

**Identifizierung und Charakterisierung von
Interaktionspartnern des synaptischen Vesikelproteins
Synaptophysin**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

von
Marco Felkl
geboren in Wiesbaden

Mainz, Dezember 2007

1. Berichtersteller:

2. Berichtersteller:

Datum der mündlichen Prüfung:

INHALTSVERZEICHNIS

1 ZUSAMMENFASSUNG 1

2 EINLEITUNG 2

2.1 Der synaptische Vesikelzyklus 2

2.1.1 Der SNARE-Komplex..... 4

2.1.2 Regulatorische Proteine des synaptischen Vesikelzyklus..... 6

2.1.2.1 Rab-Proteine..... 6

2.1.2.2 Munc-Proteine..... 6

2.1.2.3 Complexin..... 7

2.1.2.4 Synaptotagmin 7

2.1.2.5 Proteine der Endozytose 8

2.1.2.6 Synaptophysin 9

2.2 Proteininteraktionen..... 13

2.2.1 *Yeast Two-Hybrid System (Y2H)* 13

2.2.1.1 Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid System..... 14

2.2.2 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)..... 16

2.2.3 Methoden der FRET Messung 19

2.3 Zielsetzung..... 20

3 MATERIAL UND METHODEN..... 21

3.1 Material..... 21

3.1.1 Antikörper 21

3.1.2 Chemikalien und Geräte..... 22

3.1.3 Puffer und Nährmedien 25

3.1.4 Zelllinien, Bakterien- und Hefestämme..... 25

3.1.4.1 Bakterienstamm 25

3.1.4.2 Hefestamm 25

3.1.4.3 Zelllinien 25

3.1.5 Vektoren und Oligonukleotide 26

3.1.5.1 Oligonukleotide 26

3.1.5.2 Vektoren 27

3.2 Methoden..... 28

3.2.1 Molekularbiologische Methoden 28

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden..... 28

3.2.2.1 Synaptosomenpräparation..... 28

3.2.2.2 Extraktion von Membranproteinen..... 29

3.2.2.2.1	Extraktion von Membranproteinen aus Synaptosomen	29
3.2.2.2.2	Extraktion von Membranproteinen aus Zellen	29
3.2.2.3	Koimmunpräzipitation.....	30
3.2.2.3.1	Koimmunpräzipitation aus Synaptosomen	30
3.2.2.3.2	Koimmunpräzipitation aus Zellen	31
3.2.2.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	31
3.2.2.5	Immunblot.....	32
3.2.2.6	Immunchemischer Nachweis	32
3.2.3	Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
3.2.3.1	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und Anlegen von Dauerkulturen.....	33
3.2.3.2	Herstellung und Transformation kompetenter Hefezellen	34
3.2.3.2.1	Transformation einer cDNA-Bibliothek und Bestimmung der Transformationseffizienz	35
3.2.3.3	Plasmidisolierung aus Hefezellen	36
3.2.3.4	Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität in Hefen	36
3.2.3.4.1	<i>Colony-Lift Filter Assay</i>	37
3.2.3.4.2	<i>Liquid Culture Assay</i>	37
3.2.3.5	<i>Split-Ubiquitin Membrane Yeast Two-Hybrid System</i>	38
3.2.4	Mikroskopische Methoden	40
3.2.4.1	Präparation und immunzytochemische Färbung von murinen Netzhäuten	40
3.2.4.2	Fixieren und Einbetten von Zellen.....	40
3.2.4.2.1	Methanol/Aceton-Fixierung.....	40
3.2.4.2.2	Formaldehyd-Fixierung	40
3.2.4.3	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)	41
4	ERGEBNISSE.....	42
4.1	Justierung der <i>Screening</i>-Bedingungen für das <i>Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid System</i> und Interaktion von SCAMP1 mit Synaptophysin.....	42
4.2	Identifizierung neuer Synaptophysin-Interaktionspartner bei Durchführung des <i>Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screens</i>.....	45
4.3	Verifizierung der Ergebnisse des <i>Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screens</i>	50
4.3.1	Kokolisierung von Synaptophysin mit im <i>Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid System</i> identifizierten Interaktionspartnern.....	50
4.3.2	Koimmunpräzipitation von Synaptophysin mit Synaptobrevin2 und Synaptogyrin3	52
4.3.2.1	Koimmunpräzipitation aus Synaptosomen-Lysat.....	52
4.3.2.2	Koimmunpräzipitation aus Epithelzellen.....	54
4.3.3	Etablierung eines FRET-Systems zur Detektion und Charakterisierung von Synaptophysin-Interaktionspartnern.....	55

4.3.4	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer zwischen Synaptophysin und seinen Bindungspartnern	57
4.4	<i>In vivo</i> -Nachweis der Tyrosin-Phosphorylierung von Synaptophysin und Synaptogyrin3	61
5	DISKUSSION	64
5.1	Wechselwirkungen von Synaptophysin sind abhängig von seiner Membranintegration	64
5.2	Synaptophysin als Katalysator in einer Lipid-Plattform?	65
5.3	Synaptophysin und das Zytoskelett, eine regulative Funktion im synaptischen Vesikelzyklus?	69
5.4	Interaktionen der <i>tetraspan vesicle membrane proteins</i> (TVPs)	71
5.5	Phosphorylierung der <i>tetraspan vesicle membrane proteins</i> (TVPs)	73
5.6	Weitere starke Synaptophysin-Bindungspartner und ihre Funktionen.....	75
5.7	<i>Conclusio</i>	76
6	LITERATURVERZEICHNIS	77
7	ANHANG	97
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	97
7.2	Generierte Konstrukte	100

1 Zusammenfassung

Die neuronale Signalübertragung beruht auf dem synaptischen Vesikelzyklus, der durch das koordinierte Zusammenspiel von circa 400 verschiedenen Proteinen reguliert wird. Eines der Hauptproteine des synaptischen Vesikels ist Synaptophysin (SYP), das zu den *tetraspan vesicle membrane proteins* (TVPs) gehört. Es wird vermutet, dass es zahlreiche Funktionen der Exo- und Endozytose moduliert, wenngleich die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen bisher größtenteils unverstanden sind. Ziel der Arbeit war daher die Identifizierung von Interaktionspartnern von SYP, um zum Verständnis der vielen ungeklärten Prozesse im synaptischen Vesikelzyklus beizutragen.

Mit dem *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid System*, das eine direkte *in vivo* Interaktion von Membranproteinen erlaubt, konnten in der vorliegenden Arbeit bekannte, aber auch neue SYP-Bindungspartner identifiziert werden. Ein bekannter Interaktionspartner war Synaptobrevin2 (SYB2), das zu den stärksten im *Split-Ubiquitin Y2H System* identifizierten Bindeproteinen zählt. Zu den neuen starken SYP-Interaktionspartnern gehören die TVPs Synaptogyrin3 (SYNGR3) und SCAMP1. Somit konnten erstmals heterophile Interaktionen zwischen den verschiedenen TVP-Genfamilien nachgewiesen werden, die für eine universelle Funktion der TVPs sprechen.

Die Validierung der im *Split-Ubiquitin Y2H System* ermittelten Interaktionspartner wurde auf eine Auswahl von Proteinen beschränkt, die vermutlich am synaptischen Vesikelzyklus beteiligt sind. Dabei konnte eine immunhistologische Kolo-kalisierung von SYP mit SYB2, SYNGR3, SCAMP1, Stathmin-like3 (STMN3), Rho family GTPase2 (RND2), Phospholipid transfer protein, Vesicle transport through interaction with t-SNAREs 1B homolog, Arfaptin2 und Profilin1 in den Synapsen-reichen Schichten der Retina beobachtet werden. Die SYP/SYB2- und SYP/SYNGR3-Komplexe konnten zudem sowohl aus Synaptosomen-Lysat als auch aus cDNA-transfizierten Epithelzellen koimmunpräzipitiert werden, wohingegen dies für die anderen Interaktionspartner nicht gelang. Da Koimmunpräzipitation die Struktur der Proteine durch Solubilisierung mit Detergenzien beeinflusst, wurden die in der Hefe beobachteten Interaktionen noch mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer überprüft, mit dem Proteinwechselwirkungen in der nativen Umgebung nachgewiesen werden können. Ein positives FRET-Signal konnte für SYP mit SYB2, SYP, SYNGR3, SCAMP1, STMN3, RND2 und Arfaptin2 detektiert werden, lediglich für SYP mit Phospholipase D4 (PLD4) gelang dieser Nachweis nicht. Ferner zeigten FRET-Analysen von Synaptophysin-Mutanten, dass der zytoplasmatische C-Terminus für die Interaktion mit zytoplasmatischen und membranassoziierten Proteinen benötigt wird. Durch *in vivo* FRET-Studien mit der SH2-Domäne der Src-Kinase, die an phosphorylierte Tyrosine bindet, konnte eine Tyrosin-Phosphorylierung des zytoplasmatischen C-Terminus von Synaptophysin und von Synaptogyrin3 detektiert werden.

Viele der neu identifizierten Synaptophysin-Interaktionspartner sind im Lipid-Metabolismus involviert. Vermutlich rekrutiert der zytoplasmatische und durch Phosphorylierung modifizierbare C-Terminus diese Partner in spezifische Lipoproteindomänen, die an der Feinabstimmung der synaptischen Vesikelendo- und -exozytose beteiligt sind.

2 Einleitung

Unser Gehirn ist eines der faszinierendsten Forschungsobjekte. Je mehr wir darüber wissen, desto mehr wird deutlich, dass dessen Erforschung erst begonnen hat. Die Leistung und Effizienz unseres Gehirns ist überwältigend. Der schnellste Supercomputer, der BlueGene/L im Lawrence Livermore National Lab (<http://www.llnl.gov>), benötigt ein Volumen von 150 m³, verbraucht 1800 kW und leistet dabei nur 10% der Rechenleistung unseres Gehirns¹⁻⁴. Diese unvorstellbare Leistung des menschlichen Gehirns verdanken wir seiner Komplexität. Es besteht aus ca. 100 Milliarden Neuronen, wobei jedes einzelne Neuron über einige 100 bis zu 200.000 Synapsen in direkter Verbindung mit anderen Neuronen steht. Von diesen ca. 100 Billionen Synapsen (von griechisch σύν „zusammen“ und ἄπτειν „haften“) ist das Funktionieren unseres Nervensystems entscheidend abhängig. Neben den elektrischen Synapsen, die einen bidirektionalen Transport von elektrischen Signalen, Metaboliten, *Second Messengers* und anderen Molekülen kleiner als 1 kDa über *Gap Junctions* (Pore bestehend aus einem Connexin-Hexamer) gestatten^{5,6}, bilden die chemischen Synapsen die häufigste Form der Signalübertragung im Nervensystem. Bei dieser unidirektionalen Übertragung führen ankommende elektrische Signale zur Exozytose synaptischer Vesikel und damit zur Freisetzung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt. Der Neurotransmitter interagiert mit Rezeptoren auf der postsynaptischen Membran und führt je nach Typ des Rezeptors zur Depolarisierung oder Hyperpolarisierung der Zelle. Die Exozytose, die Verschmelzung des synaptischen Vesikels mit der Plasmamembran der Nervenzelle, steuert somit die Kommunikation zwischen den Zellen und bildet damit die molekulare Basis unserer Gedanken. Obwohl die synaptischen Vesikel zu den bestuntersuchten Organellen gehören⁷, sind erst in den letzten 20 Jahren einige molekulare Mechanismen des Vesikelzyklus aufgeklärt worden. Es bleiben immer noch viele Fragen offen: Warum führt der Verlust des Hauptproteins synaptischer Vesikel, Synaptophysin⁸⁻¹¹, zu keinen offensichtlichen funktionellen Veränderungen^{12,13}? Welche Interaktionen gehen die Proteine während der Exo- und Endozytose von synaptischen Vesikeln ein? Zur Beantwortung dieser Fragen trägt die vorliegende Arbeit bei.

2.1 Der synaptische Vesikelzyklus

Der synaptische Vesikelzyklus hängt von dem koordinierten Zusammenspiel spezifischer Vesikelproteine ab. Die erfasste Anzahl an Proteinen in synaptischen Vesikeln schwankt zwischen 185 und 410 (siehe Abb. 2-1), je nach der zur Quantifizierung eingesetzten Methode^{11,14-16}. Stöchiometrisch mit durchschnittlich 70 beziehungsweise 32 Kopien pro Vesikel stellen Synaptobrevin (VAMP2, *vesicle-associated membrane protein 2*) und Synaptophysin die Hauptvesikelproteine dar¹¹. Um die Effizienz der Neurotransmission sicherzustellen, unterliegen synaptische Vesikel einem Recyclingprozess. Der gesamte synaptische Vesikelzyklus kann in drei Abschnitte gegliedert werden: Endozytose, Vesikel-Biogenese und Exozytose.

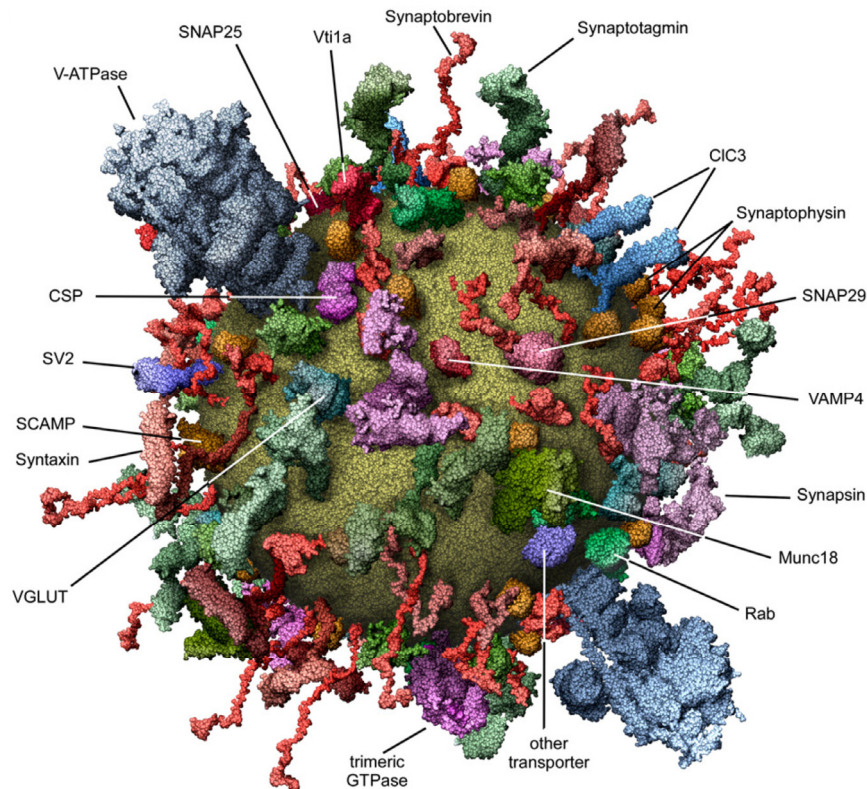


Abb. 2-1 Proteine des synaptischen Vesikel: Molekulares Modell einiger synaptischer Vesikelproteine. Abbildung modifiziert nach Takamori *et al.* 2006¹¹.

Der Docking-Prozess, das heißt die Anheftung synaptischer Vesikel an die aktive Zone, leitet die Exozytose ein (siehe Abb. 2-2). Ein nachfolgender Reife-Prozess steigert die Sensitivität des Vesikels gegenüber Kalzium. Durch die elektrische Erregung der Präsynapse öffnen sich spannungsgesteuerte HVA (*high voltage activated*) P/Q- und N-Typ Kalziumkanäle, so dass in Mikro-Domänen ein lokaler Anstieg der Kalziumkonzentration auf 10 bis 20 μM erfolgt^{17,18}. Die Fusion und Ausschüttung des Transmitters erfolgt circa 500 μsec nach dem Kalziumionen-Einstrom¹⁹. Nach der Exozytose werden die Vesikel mittels Clathrin-vermittelter Endozytose ins Zellinnere transloziert. Anschließend wird das Clathrin-Gerüst durch Hitzeschockproteine abgebaut. Durch die Anreicherung von Protonen im Vesikellumen mittels V-ATPase können über den entstandenen Protonengradienten und den Neurotransmittertransporter wieder Transmitter akkumuliert werden. Der Vesikel kann über eine zwischengeschaltete Fusion mit dem frühen Endosom modifiziert und regeneriert werden. Über einen Knospungsprozess wird er wieder ins Zytosol freigesetzt und kann anschließend über den beschriebenen aktiven Transport mit Neurotransmittern befüllt und an die aktive Zone transloziert werden. Alternativ erfolgt beim sogenannten *kiss and run* keine vollständige Fusion des Vesikels. Der Transmitter wird über eine transiente Fusionspore in den synaptischen Spalt abgegeben. Die anschließende Endozytose erfolgt über einen Clathrin-unabhängigen Vorgang²⁰. Bei *kiss and stay* verbleibt der Vesikel, nach Bildung einer Fusionspore, im geschlossenen Zustand an der aktiven Zone angedockt und kann dort mit Neurotransmittern wieder befüllt werden¹⁹. Die schnellen Clathrin-

unabhängigen Zyklen werden vorzugsweise bei schwachen und der Clathrin-abhängige bei starken Stimulationsfrequenzen angewandt²¹⁻²³.

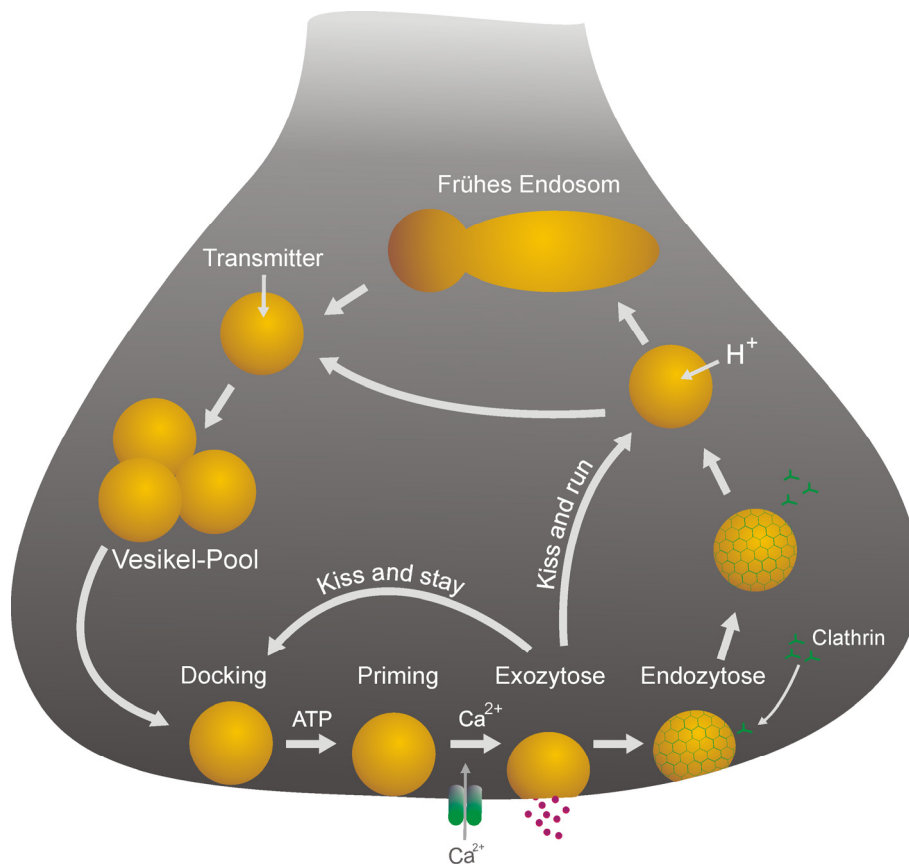


Abb. 2-2 Synaptischer Vesikelzyklus: Schematische Darstellung; *full fusion*: Clathrin-abhängiger Zyklus; *kiss and run / stay*: Clathrin-unabhängiger Zyklus, über Fusionspore

2.1.1 Der SNARE-Komplex

SNARE-Proteine (*soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor*) spielen eine essentielle Rolle bei der Exozytose synaptischer Vesikel. Gemeinsames Merkmal aller SNARE-Proteine ist eine 60-70 Aminosäuren-lange Domäne in der Nähe des Membranankers, die zur Bildung von *coiled-coil*-Strukturen fähig ist²⁴. Entsprechend ihrer Lokalisierung können sie in v-SNAREs (*vesicular*) und t-SNAREs (*target membrane*) unterteilt werden²⁵. Weiterhin können sie anhand ihrer Aminosäure in der 0-Ebene als R- (Arginin) oder Q- (Glutamin) SNAREs klassifiziert werden²⁶. Ein SNARE-Komplex besteht dabei aus einem R-SNARE und drei Q-SNAREs (Qa-c) und bildet die treibende Kraft für den Fusionsprozess²⁷. Im Fall des neuronalen SNARE-Komplexes stellt SNAP-25 (*synaptosomal-associated protein of 25 kDa*; t-SNARE) eine Besonderheit dar, da dieses beide Qb- und Qc-SNARE Motive trägt und keine eigene Transmembrandomäne besitzt. Es assoziiert über eine Palmitoyl-Seitenkette mit der Plasmamembran. Zusammen mit Synaptobrevin2 (v- bzw. R-SNARE) und Syntaxin1a (t- bzw. Qa-SNARE) bildet es den stabilen SNARE-Komplex, der erst unter ATP-abhängiger Hydrolyse durch NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein*) dissoziiert (siehe Abb.

2-3)²⁸. Die spezifische Inaktivierung einzelner SNARE-Partner mit Neurotoxinen führt zur Blockade der synaptischen Transmission²⁹. Die *coiled-coil*-Struktur des SNARE-Komplexes besteht aus vier umeinander gewundenen, parallel angeordneten α -Helices, wobei Synaptobrevin2 und Syntaxin1a je eine Helix und SNAP-25 zwei Helices einbringen³⁰.

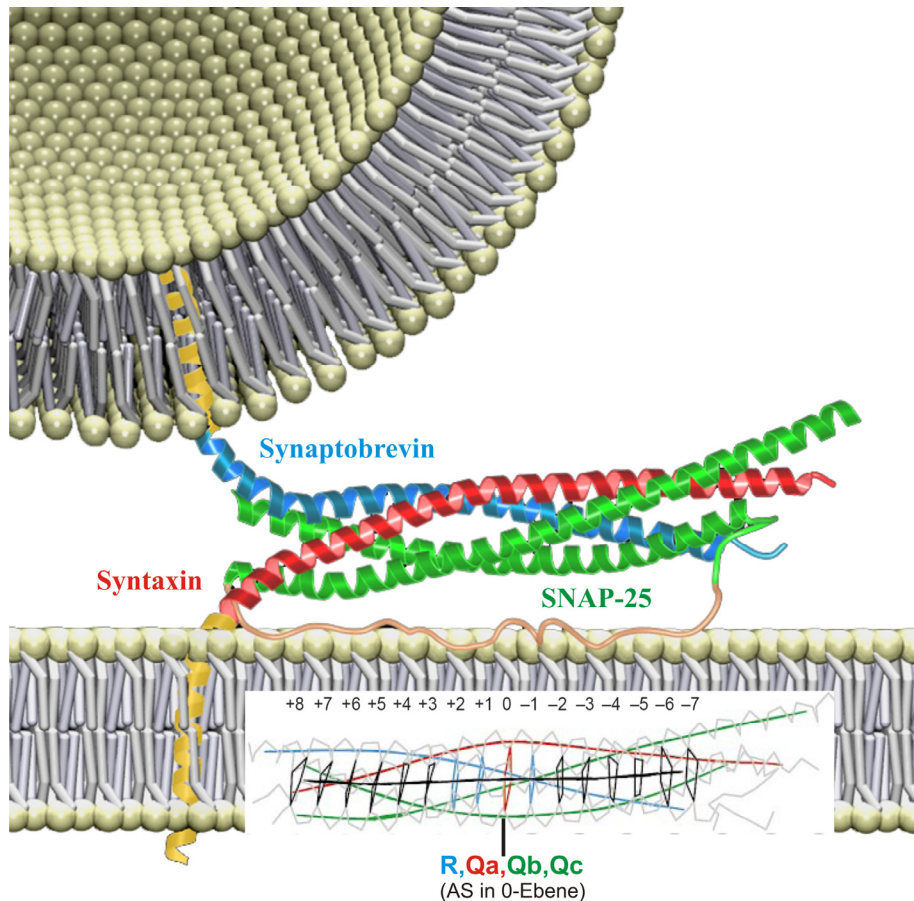


Abb. 2-3 SNARE-Komplex: Schematische Darstellung des trans-SNARE-Komplexes, bestehend aus blau: Synaptobrevin (R- bzw. v-SNARE), grün: SNAP-25 (Qb/Qc- bzw. t-SNARE) und rot: Syntaxin (Qa- bzw. t-SNARE) mit Darstellung der 16 inneren Ebenen (+8 bis -7) der *coiled-coil*-Struktur. In Ebene 0 befindet sich die für den SNARE-Komplex charakteristische 1R(Arginin):3Q(Glutamin)-Anordnung. Abbildung modifiziert nach Presseinformation B27/2006 MPI für biophysikalische Chemie und Sutton *et al.* 1998³⁰.

Die Ausbildung des Komplexes verläuft vom N-Terminus zum membranständigen C-Terminus nach einem Reißverschluss-Mechanismus. Im weiteren Verlauf kommt es zur Überwindung der Membranabstoßung und schließlich zur Fusion^{19,31}. Bei diesem Übergang, vom trans- in den cis-SNARE-Komplex, ist die treibende Kraft die freigesetzte Energie, die bei der Ausbildung der helikalen Struktur entsteht³².

2.1.2 Regulatorische Proteine des synaptischen Vesikelzyklus

Für den SNARE-Komplex an sich sowie für die übrigen Schritte des Vesikelzyklus sind weitere regulatorische/modulatorische Prozesse erforderlich. Allein für den SNARE-Komplex sind über fünfzig Interaktionspartner beschrieben worden, von denen nur wenige zuverlässig charakterisiert sind³³.

2.1.2.1 Rab-Proteine

Eine Schlüsselrolle für die Kalzium-abhängige Neurotransmitter-Freisetzung und synaptische Plastizität spielt Rab3A^{19,34-37}. Rab-Proteine sind monomere GTPasen ohne Transmembrandomäne, von denen drei Familien in synaptischen Vesikeln vertreten sind: Rab3 (Rab3A, 3B, 3C, and 3D³⁸), Rab5³⁹ und Rab11⁴⁰. Mit 25% des gesamten Rab-Proteins im Gehirn stellt die Rab3A-Isoform den quantitativ größten Anteil dar⁴¹. Rab3A wechselt zwischen einer GDP-gebundenen inaktiven und einer GTP-gebundenen aktiven Form. In der GTP-gebundenen Form ist Rab3A über ein Geranylgeranyl-Motiv⁴² an das synaptische Vesikel während und nach der Fusion gebunden¹⁹. Die Dissoziation des inaktiven GDP-gebundenen Rab3A erfolgt durch Rab **GDP dissociation inhibitor** (GDI)⁴³ und ist durch die von Kalzium ausgelöste Exozytose bedingt⁴⁴. Das GTP-gebundene Rab3A bindet an eine Reihe von löslichen Effektoren, die das Signal des aktivierten Rab3A auf die Fusionsmaschinerie übertragen³⁶. Rab3 **GTPase-activating protein** (GAP)^{35,37,45} stimuliert die GTPase-Aktivität von Rab3A und reguliert vermutlich die Dissoziation von Rab3A zeitlich⁴⁶. Elektrophysiologische Studien an Rab3A-defizienten Mäusen zeigen, dass Rab3A für die synaptische Transmission nicht essentiell ist, jedoch eine modulatorische Funktion während der Kalzium-abhängigen Fusion ausübt⁴⁷.

2.1.2.2 Munc-Proteine

Die SNARE-Komplex-Formierung in Synapsen wird vermutlich durch Munc-Proteine kontrolliert, die auch als SM-Proteine bezeichnet werden^{26,48}. Die Deletion (*knock out*) von Munc18-1 (nSec1/rbSec1) in Säugern führt zur Blockade der Exozytose und ist letal⁴⁹. Munc18-1 besitzt keine eigene Transmembrandomäne. Seine Membranassoziiierung wird vermutlich über seine Interaktion mit Syntaxin1 vermittelt^{50,51}. Rab-Proteine leiten wahrscheinlich die Dissoziation des Munc18-1/Syntaxin-Komplexes ein^{52,53}. Das Munc18-1-Modell von Pevsner beschreibt, dass der Munc18-1/Syntaxin-Komplex die Bindung von Synaptobrevin2 und SNAP-25 an Syntaxin1 verhindert⁵⁴ und umgekehrt der Syntaxin/SNAP-25-Komplex die Assoziation von Syntaxin1 mit Munc18-1 verhindert. Erst die Bindung von Munc13 mit Munc18-1 und die Auflösung der Munc18-1/Syntaxin1-Assoziation ermöglicht die Ausbildung des SNARE-Komplexes⁵⁵. Somit reguliert Munc18-1 in diesem Modell die Verfügbarkeit von Syntaxin1 für den SNARE-Komplex. Das neue Modell von Shen und Dulubova schließt eine Interaktion zwischen Munc18-1 und dem SNARE-Komplex mit ein. Somit kann

Munc18-1 sowohl den Komplex mit Syntaxin1 eingehen als auch die Interaktion mit dem assemblierten SNARE-Komplex^{56,57}. Eine direkte Wechselwirkung zwischen Munc18-1 mit beiden t-SNAREs, SNAP-25 und Syntaxin1, sowie mit dem v-SNARE Synaptobrevin2 konnte mittels *GST-pull down* und Koimmunpräzipitation gezeigt werden⁵⁷. Diese duale Interaktion von Munc18-1 führt zu dem Modell, dass die Interaktion mit den SNAREs die Membranfusion stimuliert (generelle Funktion von SM-Proteinen), wohingegen die Assoziation mit Syntaxin in der geschlossenen Konformation die SNARE-Komplex-Bildung blockiert (Funktion von Munc18-1)⁵⁷.

2.1.2.3 Complexin

Complexine (Synaphine) sind kleine, präsynaptische, zytosolische Proteine, die mit dem SNARE-Komplex in einer 1:1 Stöchiometrie interagieren^{58,59} und diesen für den schnellen, Kalzium-regulierten Exozytosevorgang während des *Priming*-Schrittes stabilisieren⁶⁰⁻⁶². Sie inserieren eine Helix in eine Tasche des helikalen SNARE-Komplex-Bündels und können nicht direkt mit einem SNARE-Protein interagieren^{58,63,64}. Die Deletion von Complexin (*knock out*) in Mäusen führt zu einer selektiven Beeinträchtigung der schnellen Kalzium-abhängigen Neurotransmitter-Freisetzung⁶⁰. Die asynchrone, langsame, Kalzium-regulierte Neurotransmitter-Freisetzung wird durch die Deletion von Complexin nicht beeinflusst⁶¹. Complexin und Synaptotagmin1 interagieren nicht direkt miteinander, jedoch führt ihre Deletion zu ähnlichen Phänotypen. Im Modell von Tang *et al.*⁶¹ ist Complexin im gleichen Signalweg wie Synaptotagmin und wird für die schnelle Kalzium-regulierte Exozytose benötigt. Die Complexin-Bindung aktiviert den SNARE-Komplex in einen metastabilen Zustand. Kalzium-gebundenes Synaptotagmin1 ersetzt Complexin aus dem metastabilen SNARE-Komplex und leitet die schnelle Exozytose ein. Somit konkurriert Synaptotagmin1 mit Complexin um die Interaktion mit dem SNARE-Komplex⁶¹.

2.1.2.4 Synaptotagmin

Das synaptische Transmembran-Protein Synaptotagmin1 reguliert als Sensor für Kalzium die schnelle, synchrone, Kalzium-abhängige Exozytose⁶⁵, wohingegen die langsame, asynchrone, Kalzium-abhängige Exozytose Synaptotagmin-unabhängig ist^{66,67}. Synaptotagmin besitzt zwei zytoplasmatische C₂-Domänen, die über eine kurze Linkerregion voneinander getrennt sind^{68,69}. Die C₂A-Domäne von Synaptotagmin bindet drei⁷⁰, die C₂B-Domäne zwei Kalziumionen⁶⁵. Ferner können beide Domänen mit SNARE-Proteinen (SNAP-25/Syntaxin1) und Phospholipiden interagieren. Im Gegensatz zur Kalzium-abhängigen Komplexbildung mit Phospholipiden ist die Interaktion mit dem SNARE-Komplex sowohl teilweise abhängig als auch unabhängig von Kalzium^{19,71-74}. Insgesamt sind innerhalb der Säuger 14 verschiedene Synaptotagmin-Isoformen bekannt⁷⁵, von denen nur Synaptotagmin1, 2 und 9 als Kalzium-Sensor für die schnelle synchrone Transmitterfreisetzung in Betracht kommen^{76,77}. Synaptotagmin9 hat im Gegensatz zu Synaptotagmin1 und 2, die sich funktionell ähnlich sind, keine

Phospholipid-Interaktion über die C₂B-Domäne und keine SNARE-Komplex-Assoziation⁷⁸. Die Deletion von Synaptotagmin1 in Mäusen (*knock out*) führt durch den selektiven Verlust der schnellen Kalzium-abhängigen Exozytose in Synapsen im Hippocampus und in Chromaffinzellen zu einem letalen Phänotyp^{66,79}.

2.1.2.5 Proteine der Endozytose

Die Disassemblierung des SNARE-Komplexes durch die ATP-abhängige Hydrolyse mittels NSF leitet die Clathrin-abhängige Endozytose ein. Die zytosolische ATPase NSF benötigt für die Interaktion mit dem SNARE-Komplex Kofaktoren, SNAPs (α -, β -, γ -SNAP; *soluble NSF attachment proteins*), die an den SNARE-Komplex binden⁷⁵. Dabei interagiert hexamerer NSF über drei α -SNAP-Proteine mit dem SNARE-Komplex unter Bildung eines transienten 20S-Komplexes, der durch die nachfolgende ATP-abhängige Hydrolyse durch NSF in die einzelnen Bestandteile zerfällt⁸⁰⁻⁸². Die an der Clathrin-abhängigen Endozytose beteiligten Proteine unterscheidet man in solche, die den Clathrin-*coat* bilden (Clathrin, Adapterproteine AP2 und AP180), und in Helferproteine wie Endophilin, Synaptojanin, Dynamin, Synaptotagmin oder Amphiphysin⁸³⁻⁸⁵. Die Endozytose beginnt mit der Anlagerung des Adapterproteins AP2 an die zu endozytierende Membran⁸⁶. Hierfür benötigt AP2 eine Interaktion mit Phosphoinositolen und vermutlich mit Synaptotagmin^{87,88}. Neben AP2 trägt AP180 zur Rekrutierung von Clathrin an die Plasmamembran bei^{89,90}. Clathrin besitzt die Fähigkeit sich als “dreibeiniges“ Protein (Triskelion) spontan zu polyedrischen Käfigen aus Fünf- und Sechsecken zusammen zu lagern und mit der dabei freigesetzten Energie die Vesikel von der Plasmamembran abzuschnüren^{91,92}. Jedes Triskelion setzt sich aus drei großen sowie drei kleineren Polypeptidketten zusammen. Da Clathrin selbst nicht an die Membran binden kann, ist es auf die Interaktion mit den Adapterproteinen angewiesen, um die Vesikel von der Membran zu lösen. Neben der Rolle als Adapter zwischen Membran und Clathrin beeinflusst AP180 die Vesikelgröße. Eine Erhöhung der AP180 Konzentration führt zu einer Verkleinerung der Clathrin-umhüllten Vesikel und die Deletion zu deren Vergrößerung⁹³⁻⁹⁵. Die durch die Clathrin-Anlagerung bedingte zunehmende Membraninvagination wird mittels der BAR-Domäne von Amphiphysin erkannt, worauf es die GTPase Dynamin rekrutiert, welche für die Abschnürung des Vesikels essentiell ist^{96,97}. Entweder aktiviert und rekrutiert Dynamin regulatorische Proteine, die für die Vesikelabschnürung benötigt werden, oder die stapelartige Anlagerung von Dynamin führt zum sogenannten “Dynaminring“, der die Energie für die Abschnürung des Vesikels liefert^{83,98}. Die Entfernung der Clathrin-Hülle unmittelbar nach der Vesikelabschnürung ist ein energetisch ungünstiger Prozess, der durch die Spaltung von ATP mittels Hitzeschockprotein Hsc70 und Kofaktor Auxilin katalysiert wird⁹⁹⁻¹⁰¹. Ferner wird vermutet, dass Synaptojanin durch seine Phosphataseaktivität PIP₂ und weitere Phosphoinositole dephosphoryliert und so die Bindungen von Adapterproteinen und Epsin mit der Vesikelmembran destabilisiert, so dass daraufhin die Bindungsaffinität zu Clathrin reduziert wird^{102,103}. Endophilin ist ein Bindungspartner von Synaptojanin und Dynamin, welcher vermutlich für die Rekrutierung beider Proteine an den

Vesikel mitverantwortlich ist⁸⁴. Die LPAAT (*lysophosphatidic acid acyl transferase*)-Aktivität von Endophilin katalysiert in der Vesikelmembran die Umwandlung von Lysophosphatidsäure zu Phosphatidsäure, so dass es zu einer negativen Membrankrümmung kommt. Somit begünstigt Endophilin die Abschnürung des Vesikels^{84,85}. Weitere nachfolgende Prozesse sind unter 2.1 zusammengefasst.

2.1.2.6 Synaptophysin

Mit durchschnittlich 32 Kopien pro Vesikel stellt Synaptophysin neben Synaptobrevin2 das Hauptprotein der synaptischen Vesikel dar¹¹. Aufgrund der vier Transmembrandomänen und der zytoplasmatisch lokalisierten Termini wird es als *tetraspan vesicle membrane protein* (TVP) klassifiziert. Neben den Physinen mit Synaptophysin, Synaptoporin, Pantophysin und Mitsugumin29 kodieren die Gyryne (Synaptogyrin1-4) und die *secretory carrier-associated membrane proteins* (SCAMP 1-5) für die drei Genfamilien der TVPs¹⁰⁴. Das Synaptophysin-Gen ist beim Menschen und der Maus auf dem X-Chromosom lokalisiert, und im Gegensatz zu anderen Physinen hat Synaptophysin ein sechstes Intron in der 3'-nichttranslatierten Region (3'-UTR)^{105,106}. Synaptophysin ist in der ersten intravesikulären Schleife N-glykosyliert¹⁰⁷. Beide intravesikulären Schleifen werden durch Disulfidbindungen zwischen Cysteinresten stabilisiert und sind für die Interaktion mit Synaptobrevin2 erforderlich¹⁰⁸. Der lange zytoplasmatische C-Terminus besteht aus Pentapeptid-Wiederholungen. Neun der zehn Wiederholungen beginnen mit einem Tyrosin^{104,109} (siehe Abb. 2-4).

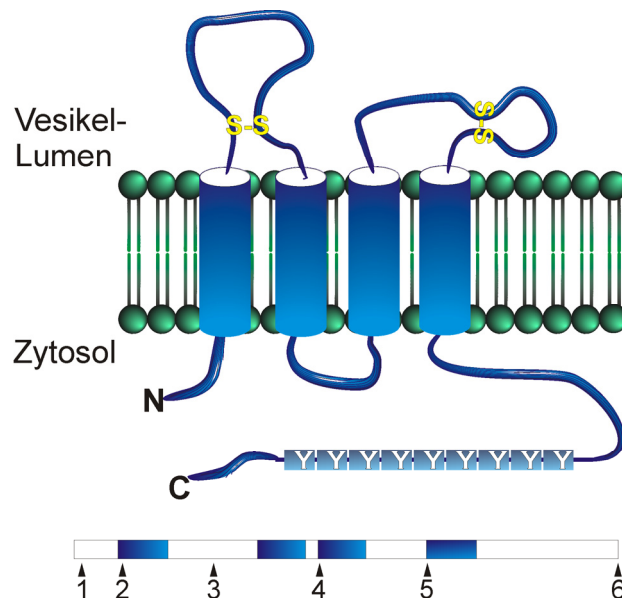


Abb. 2-4 Synaptophysin: Schematische Darstellung der Synaptophysin-Protein- und -Gen-Struktur. S-S: Disulfidbindungen; Y: Tyrosin. Die Intronpositionen (1-6) sind durch Pfeile gekennzeichnet und die Transmembrandomänen blau markiert (untere Abbildung).

Seit der Entdeckung von Synaptophysin im Jahre 1985^{8,10} zeigen zahlreiche *in vivo*- und *in vitro*-Experimente, dass es zwar nicht essentiell für den synaptischen Vesikelzyklus ist, aber dennoch als Modulator an zahlreichen Funktionen der synaptischen Vesikel-Exo- und Endozytose beteiligt ist¹⁰⁴. Frühe Studien an *Xenopus laevis* Oozyten ließen vermuten, dass Synaptophysin die Neurotransmitter-Freisetzung reguliert, da die Überexpression von Synaptophysin die Neurotransmitter-Sekretion verstärkt, die Injektion von Synaptophysin-Antikörpern hingegen die Sekretion reduziert¹¹⁰⁻¹¹³.

Der am besten untersuchte Interaktionspartner von Synaptophysin ist Synaptobrevin²^{114,115}. Zusammen bilden sie den Synaptophysin/Synaptobrevin-Komplex, der vermutlich die Verfügbarkeit von Synaptobrevin für die Bildung des SNARE-Komplexes reguliert, da die Komplexe sich gegenseitig ausschließen: Synaptobrevin kann im Komplex mit Synaptophysin nicht mehr mit Syntaxin und SNAP-25 und umgekehrt Synaptobrevin im SNARE-Komplex nicht mehr mit Synaptophysin interagieren¹¹⁵⁻¹¹⁸. Die C-terminale Transmembranregion von Synaptobrevin bindet dabei an Synaptophysin, der N-Terminus wird für die Bildung des SNARE-Komplexes benötigt¹¹⁹. Ferner ist der zytoplasmatische C-Terminus von Synaptophysin nicht, wie die Disulfidbindungen in den intravesikulären Schleifen¹⁰⁸, für die Interaktion mit Synaptobrevin essentiell, scheint jedoch für die Kontrolle der Synaptobrevin-Lokalisierung von Bedeutung zu sein¹¹⁶.

Während der Entwicklung wird Synaptophysin bereits in der frühen Neurogenese exprimiert und ist in der Synaptogenese stark hochreguliert¹²⁰⁻¹²². Im embryonalen Gehirn der Ratte ist der Synaptophysin/Synaptobrevin-Komplex noch nicht detektierbar, obwohl beide Proteine bereits exprimiert werden. Erst im Laufe der neuronalen Entwicklung wird der Komplex durch posttranslationale Modifikationen von Synaptophysin gebildet und hochreguliert¹²³. Dieser Komplex ist nicht essentiell für die Exo-/Endozytose¹², er ist jedoch vermutlich an plastischen Umbauvorgängen im adulten Gehirn beteiligt und steigert die Effizienz der synaptischen Übertragungen während der Entwicklung und bei erhöhter synaptischer Aktivität¹²⁴.

Wiederholte, lang anhaltende synaptische Hyperaktivität führt im Kindling-Epilepsiemodell der Ratte zu einer Erhöhung des Synaptophysin/Synaptobrevin-Komplexes und zu dem Modell, dass der Komplex einen Reservepool an Synaptobrevin bei erhöhter synaptischer Aktivität bereitstellt¹²⁴. Exzessive Stimulationen mit verschiedenen Stimulanzen zeigen eine Dissoziation des Synaptophysin/Synaptobrevin-Komplexes und eine erhöhte Interaktion von Synaptobrevin im SNARE-Komplex in Abhängigkeit von extrazellulärem Kalzium¹²⁵. Die Synaptophysin/Synaptobrevin-Interaktion ist abhängig von einem hohen Cholesterin-Gehalt in der Membran. Eine Erniedrigung von Cholesterin in der Membran führt zu einer Reduzierung des Komplexes¹¹⁷. Die Membran von synaptischen Vesikeln enthält eine überdurchschnittliche Dichte an Cholesterin, das in Form von Clustern auf der Membran angereichert ist¹²⁶. Solche Protein-Lipid-Cluster sind vermutlich für die Funktion des SNARE-Komplexes notwendig¹²⁷⁻¹³⁰. Ferner ist Cholesterin für die Vesikel-Biogenese und starke Krümmung der Vesikelmembran erforderlich¹³¹. Synaptophysin ist das hauptcholesterin-bindende Protein von synaptischen Vesikeln und ist vermutlich für die Rekrutierung

von Cholesterin zur synaptischen Vesikelmembran und für die Ausbildung von Protein-Lipid-Domänen verantwortlich¹³².

Weiterhin ist Synaptophysin eines der haupttyrosin-phosphorylierten Proteine in synaptischen Vesikeln^{133,134}. Die Tyrosin-Phosphorylierung erfolgt durch Src- (pp60^{c-src}) und Fyn-Kinasen an den C-terminalen Tyrosin-Resten^{135,136} und ist *in vivo* bislang noch nicht genau untersucht worden¹³⁷. Sie erfolgt vermutlich mehrfach am C-terminalen Ende innerhalb der Prolin- und Serin-reichen Pentapeptid-Wiederholungen, von denen neun mit Tyrosin beginnen^{8,109}. In diesem Bereich kann Synaptophysin auch mittels Ca²⁺/Calmodulin-abhängiger Protein-Kinase2 phosphoryliert werden^{133,138}. *Long-term potentiations* (LTPs) sind von Tyrosin-Phosphorylierungen abhängig^{139,140}. Src-Aktivität und Src/Synaptophysin-Interaktion sind *in vivo* bei Lernprozessen hochreguliert¹⁴¹. Ferner ist die Tyrosin-Phosphorylierung von Synaptophysin während LTPs erhöht¹⁴² und zeigt somit eine Korrelation des Phosphorylierungsgrades zur Stimulation¹³⁷. Die Phosphorylierung könnte demnach eine zentrale Funktion von Synaptophysin darstellen. Allgemein gehört Phosphorylierung zu den fundamentalen Mechanismen zur Steuerung von Interaktionen in Zellen. Zahlreiche Proteine des synaptischen Vesikelzyklus werden durch Phosphorylierung reguliert, wie zum Beispiel Clathrin, Amphiphysin, AP2, AP180, Dynamin, Synaptojanin und Synaptotagmin¹⁴³. Auch die Interaktion zwischen Synaptophysin und Dynamin1 wird durch Phosphorylierung reguliert und erfolgt Kalzium- und GTP-abhängig über den zytoplasmatischen C-Terminus von Synaptophysin^{144,145}.

Die Interaktion mit dem Adapterprotein AP1 wird ebenfalls über den C-Terminus von Synaptophysin vermittelt¹⁴⁶. Beide Interaktionen mit wichtigen, an der Endozytose beteiligten Proteinen und die Cholesterin-bindenden Eigenschaften von Synaptophysin deuten darauf hin, dass Synaptophysin eine regulative Aufgabe während der Endozytose erfüllt. Weitere, bislang identifizierte Interaktionspartner von Synaptophysin sind die vesikuläre Protonenpumpe V-ATPase^{147,148}, die den erforderlichen Protonengradienten für die Transmitterbefüllung des Vesikels erzeugt, Myosin V¹⁴⁹, das eine wichtige Rolle bei der Translokation von Vesikeln erfüllt, und Siah (E3 Ubiquitin-Protein Ligase), das vermutlich die Degradation von Synaptophysin reguliert¹⁵⁰.

Synaptophysin bildet selbst homomultimere Komplexe aus, die durch nicht-kovalente Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten entstehen^{108,151,152}. Der zytoplasmatische C-Terminus von Synaptophysin ist für die Oligomerisierung nicht essentiell¹⁵³. Synaptophysin Hexamere können möglicherweise spannungsabhängige Ionenkanäle bilden^{152,154}. Diese Annahme, zusammen mit der strukturellen Ähnlichkeit von Synaptophysin und dem *gap-junction* Protein Connexin, führte zum Modell, dass Synaptophysin eine Fusionspore bildet, die die Vesikelfusion und -Exozytose initiiert^{152,154}. Die Dissoziation der Synaptophysin-Homooligomere in hippokampalen Neuronen ist synchron zur kompletten Vesikelfusion und bekräftigt damit die Aussage der Fusionsporen-Theorie¹⁵³. Ein dreidimensionales elektronenmikroskopisches Strukturmodell des Synaptophysin Homomultimers in einer 20 Å Auflösung bestätigt, dass Synaptophysin als Hexamer eine Fusionspore mit einer

geschlossenen Konformation auf der zytosolischen Seite und einer offenen Konformation auf der Seite des Vesikellumens bildet¹⁵⁵ (siehe Abb. 2-5).

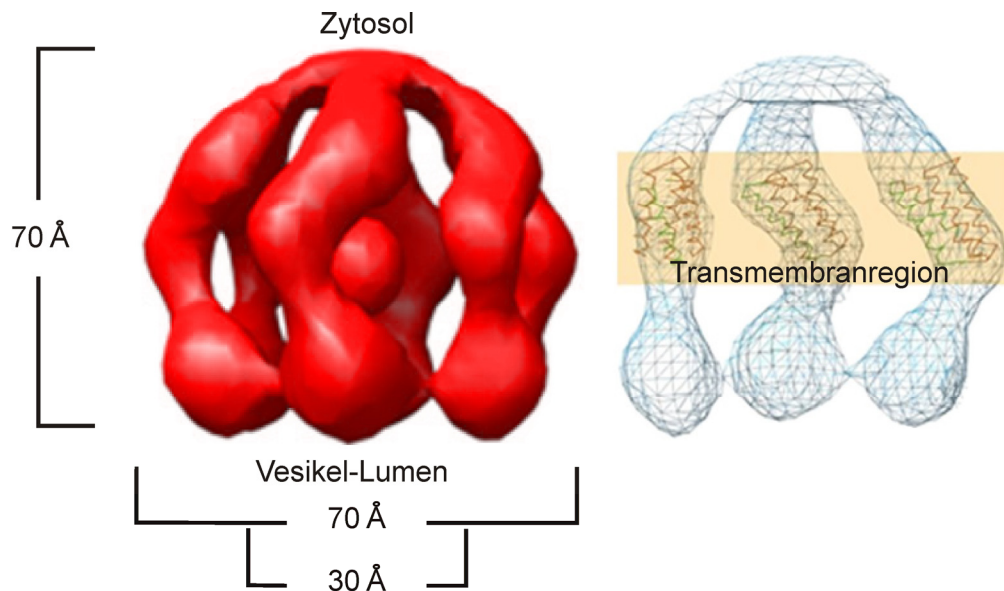


Abb. 2-5 Synaptophysin-Hexamer: Schematische dreidimensionale Darstellung der Synaptophysin-Fusionspore. Abbildung modifiziert nach Arthur *et al.* 2007¹⁵⁵.

Synaptophysin-defiziente Mäuse (*knock out*) zeigen keine auffälligen funktionellen und morphologischen Veränderungen^{12,13}. Kompensatorische Effekte anderer TVPs, wie zum Beispiel Synaptoporin und Synaptogyrin, oder völlig unterschiedliche Proteine aus alternativen Reaktionswegen, könnten das Synaptophysin-Defizit ausgleichen. Tatsächlich zeigen Untersuchungen an Photorezeptor-Terminalen, bei denen in der äußeren plexiformen Schicht der Retina (OPL) kein Synaptoporin exprimiert wird, dass es in diesen Bereichen bei Synaptophysin-defizienten Mäusen zu morphologischen Veränderungen kommt¹⁵⁶. Diese Veränderungen beruhen auf einer aktivitätsabhängigen Reduzierung der Vesikeldichte sowie einer Zunahme der Vesikelgröße und der Anzahl Clathrin-haltiger Vesikel. Die beobachtete Erhöhung von Clathrin-umhüllten Vesikeln, zusammen mit der Erkenntnis, dass die Injektion von Glutathion-S-Transferase-fusioniertem zytoplasmatischem Synaptophysin C-Terminus in Tintenfisch-Synapsen ebenfalls in einer Reduzierung der Vesikeldichte und in einer Erhöhung der Clathrin-haltigen Vesikel resultiert¹⁴⁵, führte zu der Vermutung, dass Synaptophysin vielleicht in einen Clathrin-unabhängigen Reaktionsweg, wie zum Beispiel dem *kiss and run*, involviert ist^{145,156}. Ferner zeigen TVP-doppeldefiziente Mäuse, bei denen Synaptophysin und Synaptogyrin1 deletiert wurden, Veränderungen in der synaptischen Plastizität¹³⁶. Elektrophysiologische Untersuchungen dieser Tiere ergaben eine Reduktion sowohl der *long* als auch der *short-term potentiation* (LTP bzw. STP), ohne die Neurotransmitter Freisetzung zu beeinträchtigen¹³⁶. Direkte Genexpressionsveränderungen bei Synaptophysin-defizienten Mäusen konnten mittels *microarray*-Analysen in Retinae nicht detektiert werden. Offensichtlich sind

kompensatorische Effekte bereits vorhanden und/oder basieren auf posttranskriptionalen Veränderungen¹⁵⁷. In *Caenorhabditis elegans* existiert von jeder TVP-Familie jeweils nur ein Protein: Synaptophysin (SPH-1), Synaptogyrin (SNG-1) und SCAMP (SCM-1). Untersuchungen an Einfach- oder Dreifach-Deletionsmutanten ergaben keine offensichtlichen funktionellen und morphologischen Veränderungen¹⁵⁸. Dennoch wies die TVP-Dreifachmutante auch hier eine signifikant erhöhte Anzahl von Clathrin-haltigen Vesikeln auf. Ferner zeigten sowohl TVP-Einzelmutanten als auch die Dreifachmutante ein erhöhtes Krampfverhalten unter Stressbedingungen, die durch den GABA-Antagonisten Pentylentetrazol (PTZ) ausgelöst wurden¹⁵⁹. Somit unterstützen die Beobachtungen an *C.elegans* die bereits erwähnten Vermutungen, dass TVPs nicht essentiell für neuronale Prozesse sind, sie aber als Modulatoren agieren und vermutlich an einem Clathrin-unabhängigen Vesikelweg beteiligt sind.

2.2 Proteininteraktionen

Die Genomforschung entwickelte sich in den letzten 10 Jahren mit unglaublichem Tempo. Seit der ersten kompletten Sequenzierung von *Haemophilus influenzae* im Jahre 1995 sind über 605 Genome vollständig sequenziert worden, über 1100 Genome sind in Bearbeitung (NCBI, 01.09.2007). Allein der Mensch hat schätzungsweise mehrere hunderttausend bis Millionen Proteine, da ein einzelnes Gen im Durchschnitt fünf bis zehn Proteine produziert. Die entstandene Komplexität vollständig zu erfassen und dabei neue Signalwege und Interaktionen zwischen Proteinen zu eruieren, ist eine Herausforderung für die nächsten Jahrzehnte. Die Wechselwirkungen zwischen Proteinen spielen eine essentielle Rolle in der Regulation biochemischer Prozesse. Die Identifizierung von neuen Proteininteraktionspartnern ist ein zentraler Aspekt, um die noch vielen ungeklärten Signalkaskaden und Prozesse zu verstehen. Auch für das Verständnis der molekularen Basis von Krankheiten und für die Entwicklung neuer Medikamente ist eine genaue Kenntnis der verschiedenen Proteinwechselwirkungen essentiell. Weit verbreitete Methoden zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* in eukaryontischen Zellen sind das *Yeast Two-Hybrid System* und der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), die in den nachfolgenden Kapiteln näher betrachtet werden.

2.2.1 *Yeast Two-Hybrid System* (Y2H)

Über 50% aller Protein-Protein-Wechselwirkungen^{160,161} wurden mit dem von Fields und Song 1989¹⁶² entwickelten *Yeast Two-Hybrid System* identifiziert. Das Y2H System nutzt den modularen Aufbau von Transkriptionsfaktoren aus zwei verschiedenen Domänen, der DNA-Bindungsdomäne BD und der Transkriptionsaktivierungsdomäne AD. Am häufigsten wird die GAL4- oder LexA-DNA-Bindungsdomäne mit einer GAL4-, VP16- oder B42-Transkriptionsaktivierungsdomäne im Y2H System verwendet¹⁶³. Dabei werden zwei Proteine in Fusion mit den beiden Domänen in einem

Hefestamm exprimiert, bei dem der ursprüngliche Transkriptionsfaktor deletiert wurde. Die DNA-BD bindet an ihre Zielsequenz, kann aber ohne die AD keine Genexpression auslösen. Erst wenn die DNA-BD und die AD sich in räumlicher Nähe zueinander befinden, das heißt bei einer bestehenden Protein-Protein-Wechselwirkung, wird die Funktion des Transkriptionsfaktors wiederhergestellt. Zur Detektion einer bestehenden Wechselwirkung werden verschiedene Reportergene wie His3, Ade2 und Leu2 Auxotrophiemarker oder Farbreporter wie LacZ aktiviert. Das Y2H System eignet sich auch zum *screening* von unbekanntem Interaktionspartnern eines bekannten Proteins, indem Transkripte einer cDNA Bibliothek an die AD fusioniert werden¹⁶⁴. Es ist ein sensitives, eukaryontisches *in vivo*-System, das im Gegensatz zur Koimmunpräzipitation nicht auf spezifische Antikörper angewiesen ist. Posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung, Palmitoylierung oder Faltung der Proteine durch Chaperone kommen zwar in der Hefe vor, dennoch besitzt die Hefe nur ein limitiertes Repertoire an posttranslationalen Modifikationen im Vergleich zu höheren Eukaryoten¹⁶⁵. Somit können einige Protein-Protein-Wechselwirkungen, die auf solchen Modifikationen beruhen, mit einem herkömmlichen Y2H System nur schwer detektiert werden. Des Weiteren können falsch positive Antworten in einem Interaktions-Screen entstehen, indem Proteine in Kontakt treten, die normalerweise in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert sind. Ein weiterer wesentlicher Nachteil ist, dass die Interaktion im Zellkern stattfinden muss, weshalb die Methode für die Interaktion von Membranproteinen ungeeignet ist.

2.2.1.1 Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid System

Etwa ein Drittel aller menschlichen Proteine sind Membranproteine, die zentrale und lebenswichtige Funktionen erfüllen. Mehr als 50% aller Pharmaka wirken auf sie ein, und zahlreiche Erkrankungen beruhen auf Funktionsstörungen von Membranproteinen. Mit einem konventionellen Y2H System, bei dem die Interaktion im Zellkern stattfinden muss, werden Interaktionen mit Membranproteinen oder Membran-assoziierten Proteinen nicht erfasst. Mit Hilfe von modifizierten Y2H Systemen, wie dem *reverse Ras-recruitment-System*^{166,167} oder dem *Split-Ubiquitin-System*^{168,169}, können auch Membranprotein-Wechselwirkungen direkt detektiert werden.

Das *Split-Ubiquitin Y2H System* basiert auf der Rekonstitution zweier Ubiquitin-Hälften und wurde erstmals 1994 von Johnsson und Varshavsky¹⁶⁸ beschrieben. Ubiquitin ist ein hochkonserviertes Protein aus 76 Aminosäuren, das in allen Eukaryonten zu finden ist. Dabei unterscheidet sich das Ubiquitin vom Menschen in nur drei Aminosäuren von dem der Hefe¹⁷⁰. Die reversible posttranslationale Ubiquitinierung moduliert die Aktivität von Proteinen und greift in die Regulation zahlreicher zellulärer Vorgänge ein. Es spielt eine wesentliche Rolle bei der gezielten Degradation von Proteinen über das 26S-Proteasom^{171,172}. Insgesamt kodieren in der Hefe vier Genloci für Ubiquitin, wovon drei für jeweils ein Ubiquitin und der vierte Locus dagegen für ein aus fünf Ubiquitin-Molekülen bestehendes Polyubiquitin kodiert¹⁷³. Solche Polyubiquitin-Vorstufen können aus bis zu zwölf Ubiquitin-Molekülen bestehen. Sie werden später durch Ubiquitin spezifische Proteasen (UBPs)

hinter dem C-terminalen Glycin an Stelle 67 abgespalten und können schließlich durch eine Kaskade aus verschiedenen Enzymen (E1-E3) auf ein Substrat-Protein übertragen und über das Proteasom oder in der Vakuole (Lysosomen bei höheren Eukaryoten) abgebaut werden. Nicht korrekt gefaltete Ubiquitine werden von den UBPs nicht erkannt und können damit nicht gespalten werden¹⁶⁸. Die Spaltung von Polyubiquitin durch UBPs ist die Grundlage des *Split-Ubiquitin Y2H Systems*. In diesem System wird Ubiquitin in zwei Hälften gespalten. Die C-terminale Hälfte Cub (Aminosäure 36-76) ist an einen Transkriptionsfaktor fusioniert, der aus der DNA-Bindedomäne LexA aus *Escherichia coli* und der Transkriptionsaktivierungsdomäne VP16 des *Herpes simplex Virus* besteht. Diese C-terminale Hälfte des Ubiquitin Cub ist wiederum an das *bait*-Protein fusioniert, wohingegen der N-Terminus Nub (Aminosäure 1-35) an das *prey*-Protein fusioniert ist (siehe Abb. 2-6). Die nativen Hälften des Ubiquitin können spontan reassoziieren. Deshalb wurde das Isoleucin an Stelle 13 durch Glycin bei Nub ersetzt (NubG), so dass erst bei einer bestehenden Protein-Protein-Wechselwirkung die beiden Hälften reassoziieren und daraufhin UBPs den Transkriptionsfaktor abspalten. Im Folgenden aktiviert der Transkriptionsfaktor im Nukleus die verschiedenen Wachstums- und Farb-Reporter, die Aufschluss über eine bestehende Protein-Protein-Wechselwirkung geben.

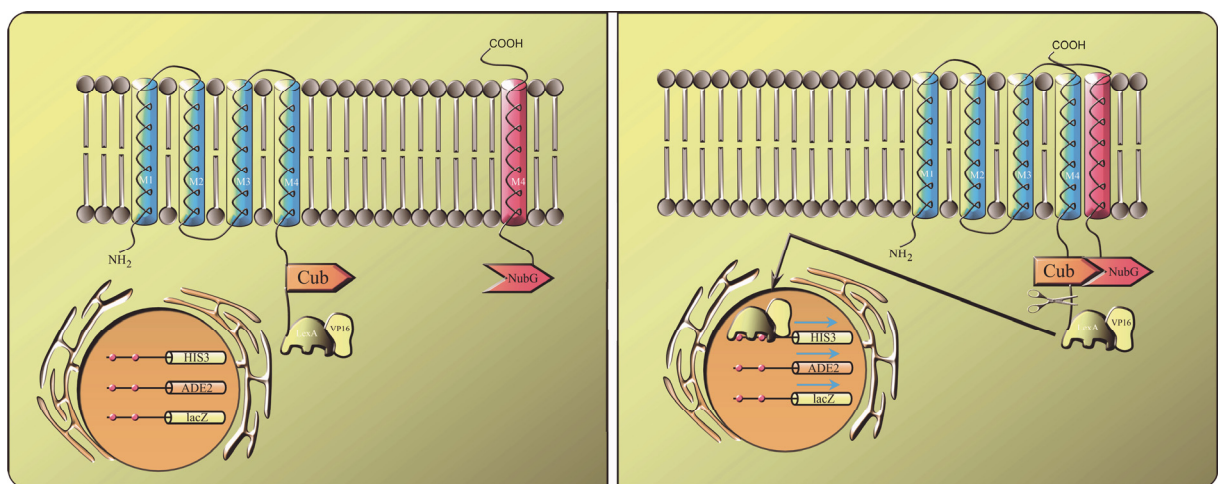


Abb. 2-6 Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid System. Schematische Darstellung des *Split-Ubiquitin Y2H System*. Ohne Interaktion der fusionierten Proteine bleibt der Transkriptionsfaktor bestehend aus LexA und VP16 am *bait*-Protein über den C-terminalen Teil des Ubiquitin Cub gebunden. Bei Interaktion der Fusionspartner wird Ubiquitin rekonstituiert, was durch UBPs erkannt wird. Daraufhin wird der Transkriptionsfaktor abgespalten, der nun im Nukleus die Reportergene aktivieren kann.

Mit Hilfe des *Split-Ubiquitin Y2H System* können alle Typen von integralen Membranproteinen, Membran-assoziierten Proteinen und zytosolischen Proteinen als Interaktionspartner eines Membranproteins identifiziert werden. Die Topologie des *bait*-Membranproteins muss dabei bekannt sein, da Cub mit fusioniertem Transkriptionsfaktor im Zytosol lokalisiert sein muss. Durch einen Membrananker an einem zytosolischen Protein kann das System auch zum *screening* von zytosolischen *bait*-Proteinen verwendet werden, da dadurch die Translokation des löslichen *bait*s in den Nukleus und die damit verbundene Aktivierung der Reportergene unterbunden bleibt¹⁷⁴. Insgesamt

betrachtet ist es ein effektives und sensitives System für das *screening* neuer Interaktionspartner von Membranproteinen und wurde bereits in mehreren Interaktionsstudien verwendet¹⁷⁵⁻¹⁸².

2.2.2 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer eignet sich als Methode für den direkten Nachweis von Bindungen und Interaktionen zwischen Proteinen, DNA, RNA und Lipiden *in vivo*. Wird Materie mit Licht einer passenden Wellenlänge bestrahlt, kann dieses absorbiert werden und dabei ein Elektron vom Grundzustand in einen elektronisch angeregten Zustand verschieben. Die absorbierte Energie kann dabei über verschiedene Wege abgegeben werden (siehe Abb. 2-7):

Bei der Fluoreszenz erfolgt die Emission aus einem Singulettzustand heraus ($S_1 \rightarrow S_0$). Bei dieser Form der Schwingungsrelaxation hat der angeregte Zustand eine kurze Lebensdauer von 10^{-9} Sekunden, und die Emission erfolgt mit geringerer Frequenz und größerer Wellenlänge (Stokes Verschiebung). Die Phosphoreszenz stellt einen Übergang aus einem Triplet in einen Singulett-Zustand ($T_1 \rightarrow S_0$) dar. Hierbei findet ein Wechsel zwischen Zuständen unterschiedlicher Spinmultiplizität (*Inter-System-Crossing*, ISC) statt. Dieser Wechsel ist zwar symmetrieverboten, kann jedoch bei Spin-Bahn-Kopplung eintreten. Aus diesem Grund ist der angeregte Triplet-Zustand länger als bei der Fluoreszenz (10^{-6} - 10^{-3} Sekunden). Der Übergang in den Grundzustand S_0 erfolgt unter Abgabe eines Photons (Phosphoreszenz), kann aber auch über Wärmeabgabe (ISC) erfolgen. Ein weiterer strahlungsloser Übergang ist die *Internal Conversion* bei gleicher Spinmultiplizität. Hierbei handelt es sich ebenfalls um einen Transfer unter Wärmeabgabe vom Singulettzustand S_1 in einen hoch angeregten Schwingungszustand des S_0 (siehe Abb. 2-7).

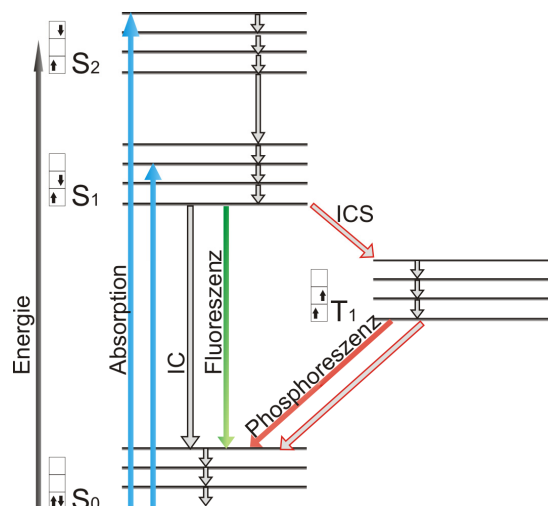


Abb. 2-7 Jablonski Diagramm: Schematische Darstellung der Energie- und Schwingungszustände. S₀: Singulett-Grundzustand; S₁: erster angeregter Singulett-Zustand; S₂: zweiter angeregter Singulett-Zustand; T₁: erster angeregter Triplet-Zustand; IC: *Internal Conversion*; ISC: *Inter-System-Crossing*

Eine weitere Möglichkeit des strahlungslosen Übergangs ist der Energietransfer von einem angeregten Donor-Fluoreszenzmolekül auf einen benachbarten Akzeptor (siehe Abb. 2-8). Der Dexter-Energietransfer-Prozess ist ein kurzreichweitiger (bis 1 nm) Austausch von Elektronen, der durch die Überlappung der Atomorbitale möglich ist. Für einen Transfer über größere Distanzen ist der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer verantwortlich.

Die Grundlage des von Theodor Förster 1948¹⁸³ postulierten Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers basiert auf einem strahlungslosen Energietransfer eines fluoreszierenden Donors auf einen Akzeptor über Dipol-Dipol-Wechselwirkung (siehe Abb. 2-8).

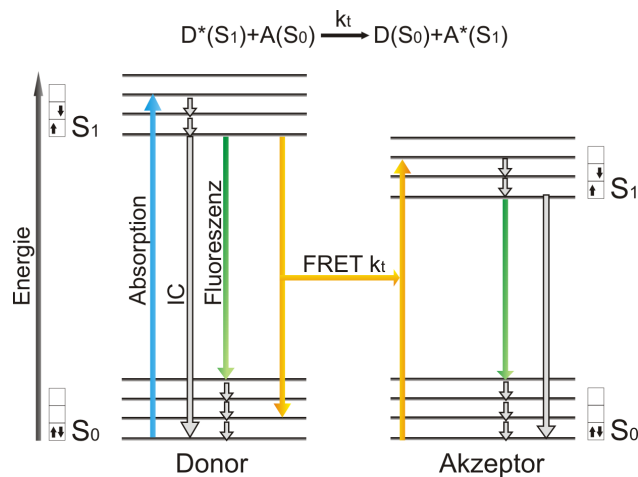


Abb. 2-8 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer: S₀: Singulett-Grundzustand; S₁: erster angeregter Singulett-Zustand; IC: *Internal Conversion*; k_t: Energieübertragung auf Akzeptor

Dabei sinkt die Fluoreszenz-Intensität und -Lebensdauer des Donors, und die Emissionsintensität des Akzeptors nimmt zu. Somit steht dieser Energietransfer in direkter Konkurrenz zu der Fluoreszenz des Donors. Die Energietransfereffizienz E wird errechnet aus der Anzahl der vom Donor zum Akzeptor transferierten Photonen dividiert durch die Anzahl der vom Donor absorbierten Photonen. Die Anzahl der sowohl vom Donor als auch vom Akzeptor emittierten Photonen ist dabei proportional zur Lebensdauer seines angeregten Zustands. Es gilt somit:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}$$

τ_D : Lebensdauer des angeregten Zustands des Donors

τ_{DA} : Lebensdauer in Anwesenheit des Akzeptors

E: Energietransfereffizienz

Dieser Transfer ist dabei abhängig von der räumlichen Nähe zwischen Donor und Akzeptor und wird beschrieben als:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R_{DA}}{R_0}\right)^6}$$

R_{DA} : Abstand zwischen Donor und Akzeptor

R_0 : Förster Radius

E: Energietransfereffizienz

Somit ist die Energietransfereffizienz E proportional zu dem Kehrwert des Abstands beider Moleküle zur sechsten Potenz. Der Förster-Radius ist abhängig vom Fluorophorenpaar und beschreibt den Abstand R_{DA} , bei dem die Energietransfereffizienz 50% beträgt (siehe Abb. 2-9).

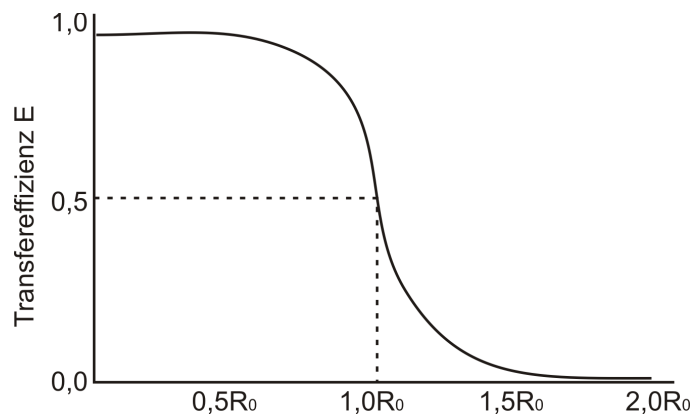


Abb. 2-9 Abstandsabhängigkeit der Transfereffizienz

Diese Abstandsabhängigkeit des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers, dass die Energie nur über einen kurzen Bereich von ungefähr 1-10 nm effizient übertragen wird¹⁸⁴, erlaubt molekulare Wechselwirkungen zwischen zwei Proteinen oder Strukturänderungen innerhalb eines Moleküls zu detektieren. Gegenüber einer normalen Fluoreszenzmikroskopie ist das Auflösungsvermögen etwa zehnmal so gut.

Eine Grundvoraussetzung für FRET ist eine ausreichende spektrale Überlappung des Fluoreszenzspektrums des Donor-Fluorophors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptor-Fluorophors. *Enhanced cyan fluorescent protein* (ECFP) und *enhanced yellow fluorescent protein* (EYFP) eignen sich sehr gut als Fluoreszenzpaar (Überlappung 450-550 nm), mit einem Förster Radius von circa 5 nm.

Für die Bestimmung der Energietransfereffizienz beziehungsweise des Förster-Radius muss ein weiterer Faktor, der Orientierungsfaktor k^2 , berücksichtigt werden. Er ist bestimmt durch die relativen Orientierungen der Übergangsdipolmomente von Donorfluoreszenz und Akzeptorabsorption und kann

dabei Werte zwischen 0 und 4 annehmen. Der maximale Wert 4 ist bei einer kollinearen Anordnung von Donor- und Akzeptor-Fluorophor, wohingegen der minimale Wert zum Beispiel bei einer senkrecht aufeinander stehenden Anordnung der Dipolmomente erreicht wird. Im Allgemeinen wird von frei beweglichen Fluorophoren ausgegangen, so dass man für den Orientierungsfaktor k^2 einen Mittelwert von 2-3 verwendet.

2.2.3 Methoden der FRET Messung

Es existieren verschiedenste mikroskopische Techniken für die Erfassung von FRET¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Eine der gängigsten Methoden für eine FRET Messung ist die indirekte über *Acceptor Photobleaching*, bei der die Donorintensität vor und nach dem Ausbleichen des Akzeptors erfasst wird^{188,189}. Da das Akzeptorfluorophor nach dem Bleichen keine Energie mehr von dem Donorfluorophor aufnehmen kann, ist im Fall einer Protein-Protein-Wechselwirkung davon auszugehen, dass die Intensität der Emission des Donorfluorophors erhöht ist (siehe Abb. 2-10).

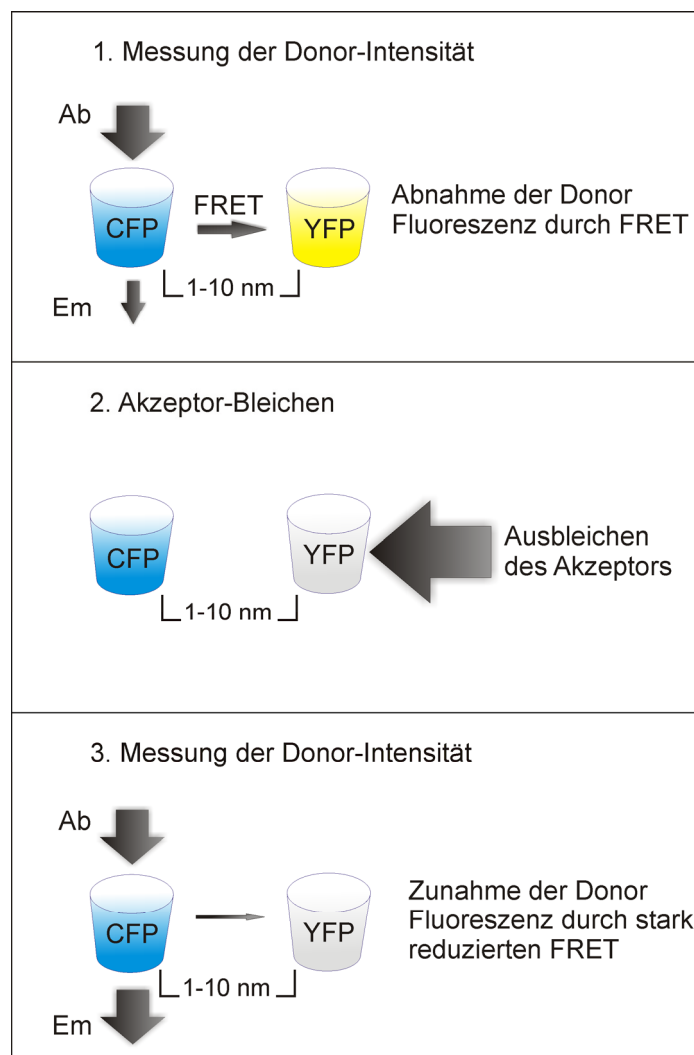


Abb. 2-10 Acceptor Photobleaching: Schematische Darstellung der indirekten FRET-Messung durch reduzierte Donor Fluoreszenz nach Akzeptor-Bleichen; Ab: Absorption; Em: Emission

Die *Sensitized-Emission*-Methode eignet sich besonders für Lebendzellmikroskopie. Hier erfolgt die FRET Messung indirekt nach der Anregung des Donors durch eine Abnahme der Donorfluoreszenz und einer Erhöhung der Akzeptorfluoreszenz bei einer bestehenden Proteinwechselwirkung¹⁹⁰. Diese Methode weist eine erhöhte Fehlerrate zum Beispiel durch *crosstalk* oder Hintergrundrauschen auf, so dass mehrere Kontrollen und Korrekturfaktoren zur Berechnung der FRET-Effizienz benötigt werden. Das *Donor-Photobleaching* ist eine von Young *et al.*¹⁹¹ entwickelte Methode zur Quantifizierung von FRET. Allgemein ist *Photobleaching* ein lichtinduzierter, irreversibler Zerstörungsprozess eines Farbstoffs, der sich im angeregten Zustand befindet¹⁹². Je länger der Farbstoff in diesem angeregten Zustand bleibt, umso höher ist die Zerstörungsrate. In einem bestehenden FRET-System besteht für den Donor neben der Fluoreszenz noch eine weitere Möglichkeit, um vom angeregten Zustand in den Grundzustand zu wechseln, der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer auf den Akzeptor, so dass der Donor in einem FRET-System schneller in den Grundzustand zurückkehren kann und somit eine geringere Ausbleichrate aufweist als ein isolierter Donor. Durch den Vergleich der Ausbleichraten von Donor/Akzeptor und Donor ohne Akzeptor erhält man ein Maß für die Berechnung der FRET-Effizienz. Mit dieser Methode konnte bereits eine Interaktion zwischen Synaptophysin und Synaptophysin beziehungsweise Synaptobrevin gezeigt werden¹⁵³.

2.3 Zielsetzung

Die neuronale Signalübertragung beruht auf dem synaptischen Vesikelzyklus, der durch zahlreiche Transmembranproteine reguliert wird. Eines der Hauptproteine des synaptischen Neurotransmittervesikel ist Synaptophysin. Es ist durch vier Transmembrandomänen und zytoplasmatisch lokalisierte Termini charakterisiert und Bestandteil von Proteinkomplexen, die den Vesikelzyklus regulieren. Welche Proteine an der Bildung und Regulation dieser Komplexe beteiligt sind, ist vorwiegend unbekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe des neuartigen *Split-Ubiquitin Y2H Systems*, das auf der Rekonstitution zweier Ubiquitin-Hälften basiert und eine direkte *in vivo*-Interaktion von Membranproteinen ermöglicht, molekulare Wechselwirkungen von Synaptophysin aufzuklären. Die Ergebnisse sollten durch Koimmunpräzipitation und Immunfluoreszenz sowie eine weitere direkte *in vivo*-Methode, der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), überprüft und genauer charakterisiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antikörper

Tab. 3-1 Primär-Antikörper (m: monoklonaler Antikörper, p: polyklonaler Antikörper, WB: Western Blot, IF: Immunfluoreszenz)

Typ	Spezies	Antigen	WB	IF	Bezugsquelle
p	Kaninchen	Synaptophysin	1:4000	1:400	DAKO, Glostrup, DK
p	Kaninchen	SCAMP	1:2000	1:200	SYSY, Göttingen, D
p	Kaninchen	Rnd2	1:2000	1:200	M. Negishi, Kyoto, J Fujita <i>et al.</i> , 2002 ¹⁹³
p	Kaninchen	Vti1b	1:3000	1:350	G. F. von Mollard, Göttingen, D Antonin <i>et al.</i> , 2000 ¹⁹⁴
p	Kaninchen	Stathmin-like3	1:5000	1:1500	A. Sobel, Paris, F Kang <i>et al.</i> , 2005 ¹⁹⁵
p	Kaninchen	Arfaptin2	1:500	1:180	C. D'Souza-Schorey, Notre Dame, USA Peters <i>et al.</i> , 2002 ¹⁹⁶
p	Kaninchen	Synaptogyrin3	1:1800	1:250	R. Janz, Houston, USA Belizaire <i>et al.</i> , 2004 ¹⁹⁷
p	Kaninchen	Profilin1	1:500	1:70	Biozol, Eching, D
p	Kaninchen	PLTP	1:250	1:50	Biozol, Eching, D
p	Kaninchen	Synaptobrevin2	1:4000	1:400	R. Jahn, Göttingen, D
p	Kaninchen	GFP	1:2000	1:200	Calbiochem, Darmstadt, D
p	Kaninchen	GFP	1:1000	1:100	Clontech, Mountain View, CA
m	Maus	Synaptophysin	1:200	1:50	W. Franke, Heidelberg, D
m	Maus	Synaptobrevin2	1:5000	1:500	R. Jahn, Göttingen, D
m	Maus	SCAMP	1:10000	1:1000	D. Castle, Virginia, USA
p	Ziege	Synaptogyrin3	1:500	1:50	Biozol, Eching, D

Tab. 3-2 Sekundär-Antikörper

Sekundär-Antikörper	Spezies	WB	IF	Bezugsquelle
HRP- α -Kaninchen-IgG	Ziege	1:5000		NEB, Frankfurt am Main, D
HRP- α -Maus-IgG	Ziege	1:5000		Jackson/Dianova, Hamburg, D
HRP- α -Ziege-IgG	Kaninchen	1:80000		Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Alexa 594- α -Maus-IgG	Ziege		1:500	Molecular Probes, Karlsruhe, D
Alexa 488- α -Maus-IgG	Ziege		1:500	Molecular Probes, Karlsruhe, D
Alexa 488- α -Kaninchen-IgG	Ziege		1:500	Molecular Probes, Karlsruhe, D
Alexa 488- α -Ziege-IgG	Kaninchen		1:500	Molecular Probes, Karlsruhe, D

3.1.2 Chemikalien und Geräte

Tab. 3-3 Geräte

Geräte	Bezugsquelle
Autoklav-Varioklav Typ 400	H+P Labortechnik, Oberschleißheim, D
Bakterienschüttler-Certomat R	B. Braun Biotech, Melsungen, D
Blotkammer - Transblot SD Semi-Dry	BioRad, München, D
Brutschrank für Bakterien	Memmert, Schwalbach, D
Brutschrank für Hefen	Memmert, Schwalbach, D
Destillator - Milli-Q	Millipore, Schwalbach, D
Eismaschine - AF-10	Scotsman, Vernon Hills, USA
Elektrophoresekammer	Sigma-Aldrich, München, D
Fluoreszenzmikroskop - Axiophot I	Carl Zeiss, Jena, D
Geldokumentation - Image Master VDS	GE Healthcare, München, D
Inkubator Zellkultur	Heraeus, Hanau, D
Laminarflow Sterilwerkbank -Microflow	Nunc, Wiesbaden, D
Laser Punktscanning SP5 System	Leica, Bensheim, D
Netzteil - Power Pac 300	BioRad, München, D
PAGE System - Mini Protean II	BioRad, München, D
PCR Gerät - Primus 96 advanced	Peqlab, Erlangen, D
PCR Gerät - Primus 96 plus	MWG Biotech, Ebersberg, D
pH-Meter - pH 530	VWR, Darmstadt, D
Photometer - Ultraspec 2000 UV	GE Healthcare, München, D
Präzisionswaage - LC 2434	Sartorius, Göttingen, D
Präzisionswaage - LC 4801	Sartorius, Göttingen, D
Rotor SW 27 Beckman	Beraneck Laborgeräte, Weinheim, D
Rotor SW 40 Beckman	Beraneck Laborgeräte, Weinheim, D
Schüttler für Hefen Certomat IS	B. Braun Biotech, Melsungen, D
Überkopfschüttler - RL-2M Intelli Mixer	ELMI, Riga, LV
Ultrazentrifuge T-1065	Kontron Analytik, Eching, D
Zentrifuge - Biofuge Fresco	Heraeus, Hanau, D
Zentrifuge - Megafuge 1 OR	Heraeus, Hanau, D

Tab. 3-4 Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
3-Amino-1,2,4-triazol	Sigma-Aldrich, München, D
Aceton	Roth, Karlsruhe, D
Acrylamid	Roth, Karlsruhe, D
APS	Sigma-Aldrich, München, D
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto-Agar	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Bacto-Peptone	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, D
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, München, D

Chemikalien	Bezugsquelle
CaCl ₂	Merck, Darmstadt, D
Complete, EDTA-free	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Coomassie Brilliant Blau – G250	Serva, Heidelberg, D
DMSO	Merck, Darmstadt, D
dNTPs	Fermentas, St. Leon-Roth, D
DTT	Merck, Darmstadt, D
EDTA	Roth, Karlsruhe, D
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol	Roth, Karlsruhe, D
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, D
FCS	Sigma-Aldrich, München, D
Glaskügelchen, säuregewaschen	Sigma-Aldrich, München, D
Glucose	Sigma-Aldrich, München, D
Glycerin	Serva, Heidelberg, D
Glycin	Roth, Karlsruhe, D
H ₃ PO ₄	Merck, Darmstadt, D
Harnstoff	Roth, Karlsruhe, D
Hepes	Invitrogen, Karlsruhe, D
Histidin	Roth, Karlsruhe, D
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, D
KCl	Fulka Chemie, Ulm, D
KH ₂ PO ₄	Roth, Karlsruhe, D
Lachssperma DNA type III Na-Salz	Sigma-Aldrich, München, D
L-Adenine Hemisulfat	Roth, Karlsruhe, D
Leucin	Roth, Karlsruhe, D
LipofectAMINE 2000	Invitrogen, Karlsruhe, D
Lithiumacetat	Roth, Karlsruhe, D
Methanol	Roth, Karlsruhe, D
Mowiol 4-88	Sigma-Aldrich, München, D
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
NaCl	Roth, Karlsruhe, D
NaOH	Roth, Karlsruhe, D
NEM (N-Ethylmaleimid)	Sigma-Aldrich, München, D
NGS (Normal Goat Serum)	Sigma-Aldrich, München, D
NP-40 (Nonident p-40)	Fulka Chemie, Ulm, D
ONPG	Sigma-Aldrich, München, D
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, D
PEG 4000	Fulka Chemie, Ulm, D
PMSF	Merck, Darmstadt, D
Ponceau-S	Roth, Karlsruhe, D
Protein A-Sepharose 4B	Invitrogen, Karlsruhe, D
Protein G-Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare, München, D
Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30% (29:1)	Roth, Karlsruhe, D
Saccharose	Roth, Karlsruhe, D
Salzsäure	Roth, Karlsruhe, D

Chemikalien	Bezugsquelle
SDS	Serva, Heidelberg, D
Seakem LE Agarose	Biozym, Oldendorf, D
TEMED	Roth, Karlsruhe, D
Tissue freezing medium	Reichert-Jung, Nussloch, D
Tris-Base	Roth, Karlsruhe, D
Triton-X 100	Sigma-Aldrich, München, D
Trockenmilchpulver	Töpfer, Dietmannsried, D
Trypsin	Roth, Karlsruhe, D
Tryptophan	Roth, Karlsruhe, D
Tween-20	Merck, Darmstadt, D
X-Gal	Roth, Karlsruhe, D
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D

Tab. 3-5 Kits

Kits	Bezugsquelle
Dualmembrane Kit 2	Dualsystems Biotech, Schlieren, CH
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, D
RNeasy-RNA-Extraction Kit	Qiagen, Hilden, D
SuperSignal West Pico Chemiluminescent	Pierce, Bonn, D

Tab. 3-6 Enzyme

Enzyme	Bezugsquelle
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	Fermentas, St. Leon-Roth, D
DNase	Promega, Mannheim, D
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	NEB, Frankfurt, D
Proteinase K	Sigma-Aldrich, München, D
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, St. Leon-Roth, D NEB, Frankfurt, D
T4-DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Roth, D
Taq-DNA-Polymerase	Eppendorf, Hamburg, D

Tab. 3-7 Marker

Marker	Bezugsquelle
GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus	Fermentas, St. Leon-Roth, D
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Roth, D
MassRuler DNA Ladders Mix	Fermentas, St. Leon-Roth, D
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Roth, D
Prestained Protein Marker, Broad Range	NEB, Frankfurt, D

Tab. 3-8 Antibiotika

Antibiotika	Stammlösung	Arbeitslösung	Bezugsquelle
Ampicillin	100 mg/ml	150 µg/ml	Sigma-Aldrich, München, D
Kanamycin	20 mg/ml	60 µg/ml	Sigma-Aldrich, München, D
Tetracyclin	10 mg/ml		Sigma-Aldrich, München, D
Penicillin/Streptomycin	10000 U Penicillin 10 mg/ml Streptomycin	1% (100U)	Invitrogen, Karlsruhe, D

3.1.3 Puffer und Nährmedien

Standardisierte Puffer und Nährmedien wurden, sofern nicht anders angegeben, nach Sambrook und Russel (2001)¹⁹⁸ hergestellt. Hefe SD-Selektionsmedium wurde von der Firma Qbiogen aus Heidelberg bezogen.

3.1.4 Zelllinien, Bakterien- und Hefestämme

3.1.4.1 Bakterienstamm

Tab. 3-9 Bakterienstamm

Bakterienstamm	Merkmale	Bezugsquelle
XL1-Blue	F ['] <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10(Tet^r) recA1 endA1 gyr A96 tbi-1 hsdR17 supE44 rel A1lac</i>	Stratagene, La Jolla, USA

3.1.4.2 Hefestamm

Tab. 3-10 Hefestamm

Hefestamm	Merkmale	Bezugsquelle
NMY32	MATa <i>his3Δ200 trp1-901 leu2-3,112 LYS2::(lexAop)₄-HIS3 URA3::(lexAop)₈-lacZ (lexAop)₈-ADE2 GAL4</i>	Dualsystems Biotech, Schlieren, CH

3.1.4.3 Zelllinien

Tab. 3-11 Zelllinien

Zelllinien	Herkunft	Referenz
PLC	<i>Homo sapiens</i> , Epithelzellen Hepatozelluläres Karzinom	Alexander <i>et al.</i> , 1976 ¹⁹⁹
HeLa	<i>Homo sapiens</i> , Epithelzellen Zervixkarzinom	Gey <i>et al.</i> , 1951 ²⁰⁰

3.1.5 Vektoren und Oligonukleotide

3.1.5.1 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech in der Qualitätsstufe HPSF (hochrein, Salzfrei) bezogen und sowohl für die Herstellung von DNA-Konstrukten als auch für Sequenzierungsreaktionen verwendet.

Tab. 3-12 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
07-07 RP	GTGCGGCCGCTTTACATCTGATTGGAGAAG
07-06 FP	CGTGTACAGTATGGACGTGGTGAATCAG
07-05 Seq FP	GCACCTTCACGAAGCCAAGG
06-94 Seq FP	AGCAGAAGAACGGCATCAAG
06-122 RP	CAGGATCCAACATGAGGTTACAGCTCTTGGC
06-121 FP	CGAAGCTTATGGAGGGGCAGAGTGG
06-116 RP	CAACCGGTATCATCTGGTTACCCTTGAAGGC
06-115 FP	TCGCTAGCATGTCGGATTTTGACAGCAACC
06-112 RP	TTGGATCCTTCCAGACACAGTCCTGGCTC
06-111 FP	GCAAGCTTATGGACAAGAAGAAAGAGCACC
06-110 RP	GCGGATCCATCTGCTCCTCTAACCAGGAAG
06-109 FP	GCAAGCTTATGACGGACGGGATTCTAGG
06-108 RP	TAGGATCCGTATAGGCAGGCACCTGGTAC
06-107 FP	CGAAGCTTATGGAGGGAGCATCCTTTG
06-106 RP	GTGGATCCGAGCCAGACATTTCTCCCGC
06-105 FP	GCAAGCTTATGGCCAGCACCGTATCTG
05-44 FP	GTACGAGGCCATTACGGCCATGGACGTGGTGAATCAG
05-43 Seq FP	GGTATCGATAAGCTTGATATCG
05-182 RP	GTTACTGGCCGAGGCGGCCAATGATGTCTTCATCTGCTTC
05-181 FP	GTACGAGGCCATTACGGCCACATGGGCTTATTTCTTC
05-180 FP	GTACGAGGCCATTACGGCCATGTCAGATAATCCGTT
05-179 RP	GTTACTGGCCGAGGCGGCCAATGAGAATCGTCCTTGAGTC
05-178 RP	GTTACTGGCCGAGGCGGCCATCTTCATCTGGTTACCCTTG
05-177 RP	GCGCATCGATCTTCATCTGGTTACCCTTG
05-176 RP	GCGGCATCGATTGACATCTGATTGGAGAAGG
05-175 RP	GTTACTGGCCGAGGCGGCCAATGACATCTGATTGGAGAAGG
05-174 RP	GTGGTCTAGAGTGACATCTGATTGGAGAAGG
05-131 Seq RP	GGCGTGAATGTAAGCGTG
05-128 RP	GCATCCGCGGTTACATCTGATTGGAGAAGG
05-127 FP	ATTACCGCGGATGGACGTGGTGAATCAG
05-112 FP	GTACGAGGCCATTACGGCCCTATGTCGGATTTTGACAGC
05-110 FP	GTACGAGGCCATTACGGCCATGTCGGATTTTGACAGC
05-109 FP	GTACGAGGCCATTACGGCCACATGGACGTGGTGAATCAG
05-01 FP	TCGACCCGGGAAAAATGTCGGATTTTGACAGC
04-99 FP	CTACGGATCCAAAAATGGACGTGGTGAATCAG

Bezeichnung	Sequenz
04-89 FP	CTGCTCTAGAAAAATGGACGTGGTGAATCAG
04-88 Seq RP	CCTGCAGCCACTGGTTCCG
04-87 Seq FP	CATTAGGACCTTTGCAGC
04-112 Seq RP	CCGGTCAAAGTCTTGACG
04-111 Seq FP	TCCTCGTCATTGTTCTCG
98-74 Seq FP	ATTGACGCAAATGGGCGGTA

3.1.5.2 Vektoren

Tab. 3-13 Vektoren

Vektoren	Resistenz	Bezugsquelle
pEYFP-N1	Kanamycin/Neomycin	Clontech, Mountain View, CA
pECFP-N1	Kanamycin/Neomycin	Clontech, Mountain View, CA
pNCW	Kanamycin	Dualsystems Biotech, Schlieren, CH
pCCW	Kanamycin	Dualsystems Biotech, Schlieren, CH
pCCW-STE	Kanamycin	Dualsystems Biotech, Schlieren, CH
pCCW-SUC	Kanamycin	Dualsystems Biotech, Schlieren, CH
pDSL-Nx	Ampicillin	Dualsystems Biotech, Schlieren, CH
pDL2-xN	Ampicillin	Dualsystems Biotech, Schlieren, CH
pDL2xN-STE	Ampicillin	Dualsystems Biotech, Schlieren, CH
pDL2xN-SUC	Ampicillin	Dualsystems Biotech, Schlieren, CH
pCCW-Alg5	Kanamycin	Dualsystems Biotech, Schlieren, CH
pAI-Alg5	Ampicillin	Dualsystems Biotech, Schlieren, CH
pDL2-Alg5	Ampicillin	Dualsystems Biotech, Schlieren, CH
YFP-dSH2	Kanamycin/Neomycin	B. Geiger, Rehovot, IL Ballestrem <i>et al.</i> , 2006 ²⁰¹ , Kirchner <i>et al.</i> , 2003 ²⁰²
YFP-SH2	Kanamycin/Neomycin	B. Geiger, Rehovot, IL Ballestrem <i>et al.</i> , 2006 ²⁰¹ , Kirchner <i>et al.</i> , 2003 ²⁰²
YFP-SH2 (R183A)	Kanamycin/Neomycin	B. Geiger, Rehovot, IL Ballestrem <i>et al.</i> , 2006 ²⁰¹ , Kirchner <i>et al.</i> , 2003 ²⁰²
CFP-dSH2	Kanamycin/Neomycin	B. Geiger, Rehovot, IL Ballestrem <i>et al.</i> , 2006 ²⁰¹ , Kirchner <i>et al.</i> , 2003 ²⁰²
pECFP-Sph	Kanamycin/Neomycin	F. Valtorta, Mailand, I Pennuto <i>et al.</i> , 2002 ¹⁵³
pEYFP-Sph	Kanamycin/Neomycin	F. Valtorta, Mailand, I Pennuto <i>et al.</i> , 2002 ¹⁵³
pECFP-Sph-Deletion	Kanamycin/Neomycin	F. Valtorta, Mailand, I Pennuto <i>et al.</i> , 2002 ¹⁵³
pEYFP-Sph-Deletion	Kanamycin/Neomycin	F. Valtorta, Mailand, I Pennuto <i>et al.</i> , 2002 ¹⁵³
pECFP-VAMP2	Kanamycin/Neomycin	F. Valtorta, Mailand, I Pennuto <i>et al.</i> , 2002 ¹⁵³
pEYFP-VAMP2	Kanamycin/Neomycin	F. Valtorta, Mailand, I Pennuto <i>et al.</i> , 2002 ¹⁵³
pDest501-CFP-YFP	Ampicillin	A. Gießl, Mainz, D

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

Gebäuchliche Methoden der Molekularbiologie wurden, soweit hier nicht anders erläutert, wie in den folgenden Lehrbüchern beschrieben angewandt: „Molecular Cloning: A laboratory manual“ von Sambrook *et al.* (2001)¹⁹⁸, „Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics“ von Mülhardt (2002)²⁰³ und „Gentechnische Methoden“ von Schrimpf (2002)²⁰⁴.

Als Ausgangs-DNA (*Template*) für die meisten Klonierungen wurde eine cDNA aus 100 mg Gesamtgehirn von adulten, 6 Wochen alten Mäusen nach dem *RNeasy-RNA-Extraction-* und *Omniscript RT-Kit* hergestellt. PCR Ansätze für Klonierungen wurden mit der *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* nach den Angaben des Herstellers NEB erstellt. Die Phusion-Polymerase vereint die hohe Prozessivität der Taq-DNA-Polymerase mit einer 3'-5'-Exonuklease-Aktivität. Alle geschnittenen Vektoren wurden vor der Ligation mit der *calf intestine alkaline Phosphatase* (CIAP) am 5'-Phosphat-Ende dephosphoryliert, um die Rezirkularisierung des linearisierten Vektors zu unterbinden. Für die Ligation selbst mit der T4-DNA-Ligase wurde 50 ng Vektor eingesetzt. Die benötigte Masse an zu inserierendem Fragment betrug das Fünffache und wurde mit folgender Formel berechnet:

$$Masse_{Fragment} [ng] = \frac{250 [ng] * Länge_{Fragment} [bp]}{Länge_{Vektor} [bp]}$$

Die genaue Konzentration von Fragment und Vektor wurde über ein Agarosegel mit Hilfe des *MassRuler*-Markers nach den Angaben des Herstellers Fermentas berechnet. Die Transformation der Plasmid-DNA in kompetente *XLI-Blue* Zellen erfolgte über einen 1-minütigen Hitzeschock bei 42°C. Anschließende Sequenzierungen wurden von GENTERprise Genomics in Mainz durchgeführt und mit den PC-Programmen Chromas (Technelysium Pty Ltd, Tewantin Qld, AU) und Clonemanager (Scientific & Educational Software, Cary, USA) ausgewertet.

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1 Synaptosomenpräparation

Synaptosomen, abgeschnürte Nervenenden mit Vesikeln, Zytoplasma und postsynaptischer Zellmembran, wurden aus Gesamtgehirnen adulter Mäuse nach einer modifizierten Methode von Edelman *et al.*, (1995)¹¹⁵ isoliert. Für eine Koimmunpräzipitation mit dazugehöriger Kontrolle wurden 4 g Mäusegehirn (8 Mäusegehirne) benötigt.

Dazu wurden die Mäuse mit Diethylether narkotisiert und dekapitiert. Das Gehirn wurde durch die Öffnung des Schädeldaches entnommen und sofort in eine mit 0,2% Wasserstoffperoxid angereicherte 320 mM Saccharoselösung überführt. Dieser Schritt sowie die folgenden wurden bei 4°C durchgeführt, um mögliche Proteaseaktivitäten zu reduzieren. Die Gehirne wurden in 14 ml 320 mM Saccharoselösung mit Proteaseinhibitoren (Roche, *Complete EDTA-free*) aufgenommen, mittels eines *Dounce*-Homogenisators homogenisiert und anschließend bei 900xg für 10 min zentrifugiert. Der daraus resultierende postnukleäre Überstand wurde erneut für 15 min bei 10.000xg zentrifugiert, wodurch eine ungereinigte Synaptosomenfraktion (P2) entstand. Dieses P2-Sediment wurde mit 12 ml 320 mM Saccharoselösung und Proteaseinhibitoren resuspendiert und bei 900xg für 10 min zentrifugiert.

3.2.2.2 Extraktion von Membranproteinen

3.2.2.2.1 Extraktion von Membranproteinen aus Synaptosomen

Das aus der Synaptosomenpräparation gewonnene, gewaschene P2-Sediment wurde in 650 µl Extraktionspuffer resuspendiert und für 2 Stunden bei 4°C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Nicht extrahierbare Anteile wurden mit einem anschließenden Zentrifugationsschritt (15 min, 14.000xg, 4°C) entfernt. Der resultierende Überstand entsprach dem extrahierbaren Extrakt (E), welches für die Koimmunpräzipitation verwendet wurde.

Extraktionspuffer Synaptosomen	
60 mM	KCl
20 mM	N-Ethylmaleimid
20 mM	HEPES-KOH, pH 7,3
1%	Triton X-100
4%	<i>Complete EDTA-free</i>

3.2.2.2.2 Extraktion von Membranproteinen aus Zellen

Hela-Zellen, die die möglichen Interaktionspartner exprimierten, wurden in einer 100 mm Zellkulturschale bis zu einer 90%igen Konfluenz kultiviert. Für eine Koimmunpräzipitation wurden einschließlich der Kontrolle insgesamt vier 100 mm Schalen benötigt. Die Zellen wurden vor dem Ablösen mittels Gummispatel zweimal mit 5 ml PBS-EDTA gewaschen. Das Ablösen selbst erfolgte mit 500 µl PBS-EDTA und anschließender Zentrifugation für 15 s bei 10.000xg. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt, um mögliche Proteaseaktivitäten zu reduzieren. Das resultierende Pellet wurde in 1 ml Extraktionspuffer gelöst und für zwei Stunden bei 4°C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Nicht extrahierbare Anteile wurden mit einem anschließenden Zentrifugationsschritt (20 min, 14.000xg, 4°C) entfernt. Der resultierende Überstand entsprach dem extrahierbaren Extrakt (E), welches für die Koimmunpräzipitation verwendet wurde.

Extraktionspuffer Zellen	
2 mM	EDTA
4%	<i>Complete EDTA-free</i>
1%	Nonidet P-40
in PBS; pH 7,4	

3.2.2.3 Koimmunpräzipitation

Mit spezifischen Antikörpern können gezielt Proteine aus einem Proteingemisch isoliert werden. Dazu wird der Antikörper an Protein G- oder Protein A-Sepharose gekoppelt und mit dem Proteingemisch inkubiert. Interaktionspartner, die mit dem Zielprotein interagieren, werden dabei koimmunpräzipitiert. Protein A und Protein G sind Proteine der bakteriellen Zellwand von *Staphylococcus aureus* beziehungsweise *Streptococcus*, die eine hohe Affinität zur Fc-Region von Immunglobulinen besitzen. Der Fab-Anteil steht dabei weiterhin für die Antigenbindung zur Verfügung. Die Auswahl der Sepharose richtet sich nach der Affinität zum Antikörper¹⁹⁸ sowie nach dem Größenverhältnis von Zielprotein zur Sepharose (Protein A: 42 kDa; Protein G: 25 kDa).

3.2.2.3.1 Koimmunpräzipitation aus Synaptosomen

Pro Koimmunpräzipitation wurden 330 µl Proteinextrakt E mit 5-10 µl Antikörper versetzt. Als Negativ-Kontrolle diente ein Koimmunpräzipitationsansatz ohne Zugabe des Antikörpers. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C in einem Überkopfschüttler. Protein A- oder Protein G-Sepharose wurde vor der Präzipitation zweimal im Waschpuffer gewaschen und im Verhältnis 3:1 gelöst. Anschließend wurden zu jedem Ansatz 30 µl gewaschene Protein A- oder Protein G-Sepharose mit abgeschnittener Pipettenspitze pipettiert und für 1 Stunde bei 4°C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Durch einen einminütigen Zentrifugationsschritt bei 2000 Upm wurde das Immunpräzipitat von dem nicht präzipitierbaren Überstand (S/N) getrennt. Vor der weiteren Verwendung wurde das Immunpräzipitat dreimal mit Waschpuffer gewaschen (Zentrifugation: 2000 Upm, 1 min). Nachfolgend wurde das Immunpräzipitat und zugehöriger Überstand (S/N) im Laemmli-Probenpuffer aufgenommen, für 5 min bei 95°C aufgekocht, abzentrifugiert, der Überstand auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen und mittels Westernblot und Immundetektion analysiert.

Waschpuffer Synaptosomen	
60 mM	KCl
20 mM	N-Ethylmaleimid
20 mM	HEPES-KOH, pH 7,3
4 %	<i>Complete EDTA-free</i>

3.2.2.3.2 Koimmunpräzipitation aus Zellen

Pro Koimmunpräzipitation wurden 1000 µl Proteinextrakt E mit 10 µl Antikörper versetzt. Auch hier diente ein Koimmunpräzipitationsansatz ohne Zugabe des Antikörpers als Negativ-Kontrolle. Die Inkubation erfolgte bei 4°C für eine Stunde in einem Überkopfschüttler. Anschließend wurde zu jedem Ansatz 50 µl gewaschene Protein A- oder Protein G-Sepharose (siehe 3.2.2.3.1) pipettiert und für 2 Stunden bei 4°C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Durch einen einminütigen Zentrifugationsschritt bei 2000 Upm wurde das Immunpräzipitat von dem nicht präzipitierbaren Überstand (S/N) getrennt und vor der weiteren Verwendung dreimal mit Waschpuffer gewaschen (Zentrifugation: 2000 Upm, 1 min). Nachfolgend wurde das Immunpräzipitat und zugehöriger Überstand (S/N) in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen, für 5 min bei 95°C aufgekocht, abzentrifugiert, der Überstand auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen und mittels Westernblot und Immundetektion analysiert.

Waschpuffer Zellen	
2 mM	EDTA
4 %	<i>Complete EDTA-free</i>
0,1%	Nonidet P-40
in PBS; pH 7,4	

3.2.2.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte grundsätzlich im diskontinuierlichen Gelsystem mit Trenn- und Sammelgel. Die Konzentration des Trenngels richtete sich dabei nach dem Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine.

Trenngel 10 ml	12% (10-100 kDa)	10% (30-120 kDa)	8% (50-200 kDa)
H ₂ O	3,3 ml	4 ml	4,6 ml
Acrylamid/Bis-Lösung 30%	4,0 ml	3,3 ml	2,7 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	4 µl	4 µl	6 µl

Sammelgel 4 ml	
H ₂ O	2,7 ml
Acrylamid/Bis-Lösung 30%	670 µl
1 M Tris (pH 6,8)	500 µl
10% SDS	40 µl
10% APS	40 µl
TEMED	4 µl

Elektrodenpuffer (10x)	
Glycin	144 g
Tris-Base	30 g
SDS	10 g
H ₂ O	auf 1 Liter

Solange die Coomassie-Lauffront im Sammelgel war, blieb die Spannung bei 40 Volt. Erst im Trenngel wurde die Spannung auf 120 Volt erhöht und blieb solange erhalten, bis die Coomassie-Lauffront das Gel vollständig passierte.

3.2.2.5 Immunblot

Die in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden anschließend mit der Semi-dry Western-Blot Methode auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Sandwich-Blot bestand aus drei Lagen von im Transferpuffer getränkten Whatman-Filterpapieren, die direkt auf die Anodenplatte der Transfereinheit gelegt wurden. Darauf wurde die angefeuchtete Nitrozellulosemembran mit dem Trenngel gelegt, die wiederum von drei Lagen im Transferpuffer getränkten Whatman-Filterpapieren überschichtet wurde. Der Transfer erfolgte über zwei Stunden bei einer Stromstärke, die sich aus folgender Formel herleitet:

$$\text{Stromstärke [mA]} = \frac{1 \text{ mA}}{\text{Geloberfläche [cm}^2\text{]}} * 1,5$$

Dies entspricht einer Stromstärke von 75 mA pro Gel. Nach dem Transfer konnte die Nitrozellulosemembran entweder getrocknet oder direkt für den immunchemischen Nachweis verwendet werden.

Transferpuffer	
Tris-Base	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	10% (v/v)

3.2.2.6 Immunchemischer Nachweis

Der immunchemische Nachweis basiert auf Bindung eines spezifischen Erstantikörpers an die Proteinbande der Nitrozellulosemembran. Durch weitere Bindung eines mit der HRP (*Horse-Radish-Peroxidase*) konjugierten Sekundärantikörpers, der gegen den Erstantikörper gerichtet ist, wird das Protein indirekt detektierbar.

Zu Beginn wurden unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran durch Inkubation im Blockpuffer für eine Stunde abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation des Erstantikörpers (mit Verdünnungspuffer verdünnt) über Nacht bei 4°C in einem Überkopfschüttler. Nach dreimaligem fünfminütigen Waschen in TBST erfolgte eine zweistündige Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper (im Blockpuffer verdünnt). Im Anschluss daran wurde die Membran erneut dreimal für 5-10 min mit TBST gewaschen. Die Proteine wurden abschließend durch Chemilumineszenz mit ECL-Lösung (*SuperSignal West Pico Chemiluminescent*, Pierce) detektiert. Dabei spaltete die am Zweitantikörper konjugierte Peroxidase das Luminol der ECL-Lösung, wodurch ein Lichtsignal entstand, das mittels Röntgenfilm detektiert werden konnte.

Blockpuffer	
5% (w/v) Magermilchpulver	in TBST
TBST	
0,1 % (v/v) Tween-20	in TBS
Verdünnungspuffer	
5% (w/v) BSA	in TBST

3.2.3 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

3.2.3.1 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* und Anlegen von Dauerkulturen

Hefekulturen wurden im Vollmedium YPAD oder im SD Selektionsmedium (*synthetic dropout*, SD) bei 30°C und 220 Upm im Schikanekolben amplifiziert. Zur Herstellung von Agar-Platten wurde dem Flüssigmedium 20 g/l Bacto-Agar zugesetzt. Entsprechend der Auxotrophie-Marker der transformierten Plasmide wurden dem SD Selektionsmedium entsprechende Aminosäuren zugegeben. Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden Hefezellen im Flüssigmedium bis zum logarithmischen Wachstum (OD_{546} 0,6-0,8) kultiviert. Die Hefekultur wurde mit 15% Glycerol versetzt und in 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen bei -70°C eingefroren. Dabei wurde eine Kryobox verwendet, bei welcher sich die Temperatur pro Stunde nur um 1°C verringerte. Eine kurzzeitige Lagerung von Hefe erfolgte auf Agar-Platten bei 4°C. Hierbei wurden alle 2 Wochen die Kolonien auf eine frische Platte überführt und bei 30°C für 2 Tage kultiviert. Anschließend konnten die Platten wieder bei 4°C gelagert werden. Die maximale Haltbarkeit einer Selektionsplatte mit 3-AT (3-Amino-1,2,4-triazol, kompetitiver Inhibitor des his3-Proteins) betrug 6 Wochen bei einer Lagertemperatur von 4°C.

YPAD Medium (YPAD-Agar)	
Hefeextrakt	10 g/l
Bacto Pepton	20 g/l
Glucose	20 g/l
Adeninsulfat	40 mg/l
(Bacto Agar	20 g/l)

SD Selektionsmedium (-leu, -trp, -his, -ade) wurde von der Firma Qbiogen aus Heidelberg bezogen. Die entsprechenden fehlenden Aminosäuren wurden bei Bedarf zugeführt.

Aminosäuren	Stammlösungen	Menge pro Liter SD-Medium
L-Tryptophan	10 g/l	2 ml
L-Histidin	10 g/l	2 ml
L-Leucin	10 g/l	10 ml
L-Adenin	2 g/l	10 ml

3.2.3.2 Herstellung und Transformation kompetenter Hefezellen

Zur Herstellung kompetenter Hefezellen wurde die Lithiumacetat-Methode von Ito *et al.*, 1983²⁰⁵ verwendet. Im ersten Schritt wurde eine 50 ml YPAD Vorkultur mit 10 Kolonien von einer frischen NMY32 Hefeplatte angeimpft (1 Kolonie pro 5 ml Medium) und über Nacht bei 30°C und 220 Upm geschüttelt. Diese Kultur wurde wiederum zum Animpfen einer weiteren 50 ml Kultur verwendet, die eine Anfangszellichte von OD₅₄₆ 0,2 aufweisen sollte. Die frisch angeimpfte Kultur wurde bis zu einer OD₅₄₆ von 0,6 geschüttelt und anschließend 5 min bei 2500xg zentrifugiert. Nachfolgend wurde das Pellet in 2,5 ml Wasser resuspendiert.

Für einen Transformationsansatz wurden 300 µl frisch angesetzte PEG/Lithiumacetat Lösung, 1-2 µg Plasmid-DNA und 100 µl kompetente Hefezellen für eine Minute gevortext. Danach erfolgte ein 45-minütiger Hitzeschock bei 42°C. Die Hefezellen wurden dann für 5 min bei 700xg pelletiert, in 100 µl 0,9% NaCl aufgenommen und auf entsprechende SD-Selektionsplatten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 30°C für 2-3 Tage. Bei einer Kotransformation wurde statt dem YPAD Vollmedium ein SD-Selektionsmedium verwendet.

PEG/Lithiumacetat Lösung	
50 % PEG 4000 (steril filtriert)	1,2 ml
1 M Lithiumacetat (steril filtriert)	180 µl
Lachssperma-DNA Typ III Na-Salz (2mg/ml)	125 µl

3.2.3.2.1 Transformation einer cDNA-Bibliothek und Bestimmung der Transformationseffizienz

Um einen vollständigen *screen* einer cDNA-Bibliothek zu ermöglichen, ist eine hohe Transformationseffizienz notwendig. In diesem *screen* wurde eine cDNA-Bibliothek (pNubGx) aus adultem Mausgehirn mit einer Komplexität von 3×10^6 Transkripten von Dualsystems verwendet.

Im ersten Schritt wurden 10 ml Selektionsmedium (SD -leu) mit einer Kolonie vom *bait*-Plasmid transformierten NMY32 Hefestamm inokuliert und für 8 Stunden bei 30°C und 220 Upm inkubiert. Mit dieser 10 ml Vorkultur wurden 100 ml Selektionsmedium (SD -leu) angeimpft und über Nacht bei 30°C und 220 Upm inkubiert. Anschließend wurde die Zelldichte bei OD₅₄₆ der 1:10 verdünnten Übernachtkultur gemessen. Die für den nächsten Schritt benötigte Kulturmenge berechnete sich aus folgender Formel:

$$\frac{30}{[OD] * 10} = [ml]$$

Diese Kulturmenge wurde bei 700xg für 5 min zentrifugiert und das Pellet anschließend zum Animpfen einer auf 30°C vorgewärmten 200ml 2xYPAD-Kultur verwendet. Die Anfangszelldichte sollte eine OD₅₄₆ von 0,15 nicht überschreiten. Die Kultur wurde bis zu einer Zelldichte von OD₅₄₆ 0,6 geschüttelt, danach in vier 50 ml Aliquots aufgeteilt und bei 700xg für 5 min zentrifugiert. Jedes Pellet wurde mit 30 ml Wasser resuspendiert und erneut bei 700xg für 5 min zentrifugiert. Die Pellets wurden mit je 1 ml frisch angesetzter Lithiumacetat/TE Lösung resuspendiert und wiederum für 5 min bei 700xg zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets nochmals in je 600 µl Lithiumacetat/TE-Lösung resuspendiert.

Für einen Transformationsansatz (insgesamt vier Stück) wurden 2,5 ml frisch angesetzter PEG/Lithiumacetat Mix, 7 µg cDNA-Bibliothek, 600 µl in Lithiumacetat/TE Lösung resuspendierte Hefezellen und 100 µl *carrier*-DNA (Lachssperma) für 1 min gevortext.

Um eine möglichst hohe Transformationseffizienz zu gewährleisten, war es notwendig, die *carrier*-DNA (Lachssperma) zuvor zweimal für 5 min bei 95°C zu inkubieren und anschließend sofort im Eisbad abzukühlen. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 30°C für 45 min. Nach Zugabe von je 160 µl DMSO wurden die Zellen für 20 min einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Danach wurden sie für 5 min bei 700xg pelletiert, in 3 ml 2xYPAD Medium aufgenommen und für 90 min bei 30°C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen erneut für 5 min bei 700xg pelletiert und in 1,5 ml 0,9% NaCl aufgenommen. Alle vier Ansätze wurden vereinigt und je 300 µl auf insgesamt 16 SD-Selektionsplatten (SD -leu, -trp, -his, -ade + 7,5 mM 3AT) ausplattiert. Um die Gesamtzahl der transformierten Hefezellen und die Transformationseffizienz bestimmen zu können, mussten von dem resultierenden Restvolumen 1:100, 1:1000 und 1:10000 Verdünnungen hergestellt und je 100 µl auf

SD-Selektionsplatten (SD -leu, -trp) ausplattiert werden. Alle Platten wurden bei 30°C für 3-4 Tage inkubiert. Anschließend wurde die Transformationseffizienz nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Gesamtanzahl [n]} = \text{Anzahl Kolonien auf SD - leu - trp [n]} * \text{Verdünnungsfaktor [x]} * 10 * 1,5$$

$$\text{Transformationseffizienz [Klone/}\mu\text{g DNA]} = \frac{\text{Gesamtanzahl [n]}}{7 \mu\text{g}}$$

Um einen vollständigen *screen* zu ermöglichen, sollte die Transformationseffizienz im Bereich zwischen 5×10^5 and 3×10^6 liegen.

Lithiumacetat/TE-Lösung 10 ml	
1 M Lithiumacetat	1,1 ml
10x TE-Puffer (pH 7,5)	1,1 ml
ddH ₂ O	7,8 ml

PEG/Lithiumacetat-Mix 15 ml	
1 M Lithiumacetat	1,5 ml
10x TE-Puffer (pH 7,5)	1,5 ml
50% PEG 4000	12 ml

3.2.3.3 Plasmidisolierung aus Hefezellen

Für die Plasmidisolierung wurden Puffer und Silicasäulen vom *QIAprep Spin Miniprep Kit* von Qiagen verwendet. Eine mit Einzelklonen angeimpfte 5 ml Vorkultur (SD -trp) wurde über Nacht bei 30°C bei 220 Upm geschüttelt und anschließend 5 min bei 4000xg zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 250 µl P1-Puffer resuspendiert, mit 100 µl säuregewaschenen Glasperlen (400-500 µm) versetzt und für 5 min gevortext. Nachfolgende Schritte entsprachen dem Qiagen Protokoll. Um die Nukleasen aus dem Ansatz möglichst effizient zu entfernen, wurde der PB-Puffer-Waschvorgang zweimal ausgeführt. Die Elution der Plasmid-DNA aus der Silicasäule erfolgte mit 50 µl EB-Puffer. Da die Ausbeute an Plasmid-DNA zu gering für anknüpfende Restriktions- und Sequenzierungsreaktionen war, wurden 10 µl der eluierten Plasmid-DNA in *E.coli* transformiert und die Plasmide mit Hilfe des *QIAprep Spin Miniprep Kits* erneut isoliert.

3.2.3.4 Nachweis der β-Galaktosidase-Aktivität in Hefen

Zur Prüfung der Aktivierung des LacZ-Reporters standen verschiedene Verfahren zur Verfügung, welche sich in der Empfindlichkeit und Durchführbarkeit unterschieden.

3.2.3.4.1 Colony-Lift Filter Assay

Der *colony-lift filter assay* erlaubt große Mengen an Hefekolonien mit geringem Aufwand und hoher Sensitivität bezüglich der Aktivierung des LacZ-Reporters zu überprüfen. Dieser qualitative Nachweis erfolgt mittels Bildung eines Spaltprodukts bei der Hydrolyse von X-gal durch sezernierte β -Galaktosidase. Das Spaltprodukt wird vom Luftsauerstoff zu einem blauen Indigofarbstoff oxidiert, der die Aktivität des LacZ-Reporters signalisiert.

Für den *colony-lift filter assay* wurden frisch transformierte Hefezellen auf SD-Selektionsplatten ausplattiert und für 3 Tage bei 30°C inkubiert. Pro Hefepatte wurde ein in einer Petrischale befindlicher, mit 3 ml Z-Puffer/X-gal Lösung-getränkter Whatman Rundfilter benötigt. Mit Hilfe eines weiteren Whatman Rundfilters wurde von der Hefepatte ein Abdruck erstellt und der Filter zum Aufschließen der anhaftenden Kolonien für 15 s in flüssigen Stickstoff getaucht. Nach dem Auftauen wurde der Filter mit der Zellseite nach oben auf den zuvor getränkten Filter in der Petrischale gelegt und bei Raumtemperatur inkubiert. In regelmäßigen Messintervallen wurde der Filter auf eine Farbreaktion hin überprüft. Dabei war der Zeitpunkt der Farbreaktion ein grobes Indiz für die Wechselwirkungsstärke.

Z-Puffer (pH7)	
Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O	10,96 g/l
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	5,5 g/l
KCl	0,75 g/l
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,246 g/l

Z-Puffer/X-gal Lösung	
Z-Puffer	100 ml
β -Mercaptoethanol	270 μ l
X-gal Stammlösung (100 mg/ml in DMF)	335 μ l

3.2.3.4.2 Liquid Culture Assay

Der *liquid culture assay* erlaubt eine quantitative Bestimmung der Lac-Reporter Aktivität bei hohem zeitlichem Aufwand, so dass er sich nur begrenzt für große *screens* eignet. Als Substrat fungiert ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid), das durch die sezernierte β -Galaktosidase zu Galaktose und dem gelben Farbstoff o-Nitrophenol hydrolysiert wird. Die Menge des gebildeten o-Nitrophenols wird photometrisch bestimmt und daraus die Aktivität der β -Galaktosidase nach Miller berechnet.

Im ersten Schritt wurden kotransformierte Hefezellen über Nacht in einer 5 ml Vorkultur (SD -leu, -trp, -his, -ade +7,5 mM 3AT) herangezogen und davon 2 ml zum Animpfen einer 8 ml YPAD-Kultur verwendet. Diese wurde bei 30°C und 220 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 inkubiert. Der Wert wurde dokumentiert und die Kultur anschließend in drei Ansätze von je 1,5 ml aufgeteilt. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt (10 s 14.000 Upm) wurde das Pellet mit 1,5 ml Z-Puffer resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 300 μ l Z-Puffer resuspendiert, wodurch sich die Zelldichte verfünffachte.

Zum Aufschließen der Zellen wurden 100 µl dieser Suspension in flüssigem Stickstoff für 1 min tiefgefroren und anschließend im 37°C Wasserbad aufgetaut. Um sicherzustellen, dass alle Zellen aufgeschlossen waren, wurde dieser Schritt zweimal wiederholt. Als Leerwert für die spätere photometrische Bestimmung wurden 100 µl Z-Puffer verwendet. Die Reaktionsansätze und der Leerwert wurden mit 700 µl Z-Puffer/β-Mercaptoethanol versetzt, die Zeitmessung gestartet und sofort 160 µl ONPG hinzugefügt. Nachdem es zu einer leichten Gelbfärbung kam (ca. 15 min), wurde die Aktivität der β-Galaktosidase durch Verschiebung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich mit 400 µl 1 M Natriumcarbonat gestoppt. Die Ansätze wurden für 10 min bei 14.000 Upm zentrifugiert und die Extinktion des Überstandes bei einer Wellenlänge von 420 nm bestimmt. Nach Miller ist eine Einheit β-Galaktosidase definiert als die Menge, die 1 mmol ONPG in einer Minute zu o-Nitrophenol und Galaktose pro Zelle hydrolysiert. Anhand folgender Formel lässt sich die β-Galaktosidase-Einheit berechnen:

$$\beta - \text{Galaktosidase} - \text{Einheit} = \frac{1000 * OD_{420}}{(t * V * OD_{600})}$$

t = Reaktionszeit; V = 0,1 * Konzentrationsfaktor

Um Schwankungen auszugleichen, wurden zwei Hefekolonien je Kotransformation untersucht, so dass sich insgesamt sechs Messwerte ergaben.

Z-Puffer/β-Mercaptoethanol	
Z-Puffer (siehe 3.2.3.4.1)	100 ml
β-Mercaptoethanol	270 µl
ONPG (2h lösen, frisch ansetzen)	
Z-Puffer (siehe 3.2.3.4.1)	10 ml
ONPG	40 mg

3.2.3.5 *Split-Ubiquitin Membrane Yeast Two-Hybrid System*

Die Durchführung des *Split-Ubiquitin Membrane Yeast Two-Hybrid System* von Dualsystems kann in neun Arbeitsschritte gegliedert werden. Im ersten Schritt wird das *bait*-Protein in verschiedene *bait*-Vektoren, die sich in der Leadersequenz und Orientierung unterscheiden, kloniert. Anschließend erfolgt die Transformation in Hefe. Verschiedene Kontrollvektoren, die mit dem *bait*-Protein kotransformiert werden, erlauben optimale *screening*-Bedingungen, das heißt möglichst hohe Selektionsbedingungen ohne Hintergrundaktivität. Im weiteren Verlauf erfolgt dann die Kotransformation der cDNA-Bibliothek mit dem *bait*-Protein. Mit Hilfe von Farb- (LacZ-Reporter) und Wachstumsselektionen (His-, Ade-Reporter) wird die Anzahl der positiven Interaktionspartner minimiert. Anschließend werden die Plasmide der positiven Interaktionspartner aus der Hefe isoliert

und mit Restriktionsenzymen analysiert. Weiterhin positive Interaktionspartner werden in die Hefe retransformiert und über weitere Farb- und Wachstumsselektionen werden falsch positive Interaktionspartner aufgedeckt. Im letzten Schritt erfolgt die Sequenzierung, bei der erneut falsch positive Interaktionspartner ausselektioniert werden. Die Grafik in Abb. 3-1 veranschaulicht den Ablauf.

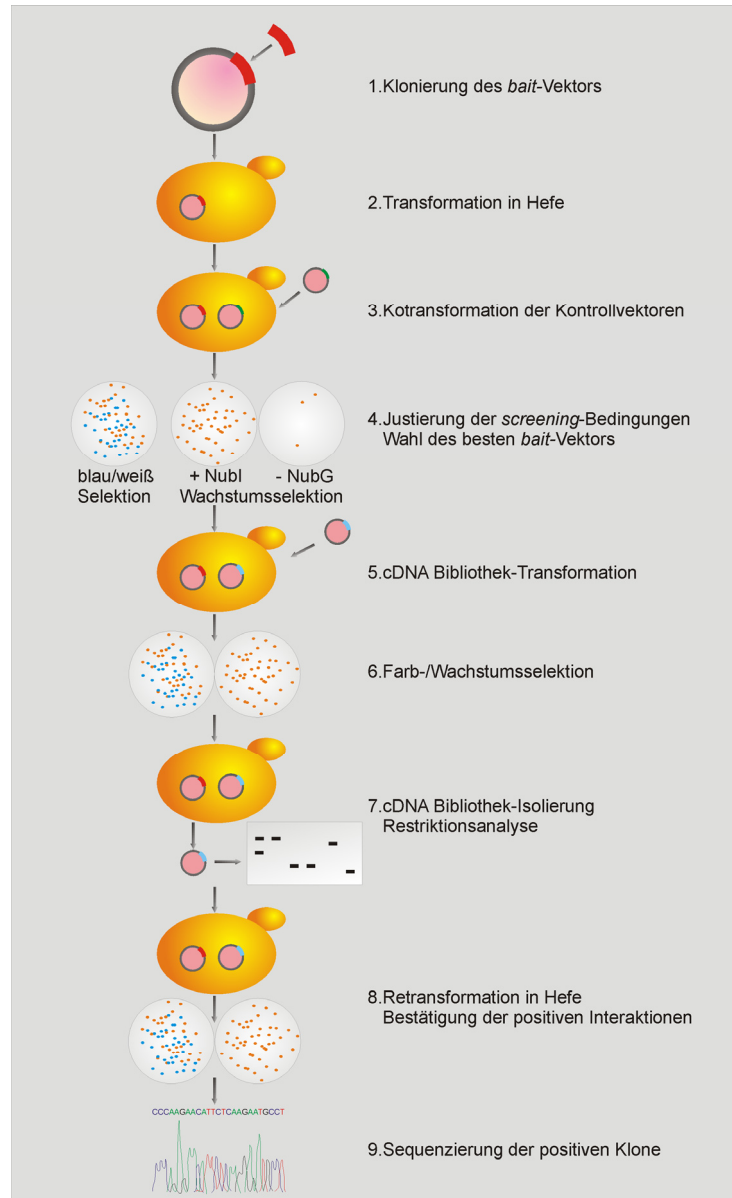


Abb. 3-1 Split-Ubiquitin Membrane Yeast Two-Hybrid System

3.2.4 Mikroskopische Methoden

3.2.4.1 Präparation und immunzytochemische Färbung von murinen Netzhäuten

Die Präparation der Maus-Retinae erfolgte an adulten, 8-12 Wochen alten Wildtyp und Synaptophysin-*knockout*-Mäusen mittels Winklertechnik. Im ersten Schritt wurde die Hornhaut des Auges, die Linse und der Glaskörper entfernt und danach die Netzhaut heraus präpariert. Die Immersionsfixierung der Retinae erfolgte über 20 min mit 4% Paraformaldehyd (im PBS-Puffer). Dieser Schritt sowie alle weiteren wurden bei 4°C auf Eis durchgeführt. Nach der Fixierung wurde die Retina dreimal für 10 min in PBS gewaschen und für je eine Stunde in 10% und 20% Saccharose (im PBS-Puffer) inkubiert. Die letzte Inkubation mit 30% Saccharoselösung (im PBS-Puffer) erfolgte über Nacht. Anschließend wurde die Retina für 20 min im *Tissuetec freezing*-Medium eingebettet und bei -16°C 10 µm dicke Vertikalschnitte mittels Gefriermikrotom angefertigt. Die auf dem Objektträger befindlichen Schnitte wurden zweimal für 10 min in PBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen mit 80 µl Prä-Inkubationslösung für eine Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation des Primär-Antikörpers über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Objektträger dreimal für 10 min in PBS gewaschen und danach im Dunkeln eine Stunde mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert. Im Folgenden wurden die Schnitte erneut dreimal für 10 min mit PBS gewaschen und anschließend mit Elvanol eingedeckt.

Prä-Inkubationslösung	
NGS (<i>Normal Goat Serum</i>)	10%
BSA (<i>Bovine Serum Albumin</i>)	1%
Triton X-100	0,5%
in PBS	

3.2.4.2 Fixieren und Einbetten von Zellen

3.2.4.2.1 Methanol/Aceton-Fixierung

Auf Deckgläschen konfluent gewachsene Zellen wurden kurz mit 37°C warmem PBS-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen für 5 min in -20°C kaltem Methanol und danach für 20 s in Aceton (-20°C). Nach der Fixierung wurden die Zellen mit einem Tropfen Elvanol auf den Objektträgern eingebettet.

3.2.4.2.2 Formaldehyd-Fixierung

Auf Deckgläschen konfluent gewachsene Zellen wurden kurz mit 37°C warmem PBS-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen für 10 min in 4°C kaltem 4% PFA (in PBS). Nach dreimaligem fünfminütigen Waschen der Zellen mit 4°C kaltem PBS erfolgte eine einminütige Inkubation mit 0,01% Digitonin (in PBS) bei 4°C, woran sich ein erneuter Waschvorgang

(zweimal 5 min in PBS, 4°C) anschloss. Es folgte eine zehnmünütige Inkubation mit 5% BSA (in PBS) bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen in PBS für 5 min bei 4°C konnten die Zellen mit Elvanol eingebettet werden.

Elvanol	
Mowiol 4-88	1 g
PBS	4 ml
Glycerin	2 ml

3.2.4.3 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Die Durchführung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer erfolgte am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop von Leica, ein inverses DMI 6000 CS Trino Mikroskop mit Resonanzscanner und einem SP5 Punkt-Scanningsystem. Die Messung und Auswertung erfolgte mit der Leica Software LAS-AF.

Für den FRET-Assay wurden die fluoreszierenden Proteine *enhanced cyan fluorescent protein* (ECFP) und *enhanced yellow fluorescent protein* (EYFP) als Förster-Paar eingesetzt. Sie eignen sich als Reporter von Interaktionen, da sie bei einer Entfernung von 5 nm 50% Transfereffizienz aufweisen. Eine mögliche Interaktion zwischen *bait*- und *prey*-Protein wurde mittels *Acceptor Photobleaching* (FRET-AB) bestimmt. Hierbei wurden *bait*- und *prey*-Protein, jeweils fusioniert mit ECFP beziehungsweise EYFP, in PLC-Zellen koexprimiert und mit Paraformaldehyd fixiert. Während dem *Acceptor Photobleaching* wurde die Donorintensität vor und nach dem Ausbleichen des Akzeptors bei 16 Bit gemessen. Da das Akzeptorfluorophor nach dem Bleichen keine Energie mehr vom Donorfluorophor aufnehmen kann, war im Fall einer Protein-Protein-Wechselwirkung davon auszugehen, dass die Intensität der Emission des Donorfluorophors erhöht ist. Die Laserintensität betrug für ECFP (Anregung: 458 nm, Emission: 465-500 nm) 20% und für EYFP (Anregung: 514 nm, Emission: 525-600 nm) 10%, bei einer Argon-Laserintensität von 15%. Der Bleichvorgang erfolgte dreimal bei 50-100% Intensität der Laserlinie 514 nm und entsprach einer 80%igen Verminderung des YFP-Signals. Für die FRET-Aufnahmen wurden nur eine Auflösung von 512x512 bei 700Hz, ein *frame average* von 4 (*line average* von 1) und eine schwache CFP Laserintensität verwendet, um den Ausbleichprozess des ECFP zu minimieren. Die Darstellung der FRET-Effizienz erfolgte tabellarisch und in einer Fehlfarbandarstellung unter Verwendung folgender Formel:

$$FRET_{eff} = \frac{Donor_{post} - Donor_{pre}}{Donor_{post}}$$

Hierbei ist $Donor_{post}$ die Fluoreszenzintensität des Donors nach dem *Acceptor Photobleaching* und $Donor_{pre}$ die Intensität vor dem Bleichvorgang.

4 Ergebnisse

4.1 Justierung der *Screening*-Bedingungen für das *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid System* und Interaktion von SCAMP1 mit Synaptophysin

Ziel dieser Arbeit war es, mit dem *Split-Ubiquitin Y2H System*, das eine direkte *in vivo*-Interaktion von Membranproteinen ermöglicht, molekulare Wechselwirkungen von Synaptophysin mit anderen Proteinen in einem cDNA-*screen* aufzuklären. Die Justierung der Bedingungen ist von grundlegender Bedeutung. Hierfür standen verschiedene Kontrollen und Vektoren zur Verfügung. Da bei Synaptophysin beide Termini im Zytoplasma liegen, sind für die Fusion der C-terminalen Ubiquitin-Hälfte (Cub), die mit dem Transkriptionsfaktor (LexA/VP16) gekoppelt ist, prinzipiell beide Termini von Synaptophysin geeignet. Die Integration von Membranproteinen höherer Eukaryonten in die Hefe erweist sich als schwierig, da Signalsequenzen oft nicht richtig erkannt werden. Somit kann keine korrekte Membranintegration erfolgen, die eine Grundvoraussetzung für Interaktionsstudien mittels *Split-Ubiquitin Y2H System* ist. Daher wurden neben der Integration von Synaptophysin mit fusioniertem Cub am C-Terminus (pNCW-Sph) und N-Terminus (pCCW-Sph) auch Synaptophysin-Fusionskonstrukte mit kurzen N-terminalen Leadersequenzen aus der Hefe verwendet (pCCW-SUC-Sph, pCCW-STE-Sph). Die SUC-Leadersequenz ist eine N-terminale Typ I Signal Sequenz aus der SUC2-Invertase von *Saccharomyces cerevisiae*. Im Gegensatz zur SUC-Leadersequenz besitzt die STE-Leadersequenz, bestehend aus 15 Aminosäuren vom N-Terminus des STE2-Proteins aus *Saccharomyces cerevisiae*, keine *targeting* Funktion. Sie hat keinen Einfluss auf die Orientierung der Insertion in die Membran, führt jedoch in vielen Fällen zu einer verstärkten Expression, das heißt die korrekte Integration von Synaptophysin erfolgt über die eigene Transmembrandomäne, die als Signalsequenz wirkt. Alle vier Synaptophysin-Konstrukte wurden mit den Kontrollvektoren pAI-Alg5 und pDL-Alg5 kotransformiert. pAI-Alg5 exprimiert den N-terminalen Teil von Ubiquitin in der nativen NubI-Form (Alg5-NubI), die spontan mit dem am Synaptophysin fusionierten Cub reassoziieren kann. Diese Reassoziierung wird durch Ubiquitin-spezifische Proteasen (UBPs) erkannt, die den Transkriptionsfaktor abspalten. Folglich fungiert die Koexpression von pAI-Alg5 mit Synaptophysin als Positiv-Kontrolle für die korrekte Membranintegration von Synaptophysin. pDL2-Alg5 (Negativ-Kontrolle) exprimiert den N-terminalen Teil von Ubiquitin in der mutierten NubG-Variante (Alg5-NubG), die sich nicht spontan mit Cub reassoziert.

<i>prey</i> -Konstrukt	pCCW-STE-Sph	pCCW-SUC-Sph	pCCW-Sph	pNCW-Sph
pAI-Alg5 (+)	850	1200	800	1
pDL-Alg5 (-)	40	102	800	1
pDL2xN-SUC-Sph	545	312	-	-
pDL2xN-SUC-SCAMP	381	216	-	-
pDL2xN-STE-Sph	501	409	-	-
pDL2xN-STE-SCAMP	271	198	-	-
pDL2xN-Sph	543	347	-	-
pDL2xN-SCAMP	391	219	-	-

Tab. 4-1 Koexpression von Synaptophysin mit *prey* Kontrollen: Bei den dargestellten Werten handelt es sich um die Anzahl der NMY32 Hefekolonien auf einer SD-leu-trp-his-ade Selektionsplatte nach Kotransformation. Im Gegensatz zu pCCW-STE-Sph und pCCW-SUC-Sph erfolgte bei pCCW-Sph und pNCW-Sph keine korrekte Membranintegration von Synaptophysin. Sowohl Synaptophysin als auch SCAMP1 zeigten eine Wechselwirkung mit dem *bait*-Protein Synaptophysin.

Nach der Kotransformation wurden die Hefezellen auf SD-leu-trp, SD-leu-trp-his und SD-leu-trp-his-ade Selektionsplatten ausplattiert. Wie aus Tab. 4-1 erkennbar ist, erfolgte bei pCCW-Suc-Sph und pCCW-STE-Sph im Gegensatz zu pCCW-Sph und pNCW-Sph eine korrekte Membranintegration des Synaptophysin-Fusionskonstrukts. Die Anzahl der Kolonien auf SD-leu-trp Selektionsplatten diente lediglich der Selektion der Plasmide und war kein Indiz für die Aktivierung von Reportergenen. Bei allen Kotransformationen zeigte sich eine vergleichbare Kolonienanzahl von ungefähr 1600 Stück. Somit waren die Kolonienanzahlen auf SD-leu-trp-his-ade Selektionsplatten mit den verschiedenen Kontrollen in ihrer Stärke vergleichbar. Auf SD-leu-trp-his war die Kolonienanzahl im Vergleich zu SD-leu-trp-his-ade geringfügig höher (circa 10-100 Kolonien je nach Kotransformation), das Verhältnis zwischen der Positiv-Kontrolle pAI-Alg5 und der Negativ-Kontrolle pDL-Alg5 hingegen geringfügig schlechter. pCCW-STE-Sph wurde als *bait* für einen cDNA *screen* bestimmt, da er ähnlich wie pCCW-SUC-Sph ein gutes Ausgangsverhältnis zwischen positiv und Negativ-Kontrolle aufweist. Jedoch erfolgt bei pCCW-SUC-Sph die Membranintegration mittels SUC-Leader, wohingegen bei pCCW-STE-Sph die korrekte Integration von Synaptophysin über die eigene Transmembrandomäne erfolgt. Demnach ist pCCW-STE-Sph die nativere Form.

Die Überprüfung der korrekten Membranintegration von Synaptophysin erfolgte auch mit spezifischen, auf Synaptophysin zugeschnittenen Kontrollen. Da Synaptophysin selbst homomultimere Komplexe ausbildet^{108,151,152}, dient Synaptophysin in dem pDL2xN *prey*-Vektor sowohl mit Leadersequenz (pDL2xN-SUC-Sph, pDL2xN-STE-Sph) als auch ohne Leadersequenz (pDL2xN-Sph) als Positiv-Kontrolle. Zusätzlich wurde SCAMP1, das wie Synaptophysin zu den TVPs gehört¹⁰⁴, in den pDL2xN *prey*-Vektor sowohl mit Leadersequenz (pDL2xN-SUC-SCAMP, pDL2xN-STE-SCAMP) als auch ohne Leadersequenz (pDL2xN-SCAMP) als Negativ-Kontrolle kloniert. Eine Interaktion zwischen SCAMP1 und Synaptophysin wurde bisher nicht publiziert. Überraschenderweise zeigten sowohl Synaptophysin als auch SCAMP mit und ohne Leadersequenz eine offensichtliche Wechselwirkung mit Synaptophysin, die zur Aktivierung der Reportergene und

damit zum Wachstum auf dem Selektionsmedium führte (siehe Tab. 4-1). Neben der erwarteten homopolymeren Synaptophysin-Interaktion konnten somit erstmals heterophile Interaktionen zwischen den verschiedenen Genfamilien der TVPs identifiziert werden.

Im weiteren Verlauf wurden die *screening*-Bedingungen so eingestellt, dass die Selbstaktivierung des *bait*s durch erhöhte Selektionsstringenz ausblieb. Es galt zu berücksichtigen, dass die Anzahl der Kolonien auf den Selektionsplatten bei Kotransformation mit der Positiv-Kontrolle pAI-Alg5 noch 50% der Anzahl der Kolonien auf SD-leu-trp Platten betragen. Die Selektionsstringenz wurde mittels 3-Aminotriazol (3-AT), einem kompetitiven Inhibitor des HIS3-Genprodukts, erhöht.

	-l-t	-l-t-h-a	-l-t-h-a 1mM 3AT	-l-t-h-a 2,5mM	-l-t-h-a 7,5mM	-l-t-h-a 10mM	-l-t-h-a 15mM
pAI-Alg5	1700	1400	1200	1083	853	516	418
pDL-Alg5	1700	263	50	23	4	3	1
pDL2xN-STE-Sph	1200	337	81	42	17	15	6
pDL2xN-STE-SCAMP	1200	258	67	31	15	4	3

Tab. 4-2 Koexpression von pCCW-STE-Sph mit *prey* Kontrollen bei erhöhter Selektionsstringenz. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um die Anzahl der NMY32 Hefekolonien auf Selektionsplatten mit zunehmender Selektionsstringenz durch Erhöhung der 3-Aminotriazol (3-AT) Konzentration. Bei einer 3-AT Konzentration von 7,5 mM liegt das optimale Verhältnis zwischen Positiv (pAI-Alg5)- und Negativ (pDL-Alg5)-Kontrolle vor. Homophile (pDL2xN-STE-Sph) und heterophile (pDL2xN-STE-SCAMP) TVP-Interaktionen sind unter diesen Selektionsbedingungen detektierbar, jedoch im Vergleich zur Positiv-Kontrolle deutlich schwächer.

Wie der Tab. 4-2 zu entnehmen ist, führte die Erhöhung der Selektionsstringenz durch 3-AT zur Reduzierung der Selbstaktivierung des *bait*s. Bei einer 3-AT Konzentration von 7,5 mM in der Selektionsplatte war nahezu kein Wachstum bei Kotransformation mit der Negativ-Kontrolle pDL-Alg5 festzustellen (siehe auch Abb. 4-1), wohingegen die Positiv-Kontrolle noch eine Kolonienanzahl aufwies, die 50% der von SD-leu-trp entsprach.

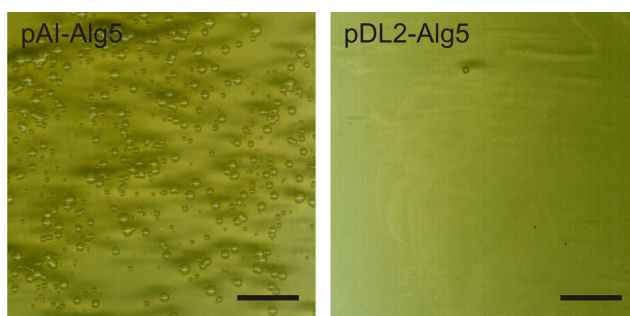


Abb. 4-1 Kotransformation pCCW-STE-Sph mit Kontrollvektoren: Bild der SD-leu-trp-his-ade Selektionsplatte mit 7,5 mM 3-Aminotriazol bei Kotransformation von pCCW-STE-Sph mit der Positiv (pAI-Alg5)- und Negativ (pDL2-Alg5)-Kontrolle. Größenbalken 10 mm.

Diese Selektionsstringenz ist somit optimal für einen cDNA *screen*, da hier die Selbstaktivierung fast vollständig reduziert wurde. Es ist zu beachten, dass die bekannte Wechselwirkung mit Synaptophysin (pDL2xN-STE-Sph) und die neue mit SCAMP (pDL2xN-STE-SCAMP) bei diesen erhöhten Selektionsbedingungen zwar noch mit der sechsfach höheren Kolonienanzahl der Negativ-Kontrolle (unter Einbezug der Kolonienanzahl auf SD-leu-trp) detektierbar, aber im Vergleich zur Positiv-

Kontrolle deutlich schwächer sind (siehe Tab. 4-2). Somit werden unter solchen Selektionsbedingungen nur starke Wechselwirkungen in einem *screen* identifiziert.

4.2 Identifizierung neuer Synaptophysin-Interaktionspartner bei Durchführung des *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screens*

Nach der Auswahl des Synaptophysin-*baits* (pCCW-STE-Sph) und der Wahl der Selektionsstringenz (SD-leu-trp-his-ade + 7,5 mM 3-AT) konnte der Synaptophysin-*screen* durchgeführt werden. Es wurde eine cDNA-Bibliothek in pNubGx aus Gesamtgehirn adulter Mäuse von Dualsystems Biotech verwendet, die mit den in 3.2.3.2.1 beschriebenen Methoden transformiert und auf insgesamt 16 SD-leu-trp-his-ade + 7,5 mM 3AT Selektionsplatten ausplattiert wurde. Die Transformationseffizienz wurde nach der in 3.2.3.2.1 beschriebenen Methode berechnet und ergab eine Effizienz von 1×10^5 Klone/ μg DNA. Somit wurden insgesamt $2,8 \times 10^6$ Kolonien auf ihre Fähigkeit auf Selektionsmedium zu wachsen hin gescreent. Nach einer Inkubation von drei Tagen bei 30°C wurden die Selektionsplatten ausgewertet (siehe Abb. 4-2).

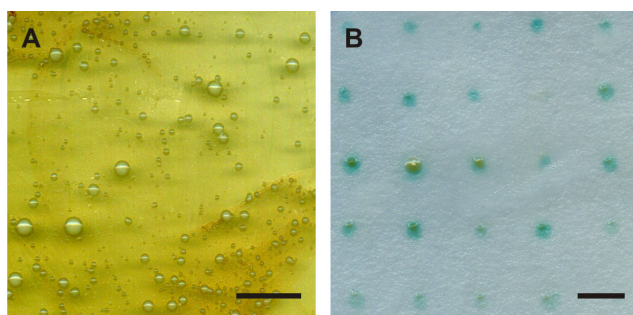


Abb. 4-2 Transformation und Selektion der cDNA-Bibliothek pNubGx: (A) Bild der SD-leu-trp-his-ade + 7,5 mM 3-AT Selektionsplatte nach einer Inkubation von 3 Tagen bei 30°C bei Kotransformation von pCCW-STE-Sph mit der cDNA-Bibliothek pNubGx. Die Anzahl der Kolonien pro Platte betrug circa 800, die in Größe und Farbe variierten (0,1 bis 3,5 mm; weiß bis rosa). (B) Bild des *colony-lift filter assay* von koexprimierten (pCCW-STE-Sph/pNubGx-cDNA)

Hefekolonien auf SD-leu-trp-his-ade + 15 mM 3AT Selektionsplatten. Die Kolonien unterschieden sich sowohl in der Intensität der Blaufärbung als auch in der Zeit bis zur Verfärbung (20-45 min). Größenbalken 10 mm.

Die Anzahl der Kolonien pro Selektionsplatte betrug circa 800 (insgesamt 13.000 Kolonien) und variierte stark in der Koloniengröße (0,1 bis 3,5 mm; siehe Abb. 4-2). Ferner kam es durch den ADE2-Reporter bei fehlender oder schwacher Interaktion vereinzelt zu einer leichten Rosafärbung der Hefekolonien. Dies ist durch die Akkumulation eines roten Intermediärproduktes bei blockiertem Adenin-Syntheseweg bedingt. Pro Platte wurden die 37 stärksten Kolonien (insgesamt 592), das heißt weiße Kolonien mit einem Durchmesser von über 2 mm, auf eine neue Selektionsplatte mit erhöhter 3-AT Konzentration überführt (SD-leu-trp-his-ade + 15 mM 3-AT) und bei 30°C für 3 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien auf Wachstum und Farbe untersucht. 42 der insgesamt 592 Kolonien konnten unter erhöhten Selektionsbedingungen nicht wachsen oder verfärbten sich rot. Die verbleibenden 550 Kolonien wurden auf die Aktivität des LacZ-Reporters über den *colony-lift filter assay* (siehe Methode 3.2.3.4.1) hin überprüft. Als LacZ-negativ wurde eine Kolonie betrachtet, die sich nicht verfärbte oder erst nach 45 min eine leichte Blaufärbung aufwies (siehe Abb. 4-2). Von 550 untersuchten Kolonien waren 268 Kolonien LacZ-positiv. Nach der Identifizierung von 268 Kolonien,

die mögliche Interaktionspartner exprimieren, erfolgte die Plasmid-Isolierung nach der in 3.2.3.3 beschriebenen Methode. Da Hefen während der Transformation mehrere Plasmide aufnehmen können, wurden jeweils zwei getrennte DNA-Präparationen durchgeführt. Die cDNAs wurden mit der Restriktionsendonuklease SfiI aus dem Vektor pNubGx geschnitten und mittels Gelelektrophorese analysiert (siehe Abb. 4-3). Von 268 untersuchten Hefekolonien wiesen 33 Kolonien zwei *prey*-Plasmide mit unterschiedlicher cDNA auf.

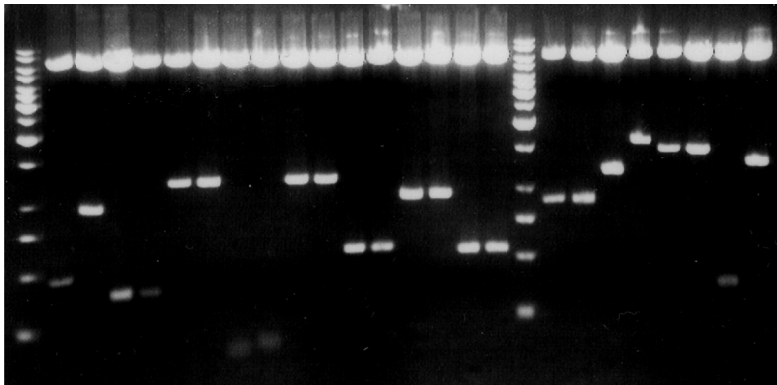


Abb. 4-3 Restriktionsanalyse der pNubGx-cDNA Plasmide: Beispiel aus der Restriktionsanalyse der pNubGx-cDNA Plasmide. Die cDNA wurde durch die Restriktionsendonuklease SfiI herausgeschnitten. Von jeder Hefekolonie wurden zwei pNubGx-cDNA Plasmide isoliert. Von 268 Hefekolonien (536 pNubGx-Plasmide) trugen 33 Hefekolonien unterschiedliche cDNA.

Die resultierenden 301 pNubGx-cDNA Plasmide wurden zusammen mit pCCW-STE-Sph erneut in die Hefe retransformiert und hinsichtlich ihres Wachstums auf SD-leu-trp-his-ade + 15 mM 3-AT Selektionsplatten analysiert. 193 der 301 pNubGx-cDNA Plasmide konnten bei Kotransformation mit pCCW-STE-Sph nicht unter den Selektionsbedingungen wachsen beziehungsweise die Anzahl der Kolonien pro Platte war geringer als die der Negativ-Kontrolle pDL2-Alg5. Alle Kolonien, die auf den Selektionsplatten wachsen konnten, waren auch im *colony-lift filter assay* (LacZ-Test) LacZ-positiv. Die cDNA der 108 Plasmide wurde sequenziert und die Sequenzen in der Internetdatenbank vom amerikanischen Nationalen Zentrum für Biotechnologie-Information (NCBI) auf der Seite <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> mittels BLAST-Algorithmus (*Basic Local Alignment Search Tool*) mit bekannten Sequenzen verglichen.

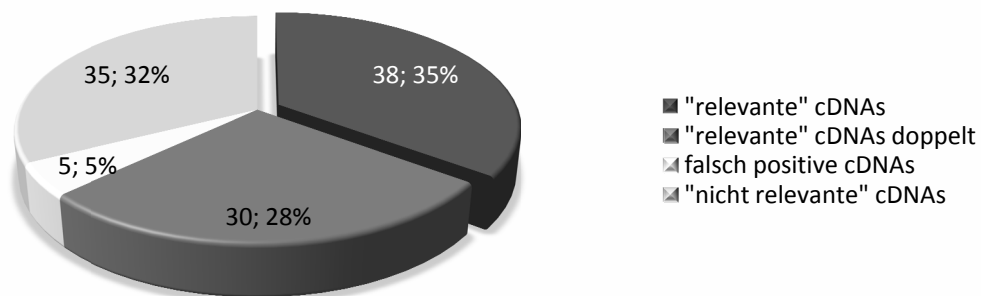


Abb. 4-4 Auswertung der DNA-Sequenzierung der *prey*-Plasmide: Von 108 sequenzierten *prey*-Plasmiden wurden 68 "relevante" cDNA Sequenzen erfasst (im Leseraster, übereinstimmende Sequenz in der BLAST-Datenbank, die für ein Protein kodiert), wobei 30 mehrfach gefunden wurden. "Nicht relevante" cDNAs waren nicht im Leseraster zum fusionierten NubG, ergaben keine Übereinstimmung in der Datenbank oder kodierten für einen Bereich außerhalb des Leserahmens. Falsch positive cDNAs sind bekannte unspezifische Protein-Interaktionspartner, die im *Split-Ubiquitin Y2H System* auftreten können. Insgesamt konnten 38 verschiedene "relevante" cDNAs identifiziert werden.

Insgesamt waren 68 der sequenzierten cDNAs (siehe Abb. 4-4) im Leseraster zum fusionierten NubG und ergaben in der Datenbank eine übereinstimmende Sequenz, die für ein Protein kodierte (als "relevante" cDNAs bezeichnet). 90% dieser "relevanten" cDNAs enthielten den vollständigen offenen Leserahmen. Ferner waren 38 der 68 "relevanten" cDNAs unterschiedlich, das heißt dass einige Proteine in diesem *screen* mehrfach (meist zwei- bis dreifach) als Interaktionspartner identifiziert wurden. 35 der sequenzierten cDNAs, im Folgenden als "nicht relevante" cDNAs bezeichnet, waren nicht im Leseraster zum fusionierten NubG, ergaben keine Übereinstimmung in der Datenbank oder kodierten für einen Bereich außerhalb des Leserahmens. Des Weiteren wurden fünf Proteine identifiziert, die als falsch-positive, unspezifische Interaktionspartner im *Split-Ubiquitin Y2H System* auftreten können.

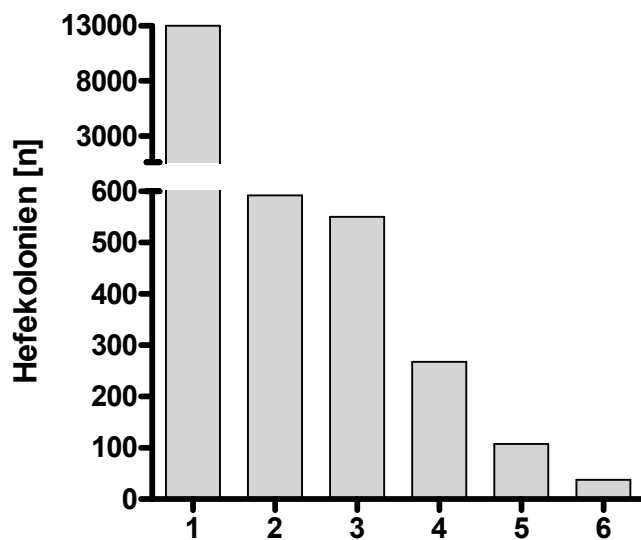


Abb. 4-5 Eliminierung falsch-positiver Interaktionspartner im Verlauf des *Split-Ubiquitin Y2H Screens*: (1) Anfangskolonienzahl auf SD-leu-trp-his-ade + 7,5mM 3-AT (2) Selektion nach Koloniengröße und Farbe (≥ 2 mm / weiß) (3) Selektion nach Wachstum und Farbe unter erhöhten Selektionsbedingungen (SD-leu-trp-his-ade + 15 mM 3-AT) (4) Selektion nach LacZ-Aktivität im *colony-lift filter assay* (5) Selektion nach Wachstum und LacZ-Aktivität im *colony-lift filter assay* nach Retransformation in die Hefe (6) Selektion durch Sequenzüberprüfung und Eliminierung "nicht relevanter" cDNAs.

Aus Abb. 4-5 wird die systematische Eliminierung falsch-positiver Signale im *Split-Ubiquitin Y2H Screen* noch einmal deutlich. Durch gezielte Selektionsmethoden konnte eine Anfangskolonienzahl von 13.000 auf 38 cDNAs, die mit dem Synaptophysin-*bait* interagieren, reduziert werden. In Tab. 4-3 sind alle mit Synaptophysin interagierenden Proteine aufgelistet. Die Anzahl der Klone beziehungsweise Kolonien im Experiment 1 (siehe Tab. 4-3) sind Werte aus der Retransformation, die im *screen* entstanden. Da aufgrund getrennter Experimente (Transformationen) die Anzahl der Kolonien untereinander nicht direkt vergleichbar ist, wurden 29 cDNAs in einer erneuten Runde (Experiment 2, siehe Tab. 4-3) transformiert und zweifach auf Selektionsplatten SD-leu-trp-his-ade + 15mM 3-AT ausplattiert. Die Werte im Experiment 2 sind somit ein vergleichbarer Maßstab für die Interaktionsstärke mit Synaptophysin. Mehrfach im *screen* detektierte Interaktionspartner, wie zum Beispiel Stathmin-like3, das insgesamt 18-mal identifiziert wurde, sind ein weiteres Indiz für eine starke Interaktion.

Interaktionspartner	Exp. 1 Anzahl Klone	Exp. 1 Anzahl Kolonien	Exp. 2 Anzahl Kolonien
Synaptobrevin2 (Syb2) GeneID: 22318	1	1050	1425
Leptin receptor overlapping transcript (Leprot) GeneID: 230514	1	890	1450
Synaptogyrin3 (Syngr3) GeneID: 20974	3	886	1525
Vesicle transport through interaction with t-SNAREs 1B homolog (Vti1b) GeneID: 53612	1	870	1450
Phospholipase D4 (Pld4) GeneID: 104759	1	842	840
Glutaredoxin5 homolog (Glx5) GeneID: 73046	2	780	1425
Na ⁺ /K ⁺ transporting ATPase interacting 4 (Nkain4) GeneID: 58237	1	780	-
DNA segment, Chr 4, ERATO Doi 196, expressed (D4Ertd196e) GeneID: 52174	1	710	-
Potassium channel, subfamily K, member 1 (Kcnk1) GeneID: 16525	1	690	1280
Regulator of G-protein signaling 10 (Rgs10) GeneID: 67865	1	680	1220
Transmembrane protein 163 (Tmem163) GeneID: 72160	2	653	-
Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate-associated protein 1 (Grina) GeneID: 66168	1	646	1415
Stathmin-like3 (Stmn3) GeneID: 20262	18	625	1055
Rho family GTPase2 (Rnd2) GeneID: 11858	1	600	735
Vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1 (Vkorc1) GeneID: 27973	1	600	-
Ring finger protein10 (Rnf10) GeneID: 50849	1	580	1115
ADP-ribosylation factor interacting protein 2 (Arfaptin2) GeneID: 76932	1	550	1425
Tumor suppressor candidate 3 (Tusc3) GeneID: 80286	1	466	830
Phospholipid transfer protein (Pltp) GeneID: 18830	2	391	829
Transmembrane protein 147 (Tmem147) GeneID: 69804	1	331	-
Ndufa12-like (Ndufa12l, Mimitin) GeneID: 75597	1	269	1240
Neuron specific gene family member 1 (Nsg1) GeneID: 18196	3	205	775
Integral membrane protein 2B (Itm2b) GeneID: 16432	2	196	1240
Protein phosphatase 1, regulatory subunit 16A	1	155	747

Interaktionspartner	Exp. 1 Anzahl Klone	Exp. 1 Anzahl Kolonien	Exp. 2 Anzahl Kolonien
(Ppp1r16a) GeneID: 73062			
N-myc downstream regulated gene 4 (NdrG4) GeneID: 234593	3	144	740
Profilin 1 (Pfn1) GeneID: 18643	1	143	575
Peptidylprolyl isomerase A (Ppia) GeneID: 268373	2	104	508
Glycoprotein, synaptic 2 (Gpsn2) GeneID: 106529	1	101	-
Calcineurin B, type I (Ppp3r1) GeneID: 19058	1	91	465
Calmodulin 1 (Calm1) GeneID: 12313	1	84	640
Calmodulin 2 (Calm2) GeneID: 12314	2	84	176
RIKEN cDNA 0610031J06 gene (0610031J06Rik) GeneID: 56700	1	81	-
Ring finger protein 41 (Rnf41) GeneID: 67588	1	50	-
Solute carrier family 22, member 17 (Slc22a17) GeneID: 59049	1	48	210
Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain (Acadvl) GeneID: 11370	1	41	-
Glutathione S-transferase, pi 2 (Gstp2) GeneID: 14869	1	40	208
Tetraspanin 5 (Tspan5) GeneID: 56224	1	40	166
Similar to tumor protein, translationally-controlled 1 (LOC100043703) GeneID: 100043703	1	35	-

Tab. 4-3 Liste der im *Split-Ubiquitin Y2H System* identifizierten Synaptophysin-Interaktionspartner: Anzahl der Kolonien bei Kotransformation pCCW-STE-Sph mit unterschiedlichen *prey*-Plasmiden auf SD-leu-trp-his-ade + 15 mM 3-AT Selektionsplatten. Die Kolonienanzahl aus Experiment 2 (Exp.2, unabhängiges Experiment nach dem *screen*, Mittelwert der Kolonienanzahl von zwei Selektionsplatten) ist, im Gegensatz zu Experiment 1 (Exp.1, Retransformations-Werte aus dem *screen*), ein direkter Maßstab für die Interaktionsstärke, da es sich um eine einzelne Transformationsrunde handelt. Die Negativ-Kontrolle (pDL-Alg5) ergab im Experiment 2 eine Kolonienanzahl von 50 und die Positiv-Kontrolle (pAI-Alg5) eine Kolonienanzahl von 1400 (nicht gezeigt). Mehrfach im *screen* detektierte Interaktionspartner (Anzahl Klone) sind ein mögliches weiteres Indiz für eine starke Interaktion.

Die Identifizierung des bekannten Synaptophysin-Bindungspartners Synaptobrevin2 als einen der stärksten Interaktionspartner im *Split-Ubiquitin Y2H System* ist ein Indiz für die Qualität und Spezifität der Methode. Eine ebenso starke Interaktion konnte für das TVP Synaptogyrin3 detektiert werden. Somit konnte neben der in 4.1 beschriebenen SCAMP1-Interaktion eine weitere heterophile Interaktion zwischen den verschiedenen Genfamilien der TVPs identifiziert werden.

4.3 Verifizierung der Ergebnisse des *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screens*

Die Verifizierung der im *Split-Ubiquitin Y2H System* ermittelten Interaktionspartner wurde auf eine Auswahl von zehn Proteinen beschränkt, die vermutlich an der Exo- oder Endozytose involviert sind. Es handelt sich dabei um Synaptobrevin2 (SYB2), Synaptogyrin3 (SYNGR3), SCAMP1, Stathmin-like3 (STMN3), Rho family GTPase2 (RND2), Phospholipid transfer Protein (PLTP), Vesicle transport through interaction with t-SNAREs 1B homolog (Vti1b), Phospholipase D4 (PLD4), ADP-ribosylation factor interacting protein 2 (Arfaptin2) und Profilin1 (Pfn1). Für diese Proteine standen mit Ausnahme von Phospholipase D4 Antikörper zur Verfügung.

4.3.1 Kolokalisierung von Synaptophysin mit im *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid System* identifizierten Interaktionspartnern

Die Doppelimmunfluoreszenz-Mikroskopie von Maus Retinae nach der Methode 3.2.4.1 diente der Kontrolle, ob die im *Split-Ubiquitin Y2H-System* ermittelten Interaktionspartner mit Synaptophysin kolokalisieren. Folgende Primär- und Sekundär-Antikörper Konstellationen wurden eingesetzt:

IF (A/B)	1.AK (A)	2.AK (A)	1.AK (B)	2.AK (B)
SYP/SYB2	rb04	Alexa 488	mc37	Alexa 594
SYP/SCAMP1	mc11	Alexa 594	rb (von SySy)	Alexa 488
SYP/SYNGR3	mc11	Alexa 594	rb (von R. Janz)	Alexa 488
SYP/RND2	mc11	Alexa 594	rb(von M. Negishi)	Alexa 488
SYP/PLTP	mc11	Alexa 594	rb91I	Alexa 488
SYP/Arfaptin2	mc11	Alexa 594	rb(von C. D'Souza-Schorey)	Alexa 488
SYP/STMN3	mc11	Alexa 594	rb(von A. Sobel)	Alexa 488
SYP/PFN1	mc11	Alexa 594	rb90I	Alexa 488
SYP/Vti1b	mc11	Alexa 594	rb(von G. F. von Mollard)	Alexa 488

Tab. 4-4 Liste der Primär- und Sekundär-Antikörper: Genauere Bezeichnungen der Antikörper sind unter 3.1.1 aufgelistet. 1.AK: Primär-Antikörper, interne Laborbezeichnung; 2.AK: Alexa488- bzw. Alexa 594-gekoppelter Sekundär-Antikörper; rb: polyklonal Kaninchen; mc: monoklonal Maus.

Die Detektion der Primär-Antikörper erfolgte mit Alexa488/594-konjugierten Sekundärantikörpern, die ein geringeres Hintergrundrauschen als Cy2/Cy3- oder TexasRed-konjugierte Sekundärantikörper aufwiesen. Für Phospholipase D4 standen keine spezifischen Antikörper zur Verfügung. In den Synapsen-reichen Schichten der äußeren und inneren plexiformen Schicht (IPL, OPL) der Retina konnte eine Kolokalisierung von SYB2, SYNGR3, SCAMP1, STMN3, RND2, PLTP, Vti1b, Arfaptin2 und PFN1 mit Synaptophysin (SYP) detektiert werden (siehe Abb. 4-6). Bedingt durch quantitativ sowie qualitativ minderwertige Antikörper für PFN1, STMN3 und Vti1b ist die Kolokalisierung in OPL und IPL nicht so deutlich wie für SYP2, SYNGR3, SCAMP1, STMN3,

RND2 und PLTP. Die relative Fluoreszenzstärke für SCAMP1 und SYNGR3 war in der IPL stärker als in der OPL. Im Gegensatz zu den löslichen Proteinen STMN3, RND2, PLTP, Arfaptin2 und PFN1 zeigten die synaptischen Vesikel-Membranproteine SYP, SYB2, SCAMP1 und SYNGR3 eine punktiertere Expression. Immunzytochemische Färbung von Retinae an Synaptophysin-defizienten Mäusen (*knockout*) zeigten bei SYP2, SYNGR3, SCAMP1, STMN3, RND2, PLTP, Vti1b, Arfaptin2 und PFN1 im Gegensatz zum Wildtyp kein verändertes Expressions-Muster beziehungsweise keine veränderte Expressions-Stärke (Daten nicht gezeigt).

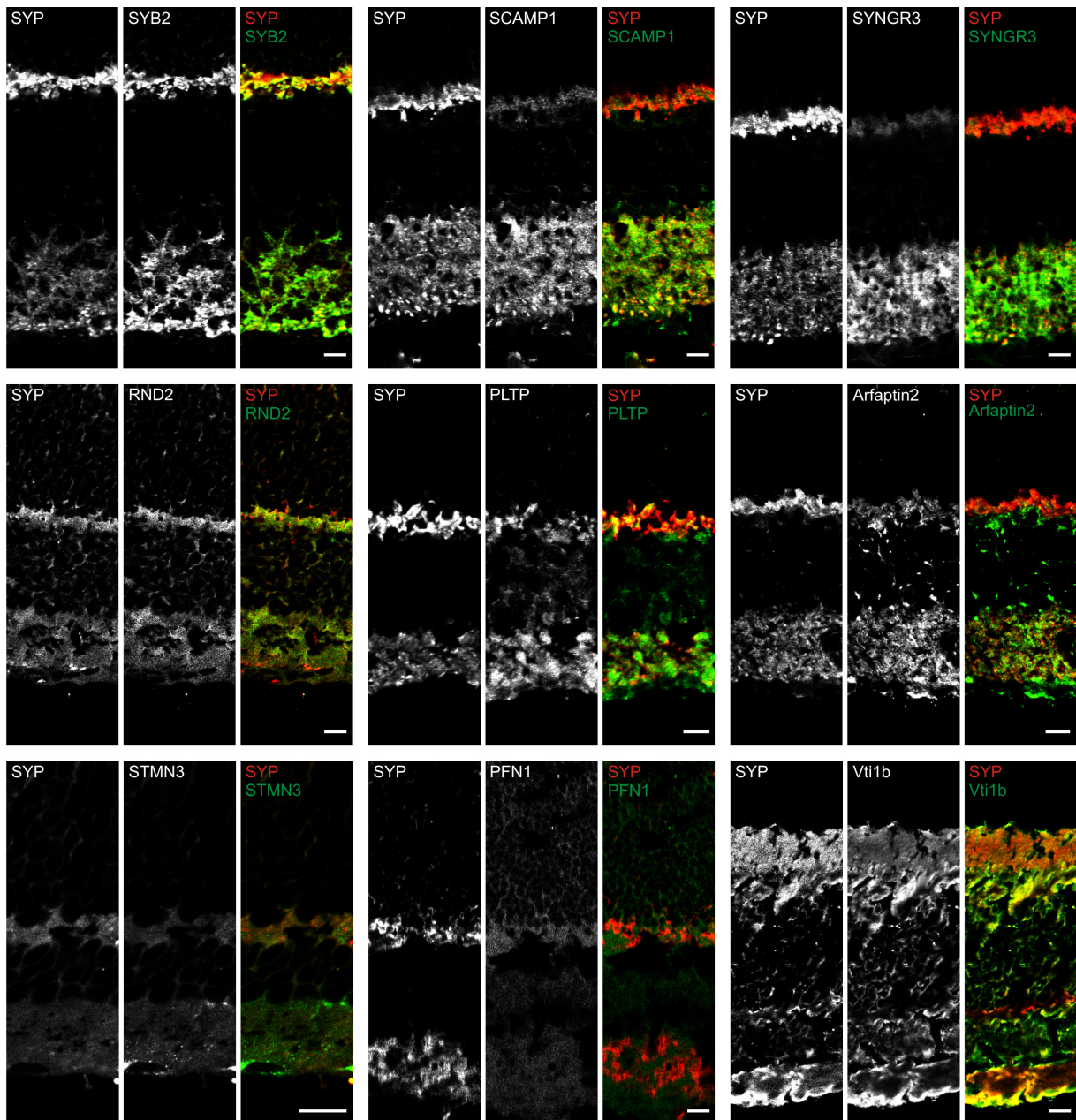


Abb. 4-6 Kolokalisierung von Synaptophysin mit im *Split-Ubiquitin Y2H System* identifizierten Interaktionspartnern in der Retina der Maus: Doppelimmunfluoreszenz-Markierung von Maus-Retinae. Die Konstellation der Primär- und Sekundär-Antikörper ist der Tab. 4-4 zu entnehmen. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden zur besseren Visualisierung überlagert und gefärbt (SYP = rot; im Y2H identifizierte Interaktionspartner = grün). Größenbalken: 10µm.

4.3.2 Koimmunpräzipitation von Synaptophysin mit Synaptobrevin2 und Synaptogyrin3

4.3.2.1 Koimmunpräzipitation aus Synaptosomen-Lysat

Der nächste Schritt bestand in der Verifizierung der im *Split-Ubiquitin Y2H System* ermittelten Interaktionspartner durch Koimmunpräzipitation mit Synaptophysin von Mausgehirn-Lysat. Es wurden Extraktionsbedingungen gewählt, mit denen eine starke Synaptophysin/Synaptobrevin2-Koimmunpräzipitation erzielt wurde (siehe Methoden 3.2.2.1, 3.2.2.2.1, 3.2.2.3.1 sowie Abb. 4-7).

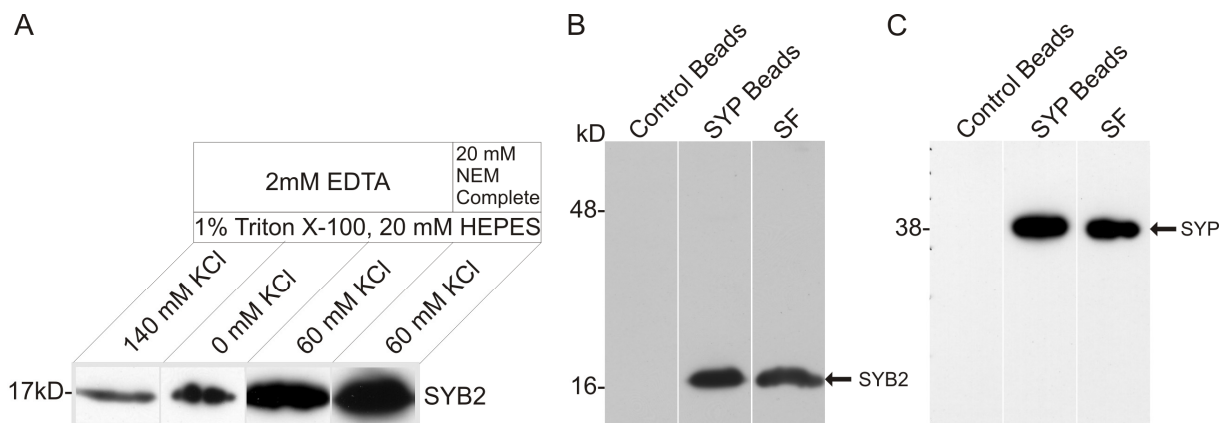


Abb. 4-7 Immunblot der Koimmunpräzipitation von Synaptophysin mit Synaptobrevin2 aus Synaptosomen-Lysat: (A) Einfluss der Synaptosomen-Extraktionsbedingungen auf die Koimmunpräzipitation von SYP mit SYB2: Stärkste Koimmunpräzipitation bei 60 mM KCl, 20 mM N-Ethylmaleimid (NEM), 1% Triton X-100, 20 mM HEPES-KOH in Gegenwart von Proteaseinhibitoren (Roche, *Complete EDTA-free*). (B) Koimmunpräzipitation von SYP mit SYB2: Für eine Koimmunpräzipitation wurden 6,5 μ l monoklonaler SY38 SYP-Antikörper und 30 μ l Protein A-Sepharose verwendet. SYB2-Detektion mit monoklonalen mc37 SYB2-Antikörpern. Als Positiv-Kontrolle wurde das Synaptosomen-Lysat (SF: *Starting Fraction*) aufgetragen. Eine Koimmunpräzipitation ohne den Primär-Antikörper SYP mc11 diene als Negativ-Kontrolle (*Control Beads*). Die Proben wurden über ein 12%iges SDS-PAGE aufgetrennt. (C) Kontrolle der Synaptophysin-Präzipitation: Für die Präzipitation von Synaptophysin wurden 6,5 μ l monoklonaler SY38 SYP-Antikörper und 30 μ l Protein A-Sepharose verwendet. SYP-Detektion mit SY38 SYP-Antikörpern. Als Positiv-Kontrolle wurde das Synaptosomen-Lysat (SF: *Starting Fraction*) aufgetragen. Eine Präzipitation ohne den Primär-Antikörper SYP diene als Negativ-Kontrolle (*Control Beads*). Die Proben wurden über ein 12%iges SDS-PAGE aufgetrennt.

Bei einem Extraktionspuffer von 60 mM KCl, 1% Triton X-100, 20 mM N-Ethylmaleimid und 20 mM HEPES-KOH in Gegenwart von Proteaseinhibitoren (Roche, *Complete EDTA-free*) konnte die stärkste Interaktion zwischen SYP und SYB2 ermittelt werden (Abb. 4-7 A). Eine Kontrollpräzipitation mit Synaptophysin zeigte, dass Synaptophysin mit monoklonalen SY38-Antikörpern präzipitiert und nicht unspezifisch an Protein A- (Abb. 4-7 C) oder Protein G-Sepharose bindet. Diese Bedingungen wurden auch für die Koimmunpräzipitationen von SYP mit SYNGR3, SCAMP1, STMN3, RND2, PLTP, Vti1b, Arfaptin2 und PFN1 verwendet. Für SCAMP1, STMN3, RND2, PLTP, Vti1b, Arfaptin2 und PFN1 konnte weder mit Protein A- noch mit Protein G-Sepharose eine Koimmunpräzipitation mit SYP aus Synaptosomen-Lysat erzielt werden (Abb. 4-8 B-H). Im Gegensatz dazu konnte SYNGR3 mit SYP kopräzipitieren (Abb. 4-8 A).

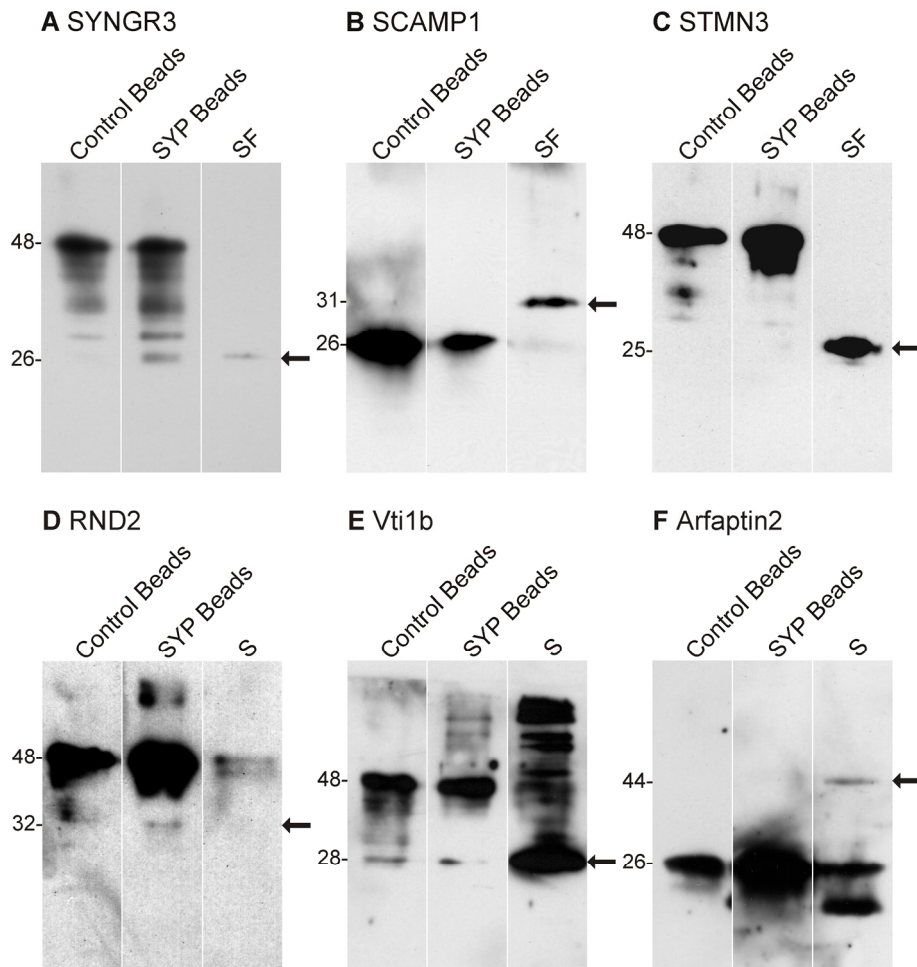


Abb. 4-8 Immunblot der Koimmunpräzipitation von Synaptophysin mit Interaktionspartnern aus dem Split-Ubiquitin Y2H System: Für eine Koimmunpräzipitation wurden 6,5 μ l monoklonaler SY38 SYP-Antikörper und 30 μ l Protein A- oder Protein G-Sepharose verwendet. Als Positiv-Kontrolle wurde das Synaptosomen-Lysat (SF: *Starting Fraction*) oder der Überstand (S: *Supernatant*) der nicht präzipitierten Proteine aufgetragen (dieser kann geringe Mengen von Protein A oder Protein G enthalten, die detektiert werden). Eine Koimmunpräzipitation ohne den Primär-Antikörper diente als Negativ-Kontrolle (*Control Beads*). Die Pfeile markieren die Position des zu präzipitierenden Proteins. **(A)** Koimmunpräzipitation von SYP mit SYNGR3 und Protein A: SYNGR3-Detektion mit polyklonalen Kaninchen anti-SYNGR3-Antikörpern (R. Janz); 12%iges SDS-PAGE. **(B)** Koimmunpräzipitation von SYP mit SCAMP1 und Protein G: SCAMP1-Detektion mit polyklonalen Kaninchen anti-SCAMP1-Antikörpern (SySy); 12%iges SDS-PAGE. **(C)** Koimmunpräzipitation von SYP mit STMN3 und Protein A: STMN3-Detektion mit polyklonalen Kaninchen anti-STMN3-Antikörpern (A. Sobel); 15%iges SDS-PAGE. **(D)** Koimmunpräzipitation von SYP mit RND2 und Protein A: RND2-Detektion mit polyklonalen Kaninchen anti-RND2-Antikörpern (M. Negishi); 15%iges SDS-PAGE. **(E)** Koimmunpräzipitation von SYP mit Vti1b und Protein A: Vti1b-Detektion mit polyklonalen Kaninchen anti-Vti1b-Antikörpern (G. F. von Mollard); 15%iges SDS-PAGE. **(F)** Koimmunpräzipitation von SYP mit Arfaptin2 und Protein G: Arfaptin2-Detektion mit polyklonalen Kaninchen anti-Arfaptin2-Antikörpern (C. D'Souza-Schorey); 12%iges SDS-PAGE.

Im Fall von PFN1 und PLTP konnte mit den vorhandenen Antikörpern kein spezifisches Protein detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Auch eine direkte Koimmunpräzipitation mit SYB2, Arfaptin2, Vti1b, STMN3 oder RND2 und anschließender Detektion von präzipitiertem SYP blieb mit Ausnahme der SYP/SYB2-Kopräzipitation erfolglos (Daten nicht gezeigt).

4.3.2.2 Koimmunpräzipitation aus Epithelzellen

Um Detektionsprobleme, die sich durch die verwendeten Antikörper ergaben, auszuschließen und da es ferner für PLD4 keine spezifischen Antikörper gab, wurden Koimmunpräzipitationen auch in Epithelzellen (PLC-, HeLa-Zellen) bei Koexpression von Synaptophysin mit GFP-markierten, im *Split-Ubiquitin Y2H System* ermittelten Interaktionspartnern durchgeführt. Die Detektion der mit SYP interagierenden Proteine erfolgte hierbei mit dem polyklonalen GFP-Antikörper von Clontech.

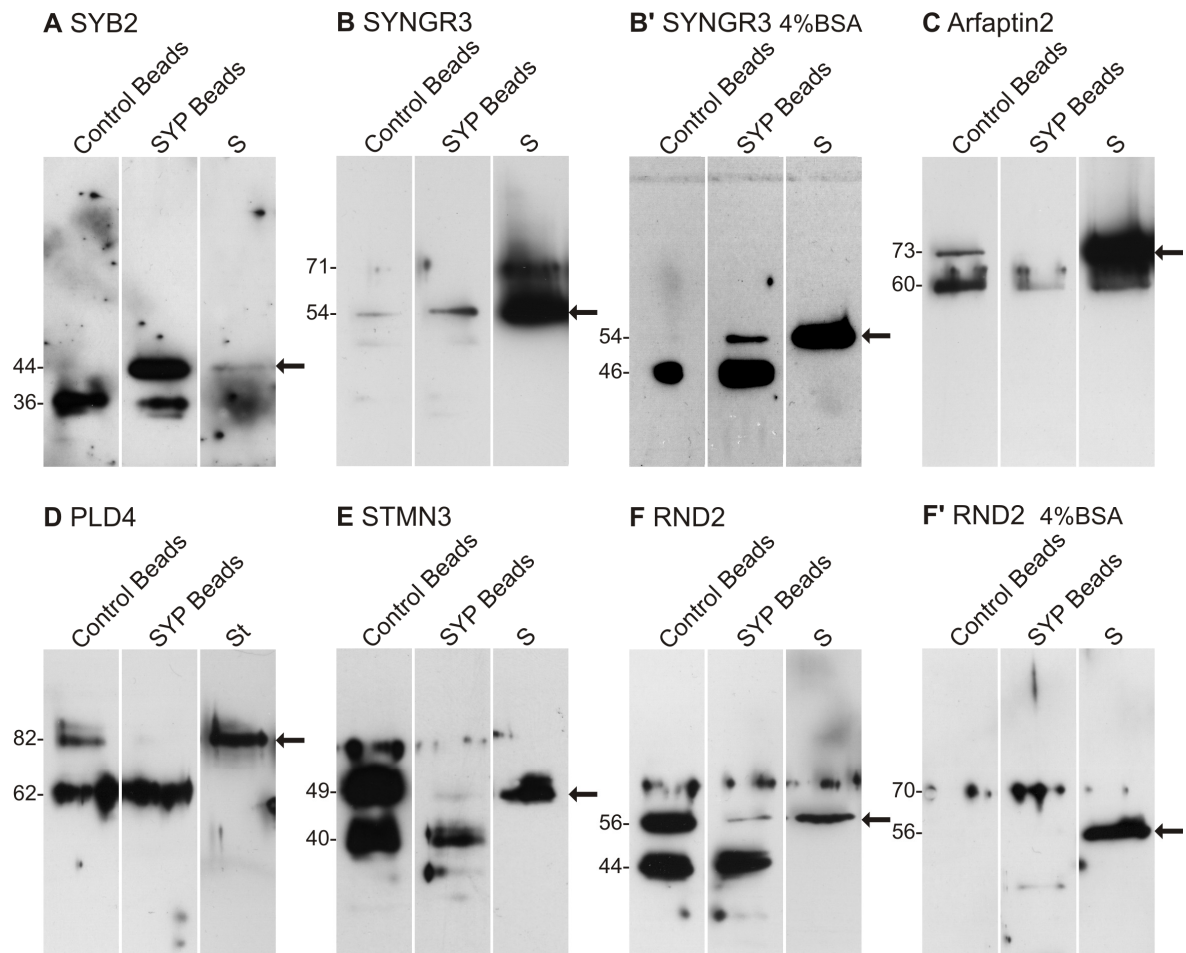


Abb. 4-9 Koimmunpräzipitation von Synaptophysin mit GFP-fusionierten Interaktionspartnern aus dem *Split-Ubiquitin Y2H-System*: HeLa-Zellen wurden mit SYP- und GFP-fusionierten Interaktionspartnern in HeLa-Zellen koexprimiert. Für eine Koimmunpräzipitation wurden 10 μ l monoklonaler SY38 SYP-Antikörper und 30 μ l Protein G-Sepharose verwendet. Als Positiv-Kontrolle wurde der Überstand (S: *Supernatant*) der nicht präzipitierten Proteine aufgetragen. Eine Koimmunpräzipitation ohne den Primär-Antikörper diente als Negativ-Kontrolle (*Control Beads*). Die Pfeile markieren die Position des zu präzipitierenden Proteins. Die Detektion der GFP-gekoppelten Proteine erfolgte mit polyklonalen GFP-Antikörpern von Clontech. (**B'**, **F'**) Zur Reduzierung unspezifischer Bindung der GFP-gekoppelten Proteine an Protein G-Sepharose wurde die Sepharose über Nacht mit Zell-Lysat (Verhältnis 1:4 (v/v)) nicht transfizierter HeLa-Zellen in 4% BSA vorinkubiert.

Wie bereits im Synaptosomen-Lysat konnte der SYP/SYB2-Komplex sowie der SYP/SYNGR3-Komplex koimmunpräzipitiert werden (Abb. 4-9 A, B). Arfaptin2, PLD4, STMN3 und RND2 zeigten gegenüber der Koimmunpräzipitation in der Kontrolle ein starkes Signal (siehe *Control Beads*), welches durch eine unspezifische Bindung der GFP-fusionierten Proteine an Protein G-Sepharose

hervorgerufen wurde (Abb. 4-9 C, D, E, F). Durch eine Vorinkubation der Protein G-Sepharose mit Zell-Lysat nicht transfizierter HeLa-Zellen in 4% BSA konnte die unspezifische Bindung vollständig reduziert werden (Abb. 4-9 B', F'), so dass die Koimmunpräzipitation von SYP/SYNGR3 noch deutlicher wurde. Vermutlich sind SYP-Interaktionen, die mit dem *Split-Ubiquitin Y2H-System* gefunden wurden, mit einem System, bei dem Membranproteine aus der Membran durch Salze und Detergenzien herausgelöst werden und so die Struktur der Proteine geändert wird, nur bedingt zu verifizieren. Lediglich starke Interaktionspartner wie die Membranproteine SYB2 und SYNGR3 konnten mit Koimmunpräzipitation sowohl im Synaptosomen-Lysat als auch bei Koexpression in HeLa-Zellen verifiziert werden.

4.3.3 Etablierung eines FRET-Systems zur Detektion und Charakterisierung von Synaptophysin-Interaktionspartnern

Im Gegensatz zur Koimmunpräzipitation können mit dem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) Interaktionsstudien von Membranproteinen und Membran-assoziierten Proteinen *in situ* unter nativen Bedingungen erfolgen. Als Verfahren zur Detektion von FRET wurde das *Acceptor Photobleaching* (FRET-AB) gewählt (siehe 2.2.3, 3.2.4.3), bei dem die FRET-Effizienz direkt, ohne aufwendige und mit Fehlerquellen behaftete Bestimmung von Korrekturfaktoren erfasst werden konnte. Um falsch-positive FRET-Signale zu reduzieren, ist eine Kalibrierung des Messsystems unumgänglich. Mögliche Ursachen für falsch-positive FRET-Signale können sein: Hintergrundrauschen, *crosstalk*, Dimerisierung von CFP und YFP, Photokonversion von YFP in *CFP-like* während des Bleichvorgangs und Verstärkung der CFP-Emission durch Veränderung der chemischen Zusammensetzung des Mediums beim Bleichprozess^{188,206-208}. Aus diesen Gründen wurde die FRET-Effizienz auch in einem Bereich der Zellen bestimmt, der nicht gebleicht wurde. Diese falsch-positive FRET-Effizienz wurde von der FRET-Effizienz im gebleichten Bereich der Zelle subtrahiert. Die Berechnungsprozedur wird aus Abb. 4-10 A ersichtlich. Insgesamt wurde die FRET-Effizienz in dem gebleichten Bereich (Abb. 4-10 A, weiße Quadrate) beziehungsweise dem nicht gebleichten Bereich (Abb. 4-10 A, gelbe Quadrate) je sechsmal bestimmt: Einmal über den gesamten Bleichbereich beziehungsweise über einen gleich großen Bereich außerhalb des Bleichbereichs und je fünfmal innerhalb dieser Bereiche die fünf höchsten FRET-Werte aus Bereichen definierter gleichbleibender Größe. Sowohl von den gebleichten als auch von den ungebleichten Bereichen wurde der Mittelwert gebildet und anschließend der Mittelwert des ungebleichten Bereichs von dem des gebleichten Bereichs subtrahiert.

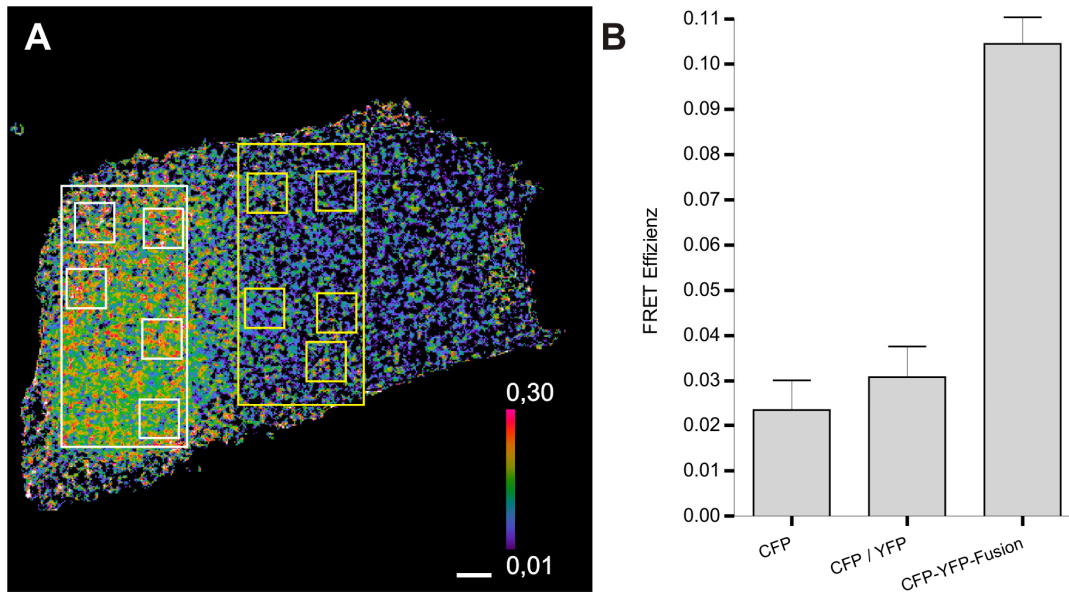


Abb. 4-10 Messtechnik beim Acceptor Photobleaching und Kalibrierung der FRET-Effizienz: (A) Messtechnik beim *Acceptor Photobleaching*: Darstellung der FRET-Effizienz ($E = 0,01$ bis $0,30$) in Fehlfarben bei Expression des CFP-YFP-Fusionskonstrukts in PLC-Zellen. Größenbalken: $1 \mu\text{m}$. Insgesamt wurde die FRET-Effizienz in dem gebleichten Bereich (weiße Quadrate) beziehungsweise dem nicht gebleichten Bereich (gelbe Quadrate) je sechsmal bestimmt: Einmal über den gesamten Bleichbereich beziehungsweise über einen gleich großen Bereich außerhalb des Bleichbereichs und je fünfmal innerhalb dieser Bereiche die fünf höchsten FRET-Werte aus Bereichen definierter gleichbleibender Größe. Sowohl von den gebleichten als auch von den ungebleichten Bereichen wurde der Mittelwert gebildet und anschließend der Mittelwert des ungebleichten Bereichs von dem des gebleichten Bereichs subtrahiert. Der Mindestabstand zwischen gebleichtem und ungebleichtem Bereich betrug dabei $3 \mu\text{m}$. (B) Für das CFP-YFP-Fusionskonstrukt ergab sich daraus eine FRET-Effizienz von $E = 10,45\%$ ($n=10$), für die getrennte Expression von CFP und YFP eine Effizienz von $E = 3,08\%$ ($n=9$) und für die alleinige Expression von CFP eine Effizienz von $E = 2,34\%$ ($n=7$). Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm SEM. Folgende P-Werte (ungepaarter t-Test) wurden im Vergleich zur CFP/YFP-Expression ermittelt: $0,4572$ für CFP und $P < 0,0001$ für CFP-YFP-Fusion ($P < 0,05$ signifikant).

Da der Laser auch den Randbereich außerhalb des Bleichbereichs mit ausbleicht (Abb. 4-11), musste für die Auswahl der nicht gebleichten Bereiche ein Abstand von $3 \mu\text{m}$ von dem gebleichten Bereich gewählt werden. Zur weiteren Kalibrierung des Messsystems wurde die FRET-Effizienz für ein CFP-YFP-Fusionskonstrukt (Positiv-Kontrolle) sowie für die getrennte Expression von CFP und YFP (Negativ-Kontrolle) bestimmt (Abb. 4-10 B). Für das Fusionskonstrukt ergab sich eine FRET-Effizienz von $E = 10,45\%$ und für die getrennte Expression eine FRET-Effizienz von $E = 3,08\%$. Die alleinige Expression von CFP führte zu einer niedrigeren FRET-Effizienz von $2,34\%$. Der höhere Wert bei getrennter CFP/YFP-Expression gegenüber der einfach CFP-Expression ist vermutlich auf den bereits erwähnten Dimerisierungs- oder Photokonversions-Prozess zurückzuführen. FRET-Effizienzen mit einem signifikant höheren Wert als $E = 3,08\%$ wurden im Folgenden als spezifische FRET-Signale interpretiert, die ein Indiz für eine Protein-Protein-Wechselwirkung sind.

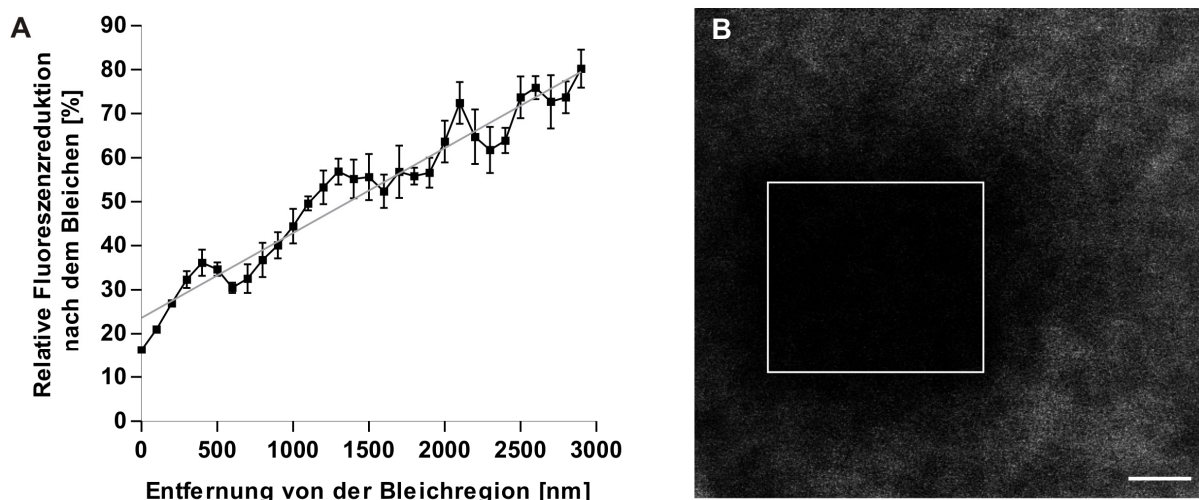


Abb. 4-11 Ungenauigkeit der Fluoreszenz-Ausbleichung am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop Leica SP5: Mit YFP transfizierte PLC-Zellen wurden in einem definierten Bereich (B, weißes Quadrat) vollständig gebleicht. Auch in den Randbereichen außerhalb des gebleichten Bereichs kommt es zu einer Erniedrigung der Fluoreszenzintensität (B). Ab einer Entfernung von 3 μm beträgt die Fluoreszenzintensität annähernd die Intensität vor dem Bleichen (A). Abbildung A stellt den Mittelwert dreier unabhängiger Messreihen ($n = 3 \pm \text{SEM}$) dar, aus denen eine einfache lineare Regression berechnet wurde. Größenbalken: 1 μm .

4.3.4 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer zwischen Synaptophysin und seinen Bindungspartnern

Wie zu erwarten, konnte mit dem *Acceptor Photobleaching* (FRET-AB) eine starke FRET-Effizienz zwischen SYP-CFP und SYP-YFP beobachtet werden, die mit der Effizienz des CFP-YFP-Fusionskonstrukts vergleichbar ist. Neben dem homodimeren SYP-Komplex konnte eine ebenso starke Interaktion zwischen SYP-YFP / SYB2-CFP und SYP-YFP / SYNGR3-CFP verifiziert werden (Abb. 4-12, Abb. 4-13). Im *Split-Ubiquitin Y2H-System* ermittelte SYP-Interaktionspartner wie SCAMP1, Arfaptin2, RND2, STMN3 und PLD4 konnten im Gegensatz zu den Koimmunpräzipitations-Analysen mit Ausnahme von PLD4 ebenfalls verifiziert werden. Sie zeigten eine schwächere Interaktion als die für SYP, SYB2 oder SYNGR3, jedoch war die Interaktion signifikant ($P < 0,05$) im Vergleich zu den Negativ-Kontrollen, der getrennten Expression von CFP und YFP und der Koexpression von SYP-YFP mit Connexin32-CFP (Abb. 4-13). Das FRET-AB-System ist somit ein deutlich sensitiveres System zur Studie von Protein-Protein-Wechselwirkung als die Koimmunpräzipitation, bei der Membranproteine solubilisiert werden müssen.

Da die Energietransfereffizienz E proportional zu dem Kehrwert des Abstands beider Moleküle zur sechsten Potenz ist und deshalb der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer nur über einen kurzen Bereich von ungefähr 1-10 nm effizient übertragen wird¹⁸⁴, ist die Position des YFP am Protein mit zu berücksichtigen. Aus diesem Grund wurde das YFP auch an den N-Terminus von Synaptophysin fusioniert (YFP-SYP) und erneut die FRET-Effizienz für alle Interaktionen bestimmt (Abb. 4-14).

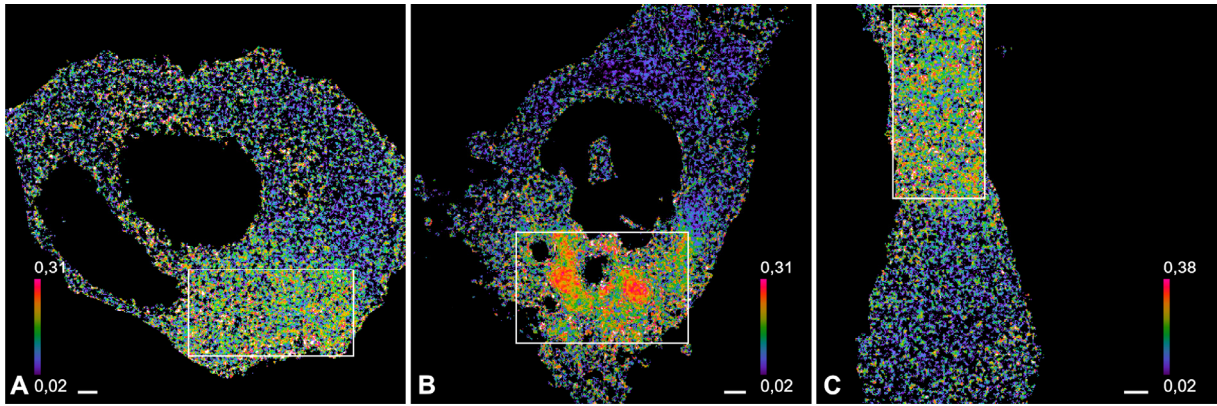


Abb. 4-12 Starke Interaktion von Synaptophysin mit Synaptophysin (Homodimer), Synaptobrevin2 und Synaptogyrin3 beim Acceptor Photobleaching (FRET-AB): Darstellung der FRET-Effizienz ($E = 0,02$ bis $0,31 / 0,38$) in Fehlfarben bei Koexpression von YFP-fusioniertem SYP und CFP-fusionierten Interaktionspartnern SYP (A), SYB2 (B) und SYNGR3 (C). Der weiß umrandete Bereich markiert die Position des jeweiligen Bleichareals. Größenbalken: $1 \mu\text{m}$.

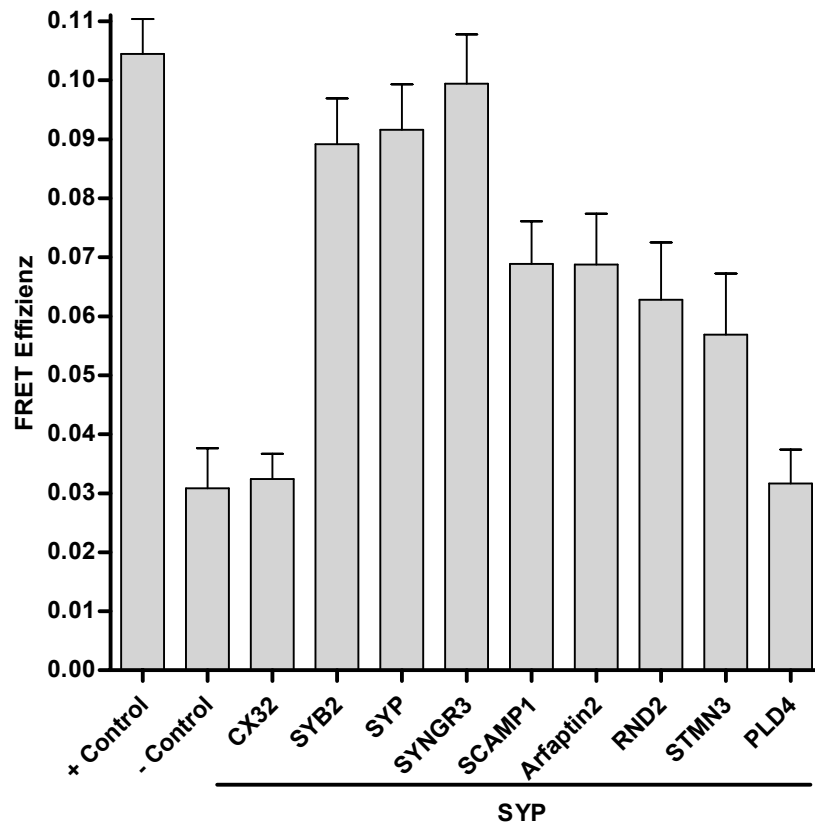


Abb. 4-13 FRET-Effizienzen von Synaptophysin mit seinen Bindungspartnern: Histogramm der FRET-Effizienz von SYP-YFP (YFP fusioniert am C-Terminus von SYP) mit CFP-fusionierten (über C-Terminus) Bindungspartnern. Als Positiv-Kontrolle (+ Control) wurden PLC-Zellen mit CFP-YFP-Fusionskonstrukt transfiziert und als Negativ-Kontrolle (- Control) mit getrenntem CFP und YFP kotransfiziert. Zusätzlich diente die Koexpression von SYP-CFP mit Connexin32-YFP als weitere Negativ-Kontrolle. Anzahl der erfassten FRET-Effizienzen: + Control $n=10$, - Control $n=9$, Cx32 $n=22$, SYB2 $n=16$, SYP $n=8$, SYNGR3 $n=16$, SCAMP1 $n=16$, Arfaptin2 $n=16$, RND2 $n=16$, STMN3 $n=16$, PLD4 $n=8$. Folgende P-Werte (t-Test, $P < 0,05$ signifikant) wurden im Vergleich zur - Control bestimmt: $0,8447$ für SYP-YFP/CX32-CFP, $<0,0001$ für +Control, SYP-YFP/SYB2-CFP, SYP-YFP/SYP-CFP, SYP-YFP/SYNGR3-CFP, $0,002$ für SYP-YFP/SCAMP1-CFP, $0,0064$ für SYP-YFP/Arfaptin2-CFP, $0,0318$ für SYP-YFP/Rnd2-CFP, $0,482$ für SYP-YFP/STMN3-CFP, und $0,9292$ für SYP-YFP/PLD4-CFP.

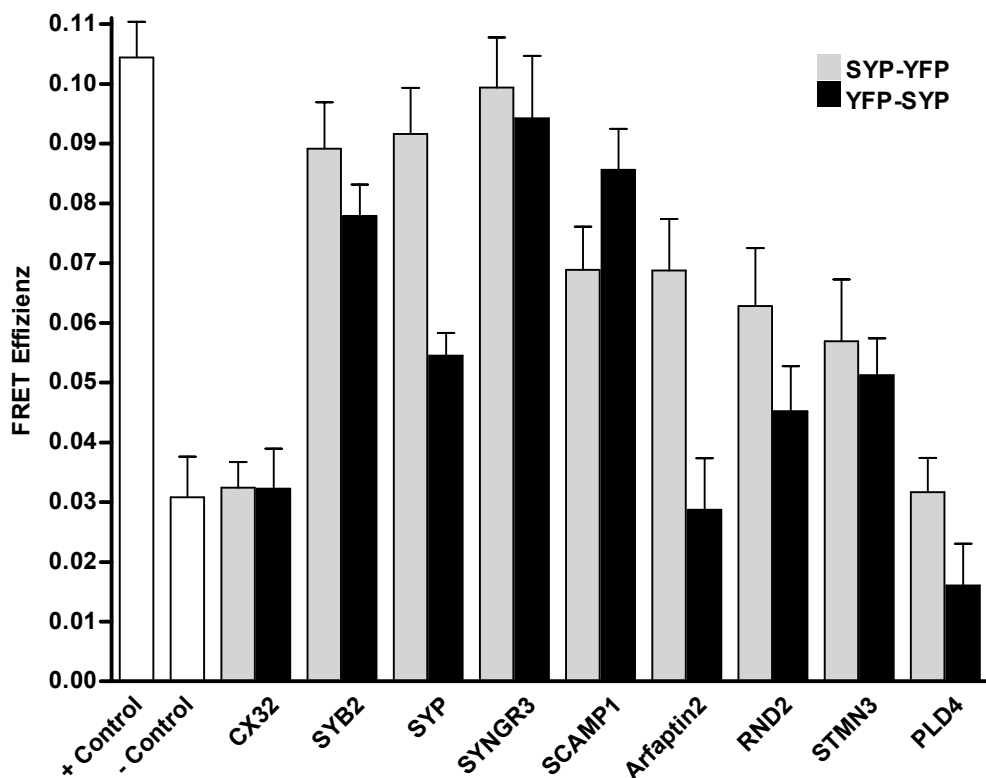


Abb. 4-14 Vergleich der FRET-Effizienzen von Synaptophysin mit seinen Bindungspartnern in Abhängigkeit von der Orientierung der YFP-Fusion an Synaptophysin: Histogramm der FRET-Effizienz von SYP-YFP (YFP fusioniert am C-Terminus von SYP) beziehungsweise YFP-SYP (YFP fusioniert am N-Terminus von SYP) mit CFP-fusionierten (über C-Terminus) Bindungspartnern. Als Positiv-Kontrolle (+Control) wurden PLC-Zellen mit CFP-YFP-Fusionskonstrukt transfiziert und als Negativ-Kontrolle (-Control) mit getrennten CFP und YFP kotransfiziert. Zusätzlich diente die Koexpression von SYP-YFP mit Connexin32-CFP als weitere Negativ-Kontrolle. Anzahl der erfassten FRET-Effizienzen (SYP-YFP/YFP-SYP): +Control n=10, -Control n=9, Cx32 n=22/8, SYB2 n=16/8, SYP n=8/8, SYNGR3 n=16/8, SCAMP1 n=16/8, Arfaptin2 n=16/8, RND2 n=16/8, STMN3 n=16/8, PLD4 n=8/8. Folgende P-Werte (t-Test, $P < 0,05$ signifikant) wurden im Vergleich zur -Control bestimmt (SYP-YFP / YFP-SYP): 0,8447 / 0,8829 für CX32-CFP, $< 0,0001$ für +Control, $< 0,0001$ / $< 0,0001$ für SYB2-CFP, $< 0,0001$ / 0,0104 für SYP-CFP, $< 0,0001$ / $< 0,0001$ für SYNGR3-CFP, 0,002 / $< 0,0001$ für SCAMP1-CFP, 0,0064 / 0,8489 für Arfaptin2-CFP, 0,0318 / 0,1747 für Rnd2-CFP, 0,482 / 0,431 für STMN3-CFP, und 0,9292 / 0,1514 für PLD4-CFP. P-Wert zwischen SYP-YFP/SYP-CFP und YFP-SYP/SYP-CFP: 0,0007; zwischen SYP-YFP/Arfaptin2-CFP und YFP-SYP/Arfaptin2-CFP: 0,0079; zwischen SYP-YFP/SCAMP1-CFP und YFP-SYP/SCAMP1-CFP: 0,1547.

Eine signifikante Reduzierung der FRET-Effizienz konnte für SYP und Arfaptin2 mit YFP-SYP detektiert werden, wohingegen die Interaktion von SCAMP1 mit YFP-SYP stärker wurde. Sie war in ihrer Stärke mit der Interaktion von SYP und SYB2 vergleichbar (Abb. 4-14). Sowohl die Interaktion von Arfaptin2 als auch die von RND2 und PLD4 mit YFP-SYP war im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (- Control) nicht signifikant.

Um die Interaktionen genauer zu charakterisieren, wurden auch FRET-Effizienzen von Synaptophysin mit deletiertem zytoplasmatischem C-Terminus (SYP- Δ C-YFP) bestimmt. Dieser zytoplasmatische Bereich von SYP wird vermutlich stark phosphoryliert und ist für die Interaktion mit AP1 und Dynamin essentiell^{109,137,144-146}. Die Interaktionen der integralen Membranproteine SYP, SYB2, SYNGR3 und SCAMP1 mit SYP- Δ C-YFP blieben bestehen. Im Fall von SYNGR3 konnte eine

signifikante Reduktion der FRET-Effizienz detektiert werden, wohingegen die Interaktion von SCAMP1 mit SYP- Δ C-YFP wie bereits bei YFP-SYP stärker wurde (Abb. 4-15).

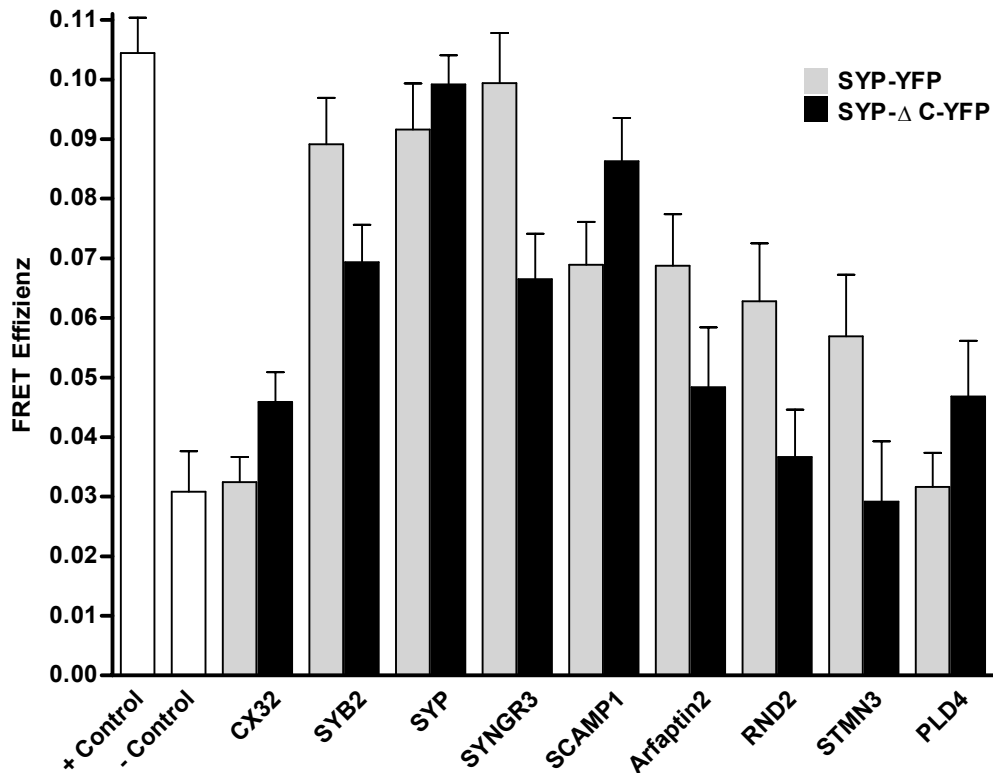


Abb. 4-15 Vergleich der FRET-Effizienzen von Synaptophysin und der C-terminalen Synaptophysin-Deletions-Mutante mit ihren Bindungspartnern. Histogramm der FRET-Effizienz von SYP-YFP (YFP fusioniert am C-Terminus von SYP) beziehungsweise der C-terminalen Synaptophysin-Deletions-Mutante SYP- Δ C-YFP (YFP fusioniert am gekürzten C-Terminus von SYP) mit CFP-fusionierten (über C-Terminus) Bindungspartnern. Als Positiv-Kontrolle (+ *Control*) wurden PLC-Zellen mit CFP-YFP-Fusionskonstrukt transfiziert und als Negativ-Kontrolle (- *Control*) mit getrenntem CFP und YFP kotransfiziert. Zusätzlich diente die Koexpression von SYP-YFP mit Connexin32-CFP als weitere Negativ-Kontrolle. Anzahl der erfassten FRET-Effizienzen (SYP-YFP/SYP- Δ C-YFP): + *Control* n=10, - *Control* n=9, CX32 n=22/8, SYB2 n=16/8, SYP n=8/8, SYNGR3 n=16/8, SCAMP1 n=16/8, Arfaptin2 n=16/8, RND2 n=16/7, STMN3 n=16/8, PLD4 n=8/8. Folgende P-Werte (t-Test, P <0,05 signifikant) wurden im Vergleich zur - *Control* bestimmt (SYP-YFP / SYP- Δ C-YFP): 0,8447 / 0,0848 für CX32-CFP, <0,0001 für + *Control*, <0,0001 / 0,0009 für SYB2-CFP, <0,0001 / <0,0001 für SYP-CFP, <0,0001 / 0,0032 für SYNGR3-CFP, 0,002 / <0,0001 für SCAMP1-CFP, 0,0064 / 0,1619 für Arfaptin2-CFP, 0,0318 / 0,5857 für Rnd2-CFP, 0,482 / 0,8904 für STMN3-CFP, und 0,9292 / 0,1810 für PLD4-CFP. P-Wert zwischen SYP-YFP/SYNGR3-CFP und SYP- Δ C-YFP/SYNGR3-CFP: 0,0198.

Für zytoplasmatische und Membran-assoziierte Proteine wie Arfaptin2, RND2, STMN3 und PLD4 konnte kein signifikantes FRET-Signal mit der SYP-Mutante detektiert werden (Abb. 4-17). Vermutlich ist der zytoplasmatische C-Terminus von Synaptophysin für diese Interaktion notwendig oder ermöglicht erst einen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer durch einen geringeren Abstand zwischen YFP und CFP.

4.4 *In vivo*-Nachweis der Tyrosin-Phosphorylierung von Synaptophysin und Synaptogyrin3

Wie in Kapitel 2.1.2.6 beschrieben, könnte die *in vivo* bislang noch nicht genau untersuchte Tyrosin-Phosphorylierung von Synaptophysin eine zentrale Funktion von SYP darstellen. Neben SYP werden auch Synaptogyrin1 (SYNGR1) und Synaptogyrin2 (SYNGR2) an ihren zytoplasmatischen C-Terminus durch Src-Kinasen Tyrosin-phosphoryliert^{136,209}. SYNGR3 soll im Gegensatz zu SYP, SYNGR1 und SYNGR2 nicht phosphoryliert werden, jedoch wurde dies bisher nicht gezeigt¹⁹⁷. Die Src-Kinase besteht neben der katalytischen Kinase-Domäne aus zwei Peptid-Bindedomänen, der SH2-Domäne, die an phosphorylierte Tyrosine bindet, und der SH3-Domäne, die Polyprolin-Helices (PXXP-Motiv) erkennt²¹⁰⁻²¹³. Quantitativ besitzen SYNGR1 und SYNGR2 mit je 7 Tyrosin-Resten im zytoplasmatischen C-Terminus zwei Tyrosin-Reste mehr als SYNGR3. Jedoch verfügen nur SYNGR1 und SYNGR3 über ein PXXP-Motiv, das für die Erkennung der SH3-Domäne benötigt wird (Abb. 4-16). Auch SYP verfügt über ein PXXP-Motiv sowie über 9 Tyrosin-Reste im zytoplasmatischen C-Terminus (Abb. 4-16).

```

SYNGR1 168 AFORIQIGADSAIFSQDYMDP SQDSSMEVAPVEPSAGSDPAGMGGTVOHP--ANAFDAEPQYQSQGM-
SYNGR3 167 ALORFRLGTDMSLFATDQLGTGAAQAIVGVFVVGSGVEGTE-----TYQSPPFTEITLDTSSKGMQVPAV-
SYNGR2 166 AYORIKAGVDA--FIQNYVDP-----TDPNTAIVASVPSASVENIQQPPFTQNVETT-EGYQPPPVV
SYP      217 VEKETGWAAPFMRAPFGAPFEKQPAPGDAIGDAGVGGQGGVGPQDSVGPQGGVQPDVGGQPASGGGGVGPQGVGGQGGVGGQGGAPTSFSNQM

```

Abb. 4-16 Aminosäuresequenz des zytoplasmatischen C-Terminus von SYNGR1-3 und SYP: Die letzten zwei Aminosäuren der Transmembrandomäne sind unterstrichen. Im Alignment von SYNGR1, SYNGR2 und SYNGR3 sind konservierte Bereiche blau gekennzeichnet. Tyrosine sind rot und das PXXP-Motiv, das für die Erkennung der SH3-Domäne benötigt wird, ist durch eine Einrahmung gekennzeichnet.

Folglich könnte SYNGR3 doch von Src-Kinasen phosphoryliert werden. Um dies zu überprüfen und die Tyrosin-Phosphorylierung von SYP genauer zu charakterisieren, wurden FRET-Effizienzen zwischen der SH2-Domäne von pp60^{src} (SH2-YFP) und SYP (SYP-CFP) beziehungsweise SYNGR3 (SYNGR3-CFP) in PLC-Zellen bestimmt. Neben der SH2-Domäne wurde auch die FRET-Effizienz von einem SH2-Dimer-Fusionskonstrukt (dSH2; SH2-SH2-YFP) bestimmt, das eine stärkere Spezifität zu phosphoryliertem Tyrosin hat und mit dem bereits Phosphorylierungsstudien an fokalen Kontakten durchgeführt wurden^{201,202,214}. Als Kontrolle fungierten neben dem CFP-YFP-Fusionskonstrukt (+ *Control*) und der getrennten Expression von CFP und YFP (- *Control*) auch eine SH2-Mutante (SH2 R183A-YFP), die eine 200fach niedrigere Affinität zu phosphoryliertem Tyrosin besitzt²¹⁵. Ferner diente SYP mit deletiertem zytoplasmatischem C-Terminus als weitere Negativ-Kontrolle. Sowohl für SH2-YFP als auch für dSH2-YFP konnten starke FRET-Effizienzen mit SYP-CFP detektiert werden (Abb. 4-17).

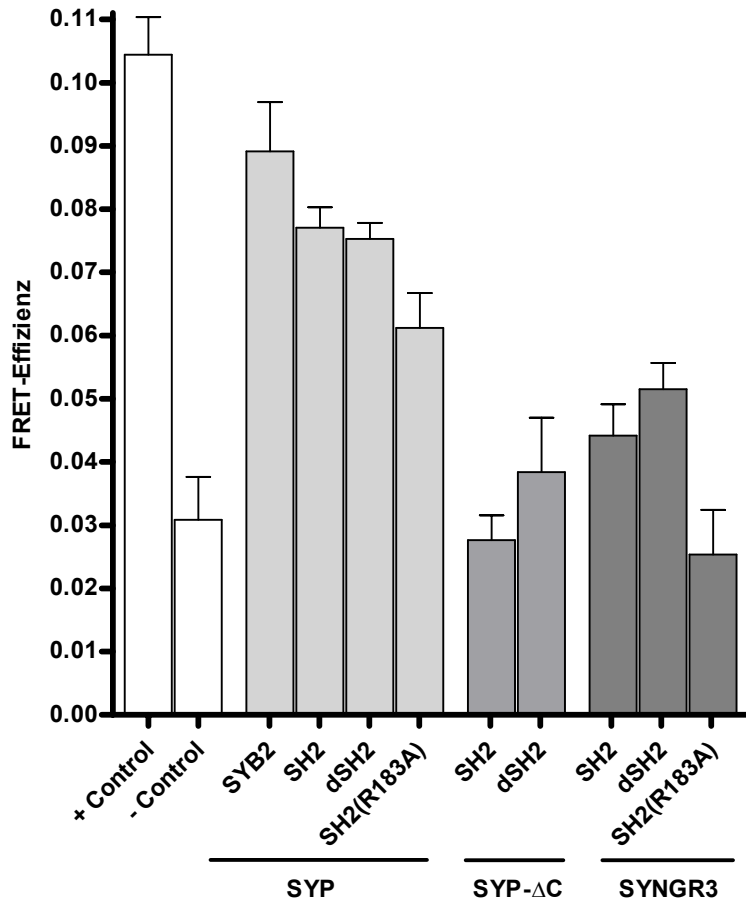


Abb. 4-17 *In vivo*-Tyrosin-Phosphorylierung von SYP und SYNGR3: Histogramm der FRET-Effizienz von SYP-CFP (CFP fusioniert am C-Terminus von SYP), der C-terminalen Synaptophysin-Deletions-Mutante SYP-ΔC-CFP (CFP fusioniert am gekürzten C-Terminus von SYP) und SYNGR3-CFP (CFP fusioniert am C-Terminus von SYNGR3) bei Koexpression in PLC-Zellen mit SH2-YFP, dSH2-YFP und der SH2-Mutante SH2(R183A), die eine 200fach niedrigere Affinität zu phosphoryliertem Tyrosin hat als SH2. Als Positiv-Kontrolle (+ *Control*) wurden PLC-Zellen mit CFP-YFP-Fusionskonstrukt transfiziert und als Negativ-Kontrolle (- *Control*) mit getrenntem CFP und YFP kotransfiziert. Zusätzlich diente die Koexpression von SYP-YFP mit SYB2-CFP als Kontrolle zur Einschätzung der Interaktionsstärke. Anzahl der erfassten FRET-Effizienzen: +*Control* n=10, - *Control* n=9, SYP/SYB2 n=16, SYP/SH2 n=10, SYP/dSH2 n=11, SYP/SH2(R183A) n=10, SYP-ΔC/SH2 n=10, SYP-ΔC/dSH2 n=10, SYNGR3/SH2 n=10, SYNGR3/dSH2 n=10, SYNGR3/SH2(R183A) n=10. Folgende P-Werte (t-Test, $P < 0,05$ signifikant) wurden im Vergleich zur - *Control* bestimmt: $< 0,0001$ für SYP/SYB2, SYP/SH2 und SYP/dSH2; 0,0027 für SYP/SH2(R183A), 0,6831 für SYP-ΔC/SH2, 0,5061 für SYP-ΔC/dSH2, 0,1276 für SYNGR3/SH2, 0,0167 für SYNGR3/dSH2 und 0,5854 für SYNGR3/SH2(R183A). P-Wert zwischen SYP/SH2 und SYP/SH2(R183A): 0,0228, zwischen SYP/dSH2 und SYP/SH2(R183A): 0,0272, zwischen SYNGR3/SH2 und SYNGR3/SH2(R183A): 0,0428, zwischen SYNGR3/dSH2 und SYNGR3/SH2(R183A): 0,0050 und zwischen SYP/SH2 und SYP-ΔC/SH2 $< 0,0001$.

Die SH2-Mutante SH2 R183A-YFP führte zu einer signifikanten Reduzierung der FRET-Effizienz mit SYP-CFP in Bezug zu SH2-YFP oder dSH2-YFP mit SYP-CFP. Der noch vorhandene Energie-Transfer zwischen SYP und der SH2-Mutante ist vermutlich auf die multiplen Phosphorylierungsstellen im SYP-C-Terminus zurückzuführen. Die Deletion des zytoplasmatischen C-Terminus von SYP führte zu keinem signifikanten FRET bei SH2 und dSH2 (Abb. 4-17). Demgemäß erfolgt *in vivo* die Tyrosin-Phosphorylierung am zytoplasmatischen C-Terminus von SYP. SYNGR3 zeigte einen signifikanten FRET bei Koexpression mit dSH2-YFP, und die SH2-Mutante

SH2 R183A-YFP führte zu einer signifikanten Reduzierung der FRET-Effizienz bei SH2 und dSH2 (Abb. 4-17). Somit konnte auch für SYNGR3 erstmals eine schwache *in vivo*-Tyrosin-Phosphorylierung detektiert werden.

5 Diskussion

5.1 Wechselwirkungen von Synaptophysin sind abhängig von seiner Membranintegration

Bisherige Interaktions-*screens* von Synaptophysin wurden bis zu diesem Zeitpunkt ausschließlich mit einem konventionellen *Yeast Two-Hybrid System* mit dem zytoplasmatischen C-Terminus von Synaptophysin durchgeführt^{146,150}. Etwa ein Drittel aller menschlichen Proteine sind Membranproteine und können mit dem konventionellen Y2H System, bei dem die Interaktion im Zellkern stattfinden muss, nicht erfasst werden. Durch die Verwendung des *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Systems*^{168,169} konnte erstmals ein Interaktions-*screen* von Membran-integriertem Synaptophysin für die Identifizierung neuer zytoplasmatischer, Membran-assoziiertes und Membran-integrierter Proteine durchgeführt werden. In diesem System konnten erstmalig heterophile Interaktionen zwischen den verschiedenen Genfamilien der *tetraspan vesicle membrane proteins* identifiziert werden. Ferner wurden weitere neue Protein-Protein-Wechselwirkungen sowie der bekannte Synaptophysin-Interaktionspartner Synaptobrevin2 detektiert (Tab. 4-3). Diese Interaktionen konnten für eine Auswahl an Proteinen mit dem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer, der ebenfalls direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen in einem Membran-assoziierten oder -integrierten Zustand erlaubt, zu 90% verifiziert werden (Abb. 4-13). Diese hohe Verifizierungsquote ist ein Indiz für die stringenten Selektionsbedingungen im *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid System*. Im Gegensatz dazu wurden nur wenige Interaktionen (20 % der untersuchten Proteine) mit der Koimmunpräzipitation bestätigt, bei der Membranproteine durch Detergenzien und Salze in Lösung gebracht werden. Somit sind vermutlich zahlreiche Protein-Protein-Wechselwirkungen des *tetraspan vesicle membrane proteins* Synaptophysin mit seiner Integration in die Membran gekoppelt. Detaillierte FRET-Interaktionsanalysen von Synaptophysin mit C-terminal und N-terminal gekoppeltem YFP sowie mit deletiertem zytoplasmatischem C-Terminus zeigten ferner, dass der zytoplasmatische C-Terminus von Synaptophysin für die Synaptophysin Protein-Protein-Wechselwirkung mit den Membranproteinen Synaptobrevin2, Synaptophysin (Homodimer), Synaptogyrin3 und SCAMP1 nicht essentiell ist. Jedoch ist er bei der Detektion von Interaktionen mit zytoplasmatischen und Membran-assoziierten Proteinen wie Arfaptin2, Rho GTPase2 and Stathmin-like3 im FRET involviert (Abb. 4-14, Abb. 4-15). Die Identifizierung von vSNARE Synaptobrevin2 als einen der stärksten Synaptophysin-Interaktionspartner im *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid System*, in der Koimmunpräzipitation und im Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer belegt die methodische Qualität. Zudem konnten die Ergebnisse der Koimmunpräzipitationsexperimente von Bonanomi *et al.* 2007 zeigen, dass die aminoterminal Transmembrandomäne von Synaptophysin für den Synaptophysin/Synaptobrevin-Komplex erforderlich ist¹¹⁶, mit FRET bestätigt werden.

5.2 Synaptophysin als Katalysator in einer Lipid-Plattform?

Im Verlauf dieser Arbeit wurde gezeigt, dass zahlreiche Protein-Protein-Wechselwirkungen des *tetraspan vesicle membrane proteins* Synaptophysin mit dessen Integration in die Membran gekoppelt sind. Diese Membranintegration ermöglicht es, einerseits Interaktionsstudien von Synaptophysin in seiner nativen Tertiärstruktur durchzuführen und andererseits die Membran als möglichen Regulator in Protein-Protein-Wechselwirkungen mit einzubeziehen. Synaptophysin ist das hauptcholesterolbindende Protein von synaptischen Vesikeln und vermutlich für die Rekrutierung von Cholesterin zur synaptischen Vesikelmembran und für die Formierung von Protein-Lipid-Domänen verantwortlich¹³². Die Hefe-Membran unterscheidet sich von der Membran der Säugetiere, da sie kein Cholesterin enthält. Somit könnte die Argumentation, dass Membran-Elemente in der Regulation der Protein-Protein-Wechselwirkung von Synaptophysin involviert sind, und die *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid*-Methode an sich in Frage gestellt werden. Jedoch zeigt die chemische Struktur des Hefeverwandten Cholesterins, des Ergosterins²¹⁶, eine hohe Übereinstimmung zum Cholesterin der Säugetiere (Abb. 5-1).

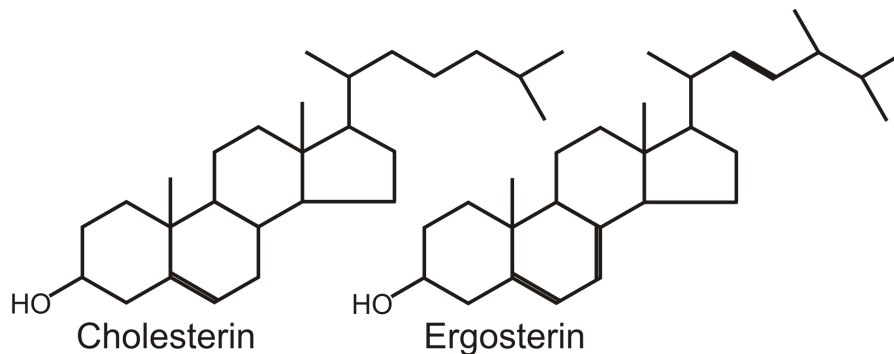


Abb. 5-1 Chemische Struktur von Cholesterin (Säugetier) und Ergosterin (Hefe)

Des Weiteren finden sich zahlreiche orthologe Gene in der Hefe, die an der Cholesterin-Biosynthese involviert sind^{217,218}. Ferner ist bekannt, dass der Synaptophysin/Synaptobrevin-Komplex von einem hohen Cholesterin-Gehalt in der Membran abhängig ist. Eine Erniedrigung des Cholesterins in der Membran führt zu einer Reduzierung des Komplexes¹¹⁷. Da Synaptobrevin2 einer der stärksten identifizierten Interaktionspartner von Synaptophysin im *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid System* war, wird Ergosterin vermutlich mit einer ähnlich starken Affinität wie Cholesterin von Synaptophysin gebunden, weshalb die strukturellen Unterschiede der Membran von Säugetieren und Hefen für Interaktionsstudien von Synaptophysin nur von untergeordneter Bedeutung sind.

Die Membran der synaptischen Vesikel enthält mit einem molaren Verhältnis von 0,58 eine überdurchschnittlich hohe Dichte an Cholesterin, das in Form von Clustern zusammen mit Sphingolipiden auf der Membran angereichert ist^{7,126,219}. Beobachtungen in PC12-Zellen und primären Neuronen zeigen, dass Cholesterin für die Protein-Clusterbildung und für die Endozytose essentiell

ist^{132,220-222}. Protein-Lipid-Cluster sind vermutlich für die Funktion des SNARE-Komplexes notwendig¹²⁷⁻¹³⁰. Des Weiteren ist Cholesterin für die Vesikel-Biogenese und starke Krümmung der Vesikelmembran erforderlich^{131,223,224}. Als hauptcholesterin-bindendes Protein von synaptischen Vesikeln könnte Synaptophysin dabei eine wesentliche Rolle spielen²²³. Einer der im *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid System* identifizierten Synaptophysin-Bindungspartner war das ubiquitär exprimierte Phospholipid Transfer Protein (PLTP, Tab. 4-3), das eine wichtige Funktion im Plasma-Lipoprotein-Metabolismus hat. Es transferiert Phospholipide, Cholesterin, Diacylglycerine und Apolipoproteine zwischen verschiedenen Klassen von Lipoproteinen und verfügt dabei über eine eigene proteolytische Funktion²²⁵⁻²²⁸. Ferner modifiziert es Lipoproteine mit hoher Dichte (*high density lipoproteins*, HDL) und erfüllt eine wichtige Funktion im Cholesterin- und Phospholipid-Efflux von peripheren Zellen²²⁹⁻²³². Das Phospholipid Transfer Protein ist in vielen Bereichen des zentralen Nervensystems lokalisiert und wird in Gliazellen und Neuronen synthetisiert²³³⁻²³⁶. Die Aktivität des Phospholipid Transfer Proteins ist bei Alzheimer Demenz und anderen neurologischen Krankheiten stark reduziert und induziert ferner die ApoE-Sekretion *in vitro*²³⁶. In den Synapsenreichen Schichten der äußeren und inneren plexiformen Schicht (IPL, OPL) der Retina konnte eine Kollokalisierung von Phospholipid Transfer Protein mit Synaptophysin detektiert werden (siehe Abb. 4-6). Ferner ist das Phospholipid Transfer Protein in der Lage, d-HDL (diskoidales *high density lipoprotein*) in vesikuläre Strukturen zu transformieren und Cholesterin von Vesikeln auf HDL *in vitro* zu übertragen^{225,237}.

Synaptophysin könnte seinerseits die Membranumgebung durch die Interaktion mit Phospholipase D4 (PLD4), einem im *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid System* identifizierten starken Bindungspartner, beeinflussen (Tab. 4-3). Diese Interaktion konnte in der Koimmunpräzipitation und im FRET nicht verifiziert werden, jedoch könnte dies durch die Solubilisierung von Synaptophysin und eine sterische Behinderung von CFP an Phospholipase D4 verursacht sein. Phospholipase D hat eine zentrale Funktion im synaptischen Vesikelzyklus²³⁸⁻²⁴². Es hydrolysiert das Membranphospholipid Phosphatidylcholin (PC) zu Cholin und Phosphatidsäure (PA). Neben dem essentiellen Kofaktor PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) aktivieren Arf-Proteine (ADP-Ribosylierungs-Faktor, ARF1, ARF5 und ARF6)²⁴³, Rho GTPasen (RhoA, Rac und Cdc42) und die Protein Kinase C synergistisch die Phospholipase D1²⁴⁴. Ein weiterer Regulationsmechanismus der Phospholipase D ist die indirekte Inaktivierung von ARF (ARF1, ARF3, ARF5, ARF6) durch Arfaptin, einem im *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid System* identifizierten und im FRET verifizierten Interaktionspartner von Synaptophysin (Tab. 4-3, Abb. 4-13)²⁴⁵. Arfaptin2 kolokalisiert zudem in den Synapsenreichen Schichten der äußeren und inneren plexiformen Schicht der Retina mit Synaptophysin (siehe Abb. 4-6). Im Gegensatz zu Arfaptin1 bindet der Synaptophysin-Interaktionspartner Arfaptin2 neben der GTP abhängigen Interaktion mit ARF auch an Rac1 in seiner GDP-Form^{246,247}. Somit könnte Arfaptin2 über zwei unterschiedliche Wege die Aktivität der Phospholipase D regulieren. Ein weiterer im *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid System* identifizierter und im FRET verifizierter Interaktionspartner von

Synaptophysin ist die Rho GTPase 2 (Rnd2) (Tab. 4-3, Abb. 4-13), die wie die Rho GTPasen RhoA, Rac und Cdc42 die Aktivität der Phospholipase beeinflussen könnte^{241,242,248}. Auch bei diesem Synaptophysin-Interaktionspartner konnte eine Kolokalisierung in den Synapsen-reichen Schichten der äußeren und inneren plexiformen Schicht der Retina mit Synaptophysin festgestellt werden (siehe Abb. 4-6).

Über den Synaptophysin-Bindungspartner Phospholipase D4 ist bislang wenig bekannt. Eigene Sequenzuntersuchungen zeigten, dass Phospholipase D4 wie Phospholipase D1 ein katalytisches HxKxxxxD-Motiv besitzt und im Gegensatz zur Phospholipase D3, die vermutlich membranintegriert sein könnte^{249,250}, keinen so starken hydrophilen α -Helix Bereich aufweist (Kyte/Doolittle-Hydropathieanalyse und Chou-Fasman-Analyse, DNA-STAR). Das bei der Hydrolyse von Phosphatidylcholin (PC) zu Phosphatidsäure (PA) durch Phospholipase D freiwerdende Cholin kann für die Acetylcholin-Synthese in Synaptosomen verwendet werden²⁵¹. Der gebildete Botenstoff Phosphatidsäure (PA) steuert zahlreiche Prozesse. Er aktiviert wie ARF die PIP-5-Kinase, die PIP (Phosphatidylinositol-4-phosphat) zu dem wichtigen Botenstoff PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) phosphoryliert^{241,252,253}, der wie bereits erwähnt ein essentieller Kofaktor für Phospholipase D ist. Die Konversion von PI (Phosphatidylinositol) über PIP zu PIP₂ ist für die Prozesse der Endo- und Exozytose notwendig²⁵⁴. Phosphoinositide, wie PIP₂, spielen bei der Verankerung zahlreicher Proteine mit der Membran eine Rolle²²⁴. Vermutlich dienen PIP₂ und Synaptophysin als Membrananker für Phospholipase D4, die dadurch in räumliche Nähe zu ihrem Substrat gebracht wird. Somit begünstigt Synaptophysin als Katalysator in einer Lipid-Plattform die Reaktion von Phospholipase D4 und reguliert ferner deren Feinabstimmung (*fine-tuning*) durch die Assoziation mit Regulatoren wie Arfaptin2 und Rho GTPase2.

Zudem können aus Phosphatidsäure (PA) die beiden Botenstoffe DAG (Diacylglycerol) und LPA (Lysophosphatidsäure) gebildet werden, die wiederum zahlreiche Prozesse im Lipid-Metabolismus steuern²⁴². Auch im synaptischen Vesikelzyklus erfüllt Phosphatidsäure (PA) im Zusammenspiel mit PIP₂ eine zentrale Aufgabe^{224,255}. Bedingt durch die kleinere Kopfgruppe von Phosphatidsäure (PA) im Vergleich zu Phosphatidylcholin (PC), an das im Kopfbereich Cholin noch kovalent gebunden ist, führt die Hydrolyse von PC zu PA zu einer Erniedrigung der Aktivierungsenergie für die negative Krümmung des Vesikels in der Exozytose^{224,256}. Ferner begünstigen die von PA regulierten Lipide PIP₂ und DAG mit ihren kompakten Kopfgruppen ebenfalls die Exozytose durch die negative Krümmung des Vesikels im Fusionsprozess. Im Gegensatz dazu führen Lipide wie das von PA regulierte LPA, Glykolipide und Glycosphingolipide zu einer positiven Krümmung des Vesikels²²⁴.

Die Erhöhung der Kalziumionen-Konzentration während der Exozytose führt zu einer Aktivierung der Phospholipase D über die Assoziation mit Calmodulin Kinase2, Rho Proteine und PIP₂^{257,258}. Die sich daran anschließende Bildung von PA und indirekt die von PIP₂ durch die Aktivierung von Phospholipase D führt zu einer Reduzierung der Aktivierungsenergie für die Exozytose. Ferner regulieren PA und PIP₂ Proteine wie Synaptotagmin, Synaptobrevin, Dynamin, Phospholipase A, C

und D, Synaptojanin, und Adapterproteine AP2 und AP180, die für die Exo- und Endozytose benötigt werden²²⁴. Phospholipase D ist in der Lage, neben Synaptophysin mit weiteren synaptischen Proteinen, wie dem Adapterprotein3 und dem Synaptojanin, das vermutlich den Kofaktor PIP_2 hydrolysiert und damit die Phospholipase D inaktiviert, zu interagieren^{259,260}.

Der Synaptophysin-Interaktionspartner Arfaptin2 reguliert außer der Phospholipase D vermutlich auch, ähnlich wie Amphiphysin, die synaptische Endozytose. Wie Amphiphysin gehört Arfaptin2 zur BAR-Domänen-Familie, deren Mitglieder in der Lage sind, in Form von gekrümmten Homodimeren Membranbiegungen in synaptischen Vesikeln zu detektieren und zu induzieren^{96,261,262}. Amphiphysin erkennt die durch die Clathrin-Anlagerung bedingte zunehmende Membraninvagination, worauf es die Dynamin GTPase rekrutiert, die für die Abschnürung des Vesikels essentiell ist^{96,97}. Eine ähnliche Aufgabe könnte auch für Arfaptin2 im Zusammenspiel mit Synaptophysin zutreffen. Synaptophysin könnte das Bindeglied zwischen den beiden regulativen Funktionen von Arfaptin2 sein, indem der für die Interaktion notwendige zytoplasmatische C-Terminus von Synaptophysin als Membrananker dient und die Interaktion von Arfaptin2 mit den negativ geladenen Lipid Kopfgruppen, die als Marker für die Vesikelkrümmung dienen²⁶¹, in der Rolle eines Katalysators begünstigt. Ist die Krümmung des Vesikels für Arfaptin2 ausreichend, könnte Synaptophysin die Hemmung von Phospholipase D durch die Inaktivierung von Rac- und ARF-GTPasen durch Arfaptin2 vermitteln. Das Modell aus Abb. 5-2 verdeutlicht die mögliche Rolle von Synaptophysin als Katalysator in einer Lipid-Plattform mit den Synaptophysin-Bindungspartnern Phospholipase D4, Rho GTPase2 (RND2) und Arfaptin2.

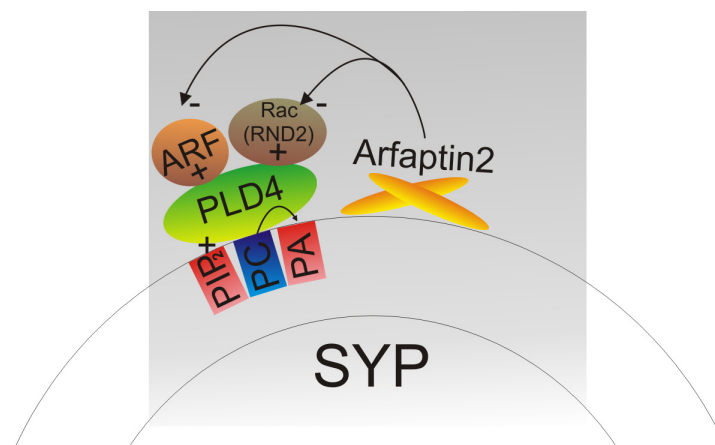


Abb. 5-2 Synaptophysin als Katalysator in einer Lipid-Plattform. Modell einer möglichen Regulation der Exozytose durch Synaptophysin und die Interaktionspartner Phospholipase D4 (PLD4), Arfaptin2 und Rho GTPase2 (RND2). Der zytoplasmatische C-Terminus von Synaptophysin interagiert als Membrananker mit PLD4, Arfaptin2 und RND2, die dadurch in räumliche Nähe zu ihren Substraten oder Proteinen gebracht werden. Das Homodimer Arfaptin2 detektiert Veränderungen in der Membran und hemmt ferner die Aktivität der Phospholipase D durch Inhibierung der Aktivatoren ARF und Rho GTPasen wie Rac1 und möglicherweise auch RND2. Phospholipase D benötigt den Kofaktor Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) für die Hydrolyse von Phosphatidylcholin (PC) zu Phosphatidsäure (PA) und Cholin. Die Bildung von PIP_2 wird über ARF und PA aktiviert. Sowohl PA als auch PIP_2 (rot) begünstigen die negative Krümmung des Vesikels im Fusionsprozess, wohingegen PC (blau) zu einer positiven Krümmung des Vesikels führt. Somit begünstigt Synaptophysin als Katalysator in einer Lipid-Plattform die Reaktion von Phospholipase D4 in der Exozytose und reguliert ferner deren Feinabstimmung (*fine-tuning*) durch die Assoziation mit Regulatoren wie Arfaptin2 und Rho GTPase2.

Das Modell, in dem Synaptophysin als Katalysator in einer Lipid-Plattform fungiert und dort die Reaktion von Phospholipase D4 in der Exozytose begünstigt, ferner deren Feinabstimmung (*fine-tuning*) durch die Assoziation mit Regulatoren wie Arfaptin2 und Rho GTPase2 erleichtert, wird durch die Ergebnisse von SCAMP2, das wie Synaptophysin zu den *tetraspan vesicle membrane proteins* (TVPs) gehört, unterstützt. SCAMP2 interagiert dabei sowohl mit Phospholipase D1 als auch mit seinem Aktivator Arf6 und begünstigt so, ähnlich wie Synaptophysin, vermutlich die Exozytose²⁶³. Ferner assoziiert PIP₂ mit SCAMP2, wodurch wahrscheinlich die Fusionsporen-Bildung während der Exozytose reguliert wird²⁶⁴.

5.3 Synaptophysin und das Zytoskelett, eine regulative Funktion im synaptischen Vesikelzyklus?

Der synaptische Vesikelzyklus wird durch Aktinfilamente reguliert. Diverse Modelle zeigen, wie Mikrofilamente diesen Zyklus steuern könnten. Über die Assoziation mit Synapsin könnten Aktinfilamente den Transport der synaptischen Vesikel zur aktiven Zone regeln²⁶⁵. Synapsin enthält sowohl Protein- als auch Lipid-Bindedomänen, die an Phospholipide des synaptischen Vesikels, an Phosphatidylinositol 3-Kinase und an Aktin binden. Kalziumionen-abhängige Phosphorylierung von Synapsin führt zur Dissoziation des Vesikels und ermöglicht den Transport zur aktiven Zone²⁶⁵⁻²⁶⁷. Zudem ist es möglich, dass Aktinfilamente den synaptischen Vesikel-Reservepool aufrecht erhalten, indem sie eine Barrierefunktion ausüben, die die unkontrollierte Exozytose verhindert²⁶⁸. Ferner könnte Aktin die Clathrin-Assemblierung regulieren^{269,270} oder als Gerüst für die Anlagerung von zahlreichen Proteinen im Vesikelzyklus dienen^{271,272}. Die Regulation der Aktinfilamente ist für alle Modelle von grundlegender Bedeutung.

Der im *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid System* identifizierte Synaptophysin-Bindungspartner Profilin1 (Tab. 4-3) stimuliert die Aktin-Polymerisation²⁷³. Die Dissoziation des Profilin/Aktinmonomer-Komplexes wird durch die Bindung von PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) an Profilin ausgelöst^{274,275}. Synaptophysin könnte diese Bindung von PIP₂ begünstigen, indem der Glycin- und Prolin-reiche C-Terminus als Membrananker für Profilin fungiert. Profilin verfügt im Allgemeinen über eine hohe Affinität zu Poly-L-Prolin und bindet an mehr als 30 Prolin-reiche Proteine wie VASP, MENA, Dynamin, Gephyrin, Aczonin, Diaphanous und Delphilin^{273,276-282}. Es wird mitunter in der Prä- und Postsynapse exprimiert und kolokalisiert mit Synaptophysin²⁸³. Diese Kolokalisierung von Synaptophysin und Profilin1 ist aktivitätsabhängig und ist unter Depolarisierungsbedingungen erhöht²⁸³. Die Inaktivierung von Profilin1 (*knock out*) ist letal und kann nicht durch Profilin2, das vor allem neuronal exprimiert wird, kompensiert werden²⁸⁴. Die Überexpression von Profilin2 inhibiert durch eine Inaktivierung von Dynamin1 die Endozytose, wohingegen die Deletion von Profilin2 die Endozytose verstärkt²⁸⁵. Die Bindung von PIP₂ an Profilin2

führt zur Dissoziation des Profilin2/Dynamin1-Komplexes, so dass Dynamin1 wieder mit Amphiphysin interagieren kann und so für die Endozytose zur Verfügung steht²⁸⁵.

Neben Profilin reguliert auch PIP₂ zahlreiche Prozesse der Aktin-Polymerisierung sowie die Membran-Verankerung der Aktine²⁸⁶. Ferner steuert PIP₂ die Clathrin- und Aktin-abhängige Endozytose²⁸⁷. Neben PIP₂ spielt Cholesterin an der präsynaptischen Aktin-Organisation eine regulative Funktion²⁸⁸. Somit ist die in 5.2 beschriebene Regulation des Lipid-Metabolismus durch die Synaptophysin-Interaktionspartner Phospholipase D4 und Arfaptin2 auch für die Regulation des Aktin-Zytoskeletts von Bedeutung. Ferner ist Arfaptin2 selbst ein wichtiger regulatorischer Faktor für die von Arf6 und Rac1 induzierte Aktin-Polymerisierung^{289,290}. Des Weiteren wird Phospholipase D durch die Interaktion mit Aktin in ihrer Aktivität inhibiert²⁹¹.

Ein weiterer im *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid System* und im FRET verifizierter Synaptophysin-Bindungspartner ist die bereits in 5.2 beschriebene Rho GTPase Rnd2 (Tab. 4-3, Abb. 4-13). Rho GTPasen sind wie Profilin an der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt²⁹²⁻²⁹⁴. Fast alle Rho GTPasen wechseln zwischen einer GDP-gebundenen und GTP-gebundenen aktiven Form. Im Gegensatz dazu ist die Gruppe der Rnd GTPasen fast ausschließlich an GTP gebunden. Ihre Aktivität wird eher durch ihre Lokalisation und Phosphorylierung gesteuert als durch ihren Wechsel in die inaktive GDP-Form²⁹⁵. Ferner werden Rnd Proteine im Unterschied zu anderen Rho GTPasen ausschließlich in Vertebraten exprimiert²⁹⁵. Der Synaptophysin-Interaktionspartner Rnd2 GTPase wird besonders stark in Neuronen im Gehirn exprimiert^{296,297} und kolokalisiert in den Synapsen-reichen Schichten der äußeren und inneren plexiformen Schicht (IPL, OPL) der Retina mit Synaptophysin (siehe Abb. 4-6). Rnd Proteine können über posttranslationale Anheftung von Farnesylresten am C-Terminus mit der Membran assoziieren²⁹⁵. Diese Assoziation könnte über den zytoplasmatischen C-Terminus von Synaptophysin, der für die Interaktion mit Rnd2 GTPase benötigt wird, begünstigt werden. Rnd1 GTPase und Rnd3 GTPase zeigen einen antagonistischen Effekt auf die RhoA GTPase, wohingegen die Rnd2 GTPase im Zusammenwirken mit ihrem Effektor Pragmin die RhoA GTPase aktiviert und auf diese Weise das von RhoA gesteuerte Neuritenwachstum inhibiert²⁹⁸. Ein weiterer, vorwiegend im Gehirn exprimierter Effektor von Rnd2 GTPase ist Rapostlin, das mit Rnd2 GTPase über das Aktin-Zytoskelett die Neuritenverzweigung induziert^{193,295}. Wenn Rnd2 GTPase nicht gebunden ist, assoziiert Rapostlin auch mit Mikrotubuli. Somit ist Rapostlin, wie viele Rho GTPasen^{193,299}, ein Bindeglied zwischen den zwei Zytoskelett-Strukturen. Mikrotubuli sind Bestandteile des Zytoskeletts in der Prä- und Postsynapse. Ihre Funktion in der Synapse ist bislang nur begrenzt erforscht. Vermutlich sind sie an der Entwicklung und Versorgung der synaptischen Transmission beteiligt²⁹⁹⁻³⁰¹. Zudem wird der Synaptophysin-Bindungspartner Phospholipase D durch die Interaktion mit Tubulin in der Aktivität inhibiert. Die Stärke der Inhibierung variiert dabei in Abhängigkeit von der Menge an freiem monomerem Tubulin³⁰². Neben den durch den Synaptophysin-Interaktionspartner Arfaptin2 regulierten Arf-Proteinen (ADP-Ribosylierungs-Faktor) steuern Stathmine die Mikrotubuli-Dynamik^{303,304}. Stathmin-like3, ein Mitglied der Stathmin-Familie, ist ein

im *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid System* und im FRET verifizierter Synaptophysin-Bindungspartner (Tab. 4-3, Abb. 4-13), der mit Synaptophysin in den Synapsen-reichen Schichten der äußeren und inneren plexiformen Schicht (IPL, OPL) der Retina kolokalisiert (siehe Abb. 4-6). Gegenüber dem ubiquitär exprimierten zytosolischen Phosphoprotein Stathmin werden Stathmin-like2, Stathmin-like3 und Stathmin-like4 überwiegend neuronal exprimiert und können über posttranslationale Anheftung von Palmitoylresten am N-Terminus mit der Membran assoziieren^{305,306}. Auch hier könnte die Assoziation von Stathmin-like3 an die Membran durch den zytoplasmatischen C-Terminus von Synaptophysin, der für die Interaktion mit Stathmin-like3 benötigt wird, begünstigt werden. Somit könnte der Synaptophysin/Stathmin-Komplex im Zusammenspiel mit dem Mikrotubulus-Zytoskelett in dem synaptischen Vesikelzyklus involviert sein. Alle Stathmine beeinträchtigen die Mikrotubulus-Assemblierung durch die Bindung von α/β -Tubuli-Heterodimeren in einen ternären T₂S-Komplex, der durch Phosphorylierung von Stathmin an vier Phosphorylierungsstellen in seiner Stabilität reduziert wird^{304,306-308}. Clusterin und RasGRF1 interagieren mit Stathmin-like3 und regulieren dabei die neuronale Differenzierung^{195,309}. Ferner wird Stathmin besonders stark in der Amygdala exprimiert und kontrolliert dort gelernte und angeborene Angst³¹⁰. Sowohl Synaptophysin als auch Stathmin, Stathmin-like1, Stathmin-like2 und Stathmin-like3 werden bei der Behandlung von Ratten mit Stimulanzien wie Amphetaminen und Kokain über die Aktivierung des CREB-Transkriptionsfaktors hochreguliert³¹¹⁻³¹³. In den ersten 24 Stunden nach Verabreichung konnte für Synaptophysin und für Stathmin eine Erhöhung der Expression von 20 bis 40% beobachtet werden, wohingegen der Gehalt der beiden Hauptbindungspartner der jeweiligen Proteine, Synaptobrevin2 und α -Tubulin, nicht verändert wurde^{312,314}. Bei einer chronischen Induzierung durch Amphetamine dagegen konnten keine Erhöhungen detektiert werden³¹⁴. Beobachtungen bei Stathmin- und Synaptophysin/Synaptogyrin1-Deletion (*knock out*) sprechen ferner für eine Regulierung der synaptischen Plastizität durch Synaptophysin und Stathmin^{136,310}. Auch der Synaptophysin-Bindungspartner Rho GTPase Rnd2, der an der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt ist, wird durch Stimulanzien wie Amphetamine und Kokain hochreguliert³¹⁵. Da viele Proteine aus dem Lipid-Metabolismus auch in der Reorganisation des Zytoskeletts beteiligt sind, könnte Synaptophysin als Mediator in einer Lipid-Plattform eine Brücke zwischen diesen ineinander verzahnten Bereichen bilden.

5.4 Interaktionen der *tetraspan vesicle membrane proteins* (TVPs)

Tetraspan vesicle membrane proteins (TVPs) sind Vesikelproteine, die durch vier Transmembrandomänen und zytoplasmatisch lokalisierte Termini klassifiziert werden. Neben den Physinen mit Synaptophysin, Synaptoporin, Pantophysin und Mitsugumin29 kodieren die Gyryne (Synaptogyrin1-4) und die *secretory carrier-associated membrane proteins* (SCAMP 1-5) für die drei Genfamilien der TVPs¹⁰⁴. Wegen ihrer charakteristischen Membrantopologie und ihrer modulatorischen Funktion im synaptischen Vesikelzyklus werden die TVPs ferner den Marvel-

Proteinen (*MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link*) zugeordnet^{155,316,317}. Diese zeichnen sich durch vier Transmembrandomänen und zytoplasmatisch lokalisierte Termini aus und assoziieren häufig mit speziellen Membran-Mikrodomänen. Neben den TVPs gehören auch die Proteine der MAL- und Occulidin-Familie zu den Marvel-Proteinen^{155,316,317}.

In *Caenorhabditis elegans* existiert von jeder TVP-Familie jeweils nur ein Protein: Synaptophysin (SPH-1), Synaptogyrin (SNG-1) und SCAMP (SCM-1). Cladogramm-Analysen von Maus- und *C. elegans*-TVPs zeigen zwei große Phyla: das SCAMP-Phylum und das Physin-Gyrin-Phylum. Dabei hat Synaptophysin aus *C. elegans* mehr Ähnlichkeit zum gemeinsamen Vorläufer der Physine und Gyryne als die Physine der Maus und die Gyryne des *C. elegans* und die der Maus. Wie auch in den Säugern weisen TVPs in *C. elegans* ein vesikuläres Verteilungsmuster auf. Überraschenderweise zeigt das in Säugern neuronal exprimierte Synaptophysin in *C. elegans* eine intestinale Verteilung^{158,159}. Möglicherweise werden die Funktionen von Synaptophysin im Säuger in *C. elegans* von dem fast ausschließlich im Nervensystem lokalisierten Synaptogyrin^{158,318,319} ersetzt. Ferner besitzen *Strongylocentrotus purpuratus* (Purpursseeigel) und *Drosophila melanogaster*³²⁰ kein Synaptophysin, jedoch Synaptogyrin und SCAMP (*Strongylocentrotus purpuratus* / *Drosophila melanogaster*: SCAMP GeneID: 759213 / 32470, Gyrin GeneID: 753715 / 36533). Im primitivsten Organismus mit einem erkennbaren diffusen Nervensystem, in *Hydra magnipapillata* (Süßwasserpolyt, *Cnidaria*), ist vermutlich nur SCAMP als TVP (dbEST: 31275634) vertreten, wohingegen in *Saccharomyces cerevisiae* kein TVP vorhanden ist^{321,322}. Möglicherweise variierten die Aufgaben der einzelnen TVPs im Verlauf der Evolution und waren dabei nicht stringent auf eine Genfamilie beschränkt. Eine heterophile Interaktion innerhalb der *tetraspan vesicle membrane proteins* (TVPs) könnte diese Aussage unterstützen.

Innerhalb der *tetraspan vesicle membrane proteins* (TVPs) wurden homomultimere Strukturen bislang bei Synaptophysin^{108,151,152,155}, Synaptoporin³²³ und SCAMPs^{324,325} beobachtet. Heterophile Interaktionen innerhalb der Physine³²³, Gyryne¹⁹⁷ oder SCAMPs waren bislang nur bei SCAMPs³²⁵ gezeigt worden. Eine heterophile Interaktion zwischen den drei Genfamilien der TVPs, das heißt zwischen Physinen und Gyrynen^{115,197,326}, Physinen und SCAMPs beziehungsweise Gyrynen und SCAMPs, konnte noch nicht detektiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals heterophile Interaktionen zwischen Physin und Gyrin beziehungsweise Physin und SCAMP erfasst. Synaptogyrin3 ist ein mit dem *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid System* identifizierter und im FRET verifizierter Synaptophysin-Bindungspartner (Tab. 4-3, Abb. 4-13), der mit Synaptophysin in den Synapsen-reichen Schichten der äußeren und inneren plexiformen Schicht der Retina kolokalisiert (Abb. 4-6). Die Interaktionsstärke zwischen Synaptogyrin3 und Synaptophysin war mit der des starken, gut charakterisierten Synaptophysin/Synaptobrevin2-Komplexes vergleichbar und konnte wie dieser Komplex mittels Koimmunpräzipitation sowohl in kotransfizierten HeLa-Zellen (Abb. 4-9) als auch im Synaptosomen-Lysat von adulten Mäusen (Abb. 4-7; Abb. 4-8) verifiziert werden. Synaptogyrin3 wird ausschließlich neuronal exprimiert und kann zusammen mit Synaptogyrin1 in

denselben synaptischen Vesikeln kolokalisieren. Im Gegensatz zu Synaptogyrin1 ist Synaptogyrin3 nicht ubiquitär im Gehirn verteilt, sondern auf spezifische Areale im Gehirn, wie Hippocampus, *Globus pallidus* oder die *Pars reticulata* der *Substantia nigra* beschränkt¹⁹⁷.

Ebenso wie Synaptogyrin3 ist SCAMP1 ein starker, mit dem *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid System* identifizierter und im FRET verifizierter Synaptophysin-Bindungspartner (Tab. 4-3, Abb. 4-14), der auch in den Synapsen-reichen Schichten der äußeren und inneren plexiformen Schicht der Retina mit Synaptophysin kolokalisiert (Abb. 4-6). SCAMP1 ist wie SCAMP5 in synaptischen Vesikeln massiv angereichert³²² und vermag mit SCAMP2 einen heterodimeren Komplex zu bilden³²⁵. Des Weiteren kann SCAMP1 vermutlich über die Bildung einer homopolymeren Fusionspore die Exo- und Endozytose steuern³²⁷⁻³²⁹.

Für beide heterophile Komplexe, Synaptogyrin3/Synaptophysin und SCAMP1/Synaptophysin, ist der zytoplasmatische Synaptophysin C-Terminus nicht essentiell (Abb. 4-15). In Anbetracht ihres meist ähnlichen Expressionsmusters im Gehirn¹⁰⁴ und der punktierten Kolokalisierung in der äußeren und inneren plexiformen Schicht (Abb. 4-6) ist es möglich, dass Physine mit Gyrienen oder SCAMPs in spezifischen Arealen des Gehirns ausgetauscht werden und so die Neurotransmission je nach Art des TVP-Komplexes feinregulieren (*fine-tuning*). Diese Vermutung wird durch vergleichbare Funktionen von Synaptophysin (Kap. 5.2) und SCAMP2²⁶³ im Lipid-Metabolismus manifestiert. Ferner wäre eine austauschbare Funktion der TVPs eine mögliche Erklärung für den schwachen neuronalen Phänotyp der TVP-Mutanten^{136,156,158,159,327}. Synaptophysin bildet vermutlich eine hexamere Fusionspore, die die Vesikelfusion und Exozytose initiiert¹⁵²⁻¹⁵⁵. Wie für die Assoziation mit Synaptogyrin3 oder SCAMP1 ist der zytoplasmatische C-Terminus von Synaptophysin für diese Oligomerisierung nicht essentiell¹⁵³ (Abb. 4-15). Somit wäre es denkbar, dass sich die Fusionspore auch aus verschiedenen TVPs bildet. Zudem könnten alle TVPs, wie für Synaptophysin (Kap. 5.2) und SCAMP2²⁶³ gezeigt, als Katalysatoren in einer Lipid-Plattform Reaktionen begünstigen, indem sie Proteine rekrutieren und positionieren und auf diese Weise den synaptischen Vesikelzyklus modulieren. Diese universelle Funktion und die heterophile Interaktion der TVPs stehen im Einklang mit den unterschiedlichen Expressionen im Verlauf der Evolution.

5.5 Phosphorylierung der *tetraspan vesicle membrane proteins* (TVPs)

Synaptophysin ist eines der haupttyrosin-phosphorylierten Proteine in synaptischen Vesikeln^{133,134,135,136}, dessen Phosphorylierung *in vivo* bislang noch nicht genau untersucht worden ist¹³⁷. *Long-term potentiations* (LTPs) sind von Tyrosin-Phosphorylierungen abhängig^{139,140}. Zudem ist die Tyrosin-Phosphorylierung von Synaptophysin während LTPs erhöht¹⁴² und zeigt eine Korrelation des Phosphorylierungsgrades zur Stimulation¹³⁷. Phosphorylierung könnte demnach eine zentrale Funktion von Synaptophysin darstellen. Zahlreiche Proteine des synaptischen Vesikelzyklus werden durch Phosphorylierung reguliert, wie zum Beispiel Clathrin, Amphiphysin, AP2, AP180, Dynamin, Synaptojanin und Synaptotagmin¹⁴³. Der C-Terminus von Synaptophysin ist in die Interaktion mit

Arfaptin2, Rho GTPase Rnd2 und Stathmin-like3 involviert (Abb. 4-15). Er vermittelt vermutlich die transiente Membranassoziation der Proteine, die über den Grad seiner Phosphorylierung gesteuert werden könnte. Für die Interaktion von Synaptophysin mit Synaptobrevin2 ist der C-Terminus von Synaptophysin nicht essentiell (Abb. 4-15), scheint jedoch das Expressionsmuster von Synaptobrevin2 zu beeinflussen¹¹⁶. Somit könnte der Grad der Tyrosin-Phosphorylierung von Synaptophysin auch das Expressionsmuster von Synaptobrevin2 regulieren. Neben Synaptophysin werden auch Synaptogyrin1 und Synaptogyrin2 an ihrem zytoplasmatischen C-Terminus durch Src-Kinasen Tyrosin-phosphoryliert^{136,209}. Es wird angenommen, dass Synaptogyrin3 im Gegensatz zu Synaptophysin, Synaptogyrin1 und Synaptogyrin2 nicht phosphoryliert wird, jedoch wurde dies noch nicht gezeigt¹⁹⁷. Im Verlauf dieser Arbeit konnte mit der SH2- und der dSH2-Domäne der Src-Kinase im FRET eine Tyrosin-Phosphorylierung des zytoplasmatischen C-Terminus von Synaptophysin detektiert werden (Abb. 4-17). Die Interaktion war so stark, dass eine Detektion der Phosphorylierung auch mit der schwächeren SH2-Domäne²¹⁴, die für die Erfassung von Tyrosin-Phosphorylierung in fokalen Kontakten zu schwach war^{201,202}, erfolgen konnte. Die FRET-Effizienz war dabei mit der zwischen Synaptophysin und Synaptobrevin2 vergleichbar (Abb. 4-17). Mit der SH2-Mutante R183A, die eine 200fach niedrigere Affinität zu phosphorylierten Tyrosinen aufweist²¹⁵, konnte eine signifikante Reduzierung, jedoch keine vollständige Reduktion des FRET Signals gezeigt werden (Abb. 4-17). Offensichtlich reicht die große Anzahl von neun Tyrosinen im zytoplasmatischen C-Terminus von Synaptophysin noch aus, um ein signifikantes FRET-Signal zu detektieren. Durch die Deletion der neun Tyrosin-Reste konnte das FRET-Signal jedoch vollständig aufgehoben werden (Abb. 4-17). Im Fall von Synaptogyrin3 konnte erstmals eine Tyrosin-Phosphorylierung gezeigt werden, die durch die SH2-Mutante R183A vollständig aufgehoben wurde (Abb. 4-17). Die Interaktionsstärke war deutlich schwächer als die für Synaptophysin, jedoch war der Unterschied zur Negativ-Kontrolle für die dSH2-Domäne signifikant. Ein wesentlicher Vorteil der angewandten FRET-Methode ist, dass im Gegensatz zu früheren Phosphorylierungsanalysen von Physinen und Gyrinen keine Tyrosin-Kinasen überexprimiert werden¹³⁶. Erst durch die Tyrosin-Kinasen-Überexpression konnten Phosphorylierungen an Physinen und Gyrinen detektiert werden. Dies verdeutlicht die hohe Sensitivität der FRET-Methode zur Detektion der Tyrosin-Phosphorylierung. Da die Tyrosin-Phosphorylierung von Synaptophysin so stark ist, dass sie sich selbst mit der schwachen SH2-Domäne nachweisen lässt, und die FRET-Effizienz nur bedingt durch die SH2-Mutante R183A reduziert wurde, wird Synaptophysin mit großer Wahrscheinlichkeit mehrfach am C-terminalen Ende innerhalb der Prolin- und Serin-reichen Pentapeptid Wiederholungen, von denen neun mit Tyrosin beginnen, phosphoryliert. Der Grad der Phosphorylierung könnte dabei die Stärke zu den Interaktionspartnern regulieren. Da neben den Physinen und Gyrinen auch SCAMPs Tyrosin-phosphoryliert werden³³⁰, könnte der Grad der Phosphorylierung generell bei TVPs die Rekrutierung von Proteinen an die Membran steuern.

5.6 Weitere starke Synaptophysin-Bindungspartner und ihre Funktionen

Neben den bereits unter 5.2, 5.3 und 5.4 beschriebenen Interaktionspartnern von Synaptophysin konnten im *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid System* weitere neue Synaptophysin-Bindungspartner identifiziert werden, die in dem synaptischen Vesikelzyklus involviert sind. *Vesicle transport through interaction with t-SNAREs 1B* (Vti1b) war einer der stärksten Interaktionspartner im *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid System* (Tab. 4-3), der überwiegend in den Synapsen-reichen Schichten der äußeren und inneren plexiformen Schicht (IPL, OPL) der Retina mit Synaptophysin kolokalisiert (siehe Abb. 4-6). Synaptophysin konnte nicht mit Vti1b koimmunpräzipitieren (Abb. 4-8), da vermutlich die Protein-Protein-Wechselwirkungen von der Integration der beiden Proteine in die Membran abhängig sind. Der Q-SNARE Vti1b bildet zusammen mit den Q-SNAREs Syntaxin7, Syntaxin8 und dem R-SNARE Endobrevin einen SNARE-Komplex, der die Fusion im späten Endosom reguliert³³¹⁻³³³. Ferner konnte eine Lokalisierung von Vti1b auch im frühen Endosom und im trans-Golgi-Netzwerk detektiert werden³³⁴. Die Gehirn spezifische Splice-Variante von Vti1a, das Vti1a- β , ist auf synaptischen Vesikeln lokalisiert, ebenso in geringem Umfang der Synaptophysin-Interaktionspartner Vti1b¹⁹⁴. Vermutlich sind Vti1a- β und Vti1b Bestandteile eines separaten SNARE-Komplexes, der sich von dem SNARE-Komplex der Exozytose unterscheidet und wahrscheinlich an einem Fusionsschritt innerhalb des synaptischen Vesikel-Recyclings oder der Biogenese involviert ist¹⁹⁴. In diesem SNARE-Komplex könnten die mit Vti1a interagierenden und auf synaptischen Vesikeln lokalisierten Proteine VAMP4, Syntaxin6, Syntaxin16^{16,334} und Vti1b enthalten sein. Synaptophysin könnte in diesem Zusammenhang, ähnlich wie bei Synaptobrevin2, die Menge an Vti1b für den SNARE-Komplex regulieren. Ferner wäre es möglich, dass Vti1b auch andere SNARE-Komplexe reguliert, da ein einzelner SNARE auch Bestandteil verschiedener Komplexe sein kann. Das mit Vti1b verwandte Vti1p der Hefe interagiert zum Beispiel mit t-SNARE Sed5p im cis-Golgi³³⁵, mit t-SNARE Pep12p im Endosom³³⁶ und mit t-SNARE Vam3p im Lysosom³³⁷.

Ein weiterer im *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid System* identifizierter starker Synaptophysin-Interaktionspartner ist das in Hefe und *C. elegans* konservierte Leprot (*leptin receptor overlapping transcript*; OB-RGRP). Das Leprot-Gen teilt sich den Promotor und zwei Exons mit dem Leptin-Rezeptor³³⁸⁻³⁴⁰, von dem selbst sechs Splice-Varianten existieren³⁴¹. Zahlreiche intrazelluläre Signalwege werden durch das Leptin-Hormon gesteuert, die auch an der Regulation der synaptischen Plastizität, des Lipid-Metabolismus, des Amyloid-Beta und des Aktin-Zytoskeletts beteiligt sind³⁴²⁻³⁴⁶. Der Leptin-Rezeptor selbst kann sowohl auf der Prä- als auch auf der Postsynapse exprimiert werden^{343,347}. Welche Funktion Leprot und Synaptophysin im Leptin-Signalweg haben könnten, ist unklar. Mäuse mit deletiertem Leptin (*knock out*) zeigen Veränderungen in der Expression des Leptin-Rezeptors, wohingegen die Expression von Leprot unverändert bleibt³³⁹. Es könnte sein, dass Leprot

im Zusammenspiel mit Synaptophysin auch eine Leptin unabhängige Funktion ausübt, da in Hefe und *C. elegans* zwar Leptin exprimiert wird, jedoch nicht Leptin oder der Leptin-Rezeptor selbst^{338,348}.

5.7 Conclusio

Im *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid System*, das einen Interaktions-Screen von Membranproteinen ermöglicht, konnten bekannte und neue Bindungspartner von Synaptophysin detektiert werden, die mit dem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer und mit Koimmunpräzipitation verifiziert wurden. Dabei konnten erstmals heterophile Interaktionen zwischen Physin und Gyrin beziehungsweise Physin und SCAMP erfasst werden, die für eine universelle Funktion der TVPs sprechen. Sowohl Synaptophysin als auch SCAMP2 agieren vermutlich als Membrananker, die Proteine des Lipid-Metabolismus in räumliche Nähe zu ihrem Substrat bringen. Sie begünstigen als Katalysatoren in einer Lipid-Plattform die Reaktion der Phospholipase D und regulieren deren Feinabstimmung (*fine-tuning*) durch die Assoziation mit Regulatoren wie Arf6, Arfaptin2 und Rho GTPase2. Synaptophysin ist durch die Assoziation mit Zytoskelett-Mediatoren vermutlich an der Regulation des Zytoskeletts in der Synapse involviert. Zudem sind viele Proteine des Lipid-Metabolismus an der Reorganisation des Zytoskeletts beteiligt. Somit könnte Synaptophysin als Mediator in einer Lipid-Plattform eine Brücke zwischen diesen ineinander verzahnten Bereichen bilden. In vielen Fällen wird Synaptophysin, wie bereits bei den Interaktionspartnern im Lipid-Metabolismus, über seinen zytoplasmatischen C-Terminus die Bindung von Zytoskelett-Mediatoren an die Vesikelmembran erleichtern und nachfolgende Reaktionen in der Funktion eines Katalysators begünstigen. Da neben den Physinen und Gyrinen auch SCAMPs Tyrosin-phosphoryliert werden³³⁰, könnte der Grad der Phosphorylierung generell bei TVPs die Rekrutierung von Proteinen an die Membran steuern.

6 Literaturverzeichnis

1. Furber, S. & Temple, S. Neural systems engineering. *Journal of the Royal Society Interface* **4**, 193-206 (2007).
2. Almasi, G. *et al.* Architecture and performance of the BlueGene/L message layer. *Recent Advances in Parallel Virtual Machine and Message Passing Interface, Proceedings* **3241**, 405-414 (2004).
3. Moreira, J. E. *et al.* The Blue Gene/L supercomputer: A hardware and software story. *International Journal of Parallel Programming* **35**, 181-206 (2007).
4. Bevan, K. Just how powerful is the brain of a mouse? *The Guardian* . 3-3-2007.
5. Meier, C. & Dermietzel, R. Electrical synapses--gap junctions in the brain. *Results Probl. Cell Differ.* **43**, 99-128 (2006).
6. Connors, B. W. & Long, M. A. Electrical synapses in the mammalian brain. *Annu. Rev. Neurosci.* **27**, 393-418 (2004).
7. Bonanomi, D., Benfenati, F. & Valtorta, F. Protein sorting in the synaptic vesicle life cycle. *Prog. Neurobiol.* **80**, 177-217 (2006).
8. Jahn, R., Schiebler, W., Ouimet, C. & Greengard, P. A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **82**, 4137-4141 (1985).
9. Navone, F. *et al.* Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. *J. Cell Biol.* **103**, 2511-2527 (1986).
10. Wiedenmann, B. & Franke, W. W. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* **41**, 1017-1028 (1985).
11. Takamori, S. *et al.* Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **127**, 831-846 (2006).
12. Eshkind, L. G. & Leube, R. E. Mice lacking synaptophysin reproduce and form typical synaptic vesicles. *Cell Tissue Res.* **282**, 423-433 (1995).
13. McMahon, H. T. *et al.* Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 4760-4764 (1996).
14. Blondeau, F. *et al.* 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 (2004).
15. Burre, J. *et al.* Synaptic vesicle proteins under conditions of rest and activation: analysis by 2-D difference gel electrophoresis. *Electrophoresis* **27**, 3488-3496 (2006).
16. Burre, J. & Volkhardt, W. The synaptic vesicle proteome. *J. Neurochem.* **101**, 1448-1462 (2007).
17. Schneggenburger, R. & Neher, E. Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse. *Nature* **406**, 889-893 (2000).

18. Augustine, G. J., Charlton, M. P. & Smith, S. J. Calcium action in synaptic transmitter release. *Annu. Rev. Neurosci.* **10**, 633-693 (1987).
19. Sudhof, T. C. The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Neurosci.* **27**, 509-547 (2004).
20. Harata, N. C., Aravanis, A. M. & Tsien, R. W. Kiss-and-run and full-collapse fusion as modes of exo-endocytosis in neurosecretion. *J. Neurochem.* **97**, 1546-1570 (2006).
21. Koenig, J. H. & Ikeda, K. Synaptic vesicles have two distinct recycling pathways. *J. Cell Biol.* **135**, 797-808 (1996).
22. Pyle, J. L., Kavalali, E. T., Piedras-Renteria, E. S. & Tsien, R. W. Rapid reuse of readily releasable pool vesicles at hippocampal synapses. *Neuron* **28**, 221-231 (2000).
23. Richards, D. A., Guatimosim, C. & Betz, W. J. Two endocytic recycling routes selectively fill two vesicle pools in frog motor nerve terminals. *Neuron* **27**, 551-559 (2000).
24. Weimbs, T., Mostov, K., Low, S. H. & Hofmann, K. A model for structural similarity between different SNARE complexes based on sequence relationships. *Trends Cell Biol.* **8**, 260-262 (1998).
25. Sollner, T. *et al.* SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**, 318-324 (1993).
26. Jahn, R., Lang, T. & Sudhof, T. C. Membrane fusion. *Cell* **112**, 519-533 (2003).
27. Hanson, P. I., Heuser, J. E. & Jahn, R. Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes. *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**, 310-315 (1997).
28. Sollner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H. & Rothman, J. E. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* **75**, 409-418 (1993).
29. Ahnert-Hilger, G. & Bigalke, H. Molecular aspects of tetanus and botulinum neurotoxin poisoning. *Prog. Neurobiol.* **46**, 83-96 (1995).
30. Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R. & Brunger, A. T. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* **395**, 347-353 (1998).
31. Hay, J. C. & Scheller, R. H. SNAREs and NSF in targeted membrane fusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 505-512 (1997).
32. Fasshauer, D. Structural insights into the SNARE mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* **1641**, 87-97 (2003).
33. Jahn, R. Principles of exocytosis and membrane fusion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1014**, 170-178 (2004).
34. Rosenmund, C., Rettig, J. & Brose, N. Molecular mechanisms of active zone function. *Curr. Opin. Neurobiol.* **13**, 509-519 (2003).
35. Takai, Y., Sasaki, T. & Matozaki, T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* **81**, 153-208 (2001).
36. Zerial, M. & McBride, H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 107-117 (2001).

37. Geppert, M. & Sudhof, T. C. RAB3 and synaptotagmin: the yin and yang of synaptic membrane fusion. *Annu. Rev. Neurosci.* **21**, 75-95 (1998).
38. Schluter, O. M., Khvotchev, M., Jahn, R. & Sudhof, T. C. Localization versus function of Rab3 proteins. Evidence for a common regulatory role in controlling fusion. *J. Biol. Chem.* **277**, 40919-40929 (2002).
39. Fischer von, M. G. *et al.* Localization of Rab5 to synaptic vesicles identifies endosomal intermediate in synaptic vesicle recycling pathway. *Eur. J. Cell Biol.* **65**, 319-326 (1994).
40. Khvotchev, M. V., Ren, M., Takamori, S., Jahn, R. & Sudhof, T. C. Divergent functions of neuronal Rab11b in Ca²⁺-regulated versus constitutive exocytosis. *J. Neurosci.* **23**, 10531-10539 (2003).
41. Geppert, M. *et al.* The role of Rab3A in neurotransmitter release. *Nature* **369**, 493-497 (1994).
42. Johnston, P. A. *et al.* rab3A attachment to the synaptic vesicle membrane mediated by a conserved polyisoprenylated carboxy-terminal sequence. *Neuron* **7**, 101-109 (1991).
43. Araki, S., Kikuchi, A., Hata, Y., Isomura, M. & Takai, Y. Regulation of reversible binding of smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein, to synaptic plasma membranes and vesicles by its specific regulatory protein, GDP dissociation inhibitor. *J. Biol. Chem.* **265**, 13007-13015 (1990).
44. Fischer von, M. G., Sudhof, T. C. & Jahn, R. A small GTP-binding protein dissociates from synaptic vesicles during exocytosis. *Nature* **349**, 79-81 (1991).
45. Takai, Y., Sasaki, T., Shirataki, H. & Nakanishi, H. Rab3A small GTP-binding protein in Ca(2+)-dependent exocytosis. *Genes Cells* **1**, 615-632 (1996).
46. Sakane, A. *et al.* Rab3 GTPase-activating protein regulates synaptic transmission and plasticity through the inactivation of Rab3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 10029-10034 (2006).
47. Geppert, M., Goda, Y., Stevens, C. F. & Sudhof, T. C. The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion. *Nature* **387**, 810-814 (1997).
48. Gallwitz, D. & Jahn, R. The riddle of the Sec1/Munc-18 proteins - new twists added to their interactions with SNAREs. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 113-116 (2003).
49. Verhage, M. *et al.* Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* **287**, 864-869 (2000).
50. Garcia, E. P., McPherson, P. S., Chilcote, T. J., Takei, K. & De, C. P. rbSec1A and B colocalize with syntaxin 1 and SNAP-25 throughout the axon, but are not in a stable complex with syntaxin. *J. Cell Biol.* **129**, 105-120 (1995).
51. Hata, Y., Slaughter, C. A. & Sudhof, T. C. Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. *Nature* **366**, 347-351 (1993).
52. Tall, G. G., Hama, H., DeWald, D. B. & Horazdovsky, B. F. The phosphatidylinositol 3-phosphate binding protein Vac1p interacts with a Rab GTPase and a Sec1p homologue to facilitate vesicle-mediated vacuolar protein sorting. *Mol. Biol. Cell* **10**, 1873-1889 (1999).
53. Misura, K. M., Scheller, R. H. & Weis, W. I. Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. *Nature* **404**, 355-362 (2000).

54. Pevsner, J. *et al.* Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex. *Neuron* **13**, 353-361 (1994).
55. Yang, B., Steegmaier, M., Gonzalez, L. C., Jr. & Scheller, R. H. nSec1 binds a closed conformation of syntaxin1A. *J. Cell Biol.* **148**, 247-252 (2000).
56. Dulubova, I. *et al.* Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**, 2697-2702 (2007).
57. Shen, J., Tareste, D. C., Paumet, F., Rothman, J. E. & Melia, T. J. Selective activation of cognate SNAREpins by Sec1/Munc18 proteins. *Cell* **128**, 183-195 (2007).
58. McMahon, H. T., Missler, M., Li, C. & Sudhof, T. C. Complexins: cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function. *Cell* **83**, 111-119 (1995).
59. Chen, X. *et al.* Three-dimensional structure of the complexin/SNARE complex. *Neuron* **33**, 397-409 (2002).
60. Reim, K. *et al.* Complexins regulate a late step in Ca²⁺-dependent neurotransmitter release. *Cell* **104**, 71-81 (2001).
61. Tang, J. *et al.* A complexin/synaptotagmin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis. *Cell* **126**, 1175-1187 (2006).
62. Giraudo, C. G., Eng, W. S., Melia, T. J. & Rothman, J. E. A clamping mechanism involved in SNARE-dependent exocytosis. *Science* **313**, 676-680 (2006).
63. Ishizuka, T., Saisu, H., Odani, S. & Abe, T. Synaphin: a protein associated with the docking/fusion complex in presynaptic terminals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213**, 1107-1114 (1995).
64. Pabst, S. *et al.* Rapid and selective binding to the synaptic SNARE complex suggests a modulatory role of complexins in neuroexocytosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 7838-7848 (2002).
65. Fernandez-Chacon, R. *et al.* Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* **410**, 41-49 (2001).
66. Geppert, M. *et al.* Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* **79**, 717-727 (1994).
67. Deak, F., Schoch, S., Liu, X., Sudhof, T. C. & Kavalali, E. T. Synaptobrevin is essential for fast synaptic-vesicle endocytosis. *Nat. Cell Biol.* **6**, 1102-1108 (2004).
68. Perin, M. S., Fried, V. A., Mignery, G. A., Jahn, R. & Sudhof, T. C. Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature* **345**, 260-263 (1990).
69. Geppert, M., Archer, B. T., III & Sudhof, T. C. Synaptotagmin II. A novel differentially distributed form of synaptotagmin. *J. Biol. Chem.* **266**, 13548-13552 (1991).
70. Ubach, J., Zhang, X., Shao, X., Sudhof, T. C. & Rizo, J. Ca²⁺ binding to synaptotagmin: how many Ca²⁺ ions bind to the tip of a C2-domain? *EMBO J.* **17**, 3921-3930 (1998).
71. Bowen, M. E., Weninger, K., Ernst, J., Chu, S. & Brunger, A. T. Single-molecule studies of synaptotagmin and complexin binding to the SNARE complex. *Biophys. J.* **89**, 690-702 (2005).

72. Rickman, C. *et al.* Synaptotagmin interaction with the syntaxin/SNAP-25 dimer is mediated by an evolutionarily conserved motif and is sensitive to inositol hexakisphosphate. *J. Biol. Chem.* **279**, 12574-12579 (2004).
73. Shin, O. H. *et al.* Sr²⁺ binding to the Ca²⁺ binding site of the synaptotagmin 1 C2B domain triggers fast exocytosis without stimulating SNARE interactions. *Neuron* **37**, 99-108 (2003).
74. Li, C. *et al.* Ca(2+)-dependent and -independent activities of neural and non-neural synaptotagmins. *Nature* **375**, 594-599 (1995).
75. Jahn, R. & Scheller, R. H. SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 631-643 (2006).
76. Sullivan, J. M. Please release me. *Neuron* **54**, 493-494 (2007).
77. Xu, J., Mashimo, T. & Sudhof, T. C. Synaptotagmin-1, -2, and -9: Ca(2+) sensors for fast release that specify distinct presynaptic properties in subsets of neurons. *Neuron* **54**, 567-581 (2007).
78. Shin, O. H., Maximov, A., Lim, B. K., Rizo, J. & Sudhof, T. C. Unexpected Ca²⁺-binding properties of synaptotagmin 9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 2554-2559 (2004).
79. Voets, T. *et al.* Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking. *Neuron* **31**, 581-591 (2001).
80. Brunger, A. T. & DeLaBarre, B. NSF and p97/VCP: similar at first, different at last. *FEBS Lett.* **555**, 126-133 (2003).
81. Wimmer, C. *et al.* Molecular mass, stoichiometry, and assembly of 20 S particles. *J. Biol. Chem.* **276**, 29091-29097 (2001).
82. Furst, J., Sutton, R. B., Chen, J., Brunger, A. T. & Grigorieff, N. Electron cryomicroscopy structure of N-ethyl maleimide sensitive factor at 11 Å resolution. *EMBO J.* **22**, 4365-4374 (2003).
83. Brodsky, F. M., Chen, C. Y., Knuehl, C., Towler, M. C. & Wakeham, D. E. Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 517-568 (2001).
84. Slepnev, V. I. & De, C. P. Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat. Rev. Neurosci.* **1**, 161-172 (2000).
85. Song, W. & Zinsmaier, K. E. Endophilin and synaptojanin hook up to promote synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* **40**, 665-667 (2003).
86. Schmid, S. L. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 511-548 (1997).
87. Gaidarov, I. & Keen, J. H. Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits. *J. Cell Biol.* **146**, 755-764 (1999).
88. Zhang, J. Z., Davletov, B. A., Sudhof, T. C. & Anderson, R. G. Synaptotagmin I is a high affinity receptor for clathrin AP-2: implications for membrane recycling. *Cell* **78**, 751-760 (1994).
89. Hao, W., Luo, Z., Zheng, L., Prasad, K. & Lafer, E. M. AP180 and AP-2 interact directly in a complex that cooperatively assembles clathrin. *J. Biol. Chem.* **274**, 22785-22794 (1999).

90. Brown, C. M. & Petersen, N. O. Free clathrin triskelions are required for the stability of clathrin-associated adaptor protein (AP-2) coated pit nucleation sites. *Biochem. Cell Biol.* **77**, 439-448 (1999).
91. Nossal, R. Energetics of clathrin basket assembly. *Traffic.* **2**, 138-147 (2001).
92. Smith, C. J. & Pearse, B. M. Clathrin: anatomy of a coat protein. *Trends Cell Biol.* **9**, 335-338 (1999).
93. Ahle, S. & Ungewickell, E. Purification and properties of a new clathrin assembly protein. *EMBO J.* **5**, 3143-3149 (1986).
94. Ye, W. & Lafer, E. M. Bacterially expressed F1-20/AP-3 assembles clathrin into cages with a narrow size distribution: implications for the regulation of quantal size during neurotransmission. *J. Neurosci. Res.* **41**, 15-26 (1995).
95. Nonet, M. L. *et al.* UNC-11, a *Caenorhabditis elegans* AP180 homologue, regulates the size and protein composition of synaptic vesicles. *Mol. Biol. Cell* **10**, 2343-2360 (1999).
96. Peter, B. J. *et al.* BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* **303**, 495-499 (2004).
97. Marsh, M. & McMahon, H. T. The structural era of endocytosis. *Science* **285**, 215-220 (1999).
98. Takei, K., Mundigl, O., Daniell, L. & De, C. P. The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. *J. Cell Biol.* **133**, 1237-1250 (1996).
99. Ungewickell, E. Wrapping the package. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 8809-8810 (1999).
100. Fotin, A. *et al.* Structure of an auxilin-bound clathrin coat and its implications for the mechanism of uncoating. *Nature* **432**, 649-653 (2004).
101. Fotin, A. *et al.* Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature* **432**, 573-579 (2004).
102. Cremona, O. & De, C. P. Phosphoinositides in membrane traffic at the synapse. *J. Cell Sci.* **114**, 1041-1052 (2001).
103. Cremona, O. *et al.* Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* **99**, 179-188 (1999).
104. Hubner, K., Windoffer, R., Hutter, H. & Leube, R. E. Tetraspan vesicle membrane proteins: synthesis, subcellular localization, and functional properties. *Int. Rev. Cytol.* **214**, 103-159 (2002).
105. Ozcelik, T. *et al.* Synaptophysin: structure of the human gene and assignment to the X chromosome in man and mouse. *Am. J. Hum. Genet.* **47**, 551-561 (1990).
106. Bargou, R. C. & Leube, R. E. The synaptophysin-encoding gene in rat and man is specifically transcribed in neuroendocrine cells. *Gene* **99**, 197-204 (1991).
107. Leube, R. E., Wiedenmann, B. & Franke, W. W. Topogenesis and sorting of synaptophysin: synthesis of a synaptic vesicle protein from a gene transfected into nonneuroendocrine cells. *Cell* **59**, 433-446 (1989).
108. Johnston, P. A. & Sudhof, T. C. The multisubunit structure of synaptophysin. Relationship between disulfide bonding and homo-oligomerization. *J. Biol. Chem.* **265**, 8869-8873 (1990).

109. Valtorta, F., Pennuto, M., Bonanomi, D. & Benfenati, F. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays* **26**, 445-453 (2004).
110. Alder, J., Xie, Z. P., Valtorta, F., Greengard, P. & Poo, M. Antibodies to synaptophysin interfere with transmitter secretion at neuromuscular synapses. *Neuron* **9**, 759-768 (1992).
111. Alder, J., Kanki, H., Valtorta, F., Greengard, P. & Poo, M. M. Overexpression of synaptophysin enhances neurotransmitter secretion at *Xenopus* neuromuscular synapses. *J. Neurosci.* **15**, 511-519 (1995).
112. Alder, J., Lu, B., Valtorta, F., Greengard, P. & Poo, M. M. Calcium-dependent transmitter secretion reconstituted in *Xenopus* oocytes: requirement for synaptophysin. *Science* **257**, 657-661 (1992).
113. Shibaguchi, H. *et al.* Role of synaptophysin in exocytotic release of dopamine from *Xenopus* oocytes injected with rat brain mRNA. *Cell Mol. Neurobiol.* **20**, 401-408 (2000).
114. Calakos, N. & Scheller, R. H. Vesicle-associated membrane protein and synaptophysin are associated on the synaptic vesicle. *J. Biol. Chem.* **269**, 24534-24537 (1994).
115. Edelmann, L., Hanson, P. I., Chapman, E. R. & Jahn, R. Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *EMBO J.* **14**, 224-231 (1995).
116. Bonanomi, D., Rusconi, L., Colombo, C. A., Benfenati, F. & Valtorta, F. Synaptophysin I selectively specifies the exocytic pathway of synaptobrevin 2/VAMP2. *Biochem. J.* **404**, 525-534 (2007).
117. Mitter, D. *et al.* The synaptophysin/synaptobrevin interaction critically depends on the cholesterol content. *J. Neurochem.* **84**, 35-42 (2003).
118. Siddiqui, T. J. *et al.* Determinants of synaptobrevin regulation in membranes. *Mol. Biol. Cell* **18**, 2037-2046 (2007).
119. Yelamanchili, S. V. *et al.* The C-terminal transmembrane region of synaptobrevin binds synaptophysin from adult synaptic vesicles. *Eur. J. Cell Biol.* **84**, 467-475 (2005).
120. Leclerc, N. *et al.* Synaptophysin expression during synaptogenesis in the rat cerebellar cortex. *J. Comp Neurol.* **280**, 197-212 (1989).
121. Devoto, S. H. & Barnstable, C. J. Expression of the growth cone specific epitope CDA 1 and the synaptic vesicle protein SVP38 in the developing mammalian cerebral cortex. *J. Comp Neurol.* **290**, 154-168 (1989).
122. Marazzi, G. & Buckley, K. M. Accumulation of mRNAs encoding synaptic vesicle-specific proteins precedes neurite extension during early neuronal development. *Dev. Dyn.* **197**, 115-124 (1993).
123. Becher, A. *et al.* The synaptophysin-synaptobrevin complex: a hallmark of synaptic vesicle maturation. *J. Neurosci.* **19**, 1922-1931 (1999).
124. Hinz, B. *et al.* Activity-dependent changes of the presynaptic synaptophysin-synaptobrevin complex in adult rat brain. *Eur. J. Cell Biol.* **80**, 615-619 (2001).
125. Reisinger, C. *et al.* The synaptophysin/synaptobrevin complex dissociates independently of neuroexocytosis. *J. Neurochem.* **90**, 1-8 (2004).

126. Westhead, E. W. Lipid composition and orientation in secretory vesicles. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **493**, 92-100 (1987).
127. Lang, T. *et al.* SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J.* **20**, 2202-2213 (2001).
128. Chamberlain, L. H., Burgoyne, R. D. & Gould, G. W. SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 5619-5624 (2001).
129. Salaun, C., James, D. J. & Chamberlain, L. H. Lipid rafts and the regulation of exocytosis. *Traffic*. **5**, 255-264 (2004).
130. Salaun, C., Gould, G. W. & Chamberlain, L. H. Lipid raft association of SNARE proteins regulates exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 19449-19453 (2005).
131. Hannah, M. J., Schmidt, A. A. & Huttner, W. B. Synaptic vesicle biogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 733-798 (1999).
132. Thiele, C., Hannah, M. J., Fahrenholz, F. & Huttner, W. B. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat. Cell Biol.* **2**, 42-49 (2000).
133. Pang, D. T., Wang, J. K., Valtorta, F., Benfenati, F. & Greengard, P. Protein tyrosine phosphorylation in synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 762-766 (1988).
134. Greengard, P., Valtorta, F., Czernik, A. J. & Benfenati, F. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* **259**, 780-785 (1993).
135. Barnekow, A., Jahn, R. & Schartl, M. Synaptophysin: a substrate for the protein tyrosine kinase pp60c-src in intact synaptic vesicles. *Oncogene* **5**, 1019-1024 (1990).
136. Janz, R. *et al.* Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I. *Neuron* **24**, 687-700 (1999).
137. Evans, G. J. & Cousin, M. A. Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1350-1353 (2005).
138. Rubenstein, J. L., Greengard, P. & Czernik, A. J. Calcium-dependent serine phosphorylation of synaptophysin. *Synapse* **13**, 161-172 (1993).
139. Purcell, A. L. & Carew, T. J. Tyrosine kinases, synaptic plasticity and memory: insights from vertebrates and invertebrates. *Trends Neurosci.* **26**, 625-630 (2003).
140. Kalia, L. V., Gingrich, J. R. & Salter, M. W. Src in synaptic transmission and plasticity. *Oncogene* **23**, 8007-8016 (2004).
141. Zhao, W., Cavallaro, S., Gusev, P. & Alkon, D. L. Nonreceptor tyrosine protein kinase pp60c-src in spatial learning: synapse-specific changes in its gene expression, tyrosine phosphorylation, and protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 8098-8103 (2000).
142. Mullany, P. M. & Lynch, M. A. Evidence for a role for synaptophysin in expression of long-term potentiation in rat dentate gyrus. *Neuroreport* **9**, 2489-2494 (1998).
143. Korolchuk, V. & Banting, G. Kinases in clathrin-mediated endocytosis. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 857-860 (2003).

144. Daly, C. & Ziff, E. B. Ca²⁺-dependent formation of a dynamin-synaptophysin complex: potential role in synaptic vesicle endocytosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 9010-9015 (2002).
145. Daly, C., Sugimori, M., Moreira, J. E., Ziff, E. B. & Llinas, R. Synaptophysin regulates clathrin-independent endocytosis of synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 6120-6125 (2000).
146. Horikawa, H. P., Kneussel, M., El, F. O. & Betz, H. Interaction of synaptophysin with the AP-1 adaptor protein gamma-adaptin. *Mol. Cell Neurosci.* **21**, 454-462 (2002).
147. Thomas, L. & Betz, H. Synaptophysin binds to physophilin, a putative synaptic plasma membrane protein. *J. Cell Biol.* **111**, 2041-2052 (1990).
148. Galli, T., McPherson, P. S. & De, C. P. 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 (1996).
149. Prekeris, R. & Terrian, D. M. Brain myosin V is a synaptic vesicle-associated motor protein: evidence for a Ca²⁺-dependent interaction with the synaptobrevin-synaptophysin complex. *J. Cell Biol.* **137**, 1589-1601 (1997).
150. Wheeler, T. C., Chin, L. S., Li, Y., Roudabush, F. L. & Li, L. Regulation of synaptophysin degradation by mammalian homologues of seven in absentia. *J. Biol. Chem.* **277**, 10273-10282 (2002).
151. Rehm, H., Wiedenmann, B. & Betz, H. Molecular characterization of synaptophysin, a major calcium-binding protein of the synaptic vesicle membrane. *EMBO J.* **5**, 535-541 (1986).
152. Thomas, L. *et al.* Identification of synaptophysin as a hexameric channel protein of the synaptic vesicle membrane. *Science* **242**, 1050-1053 (1988).
153. Pennuto, M., Dunlap, D., Contestabile, A., Benfenati, F. & Valtorta, F. Fluorescence resonance energy transfer detection of synaptophysin I and vesicle-associated membrane protein 2 interactions during exocytosis from single live synapses. *Mol. Biol. Cell* **13**, 2706-2717 (2002).
154. Gincel, D. & Shoshan-Barmatz, V. The synaptic vesicle protein synaptophysin: purification and characterization of its channel activity. *Biophys. J.* **83**, 3223-3229 (2002).
155. Arthur, C. P. & Stowell, M. H. Structure of synaptophysin: a hexameric MARVEL-domain channel protein. *Structure* **15**, 707-714 (2007).
156. Spiwox-Becker, I. *et al.* Synaptic vesicle alterations in rod photoreceptors of synaptophysin-deficient mice. *Neuroscience* **107**, 127-142 (2001).
157. Bai, L., Spiwox-Becker, I. & Leube, R. E. Transcriptome comparison of murine wild-type and synaptophysin-deficient retina reveals complete identity. *Brain Res.* **1081**, 53-58 (2006).
158. Abraham, C. *et al.* Synaptic tetraspan vesicle membrane proteins are conserved but not needed for synaptogenesis and neuronal function in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 8227-8232 (2006).
159. Abraham, C. Expressions- und Funktionsanalysen von "Tetraspan Vesicle Membrane Proteins" in *Caenorhabditis elegans*. 1-4-2007. Mainz, Universität Mainz, Institut für Anatomie und Zellbiologie.

160. Xenarios, I. *et al.* DIP: The Database of Interacting Proteins: 2001 update. *Nucleic Acids Res.* **29**, 239-241 (2001).
161. Xenarios, I. *et al.* DIP, the Database of Interacting Proteins: a research tool for studying cellular networks of protein interactions. *Nucleic Acids Res.* **30**, 303-305 (2002).
162. Fields, S. & Song, O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246 (1989).
163. Stephens, D. J. & Banting, G. The use of yeast two-hybrid screens in studies of protein:protein interactions involved in trafficking. *Traffic.* **1**, 763-768 (2000).
164. Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R. & Fields, S. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 9578-9582 (1991).
165. Fields, S. & Sternglanz, R. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet.* **10**, 286-292 (1994).
166. Aronheim, A. *et al.* Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. *Cell* **78**, 949-961 (1994).
167. Broder, Y. C., Katz, S. & Aronheim, A. The ras recruitment system, a novel approach to the study of protein-protein interactions. *Curr. Biol.* **8**, 1121-1124 (1998).
168. Johnsson, N. & Varshavsky, A. Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 10340-10344 (1994).
169. Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N. & te, H. S. A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 5187-5192 (1998).
170. Wilkinson, K. D. Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin. Cell Dev. Biol.* **11**, 141-148 (2000).
171. Hershko, A. & Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425-479 (1998).
172. Hershko, A. The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell-division cycle (Nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **44**, 5932-5943 (2005).
173. Finley, D., Ozkaynak, E. & Varshavsky, A. The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell* **48**, 1035-1046 (1987).
174. Suter, B., Auerbach, D. & Stagljar, I. Yeast-based functional genomics and proteomics technologies: the first 15 years and beyond. *Biotechniques* **40**, 625-644 (2006).
175. Paumi, C. M. *et al.* Mapping protein-protein interactions for the yeast ABC transporter Ycf1p by integrated split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid analysis. *Mol. Cell* **26**, 15-25 (2007).
176. McGee, M. D., Rillo, R., Anderson, A. S. & Starr, D. A. UNC-83 IS a KASH protein required for nuclear migration and is recruited to the outer nuclear membrane by a physical interaction with the SUN protein UNC-84. *Mol. Biol. Cell* **17**, 1790-1801 (2006).
177. Chavan, M. *et al.* Dimeric organization of the yeast oligosaccharyl transferase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 8947-8952 (2006).

178. Zheng, J. *et al.* Analysis of the oligomeric structure of the motor protein prestin. *J. Biol. Chem.* **281**, 19916-19924 (2006).
179. Ma, J. *et al.* LPA2 is required for efficient assembly of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **19**, 1980-1993 (2007).
180. Xue, C., Bahn, Y. S., Cox, G. M. & Heitman, J. G protein-coupled receptor Gpr4 senses amino acids and activates the cAMP-PKA pathway in *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Biol. Cell* **17**, 667-679 (2006).
181. Matsuda, S. *et al.* The familial dementia BRI2 gene binds the Alzheimer gene amyloid-beta precursor protein and inhibits amyloid-beta production. *J. Biol. Chem.* **280**, 28912-28916 (2005).
182. Miller, J. P. *et al.* Large-scale identification of yeast integral membrane protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 12123-12128 (2005).
183. Forster, T. Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann. Phys.* 55-75 (1948).
184. Clegg, R. M. Fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 103-110 (1995).
185. Jares-Erijman, E. A. & Jovin, T. M. FRET imaging. *Nat. Biotechnol.* **21**, 1387-1395 (2003).
186. Jares-Erijman, E. A. & Jovin, T. M. Imaging molecular interactions in living cells by FRET microscopy. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**, 409-416 (2006).
187. Wu, P. & Brand, L. Resonance energy transfer: methods and applications. *Anal. Biochem.* **218**, 1-13 (1994).
188. Karpova, T. S. *et al.* Fluorescence resonance energy transfer from cyan to yellow fluorescent protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a single laser. *J. Microsc.* **209**, 56-70 (2003).
189. van Munster, E. B., Kremers, G. J., djobo-Hermans, M. J. & Gadella, T. W., Jr. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurement by gradual acceptor photobleaching. *J. Microsc.* **218**, 253-262 (2005).
190. Piston, D. W. & Kremers, G. J. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 407-414 (2007).
191. Young, R. M., Arnette, J. K., Roess, D. A. & Barisas, B. G. Quantitation of fluorescence energy transfer between cell surface proteins via fluorescence donor photobleaching kinetics. *Biophys. J.* **67**, 881-888 (1994).
192. Petty, H. R. Fluorescence microscopy: established and emerging methods, experimental strategies, and applications in immunology. *Microsc. Res. Tech.* **70**, 687-709 (2007).
193. Fujita, H., Katoh, H., Ishikawa, Y., Mori, K. & Negishi, M. Rapostlin is a novel effector of Rnd2 GTPase inducing neurite branching. *J. Biol. Chem.* **277**, 45428-45434 (2002).
194. Antonin, W., Riedel, D. & von Mollard, G. F. The SNARE Vti1a-beta is localized to small synaptic vesicles and participates in a novel SNARE complex. *J. Neurosci.* **20**, 5724-5732 (2000).
195. Kang, S. W. *et al.* Clusterin interacts with SCLIP (SCG10-like protein) and promotes neurite outgrowth of PC12 cells. *Exp. Cell Res.* **309**, 305-315 (2005).

196. Peters, P. J. *et al.* Arfaptin 2 regulates the aggregation of mutant huntingtin protein. *Nat. Cell Biol.* **4**, 240-245 (2002).
197. Belizaire, R. *et al.* Characterization of synaptogyrin 3 as a new synaptic vesicle protein. *J. Comp Neurol.* **470**, 266-281 (2004).
198. Sambrook, J. & Russel, D. W. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, (2001).
199. Alexander, J. J., Bey, E. M., Geddes, E. W. & Lecatsas, G. Establishment of a continuously growing cell line from primary carcinoma of the liver. *S. Afr. Med. J.* **50**, 2124-2128 (1976).
200. Gey, G. O., Coffman, W. D. & Kubicek, M. T. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **12**, 264-265 (1952).
201. Ballestrem, C. *et al.* Molecular mapping of tyrosine-phosphorylated proteins in focal adhesions using fluorescence resonance energy transfer. *J. Cell Sci.* **119**, 866-875 (2006).
202. Kirchner, J., Kam, Z., Tzur, G., Bershadsky, A. D. & Geiger, B. Live-cell monitoring of tyrosine phosphorylation in focal adhesions following microtubule disruption. *J. Cell Sci.* **116**, 975-986 (2003).
203. Mülhardt, C. *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag, (2002).
204. Schrimpf, G. *Gentechnische Methoden*. Spektrum Akademischer Verlag, (2002).
205. Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. & Kimura, A. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163-168 (1983).
206. Valentin, G. *et al.* Photoconversion of YFP into a CFP-like species during acceptor photobleaching FRET experiments. *Nat. Methods* **2**, 801 (2005).
207. Zaccolo, M. Use of chimeric fluorescent proteins and fluorescence resonance energy transfer to monitor cellular responses. *Circ. Res.* **94**, 866-873 (2004).
208. Kirber, M. T., Chen, K. & Keaney, J. F., Jr. YFP photoconversion revisited: confirmation of the CFP-like species. *Nat. Methods* **4**, 767-768 (2007).
209. Janz, R. & Sudhof, T. C. Cellugyrin, a novel ubiquitous form of synaptogyrin that is phosphorylated by pp60c-src. *J. Biol. Chem.* **273**, 2851-2857 (1998).
210. Solomaha, E., Szeto, F. L., Yousef, M. A. & Palfrey, H. C. Kinetics of Src homology 3 domain association with the proline-rich domain of dynamins: specificity, occlusion, and the effects of phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **280**, 23147-23156 (2005).
211. Cowan-Jacob, S. W. Structural biology of protein tyrosine kinases. *Cell Mol. Life Sci.* **63**, 2608-2625 (2006).
212. Pawson, T. Protein modules and signalling networks. *Nature* **373**, 573-580 (1995).
213. Pawson, T. Protein-tyrosine kinases. Getting down to specifics. *Nature* **373**, 477-478 (1995).
214. Bradshaw, J. M. & Waksman, G. Molecular recognition by SH2 domains. *Adv. Protein Chem.* **61**, 161-210 (2002).

215. Bradshaw, J. M., Mitaxov, V. & Waksman, G. Investigation of phosphotyrosine recognition by the SH2 domain of the Src kinase. *J. Mol. Biol.* **293**, 971-985 (1999).
216. Zinser, E., Paltauf, F. & Daum, G. Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism. *J. Bacteriol.* **175**, 2853-2858 (1993).
217. Mo, C. & Bard, M. A systematic study of yeast sterol biosynthetic protein-protein interactions using the split-ubiquitin system. *Biochim. Biophys. Acta* **1737**, 152-160 (2005).
218. Veen, M. & Lang, C. Interactions of the ergosterol biosynthetic pathway with other lipid pathways. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1178-1181 (2005).
219. Munro, S. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* **115**, 377-388 (2003).
220. Wasser, C. R., Ertunc, M., Liu, X. & Kavalali, E. T. Cholesterol-dependent balance between evoked and spontaneous synaptic vesicle recycling. *J. Physiol* **579**, 413-429 (2007).
221. Mauch, D. H. *et al.* CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* **294**, 1354-1357 (2001).
222. Martin, T. F. Racing lipid rafts for synaptic-vesicle formation. *Nat. Cell Biol.* **2**, E9-11 (2000).
223. Huttner, W. B. & Schmidt, A. Lipids, lipid modification and lipid-protein interaction in membrane budding and fission--insights from the roles of endophilin A1 and synaptophysin in synaptic vesicle endocytosis. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 543-551 (2000).
224. Rohrbough, J. & Broadie, K. Lipid regulation of the synaptic vesicle cycle. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 139-150 (2005).
225. Nishida, H. I. & Nishida, T. Phospholipid transfer protein mediates transfer of not only phosphatidylcholine but also cholesterol from phosphatidylcholine-cholesterol vesicles to high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* **272**, 6959-6964 (1997).
226. Rao, R., Albers, J. J., Wolfbauer, G. & Pownall, H. J. Molecular and macromolecular specificity of human plasma phospholipid transfer protein. *Biochemistry* **36**, 3645-3653 (1997).
227. Jauhiainen, M. *et al.* Phospholipid transfer protein (PLTP) causes proteolytic cleavage of apolipoprotein A-I. *J. Lipid Res.* **40**, 654-664 (1999).
228. Kostner, G. M. *et al.* Human plasma phospholipid transfer protein accelerates exchange/transfer of alpha-tocopherol between lipoproteins and cells. *Biochem. J.* **305 (Pt 2)**, 659-667 (1995).
229. van, T. A. Phospholipid transfer protein. *Curr. Opin. Lipidol.* **13**, 135-139 (2002).
230. Lusa, S., Jauhiainen, M., Metso, J., Somerharju, P. & Ehnholm, C. The mechanism of human plasma phospholipid transfer protein-induced enlargement of high-density lipoprotein particles: evidence for particle fusion. *Biochem. J.* **313 (Pt 1)**, 275-282 (1996).
231. Tu, A. Y., Nishida, H. I. & Nishida, T. High density lipoprotein conversion mediated by human plasma phospholipid transfer protein. *J. Biol. Chem.* **268**, 23098-23105 (1993).
232. Oram, J. F., Wolfbauer, G., Vaughan, A. M., Tang, C. & Albers, J. J. Phospholipid transfer protein interacts with and stabilizes ATP-binding cassette transporter A1 and enhances cholesterol efflux from cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 52379-52385 (2003).

233. Vuletic, S. *et al.* Widespread distribution of PLTP in human CNS: evidence for PLTP synthesis by glia and neurons, and increased levels in Alzheimer's disease. *J. Lipid Res.* **44**, 1113-1123 (2003).
234. Schmitz, G. & Orso, E. Intracellular cholesterol and phospholipid trafficking: comparable mechanisms in macrophages and neuronal cells. *Neurochem. Res.* **26**, 1045-1068 (2001).
235. Albers, J. J. *et al.* Functional expression of human and mouse plasma phospholipid transfer protein: effect of recombinant and plasma PLTP on HDL subspecies. *Biochim. Biophys. Acta* **1258**, 27-34 (1995).
236. Vuletic, S. *et al.* Reduced CSF PLTP activity in Alzheimer's disease and other neurologic diseases; PLTP induces ApoE secretion in primary human astrocytes in vitro. *J. Neurosci. Res.* **80**, 406-413 (2005).
237. Nishida, H. I., Klock, D. G., Guo, Z., Jakstys, B. P. & Nishida, T. Phospholipid transfer protein can transform reconstituted discoidal HDL into vesicular structures. *Biochim. Biophys. Acta* **1349**, 222-232 (1997).
238. Zeniou-Meyer, M. *et al.* Phospholipase D1 production of phosphatidic acid at the plasma membrane promotes exocytosis of large dense-core granules at a late stage. *J. Biol. Chem.* **282**, 21746-21757 (2007).
239. Corrotte, M. *et al.* Dynamics and function of phospholipase D and phosphatidic acid during phagocytosis. *Traffic*. **7**, 365-377 (2006).
240. Klein, J. Functions and pathophysiological roles of phospholipase D in the brain. *J. Neurochem.* **94**, 1473-1487 (2005).
241. Jones, D., Morgan, C. & Cockcroft, S. Phospholipase D and membrane traffic. Potential roles in regulated exocytosis, membrane delivery and vesicle budding. *Biochim. Biophys. Acta* **1439**, 229-244 (1999).
242. Jenkins, G. M. & Frohman, M. A. Phospholipase D: a lipid centric review. *Cell Mol. Life Sci.* **62**, 2305-2316 (2005).
243. Massenburg, D. *et al.* Activation of rat brain phospholipase D by ADP-ribosylation factors 1,5, and 6: separation of ADP-ribosylation factor-dependent and oleate-dependent enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 11718-11722 (1994).
244. Hammond, S. M. *et al.* Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1. Activation of the purified enzymes by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, ADP-ribosylation factor, and Rho family monomeric GTP-binding proteins and protein kinase C- α . *J. Biol. Chem.* **272**, 3860-3868 (1997).
245. Tsai, S. C. *et al.* Effects of arfaptin 1 on guanine nucleotide-dependent activation of phospholipase D and cholera toxin by ADP-ribosylation factor. *J. Biol. Chem.* **273**, 20697-20701 (1998).
246. Shin, O. H. & Exton, J. H. Assays and properties of arfaptin 2 binding to Rac1 and ADP-ribosylation factors (Arfs). *Methods Enzymol.* **404**, 359-367 (2005).
247. Tarricone, C. *et al.* The structural basis of Arfaptin-mediated cross-talk between Rac and Arf signalling pathways. *Nature* **411**, 215-219 (2001).

248. Henage, L. G., Exton, J. H. & Brown, H. A. Kinetic analysis of a mammalian phospholipase D: allosteric modulation by monomeric GTPases, protein kinase C, and polyphosphoinositides. *J. Biol. Chem.* **281**, 3408-3417 (2006).
249. Munck, A., Bohm, C., Seibel, N. M., Hashemol, H. Z. & Hampe, W. Hu-K4 is a ubiquitously expressed type 2 transmembrane protein associated with the endoplasmic reticulum. *FEBS J.* **272**, 1718-1726 (2005).
250. Pedersen, K. M., Finsen, B., Celis, J. E. & Jensen, N. A. Expression of a novel murine phospholipase D homolog coincides with late neuronal development in the forebrain. *J. Biol. Chem.* **273**, 31494-31504 (1998).
251. Hattori, H. & Kanfer, J. N. Synaptosomal phospholipase D potential role in providing choline for acetylcholine synthesis. *J. Neurochem.* **45**, 1578-1584 (1985).
252. Jones, D. H. *et al.* Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase directly interacts with ADP-ribosylation factor 1 and is responsible for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis in the golgi compartment. *J. Biol. Chem.* **275**, 13962-13966 (2000).
253. Moritz, A., De Graan, P. N., Gispén, W. H. & Wirtz, K. W. Phosphatidic acid is a specific activator of phosphatidylinositol-4-phosphate kinase. *J. Biol. Chem.* **267**, 7207-7210 (1992).
254. Stenmark, H. Cycling lipids. *Curr. Biol.* **10**, R57-R59 (2000).
255. Vicogne, J. *et al.* Asymmetric phospholipid distribution drives in vitro reconstituted SNARE-dependent membrane fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 14761-14766 (2006).
256. Kozlovsky, Y., Chernomordik, L. V. & Kozlov, M. M. Lipid intermediates in membrane fusion: formation, structure, and decay of hemifusion diaphragm. *Biophys. J.* **83**, 2634-2651 (2002).
257. Sarri, E. *et al.* Regulation of phospholipase D activity in synaptosomes permeabilized with *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *FEBS Lett.* **440**, 287-290 (1998).
258. Waring, M. *et al.* Modulation of neuronal phospholipase D activity under depolarizing conditions. *FEBS Lett.* **464**, 21-24 (1999).
259. Chung, J. K. *et al.* Synaptojanin inhibition of phospholipase D activity by hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **272**, 15980-15985 (1997).
260. Lee, C. *et al.* Inhibition of phospholipase D by clathrin assembly protein 3 (AP3). *J. Biol. Chem.* **272**, 15986-15992 (1997).
261. Blood, P. D. & Voth, G. A. Direct observation of Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-induced membrane curvature by means of molecular dynamics simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 15068-15072 (2006).
262. Habermann, B. The BAR-domain family of proteins: a case of bending and binding? *EMBO Rep.* **5**, 250-255 (2004).
263. Liu, L. *et al.* SCAMP2 Interacts with Arf6 and Phospholipase D1 and Links Their Function to Exocytotic Fusion Pore Formation in PC12 Cells. *Mol. Biol. Cell* (2005).
264. Liao, H. *et al.* Secretory carrier membrane protein SCAMP2 and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate interactions in the regulation of dense core vesicle exocytosis. *Biochemistry* **46**, 10909-10920 (2007).

265. Bloom, O. *et al.* Colocalization of synapsin and actin during synaptic vesicle recycling. *J. Cell Biol.* **161**, 737-747 (2003).
266. Chi, P., Greengard, P. & Ryan, T. A. Synaptic vesicle mobilization is regulated by distinct synapsin I phosphorylation pathways at different frequencies. *Neuron* **38**, 69-78 (2003).
267. Cheetham, J. J. *et al.* Identification of synapsin I peptides that insert into lipid membranes. *Biochem. J.* **354**, 57-66 (2001).
268. Jockusch, B. M., Rothkegel, M. & Schwarz, G. Linking the synapse to the cytoskeleton: a breath-taking role for microfilaments. *Neuroreport* **15**, 1535-1538 (2004).
269. Bourne, J., Morgan, J. R. & Pieribone, V. A. Actin polymerization regulates clathrin coat maturation during early stages of synaptic vesicle recycling at lamprey synapses. *J. Comp Neurol.* **497**, 600-609 (2006).
270. Shupliakov, O. *et al.* Impaired recycling of synaptic vesicles after acute perturbation of the presynaptic actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 14476-14481 (2002).
271. Sankaranarayanan, S., Atluri, P. P. & Ryan, T. A. Actin has a molecular scaffolding, not propulsive, role in presynaptic function. *Nat. Neurosci.* **6**, 127-135 (2003).
272. Dresbach, T., Qualmann, B., Kessels, M. M., Garner, C. C. & Gundelfinger, E. D. The presynaptic cytomatrix of brain synapses. *Cell Mol. Life Sci.* **58**, 94-116 (2001).
273. Witke, W. The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol.* **14**, 461-469 (2004).
274. Lassing, I. & Lindberg, U. Specificity of the interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and the profilin:actin complex. *J. Cell Biochem.* **37**, 255-267 (1988).
275. Lassing, I. & Lindberg, U. Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature* **314**, 472-474 (1985).
276. Reinhard, M. *et al.* The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *EMBO J.* **14**, 1583-1589 (1995).
277. Gertler, F. B., Niebuhr, K., Reinhard, M., Wehland, J. & Soriano, P. Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell* **87**, 227-239 (1996).
278. Witke, W. *et al.* In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly. *EMBO J.* **17**, 967-976 (1998).
279. Giesemann, T. *et al.* Complex formation between the postsynaptic scaffolding protein gephyrin, profilin, and Mena: a possible link to the microfilament system. *J. Neurosci.* **23**, 8330-8339 (2003).
280. Wang, X. *et al.* 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 (1999).
281. Watanabe, N. *et al.* p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J.* **16**, 3044-3056 (1997).

282. Miyagi, Y. *et al.* Delphilin: a novel PDZ and formin homology domain-containing protein that synaptically colocalizes and interacts with glutamate receptor delta 2 subunit. *J. Neurosci.* **22**, 803-814 (2002).
283. Neuhoff, H. *et al.* The actin-binding protein profilin I is localized at synaptic sites in an activity-regulated manner. *Eur. J. Neurosci.* **21**, 15-25 (2005).
284. Witke, W., Sutherland, J. D., Sharpe, A., Arai, M. & Kwiatkowski, D. J. Profilin I is essential for cell survival and cell division in early mouse development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 3832-3836 (2001).
285. Gareus, R., Di, N. A., Rybin, V. & Witke, W. Mouse profilin 2 regulates endocytosis and competes with SH3 ligand binding to dynamin 1. *J. Biol. Chem.* **281**, 2803-2811 (2006).
286. Yin, H. L. & Janmey, P. A. Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Physiol* **65**, 761-789 (2003).
287. Sun, Y., Carroll, S., Kaksonen, M., Toshima, J. Y. & Drubin, D. G. PtdIns(4,5)P₂ turnover is required for multiple stages during clathrin- and actin-dependent endocytic internalization. *J. Cell Biol.* **177**, 355-367 (2007).
288. Murthy, V. N. & De, C. P. Cell biology of the presynaptic terminal. *Annu. Rev. Neurosci.* **26**, 701-728 (2003).
289. Souza-Schorey, C., Boshans, R. L., McDonough, M., Stahl, P. D. & Van, A. L. A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *EMBO J.* **16**, 5445-5454 (1997).
290. Boshans, R. L., Szanto, S., Van, A. L. & Souza-Schorey, C. ADP-ribosylation factor 6 regulates actin cytoskeleton remodeling in coordination with Rac1 and RhoA. *Mol. Cell Biol.* **20**, 3685-3694 (2000).
291. Lee, S. *et al.* Actin directly interacts with phospholipase D, inhibiting its activity. *J. Biol. Chem.* **276**, 28252-28260 (2001).
292. Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635 (2002).
293. Negishi, M. & Katoh, H. Rho family GTPases as key regulators for neuronal network formation. *J. Biochem. (Tokyo)* **132**, 157-166 (2002).
294. Hall, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-514 (1998).
295. Chardin, P. Function and regulation of Rnd proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 54-62 (2006).
296. Nishi, M. *et al.* RhoN, a novel small GTP-binding protein expressed predominantly in neurons and hepatic stellate cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **67**, 74-81 (1999).
297. Decourt, B., Bouleau, Y., Dulon, D. & Hafidi, A. Expression analysis of neuroleukin, calmodulin, cortactin, and Rho7/Rnd2 in the intact and injured mouse brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **159**, 36-54 (2005).
298. Tanaka, H., Katoh, H. & Negishi, M. Pragmin, a novel effector of Rnd2 GTPase, stimulates RhoA activity. *J. Biol. Chem.* **281**, 10355-10364 (2006).
299. Watanabe, T., Noritake, J. & Kaibuchi, K. Regulation of microtubules in cell migration. *Trends Cell Biol.* **15**, 76-83 (2005).

300. Yan, Y. & Broadie, K. In vivo assay of presynaptic microtubule cytoskeleton dynamics in *Drosophila*. *J. Neurosci. Methods* **162**, 198-205 (2007).
301. Andrieux, A., Salin, P. A. & Job, D. [A role for microtubules in mental diseases?]. *Pathol. Biol. (Paris)* **52**, 89-92 (2004).
302. Chae, Y. C. *et al.* Inhibition of muscarinic receptor-linked phospholipase D activation by association with tubulin. *J. Biol. Chem.* **280**, 3723-3730 (2005).
303. Kahn, R. A. *et al.* Arf family GTPases: roles in membrane traffic and microtubule dynamics. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1269-1272 (2005).
304. Clement, M. J. *et al.* N-terminal stathmin-like peptides bind tubulin and impede microtubule assembly. *Biochemistry* **44**, 14616-14625 (2005).
305. Bieche, I. *et al.* Expression of stathmin family genes in human tissues: non-neural-restricted expression for SCLIP. *Genomics* **81**, 400-410 (2003).
306. Ozon, S., Byk, T. & Sobel, A. SCLIP: a novel SCG10-like protein of the stathmin family expressed in the nervous system. *J. Neurochem.* **70**, 2386-2396 (1998).
307. Curmi, P. A. *et al.* The stathmin/tubulin interaction in vitro. *J. Biol. Chem.* **272**, 25029-25036 (1997).
308. Beretta, L., Dobransky, T. & Sobel, A. Multiple phosphorylation of stathmin. Identification of four sites phosphorylated in intact cells and in vitro by cyclic AMP-dependent protein kinase and p34cdc2. *J. Biol. Chem.* **268**, 20076-20084 (1993).
309. Baldassa, S., Gnesutta, N., Fascio, U., Sturani, E. & Zippel, R. SCLIP, a microtubule-destabilizing factor, interacts with RasGRF1 and inhibits its ability to promote Rac activation and neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* **282**, 2333-2345 (2007).
310. Shumyatsky, G. P. *et al.* stathmin, a gene enriched in the amygdala, controls both learned and innate fear. *Cell* **123**, 697-709 (2005).
311. McClung, C. A. & Nestler, E. J. Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and DeltaFosB. *Nat. Neurosci.* **6**, 1208-1215 (2003).
312. Takaki, M. *et al.* Increased expression of synaptophysin and stathmin mRNAs after methamphetamine administration in rat brain. *Neuroreport* **12**, 1055-1060 (2001).
313. Rademacher, D. J., Napier, T. C. & Meredith, G. E. Context modulates the expression of conditioned motor sensitization, cellular activation and synaptophysin immunoreactivity. *Eur. J. Neurosci.* **26**, 2661-2668 (2007).
314. Ujike, H., Takaki, M., Kodama, M. & Kuroda, S. Gene expression related to synaptogenesis, neuritogenesis, and MAP kinase in behavioral sensitization to psychostimulants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **965**, 55-67 (2002).
315. Marie-Claire, C. *et al.* Rnd family genes are differentially regulated by 3,4-methylenedioxymethamphetamine and cocaine acute treatment in mice brain. *Brain Res.* **1134**, 12-17 (2007).
316. Sanchez-Pulido, L., Martin-Belmonte, F., Valencia, A. & Alonso, M. A. MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 599-601 (2002).

317. Estrada, B. *et al.* The MARVEL domain protein, Singles Bar, is required for progression past the pre-fusion complex stage of myoblast fusion. *Dev. Biol.* **307**, 328-339 (2007).
318. Zhao, H. & Nonet, M. L. A conserved mechanism of synaptogyrin localization. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2275-2289 (2001).
319. Ruvinsky, I., Ohler, U., Burge, C. B. & Ruvkun, G. Detection of broadly expressed neuronal genes in *C. elegans*. *Dev. Biol.* **302**, 617-626 (2007).
320. Lloyd, T. E. *et al.* A genome-wide search for synaptic vesicle cycle proteins in *Drosophila*. *Neuron* **26**, 45-50 (2000).
321. Lustgarten, V. & Gerst, J. E. Yeast VSM1 encodes a v-SNARE binding protein that may act as a negative regulator of constitutive exocytosis. *Mol. Cell Biol.* **19**, 4480-4494 (1999).
322. Fernandez-Chacon, R. & Sudhof, T. C. Novel SCAMPs lacking NPF repeats: ubiquitous and synaptic vesicle-specific forms implicate SCAMPs in multiple membrane-trafficking functions. *J. Neurosci.* **20**, 7941-7950 (2000).
323. Fykse, E. M. *et al.* Relative properties and localizations of synaptic vesicle protein isoforms: the case of the synaptophysins. *J. Neurosci.* **13**, 4997-5007 (1993).
324. Hannah, M. J., Weiss, U. & Huttner, W. B. Differential extraction of proteins from paraformaldehyde-fixed cells: lessons from synaptophysin and other membrane proteins. *Methods* **16**, 170-181 (1998).
325. Wu, T. T. & Castle, J. D. Evidence for colocalization and interaction between 37 and 39 kDa isoforms of secretory carrier membrane proteins (SCAMPs). *J. Cell Sci.* **110 (Pt 13)**, 1533-1541 (1997).
326. Lazzell, D. R., Belizaire, R., Thakur, P., Sherry, D. M. & Janz, R. SV2B regulates synaptotagmin 1 by direct interaction. *J. Biol. Chem.* **279**, 52124-52131 (2004).
327. Fernandez-Chacon, R., varez de, T. G., Hammer, R. E. & Sudhof, T. C. Analysis of SCAMP1 function in secretory vesicle exocytosis by means of gene targeting in mice. *J. Biol. Chem.* **274**, 32551-32554 (1999).
328. Fernandez-Chacon, R., Achiriloaie, M., Janz, R., Albanesi, J. P. & Sudhof, T. C. SCAMP1 function in endocytosis. *J. Biol. Chem.* **275**, 12752-12756 (2000).
329. Castle, A. & Castle, D. 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 (2005).
330. Wu, T. T. & Castle, J. D. Tyrosine phosphorylation of selected secretory carrier membrane proteins, SCAMP1 and SCAMP3, and association with the EGF receptor. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1661-1674 (1998).
331. Antonin, W. *et al.* A SNARE complex mediating fusion of late endosomes defines conserved properties of SNARE structure and function. *EMBO J.* **19**, 6453-6464 (2000).
332. Antonin, W., Fasshauer, D., Becker, S., Jahn, R. & Schneider, T. R. Crystal structure of the endosomal SNARE complex reveals common structural principles of all SNAREs. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 107-111 (2002).
333. Atlashkin, V. *et al.* Deletion of the SNARE *vti1b* in mice results in the loss of a single SNARE partner, syntaxin 8. *Mol. Cell Biol.* **23**, 5198-5207 (2003).

334. Kreykenbohm, V., Wenzel, D., Antonin, W., Atlachkine, V. & von Mollard, G. F. The SNAREs vti1a and vti1b have distinct localization and SNARE complex partners. *Eur. J. Cell Biol.* **81**, 273-280 (2002).
335. Lupashin, V. V., Pokrovskaya, I. D., McNew, J. A. & Waters, M. G. Characterization of a novel yeast SNARE protein implicated in Golgi retrograde traffic. *Mol. Biol. Cell* **8**, 2659-2676 (1997).
336. von Mollard, G. F., Nothwehr, S. F. & Stevens, T. H. The yeast v-SNARE Vti1p mediates two vesicle transport pathways through interactions with the t-SNAREs Sed5p and Pep12p. *J. Cell Biol.* **137**, 1511-1524 (1997).
337. Fischer von, M. G. & Stevens, T. H. The *Saccharomyces cerevisiae* v-SNARE Vti1p is required for multiple membrane transport pathways to the vacuole. *Mol. Biol. Cell* **10**, 1719-1732 (1999).
338. Bailleul, B., Akerblom, I. & Strosberg, A. D. The leptin receptor promoter controls expression of a second distinct protein. *Nucleic Acids Res.* **25**, 2752-2758 (1997).
339. Mercer, J. G. *et al.* B219/OB-R 5'-UTR and leptin receptor gene-related protein gene expression in mouse brain and placenta: tissue-specific leptin receptor promoter activity. *J. Neuroendocrinol.* **12**, 649-655 (2000).
340. Huang, Y. *et al.* Cloning and characterization of a novel human leptin receptor overlapping transcript-like 1 gene (LEPROTL1). *Biochim. Biophys. Acta* **1517**, 327-331 (2001).
341. Lee, G. H. *et al.* Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* **379**, 632-635 (1996).
342. Fruhbeck, G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem. J.* **393**, 7-20 (2006).
343. Harvey, J., Solovyova, N. & Irving, A. Leptin and its role in hippocampal synaptic plasticity. *Prog. Lipid Res.* **45**, 369-378 (2006).
344. Harvey, J. Leptin: a diverse regulator of neuronal function. *J. Neurochem.* **100**, 307-313 (2007).
345. Power, D. A., Noel, J., Collins, R. & O'Neill, D. Circulating leptin levels and weight loss in Alzheimer's disease patients. *Dement. Geriatr. Cogn Disord.* **12**, 167-170 (2001).
346. Fewlass, D. C. *et al.* Obesity-related leptin regulates Alzheimer's Abeta. *FASEB J.* **18**, 1870-1878 (2004).
347. Shanley, L. J., Irving, A. J., Rae, M. G., Ashford, M. L. & Harvey, J. Leptin inhibits rat hippocampal neurons via activation of large conductance calcium-activated K⁺ channels. *Nat. Neurosci.* **5**, 299-300 (2002).
348. Chiang, S. H. & MacDougald, O. A. Will fatty worms help cure human obesity? *Trends Genet.* **19**, 523-525 (2003).

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Name
3'-UTR	3'-nichttranslatierte Region
3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
Acadv1	<i>Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain</i>
AD	Transkriptionsaktivierungsdomäne
ade	Adenin
AK	Antikörper
AP	Adapterprotein
ARF	ADP-Ribosylierungs-Faktor
Arfaptin2	<i>ADP-ribosylation factor interacting protein 2</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Bindungsdomäne
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Calm1	<i>Calmodulin 1</i>
Calm2	<i>Calmodulin 2</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CFP	<i>Cyan fluorescent protein</i>
CIAP	<i>Calf intestine alkaline phosphatase</i>
Cub	C-terminale Hälfte des Ubiquitin
Cx32	<i>Connexin32</i>
D4Erd196e	<i>DNA segment, Chr 4, ERATO Doi 196, expressed</i>
DAG	Diacylglycerol
ddH ₂ O	Doppelt-destilliertes Wasser
d-HDL	<i>discoidal high density lipoprotein</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECFP	<i>Enhanced cyan fluorescent protein</i>
ECL	<i>Enhanced chemi-luminescence</i>
EYFP	<i>Enhanced yellow fluorescent protein</i>
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FRET-AB	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer- <i>Acceptor Photobleaching</i>
g	Gramm
GAP	<i>Rab3 GTPase-activating protein</i>
GDI	<i>Rab GDP dissociation inhibitor</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>

Abkürzung	Name
Glrx5	<i>Glutaredoxin5 homolog</i>
Gpsn2	<i>Glycoprotein, synaptic 2</i>
Grina	<i>Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate-associated protein 1</i>
Gstp2	<i>Glutathione S-transferase, pi 2</i>
gt	Ziege
GTP	Guanosintriphosphat
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
his	Histidin
HRP	<i>Horse-radish-peroxidase</i>
HVA	<i>High voltage activated</i>
IF	Immunfluoreszenz
IPL	Innere plexiforme Schicht der Retina
ISC	<i>Inter-System-Crossing</i>
Itm2b	<i>Integral membrane protein 2B</i>
kb	Kilobasen
Kcnk1	<i>Potassium channel, subfamily K, member 1</i>
kDa	Kilodalton
kW	Kilowatt
Leprot	<i>Leptin receptor overlapping transcript</i>
leu	Leucin
LOC100043703	<i>Similar to tumor protein, translationally-controlled 1</i>
LPA	Lysophosphatidsäure
LPAAT	<i>Lysophosphatidic acid acyl transferase</i>
LSM	Laser-Scanning Mikroskop
LTPs	<i>Long-term potentiations</i>
M	Molmasse
mc	Maus
min	Minuten
NdrG4	<i>N-myc downstream regulated gene 4</i>
Ndufa12l	<i>Ndufa12-like</i>
NEM	N-Ethylmaleimid
NGS	<i>Normal goat serum</i>
Nkain4	<i>Na⁺/K⁺ transporting ATPase interacting 4</i>
nm	Nanometer
NP-40	Nonident p-40
NSF	<i>N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein</i>
Nsg1	<i>Neuron specific gene family member 1</i>
Nub	N-terminale Hälfte des Ubiquitin
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
OPL	Äußere plexiforme Schicht der Retina
PA	Phosphatidsäure
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>

Abkürzung	Name
PFA	Paraformaldehyd
Pfn1	<i>Profilin 1</i>
PI	Phosphatidylinositol
PIP	Phosphatidylinositol-4-phosphat
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLD	Phospholipase D
Pltp	Phospholipid transfer protein
Pltp	<i>Phospholipid transfer protein</i>
Ppia	<i>Peptidylprohyl isomerase A</i>
Ppp1r16a	<i>Protein phosphatase 1, regulatory subunit 16A</i>
Ppp3r1	<i>Calcineurin B, type I</i>
PTZ	Pentylentetrazol
Q	Guanin
R	Arginin
rb	Kaninchen
Rgs10	<i>Regulator of G-protein signaling 10</i>
RNA	Ribonukleinsäure
Rnd2	<i>Rho family GTPase Rnd2</i>
Rnf10	<i>Ring finger protein10</i>
Rnf41	<i>Ring finger protein 41</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
S	Supernatant
SCAMP	<i>Secretory carrier-associated membrane protein</i>
SD	<i>Synthetic dropout</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SF	<i>Starting fraction</i>
Siah	E3 Ubiquitin-Protein Ligase
Slc22a17	<i>Solute carrier family 22, member 17</i>
SNAP-25	<i>Synaptosomal-associated protein of 25 kDa, t-SNARE</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor</i>
SPH	<i>Synaptophysin</i>
STMN3	<i>Statbmin-like3</i>
STP	<i>Short-term potentiation</i>
Syb2	<i>Synaptobrevin2</i>
SYNGR3	<i>Synaptogyrin3</i>
Syp	<i>Synaptophysin</i>
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	<i>Thermophilus aquaticus</i> -Polymerase
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tmem147	<i>Transmembrane protein 147</i>
Tmem163	<i>Transmembrane protein 163</i>
trp	Tryptophan
t-SNARE	<i>Target membrane- soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor</i>
Tspan5	<i>Tetraspanin 5</i>

Abkürzung	Name
Tusc3	<i>Tumor suppressor candidate 3</i>
TVP	<i>Tetraspan vesicle membrane protein</i>
UBPs	Ubiquitin spezifische Proteasen
UBPS	Ubiquitin spezifische Proteasen
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
VAMP2	<i>Vesicle-associated membrane protein 2</i>
Vkorc1	<i>Vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1</i>
v-SNARE	<i>Vesicular-soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor</i>
Vti1b	<i>Vesicle transport through interaction with t-SNAREs 1B homolog</i>
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen
WB	Western Blot
xg	Erdbeschleunigung
Y2H	<i>Yeast Two-Hybrid</i>
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>

7.2 Generierte Konstrukte

Konstrukt	Klon-Nr.	FP Primer	RP Primer	Restriktion
pCCW-Sph	4040	04-89	05-174	XbaI
pCCW-SUC-Sph	4041	05-44	05-175	SfiI
pCCW-STE-Sph	4042	05-44	05-175	SfiI
pNCW-Sph	4039	05-127	05-128	SacII
pDL2xN-SCAMP1	4044	05-01	05-177	XmaI/Bsu15I
pDL2xN-SUC-SCAMP1	4046	05-110	05-178	SfiI
pDL2xN-STE-SCAMP1	4048	05-112	05-178	SfiI
pDL2xN-Sph	4043	04-99	05-176	BamHI/Bsu15I
pDL2xN-SUC-Sph	4045	05-44	05-175	SfiI
pDL2xN-STE-Sph	4047	05-109	05-175	SfiI
pECFP-N1-STMN3	4051	06-105	06-106	HindIII/BamHI
pECFP-N1-SYNGR3	4052	06-107	06-108	HindIII/BamHI
pECFP-N1-Arfaptin2	4053	06-109	06-110	HindIII/BamHI
pECFP-N1-PLD4	4054	06-111	09-112	HindIII/BamHI
pECFP-N1-SCAMP1	4056	06-115	06-116	NheI/AgeI
pECFP-N1-Rnd2	4057	06-121	06-122	HindIII/BamHI
pEYFP-SPH (YFP-Sph)	4064	07-06	07-07	BsrGI/NotI