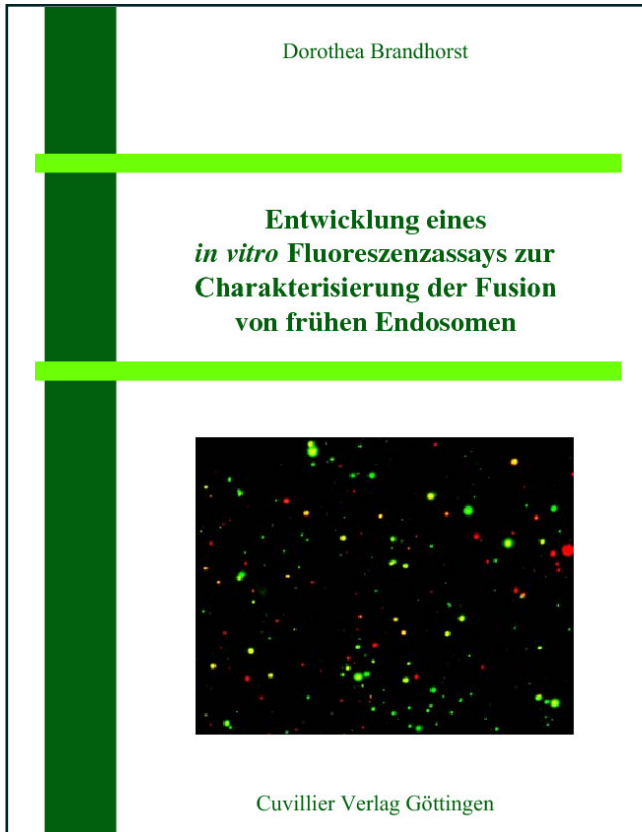




Dorothea Brandhorst (Autor)

Entwicklung eines *in vitro* Fluoreszenzassays zur Charakterisierung der Fusion von frühen Endosomen



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/2603>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Endozytose	2
1.1.1	Phagozytose.....	3
1.1.2	Pinozytose	3
1.1.2.1	Makropinozytose	4
1.1.2.2	Clathrin-abhängige Endozytose	5
1.1.2.3	Caveolae-vermittelte Endozytose.....	7
1.1.2.4	Clathrin- und Caveolae-unabhängige Endozytose	8
1.2	Der endozytotische Weg	8
1.2.1	Recycling von synaptischen Vesikeln.....	8
1.2.2	Frühe Endosomen und Recycling-Endosomen	9
1.2.3	<i>Endosomal Carrier Vesicles</i> (ECVs)	11
1.2.4	Späte Endosomen	12
1.2.5	Lysosomen	13
1.3	Membranfusion	14
1.3.1	SNARE-Proteine als Vermittler der Membranfusion	14
1.3.2	Endosomenfusion	17
1.3.2.1	Bildung von Rab-Effektor-Domänen als Voraussetzung für die Fusion von frühen Endosomen.....	18
1.3.2.2	Weitere Funktionen von Rab5 und seinen Effektoren auf Endosomen	22
1.3.2.3	Kandidaten für einen funktionellen SNARE-Komplex auf frühen Endosomen ..	23
1.3.3	Die Vakuolenfusion in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
1.4	<i>In vitro</i> -Assays zur Messung der Endosomenfusion.....	26
1.5	Ziel dieser Arbeit.....	29
2	Material und Methoden	30
2.1	Chemikalien und besondere Geräte.....	30
2.2	Software	30
2.3	Biochemische Standardmethoden	31
2.3.1	Proteinbestimmung.....	31
2.3.2	SDS-PAGE und Immunoblot.....	31
2.4	Antikörper	32
2.5	Herstellung von F _{ab} -Fragmenten	32
2.6	Zellkultur	33
2.7	Zytosolpräparation	33
2.8	Marker für die Fusionsassays	34
2.9	3D-Rekonstruktion von frühen Endosomen in PC12-Zellen	35
2.10	<i>Fluid phase</i> -Internalisierung der Marker in frühe Endosomen	35
2.11	Präparation von subzellulären Fraktionen.....	36
2.12	Biochemischer <i>in vitro</i> -Fusionsassay	37
2.13	Vorbereitung der Deckgläser für den Fluoreszenzassay	37
2.14	<i>In vitro</i> -Fluoreszenzassay.....	38
2.15	Bildbearbeitung und Auswertung des Fluoreszenzassays.....	39
2.15.1	Größenbestimmung von frühen Endosomen.....	40
2.15.2	Klassifikation von <i>docking</i> - und Fusionsereignissen	41
2.16	Tetraspeck-Beads	41
2.17	Nycodenz-Gradienten.....	41
2.18	Adsorption der Endosomen an die Deckgläser	42
2.19	Inhibierungsexperimente mit NEM, BAPTA und BoNT/E	42

2.20	Inhibierungsexperimente mit F _{ab} -Fragmenten und rekombinanten Proteinen	43
2.21	Überprüfung der Verdünnungsresistenz.....	44
2.22	Immunocytochemische Untersuchungen an isolierten frühen Endosomen	44
2.22.1	Bildanalyse und Bestimmung der Kollokalisationsrate	45
3	Ergebnisse	46
3.1	Entwicklung eines neuen <i>in vitro</i> -Fluoreszenzassays zur Messung der Fusion von frühen Endosomen aus PC12-Zellen.....	46
3.1.1	<i>In vivo</i> Markierung von frühen Endosomen in PC12-Zellen	47
3.1.2	Optimierung der Dichtegradientenzentrifugation zur Anreicherung der frühen Endosomen	47
3.1.3	Mikroskopische Bilder des Fluoreszenzassays	51
3.1.4	Bestimmung der Größe von frühen Endosomen und Klassifikation von Fusion und <i>docking</i> im Fluoreszenzassay	54
3.1.5	Adsorptionseffizienz der Endosomen an die Deckgläser.....	57
3.1.6	Kointernalisierung beider Marker und Verwendung von Tetraspeck-Beads als Referenz im Fluoreszenzassay	59
3.2	Charakterisierung der Fusion von frühen Endosomen	60
3.3	Verdünnungsresistenz der Fusionsreaktion.....	63
3.4	Identifizierung von Komponenten der Fusionsmaschinerie auf frühen Endosomen	64
3.4.1	NEM und die dominant negative α -SNAP-Mutante L294A inhibieren die Fusion von frühen Endosomen.....	64
3.4.2	Inhibierungsexperimente mit F _{ab} -Fragmenten	67
3.4.3	Inhibierungsexperimente mit rekombinanten SNARE-Proteinen.....	68
3.5	Immunocytochemische Untersuchungen an isolierten frühen Endosomen	73
4	Diskussion	76
4.1	Etablierung und Charakterisierung eines neuen <i>in vitro</i> -Fluoreszenzassays zur Messung der Fusion von frühen Endosomen aus PC12-Zellen	76
4.1.1	Fluoreszenzmarkierung der Endosomen und Auswertung der Signale.....	77
4.1.2	Heterogenität der Signalstärke	79
4.1.3	Fusionseffizienz im Fluoreszenzassay	81
4.2	Detektion von Fusion und <i>docking</i> im Fluoreszenzassay	82
4.3	Regulation der Fusion früher Endosomen durch SNARE-Proteine.....	84
4.3.1	Kandidaten für einen funktionellen SNARE-Komplex auf frühen Endosomen ..	85
5	Literatur	94
6	Anhang	112
6.1	Untersuchung der Signifikanz von beobachteten Abständen.....	112
6.2	Visual basic Macros für die Fluoreszenzassay-Analyse mit Excel.....	114
6.3	Berechnung der Korrelationskoeffizienten zur Untersuchung der Kollokalisation der Signale der immunocytochemischen Untersuchungen an isolierten frühen Endosomen	118