dies konnte anhand von Western Blot Analysen des integralen synaptischen Vesikelproteins Synaptophysin demonstriert werden. Die leichten Schwankungen sind durch manuelle Entnahme der 1 ml-Fraktionen zu erklären. Um geeignete Fraktionen des Gradienten für die Analyse des Proteoms synaptischer Vesikel auszuwählen, wurde dieser eingehend über Immunanalysen untersucht. Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die Fraktionen 5 bis 11 freie synaptische Vesikel enthalten. Alle untersuchten integralen synaptischen Vesikelproteine sowie peripher assoziierte Vesikelproteine sind in diesen Fraktionen enthalten. Als wichtiges Indiz dienen zudem Markerproteine für Plasmamembran und postsynaptische Dichte, die in diesen Fraktionen fehlen. Zusätzlich enthalten die gewählten Fraktionen keine Spuren von ER, Golgi, Peroxisomen, Lysosomen, Nuklei und Mitochondrien. Auch hochmolekulare Proteine wie Bassoon und Piccolo sind nur in geringem Ausmaß vorhanden bzw. nicht detektierbar. Dagegen finden sich diese Proteine in den unteren Fraktionen wieder, die daher vermutlich u.a. an die Plasmamembran gedockte Vesikel darstellen (Morciano *et al.*, 2005). Hier sind Plasmamembran und postsynaptische Dichte zu erwarten. Zusätzlich lassen sich in diesen Fraktionen Endosomen, Peroxisomen, Mitochondrien, Golgi und ER detektieren, die Kontaminationen der Vesikelpräparation darstellen.

Charakteristika für den freien synaptischen Vesikelpool (Fraktionen 5 bis 11) stellen das Wanderungsverhalten im Gradienten bei 0,29 M bis 0,44 M Saccharose dar sowie eine sechsfach geringere Proteinkonzentration im Vergleich zu den tieferen Fraktionen. Integrale Vesikelproteine zeigen hierbei jedoch nach Quantifizierung der Immunsignale eine äquivalente Abundanz in beiden Fraktionen und liegen teilweise sogar in den oberen Fraktionen höher konzentriert vor. Dies läßt sich dadurch erklären, daß in den unteren Fraktionen Proteine der Plasmamembran und Postsynapse sowie die erwähnten Verunreinigungen die relative Konzentration an synaptischem Vesikelprotein reduzieren.

4.2 Evaluation der Analyse der Immunreinigung

Das Protokoll der Immunreinigung muß so entwickelt werden, daß optimale Bedingungen für die Bindung des Antikörpers und der Probe an die Magnetbeads sowie für die Elution der Probe von den Magnetbeads geschaffen werden. Die leistungsfähigste Elution erhält man durch Verwendung von DTT-haltigem SDS-Probenpuffer. Da dies jedoch in der Spaltung der eingesetzten Antikörper (Antikörper aus dem SV2-haltigen Hybridoma-Überstand und Antikörper, die bereits an die Magnetbeads gekoppelt vorliegen) resultiert, wurde in den meisten Fällen die Verwendung von NP-40 bevorzugt. Ein zusätzlicher Vorteil des NP-40 liegt in seiner Verwendbarkeit bei 4°C, was die Proteinstabilität fördert und Proteinaggregationen verhindert. Wie anhand der Nachelution demonstriert wurde, ist neben SDS-Probenpuffer auch NP-40 ein potentes Elutionsmittel. Nicht eluierte Proteine sind in marginalen Konzentrationen nachweisbar. Die Verwendung von NP-40 führt jedoch zu keiner oder nur einer geringen Detektion von SV2, da der Großteil des Proteins über Antikörper-Antigen-Bindung an die Magnetbeads gebunden bleibt. Eine vollständige Elution dieses Proteins ist lediglich durch Verwendung reduzierender Agenzien wie DTT möglich. Der Nachteil der fehlenden SV2-Elution gegenüber der hohen Abundanz der Antikörper-Ketten und Überlagerung anderer Proteine bei der Elution durch Probenpuffer/DTT ist vernachlässigbar. Andere Elutionsmittel kamen bis auf die Verwendung von BAC-Probenpuffer nicht zum Einsatz, da die Nachelution in vergleichsweise hohen Proteinkonzentrationen resultierte. Zusätzlich ist durch Wahl der Magnetbeads und geeignete Blockierungsmethoden die Spezifität der Aufreinigung gewährleistet.

Die Magnetbeadkontrollen beweisen die Spezifität der Immunreinigung synaptischer Vesikel. Bei Inkubation der Magnetbeads mit TBS, mit unspezifischem Maus-Antikörper oder SV2-Antikörper ohne Zugabe von Vesikelprobe sind lediglich zwei Signale bei 25 kDa und 50 kDa detektierbar. Hierbei handelt es sich um die verwendeten Immunglobuline, die durch Elution mit Probenpuffer und DTT in leichte und schwere Ketten gespalten werden. Die Signale im Versuch ohne Zugabe von SV2-Antikörper resultieren aus der Elution bereits an die Magnetbeads gekoppelter Antikörper. Die Signale für die beiden Immunglobulin-Ketten sind daher in den Ansätzen mit zugegebenem SV2-Antikörper intensiver als in den Ansätzen ohne. Die Inkubation der Magnetbeads mit synaptischen Vesikeln ohne Zugabe von Antikörper resultiert neben den Immunglobulin-Ketten in zwei Spots bei ~80 kDa. Hierbei handelt es sich um Synapsin Ia und Ib, wie durch massenspektrometrische Analyse gezeigt werden konnte. Diese Proteine binden vermutlich unspezifisch an die Magnetbeads. Dies wird durch

den Versuch mit unspezifischem Maus-Antikörper und der Vesikelprobe bestätigt. Auch hier sind die Immunglobulin-Ketten sowie die beiden Synapsin I-Isoformen nachweisbar. Die Inkubation der Magnetbeads mit SV2-Antikörper und Vesikelprobe resultiert hingegen in der Aufreinigung synaptischer Vesikelproteine.

Der Salz- und pH-Schritt während der Immunreinigung sollte der Vereinfachung des Proteinmusters durch Loslösung peripher assoziierter Proteine dienen, basierend auf einer Schwächung der elektrostatischen Interaktionen. Immunanalysen der beiden Schritte demonstrieren jedoch, daß kein Protein abgelöst wurde. Selbst Synapsin und das lösliche GFAP liegen nach der Behandlung nach wie vor an die Vesikel gebunden vor. Dies wurde einerseits bereits für Synapsin demonstriert (Hartinger *et al.*, 1996), andererseits könnten die Magnetbeads einen schützenden Effekt auf gebundene synaptische Vesikel besitzen. Beide Schritte wurden trotz des fehlenden Effektes bei jeder Immunreinigung durchgeführt, da das Proteinmuster nach 2D-Elektrophorese eine bessere Fokussierung und eine geringere unspezifische Hintergrundfärbung aufwies.

Die Analyse der ungebundenen Probe ergibt eine Reihe von Vesikelproteinen. Sowohl integrale Proteine wie SV2, Synaptophysin, Synaptogyrin als auch peripher assoziierte Proteine wie Synapsin I, Synapsin II und GFAP wurden detektiert. Gegenüber der gebundenen Probe sind diese Proteinkonzentrationen jedoch vernachlässigbar. Die Konzentrationsbestimmung und elektrophoretische Analyse des Hybridoma-Überstandes vor nach der Immunreinigung legt dar, daß im Überschuß gearbeitet wurde und nicht der Antikörper Grund der unzureichenden Vesikelbindung ist.

Drei Vesikelpopulationen wurden nach Immunreinigung und zweidimensionaler Elektrophorese untersucht: Fraktionen 5 bis 11, 12 bis 27 und 28 bis 34, von denen die oberen Fraktionen erwartungsgemäß die proteinärmsten sind. Dies wurde bereits durch Silberfärbung der Gradientenfraktionen dargelegt. Insbesondere bezüglich der Proteine hoher molekularer Masse lassen sich Unterschiede zwischen den Fraktionen 5 bis 11 und den beiden anderen Populationen feststellen. Die Anfärbung von Proteinen größer als 120 kDa ist in den Fraktionen 12 bis 27 ausgeprägter als in den oberen Fraktionen und zeigt in den unteren Fraktionen die stärkste Präsenz. Die unteren Fraktionen sollten laut Immunanalysen neben synaptischen Vesikelproteinen Proteine der Plasmamembran, Postsynapse und die nachgewiesenen Kontaminationen enthalten. Dies geht konform mit der Anzahl gefärbter

Proteinspots. Die mittleren Fraktionen geben eine intermediäre Proteinabundanz wieder. Ähnlichkeiten bestehen sowohl zu den oberen als auch zu den unteren Fraktionen. Neben diesen Ähnlichkeiten sind zudem Spots detektierbar, die in keinem der beiden anderen Gele vorhanden sind. Die mittleren Fraktionen könnten eine weitere Population von Vesikeln darstellen. Laut Immunanalyse des Saccarosegradienten sind nur geringe Konzentrationen synaptischer Vesikelproteine in diesen Fraktionen enthalten. Dennoch läßt sich dieses Organell über SV2 aufreinigen. Ein zusätzliches Indiz für das Vorhandensein einer weiteren Vesikelpopulation bildet der dreigipfelige Verlauf nach Konzentrationsbestimmung der Gradientenfraktionen. Der mittlere Gipfel entspricht hierbei den Fraktionen 12 bis 21, die durch Wahl der Fraktionen 12 bis 27 eingeschlossen sind. Welches Organell sich hinter diesen Fraktionen verbirgt, kann nur durch eingehende massenspektrometrische Analyse herausgefunden werden.

4.3 Analyse von Vesikelsubpopulation

Die molekulare Diversität synaptischer Vesikel entstammt vermutlich der differentiellen Expression synaptischer Vesikelproteine in verschiedenen Teilen des Gehirns. Um Unterschiede in Vesikelsubtypen aufzuzeigen, wurden synaptische Vesikel über die Neurotransmittertransporter vGat und vGlut1 aufgereinigt. Beide Subtypen beinhalten jedoch laut Immunanalyse den jeweils anderen Transportertyp, so daß eine Trennung der GABA/glycinerigen und glutamatergen Vesikel nicht erfolgen kann. Die Daten sprechen für eine Kolo-kalisation beider Transmittertransporter auf identischen Vesikeln. Dies steht in Einklang mit Hinweisen für das Vorkommen beider Transportertypen auf identischen Vesikeln (Jonas *et al.*, 1998).

4.4 Evaluation der Analyse des Präparationsverlaufes

Für bestimmte Kompartimente spezifische Proteine reichern in ihrer Konzentration relativ zum Ausgangsmaterial an (Brunet *et al.*, 2003). Proteine, die an Abundanz im Verlauf der Präparation abnehmen, stellen daher Proteine dar, die unspezifisch mit synaptischen Vesikeln assoziiert sind bzw. deren Gehalt in oder an den Vesikeln gegenüber anderen subzellulären Kompartimenten vergleichsweise gering ausfällt. An- und Abreicherungsstudien sind daher ein wichtiges Mittel zur Überprüfung der aufgereinigten Organelle.

Die integralen synaptischen Vesikelproteine reichern sich während der Präparation an. Unterschiede finden sich im Ausmaß des Effektes. Die Anreicherung der Transporter vGat und vGlut1 ist als gering zu beschreiben, während der vesikuläre Acetylcholintransporter vAChT stark an Konzentration zunimmt. Proteine, die mit dem SNARE-Komplex und damit der präsynaptischen Plasmamembran assoziiert sind, sowie einige vesikelassoziierte Proteine können in der immungereinigten Probe nicht detektiert werden. Gleiches gilt für endozytotische Proteine, postsynaptische Proteine, peroxisomale und mitochondriale Proteine. All diese Daten sprechen für eine Aufreinigung synaptischer Vesikel.

4.5 Evaluation der angewandten Phasentrennungen

Präfraktionierungen zielen darauf ab, die Diversität und Komplexität von Proteinmischungen zu reduzieren. Phasenseparationen sind eine Möglichkeit, dieses Ziel zu erreichen. Die Separation mit Triton X-114 resultiert in erfolgsversprechenden Ergebnissen, da Membranproteine und lösliche Proteine optimal voneinander separiert werden. Jedoch treten bei massenspektrometrischer Analyse unüberwindbare Schwierigkeiten bei der Kristallisation von Matrix und Analyt auf, die vermutlich durch den Einsatz des Detergenz bedingt sind. Triton wirkt als nicht flüchtiges Lösungsmittel und resultiert in einer schlechten Kristallisation der Matrix (Vorm *et al.*, 1994). Die Entfernung des TX-114 könnte über Bio-Beads SM (BIO-RAD), Detergent-Out (Chemicon) oder Extracti-Gel D (Pierce) erreicht werden, die zum Zeitpunkt der Analyse jedoch nicht zur Verfügung standen.

Andere Systeme basieren auf einer Mischung aus Polymer und mildem Detergenz wie Digitonin und Dodecylmaltosid. Digitonin führt in Kombination mit PEG-6000 zu einer Phasentrennung, die lediglich in quantitativen Unterschieden resultiert. Vermutlich ist die Solubilisierung durch Digitonin nicht potent genug, um assoziierte von integralen Proteinen zu trennen, da Digitonin beispielsweise für die Solubilisierung von Proteinkomplexen, u. a. auch sehr labiler Komplexe, verwendet wird. Aus diesem Grund wurde Dodecylmaltosid eingesetzt. Aber auch hier ist die Solubilisierung der Vesikelmembran nicht ausreichend, wie anhand der Nachelution gezeigt werden kann. Beide Phasen resultieren in identischen Proteinmustern. Auch dieses Detergenz scheint für eine Trennung peripher assoziierter Proteine von integralen Membranproteinen zu mild zu sein. Daher wurde NP-40 als Detergenz verwendet, für das bereits gezeigt werden konnte, daß es Vesikelproteine potent solubilisiert. Die Ansätze bei pH 7,4 resultieren in einer sehr schlechten Separation, die vorwiegend quantitativer Natur ist. Durch Einführung von SDS unter dessen kritischer

Mizellarkonzentration und Anheben des pH-Wertes auf pH 9 oder 10 ändert sich das Phasenverhalten durch die erhöhte elektrostatische Repulsion grundlegend. Die Anwendung dieses Systems resultiert in zwei Phasen, die deutliche Unterschiede im Proteinmuster erkennen lassen. Trotz der guten Proteinseparation konnte dieses System nicht für die Massenspektrometrie verwendet werden, da es zu Problemen bei der Proteinsolubilisierung kam, nachdem die jeweilige Phase zur Konzentrierung präzipitiert wurde.

Neben Detergenzien kann auch Chloroform zur Solubilisierung von Membranen verwendet werden. In Kombination mit Methanol lassen sich Phasentrennungen erzielen, deren Ergebnisse vielversprechend aussehen, die jedoch wiedergeben, daß Inkompatibilitäten zwischen den Magnetbeads und den verwendeten Lösungsmitteln bestehen. Die Proteinkonzentration des Eluats liegt bei Vergleich mit anderen Ansätzen zu niedrig. Versuche, die Konzentration der noch gebundenen Proteine über Nachelution qualitativ zu bestimmen, schlugen fehl und zeigen erneut die Unverträglichkeit der Magnetbeads mit den organischen Lösungsmitteln. Aufgrund der schlechten Elution wurden Vesikelproteine zunächst mit Detergenz eluiert und das Eluat anschließend der Phasenseparation mittels Methanol und Chloroform zugeführt. Hierbei stellte sich heraus, daß keine Separation erzielt werden konnte. Da dies vermutlich in einer schlechten Solubilisierung der Proteine begründet liegt, wurde die Vesikelprobe mit Ultraschall behandelt, was in einem Phasenverhalten resultierte, das lediglich quantitativer Natur war. Um den Einfluß des Detergenz auf das Phasenverhalten zu untersuchen und gegebenenfalls auszuschließen, wurden Ansätze mit und ohne Präzipitation nach Elution mit Detergenz durchgeführt. Einige der Gemische resultierten in heterogenen Zweiphasensystemen, andere in Dreiphasensystemen. Die 1:1-Mischung führte zu einem homogenen Zweiphasensystem. Die höchsten Proteinkonzentrationen befanden sich hierbei in allen Ansätzen mit Dreiphasensystemen in den wäßrigen Phasen. Den Zweiphasensystemen ist eigen, daß sich in drei der fünf Systeme für die präzipitierte Probe eine Separation erkennen läßt. Hierbei handelt es sich jedoch wiederum ausschließlich um ein quantitatives Phänomen. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß keines der verwendeten Systeme in einer hinreichend überzeugenden Separation resultierte. Ultraschallbehandlung resultierte zwar in einer verbesserten Solubilisierung, konnte jedoch nicht das Problem der Phasentrennung beheben. Der Einsatz von Detergenz änderte das Phasenverhalten dramatisch. Präzipitation war an dieser Stelle keine Lösung, da diese lediglich in Proteinverlusten resultierte. Hier bestätigt sich, daß für jedes biologische System eigene Systeme entwickelt werden müssen, obwohl die Systeme an sich mit anderen Proben hervorragend funktionieren.

Tris- und Natriumcarbonat-basierende Systeme zeigen eine schwache Extraktion peripher assoziierter Proteine. Resultiert das Hochsalz-System in der Ablösung einiger Proteine, die jedoch in höheren Konzentrationen immer noch an die Vesikelmembran assoziiert sind, führt die Anwendung eines hohen pH-Wertes zu keinerlei Einfluß auf die elektrostatische Anheftung peripherer Vesikelproteine. Dies könnte sich durch einen durch die Magnetbeads verursachten, schützenden Effekt erklären lassen, der den Einfluß von Puffern minimiert.

Da all diese Systeme entweder zu unbefriedigenden Ergebnissen führten oder inkompatibel mit weiterführenden Analysen über Massenspektrometrie waren, wurde auf eine Präfraktionierung verzichtet und das synaptische Vesikelproteom komplett analysiert. Mögliche Ansatzpunkte für eine erfolgreiche Anreicherung gering abundanter Proteine könnten die Equalizer Beads (Cypherger) sein. An diese Beads ist eine Bibliothek von Millionen von Liganden gekoppelt, wobei jeder Bead eine äquivalente Bindekapazität und eigene Liganden besitzt. Wenn eine komplexe Probe mit den Beads inkubiert wird, findet jedes Protein seinen Bindepartner. Hochabundante Proteine sättigen ihre Beads und überschüssiges Protein wird entfernt. Dagegen werden gering abundante Proteine angereichert. Eine weitere Vereinfachung des Proteinmusters könnte ferner durch Ultrafiltration mit Filtrationseinheiten unterschiedlicher Cutoff-Werte erreicht werden.

4.6 Massenspektrometrie

Die Etablierung geeigneter Protokolle für die massenspektrometrische Analyse resultierte in folgenden Punkten. Als Präzipitationstechnik erwies sich die Aceton-Fällung am ehesten geeignet. Die Chloroform/Methanol-Fällung erschien mit den gegebenen Volumina als schwer durchführbar und lieferte keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Die Konzentrierung per Ultrazentrifuge resultierte in einer Akkumulation von Salz, was bei der anschließenden Gelelektrophorese zu massiven Interferenzen führte. Insgesamt resultierte die Probenpräzipitation in Proteinverlusten und wurde daher unterlassen, wo es möglich war. MS-Gele wurden ausschließlich mit Coomassie gefärbt, da die Silberfärbung erwiesenermaßen zu geringeren Signifikanzen bei der Proteindetektion führte. Da dies bereits für hydrophile Proteine zu beobachten war und davon auszugehen ist, daß sich diese Probleme bei der Detektion hydrophober oder gering abundanter Proteine verstärkt, ist die Färbung mit Coomassie trotz der Sensitivitätsnachteile (5 bis 10 ng mit Coomassie im Vergleich zu 0,05 bis 2 ng mit Silber) Methode der Wahl. Coomassie färbt hierbei alle Proteine bis auf Glycoproteine und solche mit extremen isoelektrischen Punkten an. Es entstehen jedoch

Artefakte in der Massenspektrometrie durch die Entfärbung mit einer Säure/Alkohol-Mischung, die in der Bildung von Methyl-, Ethyl- oder Isopropylacetaten resultiert. Diese Ester könnten mit Aminogruppen reagieren und Amide bilden, was zur Blockade des N-Terminus oder zur Acetylierung der Lysine führt, wodurch die Spaltung mit Trypsin nicht funktioniert. Möglicherweise könnte dies der Grund für die fehlende Identifikation einiger Proteine sein, die durch alleinige Entfärbung mit Säure oder Alkohol hätten identifiziert werden können. Da jedoch bei schneller Verarbeitung der Gele diese Effekte zu vernachlässigen sind, wurde auf die deutlich langsamere Entfärbung mit Säure oder Alkohol verzichtet, zumal diese die Gefahr von Kontaminationen aufgrund der längeren Zeitdauer erhöht hätten.

Trotz der optimalen Eigenschaften des Trypsin für den proteolytischen Verdau kann durch Einsatz unspezifisch verdauender Proteasen zusätzliche Sequenzabdeckung geschaffen werden. Dies gilt insbesondere für die problematischen hydrophoben Proteine. Grund der Problematik ist das Fehlen tryptischer Spaltstellen in membrandurchspannenden Teilen der Proteine. Die generierten tryptischen Fragmente sind zu groß für eine Detektion per MS. Zum Einsatz könnten die Proteasen Chymotrypsin, Elastase, Thermolysin, Pepsin, Endopeptidase und Bromcyan kommen (Tabelle 26). Zu beachten ist hierbei, daß Pepsin ein pH-Optimum von 2 besitzt und auch die Spaltung mit Bromcyan im Sauren stattfinden muß. Die aufgelisteten Enzyme haben trotz ihrer teilweise hohen Spezifität dennoch den Nachteil, daß sie für die Massenspektrometrie Fragmente ungeeigneter Größe produzieren. Trypsin bleibt demnach Enzym der Wahl.

Spaltung durch	Spaltung	
	spezifisch	gelegentlich
Trypsin	Arg, Lys	
Chymotrypsin	Phe, Trp, Tyr	Asn, His, Met, Leu
Elastase	Ala, Gly, Ser, Val	
Thermolysin	Ile, Met, Phe, Trp, Tyr, Val	Ala, Asp, His, Thr
Pepsin	Leu, Phe, Trp, Tyr	viele andere
Endopeptidase	Glu	
Bromcyan	Met	

Tabelle 26. Peptidase, die in der Massenspektrometrie Anwendung finden.

Ebenfalls nützlich könnte der methanolgepufferte Trypsinverdau in Lösung sein (Blonder *et al.*, 2004), in dem hydrophobe Proteine durch Methanol solubilisiert werden und so leichter identifiziert werden können. Möglicherweise zeigt Trypsin in Methanol aber unspezifische Peptidaseaktivität. Zusätzlich sind nützliche Effekte durch Einführung von 0,1% Octylglucosid während der Trocknung der Gelstücke in der Vakuumzentrifuge beschrieben, was die Gewinnung hydrophober Peptide steigert (van Montfort *et al.*, 2002). All dies ist

jedoch mit der in und an Vesikeln vorhandenen Proteinzahl und einer nicht vollständig automatisierten Analyse nicht machbar.

Die Analyse des Proteoms synaptischer Vesikel über Verdau in Lösung ist keine Option. Das Proteingemisch ist für solch einen Ansatz zu komplex und resultiert lediglich in der Identifikation hoch abundanter Proteine, die alle anderen Proteine überlagern. Die Analyse des Proteoms wurde daher durch Kombination zweidimensionaler Systeme mit MALDI-TOF-MS und eindimensionaler SDS-PAGE mit nanoscale-LC ESI-MS/MS erreicht. In letzterem Fall reicht die Analyse über MALDI-TOF-MS nicht aus. Aufgrund der schlechten Separation der Proteine über die eindimensionale Elektrophorese können viele Proteine nur als Gemisch detektiert werden, was die Signifikanz der Identifikation drastisch herabsetzt. Eine weitere Trennung über Chromatographie ist daher unabdingbar.

4.6.1 Evaluation der Proteinseparation über verschiedene Elektrophoresetechniken

Ein Meilenstein in der 2D-Elektrophorese lag in der Einführung immobilisierter pH-Gradienten für die isoelektrische Fokussierung (Corbett *et al.*, 1994). Für Membranproteine ist aber nach wie vor die Probensolubilisierung ein Problem, obwohl Chaotrope wie Harnstoff und Thioharnstoff Wasserstoffbrücken zerstören, zum Entfalten der Proteine führen, und zwitterionische Detergenzien wie CHAPS hydrophobe Interaktionen vermindern, die aufgrund der durch die Chaotrope induzierten Exposition hydrophober Domänen entstehen können (Rabilloud, 1996). Die Anwendung der isoelektrischen Fokussierung in Kombination mit SDS-PAGE resultiert in einer bescheidenen Fokussierung eines Großteils der Proteine. Insbesondere Membranproteine schmieren gemäß Immunanalyse über einen breiten pH-Bereich und können nur sehr schlecht in der ersten Dimension separiert werden, was dem Ausschneiden definierter Spots sehr abträglich ist. Möglicherweise könnte diesem Problem durch ‚Cup-Loading‘ Abhilfe geschaffen werden, das jedoch nicht zur Verfügung stand.

Die Systeme BAC/SDS-PAGE und dSDS-PAGE sind hingegen deutlich besser für die Auftrennung hydrophober Membranproteine geeignet (Hartinger *et al.*, 1996; Rais *et al.*, 2004), wie sich durch die Western Blot Daten belegen läßt. Für alle analysierten integralen Vesikelproteine sind scharf fokussierte Spots erkennbar. Obwohl die Fläche zur Proteinseparation geringer ist als die Fläche, die bei der IEF/SDS-PAGE zur Verfügung steht, wurden diese beiden Systeme für die Proteomanalyse verwendet. Die Trennung über BAC/SDS-PAGE ist hierbei optisch besser zu werten als die über dSDS-PAGE, was in der

Verwendung des Detergenz BAC und dem Einsatz von Harnstoff begründet liegt. BAC trennt Proteine primär nach molekularer Masse, besitzt aber nützliche Diskrepanzen im Vergleich zu SDS. Der Grund ist nicht klar, jedoch könnte BAC weniger effektiv Disulfidbrücken reduzieren, und verschiedene Proteine könnten unterschiedliche Mengen der zwei ionischen Detergenzien binden (Macfarlane, 1986). Die Verwendung der dSDS-PAGE gegenüber BAC/SDS-PAGE besitzt insofern Vorteile, daß keine Umpufferung des Detergenz nötig ist und so der Transfer von der ersten in die zweite Dimension leichter erfolgen kann.

Erleichternd bei der Evaluation der Gelelektrophoresetechniken war die Möglichkeit der Anfärbung von Nitrozellulosemembranen vor der Immundetektion. Wie gezeigt werden konnte, hat diese Technik keinen Einfluß auf die Antikörperdetektion und kann daher standardmäßig eingesetzt werden.

4.6.2 Evaluation der Effizienz verschiedener Elektrophoresetechniken

Die drei verwendeten gelelektrophoretischen Systeme resultierten in einer hohen Zahl identifizierter synaptischer Vesikelproteine und ergänzen sich in dieser Hinsicht sehr. Nur 19% der 185 Proteine wurden mit allen drei Techniken nachgewiesen. Die eindimensionale SDS-PAGE in Kombination mit nano-LC ESI-MS/MS erwies sich als die effizienteste Technik für eine Proteomanalyse. Dennoch entgingen dem System 23% der identifizierten Proteine, die über BAC/SDS- und dSDS-PAGE identifiziert werden konnten. Dies zeigt, daß für eine eingehende Proteomanalyse mehrere verschiedene, komplementäre Systeme verwendet werden müssen, um ein umfassendes Bild eines Organells zu erhalten.

Bei Vergleich der drei Systeme fällt auf, daß für die Identifizierung integraler Membranproteine die 1D- und dSDS-PAGE gut geeignet sind. Vermutlich liegt dies in der nicht nötigen Umpufferung des Detergenz und der damit verbundenen fehlenden möglichen Präzipitation begründet. Für membranassoziierte Proteine ist hingegen das BAC-System am besten geeignet. Betrachtet man Parameter wie den Gravy Score, so ist die dSDS-PAGE am effektivsten in der Trennung hydrophober Proteine. Weshalb durch Verwendung des eindimensionalen, ebenfalls auf SDS basierenden Systems nicht ähnliche Ergebnisse erhalten wurden, bleibt unklar. Die 1D-PAGE hat jedoch deutlich Vorteile bei der Identifikation von Proteinen hoher molekularer Masse. Dies sieht sich darin begründet, daß die komplette Gelspur analysiert wurde, während dieser Bereich in den 2D-Gelen als schlecht fokussierter Schmier erschien, aus dem keine definierten Spots entnommen werden konnten. Letztendlich

zeigt sich, daß die Anwendung multipler System essentiell für eine Proteomanalyse ist, selbst wenn das Proteom wie das der synaptischen Vesikel sehr überschaubar ist. Die Auflösung der Proteine im eindimensionalen SDS-Gel ist wie zu erwarten für hoch abundante und hydrophobe Proteine unzureichend. Nahezu alle integralen synaptischen Vesikelproteine zeigen eine hohe Unschärfe und können über die zweidimensionalen Techniken deutlich besser von anderen Proteinen separiert werden. Gute Trennleistungen zeigt das System jedoch für gering abundante Proteine, die in ein oder zwei Gelbanden nachgewiesen werden konnten.

Die unter Kontaminationen geführten Proteine müssen in weiteren Analysen als wirkliche Kontaminationen bestätigt werden. Im Einzelnen sind alle identifizierten Proteine in den nachfolgenden Abschnitten besprochen. Dort wird klar, daß einige der Kontaminationen durchaus Kandidaten für eine Assoziation mit und/oder Funktion an synaptischen Vesikeln sein könnten.

4.6.3 Identifizierung von Proteinen

4.6.3.1 Integrale synaptische Vesikelproteine

4.6.3.1.1 SV2

Das Protein SV2 wurde für die Immunreinigung verwendet, da es intrazellulär exklusiv auf synaptischen Vesikeln lokalisiert ist. Die Analyse des Saccharosegradienten zeigt den für integrale synaptische Vesikelproteine typischen bimodalen Verlauf und demonstriert die Anhäufung des Proteins in den oberen und unteren Fraktionen. SV2 zeigt erwartungsgemäß eine Anreicherung während der Präparation und ist damit als vesikelspezifisches Protein zu werten.

Bei SV2 handelt es sich um ein stark glykosyliertes Protein mit zytoplasmatischen N- und C-Termini, das zwölf potentielle Transmembranhelices enthält. Das Protein ist homolog zu bakteriellen und eukaryontischen Kohlenhydrattransportern (Buckley und Kelly, 1985; Feany *et al.*, 1992; Bajjalieh *et al.*, 1994), die Substrate sind jedoch bisher nicht identifiziert. Verschiedene Hypothesen weisen auf eine essentielle Funktion des SV2 für eine normale Ausprägung der Ca^{2+} -regulierten Exozytose hin (Brose und Rosenmund, 1999). Die glykosylierten, intravesikulären Domänen von SV2 könnten lösliche Neurotransmitter fixieren, um den intravesikulären osmotischen Druck herabzusetzen (Alvarez de Toledo *et al.*, 1993). Die intravesikuläre Matrix eines cholinergen synaptischen Vesikels würde sich damit

wie ein Ionenaustauschergel verhalten. Ergebnisse aus SV2 hat eine Ca^{2+} -puffernde Wirkung und vermittelt die Ca^{2+} -stimulierte Exozytose (Janz und Südhof, 1999). Die Wechselwirkung positiver Ladungen des Ca^{2+} würde SV2-komplexiertes Acetylcholin ersetzen. ATP besitzt zwar eine geringere Affinität für Ca^{2+} als Sialylsäure, wird aber ebenso von der Matrix entfernt, wenn die Ca^{2+} -Konzentration steigt und die Ca^{2+} -Bindestellen am Matrixgerüst besetzt sind (Reigada *et al.*, 2003). Alternativ könnte SV2 die Exozytose durch Interaktion mit Synaptotagmin I modulieren (Schivell *et al.*, 1996; Lazzell *et al.*, 2004; Schivell *et al.*, 2005). Die Bindung wird spezifisch durch Ca^{2+} inhibiert, durch Phosphorylierung moduliert (Pyle *et al.*, 2000b) und ist essentiell für normale Exozytosewerte. Beide oder eines der beiden Proteine könnte hierüber in dessen Wirkung reguliert werden. SV2 könnte Synaptotagmin für die Interaktion mit anderen Molekülen primen oder es von ungeeigneten Wechselwirkungen abhalten, bis die angemessene Ca^{2+} -Konzentration erreicht ist (Schivell *et al.*, 2005). Es könnte zudem als Gerüstprotein wirken, das die Vesikelform reguliert (Janz und Südhof, 1998) bzw. als Ca^{2+} -Transporter fungieren und überschüssiges präsynaptisches Ca^{2+} in Vesikel transportieren. Zusätzlich gibt es Hinweise für die Kontrolle der fusionskompetenten Vesikelzahl. Dieser Primingvorgang wird vermutlich Ca^{2+} -abhängig reguliert (Neher und Zucker, 1993; Stevens und Sullivan, 1998), und SV2 erhöht selektiv die Freisetzungswahrscheinlichkeit der durch Priming morphologisch gedockten Vesikel während Ruheperioden (Custer *et al.*, 2006). Kleinere Effekte auf die asynchrone Freisetzung bedeuten, daß SV2 eine geringe Rolle spielt, nachdem Vesikel den RRP erreicht haben. Ohne SV2 ist eine 40%ige Reduktion der Größe des RRP feststellbar. Wenn SV2 als Transporter wirkt, so könnte es die Größe des RRP durch Transport eines Moleküls beeinflussen, das die RRP-Bildung reguliert. Andere Möglichkeiten sind Protein-Protein-Interaktionen (Custer *et al.*, 2006). SV2A ist in nahezu allen Neuronen vorhanden, SV2B zeigt eine eingeschränkte Verteilung (Bajjalieh *et al.*, 1994), und SV2C ist nur in einer Subpopulation von Neuronen präsent (Janz und Südhof, 1999).

4.6.3.1.2 Protonenpumpe

Alle Untereinheiten der vakuolären vATPase konnten nach Anwendung der verschiedenen Elektrophoresetechniken in Kombination mit Massenspektrometrie identifiziert werden. Dies beinhaltet sogar die sehr hydrophobe und damit schwer zu identifizierende Proteolipid-Untereinheit V_0 c.

Vakuoläre ATPasen transportieren Protonen über Membranen verschiedener intrazellulärer Organellen (Nelson und Harvey, 1999). Die Azidifizierung dieser Organellen ist nötig für zelluläre Prozesse wie Proteinreifung, rezeptorvermittelte Endozytose und Symport kleiner Moleküle. vATPasen sind große multimere Enzyme, bestehend aus zwei Domänen. Die katalytische V_1 -Domäne (500 kDa) besteht aus acht verschiedenen Untereinheiten (A-H), der Membransektor V_0 (250 kDa) aus sechs Proteolipid-Untereinheiten (5 c-Untereinheiten, 1 c''-Untereinheit) und einer Kopie von a und d (Nelson und Harvey, 1999; Nishi und Forgac, 2002). Die Proteolipid-Untereinheiten bilden einen Ring, der im Protonentransport involviert ist. Die ATP-Hydrolyse in V_1 A induziert die Rotation des Rings in der Membran und die Translokation von in der Peripherie gebundener Protonen (Nelson und Harvey, 1999). Untereinheit B bindet ATP unter eingeschränkteren Bedingungen als A und spielt vermutlich eine regulatorische Rolle in der Bereitstellung wichtiger Aminosäuren für die katalytische Funktion von A (Nelson und Harvey, 1999). Die V_0 a-Untereinheiten sind sehr divers und könnten für Gewebe- und subzelluläre Spezifität wichtig sein oder vATPasen unterschiedlicher funktioneller Eigenschaften generieren (Kawasaki-Nishi *et al.*, 2001). Die G2-Untereinheit wird exklusiv im Gehirn exprimiert und ist an synaptischen Vesikeln lokalisiert; G1 findet man dagegen vor allem in Somata und Dendriten (Murata *et al.*, 2002). Da die Kinetiken beider Formen gleich sind, könnte die Diversität eine Rolle im Targeting der vATPase spielen. Die Proteine inhibieren vermutlich die Rotation der katalytischen Untereinheiten (Supekova *et al.*, 1996). Die Untereinheit C ist wahrscheinlich für den V_0V_1 -Zusammenbau (Nelson und Harvey, 1999), E für die Assemblierung von V_1 (Ho *et al.*, 1993) und die F-Untereinheit für den Zusammenbau von V_0 und V_1 zuständig (Graham *et al.*, 1994). Untereinheit D koppelt vermutlich als rotierender Schaft die ATP-Hydrolyse mit dem Protonenpumpen, während H die Aktivität und Kommunikation zwischen den vATPasen reguliert (Nelson und Harvey, 1999). Die V_0 -Untereinheit d ist peripher mit dem V_0 -Sektor auf der zytosolischen Seite assoziiert und reguliert den Zusammenbau beider Sektoren (Nelson und Harvey, 1999).

Es gibt mehrere Hinweise dafür, daß der Membransektor der vATPase die Fusionspore bilden könnte (Morel *et al.*, 2001). So führen aufgereinigte Proteolipidringe zur Porenbildung und Öffnung in Anwesenheit von Calcium und Calmodulin, das mit V_0 -Proteolipidkanälen interagiert und bei diesen große Konformationsänderungen auslösen kann (Peters *et al.*, 2001). Ein V_0V_0 *trans*-Komplex bildet eine Pore durch die beiden Membranen (Peters *et al.*, 2001). Das Treffen beider V_0 -Teile ist hierbei durch Interaktion des V_0 auf synaptischen

Vesikeln mit VAMP-2 (Daro *et al.*, 1996) und auf der Plasmamembran mit Syntaxin (Shiff *et al.*, 1996) gesichert. Zudem verbrauchen die Neurotransmittertransporter synaptischer Vesikel nach Befüllung nicht länger den elektrochemischen Gradienten, der maximale Werte erreicht. Dies könnte zur Dissoziation des V_1 -Teils führen. Die reversible Dissoziation von V_1 wurde bereits unter physiologischen Zuständen als Mittel zur Regulation der vATPase gezeigt (Kane, 1995; Sumner *et al.*, 1995). Dies erklärt neben der quantalen Natur der synaptischen Transmission, warum nur gefüllte Vesikel verwendet werden, um Neurotransmitter freizusetzen.

4.6.3.1.3 Vesikuläre Neurotransmittertransporter

4.6.3.1.3.1 Vesikulärer GABA-Transporter

Wie SV2 ist das Transporterprotein durch eine bimodale Verteilung im Saccharosegradienten gekennzeichnet und nimmt während der Präparation an Abundanz zu. Der vesikuläre GABA-Transporter vGat ist in hohen Mengen sowohl in GABAergen als auch glycinergen Nervenendigungen vorhanden und dort mit synaptischen Vesikeln assoziiert (Chaudhry *et al.*, 1998). Subpopulationsanalysen ergeben, daß vGat-Vesikel getrennt von Vesikeln existieren, die Monoamine und Acetylcholin enthalten, aber alle Hauptproteine synaptischer Vesikel enthalten (Takamori *et al.*, 2000).

4.6.3.1.3.2 Vesikulärer Glutamatttransporter

Für die Immunanalysen des Glutamatttransportes gilt Gleiches wie für vGat. Das Protein ist durch ein bimodales Migrationsprofil im Saccharosegradienten und eine Abundanzzunahme während der Präparation charakterisiert. vGlut1 (BNPI) arbeitet als vesikulärer Glutamatttransporter (Bellocchio *et al.*, 2000; Takamori *et al.*, 2000), ist exklusive auf synaptischen Vesikeln lokalisiert, fehlt aber auf vielen excitatorischen Synapsen, die Glutamat als Neurotransmitter nutzen (Bellocchio *et al.*, 2000). Dort könnte vGlut2 (DNPI) wirken, der große Homologie mit vGlut1 besitzt. So enthalten synaptische Vesikel vorwiegend einen der beiden Transportertypen. Kolokalisationen sind jedoch in einigen Axonen vorhanden (Sakata-Haga *et al.*, 2001). vGlut1 ist massiv in excitatorischen Neuronen des cerebralen und cerebellären Cortex sowie im Hippocampus präsent, während glutamaterge Neuronen des Encephalon und Rhombencephalon vorwiegend vGlut2 nutzen (Fremeau *et al.*, 2002; Varoqui *et al.*, 2002). vGlut3 zeigt einzigartige Eigenschaften: man findet ihn in allen cholinergen Interneuronen des Striatum sowie in serotoninerger Neuronen der Raphe Nuclei (Gras *et al.*, 2002).

4.6.3.1.4 Vesikulärer Acetylcholintransporter

Der vesikuläre Acetylcholintransporter wird vorwiegend von cholinergen Neuronen exprimiert (Gilmor *et al.*, 1996). vAChT ist phosphoryliert (Barbosa *et al.*, 1997) - ein Phosphoserin im C-terminalen Schwanz kontrolliert das Sortieren des Transporters in verschiedene Typen sekretorischer Organellen in PC12 Zellen (Cho *et al.*, 2000). Die Leucine 485 und 486 sind nötig für die Endozytose (Tan *et al.*, 1998) und interagieren mit Adaptorproteinen des Clathrin Coats (Bonifacino und Traub, 2003). Immunanalysen belegen die spezifische Assoziation des Transporters mit synaptischen Vesikeln und die Präsenz im freien Vesikelpool. Allerdings konnte das Protein nicht über massenspektrometrische Analyse nachgewiesen werden.

4.6.3.1.4.1 Vesikulärer Amintransporter

Der vesikuläre Amintransporter Vat1 ist ein 41 kDa integrales Membranprotein und Hauptprotein synaptischer Vesikel in Torpedo (Linial *et al.*, 1989). Er bindet Ca^{2+} (Levius und Linial, 1993), was die Komplexbildung aus drei bis vier Untereinheiten fördert. Calcium-Entzug führt zur Destabilisierung der hochmolekularen Assemblate (Levius und Linial, 1993). Vat1 zeigt ATPase-Aktivität (Linial und Levius, 1993), die nicht mit V-Typ und P-Typ ATPasen übereinstimmt. Das Protein wird ausschließlich neuronal exprimiert, obwohl es Gemeinsamkeiten mit der Familie der Oxidoreduktasen aufweist (Linial, 1993; Persson *et al.*, 1994).

4.6.3.1.4.2 Vesikulärer Zinktransporter

Das Übergangsmetall Zink spielt vermutlich eine wichtige physiologische und pathologische Rolle in der neuronalen Entwicklung (Wall, 2005). Zink synaptischer Vesikel ist ein spezieller Pool im Gehirn und vorwiegend in glutamatergen Vesikeln des Vorderhirns lokalisiert (Martinez-Guijarro *et al.*, 1991; Sindreu *et al.*, 2003). Wie andere Neurotransmitter wird Zink bei neuronaler Aktivität freigesetzt (Assaf und Chung, 1984; Howell *et al.*, 1984) und könnte verschiedene physiologische Rollen in der synaptischen Transmission spielen (Li *et al.*, 2001; Ueno *et al.*, 2002), u. a. durch Modulation spannungsabhängiger und ligandengesteuerter Ionenkanäle (Smart *et al.*, 1994). Zusätzlich könnte Zink Zugang zum neuronalen Zytoplasma erhalten und als Signalmolekül dienen (Koh, 2001). Pathologische Funktionen beinhalten eine Rolle in der β -Amyloid-Aggregation und im Neuronentod durch exzessive Zinkfreisetzung in verschiedenen Modellen akuter Gehirnverletzung (Frederickson *et al.*, 1989; Suh *et al.*, 2000). ZnT-3 ist verantwortlich für den Transport von Zink in

synaptische Vesikel (Cole *et al.*, 1999) und wird entwicklungsabhängig im Gehirn exprimiert (Valente und Auladell, 2002). Die Verfügbarkeit von Chlorid-Kanälen in synaptischen Vesikeln reguliert hierbei den Zinkinhalt (Salazar *et al.*, 2004). Dies suggeriert, daß anionische Transportmechanismen die Zinkaufnahme in synaptische Vesikel favorisieren. Glutamat ist als Gegenion ebenfalls gut geeignet, da vGlut1 zusammen mit ZnT-3 in Synapsen exprimiert wird (Palmiter *et al.*, 1996; Wenzel *et al.*, 1997), die Zink und Glutamat freisetzen (Huang, 1997; Takeda, 2000). Zink ist nicht essentiell für die synaptische Transmission oder das Überleben der Neurone, hat aber schützende und neuromodulierende Funktion (Fernandez-Chacon und Südhof, 1999).

4.6.3.1.4.3 NTT4

Der Neurotransmittertransporter NTT4 ist aus 12 Transmembranhelices aufgebaut, wird im ZNS exklusiv in Neuronen exprimiert (Liu *et al.*, 1993; Mestikawy *et al.*, 1994; Masson *et al.*, 1999) und ist vor allem in glutamatergen und einigen Subpopulationen GABAerger Nervenendigungen vorhanden. Sein Substrat ist bisher unbekannt. Es ist überraschend, daß NTT4 ein vesikuläres membrangebundenes Protein ist, da andere Na⁺/Cl⁻-abhängigen Transporter an der Plasmamembran lokalisiert sind (Masson *et al.*, 1999). Neben einer möglichen Funktion als vesikulärer Neurotransmittertransporter könnte vesikulärer NTT4 einen Reservepool an Protein darstellen, das bei Eintreffen eines geeigneten Signals an die Plasmamembran transportiert wird.

4.6.3.1.5 Synaptotagmin

Immunanalysen des Saccharosegradienten hinsichtlich Synaptotagmin resultieren in einem für integrale synaptische Vesikelproteine typischen bimodalen Verlauf. Synaptotagmin 1 nimmt während der Präparation an Abundanz zu. Nach massenspektrometrischer Analyse der gelelektrophoretisch aufgetrennten Vesikelproteine wurden die Synaptotagmin-Isoformen I, II, V und XII identifiziert.

Synaptotagmine sind integrale Membranproteine und befinden sich in nicht überlappenden subzellulären Kompartimenten. Sie sind daher vermutlich in verschiedenen Schritten des Membranverkehrs involviert (Adolfson *et al.*, 2004). Synaptotagmine wirken auf zwei Schritte der Ca²⁺-getriggerten Exozytose: Öffnung der Fusionspore und folgende Porenverbreiterung (Wang *et al.*, 2006). Die zwei charakteristischen Domänen C₂A und C₂B haben hierbei verschiedene Funktionen: C₂A schließt die Fusionspore und fördert „kiss and

run“, C₂B fördert die Öffnung der Pore und die Porenverbreiterung. Diese gegensätzlichen Effekte legen die Wahl zwischen „kiss and run“ und der vollen Fusion als Balanceakt zwischen den beiden Synaptotagmindomänen dar. Synaptotagmin bindet an SNARE-Komplexe in Abwesenheit von Ca²⁺, wechselt aber zur Phospholipidmembran sobald Ca²⁺ einströmt (Davis *et al.*, 1999). Dies könnte das Fusionsintermediat destabilisieren und zum Öffnen der Fusionspore führen (Mahal *et al.*, 2002). Die hier gezeigten Immundaten für Synaptotagmin bestätigen den Status als integrales synaptisches Vesikelprotein.

Nicht alle Synaptotagmine binden jedoch Ca²⁺ und Phospholipide (Rickman *et al.*, 2004). Man unterscheidet vier Klassen. Klasse A beinhaltet die Isoformen 1, 2 und 9, B die Formen 3, 5, 6 und 10. Zu Klasse C zählen Synaptotagmin 4 und 11. Die vierte Klasse beinhaltet einzigartige Synaptotagmine, wozu die Isoformen 7, 12, 13, 14 und 15 zählen. Nur die Klassen A und B sowie Synaptotagmin 7 unterstützen die Ca²⁺-getriggerte Phospholipidbindung bei μ M Konzentrationen, die die beiden zu fusionierenden Membranen zusammenziehen könnte. Die SNARE-Bindung ist für die Ca²⁺-ausgelöste Phospholipidbindung essentiell (Rickman *et al.*, 2004). Bis auf Synaptotagmin 12 und 13 binden alle Isoformen Ca²⁺-abhängig Syntaxin 1 und SNAP-25 (Chapman *et al.*, 1995; Schiavo *et al.*, 1997). Sie interagieren ferner Ca²⁺-unabhängig mit AP2, was durch Frachtbindung an AP2 verstärkt wird (Haucke und De Camilli, 1999) und AP2 für die Endozytose an die Membran rekrutieren könnte. Neben der Bindung weiterer Proteine bilden sie Homo- und Heteromultimere zur Regulation synaptischer Plastizität (Littleton *et al.*, 1999).

Synaptotagmin 1 und 2 sind abundante synaptische Vesikelproteine, die differentiell exprimiert werden (Ullrich *et al.*, 1994). Der einzige Unterschied liegt in der apparenten Ca²⁺-Affinität (Sugita *et al.*, 2002). Die intrinsische Ca²⁺-Affinität der C₂-Domänen ist gering. Erst bei Bindung der C₂-Domänen an Phospholipidmembranen, deren negativ geladene Kopfgruppen zusätzliche Koordinationsstellen für gebundene Ca²⁺-Ionen liefert (Fernandez-Chacon *et al.*, 2001), steigt die Affinität um bis zu 1000-fach. Beide C₂-Domänen haben Teil an der Ca²⁺-Sensitivität der Neurotransmitterfreisetzung. C₂B scheint hierbei einen größeren Effekt zu haben (Rhee *et al.*, 2005). Die langsame, asynchrone Ca²⁺-abhängige Exozytose könnte durch andere Synaptotagmin-Isoformen vermittelt werden, die teilweise höhere Affinitäten für Ca²⁺ besitzen (Sugita *et al.*, 2002). Die Synaptotagmine 5, 6, 7, 9 und 10 sind geeignete Kandidaten als Ca²⁺-Sensoren für diese Komponente der Exozytose, die 10 bis 100

ms anhält, nachdem die Ca^{2+} -Domänen kollabiert sind, vermutlich weil Ca^{2+} an Synaptotagmin gebunden bleibt (Hui *et al.*, 2005). Synaptotagmin 5 ist auf synaptischen Vesikeln lokalisiert und wird nur im Gehirn in hohen Mengen exprimiert (Craxton und Goedert, 1995), wo es vermutlich die Ca^{2+} -abhängige Exozytose reguliert (Saegusa *et al.*, 2002). Aufgrund der Ähnlichkeit mit anderen Synaptotagminen bindet Synaptotagmin 5 wahrscheinlich ebenfalls Phospholipide und AP2 (Craxton und Goedert, 1995). Synaptotagmin 12 ist auf synaptischen Vesikeln lokalisiert, zeigt aber keine Bindung von Ca^{2+} (persönliche Mitteilung von Dr. Anton Maximov, Dallas, USA). Die physiologische Rolle ist unklar.

4.6.3.1.6 Synaptophysin, Synaptoporin und Synaptogyrin

Synaptophysin, Synaptoporin und Synaptogyrin weisen eine bimodale Verteilung im Saccharosegradienten auf und sind durch eine Anreicherung während der Präparation gekennzeichnet. Massenspektrometrisch wurden Synaptophysin, Synaptoporin und die Synaptogyrin-Isoformen 1 und 3 identifiziert.

Synaptophysin liegt als hexameres Protein vor (Wiedenmann und Franke, 1985). Die Lokalisation auf synaptischen Vesikeln und die Interaktion mit VAMP-2 weisen auf eine Rolle in der Exozytose hin (Calakos und Scheller, 1994). VAMP-Homodimere, Synaptophysin-Homomultimere und VAMP/Synaptophysin-Heterodimere sind physiologisch existent (Khvotchev und Südhof, 2004), ein großer Teil von VAMP ist mit Synaptophysin komplexiert, und die Bildung dieser drei Komplexe wird durch Stimulation erhöht. Der Heterokomplex scheint VAMP-2 von der Bildung des SNARE-Komplex abzuhalten (Calakos und Scheller, 1994; Edelman *et al.*, 1995). Demgegenüber steht die Tatsache, daß die Deletion von Synaptophysin keinen großen Effekt auf die Neurotransmitterfreisetzung hat (Eshkind und Leube, 1995; McMahon *et al.*, 1996). Die Dissoziation des VAMP-2 von Synaptophysin benötigt Ca^{2+} . Der Effekt wird über einen zytosolischen Faktor aus synaptosomalen Extrakten bereitgestellt (Daly und Ziff, 2002). Trotz des Fehlens einer genauen Funktion spielt das Protein wohl keine essentielle Rolle in der Exozytose synaptischer Vesikel, sondern besitzt vielmehr eine Funktion in der Bestimmung der synaptischen Stärke und ist daher eher für die Regulation der Verfügbarkeit, der Endozytose oder das Recycling synaptischer Vesikel wichtig (Evans und Cousin, 2005). So muß VAMP-2 für die Fusion so ausgerichtet werden, daß es mit Syntaxin 1 und SNAP-25 auf der Plasmamembran interagieren kann. Dies könnte eine spezielle laterale Organisation der

synaptischen Vesikelmembran benötigen. Die Fähigkeit von Synaptophysin, Cholesterin zu binden (Thiele *et al.*, 2000), könnte neben der Rolle in der Biogenese synaptischer Vesikel für solch eine Ausrichtung essentiell sein (Mitter *et al.*, 2003).

Synaptophysin ist schon während der Synaptogenese in hohen Mengen vorhanden und eines der ersten synaptischen Proteine, das in sich entwickelnden Synapsen in Kultur akkumuliert (Fletcher *et al.*, 1991). Dies geht konform mit Befunden, daß Synaptophysin Synapsen aktivitätsabhängig stabilisiert (Tarsa und Goda, 2002). Es spielt zudem eine Rolle in synaptischer Plastizität über Interaktion mit Synaptogyrin 1 (Janz *et al.*, 1999) und inaktiviert die vATPase vor der Exozytose (Carrión-Vázquez *et al.*, 1998). Synaptophysin zeigt ferner Eigenschaften eines großen und schnell fluktuierenden Kationenkanals mit Spezifität für Kalium (Thomas *et al.*, 1988) von unklarer physiologischer Signifikanz (Gincel und Shoshan-Barmatz, 2002). Auch die Regulation der Endozytose über die Ca^{2+} - und vermutlich phosphorylierungsabhängige Interaktion mit Dynamin I scheint eine wichtige Funktion des Proteins zu sein (Daly *et al.*, 2000; Daly und Ziff, 2002). Diese Interaktion wird durch die Dissoziation von VAMP-2 und GTP-Bindung durch Dynamin moduliert. Es scheint daher sehr wahrscheinlich, daß die Assoziation von Dynamin mit Synaptophysin durch Rekrutierung von Dynamin an die synaptische Vesikelmembran eine Rolle im Vesikelrecycling spielt. Die GTP-Regulation könnte Dynamin von Synaptophysin nach Rekrutierung an die synaptischen Vesikel freisetzen und es zur Selbstassemblierung und Endozytose befähigen. Neben der durch Amphiphysin vermittelten Rekrutierung des Dynamin für die Endozytose per CCV könnte dieser Mechanismus die schnelle Endozytose ohne Clathrinkäfig vermitteln (Daly und Ziff, 2002)

Synaptoporin (Synaptophysin 2) enthält vier Transmembranhelices und einen kurzen zytoplasmatischen Teil, wird aber im Gegensatz zu Synaptophysin nicht glykosyliert. Die Verteilung der Expression beider Isoformen variiert. Der uniformen Expression des Synaptophysin steht die Anreicherung von Synaptoporin in Synapsen von Moosfasern im Hippocampus gegenüber (Brandstätter *et al.*, 1996).

Synaptogyrine bilden eine Familie tyrosinphosphorylierter Proteine mit zwei neuronalen Formen (Synaptogyrin 1 und 3) und einer ubiquitären Form (Cellugyrin), die in geringen Mengen im Gehirn, aber nicht auf synaptischen Vesikeln vorliegt (Janz und Südhof, 1998). Die biologische Funktion ist schlecht verstanden, obwohl eine Rolle in der Regulation der

Vesikelexozytose und/oder im Membranverkehr sowie in synaptischer Plastizität angenommen wird (Janz *et al.*, 1999). Synaptogyrin 1 ist ein integrales Membranprotein synaptischer Vesikel (Baumert *et al.*, 1990). Auch Synaptogyrin 3 wird nur im Gehirn exprimiert (Sugita *et al.*, 1999) und ist auf synaptischen Vesikeln lokalisiert. Synaptogyrin 3 zeigt ein eingeschränktes Expressionsmuster im Gehirn, Synaptogyrin 1 ist dagegen in den meisten Synapsen präsent. Dies weist auf eine allgemeine Rolle für Isoform 1 und eine spezialisierte für 3 hin (Belizaire *et al.*, 2004). Teilweise liegen beide Formen auch auf gleichen Vesikeln vor (Belizaire *et al.*, 2004). Synaptogyrin 3 und Synaptoporin werden wahrscheinlich im Gegensatz zu Synaptogyrin 1 und Synaptophysin nicht phosphoryliert. Daher können redundante Funktionen ausgeschlossen werden. Synaptogyrin 3 und Synaptoporin könnten mit anderen Proteinen interagieren (Belizaire *et al.*, 2004).

4.6.3.1.7 SCAMP-Familie

SCAMP 1 zeigt gemäß der Immunanalysen wie die anderen integralen synaptischen Vesikelproteine eine bimodale Verteilung im Saccharosegradienten sowie eine Abundanzzunahme während der Präparation. Massenspektrometrische Analysen resultierten in der Identifizierung der SCAMP-Isoformen 1, 3 und 5. SCAMPs sind eine Familie integraler Membranproteine mit vier Transmembranhelices und kurzem zytoplasmatischen, C-terminalem Schwanz (Castle und Castle, 2005). Sie assoziieren mit regulierten sekretorischen Vesikeln sowie Golgi-stämmigen und endosomalen Membranen (Brand *et al.*, 1991; Singleton *et al.*, 1997). Mindestens vier verschiedene Isoformen (SCAMPs 1-4) sind ubiquitär exprimiert; SCAMP5 zeigt primär neuronale Expression (Fernandez-Chacon und Südhof, 2000). SCAMPs liegen in zwei molekularen Massen vor: ~38 kDa (SCAMPs 1 bis 3) und ~25 kDa (SCAMP 4 und 5). Die SCAMPs 1 bis 3 enthalten ausladende N-terminale zytoplasmatische Segmente mit Proteinbindemotiven (NPF-Repeats), welche die SCAMP-Funktion und intermolekulare Interaktionen regulieren können (Fernandez-Chacon *et al.*, 2000; Hubbard *et al.*, 2000). Diese Bindemotive für EH-Domänen (Beer *et al.*, 1998) implizieren eine Rolle in der Endozytose als Dockingstationen für Proteinkomplexe, da EH-Domänenproteine in der Clathrin-vermittelten Endozytose eine Rolle spielen (Hussain *et al.*, 1999). Die universelle Expression der SCAMPs könnte ein Hinweis darauf sein, daß sie den Rezeptor für den Aufbau des Clathrin Coats bilden (Fernandez-Chacon *et al.*, 2000). So bildet SCAMP 1 einen Komplex mit AP2, und die N-terminale NPF-Deletion hemmt die Endozytose (Fernandez-Chacon *et al.*, 2000). Zusätzlich werden SCAMP 1 und 3 wie andere Proteine in der Endozytose vom EGF-Rezeptor tyrosinphosphoryliert (Wu und Castle, 1998;

Fernandez-Chacon und Südhof, 2000). SCAMP 1 und 2 sind hauptsächlich im endozytotischen Recycling Kompartiment, SCAMP 3 und 4 im TGN lokalisiert. Innerhalb des endosomalen Netzwerkes scheinen die verschiedenen Isoformen verschiedene Wege zu markieren, die durch unterschiedliche Adaptoren wie AP1 und AP3 unterschieden werden können. SCAMP 5 ist nur im Gehirn nachweisbar, wo es hochgradig auf synaptischen Vesikeln angereichert ist. Es besitzt keine NPF-Repeats, ist also nicht in der Endozytose involviert (Fernandez-Chacon und Südhof, 2000).

4.6.3.1.8 Reticulon-Familie

In dieser Arbeit wurden die Reticulon-Isoformen 1, 3 und 4 identifiziert. Reticulons sind eine Familie integraler Membranproteine mit zytosolischen N- und C-Termini (GrandPre *et al.*, 2000), die vorwiegend auf dem ER lokalisiert sind (Velde *et al.*, 1994; Ortle und Schwab, 2003). Die physiologische Rolle der Proteine ist immer noch unklar, suggeriert aber aufgrund der Akkumulation im ER eine intrazelluläre Funktion (Scala *et al.*, 2005). Reticulon 1A und B interagieren mit AP50, einer Komponente des AP2 Adaptorkomplexes (Iwahashi und Hamada, 2003). Reticulon 1C präzipitiert mit einem Teil der SNAREs Syntaxin 1, 7 und 13 sowie mit VAMP-2, bindet aber nicht den SNARE-Komplex (Steiner *et al.*, 2004). Reticulon 1C könnte daher in der Biosynthese oder dem Targeting neuer SNAREs involviert sein, die dann zusammen zur Nervenendigung gelangen. Trotz eingehender Untersuchung ist immer noch unklar, wie SNAREs an ihren Zielort gelangen, da sie keine Signalsequenz besitzen und die Insertion ihrer Transmembranbereiche nicht über den SRP-abhängigen Prozeß stattfinden kann. Fest steht, daß VAMP-2 nach Translation über eine unbekannt proteinartige Komponenten an Membranen gebunden wird (Kutay *et al.*, 1995; Whitley *et al.*, 1996). Reticulon 1C könnte Teil dieses 150 kDa Komplexes sein, der sich von vorgeformten SNARE-Komplexen unterscheidet, aber Fraktionen individueller SNAREs enthält. Nach Depolarisation würden einige dieser Strukturen relokalisiert, um in näheren Kontakt mit anderen Membranstrukturen zu kommen und räumlich die Membranfusionsereignisse zu organisieren (Steiner *et al.*, 2004). Hierbei scheint spezifisch der Transmembranbereich der Reticulons eine wichtige Rolle zu spielen. Reticulon 3 fungiert vermutlich im Membranverkehr des frühen sekretorischen Weges (Wakana *et al.*, 2005). Reticulon 4 (Nogo-A) ist ein wichtiger Regulator der Regeneration und Plastizität innerhalb des adulten ZNS (Simonen *et al.*, 2003). Es wird hauptsächlich in Oligodendrozyten, aber auch in verschiedenen Neuronenpopulationen exprimiert (Wang *et al.*, 2002a). Man findet es in Zellkörpern von Oligodendrozyten und in den inneren und äußeren Membranen des Myelin

im ZNS, konsistent mit der Funktion als Myelin-assoziiertes Inhibitor des Neuritenwachstums und der neuronalen Regeneration des ZNS (Scala *et al.*, 2005). Weiterhin ist es in Neuriten und Somata von Neuronen vorhanden, wo es in Golgi und ER detektiert werden kann (Oertle *et al.*, 2003). Neueste Resultate legen dar, daß die Reticulons eine wichtige Rolle in der Bildung und Aufrechterhaltung der Membrankurvatur spielen (persönliche Mitteilung von Prof. Tom Rapoport, Boston, USA) und in diesem Aspekt Caveolin ähneln. So lokalisiert in Hefe Yop1p (polyposis locus protein 1 oder GP106) mit Reticulon 1 und Reticulon 1 mit Reticulon 2. Knockout dieser drei Proteine resultiert in Änderungen der ER-Form. Zusätzlich interagieren Reticulons mit Proteinen des Zytoskeletts (Taketomi *et al.*, 2002). Vermutlich spielen die Proteine auch auf synaptischen Vesikeln eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Membrankurvatur.

4.6.3.2 Der SNARE-Komplex

SNAREs sind eine Superfamilie von 24 bekannten Mitgliedern in Hefe und mehr als 35 in Säugern (Bock *et al.*, 2001) und variieren in Sequenz und Struktur. Gemein ist ihnen das SNARE-Motiv, das aus 60 bis 70 Aminosäuren besteht. Direkt angrenzend enthalten die meisten SNAREs eine C-terminale Transmembranhelix. Andere besitzen diesen Membrananker nicht und sind statt dessen durch posttranslationale Modifikationen an Membranen assoziiert. Die Bildung der SNARE-Komplexe wird durch die SNARE-Motive vermittelt und ist von großen konformationellen Änderungen begleitet. Bei Auftreffen mehrerer SNARE-Motive assemblieren diese spontan in Vier-Helix-Bündel, in denen die vier SNARE-Motive parallel zu liegen kommen (Lin und Scheller, 1997). Mehrere SNARE-Komplexe könnten hierbei eine rosettenähnliche Form annehmen - Kontroversen gibt es über die Anzahl involvierter Komplexe (Motecuccio *et al.*, 2005). Die Abstoßung negativ geladener Phospholipide destabilisiert diesen extrem transienten Zustand, so daß es an diesem Punkt entweder zur Entwindung der Helices oder zur Fusion kommt, möglicherweise durch Ausüben einer Kraft auf die Membrananker und durch Zerstörung der Bilayer-Struktur (Lin und Scheller, 2000). Erfolgreiche Bündel ziehen die Membranen dicht zusammen und resultieren in einem *trans*-Komplex, der vermutlich den Großteil der Energiebarriere für die Fusion überwindet. Dies zeigt sich in der Stabilität der SNARE-Komplexe bestätigt, die auf eine große Energiefreisetzung schließen läßt (Fasshauer *et al.*, 2002). Nach der Fusion befinden sich die SNARE-Proteine in der gleichen Membran und bilden einen *cis*-Komplex, der für die Reaktivierung der einzelnen Komponenten durch NSF abgebaut wird (Söllner *et al.*, 1993a). SNARE-Komplexe sind jedoch nicht für die Fusion selbst, sondern für Effizienz

und physiologische Regulation nötig. Dies könnte durch Induktion von Übergangsstadien geschehen, die letztendlich zum Öffnen der Fusionspore führen (Südhof, 2004). Es ist essentiell für die Membranfusion, daß sie mit hoher räumlicher und zeitlicher Präzision abläuft. Daher ist das Verhindern unkontrollierter SNARE-Komplexbildung sehr wichtig für die Kontrolle der Membranfusion. Phospholipidmembranen dienen hier als generelle Regulatoren für das SNARE-Motiv vesikulärer SNAREs (Hu *et al.*, 2004).

4.6.3.2.1 SNARE-Proteine

4.6.3.2.1.1 VAMP

VAMP-2 zeigt einen bimodalen Verlauf in den Fraktionen des Saccharosegradienten und reichert sich während der Präparation an. Das Protein wurde ebenso wie VAMP-1 massenspektrometrisch identifiziert. VAMP-1 ist ein neuronspezifisches Protein synaptischer Vesikel und wird im ZNS exprimiert (Trimble *et al.*, 1988). VAMP-2 ist neben Neuronen in einer Vielzahl nicht neuronaler Gewebe exprimiert und dort mit endosomalen Strukturen assoziiert (Rossetto *et al.*, 1996). VAMP-3 (Cellubrevin) ist endosomal lokalisiert (Link *et al.*, 1993). Das v-SNARE VAMP-2 ist essentiell für die schnelle Endozytose synaptischer Vesikel. So verursacht die Deletion des VAMP-2 eine Verzögerung im Auffüllen des RRP durch Beeinflussung des schnellen Recyclens exozytierter Vesikel (Deak *et al.*, 2004). Zusätzlich sind Form und Größe synaptischer Vesikel in Knockouts heterogener und ca. 30% größer. Zudem besitzen mehr als 30% der Vesikel länglichere Formen. Die Insertion der sieben oder acht C-terminalen Aminosäuren des VAMP-2 SNARE-Motivs (Aminosäuren 32-92) in den Lipidbilayer verhindert die SNARE-Komplexbildung. Dies ist ein regulatorischer Mechanismus: VAMP-2 muß erst aus der Membran gelöst werden, bevor es in den SNARE-Komplex eingehen kann (Kweon *et al.*, 2003).

4.6.3.2.2 SNAP-25

Im Saccharosegradienten ist SNAP-25 ausschließlich in den unteren Fraktionen nachweisbar. Die Konzentration des SNAP-25 nimmt zudem im Präparationsverlauf ab, insbesondere nach der Immunreinigung. Dennoch konnte das Protein massenspektrometrisch durch die geringe Präsenz von SNAP-25 auf synaptischen Vesikeln und anderen internen Membranen (Hanson *et al.*, 1997) identifiziert werden. Die Funktion von SNAP-25 liegt im Priming, der Überführung morphologisch gedockter Vesikel in einen exozytosekompetenten Status (Nagy *et al.*, 2004). Der assemblierte SNARE-Komplex würde demnach den Pool der freisetzbaren Organellen kontrollieren und dadurch eine Plattform für Hilfsproteine darstellen, die die

Exozytosekompetenz entweder durch Kontrolle der Verfügbarkeit der SNAREs oder ihre direkte Assoziation regulieren (Borisovska *et al.*, 2005). SNAP-25, alleine oder zusammen mit Syntaxin, bindet und moduliert Ca^{2+} -Kanäle negativ, was synaptische Vesikel in die Nähe des Ca^{2+} bringt (Hanson *et al.*, 1997). Eine wahrscheinliche Rolle für SNAP-25 liegt in der Erhöhung der Affinität zwischen Syntaxin und Vamp-2 (Hodel, 1998).

4.6.3.2.3 Syntaxin und Munc18

Syntaxin 1 und Munc18 sind in den oberen Fraktionen des Saccharosegradienten nicht bzw. in sehr geringer Konzentration vertreten. Zudem zeigen die Proteine eine sehr geringe bzw. keine Abundanz in der immungereinigten Fraktion. Diese belegt den Ausschluß von an die Plasmamembran gedockten Vesikeln. Neben Syntaxin 1 wurden die Syntaxin-Isoformen 7 und 12 massenspektrometrisch identifiziert. Die Detektion des Munc18 ist durch die hohe Sensitivität und die Möglichkeit einer sehr geringfügigen Assoziation des Proteins an Vesikel des Reservepools erklärbar.

Munc18 hat sowohl positive als auch negative Effekte auf die synaptische Transmission. Die Interaktion mit Syntaxin im nanomolaren Bereich (Pevsner *et al.*, 1994) verhindert die Bindung von VAMP-2 und SNAP-25 (Calakos und Scheller, 1994; Pevsner *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2000). Syntaxin wechselt zwischen offener und geschlossener Konformation mit einer Relaxationszeit von 0,8 ms. Daher sind regulatorische Proteine unabdingbar, um das Protein in einer der beiden Konformationen zu arretieren (Margittai *et al.*, 2003). Die Wirkung von rab-Proteinen und deren Effektoren auf die geschlossene Syntaxin-Konformation verursacht eine konformationelle Änderung in Munc18, führt zur Destabilisierung der geschlossenen Konformation und erlaubt Syntaxin die Bildung des ternären SNARE-Komplexes. Syntaxin 1 kann in geringer Konzentration (~12%) in einer kleinen intrazellulären Fraktion gefunden werden, die an synaptischen Endigungen lokalisiert ist und einen pH-Wert von ~5 besitzt (Sankaranarayanan und Ryan, 2000). Während der induzierten Exozytose wechselt Syntaxin aber nicht in intrazelluläre Pools, so daß diese Vesikel nicht freisetzungskompetent zu sein scheinen oder Vorläufer der Vesikel der aktiven Zone sind, die mit der Plasmamembran während der Synaptogenese fusionieren (Shapira *et al.*, 2003). Syntaxin 7 ist in der Fusion von späten Endosomen und späten Endosomen mit Lysosomen, nicht aber in der Fusion früher Endosomen mit Lysosomen involviert (Mullock *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2000). Syntaxin 12 ist direkt am Recycling von Plasmamembranproteinen beteiligt und liegt im Komplex mit VAMP-3 und/oder VAMP-2 vor (Advani *et al.*, 1998).

4.6.3.2.4 NSF und SNAPs

Die SNARE-Komplex assoziierten Proteine NSF, $\alpha\beta$ -SNAP und Complexin zeigen erwartungsgemäß im Saccharosegradienten nur in den unteren Fraktionen eine Präsenz und nehmen während der Präparation an Konzentration ab. Die dennoch über Massenspektrometrie nachgewiesenen Proteine NSF und β -SNAP sind durch geringfügige Spuren in der freien synaptischen Vesikelpopulation erklärbar.

Die ATPase NSF bildet eine hexamere Ringstruktur (Hanson *et al.*, 1997) mit drei Untereinheiten pro Domäne und wirkt vor der Fusion (Banerjee *et al.*, 1996). Ihre Inaktivierung erhöht die Zahl der SNARE-Komplexe, ohne die Neurotransmitterfreisetzung auszulösen (Lonart und Südhof, 2000). Die SNARE-Assemblierung scheint daher vor der Fusionsporenöffnung zu geschehen und führt wohl nur zur Membranfusion, während andere Proteine die nachfolgende Porenöffnung bewirken. Die ATPase-Aktivität des NSF dissoziiert den SNARE-Komplex in seine Untereinheiten (Söllner *et al.*, 1993b). NSF kann hierbei nicht nur *cis*-, sondern auch *trans*-SNARE-Komplexe (Ungermann *et al.*, 1998) und zusätzlich Vier-Helixbündel zwischen Syntaxin und SNAP-25 abbauen, die kinetische Fallen darstellen und eine korrekte Bündelung verhindern (Misura *et al.*, 2001).

α - und γ -SNAP werden in allen Zellen, β -SNAP nur in Neuronen exprimiert (Whiteheart *et al.*, 1993). SNAPs spielen eine Rolle im Vesikelpriming, nicht aber in der Auslösung der Fusion des RRP. α -SNAP erhöht durch Rekrutierung von NSF an den SNARE-Komplex die Rate der Exozytose dramatisch (Clary *et al.*, 1990). β -SNAP hat diesen Einfluß nicht. NSF und α -SNAP brechen präferentiell *cis*-SNARE-Komplexe, um die Bildung der *trans*-Komplexe zu erhöhen, die die Membranfusion vorantreiben (Weber *et al.*, 2000). α -SNAP ersetzt zudem Synaptotagmin am SNARE-Komplex, während β -SNAP den gegensätzlichen Effekt hat (Söllner *et al.*, 1993b; Schiavo *et al.*, 1995). α -SNAP könnte einen zusätzlichen späten Schritt in der Exozytose regulieren, der sich vom ATP-abhängigen Priming der freisetzbaren Vesikel unterscheidet (Chamberlain *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1998b).

4.6.3.2.5 VAP-Proteine

VAP-Proteine besitzen eine Vielzahl potentieller Funktionen im vesikulären Transport wie die Regulation des COP1-Vesikeltransports (Soussan *et al.*, 1999), die durch VAMP-2 vermittelte Neurotransmitterfreisetzung (Skehel *et al.*, 1995), den VAMP-2 vermittelten

Glut4-Transport an die Plasmamembran (Foster *et al.*, 2000) sowie die Interaktion mit Mikrotubuli (Skehel *et al.*, 1995) und Tight Junctions (Lapierre *et al.*, 1999). VAP-33 und seine Säugetier-Homologe VAP-A und VAP-B (VAMP-A und -B) interagieren mit VAMP-2 und sind vermutlich für die Exozytose nötig (Skehel *et al.*, 1995). Sie teilen sich mit den SNAREs die charakteristische Coiled Coil-Domäne in der Nähe des C-Terminus (Lapierre *et al.*, 1999). Die integralen Membranproteine sind in einem zytoplasmatischen Vesikelpool und an der Plasmamembran zusammen mit Occludin lokalisiert. Die VAP-33/Occludin-Interaktion ist aber eher labiler Natur (Lapierre *et al.*, 1999). VAP-33 könnte demnach als Komponente im vesikulären Docken wirken und spezifisch in der Zielfindung der Vesikel an Tight Junctions involviert sein. Neben VAMP-2 bindet VAP-A weitere SNAREs, so daß es eine generelle Rolle im SNARE-vermittelten Membranverkehr spielt. Starke Interaktionen sind zusätzlich mit NSF und α -SNAP vorhanden (Weir *et al.*, 2001). Interferenz von VAP-33 blockiert die Neurotransmission (Skehel *et al.*, 1995).

4.6.3.3 Rab-Proteine

In dieser Arbeit wurde eine Vielzahl von Rab-Proteinen detektiert, die im Folgenden detailliert diskutiert werden. Inwiefern diese Identifikationen reelle Resultate in Bezug auf eine Assoziation mit synaptischen Vesikeln darstellen, muß überprüft werden.

Die komplexen Muster der Verteilung verschiedener rab-Proteine erlauben eine zellspezifische Modulation des Vesikelverkehrs innerhalb unterschiedlicher Gewebe. Aktivierte rab-Proteine könnten als Gerüst für diverse Effektoren dienen. Über die zeitliche Kontrolle der Effektorbindung könnten sie auf diese Weise verschiedene Ereignisse regulieren, die für den Transport von Fracht zwischen Kompartimenten nötig sind. Rab-Proteine sind vermutlich nicht selbst für die Spezifität des Dockens und der Fusion wichtig, sondern bilden Mikrodomänen für die Rekrutierung wichtiger Faktoren. Die Spezifität der rab-Interaktion wird durch die RabCDR (complementarity-determining region) bestimmt. Variationen dieser Region könnten die Spezifität der Interaktion vermitteln. Die Spezifität der rab-Funktion und Lokalisation sowie ihre Präsenz auf der Oberfläche von Vesikeln suggeriert die Anwesenheit einer Maschinerie, die rab-Proteine an die richtige Membran rekrutiert (Jahn *et al.*, 2003). Dies geschieht durch rab-GAPs. Die GAPs wiederum werden vermutlich durch Phosphorylierung reguliert (Bernards und Settleman, 2004), was sowohl Substratspezifität als auch subzelluläre Lokalisation beeinflussen könnte (Minoshima *et al.*, 2003). Die Phosphorylierung resultiert hierbei meist in einer Membranassoziation. Zusätzlich weisen

einige Studien auf Lipide als GAP-Regulatoren hin (Lockyer *et al.*, 1997; Lockyer *et al.*, 2001).

Rab1 wird ubiquitär exprimiert und fungiert im Transport zwischen ER und Golgi. Es rekrutiert SNARE-Komplexe (Schluter *et al.*, 2006) an abschnürende Vesikel über den Effektor p115 und interagiert über das Effektorprotein PRA1 mit VAMP-2 (Zerial und McBride, 2001).

Ubiquitär exprimiertes rab2 assoziiert mit Strukturen, die aus Vesikeln und Tubuli aufgebaut sind (vesicular tubular cluster (VTC)) (Tisdale *et al.*, 1992) und als Transportintermediate zwischen ER und Golgi fungieren (Balch *et al.*, 1994). Dort führt es zur Rekrutierung löslicher Komponenten, die die Membranabschnürung und Interaktion mit dem Zytoskelett erleichtern, was in der Freisetzung retrograd gerichteter Vesikel resultiert (Tisdale, 2002). Auch die GAPDH-Rekrutierung ist essentiell für den Membranverkehr zwischen ER und Golgi (Tisdale, 2001). GAPDH fungiert neben der Glykolyse in der Förderung der Membranfusion, der Modulation des Zytoskeletts, der DNA-Reparatur, der RNA-Replikation und im tRNA-Export (Sirover, 1999) und wird neben rab2-GTP von der atypischen Protein Kinase C phosphoryliert, die im Komplex mit rab2 und GAPDH vorliegt (Tisdale *et al.*, 2004). Phosphorylierte GAPDH könnte den Aufbau und die Bündelung von Mikrotubuli fördern, die von rab2-Vesikeln genutzt würden, um vom Golgi zum ER transportiert zu werden. Aufgrund des Fehlens von Golgi-Apparaten im Axon ist dessen dortige Lokalisation unerwartet. Rab2 könnte in Transport und Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran an Wachstumsspitzen von Neuronen eine wichtige Rolle spielen (Ayala *et al.*, 1990).

Rab3A wird exklusiv in Neuronen exprimiert und ist dort auf synaptischen Vesikeln lokalisiert, wo es eine Rolle in der Regulation der Neurotransmitterfreisetzung spielt (Zerial und McBride, 2001). An der Synapse reguliert rab3 die vesikuläre Freisetzungswahrscheinlichkeit (Schluter *et al.*, 2004) und spielt zudem eine unerwartete Rolle in kurzzeitiger synaptischer Plastizität. Es erhöht die anwesende Ca^{2+} -Sensitivität bestimmter Vesikel im RRP und führt dadurch funktionelle Heterogenität unter den gepressten Vesikeln ein. Diese „supergepressten Vesikel“ fusionieren als erste mit der Membran. Rab3 könnte hierfür die Vesikel an Stellen mit intrinsisch hoher Freisetzungswahrscheinlichkeit dirigieren, wie in die Nähe von Ca^{2+} -Kanälen (Meinrenken *et al.*, 2002). Es könnte aber auch zusätzliche Proteine an die Freisetzungsmaschinerie rekrutieren oder die Bindung von

Proteinen erhöhen und so die Effizienz der Ca^{2+} -getriggerten Freisetzung steigern. Rab3-Effektoren sind hierbei wahrscheinlich nicht involviert. Zusätzlich spielt rab3A eine Rolle im aktivitätsabhängigen Transport synaptischer Vesikel an die aktive Zone (Nonet *et al.*, 1997; Leenders *et al.*, 2001), möglicherweise über Interaktion von rab3A-GTP mit Synapsin I (Giovedi *et al.*, 2004), und könnte über den Effektor Rabphilin3A eine Rolle in der Endozytose spielen (Burns *et al.*, 1998). Positive Effekte auf die LTP (Castillo *et al.*, 1997) sind ebenso beschrieben wie die Regulation der SNARE-Assoziation. So ist PRA-1 sowohl für rab3 als auch für VAMP-2 Effektor (Bucci *et al.*, 1999). Gemäß der Immunanalyse des Saccharosegradienten ist rab3A erst ab Fraktion 17 detektierbar. Belegt wird dieser Befund durch das Fehlen des Proteins in der immungereinigten Probe nach Analyse des Präparationsverlaufes. Rab3A scheint daher nicht an die Vesikel des Reservepools gebunden zu sein oder liegt dort in einer sehr geringen Konzentration vor. Dem entgegen steht die signifikante Identifikation über Massenspektrometrie.

Rab4 wird ubiquitär exprimiert und wirkt im Recycling und Sortieren zwischen Plasmamembran und Endosom (Daro *et al.*, 1996). Als Effektoren sind Rabaptin-4, Rabaptin-5 und Rabaptin-5 β beschrieben, das wiederum rab5 über Komplexbildung mit dem GEF Rabex-5 aktiviert. Rabaptin-4 spielt eine Rolle im Membranrecycling und Sortieren der Proteine (Zerial und McBride, 2001) zurück an die Plasmamembran (Sluijs *et al.*, 1992). Im GTP-gebundenen Zustand verhindert rab4 den minus-gerichteten Transport über Kinesine (wahrscheinlich KIFC2) über Interaktion mit vesikelassoziierten Proteinen. Die GTP-Hydrolyse und damit aufgehobene Kinesininhibition resultiert in einer minus-gerichteten Bewegung und im Abschnüren und Sortieren von Vesikeln auf Mikrotubuli (Bananis *et al.*, 2003). Rab4 ist nach Analyse des Präparationsverlaufes nicht mit synaptischen Vesikeln assoziiert. Möglicherweise ist die nachgewiesene Interaktion mit vesikelassoziierten Proteinen derart transient, daß rab4 aufgrund der Kurzlebigkeit nicht immundetektiert werden kann, aber durch die hohe Sensitivität der Massenspektrometrie nachzuweisen ist.

Rab5 ist hauptsächlich auf Endosomen lokalisiert (Gorvel *et al.*, 1991) und nicht nur in der homotypischen Endosomenfusion, sondern auch im Abschnüren von CCVs von der Plasmamembran und deren Transport zu frühen Endosomen involviert (Gorvel *et al.*, 1991; Bucci *et al.*, 1992; Barbieri *et al.*, 1998). Effektorproteine sind u. a. EEA1 (Stenmark *et al.*, 1994; Simonsen *et al.*, 1998), Rabenosyn-5 und Rabaptin-5 (Stenmark *et al.*, 1995; Pfeffer, 2005), die wiederum Proteine wie Rabphilin3A und t-SNAREs binden (Zerial und McBride,

2001). Hierüber wird die Proteinsortierung innerhalb der Endosomen (Renzis *et al.*, 2002) und die Beweglichkeit der frühen Endosomen entlang von Mikrotubuli reguliert (Zerial und McBride, 2001). Rab5 und seine Effektoren binden zudem Aktin (Ohya *et al.*, 1998) und Kinesin und können die Aktivität von Motorproteinen regulieren (Nielsen *et al.*, 1999). Der rab5-Effektor EEA1 könnte die Aktivität von Syntaxin 13 in Endosomen regulieren (McBride *et al.*, 1999). Rab5 konnte in dieser Arbeit in geringen Spuren auf immungereinigten Vesikeln gefunden werden. Dies geht konform mit den oben beschriebenen Evidenzen.

Rab6 ist im Golgi lokalisiert (Pfeffer, 2005), vor allem in den medialen und *trans*-Zisternen, zeigt eine Anreicherung im TGN und fungiert im Transport innerhalb des Golgi (Goud *et al.*, 1990; Antony *et al.*, 1992). In einigen Zellen ist es auf Golgi-abstammenden Vesikeln zusammen mit Synaptophysin detektierbar (Tixier-Vidal *et al.*, 1993). Es interagiert mit dem molekularen Motor Rabkinesin-6 (Schluter *et al.*, 2006), ist im COPI-unabhängigen Transport von Golgi zu ER involviert und wird für die Langstreckenbewegung entlang von Mikrotubuli benötigt. Solch ein Weg könnte das Recyceln von Lipiden erlauben, um die intrazelluläre Lipidbalance aufrechtzuerhalten. Zusätzlich zeigt rab6 eine Anreicherung auf sehr dynamischen Transport Carriern (TC) globulärer oder tubulärer Struktur, die entlang von Mikrotubuli vom Golgi zur Zellperipherie wandern (White *et al.*, 1999). Dieses Membransystem unterscheidet sich von den Vesikeln, die von Endosomen, Lysosomen und Golgi abstammen und zur Plasmamembran wandern. Rab-Proteine könnten demnach spezifische Routen definieren (Simons und Zerial, 1993). Rab6 wird durch PKC phosphoryliert, was die Affinität für GTP erhöht, aber nicht die intrinsische GTPase-Aktivität des Moleküls ändert, und dissoziiert nach Phosphorylierung von der Membran (Scheper *et al.*, 2004).

Rab7 wird ubiquitär exprimiert und ist auf dem späten Endosom lokalisiert, wo es den endozytotischen Vesikelverkehr zwischen frühem und spätem Endosom vermittelt (Pfeffer, 2005). Das ubiquitär exprimierte rab8 ist auf dem TGN und der Plasmamembran lokalisiert und ist im vesikulären Verkehr zwischen diesen beiden Membransystemen beteiligt (Zerial und McBride, 2001). Rab9 vermittelt den Vesikelverkehr zwischen spätem Endosom und dem TGN (Pfeffer, 2003) und wird ubiquitär exprimiert. Der rab9-Effektor p40 stimuliert hierbei die Vesikelfusion. Rab10 spielt im Vesikeltransport zwischen Golgi und TGN eine Rolle (Pfeffer, 2003).

Rab11 ist auf dem Recycling Endosom und TGN lokalisiert und vermittelt den Vesikeltransport zur Plasmamembran und zum TGN (Chen *et al.*, 1998; Wilcke *et al.*, 2000). Rab11A wird ubiquitär exprimiert (Sakurada *et al.*, 1991), während rab11B in Gehirn und Herz angereichert ist (Lai *et al.*, 1994). In PC12-Zellen ist rab11 auf sekretorischen Vesikeln präsent (Volkhardt *et al.*, 1993; Khvotchev *et al.*, 2003), im Gehirn findet man es auf synaptischen Vesikeln. Die GTP- und GDP-gebundenen Formen von rab11B sind gleichermaßen effektiv in der Hemmung der Exozytose, zeigen aber verschiedene Effekte. Rab11B wirkt in der Ca^{2+} -regulierten Exozytose synaptischer Vesikel und integriert regulierte und konstitutive Exozytose in Neuronen und neuroendokrinen Zellen (Khvotchev *et al.*, 2003).

Rab14 ist im biosynthetischen Vesikelverkehr und im Recycling zwischen Golgi und endosomalen Kompartimenten involviert (Junutula *et al.*, 2004). Rab15 (rab16, rab3D) ist auf synaptischen Vesikeln lokalisiert und wirkt im Vesikelverkehr zwischen frühem und Recycling-Endosom (Zerial und McBride, 2001). Seine Lokalisation überlappt zu großen Teilen mit rab3A (Elferink *et al.*, 1992). Rab18 fungiert im Vesikelverkehr zwischen frühem und Recycling-Endosom. Rab30 spielt eine Rolle im Vesikelverkehr zwischen Golgi und TGN. Rab33B wirkt im Vesikeltransport zwischen Golgi und TGN und bindet an ein kinesinverwandtes Protein (Lapierre *et al.*, 1999). Das Effektorprotein Rab33B-BP reguliert vermutlich die Beweglichkeit der rab33B-Vesikel (Zerial und McBride, 2001). Rab37 agiert im Vesikelverkehr zwischen TGN und der Plasmamembran.

4.6.3.3.1 Rabphilin3A

Rabphilin3A ist nach Analyse des Präparationsverlaufes auch in der immungereinigten Probe präsent und wurde massenspektrometrisch nachgewiesen. Das Fehlen von rab3A in dieser Fraktion legt nahe, daß Rabphilin3A auch ohne rab3A Funktionen im Zyklus synaptischer Vesikel ausübt. Rabphilin3A ist ein peripheres Membranprotein, das GTP-abhängig an rab3A und rab3C bindet, mit beiden Proteinen auf synaptischen Vesikeln kolokalisiert und koordiniert während oder nach der Exozytose von den Vesikeln dissoziiert (Mollard *et al.*, 1994; Stahl *et al.*, 1996). Es wird durch CaMKII und PKA phosphoryliert (Fykse und Fonnum, 1996). Über die beiden C_2 -Domänen, die denen des Synaptotagmin ähneln, bindet es Ca^{2+} , Phospholipide (Chung *et al.*, 1998), Rabaptin (Ohya *et al.*, 1998), β -Adducin (Miyazaki *et al.*, 1994) und α -Actinin (Kato *et al.*, 1996). Dies impliziert eine Rolle in der Exo- und Endozytose sowie in der Modulation des Zytoskeletts. Da die GTP-gebundene Form von

rab3A die Interaktion von Rabphilin3A mit Actinin hemmt (Kato *et al.*, 1996), könnte rab3A prinzipiell die Reorganisation des Zytoskeletts beeinflussen (Doussau und Augustine, 2000). Ob Rabphilin über rab3A an synaptische Vesikel bindet (Südhof, 1997), oder ob es direkt an die Membran synaptischer Vesikel assoziiert (Shirataki *et al.*, 1993), ist unklar. Jedes Modell wird durch Befunde belegt. Rabphilin benötigt rab3A für seine Stabilität und synaptische Lokalisierung, rab3 wirkt jedoch unabhängig von Rabphilin3A. Die Deletion von Rabphilin3A ist nicht mit der des rab3A vergleichbar (Schluter *et al.*, 1999). Neuere Evidenzen indizieren zudem, daß Rabphilin3A unabhängig von rab3A funktioniert. Rabphilin könnte über die Bindung von SNAP-25 über seine C₂B-Domäne die SNARE-Funktion modulieren (Staunton *et al.*, 2001) oder das Docken von Dense Core Vesikeln an die Plasmamembran durch Verbindung von rab27A auf den Vesikeln und SNAP-25 erleichtern. Überexpression hemmt die Clathrin-vermittelte Endozytose (Gundelfinger *et al.*, 2003), was durch die Interaktion von Rabphilin mit Rabaptin-5 erklärt werden kann (Oishi *et al.*, 1996), der als Effektor von rab5 die Endozytose kontrolliert. Weder die synaptische Transmission noch die Plastizität sind in Rabphilin-defizienten Mäusen beeinflusst (Schluter *et al.*, 1999), was demonstriert, daß es nur eine geringe oder redundante Rolle für Rabphilin gibt.

4.6.3.3.2 Rabconnectin-3

Rabconnectin-3 besitzt 12 WD-Domänen und ist im Gehirn abundant exprimiert, wo es mit synaptischen Vesikeln assoziiert (Nagano *et al.*, 2002). Das Protein besteht wahrscheinlich aus den Untereinheiten α und β , wobei Rabconnectin-3 β (TGF-beta resistance-associated protein) direkt an rab3-GEF bindet. Rabconnectin-3 bindet ferner über ein unidentifiziertes Molekül an rab3-GAP. Beide Untereinheiten sind keine Transmembranproteine, assoziieren aber mit Membranen synaptischer Vesikel. Rab3-GEF könnte durch Rabconnectin-3 an synaptische Vesikel rekrutiert werden. In Analogie mit COPII Coat Proteinen könnte Rabconnectin-3 rab3-GAP binden und die GAP-Aktivität beschleunigen (Kawabe *et al.*, 2003).

4.6.3.3.3 Yop1p

Das integrale Hefe-Membranprotein Yop1p (GP106 oder polyposis locus protein 1 homolog) interagiert mit Yip1p, einem Membranprotein, das die Dissoziation von rab-GDI-Heterodimeren vermittelt. Yip1p fehlt jedoch jegliche Spezifität (Yang *et al.*, 1998), die durch Yop1p gewährleistet werden könnte. Yop1p zeigt eine eingeschränkte subzelluläre Verteilung und kann spezifisch mit rab-Proteinen präzipitiert werden. Yop1p könnte zusammen mit

Yip1p agieren, um die rab-vermittelten Ereignisse im Membranverkehr zu erleichtern (Calero *et al.*, 2001).

4.6.3.4 Synapsine

Die Synapsinisoformen I und II zeigen wie die integralen Vesikelproteine eine bimodale Verteilung im Saccharosegradienten. Während die Synapsine der oberen Fraktion vermutlich für die Verankerung des Reservepools oder für den Transport von Vesikeln zu und von der Plasmamembran benötigt werden, spielen die Synapsine in den unteren Fraktionen wohl eher keine Rolle. Interessanterweise ist gemäß der Analyse des Präparationsverlaufes Synapsin I in immungereinigten Proben vorhanden, während Synapsin II in dieser Fraktion fehlt bzw. in nur sehr geringer Konzentration vorliegt. Massenspektrometrisch wurden aber beide Proteine detektiert.

Synapsine sind in nahezu allen präsynaptischen Nervenendigungen vorhanden und repräsentieren mit etwa 1% des totalen Proteins im Gehirn eine der meist abundanten Familien synaptischer Proteine (Ueda und Greengard, 1977; Browning *et al.*, 1987). Sie werden nur in Neuronen exprimiert und sind spezifisch in präsynaptischen Kompartimenten lokalisiert (De Camilli *et al.*, 1983). Verschiedene Neuronen haben hierbei unterschiedliche Repertoires an Synapsinen (De Camilli *et al.*, 1983; Mandell *et al.*, 1992; Greengard *et al.*, 1993). Sie sind aus acht verschiedenen Domänen aufgebaut, von denen die A-Domäne die Interaktion mit Vesikeln kontrolliert (Hosaka *et al.*, 1999) und die einzige Phosphorylierungsstelle der Synapsine enthält, die Substrat für PKA, CaMKII und Erk ist (Jovanovic *et al.*, 1996; Hosaka *et al.*, 1999). Synapsine verankern synaptische Vesikel an Aktinfilamente durch Bindung von Lipiden und Proteinkomponenten in einer Ca^{2+} - und phosphorylierungsabhängigen Weise, kontrollieren dadurch die Zahl der Vesikel, die für die Neurotransmitterfreisetzung zur Verfügung steht (Schiebler *et al.*, 1986; Trimble und Scheller, 1988; Benfenati *et al.*, 1989a) und regulieren demnach den Reservepool synaptischer Vesikel für die Exozytose und die Effizienz der Neurotransmitterfreisetzung (Giovedi *et al.*, 2004). Vesikel, die an die Plasmamembran gedockt oder mit dieser fusioniert sind, sind nur teilweise von Synapsinen befreit (Torri Tarelli *et al.*, 1992; Pieribone *et al.*, 1995; Bloom *et al.*, 2003). Synapsine sind neben der initialen Bildung synaptischer Kontakte auch für die Aufrechterhaltung der Synapsenstruktur nötig (Ferreira *et al.*, 1996). Sie regeln die Expression anderer synaptischer Proteine (Han *et al.*, 1991; Ferreira *et al.*, 1994), die Neuriten-Elongation und die Etablierung der Zellpolarität, möglicherweise durch Interaktion

mit F-Aktin, Mikrotubuli und Neurofilamenten (Baines und Bennett, 1986; Bahler *et al.*, 1989; Petrucci und Morrow, 1991). Sie binden ATP (Hosaka und Südhof, 1998), sind strukturell mit einer Gruppe ATP-nutzender Enzyme verwandt (Esser *et al.*, 1998; Brautigam *et al.*, 2004) und könnten daher enzymatische Funktion haben. Aus all diesen Befunden geht hervor, daß Synapsine über Verbindung der synaptischen Vesikel untereinander und mit dem Aktinzytoskelett einen Reservepool synaptischer Vesikel in der Nähe der aktiven Zone aufrechterhalten, daß sie die Verfügbarkeit der Vesikel über die Fähigkeit der Dissoziation der Vesikel vom Aktinzytoskelett in einer phosphorylierungsabhängigen Weise kontrollieren und eine Rolle im Schritt nach dem Docken in der Exozytose spielen (Valtorta *et al.*, 1992; Benfenati *et al.*, 1993; Hilfiker *et al.*, 1998). Die Phosphorylierung der Synapsine wird durch synaptische Aktivität reguliert (Nestler und Greengard, 1982; Sihra *et al.*, 1989) und ist begleitet von tiefen Änderungen der Affinität für synaptische Vesikel und Aktin (Benfenati *et al.*, 1989a; Valtorta *et al.*, 1992; Hosaka *et al.*, 1999). Synapsine spielen zudem eine wichtige Rolle in der Bestimmung der Größe des Reservepools in glutamatergen Vesikeln. In excitatorischen Synapsen bestimmen sie die Zahl der Vesikel des Reservepools, in inhibitorischen die Zahl von Reservepool und RRP. Dies zeigt, daß synapsenabhängig die molekularen Mechanismen für die Verteilung der synaptischen Vesikel in RRP und Reservepool unterschiedlich sein müssen. Dies könnte durch die zahlreichen Bindepartner zustande kommen (Gitler *et al.*, 2004). So zeigen verschiedene vesikuläre Transporter eine Variabilität der Kolo-kalisation mit Synapsinen (Bogen *et al.*, 2006).

4.6.3.5 Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase II

Die CaMKII ist ein wichtiger Regulator der neuronalen Plastizität (Griffith *et al.*, 2003). Die Bindung des Enzyms an spezifische subzelluläre Kompartimente ist wichtig für ihre Funktion. Sie ist stark in Neuronen exprimiert, wo sie die meisten Aspekte neuronaler Funktion vermittelt. Dazu zählen Genexpression, Synthese und Exozytose von Neurotransmittern, Rezeptor- und Ionenkanalfunktion, Interaktionen mit dem Zytoskelett sowie verschiedene Signalwege. Jedes Protein ist aus einer N-terminalen Serin/Threoninkinase-Domäne aufgebaut, gefolgt von einer regulatorischen Region mit autoinhibitorischer Sequenz und einer Calmodulin-Bindestelle. Der C-Terminus oder die Assoziationsdomäne ist verantwortlich für den Zusammenbau der Untereinheiten in große Multimere (Braun und Schulmann, 1995). Die Isozyme alpha und beta sind die vorherrschenden Formen im ZNS (Miller und Kennedy, 1985), wobei alpha hauptsächlich im Vorderhirn und beta im Cerebellum vorhanden ist (Miller und Kennedy, 1985). Die Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin an

die regulatorische Domäne der Kinase aktiviert sie durch Entlassen der katalytischen Domäne aus der Inhibition. Dies erlaubt der Kinase, sich selbst und ihre Substrate zu phosphorylieren, was sie unabhängig von der Ca^{2+} /Calmodulin-Bindung macht. Nach Autophosphorylierung und Verlust des Ca^{2+} /Calmodulin werden weitere Phosphorylierungsstellen frei, die die Calmodulin-Bindung blockieren und eine weitere Stimulation durch Calmodulin verhindern. Die dynamische Umverteilung von CaMKII geschieht mit synaptischer Aktivität und hängt mit Protein-Protein-Interaktionen zusammen (Griffith *et al.*, 2003). Die Wirkung zellulärer Serin/Threonin-Protein Phosphatasen (PP) spielt eine signifikante Rolle in der Regulation der CaMKII durch antagonistische Effekte. So entfernen PP1, PP2A und PP2C die Phosphorylierung an der CaMKII *in vitro*, und insbesondere PP1 ist wichtiger Regulator der CaMKII in der hippocampalen synaptischen Transmission (Shields *et al.*, 1985).

CaMKII bindet an Aktinfilamente. Calmodulin fördert die Dissoziation der Kinase von Aktin (Ohta *et al.*, 1986; Shen und Meyer, 1999). CaMKII assoziiert auch mit Mikrotubuli in Gehirnextrakten (Vallano *et al.*, 1986), und die Phosphorylierung von MAP2 durch CaMKII blockiert die F-Aktin-Bündelung (Yamauchi und Fujisawa, 1988). Eine besondere Form der CaMKII α ist eng mit präsynaptischen Vesikeln assoziiert, hat aber identische katalytische Eigenschaften wie die lösliche CaMKII α (Benfenati *et al.*, 1996). Die vesikelassoziierte CaMKII bindet und phosphoryliert Synapsin I (Benfenati *et al.*, 1992), fördert die Dissoziation von Synapsin I von synaptischen Vesikeln und erhöht dadurch die verfügbare Zahl synaptischer Vesikel an der aktiven Zone (Greengard *et al.*, 1993). Zusätzlich gesteigert wird die CaMKII-Aktivität durch Bindung an Myosin-V, ein Ca^{2+} -reguliertes, aktinbasierendes Motorprotein, das in der Modulation des Vesikelverkehrs wirkt (Costa *et al.*, 1999). Neben der CaMKII kann auch PKC die Änderung der Rekrutierung von Vesikeln aus dem Reservepool kontrollieren (Lonart und Südhof, 2000). In Anwesenheit von Ca^{2+} /ATP bindet CaMKII α spezifisch an Syntaxin. Dieser Komplex schließt die Munc18-Bindung an Syntaxin aus, rekrutiert größere Mengen von Synaptotagmin und SNAP-25 als Syntaxin alleine, beeinflusst die Bildung des SNARE-Komplexes und fördert die Exozytose (Ohyama *et al.*, 2002). Die CaMKII wird entlassen, wenn die Ca^{2+} -Konzentration sinkt oder die Kinase dephosphoryliert wird.

4.6.3.6 Septine

Die in dieser Arbeit identifizierten Septin-Isoformen beinhalten die Septine 2, 3, 5, 7 und 11. Septine bilden eine Multigenfamilie (Xue *et al.*, 2004b) mit vielen Spleißvarianten. Sie stellen

GTP-bindende Proteine von 40 bis 70 kDa dar (Macara *et al.*, 2002; Kinoshita, 2003), die zentral für die räumliche und zeitliche Koordination der Membranpolarität und Zellteilung sind (Kinoshita *et al.*, 1997; Hsu *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 1999; Surka *et al.*, 2002). Septine assemblieren zu Filamenten und/oder sind mit Membranen assoziiert (Fung und Scheller, 1999). Die Filamente sind stark mit Aktinfilamenten (Kinoshita *et al.*, 2002) und/oder Mikrotubuli verbunden (Surka *et al.*, 2002) und können in höhere Strukturen assemblieren sowie in Anwesenheit von F-Aktin zytoplasmatische Ringe oder lineare Bündel bilden (Kinoshita *et al.*, 2002). Sie sind im Nervensystem angereichert und zeigen eine überlappende, aber abweichende Verteilung im Gehirn (Hsu *et al.*, 1998; Kinoshita *et al.*, 2000). Die molekularen Details der Septinfunktion höherer Eukaryoten sind schlecht verstanden. In Mäusen resultiert die Deletion der Septingene in physiologischen Abnormalitäten (Dent *et al.*, 2002) und morphogenetischen Defekten (Ihara *et al.*, 2005). Im Menschen werden Abnormalitäten der Septinexpression mit Krebs und anderen Krankheiten in Verbindung gebracht (Hall und Russell, 2004).

Septine assoziieren mit biologischen Membranen über eine hochkonservierte, polybasische Region am N-Terminus der GTP-bindenden Domäne. Dies geschieht hauptsächlich mit PI-4-P und PI-5-P (Casamayor und Snyder, 2003). Die Assoziation von Septinen mit Phospholipiden ist kritisch für die Bildung und Aufrechterhaltung von Membrandomänen. Einige der Interaktionspartner sind Komponenten der Maschinerie für Vesikeldocken und Fusion.

Die Septine 2, 4, 6, 7 und 9 sind mit dem Exozystenkomplex in Gehirnlisaten assoziiert (Hsu *et al.*, 1998). Septin 2 zeigt hierbei eine differenzierungsabhängige Lokalisation mit dem Exozystenkomplex, der in der polarisierten Vesikelfreisetzung involviert ist (Vega und Hsu, 2003). Die Interaktion der Septine mit dem Exozystenkomplex könnte für die Aufrechterhaltung neuronaler Polarität und für Prozesse wie synaptische Plastizität wichtig sein (Hsu *et al.*, 1998). Zusätzlich wirkt Septin 2, das ubiquitär exprimiert wird, zusammen mit Septin 6 und 7 (Joberty *et al.*, 2001) in der Zytokinese (Kinoshita *et al.*, 1997). Septin 2 ist zudem für die Aufrechterhaltung normaler Aktinlevel und gebündelter Aktinstrukturen essentiell (Schmidt und Nichols, 2004) und reguliert über Interaktion mit GLAST die Glutamataufnahme im Gehirn (Kinoshita *et al.*, 2004).

Die Septine 3 und 5 sind die einzigen bisher bekannten Septine, die primär gehirnspezifisch vorkommen (Beites *et al.*, 1999). Septin 3 ist Substrat der cGMP-abhängigen Kinase und als Phosphoprotein spezifisch in präsynaptischen Nervenendigungen präsent (Xue *et al.*, 2000). Es ist auf synaptischen Vesikeln lokalisiert (Xue *et al.*, 2004a) und könnte eine Rolle in der Dynamik synaptischer Vesikel spielen. Septin 3 zeigt eine starke Kollokalisierung mit Synaptophysin und Dynamin I.

Septin 5 assoziiert mit Membranen GABAerger synaptischer Vesikel (Caltagarene *et al.*, 1998; Kinoshita *et al.*, 2000), kollokalisiert teilweise mit VAMP-2 (Peng 2002), interagiert mit Synaptophysin (Caltagarene *et al.*, 1998), bindet über Syntaxin an den SNARE-Komplex (Beites *et al.*, 1999), konkurriert mit NSF und den SNAPs um dessen Bindung und könnte daher die Verfügbarkeit der SNAREs für die Fusion regeln. So ist die Binderegion für Syntaxin auch Binderegion für VAMP-2 und SNAP-25. Septin 5 zeigt dementsprechend eine inhibitorische Rolle in der Exozytose (Dent *et al.*, 2002) und könnte andere Proteine für die Exozytose rekrutieren. Septine könnten den Raum zwischen Vesikel- und Plasmamembran durch Bildung langer Filamente und Bindung der SNARE-Komplexe überbrücken oder durch Filamentbildung eine Barriere für die Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran aufbauen. Möglich ist auch die Definition nicht-aktiver Zonen (Beites *et al.*, 2005). Zusätzlich liegt Septin 5 im Komplex mit den Septinen 2 und 7 vor (Peng *et al.*, 2002) und wird durch Septin 3 im frontalen Cortex komplexiert (Takehashi *et al.*, 2004). Einige Septine wie Septin 2 und 5 fungieren aber nicht nur in der Vesikelfusion (Hsu *et al.*, 1998; Beites *et al.*, 1999), sondern auch in der Apoptose (Larisch *et al.*, 2000) und Neurodegeneration (Dong *et al.*, 2003).

Septin 7 ist in postsynaptischen Fraktionen vorhanden (Walikonis *et al.*, 2000), was eine Rolle in der Zellarchitektur suggeriert. Septin 11 wird in vielen Geweben exprimiert und kollokalisiert mit dem Zytoskelett (Hanai *et al.*, 2004).

4.6.3.7 Thy-1

Thy-1 ist ein GPI-verankertes Membranprotein der Immunglobulin-Superfamilie (Williams und Gagnon, 1982; Low und Kincade, 1985). Es wird in nahezu allen Säugetieren im Nervensystem exprimiert (Morris, 1985) und liegt sowohl auf der Plasmamembran (Green und Kelly, 1992) als auch intrazellulär vor (Morris, 1985). Im Vergleich zur Zelloberfläche sind mehr als 50% des Proteins auf Vesikeln lokalisiert (Jeng *et al.*, 1998). Nach Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran bleibt ein signifikanter Teil des Thy-1 an der Membran

zurück und recycelt nicht mit den anderen Vesikelproteinen, möglicherweise, um mit extrazellulären Molekülen im synaptischen Spalt zu interagieren. Die Interferenz des Thy-1 vermindert die Menge der Neurotransmitterfreisetzung. Dieser Effekt liegt zeitlich zwischen der Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und der Fusion der Vesikel (Jeng *et al.*, 1998). Zusätzlich spielt Thy-1 eine Rolle in der Signaltransduktion über Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Barboni *et al.*, 1991) und Stimulation der Tyrosinphosphorylierung (Garnett *et al.*, 1993). Die Entfernung des Thy-1 löst die Differenzierung und das Neuritenwachstum in primären Neuronen aus (Leifer *et al.*, 1984). Knockout-Mäuse zeigen spezifische LTP-Defizite (Nosten-Bertrand *et al.*, 1996).

4.6.3.8 Sarkoglykane

Die Sarkoglycan-Isoform ϵ wurde nicht signifikant über Massenspektrometrie identifiziert. Der von Prof. Imamura zur Verfügung gestellte Antikörper gegen zwei Sarkoglycan-Isoformen konnte jedoch insbesondere in den unteren Fraktionen Protein nachweisen. Auch immungereinigte Fraktionen zeigten starke Immunsignale.

Sarkoglykane sind essentielle Konstituenten des Dystrophin-assoziierten Proteinkomplexes (DAP), der wichtig für die Integrität gestreifter Muskelfasern ist. Er enthält u. a. die Sarkoglykane α , β , γ und δ . Diese Proteine sind membrandurchspannende Glycoproteine, assoziieren mit anderen membranären Komplexen und müssen im Komplex vorliegen, um funktionell zu sein. Zwei ϵ -Sarkoglykane, Typ I Transmembranglycoproteine, sind homolog zu α -Sarkoglykan (Ettinger *et al.*, 1997; McNally *et al.*, 1998). ϵ -Sarkoglykan 1 wird in einer breiten Vielfalt von Geweben exprimiert, die Isoform 2 zeigt dagegen hohe Abundanz im Gehirn. Beide werden in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen exprimiert und scheinen im Gehirn nicht im Komplex mit Dystrophin vorzuliegen. Fraktionierungen ergeben, daß ϵ -Sarkoglykane in synaptischen Membranen dopaminerger Neuronen in der Substantia Nigra vorhanden sind (Nishiyama *et al.*, 2004).

4.6.3.9 Endozytose

Proteine der Endozytosemaschinerie wie Clathrin und Dynamin nehmen im Verlauf der Präparation an Konzentration ab, sind in den oberen Fraktionen des Saccharosegradienten und in immungereinigten Fraktionen nicht vorhanden und daher als unspezifisch mit synaptischen Vesikeln assoziierte Proteine zu werten. Die Detektion per Massenspektrometrie ist vermutlich auf Spuren der Proteine in den entsprechenden Proben zurückzuführen.

Nach der Exozytose induzieren Clathrin-Triskelia und ihre Adaptorproteine AP2 und AP180 die Endozytose synaptischer Vesikel (Keen *et al.*, 1979). Der Zusammenbau wird durch Endophilin erleichtert, welches in der Kurvaturbildung assistiert (Schmidt *et al.*, 1999). Nach Bildung der Vesikel werden diese von der Membran gelöst und erreichen das Zytoplasma durch Wirkung des Dynamin/Amphiphysin-Komplexes (Shupliakov *et al.*, 1997). Diese endozytierten Vesikel, die nur transient ihre Clathrin Coats behalten, durchlaufen dann einen Coat-Entfernungsprozeß, um mit Neurotransmitter beladen und für die nächste Runde von Exozytose positioniert werden zu können. Nach Endozytose muß sichergestellt sein, daß die Vesikel gleicher Größe sind und keine homotypische Fusion durchlaufen. Ersteres wird durch Clathrin, Adaptorproteine und Dynamin gewährleistet (Zhang *et al.*, 1999a). Auf synaptischen Vesikeln lokalisiertes rab5 (Mollard *et al.*, 1994) hält die Größe der synaptischen Vesikel uniform, wahrscheinlich durch Verhinderung homotypischer Fusion (Jahn *et al.*, 2003).

4.6.3.9.1 Clathrin

Die Clathrin-vermittelte Vesikelabschnürung ist essentiell für eine Vielzahl intrazellulärer Membrantransportreaktionen im sekretorischen und endozytotischen Weg (Schmid, 1997; Lafer, 2002). Dieser Prozeß läßt sich in verschiedene sequentielle Schritte einteilen, die die Rekrutierung des Clathrin Coats, Membraneinstülpung, Aufbau des Clathringerüsts und Vesikelhalses und Abschnürung des Vesikels beinhalten, was von einem schnellen Verlust des Coats begleitet wird (Schmid, 1997; Brodsky *et al.*, 2001). Clathrin besteht aus Heterodimeren einer schweren Kette und einer von zwei leichten Ketten. Clathrinheterodimere bilden Triskelia, die aus drei schweren und drei leichten Ketten aufgebaut sind (Kirchhausen und Harrison, 1981).

4.6.3.9.2 Adaptoren

Die heterotetramere Adaptorenfamilie beinhaltet die fünf Mitglieder AP1, AP2, AP3, AP4 und die β , γ , δ , ζ Subkomplexe von COPI (Boehm und Bonifacino, 2001). Alle AP-Komplexe bestehen aus zwei großen (α und β), einer mittleren (μ) und einer kleinen Untereinheit (σ) (Kirchhausen, 1999), welche die Membranproteine erkennt (Ohno *et al.*, 1998). AP2 spielt eine zentrale Rolle in der endozytotischen CCV-Bildung über Rekrutierung von Clathrin, Phospholipiden, Proteinfraucht und anderer Komponenten der CCVs. Kurze lineare Aminosäuresequenzen (Traffick Motive) in den zytoplasmatischen Arealen der transmembranären Proteinfraucht bestimmen größtenteils die Routen, zwischen denen sie sich bewegen (Aridor und Traub, 2002). Dies geschieht über Interaktion mit einem Frachtrezeptor,

der in die Vesikel eingebaut wird und eine bestimmte Route determiniert. Die Phosphorylierung von AP2 ist lokalisationsabhängig und resultiert in der Bindung von Membranen und Sortiersignalen in Frachtmolekülen. Die Membranassoziation von AP2 wird zudem über die Interaktion mit PIP₂ reguliert (Owen, 2004). Phosphoryliertes AP2 wird an die Membran rekrutiert. Nach der Bindung wird es dephosphoryliert, was die Rekrutierung des Clathrin und anderer Komponenten erlaubt. Ihr Zusammenbau wird durch Dephosphorylierung weiter unterstützt. Die Entfernung des Coats wird durch Hsc70 katalysiert (Braell *et al.*, 1984; Höning *et al.*, 1994; Hannan *et al.*, 1998). Die Dissoziation von AP2 und vermutlich auch der anderen Akzessorproteine wird durch Phosphorylierung getrieben (Fingerhut *et al.*, 2001). Der Einbau von Lipid-Phosphatasen wie Synaptojanin (Haffner *et al.*, 2000) in CCVs, die an α -Adaptin binden, würde ultimativ in der Bildung von PI-3-P aus PIP₃ resultieren, gefolgt vom Abschnüren des Vesikels. PI-3-P ist das endosomale System markierende Polyphosphatidylinositol (Gillooly *et al.*, 2000) und stellt das Ziel der Vesikel dar. Die Umwandlung von PIP₃ in PI-3-P induziert außerdem die Entfernung des Vesikelcoats durch Reduktion der Bindungsstärke von AP2 an die Membran (Owen, 2004).

AP1-Komplexe sind mit dem TGN assoziiert und im Transport von Proteinen zum endosomalen/lysosomalen System und zur Zelloberfläche (β 1, μ 1) involviert (Robinson, 1987).

4.6.3.9.3 AP2-assozierte Kinase

Die AP2-assozierte Kinase ist vermutlich die endogene μ 2-Kinase und spielt eine regulatorische Rolle in der Clathrin-vermittelten Endozytose sowie in der Regulation der Fettsäure- und Cholesterinbiosynthese (Quelle: Pubmed).

4.6.3.9.4 Dynamin

Die große GTPase Dynamin kontrolliert die Abschnürungsreaktion synaptischer Vesikel (Sever *et al.*, 2000). Mit Dynamin interagierende Proteine wie Amphiphysin I und II (Wigge und McMahon, 1998) erkennen die C-terminale prolinreiche Domäne des Dynamin über ihre SH3-Domänen. Diese Bindung kann zu einer starken Aktivierung der GTPase-Aktivität *in vitro* führen. Die Interaktion mit sauren Phospholipiden wie PI-4,5-P₂ stimuliert die GTPase-Aktivität des Dynamin (Tuma *et al.*, 1993; Zheng *et al.*, 1996), könnte essentiell für die Rekrutierung des Dynamin an die Plasmamembran sein und dadurch die lokale Dynaminkonzentration erhöhen. Dynamin tendiert bei hohen Konzentrationen zur

Oligomerisierung, und die Selbstassemblierung stimuliert synergistisch die GTPase-Aktivität (Tuma und Collins, 1994).

4.6.3.9.5 Amphiphysin

Amphiphysin hilft bei der Generierung der Membrankurvatur an Clathrin-vermittelten Endozytosestellen und dient als multifunktionaler Adaptor zwischen Membran und anderen endozytotischen und Signal-Proteinen (Wigge und McMahon, 1998; Takei *et al.*, 1999). Dies wird über die reversible Phosphorylierung während der Depolarisation der Nervenendigung reguliert (Bauerfeind *et al.*, 1997; Tomizawa *et al.*, 2003). Unter Ruhe ist Amphiphysin in vesikulären Clustern lokalisiert, wird aber bei Stimulation an endozytotische Zonen rekrutiert (Evergren *et al.*, 2004). In ruhenden Nervenendigungen ist es konstitutiv phosphoryliert und durchläuft eine Ca^{2+} - und stimulationsabhängige Dephosphorylierung (Bauerfeind *et al.*, 1997; Tomizawa *et al.*, 2003), was die Interaktion mit AP2 und Clathrin verstärkt (Takei *et al.*, 2005). Die Interaktion mit Dynamin wird durch die gleichzeitig stattfindende, stimulationsabhängige Dephosphorylierung von Dynamin stimuliert (Tomizawa *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2004). Es interagiert ferner mit Synaptojanin (Heuvel *et al.*, 1997). Amphiphysin ist im Gehirn primär als Homo- und Heterodimer aus Amphiphysin 1 und 2 präsent. Das Protein bindet saure Phospholipide und tubuliert Liposomen bei Bindung (Takei *et al.*, 1999). Die Phosphorylierung kann über cdk5 und MAPK stattfinden (Tan *et al.*, 2003; Shang *et al.*, 2004). Applikation von Antisense-Oligonukleotiden resultiert in einem Kollaps der Wachstumszonen und Zerstörung der Aktin-Organisation ohne Beeinflussung der Endozytose. Dies impliziert eine von der Endozytose abweichende Funktion (Zhang und Zehlf, 2002).

4.6.3.9.6 AP180

AP180 bindet an Clathrin, Phosphoinositide (Ford *et al.*, 2001) und wahrscheinlich VAMP-2 (Nonet 1999) und agiert demnach vermutlich zusammen mit AP2 in den frühen Stufen der Clathrin-vermittelten Vesikelbildung (Royle und Lagnado, 2003). Zusätzlich bindet es Synaptotagmin I und könnte es dadurch während der Endozytose in sich abschnürende synaptische Vesikel rekrutieren (Jarousse *et al.*, 2003). Über die Bindung an Inositol (Norris *et al.*, 1995) und Phosphatidylinositolpolyphosphate (Hao *et al.*, 1997) kann es den Zusammenbau des Clathrinkäfigs verhindern (Mao *et al.*, 2001). AP180 reguliert zudem die Größe synaptischer Vesikel (Zhang *et al.*, 1998; Nonet *et al.*, 1999).

4.6.3.9.7 Phospholipide

Wie für die aktive Zone der Exozytose gibt es auch für die Clathrin-vermittelte Endozytose spezielle Zonen (Gundelfinger *et al.*, 2003). Diese können durch die Lipidzusammensetzung, das kortikale Zytoskelett oder spezielle Gerüstproteine geschaffen werden. Die Hydrolyse der PIP₂ durch die Polyphosphoinositid-Phosphatase Synaptojanin (McPherson *et al.*, 1996) ist unabdingbar für die Entfernung des Clathrin Coats der gebildeten Vesikel. Obwohl Phosphatidylinositide nur eine geringe Fraktion der Membranphospholipide darstellen, besitzen sie eine Schlüsselrolle in der Regulation von Membranverkehr und Signalereignissen an der Synapse (Cremona und De Camilli, 2001). Die Modulation der Synthese, die Umwandlung und der Abbau von Phosphatidylinositolen ist ein essentieller Mechanismus für die zeitliche und räumliche Koordination von Signalprozessen, Membranverkehr und des Aktin-Zytoskeletts (Cremona und De Camilli, 2001; Martin, 2001). Mehrere Proteine im Zyklus synaptischer Vesikel enthalten PI-4,5-P₂-bindende Domänen wie die Pleckstrin-Homologie-Domänen (PH) (Martin, 2001). PIP₂-reiche Mikrodomänen können spezifische Stellen für den vesikulären Membranverkehr etablieren (Martin, 2001) und sind an nahezu allen Clathrin-vermittelten Schritten der Endozytose beteiligt (Gundelfinger *et al.*, 2003). So hängen die anfänglichen Schritte der Bildung des Clathrin Coats von der PIP₂-vermittelten Membranrekrutierung des Clathrin Coats und assoziierter Proteine ab, wozu AP2 (Gaidarov und Keen, 1999), AP180 (Ford *et al.*, 2001) und Epsin (Itoh *et al.*, 2001) zählen. Die Freisetzung endozytotischer Vesikel von der Plasmamembran beinhaltet Dynamin. Die Bindung des PIP₂ an deren PH-Domäne ist essentiell für die Membranrekrutierung und endozytotische Funktion (Hinshaw, 2000). Die lokale Synthese der PI-Phosphate in Membrandomänen könnte für die Regulation der durch Aktin polymerisationsgetriebenen Vesikelbewegung dienen (Rozelle *et al.*, 2000). PIP₂ ist aber auch für die Exozytose entscheidend. Während des Primingvorgangs bindet das PI-Transferprotein an PI-4-P und präsentiert es der PI-4-P-5Kinase, die PI-4,5-P₂ bildet (Hay *et al.*, 1995). PIP₂ ist in neuroendokrinen Zellen an der Plasmamembran lokalisiert und hemmt die Ca²⁺-stimulierte Exozytose (Holz *et al.*, 2000).

4.6.3.9.8 Synaptojanin

Inositol-5'-Phosphatasen repräsentieren eine Familie von Proteinen, die das 5'-Phosphat des Inositolringes von Inositolpolyphosphaten und/oder Phosphoinositiden abspalten (Jefferson *et al.*, 1997). Mitglieder dieser Familie spielen in zellulären Prozessen wie intrazellulärer Signalkaskaden, Zytoskelettfunktion und Membrandynamik eine wichtige Rolle (Woscholski

und Parker, 1997). Eine Untergruppe bilden die Synaptojanine (McPherson *et al.*, 1996), die an bestimmten subzellulären Stellen lokalisieren (Cremona *et al.*, 1999). Synaptojanin 1 spielt in den Nervenendigungen vermutlich eine Rolle in der Clathrin-vermittelten Endozytose (Haffner *et al.*, 1997) und fungiert zudem im Aktinzytoskelett und der intrazellulären Signalgebung (Mitchell *et al.*, 1996; Sakisaka *et al.*, 1997).

4.6.3.9.9 EHD-Proteine

Neben den klassisch involvierten Proteinen werden auch Proteine mit Eps15 Homologie (EH)-Domänen für die Endozytose rekrutiert. EH-Domänen (EHD) enthaltende Proteine bilden zusammen mit ihren Interaktionspartnern ein Netzwerk, das im endozytotischen Transport involviert ist (Polo *et al.*, 2003) und dienen vermutlich als molekulare Gerüste. Eine weitere Funktion ist die Regulation der Aktindynamik (Duncan *et al.*, 2001; Hussain *et al.*, 2001). Einige EHD-Proteine regulieren die Aktinfilamente über Interaktion mit GAPs für die rho-GTPasen Rac1 und cdc42 (Yamaguchi *et al.*, 1997; Ikeda *et al.*, 1998), was in der Aktinassemblierung resultiert. Andere dienen als GEDs für cdc42 (Hussain *et al.*, 2001) oder binden an Proteine, die den ARP2/3 Komplex aktivieren und so die Nukleation neuer Aktinfilamente stimulieren (Millard *et al.*, 2004). EHD-Proteine spielen zudem verschiedene Rollen in der Signaltransduktion (Adams *et al.*, 2000; Tong *et al.*, 2000), da sie meist zusätzlich SH3- und prolinreiche Domänen besitzen. EHD1 interagiert u. a. mit SNAP-29, AP2 alpha, der schweren Kette des Clathrin, Syndapin I und II, Rabenosyn-5, Epsin und Stonin 2 (Rotem-Yehudar *et al.*, 2001; Naslavsky *et al.*, 2004; Braun *et al.*, 2005; Naslavsky und Caplan, 2005). Neben der Regulation Clathrin-vermittelter Transporte kontrolliert EHD1 das endozytotische Recyceln und den Transport von Rezeptoren, die über Clathrin-unabhängige Wege internalisiert wurden. EHD1 selbst wird durch die kleine GTPase ARF6 reguliert (Caplan *et al.*, 2002). Die Interaktion mit Rabenosyn 5 gibt die Rolle im Transport von frühem Endosom zum endosomalen Recycling Kompartiment wieder (Naslavsky *et al.*, 2004).

4.6.3.9.10 Flotillin-1 / Reggie-2

Flotillin-1 ist im Saccharosegradienten nur in den unteren Fraktionen detektierbar, läßt sich aber in geringer Konzentration auch in der immungereinigten Probe nachweisen. Die Assoziation von Flotillin mit synaptischen Vesikeln ist daher nicht auszuschließen.

Innerhalb von Säugerzellen werden Proteine in verschiedene organelläre Membrankompartimente wie Caveolae unterteilt (Yamada, 1955; Severs, 1988), und diese Lokalisation beeinflusst die Funktion der Proteine (Bickel *et al.*, 1997). Caveolinreiche Membranen enthalten heterotrimere G-Proteine, kleine G-Proteine wie H-Ras und Rap-GTPasen (Li *et al.*, 1995b; Song *et al.*, 1996). In allen Geweben zeigen Caveolin und Flotillin gleiche Expressionslevel. Nur im Gehirn ist Caveolin nicht nachweisbar, obwohl Caveolae-ähnliche Strukturen existieren (Olive *et al.*, 1995; Bouillot *et al.*, 1996). Flotillin könnte diese Rolle übernehmen (Bickel *et al.*, 1997). So wurde Flotillin-1 in Endosomen (Glebov *et al.*, 2006), Lysosomen und im Zellkern identifiziert (Kokubo *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005; Santamaria *et al.*, 2005) und definiert eine bestimmte Klasse Clathrin-unabhängiger, endozytotischer Strukturen (Glebov *et al.*, 2006).

4.6.3.9.11 MAL2A

MAL ist ein integrales, mit „Lipid Rafts“ assoziiertes Membranprotein mit essentieller Rolle im Proteintransport (de Marco *et al.*, 2002) und wird spezifisch in polarisierten Epithelzellen, sekretorischen Zellen, Neuronen, dendritischen Zellen und Mastzellen exprimiert (Marazuela *et al.*, 2004).

4.6.3.10 Zytoskelett

4.6.3.10.1 Aktin

Die Immunanalysen in dieser Arbeit geben die Assoziation von Aktin mit synaptischen Vesikeln wieder. Sowohl in den Fraktionen des Saccharosegradienten als auch über Massenspektrometrie wurde das Protein nachgewiesen. Eine der Funktionen von Aktin im Nervensystem ist die strukturelle Organisation der Nervenendigung (Doussau und Augustine, 2000; Dillon und Goda, 2005), die die geregelte Verteilung synaptischer Vesikel aufrechterhält. Jeder der physiologischen Parameter des Vesikelzyklus ist durch das Aktinzytoskelett beeinflusst (Doussau und Augustine, 2000). So reguliert Aktin die Verfügbarkeit des Reservepools, den es als physische Barriere umgibt (Richards *et al.*, 2004). Dies könnte durch Synapsine weiter verstärkt werden (Greengard *et al.*, 1994). Für die Mobilisierung des Reservepools könnte es Schienen darstellen, entlang derer Vesikel über Motorproteine transportiert werden (Evans *et al.*, 1998). Möglich ist auch eine passive Barriere zwischen RRP und Reservepool. Zusätzlich wird die Freisetzung der Neurotransmitter an der aktiven Zone direkt durch Aktin geregelt. Eukaryotische Zellen

verfügen über ein kortikales Aktin-Spektrin-basierendes Zytoskelett, das der Plasmamembran anliegt (Gundelfinger *et al.*, 2003). Das Aktin-Spektrin-Netzwerk bildet eine passive Barriere, die den Zugang zu den aktiven Zentren verhindert. Um bestimmten Vesikeln den Zugang zur Plasmamembran zu gewährleisten, müssen Aktinfilamente lokal ab- oder umgebaut werden (Valentijn *et al.*, 1999; Trifaro *et al.*, 2000). Der Abbau kortikalen Aktins wird durch die PKC ausgelöst, welche wiederum den Aktinumbau über Phosphorylierung von MARCKS (myristoylated alanine-rich C kinase-substrate) fördert (Trifaro *et al.*, 2002). Während der Endozytose könnte Aktin zudem in Kombination mit Dynamin eine Rolle in der Abschnürung der CCVs spielen (Dillon und Goda, 2005). So wachsen Aktinfilamente nach Stimulation der Nervenendigung aus der endozytotischen Zone heraus. Diese Filamente sind mit synaptischen Vesikeln assoziiert und transportieren vermutlich die Vesikel im endozytotischen Prozeß (Shupliakov *et al.*, 2002). Die Aktinpolymerisation an der Membran ist hierbei die treibende Kraft für die Bewegung der Vesikel weg von der Plasmamembran (Kaksonen *et al.*, 2005). Aktin könnte ferner als Gerüst für die Rekrutierung von Akzessorproteinen dienen (Qualmann und Kessels, 2002) und dadurch die Stellen der Endozytose definieren bzw. räumlich begrenzen (Ehrlich *et al.*, 2004). Welche Funktionen auch immer durch Aktinfilamente ausgeübt werden, sie müssen durch Hilfsproteine wie Synapsin, Myosin, Protein Kinase C, Rabphilin oder Profilin vermittelt werden.

4.6.3.10.1.1 Profilin

Das kleine G-Protein Profilin reguliert über ADP/ATP-Austausch im Aktin und Interaktion mit ARP2/3 den Aktinaufbau und die Filamentdynamik (Schluter *et al.*, 1997; Ayscough, 1998) und wird durch Ca^{2+} reguliert. Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration während synaptischer Aktivität könnte das Aktinnetzwerk modulieren und den Vesikeln den Zugang zur aktiven Zone erlauben (Doussau und Augustine, 2000).

4.6.3.10.1.2 ARP2/3

Der ARP2/3-Komplex ist Schlüsselregulator der Aktinpolymerisation (Pollard und Borisy, 2003). Der Komplex fördert den Zusammenbau dendritischer Aktinnetzwerke, die Zellbewegung, Phagozytose und intrazelluläre Beweglichkeit von Lipidvesikeln, Organellen und invasiver Pathogene (Welch und Mullins, 2002). Der 220 kDa-Komplex besteht aus zwei aktinverwandten Proteinen, Arp2 und Arp3, und fünf weiteren Untereinheiten (ARPC1-ARPC5). Der Komplex selbst hat eine geringe Nukleationssaktivität, fördert aber nach Bindung an NPFs (nucleation promoting factors), ATP und bereits bestehende Aktinfilamente die Bildung einer verzweigten Aktinstruktur mit 70°-Verzweigungen (Mullins *et al.*, 1998;

Volkman *et al.*, 2001). Der ARP2/3-Komplex ist essentiell für die Exozytose in Hefe und wird in der Clathrin-vermittelten Endozytose in Säugetieren vermutet, da er transient mit CCVs assoziiert ist (Merrifield, 2004). Zudem bindet Dynamin an verschiedene Aktivatoren des ARP2/3-Komplexes (Qualmann *et al.*, 2000). Unter der Kontrolle von Dynamin könnte so die Aktinpolymerisation den Schritt der Vesikelschließung vor der Abschnürung bewirken sowie für die Bewegung der Vesikel weg von der Plasmamembran verantwortlich sein (Merrifield, 2004).

4.6.3.10.1.3 ARP1

ARP1 ist eine Untereinheit von Dynactin und interagiert direkt mit β III-Spektrin. Diese Interaktion vermittelt die direkte Interaktion von Dynein mit Dynactin am Vesikel und steuert dadurch den aktiven, Dynein-getriebenen Transport spezifischer vesikulärer Fracht entlang der Mikrotubuli (Holleran *et al.*, 2001).

4.6.3.10.1.4 Capping Protein

Das Capping Protein (CP), auch bekannt als β -Actinin, ist ein $\alpha\beta$ -Heterodimer, der an die bärtigen Enden von Aktinfilamenten bindet (Hart *et al.*, 1997). CP ist für die Assemblierung und Organisation des Zytoskeletts wichtig, kolokalisiert mit bestimmten zellulären Aktinfilamenten (Cooper *et al.*, 1999) und ist Teil des Dynactin-Komplexes am Ende kurzer Aktin-ähnlicher Filamente (Schafer *et al.*, 1994). Es ist essentiell für die initiale Bewegung endozytotischer Vesikel weg von der Plasmamembran, die vermutlich abgeschnürte Vesikel darstellen. Die wichtige Rolle des Capping bärtiger Aktinenden durch das Capping Protein liegt darin, die Aktinfilamente des durch ARP2/3 verzweigten Netzwerkes kurz zu halten, was das Netzwerk stark macht und Filamentwachstum nur an freien Enden erlaubt, die in der Nähe der Objekte liegen, die bewegt werden sollen (Kim *et al.*, 2006). Der Verlust des Capping Protein resultiert in einer gehemmten Bewegung endozytotischer Vesikel weg von der Plasmamembran. Verschiedene Isoformen der Untereinheiten zeigen abweichende subzelluläre Lokalisationen (Schafer *et al.*, 1994; Hart *et al.*, 1997). Die Untereinheit alpha 2 ist hierbei vorzugsweise im Gehirn zu finden (Hart *et al.*, 1997).

4.6.3.10.1.5 Myosin-Va

Myosine sind dimere, aktinbasierende Motoren, die ATP hydrolysieren, um sich entlang von Aktinfilamenten zu bewegen. Die aktinabhängige ATPase-Aktivität von Myosin wird durch die Myosin Light Chain Kinase (MLCK) aktiviert. Die Blockade eines der beiden Proteine resultiert in einer Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung bei lang anhaltender Stimulation

(Prekeris und Terrian, 1997; Ryan, 1999), was eine Inhibition der Mobilisierung synaptischer Vesikel des Reservepools suggeriert. Myosin könnte ferner als präsynaptischer Ca^{2+} -Effektor agieren, da es mit synaptischen Vesikeln in einer Ca^{2+} -abhängigen Weise interagiert (Prekeris und Terrian, 1997). Auch Calmodulin bindet an Myosin, und dieser Komplex ist effizienter für die Aktivierung der CaMKII (Costa *et al.*, 1999). Myosin könnte demnach Calmodulin an synaptische Vesikel rekrutieren und lokal die CaMKII aktivieren, um vesikelassoziierte Substrate wie Synapsine zu phosphorylieren (Doussau *et al.*, 2000). Myosin-V wird in allen Kompartimenten von Nervenzellen gefunden und ist essentiell für die lokale Bewegung der Vesikel (Kabsch und Vandekerckhove, 1992; Bridgman, 1999). Myosin-Va ist mit endosomalen (Rodriguez und Cheney, 2002) und synaptischen Vesikeln assoziiert und bindet an den binären VAMP-2/Synaptophysin-Komplex (Prekeris und Terrian, 1997). Myosin-Va kann zudem Syntaxin 1A binden. Diese Interaktion, verbunden mit der Ca^{2+} -abhängigen Freisetzung des Calmodulin von der Halsregion des Myosin-Va, ist involviert in der Ca^{2+} -regulierten Exozytose und könnte die Rekrutierung synaptischer Vesikel zum RRP während anhaltender Sekretion regulieren (Watanabe *et al.*, 2005). In Melanosomen bindet Myosin-Va an rab27a-GTP und Melanophilin, einen putativen rab27-Effektor, der als Rezeptor Myosin-Va rekrutiert. Dies könnte auch für andere Vesikel gegeben sein, so daß rab-Proteine und ihre Effektoren Myosin-Va spezifisch an bestimmte Organellen rekrutieren (Wu *et al.*, 2002).

4.6.3.10.1.6 Elongation Factor 1

Elongation Factor 1 alpha ist eine essentielle Komponente der Proteinsynthesemaschine (Slobin, 1980), katalysiert die GTP-abhängige Bindung von Aminoacyl-tRNA an Ribosomen und reguliert dadurch die Genauigkeit und Schnelligkeit der Polypeptid-Elongation während der Translation (Sprinzl, 1994). Der Großteil der Proteinsynthesemaschinerie wird in Assoziation mit dem Aktin-Zytoskelett gefunden (Condeelis, 1995). Auch EF1 α , EF1 β , EF2, mRNA und Ribosomen sind mit dem Aktinzytoskelett assoziiert (Bektas *et al.*, 1994), was Transport und Verankerung der Maschinerie vermitteln und zur Lokalisierung bestimmter Proteinprodukte genutzt werden könnte (Kislauskis *et al.*, 1994). So werden Aktinfilamente durch EF1 verbunden (Yang *et al.*, 1993) und die Raten der Aktinpolymerisation verändert, was in einer Hemmung der Aktinpolymerisation durch sterische Blockade der Monomeraddition resultiert. Die Interaktion von EF1 mit Aktin und Aminoacyl-tRNA ist kompetitiv. Geringfügige lokale pH-Änderungen können die Dynamik regulieren (Liu *et al.*, 1996). EF1 bindet zudem Mikrotubuli (Yang *et al.*, 1993), was in deren Durchtrennung

resultiert (Shiina *et al.*, 1994). EF1 α kann außerdem die Phosphatidylinositol-4-Kinase aktivieren (Yang *et al.*, 1993) und Calmodulin binden (Kaur und Ruben, 1994).

4.6.3.10.2 Mikrotubuli

Tubulin ist gemäß der Analyse des Saccharosegradienten ausschließlich in den unteren Fraktionen präsent. Dennoch wurde Tubulin nach Immunreinigung, 2D-Elektrophorese und Immunblot sowie durch Massenspektrometrie in den oberen Fraktionen nachgewiesen.

Mikrotubuli sind in Axonen so organisiert, daß ihre Minusenden zum Perikaryon und die Plusenden zu den Synapsen zeigen (Baas *et al.*, 1988). Mikrotubuli werden für den Langstreckentransport genutzt, während lokale Bewegungen in der Zellperipherie über Aktin vermittelt werden (Goode *et al.*, 2000). Ein Teil der Mikrotubuli reicht jedoch in die kortikale Zytoskelettmatrix von Nervenendigungen und ist manchmal mit synaptischen Vesikeln dekoriert (Gray *et al.*, 1982; Westrum *et al.*, 1983; Hirokawa *et al.*, 1989). Möglicherweise werden Mikrotubuli in Nervenendigungen durch Ca²⁺-abhängige Synaptotagmin 1-Bindung an Tubulin (Honda *et al.*, 2002) gebildet und erhalten. Die Bindung findet über C₂A und C₂B und nur bei hohen Ca²⁺-Konzentrationen statt. Da Ca²⁺ die Tubulinpolymerisation hemmt, Synaptotagmin aber genau dort bindet, wo Ca²⁺ blockiert, könnte Synaptotagmin I die Polymerisation fördern. Aufgrund der hohen lokalen Ca²⁺-Konzentration und der schnellen Entfernung von Ca²⁺ in der Nervenendigung wäre die Mikrotubuli-Population sehr dynamisch und kurzlebig (Honda *et al.*, 2002). Neueste Berichte sprechen für eine Rolle des Tubulin im Vesikelverkehr der CCVs (Hussain *et al.*, 2003; Rappoport *et al.*, 2003). Zusätzliches Indiz für die Anwesenheit in Nervenendigungen ist die Anwesenheit von KIF3A-Kinesin auf synaptischen Vesikeln an der aktiven Zone (Muresan *et al.*, 1999), das für den anterograden Transport verantwortlich sein könnte. Zwei Typen von Motoren, Kinesin und zytoplasmatisches Dynein, bewegen Moleküle und Organellen anterograd und retrograd entlang der Mikrotubuli (Vallee und Bloom, 1991).

4.6.3.10.2.1 Dynein

Dynein wurde als Protein identifiziert, das nach Stimulation von Neuronen eine Abundanzsteigerung um Faktor 1,96 zeigt. Zytoplasmatisches Dynein ist ein Mitglied der Dynein-Superfamilie (Hirokawa, 1998) und bildet einen großen Komplex (1200 kDa), bestehend aus 2 schweren (~530 kDa) (Vallee und Shpetner, 1990), 3 intermediären (74 kDa) und 4 intermediären leichten Ketten (~55 kDa) (Gill *et al.*, 1994) sowie verschiedener leichter

Ketten (King *et al.*, 1996; Bowman *et al.*, 1999) und bewegt sich entlang von Mikrotubuli zu deren Minuspol (Schnapp und Reese, 1989; Schroer, 1994). Es assoziiert mit dem Proteinkomplex Dynactin (Schafer *et al.*, 1994), der u. a. ARP1, Aktin und das Capping Protein enthält. Diese Interaktion stellt den Kontakt zur Vesikelmembran her (Holleran *et al.*, 2001). Dynein ist demnach Motor für den Transport membranärer Organellen im Axon (Schnapp und Reese, 1989; Waterman-Storer *et al.*, 1997) und zudem für die Verteilung später Endosomen und Lysosomen (Lin und Collins, 1992), die Lokalisation des Golgi (Corthesy-Theulaz *et al.*, 1992), den vesikulären Transport von frühem zu spätem Endosom (Aniento *et al.*, 1993) und die Bewegung von Phagosomen verantwortlich (Blocker *et al.*, 1997). Die Regulation erfolgt vermutlich durch Phosphorylierung (Dillman *et al.*, 1996).

4.6.3.10.2.2 STOP

In einer Reihe von Zelltypen resultiert die Kältestabilität der Mikrotubuli aus einer Familie Calmodulin-regulierter Proteine - der STOP-Proteine (stable tubulin only polypeptide) (Job *et al.*, 1982), welche die Dynamik der Mikrotubuli reversibel blockieren können (Bosc *et al.*, 1999). Neuronale Zellen enthalten viele stabilisierte Mikrotubuli (Baas *et al.*, 1988), was durch Modifikation der Tubuline und durch Entfernung des C-terminalen Tyrosinrestes der α -Untereinheit durch Carboxypeptidase erreicht wird (MacRae, 1997). In sehr langlebigen Polymeren wird zusätzlich die vorletzte C-terminale Aminosäure abgespalten (Paturle-Lafanechere *et al.*, 1994). Ungefähr 60% neuronaler Mikrotubuli sind mit STOP assoziiert, das vor allem an kältestabilen und detyrosinierten Mikrotubuli anreichert. Interferenz der STOP-Bindung an Mikrotubuli resultiert in einem Verlust ihrer Stabilität. Da die Interferenz in Anwesenheit von NGF zu einem Verlust der Neuritenbildung führt, sind STOP-Proteine vermutlich wichtig für eine normale neuronale Differenzierung (Guillaud *et al.*, 1998).

4.6.3.10.2.3 p25

p25 α (TPPP oder tubulin polymerization promoting protein) ist ein kleines basisches Protein (Tirian *et al.*, 2003), das mit dem tau-Protein präzipitiert (Takahashi *et al.*, 1991). p25 hat submikromolare Affinität für Tubulin (Tirian *et al.*, 2003) und verursacht abweichende Mikrotubuli-Assemblate bei substöchiometrischen Konzentrationen (Martin, 2002). p25 α aus der Ratte ist potenter Inhibitor der Glycogen Synthase Kinase 3 (Martin *et al.*, 2002), humanes p25 α stimuliert die Aggregation von α -Synuclein, der Hauptkomponente der mit Parkinson assoziierten Lewy-Körper (Lindersson *et al.*, 2005). p25 kann sowohl

Tubulinmonomere als auch -polymere binden und Monomere in Mikrotubuli assemblieren (Tirian *et al.*, 2003).

4.6.3.10.3 Intermediärfilamente

Intermediärfilamente bilden eine große Proteinfamilie, die gewebespezifisch exprimiert werden (Herrmann und Aebi, 2000) und basierend auf Sequenzhomologien und Genstruktur in sechs Typen unterteilt werden. Bisher wurden fünf Intermediärfilament-Proteine in reifen Neuronen detektiert: die drei Neurofilament-Proteine, α -Internexin und Peripherin (Lariviere und Julien, 2004). Intermediärfilamente bewirken durch Erzeugung eines intrazellulären Gerüsts mechanische Stabilität für die Zellen (Lariviere und Julien, 2004) und könnten auch am Axonwachstum beteiligt sein (Lin und Szaro, 1995). Von der normalen Lokalisation abweichende neuronale Intermediärfilamente können zu progressiver Neurodegeneration und Neuronentod führen (Chien *et al.*, 2005).

4.6.3.10.3.1 Neurofilamente

Neurofilamente bestehen aus drei Untereinheiten, NF-H, NF-M und NF-L (schwere, mittlere und leichte Kette) und bilden den Haupttyp der Intermediärfilamente adulter Neuronen. Phosphorylierungsabhängige Interaktion von Neurofilamenten miteinander und mit anderen Strukturen des Zytoskeletts regulieren vermutlich die Bildung eines Zytoskelettgerüsts, das reife Axone unterstützt (Grant und Pant, 2000). Neurofilamente werden entlang des Axons über Dynein und Kinesin transportiert (Pralhad *et al.*, 2000). Die Interaktion mit Myosin-Va ist nötig für den Aufbau einer normalen Neurofilamentverteilung im Axon (Rao *et al.*, 2002).

4.6.3.10.3.2 Alpha-Internexin

Alpha-Internexin, auch bekannt als NF66, ist ein neuronales Intermediärfilament, das in Neuronen exprimiert wird, die Differenzierung und Reifung durchlaufen (Fliegner *et al.*, 1994). Es gehört wie NF-L, -M und -H zur Klasse IV der Intermediärfilamente (Ching und Liem, 1991). α -Internexin kann homooligomere und mit den Neurofilamenten heterooligomere Filamente bilden, während die Neurofilamente obligate Heteropolymere sind (Lariviere und Julien, 2004). Alpha-Internexin fördert das Axon- und Neuritenwachstum (Lariviere und Julien, 2004; Chien *et al.*, 2005).

4.6.3.10.4 Spektrin

Spektrine können Membranen und Membranproteinkomplexe an F-Aktin oder Mikrotubuli-Motoren wie Dynein-Dynactin und einige Kinesine binden (Matteis und Morrow, 2000). Verschiedene β -Spektrine spielen spezifische Rollen in der Bildung einzigartiger Mikrodomänen. $\beta 1$ -Spektrin ist neben der ubiquitären Expression in einer Vielzahl von Geweben auch im Gehirn vorhanden (Goodman *et al.*, 1995) und assoziiert dort über Synapsin I mit synaptischen Vesikeln (Sikorski *et al.*, 1991). Die Verbindung der synaptischen Vesikel an Spektrin und damit auch an die Plasmamembran ist hierbei unabhängig vom Phosphorylierungsstatus der Synapsine (Sikorski *et al.*, 1991), aber kompetitiv mit der Interaktion zwischen Spektrin und Aktin. Solch eine Interaktion würde demnach Spektrin von F-Aktin dissoziieren. βIII -Spektrin ist an synaptischen Vesikeln vorhanden, an der Plasmamembran angereichert und interagiert mit Munc13 (Sakaguchi *et al.*, 1998). Dies legt nahe, daß βIII -Spektrin zusammen mit Munc13 in die Neurotransmitterfreisetzung involviert ist, da die Reorganisation des Zytoskeletts die Ca^{2+} -abhängige Exozytose reguliert (Trifaro und Vitale, 1993). Zudem sind Dynein, Dynactin und Spektrin essentiell für die Rekonstitution des minus-gerichteten Transporters axonaler Vesikel entlang von Mikrotubuli (Muresan *et al.*, 2001).

4.6.3.11 G-Proteine

Zwei Klassen GTP-bindender Proteine sind existent. Heterotrimere G-Proteine bestehen aus den Untereinheiten α , β und γ , die nach Aktivierung in G_α und $G_{\beta\gamma}$ dissoziieren. Sie transduzieren rezeptorvermittelte Signale über die Plasmamembran an spezifische Effektorsysteme wie die Adenylatzyklase, cGMP-Phosphodiesterase, Phospholipasen und Ionenkanäle (Gilman, 1987). Die zweite Klasse sind kleine GTP-bindende Proteine. Neben H- (Shimizu *et al.*, 1983), N- und K-Ras (DeFeo *et al.*, 1981) gehören Rho (Madaule *et al.*, 1987), Ral (Chardin und Tavitian, 1986), rab-Homologe (Touchot *et al.*, 1987), Rap-Homologe (Pizon *et al.*, 1988), Rac (ras-related C3 botulinum toxin substrate) (Didsbury *et al.*, 1989) und ARF (Sewell und Kahn, 1988) dazu.

4.6.3.11.1 Heterotrimere G-Proteine

Das heterotrimere G-Protein G_{O2} ist konstitutiv mit synaptischen Vesikeln assoziiert. Die α -Untereinheit reguliert hierbei die Aktivität des vesikulären Monoamintransporters (Holtje *et al.*, 2000) und kontrolliert die Glutamataufnahme in synaptische Vesikel (Pahner *et al.*, 2003).

4.6.3.11.2 ARF

ARFs (ADP-ribosylation factor) bilden eine Familie kleiner GTP-bindender Proteine (Turner *et al.*, 2001). Die ARF-Familie beinhaltet sechs Mitglieder und ARF-ähnliche Proteine. ARFs sind in der Regulation der Vesikelabschnürung und der Reorganisation des Zytoskeletts involviert. Wie für die anderen kleinen GTPasen wird die Aktivierung und Deaktivierung durch GEFs und GAPs reguliert. GAP1 ist das erste Molekül, das als ARF-GAP beschrieben wurde und spezifisch mit ARF1 interagiert (Cukierman *et al.*, 1995). GAP1 lokalisiert im Golgi und interagiert mit COP1 (Eugster *et al.*, 2000). ARF6 ist im Plasmamembran/Endosomen-Verkehr und der kortikalen Aktin-Organisation involviert (Chavier und Goud, 1999). Dies beinhaltet die von Clathrin abhängige und unabhängige Endozytose (Altschuler *et al.*, 1999; Blagoveshchenskaya *et al.*, 2002). ARF6 stimuliert über Aktivierung der PI4P5-Kinase die Membranassoziation von AP2 (Krauss *et al.*, 2003) und ist in die frühen Stadien der Clathrin-vermittelten Rezeptorinternalisierung durch direkte Kontrolle der AP2-Assemblierung auf der Plasmamembran involviert (Paleotti *et al.*, 2005).

4.6.3.11.3 Ras

Ras-Proteine vermitteln die Signaltransduktion extrazellulärer Signale zum Zellkern und regulieren darüber ein breites Spektrum intrazellulärer Prozesse (Marshall, 1995). Die palmitoylierten Formen von Ras, N-Ras und H-Ras, werden sowohl auf der Plasmamembran als auch auf dem Golgi exprimiert. Sie werden im Zytosol synthetisiert und assoziieren mit Membranen als nach posttranslationaler Modifikation (Clarke, 1992). Am Golgi werden Ras-Proteine über die PLC γ aktiviert, die über Bildung von DAG und IP $_3$ zur Ca $^{2+}$ -Freisetzung führt (Chin *et al.*, 2002b). Zusätzlich können N- und H-Ras an der Plasmamembran depalmitoyliert werden und dann retrograd zum Golgi transportiert werden (Goodwin *et al.*, 2005). Ras aktiviert dort Erk und Akt, nicht aber Jnk. Dagegen sind ER-ständige Ras-Proteine schwache Aktivatoren von Erk und Akt, wirken aber stark auf Jnk (Chiu *et al.*, 2002). Die subzelluläre Lokalisation von Ras hat daher einen wichtigen Einfluß auf das Signal-Output. Auch K-Ras sitzt an der Plasmamembran, wird aber nach Phosphorylierung zu den internen Membranen rekrutiert. Hierzu zählt auch die äußere Mitochondrienmembran (Philips, 2005).

4.6.3.11.4 Ral

RalA und B (ras-like) sind Mitglieder der Ras-Superfamilie kleiner GTPasen (Chardin und Tavitian, 1986). Wie andere GTPasen dienen sie als molekulare Schalter und zyklisieren zwischen einer aktiven, GTP-gebundenen und einer inaktiven, GDP-gebundenen Form (Takai

et al., 2001). Sie sind wichtig für diverse zelluläre Funktionen, wie die Kontrolle der Zellproliferation (Chien und White, 2003), Migration (Gildea *et al.*, 2002), Filopodienbildung (Sugihara *et al.*, 2002), Differenzierung (Ruiter *et al.*, 2000), Organisation des Zytoskeletts (Bhattacharya *et al.*, 2002), vesikulären Transports (Moskalenko *et al.*, 2002), Exozytose (Polzin *et al.*, 2002) und Rezeptorendozytose (Nakashima *et al.*, 1999; Jullien-Flores *et al.*, 2000). RalA und B binden Calmodulin in einer Ca^{2+} -abhängigen und -unabhängigen Weise (Clough *et al.*, 2002) und fördern durch Bindung die Aktivität der Phospholipase C- δ 1. Die Rolle der PLC- δ 1 liegt in der Amplifizierung oder Aufrechterhaltung der IP_3 -Produktion, die durch PLC- β , - γ und - ϵ initiiert wird (Sidhu *et al.*, 2005). Ral-Proteine werden über Ral-GEFs aktiviert, die Ziel GTP-gebundener Ras-Proteine sind (Feig, 2003). Daneben gibt es aber auch Ras-unabhängige Mechanismen wie über die kleine GTPase RAP (Wolthuis *et al.*, 1998). Ral operiert synergistisch mit kleinen GTPasen der ARF-Familie (Luo *et al.*, 1998).

Ral-Proteine spielen neben den rab-Proteinen eine wichtige Rolle in der Vesikelregulation. RalA sitzt auf Plasmamembranen, während RalB auf intrazellulären Vesikeln lokalisiert ist (Gasman *et al.*, 1999). Sie werden durch Calmodulin von der Membran eluiert (Park, 2001). Die Ral-Proteine haben an der Regulation der ARF-abhängigen Phospholipase D teil (Jiang *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1997), ein Enzym impliziert in der Vesikelfunktion (Exton, 1997). Zusätzlich ist die PLD Ziel des Ral-Proteins RalBP1 (Cantor *et al.*, 1995), das mit Proteinen einen Komplex bildet, die in der Clathrin-vermittelten Endozytose eine Rolle spielen, und das die Zellmorphologie über Modulation des Aktinzytoskeletts beeinflusst (Cantor *et al.*, 1995). Ral spielt demnach als Protein synaptischer Vesikel eine Funktion in der Regulation der Neurosekretion (Polzin *et al.*, 2002).

Der Exozystenkomplex liegt an der Plasmamembran von Nervenendigungen (Hsu *et al.*, 1996) und bindet spezifisch an aktives Ral (Moskalenko *et al.*, 2002; Polzin *et al.*, 2002; Fukai *et al.*, 2003). Die Interaktion von RalA und dem Exozysten ist essentiell für die GTP-abhängige, nicht aber für die Ca^{2+} -abhängige Exozytose. Die GTP-abhängige Interaktion hat Einfluß auf die Modulation des RRP (Wang *et al.*, 2004). So führt die Hemmung von Ral zu einer Unterdrückung der Vergrößerung des RRP synaptischer Vesikel, induziert durch PKC und Ca^{2+} . RalA kontrolliert demnach das Wiederauffüllen des an die Plasmamembran gedockten RRP, vermutlich durch Modulation einiger Synapsin- und/oder Zytoskelett-vermittelter Ereignisse (Polzin *et al.*, 2002). RalA wird nach Membrandepolarisation aktiv – die Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin stimuliert die GTP-Bindung an RalA (Clough *et al.*, 2002).

4.6.3.11.5 RAP

RAP2 interagiert mit Effektoren von Ras oder wirkt diesen wie im Fall von RAP1 entgegen. RAP2 wird durch GEFs aktiviert und zeigt keine funktionelle Redundanz zu RAP1. Beide Proteine übernehmen überlappende, aber auch verschiedene Signalfunktionen. Effektoren sind der Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 2 (Traf2)- und die Nck-interacting Kinase (TNIK) (Fu *et al.*, 1999). TNIK dient als RAP2-Effektor zur Regulation des Aktinzytoskeletts über Induktion des Abbaus von F-Aktin (Fu *et al.*, 1999). RAP2 könnte durch eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli aktiviert werden.

4.6.3.11.6 Rac

Rac gehört zur Rho-Familie und wirkt wie die anderen G-Proteine der Ras-Familie als molekularer Schalter. Rac1 assoziiert selektiv mit gereinigten synaptischen Vesikeln und spielt vermutlich eine wichtige Rolle in der Kontrolle eines bisher undefinierten, Ca^{2+} -abhängigen späten Schrittes der Exozytose (Doussau *et al.*, 2000). Das G-Protein kann mit der Rho-Kinase interagieren (Lamarche *et al.*, 1996) und so die Myosinphosphorylierung regulieren (Amano *et al.*, 1996). Da Myosin wiederum die Neurotransmitterfreisetzung reguliert (Mochida *et al.*, 1994), könnte rac1 über Regulation der Aktin/Myosin-Interaktion die Bewegung der Vesikel zu den Stellen des Dockens und der Fusion beeinflussen. Rac kann zudem über die Regulation mehrerer Phosphatidylinositolphosphat-Kinasen Einfluß auf die Exozytose nehmen (Bokoch *et al.*, 1996). Rac-GTP beeinflusst zudem spezifisch die intrazelluläre Lokalisation von Synaptojanin 2, nicht aber von 1 (Nemoto *et al.*, 2001).

4.6.3.11.7 Atlastin

Atlastin (SPG3A) ist eine oligomere GTPase, die aufgrund der Ähnlichkeit mit Mitgliedern der Dynamamin/Mx/Guanylat-Bindeprotein (GBP)-Superfamilie großer GTPasen im intrazellulären Membranverkehr eine Rolle spielt (Zhao *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu den GBPs besteht Atlastin aus Untereinheiten integraler Membranproteine, wobei N- und C-Terminus im Zytoplasma liegen. Atlastin bildet Homooligomere und ist v. a. in *cis*-Golgi-Zisternen lokalisiert und in zerebralen kortikalen Pyramidalzellen angereichert. Neben der hohen Abundanz im Gehirn ist es in verschiedenen anderen Geweben in geringer Konzentration vorhanden. Das Protein ist insbesondere im Soma und weniger in Axonen und Dendriten lokalisiert (Zhu *et al.*, 2003).

4.6.3.12 Chaperone

Molekulare Chaperone erkennen denaturierte Proteine und stabilisieren teilweise gefaltete Proteinintermediate während der Faltung, Assemblierung und Deassemblierung (Feldman und Frydman, 2000). Neben dieser klassischen Rolle ist die Aufrechterhaltung korrekter Proteinintermediate essentiell für die normale Funktion vieler Proteine (Zinsmaier und Bronk, 2001). In der Synapse sind Chaperone wichtige Regulatoren der dynamischen Komplexe, die der Neurotransmitterfreisetzung unterliegen und erlauben die essentielle Geschwindigkeit und hohe Zuverlässigkeit des Prozesses. Sie werden zum Abbau oder zur Inaktivierung von Komplexen benötigt. Drei Systeme sind gut beschrieben. Das SNAP/NSF-System wirkt zusammen mit den SNAPs, die die intrinsische, schwache ATPase-Aktivität des NSF steigern (Agashe und Hartl, 2000), bei der Auflösung des SNARE-Komplexes. Das Auxilin/Hsc70-System ist an der Entfernung des Clathrin Coats beteiligt. DnaJ-Familienmitglieder dienen hier als Co-Chaperone, die die ATP-Hydrolyse ihrer Hsc70-Partner steigern. Hsc70 könnte aber auch Clathrin-Triskelia primen (Jiang *et al.*, 2000). Das CSP/Hsc70-System spielt vermutlich eine Rolle in der Stabilisierung unstrukturierter, monomerer SNAREs oder bei der Bildung des SNARE-Komplexes (Chamberlain und Burgoyne, 2000). Auch das α GDI, das rab3A bindet, liegt im Komplex mit CSP, Hsc70 und Hsp90 an der Vesikelmembran vor, was vermutlich die Membranextraktion von rab3A erleichtert (Sakisaka *et al.*, 2002). Zusätzlich führt ein Komplex aus CSP, Hsc70 und SGT eine unbekannt Funktion in der Neurotransmitterfreisetzung aus (Tobaben *et al.*, 2001). Der Komplex bindet die G-Protein $\beta\gamma$ -Untereinheit (Magga *et al.*, 2000) sowie phosphorylierungsabhängig an Syntaxin (Nie *et al.*, 1999) und Synaptotagmin I. Die Interaktion mit G-Protein-Untereinheiten steht im Zusammenhang mit der Regulation von Ca^{2+} -Kanälen (Magga *et al.*, 2000); aber auch direkte Effekte heterotrimerer G-Proteine auf die Exozytosemaschinerie sind in Neuronen vorhanden (Blackmer *et al.*, 2001). Vielleicht wirken sie als Organisatoren der Ca^{2+} -Kanalassemblierung, was die Geschwindigkeit der Neurotransmitterfreisetzung erklären könnte (Fernandez-Chacon und Südhof, 1999). Eine attraktive Hypothese der Syntaxin-Interaktion ist eine Funktion in der Modulation des SNARE-Komplexes (Evans und Morgan, 2002). Die PKA-Phosphorylierung von vesikelständigem CSP könnte Syntaxin entlassen, welches dann andere Proteine wie Munc18 bindet (Evans *et al.*, 2001). CSP α ist zudem essentiell für das Langzeitüberleben von Synapsen und fungiert in der Prävention der Degeneration von Nervenendigungen. All diese Daten sind konsistent mit der Rolle als molekularem Chaperon, die es der Synapse erlaubt, für eine lange Zeit korrekt zu funktionieren. CSP und die anderen Chaperone erhalten somit die Integrität der Synapse angesichts des Stresses durch häufiges

Nutzen (Fernandez-Chacon *et al.*, 2004). Auch die anderen identifizierten Chaperone könnten in der synaptischen Transmission involviert sein.

4.6.3.13 Metabolische Enzyme

4.6.3.13.1 Glykolyse

Die Glykolyse spielt eine lebenswichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der normalen Gehirnfunktion. Glukose ist Hauptsubstrat für die zerebrale Energie unter normalen Bedingungen (Siesjo, 1978). Neuere Erkenntnisse suggerieren eine direkte Korrelation zwischen Glukosenutzung und kognitiver Funktion (McNay *et al.*, 2000). Glykolytisch produziertes ATP treibt den Neurotransmitterimport in synaptische Vesikel. Im Gegensatz zur mitochondrialen Produktion ist auf diese Weise eine hohe lokale ATP-Konzentration möglich, die ein schnelles Wiederbefüllen der synaptischen Vesikel nach Exozytose gewährleistet (Ikemoto *et al.*, 2003). Dies wird durch die Interaktion der Aldolase und Phosphofruktokinase mit Untereinheiten der vATPase belegt (Lu *et al.*, 2001; Su *et al.*, 2003), die ein ‚Metabolon‘ zur Maximierung der Energielieferung für die vATPase bilden (Ikemoto *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2003). Die GAPDH spielt zusätzlich eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion und Neurotoxizität, bindet Aktin und könnte in der Organisation des präsynaptischen Terminals involviert sein (Rogalski-Wilk und Cohen, 1997). Zusätzlich könnte sie an der Fusion beteiligt sein, denn GAPDH ist Teil des Fusionskomplexes mit vATPase und Ca^{2+} /Calmodulin (Peters *et al.*, 2001). Glykolytische Enzyme im Gehirn zeigen in Synaptosomen ihre größte Aktivität (Knull, 1978). Daher ist es nicht überraschend, daß nach Immunreinigung die glykolytischen Enzyme Fructose Bisphosphat Aldolase, GAPDH, Lactat Dehydrogenase, Phosphofruktokinase, Hexokinase, Pyruvat Kinase und Dihydrolipoamid Acetyltransferase als Teil des Pyruvat Dehydrogenase Komplexes identifiziert wurden. Die Analysen des Saccharosegradienten hinsichtlich der GAPDH und Pyruvat Kinase geben die Abundanz beider Proteine in den oberen Fraktionen wieder. Allerdings weicht das Muster von dem integraler synaptischer Vesikelproteine ab, da auch Immunsignale in den Fraktionen 1 bis 3 erhalten wurden. Da die Proteine neben der Membranbindung jedoch auch löslich vorkommen, könnte dies Grund der Detektion in diesen Fraktionen sein. Laut Analyse des Präparationsverlaufes sind in der immungereinigten Probe nur noch Spuren beider Enzyme vorhanden. Dies schließt eine spezifische Assoziation nicht aus, da die Glykolyse zellweit stattfindet und die Enzyme möglicherweise nur eine Subpopulation darstellen, die an synaptische Vesikel bindet.

4.6.3.13.2 Protein Phosphatase 1

Protein Phosphatase 1 gehört zu den Enzymen, die den Großteil der Serin/Threonin-Phosphatase Aktivität des Gehirns und anderer Gewebe bildet (Cohen, 1997). Die katalytischen Untereinheiten der PP1 sind konstitutiv aktiv, während andere die Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin benötigen. Verschiedene Proteinphosphatase-Komplexe werden durch Assemblierung der katalytischen Untereinheiten mit regulatorischen gebildet (Colbran, 2004a). Die Protein Phosphatase 1 bestimmt die Effizienz des Lernens und Gedächtnisses durch Begrenzen der Aufnahme und Bevorzugen des Gedächtnisabfalls (Feng *et al.*, 2000). Die Hemmung der PP1 verlängert das Gedächtnis, indem sie das Vergessen fördert (Genoux *et al.*, 2002). LTP beinhaltet oft die (Auto-)Phosphorylierung von CAMKII im Hippocampus (Colbran, 2004b). PP1 dephosphoryliert neben anderen Protein Phosphatasen die CaMKII (Shields *et al.*, 1985). Die physiologisch relevante Phosphatase hängt hierbei wahrscheinlich von der subzellulären Lokalisation der Kinase ab. Diese wiederum wird durch zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen gesteuert (Colbran, 2004a).

4.6.3.13.3 Protein Tyrosin Phosphatase MEG2

Die Protein Tyrosin Phosphatase MEG2 oder Protein Tyrosin Phosphatase 9 ist über eine Phosphatidylbindedomäne an sekretorische Vesikelmembranen gebunden (Kruger *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002b). Diese Domäne reguliert die katalytische Aktivität des Enzyms (Kruger *et al.*, 2002; Huynh *et al.*, 2003). NSF ist Substrat für PTP-MEG2 und die Tyrosinphosphorylierung/-dephosphorylierung von NSF beeinflusst dessen Funktion. Dies könnte die Biogenese oder Homöostase synaptischer Vesikel durch Regulation der homotypischen Fusion unreifer sekretorischer Vesikel beeinflussen. Die Tyrosinphosphorylierung verhindert die Bindung von α SNAP an NSF. Da die Bindung von α SNAP für die Funktion des NSF im Abbau des *cis*-SNARE-Komplexes essentiell ist, würde die Phosphorylierung in einer Reduktion der Fähigkeit von NSF resultieren, die Fusion zu initiieren. Daher dient PTP-MEG2 als positiver Regulator von NSF (Huynh *et al.*, 2004).

4.6.3.13.4 PKC

Viele Studien der letzten 20 Jahre haben gezeigt, daß die Exozytose durch Protein Kinasen wie PKA und PKC moduliert wird (Lindau und Gomperts, 1991; Hille *et al.*, 1999; Turner *et al.*, 1999; Leenders und Sheng, 2005). Die PKC scheint an verschiedenen Stufen zu wirken und wird durch Ca^{2+} und DAG aktiviert (Newton, 2001). Zum einen beeinflusst sie die Größe und Wiederauffüllrate des RRP (Smith *et al.*, 1998; Lonart und Südhof, 2000), zum anderen

hat sie Wirkung auf die Rate und das Ausmaß der Exozytose (Barclay *et al.*, 2003). Dutzende von Proteinen sind als Substrate identifiziert worden. Zusätzlich ist es wahrscheinlich, daß die PKC-induzierte Rearrangierung des Aktinzytoskeletts in die erhöhte Exozytoserate involviert ist (Burgoyne und Morgan, 2003). Die ϵ -Untereinheit bindet hierbei an Aktinfilamente und führt nach Bindung zur Aktivierung der Kinase (Prekeris *et al.*, 1996). Die Aktinfilamente könnten auf diese Weise die ϵ -PKC in einer katalytisch aktiven Form in der Nähe der präsynaptischen Substrate halten (Prekeris *et al.*, 1996).

4.6.3.13.5 Erk

Erk-1/2 verhält sich im Saccharosegradienten wie ein integrales Vesikelprotein, ist aber in immungereinigten Proben nicht detektierbar. Interessanterweise gilt dies nur für die Anreicherungsstudien, während nach 2D-Elektrophorese ein Signal detektiert werden kann. Die Abreicherung während der Präparation läßt nicht ausschließen, daß eine Subpopulation von Erk mit synaptischen Vesikeln assoziiert ist, zumal per Massenspektrometrie die interagierenden Ras-Proteine detektiert wurden.

Erks (extracellular signal-regulated kinase) sind Serin/Threonin-Kinasen, deren Ziele Transkriptionsfaktoren, Zytoskelettproteine, regulatorische Enzyme und andere Kinasen beinhalten. Erks, ihre Aktivatoren und Effektoren sind in reifen Neuronen exprimiert und werden aufgrund excitatorischer glutamaterger Stimulation aktiviert, was viele Formen der synaptischen Plastizität wie Lernen und Gedächtnis kontrolliert (Rosenblum *et al.*, 2000) sowie eine Rolle in der temporalen Integration der Synapse spielt (Selcher *et al.*, 2003). Sie werden durch Phosphorylierung an der Plasmamembran und anderen subzellulären Organellen wie Golgi und spätem Endosom aktiviert (Chiu *et al.*, 2002; Teis *et al.*, 2002; Torii *et al.*, 2004). Erk reguliert die Organellendynamik und den endosomalen Membranverkehr. Es wirkt spezifisch im nicht Clathrin-vermittelten Recyclingsystem, das von Arf6 reguliert wird (Roberston *et al.*, 2006) und ist nötig für die Aufrechterhaltung der normalen Morphologie und Dynamik des tubulären Endosoms. Ein weiteres Protein, das in diesem Membranweg eine Rolle spielt, ist EHD1 (Naslavsky *et al.*, 2004), das durch Erk phosphoryliert werden könnte (Roberston *et al.*, 2006). Der Ca^{2+} -Einstrom in neuronale Zellen über Ca^{2+} -Kanäle des L-Typs und NMDA-Rezeptoren kann effizient Erk über Ras aktivieren (Rosen *et al.*, 1994). Erk2 hat Effekte auf viele zelluläre Ereignisse, wie die Aktivierung von CREB und anderen Wegen, die in synaptischer Plastizität eine Rolle spielen (Josselyn *et al.*, 2001; Genoux *et al.*, 2002). Erks können auch über direkte

Membrandepolarisierung (Rosen *et al.*, 1994) oder glutamaterges Signalling aktiviert werden (Thomas und Huganir, 2004). Diese Aktivierung ist Ras-abhängig und zeigt wiederum eine Ca^{2+} -Abhängigkeit (Nakielny *et al.*, 1992).

4.6.3.13.6 Dipeptidyl-Peptidase

Dipeptidyl-Peptidasen spalten als Serinproteasen N-terminal Dipeptide von Oligo- und Polypeptiden (Wada *et al.*, 1992). Peptidasen wie DPP6 sind integrale Membranglykoproteine, vorwiegend im Gehirn lokalisiert und könnten in neuronaler Plastizität involviert sein. DPP6 ist zudem eine Akzessoruntereinheit des Kaliumkanals Kv_4 (Wada *et al.*, 1992; Nadal *et al.*, 2003) und erhöht dramatisch die Oberflächenexpression der Kv_4 -Kanäle (Nadal *et al.*, 2003). DPP10 zeigt die höchste Expression in Gehirn, Pankreas, Rückenmark und adrenergen Drüsen (Allen *et al.*, 2003) und hat ähnliche Effekte auf die $\text{Kv}_{4,2}$ -Kanäle wie DPP6.

4.6.3.13.7 cdk6

Postmitotisch differenzierte Neuronen nutzen Zellzyklusregulatoremechanismen als Teil des apoptotischen Weges, der durch Nährstoffentzug aktiviert wird. Cdk6 zählt hierzu (Park *et al.*, 1997).

4.6.3.13.8 Aldose Reduktase

Die Aldose Reduktase ist Mitglied der Aldo/Keto-Reduktase-Superfamilie (Jez *et al.*, 1997) und reduziert biogene Amine (Wermuth, 1985). Das Enzym ist in sympathischen Neuronen vorhanden (Kawamura *et al.*, 1999). Norepinephrin wird durch Monoamin-Oxidasen zu einem Aldehyd-Intermediat metabolisiert, das durch Aldose Reduktasen weiter zum stabilen Derivat 3,4-Dihydroxyphenylglykol umgewandelt wird (Kawamura *et al.*, 2002).

4.6.3.13.9 Monoglycerid Lipase

Monoglycerid Lipasen sind Abbauenzyme endogener Cannabinoide und in Axonenden präsynaptisch lokalisiert (Gulyas *et al.*, 2004).

4.6.3.13.10 Inositol Polyphosphat Phosphatase

Inositol Polyphosphat Phosphatasen gehören wie Synaptojanin zu der Proteinfamilie, die an Position 5 des Inositolringes das Phosphat abspaltet. Substrate sind Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat, Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat, Inositol-1,4,5-Trisphosphat und

Inositol-1,3,4,5-Tetraphosphat. Die 5-Phosphatase-vermittelte Phosphoinositidregulation spielt im Recycling synaptischer Vesikel eine essentielle Rolle (Cremona *et al.*, 1999).

4.6.3.13.11 CNPase

Die 3',5'-Zyklische Nukleotidphosphodiesterase (CNPase) katalysiert die Hydrolyse von cAMP und/oder cGMP. Sie wirkt zusammen mit der Adenylat- oder Guanylatzyklase in der Regulation der Amplitude und Dauer der Zellsignalmechanismen, die durch cAMP oder cGMP vermittelt werden. Man kennt lösliche und membrangebundene Formen, die durch CaMKII und/oder PKA aktiviert werden und Teil an der Amplifizierung neuronaler Signale haben. In der Nervenendigung findet sich CNPase-Aktivität auf Membranen synaptischer Vesikel (Pardos und Lentz, 1976), was eine Rolle für cAMP in der Funktion synaptischer Vesikel suggeriert. Die CNPase könnte ferner als MAP die Bindung von Tubulin an Membranen vermitteln (Laezza *et al.*, 1997). Der Hauptteil von Tubulin ist zytoplasmatisch, aber eine signifikante Portion ist eng mit der Plasmamembran und anderen Membranen assoziiert (Bifulco *et al.*, 2002). CNP ist prenyliert und palmitoyliert (Braun *et al.*, 1991) und liefert so hydrophobe Domänen für die Membraninsertion (Bifulco *et al.*, 2002). Auch die Assoziation von Mikrotubuli mit Mitochondrien (Bernier-Valentin *et al.*, 1983), synaptischen Vesikeln (Gray, 1978), ER (Vogl, 1996) und Lysosomen (Mithieux *et al.*, 1988) könnte über CNPase stattfinden.

4.6.3.13.12 Adenylsuccinat Lyase

Die Adenylsuccinat Lyase ist ein Enzym, das sowohl in der zellulären Replikation als auch im Stoffwechsel eine wichtige Rolle spielt. Die Lyase ist Teil des Purin-Syntheseweges. Aufgrund der Wichtigkeit in der Aufrechterhaltung des zellulären Metabolismus, haben Mutationen schwere klinische Konsequenzen, wie mentale Retardation mit autistischen Charakteristika (Toth und Yeates, 2000).

4.6.3.13.13 Glutamin Synthetase

Innerhalb des ZNS enthalten Astrozyten verschiedene gliaspezifische Enzyme des Citrat- und Glutaminzyklus. Hierzu zählt u. a. die Glutamin Synthetase, die die Umwandlung von Glutamat in das nichtreaktive Glutamin katalysiert (Martinez-Hernandez *et al.*, 1977; Cooper, 1988). Glutamin wird von Astrozyten freigesetzt, von glutamatergen Neuronen aufgenommen und zu Glutamat deamidiert, wenn sie Glutamat für die Neurotransmission benötigen.

Freigesetztes Glutamat wird anschließend von Astrozyten wieder zu Glutamin recycelt (Duce und Keen, 1983).

4.6.3.13.14 Chromaffine Granula ATPase II

Die sekretorischen Granula der adrenalen Medulla, genannt chromaffine Granula, speichern und sezernieren Catecholamine, Nukleotide und Proteine (Percy *et al.*, 1985). Die Akkumulation wird durch Wirkung einer elektrogenen Protonen-ATPase erreicht (Knoth *et al.*, 1982). Chromaffine Granula enthalten zwei ATPase-Typen mit unterschiedlichen Eigenschaften (Apps *et al.*, 1983): ATPase I (400 kDa) und II (140 kDa), wobei es unwahrscheinlich ist, daß Typ II Protonen pumpt (Percy *et al.*, 1985). Die chromaffine Granula ATPase II (phospholipid-transporting ATPase IA oder ATPase Klasse I Typ 8A Mitglied 1) ist Mitglied der Subfamilie von P-Typ ATPasen und könnte eine Rolle im Transport von Aminophospholipiden vom äußeren in den inneren Layer verschiedener Membranen spielen und die asymmetrische Verteilung von Phospholipiden, hauptsächlich in sekretorischen Vesikeln (Tang *et al.*, 1996), aufrechterhalten. Sie wird in vielen Geweben exprimiert, zeigt aber in Gehirn und Lunge die höchste Abundanz.

4.6.3.14 Putative Kontaminationen

4.6.3.14.1 Plasmamembran

Wie erwartet lassen sich Proteine der Plasmamembran nach Analyse des Saccharosegradienten ausschließlich in den unteren Fraktionen detektieren. Neben der Na₂K-ATPase beinhaltet dies den Calcium-Kanal des N-Typs. Weitere Evidenz für das Fehlen von Plasmamembran in den immungereinigten Fraktionen ist die Analyse des Präparationsverlaufs. Die Na₂K-ATPase, der Calcium-Kanal Ca_v2.2 und die Proteine CAT, GAT und EAAC1 zeigen eine Abundanzabnahme während der Präparation und sind in immungereinigten Vesikeln nicht nachweisbar. Die massenspektrometrisch detektierten Proteine der Plasmamembran sind daher vermutlich auf Spuren der Proteine oder der Plasmamembran in der vesikulären Präparation zurückzuführen. Andere Proteine hingegen sind neueren Befunden zufolge auch intrazellulär und daher möglicherweise auch auf synaptischen Vesikeln lokalisiert.

4.6.3.14.1.1 Na₂K-ATPase

Die Na₂K-ATPase ist ein Membranprotein mit ubiquitärer Expression (Lingrel und Kuntzweiler, 1994). In Nervenzellen werden 70% des ATP von der elektrogenen Pumpe

genutzt. Der durch Ionen-transport generierte elektrochemische Gradient über der Plasmamembran ist nötig für den direktionalen Fluß von Molekülen über die Membran. Die Pumpe schafft die Voraussetzungen für die elektrische Erregbarkeit von Nerven- und Muskelzellen, erleichtert den Transport von Glucose, Aminosäuren und anderen Nährstoffen in die Zelle und schafft in Epithelzellen einen osmotischen Gradienten, der die Wasseraufnahme antreibt, was insbesondere in Darm und Niere eine wichtige Rolle spielt (Geering, 1997). Die Na,K-ATPase besteht aus zwei Untereinheiten. Die α -Untereinheit bindet ATP, K^+ und Na^+ und enthält die Phosphorylierungsstelle (Jorgensen *et al.*, 2003). Die kleinere β -Untereinheit ist nötig für die Aktivität des Komplexes und für die Lokalisation und Aktivität der α -Untereinheit. Man vermutet acht oder zehn Transmembranhelices.

4.6.3.14.1.2 LSAMP

LSAMP (limbic system-associated membrane protein) ist ein Glykoprotein auf der Oberfläche von Somata und proximalen Dendriten von Neuronen kortikaler und subkortikaler Regionen des limbischen Systems (Zacco *et al.*, 1990). Es inseriert mit einem GPI-Anker in die Zellmembran (Pimenta *et al.*, 1996), fördert das Neuritenwachstum (Mann *et al.*, 1998) und vermittelt die Netzwerkbildung des limbischen Systems (Keller *et al.*, 1989).

4.6.3.14.1.3 Glykoprotein m6a

M6a ist ein neuronales Oberflächenmolekül im ZNS (Lagenaur *et al.*, 1992), das hohe Homologie mit dem Proteolipidprotein PLP aus der Familie der Myeline zeigt. Es wird vorwiegend in granulären Zellkörpern synthetisiert und akkumuliert dann schnell in synaptischen Endigungen der Molekularschicht (Yan *et al.*, 1996). Über Elektronenmikroskopie ist es präsynaptischen Vesikeln zugeordnet worden (Roussel *et al.*, 1998) und spielt eine wichtige Rolle im Neuritenwachstum und der Synapsenbildung (Alfonso *et al.*, 2005). M6a ist im Cerebellum vorwiegend mit synaptischen Strukturen assoziiert und spielt dort möglicherweise eine Rolle im Vesikeldocken. Sowohl die Lokalisierung in der präsynaptischen Plasmamembran als auch auf Membranen synaptischer Vesikel und die hohe Homologie mit den Myelin-Proteolipiden (Diaz *et al.*, 1990) sprechen für eine Funktion als Ca^{2+} -Kanal, der durch NGF-abhängige PKC-Phosphorylierung reguliert wird (Mukobata *et al.*, 2002).

4.6.3.14.1.4 Myelin Basic Protein und Proteolipid Protein

Die Myelinscheide des ZNS wird durch Membranen von Oligodendrozyten gebildet, die sich mehrere hundert Male um Nervenfasern wickeln, sie dadurch isolieren und die schnelle

Weiterleitung von Nervenimpulsen erlauben (Kramer *et al.*, 2001). Die Hauptproteine des Myelin sind das Myelin Basic Protein (MBP) und das Proteolipid Protein in nahezu äquimolaren Teilen (Arvanitis *et al.*, 2004). MBP interagiert *in vitro* mit Calmodulin (Libich und Harauz, 2002), Aktin (Hill *et al.*, 2004), Tubulin (Gendreau *et al.*, 2003), Clathrin (Prasad *et al.*, 1995) und CNP, welches mit dem Zytoskelett assoziiert ist (Richter-Landsberg, 2001). Die Bindung an Aktin beeinflusst die Polymerisation des MBP dramatisch (Harauz *et al.*, 2004). Die Assoziation von MBP mit SNARE-Komplexen wurde bereits dokumentiert (Söllner *et al.*, 1993a) und stellt ein *in vitro*-Artefakt dar, da MBP und synaptische SNAREs in unterschiedlichen Zellen lokalisiert sind. PLP erhält die strukturelle Integrität der Myelinmembran und spielt vermutlich eine wichtige Rolle in der frühen Oligodendrozytendifferenzierung und dem Überleben der Zellen lange vor Einsetzen der Myelinisierung (Yan *et al.*, 1996). Ein signifikanter Teil ist auf Coated Vesicles vorhanden, die Transportvesikel für die intrazelluläre Bewegung des Proteins darstellen könnten (Sapirstein *et al.*, 1988). Möglicherweise sind diese Transportvesikel SV2-haltig und resultierten daher in der Identifikation des Proteins.

4.6.3.14.1.5 NCAM140 und Contactin

NCAM ist ein Zelladhäsionsmolekül der Immunglobulin-Superfamilie (Leshchyn'ska *et al.*, 2003), das in Neuronen im gesamten ZNS und PNS exprimiert wird (Cunningham *et al.*, 1987). Alternatives Spleißen führt zu Transmembranproteinen von 180 und 140 kDa und einem GPI-verankerten Produkt von 120 kDa (Murray *et al.*, 1986), die verschiedene Expressionsmuster und Funktionen besitzen. Während der Entwicklung fördern die NCAMs das Axonwachstum in korrekte Richtungen (Stoeckli und Landmesser, 1995). Im reifen Nervensystem sind sie in synaptischen Membranen lokalisiert (Persohn *et al.*, 1989) und regulieren präsynaptisches Spritzen und synaptische Stabilisation über NCAM-ähnliche Proteine (Schuster *et al.*, 1996). Außerdem sind sie in LTP (Luthl *et al.*, 1994) und Lernen (Arami *et al.*, 1996) involviert. Zur gleichen Familie gehört F3/Contactin, ein GPI-verankertes Molekül, das von Neuronen exprimiert wird. Die Bindung von Contactin an Mitglieder der L1-Familie von Zelladhäsionsmolekülen der Immunglobulin-Superfamilie moduliert und kontrolliert das axonale Wachstum. Über die Assoziation mit Komponenten der extrazellulären Matrix vermittelt es Neuron-Glia-Kontakte. Ferner organisiert es axonale Subdomänen an den Ranvier'schen Schnürringen und interagiert dort mit spannungsgesteuerten Na⁺-Kanälen (Falk *et al.*, 2002).

4.6.3.14.1.6 VILIP-1 und -3

VILIP-1 ist ein Mitglied der Superfamilie neuronaler Ca^{2+} -Sensorproteine, dessen Myristoylierung Ca^{2+} -abhängig die Membranassoziation erleichtert (Ames *et al.*, 1997). Das NCS-Protein vermittelt die Zellmigration und die Zelladhäsion an die extrazelluläre Matrix und reguliert im ZNS die Konzentration an cAMP für Signalkaskaden und Differenzierung (Gonzalez Guerrico *et al.*, 2005). VILIP-1 interagiert mit den nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (Lin *et al.*, 2002) und Guanylatzykluserezeptoren (Braunewell *et al.*, 2001) und moduliert vermutlich deren Oberflächenexpression durch Änderungen intrazellulärer Ca^{2+} -Level. Neben der Plasmamembran ist es an Golgi-Membranen und bisher unidentifizierten Spezialisierungen neuronaler Dendriten lokalisiert (Spilker und Braunewell, 2003). Durch den globalen Einfluß auf das Rezeptortrafficking könnte VILIP-1 unter physiologischen und pathologischen Bedingungen zum Prozeß der synaptischen Plastizität beitragen (Brackmann *et al.*, 2005). Neuere Studien zeigen, daß VILIP-1 mit CCV aus Rattenhirn assoziiert ist, was eine Funktion im Clathrin-abhängigen Membranverkehr beinhaltet (Blondeau *et al.*, 2004). VILIP-1 wird in zerebellären Granulazellen exprimiert, während VILIP-3 in Purkinjezellen lokalisiert ist (Spilker *et al.*, 2000). Beide kolokalisieren in Neuronen im Hippocampus. NCS-Proteine sind in eine Vielzahl von Ca^{2+} -abhängigen Signaltransduktionskaskaden involviert, wie dem Metabolismus zyklischer Nukleotide, der Neurotransmitterfreisetzung, der Modulation von Ionenkanälen und der Regulation der Genexpression (Braunewell *et al.*, 2001; Burgoyne und Weiss, 2001). VILIP-1 ist vorwiegend mit Neuronenmembranen assoziiert, während VILIP-3 auf intrazellulären Strukturen lokalisiert ist, wo es Einfluß auf Signalkaskaden über MAPK nimmt (Spilker *et al.*, 2002), VILIP-1 könnte ferner über α -Adaptin in der Endozytose fungieren (Blondeau *et al.*, 2004).

4.6.3.14.2 Mitochondriale Proteine

Analysen mitochondrialer Verunreinigungen fanden durch Immunanalyse der F-ATPase statt. Das Enzym ist im Saccharosegradienten nur in den unteren Fraktionen präsent, reichert während der Präparation ab und zeigt keine Präsenz in immungereinigten Fraktionen. Die detektierten mitochondrialen Proteine sind demnach als Verunreinigungen zu werten.

4.6.3.14.2.1 Aspartat Aminotransferase

Mitochondriale Vorläuferproteine werden mit einer positiv geladenen Präsequenz synthetisiert (Heijne, 1986). Der Vorläufer der mitochondrialen Aspartat Aminotransferase bindet daher an negativ geladene Phospholipidvesikel (Berezov *et al.*, 1996). Aufgrund dieser

Gegebenheit und der Zerstörung der präsynaptischen Nervenendigung ist es möglich, daß das Vorläuferprotein an die synaptische Vesikelmembran bindet.

4.6.3.14.2.2 Mitochondriale Creatin Kinase

Creatin Kinasen (CK) katalysieren den reversiblen Transfer von Phosphatgruppen des ATP an Creatin für die Bildung von Phosphocreatin und ADP (Vacheron *et al.*, 1997) und geben dem oxidativen Phosphorylierungssystem direkte Auskunft über den momentanen Wert des Phosphorylpotentials im Zytoplasma (Lipskaya, 2001). Das Enzym existiert als zytosolische und mitochondriale Isoform (mt-CK). Die mt-CK ist über ionische Interaktionen an die äußere Seite der inneren Membran von Muskel- oder Hirnmitochondrien gebunden (Scholte, 1973). Neben Cardiolipin (Müller *et al.*, 1985) bindet die mt-CK auch negativ geladene Phospholipide wie Phosphatidylglycin, -amin, -inositol oder -serin (Müller *et al.*, 1985; Rojo *et al.*, 1991). Über solche Interaktionen ist eine Bindung des Proteins während der Präparation an synaptische Vesikel möglich.

4.6.3.14.2.3 F-ATPase

Die F_0F_1 -ATPase regeneriert in Mitochondrien ATP aus ADP und P_i (Boyer, 1997). Der F_1 -Sektor kann dissoziieren und behält hierbei seine Fähigkeit, ATP zu hydrolysieren. Die Identifikation der F_1 -Untereinheit könnte während der Zellfraktionierung durch Dissoziation des löslichen ATPase-Sektors vom membranständigen Sektor und unspezifische Bindung an synaptische Vesikelmembranen zustande gekommen sein. So wurde die F_1 -ATPase auch nach Isolation chromaffiner Granula als Kontamination identifiziert (Percy *et al.*, 1985).

4.6.3.14.3 Nukleäre Proteine

4.6.3.14.3.1 BASP1

Brain acid soluble protein 1 (BASP1) ist ein transkriptioneller Kosuppressor des Transkriptionsregulators Wilms Tumor Suppressor Protein WT1, der eine Rolle in der Entwicklung der Nieren spielt. Beide Proteine sind im Nukleus lokalisiert (Carpenter *et al.*, 2004).

4.6.3.14.3.2 Interleukin enhancer binding factor

ILF-2 wird weit verbreitet exprimiert und hat eine vorwiegend nukleäre Lokalisation. Als Regulator der Genexpression aktiviert es die Transkription (Zhao *et al.*, 2005).

4.6.3.14.3.3 MatrIn 3

Matrin 3 ist ein abundantes Protein der nukleären Matrix, die als Komplex von Proteinen und Nukleinsäuren im Zellkern definiert werden kann (Berezney und Coffey, 1974). Die Matrixproteine haben Teil an der DNA-Replikation, RNA-Transkription und dem Prozessieren und Organisieren von Chromatin (Agutter und Richardson, 1980; Nickerson *et al.*, 1997). Die Funktion des Matrin 3 ist größtenteils unklar. Die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren führt aber zu dessen Phosphorylierung und ist in der LTP involviert (Giordano *et al.*, 2005).

4.6.3.14.3.4 Spindlin-like protein 2

SPIN-2 ist im Zellkern lokalisiert und hat anti-apoptotische Eigenschaften. Es reguliert vermutlich die Zellzyklus-Progression (Fletcher *et al.*, 2002).

4.6.3.14.3.5 Transcription factor NRF

Der Transkriptionsfaktor NRF interagiert mit einem spezifischen negativen Regulatorelement (NRE) 5'-AATTCCTCTGA-3', um die transkriptionelle Inhibition bestimmter, durch NFκ-B induzierter Gene zu vermitteln. Das Protein ist im konstitutiven Stilllegen des Interferon-β Promotors, der Regulation der IL-8 Transkription sowie in der Inhibition der basalen und Cytokin-induzierten iNOS Promotoraktivität involviert (Nourbakhsh und Hauser, 1999) und interagiert mit NFκ-B.

4.6.3.14.4 Andere

Um Kontaminationen durch andere Organellen auszuschließen, wurde der Saccharosegradient und die während der Präparation entnommenen Proben hinsichtlich ER (IP3-Rezeptor, Calnexin), Golgi (TGN38), Endosomen (EEA1), Peroxisomen (PMP70) und postsynaptischer Dichte (PSD93, PSD95, SAP102, AMPA-R) untersucht. Diese Proteine können bis auf Calnexin und den AMPA-Rezeptor ausschließlich in den unteren Fraktionen des Saccharosegradienten nachgewiesen werden und sind in immungereinigten Proben nicht präsent. Dies spricht für eine unspezifische Assoziation der identifizierten Proteine mit synaptischen Vesikeln. Der ionotrope AMPA-Rezeptor läßt sich in geringen Spuren in den oberen Fraktionen des Gradienten sowie in der immungereinigten Probe detektieren. Dies sieht sich durch Befunde von Fabian-Fine und Mitarbeitern bestätigt (Fabian-Fine *et al.*, 2000), in denen der AMPA-Rezeptor auf präsynaptischen Vesikeln lokalisiert ist und dort zur Modulation der Transmission verwendet werden könnte. Calnexin ist in gleichen

Konzentrationen in allen Fraktionen des Gradienten und in der Anreicherungsstudie nachweisbar und damit unspezifisch mit Vesikeln assoziiert. Untersuchungen astrozytärer Proteine umfassen Analysen von GFAP und GLAST. GFAP kann über den gesamten Saccharosegradienten detektiert werden, nimmt aber im Verlauf der Präparation an Konzentration ab. Daher ist auch dieses Protein unspezifisch mit Vesikeln assoziiert. GLAST ist in immungereinigten Proben nicht nachweisbar.

4.6.3.14.4.1 BIT

BIT (brain immunoglobulin-like molecule with tyrosine-based inhibitory motifs) ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie und kann als Zelladhäsionsmolekül agieren (Comu *et al.*, 1997). Es ist vermutlich in der Wachstumsfaktor-Signalgebung (Wang *et al.*, 2003) und in der neuronalen Antwort auf Kälteexposition im Hypothalamus involviert (Taniguchi *et al.*, 2004).

4.6.3.14.4.2 NADPH-Cytochrom P450 Oxidase

Cytochrom P450 ist die letzte Komponente der Elektronentransportkette im ER und wichtig für die Verstoffwechslung körperfremder Komponenten. Das System wandelt lipophile Substrate durch Insertion eines Sauerstoffatoms in wasserlöslichere Produkte um (Backes und Kelley, 2003).

4.6.3.14.4.3 GFAP

GFAP ist das Hauptintermediärfilament reifer Astrozyten (Eng *et al.*, 2000) und neuronaler Vorläuferzellen (Campbell und Götz, 2002). Die Funktion des Proteins ist immer noch nicht richtig verstanden.

4.6.3.14.4.4 Phospholipidhydroperoxid Glutathion Peroxidase

Die Phospholipidhydroperoxid Glutathion Peroxidase (PHGP) ist ein einzigartiges Selen-abhängiges, monomeres Enzym, das Phospholipide, Cholesterin und Cholesterinesterhydroperoxide reduziert und damit Zellen vor peroxidvermitteltem Schaden schützt (Ursini *et al.*, 1985; Thomas *et al.*, 1990). Sie interagiert hierbei mit zellulären Lipoproteinmembranen zur Verhinderung lipidperoxidvermittelten Schadens dieser Strukturen (Brigelius-Flohe *et al.*, 1994). Die reife PHGP ist v. a. in Mitochondrien, im Kern und im Zytoplasma präsent. Lipidperoxide sind involviert in einer Reihe von Krankheiten, wie Atherosklerose (O'Brien *et al.*, 1996) und neurodegenerativen Krankheiten (Martin *et al.*, 1996).

4.6.3.14.4.5 Proteasom

Die meisten Proteine in der Zelle werden durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) abgebaut. Das Zielprotein wird hierbei durch Ubiquitin markiert, durch das Proteasom erkannt und degradiert (Bingol und Schuman, 2005). Die Polyubiquitinkette kann durch deubiquitierende Enzyme moduliert und die Reaktion dadurch rückgängig machen. In Neuronen sind alle Komponenten des UPS in Dendriten und in der präsynaptischen Endigung vorhanden (Chapman *et al.*, 1994; Ehlers, 2003), und ubiquitinierte Proteine werden nicht zum Soma transportiert, sondern lokal abgebaut (Speese *et al.*, 2003). Eine Hemmung des Proteasoms verursacht eine dramatische Steigerung der synaptischen Transmission, die schnell und präsynaptisch ist. Die Ubiquitinierung ist demnach ein wichtiger Regulatormechanismus, der Struktur und Funktion der Synapse formt (DiAntonio und Hicke, 2004). Die Ubiquitin-abhängige Proteolyse agiert lokal und schnell, um die Neurotransmitterfreisetzung zu regulieren. Proteine, die durch das Proteasom moduliert werden, sind Syntaxin-1 und Synaptophysin (Chin *et al.*, 2002a; Wheeler *et al.*, 2002).

4.6.3.14.4.6 Ribosomen

Neben der Proteinsynthese im Soma findet auch im Axon und in den Synapsen Proteinbiosynthese statt. Im Axon ist mRNA für β -Aktin und β -Tubulin, Neurofilamente (Giuditta *et al.*, 1991) und Kinesin (Gioio *et al.*, 1994) vorhanden. Die synaptische Plastizität scheint zudem durch lokale Translationsprozesse unterstützt zu werden (Giuditta *et al.*, 2002).

4.6.3.14.4.7 SERCA2 und RS8-17

Die Regulation intrazellulären Calciums benötigt den aktiven Transport von Ca^{2+} über die Plasmamembran und intrazelluläre Membranen wie das sarkoplasmatische und endoplasmatische Retikulum (Carafoli, 1987). SERCA2 und RS8-17 sind sarkoplasmatisch und koppeln die ATP-Hydrolyse mit der Translokation von Ca^{2+} aus dem Zytosol in das Lumen des sarkoplasmatischen Retikulums. SERCA ist auch auf dem ER und Mikrosomen vorhanden (Sepulveda *et al.*, 2004).

4.6.3.14.4.8 Hämoglobin

Hämoglobin ist ein eisenhaltiges Protein in roten Blutzellen, das Sauerstoff bindet. Es besteht aus einem eisenhaltigen Häm und dem Protein Globin. In den Lungen bildet es mit Sauerstoff Oxyhämoglobin. In den Geweben des Körpers, in denen die Konzentration des Sauerstoffs gering und die des CO_2 hoch ist, tauscht Oxyhämoglobin den Sauerstoff durch CO_2 aus. Funktionell bindet und transportiert es Sauerstoff aus den Lungen in alle Gewebe des

Körpers. CO₂ wird über das Blut zurück zu den Lungen transportiert und bei Ausatmung entlassen. Das Protein besteht aus zwei alpha- und zwei beta-Ketten (Voet und Voet).

4.6.3.14.4.9 Protein der postsynaptischen Dichte (Citron)

PSD-Proteine könnten als Gerüst für Neurotransmitterrezeptoren, Ionenkanäle oder Signalmoleküle in der Postsynapse agieren (Ziff, 1997). Citron ist eine Hauptkomponente isolierter PSDs (Zhang *et al.*, 1999b). Zusammen mit NMDA-Rezeptoren, PSD-95, CaMKII α und einigen anderen Proteinen ist es Teil der Kern-PSD, die auch nach starker Detergenzextraktion zusammenbleibt (Peng *et al.*, 2004). Hierbei läßt es sich nur in bestimmten excitatorischen Synapsen im Vorderhirn detektieren (Furuyashiki *et al.*, 1999). Citron kann auch Rho binden und aktivieren (Madaule *et al.*, 1995). Neuere Evidenz zeigt, daß es für die korrekte Lokalisation des Golgi innerhalb neuronaler Zellkörper nötig ist (Camera *et al.*, 2003).

4.6.3.15 Putativ neue Proteine

4.6.3.15.1 Svap30 und SV35

Diese beiden Proteine waren Objekt eingehender Studien. Angaben über Domänenstruktur und putative Funktionen sind an anderer Stelle wiedergegeben.

4.6.3.15.2 WD repeat and FYVE domain containing 1 isoform 1

Dieses Protein enthält laut SMART-Algorithmus drei WD-40 Repeats, die die Aminosäuren 5 bis 43, 48 bis 87 und 91 bis 130 umspannen. WD-40 Repeats, auch bekannt als β -Transducin Repeats, sind kurze, etwa 40 Aminosäuren lange Motive, die oft in dem Dipeptid Tryptophan und Aspartat (WD) enden (van der Voorn und Ploegh, 1992). WD-haltige Proteine besitzen 4 bis 16 dieser Einheiten, die vermutlich alle eine zirkularisierte β -Propellerstruktur bilden. Die Proteine sind an einer Vielzahl von Funktionen wie Signaltransduktion und Regulation von Transkription, Zellzyklus und Apoptose beteiligt. Dies geschieht durch Koordination von Multiproteinkomplex-Assemblaten. Die Spezifität der Proteine wird durch die Sequenzen um die WD-Repeats sichergestellt. Zu diesen Proteinen zählen G-Proteine, der TAFII Transkriptionsfaktor und die E3 Ubiquitin-Ligase. Unterhalb der Signifikanzschwelle gibt SMART eine Reihe weiterer Domänen an. Die Ubiquitin-Domäne (Aminosäure 28 bis 101) wird für eine Vielzahl zellulärer Prozesse genutzt, abhängig von der subzelluläre Lokalisation, der Proteinart und der Art der kovalenten Bindung (Larsen und Wang, 2002). Die Myosin-Domäne (Aminosäure 48 bis 148) wird neben den klassischen Motorproteinen auch in

Proteinen ohne Motorfunktion gefunden. Diese Domäne bindet vermutlich an Mikrotubuli und könnte eine Verbindung zwischen dem Mikrotubuliskelett und aktinbasierenden Motoren schaffen. RING-Domänen (Aminosäure 64 bis 150) enthalten intrinsische E3 Ubiquitin-Ligaseaktivität. Diese Ligase bestimmt die Substratspezifität für die Ubiquitinierung. FYVE-Domänen (Aminosäuren 136 bis 167 und 139 bis 188) sind Zink-Bindedomänen, die vermutlich im endosomalen Targeting involviert sind. Neuere Daten zeigen, daß diese Domänen Phosphatidylinositol-3-Phosphat binden. Proteine mit dieser Domäne beinhalten u.a. EEA1. Gemäß Psi/Phi-BLAST werden nach sieben Iterationen Ähnlichkeiten mit β -Transducin, der Untereinheit β 2 des guanine nucleotide-binding proteins, und mit einer Serin/Threonin- und Tyrosin-Kinase gefunden.

4.6.3.15.3 Testis specific adriamycin sensitivity protein (Ähnlichkeiten mit LanC (bacterial lantibiotic synthetase component C)-like 2)

Die LANC-ähnliche Domäne umfaßt die Aminosäuren 81 und 444. Lanthionine sind Thioetherbrücken, die vermutlich durch Dehydratation von Serinen und Threoninen und Anfügung von Cysteinen entstehen. LANCL1 (P40 seven-transmembrane-domain protein) und LANCL2 (testis-specific adriamycin sensitivity protein) werden als peptidmodifizierende Enzyme vermutet. Sie werden in hohen Mengen in Gehirn und Testes exprimiert und könnten eine Rolle in der Immunüberwachung dieser Organe spielen (Mayer *et al.*, 2001).

4.6.3.15.4 Hypothetisches Protein LOC303183 (RIKEN cDNA 110031B06)

Nach sieben BLAST-Iterationen zeigen sich Ähnlichkeiten mit SVAP1, SNAP-25, SNAP-23 und weiteren SNAPS. Der SMART-Algorithmus gibt eine t-SNARE Domäne, die helicale Region in SNAREs, für die Aminosäuren 346 bis 418 wieder. Unterhalb der Signifikanzschwelle werden weitere Domänen identifiziert. Die Homologiedomäne des Gelsolin (Aminosäuren 278 bis 376) ist ein zytoplasmatisches, Ca^{2+} -reguliertes und aktinmodulierendes Protein ist, das an bärtige Enden von Aktinfilamenten bindet und diese blockiert. Es kann die Nukleation der Monomere in Filamente initiieren sowie bestehende Filamente auseinanderschneiden. Zudem bindet es mit hoher Affinität an Fibronectin, eine Komponente der extrazellulären Matrix. Spektrin Repeats (Aminosäure 296 bis 395) findet man in einer Vielzahl von Proteinen, die in der Zytoskelett-Architektur eine Rolle spielen. Dazu zählen Spektrin, α -Actinin und Dystrophin. Spektrin Repeats bilden Dreihelixbündel. Die Domäne des GoLoco (Aminosäure 119 bis 137) oder G-Protein regulatorischen (GPR)

Motivs wird in verschiedenen Regulatoren von G-Proteinen gefunden und wirkt als GDI für $G_{\alpha i}$.

4.6.3.15.5 Da1-10

Das bisher unbeschriebene Protein Da1-10 enthält bis auf die Coiled Coil-Domäne (Aminosäuren 361 bis 400) keine signifikanten Domänen. Unterhalb der Signifikanzschwelle könnte BPTI/Kunitz (Aminosäuren 234 bis 259) in Frage kommen, was zu einer Familie von Serinprotease-Inhibitoren gehört, Proteasen der S1-Familie hemmt und auf Metazoa beschränkt ist. Eine Domäne eines eukaryontischen Translationsinitiationsfaktors (Aminosäuren 85 bis 162) sowie eine konservierte Domäne aus dem Bowman-Birk Proteinase Inhibitor 8 (Aminosäure 322 bis 361) sind ebenfalls möglich.

4.6.3.15.6 Hypothetisches Protein (Ähnlichkeiten mit Ankyrin 2 Isoform 2)

Ankyrine verbinden das kortikale Aktin-Spektrin-basierende Membranzytoskelett mit der Plasmamembran und spielen essentielle Rollen in der Zellbewegung, Proliferation, Zell-Zell-Kontakten und der Aufrechterhaltung spezialisierter Membrandomänen. Ankyrin 2 ist das Hauptankyrin im Gehirn.

4.6.3.15.7 KIAA0587 (Vorhersage: NCK-associated protein 1 (Nap1))

Nck ist ein Adaptormolekül, dessen Bindepartner Nap1 mit Rac präzipitiert. Die Bindung wird vermutlich über zusätzliche Proteine vermittelt (Kitamura *et al.*, 1997). Nap1 ist in sporadischer Alzheimer herunterreguliert, und die Suppression der Nap1-Expression resultiert in Apoptose (Suzuki *et al.*, 2000).

4.6.3.15.8 Leucine zipper domain protein (LOC287061)

Nach Anwendung des SMART-Algorithmus konnten keine signifikanten Domänen zugeordnet werden. Unterhalb der Signifikanzschwelle kommen jedoch mehrere Domänen in Frage. Hierzu zählen die katalytische Domäne der Tyrosin Kinase (Aminosäuren 5 bis 188), die Polyphosphat Kinase 2-Domäne (Aminosäuren 5 bis 161) sowie eine DEATH-Domäne (Aminosäure 96 bis 184). Zusätzlich kommen die C-terminale Domäne der Glutathion S-Transferase (Aminosäuren 105 bis 207), die in der Detoxifizierung eine wichtige Rolle spielt, als auch eine BAR-Domäne (Aminosäuren 112 bis 277) in Frage, die in die Endozytose und verschiedene Schritte des intrazellulären Transportes verwickelt ist und eine Rolle bei der Bildung der Membrankurvatur spielt.

4.6.3.15.9 Nicht detektierte synaptische Vesikelproteine

Einige Proteine wie der vesikuläre Transporter für Acetylcholin (vAChT) oder für Monoamine (vMaT2) konnten nicht über Massenspektrometrie identifiziert werden. Dies läßt sich darauf zurückführen, daß diese im Vergleich zu anderen synaptischen Vesikelproteinen im Gesamtgehirn unterrepräsentiert sind. Die Anwesenheit des vesikulären Acetylcholintransporters konnte über Immunblot bestätigt werden. Es ist daher durchaus möglich, daß auch andere Proteine einer Detektion entgangen sind, insbesondere wenn diese wie die beiden erwähnten Transporter in geringer Abundanz und nur in Subpopulationen von Neuronen existent sind.

4.6.3.16 Vergleich mit anderen Arbeiten

In den letzten Jahren wurden einige Arbeiten über die proteinäre Zusammensetzung synaptischer Vesikel und CCVs publiziert. Coughenour und Mitarbeiter (Coughenour *et al.*, 2004) nutzten einen Glyceringradienten als letzten Schritt für die Aufreinigung synaptischer Vesikel und identifizierten über BAC/SDS- und IEF/SDS-PAGE insgesamt 36 Proteine, von denen annähernd alle auch in dieser Arbeit detektiert werden konnten. Dies trifft auch auf mögliche Kontaminationen wie die NADPH Cytochrom Reduktase zu. Nicht identifiziert wurden in dieser Arbeit AnnexinIII, das Ca^{2+} -abhängig Phospholipide bindet und Inhibitor der Phospholipase A2 ist (Kim *et al.*, 2001) und VDAC1, ein Ionenkanal in der äußeren Mitochondrienmembran (Hodge und Colombini, 1997) und in Caveolae von Plasmamembranen (Bathori *et al.*, 1999). Die Proteomanalyse von CCVs (Blondeau *et al.*, 2004) resultierte in der Identifizierung von 32 integralen synaptischen Vesikelproteinen. Dazu zählen VAMP-1 und -2, Synaptotagmin 1 und 2, Syntaxin 1A und B und SNAP-25, die auch in dieser Arbeit detektiert werden konnten. Auch die nachgewiesenen rab-Proteine stimmen mit den hier beschriebenen überein. Blondeau *et al.* identifizierten ferner 17 metabolische Enzyme, 12 davon Bestandteil der Glykolyse. Zu den 11 Zytoskelettproteinen zählen wie hier beschrieben Aktin und Tubulin. GTPasen beinhalten ras, das konstitutiv mit CCVs assoziiert ist (Howe *et al.*, 2001), und ein heterotrimeres G-Protein. Zu den nachgewiesenen 18 Plasmamembranproteinen zählen die Na,K-ATPase, die in CCVs angereichert ist und hierüber möglicherweise die Zelloberflächenexpression reguliert (Chibalin *et al.*, 1998), sowie die Na^+ -abhängigen Transporter EAAT1, EAAT2, EAAT4, GAT-1, GAT-3. Diese Transporter fehlen in dieser Arbeit, was die Reinheit der Vesikelfraktion gegenüber den CCVs belegt und darlegt, daß CCVs in der hier verwendeten Präparation nur in geringer Konzentration vorhanden sind. Blondeau *et al.* wiesen ferner 23 Proteine zur

Phosphorylierung und Ca^{2+} -Interaktion nach. Hierzu zählen u. a. Calcineurin A, Calcineurin B-like, Peptidylprolyl-Isomerase, VILIP-1 und VILIP-3. Die Isomerase sowie die beiden VILIP-Proteine konnten auch in dieser Arbeit detektiert werden. Ebenso wie hier beschrieben, waren die Vesikel nach Immunanalyse frei von Kontaminationen durch Mitochondrien, Nuklei, Golgi und ER. Detektiert wurden aber Myelin sowie 25 ribosomale und RNA-Bindeproteine, die vermutlich Teil von RNA-Granula sind. Blondeau *et al.* beschreiben diese als Teil von RNA-Granula, die aus Zufall in Dichte und Größe mit CCVs kofraktionieren. Proteine, die in dieser Analyse, nicht aber auf CCVs gefunden wurden, beinhalten Syntaxin 7, Synaptotagmin V und XII, ZnT-3, Reticulon 4, der Prolintransporter, Vat1, GP106, die Synapsine, Rabphilin3A, Rabconnectin 3, die Septine, Synaptojanin, Amphiphysin, die AP2-assoziierte Kinase, Neurofilamente, ARP2/3, Spektrin, α -Internexin, Myosin-Va, Capping Proteine, EF1, STOP, MAL2A, Atlastin, GAP1-like, RAP, Ral, einige Stoffwechsel-Enzyme sowie die identifizierten neuen Proteine. Da einige dieser Proteine wie Synaptojanin oder Amphiphysin bewiesenermaßen auf CCVs lokalisieren, diese aber nicht durch Blondeau *et al.* nachgewiesen werden konnten, demonstriert dies die Nützlichkeit des in dieser Arbeit verwendeten Ansatzes über verschiedene Elektrophoresetechniken, die zu einer genaueren Charakterisierung von Organellen verwendet werden sollten.

4.6.3.17 Evaluation der gereinigten Organellen

Aufgrund der durchgeführten Immunanalysen des Saccharosegradienten sowie der Anreicherungsstudien während der Präparation kann darauf geschlossen werden, daß es sich bei den aufgereinigten Organellen um synaptische Vesikel des Reservepools handelt. Obwohl Proteine wie Clathrin, die Adaptoren und Dynamin per Massenspektrometrie identifiziert wurden, konnte über die Immunanalysen dargelegt werden, daß Clathrin in den oberen Fraktionen des Gradienten nicht vorhanden ist und zudem während der Präparation an Konzentration abnimmt. Die identifizierten Proteine der CCVs sind daher auf Proteinspuren in der Vesikelpräparation zurückzuführen. Die Anwesenheit endosomaler Organellen ist durch die Identifizierung von Syntaxin 7 und 12 und diverser rab-Proteine bestätigt. Allerdings fehlen an dieser Stelle andere wichtige Endosomenmarker wie VAMP-3 (Link *et al.*, 1993) oder EEA1. Letzteres ist gemäß der Immunanalysen lediglich in den unteren Fraktionen detektierbar. Andere Vesikel, die von ER und Golgi abstammen, sind ebenso auszuschließen wie Peroxisomen, Nuklei und Mitochondrien. Für all diese Organellen und die Plasmamembran durchgeführte Immunanalysen resultieren in einer Abnahme der

Konzentration und sind damit auf unspezifische Interaktion oder auf Nachweise von Proteinspuren durch die sehr sensitive Massenspektrometrie zurückzuführen.

4.7 Stimulation synaptischer Vesikel und Analyse über DIGE

4.7.1 Analyse der Qualität der Stimulation

Die Effizienz und Qualität der Stimulation läßt sich durch Überprüfung der Verteilung des endosomalen Proteins EEA1 demonstrieren. Das integrale Membranprotein ist unter Ruhe ab Fraktion 13 detektierbar, während es nach Stimulation erst ab Fraktion 17 nachzuweisen ist. Dies legt dar, daß sich endosomale Kompartimente zu größeren Dichten verschieben, demnach also an Größe zunehmen. Die Zunahme endosomaler Größe hängt direkt mit der Exozytoserate synaptischer Vesikel zusammen. Bei massiver Vesikelfreisetzung kann die endosomale Sortierstation die normale Endosomengröße durch Abschnürung und Bereitstellung neuer synaptischer Vesikel nicht aufrechterhalten (Leenders *et al.*, 2002), so daß die Endosomen an Größe zunehmen. Dies belegt, daß die gewählten Stimulationsbedingungen für die Exozytose synaptischer Vesikel ausreichend sind und das System für eine qualitative, funktionelle Analyse verwendet werden kann.

4.7.2 Detektierte Abundanzänderungen

Nach Anwendung des DIGE-Systems ergeben sich für acht Proteine Abundanzänderungen, die sich zwischen 1,96 und -1,53 bewegen. Die SNARE-Proteine SNAP-25 und VAMP-2 ändern hierbei mit Faktor 1,38 und 1,3 in gleichem Maße ihre Abundanz. Interessanterweise resultiert auch das RIKEN-Protein mit Faktor 1,36 in einer identischen Abundanzänderung und könnte daher mit den SNAREs zusammenhängen. Auch Synaptophysin zeigt mit Faktor 1,21 eine ähnliche Änderung. Rab3A weist eine Abundanzerrhöhung um 1,38, rab2B eine entsprechende Abundanzerniedrigung auf. Das Motorprotein Dynein zeigt nach Stimulation eine nahezu doppelte Abundanz, während sich die d-Untereinheit des V_0 -Teils der vATPase um Faktor -1,25 ändert. Abundanzänderungen können durch posttranslationale Modifizierungen wie Phosphorylierung zustandekommen. Daher wurden die betroffenen Proteine hinsichtlich ihres Phosphorylierungsstatus untersucht. Es wurde zudem sichergestellt, daß die verwendeten Phosphoantikörper spezifisch die jeweiligen phosphorylierten Aminosäuren erkennen. Verdau der Proteine mit Lambda Protein Phosphatase resultierte bis auf ein nicht näher identifizierbares Signal im kompletten Verlust des Immunsignals.

Anhand der Phosphostudien wird deutlich, daß einige der identifizierten Proteine stimulationsabhängige Phosphorylierungen durchlaufen. Die Phosphorylierung ist ein Mittel zur Modulation der Proteinfunktion und -stabilität und dient der Vermittlung phosphorylierungsabhängiger Protein-Protein-Interaktionen. Viele Proteine, die in der Membranfusion involviert sind, sind Phosphoproteine (Gerst, 2003), und der Phosphorylierungsstatus von Proteinen in Prä- und Postsynapse beeinflusst die synaptische Struktur, Organisation und Funktion. Die Phosphorylierung durch Kinasen und die Dephosphorylierung durch diverse Phosphatasen kontrolliert nahezu jeden Aspekt der synaptischen Funktion, wie die Neurotransmitterfreisetzung, Endozytose, Aktivität von Rezeptoren und Ionenkanälen sowie die lokale Proteinsynthese. Auf die nachgewiesenen Phosphorylierungen der identifizierten Proteine sowie andere Hypothesen zur Abundanzänderung wird im Folgenden detailliert eingegangen.

4.7.2.1 SNAP-25

SNAP-25 wird durch Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration über PKA an Thr¹³⁸ und über PKC an Ser¹⁸⁷ phosphoryliert. Die Threoninphosphorylierung hat keinen Effekt auf den Zusammenbau des SNARE-Komplexes oder die Bindung von Synaptotagmin, während die Serinphosphorylierung in einer reduzierten Bindung von Synaptotagmin und einer geänderten subzellulären Lokalisation resultiert (Shimazaki *et al.*, 1996; Risinger und Bennett, 1999). Thr¹³⁸ ist zudem nötig für den geprimten Zustand des RRP (Nagy *et al.*, 2004), Ser¹⁸⁷ beeinflusst die anhaltende Phase der Sekretion durch Erhöhung der Vesikelrekrutierung, nachdem der RRP exozytiert ist (Nagy *et al.*, 2002). Zusätzlich führt die Inkubation mit hohen Kaliumkonzentrationen zu einem Anstieg der Genexpression für SNAP-25, präferentiell SNAP-25a. Reguliert wird dies über Phosphorylierung durch CaMK, PKA und/oder PKC (Montiel *et al.*, 2003). Die nachgewiesene Abundanzänderung von 1,38 könnte durch Phosphorylierung zustande kommen. Die Phosphostudien liefern diesbezüglich aufgrund der Kolo-kalisation mit der leichten Immunglobulinkette keine aussagekräftigen Ergebnisse. Eine Abundanzerhöhung durch Anstieg der Genexpression ist aufgrund der zu kurzen Zeitdauer auszuschließen.

4.7.2.2 VAMP-2 und Synaptophysin

VAMP-2 besitzt zwei potentielle Phosphorylierungsstellen, Ser³⁵ und Thr⁶¹ (Nielander *et al.*, 1995). Da die Bindung von Synaptophysin an VAMP-2 dessen Verfügbarkeit regulieren

und/oder den monomeren, thermodynamisch instabilen Zustand stabilisieren kann (Thiele *et al.*, 2000) und die Phosphorylierung von VAMP-2 nicht die Bindung an Syntaxin oder SNAP-25 beeinflusst (Nieler *et al.*, 1995), könnte die Phosphorylierung die Bindung des VAMP-2 an Synaptophysin modulieren und das Protein für die Bildung des SNARE-Komplexes nach Stimulation entlassen. Die nachgewiesene Serinphosphorylierung geht konform mit diesen Aussagen.

Synaptophysin ist das Hauptphosphoprotein synaptischer Vesikel (Pang *et al.*, 1988) und kann potentiell an Serin, Threonin und Tyrosin phosphoryliert werden. Als Kinasen kommen c-src (Pang *et al.*, 1988; Onofri *et al.*, 1997) und CaMKII in Frage (Pang *et al.*, 1988; Rubenstein *et al.*, 1993). Die Phosphorylierungsstellen sind aufgrund des Fehlens von Trypsinspaltstellen im C-Terminus jedoch immer noch nicht identifiziert. Unter Ruhe ist Synaptophysin tyrosinphosphoryliert (Jena *et al.*, 1997; Mullany und Lynch, 1998) und wird vermutlich nicht durch Depolarisation phosphoryliert (Rubenstein *et al.*, 1993). Dies stimmt mit fehlenden Evidenzen der direkten Rolle einer Tyrosinphosphorylierung in der Neurotransmitterfreisetzung überein (Gurd, 1997). Allerdings wirkt die Tyrosinphosphorylierung in der LTP und besitzt damit einen Effekt auf die synaptische Stärke (Kalia *et al.*, 2004). Die nachgewiesene Tyrosinphosphorylierung könnte durch die harschen Stimulationsbedingungen entstehen, die einer LTP nahekommen. Zusätzlich ist die Interaktion zwischen Dynamin und Synaptophysin abhängig von der Tyrosinphosphorylierung, wird aber nur durch Ca^{2+} -Konzentrationen im μM Bereich stimuliert (Daly und Ziff, 2002; Evans und Cousin, 2005). Die Zunahme der Serinphosphorylierung nach Stimulation durch Ca^{2+} /Calmodulin ist bereits beschrieben, stimmt jedoch im Ausmaß um Faktor 1,9 nicht mit der Literatur überein. So resultiert Ca^{2+} /Calmodulin in einer vierfachen Zunahme der CaMKII-induzierten Serinphosphorylierung (Rubenstein *et al.*, 1993).

4.7.2.3 VAMP-2, Synaptophysin und vATPase V_0 d

Die Untereinheiten V_0 a und d sind eher für Zusammenbau, Targeting und Regulation der vATPase als für ihre katalytische oder protonenpumpende Aktivität wichtig (Carrión-Vázquez *et al.*, 1998). So spielt die d-Untereinheit eine wichtige Rolle im Zusammenbau von V_0 und des V_0V_1 -Komplexes (Bauerle *et al.*, 1993; Myers und Forgac, 1993). VAMP-2 liegt in Assoziation mit Synaptophysin und dem V_0 -Teil der vATPase vor, der den V_1 -Teil sowie SNAP-25 und Syntaxin-1 ausschließt (Galli *et al.*, 1996). Die direkte Bindung von VAMP-2

an Synaptophysin könnte daher zwei Funktionen beinhalten: die bereits beschriebene Regulation der Bildung des SNARE-Komplexes und die Regulation der Fusionspore (Calakos und Scheller, 1994; Edelman *et al.*, 1995; Washbourne *et al.*, 1995) über die Bindung des Synaptophysin an $V_0 d$ (Thomas und Betz, 1990). Die Regulation der vATPase durch Dissoziation ist beschrieben (Sumner *et al.*, 1995). $V_0 d$ ist ein vielversprechender Kandidat für die Vermittlung dieser Reaktion, da es die umgekehrte Reaktion seiner postulierten Funktion der vATPase-Biogenese darstellt (Myers und Forgac, 1993). Die Phosphorylierung/Dephosphorylierung und/oder Sulphatisierung könnten Induktoren sein, da $V_0 d$ zwölf Phosphorylierungsstellen für Casein Kinase II, eine für Tyrosin-Kinase und eine Tyrosin-Sulphatisierungsstelle besitzt. Der Komplex zwischen VAMP-2, Synaptophysin und V_0 könnte zur Inaktivierung der vATPase vor der Exozytose dienen. Synaptophysin und die vATPase lägen vorgeformt auf der Vesikelmembran vor und die Bindung des VAMP-2 würde in einer Konformationsänderung der d-Untereinheit resultieren, was zum Ablösen des V_1 -Sektors und damit zur Inaktivierung der Pumpe führt (Carrión-Vázquez *et al.*, 1998).

4.7.2.4 Rab-Proteine und Dynein

Die direkte Phosphorylierung von rab-Proteinen kann deren Aktivität und/oder zelluläre Lokalisation regulieren sowie die Interaktion mit Effektoren beeinflussen (Ding *et al.*, 2003). Rab3B, rab6 und rab8 werden nach Thrombinstimulation von Blutplättchen phosphoryliert (Karniguian *et al.*, 1993), und rab8 kann in seiner aktiven Form mit der streßaktivierten GC-Kinase reagieren (Ren *et al.*, 1996). Nach Phosphorylierung ändern rab1 und 4 ihre subzelluläre Verteilung und werden hauptsächlich zytosolisch detektiert (Bailly *et al.*, 1991; Cormont *et al.*, 1994). Auch die drei rab5-Isoformen können durch verschiedene Kinasen phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung könnte generell für die Feinregulation der rab-Wirkung verantwortlich sein (Chiariello *et al.*, 1999), so auch für die Wirkung von rab3A. So könnte die Serin- und Threoninphosphorylierung rab3A in dessen Rolle als Superprimer unterstützen oder die Funktion im aktivitätsabhängigen Transport synaptischer Vesikel an die aktive Zone fördern. Studien mit rab-Mutanten lassen den Schluß zu, daß die GTP-Hydrolyse nicht an den Transport gekoppelt ist, sondern daß GTP-gebundene rabs als Beschleuniger der Verkehrrate arbeiten (Tuvim *et al.*, 2001). Dies könnte auch für rab2 gelten. Rab2 führt zur Rekrutierung von Komponenten, die die Membranabschnürung und Interaktion mit dem Zytoskelett erleichtern, was in der Freisetzung und dem Transport retrograd gerichteter Vesikel im Komplex mit GAPDH und Mikrotubuli resultiert. Detektiertes Dynein könnte hier

ebenso eine Rolle spielen. Die Abundanzzunahme könnte in einer erhöhten Rekrutierung an synaptische Vesikel erklärt werden.

4.7.2.5 Svap30

Interessanterweise zeigt auch eines der neuen Proteine, die in dieser Arbeit näher charakterisiert wurden, eine Abundanzänderung. Da das Protein physiologisch nachweislich zytosolisch und membranassoziiert vorkommt, könnte es während der Stimulation an Vesikel binden, was die Abundanzhöhung erklärt. Ferner könnte es wie die rab-Proteine phosphoryliert und dadurch in seiner Funktion moduliert werden. Dies geht konform mit vorhergesagten Phosphorylierungsstellen für Protein Kinase C und Casein Kinase II. Inwieweit die nachgewiesene Lokalisation in Gliazellen eine Rolle im Vesikelzyklus spielt, bleibt zu klären. Dem Protein wurde der Name Svap30 (synaptic vesicle-associated protein of 30 kDa) gegeben.

4.7.2.6 Weitere Proteine

Bei den Proteinen VII und VIII, deren Phosphorylierungsstatus sich nach Stimulation ändert, handelt es sich nach Vergleich mit den MS-Identifikationen vermutlich um Aktin (VII) und GAPDH (VIII). Die Zunahme der Serinphosphorylierung von Aktin nach Stimulation kann dessen Polymerisationsverhalten beeinflussen (Papakonstanti und Stournaras, 2002) und könnte dadurch Einfluß auf die Verfügbarkeit synaptischer Vesikel für die Fusion nehmen. GAPDH wird nach Stimulation tyrosinphosphoryliert. Die phosphorylierte GAPDH ist nötig für die Bindung der Mikrotubuli an rab2-haltige VTCs. Dies stellt den retrograden Transport sicher. GAPDH ist Substrat der PKC λ (Tisdale, 2002). Daß diese Proteine nicht über das DIGE-System identifiziert wurden, könnte an der Höhe der Abundanzänderung liegen, die für eine signifikante Erkennung über die DeCyder-Software zu gering ist.

4.7.3 Zusammenfassung

Eine zusammenfassende Darstellung der Proteine, die nach Stimulation ihre Abundanz ändern, ist mit zugehörigen funktionellen Angaben bzw. vermuteten Funktionen in Abbildung 157 wiedergegeben.

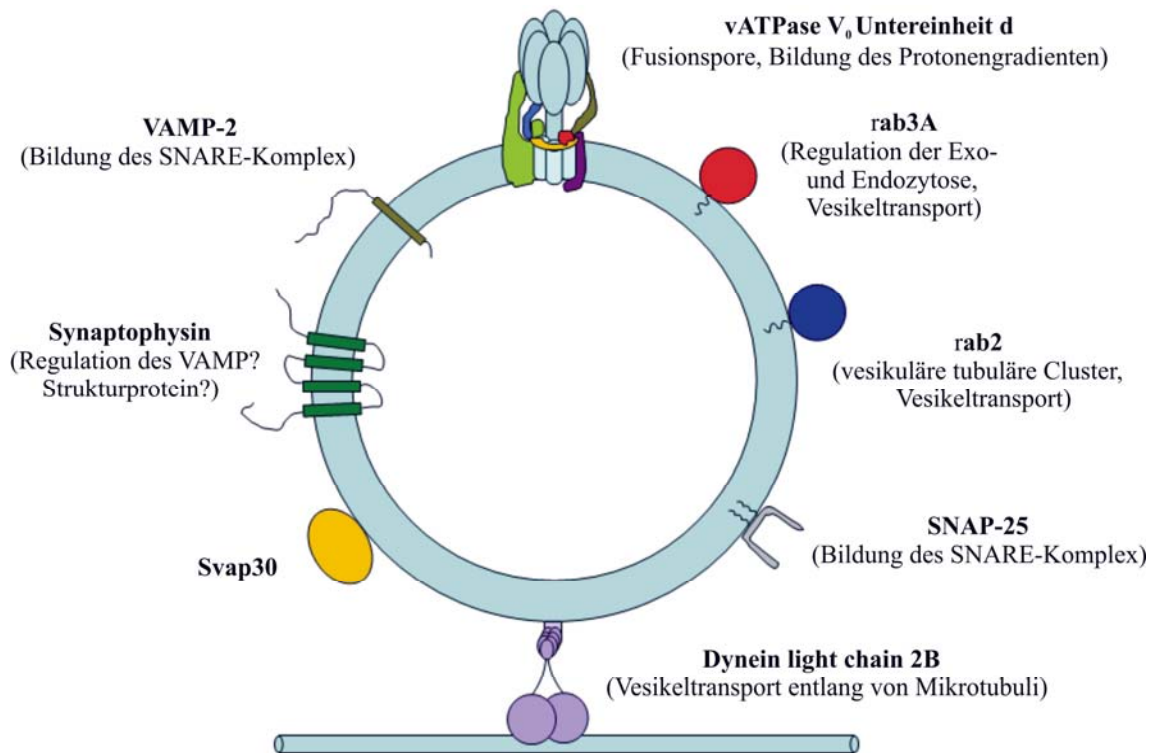


Abb. 157. Schema der putativen Funktionen der über DIGE identifizierten Proteine.

4.7.4 Evaluation des DIGE-Systems

Das DIGE-System hat sich in Kombination mit BAC/SDS-PAGE für die Identifikation von Abundanzänderungen nach Stimulation als geeignet erwiesen. Möglicherweise wäre es sinnvoll gewesen, das Markieren der Proteine vor oder nach der Immunreinigung durchzuführen, da die Magnetbeads einen schützenden Einfluß auf die gebundenen Vesikel zu haben scheinen. Wie bereits beschrieben wurde, konnten durch Einsatz von Natriumcarbonat oder Tris keine peripher assoziierten Proteine von der Vesikelmembran abgelöst werden. Dennoch erwies sich das Muster der mit CyDyes gelabelten Proteine als identisch mit dem coomassiegefärbter Gele, so daß der Ausschluß der Magnetbeads während der Markierung vermutlich nur einen Einfluß auf die Menge des gebundenen Farbstoffes gehabt hätte.

Zusätzliche Evidenz für die Abundanzänderung nach Stimulation könnte über den Einsatz von ICAT und/oder iTRAQ erreicht werden. ICAT verläuft über die cysteinspezifische Markierung von Proteinen mit den Isotopen ^{13}C und ^{12}C und erlaubt damit Multiplexing und relative Quantifizierung zweier Proben. Die Proteine können anschließend per Gel oder Flüssigkeitschromatographie analysiert werden. iTRAQ basiert auf der Markierung von Peptiden mit isobaren Farbstoffen und erlaubt Multiplexing bis zu vier verschiedener Proben in einer Analyse. Vorteil des Systems gegenüber DIGE und ICAT ist das Labeln von Peptiden

nach tryptischem Verdau in Lösung, was eine relative oder absolute Quantifizierung erlaubt und keine Trennung per Gelelektrophorese mit möglichen anschließenden Problemen bei der Peptidelution benötigt. Zusätzlich gehen keine posttranslationalen Modifizierungen verloren, da alle Peptide markiert werden. Für die Feststellung der jeweils phosphorylierten Aminosäure können Phosphopeptide aus komplexen Proteinmischungen über Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) (Andersson und Porath, 1986) isoliert und danach über Massenspektrometrie identifiziert werden (Ficarro *et al.*, 2002). Trotz der möglichen Probleme durch multiple Phosphorylierungen in einem Peptid, Heterogenität der Phosphorylierung eines Proteins und der zur Zeit schlechten Fragmentierung der Phosphopeptide (Collins *et al.*, 2005) könnte dieser Ansatz Aufschluß über den genauen Phosphorylierungsstatus der identifizierten Proteine geben.

4.8 Charakterisierung ausgewählter neuer Vesikelproteine

4.8.1 Svap30

Die Analyse von Svap30 zeigt nach Expression in CHO- und PC12-Zellen ein punktuell Muster, das in PC12-Zellen neben der somatischen Lokalisation bis in die Neuriten reicht und in den Wachstumszonen eine hohe Präsenz zeigt. Membranfraktionen legen dar, daß das Protein sowohl zytosolisch als auch membranassoziiert vorliegt, was durch die immunzytochemischen Daten und Stickstoffbehandlung transfizierter CHO-Zellen zusätzlich belegt werden kann. Das Protein läßt sich durch hohe pH-Werte von der Membran extrahieren, was auf eine elektrostatische Interaktion hinweist. Über das Wanderungsverhalten im Saccharosegradienten und damit auch über einen Profilvergleich mit anderen analysierten Proteinen kann aufgrund der beschriebenen Problematik nicht viel ausgesagt werden. Hinweise auf eine bimodale Verteilung, wie sie für integrale synaptische Vesikelproteine beschrieben wurden, liegen jedoch nicht vor. Dennoch zeigt das Protein während des Präparationsverlaufes eine Anreicherung und scheint daher spezifisch mit synaptischen Vesikeln assoziiert vorzuliegen. Die Analyse der Gewebeexpression mittels RT-PCR legt nahe, daß das korrespondierende Gen ubiquitär exprimiert wird und in seinen Expressionleveln nur leichten Schwankungen in den untersuchten Geweben unterliegt. Immunhistologische Untersuchungen bestätigen die Präsenz in allen Gehirnarealen, der Milz, Niere, Lunge und dem Thymus. In anderen Geweben kann kein sicherer immunhistologischer Nachweis geführt werden. Eine Aufreinigung der Präimmunsereen über die antigenen Peptide wäre in diesem Fall sinnvoll, um einen spezifischen Immunnachweis führen zu können.

Die immunhistologische Markierung ähnelt in allen Gehirnarealen stark der von astroglialen Proteinen, was die Kolokalisationsstudien mit GFAP bestätigen. Die Überlappung mit GFAP in den glialen Ausläufern läßt eine Assoziation des Proteins mit GFAP und/oder glialen Intermediärfilamenten vermuten. Bisher wurden jedoch keine Proteine identifiziert, die solch ein Verhalten aufzeigen. Zudem geht die errechnete molekulare Masse nicht konform mit anderen Neurofilamenten, und Svp30 weist keine für diese Proteinfamilie charakteristische Domänenstruktur oder andere Ähnlichkeiten auf. Das Verteilungsmuster von Svp30 ist dennoch nicht absolut mit GFAP vergleichbar, da es auch in großen Neuronen detektiert werden kann, in denen es mit VAMP-2 kolokalisiert.

SNARE-Proteine existieren neben der hochabundanten Lokalisation in Neuronen auch in Gliazellen (Madison *et al.*, 1999), die wie Neurone eine Ca^{2+} -Erregbarkeit zeigen (Peters *et al.*, 2003) und vermutlich neben der strukturellen Unterstützung und Ernährung von Neuronen eine regulierende Funktion in synaptischer Stärke und Plastizität besitzen (Stigliani *et al.*, 2006). Dies könnte die Anwesenheit von Svp30 in Gliazellen erklären. Dennoch ist eine Aufreinigung SV2-haltiger Organellen aus diesem Zelltyp auszuschließen, da SV2 nicht in akut isolierten Astrozyten vorhanden ist (Wilhelm *et al.*, 2004) und keine Überlappung von SV2 und Svp30 nachgewiesen werden konnte. Da das Protein jedoch nach Immunreinigung synaptischer Vesikel über SV2 identifiziert wurde, ist dessen fehlende Kolokalisation mit SV2 nicht erklärbar. Wie für alle anderen identifizierten Proteine, die nicht in Neuronen oder an synaptischen Vesikeln lokalisiert sind, könnte das Protein unspezifisch an die Vesikel gebunden haben. Dies erklärt jedoch weder die Konzentrationszunahme des Proteins während der Präparation noch die Abundanzänderung des Proteins nach Stimulation von Neuronen sowie die endogene Präsenz in PC12-Zellen. Möglicherweise erkennt der Peptidantikörper nicht nur Svp30, sondern resultiert in einer unspezifischen Interaktion mit GFAP. Dies könnte über Transfektion von CHO-Zellen mit einem GFAP-haltigen Vektor und anschließender Immunzytochemie über Applikation des Svp30-Antikörpers überprüft werden. Da jedoch das Präimmenserum in der Immunzytochemie identische Markierungen wie der Peptidantikörper ergibt, sind diese Studien als nicht signifikant zu werten. Auch hier wäre eine Aufreinigung des Peptidantikörpers und des korrespondierenden Präimmenserums von Vorteil. Vergleicht man die Sequenz des gewählten Epitops mit der GFAP-Sequenz, so stellen sich keine signifikanten Ähnlichkeiten dar - die größtmögliche Ähnlichkeit im Bereich der GFAP-Sequenz ist in Abbildung 158 dargelegt.

```

GFAP           ALRE--IRTQYEAV
RIKEN         NKREGFGVRIQWDKQ
                **  :*  *::

```

Abb. 158. Darstellung der größten Sequenzhomologie für das Epitop des Svap30-Antikörpers und die Proteinsequenz von GFAP.

Dies läßt eine unspezifische Markierung von GFAP mit dem Svap30-Antikörper ausschließen. Weiter bestätigt werden kann dieser Befund durch Western Blots, die bei Applikation des Svap30-Antikörpers in einer einzigen Bande bei ~30 kDa resultieren. Das für GFAP typische Immunsignal bei 42 kDa konnte nicht detektiert werden. Eine unspezifische Antikörpermarkierung des nativen Proteins ist jedoch weiterhin nicht ausgeschlossen.

4.8.2 SV35

Das integrale Membranprotein SV35 zeigt ebenso wie Svap30 eine punktuelle Verteilung und ist in den Wachstumskegeln der PC12-Zellen angereichert. Laut Membranfraktion ist das Protein erwartungsgemäß ausschließlich membranär lokalisiert und ist mit einer Reihe integraler synaptischer Vesikelproteine kolokalisiert. Im Saccharosegradienten zeigt es eine den integralen Vesikelproteinen entsprechende Verteilung und reichert sich während der Präparation an. All dies läßt auf eine spezifische Assoziation mit synaptischen Vesikeln schließen. Sämtliche Immunanalysen geben das Protein als Doppelbande oder -spot wieder, so daß es vermutlich in zwei Spleißvarianten oder zusätzlich als anderweitig posttranslational modifizierte Population vorliegt. Das Protein ist endogen in PC12-Zellen vorhanden.

Erste Resultate nach einem Knockout eines SV35-verwandten Proteins in *C. elegans* induzieren einen unkoordinierten Phänotyp, der aus einer reduzierten Neurotransmitterfreisetzung resultiert (Kollaboration mit Dr. Alexander Gottschalk). Immunhistochemische Untersuchungen umfassen Studien zur Kolokalisation mit den integralen synaptischen Vesikelproteinen VAMP-2 und SV2 sowie mit diversen Neurotransmittertransportern. VAMP-2 und SV2 als integrale Vesikelproteine zeigen in allen untersuchten Gehirnbereichen partielle Überlappungen mit SV35. Dies läßt den Schluß zu, daß es sich bei SV35 um ein Vesikelprotein handelt, das aufgrund der eingeschränkten Kolokalisation mit den untersuchten synaptischen Vesikelproteinen in Subpopulationen von Neuronen exprimiert wird. Deren Typ wurde durch Kolokalisationsanalysen mit vGat, vGlut1 und der Tyrosinhydroxylase untersucht. Die immunhistochemischen Analysen lassen den Schluß zu, daß SV35 nicht in dopaminergen, noradrenergen oder adrenergen Neuronen vorhanden ist, da für die Tyrosin Hydroxylase keine Überlappungen nachgewiesen werden

konnten. Aufgrund der nicht aussagekräftigen Resultate der Immunanalysen der vesikulären Transporter für Acetylcholin und für Monoamine lassen sich keine Aussagen über die Kolokalisation in cholinergen und serotonergen Neuronen treffen. Um zudem Kolokalisationen mit Monoaminen vollständig auszuschließen, wäre eine Untersuchung histaminergener Neuronen sinnvoll, gegen die zum Zeitpunkt der Studie jedoch keine Antikörper verfügbar waren. Für glutamaterge und GABA/glycinerge Neuronensubtypen wurden hingegen positive, aber auch negative Resultate erzielt. Kolokalisationen wurden für beide Proteine in der Habenula nachgewiesen. Andere Bereiche wie der geniculate Kern zeigen ausschließlich für vGat eine Kolokalisation. Im piriformen Cortex ergibt sich für vGlut1 eine Kolokalisation, während vGat dort eine geringe bis keine Überlappung zeigt. In den olfaktorischen Tuberkeln hingegen ergibt sich eine Kolokalisation für vGat, während vGlut1 den Bereich völlig ausspart. Im Bulbus olfactorius ist in der äußeren plexiformen Schicht für vGlut1 eine Kolokalisation feststellbar, während sich für vGat eine mäßige bis keine Überlappung ergibt. Dagegen zeigen die Analysen der Glomeruli Überlappungen für beide Transporter. Im Cerebellum lassen sich beide Transporter zusammen mit SV35 in der Molekularschicht nachweisen. Auch in der Körnerzellschicht sowie im Hirnstamm sind für beide Proteine Überlappungen mit SV35 nachweisbar. Andere untersuchte Bereiche wie der Cortex und die Fasertrakte in der Molekularschicht des Cerebellums sind ausschließlich SV35-haltig. Keiner der untersuchten Neuronenmarker ergab an dieser Stelle eine Überlappung. Der Nachweis von VAMP-2 und SV2 zusammen mit SV35 in diesem Bereich läßt daher den Schluß zu, daß es sich bei den markierten Zellen um Neuronen handelt, deren Typ jedoch noch bestimmt werden muß. Zusammenfassend läßt sich SV35 weder glutamatergen noch GABA/glycinergen Neuronen eindeutig zuordnen. Das Protein scheint vielmehr in beiden Populationen partiell präsent zu sein und zusätzlich in Neuronen vorzuliegen, die durch keine der verwendeten Marker markiert wurden. Glycinerge Neuronen sind vermutlich auszuschließen, da man Glycinrezeptoren fast ausschließlich im ventralen Rückenmark findet.

Möglicherweise besitzt SV35 neuromodulatorische Funktion, da es nur in Subpopulationen von Neuronen vorhanden ist. Das Vorkommen in excitatorischen und auch inhibitorischen Neuronenpopulationen steht hierbei nicht im Widerspruch zu Befunden anderer Gruppen. So wurde gezeigt, daß Synapsen gleichzeitig Dopamin und Glutamat (Sulzer und Rayport, 2000), Acetylcholin und GABA (O'Malley *et al.*, 1992) oder GABA und Glycin (Knopp *et al.*, 1999) freisetzen können. Selbst die im Gehirn am häufigsten vorkommenden und antagonist

wirkenden Transmitter Glutamat und GABA können durch die gleiche Zelle freigesetzt werden, z.B. durch hippocampale Moosfasern (Sandler und Smith, 1991; Walker *et al.*, 2001; Bergersen *et al.*, 2003), bipolare Zellen der Katzenretina (Kao *et al.*, 2004) und vermutlich bipolare Salamanderzellen (Yang *et al.*, 2003). Zu überprüfen bleiben die Bereiche, die nach Immunmarkierung über alkalische Phosphatase eine schwache SV35-Präsenz aufweisen.

4.9 Ausblick

Obwohl in den letzten Jahrzehnten signifikante Fortschritte auf dem Gebiet synaptischer Vesikel erzielt wurden, ist für ein mechanistisches Verständnis des Vesikelzyklus weitere Forschung unabdingbar. Die Lücke zwischen physiologischer Beschreibung und molekularem Verständnis des Vesikelzyklus ist immens. Die meisten Proteine agieren in Netzwerken, die schwierig zu definieren und zu validieren sind, und viele Proteine partizipieren in mehr als einer Funktion. Zusätzlich legen bisherige Befunde dar, daß es eine unerwartete Variabilität in der Art der Kopplung von Exo- und Endozytose gibt und daß mehrere Wege für die Organisation und Regulation der beiden Mechanismen existieren. Die Aufschlüsselung dieser Netzwerke und deren überlappenden Funktionen muß daher im Fokus zukünftiger Forschung liegen. Die hier dargestellten Proteinnachweise ebnet den Weg für die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung einiger neuer Proteinbestandteile synaptischer Vesikel.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde das Proteom synaptischer Vesikel mit Hilfe vier verschiedener elektrophoretischer Techniken in Kombination mit Massenspektrometrie eingehend charakterisiert. Die bisherigen Proteomansätze resultierten in der Identifizierung einer deutlich geringeren Anzahl von Proteinen. Bis auf wenige Ausnahmen wurden alle in der Literatur beschriebenen Proteine detektiert. Dies zeigt, daß die Verwendung der eingesetzten Techniken die umfassende Charakterisierung der Proteinbestandteile der Vesikel zuläßt. Ferner kann aus den Analysen geschlossen werden, daß zum jetzigen Zeitpunkt die technischen Grenzen für die Charakterisierung nicht weiter subfraktionierter synaptischer Vesikel erreicht sind.

Die Anwendung der drei Techniken legt nahe, daß jede Technik ihre Vor- und Nachteile für die Identifizierung bestimmter Proteinklassen besitzt. Dies wurde bisher noch nicht in dieser Form gezeigt und liefert wertvolle Informationen für weitere Proteomanalysen.

Zu den in der Summe 238 identifizierten Proteinen gehören neun Proteine, für die weder Lokalisations- noch Funktionsdaten vorliegen. Die zwei ausgewählten Proteine Svap30 und SV35 zeigen eine gliale bzw. neuronale Verteilung. SV35 befindet sich in Subpopulationen von Neuronen, die nach immunhistochemischer Untersuchung als GABAerg und glutamaterg zu werten sind. Welche Funktion dieses Protein in diesen Neuronen ausübt, bleibt zu klären. Analysen mittels RNA-Interferenz in PC12-Zellen und Untersuchungen zur Änderung der catecholaminergen Transmitterausschüttung könnten erste Indizien liefern. Zudem könnte über Transfektion des Proteins in Oozyten die Identität des putativ transportierten Substrates bestimmt werden. All diese Arbeiten werden in Zukunft zu einer eingehenden Charakterisierung des Proteins beitragen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Adams A., Thorn J. M., Yamabhai M., Kay B. K. und O'Bryan J. P. (2000). Intersectin, an adaptor protein involved in clathrin-mediated endocytosis, activates mitogenic signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 275, 27414-27420.
- Adolfson B., Saraswati S., Yoshihara M. und Littleton J. T. (2004). Synaptotagmins are trafficked to distinct subcellular domains including the postsynaptic compartment. *J. Cell Biol.* 166, 249-260.
- Advani R. J., Bae H. R., Bock J. B., Chao D. S., Doung Y. C., Prekeris R., Yoo J. S. und Scheller R. H. (1998). Seven novel mammalian SNARE proteins localize to distinct membrane compartments. *J. Biol. Chem.* 273, 10317-10324.
- Agashe V. R. und Hartl F. U. (2000). Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Semin. Cell Dev. Biol.* 11, 15-25.
- Agutter P. S. und Richardson J. C. (1980). Nuclear non-chromatin proteinaceous structures: their role in the organization and function of the interphase nucleus. *J. Cell Sci.* 44, 395-435.
- Alfonso J., Fernandez M. E., Cooper B., Flugge G. und Frasch A. C. (2005). The stress-regulated protein M6a is a key modulator for neurite outgrowth and filopodium/spine formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 17196-17201.
- Allan B. B., Moyer B. D. und Balch W. E. (2000). Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion. *Science* 289, 444-448.
- Allen M., Heinzmann A., Noguchi F., Abecasis G., Broxholme J., Ponting C. P., Bhattacharyya S., Tinsley J., Zhang Y., Holt R., Jones E. Y., Lench N., Carey A., Jones H., Dickens N. J., Dimon C., Nochills R., Baker C., Xue L., Townsend E., Kabesch M., Weiland S. K., Carr D., von Mutius E., Adcock I. M., Barnes P. J., Lathrop G. M., Edwards M., Moffatt M. F. und Cookson W. O. (2003). Positional cloning of a novel gene influencing asthma from chromosome 2q14. *Nat. Genet.* 35, 258-263.
- Altrock W. D., Dieck S. t., Sokolov M., Meyer A. C., Sigler A., Brakebusch C., Fassler R., Richter K., Boeckers T. M., Potschka H., Brandt C., Loscher W., Grimberg D., Dresbach T., Hempelmann A., Hassan H., Balschun D., Frey J. U., Brandstatter J. H., Garner C. C., Rosenmund C. und Gundelfinger E. D. (2003). Functional inactivation of a fraction of excitatory synapses in mice deficient for the active zone protein bassoon. *Neuron* 37, 787-800.
- Altschuler Y., Liu S., Katz L., Tang K., Hardy S., Brodsky F., Apodaca G. und Mostov K. (1999). ADP-ribosylation factor 6 and endocytosis at the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* 147, 7-12.
- Alturi P. P. und Regehr W. G. (1998). Delayed release of neurotransmitter from cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* 18, 8214-8227.
- Alvarez de Toledo G., Fernandez-Chacon R. und Fernandez J. M. (1993). Release of secretory products during transient vesicle fusion. *Nature* 363, 554-558.
- Amano M., Ito K., Kimura K., Fukata Y., Chihara K., Nakano T., Matsuura Y. und Kaibuchi K. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J. Biol. Chem.* 271, 20246-20249.
- Ames J. B., Ishima R., Tanaka T., Gordon J. I., Stryer L. und Ikura M. (1997). Molecular mechanics of calcium-myristoyl switches. *Nature* 389, 198-202.
- Andersson L. und Porath J. (1986). Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe³⁺) affinity chromatography. *Anal. Biochem.* 154, 250-254.
- Aniento F., Emans N., Griffiths G. und Gruenberg J. (1993). Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J. Cell Biol.* 123, 1373-1387.
- Antony C., Cibert C., Geraud G., Santa Maria A., Maro B., Mayau V. und Goud B. (1992). The small GTP-binding protein rab6p is distributed from medial Golgi to the trans-Golgi network as determined by a confocal microscopic approach. *J. Cell Sci.* 103, 785-796.
- Apps D. K., Pryde J. G. und Sutton R. (1983). Characterization of detergent-solubilized adenosine triphosphatase of chromaffin granule membranes. *Neuroscience* 9, 687-700.
- Arami S., Jucker M., Schachner M. und Welzl H. (1996). The effect of continuous intraventricular infusion of L1 and NCAM antibodies on spatial learning in rats. *Behav. Brain Res.* 81, 81-87.
- Archer D. A., Graham M. E. und Burgoyne R. D. (2002). Complexin regulates the closure of the fusion pore during regulated vesicle exocytosis. *J. Biol. Chem.* 277, 18249-18252.
- Aridor M. und Traub L. M. (2002). Cargo selection in vesicular transport: the making and breaking of a coat. *Traffic* 3, 537-546.
- Arvanitis D. N., Wang H., Bagshaw R. D., Callahan J. W. und Boggs J. M. (2004). Membrane-associated estrogen receptor and caveolin-1 are present in central nervous system myelin and oligodendrocyte plasma membranes. *J. Neurosci. Res.* 75, 603-613.

- Assaf S. Y. und Chung S. H. (1984). Release of endogenous Zn²⁺ from brain tissue during activity. *Nature* 308, 734-736.
- Augustine G. J. (2001). How does calcium trigger neurotransmitter release? *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 320-326.
- Ayala J., Touchot N., Zahraoui A., Tavitian A. und Prochiantz A. (1990). The product of rab2, a small GTP binding protein, increases neuronal adhesion, and neurite growth in vitro. *Neuron* 4, 797-805.
- Ayscough K. R. (1998). In vivo functions of actin-binding proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 102-111.
- Baas P. W., Deitch J. S., Black M. M. und Banker G. A. (1988). Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 8335-8339.
- Backes W. L. und Kelley R. W. (2003). Organization of multiple cytochrome P450s with NADPH-cytochrome P450 reductase in membranes. *Pharmacol. Ther.* 98, 221-233.
- Bahler M., Benfenati F., Valtorta F., Czernik A. J. und Greengard P. (1989). Characterization of synapsin I fragments produced by cysteine-specific cleavage: a study of their interactions with F-actin. *J. Cell Biol.* 108, 1841-1849.
- Bai J., Wang P. und Chapman E. R. (2002). C2A activates a cryptic Ca²⁺-triggered membrane penetration activity within the C2B domain of synaptotagmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 1665-1670.
- Bailly F., McCaffrey M., Touchot N., Zahraoui A., Goud B. und Bornens M. (1991). Phosphorylation of two small GTP-binding proteins of the Rab family by p34cdc2. *Nature* 350, 715-718.
- Baines A. J. und Bennett V. (1986). Synapsin I is a microtubule-bundling protein. *Nature* 619, 145-147.
- Bajjalieh S. M., Frantz G. D., Weimann J. M., McConnell S. K. und Scheller R. H. (1994). Differential expression of synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms. *J. Neurosci.* 14, 5223-5235.
- Balch W. E., McCaffery J. M., Plutner H. und Farquhar M. G. (1994). Vesicular stomatitis virus glycoprotein is sorted and concentrated during export from the endoplasmic reticulum. *Cell* 76, 841-852.
- Banani E., Murray J. W., Stockert R. J., Satir P. und Wolkoff A. W. (2003). Regulation of early endocytic vesicle mobility and fission in a reconstituted system. *J. Cell Science* 116, 2749-2761.
- Banerjee A., Barry V. A., DasGupta B. R. und Martin T. F. (1996). N-Ethylmaleimide-sensitive factor acts at a pre-fusion ATP-dependent step in Ca²⁺-activated exocytosis. *J. Biol. Chem.* 271, 20223-20226.
- Banks J. F. J., Shen S., Whitehouse C. M. und Fenn J. B. (1994). Ultrasonically assisted electrospray ionization for LC/MS determination of nucleosides from a transfer RNA digest. *Anal. Chem.* 66, 406-414.
- Barbieri M. A., Hoffenberg S., Roberts R., Mukhopadhyay A., Pomrehn A., Dickey B. F. und Stahl P. D. (1998). Evidence for a symmetrical requirement for Rab5-GTP in in vitro endosome-endosome fusion. *J. Biol. Chem.* 273, 25850-25855.
- Barboni E., Gormley A. M., Pliego Rivero F. B., Vidal M. und Morris R. J. (1991). Activation of T lymphocytes by cross-linking of glycopospholipid-anchored Thy-1 mobilizes separate pools of intracellular second messengers to those induced by the antigen-receptor/CD3 complex. *Immunology* 72, 457-463.
- Barbosa J. J., Clarizia A. D., Gomez M. V., Romano-Silva M. A., Prado V. F. und Prado M. A. (1997). Effect of protein kinase C activation on the release of [³H]acetylcholine in the presence of vesamicol. *J. Neurochem.* 69, 2608-2611.
- Barclay J. W., Craig T. J., Fisher R. J., Ciuffo L. F., Evans G. J., Morgan A. und Burgoyne R. D. (2003). Phosphorylation of Munc18 by protein kinase C regulates the kinetics of exocytosis. *J. Biol. Chem.* 278, 10538-10545.
- Bathori G., Parolini I., Tombola F., Szabo I., Messina A., Oliva M., Pinto V. D., Lisanti M., Sargiacomo M. und Zoratti M. (1999). Porin is present in the plasma membrane where it is concentrated in caveolae and caveolae-related domains. *J. Biol. Chem.* 274, 29607-29612.
- Bauerfeind R., Takei K. und De Camilli P. (1997). Amphiphysin I is associated with coated endocytic intermediates and undergoes stimulation-dependent dephosphorylation in nerve terminals. *J. Biol. Chem.* 272, 30984-30992.
- Bauerle C., Ho M. N., Lindorfer M. A. und Stevens T. H. (1993). The *Saccharomyces cerevisiae* VMA6 gene encodes the 36-kDa subunit of the vacuolar H(+)-ATPase membrane sector. *J. Biol. Chem.* 268, 12749-12757.
- Baumert M., Takei K., Hartinger J., Burger P. M., Mollard G. F. v., Maycox P. R., De Camilli P. und Jahn R. (1990). P29: a novel tyrosine-phosphorylated membrane protein present in small clear vesicles of neurons and endocrine cells. *J. Cell Biol.* 110, 1285-1294.
- Becher A., Drenckhahn A., Pahner I., Margittai M., Jahn R. und Ahnert-Hilger G. (1999). The synaptophysin-synaptobrevin complex: a hallmark of synaptic vesicle maturation. *J. Neurosci.* 19, 1922-1931.
- Beer T. d., Carter R. E., Lobel-Rice K. E., Sorkin A. und Overduin M. (1998). Structure and Asn-Pro-Phe binding pocket of the Eps15 homology domain. *Science* 281, 1357-1360.
- Beites C. L., Xie H., Bowser R. und Trimble W. S. (1999). The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis. *Nat. Neurosci.* 2, 434-439.
- Beites C. L., Campbell K. A. und Trimble W. S. (2005). The septin Sept5/CDCrel-1 competes with alpha-SNAP for binding to the SNARE complex. *Biochem. J.* 385, 347-353.

- Bektas M., Nurten R., Gurel Z., Sayers Z. und Bermek E. (1994). Interactions of eukaryotic elongation factor 2 with actin: a possible link between protein synthetic machinery and cytoskeleton. *FEBS Lett.* 356, 89-93.
- Belizaire R., Komanduri C., Wooten K., Chen M., Thaller C. und Janz R. (2004). Characterization of synaptogyrin 3 as a new synaptic vesicle protein. *J. Comp. Neurol.* 470, 266-281.
- Bellocchio E. E., Reimer R. J., Freneau R. T. J. und Edwards R. H. (2000). Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science* 289, 957-960.
- Benfenati F., Bahler M., Jahn R. und Greengard P. (1989a). Interactions of synapsin I with small synaptic vesicles: distinct sites in synapsin I bind to vesicle phospholipids and vesicle proteins. *J. Cell Biol.* 108, 1863-1872.
- Benfenati F., Greengard P., Brunner J. und Bahler M. (1989b). Electrostatic and hydrophobic interactions of synapsin I and synapsin I fragments with phospholipid bilayers. *J. Cell Biol.* 108, 1851-1862.
- Benfenati F., Valtorta F., Rubenstein J. L., Gorelick F. S., Greengard P. und Czernik A. J. (1992). Synaptic vesicle-associated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is a binding protein for synapsin I. *Nature* 359, 417-420.
- Benfenati F., Valtorta F., Rossi M. C., Onofri F., Sihra T. und Greengard P. (1993). Interactions of synapsin I with phospholipids: possible role in synaptic vesicle clustering and in the maintenance of bilayer structures. *J. Cell Biol.* 123, 1845-1855.
- Benfenati F., Onofri F., Czernik A. J. und Valtorta F. (1996). Biochemical and functional characterization of the synaptic vesicle-associated form of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 40, 297-309.
- Bennett M. K., Calakos N., Kreiner T. und Scheller R. H. (1992a). Synaptic vesicle membrane proteins interact to form a multimeric complex. *J. Cell Biol.* 116, 761-775.
- Bennett M. K., Calakos N. und Scheller R. H. (1992b). Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* 257, 255-259.
- Berezney R. und Coffey D. S. (1974). Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 1410-1417.
- Berezov A., Iriarte A. und Martinez-Carrion M. (1996). Interaction of a dimeric mitochondrial precursor with phospholipid vesicles: direct association of each subunit with the membrane is required for loss of functionality. *Arch. Biochem. Biophys.* 336, 173-183.
- Bergersen L., Ruiz A., Bjaalie J. G., Kullmann D. M. und Gundersen V. (2003). GABA and GABA_A receptors at hippocampal mossy fibre synapses. *Eur. J. Neurosci.* 18, 931-941.
- Bernards A. und Settleman J. (2004). GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol.* 14, 377-385.
- Bernier-Valentin F., Aunis D. und Roussel G. (1983). Evidence for tubulin-binding sites on cellular membranes: plasma membranes, mitochondrial membranes, and secretory granule membranes. *J. Cell Biol.* 97, 209-216.
- Betz A., Okamoto M., Benseler F. und Brose N. (1997). Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin. *J. Biol. Chem.* 272, 2520-2526.
- Bhattacharya M., Anborgh P. H., Babwah A. V., Dale L. B., Dobransky T., Benovic J. L., Feldman R. D., Verdi J. M., Rylett R. J. und Ferguson S. S. (2002). Beta-arrestins regulate a Ral-GDS Ral effector pathway that mediates cytoskeletal reorganization. *Nat. Cell Biol.* 4, 547-555.
- Bickel P. E., Scherer P. E., Schnitzer J. E., Oh P., Lisanti M. P. und Lodish H. F. (1997). Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 272, 13793-13802.
- Bielinski D. F., Pyun H. Y., Linko-Stentz K., Macara I. G. und Fine R. E. (1993). Ral and Rab3a are major GTP-binding proteins of axonal rapid transport and synaptic vesicles and do not redistribute following depolarization stimulated synaptosomal exocytosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1151, 246-256.
- Bifulco M., Laezza C., Stingo S. und Wolff J. (2002). 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: a membrane-bound, microtubule-associated protein and membrane anchor for tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 1807-1812.
- Bingol B. und Schuman E. M. (2005). Synaptic protein degradation by the ubiquitin proteasome system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 536-541.
- Blackmer T., Larsen E. C., Takahashi M., Martin T. F., Alford S. und Hamm H. E. (2001). G protein betagamma subunit-mediated presynaptic inhibition: regulation of exocytotic fusion downstream of Ca²⁺ entry. *Science* 292, 293-297.
- Blagoveshchenskaya A. D., Thomas L., Feliciangeli S. F., Hung C. H. und Thomas G. (2002). HIV-1 Nef downregulates MHC-I by a PACS-1- and PI3K-regulated ARF6 endocytic pathway. *Cell* 111, 853-866.
- Blocker A., Severin F. F., Burkhardt J. K., Bingham J. B., Yu H., Olivo J. C., Schroer T. A., Hyman A. A. und Griffiths G. (1997). Molecular requirements for bi-directional movement of phagosomes along microtubules. *J. Cell Biol.* 137, 113-129.

- Blondeau F., Ritter B., Allaire P. D., Wasiaik S., Girard M., Hussain N. K., Angers A., Legendre-Guillemain V., Roy L., Boismenu D., Kearney R. E., Bell A. W., Bergeron J. J. M. und McPherson P. S. (2004). Tandem MS analysis of brain clathrin-coated vesicles reveals their critical involvement in synaptic vesicle recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3833-3838.
- Blonder J., Conrads T. P., Yu L.-R., Terunuma A., Janini G. M., Isaaq H. J., Vogel J. C. und Veenstra T. D. (2004). A detergent- and cyanogen bromide-free method for integral membrane proteomics: Application to *Halobacterium* purple membranes and the human epidermal membrane proteome. *Proteomics* 4, 31-45.
- Bloom O., Evergren E., Tomilin N., Kjaerulff O., Low P., Brodin L., Pieribone V. A., Greengard P. und Shupliakov O. (2003). Colocalization of synapsin and actin during synaptic vesicle recycling. *J. Cell Biol.* 161, 737-747.
- Bock J. B., Matern H. T., Peden A. A. und Scheller R. H. (2001). A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* 409, 839-841.
- Boehm M. und Bonifacino J. S. (2001). Adaptins: the final recount. *Mol. Biol. Cell* 12, 2907-2920.
- Bogen I. L., Boulannd J. L., Mariussen E., Wright M. S., Fonnum F., Kao H. T. und Walaas S. I. (2006). Absence of synapsin I and II is accompanied by decreases in vesicular transport of specific neurotransmitters. *J. Neurochem.* 96, 1458-1466.
- Bokoch G. M., Vlahos C. J., Wang Y., Knaus U. G. und Traynor-Kaplan A. E. (1996). Rac GTPase interacts specifically with phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem. J.* 315, 775-779.
- Bollmann J. H., Sakmann B. und Borst J. G. (2000). Calcium sensitivity of glutamate release in a calyx-type terminal. *Science* 289, 953-957.
- Bonifacino J. S. und Traub L. M. (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 395-447.
- Bordier C. (1981). Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* 256, 1604-1607.
- Borisovska M., Zhao Y., Tsytsyura Y., Glyvuk N., Takamori S., Matti U., Rettig J., Südhof T. C. und Bruns D. (2005). v-SNAREs control exocytosis of vesicles from priming to fusion. *EMBO J.* 24, 2114-2126.
- Bosc C., Oenariet E., Andrieux A. und Job D. (1999). STOP proteins. *Cell. Struct. Funct.* 24, 393-399.
- Bouillot C., Prochiantz A., Rougon G. und Allinquant B. (1996). Axonal amyloid precursor protein expressed by neurons in vitro is present in a membrane fraction with caveolae-like properties. *J. Biol. Chem.* 271, 7640-7644.
- Bowman A. B., Patel-King R. S., Benashski S. E., McCaffery J. M., Goldstein L. S. und King S. M. (1999). Drosophila roadblock and Chlamydomonas LC7: a conserved family of dynein-associated proteins involved in axonal transport, flagellar motility, and mitosis. *J. Cell Biol.* 146, 165-180.
- Boyer B. D. (1997). The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 717-749.
- Brackmann M., Schuchmann S., Anand R. und Braunewell K. H. (2005). Neuronal Ca²⁺ sensor protein VILIP-1 affects cGMP signalling of guanylyl cyclase B by regulating clathrin-dependent receptor recycling in hippocampal neurons. *J. Cell Sci.* 118, 2495-2505.
- Braell W. A., Schlossman D. M., Schmid S. L. und Rothman J. E. (1984). Dissociation of clathrin coats coupled to the hydrolysis of ATP: role of an uncoating ATPase. *J. Cell Biol.* 99, 734-741.
- Brand S. H., Laurie S. M., Mixon M. B. und Castle J. D. (1991). Secretory carrier membrane proteins 31-35 define a common protein composition among secretory carrier membranes. *J. Biol. Chem.* 266, 18949-18957.
- Brandstätter J. H., Lohrke S., Morgans C. W. und Wassle H. (1996). Distributions of two homologous synaptic vesicle proteins, synaptoporin and synaptophysin, in the mammalian retina. *J. Comp. Neurol.* 370, 1-10.
- Braun A., Pinyol R., Dahlhaus R., Koch D., Fonarev P., Grant B. D., Kessels M. M. und Qualmann B. (2005). EHD proteins associate with syndapin I and II and such interactions play a crucial role in endosomal recycling. *Mol. Biol. Cell* 16, 3642-3658.
- Braun A. P. und Schulmann H. (1995). The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 417-445.
- Braun P. E., De Angelis D., Shtybel W. W. und Bernier L. (1991). Isoprenoid modification permits 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase to bind to membranes. *J. Neurosci. Res.* 30, 540-544.
- Braunewell K. H., Brackmann M., Schaupp M., Spilker C., Anand R. und Gundelfinger E. D. (2001). Intracellular neuronal calcium sensor (NCS) protein VILIP-1 modulates cGMP signalling pathways in transfected neural cells and cerebellar granule neurones. *J. Neurochem.* 78, 1277-1286.
- Brautigam C. A., Chelliah Y. und Deisenhofer J. (2004). Tetramerization and ATP binding by a protein comprising the A, B, and C domains of rat synapsin I. *J. Biol. Chem.* 279, 11948-11956.
- Bridgman P. C. (1999). Myosin Va movements in normal and dilute-lethal axons provide support for a dual filament motor complex. *J. Cell Biol.* 146, 1045-1060.
- Brigelius-Flohe R., Aumann K. D., Blocker H., Gross G., Kiess M., Kloppel K. D., Maiornino M., Roveri A., Schuckelt R., Usani F. und al e. (1994). Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* 269, 7342-7348.

- Brodsky F. M., Chen C. Y., Knuehl C., Towler M. C. und Wakeham D. E. (2001). Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 17, 517-568.
- 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, 25273-25280.
- Brose N. und Rosenmund C. (1999). SV2: SVEeping up excess Ca²⁺ or tranSVorming presynaptic Ca²⁺ sensors? *Neuron* 24, 766-768.
- Brose N., Rosenmund C. und Rettig J. (2000). Regulation of transmitter release by Unc-13 and its homologues. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 303-311.
- Browning M. D., Huang C. K. und Greengard P. (1987). Similarities between protein IIIa and protein IIIb, two prominent synaptic vesicle-associated phosphoproteins. *J. Neurosci.* 7, 847-853.
- Brunet S., Thibault P., Gagnon E., Kearney P., Bergeron J. J. und Desjardings M. (2003). Organelle proteomics: looking at less to see more. *Trends Cell Biol.* 13, 629-638.
- Brymora A., Valova V. A., Larsen M. R., Roufogalis B. D. und Robinson P. J. (2001). The brain exocyst complex interacts with RalA in a GTP-dependent manner: identification of a novel mammalian Sec3 gene and a second Sec15 gene. *J. Biol. Chem.* 276, 29792-29797.
- Bucci C., parton R. G., Mather I. H., Stunnenberg H., Simons K., Hoflack B. und Zerial M. (1992). The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 70, 715-728.
- Bucci C., Chiariello M., Lattero D., Maiorano M. und Bruni C. B. (1999). Interaction cloning and characterization of the cDNA encoding the human prenylated rab acceptor (PRA1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 657-662.
- Buckley K. und Kelly R. B. (1985). Identification of a transmembrane glycoprotein specific for secretory vesicles of neural and endocrine cells. *J. Cell Biol.* 100, 1284-1294.
- Burgoyne R. D. und Weiss J. L. (2001). The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺-binding proteins. *Biochem. J.* 353, 1-12.
- Burgoyne R. D. und Morgan A. (2003). Secretory granule exocytosis. *Physiol. Rev.* 83, 581-632.
- 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, 243-255.
- Burré J., Beckhaus T., Schägger H., Corvey C., Karas M., Volkandt W. und Zimmermann H. (2006). Synaptic vesicle proteins under conditions of rest and activation: analysis by two-dimensional difference gel electrophoresis. *Electrophoresis*, in press.
- Calakos N. und Scheller R. H. (1994). Vesicle-associated membrane protein and synaptophysin are associated on the synaptic vesicle. *J. Biol. Chem.* 269, 24534-24537.
- Calero M., Whittaker G. R. und Collins R. N. (2001). Yop1p, the yeast homolog of the polyposis locus protein 1, interacts with Yip1p and negatively regulates cell growth. *J. Biol. Chem.* 276, 12100-12102.
- Caltagarone J., Rhodes J., Honer W. G. und Bowser R. (1998). Localization of a novel septin protein, hCDCrel-1, in neurons of human brain. *Neuroreport* 9, 2907-2912.
- Camera P., da Silva J. S., Griffiths G., Giuffrida M. G., Ferrara L., Schubert V., Imarisio S., Silengo L., Dotti C. G. und Di Cunto F. (2003). Citron-N is a neuronal Rho-associated protein involved in Golgi organization through actin cytoskeleton regulation. *Nat. Cell Biol.* 5, 1071-1078.
- Campbell K. und Gotz M. (2002). Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci.* 25, 235-238.
- Cantor S. B., Urano T. und Feig L. A. (1995). Identification and characterization of Ral-binding protein 1, a potential downstream target of Ral GTPases. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4578-4584.
- Cao X. und Barlowe C. (2000). Asymmetric requirements for a Rab GTPase and SNARE proteins in fusion of COPII vesicles with acceptor membranes. *J. Cell Biol.* 149, 55-66.
- Caplan S., Naslavsky N., Hartnell L. M., Lodge R., Polishchuk R. S., Donaldson J. G. und Bonifacino J. S. (2002). A tubular EHD1-containing compartment involved in the recycling of major histocompatibility complex class I molecules to the plasma membrane. *EMBO J.* 21, 2557-2567.
- Carafoli E. (1987). Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 395-433.
- Carpenter B., Hill K. J., Charalambous M., Wagner K. J., Lahiri D., James D. I., Andersen J. S., Schumacher V., Royer-Pokora B., Mann M., Ward A. und Roberts S. G. (2004). BASP1 is a transcriptional cosuppressor for the Wilms' tumor suppressor protein WT1. *Mol. Biol. Cell* 24, 537-549.
- Carrión-Vázquez M., Fernandez A. M., Chowen J. und Nieto-Sampedro M. (1998). Brain Ac39/physophilin: cloning, coexpression and colocalization with synaptophysin. *Eur. J. Neurosci.* 10, 1153-1166.
- Casamayor A. und Snyder M. (2003). Molecular dissection of a yeast septin: distinct domains are required for septin interaction, localization, and function. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2762-2777.
- Cases-Langhoff C., Voss B., Garner A. M., Appeltauer U., Takei K., Kindler S., Veh R. W., De Camilli P., Gundelfinger E. D. und Garner C. C. (1996). Piccolo, a novel 420 kDa protein associated with the presynaptic cytomatrix. *Eur. J. Cell Biol.* 69, 214-223.
- 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, 590-593.

- Castle A. und Castle D. (2005). Ubiquitously expressed secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) 1-4 mark different pathways and exhibit limited constitutive trafficking to and from the cell surface. *J. Cell Sci.* 118, 3769-3780.
- Ceccarelli B., Hurlbut W. P. und Mauro A. (1973). Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* 57, 499-524.
- Chamberlain L. H., Roth D., Morgan A. und Burgoyne R. D. (1995). Distinct effects of alpha-SNAP, 14-3-3 proteins, and calmodulin on priming and triggering of regulated exocytosis. *J. Cell Biol.* 130, 1063-1070.
- Chamberlain L. H. und Burgoyne R. D. (2000). Cysteine-string protein: the chaperone at the synapse. *J. Neurochem.* 74, 1781-1789.
- Chapman A. P., Smith S. J., Rider C. C. und Beesley P. W. (1994). Multiple ubiquitin conjugates are present in rat brain synaptic membranes and postsynaptic densities. *Neurosci. Lett.* 168, 238-242.
- Chapman E. R., Hanson P. I., An S. und Jahn R. (1995). Ca²⁺ regulates the interaction between synaptotagmin and syntaxin 1. *J. Biol. Chem.* 270, 23667-23671.
- Chapman E. R. (2002). Synaptotagmin: a Ca²⁺ sensor that triggers exocytosis? *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3, 498-508.
- Chardin P. und Tavittian A. (1986). The ral gene: a new ras related gene isolated by the use of a synthetic probe. *EMBO J.* 5, 2203-2208.
- Chaudhry F. A., Reimer R. J., Bellocchio E. E., Danbolt N. C., Osen K. K., Edwards R. H. und Storm-Mathisen J. (1998). The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *J. Neurosci.* 18, 9733-9750.
- Chavrier P. und Goud B. (1999). The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 466-475.
- Chen W., Feng Y., Chen D. und Wandinger-Ness A. (1998). Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor. *Mol. Biol. Cell* 9, 3241-3257.
- Chen X., Tomchick D. R., Kovrigin E., Arac D., Machius M., Südhof T. C. und Rizo J. (2002). Three-dimensional structure of the complexin/SNARE complex. *Neuron* 33, 397-409.
- Chiariello M., Bruni C. B. und Bucci C. (1999). The small GTPases Rab5a, Rab5b and Rab5c are differentially phosphorylated in vitro. *FEBS Lett.* 453, 20-24.
- Chibalin A. V., Zierath J. R., Katz A. I., Berggren P. O. und Bertorello A. M. (1998). Phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis of renal Na⁺, K⁺-ATPase alpha subunit in response to dopamine. *Mol. Biol. Cell* 9, 1209-1220.
- Chien C. L., Liu T. C., Ho C. L. und Lu K. S. (2005). Overexpression of neuronal intermediate filament protein alpha-internexin in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* 80, 693-706.
- Chien Y. und White M. A. (2003). RAL GTPases are linchpin modulators of human tumour-cell proliferation and survival. *EMBO Rep.* 4, 800-806.
- Chin L. S., Vavalle J. P. und Li L. (2002a). Staring, a novel E3 ubiquitin-protein ligase that targets syntaxin 1 for degradation. *J. Biol. Chem.* 277, 35071-35079.
- Chin V. K., Bivona T., Hach A., Sajous J. B., Silletti J., Wiener H., Johnson R. L. n., Cox A. D. und Philips M. R. (2002b). Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat. Cell Biol.* 4, 343-350.
- Ching G. Y. und Liem R. K. (1991). Structure of the gene for the neuronal intermediate filament protein alpha-internexin and functional analysis of its promoter. *J. Biol. Chem.* 266, 19459-19468.
- Chiu V. K., Bivona T., Hach A., Sajous J. B., Silletti J., Wiener H., Johnson R. L. n., Cox A. D. und Philips M. R. (2002). Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat. Cell Biol.* 4, 343-350.
- Cho G. W., Kim M. H., Chai Y. G., Gilmore M. L., Levey A. I. und Hersch L. B. (2000). Phosphorylation of the rat vesicular acetylcholine transporter. *J. Biol. Chem.* 275, 19942-19948.
- Chomczynski P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 15, 532-537.
- Chung S. H., Song W. J., Kim K., Bednarski J. J., J, Prestwich G. D. und Holz R. W. (1998). The C2 domains of Rabphilin3A specifically bind phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate containing vesicles in a Ca²⁺-dependent manner. In vitro characteristics and possible significance. *J. Biol. Chem.* 273, 10240-10248.
- Clarke S. (1992). Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 355-386.
- Clary O. D., Griff I. C. und Rothman J. E. (1990). SNAPS, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell* 61, 709-721.
- Clough R. R., Sidhu R. S. und Bhullar R. P. (2002). Calmodulin binds RalA and RalB and is required for the thrombin-induced activation of Ral in human platelets. *J. Biol. Chem.* 277, 28972-28980.
- Cohen P. T. (1997). Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem. Sci.* 22, 245-251.
- Colbran R. J. (2004a). Protein phosphatases and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 24, 8404-8409.

- Colbran R. J. (2004b). Targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem. J.* 378, 1-16.
- Cole T. B., Wenzel H. J., Kafer K. E., Schwartzkroin P. A. und Palmiter R. D. (1999). Elimination of zinc from synaptic vesicles in the intact mouse brain by disruption of the ZnT3 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 1716-1721.
- Collins M. O., Yu L., Coba M. P., Husi H., Campuzano I., Blackstock W. P., Choudhary J. S. und Grant S. G. (2005). Proteomic analysis of in vivo phosphorylated synaptic proteins. *J. Biol. Chem.* 280, 5972-5982.
- Comu S., Weng W., Olinsky S., Ishwad P., Mi Z., Hempel J., Watkins S., Lagenaur C. F. und Narayanan V. (1997). The murine P84 neural adhesion molecule is SHPS-1, a member of the phosphatase-binding protein family. *J. Neurosci.* 17, 8702-8710.
- Condeelis J. (1995). Elongation factor 1 alpha, translation and the cytoskeleton. *Trends Biochem. Sci.* 20, 169-170.
- Cooper A. J. L. (1988). Glutamine synthetase. In *Glutamine und Glutamate in Mammals*, Kvamme E., eds. (Boca Raton, CRC Press), pp. 7-31.
- Cooper J. A., Hart M. C., Karpova T. S. und Schafer D. A. (1999). Capping protein. In *Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins*, Kreis T. und Vale R., eds. (New York, Oxford University Press), pp. 62-64.
- Corbett J. M., Dunn M. J., Posch A. und Gorg A. (1994). Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilised pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: an interlaboratory comparison. *Electrophoresis* 15, 1205-1211.
- Cormont M., Tanti J. F., Zahraoui A., Obberghen E. V. und Marchand-Brustel Y. L. (1994). Rab4 is phosphorylated by the insulin-activated extracellular-signal-regulated kinase ERK1. *Eur. J. Biochem.* 219, 1081-1085.
- Corthesy-Theulaz I., Pauloin A. und Pfeffer S. R. (1992). Cytoplasmic dynein participates in the centrosomal localization of the Golgi complex. *J. Cell Biol.* 118, 1333-1345.
- Costa M. C., Mani F., Santoro W. J., Espreafico E. M. und Larson R. E. (1999). Brain myosin-V, a calmodulin-carrying myosin, binds to calmodulin-dependent protein kinase II and activates its kinase activity. *J. Biol. Chem.* 274, 15811-15819.
- Coughenour H. D., Spaulding R. S. und Thompson C. M. (2004). The synaptic vesicle proteome: A comparative study in membrane protein identification. *Proteomics* 4, 3141-3155.
- Craxton M. und Goedert M. (1995). Synaptotagmin V: a novel synaptotagmin isoform expressed in rat brain. *FEBS Lett.* 361, 196-200.
- Cremona O., Paolo G. D., Wenk M. R., Luthi A., Kim W. T., Takei K., Daniell L., Nemoto Y., Shears S. B., Flavell R. A., McCormick D. A. und De Camilli P. (1999). Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* 99, 179-188.
- Cremona O. und De Camilli P. (2001). Phosphoinositides in membrane traffic at the synapse. *J. Cell Sci.* 114, 1041-1052.
- Cukierman E., Huber I., Rotman M. und Cassel D. (1995). The ARF1 GTPase-activating protein: zinc finger motif and Golgi complex localization. *Science* 270, 1999-2002.
- Cunningham B. A., Hemperley J. J., Murray B. A., Prediger E. A., Brackenbury R. und Edelman G. M. (1987). Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* 236, 799-806.
- Custer K. L., Austin N. S., Sullivan J. M. und Bajjalieh S. M. (2006). Synaptic vesicle protein 2 enhances release probability at quiescent synapses. *J. Neurosci.* 26, 1303-1313.
- Daly C., Sugomiri M., Moreira J. E., Ziff E. B. und Llinas R. (2000). Synaptophysin regulates clathrin-independent endocytosis of synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6120-6125.
- Daly C. und Ziff E. B. (2002). Ca²⁺-dependent formation of a dynamin-synaptophysin complex: potential role in synaptic vesicle endocytosis. *J. Biol. Chem.* 277, 9010-9015.
- Daro E., Sluijs P. v. d., Galli T. und Mellman I. (1996). Rab4 and cellubrevin define different early endosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9559-9564.
- Davis A. F., Bai J., Fasshauer D., Wolowick M. J., Lewis J. L. und Chapman E. R. (1999). Kinetics of synaptotagmin responses to Ca²⁺ and assembly with the core SNARE complex onto membranes. *Neuron* 24, 363-376.
- de Marco M. C., Martin-Belmonte F., Kremer L., Albar J. P., Correas I., Vaerman J. P., Marazuela M., Byrne J. A. und Alonso M. A. (2002). MAL2, a novel raft protein of the MAL family, is an essential component of the machinery for transcytosis in hepatoma HepG2 cells. *J. Cell Biol.* 159, 37-44.
- Deak F., Schoch S., Liu X., Südhof T. C. und Kavalali E. T. (2004). Synaptobrevin is essential for fast synaptic-vesicle endocytosis. *Nat. Cell Biol.* 6, 1102-1108.
- De Camilli P., Harris S. M. J., Huttner W. B. und Greengard P. (1983). Synapsin I (Protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. II. Its specific association with synaptic vesicles demonstrated by immunocytochemistry in agarose-embedded synaptosomes. *J. Cell Biol.* 96, 1355-1373.

- DeFeo D., Gonda M. A., Young H. A., Chang E. H., Lowy D. R., Scolnick F. M. und Ellis R. W. (1981). Analysis of two divergent rat genomic clones homologous to the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 3328-3332.
- Dent J., Kato K., Peng X. R., Martinez C., Cattaneo M., Poujol C., Nurden P., Nurden A., Trimble W. S. und Ware J. (2002). A prototypic platelet septin and its participation in secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 3064-3069.
- Desai R. C., Vyas B., Earles C. A., Littleton J. T., Kowalchuck J. A., Martin T. F. und Chapman E. R. (2000). The C2B domain of synaptotagmin is a Ca(2+)-sensing module essential for exocytosis. *J. Cell Biol.* 150, 1125-1136.
- DiAntonio A. und Hicke L. (2004). Ubiquitin-dependent regulation of the synapse. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 223-246.
- Diaz R. S., Monreal J. und Lucas M. (1990). Calcium movements mediated by proteolipid protein and nucleotides in liposomes prepared with the endogenous lipids from brain white matter. *J. Neurochem.* 55, 1304-1309.
- Didsbury J., Weber R. F., Bokoch G. M., Evans T. und Snyderman R. (1989). rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J. Biol. Chem.* 264, 16378-16382.
- Dieck S. t., 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.
- Dillman J. F. r., Dabney L. P. und Pfister K. K. (1996). Cytoplasmic dynein is associated with slow axonal transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 141-144.
- Dillon C. und Goda Y. (2005). The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annu. Rev. Neurosci.* 28, 25-55.
- Ding J., Soule G., Overmeyer J. H. und Maltese W. A. (2003). Tyrosine phosphorylation of the Rab24 GTPase in cultured mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312, 670-675.
- Dong Z., Ferger B., Paterna J. C., Vogel D., Furler S., Osinde M., Feldon J. und Bueler H. (2003). Dopamine-dependent neurodegeneration in rats induced by viral vector-mediated overexpression of the parkin target protein, CDCrel-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 12438-12443.
- Doussau F. und Augustine G. J. (2000). The actin cytoskeleton and neurotransmitter release: an overview. *Biochimie* 82, 353-363.
- Doussau F., Gasman S., Humeau Y., Vitiello F., Popoff M., Boquet P., Bader M. F. und Poulain B. (2000). A Rho-related GTPase is involved in Ca(2+)-dependent neurotransmitter exocytosis. *J. Biol. Chem.* 275, 7764-7770.
- Dresbach T., Qualmann B., Kessels M. M., Garner C. C. und Gundelfinger E. D. (2001). The presynaptic cytomatrix of brain synapses. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 94-116.
- Duce I. R. und Keen P. (1983). Selective uptake of [3H]glutamine and [3H]glutamate into neurons and satellite cells of dorsal root ganglia in vitro. *Neuroscience* 8, 861-868.
- Duncan M. C., Cope M. J., Goode B. L., Wendland B. und Drubin D. G. (2001). Yeast Eps15-like endocytic protein, Pan1p, activates the Arp2/3 complex. *Nat. Cell Biol.* 3, 687-690.
- Duncan R. R., Greaves J., Wiegand U. K., I, Bodammer G., Apps D. K., Shipston M. J. und Chow R. H. (2003). Functional and spatial segregation of secretory vesicle pools according to vesicle age. *Nature* 422, 176-180.
- 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, 224-231.
- Ehlers M. D. (2003). Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat. Neurosci.* 6, 231-242.
- Ehrlich M., Boll W., Oijen A. V., Hariharan R., Chandran K., Nibert M. L. und Kirchhausen T. (2004). Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell* 118, 591-605.
- Elferink L. A., Anzai K. und Scheller R. H. (1992). rab15, a novel low molecular weight GTP-binding protein specifically expressed in rat brain. *J. Biol. Chem.* 267, 5768-5775.
- Eng L. F., Ghirnikar R. S. und Lee Y. L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem. Res.* 25, 1439-1451.
- 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, 10993-10997.
- Eshkind L. G. und Leube R. E. (1995). Mice lacking synaptophysin reproduce and form typical synaptic vesicles. *Cell Tissue Res.* 282, 423-433.
- Esser L., Wang C. R., Hosaka M., Smagula C. S., Südhof T. C. und Deisenhofer J. (1998). Synapsin I is structurally similar to ATP-utilizing enzymes. *EMBO J.* 17, 977-984.
- Ettinger A. J., Feng G. und Saues J. R. (1997). epsilon-Sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy 2D. *J. Biol. Chem.* 272, 32534-32538.

- Eugster A., Frigerio G., Dale M. und Duden R. (2000). COP I domains required for coatamer integrity, and novel interactions with ARF and ARF-GAP. *EMBO J.* 19, 3905-3917.
- Evans G. J., Wilkinson M. C., Graham M., Turner K. M., Chamberlain L. H., Burgoyne R. D. und Morgan A. (2001). Phosphorylation of cysteine string protein by protein kinase A. Implications for the modulation of exocytosis. *J. Biol. Chem.* 276, 47877-47885.
- Evans G. J. und Morgan A. (2002). Phosphorylation-dependent interaction of the synaptic vesicle proteins cysteine string protein and synaptotagmin I. *Biochem. J.* 364, 343-347.
- Evans G. J. und Cousin M. A. (2005). Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 1350-1353.
- Evans L. L., Lee A. J., Bridgman P. C. und Mooseker M. S. (1998). Vesicle-associated brain myosin-V can be activated to catalyze actin-based transport. *J. Cell Sci.* 111, 2055-2066.
- Everberg H., Sivars U., Emanuelsson C., Persson C., Englund A. K., Haneskog L., Lipniunas P., Jornten-Karlsson M. und Tjerneld F. (2004). Protein pre-fractionation in detergent-polymer aqueous two-phase systems for facilitated proteomic studies of membrane proteins. *J. Chromatogr. A* 1029, 113-124.
- Evergren E., Marcucci M., Tomilin N., Low P., Slepnev V., Andersson F., Gad H., Brodin L., De Camilli P. und Shupliakov O. (2004). Amphiphysin is a component of clathrin coats formed during synaptic vesicle recycling at the lamprey giant synapse. *Traffic* 5, 514-528.
- Exton J. H. (1997). New developments in phospholipase D. *J. Biol. Chem.* 272, 15579-15582.
- Fabian-Fine R., Volkandt W., Fine A. und Stewart M. G. (2000). Age-dependent pre- and postsynaptic distribution of AMPA receptors at synapses in CA3 stratum radiatum of hippocampal slice cultures compared with intact brain. *Eur. J. Neurosci.* 12, 3687-3700.
- Falk J., Bonnon C., Girault J. A. und Faivre S., C (2002). F3/contactin, a neuronal cell adhesion molecule implicated in axogenesis and myelination. *Biol. Cell* 94, 327-334.
- Fasshauer D., Sutton R. B., Brunger A. T. und Jahn R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15781-15786.
- Fasshauer D., Antonin W., Subramaniam V. N. und Jahn R. (2002). SNARE assembly and disassembly exhibit a pronounced hysteresis. *Nat. Struct. Biol.* 9, 144-151.
- Faundez V. und Hartzell H. C. (2004). Intracellular chloride channels: determinants of function in the endosomal pathway. *Sci. STKE* 2004, re8.
- Feany M. B., Lee S., Edwards R. H. und Buckley K. M. (1992). The synaptic vesicle protein SV2 is a novel type of transmembrane transporter. *Cell* 70, 861-867.
- Feig L. A. (2003). Ral-GTPases: approaching their 15 minutes of fame. *Trends Cell Biol.* 13, 419-425.
- Feldman D. E. und Frydman J. (2000). Protein folding in vivo: the importance of molecular chaperones. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 26-33.
- Feng J., Yan Z., Ferreira A., Tomizawa K., Liauw J. A., Zhuo M., Allen P. B., Ouimet C. C. und Greengard P. (2000). Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 9287-9292.
- 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, 203-214.
- Fernandez-Chacon I., Arac D., Ubach J., Gerber S. H., Shin O., Gao Y., Anderson R. G., Südhof T. C. und Rizo J. (2001). Three-dimensional structure of the synaptotagmin I C2B-domain: synaptotagmin I as a phospholipid binding machine. *Neuron* 32, 1057-1069.
- Fernandez-Chacon R. und Südhof T. C. (1999). Genetics of synaptic vesicle function: toward the complete functional anatomy of an organelle. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 753-776.
- Fernandez-Chacon R., Achiriloaie M., Janz R., Albanesi J. P. und Südhof T. C. (2000). SCAMP1 function in endocytosis. *J. Biol. Chem.* 275, 12752-12756.
- Fernandez-Chacon R. und Südhof T. C. (2000). Novel SCAMPs lackin NPF repeats: ubiquitous and synaptic vesicle-specific forms implicate SCAMPs in multiple membrane-trafficking functions. *J. Neurosci.* 20, 7941-7950.
- Fernandez-Chacon R., Wolfel M., Nishimune H., Tabares L., Schmitz F., Castellano-Munoz M., Rosenmund C., Montesinos M. L., Sanes J. R., Schneggenburger R. und Südhof T. C. (2004). The synaptic vesicle protein CSP alpha prevents presynaptic degeneration. *Neuron* 42, 237-251.
- Ferreira A., Kosik K. S., Greengard P. und Han H. Q. (1994). Aberrant neurites and synaptic vesicle protein deficiency in synapsin II-depleted neurons. *Science* 264, 977-979.
- Ferreira A., Li L., Chin L. S., Greengard P. und Kosik K. S. (1996). Postsynaptic element contributes to the delay in synaptogenesis in synapsin I-deficient neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 8, 286-299.
- Ficarro S. B., McClelland M. L., Stukenberg P. T., Burke D. J., Ross M. M., Shabanowitz J., Hunt D. F. und White F. M. (2002). Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Biotechnol.* 20, 301-305.

- Fingerhut A., Figura K. v. und Höning S. (2001). Binding of AP2 to sorting signals is modulated by AP2 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 276, 5476-5482.
- Fisher R. J., Pevsner J. und Burgoyne R. D. (2001). Control of fusion pore dynamics during exocytosis by Munc18. *Science* 291, 875-878.
- Fletcher B. S., C, Notterpek L. und Nolan G. P. (2002). Functional cloning of SPIN-2, a nuclear anti-apoptotic protein with roles in cell cycle progression. *Leukemia* 16, 1507-1518.
- Fletcher T. L., Cameron P., De Camilli P. und Banker G. (1991). The distribution of synapsin I and synaptophysin in hippocampal neurons developing in culture. *J. Neurosci.* 11, 1617-1626.
- Fliegner K. H., Kaplan M. P., Wood T. L., Pintar J. E. und Liem R. K. (1994). Expression of the gene for the neuronal intermediate filament protein alpha-internexin coincides with the onset of neuronal differentiation in the developing rat nervous system. *J. Comp. Neurol.* 342, 161-173.
- Ford M. G., Pearse B. M., Higgins M. K., Vallis Y., Owen D. J., Gibson A., Hopkins C. R., Evans P. R. und McMahon H. T. (2001). Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P2 and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science* 291, 1051-1055.
- Forgacs M. (1999). Structure and properties of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *J. Biol. Chem.* 274, 12951-12954.
- Foster L. J., Weir M. L., Lim D. Y., Liu Z., Trimble W. S. und Klip A. (2000). A functional role for VAP-33 in insulin-stimulated GLUT4 traffic. *Traffic* 1, 512-521.
- Frederickson C. J., Hernandez M. D. und McGinty J. F. (1989). Translocation of zinc may contribute to seizure-induced death of neurons. *Brain Res.* 480, 317-321.
- Fremeau R. T. J., Burman J., Qureshi T., Tran C. H., Proctor J., Johnson J., Zhang H., Sulzer D., Copenhagen D. R., Storm-Mathisen J., Reimer R. J., Chaudhry F. A. und Edwards R. H. (2002). The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 14488-14493.
- Fu C. A., Shen M., Huang B. C., Lasaga J., Payan D. G. und Luo Y. (1999). TNIK, a novel member of the germinal center kinase family that activates the c-Jun N-terminal kinase pathway and regulates the cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 274, 30729-30737.
- Fujiki Y., Hubbard A. L., Fowler S. und Lazarow P. B. (1982). Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 93, 97-102.
- Fukai S., Matern H. T., Jagath J. R., Scheller R. H. und Brunger A. T. (2003). Structural basis of the interaction between RalA and Sec5, a subunit of the sec6/8 complex. *EMBO J.* 22, 3267-3278.
- Fung E. T. und Scheller R. H. (1999). Identification of a novel alternatively spliced septin. *FEBS Lett.* 451, 203-208.
- Furuyashiki T., Fujisawa K., Fujita A., Madaule P., Uchino S., Mishina M., Bito H. und Narumiya S. (1999). Citron, a Rho-target, interacts with PSD-95/SAP-90 at glutamatergic synapses in the thalamus. *J. Neurosci.* 19, 109-118.
- Fykse F. M. und Fonnum F. (1996). Amino acid neurotransmission: dynamics of vesicular uptake. *Neurochem. Res.* 21, 1053-1060.
- Gaidarov I. und Keen J. H. (1999). Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits. *J. Cell Biol.* 146, 755-764.
- Galli T., McPherson P. S. und De Camilli P. (1996). The V0 sector of the V-ATPase, synaptobrevin, and synaptophysin are associated on synaptic vesicles in a Triton X-100-resistant, freeze-thawing sensitive, complex. *J. Biol. Chem.* 271, 2193-2198.
- Garnett D., Barclay A. N., Carmo A. M. und Beyers A. D. (1993). The association of the protein tyrosine kinases p56lck and p60fyn with the glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins Thy-1 and CD48 in rat thymocytes is dependent on the state of cellular activation. *Eur. J. Immunol.* 23, 2540-2544.
- Gasman S., Chasserot-Golaz S., Popoff M. R., Annis D. und Bader M. F. (1999). Involvement of Rho GTPases in calcium-regulated exocytosis from adrenal chromaffin cells. *J. Cell Sci.* 112, 4763-4771.
- Geering K. (1997). Na,K-ATPase. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 6, 434-439.
- Gendreau S., Schirmer J. und Schmalzing G. (2003). Identification of a tubulin binding motif on the P2X2 receptor. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 786, 311-318.
- Genoux D., Haditsch U., Knoblock M., Michalon A., Storm D. und Mansuy I. M. (2002). Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature* 418, 970-975.
- Geppert M. und Südhof T. C. (1998). RAB3 and synaptotagmin: the yin and yang of synaptic membrane fusion. *Annu. Rev. Neurosci.* 21, 75-95.
- Gerona R. R., Larsen E. C., Kowalchuk J. A. und Martin T. F. (2000). The C terminus of SNAP25 is essential for Ca(2+)-dependent binding of synaptotagmin to SNARE complexes. *J. Biol. Chem.* 275, 6328-6336.
- Gersdorff H. v. und Matthews G. (1994). Dynamics of synaptic vesicle fusion and membrane retrieval in synaptic terminals. *Nature* 367, 735-739.
- Gerst J. E. (2003). SNARE regulators: matchmakers and matchbreakers. *Biochim. Biophys. Acta* 1641, 99-110.
- Gildea J. J., Harding M. A., Seraj M. J., Gulding K. M. und Theodorescu D. (2002). The role of Ral A in epidermal growth factor receptor-regulated cell motility. *Cancer Res.* 62, 982-984.

- Gill S. R., Cleveland D. W. und Schroer T. A. (1994). Characterization of DLC-A and DLC-B, two families of cytoplasmic dynein light chain subunits. *Mol. Biol. Cell.* 5, 645-654.
- Gillooly D. J., Morrow I. C., Lindsay M., Gould R., Bryant N. J., Gaullier J. M., Parton R. G. und Stenmark H. (2000). Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J.* 19, 4577-4588.
- Gilman A. G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 615-649.
- Gilmor M. L., Nash N. R., Roghani A., Edwards R. H., Yi H., Hersch S. M. und Levey A. I. (1996). Expression of the putative vesicular acetylcholine transporter in rat brain and localization in cholinergic synaptic vesicles. *J. Neurosci.* 16, 2179-2190.
- Gincel D. und Shoshan-Barmatz V. (2002). The synaptic vesicle protein synaptophysin: purification and characterization of its channel activity. *Biophys. J.* 83, 3223-3229.
- Gioio A. E., Chun J. T., Crispino M., Capano C. P., Giuditta A. und Kaplan B. B. (1994). Kinesin mRNA is present in the squid giant axon. *J. Neurochem.* 63, 13-18.
- Giordano G., Sanchez-Perez A. M., Montoliu C., Berezney R., Malyavantham K., Costa L. G., Calvete J. J. und Felipo V. (2005). Activation of NMDA receptors induces protein kinase A-mediated phosphorylation and degradation of matrin 3. Blocking these effects prevents NMDA-induced neuronal death. *J. Neurochem.* 94, 808-818.
- Giovedi S., Vaccaro P., Valtorta F., Darchen F., Greengard P., Cesaren G. und Benfenati F. (2004). Synapsin is a novel rab3 effector protein on small synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.*
- Gitler D., Takagishi Y., Feng J., Ren Y. Q., Reodriguez R. M., Wetsel W. C., Greengard P. und Augustine G. J. (2004). Different presynaptic roles of synapsins at excitatory and inhibitory synapses. *J. Neurosci.* 24, 11368-11380.
- Giuditta A., Menichini E., Perrone Capano C., Langella M., Martin R., Castigli E. und Kaplan B. B. (1991). Active polysomes in the axoplasm of the squid giant axon. *J. Neurosci. Res.* 28, 18-28.
- Giuditta A., Kaplan B. B., van Minnen J., Alvarez J. und Koenig E. (2002). Axonal and presynaptic protein synthesis: new insights into the biology of the neuron. *Trends Neurosci.* 25, 400-404.
- Glebov O. O., Bright N. A. und Nichols B. J. (2006). Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* 8, 46-54.
- Goda Y. und Stevens C. F. (1994). Two components of transmitter release at a central synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 12942-12946.
- Gonzalez Guerrico A. M., Jaffer Z. M., Page R. E., Braunewell K. H., Chernoff J. und Klein-Szanto A. J. (2005). Visinin-like protein-1 is a potent inhibitor of cell adhesion and migration in squamous carcinoma cells. *Oncogene* 24, 2307-2316.
- Gonzalez L. J. und Scheller R. H. (1999). Regulation of membrane trafficking: structural insights from a Rab/effector complex. *Cell* 96, 755-758.
- Goode B. L., Drubin D. G. und Barnes G. (2000). Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 63-71.
- Goodman S. R., Zimmer W. E., Clark M. B., Zagon I. S., Barker J. E. und Bloom M. L. (1995). Brain spectrin: of mice and men. *Brain Res. Bull.* 36, 593-606.
- Goodwin J. S., Drake K. R., Rogers C., Wright L., Lippincott-Schwartz J., Philips M. R. und Kenworthy A. K. (2005). Depalmitoylated Ras traffics to and from the Golgi complex via a nonvesicular pathway. *J. Cell Biol.* 170, 261-272.
- Görg A., Postel W. und Gunther S. (1988). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9, 531-546.
- Gorvel J. P., Chavrier P., Zerial M. und Gruenberg J. (1991). rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* 64, 915-925.
- Goud B., Zahraoui A., Tavitian A. und Saraste J. (1990). Small GTP-binding protein associated with Golgi cisternae. *Nature* 345, 553-556.
- Graham L. A., Hill K. J. und Stevens T. H. (1994). VMA7 encodes a novel 14-kDa subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar H(+)-ATPase complex. *J. Biol. Chem.* 269, 25974-25977.
- GrandPre T., Nakamura F., Vartanian T. und Strittmatter S. M. (2000). Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 403, 439-444.
- Grant P. und Pant H. C. (2000). Neurofilament protein synthesis and phosphorylation. *J. Neurocytol.* 29, 843-872.
- Gras C., Herzog E., Bellenchi G. C., Bernard V., Ravassard P., Pohl M., Gasnier B., Giros B. und Mesikawy S. E. (2002). A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J. Neurosci.* 22, 5442-5451.
- Gray E. G. (1978). Synaptic vesicles and microtubules in frog motor endplates. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 203, 219-227.
- Gray E. G., Westrum L. E., Burgoyne R. D. und Barron J. (1982). Synaptic organisation and neuron microtubule distribution. *Cell Tissue Res.* 226, 579-588.

- Green S. A. und Kelly R. B. (1992). Low density lipoprotein receptor and cation-independent mannose 6-phosphate receptor are transported from the cell surface to the Golgi apparatus at equal rates in PC12 cells. *J. Cell Biol.* 117, 47-55.
- Greene L. A. und Rein G. (1977). Release of (3H)norepinephrine from a clonal line of pheochromocytoma cells (PC12) by nicotinic cholinergic stimulation. *Brain Res.* 138, 521-528.
- Greengard P., Valtorta F., Czernik A. J. und Benfenati F. (1993). Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* 259, 780-785.
- Greengard P., Benfenati F. und Valtorta F. (1994). Synapsin I, an actin-binding protein regulating synaptic vesicle traffic in the nerve terminal. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 29, 31-45.
- Griffith L. C., Lu C. S. und Sun X. X. (2003). CaMKII, an enzyme on the move: regulation of temporospatial localization. *Mol. Interv.* 3, 386-403.
- Grindstaff K. K., Yeaman C., Anandasabapathy N., Hsu S. C., Rodriguez-Boulan E., Scheller R. H. und Nelson W. J. (1998). Sec6/8 complex is recruited to cell-cell contacts and specifies transport vesicle delivery to the basal-lateral membrane in epithelial cells. *Cell* 93, 731-740.
- Groot R. D. und Rabone K. L. (2001). Mesoscopic simulation of cell membrane damage, morphology change and rupture by nonionic surfactants. *Biophys. J.* 81, 725-736.
- Guillaud L., Bosc C., Fourest-Lieuvin A., Denarier E., Pirollet F., Lafanechere L. und Job D. (1998). STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells. *J. Cell Biol.* 142, 167-179.
- Gulyas A. I., Cravatt B. F., Bracey M. H., Dinh T. P., Piomelli D., Boscia F. und Freund T. F. (2004). Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur. J. Neurosci.* 20, 441-458.
- Gundelfinger E. D., Kessels M. M. und Qualmann B. (2003). Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 127-139.
- Gurd J. W. (1997). Protein tyrosine phosphorylation: implications for synaptic function. *Neurochem. Int.* 31, 635-649.
- Haffner C., Takei K., Chen H., Ringstad N., Hudson A., Butler M. H., Salcini A. E., Di Fiore P. P. und De Camilli P. (1997). Synaptojanin 1: localization on coated endocytic intermediates in nerve terminals and interaction of its 170 kDa isoform with Eps15. *FEBS Lett.* 419, 175-180.
- Haffner C., Paolo G. D., Rosenthal J. A. und De Camilli P. (2000). Direct interaction of the 170 kDa isoform of synaptojanin 1 with clathrin and with the clathrin adaptor AP-2. *Curr. Biol.* 10, 471-474.
- Hagler D. J. J. und Goda Y. (2001). Properties of synchronous and asynchronous release during pulse train depression in cultured hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 85, 2324-2334.
- Halachmi N. und Lev Z. (1996). The Sec1 family: a novel family of proteins involved in synaptic transmission and general secretion. *J. Neurochem.* 66, 889-897.
- Hall P. A. und Russell S. E. (2004). The pathobiology of the septin gene family. *J. Pathol.* 204, 489-505.
- Han H. Q., Nichols R. A., Rubin M. R., Bahler M. und Greengard P. (1991). Induction of formation of presynaptic terminals in neuroblastoma cells by synapsin IIb. *Nature* 349, 697-700.
- Hanai N., Nagata K., Kawajiri A., Shiromizu T., Saitoh N., Hasegawa Y., Murakami S. und Inagaki M. (2004). Biochemical and cell biological characterization of a mammalian septin, Sept11. *FEBS Lett.* 568, 83-88.
- Hannan L. A., Newmyer S. L. und Schmid S. L. (1998). ATP- and cytosol-dependent release of adaptor proteins from clathrin-coated vesicles: A dual role for Hsc70. *Mol. Biol. Cell* 9, 2217-2229.
- 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, 523-535.
- Hao W., Tan Z., Prasad K., Reddy K. K., Chen J., Prestwich G. D., Falck J. R., Shears S. B. und Lafer E. M. (1997). Regulation of AP-3 function by inositides. Identification of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate as a potent ligand. *J. Biol. Chem.* 272, 6393-6398.
- Harauz G., Ishiyama N., Hill C. M., Bates I. R., Libich D. S. und Fares C. (2004). Myelin basic protein-diverse conformational states of an intrinsically unstructured protein and its roles in myelin assembly and multiple sclerosis. *Micron* 35, 503-542.
- Hart M. C., Korshunova Y. O. und Cooper J. A. (1997). Vertebrates have conserved capping protein alpha isoforms with specific expression patterns. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 38, 120-132.
- Hartinger J., Stenius K., Högemann D. und Jahn R. (1996). 16-BAC/SDS-PAGE: A two-dimensional gel electrophoresis system suitable for the separation of integral membrane proteins. *Anal. Biochem.* 240, 126-133.
- Hata Y., Slaughter C. A. und Südhof T. C. (1993). Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. *Nature* 366, 347-351.
- Haucke V. und De Camilli P. (1999). AP-2 recruitment to synaptotagmin stimulated by tyrosine-based endocytic motifs. *Science* 285, 1268-1271.

- Hay J. C., Fiset P. L., Jenkins G. H., Fukami K., Takenawa T., Anderson R. A. und Martin T. F. (1995). ATP-dependent inositide phosphorylation required for Ca²⁺-activated secretion. *Nature* 374, 173-177.
- Heijne G. v. (1986). Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J.* 5, 1335-1342.
- Herrmann H. und Aebi U. (2000). Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 79-90.
- Heuvel E. d., Bell A. W., Ramjaun A. R., Wong K., Sossin W. S. und McPerson P. S. (1997). Identification of the major synaptotagmin-binding proteins in brain. *J. Biol. Chem.* 272, 8710-8716.
- Hilfiker S., Schweizer F. E., Kao H. T., Czernik A. J., Greengard P. und Augustine G. J. (1998). Two sites of action for synaptotagmin domain E in regulating neurotransmitter release. *Nat. Neurosci.* 1, 29-35.
- Hill C. M. D., Hewer L. M., Hallett F. R. und Harauz G. (2004). Modulation of actin assembly by myelin basic protein. Paper presented at: Proceedings of the 48th Annual Meeting of the Biophysical Society (Baltimore, MD).
- Hille B., Billiard J., Babcock D. F., Nguyen T. und Koh D. S. (1999). Stimulation of exocytosis without a calcium signal. *J. Physiol.* 520, 23-31.
- Hinshaw J. E. (2000). Dynamin and its role in membrane fission. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 16, 483-519.
- Hirokawa N., Sobue K., Kanda K., Harada A. und Yorifuji H. (1989). The cytoskeletal architecture of the presynaptic terminal and molecular structure of synaptotagmin I. *J. Cell Biol.* 108, 111-126.
- Hirokawa N. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 279, 519-526.
- Ho M. N., Hill K. J., Lindorfer M. A. und Stevens T. H. (1993). Isolation of vacuolar membrane H(+)-ATPase-deficient yeast mutants; the VMA5 and VMA4 genes are essential for assembly and activity of the vacuolar H(+)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 268, 221-227.
- Hodel A. (1998). SNAP-25. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 1069-1073.
- Hodge T. und Colombini M. (1997). Regulation of metabolite flux through voltage-gating of VDAC channels. *J. Membr. Biol.* 157, 271-279.
- Holleran E. A., Ligon L. A., Tokito M., Stankewich M. C., Morrow J. S. und Holzbaur E. L. (2001). beta III spectrin binds to the Arp1 subunit of dynactin. *J. Biol. Chem.* 276, 36598-36605.
- Holtje M., Jagow B. v., Pahner I., Lautenschlager M., Hortnagl H., Nurnberg B., Jahn R. und Ahnert-Hilger G. (2000). The neuronal monoamine transporter VMAT2 is regulated by the trimeric GTPase Go(2). *J. Neurosci.* 20, 2131-2141.
- Holz R. W., Hlubek M. D., Sorensen S. D., Fisher S. K., Balla T., Ozaki S., Prestwich G. D., Stuenkel E. L. und Bittner M. A. (2000). A pleckstrin homology domain specific for phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PtdIns-4,5-P2) and fused to green fluorescent protein identifies plasma membrane PtdIns-4,5-P2 as being important in exocytosis. *J. Biol. Chem.* 275, 17878-17885.
- Honda A., Yamada M., Saisu H., Takahashi H., Mori K. J. und Abe T. (2002). Direct, Ca²⁺-dependent interaction between tubulin and synaptotagmin I: a possible mechanism for attaching synaptic vesicles to microtubules. *J. Biol. Chem.* 277, 20234-20242.
- Höning S., Kreimer G., Robenek H. und Jokus B. M. (1994). Receptor-mediated endocytosis is sensitive to antibodies against the uncoating ATPase (hsc70). *J. Cell Sci.* 107, 1185-1196.
- Hopp T. P. und Woods K. R. (1981). Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 3824-3828.
- Hosaka M. und Südhof T. C. (1998). Synaptotagmin I and II are ATP-binding proteins with differential Ca²⁺ regulation. *J. Biol. Chem.* 273, 1425-1429.
- Hosaka M., Hammer R. E. und Südhof T. C. (1999). A phospho-switch controls the dynamic association of synaptotagmin with synaptic vesicles. *Neuron* 24, 377-387.
- Howe C. L., Valletta J. S., Rusnak A. S. und Mobley W. C. (2001). NGF signaling from clathrin-coated vesicles: evidence that signaling endosomes serve as a platform for the Ras-MAPK pathway. *Neuron* 32, 801-814.
- Howell G. A., Welch M. G. und Frederickson C. J. (1984). Stimulation-induced uptake and release of zinc in hippocampal slices. *Nature* 308, 736-738.
- Hsu S. C., Ting A. E., Hazuka C. D., Davanger S., Kenny J. W., Kee Y. und Scheller R. H. (1996). The mammalian brain sec6/8 complex. *Neuron* 17, 1209-1219.
- Hsu S. C., Hazuka C. D., Roth R., Foletti D. L., Heuser J. und Scheller R. H. (1998). Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments. *Neuron* 20, 1111-1122.
- Hu K., Rickman C., Carroll J. und Davletov B. (2004). A common mechanism for the regulation of vesicular SNAREs on phospholipid membranes. *Biochem. J.* 377, 781-785.
- Huang E. P. (1997). Metal ions and synaptic transmission: think zinc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 13386-13387.
- Hubbard C., Singleton D., Rauch M., Jayasinghe S., Cafiso D. und Castle D. (2000). The secretory carrier membrane protein family: structure and membrane topology. *Mol. Biol. Cell* 11, 2933-2947.

- Hui E., Bai J., Wang P., Sugimori M., Llinas R. und Chapman E. R. (2005). Three distinct kinetic groupings of the synaptotagmin family: candidate sensors for rapid and delayed exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 5210-5214.
- Hussain N. K., Yamabhai M., Ramjaun A. R., Guy A. M., baranes D., O'Bryan J. P., Der C. J., Kay B. K. und McPerson P. S. (1999). Splice variants of intersectin are components of the endocytic machinery in neurons and nonneuronal cells. *J. Biol. Chem.* 274, 15671-15677.
- Hussain N. K., Jenna S., Glogauer M., Quinn C. C., Wasiak S., Guipponi M., Antonarakis S. E., Kay B. K., Stossel T. P., Lamarche-Vane N. und McPerson P. S. (2001). Endocytic protein intersectin-I regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP. *Nat. Cell Biol.* 3, 927-932.
- Hussain N. K., Yamabhai M., Bhakar A. L., Metzler M., Ferguson S. S., Hayden M. R., McPerson P. S. und Kay B. K. (2003). A role for epsin N-terminal homology/AP180 N-terminal homology (ENTH/ANTH) domains in tubulin binding. *J. Biol. Chem.* 278, 28823-28830.
- Huynh H., Wang X., Li W., Bottini N., Williams S., Nika K., Ishihara H., Godzik A. und Mustelin T. (2003). Homotypic secretory vesicle fusion induced by the protein tyrosine phosphatase MEG2 depends on polyphosphoinositides in T cells. *J. Immunol.* 171, 6661-6671.
- Huynh H., Bottini N., Williams S., Cheperanov V., Musumeci L., Saito K., Bruckner S., Vachon E., Wang X., Kruger J., Chow C. W., Pellicchia M., Monosov E., Greer P. A., Trimble W., Downey G. P. und Mustelin T. (2004). Control of vesicle fusion by a tyrosine phosphatase. *Nat. Cell Biol.* 6, 831-839.
- Ihara M., Kinoshita A., Yamada S., Tanaka H., Tanigaki A., Kitano A., Goto M., Okube K., Nishiyama H., Ogawa O., Takahashi C., Itohara S., Nishimune Y., Noda M. und Kinoshita M. (2005). Cortical organization by the septin cytoskeleton is essential for structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa. *Dev. Cell* 8, 343-352.
- Ikeda M., Ishida O., Hinoi T., Kishida S. und Kikuchi A. (1998). Identification and characterization of a novel protein interacting with Ral-binding protein 1, a putative effector protein of Ral. *J. Biol. Chem.* 273, 814-821.
- Ikemoto A., Bole D. G. und Ueda T. (2003). Glycolysis and Glutamate Accumulation into Synaptic Vesicles. *J. Biol. Chem.* 278, 5929-5940.
- Ishizuka T., Saisu H., Odani S. und Abe T. (1995). Synaphin: a protein associated with the docking/fusion complex in presynaptic terminals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213, 1107-1114.
- Itoh T., Koshiba S., Kigawa T., Kikuchi A., Yokoyama S. und Takenawa T. (2001). Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science* 291, 1047-1051.
- Iwahashi J. und Hamada N. (2003). Human reticulon 1-A and 1-B interact with a medium chain of the AP-2 adaptor complex. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 49, OL467-471.
- Jahn R. und Südhof T. C. (1999). Membrane fusion and exocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 863-911.
- Jahn R. (2000). Sec1/Munc18 proteins: mediators of membrane fusion moving to center stage. *Neuron* 27, 201-204.
- Jahn R., Lang T. und Südhof T. C. (2003). Membrane Fusion. *Cell* 112, 519-533.
- Janz R. und Südhof T. C. (1998). Cellugyrin, a novel ubiquitous form of synaptogyrin that is phosphorylated by pp60c-src. *J. Biol. Chem.* 273, 2851-2857.
- Janz R. und Südhof T. C. (1999). SV2C is a synaptic vesicle protein with an unusually restricted localization: anatomy of a synaptic vesicle protein family. *Neuroscience* 94, 1279-1290.
- Janz R., Südhof T. C., Hammer R. E., Unni V., Siegelbaum S. A. und Bolshakov V. Y. (1999). Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I. *Neuron* 24, 687-700.
- Jarousse N., Wilson J. D., Arac D., Rizo J. und Kelly R. B. (2003). Endocytosis of synaptotagmin 1 is mediated by a novel, tryptophan-containing motif. *Traffic* 4, 468-478.
- Jefferson A. B., Auethavekiat V., Pot D. A., Williams L. T. und Majerus P. W. (1997). Signaling inositol polyphosphate-5-phosphatase. Characterization of activity and effect of GRB2 association. *J. Biol. Chem.* 272, 5983-5988.
- Jena B. P., Webster P., Geibel J. P., Van den Pol A. N. und Sritharan K. C. (1997). Localization of SH-PTP1 to synaptic vesicles: a possible role in neurotransmission. *Cell Biol. Int.* 21, 469-476.
- Jeng C. J., McCarroll S. A., Martin T. F., Floor E., Adams J., Krantz D., Butz S., Edwards R. und Schweitzer E. S. (1998). Thy-1 is a component common to multiple populations of synaptic vesicles. *J. Cell Biol.* 140, 685-698.
- Jez J. M., Flynn T. G. und Penning T. M. (1997). A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem. Pharmacol.* 54, 639-647.
- Jiang H., Luo J. Q., Urano T., Frankel P., Lu Z., Foster D. A. und Feig L. A. (1995). Involvement of Ral GTPase in v-Src-induced phospholipase D activation. *Nature* 378, 409-412.
- Jiang R., Gao B., Prasad K., Greene L. E. und Eisenberg E. (2000). Hsc70 chaperones clathrin and primes it to interact with vesicle membranes. *J. Biol. Chem.* 275, 8439-8447.
- Job C., Rauch C. T., Fischer E. H. und Margolis R. L. (1982). Recycling of cold-stable microtubules: evidence that cold stability is due to substoichiometric polymer blocks. *Biochemistry* 21, 509-515.

- Joberty G., Perlungher R. R., Sheffield P. J., Kinoshita M., Noda M., Haystead T. und Macara I. G. (2001). Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42. *Nat. Cell Biol.* 3, 861-866.
- Jonas P., Bischofberger J. und Sandkuhler J. (1998). Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science* 281, 419-424.
- Jordan R., Lemke E. A. und Klingauf J. (2005). Visualization of synaptic vesicle movement in intact synaptic boutons using fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophys. J.* 89, 2091-2102.
- Jorgensen P. L., Hakansson K. O. und Karlisch S. J. (2003). Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu. Rev. Physiol.* 65, 817-849.
- Josselyn S. A., Shi C., Carlezon W. A. J., Neve R. L., Nestler E. J. und Davis M. (2001). Long-term memory is facilitated by cAMP response element-binding protein overexpression in the amygdala. *J. Neurosci.* 21, 2404-2412.
- Jovanovic J. N., Benfenati F., Siow Y. L., Sihra T. S., Sanghera J. S., Pelech S. L., Greengard P. und Czernik A. J. (1996). Neurotrophins stimulate phosphorylation of synapsin I by MAP kinase and regulate synapsin I-actin interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 3679-3683.
- Jullien-Flores V., Mahe Y., Mirey G., Leprince C., Meunier-Bisceuil B., Sorkin A. und Camonis J. H. (2000). RLIP76, an effector of the GTPase Ral, interacts with the AP2 complex: involvement of the Ral pathway in receptor endocytosis. *J. Cell Sci.* 113, 2837-2844.
- Junutula J. R., De Maziere A. M., Peden A. A., Ervin K. E., Advani R. J., Dijk S. M. v., Klumperman J. und Scheller R. H. (2004). Rab14 is involved in membrane trafficking between the Golgi complex and endosomes. *Mol. Biol. Cell* 15, 2218-2229.
- Kabsch W. und Vandekerckhove J. (1992). Structure and function of actin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21, 49-76.
- Kaksonen M., Toret C. P. und Drubin D. G. (2005). A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell* 123, 305-320.
- Kalia L. V., Gingrich J. R. und Salter M. W. (2004). Src in synaptic transmission and plasticity. *Oncogene* 23, 8007-8016.
- Kane P. M. (1995). Disassembly and reassembly of the yeast vacuolar H(+)-ATPase in vivo. *J. Biol. Chem.* 270, 17025-17032.
- Kao Y. H., Lassoova L., Bar-Yehuda T., Edwards R. H., Sterling P. und Vardi N. (2004). Evidence that certain retinal bipolar cells use both glutamate and GABA. *J. Comp. Neurol.* 478, 207-218.
- Karas M. und Hillenkamp F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* 60, 2299-2301.
- Karniguian A., Zahraoui A. und Tavitian A. (1993). Identification of small GTP-binding rab proteins in human platelets: thrombin-induced phosphorylation of rab3B, rab6, and rab8 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 7647-7651.
- Kato M., Sasaki M., 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, 31775-31778.
- Katz (1969). The release of neural transmitter substances (Liverpool, Liverpool Univ. Press).
- Kaur K. J. und Ruben L. (1994). Protein translation elongation factor-1 alpha from *Trypanosoma brucei* binds calmodulin. *J. Biol. Chem.* 269, 23045-23050.
- Kawabe H., Sakisaka T., Yasumi M., Shingai T., Izumi G., Nagano F., Deguchi-Tawarada M., Takeuchi M., Nakanishi H. und Takai Y. (2003). A novel rabconnectin-3-binding protein that directly binds a GDP/GTP exchange protein for Rab3A small G protein implicated in Ca(2+)-dependent exocytosis of neurotransmitter. *Genes Cells* 8, 537-546.
- Kawamura M., Eisenhofer G., Kopin I. J., Kador P. F., Lee Y. S., Tsai J. Y., Fujisawa S., Lizak M. J., Sinz A. und Sato S. (1999). Aldose reductase, a key enzyme in the oxidative deamination of norepinephrine in rats. *Biochem. Pharmacol.* 58, 517-524.
- Kawamura M., Eisenhofer G., Kopin I. J., Kador P. F., Lee Y. S., Fujisawa S. und Sato S. (2002). Aldose reductase: an aldehyde scavenging enzyme in the intraneuronal metabolism of norepinephrine in human sympathetic ganglia. *Auton. Neurosci.* 96, 131-139.
- Kawasaki-Nishi S., Bowers K., Nishi T., Forgac M. und Stevens T. H. (2001). The amino-terminal domain of the vacuolar proton-translocating ATPase a subunit controls targeting and in vivo dissociation, and the carboxyl-terminal domain affects coupling of proton transport and ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 276, 47411-47420.
- Keen J. H., Willingham M. C. und Pastan I. H. (1979). Clathrin-coated vesicles: isolation, dissociation and factor-dependent reassociation of clathrin baskets. *Cell* 16, 303-312.
- Keller F., Rimvall K., Barbe M. F. und Levitt P. (1989). A membrane glycoprotein associated with the limbic system mediates the formation of the septo-hippocampal pathway in vitro. *Neuron* 3, 551-561.
- Khvotchev M. V., Ren M., Takamori S., Jahn R. und Südhof T. C. (2003). Divergent functions of neuronal Rab11b in Ca2+-regulated versus constitutive exocytosis. *J. Neurosci.* 23, 10531-10539.

- Khvotchev M. V. und Südhof T. C. (2004). Stimulus-dependent dynamic homo- and heteromultimerization of synaptobrevin/VAMP and synaptophysin. *Biochemistry* 43, 15037-13043.
- Kim K., Galletta B. J., Schmidt K. O., Chang F. S., Blumer K. J. und Cooper J. A. (2006). Actin-based Motility during Endocytosis in Budding Yeast. *Mol. Biol. Cell* Epub ahead of print.
- Kim S., Ko J., Kim J. H., Choi E. C. und Na D. S. (2001). Differential effects of annexins I, II, III, and V on cytosolic phospholipase A2 activity: specific interaction model. *FEBS Lett.* 489, 243-248.
- King S. M., Barbarese E., Dillman J. F. r., Patel-King R. S., Carson J. H. und Pfister K. K. (1996). Brain cytoplasmic and flagellar outer arm dyneins share a highly conserved Mr 8,000 light chain. *J. Biol. Chem.* 271, 19358-19366.
- Kinoshita A., Noda M. und Kinoshita M. (2000). Differential localization of septins in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 428, 223-239.
- Kinoshita A. (2003). Assembly of mammalian septins. *J. Biochem. (Tokyo)* 134, 491-496.
- Kinoshita M., Kumar S., Mizoguchi A., Ide C., Kinoshita A., Haraguchi T., Hiraoka Y. und Noda M. (1997). Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. *Genes Dev.* 11, 1535-1547.
- Kinoshita M., Field C. M., Coughlin M. L., Straight A. F. und Mitchison T. J. (2002). Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins. *Dev. Cell* 3, 791-802.
- Kinoshita N., Kimura K., Matsumoto N., Watanabe M., Fukaya M. und Ide C. (2004). Mammalian septin Sept2 modulates the activity of GLAST, a glutamate transporter in astrocytes. *Genes Cells* 9, 1-14.
- Kirchhausen T. und Harrison S. C. (1981). Protein organization in clathrin trimers. *Cell* 23, 755-761.
- Kirchhausen T. (1999). Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 15, 705-732.
- Kislauskis E. H., Zhu X. und Singer R. H. (1994). Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype. *J. Cell Biol.* 127, 441-451.
- Kitamura Y., Kitamura T., Sakaue H., Maeda T., Ueno H., Nishio S., Ohno S., Osada S., Sakaue M., Ogawa W. und Kasuga M. (1997). Interaction of Nck-associated protein 1 with activated GTP-binding protein Rac. *Biochem. J.* 322, 873-878.
- Klarskov K. und Naylor S. (2002). India Ink staining after sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and in conjunction with Western blots for peptide mapping by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 35-42.
- Klenchin V. A. und Martin T. F. (2000). Priming in exocytosis: attaining fusion-competence after vesicle docking. *Biochimie* 82, 399-407.
- Klenchov V. A. und Martin T. F. (2000). Priming in exocytosis: attaining fusion-competence after vesicle docking. *Biochimie* 82, 399-407.
- Knopp E. A., Arndt T. L., Eng K. L., Caldwell M., LeBoeuf R. C., Deeb S. S. und O'Brien K. D. (1999). Murine phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: cDNA sequence, tissue expression, and mapping. *Mamm. Genome* 10, 601-605.
- Knoth J., Zallakian M. und Njus D. (1982). Mechanisms of proton-linked monoamine transport in chromaffin granule ghosts. *Fed. Proc.* 41, 2742-2745.
- Knoll H. R. (1978). Association of glycolytic enzymes with particulate fractions from nerve endings. *Biochim. Biophys. Acta* 522, 1-9.
- Koepsell H., Korn K., Ferguson D., Menuhr H., Ollig D. und Haase W. (1984). Reconstitution and partial purification of several Na⁺ cotransport systems from renal brush-border membranes. Properties of the L-glutamate transporter in proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* 259, 6548-6568.
- Koh J. Y. (2001). Zinc and disease of the brain. *Mol. Neurobiol.* 42, 99-106.
- Kokubo H., Helms J. B., Ohno-Iwashita Y., Shimada Y., Horikoshi Y. und Yamaguchi H. (2003). Ultrastructural localization of flotillin-1 to cholesterol-rich membrane microdomains, rafts, in rat brain tissue. *Brain Res.* 965, 83-90.
- Kramer E. M., Schardt A. und Nave K. A. (2001). Membrane traffic in myelinating oligodendrocytes. *Microsc. Res. Tech.* 52, 656-671.
- Krauss M., Kinuta M., Wenk M. R., De Camilli P., Takei K. und Haucke V. (2003). ARF6 stimulates clathrin/AP-2 recruitment to synaptic membranes by activating phosphatidylinositol phosphate kinase type Igamma. *J. Cell Biol.* 162, 113-124.
- Kruger J. M., Fukushima T., Cheperanov V., Borregaard N., Loeve C., Shek C., Sharma K., Tanswell A. K., Chow C. W. und Downey G. P. (2002). Protein-tyrosine phosphatase MEG2 is expressed by human neutrophils. Localization to the phagosome and activation by polyphosphoinositides. *J. Biol. Chem.* 277, 2620-2628.
- Kutay U., Ahnert-Hilger G., Hartmann E., Wiedenmann B. und Rapoport T. A. (1995). Transport route for synaptobrevin via a novel pathway of insertion into the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J.* 14, 217-223.
- Kweon D. H., Kim C. S. und Shin Y. K. (2003). Regulation of neuronal SNARE assembly by the membrane. *Nat. Struct. Biol.* 10, 440-447.

- Kyte J. und Doolittle R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laezza C., Wolff J. und Bifulco M. (1997). Identification of a 48-kDa prenylated protein that associates with microtubules as 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in FRTL-5 cells. *FEBS Lett.* 413, 260-264.
- Lafer E. M. (2002). Clathrin-protein interactions. *Traffic* 3, 513-520.
- Lagenaur C., Kunemund V., Fischer G., Fushiki S. und Schachner M. (1992). Monoclonal M6 antibody interferes with neurite extension of cultured neurons. *J. Neurobiol.* 23, 71-88.
- Lagnado L., Gomis A. und Job C. (1996). Continuous vesicle cycling in the synaptic terminal of retinal bipolar cells. *Neuron* 17, 957-967.
- Lai F., Stubbs L. und K. A. (1994). Molecular analysis of mouse Rab11b: a new type of mammalian YPT/Rab protein. *Genomics* 22, 610-616.
- Lamarche N., Tapon N., Stowers L., Burbelo P. D., Aspenstrom P., Bridges T., Chant J. und Hall A. (1996). Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell* 87, 519-529.
- Lapierre L. A., Tuma P. L., Navarre J., Goldenring J. R. und Anderson J. M. (1999). VAP-33 localizes to both an intracellular vesicle population and with occludin at the tight junction. *J. Cell Sci.* 112, 3723-3732.
- Larisch S., Yi Y., Lotan R., Kerner H., Eimerl S., Tony Parks W., Gottfried Y., Birkey Reffey S., Caestecker M. P. d., Danielpir D., Book-Melamed N., Timberg R., Duckett C. S., Lechleider R. J., Steller H., Orly J., Kim S. J. und Roberts A. B. (2000). A novel mitochondrial septin-like protein, ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif. *Nat. Cell Biol.* 2, 915-921.
- Lariviere R. C. und Julien J. P. (2004). Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J. Neurobiol.* 58, 131-148.
- Larsen C. N. und Wang H. (2002). The ubiquitin superfamily: members, features, and phylogenies. *J. Proteome Res.* 1, 411-419.
- Lazzell D. R., Belizaire R., Thakur P., Sherry D. M. und Janz R. (2004). SV2B regulates synaptotagmin 1 by direct interaction. *J. Biol. Chem.* 279, 52124-52131.
- Leenders A. G., Silva F. H. L. d., Ghijsen W. E. und Verhage M. (2001). Rab3a is involved in transport of synaptic vesicles to the active zone in mouse brain nerve terminals. *Mol. Biol. Cell* 12, 3095-3102.
- Leenders A. G. und Sheng Z. H. (2005). Modulation of neurotransmitter release by the second messenger-activated protein kinases: implications for presynaptic plasticity. *Pharmacol. Ther.* 105, 69-84.
- Leenders A. G. M., Scholten G., Lange R. P. J. d., Silva F. H. L. d. und Ghijsen W. E. J. M. (2002). Sequential changes in synaptic vesicle pools and endosome-like organelles during depolarization near the active zone of central nerve terminals. *Neuroscience* 109, 195-206.
- Leifer D., Lipton S. A., Barnstable C. J. und Masland R. H. (1984). Monoclonal antibody to Thy-1 enhances regeneration of processes by rat retinal ganglion cells in culture. *Science* 224, 303-306.
- Leshchyn'ska I., Sytnyk V., Morrow J. S. und Schachner M. (2003). Neural cell adhesion molecule (NCAM) association with PKCbeta2 via beta1 spectrin is implicated in NCAM-mediated neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* 161, 625-639.
- Levius O. und Linial M. (1993). VAT-1 from Torpedo synaptic vesicles is a calcium binding protein: a study in bacterial expression systems. *Cell. Mol. Neurobiol.* 13, 483-492.
- Li C., Ullrich B., Zhang J. Z., Anderson R. G., Brose N. und Südhof T. C. (1995a). Ca(2+)-dependent and -independent activities of neural and non-neural synaptotagmins. *Nature* 375, 594-599.
- Li L. und Chen L. S. (2003). The molecular machinery of synaptic vesicle exocytosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 942-960.
- Li S., Okamoto T., Chun M., Sargiacomo M., Casanova J. E., Hansen S. H., Nishimoto I. und Lisanti M. P. (1995b). Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J. Biol. Chem.* 270, 15693-15701.
- Li Y., Hough C. J., Frederickson C. J. und Sarvey J. M. (2001). Induction of mossy fiber --> Ca3 long-term potentiation requires translocation of synaptically released Zn2+. *J. Neurosci.* 21, 8015-8025.
- Libich D. S. und Harauz G. (2002). Interactions of the 18.5 kDa isoform of myelin basic protein with Ca2+-calmodulin: in vitro studies using gel shift assays. *Mol. Cell. Biochem.* 241, 45-52.
- Lin L., Jeanclos E. M., Treuil M., Braunewell K. H., Gundelfinger E. D. und Anand R. (2002). The calcium sensor protein visinin-like protein-1 modulates the surface expression and agonist sensitivity of the alpha 4beta 2 nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* 277, 41872-41878.
- Lin R. C. und Scheller R. H. (1997). Structural organization of the synaptic exocytosis core complex. *Neuron* 19, 1087-1094.
- Lin R. C. und Scheller R. H. (2000). Mechanism of synaptic vesicle exocytosis. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 16, 19-49.

- Lin S. X. und Collins C. A. (1992). Immunolocalization of cytoplasmic dynein to lysosomes in cultured cells. *J. Cell Sci.* 101, 125-137.
- Lin W. und Szaro B. G. (1995). Neurofilaments help maintain normal morphologies and support elongation of neurites in *Xenopus laevis* cultured embryonic spinal cord neurons. *J. Neurosci.* 15, 8331-8344.
- Lindau M. und Gomperts B. D. (1991). Techniques and concepts in exocytosis: focus on mast cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1071, 429-471.
- Lindersson E., Lundvig D., Petersen C., Madsen P., Nyengaard J. R., Hojrup P., Moos T., Otzen D., Gai W. P., Blumbergs P. C. und Jensen P. H. (2005). p25alpha Stimulates alpha-synuclein aggregation and is co-localized with aggregated alpha-synuclein in alpha-synucleinopathies. *J. Biol. Chem.* 280, 5703-5715.
- Lingrel J. B. und Kuntzweiler T. (1994). Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase. *J. Biol. Chem.* 269, 19659-19662.
- Linial M., Miller K. und Scheller R. H. (1989). VAT-1: an abundant membrane protein from Torpedo cholinergic synaptic vesicles. *Neuron* 2, 1265-1273.
- Linial M. (1993). VAT-1 from Torpedo electric organ forms a high-molecular-mass protein complex within the synaptic vesicle membrane. *Eur. J. Biochem.* 216, 189-197.
- Linial M. und Levius O. (1993). The protein VAT-1 from Torpedo electric organ exhibits an ATPase activity. *Neurosci. Lett.* 152, 155-157.
- Link E., McMahon H., Mollard G. F. v., Yamasaki S., Niemann H., Südhof T. C. und Jahn R. (1993). Cleavage of cellubrevin by tetanus toxin does not affect fusion of early endosomes. *J. Biol. Chem.* 268, 18423-18426.
- Lipschutz J. H., Guo W., O'Brien L. E., Nguyen Y. H., Novick P. und Mostov K. E. (2000). Exocyst is involved in cystogenesis and tubulogenesis and acts by modulating synthesis and delivery of basolateral plasma membrane and secretory proteins. *Mol. Biol. Cell* 11, 4259-4275.
- Lipskaya T. Y. (2001). Mitochondrial creatine kinase: properties and function. *Biochemistry (Mosc.)* 66, 1098-1111.
- Littleton J. T., Serano T. L., Rubin G. M., Ganetzky B. und Chapman E. R. (1999). Synaptic function modulated by changes in the ratio of synaptotagmin I and IV. *Nature* 400, 757-760.
- Liu G., Tang J., Edmonds B. T., Murray J., Levin S. und Condeelis J. (1996). F-actin sequesters elongation factor 1alpha from interaction with aminoacyl-tRNA in a pH-dependent reaction. *J. Cell Biol.* 135, 953-963.
- Liu J. P., Deyoung S. M., Zhang M., Dold L. H. und Saltiel A. R. (2005). The stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C domain of flotillin-1 contains distinct sequences that direct plasma membrane localization and protein interactions in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 280, 16125-16134.
- Liu Q. R., Mandiyan S., Lopez-Corcuera B., Nelson H. und Nelson N. (1993). A rat brain cDNA encoding the neurotransmitter transporter with an unusual structure. *FEBS Lett.* 315, 114-118.
- Liu Y., Peter D., Roghani A., Schuldiner S., Prive G. G., Eisenberg D., Brecha N. und Edwards R. H. (1992). A cDNA that suppresses MPP⁺ toxicity encodes a vesicular monoamine transporter. *Cell* 70, 539-551.
- Lockyer P. J., Bottomley J. R., Reynolds J. S., McNulty T. J., Venkateswarlu K., Potter B. V., Dempsey C. E. und Cullen P. J. (1997). Distinct subcellular localisations of the putative inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptors GAP1P4BP and GAP1m result from the GAP1P4BP PH domain directing plasma membrane targeting. *Curr. Biol.* 7, 1007-1010.
- Lockyer P. J., Kupzig S. und Cullen P. J. (2001). CAPRI regulates Ca⁽²⁺⁾-dependent inactivation of the Ras-MAPK pathway. *Curr. Biol.* 11, 981-986.
- Lonart G. und Südhof T. C. (2000). Assembly of SNARE core complexes prior to neurotransmitter release sets the readily releasable pool of synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.* 275, 27703-27707.
- Low M. G. und Kincade P. W. (1985). Phosphatidylinositol is the membrane-anchoring domain of the Thy-1 glycoprotein. *Nature* 318, 62-64.
- Lu M., Holliday L. S., Zhang L., Dunn W. A. J. und Gluck S. L. (2001). Interaction between aldolase and vacuolar H⁺-ATPase: evidence for direct coupling of glycolysis to the ATP-hydrolyzing proton pump. *J. Biol. Chem.* 276, 30407-30413.
- Luo J. Q., Liu X., Hammond S. M., Colley W. C., Feig L. A., Frohman M. A., Morris A. J. und Foster D. A. (1997). RalA interacts directly with the Arf-responsive, PIP2-dependent phospholipase D1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 854-859.
- Luo J. Q., Liu X., Frankel P., Rotunda T., Ramos M., Flom J., Jiang H., Feig L. A., Morris A. J., Kahn R. A. und Foster D. A. (1998). Functional association between Arf and RalA in active phospholipase D complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 3632-3637.
- Luthl A., Laurent J. P., Figurov A., Muller D. und Schachner M. (1994). Hippocampal long-term potentiation and neural cell adhesion molecules L1 and NCAM. *Nature* 372, 777-779.
- Macara I. G., Baldarelli R., Field C. M., Glotzer M., Hayashi Y., Hsu S. C., Kennedy M. B., Kinoshita M., Lontine M., Low C., Maltrais L. J., McKenzie L., Mitchison T. J., Nishikawa T., Noda M., Petty E. M., Peifer M., Pringle J. R., Robinson P. J., Roth D., Russell S. E., Stuhlmann H., Tanaka M., Tanaka T.,

- Trimble W. S., Ware J., Zeleznik-Le N. J. und Zieger B. (2002). Mammalian septins nomenclature. *Mol. Biol. Cell.* 13, 4111-4113.
- Macfarlane D. E. (1986). Phorbol Diester-induced Phosphorylation of Nuclear Matrix Proteins in HL60 Promyelocytes. *J. Biol. Chem.* 261, 6947-6953.
- MacRae T. H. (1997). Tubulin post-translational modifications--enzymes and their mechanisms of action. *Eur. J. Biochem.* 244, 265-278.
- Madaule P., Axel R. und Myers A. M. (1987). Characterization of two members of the rho gene family from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 779-783.
- Madaule P., Furuyashiki T., Reid T., Ishizaki T., Watanabe G., Morii N. und Narumiya S. (1995). A novel partner for the GTP-bound forms of rho and rac. *FEBS Lett.* 377, 243-248.
- Madison D. L., Krueger W. H., Cheng D., Trapp B. D. und Pfeiffer S. E. (1999). SNARE complex proteins, including the cognate pair VAMP-2 and syntaxin-4, are expressed in cultured oligodendrocytes. *J. Neurochem.* 72, 988-998.
- Magga J. M., Jarvis S. E., Arnot M. I., Zamponi G. W. und Braun J. E. (2000). Cysteine string protein regulates G protein modulation of N-type calcium channels. *Neuron* 28, 195-204.
- Mahal L. K., Sequeira S. M., Gureasko J. M. und Sollner T. H. (2002). Calcium-independent stimulation of membrane fusion and SNAREpin formation by synaptotagmin I. *J. Cell Biol.* 158, 273-282.
- Mandell J. W., Czernik A. J., De Camilli P., Greengard P. und Townes-Anderson E. (1992). Differential expression of synapsins I and II among rat retinal synapses. *J. Neurosci.* 12, 1736-1749.
- Mann F., Zhukareva V., Pimenta A., Levitt P. und Bolz J. (1998). Membrane-associated molecules guide limbic and nonlimbic thalamocortical projections. *J. Neurosci.* 18, 9409-9419.
- Mao Y., Chen J., Maynard J. A., Zhang B. und Quijcho F. A. (2001). A novel all helix fold of the AP180 amino-terminal domain for phosphoinositide binding and clathrin assembly in synaptic vesicle endocytosis. *2001* 104, 433-440.
- Marazuela M., Acevedo A., Garcia-Lopez M. A., Adrados M., de Marco M. C. und Alonso M. A. (2004). Expression of MAL2, an integral protein component of the machinery for basolateral-to-apical transcytosis, in human epithelia. *J. Histochem. Cytochem.* 52, 243-252.
- Margittai M., Widengren J., Schweinberger E., Schroder G. F., Felekyan S., Hausteiner F., Konig M., Fasshauer D., Grubmüller H., Jahn R. und Seidel C. A. (2003). Single-molecule fluorescence resonance energy transfer reveals a dynamic equilibrium between closed and open conformations of syntaxin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 15516-15521.
- Marshall M. S. (1995). Ras target proteins in eukaryotic cells. *FASEB J.* 9, 1311-1318.
- Martin C. P., Vazquez J., Avila J. und Moreno F. J. (2002). P24, a glycogen synthase kinase 3 (GSK 3) inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta* 1586, 113-122.
- Martin G. M., Austad S. N. und Johnson T. E. (1996). Genetic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses. *Nat. Genet.* 13, 25-34.
- Martin T. F. (2001). PI(4,5)P(2) regulation of surface membrane traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 493-499.
- Martin T. F. (2002). Prime movers of synaptic vesicle exocytosis. *Neuron* 34, 9-12.
- Martinez-Guijarro F. J., Soriano E., Rio J. A. D. und Lopez-Garcia C. (1991). Zinc-positive boutons in the cerebral cortex of lizards show glutamate immunoreactivity. *J. Neurocytol.* 20, 834-843.
- Martinez-Hernandez A., Bell K. P. und Norenberg M. D. (1977). Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science* 195, 1356-1358.
- Masson J., Riad M., Chaudhry F., Darmon M., Aidouni Z., Conrath M., Giros B., Hamon M., Storm-Mathisen J., Descarries L. und Mestikawy S. e. (1999). Unexpected localization of the Na⁺/Cl⁻-dependent-like orphan transporter, Rxt1, on synaptic vesicles in the rat central nervous system. *Eur. J. Neurosci.* 11, 1349-1361.
- Matteis M. A. D. und Morrow J. S. (2000). Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway. *J. Cell Sci.* 113, 2331-2343.
- Maycox P. R., Deckwerth T., Hell J. W. und Jahn R. (1988). Glutamate uptake by brain synaptic vesicles. Energy dependence of transport and functional reconstitution in proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* 263, 15423-15428.
- Mayer H., Bauer H., Breuss J., Ziegler S. und Prohaska R. (2001). Characterization of rat LANCL1, a novel member of the lanthionine synthetase C-like protein family, highly expressed in testis and brain. *Gene* 269, 73-80.
- McBride H. M., Rybin V., Murphy C., Giner A., Teasdale R. und Zerial M. (1999). Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell* 98, 377-386.
- McMahon H., 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, 4760-4764.
- McMahon H. T., Missler M., Li C. und Südhof T. C. (1995). Complexins: cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function. *Cell* 83, 111-119.

- McNally E. M., Ly C. T. und Kunkel L. M. (1998). Human epsilon-sarcoglycan is highly related to alpha-sarcoglycan (adhelin), the limb girdle muscular dystrophy 2D gene. *FEBS Lett.* 422, 27-32.
- McNay E. C., Fries T. M. und Gold P. E. (2000). Decreases in rat extracellular hippocampal glucose concentration associated with cognitive demand during a spatial task. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 2881-2885.
- McPherson P. S., Garcia E. P., Slepnev V. I., David C., Zhang X., Grabs D., Sossin W. S., Bauerfeind R., Nemoto Y. und De Camilli P. (1996). A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature* 379, 353-357.
- Meinrenken C. J., Borst J. G. und Sakmann B. (2002). Calcium secretion coupling at calyx of held governed by nonuniform channel-vesicle topography. *J. Neurosci.* 22, 1648-1667.
- Merrifield C. J. (2004). Seeing is believing: imaging actin dynamics at single sites of endocytosis. *Trends Cell Biol.* 14, 352-358.
- Mestikawy S. E., Giros B., Pohl M., Hamon M., Kingsmore S. F., Seldin M. F. und Caron M. G. (1994). Characterization of an atypical member of the Na⁺/Cl⁻-dependent transporter family: chromosomal localization and distribution in GABAergic and glutamatergic neurons in the rat brain. *J. Neurochem.* 62, 445-455.
- Meyer T. S. und Lamberts B. L. (1965). Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim. Biophys. Acta* 107, 144-145.
- Millard T. H., Sharp S. J. und Machesky L. M. (2004). Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem. J.* 380, 1-17.
- Miller S. G. und Kennedy M. B. (1985). Distinct forebrain and cerebellar isozymes of type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase associate differently with the postsynaptic density fraction. *J. Biol. Chem.* 260, 9039-9046.
- Minoshima Y., Kawashima T., Hirose K., Tonozuka Y., Kawajiri A., Bao Y. C., Deng X., Tatsuka M., Narumiya S., May W. S. J., Nosaka T., Semba K., Inoue T., Satoh T., Inagaki M. und Kitamura T. (2003). Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. *Dev. Cell* 4, 549-560.
- Misura K. M., Gonzalez L. C., May A. P., Scheller R. H. und Weis W. I. (2001). Crystal structure and biophysical properties of a complex between the N-terminal SNARE region of SNAP25 and syntaxin 1a. *J. Biol. Chem.* 276, 41301-41309.
- Mitchell C. A., Brown S., Campbell J. K., Munday A. D. und Speed C. J. (1996). Regulation of second messengers by the inositol polyphosphate 5-phosphatases. *Biochem. Soc. Trans.* 24, 994-1000.
- Mithieux G., Audebet C. und Rousset B. (1988). Association of purified thyroid lysosomes to reconstituted microtubules. *Biochim. Biophys. Acta* 969, 121-130.
- Mitter D., Reisinger C., Hinz B., Hollmann S., Yelamanchili S. V., Treiber-Held S., Ohm T. G., Herrmann A. und Ahnert-Hilger G. (2003). The synaptophysin/synaptobrevin interaction critically depends on the cholesterol content. *J. Neurochem.* 84, 35-42.
- Miyazaki M., Shirataki H., Kohno H., Kaibuchi K., Tsugita A. und Takai Y. (1994). Identification as beta-adducin of a protein interacting with rabphilin-3A in the presence of Ca²⁺ and phosphatidylserine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205, 460-466.
- Mochida S., Kobayashi H., Matsuda Y., Yuda Y., Muramoto K. und Nonomura Y. (1994). Myosin II is involved in transmitter release at synapses formed between rat sympathetic neurons in culture. *Neuron* 13, 1131-1142.
- Mollard G. F. v., Stahl B., Walch-Solimena C., Takei K., Daniels L., Khoklatchev 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, 319-326.
- Molloy M. P., Herbert B. R., Walsh B. J., Tyler M. I., Traini M., Sanchez J. C., Hochstrasser D. F., Williams K. L. und Gooley A. A. (1998). Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 19, 837-844.
- Montiel C., Mendoza I., Garcia C. J., Awad Y., Garcia-Olivares J., Solis-Garrido L. M., Lara H., Garcia A. G. und Cardenas A. M. (2003). Distinct protein kinases regulate SNAP-25 expression in chromaffin cells. *J. Neurosci. Res.* 71, 353-364.
- Morciano M., Burré J., Corvey C., Karas M., Zimmermann H. und Volkandt W. (2005). Immunolocalization of two synaptic vesicle pools from synaptosomes: a proteomics analysis. *J. Neurochem.* 95, 1732-1745.
- Morel N., Dunant Y. und Israel M. (2001). Neurotransmitter release through the V0 sector of V-ATPase. *J. Neurochem.* 79, 485-488.
- Morris R. (1985). Thy-1 in developing nervous tissue. *Dev. Neurosci.* 7, 133-160.
- Moskalenko S., Henry D. O., Rosse C., Mirey G., Camonis J. H. und White M. A. (2002). The exocyst is a Ral effector complex. *Nat. Cell Biol.* 4, 66-72.
- Motecuccio C., Schiavo G. und Pantano S. (2005). SNARE complexes and neuroexocytosis: how many, how close? *Trends Biochem. Sci.* 30, 367-372.

- Mukobata S., Hibino T., Sugiyama A., Urano Y., Inatomi A., Kanai Y., Endo H. und Tashiro F. (2002). M6a acts as a nerve growth factor-gated Ca(2+) channel in neuronal differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297, 722-728.
- Mullany P. M. und Lynch M. A. (1998). Evidence for a role for synaptophysin in expression of long-term potentiation in rat dentate gyrus. *Neuroreport* 9, 2489-2494.
- Muller M., Moser R., Cheneval D. und Carafoli E. (1985). Cardiolipin is the membrane receptor for mitochondrial creatine phosphokinase. *J. Biol. Chem.* 260, 3839-3843.
- Müller M., Moser R., Cheneval D. und Carafoli E. (1985). Cardiolipin is the membrane receptor for mitochondrial creatine phosphokinase. *J. Biol. Chem.* 260, 3839-3843.
- Mullins R. D., Heuser J. A. und Pollard T. D. (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6181-6186.
- Mullock B. M., Smith C. W., Ihrke G., Bright N. A., Lindsay M., Parkinson E. J., Brooks D. A., Partin R. G., James D. E., Luzio J. P. und Piper R. C. (2000). Syntaxin 7 is localized to late endosome compartments, associates with Vamp 8, and is required for late endosome-lysosome fusion. *Mol. Biol. Cell* 11, 3137-3153.
- Murata Y., Sun-Wada G. H., Yoshimizu T., Yamamoto A., Wada Y. und Futai M. (2002). Differential localization of the vacuolar H+ pump with G subunit isoforms (G1 and G2) in mouse neurons. *J. Biol. Chem.* 277, 36296-36303.
- Muresan V., Lyass A. und Schnapp B. J. (1999). The kinesin motor KIF3A is a component of the presynaptic ribbon in vertebrate photoreceptors. *J. Neurosci.* 19, 1027-1037.
- Muresan V., Stankewich M. C., Steffen W., Morrow J. S., Holzbaun E. L. und Schnapp B. J. (2001). Dynactin-dependent, dynein-driven vesicle transport in the absence of membrane proteins: a role for spectrin and acidic phospholipids. *Mol. Cell* 7, 173-183.
- Murray B. A., Hemperley J. J., Prediger E. A., Edelman G. M. und Cunningham B. A. (1986). Alternatively spliced mRNAs code for different polypeptide chains of the chicken neural cell adhesion molecule (N-CAM). *J. Cell Biol.* 102, 189-193.
- Myers M. und Forgac M. (1993). Assembly of the peripheral domain of the bovine vacuolar H(+)-adenosine triphosphatase. *J. Cell. Physiol.* 156, 35-42.
- Nadal M. S., Ozaita A., Amarillo Y., Vega-Saenz de Miera E., Ma Y., Mo W., Goldberg E. M., Misumi Y., Ikehara Y., Neubert T. A. und Rudy B. (2003). The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K+ channels. *Neuron* 37, 449-461.
- Nagano F., Kawabe H., Nakanishi H., Shinohara M., Deguchi-Tawarada M., Takeuchi M., Sasaki T. und Takai Y. (2002). Rabconnectin-3, a novel protein that binds both GDP/GTP exchange protein and GTPase-activating protein for Rab3 small G protein family. *J. Biol. Chem.* 277, 9629-9632.
- Nagy G., Matti U., Nehring R. B., Binz T., Rettig J., Neher E. und Sorensen J. B. (2002). Protein kinase C-dependent phosphorylation of synaptosome-associated protein of 25 kDa at Ser187 potentiates vesicle recruitment. *J. Neurosci.* 22, 9278-9286.
- Nagy G., Reim K., Matti U., Brose N., Binz T., Rettig J., Neher E. und Sorensen J. B. (2004). Regulation of releasable vesicle pool sizes by protein kinase A-dependent phosphorylation of SNAP-25. *Neuron* 41, 417-429.
- Nakashima S., Morinaka K., Koyama S., Ikeda M., Kishida M., Okawa K., Iwamatsu A., Kishida S. und Kikuchi A. (1999). Small G protein Ral and its downstream molecules regulate endocytosis of EGF and insulin receptors. *EMBO J.* 18, 3629-3642.
- Nakielnny S., Cohen P., Wu J. und Sturgill T. (1992). MAP kinase activator from insulin-stimulated skeletal muscle is a protein threonine/tyrosine kinase. *EMBO J.* 11, 2123-2129.
- Naslavsky N., Boehm M., Backlund P. S. J. und Caplan S. (2004). Rabenosyn-5 and EHD1 interact and sequentially regulate protein recycling to the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell* 15, 2410-2422.
- Naslavsky N. und Caplan S. (2005). C-terminal EH-domain-containing proteins: consensus for a role in endocytic trafficking, EH? *J. Cell Sci.* 118, 4093-4101.
- Neher E. und Zucker R. S. (1993). Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cel. *Neuron* 10, 21-30.
- Nelson N. und Harvey W. R. (1999). Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases. *Physiol. Rev.* 79, 361-385.
- Nemoto Y., Wenk M. R., Watanabe M., Daniell L., Murakami S., Ringstad N., Yamada H., Takei K. und De Camilli P. (2001). Identification and characterization of a synaptojanin 2 splice isoform predominantly expressed in nerve terminals. *J. Biol. Chem.* 276, 41133-41142.
- Nestler E. J. und Greengard P. (1982). Nerve impulses increase the phosphorylation state of protein I in rabbit superior cervical ganglion. *Nature* 296, 452-454.
- Neuhoff V., Arold N., Taube D. und Ehrhardt W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255-262.

- Newton A. C. (2001). Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem. Rev.* 101, 2353-2364.
- Ngsee J. K., Elferink L. A. und Scheller R. H. (1991). A family of ras-like GTP-binding proteins expressed in electromotor neurons. *J. Biol. Chem.* 266, 2675-2680.
- Nickerson J. A., Krockmalnic G., Wan K. M. und Penman S. (1997). The nuclear matrix revealed by eluting chromatin from a cross-linked nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 4446-4450.
- Nie Z., Ranjan R., Wenniger J. J., Hong S. N., Bronk P. und Zinsmaier K. E. (1999). Overexpression of cysteine-string proteins in *Drosophila* reveals interactions with syntaxin. *J. Neurosci.* 19, 10270-10279.
- Nielander H. B., Onofri F., Valtorta F., Schiavo G., Montecucco C., Greengard P. und Benfenati F. (1995). Phosphorylation of VAMP/synaptobrevin in synaptic vesicles by endogenous protein kinases. *J. Neurochem.* 65, 1712-1720.
- Nielsen E., Severin F., Backer J. M., Hyman A. A. und Zerial M. (1999). Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nat. Cell Biol.* 1, 376-382.
- Nishi T. und Forgac M. (2002). The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 94-103.
- Nishiyama A., Endo T., Takeda S. i. und Imamura M. (2004). Identification and characterization of ϵ -sarcoglycans in the central nervous system. *Mol. Brain Res.* 125, 1-12.
- 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, 8061-8073.
- Nonet M. L., Holgado A. M., Brewer F., Serpe C. J., Norbeck B. A., Holleran J., Wei L., Hartweg E., Jorgensen E. M. und Alfonso A. (1999). UNC-11, a *Caenorhabditis elegans* AP180 homologue, regulates the size and protein composition of synaptic vesicles. *Mol. Biol. Cell* 10, 2343-2360.
- Norris F. A., Ungewickell E. und Najerus P. W. (1995). Inositol hexakisphosphate binds to clathrin assembly protein 3 (AP-3/AP180) and inhibits clathrin cage assembly in vitro. *J. Biol. Chem.* 270, 214-217.
- Nosten-Bertrand M., Errington M. L., Murphy K. P., Tokugawa Y., Barboni E., Kozlova E., Michalovich D., Morris R. G., Silver J., Stewart C. L., Bliss T. V. und Morris R. J. (1996). Normal spatial learning despite regional inhibition of LTP in mice lacking Thy-1. *Nature* 379, 826-829.
- Nourbakhsh M. und Hauser H. (1999). Constitutive silencing of IFN-beta promoter is mediated by NRF (NF-kappaB-repressing factor), a nuclear inhibitor of NF-kappaB. *EMBO J.* 18, 6415-6425.
- O'Brien K. D., Alpers C. E., Hokanson J. E. und Chait A. (1996). Oxidation-specific epitopes in human coronary atherosclerosis are not limited to oxidized low-density lipoprotein. *Circulation* 94, 1216-1225.
- Oertle T., Haar M. E. v. d., Bandtlow C. E., Robeva A., Burfeind P., Buss A., Huber A. B., Simonen M., Schnell L., Brosamle C., Kaupmann K., Vallon R. und Schwab M. E. (2003). Nogo-A inhibits neurite outgrowth and cell spreading with three discrete regions. *J. Neurosci.* 23, 5393-5406.
- O'Farrell P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.
- Ohno H., Aguilar R. C., Yeh D., Taura D., Saito T. und Bonifacino J. S. (1998). The medium subunits of adaptor complexes recognize distinct but overlapping sets of tyrosine-based sorting signals. *J. Biol. Chem.* 273, 25915-25921.
- Ohta Y., Nishida E. und Sakai H. (1986). Type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase binds to actin filaments in a calmodulin-sensitive manner. *FEBS Lett.* 208, 423-426.
- Ohya T., Sasaki M., Kato M. und Takai Y. (1998). Involvement of Rabphilin3 in endocytosis through interaction with Rabaptin5. *J. Biol. Chem.* 273, 613-617.
- Ohyama A., Hosaka K., Komiya Y., Akagawa K., Yamauchi E., Taniguchi H., Sasagawa N., Kumakura K., Mochida S., Yamauchi T. und Igarashi M. (2002). Regulation of exocytosis through Ca²⁺/ATP-dependent binding of autophosphorylated Ca²⁺/calmodulin-activated protein kinase II to syntaxin 1A. *J. Neurosci.* 22, 3342-3351.
- Oishi H., Sasaki T. und Takai Y. (1996). Interaction of both the C2A and C2B domains of rabphilin3 with Ca²⁺ and phospholipid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229, 498-503.
- Olive S., Dubois C., Schachner M. und Rougon G. (1995). The F3 neuronal glycosylphosphatidylinositol-linked molecule is localized to glycolipid-enriched membrane subdomains and interacts with L1 and fyn kinase in cerebellum. *J. Neurochem.* 65, 2307-2317.
- O'Malley D. M., Sandell J. H. und Masland R. H. (1992). Co-release of acetylcholine and GABA by the starburst amacrine cells. *J. Neurosci.* 12, 1394-1408.
- Onofri F., Giovedì S., Vaccaro P., Czernik A. J., Valtorta F., De Camilli P., Greengard P. und Benfenati F. (1997). Synapsin I interacts with c-Src and stimulates its tyrosine kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 12168-12173.
- Oertle T. und Schwab M. E. (2003). Nogo and its pARTNers. *Trends Cell Biol* 13, 187-194.

- Otto H., Hanson P. I. und Jahn R. (1997). Assembly and disassembly of a ternary complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP-25 in the membrane of synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 6197-6201.
- Owen D. J. (2004). Linking endocytic cargo to clathrin: structural and functional insights into coated vesicle formation. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 1-14.
- Oyler G. A., Higgins G. A., Hart R. A., Battenberg E., Billingsley M., Bloom F. E. und Wilson M. C. (1989). The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J. Cell Biol.* 106, 3039-3052.
- Pahner I., Holtje M., Winter S., Takamori S., Bellocchio E. E., Spicher K., Laake P., Nurnberg B., Ottersen O. P. und Ahnert-Hilger G. (2003). Functional G-protein heterotrimers are associated with vesicles of putative glutamatergic terminals: implications for regulation of transmitter uptake. *Mol. Cell. Neurosci.* 23, 398-413.
- Paleotti O., Macia E., Luton F., Klein S., Partisani M., Chardin P., Kirchhausen T. und Franco M. (2005). The small G-protein Arf6GTP recruits the AP-2 adaptor complex to membranes. *J. Biol. Chem.* 280, 21661-21666.
- Palmiter R. D., Cole T. B., Quaife C. J. und Findley S. D. (1996). ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 14934-14939.
- Pang D. T., Wang J. K., Valtorta F., Benfenati F. und Greengard P. (1988). Protein tyrosine phosphorylation in synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 762-766.
- Pankratov Y., Lalo U., Verkhatsky A. und North R. A. (2006). Vesicular release of ATP at central synapses. *Pfluegers Arch.* in press.
- Papakonstanti E. A. und Stournaras C. (2002). Association of PI-3 kinase with PAK1 leads to actin phosphorylation and cytoskeletal reorganization. *Mol. Biol. Cell* 13, 2946-2962.
- Pardos G. J. und Lentz T. L. (1976). Cytochemical localization of cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase activity in the neuromuscular junction and skeletal muscle of the newt. *Brain Res.* 107, 353-364.
- Park D. S., Levine B., Ferrari G. und Greene L. A. (1997). Cyclin dependent kinase inhibitors and dominant negative cyclin dependent kinase 4 and 6 promote survival of NGF-deprived sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 17, 8975-8983.
- Park J. B. (2001). Regulation of GTP-binding state in RalA through Ca²⁺ and calmodulin. *Exp. Mol. Med.* 33, 54-58.
- Parker J. M., Guo D. und Hodges R. S. (1986). New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* 25, 5425-5432.
- Paturle-Lafanechere L., Manier M., Trigault N., Pirollet F., Mazarguil H. und Job D. (1994). Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. *J. Cell Sci.* 107, 1529-1543.
- Peng J., Kim M. J., Cheng D., Duong D. M. und Sheng M. (2004). Semiquantitative proteomic analysis of rat forebrain postsynaptic density fractions by mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 279, 21003-21011.
- Peng X. R., Jia Z., Zhang Y., Ware J. und Trimble W. S. (2002). The septin CDCrel-1 is dispensable for normal development and neurotransmitter release. *Mol. Cell. Biol.* 22, 378-387.
- Percy J. M., Pryde J. G. und Apps D. K. (1985). Isolation of ATPase I, the proton pump of chromaffin-granule membranes. *Biochem. J.* 231, 557-564.
- Pereira-Leal J. B. und Seabra M. C. (2001). Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J. Mol. Biol.* 313, 889-901.
- Perin M. S. (1996). Mirror image motifs mediate the interaction of the COOH terminus of multiple synaptotagmins with the neurexins and calmodulin. *Biochemistry* 35, 13808-13816.
- Persohn E., Pollerberg G. E. und Schachner M. (1989). Immunoelectron-microscopic localization of the 180 kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM in postsynaptic membranes. *J. Comp. Neurol.* 288, 92-100.
- Persson B., Zigler J. S. J. und Jornvall H. (1994). A super-family of medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). Sub-lines including zeta-crystallin, alcohol and polyol dehydrogenases, quinone oxidoreductase enoyl reductases, VAT-1 and other proteins. *Eur. J. Biochem.* 226, 15-22.
- Peters (1991). The fine structure of the nervous system (New York/Oxford, Oxford Univ. Press).
- Peters C. und Mayer A. (1998). Ca²⁺/calmodulin signals the completion of docking and triggers a late step of vacuole fusion. *Nature* 396, 575-580.
- Peters C., Andrews P. D., Stark M. J., Cesaro-Tadic S., Glatz A., Podtelejnikov A., Mann M. und Mayer A. (1999). Control of the terminal step of intracellular membrane fusion by protein phosphatase 1. *Science* 285, 1084-1087.
- Peters C., Bayer M. J., Buhler S., Andersen J. S., Mann M. und Mayer A. (2001). Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature* 409, 581-588.

- Peters O., Schipke C. G., Hashimoto Y. und Kettenmann H. (2003). Different mechanisms promote astrocyte Ca^{2+} waves and spreading depression in the mouse neocortex. *J. Neurosci.* 23, 9888-9896.
- Petrucci T. C. und Morrow J. S. (1991). Actin and tubulin binding domains of synapsins Ia and Ib. *Biochemistry* 30, 413-422.
- Pevsner J., Hsu S. C., Braun J. E., Calakos N., Ting A. E., Bennett M. K. und Scheller R. H. (1994). Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex. *Neuron* 13, 353-361.
- Pfeffer S. (2003). Membrane domains in the secretory and endocytic pathways. *Cell* 112, 507-517.
- Pfeffer S. R. (1999). Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs. *Nat. Cell Biol.* 1, E17-E22.
- Pfeffer S. R. (2001). Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends Cell Biol.* 11, 487-491.
- Pfeffer S. R. (2005). Structural clues to Rab GTPase functional diversity. *J. Biol. Chem.* 280, 15485-15488.
- Philips M. R. (2005). Compartmentalized signalling of Ras. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 657-661.
- Pieribone V. A., Shupliakov O., Brodin L., Hilfiker-Rothenfluth S., Czernik A. J. und Greengard P. (1995). Distinct pools of synaptic vesicles in neurotransmitter release. *Nature* 375, 493-497.
- Pimenta A. F., Fischer I. und Levitt P. (1996). cDNA cloning and structural analysis of the human limbic-system-associated membrane protein (LAMP). *Gene* 170, 189-195.
- Pizon V., Chardin P., Lerosey I., Olofsson B. und Tavittian A. (1988). Human cDNAs rap1 and rap2 homologous to the Drosophila gene Dras3 encode proteins closely related to ras in the 'effector' region. *Oncogene* 3, 201-204.
- Pollard T. D. und Borisy G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465.
- Polo S., Confalonieri S., Salcini A. E. und Fiore P. P. D. (2003). EH and UIM: endocytosis and more. *Sci. STKE* 2003, re17.
- Polzin A., Shipitsin M., Goi T., Feig L. A. und Turner T. J. (2002). Ral-GTPase influences the regulation of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Mol. Cell Biol.* 22, 1714-1722.
- Prahlad V., Helfand B. T., Langford G. M., Vale R. D. und Goldman R. D. (2000). Fast transport of neurofilament protein along microtubules in squid axoplasm. *J. Cell Sci.* 113, 3939-3946.
- Prasad K., Barouch W., Martin B. M., Greene L. E. und Eisenberg E. (1995). Purification of a new clathrin assembly protein from bovine brain coated vesicles and its identification as myelin basic protein. *J. Biol. Chem.* 270, 30551-30556.
- Prehm S., Nickel V. und Prehm P. (1996). A mild purification method for polysaccharide binding membrane proteins: phase separation of digitonin extracts to isolate the hyaluronate synthase from *Streptococcus* sp. in active form. *Protein Expr. Purif.* 7, 343-346.
- Prekeris R., Mayhew M. W., Cooper J. B. und Terrian D. M. (1996). Identification and localization of an actin-binding motif that is unique to the epsilon isoform of protein kinase C and participates in the regulation of synaptic function. *J. Cell Biol.* 132, 77-90.
- Prekeris R. und Terrian D. M. (1997). Brain myosin V is a synaptic vesicle-associated motor protein: evidence for a Ca^{2+} -dependent interaction with the synaptobrevin-synaptophysin complex. *J. Cell Biol.* 137, 1589-1601.
- Pyle J. L., Kavalali E. T., Piedras-Renteria E. S. und Tsien R. W. (2000a). Rapid release of readily releasable pool vesicles at hippocampal synapses. *Neuron* 28, 221-231.
- Pyle R. A., Schivell A. E., Hidaka H. und Bajjalieh S. M. (2000b). Phosphorylation of synaptic vesicle protein 2 modulates binding to synaptotagmin. *J. Biol. Chem.* 275, 17195-17200.
- Qualmann B., Kessels M. M. und Kelly R. B. (2000). Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 150, F111-F116.
- Qualmann B. und Kessels M. M. (2002). Endocytosis and the cytoskeleton. *Int. Rev. Cytol.* 220, 93-144.
- Rabilloud T. (1996). Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. *Electrophoresis* 17, 813-829.
- Rais I., Karas M. und Schägger H. (2004). Two-dimensional electrophoresis for the isolation of integral membrane proteins and mass spectrometric identification. *Proteomics* 4, 2567-2571.
- Rao M. V., Engle L. J., Mohan P. S., Yuan A., Qiu D., Cataldo A., Hassinger L., Jacobsen S., Lee V. M., Andreadis A., Julien J. P., Bridgman P. C. und Nixon R. A. (2002). Myosin Va binding to neurofilaments is essential for correct myosin Va distribution and transport and neurofilament density. *J. Cell Biol.* 159, 279-290.
- Rappoport J. Z., Taha B. W. und Simon S. M. (2003). Movement of plasma-membrane-associated clathrin spots along the microtubule cytoskeleton. *Traffic* 4, 460-467.
- Reigada D., Díez-Pérez I., Gorostiza P., Verdaguer A., Aranda I. G. d., Pineda O., Vilarrasa J., Marsal J., Blasi J., Aleu J. und Solsona C. (2003). Control of neurotransmitter release by an internal gel matrix in synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 3485-3490.
- Reim K., Mansour M., Varoqueaux F., McMahon H. T., Südhof T. C., Brose N. und Rosenmund C. (2001). Complexins regulate a late step in Ca^{2+} -dependent neurotransmitter release. *Cell* 104, 71-81.

- Ren M., Zeng J., Lemos-Chiarandini C. D., Rosenfeld M., Adesnik M. und Sabatini D. D. (1996). In its active form, the GTP-binding protein rab8 interacts with a stress-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 5151-5155.
- Renzis S. d., Sonnichsen B. und Zerial M. (2002). Divalent Rab effectors regulate the sub-compartmental organization and sorting of early endosomes. *Nat. Cell Biol.* 4, 124-133.
- Rhee J. S., Betz A., Pyott S., Reim K., Varoqueaux F., Augustin I., Hesse D., Südhof T. C., Takahashi M., Rosenmund C. und Brose N. (2002). Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs. *Cell* 108, 121-133.
- Rhee J. S., Li L. Y., Shin O. H., Rah J. C., Rizo J., Südhof T. C. und Rosenmund C. (2005). Augmenting neurotransmitter release by enhancing the apparent Ca²⁺ affinity of synaptotagmin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 18664-18669.
- Richards D. A., Guatimosim C., Rizzoli S. O. und Betz W. J. (2003). Synaptic vesicle pools at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 39, 529-541.
- Richards D. A., Rizzoli S. O. und Betz W. J. (2004). Effects of wortmannin and latrunculin A on slow endocytosis at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol.* 557, 77-91.
- Richter-Landsberg C. (2001). Organization and functional roles of the cytoskeleton in oligodendrocytes. *Microsc. Res. Tech.* 52, 628-636.
- Rickman C., Craxton M., Osborne S. und Davletov B. (2004). Comparative analysis of tandem C2 domains from the mammalian synaptotagmin family. *Biochem. J.* 378, 681-686.
- Risinger C. und Bennett M. K. (1999). Differential phosphorylation of syntaxin and synaptosome-associated protein of 25 kDa (SNAP-25) isoforms. *J. Neurochem.* 72, 614-624.
- Rizo J. und Südhof T. C. (2002). SNAREs and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat Rev Neurosci* 3, 641-653.
- Rizzoli S. O. und Betz W. J. (2004). The structural organization of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Science* 303, 2037-2039.
- Rizzoli S. O. und Betz W. J. (2005). Synaptic vesicle pools. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 57-69.
- Roberston S. E., Setty S. R., Sitaram A., Marks M. S., Lewis R. E. und Chou M. M. (2006). Extracellular Signal-regulated Kinase Regulates Clathrin-independent Endosomal Trafficking. *Mol. Biol. Cell.* 17, 645-657.
- Robinson M. S. (1987). 100-kD coated vesicle proteins: molecular heterogeneity and intracellular distribution studied with monoclonal antibodies. *J. Cell Biol.* 104, 887-895.
- Rodriguez O. C. und Cheney R. E. (2002). Human myosin-Vc is a novel class V myosin expressed in epithelial cells. *J. Cell Sci.* 115, 991-1004.
- Rogalski-Wilk A. A. und Cohen R. S. (1997). Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Activity and F-Actin Associations on Synaptosomes and Postsynaptic Densities of Porcine Cerebral Cortex. *Cell. Mol. Neurobiol.* 17, 51-70.
- 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, 10620-10624.
- Rojo M., Hovius R., Demel R., Wallimann T., Eppenberger H. M. und Nicolav K. (1991). Interaction of mitochondrial creatine kinase with model membranes. A monolayer study. *FEBS Lett.* 281, 123-129.
- Rosen L. B., Ginty D. D., Weber M. J. und Greenberg M. E. (1994). Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. *Neuron* 12, 1207-1221.
- Rosenblum K., Futter M., Jones M., Hulme E. C. und Bliss T. V. (2000). ERK1/II regulation by the muscarinic acetylcholine receptors in neurons. *J. Neurosci.* 20, 977-985.
- Rossetto O., Gorza L., Schiavo G., Schiavo N., Scheller R. H. und Montecucco C. (1996). VAMP/synaptobrevin isoforms 1 and 2 are widely and differentially expressed in nonneuronal tissues. *J. Cell Biol.* 132, 167-179.
- Rotem-Yehudar R., Galperin E. und Horowitz M. (2001). Association of insulin-like growth factor 1 receptor with EHD1 and SNAP29. *J. Biol. Chem.* 276, 33054-33060.
- Rothman J. E. (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372, 55-63.
- Roussel G., Trifilieff E., Lagenaur C. und Nussbaum J. L. (1998). Immunoelectron microscopic localization of the M6a antigen in rat brain. *J. Neurocytol.* 27, 695-703.
- Royle S. J. und Lagnado L. (2003). Endocytosis at the synaptic terminal. *J. Physiol.* 553, 345-355.
- Rozelle A. L., Machesky L. M., Yamamoto M., Driessens M. H., Insall R. H., Roth M. G., Luby-Phelps K., Marriott G., Hall A. und Yin H. L. (2000). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr. Biol.* 10, 311-320.
- Rubenstein J. L., Greengard P. und Czernik A. J. (1993). Calcium-dependent serine phosphorylation of synaptophysin. *Synapse* 13, 161-172.
- Ruiter N. D. d., Wolthuis R. M., Dam H. v., Burgering B. M. und Bos J. L. (2000). Ras-dependent regulation of c-Jun phosphorylation is mediated by the Ral guanine nucleotide exchange factor-Ral pathway. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8480-8488.
- Ryan T. A. (1999). Inhibitors of myosin light chain kinase block synaptic vesicle pool mobilization during action potential firing. *J. Neurosci.* 19, 1317-1323.

- Saegusa C., Fukuda M. und Mikoshiba K. (2002). Synaptotagmin V is targeted to dense-core vesicles that undergo calcium-dependent exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 277, 24499-24505.
- Sagne C., Mestikawy S. E., Isambert M. F., Hamon M., Henry J. P., Giros B. und Gasnier B. (1997). Cloning of a functional vesicular GABA and glycine transporter by screening of genome databases. *FEBS Lett.* 417, 177-183.
- Sakaguchi G., Orita S., Naito A., Maeda M., Igarashi H., Sasaki T. und Takai Y. (1998). A novel brain-specific isoform of beta spectrin: isolation and its interaction with Munc13. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248, 846-851.
- Sakata-Haga H., Kanemoto M., Maruyama D., Hoshi K., Mogi K., Narita M., Okado N., Ikeda Y., Nogami H., Fukui Y., Kojima I., Takeda J. und Hisano S. (2001). Differential localization and colocalization of two neuron-types of sodium-dependent inorganic phosphate cotransporters in rat forebrain. *Brain Res.* 902, 143-155.
- Sakisaka T., Itoh T., Miura K. und Takenawa T. (1997). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphatase regulates the rearrangement of actin filaments. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3841-3849.
- Sakisaka T., Meerlo T., Matteson J., Plutner H. und Balch W. E. (2002). Rab-alphaGDI activity is regulated by a Hsp90 chaperone complex. *EMBO J.* 21, 6125-6135.
- Sakurada K., Uchida K., Yamaguchi K., Aisaka K., Ito S., Ohmori T., Takeyama Y., Ueda T., Hori Y., Ohyanagi H. und al e. (1991). Molecular cloning and characterization of a ras p21-like GTP-binding protein (24KG) from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 1224-1232.
- Salazar G., Love R., Werner E., Doucette M. M., Cheng S., Levey A. und Faundez V. (2004). The zinc transporter ZnT3 interacts with AP-3 and it is preferentially targeted to a distinct synaptic vesicle subpopulation. *Mol. Biol. Cell* 15, 575-587.
- Salinovich O. und Montelaro R. C. (1986). Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 156, 341-347.
- Sandler R. und Smith A. D. (1991). Coexistence of GABA and glutamate in mossy fiber terminals of the primate hippocampus: an ultrastructural study. *J. Comp. Neurol.* 303, 177-192.
- Sankaranarayanan S. und Ryan T. A. (2000). Real-time measurements of vesicle-SNARE recycling in synapses of the central nervous system. *Nat. Cell Biol.* 2, 197-204.
- Santamaria A., Castellanos E., Gomez V., Bénédict P., Renau-Piqueras J., Morote J., Reventos J., Thomson T. M. und Paciucci R. (2005). PTOV1 enables the nuclear translocation and mitogenic activity of flotillin-1, a major protein of lipid rafts. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1900-1911.
- Santoni V., Molloy M. und Rabilloud T. (2000). Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis* 21, 1054-1070.
- Santos T. G., Souza D. O. und Tasca C. I. (2006). GTP uptake into rat brain synaptic vesicles. *Brain Res.* 1070, 71-76.
- Sapirstein V. S., Nolan C., Stern R., Ciocci M. und Masur S. K. (1988). Identification of the plasma membrane proteolipid protein as a constituent of brain coated vesicles and synaptic plasma membrane. *J. Neurochem.* 51, 925-933.
- Sara Y., Virmani T., Deak F., Liu X. und Kavalali E. T. (2005). An isolated pool of vesicles recycles at rest and drives spontaneous neurotransmission. *Neuron* 45, 563-573.
- Sassa T., Harada S., Ogawa H., Rand J. B., Maruyama I. N. und Hosono R. (1999). Regulation of the UNC-18-Caenorhabditis elegans syntaxin complex by UNC-13. *J. Neurosci.* 19, 4772-4777.
- Scala F. D., Dupuis L., Gaiddon C., Tapia M. D., Jokic N., Aguilar J. L. G. d., Raul J. S., Ludes B. und Loeffler J. P. (2005). Tissue specificity and regulation of the N-terminal diversity of reticulon 3. *Biochem. J.* 385, 125-134.
- Schafer D. A., Gill S. R., Cooper J. A., Heuser J. E. und Schroer T. A. (1994). Ultrastructural analysis of the dynactin complex: an actin-related protein is a component of a filament that resembles F-actin. *J. Cell Biol.* 126, 403-412.
- Schägger H. und Jagow G. v. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379.
- Scheper W., Zwart R. und Baas F. (2004). Rab6 membrane association is dependent of presenilin 1 and cellular phosphorylation events. *Mol. Brain Res.* 122, 17-23.
- Schiavo G., Gmachl M. J., Stenbeck G., Sollner T. H. und Rothman J. E. (1995). A possible docking and fusion particle for synaptic transmission. *Nature* 378, 733-736.
- Schiavo G., Gu Q. M., Prestwich G. D., Sollner T. H. und Rothman J. E. (1996). Calcium-dependent switching of the specificity of phosphoinositide binding to synaptotagmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 13327-13332.
- Schiavo G., Stenbeck G., Rothman J. E. und Sollner T. H. (1997). Binding of the synaptic vesicle v-SNARE, synaptotagmin, to the plasma membrane t-SNARE, SNAP-25, can explain docked vesicles at neurotoxin-treated synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 997-1001.

- Schiebler W., Jahn R., Doucet J. P., Rothlein J. und Greengard P. (1986). Characterization of synapsin I binding to small synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.* 261, 8383-8390.
- Schikorski T. und Stevens C. F. (1997). Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses. *J. Neurosci.* 17, 5858-5867.
- Schimmoller F., Simon I. und Pfeffer S. R. (1998). Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J. Biol. Chem.* 273, 22161-22164.
- Schivell A. E., Batchelor R. H. und Bajjalieh S. M. (1996). Isoform-specific, calcium-regulated interaction of the synaptic vesicle proteins SV2 and synaptotagmin. *J. Biol. Chem.* 271, 27770-27775.
- Schivell A. E., Mochida S., Kensel-Hammes P., Custer K. L. und Bajjalieh S. M. (2005). SV2A and SV2C contain a unique synaptotagmin-binding site. *Mol. Cell. Neurosci.* 29, 56-64.
- Schluter K., Jokusch B. M. und Rothkegel M. (1997). Profilins as regulators of actin dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* 1359, 97-109.
- Schluter 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, 5834-5846.
- Schluter O. M., Schmitz F., Jahn R., Rosenmund C. und Südhof T. C. (2004). A complete genetic analysis of neuronal Rab3 function. *J. Neurosci.* 24, 6629-6637.
- Schluter O. M., Basu J., Südhof T. C. und Rosenmund C. (2006). Rab3 superprimes synaptic vesicles for release: implications for short-term synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 26, 1239-1246.
- Schmid S. L. (1997). Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 511-548.
- Schmidt A., Wolde M., Thiele C., Fest W., Kratzin H., Podtelejnikov A. V., Witke W., Huttner W. B. und Soling H. D. (1999). Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature* 401, 133-141.
- Schmidt K. und Nichols B. J. (2004). Functional interdependence between septin and actin cytoskeleton. *BMC Cell. Biol.* 5, 43.
- Schnapp B. J. und Reese T. S. (1989). Dynein is the motor for retrograde axonal transport of organelles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 1548-1552.
- Scholte H. R. (1973). The separation and enzymatic characterization of inner and outer membranes of rat-heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 330, 283-293.
- Schroer T. A. (1994). Structure, function and regulation of cytoplasmic dynein. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 69-73.
- Schuster C. M., Davis G. W., Fetter R. D. und Goodman C. S. (1996). Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. I. Fasciclin II controls synaptic stabilization and growth. *Neuron* 17, 641-654.
- Segev N. (2001a). Ypt/rab gtpases: regulators of protein trafficking. *Sci. STKE* 100, RE11.
- Segev N. (2001b). Ypt and Rab GTPases: insight into functions through novel interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 500-511.
- Seigneurin-Berny D., Rolland N., Garin J. und Joyard J. (1999). Technical Advance: Differential extraction of hydrophobic proteins from chloroplast envelope membranes: a subcellular-specific proteomic approach to identify rare intrinsic membrane proteins. *Plant J.* 19, 217-228.
- Selcher J. C., Weeber E. J., Christian J., Nekrasova T., Landreth G. E. und Sweatt J. D. (2003). A role for ERK MAP kinase in physiologic temporal integration in hippocampal area CA1. *Learn. Mem.* 10, 26-39.
- Sepulveda M. R., Hidalgo-Sanchez M. und Mata A. M. (2004). Localization of endoplasmic reticulum and plasma membrane Ca²⁺-ATPases in subcellular fractions and sections of pig cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* 19, 542-551.
- Sever S., Damke H. und Schmid S. L. (2000). Dynamin:GTP controls the formation of constricted coated pits, the rate limiting step in clathrin-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* 150, 1137-1148.
- Severs N. J. (1988). Caveolae: static in-pocketings of the plasma membrane, dynamic vesicles or plain artifact? *J. Cell Sci.* 90, 341-348.
- Sewell J. L. und Kahn R. A. (1988). Sequences of the bovine and yeast ADP-ribosylation factor and comparison to other GTP-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 4620-4624.
- Shang W. H., Adachi Y., Nakamura A., Copeland T., Kim S. R. und Kamata T. (2004). Regulation of amphiphysin1 by mitogen-activated protein kinase: its significance in nerve growth factor receptor-mediated endocytosis. *J. Biol. Chem.* 279, 40890-40896.
- Shapira M., Zahi R. G., Dresbach T., Bresler T., Torres V. I., Gundelfinger E. D., Ziv N. E. und Garner C. C. (2003). Unitary assembly of presynaptic active zones from Piccolo-Bassoon transport vesicles. *Neuron* 38, 237-252.
- Shen K. und Meyer T. (1999). Dynamic control of CaMKII translocation and localization in hippocampal neurons by NMDA receptor stimulation. *Science* 284, 162-166.
- Sheng Z. H., Yokoyama C. T. und Catterall W. A. (1997). Interaction of the synprint site of N-type Ca²⁺ channels with the C2B domain of synaptotagmin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 5405-5410.

- Shevchenko A., Wilm M., Vorm O. und Mann M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850-858.
- Shields S. M., Ingebritsen T. S. und Kelly P. T. (1985). Identification of protein phosphatase 1 in synaptic junctions: dephosphorylation of endogenous calmodulin-dependent kinase II and synapse-enriched phosphoproteins. *J. Neurosci.* 5, 3414-3422.
- Shiff G., Synguelakis M. und Morel N. (1996). Association of syntaxin with SNAP 25 and VAMP (synaptobrevin) in Torpedo synaptosomes. *Neurochem. Int.* 29, 659-667.
- Shiina N., Gotoh Y., Kubomura N., Iwamatsu A. und Nishida E. (1994). Microtubule severing by elongation factor 1 alpha. *Science* 266, 282-285.
- Shimazaki Y., Nishiki T., Omori A., Sekiguchi M., Kamata Y., Kozaki S. und Takahashi M. (1996). Phosphorylation of 25-kDa synaptosome-associated protein. Possible involvement in protein kinase C-mediated regulation of neurotransmitter release. *J. Biol. Chem.* 271, 14548-14553.
- Shimizu K., Goldfarb M., Perucho M. und Wigler M. (1983). Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 383-387.
- 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, 2061-2068.
- Shupliakov O., Low P., Grabs D., Gad H., Chen H., David C., Takei K., De Camilli P. und Brodin L. (1997). Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions. *Science* 276, 259-263.
- Shupliakov O., Bloom O., Gustafsson J. S., Kjaerulf O., Low P., Tomilin N., Pieribone V. A., Greengard P. und Brodin L. (2002). Impaired recycling of synaptic vesicles after acute perturbation of the presynaptic actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 14476-14481.
- Sidhu R. S., Clough R. R. und Bhullar R. P. (2005). Regulation of phospholipase C-delta1 through direct interactions with the small GTPase Ral and calmodulin. *J. Biol. Chem.* 280, 21933-21941.
- Siesjo B. K. (1978). Brain Energy Metabolism. In Brain Energy Metabolism (New York, John Wiley & Sons), pp. 101-130.
- Sihra T. S., Wang J. K., Gorelick F. S. und Greengard P. (1989). Translocation of synapsin I in response to depolarization of isolated nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 8108-8112.
- Sikorski A. F., Terlecki G., Zagon I. S. und Goodman S. R. (1991). Synapsin I-mediated interaction of brain spectrin with synaptic vesicles. *J. Cell Biol.* 114, 313-318.
- Simonen M., V P., Weinmann O., Schnell L., Buss A., Ledermann B., Christ F., Sansig G., Putten H. v. d. und Schwab M. E. (2003). Systemic deletion of the myelin-associated outgrowth inhibitor Nogo-A improves regenerative and plastic responses after spinal cord injury. *Neuron* 38, 201-211.
- Simons K. und Zerial M. (1993). Rab proteins and the road maps for intracellular transport. *Neuron* 11, 789-799.
- Simonsen A., Lippe R., Christoforidis S., Gaullier J. M., Brech A., Callaghan J., Toh B. H., Murphy C., Zerial M. und Stenmark H. (1998). EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* 394, 494-498.
- Sindreu C. B., Varoqui H., Erickson J. D. und Perez-Clausell J. (2003). Boutons containing vesicular zinc define a subpopulation of synapses with low AMPAR content in rat hippocampus. *Cereb. Cortex* 13, 823-829.
- Singleton D. R., Wu T. T. und Castle J. D. (1997). Three mammalian SCAMPs (secretory carrier membrane proteins) are highly related products of distinct genes having similar subcellular distributions. *J. Cell Sci.* 110, 2099-2107.
- Sirover M. A. (1999). New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* 1432, 159-184.
- Skehel P. A., Martin K. C., Kandel E. R. und Bartsch D. (1995). VAMP-binding protein from Aplysia required for neurotransmitter release. *Science* 269, 1580-1583.
- Slobin L. I. (1980). The role of eucaryotic factor Tu in protein synthesis. The measurement of the elongation factor Tu content of rabbit reticulocytes and other mammalian cells by a sensitive radioimmunoassay. *Eur. J. Biochem.* 110, 555-563.
- Sluijs P. v. d., Hull M., Webster P., Male P., Goud B. und Mellman I. (1992). The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* 70, 729-740.
- Smart T. G., Xie X. und Krishek B. J. (1994). Modulation of inhibitory and excitatory amino acid receptor ion channels by zinc. *Prog. Neurobiol.* 42, 393-341.
- Smith C., Moser T., Xu T. und Neher E. (1998). Cytosolic Ca²⁺ acts by two separate pathways to modulate the supply of release-competent vesicles in chromaffin cells. *Neuron* 20, 1243-1253.
- Söllner T., Bennett M. K., Whiteheart S. W., Scheller R. H. und Rothman J. E. (1993a). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75, 409-418.
- Söllner T., Whiteheart S. W., Brunner M., Erdjument-Bromage H., Geromanos S., Tempst P. und Rothman J. E. (1993b). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362, 318-324.

- Song K. S., Li S., Okamoto T., Quilliam L. A., Sargiacomo M. und Lisanti M. P. (1996). Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *J. Biol. Chem.* 271, 9690-9697.
- Soussan L., Burakov D., Daniels M. P., Toister-Achituv M., Porat A., Yarden Y. und Elazar Z. (1999). ERG30, a VAP-33-related protein, functions in protein transport mediated by COPI vesicles. *J. Cell Biol.* 146, 301-311.
- Spector T. (1978). Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for less than or equal to 0.5 to 50 microgram of protein. *Anal. Biochem.* 86, 142-146.
- Speese S. D., Trotta N., Rodesch C. K., Aravamudan B. und Broadie K. (2003). The ubiquitin proteasome system acutely regulates presynaptic protein turnover and synaptic efficacy. *Curr. Biol.* 13, 899-910.
- Spilker C., Richter K., Smalla K. H., Manahan-Vaughan D., Gundelfinger E. D. und Braunewell K. H. (2000). The neuronal EF-hand calcium-binding protein visinin-like protein-3 is expressed in cerebellar Purkinje cells and shows a calcium-dependent membrane association. *Neuroscience* 96, 121-129.
- Spilker C., Gundelfinger E. D. und Braunewell K. H. (2002). Evidence for different functional properties of the neuronal calcium sensor proteins VILIP-1 and VILIP-3: from subcellular localization to cellular function. *Biochim. Biophys. Acta* 1600, 118-127.
- Spilker C. und Braunewell K. H. (2003). Calcium-myristoyl switch, subcellular localization, and calcium-dependent translocation of the neuronal calcium sensor protein VILIP-3, and comparison with VILIP-1 in hippocampal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 24, 766-778.
- Sprinzl M. (1994). Elongation factor Tu: a regulatory GTPase with an integrated effector. *Trends Biochem. Sci.* 19, 245-250.
- 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, 1799-1809.
- Staunton J., Ganetzky B. und Nonet M. L. (2001). Rabphilin potentiates soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor function independently of rab3. *J. Neurosci.* 21, 9255-9264.
- Steiner P., Kulangara K., Sarria J. C., Glauser L., Regazzi R. und Hirling H. (2004). Reticulon 1-C/neuroendocrine-specific protein-C interacts with SNARE proteins. *J. Neurochem.* 89, 569-580.
- Stenius K., Janz R., Südhof T. C. und Jahn R. (1995). Structure of synaptogyrin (p29) defines novel synaptic vesicle protein. *J. Cell Biol.* 131, 1801-1809.
- Stenmark H., Parton R. G., Steele-Mortimer O., Lutcke A., Gruenberg J. und Zerial M. (1994). Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J.* 13, 1287-1296.
- Stenmark H., Vitale G., Ullrich O. und Zerial M. (1995). Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion. *Cell* 83, 423-432.
- Stevens C. F. und Sullivan J. M. (1998). Regulation of the readily releasable vesicle pool by protein kinase C. *Neuron* 21, 885-893.
- Stigliani S., Zappettini S., Raiteri L., Passalacqua M., Melloni E., Venturi C., Tacchetti C., Diaspro A., Usai C. und Bonanno G. (2006). Glia re-sealed particles freshly prepared from adult rat brain are competent for exocytotic release of glutamate. *J. Neurochem.* 96, 656-668.
- Stoeckli E. T. und Landmesser L. T. (1995). Axonin-1, Nr-CAM, and Ng-CAM play different roles in the in vivo guidance of chick commissural neurons. *Neuron* 14, 1165-1179.
- Su Y., Zhou A., Al-Lamki R. S. und Karet F. E. (2003). The a-subunit of the V-type H⁺-ATPase interacts with phosphofruktokinase-1 in humans. *J. Biol. Chem.* 278, 20013-20018.
- Südhof T. C., Lottspeich F., Greengard P., Mehl F. und Jahn R. (1987). A synaptic vesicle protein with a novel cytoplasmic domain and four transmembrane regions. *Science* 238, 1142-1144.
- Südhof T. C., Baumert M., Perin M. S. und Jahn R. (1989). A synaptic vesicle membrane protein is conserved from mammals to Drosophila. *Neuron* 2, 1475-1481.
- Südhof T. C. (1997). Function of Rab3 GDP-GTP exchange. *Neuron* 18, 519-522.
- Südhof T. C. (2000). The synaptic vesicle cycle revisited. *Neuron* 28, 317-320.
- Südhof T. C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 509-547.
- Sugihara K., Asano S., Tanaka K., Iwamatsu A., Okawa K. und Ohta Y. (2002). The exocyst complex binds the small GTPase RalA to mediate filopodia formation. *Nat. Cell. Biol.* 4, 73-78.
- Sugita S., Hata Y. und Südhof T. C. (1996). Distinct Ca²⁺-dependent properties of the first and second C2-domains of synaptotagmin I. *J. Biol. Chem.* 271, 1262-1265.
- Sugita S., Janz R. und Südhof T. C. (1999). Synaptogyrins regulate Ca²⁺-dependent exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 274, 18893-18901.
- Sugita S., Shin O. H., Han W., Lao Y. und Südhof T. C. (2002). Synaptotagmins form a hierarchy of exocytotic Ca²⁺ sensors with distinct Ca²⁺ affinities. *EMBO J.* 21, 270-280.
- Suh S. W., Chen J. W., Motamedi M., Bell B., Listiak K., Pons N. F., Danscher G. und Frederickson C. J. (2000). Evidence that synaptically-released zinc contributes to neuronal injury after traumatic brain injury. *Brain Res.* 852, 268-273.

- Sulzer D. und Rayport S. (2000). Dale's principle and glutamate corelease from ventral midbrain dopamine neurons. *Amino Acids* 19, 45-52.
- Sumner J. P., Dow J. A., Earley F. G., Klein U., Jager D. und Wieczorek H. (1995). Regulation of plasma membrane V-ATPase activity by dissociation of peripheral subunits. *J. Biol. Chem.* 270, 5649-5653.
- Supekova L., Sbia M., Supek F., Ma Y. und Nelson N. (1996). A novel subunit of vacuolar H(+)-ATPase related to the b subunit of F-ATPases. *J. Exp. Biol.* 199, 1147-1156.
- Surka M. C., Tsang C. W. und Trimble W. S. (2002). The mammalian septin MSF localizes with microtubules and is required for completion of cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* 13, 3532-3545.
- Sutton R. B., Fasshauer D., Jahn R. und Brunger A. T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395, 347-353.
- Suzuki T., Nishiyama K., Yamamoto A., Inazawa J., Iwaki T., Yamada T., Kanazawa I. und Sakaki Y. (2000). Molecular cloning of a novel apoptosis-related gene, human Nap1 (NCKAP1), and its possible relation to Alzheimer disease. *Genomics* 63, 246-254.
- Takahashi M., Tomizawa K., Ishiguro K., Sato K., Omori A., Sato S., Shiratsuchi A., Uchida T. und Imahori K. (1991). A novel brain-specific 25 kDa protein (p25) is phosphorylated by a Ser/Thr-Pro kinase (TPK II) from tau protein kinase fractions. *FEBS Lett.* 289, 37-43.
- Takahashi S., Yamamoto H., Matsuda Z., Ogawa M., Yagyu K., Taniguchi T., Miyata T., Kaba H., Higuchi T. und Okutani F. (1995). Identification of two highly homologous presynaptic proteins distinctly localized at the dendritic and somatic synapses. *FEBS Lett.* 368, 455-460.
- Takai Y., Sasaki T. und Matozaki T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol. Rev.* 81, 153-208.
- Takamori S., Riedel D. und Jahn R. (2000). Immunolocalization of GABA-specific synaptic vesicles defines a functionally distinct subset of synaptic vesicles. *J. Neurosci.* 20, 4904-4911.
- Takeda A. (2000). Movement of zinc and its functional significance in the brain. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 34, 137-148.
- Takehashi M., Tanaka S., Stedeford T., Banasik M., Tsukagoshi-Nagai H., Kinoshita N., Kawamata T. und Ueda K. (2004). Expression of septin 3 isoforms in human brain. *Gene Expr.* 11, 271-278.
- Takei K., Slepnev V. I., Haucke V. und De Camilli P. (1999). Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Cell Biol.* 1, 33-39.
- Takei K., Yoshida Y. und Yamada H. (2005). Regulatory mechanisms of dynamin-dependent endocytosis. *J. Biochem. (Tokyo)* 137, 243-247.
- Taketomi M., Kinoshita N., Kimura K., Kitada M., Noda T., Ason H., Nakamura T. und Ide C. (2002). Nogo-A expression in mature oligodendrocytes of rat spinal cord in association with specific molecules. *Neurosci. Lett.* 332, 37-40.
- Tan P. K., Waites C., Liu Y., Krantz D. E. und Edwards R. H. (1998). A leucine-based motif mediates the endocytosis of vesicular monoamine and acetylcholine transporters. *J. Biol. Chem.* 273, 17351-17360.
- Tan T. C., Valova V. A., Malladi C. S., Graham M. E., Berven L. A., Jupp O. J., Hausra G., McClure S. J., Sarcevic B., Boadle R. A., Larsen M. R., Cousin M. A. und Robinson M. S. (2003). Cdk5 is essential for synaptic vesicle endocytosis. *Nat. Cell Biol.* 5, 701-710.
- Tang B. L., Tan A. E., Lim L. K., Lee S. S., Low D. Y. und Hong W. (1998). Syntaxin 12, a member of the syntaxin family localized to the endosome. *J. Biol. Chem.* 273, 6944-6950.
- Tang X., Halleck M. S., Schlegel R. A. und Williamson P. (1996). A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science* 272, 1495-1497.
- Taniguchi H., Okumura N., Hamada J., Inagaki M., Nakahata Y., Sano S. und Nagai K. (2004). Cold exposure induces tyrosine phosphorylation of BIT through NMDA receptors in the rat hypothalamus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 178-184.
- Tarsa L. und Goda Y. (2002). Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 1012-1016.
- Teis D., Wunderlich W. und Huber L. A. (2002). Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction. *Dev. Cell* 3, 803-814.
- Thiele C., Hannah M. J., Fahrenholz F. und Huttner W. B. (2000). Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat. Cell Biol.* 2, 42-49.
- Thomas G. M. und Haganir R. L. (2004). MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 173-183.
- Thomas J. P., Maiornino M., Ursini F. und Girotti A. W. (1990). Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *J. Biol. Chem.* 265, 454-461.
- Thomas L., Hartung K., Langosch D., Rehm H., Bamberg E., Franke W. W. und Betz H. (1988). Identification of synaptophysin as a hexameric channel protein of the synaptic vesicle membrane. *Science* 242, 1050-1053.
- Thomas L. und Betz H. (1990). Synaptophysin binds to physophilin, a putative synaptic plasma membrane protein. *J. Cell Biol.* 111, 2041-2052.

- Tirian L., Hlavanda E., Olah J., Horvath I., Orosz F., Szabo B., Kovacs J., Szabad J. und Ovadi J. (2003). TPPP/p25 promotes tubulin assemblies and blocks mitotic spindle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 13976-13981.
- Tisdale E. J., Bourne J. R., Khosravi-Far R., Der C. J. und Balch W. E. (1992). GTP-binding mutants of rab1 and rab2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *J. Cell Biol.* 119, 749-761.
- Tisdale E. J. (2001). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is required for vesicular transport in the early secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 2480-2486.
- Tisdale E. J. (2002). Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Is Phosphorylated by Protein Kinase C λ and Plays a Role in Microtubule Dynamics in the Early Secretory Pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 3334-3341.
- Tisdale E. J., Kelly C. und Artalejo C. R. (2004). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interacts with Rab2 and plays an essential role in endoplasmic reticulum to Golgi transport exclusive of its glycolytic activity. *J. Biol. Chem.* 279, 54046-54052.
- Tixier-Vidal A., Barret A., Picart R., Mayan V., Vogt D., Wiedenmann B. und Goud B. (1993). The small GTP-binding protein, Rab6p, is associated with both Golgi and post-Golgi synaptophysin-containing membranes during synaptogenesis of hypothalamic neurons in culture. *J. Cell Sci.* 105, 935-947.
- Tobaben S., Thakur P., Fernandez-Chacon R., Südhof T. C., Rettig J. und Stahl B. (2001). A trimeric protein complex functions as a synaptic chaperone machine. *Neuron* 31, 987-999.
- Tokumaru H. und Augustine G. J. (1999). UNC-13 and neurotransmitter release. *Nat. Neurosci.* 2, 929-930.
- Tokumaru H., Umayahara K., Pellegrini L. L., Ishizuka T., Saisu H., Betz H., Augustine G. J. und Abe T. (2001). SNARE complex oligomerization by synaphin/complexin is essential for synaptic vesicle exocytosis. *Cell* 104, 421-432.
- Tomizawa K., Sunada S., Lu Y. F., Oda Y., Kinuta M., Ohshima T., Saito T., Wei F. Y., Matsushita M., Li S. T., Tsutsui K., Hisanaga S., Mikoshiba K., Takei K. und Matsui H. (2003). Cophosphorylation of amphiphysin I and dynamin I by Cdk5 regulates clathrin-mediated endocytosis of synaptic vesicles. *J. Cell Biol.* 163, 813-824.
- Tong X. K., Hussain N. K., Heuvel E. d., Kurakin A., Abi-Jaoude E., Quinn C. C., Olson M. F., Marais R., Baranes D., Kay B. K. und McPerson P. S. (2000). The endocytic protein intersectin is a major binding partner for the Ras exchange factor mSos1 in rat brain. *EMBO J.* 19, 1263-1271.
- Torii S., Nakayama K., Yamamoto T. und Nishida E. (2004). Regulatory mechanisms and function of ERK MAP kinases. *J. Biochem. (Tokyo)* 136, 557-561.
- Torri Tarelli F., Bossi M., Fesce R., Greengard P. und Valtorta F. (1992). Synapsin I partially dissociates from synaptic vesicles during exocytosis induced by electrical stimulation. *Neuron* 9, 1143-1153.
- Toth E. A. und Yeates T. O. (2000). The structure of adenylosuccinate lyase, an enzyme with dual activity in the de novo purine biosynthetic pathway. *Structure* 8, 163-174.
- Touchot N., Chardin P. und Tavittian 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, 8210-8214.
- 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, 4350-4354.
- Trifaro J., Rose S. D., Lejen T. und Elzagallaai A. (2000). Two pathways control chromaffin cell cortical F-actin dynamics during exocytosis. *Biochimie* 82, 339-352.
- Trifaro J. M. und Vitale M. L. (1993). Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release. *Trends Neurosci.* 16, 466-472.
- Trifaro J. M., Lejen T., Rose S. D., Pene T. D., Barkar N. D. und Seward E. P. (2002). Pathways that control cortical F-actin dynamics during secretion. *Neurochem. Res.* 27, 1371-1385.
- Trimble W. S., Cowan D. M. und Scheller R. H. (1988). VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 4538-4542.
- Trimble W. S. und Scheller R. H. (1988). Molecular biology of synaptic vesicle-associated proteins. *Trends Neurosci.* 11, 241-242.
- Tuma P. L., Stachniak M. C. und Collins C. A. (1993). Activation of dynamin GTPase by acidic phospholipids and endogenous rat brain vesicles. *J. Biol. Chem.* 268, 17240-17246.
- Tuma P. L. und Collins C. A. (1994). Activation of dynamin GTPase is a result of positive cooperativity. *J. Biol. Chem.* 269, 30842-30847.
- Turner C. E., West K. A. und Brown M. C. (2001). Paxillin-ARF GAP signaling and the cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 593-599.
- Turner K. M., Burgoyne R. D. und Morgan A. (1999). Protein phosphorylation and the regulation of synaptic membrane traffic. *Trends Neurosci.* 22, 459-464.
- Tuvim M. J., Adachi R., Hoffenberg S. und Dickey B. F. (2001). Traffic control: Rab GTPases and the regulation of interorganellar transport. *News Physiol. Sci.* 16, 56-61.

- Ubach J., Zhang X., Shao X., Südhof T. C. und Rizo J. (1998). Ca²⁺ binding to synaptotagmin: how many Ca²⁺ ions bind to the tip of a C2-domain? *EMBO J.* 17, 3921-3930.
- Ueda T. und Greengard P. (1977). Adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein system of neuronal membranes. I. Solubilization, purification, and some properties of an endogenous phosphoprotein. *J. Biol. Chem.* 252, 5155-5163.
- Ueno S., Tsukamoto M., Hirano T., Kikuchi K., Yamada M. K., Nishiyama N., Nagano T., Matsuki N. und Ikegaya Y. (2002). Mossy fiber Zn²⁺ spillover modulates heterosynaptic N-methyl-D-aspartate receptor activity in hippocampal CA3 circuits. *J. Cell Biol.* 158, 215-220.
- Ullrich B., Li C., Zhang J. Z., McMahon H., Anderson R. G., Geppert M. und Südhof T. C. (1994). Functional properties of multiple synaptotagmins in brain. *Neuron* 13, 1281-1291.
- Ullrich O., Reinsch S., Urbe S., Zerial M. und Parton R. G. (1996). Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J. Cell Biol.* 135, 913-924.
- Ungermann C., Sato K. und Wickner W. (1998). Defining the functions of trans-SNARE pairs. *Nature* 396, 543-548.
- Ünlü M., Morgan M. E. und Minden J. S. (1997). Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18, 2071-2077.
- Ursini F., Maiorino M. und Gregolin C. (1985). The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 839, 62-70.
- Vacheron M. J., Clottes E., Chautard C. und Vial C. (1997). Mitochondrial creatine kinase interaction with phospholipid vesicles. *Arch. Biochem. Biophys.* 344, 316-324.
- Valente T. und Auladell C. (2002). Developmental expression of ZnT3 in mouse brain: correlation between the vesicular zinc transporter protein and chelatable vesicular zinc (CVZ) cells. Glial and neuronal CVZ cells interact. *Mol. Cell. Neurosci.* 21, 189-204.
- Valentijn K., Valentijn J. A. und Jamieson J. D. (1999). Role of actin in regulated exocytosis and compensatory membrane retrieval: insights from an old acquaintance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266, 652-661.
- Vallano M. L., Goldenring J. R., Lasher R. S. und Delorenzo R. J. (1986). Association of calcium/calmodulin-dependent kinase with cytoskeletal preparations: phosphorylation of tubulin, neurofilament, and microtubule-associated proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 466, 357-374.
- Vallee R. B. und Shpetner H. S. (1990). Motor proteins of cytoplasmic microtubules. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 909-932.
- Vallee R. B. und Bloom G. S. (1991). Mechanisms of fast and slow axonal transport. *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 59-92.
- Valtorta F., Greengard P., Fesce R., Chieriegatti E. und Benfenati F. (1992). Effects of the neuronal phosphoprotein synapsin I on actin polymerization. I. Evidence for a phosphorylation-dependent nucleating effect. *J. Biol. Chem.* 267, 11281-11288.
- van der Voorn L. und Ploegh H. L. (1992). The WD-40 repeat. *FEBS Lett.* 307, 131-134.
- van Montfort B. A., Canas B., Duurkens R., Godovac-Zimmermann J. und Robillard G. T. (2002). Improved in-gel approaches to generate peptide maps of integral membrane proteins with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 37, 322-330.
- Varoqui H., Diebler M. F., Meunier F. M., Rand J. B., Usdin T. B., Bonner T. I., Eiden L. E. und Erickson J. D. (1994). Cloning and expression of the vesamicol binding protein from the marine ray Torpedo. Homology with the putative vesicular acetylcholine transporter UNC-17 from *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett.* 342, 97-102.
- Varoqui H., Schafer M. K., Zhu H., Weihe E. und Erickson J. D. (2002). Identification of the differentiation-associated Na⁺/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J. Neurosci.* 22, 142-155.
- Vega I. E. und Hsu S. C. (2003). The septin protein Nedd5 associates with both the exocyst complex and microtubules and disruption of its GTPase activity promotes aberrant neurite sprouting in PC12 cells. *Neuroreport* 14, 31-37.
- Velde H. J. v. d., Roebroek A. J., Senden N. H., Ramaekers E. C. und Ven W. J. v. d. (1994). NSP-encoded reticulons, neuroendocrine proteins of a novel gene family associated with membranes of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* 107, 2403-2416.
- Verhage M., Maia A. S., Plomp J. J., Brussaard A. B., Heeroma J. H., Vermeer H., Toonen R. F., Hammer R. E., Berg T. K. v. d., Missler M., Geuze H. J. und Südhof T. C. (2000). Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* 287, 864-869.
- Vettermann C., Jack H. M. und Mielenz D. (2002). A colloidal silver staining--destaining method for precise assignment of immunoreactive spots in two-dimensional protein patterns. *Anal. Biochem.* 308, 381-387.
- Voet D. und Voet J., Biochemistry, 3rd ed., Wiley-VCH.
- Voets T., Toonen R. F., Brian E. C., Wit H. d., Moser T., Rettig J., Südhof T. C., Neher E. und Verhage M. (2001). Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking. *Neuron* 31, 581-591.

- Vogl A. W. (1996). Spatially dynamic intercellular adhesion junction is coupled to a microtubule-based motility system: evidence from an in vitro binding assay. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 34, 1-12.
- Volkman N., Amann K. J., Stoilova-McPhie S., Egile C., Winter D. C., Hazelwood L., Heuser J. E., Li R., Pollard T. D. und Hanein D. (2001). Structure of Arp2/3 complex in its activated state and in actin filament branch junctions. *Science* 293, 2456-2459.
- Volkandt W., Pevsner J., Elferink L. A. und Scheller R. H. (1993). Association of three small GTP-binding proteins with cholinergic synaptic vesicles. *FEBS Lett.* 317, 53-56.
- Vorm O., Chait B. T. und Roepstorff P. (1994). Mass spectrometry of protein samples containing detergents. Paper presented at: 41th ASMS.
- Wada K., Yokotani N., Hunter C., Doi K., Wenthold R. J. und Shimasaki S. (1992). Differential expression of two distinct forms of mRNA encoding members of a dipeptidyl aminopeptidase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 197-201.
- Wakana Y., Koyama S., Nakajima K., Hatsuzawa K., Nagahama M., Tani K., Hauri H. P., Melancon P. und Tagaya M. (2005). Reticulon 3 is involved in membrane trafficking between the endoplasmic reticulum and Golgi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 1198-1205.
- Walch-Solimena C., Blasi J., Edelmann L., Chapman E. R., Mollard G. F. v. und Jahn R. (1995). The t-SNAREs syntaxin 1 and SNAP-25 are present on organelles that participate in synaptic vesicle recycling. *J. Cell Biol.* 128, 637-645.
- Walikonis R. S., Jensen O. N., Mann M., Provance D. W. J., Mercer J. A. und Kennedy M. B. (2000). Identification of proteins in the postsynaptic density fraction by mass spectrometry. *J. Neurosci.* 20, 4069-4080.
- Walker M. C., Ruiz A. und Kullmann D. M. (2001). Monosynaptic GABAergic signaling from dentate to CA3 with a pharmacological and physiological profile typical of mossy fiber synapses. *Neuron* 29, 703-715.
- Wall M. J. (2005). A role for zinc in cerebellar synaptic transmission? *Cerebellum* 4, 224-229.
- Wallin E. und Heijne G. v. (1998). Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.* 7, 1029-1038.
- Wang C. T., Bai J., Chang P. Y., Chapman E. R. und Jackson M. B. (2006). Synaptotagmin-Ca²⁺ triggers two sequential steps in regulated exocytosis in rat PC12 cells: fusion pore opening and fusion pore dilation. *J. Physiol.* 570, 295-307.
- Wang L., Li G. und Sugita S. (2004). RalA-exocyst interaction mediates GTP-dependent exocytosis. *J. Biol. Chem.* 279, 19875-19881.
- Wang X., Kinschull 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, 151-162.
- Wang X., Chun S. J., Treloar H., Vartanian T., Greer C. A. und Strittmatter S. M. (2002a). Localization of Nogo-A and Nogo-66 receptor proteins at sites of axon-myelin and synaptic contact. *J. Neurosci.* 22, 5505-5515.
- Wang X., Huynh H., Gyorloff-Wingren A., Monosov E., Stridsberg M., Fukuda M. und Mustelin T. (2002b). Enlargement of secretory vesicles by protein tyrosine phosphatase PTP-MEG2 in rat basophilic leukemia mast cells and Jurkat T cells. *J. Immunol.* 168, 4612-4619.
- Wang X. X., Dangott L. J. und Pfenninger K. H. (2003). The heterogeneous growth cone glycoprotein gp93 is identical to the signal regulatory protein SIRPalpa/SHPS-1/BIT. *J. Neurochem.* 86, 55-60.
- Ward D. M., Pevsner J., Scullion M. A., Vaughn M. und Kaplan J. (2000). Syntaxin 7 and VAMP-7 are soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors required for late endosome-lysosome and homotypic lysosome fusion in alveolar macrophages. *Mol. Biol. Cell* 11, 2327-2333.
- Washbourne P., Schiavo G. und Montecucco C. (1995). Vesicle-associated membrane protein-2 (synaptobrevin-2) forms a complex with synaptophysin. *Biochem. J.* 305, 721-724.
- Watanabe M., Nomura K., Ohyama A., Ishikawa R., Komiya Y., Hosaka K., Yamauchi E., Taniguchi H., Sasakawa N., Kumakura K., Ushiki T., Sato O., Ikebe M. und Igarashi M. (2005). Myosin-Va regulates exocytosis through the submicromolar Ca²⁺-dependent binding of syntaxin-1A. *Mol. Biol. Cell* 16, 4519-4530.
- Waterman-Storer C. M., Karki S. B., Kuznetsov S. A., Tabb J. S., Weiss D. G., Langford G. M. und Holzbaur E. L. (1997). The interaction between cytoplasmic dynein and dynactin is required for fast axonal transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 12180-12185.
- 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, 759-772.
- Weber T., Parlati F., McNew J. A., Johnston R. J., Westermann B., Sollner T. H. und Rothman J. E. (2000). SNAREpins are functionally resistant to disruption by NSF and alphaSNAP. *J. Cell Biol.* 149, 1063-1072.
- Weir M. L., Xie H., Klip A. und Trimble W. S. (2001). VAP-A binds promiscuously to both v- and tSNAREs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286, 616-621.

- Welch M. D. und Mullins R. D. (2002). Cellular control of actin nucleation. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 18, 247-288.
- Wenzel H. J., Cole T. B., Born D. E., Schwartzkroin P. A. und Palmiter R. D. (1997). Ultrastructural localization of zinc transporter-3 (ZnT-3) to synaptic vesicle membranes within mossy fiber boutons in the hippocampus of mouse and monkey. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 12676-12681.
- Wermuth B. (1985). Aldo-keto reductases. *Prog. Clin. Biol. Res.* 174, 209-230.
- Westfall D. P., Todorov L. D. und Mihaylova-Todorova S. T. (2002). ATP as a cotransmitter in sympathetic nerves and its inactivation by releasable enzymes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303, 439-444.
- Westrum L. E., Gray E. G., Burgoyne R. D. und Barron J. (1983). Synaptic development and microtubule organization. *Cell Tissue Res.* 231, 93-102.
- Wheeler T. C., Chin L. S., Li Y., Roudabush F. L. und Li L. (2002). Regulation of synaptophysin degradation by mammalian homologues of seven in absentia. *J. Biol. Chem.* 277, 10273-10282.
- White J., Johannes L., Mallard F., Girod A., Grill S., Reinsch S., Keller P., Tzschaschel B., Echard A., Goud B. und Stelzer E. H. (1999). Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *J. Cell Biol.* 147, 743-760.
- Whiteheart S. W., Griff I. C., Brunner M., Clary D. O., Mayer T., Buhrow S. A. und Rothman J. E. (1993). SNAP family of NSF attachment proteins includes a brain-specific isoform. *Nature* 362, 353-355.
- Whitley P., Grahn E., Kutay U., Rapoport T. A. und Heijne G. v. (1996). A 12-residue-long polyleucine tail is sufficient to anchor synaptobrevin to the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* 271, 7583-7586.
- Wiedenmann B. und Franke W. W. (1985). Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* 41, 1017-1028.
- Wigge P. und McMahon H. T. (1998). The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse. *Trends Neurosci.* 21, 339-344.
- Wilcke J. T., Seersholm N., Kok-Jensen A. und Dirksen A. (2000). Attitudes toward an unsolicited approach in relation to status of genetic disease: exemplified by alpha(1)-antitrypsin deficiency. *Am. J. Med. Genet.* 94, 207-213.
- Wilfinger W. W., Mackey K. und Chomczynski P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* 22, 474-481.
- Wilhelm A., Volkandt W., Langer D., Nolte C., Kettenmann H. und Zimmermann H. (2004). Localization of SNARE proteins and secretory organelle proteins in astrocytes in vitro and in situ. *Neurosci. Res.* 48, 249-257.
- Williams A. F. und Gagnon J. (1982). Neuronal cell Thy-1 glycoprotein: homology with immunoglobulin. *Science* 216, 696-703.
- Wilson M. (2003). Bassoon's part in two presynaptic orchestras. *Neuron* 37, 728-730.
- Wölfel M. und Schneggenburger R. (2003). Presynaptic capacitance measurements and Ca²⁺ uncaging reveal submillisecond exocytosis kinetics and characterize the Ca²⁺ sensitivity of vesicle pool depletion at a fast CNS synapse. *J. Neurosci.* 23, 7059-7068.
- Wolthuis R. M., Franke B., Triest M. v., Bauer B., Cool R. H., Camonis J. H., Akkerman J. W. und Bos J. L. (1998). Activation of the small GTPase Ral in platelets. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2486-2491.
- Woscholski R. und Parker P. J. (1997). Inositol lipid 5-phosphatases--traffic signals and signal traffic. *Trends Biochem. Sci.* 22, 427-431.
- Wu C. C. und Yates J. R. (2003). The application of mass spectrometry to membrane proteomics. *Nat. Biotechnol.* 21, 262-267.
- Wu T. T. und Castle J. D. (1998). Tyrosine phosphorylation of selected secretory carrier membrane proteins, SCAMP1 and SCAMP3, and association with the EGF receptor. *Mol. Biol. Cell* 9, 1661-1674.
- Wu X. S., Rao K., Zhang H., Wang F., Sellers J. R., Matestic L. E., Copeland N. G., Jenkins N. A. und Hammer J. A. r. (2002). Identification of an organelle receptor for myosin-Va. *Nat. Cell Biol.* 4, 271-278.
- Xie H., Surka M., Howard J. und Trimble W. S. (1999). Characterization of the mammalian septin H5: distinct patterns of cytoskeletal and membrane association from other septin proteins. *Cell Motil. Cytoskeleton* 43, 52-62.
- Xu X. Z., Wes P. D., Chen H., Li H. S., Yu M., Morgan S., Liu Y. und Montell C. (1998a). Retinal targets for calmodulin include proteins implicated in synaptic transmission. *J. Biol. Chem.* 273, 31297-31307.
- Xu Y., Wong S. H., Tang B. L., Subramaniam V. N., Zhang T. und Hong W. (1998b). A 29-kilodalton Golgi soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (Vti1-rp2) implicated in protein trafficking in the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 273, 21783-21789.
- Xue J., Wang X., Malladi C. S., Kinoshita M., Milburn P. J., Lengyel I., Rostas J. A. und Robinson P. J. (2000). Phosphorylation of a new brain-specific septin, G-septin, by cGMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 275, 10047-10056.
- Xue J., Milburn P. J., Hanna B. T., Graham M. E., Rostas J. A. und Robinson P. J. (2004a). Phosphorylation of septin 3 on Ser-91 by cGMP-dependent protein kinase-I in nerve terminals. *Biochem. J.* 381, 753-760.

- Xue J., Tsang C. W., Gai W. P., Malladi C. S., Trimble W. S., Rostas J. A. und Robinson P. J. (2004b). Septin 3 (G-septin) is a developmentally regulated phosphoprotein enriched in presynaptic nerve terminals. *J. Neurochem.* 91, 579-590.
- Yamada E. (1955). The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1, 445-458.
- Yamada M., Saisu H., Ishizuka T., Takahashi H. und Abe T. (1999). Immunohistochemical distribution of the two isoforms of synaphin/complexin involved in neurotransmitter release: localization at the distinct central nervous system regions and synaptic types. *Neuroscience* 93, 7-18.
- Yamaguchi A., Urano T., Goi T. und Feig L. A. (1997). An Eps homology (EH) domain protein that binds to the Ral-GTPase target, RalBP1. *J. Biol. Chem.* 272, 31230-31234.
- Yamauchi T. und Fujisawa H. (1988). Regulation of the interaction of actin filaments with microtubule-associated protein 2 by calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochim. Biophys. Acta* 968, 77-85.
- Yan Y., Narayanan V. und Lagenaur C. (1996). Expression of members of the proteolipid protein gene family in the developing murine central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 370, 465-478.
- Yang B., Steegmaier M., Jr L. C. G. und Scheller R. H. (2000). nSec1 binds a closed conformation of syntaxin1A. *J. Cell Biol.* 148, 247-252.
- Yang C. Y., Zhang J. und Yazulla S. (2003). Differential synaptic organization of GABAergic bipolar cells and non-GABAergic (glutamatergic) bipolar cells in the tiger salamander retina. *J. Comp. Neurol.* 455, 187-197.
- Yang W., Burkhart W., Cavallius J., Merrick W. C. und Boss W. F. (1993). Purification and characterization of a phosphatidylinositol 4-kinase activator in carrot cells. *J. Biol. Chem.* 268, 392-398.
- Yang X., Matern H. T. und Gallwitz D. (1998). Specific binding to a novel and essential Golgi membrane protein (Yip1p) functionally links the transport GTPases Ypt1p and Ypt31p. *EMBO J.* 17, 4954-4963.
- Yerushalmi H., Lebediker M. und Schuldiner S. (1995). EmrE, an Escherichia coli 12-kDa multidrug transporter, exchanges toxic cations and H⁺ and is soluble in organic solvents. *J. Biol. Chem.* 270, 6856-6863.
- Yoshida A., Oho C., Omori A., Kuwahara R., Ito T. und Takahashi M. (1992). HPC-1 is associated with synaptotagmin and omega-conotoxin receptor. *J. Biol. Chem.* 267, 24925-24928.
- Yoshida Y., Kinuta M., Abe T., Liang S., Araki K., Cremona O., Paolo G. D., Moriyama Y., Yasuda T., De Camilli P. und Takei K. (2004). The stimulatory action of amphiphysin on dynamin function is dependent on lipid bilayer curvature. *EMBO J.* 23, 3483-3491.
- Zacco A., Cooper V., Chantler P. D., Fisher-Hyland S., Horton H. L. und Levitt P. (1990). Isolation, biochemical characterization and ultrastructural analysis of the limbic system-associated membrane protein (LAMP), a protein expressed by neurons comprising functional neural circuits. *J. Neurosci.* 10, 73-90.
- Zerial M. und McBride H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2, 107-117.
- Zhang B., Koh Y. H., Beckstead R. B., Budnik V., Ganetzky B. und Bellen H. J. (1998). Synaptic vesicle size and number are regulated by a clathrin adaptor protein required for endocytosis. *Neuron* 21, 1465-1475.
- Zhang B., Ganetzky B., Bellen H. J. und Murthy V. N. (1999a). Tailoring uniform coats for synaptic vesicles during endocytosis. *Neuron* 23, 419-422.
- Zhang B. und Zehhof A. C. (2002). Amphiphysins: raising the BAR for synaptic vesicle recycling and membrane dynamics. Bin-Amphiphysin-Rvsp. *Traffic* 3, 452-460.
- 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, 751-760.
- Zhang W., Vazquez L., Apperson M. und Kennedy M. B. (1999b). Citron binds to PSD-95 at glutamatergic synapses on inhibitory neurons in the hippocampus. *J. Neurosci.* 19, 96-108.
- Zhang X., Kim-Miller M. J., Fukuda M., Kowalchuk J. A. und Martin T. F. (2002). Ca²⁺-dependent synaptotagmin binding to SNAP-25 is essential for Ca²⁺-triggered exocytosis. *Neuron* 34, 599-611.
- Zhao G., Shi L., Qiu D., Hu H. und Kao P. N. (2005). NF45/ILF2 tissue expression, promoter analysis, and interleukin-2 transactivating function. *Exp. Cell Res.* 305, 312-323.
- Zhao X., Alvarado D., Rainier S., Lemons R., Hedera P., Weber C. H., Tukul T., Apak M., Heiman-Patterson T., Ming L., Bui M. und Fink J. K. (2001). Mutations in a newly identified GTPase gene cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Nat. Genet.* 29, 326-331.
- Zheng J., Cahill S. M., Lemmon M. A., D F., Schlessinger J. und Cowburn D. (1996). Identification of the binding site for acidic phospholipids on the pH domain of dynamin: implications for stimulation of GTPase activity. *J. Mol. Biol.* 255, 14-21.
- Zhu P. P., Patterson A., Lavoie B., Stadler J., Shoeb M., Patel R. und Blackstone C. (2003). Cellular localization, oligomerization, and membrane association of the hereditary spastic paraplegia 3A (SPG3A) protein atlastin. *J. Biol. Chem.* 278, 49063-49071.
- Ziff E. B. (1997). Enlightening the postsynaptic density. *Neuron* 19, 1163-1174.
- Zinsmaier K. E. und Bronk P. (2001). Molecular chaperones and the regulation of neurotransmitter exocytosis. *Biochem. Pharmacol.* 62, 1-11.

Zucker R. S. und Regehr W. G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 355-405.

Danksagung

Ich danke Professor Dr. Walter Volknandt und Professor Dr. Herbert Zimmermann für die Bereitstellung des Themas und der nötigen Mittel sowie für die anregenden Diskussionen während der letzten drei Jahre. Professor Dr. Bernd Ludwig danke ich für die externe Betreuung meiner Arbeit.

Bei Professor Dr. Hermann Schägger möchte ich mich für den ausgezeichneten Kurs zur Blue Native-Elektrophorese und für die Einführung in die dSDS-PAGE sowie für die gemeinsame experimentelle Durchführung der kritischen Gele für die Massenspektrometrie im Rahmen einer sehr fruchtbaren Kooperation bedanken.

Dr. Carsten Corvey und Tobias Beckhaus möchte ich an dieser Stelle für die viele Mühe und den unermüdlichen Einsatz bei Messung meiner Proben ein großes Lob aussprechen. Meinen großen Dank für die phantastische Kooperation und für Eure stetige Diskussionsbereitschaft - ohne Euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen! Professor Dr. Michael Karas danke ich für die Bereitstellung seiner Geräte und die stetige Diskussionsbereitschaft.

Bei Bernhard Göckel bedanke ich mich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit in drei erfolgreichen Jahren. Klaus Hammer danke ich für die Einführung in die Immunhistochemie. David Langer möchte ich für die Tipps und Tricks in der Immunzytochemie und für die Perfusion der Ratten danken. Dem ganzen AK Neurochemie danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Dr. Michihiro Imamura danke ich für die freundliche Bereitstellung der Antikörper gegen die Sarkoglycan-Isoformen.

Bei Dr. Gabi Lahner bedanke ich mich für die Organisation der phantastischen Workshops und für all die Köstlichkeiten, mit denen sie immer für gute Laune gesorgt hat.

Dem Center for Membrane Proteomics, dem SFB628 und dem Graduiertenkolleg danke ich für die finanzielle Unterstützung und für die Erweiterung meines Horizontes im Rahmen der Vorträge.

Meinem Mentor Professor Dr. Sucharit Bhakdi und dem ganzen SciMento-Netzwerk möchte ich meinen Dank für die Unterstützung bei der Planung meiner weiteren Karriere aussprechen.

Gabriele Neise und Boris Fürtig gebührt außerordentlicher Dank für das Korrekturlesen dieser Arbeit - Ihr habt in der kurzen Zeit wahre Wunder vollbracht!

Meiner Familie danke ich für die fortwährende Unterstützung während des Studiums und der Promotion. Meinem Bruder möchte ich zudem für den unermüdlichen Einsatz beim Drucken meiner Arbeit und für all die technische Unterstützung danken, ohne die ich verzweifelt wäre.

Außerdem gebührt mein Dank den Praktikanten und Diplomanden, mit denen ich bei ihrer Ausbildung großen Spaß hatte. Zu guter Letzt danke ich all denen, die hier persönlich keine Erwähnung finden, die aber großen Anteil am Gelingen meiner Arbeit hatten.

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Volle Paper:

Morciano M., Burré J., Corvey C., Karas M., Zimmermann H. und Volkandt W. (2005). Immunoisolation of two synaptic vesicle pools from synaptosomes: a proteomic analysis. *J. Neurochem.* 95, 1732-1745. [Equal contribution of the first two authors]

Burré J., Beckhaus T., Corvey C., Karas M., Zimmermann H. und Volkandt W. (2006). Synaptic vesicles under conditions of rest and activation: analysis by two-dimensional difference gel electrophoresis. *Electrophoresis*, in press.

Burré J., Beckhaus T., Schägger H., Corvey C., Hofmann S., Karas M., Zimmermann H. und Volkandt W. (2006). An analysis of the synaptic vesicle proteome by three gel-based protein separation techniques. *Proteomics*, submitted.

Poster Abstracts:

Burré J., Beckhaus T., Schägger H., Karas M., Zimmermann H. und Volkandt W. (2006). Identification and characterization of a novel synaptic vesicle protein. *The Synapse*, M8.

Hofmann S., Glückmann M., Burré J., Beckhaus T., Schürken M., Zimmermann H., Volkandt W. und Karas M. (2006). Comparison of protein/peptide analysis using two techniques: nanoLC MALDI MS/MS and nanoLC ESI MS/MS. *54th Annual Meeting of the American Society for Mass Spectrometry*.

Hofmann S., Glückmann M., Kausche S., Burré J., Beckhaus T., Herr W., Zimmermann H., Volkandt W. und Karas M. (2006). Identifizierung von Peptiden und Proteinen mittels nanoLC MALDI MS/MS im Vergleich zu nanoLC ESI MS/MS. *39. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie*.

Beckhaus T., Corvey C., Burré J., Zimmermann H., Volkandt W. und Karas M. (2006). Verschiedene Methoden zur Charakterisierung des Proteoms synaptischer Vesikel. Vergleich von 1D und 2 D PAGE gefolgt von Massenspektrometrie (MALDI-TOF; nanoLC ESI /MS/MS). *39. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie*.

Burré J., Schägger H., Beckhaus T., Corvey C., Karas M., Zimmermann H. und Volkandt W. (2005). Analysis of the synaptic vesicle proteome: pros and cons using three different gel separation techniques in combination with mass spectrometry. *45th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology*, 1348.

Burré J., Corvey C., Beckhaus T., Karas M., Zimmermann H. und Volkandt W. (2005). Analysis of the synaptic vesicle proteome using SDS-PAGE and nano-liquid chromatography/tandem mass spectrometry (Nano-LC/MS/MS). *Mol. Cell. Proteomics* 4 (Suppl. 1), S90.

Burré J., Morciano M., Beckhaus T., Karas M., Zimmermann H. und Volkandt W. (2005). Synaptic vesicle proteins under conditions of rest and activation: a proteomic approach using differential in gel electrophoresis. *Proc. 30th Göttingen Neurobiology Conference & 6th German Neurosci. Soc. 2005* (K. Kriegstein and H. Zimmermann, eds.), 284A.

Volkandt W., Burré J., Corvey C., Karas M. und Zimmermann H. (2004). A proteomic approach to the analysis of synaptic vesicle proteins. *FENS Abstr.* 2, A119.19.