

Aus dem Bereich Physiologie  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Der molekulare Primingmechanismus von CAPS:  
Kontrolluntersuchungen zur Open-Syntaxin-Hypothese**

*Dissertation zur Erlangung eines Grades des Doktors der Medizin*

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2014

vorgelegt von: Johannes Martin Schneider

geboren am: 01.12.1983 in Regensburg



Aus dem Bereich Physiologie  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Der molekulare Primingmechanismus von CAPS:  
Kontrolluntersuchungen zur Open-Syntaxin-Hypothese**

*Dissertation zur Erlangung eines Grades des Doktors der Medizin*

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2014

vorgelegt von: Johannes Martin Schneider  
geboren am: 01.12.1983 in Regensburg

# INHALTSVERZEICHNIS

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN.....	VII
ZUSAMMENFASSUNG/ SUMMARY .....	IX
<b>1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 REGULIERTE EXOZYTOSE: EIN BASISPROZESS NEURONALER KOMMUNIKATION.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 PHYSIOLOGIE DER NEURONALEN REGULIERTEN EXOZYTOSE.....</b>	<b>3</b>
1.2.1 BILDUNG VON NEUROTRANSMITTERN UND VESIKELN .....	3
1.2.2 TRANSPORT DER VESIKEL AN DIE „AKTIVE ZONES“ .....	4
1.2.3 DOCKING.....	5
1.2.4 PRIMING .....	6
1.2.5 SEKRETION.....	7
1.2.5.1 Auslösen der Sekretion über Kalziumsignale .....	7
1.2.5.2 Pools sekretionsbereiter Vesikel .....	9
1.2.5.3 Membranfusion.....	10
1.2.6 RECYCLING.....	11
1.2.7 FLUSSMODELL DER VESIKEL.....	12
1.2.8 PLASTIZITÄT DER NEURONALEN REGULIERTEN EXOZYTOSE .....	15
<b>1.3 MOLEKULARE EFFEKTOREN DER NEURONALEN REGULIERTEN EXOZYTOSE.....</b>	<b>18</b>
1.3.1 SNARE-PROTEINE UND SNARE-KOMPLEX .....	19
1.3.1.1 Morphologie.....	19
1.3.1.2 Physiologie .....	21
1.3.2 SYNTAXIN 1A .....	23
1.3.2.1 Morphologie.....	23
1.3.2.2 Physiologie .....	26
1.3.2.3 Mutationen und Krankheiten .....	26
1.3.3 SEC1/MUNC18.....	27
1.3.4 MUNC13 .....	28
1.3.5 CAPS .....	29
1.3.5.1 Morphologie.....	30
1.3.5.2 Physiologie .....	31
1.3.5.3 Mutationen und Krankheiten .....	33
1.3.6 WEITERE MOLEKÜLE DER NEURONALEN REGULIERTEN EXOZYTOSE .....	34
<b>1.4 FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>35</b>

<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>36</b>
<b>2.1</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>36</b>
2.1.1	VERWENDETE SUBSTANZEN .....	36
2.1.1.1	Reagenzien .....	36
2.1.1.2	Enzyme .....	37
2.1.1.3	Antikörper .....	37
2.1.1.4	Primer .....	38
2.1.2	ZUSAMMENSETZUNG DER BENÖTIGTEN LÖSUNGEN .....	38
2.1.2.1	Lösungen: Gewinnung der Chromaffinzellen .....	38
2.1.2.2	Lösungen: Transduktion .....	40
2.1.2.3	Lösungen: Elektrophysiologie .....	42
2.1.2.4	Lösungen: Immunocytochemie .....	43
<b>2.2</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>45</b>
2.2.1	GEWINNUNG DER CHROMAFFINZELLEN .....	45
2.2.1.1	Wildtyp- und CAPS-DKO-Mäuse .....	45
2.2.1.2	Zellpräparation und Zellkultur .....	45
2.2.1.3	Genotypisierung der CAPS-KO-Mäuse .....	46
2.2.2	TRANSDUKTION .....	48
2.2.3	ELEKTROPHYSIOLOGIE .....	48
2.2.3.1	Aufbau des Patchclamp-Setups .....	48
2.2.3.2	Zelloberflächenbestimmung mittels Membrankapazitätsmessung .....	49
2.2.3.3	Ratiometrische Kalziumkonzentrationsbestimmung .....	49
2.2.3.4	Kalziumfreisetzung durch UV-Lyse von NP-EGTA .....	51
2.2.3.5	Versuchsprotokoll der Patchclamp-Experimente .....	52
2.2.3.6	Discarding criteria/ Ausschlusskriterien .....	52
2.2.3.7	Datenanalyse .....	53
2.2.4	FLUORESZENZ-MIKROSKOPIE .....	53
2.2.4.1	Immunocytochemie .....	53
2.2.4.2	Structured Illumination Microscopy .....	54

<b>3</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b> .....	<b>56</b>
<b>3.1</b>	<b>EFFEKTE DER STX1A – ÜBEREXPRESSION AUF DIE LDCV-SEKRETION IM CAPS-DKO</b> .....	<b>56</b>
3.1.1	NOTWENDIGE VORBEMERKUNGEN .....	56
3.1.2	AUSWERTUNG ALLER REGISTRIERTEN SEKRETIONEN .....	58
3.1.2.1	Flash-induzierte Sekretion im CAPS-DKO bei Stx1A-Überexpression.....	58
3.1.2.2	Kontrolle der Versuchsbedingungen in Bezug auf Sekretion .....	59
3.1.2.3	Kontrolle auf Effekte der Stx1A-Überexpression im Wildtyp .....	60
3.1.2.4	Kontrolle auf Effekte der Virusbelastung auf die Sekretion .....	61
3.1.2.5	Mittlere Pre-Flash- und Post-Flash-Kalziumkonzentrationen.....	62
3.1.2.6	Berücksichtigung der Autosekretion .....	63
3.1.2.7	Berücksichtigung der Unterschiede in der Ausgangsmembran Kapazität.....	64
3.1.3	ERGEBNISSE SPEZIFISCHER UNTERGRUPPEN IM ÜBERBLICK .....	65
3.1.3.1	Untergruppen mit vergleichbaren Pre-Flash-Kalziumkonzentrationen .....	65
3.1.3.2	Randomisierung nach Messtagen .....	67
3.1.4	ANALYSE VON BURST-SEKRETION UND SUSTAINED RATE.....	70
3.1.5	FAZIT DER ELEKTROPHYSIOLOGISCHEN MESSUNGEN .....	74
<b>3.2</b>	<b>ZELLULÄRE LOKALISATION VON STX1A UND OPEN-STX BEI ÜBEREXPRESSION</b> .....	<b>75</b>
<b>4</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b> .....	<b>77</b>
<b>4.1</b>	<b>LDCV-SEKRETION UND DIE INTERAKTION VON CAPS UND SYNTAXIN</b> .....	<b>77</b>
4.1.1	SEKRETION BEI (OPEN-)SYNTAXIN-ÜBEREXPRESSION.....	77
4.1.2	DIE ROLLE VON CAPS FÜR DIE SEKRETION.....	81
<b>4.2</b>	<b>KURZE DISKUSSION WEITERER ERGEBNISSE UND BEOBACHTUNGEN</b> .....	<b>85</b>
4.2.1	SYNTAXIN-CLUSTER IN WT-CHROMAFFINZELLEN .....	85
4.2.2	STX1A-ÜBEREXPRESSION UND INTRAZELLULÄRE KALZIUMKONZENTRATION.....	85
	LITERATURVERZEICHNIS .....	86
	DANKSAGUNG .....	102

## Verzeichnis der Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
BHK	Syrian baby hamster kidney
bp	Basenpaare
BAPTA	1,2-bis(2-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraacetat
BSA	Bovine Serum Albumin
CAPS	Calcium-dependent Activator Protein for Secretion
$C_m$	Membrankapazität
$Ca^{2+}$	Zweiwertige Kalziumionen
$[Ca^{2+}]_i$	Intrazelluläre Kalziumionenkonzentration
DKO	Double-Knock-Out
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPTA	Diethylentriaminpentaacetat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	enhanced GFP
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
FCS	Fetal Calf Serum
fF	femto-Farad
GFP	Green Fluorescent Protein
GTP	Guanosintriphosphat
$H_2O_{dest.}$	Destilliertes Wasser
$H_2O_{bidest.}$	Bidestilliertes Wasser
HBS	HEPES buffered saline
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl)-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IRES	Internal Ribosome Entry Site
IST-X	Insulin-Transferrin-Selenium-X Supplement
kDa	Kilo-Dalton
$K_D$	Dissoziationskonstante
kHz	Kilo-Hertz
KO	Knock-Out
LDCV	Large Dense Core Vesicle
M	molar, mol/l

min	Minuten
mM	millimolar, mmol/l
MΩ	Mega-Ohm
n	Anzahl
NGS	Normal Goat Serum
nM	nanomolar, nanomol/l
NP-EGTA	Nitrophenyl-EGTA
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pen/Strep	Penicillin G/Streptomycin
pF	pico Farad
RNA	Ribonucleic acid
RRP	Rapidly Releasable Pool
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SD	Standardabweichung
SFV	Semliki Forest Virus
SNAP-25	Synaptosome Associated Protein of 25 kDa
SNARE	Soluble NSF Attachment Protein Receptor
SRP	Slowly Releasable Pool
Stx	Syntaxin
UPP	Unprimed Pool
UV	Ultraviolett
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar, μmol/l

## Zusammenfassung/ Summary

### Der molekulare Primingmechanismus von CAPS: Kontrolluntersuchungen zur Open-Syntaxin-Hypothese

Das Calcium-dependent-Activator-Protein-for-Secretion (CAPS) ist ein wichtiger Priming-Faktor für die neuroendokrine Sekretion. Ein Priming-Faktor fördert die Bildung sezernierbarer Vesikel aus einem Pool vorgeformter und an der Zellmembran angebundener, jedoch noch nicht zur Sekretion bereiter Vesikel. Fehlt CAPS, wie in CAPS-Double-Knock-Out-Mäusen (CAPS-DKO), wird nach Stimulation eine deutlich verringerte Anzahl von Large-Dense-Core-Vesikeln (LDCV) aus den Chromaffinzellen des Nebennierenmarks ausgeschüttet. Die Expression einer konstitutiv-offenen Form des SNARE-Proteins Syntaxin 1A konnte sowohl in Wildtyp- als auch in CAPS-DKO-Chromaffinzellen die Anzahl sekretionsbereiter Vesikel steigern, so dass auch bei letzteren ein Sekretionsvermögen über Wildtypniveau erreicht wurde. (Begleitend trat dabei eine Einschränkung der Auffüllungsprozesse der Pools sekretionsbereiter Vesikel auf.) Es wurde daher die Hypothese vorgeschlagen, dass CAPS die Überführung von Syntaxin 1A aus der geschlossenen in die offene Konformation fördert und darüber seine Priming-Funktion ausübt.

Denkbar wäre jedoch auch, dass die Vergrößerung der Pools sekretionsbereiter Vesikel bei Open-Syntaxin-Expression unabhängig von der konstitutiv-offenen Konformation zu Stande kommt und stattdessen nur eine Folge der erhöhten Anzahl an Syntaxin-Molekülen ist. Dies ist insbesondere eine interessante Alternativhypothese, da experimentelle Hinweise auf eine Beteiligung von CAPS an der Zusammenführung der für die Fusionsreaktion zentralen SNARE-Proteine vorliegen.

Um diese Hypothesen zum molekularen Wirkmechanismus von CAPS weiter zu untersuchen, wurden Patch-Clamp-Experimente mit Stimulation der Exozytose durch Flash-Photolysis von Kalziumchelatoren in Kombination mit Überexpression von natürlichem Syntaxin 1A in CAPS-DKO- und Wildtyp-Chromaffinzellen durchgeführt. Weiter war die Überprüfung der zellulären Lokalisation von zusätzlich eingebrachten Syntaxin-1A- und Open-Syntaxin-Molekülen mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Es konnte gezeigt werden, dass die Vermehrung sekretionsbereiter Vesikel eine spezifische Wirkung der konstitutiv-offenen Form von Syntaxin ist. Die Hemmung der Nachlieferungsprozesse von fusionskompetenten Vesikeln wird jedoch durch die vermehrt eingebrachten Syntaxin-Moleküle unabhängig von deren Konformation hervorgerufen. Beide Syntaxin-Formen erreichen darüber hinaus bei Überexpression in großer Zahl die Zellmembran, so dass Unterschiede im intrazellulären Transport als Ursache der unterschiedlichen Effekte auf die Sekretion ausscheiden. In der Diskussion erfolgt eine Einordnung der Hypothesen zum molekularen Wirkmechanismus von CAPS in das durch diese Ergebnisse erweiterte Gesamtbild.

## **The molecular mechanism of CAPS's priming: Testing the open-Syntaxin-hypothesis**

The Calcium-dependent-Activator-Protein-for-Secretion (CAPS) is an important priming factor for neuroendocrine secretion. A priming factor enhances the transformation of vesicles out of a pool of preformed and docked, but not yet releasable vesicles, to a release-ready state. When CAPS is missing, as is the case in CAPS-Double-Knock-Out-mice (CAPS-DKO), stimulated exocytosis of Large-Dense-Core-Vesicles (LDCVs) from chromaffin cells of the adrenal medulla is strongly reduced. The expression of a constitutive open form of the SNARE-protein Syntaxin 1A led to an increase in the number of releasable vesicles in wild type- and CAPS-DKO chromaffin cells, resulting in greater secretion in CAPS-DKO cells than that of wild type cells. (Concomitantly, there was a reduction of the refilling reaction of the pools of releasable vesicles.) This led to the proposal of the hypothesis that CAPS acts as a priming factor by promoting the transition of Syntaxin to its open form.

Nevertheless, it is possible that the increase in the pools of release-ready vesicles following expression of open-Syntaxin is independent of the constitutively open form of Syntaxin and simply a result of the higher number of Syntaxin molecules present at the cell membrane.

This alternative hypothesis is particularly interesting, since there is experimental support for a role of CAPS in assembling the SNARE-proteins, the central molecules for fusion.

To further investigate the molecular mechanism of CAPS's priming, patch-clamp experiments combined with flash-photolysis of caged-calcium to stimulate exocytosis, in combination with overexpression of Syntaxin 1A, were performed in CAPS-DKO and wild-type chromaffin cells.

Furthermore the intracellular localization of the artificially expressed Syntaxin 1A and open-Syntaxin molecules was tested by immunofluorescence microscopy.

It could be shown, that the increase in releasable vesicles is a specific effect of the constitutively open form of Syntaxin. The decrease in the refilling reactions of the pools of fusion competent vesicles is, however, a result of the elevated amount of Syntaxin molecules independent of their conformation.

Moreover, both forms of Syntaxin reach the cell membrane in high numbers when overexpressed. Thus it appears that differences in intracellular transport do not account for the difference between effects of wild-type Syntaxin 1A and open-Syntaxin 1A on secretion.

The implications for the hypothesis of the molecular mechanism of CAPS are discussed in light of this refined view.

# 1 Einleitung und Fragestellung

## 1.1 Regulierte Exozytose: Ein Basisprozess neuronaler Kommunikation

Biologische Zellen und ihre Organelle sind durch oberflächlich negativ geladene Phospholipidmembranen umschlossen und dadurch voneinander abgegrenzt. Im Laufe der Evolution hat sich jedoch ein molekulares System entwickelt, das unter Energieverbrauch die elektrostatischen Abstoßungskräfte überwinden und die Verschmelzung der Membranen zweier Kompartimente, auch Membranfusion genannt, bewirken kann.

Verschmilzt ein intrazelluläres Kompartiment mit der Zellmembran, so spricht man von Exozytose, da dabei Membranbestandteile an die Zelloberfläche gebracht und im Kompartiment enthaltene Substanzen nach extrazellulär ausgeschüttet werden. Neben der Bedeutung der Membranfusion bei intrazellulären Transportvorgängen und der strukturellen Zusammensetzung der Zellmembran ist sie auch wichtig für Funktionen die einen gesamten Organismus betreffen, wie das kontrollierte Freisetzen von Hormonen oder die Ausschüttung zytotoxischer Substanzen durch Zellen des Immunsystems. Insbesondere ist eine hochgradig regulierte Form der Exozytose ein fundamentaler Prozess neuronaler Informationsübertragung und daher dort in hochdifferenzierter Form ausgebildet (Burgess & Kelly, 1987).

Man unterscheidet im Nervensystem zwischen der gezielten Ausschüttung von Signalstoffen, sogenannten Neurotransmittern, an wenige, definierte Zellen über unterschiedlichste spezialisierte Synapsen und der neuroendokrinen Sekretion, bei der Botenstoffe typischerweise an den Blutkreislauf abgegeben werden und somit prinzipiell alle zugänglichen Zellen des Organismus erreichen. Um Zellen ersteren Typs handelt es sich bei den meisten Neuronen, deren grundsätzliche Bauweise und Funktion dem abgebildeten Schema folgt.

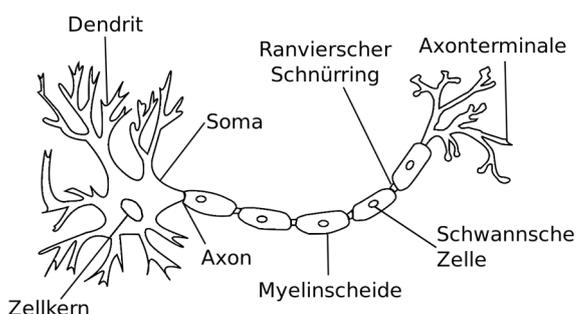


Abb. 1.1: „Neuron“ nach [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Neuron\\_\(deutsch\)-1.svg#mediaviewer/Datei:Neuron\\_\(deutsch\)-1.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Neuron_(deutsch)-1.svg#mediaviewer/Datei:Neuron_(deutsch)-1.svg) (Stand 15.08.2014)

Neuronen erhalten Information über Rezeptoren an ihren Dendriten. Dadurch wird eine Änderung des lokalen Membranpotentials induziert, welche im Zellsoma am Abgang des Axons registriert und bei ausreichender Amplitude frequenzkodiert über spezifische Membranpotentialschwankungen, sogenannte Aktionspotentiale, über das Axon an die Synapsen weitergeleitet wird. Synapsen bestehen aus dem als Präsynapse bezeichneten Membranabschnitt der informationssendenden Zelle, dem dazwischenliegenden Spalt und dem gegenüberliegenden Membranabschnitt auf den Dendriten der empfangenden Zelle, der Postsynapse. An der Präsynapse werden als Reaktion auf ankommende Aktionspotentiale Kalziumkanäle geöffnet und der folgende Kalziumeinstrom initiiert die Exozytose von kleinen intrazellulären Kompartimenten, den sogenannten Vesikeln. Die in den Vesikeln enthaltenen Neurotransmitter gelangen auf diese Weise nach extrazellulär, diffundieren durch den synaptischen Spalt und treffen auf spezifische Rezeptoren der Postsynapse, wo sie wiederum Änderungen des Membranpotentials auslösen.

Zellen des zweiten, also neuroendokrinen Typs, sind beispielsweise die verschiedenen hormone sezernierenden Zellen der Neurohypophyse oder die Chromaffinzellen im Nebennierenmark von Säugetieren. Letztere werden als besondere Form der postganglionären sympathischen Neurone angesehen und geben nach Stimulation durch das sympathische Nervensystem die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin an den Blutkreislauf ab. Diese Botenstoffe docken an Zellmembranrezeptoren in den verschiedensten Geweben an und versetzen so den Organismus in einen Zustand höchster körperlicher Leistungsfähigkeit und geistiger Fokussierung, mit dem Ziel ihn auf eine womöglich bevorstehende Kampf- oder Fluchtsituation vorzubereiten.

Reizaufnahme und Neurotransmittersekretion laufen bei neuroendokrinen Zellen und Neuronen nach den gleichen Prinzipien und mittels gleicher oder eng verwandter molekularer Strukturen ab. Chromaffinzellen weisen dabei jedoch nicht die für Neurone typische Gliederung in Dendriten, Zellsoma und Axon auf, sondern präsentieren sich in Zellkultur gleichförmig rund. Aufgrund der funktionellen Ähnlichkeit, die eine Übertragung der Erkenntnisse auf Neuronen denkbar macht, und ihrer für elektrophysiologische Untersuchungen günstigen Morphologie gehören sie zu den am besten untersuchten Nervenzellen in Bezug auf Sekretion (Burgoyne & Morgan, 1998).

Ich habe Chromaffinzellen auch bei meinen Experimenten verwendet und möchte daher bei der folgenden detaillierteren Darstellung der Physiologie der regulierten Exozytose neben der Beschreibung grundsätzlicher Vorgänge im Speziellen auf diese eingehen.

## 1.2 Physiologie der neuronalen regulierten Exozytose

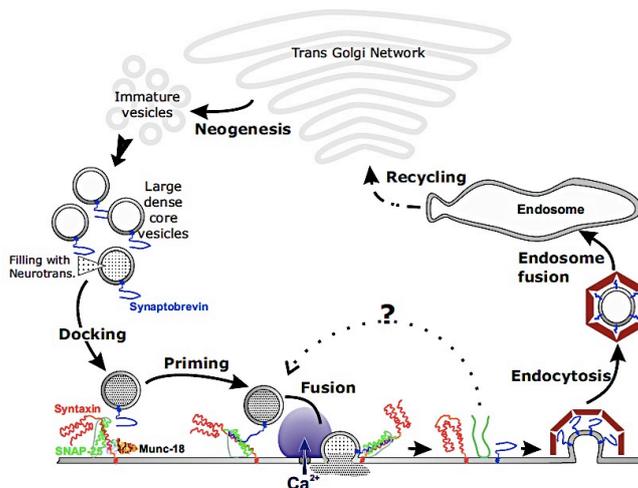


Abb. 1.2: Teilschritte der regulierten Exozytose (von Ute Becherer, nach (Becherer & Rettig, 2006))

Für die regulierte Exozytose müssen Neurotransmitter gebildet, in Vesikel verpackt und an den Ort der Sekretion gebracht werden. Dort ist es für eine schnelle und exakte Informationsübertragung notwendig, dass eine bestimmte Anzahl von Vesikeln innerhalb von Sekundenbruchteilen auf ein Aktionspotential hin mit der Zellmembran fusioniert und ihre enthaltenen Neurotransmitter freisetzt. Dafür müssen die jeweiligen Vesikel in Bereitschaft versetzt werden, was als „Priming“ bezeichnet wird. In diesem Kontext spielt auch das beobachtete Anheften von Vesikeln an die Zellmembran, das sogenannte „Docking“ eine wichtige Rolle. Der durch das Aktionspotential hervorgerufene Einstrom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen muss von den sekretionsbereiten Vesikeln registriert und die Membranfusion durchgeführt werden. An die erfolgte Exozytose schließen sich Recycling-Prozesse zur Rückgewinnung der beteiligten Moleküle an.

Modifikationen dieser Teilprozesse können Veränderungen von Übertragungsrate und Intensität der Informationsübermittlung bewirken, welche als Mechanismus der synaptischen Kurzzeitplastizität essentiell für Denk- und Lernprozesse sind.

Diese hier im Überblick beschriebenen Teilschritte der neuronalen regulierten Exozytose möchte ich im Folgenden genauer darstellen.

### 1.2.1 Bildung von Neurotransmittern und Vesikeln

Als Neurotransmitter sind eine Vielzahl von Substanzen unterschiedlicher Natur bekannt. So fand man als Botenstoffe verschiedene Proteine, Oligopeptide, einzelne Aminosäuren sowie Abwandlungen davon, Fettsäurederivate, Nukleinsäuren, etc.. Sie werden je nach Typ des Botenstoffs im Zellsoma oder an der Präsynapse gebildet und in Vesikeln gespeichert.

Die Vesikel bilden sich als Abstülpungen des Golgiapparats und schließen dabei schon ihre Neurotransmitter ein oder werden im Zellsoma beziehungsweise der Präsynapse mit ihren Transmittern gefüllt. So erfolgt beispielsweise das Laden der Katecholamine in die Vesikel der Chromaffinzellen über vesikuläre Monoamintransporter entlang eines, über eine Protonenpumpe aufrecht erhaltenen,  $H^+$ -Gradienten.

Morphologisch unterscheidet man größere (Durchmesser ca. 120 nm in der Maus), elektronendichte und deswegen als Large-dense-core-vesicles (LDCV) bezeichnete Vesikel, von kleinen, im Elektronenmikroskopbild klaren Vesikeln, den sogenannten synaptischen Vesikeln (SV, Durchmesser ca 40 nm). Die LDCVs enthalten große Proteintransmitter oder an Protein gebundene Neurotransmitter und erscheinen durch ihren hohen Proteingehalt dunkel im Elektronenmikroskop. Der Großteil der Vesikel der Chromaffinzellen sind LDCVs, da die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin dort an Vertreter der Proteinfamilie der Chromogranine gebunden sind. Daneben enthalten sie noch Enkephalin und Neuropeptid Y als Botenstoffe. Klare, synaptische Vesikel findet man hingegen in Chromaffinzellen nur in geringer Anzahl, so dass sie maximal 3-5% der Gesamtsekretion stellen (Plattner, Artalejo, & Neher, 1997; Qu, Akbergenova, Hu, & Schikorski, 2009; D. R. Stevens, Schirra, Becherer, & Rettig, 2011).

### **1.2.2 Transport der Vesikel an die „Aktive Zones“**

Im Zellsoma gebildete, neurotransmittergefüllte Vesikel werden mithilfe von Motorproteinen, wie Kinesin, entlang des Zytoskeletts zur Membran und im Fall des klassischen Neurons auf diese Weise über das Axon zur Synapse transportiert.

In Neuronen sammeln sich die Vesikel in Clustern an proteinreichen Membranabschnitten der Präsynapse, den sogenannten „Active Zones“, die je nach Zell- und Synapsentyp spezifische Formen annehmen und für die regulierte Exozytose entscheidende molekulare Effektoren enthalten (Zhai & Bellen, 2004). Dort liegen unter anderem in enger Nachbarschaft zu den synaptischen Vesikeln spannungsgesteuerte Kalziumkanäle (Zenisek, Davila, Wan, & Almers, 2003).

Diese strenge Lokalisation an „Active Zones“ gilt jedoch nur für synaptische Vesikel. LDCVs werden in Chromaffinzellen und auch in Neuronen nicht an diesen, im Elektronenmikroskop verdickt und dunkel erscheinenden Membranbereichen, sezerniert (Hammarlund, Watanabe, Schuske, & Jorgensen, 2008). Somit ist auch die enge räumliche Kopplung zwischen Kalziumkanälen und den Orten, an denen die Membranfusion stattfindet, in den ausschließlich LDCVs sezernierenden Chromaffinzellen weniger ausgeprägt (M. M. Wu, Llobet, & Lagnado, 2009).

Eine genaue örtliche Orientierung der Sekretion ist in den endokrinen Chromaffinzellen auch weniger notwendig, da sie nicht mit einer gegenüberliegenden Postsynapse exakt kommunizieren, sondern ihre Katecholamine an den Blutkreislauf abgeben.

### **1.2.3 Docking**

Unabhängig davon, ob eine „Active Zone“ ausgebildet ist, beobachtet man, dass manche der Vesikel molekular an der Zellmembran befestigt sind. Diese werden als „docked“ bezeichnet und in ihrer Gesamtheit als „Docked Pool“ zusammengefasst. Die ohne Kontakt zur Membran im Zytosol liegenden Vesikel bilden den sogenannten Depotpool.

Hinweise auf Größe und Anordnung des Docked Pools können mittels Elektronenmikroskopie (EM) gewonnen werden. Insbesondere die Entwicklung des „high pressure freezings“ zur Herstellung der Zell- und Gewebeproben für EM-Aufnahmen in neuerer Zeit hat durch die Reduktion von Strukturveränderungen an der Membran zu einer besseren Diskriminierung der „Docked Vesicles“ geführt (Hammarlund, Palfreyman, Watanabe, Olsen, & Jorgensen, 2007; D. R. Stevens, Schirra, Becherer, & Rettig, 2011).

Weiterhin trifft man jedoch auf die Schwierigkeit, dass ein Elektronenmikroskopbild einen Schnitt durch eine Zelle darstellt und dabei zwangsläufig nicht alle abgebildeten Vesikel am Ort ihres größten Durchmessers getroffen wurden. Man findet daher in Publikationen zwei verschiedene Kriterien, wie Docked Vesicles in elektronenmikroskopischen Aufnahmen definiert werden: 1. Vesikel, die einen sichtbaren Kontakt mit der Membran haben (Schikorski & Stevens, 2001) und 2. Vesikel, deren Mittelpunkt maximal einen mittleren Vesikelradius von der Zellmembran entfernt ist (Borisovska et al., 2005). Bei Anwendung des ersten Kriteriums wird die Größe des Docked Pools jedoch systematisch unterschätzt. Um die beschriebene Schwierigkeit zu umgehen kann man als weitere Möglichkeit die kumulative Distanz der Vesikel von der Membran bestimmen, was in vergleichenden Studien eine Aussage über Verschiebungen der Vesikel an die Membran treffen lässt.

Eine andere Methode zur Untersuchung von Docking-Vorgängen ist die sogenannte „Total internal reflection-fluorescence-microscopy“-Technik (TIRF). Durch in einem bestimmten Winkel schräg einfallendes Licht wird dabei nur ein Bereich bis maximal 200 nm über dem Objektträger illuminiert. Indem man Vesikel mit fluoreszierendem Cargo füllt oder mit fluoreszierenden Farbstoffen färbt und mittels spezifischen Anregungslichts sichtbar macht, wird es damit möglich, selektiv Vesikelprozesse in der Nähe oder an der Zellmembran zu beobachten, wodurch ein dynamisches Bild von Dockingvorgängen gewonnen werden kann.

Durch Zählen der Vesikel mit diesen Methoden war offensichtlich, dass deutlich mehr Docked Vesicles in einer Zelle vorhanden sind, als bei den verschiedenen, auch intensiven, Stimulationen ausgeschüttet werden, unabhängig davon, über welche Definition man den Docked Pool ermittelte. Daraus konnte abgeleitet werden, dass der Eigenschaft „docked“ nicht die Eigenschaft „sekretionsbereit“ entspricht. Erschöpfende Sekretion ging jedoch mit einer Reduktion der gedockten Vesikel in EM und TIRF einher. Diese Reduktion und insbesondere das direkte Beobachten der Vesikel an der Membran im TIRF-Mikroskop, wo man ein immobiles Verweilen von Vesikeln an der Membran vor der Sekretion beobachten konnte, sprechen dafür, dass das Docking der Vesikel an die Membran einen Zwischenschritt vor der Fusion darstellt (Nofal, Becherer, Hof, Matti, & Rettig, 2007; Plattner, Artalejo, & Neher, 1997; Steyer, Horstmann, & Almers, 1997).

Schwächere Hinweise, dass Sekretion aus dem Docked Pool heraus geschieht, liefern die Beobachtungen, dass hippocampale Neuronen bei einer erschöpfenden Stimulation mit 40 Aktionspotenzialen bei 20 Hz so viele Vesikel ausschütten, wie es der Zahl der gedockten Vesikel entspricht (Schikorski & Stevens, 2001) und dass bei Flash-Experimenten auf unphysiologisch hohe Kalziumkonzentrationen mit nachfolgend langanhaltend erhöhter intrazellulärer Kalziumkonzentration in Chromaffinzellen und Melanozyten nach 40 Sekunden eine Obergrenze der Sekretion erreicht wird, welche wiederum der Zahl der gedockten Vesikel entspricht (Parsons, Coorssen, Horstmann, & Almers, 1995). Die unphysiologisch hohen Kalziumkonzentrationen, die geringen Zellzahlen und die Definition des Dockings als Kontakt mit der Zellmembran limitieren jedoch die Aussagekraft dieser Experimente.

#### **1.2.4 Priming**

Wie beschrieben wurde beobachtet, dass nur ein Teil der Vesikel an der Membran zur Sekretion bereit steht. Dies und die weiter in den oben angeführten TIRF-Experimenten gemachte Beobachtung, dass Vesikel für ca. 90 Sekunden an der Membran verweilen bevor sie fusionieren, deutet darauf hin, dass noch weitere Reifeprozesse nach dem Andocken der Vesikel an die Membran stattfinden, bevor ein Vesikel ausgeschüttet werden kann. Auch die im folgenden Kapitel angeführten Erkenntnisse, dass die sekretionsbereiten Vesikel in Untergruppen mit verschiedenen Ausschüttungswahrscheinlichkeiten, Sekretionsgeschwindigkeiten und Kalziumsensitiväten vorliegen, weisen auf solche mehrstufigen Reifungsschritte hin.

Die Prozesse, die ein Docked Vesicle auf physiologische Stimuli sekretionsbereit machen, werden in der Gesamtheit als Priming und die resultierenden Vesikel als Primed Vesicles bezeichnet. Die an die Membran angebundener, aber nicht sekretionsbereiten Vesikel werden dementsprechend

dem Unprimed Pool (UPP) zugeordnet. Sekretionsbereit bezeichnet die Fähigkeit von Vesikeln samt Sekretionsapparat, bei Kontakt mit Kalziumionen ohne weitere Faktoren die Membranfusion durchführen zu können.

Das Priming ist ebenso wie das Auslösen der Sekretion ein kalziumabhängiger Vorgang. Es weist jedoch im Vergleich dazu eine höhere Kalziumsensitivität auf. Somit kommt es bei moderater Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration (im unstimulierten Zustand ca. 100 nM) zu einer vermehrten Bereitstellung von sekretionsbereiten Vesikeln. Diese Steigerung erreicht in vivo eine Obergrenze bei ca. 600 nM  $[Ca^{2+}]_i$ , da bei darüber hinausgehenden intrazellulären Kalziumkonzentrationen bereits eine relevante spontane Sekretion einsetzt, die die Zahl der sekretionsbereiten Vesikel parallel zum stattfindenden Priming übermäßig reduziert (Smith, Moser, Xu, & Neher, 1998; Voets, 2000; von Ruden & Neher, 1993).

### **1.2.5 Sekretion**

Der Sekretionsprozess der regulierten neuronalen Exozytose ist die kalzium-getriggerte Membranfusion von Vesikel- und Zellmembran.

#### **1.2.5.1 Auslösen der Sekretion über Kalziumsignale**

Wie beschrieben, wird Sekretion physiologisch durch den Einstrom von Kalzium nach Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle infolge der Depolarisation der Zellmembran durch eintreffende Aktionspotentiale vermittelt.

Experimentell kann Sekretion über den Weg der Membrandepolarisation ausgelöst werden über Applikation hochkonzentrierter Sucrose-Lösung, mechanische Stimulation der Membran, Erhöhen der extrazellulären Kaliumkonzentration, Wirkung von Feldelektroden oder Anlegen elektrischer Spannung an die Zellmembran in Patchclamp-Technik. Letztere ist die technisch aufwändigste, aber auch vielseitigste und physiologischste Methode, da Depolarisationen in verschiedenen Formen - bestenfalls im Spannungsverlauf eines Aktionspotentials - und in variablen Frequenzen aufgebracht werden können.

Durch die Depolarisation der Zellmembran werden physiologisch wie auch experimentell spannungsgesteuerte Kalziumkanäle geöffnet. Dadurch kann physiologisch extrazellulär in zehntausendfach höherer Konzentration vorliegendes Kalzium entlang des Konzentrations- und Ladungsgefälles nach intrazellulär strömen und die Ausschüttung sekretionsbereiter Vesikel triggern.

Das einschießende Kalzium breitet sich durch Diffusion konzentrisch intrazellulär aus, so dass in räumlichen und zeitlichen Abstand zum geöffneten Kalziumkanal die lokale Kalziumkonzentration graduell abnimmt. In diesem Zusammenhang spricht man von der Bildung lokalisierter Kalziummikrodomänen. Höchstwerte der Kalziumkonzentration innerhalb der Mikrodomäne von 10 bis 20 nm um einen Kalziumkanal herum können ausgehend von einer Ruhekonzentration von 100 nmol/l in weniger als 100  $\mu$ s nach Kanalöffnung 100  $\mu$ mol/l oder mehr erreichen. In einer Entfernung von 100-200 nm steigt hingegen die Kalziumkonzentration langsamer und erreicht nur zweistellige  $\mu$ -molare Spitzenwerte. Im Rahmen von Millisekunden nach der Kanalöffnung gleichen sich die lokalen Kalziumkonzentrationen der gesamten Präsynapse/Chromaffinzelle dann wieder auf einen leicht erhöhten Wert an (Bollmann & Sakmann, 2005; Heidelberger, Heinemann, Neher, & Matthews, 1994; Neher, 1998).

Diese Bildung von Kalziummikrodomänen hat zur Folge, dass Vesikel in unterschiedlicher Entfernung zu Kalziumkanälen unterschiedlichen Kalziumkonzentrationen und damit einem unterschiedlichen Stimulus (weiteres dazu siehe Kapitel „Flussmodell der Vesikelpools“) ausgesetzt sind.

Um diesen Einfluss auszuschalten und die Gesamtheit der Vesikel und die molekulare Fusionsmaschinerie zu untersuchen, wurden die sogenannten „Flash-Experimente“ entwickelt. Dabei wird Kalzium, an einen photolabilen Chelator gebunden, über die Patchpipette in die Zelle infundiert und durch Applikation eines kurzen UV-Lichtblitzes freigesetzt, was zu einer schlagartigen und homogenen Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration führt.

Diese Technik wurde 1994 in Chromaffinzellen eingeführt (Heinemann, Chow, Neher, & Zucker, 1994) und seitdem haben vor allem verschiedene Flash-Experimente mit dem photolabilen Kalzium-Chelator NP-EGTA zu Fortschritten bei der Untersuchung der neuronalen regulierten Exozytose geführt (Ashery et al., 2000; Voets, Neher, & Moser, 1999; Voets, 2000).

Die Stärke der ausgelösten Sekretion kann bei Neuronen aufgrund der meist für Patch-clamp unzugänglichen kleinen Synapsen nur indirekt aus der Größe der postsynaptischen Antwort abgeleitet werden. In den großen Chromaffinzellen ohne Synapsen kann in Whole-Cell-Patchclamp die Sekretion von Vesikeln über die durch Fusion vergrößerte Zelloberfläche als Änderung der elektrischen Kapazität der Zellmembran gemessen werden (Neher & Marty, 1982).

### **1.2.5.2 Pools sekretionsbereiter Vesikel**

Bei den Vesikeln, die zur Sekretion beitragen, konnte man je nach Art des Experiments verschiedene Untergruppen (Vesikel-Pools) differenzieren:

Mittels Depolarisationsexperimenten, konnte man zwei Pools sekretionsbereiter Vesikel unterscheiden. Einen schnell ausgeschütteten Immediately-Releasable-Pool (IRP) und einen 4 bis 10-mal größeren, um den Faktor 30 langsamer sezernierten Pool, den Readily-Releasable-Pool. Die Vesikel des IRP werden bei kurzen Depolarisationen, wie Aktionspotentialen, sezerniert, die Vesikel des Readily-releasable-Pools erst bei längerandauernden Stimulationen (Horrigan & Bookman, 1994; Voets, Neher, & Moser, 1999).

Bei den Flash-Experimente findet man eine schnelle Ausschüttung vieler Vesikel, den sogenannten „Burst“, gefolgt von einer kontinuierlichen Sekretion (Sustained Release), was man als Ausschüttung aller sekretionsbereiten Vesikel und einer durch Kalzium geförderten, parallel ablaufenden Sequenz von Priming und Sekretion aus dem UPP interpretiert. Diese Burst-Sekretion in der ersten Sekunde nach der Flash-Freisetzung von Kalzium präsentiert sich wiederum als aus zwei Komponenten bestehend, da man sie am besten durch eine Kurve aus zwei natürlichen Exponentialfunktionen beschreiben konnte. Man fand dabei um mehr als den Faktor 10 unterschiedliche Zeitkonstanten der beiden Kurven bei annähernd gleicher Kalziumsensitivität der beiden Komponenten ( $K_D(\text{RRP})=12,7 \mu\text{M}$ ,  $K_D(\text{SRP})= 8,0 \mu\text{M}$ ). Dies bedeutet, dass bei einer der im Burst freigesetzten Vesikelpopulationen im Vergleich zur anderen die Sekretion über 10-mal schneller abläuft. Die Vesikel-Pools wurden dementsprechend als Rapidly-Releasable-Pool (RRP) und Slowly-Releasable-Pool (SRP) bezeichnet (Heinemann, Chow, Neher, & Zucker, 1994; Voets, Neher, & Moser, 1999). Zur besseren Übersichtlichkeit verwende ich die Abkürzung RRP ausschließlich, wenn vom Rapidly-Releasable-Pool die Rede ist. In der Literatur steht RRP jedoch häufig auch für den Readily-Releasable-Pool.

In Flash-Experimenten an bovinen Chromaffinzellen hat man noch einen weiteren kleinen Pool von ungefähr 15 Vesikeln entdeckt, der eine erhöhte Kalziumsensitivität aufweist und daher als High-Calcium-Sensitivity-Pool (HCSP) bezeichnet wurde. Er wird bereits bei niedrigen Post-Flash-Kalziumkonzentrationen unter  $10 \mu\text{M}$  ausgeschüttet und stärker als der RRP von der Proteinkinase C aktiviert, was für eine physiologische Bedeutung spricht. Der HCSP ist jedoch nicht der IRP, da letzter direkt nach dem Flash auf niedrige Kalziumkonzentration noch unverändert ist (Yang, Udayasankar, Dunning, Chen, & Gillis, 2002).

Wieviele Vesikel in den jeweiligen Pools enthalten sind, wie die hier angeführten Pools zu einander stehen und wie ihre Eigenschaften erklärt werden, stelle ich im Rahmen des Flussmodells der Vesikel (siehe unten) dar.

### 1.2.5.3 Membranfusion

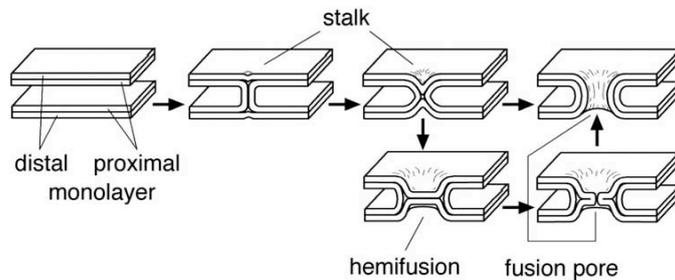


Abb. 1.3: Teilschritte der Membranfusion (Jahn, Lang, & Sudhof, 2003)

Der zentrale Schritt der Sekretion ist das Verschmelzen von Vesikel- und Zellmembran, so dass das Vesikellumen Anschluss an den extrazellulären Raum bekommt. Die Membranfusion hat dabei zwei Hindernisse zu überwinden. Zuerst müssen die beiden Phospholipiddoppelmembranen entgegen ihrer elektrostatischen Abstoßungskräfte angenähert werden und dann die enthaltenen, in wässriger Umgebung geordneten hydrophilen und hydrophoben Schichten dazu gebracht werden ihre Ordnung aufzugeben und ineinander zu fließen. Die genauen Abläufe dieses energieaufwändigen und dennoch innerhalb von Millisekunden ablaufenden Prozesses sind unbekannt. Nach der angenommenen Stalk-Theorie folgen die Schritte Annäherung, Vermischung der proximalen Monolayer, Stielbildung, evtl. Hemifusionsstatus und schließlich Fusionsporenöffnung aufeinander (Jahn, Lang, & Sudhof, 2003).

Damit bekommt das Lumen des Vesikels eine Verbindung nach extrazellulär. Wie die damit mögliche Freisetzung der Neurotransmitter jedoch physiologisch ausgestaltet ist, ist ebenfalls nicht geklärt. Wichtige Erkenntnisse darüber werden mit Hilfe der Amperometrietechnik gewonnen. Hier macht man sich zu Nutze, dass die in LDCVs enthaltenen Katecholamine oxidiert werden können und so an eine Kohlenfaser-Elektrode pro registriertes Molekül 2 Elektronen übertragen. Wird nun eine ausreichend kleine Kohlenfaser-Elektrode an die Zellmembran gebracht, kann das Freisetzungsverhalten einzelner Vesikelfusionen untersucht werden (Albillos et al., 1997).

Dabei wurden verschiedene Abläufe der Katecholaminfreisetzung beobachtet, über deren physiologische Bedeutung man sich jedoch nicht im Klaren ist. Das Vesikel kann nur eine kleine,

vorübergehend bestehende Fusionspore mit einer niedrigen Leitfähigkeit für Katecholamine ausbilden, diese nach kurzer Zeit wieder verschließen und sich als äußerlich intaktes Vesikel von der Membran wieder ablösen. Dieser Ablauf wird als Kiss-and-run-Sekretion bezeichnet und in Chromaffinzellen bei ca. 10-20% aller stimulierten Fusionen beobachtet. Teilweise kommt es dabei auch zu schnellem Wechsel zwischen Öffnen und Schließen (Flickering) dieser kleinen Fusionspore oder einem längeranhaltenden Offenstehen (Kiss-and-stay). Der Großteil der Sekretionen (80-90%) geht jedoch mit einer schnellen Freisetzung einer großen Menge von Katecholaminen einher und zeigt daher einen Spike in der Amperometriemessung. Nach der klassischen Ansicht öffnet sich die Fusionspore immer weiter, bis schließlich das Vesikellumen vollständig nach außen gewendet wurde. Damit läge die Vesikelmembran nach der Fusion in die Zellmembran integriert vor (=Full-Fusion). Eine alternative Hypothese ist, dass sich die Fusionspore auf eine hohe Leitfähigkeit vergrößert, sich anschließend jedoch wieder zusammen zieht und das Vesikel sich äußerlich unverändert von der Zellmembran löst (Extended-Kiss-and-run). Möglicherweise stellen diese verschiedenen Fusionsarten auch Formen der Regulation von Sekretion dar. So bestehen z.B. Hinweise, dass höhere intrazelluläre Kalziumkonzentrationen die Fusionsform von einfachem Kiss-and-run hin zu Sekretionen mit großer Leitfähigkeit (Spikes) verschieben (Elhamdani, Azizi, & Artalejo, 2006; Mellander, Trouillon, Svensson, & Ewing, 2012; van Kempen, vanderLeest, van den Berg, Eilers, & Westerink, 2011; Zanin, Phillips, Mackenzie, & Keating, 2011).

### **1.2.6 Recycling**

Schnelles Recycling der molekularen Elemente und ein damit mögliches schnelles Nachproduzieren sekretionsbereiter transmittergefüllter Vesikel ist vor allem bei in hohen Frequenzen sezernierenden Neuronen ein funktionslimitierender Schritt der regulierten Exozytose.

Die Art der Fusion hat dabei offensichtlich Auswirkungen auf Notwendigkeit und Umfang der Recyclingprozesse. Bildet ein Vesikel wie bei Kiss-and-run nur eine enge Fusionspore und löst sich dann von der Membran wieder ab, so ist davon auszugehen, dass seine Membrankomponenten, sowie größere Bestandteile des Vesikellumens, wie die Chromogranine der LDCVs, noch weitgehend enthalten sind. Nach einer Full-Fusion-Sekretion verteilen sich die nicht sezernierten Vesikelbestandteile jedoch vermutlich frei in der Zellmembran und werden unabhängig voneinander über Clathrin-vermittelte Endozytose wieder aufgenommen und über Endosomen dem Golgiapparat zur Neubildung von Vesikeln wieder zugeführt (Ryan, 2003; D. R. Stevens, Schirra, Becherer, & Rettig, 2011).

Auch der molekulare Fusionsapparat wird nach einer erfolgten Fusion funktionell wiederhergestellt und wiederverwendet (siehe unten: SNARE-Komplex).

Die ausgeschütteten Neurotransmitter wiederum werden an neuronalen Synapsen häufig von speziellen Transportern wieder in die Präsynapse aufgenommen. In den neuroendokrinen Chromaffinzellen ist kein solcher Mechanismus bekannt und wäre auch nicht sinnvoll, da sich die sezernierten Katecholamine im Körper als Hormone verteilen.

### 1.2.7 Flussmodell der Vesikel

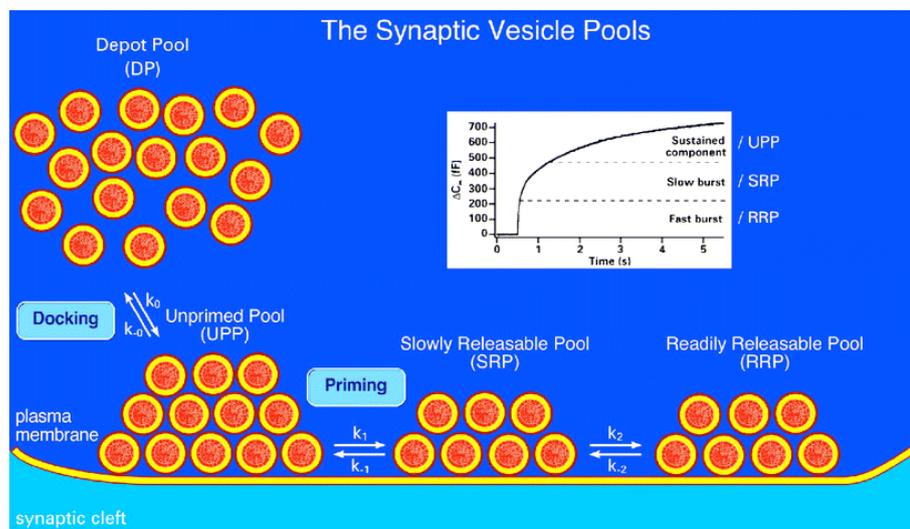


Abb. 1.4.: Flussmodell der Vesikel (Becherer & Rettig, 2006)

Aus der Zusammenschau der Erkenntnisse über die verschiedenen Vesikel-Pools wurde das Flussmodell der Vesikel entwickelt.

Nach diesem Modell lagern die Vesikel nach ihrer Bildung frei im Zytosol (Depotpool/DP) und werden bei Bedarf an die Zellmembran angebunden (Docked-Pool), wobei sie vorerst noch nicht zur Sekretion bereit sind (Unprimed Pool/UPP), sondern erst noch weitere Reifungsschritte durchlaufen müssen. Innerhalb der Gruppe sekretionsbereiter Vesikel unterscheidet man die Vesikel des Slowly-Releasable Pools (SRP) von den Vesikeln des Rapidly-Releasable Pools (RRP). Beide sind fusionskompetent, jedoch ist aus Kombinationen von Flash- und Depolarisationsexperimenten bekannt, dass bei Depolarisationsprotokollen, wie sie auch der physiologischen Stimulation entsprechen, nur die Vesikel des RRP ausgeschüttet werden. Da die Vesikel des RRP aus dem SRP nachgebildet werden, stellt der SRP vermutlich physiologisch einen schnell verfügbaren Reserve-Pool für den RRP dar. Der RRP wiederum umfasst die Vesikel des IRP und des Readily-Releasable-Pools. Da die sich die ermittelten Zeitkonstanten der Sekretion aus dem IRP in einer schmalen und die des Readily-Releasable-Pools in einer breiten Bandbreite

bewegen, diejenigen Vesikel, die bei einem einzigen aufgebracht Aktionspotential ausgeschüttet werden in der Kinetik die Charakteristika des IRP aufweisen und auch allein die Sekretion des IRP stärker durch schnelle als durch langsame Kalziumchelatoren gehemmt werden konnte, wird angenommen, dass die Vesikel des IRP in der Nähe der spannungsabhängigen Kalziumkanäle liegen. Somit kommen sie infolge einer Membrandepolarisation nämlich schnell und in hohen Konzentrationen mit Kalzium in Kontakt, was zu ihrer sofortigen Sekretion führt. Ansonsten werden die Vesikel des IRP jedoch als identisch mit den Vesikeln des RRP angesehen. Dieses Bild wird weiter durch das Fehlen des IRP in Flash-Experimenten gestützt, wo die Kalziumkonzentration schlagartig und prinzipiell homogen über das Zytosol ansteigt. (Horrigan & Bookman, 1994; Moser & Neher, 1997; Voets, Neher, & Moser, 1999).

Für die Bildung sekretionsbereiter Vesikel ergibt sich also zusammenfassend das Flussmodell  $DP \rightarrow UPP \rightarrow SRP \rightarrow RRP \rightarrow \text{Sekretion}$ .

Wie die Sekretion der Vesikel des SRP bei Flash-Experimenten abläuft, ist unbekannt. Ihre Sekretionsrate wäre vereinbar mit einem schnellen kalziumabhängigen Primingschritt vom SRP in den RRP und anschließender Sekretion. Einige weitere Befunde sprechen jedoch für eine Sekretion mit intrinsisch langsamer Kinetik ohne weiteres Priming direkt aus dem SRP.

Über welchen Weg die Sekretion des Sustained Release bei Flash-Experimenten abläuft, ist ebenfalls nicht geklärt. Die Kinetik spricht für den Weg  $UPP \rightarrow SRP \rightarrow \text{Sekretion}$ , anstatt  $UPP \rightarrow SRP \rightarrow RRP \rightarrow \text{Sekretion}$ . Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass sie über einen alternativen, evtl. kalziumabhängigen, Primingweg über  $UPP \rightarrow RRP \rightarrow \text{Sekretion}$  erfolgen könnte (Y. Liu et al., 2008; Sorensen, 2004; Voets, Neher, & Moser, 1999; Voets, 2000).

Die Bedeutung und Herkunft des Highly-Calcium-Sensitive-Pools ist nicht geklärt und er hat daher noch keinen Eingang in die veröffentlichten Flussmodelle der Vesikelpools gefunden.

Der Großteil der Erkenntnisse dieses Flussmodells wurde an Chromaffinzellen gewonnen. In Neuronen kann man aus Mangel an experimenteller Zugänglichkeit der Präsynapsen nur Depotpool, Reservepool (=Docked Pool), RRP und IRP unterscheiden. Es ist aber aufgrund der engen Verwandtschaft von neuroendokrinen Zellen und Neuronen zu vermuten, dass der Reservepool auch aus UPP und SRP besteht.

In Chromaffinzellen erwachsener Mäuse bewegen sich die jeweiligen Pools in folgenden Größenordnungen: Depotpool frei im Zytosol ca. 2000 Vesikel; Docked-Pool ca. 800 Vesikel, davon sekretionsbereite LDCVs im SRP und RRP (beeinflusst durch kalziumabhängiges Priming) jeweils ca. 40 bei niedrigem (ca. 200 nM) bis zu 200 bei hohen (ca. 700 nM) Ruhekonzentrationen; IRP ca. 10-25% des RRP; HCSP ca. 15 Vesikel (D. R. Stevens, Schirra,

Becherer, & Rettig, 2011; Voets, Neher, & Moser, 1999; Yang, Udayasankar, Dunning, Chen, & Gillis, 2002).

Die beschriebenen Pools DP-UPP-SRP-RRP stehen nach diesem Modell in einem Fließgleichgewicht, das durch die Raten der Hin- und Rückreaktionen  $k_0/k_{-0}$ ,  $k_1/k_{-1}$  und  $k_2/k_{-2}$  bestimmt wird (Siehe Abb. 1.4). Die Steigerung einer dieser Rate bewirkt darin eine gleichmäßige Erhöhung aller nachgeschalteten Pools.

Durch den sehr großen Depotpool in Chromaffinzellen, ist dort für kurzfristige Steigerungen der Sekretion die Vesikel-Bildung bzw. das Recycling nicht limitierend und auch nicht mit einer eigenen Rate im Schema enthalten. In schnell sezernierenden Neuronen spielt dieser Nachschub vermutlich eine größere Rolle.

In physiologischen Sekretionen werden, wie beschrieben, nicht alle sekretionsbereiten Vesikel des RRP auf eine Membrandepolarisation hin ausgeschüttet, sondern nur die Untergruppe des IRP, die sich vermutlich nahe an den Kalziumkanälen befindet. Da die Kalzium-getriggerte regulierte Exozytose prinzipiell ein stochastischer Prozess ist, kann man die Vesikel des IRP auch als diejenigen Vesikel des RRP mit außerordentlich hoher Ausschüttungswahrscheinlichkeit definieren. An der Zellemban befinden sich schließlich viele, potentiell fusionskompetente Vesikel. Ausgeschüttet werden sie jedoch nur dann, wenn an ihren Kalzium-Trigger der Sekretion  $Ca^{2+}$ -Ionen anbinden. Die Wahrscheinlichkeit dafür steigt bei hohen Kalziumkonzentrationen und damit exponentiell mit der Nähe zu geöffneten Kalzium-Kanälen, da dort vorübergehend die Kalziumkonzentrationen 1000-fach erhöht sind. Prinzipiell können jedoch auch weit von Kalzium-Kanälen entfernte Vesikel sezerniert werden, wie man es bei den Flash-Experimenten beobachtet und dies auch bei niedrigen intrazellulären Kalziumkonzentrationen, worauf die spontanen Vesikelfusionen hinweisen, die man als Miniature Postsynaptic Currents registriert.

Auch der großen Unterschied in den Kinetiken von IRP und Readily-Releasable-Pool mit Sekretionsraten von 150 versus 5 Vesikeln pro Sekunde bei Poolgrößen von 35 Vesikeln im IRP und 140 im Readily-Releasable-Pool lässt sich durch das Modell der verschiedenen Ausschüttungswahrscheinlichkeiten aufgrund unterschiedlicher Nähe zu Kalziumkanälen gut erklären (Voets, Neher, & Moser, 1999).

Für eine verlässliche Signalübertragung ist es also notwendig, dass nach der Ausschüttung der Vesikel des IRP wieder Vesikel mit ähnlich hoher Ausschüttungswahrscheinlichkeit generiert werden. Daher enthält das Flussmodell der Vesikelpools noch weiter einen oder mehrere Schritte zur Bildung von Vesikeln mit außerordentlich hoher Ausschüttungswahrscheinlichkeit, die die

Untergruppe des IRP innerhalb des RRP definieren und sich in noch unbekannter Reihenfolge in die Abfolge  $k_0$ - $k_1$ - $k_2$  einreihen.

Für die Mechanik dieses Schritts gibt es zusammenfassend zwei Möglichkeiten: 1) Annähern von Vesikeln des RRP an Kalziumkanäle durch aktiven Transport oder Diffusion in der Membran und 2) Nachbilden fusionskompetenter Vesikel in der Nähe der Kanäle. Von einem Flussmodell, das diesen Schritt des Bereitstellens eines IRP mit einschließt, spreche ich, wenn im folgenden Kapitel von Steigerung der Raten des Flussmodells die Rede ist.

### **1.2.8 Plastizität der neuronalen regulierten Exozytose**

Nach (Fioravante & Regehr, 2011; Zucker & Regehr, 2002)

Wird eine Nervenzelle vermehrt erregt, so steigert sie die Frequenz der Aktionspotentiale, die sie an die Präsynapse sendet. Die Aktionspotentiale führen über die oben beschriebenen Teilschritte zur Neurotransmitterausschüttung in den synaptischen Spalt und subsequent nach Bindung der Transmitter an Rezeptoren der Postsynapse zur Erzeugung postsynaptischer Potentiale. Hier wurde beobachtet, dass es bei der Weiterleitung gesteigerter präsynaptischer Erregung zu einer überproportionalen Stimulation der postsynaptischen Zelle oder auch zu einer Verminderung der synaptischen Übertragungsrates kommen kann. Das heißt, dass die Informationsweitergabe pro AP erhöht (Synaptische Potentierung) oder erniedrig wird (Synaptische Depression). Diese Fähigkeit, für Millisekunden bis wenige Minuten als Reaktion auf Aktivierung das Übertragungsverhalten zu verändern, wird als Synaptische Kurzzeit-Plastizität bezeichnet und als grundlegender Mechanismus der neuronalen Informationsprozessierung angesehen. Wie eine Synapse auf gesteigerte Erregung reagiert, ist dabei von Nervenzelle zu Nervenzelle und sogar von Synapse zu Synapse des gleichen Neurons unterschiedlich. Die jeweilige Nettoplastizität entsteht aus dem Zusammenspiel verschiedener Formen von Potentierung und Depression.

Die synaptische Potentierung kommt dabei vor allem durch präsynaptische Veränderungen zustande. Die synaptische Depression wird durch präsynaptische und postsynaptische Modifikationen erzeugt. Weiter wird die synaptische Übertragung im synaptischen Spalt durch Neurotransmitter-Clearing durch Gliazellen sowie präsynaptische Wiederaufnahme und Lyse von Neurotransmittern beeinflusst. Ich möchte mich im Folgenden auf die mein Thema betreffenden präsynaptischen Prozesse der Kurzzeit-Plastizität beschränken.

Die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration bei repetitiver Stimulation ist der wichtigste Vermittler der präsynaptischen Kurzzeit-Plastizität. Die additive Wirkung der durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom bei vorhergehenden APs leicht erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentrationen auf den niedrig-affinen Kalziumsensor (Trigger) der Sekretion kann jedoch die beobachteten, zur Kalziumkonzentrationsänderung unproportional großen Veränderungen bei kurz darauf nachfolgenden APs nicht erklären. Stattdessen muss die Präsynapse zusätzlich mit einem oder mehreren hoch-Kalzium-affinen Effektoren ausgestattet sein.

Daneben können Modifikationen auch durch Aktivierung von metabotropen und ionotropen Rezeptoren der Präsynapse vermittelt werden. Die Botenstoffe dafür stammen von der Präsynapse selbst, der nachgeschalteten Nervenzelle oder anderen Nervenzellen, sowie auch von Gliazellen. Auf die Funktion der Präsynapse wirken sie meist inhibitorisch.

#### Mechanismen der präsynaptischen Kurzzeit-Plastizität

Zur Modifikation der Neurotransmitterfreisetzung kann es durch die Blockade oder Deformierung eintreffender APs durch Kalium-Kanal-Aktivierung oder durch eine Veränderung des Transmittergehalts der ausgeschütteten Vesikel kommen. So wurde im Rahmen der synaptischen Potentierung eine Fusion von Vesikeln vor der Sekretion beobachtet und bei erschöpfenden Stimulationen führte eine Reduktion der Transmitterfüllung der Vesikel zu synaptischer Depression.

Der Hauptmechanismus der präsynaptischen Kurzzeitplastizität ist jedoch eine Veränderung der individuellen Ausschüttungswahrscheinlichkeit der Vesikel in Reaktion auf die erzeugten Kalziumsignale. Die Veränderung des Integrals der Ausschüttungswahrscheinlichkeiten aller sekretionsbereiten Vesikel bestimmt dann, ob beim nachfolgenden AP mehr oder weniger Vesikel ausgeschüttet werden.

Dies kann über verschiedene Modifikationen der oben angeführten Prozesse der regulierten Exozytose geschehen.

Die Ausschüttungswahrscheinlichkeit der sekretionsbereiten Vesikel an der Membran wird durch die verfügbaren Orte der Sekretion beeinflusst. Damit sind Membranareale gemeint, an denen funktionsfähige spannungsabhängige Kalziumkanäle und sekretionsbereite Vesikeln beieinander liegen. Zur Potentierung können „schlafende“ Orte der Sekretion aktiviert werden. Der gegenteilige Mechanismus, die „Sicherheitsabschaltung“ von Orten der Sekretion zum Schutz vor Depletion wird als Mechanismus der Depression diskutiert. Auch müssen an den Orten der Sekretion nach erfolgter Fusion die Komponenten der regulierten Exozytose regeneriert werden.

Dies bedingt eine vorübergehende Funktionsunfähigkeit und kann bei initial vielen beteiligten Orten der Sekretion zu reduzierter Vesikelausschüttung bei nachfolgenden APs führen.

Weiter beeinflusst die Anzahl sekretionsbereiter Vesikel an den Orten der Sekretion die integrale Ausschüttungswahrscheinlichkeit. Durch Modifikationen der Raten des Flussmodells kommt es zu erhöhter bzw. erniedrigter Dichte und gesteigerter bzw. verminderter Nachproduktion von sekretionsbereiten Vesikeln in der Nähe der Kalziumkanäle. (Die Anzahl weiter entfernter sekretionsbereiter Vesikel spielt erst bei langanhaltenden Stimulationen eine größere Rolle, wo im gesamten submembranären Raum erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen herrschen)

Es ist nicht klar, ob kalziumabhängige Anpassungen der Raten des Flussmodells zu synaptischer Potentierung beitragen. Sicher ist jedoch, dass Depression durch eine Depletion ausschüttbarer Vesikel hervorgerufen werden kann, die durch aktivitätsabhängig oder konstitutiv (bei bestimmten Neuronentypen) erhöhte Nachfüllung des sekretionsbereiten Pools durch diese Schritte vermindert wird. Ebenso wird die Erholung von einer synaptischen Depression auf diesem Weg - vermittelt durch erhöhtes intrazelluläres Kalzium - beschleunigt.

Auch die Ausgestaltung der Kalziummikrodomänen an den Orten der Sekretion hat einen Einfluss auf die dort liegenden sekretionsbereiten Vesikel. Wird der Maximalwert, die Dauer und die räumliche Ausdehnung der Kalziumkonzentrationserhöhung vergrößert, so erhöht sich deren Ausschüttungswahrscheinlichkeit und umgekehrt.

Verstärkte Kalziumsignale können durch verlängerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch verbreiterte APs bei Inaktivierung von Kaliumkanälen, Faszilitation von Kalziumkanälen oder Sättigung von Kalziumpuffern zwischen Kanälen und Vesikeln hervorgerufen werden. Auch werden in diesem Kontext die Freisetzung (aber auch Aufnahme und Speicherung) von Kalzium aus Endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien, die Hemmung des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers und - für die schnellste Form der Potentierung - die lokale Akkumulation von Kalzium bei kurz aufeinander folgenden APs angeführt.

Inaktivierung von Kalziumkanälen und die Depletion extrazellulären Kalziums bei starken Stimulationen führt dementsprechend zu reduzierten Kalziumsignalen.

Ähnliche Effekte können auch durch eine Veränderung der Kalziumsensitivität der sekretionsbereiten Vesikel erzielt werden. Dadurch steigt bzw. sinkt sowohl die Wahrscheinlichkeit, dass Vesikel in größerer Entfernung von Kalziumkanälen ausgeschüttet werden, als auch die Wahrscheinlichkeit, dass ein Vesikel im Zentrum der Kalziummikrodomäne sezerniert wird. Dies kann durch eine veränderte Zahl der funktionellen Kalziumtrigger pro Vesikel oder durch eine veränderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der einzelnen Sekretionsapparate (Kalziumtrigger + molekularer Fusionsapparat) hervorgerufen werden.

Eine Modifikation der Ausschüttungswahrscheinlichkeit über diesen Weg ist über Veränderungen der Konzentration der beteiligten Proteine (hier SNARE-Komplexe, siehe unten) möglich

(Mohrmann, de Wit, Verhage, Neher, & Sorensen, 2010). Ein spezieller molekularer Effektor, der eine kalziumabhängige Veränderung der Kalziumsensitivität des Sekretionsapparats vermittelt, oder ein kalziumsensitiverer Trigger wurden bisher hingegen noch nicht identifiziert.

Die beschriebenen Mechanismen der präsynaptischen Kurzzeit-Plastizität werden über verschiedene zelluläre Signalwege unter Vermittlung von Proteinkinasen/Phosphatasen wie MLCK, CaM-Kinase II, Calcineurin, PKC oder PKA, sowie über direkt  $Ca^{2+}$ -bindende Effektormoleküle hervorgerufen. Manche dieser molekularen Effektoren werden im folgenden Kapitel vorgestellt (Becherer & Rettig, 2006; Fioravante & Regehr, 2011; Zucker & Regehr, 2002).

### 1.3 Molekulare Effektoren der neuronalen regulierten Exozytose

Die molekulare Ausstattung zur regulierten Exozytose auf präsynaptischer Seite muss zum einen in der Lage sein die Energiebarriere zu überwinden, die bei der Fusion der Membranen von Vesikel und Zelle vorhanden ist und zum anderen muss sie die Anforderungen des jeweiligen neuronalen Systems an Umfang, Geschwindigkeit, Genauigkeit und Verlässlichkeit der Sekretion erfüllen und eine entsprechende Regulation ermöglichen.

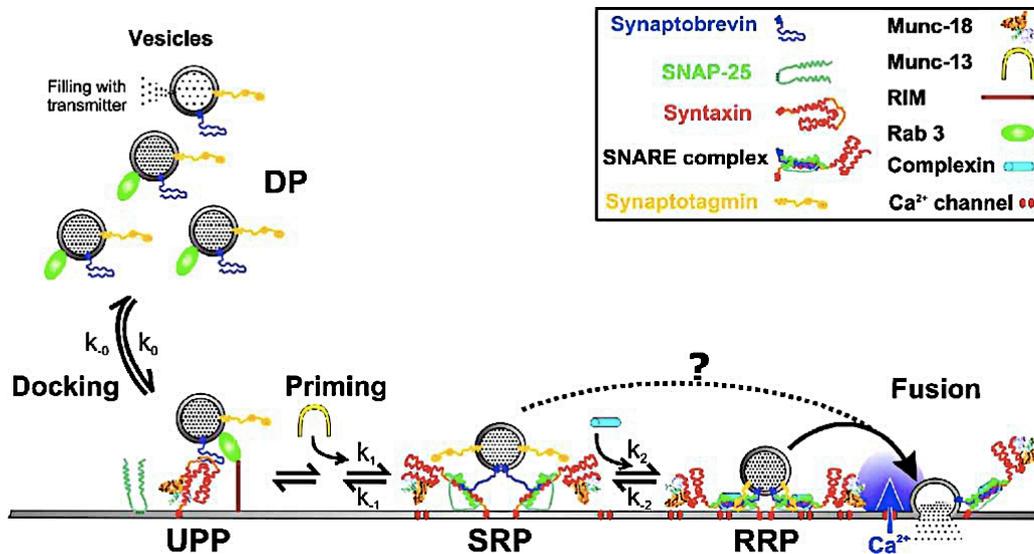


Abb. 1.5: Molekulare Kernkomponenten der Exozytosereaktion (Becherer & Rettig, 2006)

Mittlerweile sind sehr viele Proteine bekannt, die bei den Prozessen der neuronalen regulierten Exozytose eine Rolle spielen. Eine ausführliche Besprechung aller würde den Rahmen einer Einleitung überschreiten. Daher werde ich im Folgenden nur auf die zentralen und die für meine Arbeit bedeutsamen Proteine genauer eingehen und anschließend in einem kurzen Überblick weitere bekannte Proteine ansprechen.

### 1.3.1 SNARE-Proteine und SNARE-Komplex

Die zentralen Proteine der Membranfusion sind die sogenannten SNARE-Proteine. Ihr Name leitet sich von **SNA(P) – RE(ceptor) – Proteins** ab, wobei SNAP wiederum für Soluble NSF Attachment Protein steht und NSF das Akronym für N-ethylmaleimide sensitive factor ist. NSF ist eine ubiquitär im Zytoplasma vorkommende AAA-ATPase, die durch N-ethylmaleimide gehemmt wird. Als SNARE-Proteine für die synaptische Vesikelausschüttung wurden Syntaxin 1, SNAP-25 und Synaptobrevin identifiziert. (T. Sollner et al., 1993). Sie lagern sich in einer 1:1:1 –Stöchiometrie zum sogenannten SNARE-Komplex zusammen, der den elementaren Fusionsapparat der Exozytose darstellt (siehe unten).

#### 1.3.1.1 Morphologie

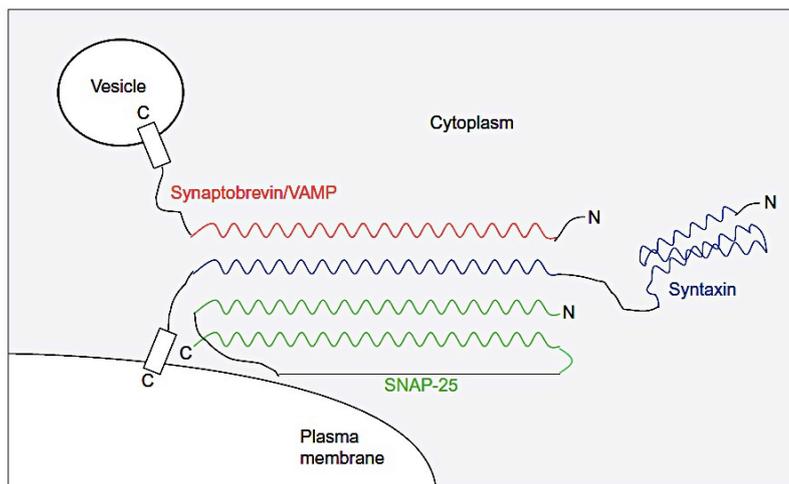


Abb. 1.6: Der SNARE-Komplex (Teng, Wang, & Tang, 2001)

Die Gensequenzen der SNARE-Proteine liegen konserviert von einzelligen Lebewesen wie Hefen bis zum Menschen vor, was auf die elementare Bedeutung dieser Proteine hinweist. Beim Menschen sind 36 Mitglieder der SNARE-Protein-Familie bekannt, die als gemeinsames Merkmal eine konservierte Sequenz von 60-70 Aminosäuren, das sogenannte SNARE-Motiv, aufweisen (Jahn & Scheller, 2006).

Dieses besteht aus einer hydrophilen Aminosäure im Zentrum, die beiderseits von hydrophoben Leucin-Zipper-ähnlichen Sequenzen flankiert wird. Leucin-Zipper sind dreidimensionale Motive in der Aminosäuresequenz von Proteinen, die dadurch charakterisiert sind, dass sich an jeder siebten Stelle einer  $\alpha$ -Helix ein Leucin und damit eine hydrophobe Aminosäure befindet. Aufgrund dieser Anordnung lagern sich in einer wässrigen Umgebung zwei solche Leucin-zipper- $\alpha$ -Helices so zusammen, dass sich die beiden hydrophoben Leucine gegenüber stehen.

Da die Leucin-Paare jedoch in der Längsachse nicht genau in einer Linie stehen, kommt es zum linksgängigen Verdrillen. Diese Anordnung wird als „Coiled Coil -Struktur“ bezeichnet. Beim SNARE-Motive schließen sich an die Leucin-Zipper-ähnlichen Strukturen beiderseits hydrophobe Aminosäuresequenzen an (Sutton, Fasshauer, Jahn, & Brunger, 1998).

Es wurde festgestellt, dass drei verschiedene SNARE-Proteine einen Komplex formen, der sehr resistent gegen SDS und hohe Temperaturen ist und als SNARE-Komplex bezeichnet wurde (T. Sollner, Bennett, Whiteheart, Scheller, & Rothman, 1993).

Aus Röntgenstrukturanalysen von kristallisierten SNARE-Komplexen weiß man, dass sich dort vier dieser SNARE-Motive zu einem 4-Helix-Bündel zusammengelagert haben. In dessen Mitte liegen benachbart und von Wasser abgeschlossen die 4 zentralen hydrophilen Aminosäuren der jeweiligen SNARE-Motive und bilden die sogenannte Zero-ionic-layer. Die vier hydrophilen Aminosäuren sind dabei konserviert drei Glutamin (Q) und ein Arginin (R). Je nachdem, ob ein SNARE-Protein Arginin oder Glutamin zur Zero-ionic-layer beisteuert, wird es als R- oder Q-SNARE bezeichnet (Fasshauer, Sutton, Brunger, & Jahn, 1998; Sutton, Fasshauer, Jahn, & Brunger, 1998).

Sowohl bei der Exozytose als auch bei intrazellulären Transportvorgängen werden Vesikel von einem Kompartiment abgekapselt und gelangen zu ihren Zielkompartimenten oder der Zellmembran, wo die SNARE-Proteine der Vesikel auf die SNARE-Proteine der Zielmembranen treffen und einen SNARE-Komplex ausbilden, der dann die Fusion der beiden Membranen ermöglicht. Die SNARE-Proteine sind dabei spezifisch verteilt und man kann sie dementsprechend als V-SNAREs oder T-SNAREs klassifizieren, in Bezug darauf, ob das SNARE-Protein an der Vesikel (V)- oder der Ziel- bzw. Target (T)-Membran vorliegt.

Im Fall der neuronalen Exozytose wird der SNARE-Komplex aus dem V-SNARE-Protein Synaptobrevin (auch VAMP = vesicle associated membrane protein) und den beiden T-SNARE-Proteinen Syntaxin 1A und SNAP-25 gebildet, wobei Synaptobrevin und Syntaxin 1A jeweils ein SNARE-Motiv und SNAP-25 zwei SNARE-Motive zum 4-Helix-Bündel beitragen. Synaptobrevin ist dabei das R-SNARE und Syntaxin 1A und SNAP-25 sind die Q-SNAREs (Fasshauer, Sutton, Brunger, & Jahn, 1998; T. Sollner et al., 1993).

Neben dem SNARE-Motiv besitzen Syntaxin 1A und Synaptobrevin wie die meisten SNARE-Proteine variable Bereiche N-terminal des SNARE-Motivs und - verbunden über eine kurze Linkersequenz - eine Transmembrandomäne C-terminal des SNARE-Motivs, die zur Verankerung in der Membran dient (Jahn & Scheller, 2006).

SNAP 25 hat keine Transmembrandomäne, sondern weist zwischen seinen beiden SNARE-Motiven eine Sequenz mit mehreren Cysteinresten auf, über die es an Palmitoylketten der Zellmembran gebunden ist (Veit, Sollner, & Rothman, 1996).

### **1.3.1.2 Physiologie**

Nach der gängigen Hypothese zur Membranfusion gilt es die beiden beteiligten Membranen entgegen ihrer elektrostatischen Abstoßung soweit anzunähern, dass diese ineinander fließen können. Hierbei hat der SNARE-Komplex eine entscheidende Bedeutung. Man nimmt an, dass die SNARE-Motive entsprechend der Leucin-zipper-Funktionsweise ineinander greifen und es zu einem Verdrillen der  $\alpha$ -Helices kommt, in dessen Folge sich der Abstand zwischen den beiden Membranen verringert (P. I. Hanson, Heuser, & Jahn, 1997; Sutton, Fasshauer, Jahn, & Brunger, 1998).

Die Zusammenlagerung von Syntaxin und SNAP-25 stellt dabei eine Vorstufe dar, an die sich dann Synaptobrevin anlagert und Strukturveränderungen hin zum SNARE-Komplex initiiert (Y. A. Chen, Scales, & Scheller, 2001; Fasshauer & Margittai, 2004; Rickman, Meunier, Binz, & Davletov, 2004).

Vor der Fusion bezeichnet man den SNARE-Komplex als trans-SNARE-Komplex, da V- und T-SNAREs an unterschiedlichen Membranen befestigt und antiparallel ausgerichtet sind. Nach der Verschmelzung der Membranen findet man auch die Transmembrandomäne des V-SNAREs in der Zielmembran und man spricht in dieser parallelen Konfiguration der SNARE-Proteine vom cis-SNARE-Komplex. Wasser in die Zero-ionic layer eindringen zu lassen und damit den cis-SNARE-Komplex wieder in die einzelnen SNARE-Proteine zu zerlegen, scheint die Aufgabe der namensgebenden Proteine NSF und  $\alpha$ -SNAP zu sein (T. Sollner, Bennett, Whiteheart, Scheller, & Rothman, 1993).

Die elementare Bedeutung des SNARE-Komplexes für die Fusion zeigt sich darin, dass das Aufeinandertreffen von V- und T-SNAREs allein schon ausreichend zum Erfolgen einer Membranfusion ist, da sie die Verschmelzung von Liposomen – artifiziellen Strukturen, die nur aus einer geschlossenen Membranhülle bestehen – bewirken (T. Weber et al., 1998). In Übereinstimmung damit haben genetische Deletionen der SNARE-Proteine Synaptobrevin1 und 2 (Borisovska et al., 2005), SNAP25 (Sorensen et al., 2003) oder Syntaxin (de Wit, Cornelisse, Toonen, & Verhage, 2006) einen fast vollständigen Verlust von Sekretion zur Folge.

Für das Halten der gedockten Vesikel an der Zellmembran ist der intakte SNARE-Komplex hingegen nicht verantwortlich, da nachträgliche Behandlung mit Botulinumtoxinen, die spezifisch die Proteine des SNARE-Komplexes zerschneiden, die Verteilung der Vesikel an der Membran nicht beeinflusst (Broadie et al., 1995; Hunt et al., 1994). Dafür scheinen also andere Proteine - vermutlich im Zusammenspiel mit den T-SNARE-Proteinen - eine Rolle zu spielen, da der genetische Knockout von Synaptobrevin zu keinem Defizit der gedockten Vesikel führt (Borisovska et al., 2005; Sorensen et al., 2003), Syntaxin-Deletion in Maus-Chromaffinzellen das Docking jedoch stark reduziert (de Wit, Cornelisse, Toonen, & Verhage, 2006). Bei SNAP-25 gibt es diesbezüglich widersprüchliche Veröffentlichungen (Borisovska et al., 2005; de Wit et al., 2009; M. E. Graham, Washbourne, Wilson, & Burgoyne, 2001; Sorensen et al., 2002).

Die Eigenschaft des SNARE-Motivs, starke hydrophobe Wechselwirkungen mit anderen SNARE-Motiven einzugehen, bedingt, dass sich die 3 SNARE-Proteine nicht nur in einer 1:1:1 Stöchiometrie zusammenlagern, sondern dass auch reine Syntaxin-Dimere und 4er-Oligomere, sowie 2:1 Syntaxin- SNAP-25- und 2:1 Syntaxin- Synaptobrevin- Oligomere entstehen (Fasshauer, Sutton, Brunger, & Jahn, 1998; Jahn & Scheller, 2006; Lerman, Robblee, Fairman, & Hughson, 2000). Dies mag funktionelle Bedeutung haben, wie z.B. in Syntaxinclusters (siehe unten), stellt aber auch eine potentielle Fehlerquelle durch Bildung von falschen Syntaxin-SNAP-25-Akzeptorkomplexen, die kein Synaptobrevin mehr aufnehmen können und somit für die Fusion nicht mehr zur Verfügung stehen, dar (Pobbati, Stein, & Fasshauer, 2006).

Nach neueren Ansichten reicht zwar ein SNARE-Komplex für die Fusion aus, jedoch agieren physiologisch mindestens 3 SNARE-Komplexe pro Vesikel gleichzeitig. Darüber hinaus gehende Anzahlen von SNARE-Komplexen können die Fusion beschleunigen bzw. die Ausschüttungswahrscheinlichkeit des Vesikels erhöhen. Weiter sollen SNARE-Komplexe im Übermaß vorliegen, um ein Reservoir gegen Verbrauch bei starker sekretorischer Belastung zu bilden. Da vermutet wird, dass Docking und Priming kollisionslimitiert sind, wird zudem erwartet, dass bei höheren SNARE-Protein-Konzentrationen auch Docking und Priming vermehrt ablaufen (Mohrmann, de Wit, Verhage, Neher, & Sorensen, 2010; Mohrmann & Sorensen, 2012).

Neben dem finalen Fusionsvorgang und dem Docking sind die SNARE-Proteine bzw. der SNARE-Komplex also auch an weiteren Prozessen der regulierten Exozytose beteiligt. Mutationen der C-terminalen Interaktionsbereiche des SNARE-Bündels verschlechtern dabei die Kinetik der Membranfusion, Mutationen des N-terminalen Endes verhindern ein effektives Priming (Walter, Wiederhold, Bruns, Fasshauer, & Sorensen, 2010).

Der dem Priming unterliegende Effekt scheint dabei mit großer Evidenz die fortschreitende Zusammensetzung des SNARE-Komplexes zu sein (Rettig & Neher, 2002; Rizo & Rosenmund, 2008; Toonen et al., 2006).

Aus dem oben beschriebenen wird deutlich, dass die SNARE-Proteine vom Andocken der Vesikel bis zur Ausschüttung an allen wichtigen Prozessen der regulierten Exozytose an der Membran beteiligt sind und auch darüber hinaus für die Modifikation dieser Prozesse eine Rolle spielen.

Da das SNARE-Protein Syntaxin 1A im Fokus meiner Experimente stand, möchte ich im Folgenden noch näher darauf eingehen.

### 1.3.2 Syntaxin 1A

Im menschlichen Genom sind insgesamt 15 Syntaxin – Isoformen angelegt.

Syntaxin 1A ist bekannt als die Hauptisoform der regulierten Exozytose in Neuronen und sekretorischen Zellen. Dort kommen weiter Syntaxin 1B und eine Splice-Variante von Syntaxin 1A vor. Die ebenfalls in der Plasmamembran lokalisierten Isoformen 2-4 sind an Transportvorgängen zur Plasmamembran beteiligt. Letztere und die weiteren, für intrazelluläre Transportvorgänge relevanten Syntaxin-Isoformen aus dem Spektrum Syntaxin 5-18 werden ubiquitär gefunden (Teng, Wang, & Tang, 2001).

Das zu 84% homologe Syntaxin 1B scheint dabei den Verlust von Syntaxin 1 A kompensieren zu können, da der Syntaxin-1A-KO in Mäusen phänotypisch keine Auffälligkeiten zeigt (Bennett, Calakos, & Scheller, 1992).

#### 1.3.2.1 Morphologie

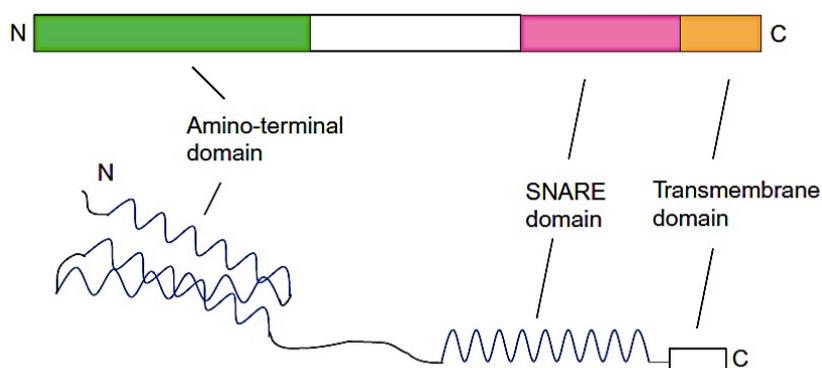


Abb. 1.7: Domänenstruktur von Syntaxin 1A (Teng, Wang, & Tang, 2001)

Syntaxin 1A besteht aus einer C-terminalen Transmembran-Domäne, dessen alpha-Helix kontinuierlich nach zytosolisch-reichend in die  $\alpha$ -Helix des SNARE-Motivs übergeht. Weiter N-terminal liegt die Habc-Domäne, welche aus drei, durch kurze Linker-Sequenzen verbundenen  $\alpha$ -Helices (Ha, Hb und Hc) besteht (Bennett, Calakos, & Scheller, 1992; Lerman, Robblee, Fairman, & Hughson, 2000; Stein, Weber, Wahl, & Jahn, 2009; Sutton, Fasshauer, Jahn, & Brunger, 1998).

Das 3-Helix-Bündel der Habc-Domäne kann sich auf das SNARE-Motiv zurückfalten und mit diesem eine reversible Bindung eingehen, was zur Folge hat, dass Syntaxin in einer sogenannten geschlossenen (Closed) und offenen (Open)-Konformation vorliegen kann. Außerhalb des SNARE-Komplexes liegt Syntaxin in der Closed- Konformation vor (Dulubova et al., 1999; Misura, Scheller, & Weis, 2000) und ist in dieser Form für das Docking der LDCVs in Chromaffinzellen (nicht SV-Docking in Neuronen, hier vermutlich andere Moleküle) von großer Bedeutung. Auch ist es die „stabilere“ Form der beiden Konformitäten, so dass in Zellen mit durch Punktmutation alleinig vorkommendem Open-Syntaxin insgesamt weniger Syntaxin-Moleküle vorhanden sind (Gerber et al., 2008). Die Open-Syntaxin- Konformation ist hingegen die Voraussetzung zur Bildung des SNARE-Komplexes (Sutton, Fasshauer, Jahn, & Brunger, 1998) und damit für den Fusionsvorgang essentiell. Eine erhöhte Konzentration an Open-Syntaxin-Molekülen in Neuronen, wo es dabei im Gegensatz zu Chromaffinzellen zu keinem Docking-Defizit kommt, führt zu einer gesteigerten Ausschüttungsbereitschaft der Vesikel. Dies ist konform mit der Hypothese, dass Priming durch fortschreitenden Zusammenbau des SNARE-Komplex geschieht und kann durch eine erhöhte Anzahl an funktionsfähigen SNARE-Komplexen zwischen Vesikel und Zellmembran erklärt werden (Gerber et al., 2008).

### Clusterbildung

Es gibt viele Berichte, dass Syntaxin in der Membran in Clustern vorliegt. In verschiedenen Studien mit Super-Resolution-Microscopy-Techniken an Phäochromozytomzellen, also entarteten Chromaffinzellen, wurden ca. 9000 Syntaxincluster pro Zelle in einer Dichte von 14-20 Cluster/ $\mu\text{m}^2$  und einem durchschnittlichen Durchmesser von 50-60 nm gefunden, was eine Bedeckung der Zelloberfläche mit Syntaxinclustern von ca. 11% (Cave: nach eigener Rechnung mit den Zahlen nur ca 5%) bedeutet (Bar-On et al., 2012; Rickman et al., 2010; Sieber et al., 2007).

In diesen Clustern liegen ca. 75 (min. 30- max. 90) Syntaxinmoleküle, was einer Organisation des Syntaxins zu 67-83% innerhalb von Clustern und zu 17-33% frei in der Membran diffundierend entspricht (Bar-On et al., 2012; Knowles et al., 2010; Rickman et al., 2010; Sieber et al., 2007).

Die freien Syntaxinmoleküle bewegen sich größtenteils in der direkten Umgebung der Cluster und befinden sich in stetigem Austausch mit diesen. Die einzelnen Cluster können zu größeren

Clustern zusammenfließen, wobei die Ausgangscluster jedoch ihre innere Morphologie mit einer von innen nach außen abnehmenden Dichte der Syntaxinmoleküle beibehalten (Bar-On et al., 2012).

Auch bei Überexpression von Syntaxin bleibt die Größe der einzelnen Cluster gleich, nur die Dichte der Cluster auf der Zelloberfläche nimmt zu, was aber aufgrund der sowieso geringen Abstände zwischen den Clustern mit konventionellen Lichtmikroskopen nicht mehr auflösbar ist (Sieber, Willig, Heintzmann, Hell, & Lang, 2006).

Für die Clusterbildung sind neben der Anwesenheit von Cholesterin in der Membran und dem Vorliegen der Transmembrandomäne vor allem schwache Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den SNARE-Motiven ausschlaggebend (Murray & Tamm, 2009; Sieber, Willig, Heintzmann, Hell, & Lang, 2006; Sieber et al., 2007).

Dabei können sich die Syntaxincluster in der beschriebenen Konfiguration allein aus dem Gleichgewicht von diesen anziehenden SNARE-SNARE-Wechselwirkungen und den abstoßenden Kräften durch sterische Repulsion bilden – vor allem, wenn man teilweise eingefaltete Habc-Domänen annimmt – und benötigen keine weiteren Bindungspartner (Sieber et al., 2007). Interessanterweise haben die SNARE-Motive dabei eine interne Spezifität, so dass sich Syntaxin 1A und Syntaxin 4 in derselben Membran in getrennten Clustern zusammenlagern (Sieber, Willig, Heintzmann, Hell, & Lang, 2006).

Für das Ausmaß der Clusterbildung spielen zudem möglicherweise auch die intrazellulären Kalziumkonzentrationen eine Rolle (Zilly et al., 2011).

50 -60% der Vesikel an der Membran liegen an den Syntaxincluster und weisen dann eine erhöhte Ausschüttungswahrscheinlichkeit auf Stimulation mit Kalium auf (Barg, Knowles, Chen, Midorikawa, & Almers, 2010; Lang et al., 2001).

Fehlen die N-terminalen Domänen von Syntaxin, findet zwar immer noch Clustering statt, aber dann sind viel weniger Vesikel an die Cluster gebunden. Open-Syntaxin-Expression zeigt hingegen das gleiche Bild wie Wildtyp-Syntaxin bezüglich Clusterbildung und dort gedockten Vesikeln (Barg, Knowles, Chen, Midorikawa, & Almers, 2010).

Cholesterindepotion der Membran hat eine Reduktion der Sekretionsrate bei gleichbleibender Fusionskinetik zu Folge (Lang et al., 2001). Ob ein Auflösen der Cluster dabei zu Grunde liegt, ist jedoch unklar (Lang et al., 2001; Rickman et al., 2010). Weiter muss das an den Active-Zones lokalisierte Membranlipid PIP<sub>2</sub> an den Clustern vorhanden sein, damit die Exozytosereaktion stattfinden kann (Aoyagi et al., 2005).

SNAP-25, das mit einer mehr als 10-fach höheren Konzentration als Syntaxin vorliegt (Knowles et al., 2010; Murray & Tamm, 2011), interagiert- möglicherweise jedoch nur am Clusterrand- mit den Syntaxins der Cluster und bildet mit diesen Heterodimere aus (Halemani, Bethani, Rizzoli, & Lang, 2010; Rickman et al., 2010).

Diesbezüglich wurden zwei Arten von räumlich getrennten Clustern gefunden. In den einen liegt v. a. ein Heterodimer aus nur 2 SNARE-Motiven und im anderen aus allen 3 SNARE-Motiven des Syntaxin-SNAP-25-Heterodimers vor (Rickman et al., 2010).

Nach den in den angeführten Studien am häufigsten genannten Hypothesen, werden die Syntaxincluster als Orte des Zusammenbaus von Syntaxin/SNAP-25-Akzeptorkomplexen und/oder als Orte des Dockings angesehen.

### **1.3.2.2 Physiologie**

Die physiologische Bedeutung des SNARE-Proteins Syntaxin für die Membranfusion wurden bereits im vorangegangenen Kapitel behandelt.

Weiter spielt Syntaxin auch eine Rolle bei der Regulation von Kalium-, Natrium- und Kalzium-Membrankanälen (Trafficking und Gating), wobei es auch hier Unterschiede in der Funktion von Syntaxin 1A zu Syntaxin 1B und speziell zu Open-Syntaxin gibt (Catterall, 1999; Condliffe, Zhang, & Frizzell, 2004; Jarvis & Zamponi, 2005; Leung et al., 2005; Leung, Kwan, Ng, Kang, & Gaisano, 2007; Martin-Moutot et al., 1996).

Der Kalzium-abhängigen Bindung von neuronalen Kalzium-Kanälen an Syntaxin wird dabei eine mögliche Rolle bei den Prozessen der neuronalen regulierten Exozytose zugeschrieben (Davies, Jarvis, & Zamponi, 2011; Sheng, Rettig, Cook, & Catterall, 1996).

### **1.3.2.3 Mutationen und Krankheiten**

Es wurde berichtet, dass Single-Nukleotid-Polymorphismen des Syntaxin 1A Gens ein erhöhtes Risiko für Migraine beim Menschen hervorrufen (Lemos et al., 2010; Tropeano et al., 2012).

Im experimentellen Setting wurde weiter festgestellt, dass homozygoter Open-Syntaxin 1B-Knock-In bei Mäusen Ataxie und den Tod zwei Tage nach Geburt unter epileptischen Krämpfen bewirkt (Gerber et al., 2008).

### 1.3.3 Sec1/Munc18

Über alle Spezies hinweg gelten 2 Proteinfamilien als essentiell für die Membranfusion. Neben den eben beschriebenen SNARE-Proteinen sind dies die Angehörigen der Sec1/Munc18-Proteinfamilie (Hata, Slaughter, & Sudhof, 1993; Toonen & Verhage, 2007).

Entsprechend seiner beschreibenden zentralen Bedeutung führt der KO der Hauptisoform Munc18-1 in Chromaffinzellen zu 10-fach vermindertem Docking und 10-fach verminderter kalziuminduzierter Sekretion und die Überexpression umgekehrt zu einer Vermehrung der ausschüttbaren Vesikel (Voets et al., 2001).

Munc18-1 ist wie alle Sec1/Munc18- (SM-) Proteine bogenförmig und weist einen zentralen Spalt auf, mit welchem es die 4-Helixbündel sowohl des Syntaxins in der Closed-Konformation, als auch des gesamten SNARE-Komplexes umschließen kann. Weiter kann es mit seiner Außenseite an den N-terminalen Bereich von Syntaxin binden, was die Bildung des SNARE-Komplexes zulässt (Jahn, Lang, & Sudhof, 2003; Toonen & Verhage, 2007).

Über diese verschiedenen Bindungsstellen und weitere Bindungspartner besitzt Munc18-1 multiple Funktionen im Verlauf des gesamten Exozytoseprozesses. Munc18-1 ist syntaxinunabhängig für den Transport von LDCVs an die Membran und den Durchtritt der Vesikel durch den Aktinkortex bedeutsam, spielt syntaxinabhängig eine wichtige Rolle für Docking und Priming der LDCVs und ist durch die Bindung an den SNARE-Komplex am Fusionsprozess beteiligt. Die kalziumabhängige Phosphorylierung einer Syntaxin-Bindungsstelle von Munc18-1 stellt weiter einen der Modulationsschritte bei der Potentierung der synaptischen Übertragung dar. Als Mechanismen für die Wirkung von Munc 18-1 werden eine Funktion als Docking-Rezeptor in Kombination mit Syntaxin, ein Verhindern der Bildung von Syntaxin-Dimeren/Oligomeren/Heterodimeren und eine Kontrolle des Primingprozesses (Priming-Hypothese: Fortschreitender Zusammenbau des SNARE-Komplexes unter Öffnung von Syntaxin) durch ein Stabilisieren von Syntaxin in der Closed-Konformation sowie eine Proofreading-Funktion über den korrekten Zusammenbau des SNARE-Komplexes vermutet (X. Chen, Lu, Dulubova, & Rizo, 2008; Margittai et al., 2003; Misura, Scheller, & Weis, 2000; Toonen et al., 2006; Toonen & Verhage, 2007).

Weiter schützt es anscheinend die Syntaxin-Moleküle vor Degradierung (zelluläres Konzentrationsverhältnis Munc18-1 : Syntaxin = ca. 1:20), so dass diese bei Anwesenheit von Munc18-1 in höherer Konzentration in der Zelle vorliegen (Toonen, de Vries, Zalm, Sudhof, & Verhage, 2005).

Auch für die Lokalisation der Syntaxinmoleküle an die Membran könnte Munc18-1 eine Rolle spielen. So wurde für Syntaxin-YFP-Fusionsproteine in nicht neuronalen HEK-Zellen beobachtet, dass diese nur bei gleichzeitiger Expression von Munc18-1 ihren Ort der Funktion, die Zellmembran, erreichen und ansonsten eine Ansammlung perinukleär und lokalisiert im Zytosol zeigen (Gladycheva et al., 2007).

#### **1.3.4 Munc13**

Munc13 ist über die Spezies hinweg ein für die synaptische Sekretion wichtiger und für manche Zellen essentieller Priming Factor (Aravamudan, Fergestad, Davis, Rodesch, & Broadie, 1999; Augustin, Rosenmund, Sudhof, & Brose, 1999; Richmond, Davis, & Jorgensen, 1999). Auch in Chromaffinzellen bewirkt die Überexpression von Munc13 eine dreifache Steigerung der Sekretion aller drei Vesikel-Pools in Flashexperimenten ohne Auswirkung auf Docking (Ashery et al., 2000; Nofal, Becherer, Hof, Matti, & Rettig, 2007), wohingegen der KO aller Isoformen von Munc13 keine Auswirkung auf die Sekretion von Chromaffinzellen hat (D.R. Stevens, unpublished data). Dies mag zur Ursache haben, dass in Chromaffinzellen andere Proteine, wie das unten beschriebene CAPS, diese Aufgabe als Priming-Faktor in Chromaffinzellen übernehmen. Infolge der Beobachtung, dass eine konstitutiv offene Form von Syntaxin den KO des Munc13-Analogons unc13 in *C.elegans* retten kann, wird als Mechanismus der Priming Funktion von Munc13 das Öffnen von Syntaxin und damit einhergehend die Bereitstellung zum Eingehen des SNARE-Komplexes angenommen (Richmond, Weimer, & Jorgensen, 2001).

Da, wie oben beschrieben, Munc18 die Closed-Syntaxin-Konformation stabilisiert und dadurch die Bildung des SNARE-Komplexes hemmt, wurde als Wirkmechanismus von Munc13 vorgeschlagen, dass es das an Closed-Syntaxin gebundene Munc18 umlagert und damit die Öffnung des Syntaxins bewirkt, wodurch die Bildung des SNARE-Komplexes möglich würde (Dulubova et al., 1999).

Die Priming Funktion wird dabei von einer Region innerhalb des Munc13-Moleküls ausgeübt, die beide MHDs (Munc Homology Domaine, siehe unten) umfasst (Basu et al., 2005; Madison, Nurrish, & Kaplan, 2005; D. R. Stevens et al., 2005).

### 1.3.5 CAPS

CAPS ist ebenso ein höchstbedeutsames Protein für die optimale Funktion der regulierten Exozytose in manchen Bereichen des Nervensystems. Das Fehlen von CAPS ist letal für den Säugetierorganismus und bringt auf zellulärer Ebene eine starke Reduktion der Neurotransmittersekretion (siehe unten) mit sich (Y. Liu et al., 2008; Speidel et al., 2005). CAPS wird als ein für die regulierte Exozytose essentielles Protein konserviert über die Spezies hinweg gefunden, wobei CAPS die Säugetierversion, dCAPS die Drosophila-Version und unc-31 die C.elegans-Version bezeichnet (Ann, Kowalchuk, Loyet, & Martin, 1997; Avery, Bargmann, & Horvitz, 1993; Hay & Martin, 1992; Renden et al., 2001; Walent, Porter, & Martin, 1992).

Wie auch (M)unc13 und (M)unc18 wurde CAPS (unc31, slow movement) als eines der Proteine gefunden, die bei Mutation zu einem starken neurologisch-bedingten motorischen Defizit (uncoordinated movement) bei C.elegans führen (Brenner, 1974).

Die festgestellte Kalzium-Bindungsaffinität ( $K_D=270 \mu\text{M}$ ), Hinweise auf eine kalziumabhängige Konformationsänderung der Molekülstruktur und die wichtige Rolle bei der kalziumabhängigen Exozytose haben zur Bezeichnung Calcium-dependent-activator-protein of secretion (CAPS) geführt (Ann, Kowalchuk, Loyet, & Martin, 1997). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit kann aufgrund aktueller Datenlage jedoch noch nicht als gesichert angenommen werden.

CAPS scheint dabei besonders für die Sekretion von Large Dense Core Vesicles von großer Bedeutung zu sein (Berwin, Floor, & Martin, 1998; Tandon et al., 1998), wurde aber auch in unproportional großer Zahl in Neuronen mit nur wenigen LDCVs nachgewiesen, so dass auch eine Wirkung bei der Sekretion von SV naheliegt (Sadakata et al., 2006; Speidel et al., 2003). Dies wird durch Untersuchungen an autaptischen Zellen in hippokampalen Neuronenkulturen unterstützt (Jockusch et al., 2007).

Im Unterschied zu Drosophila und C.elegans, welche jeweils nur ein dCAPS/munc31-Gen besitzen, gibt es in der Maus und auch im Menschen zwei CAPS-Gene mit hoher Homologie (CAPS 1 und 2) und mehrere Splice-Varianten davon. Beide CAPS Isoformen kommen im Nebennierenmark vor. Im Gehirn ist CAPS 1 ubiquitär und CAPS 2 nur an ausgewählten Neuronentypen, vor allem im Kleinhirn und in dopaminreichen Mittelhirnregionen, vorhanden. Zudem findet man die beiden CAPS-Varianten in unterschiedlicher Verteilung auch in vielen verschiedenen extraneuronalen Geweben (Sadakata, Washida, & Furuichi, 2007; Speidel et al., 2003; D. R. Stevens & Rettig, 2009).

### 1.3.5.1 Morphologie

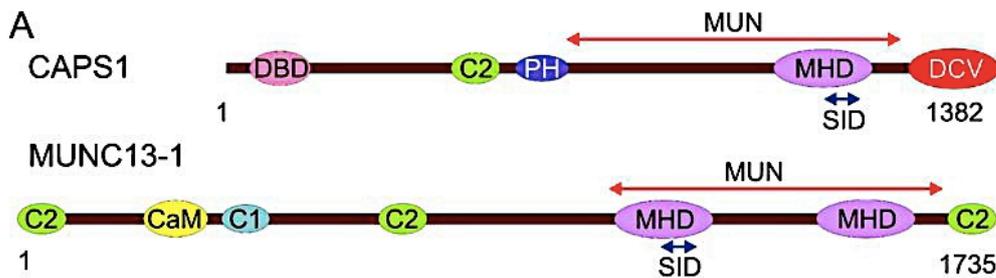


Abb. 1.8.: Domänenstruktur von CAPS 1 und Munc13-1 (D. R. Stevens & Rettig, 2009)

In der konservierten Proteinstruktur konnten verschiedene Domänen identifiziert werden. Gefunden wurden eine N-terminale Dynactin Binding Domäne (DBD) (Sadakata et al., 2007), eine C2-Domäne, die wahrscheinlich  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelt mit Membranen interagiert (Grishanin et al., 2002; Rizo & Sudhof, 1998), sowie daran anschließend eine Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH), welche mit sauren Phospholipiden in Wechselwirkung gehen und auf diese Weise ebenfalls an die Zellmembran, jedoch nicht an die Vesikelmembran, binden kann (Grishanin et al., 2002; Lemmon, 2008).

Über diese PH-Domäne und/oder über eine andere, noch nicht genauer bekannte, ebenfalls  $\text{PIP}_2$ -bindende Struktur reichert sich CAPS in den  $\text{PIP}_2$ -reichen Zellmembranteilen an, wie sie assoziiert mit Orten der Exozytose vorliegen. Die Anbindung von  $\text{PIP}_2$  scheint dabei neben Kalzium essentiell für die Funktion von CAPS zu sein (Aoyagi et al., 2005; Grishanin et al., 2002; Grishanin et al., 2004; James, Khodthong, Kowalchuk, & Martin, 2008; Loyet et al., 1998; Milosevic et al., 2005).

Da man weiter am C-terminalen Ende des CAPS-Proteins als Bindungsstelle für LDCV eine Domäne aus sauren Aminosäuren identifizierte (DCV-binding-Domäne), wurde die Theorie abgeleitet, dass CAPS Vesikel und Zellmembran miteinander verbindet und an  $\text{PIP}_2$ -reichen Regionen der Zellmembran lokalisiert (Grishanin et al., 2002; Grishanin et al., 2004).

Zudem wurde eine aus einer coiled-coil-Struktur bestehende Munc-Homologie-Domäne (MHD) beschrieben (Koch, Hofmann, & Brose, 2000), die ihrerseits eine Syntaxin-Interaktions Domäne enthält (SID) (A. Betz, Okamoto, Benseler, & Brose, 1997). Die MHD ist aus den (M)unc13-Homologen in C-elegans und Maus bekannt und wird dort zur Ausübung der Priming Funktion benötigt. Munc13's haben zwei MHD Domänen hintereinander und die für Priming erforderliche Region (MUN) überspannt beide davon (Basu et al., 2005; Madison, Nurrish, & Kaplan, 2005; D. R. Stevens et al., 2005).

Für CAPS wurde in diesem Zusammenhang vorgeschlagen, dass der Proteinbereich im Anschluss an die PH-Domäne bis zum Beginn der DCV-binding-domaine eine MUN-Domäne sei, und daher eine Funktionsweise ähnlich der von Munc13 vermutet (Speese et al., 2007).

### **1.3.5.2 Physiologie**

Funktionell ist von CAPS bekannt, dass es in Chromaffinzellen selektiv als fördernder Faktor für die Transformation der Vesikel aus dem SRP in den RRP beziehungsweise für die Stabilisierung der Vesikel im RRP wirkt (Y. Liu et al., 2010). Damit ist es ein Primingfaktor und hat das für kognitive Funktionen bedeutsame Potential, die Zahl der physiologisch auf ein Aktionspotential hin ausschüttbaren Vesikel zu erhöhen.

Ein Fehlen beider CAPS-Isoformen (Double-Knock-Out/DKO) in Maus-Chromaffinzellen führt in Flash-Experimenten zu einer um mehr als 50% reduzierten Größe des RRP. Auf zellulärer Ebene scheinen die beiden CAPS-Homologe dabei redundant zu sein und das Fehlen der jeweils anderen Isoform kompensieren zu können. Neben der Reduktion des RRP wurde zudem ein nahezu vollständiges Fehlen des Sustained Release in den CAPS-DKO-Zellen registriert (Y. Liu et al., 2008; Y. Liu et al., 2010).

Weiter wurde eine Bedeutung von CAPS 1 und CAPS 2 für das Laden der LDCVs mit Katecholaminen festgestellt (Brunk, Blex, Speidel, Brose, & Ahnert-Hilger, 2009; Speidel et al., 2005).

Die Eigenschaft, dass CAPS an Syntaxin binden kann (N. J. Daily, Boswell, James, & Martin, 2010), die morphologische Ähnlichkeit zu Munc13 und die experimentelle Beobachtung, dass über ein virales Expressionssystem nachträglich eingebrachte konstitutiv-offene Syntaxinmoleküle das Sekretionsdefizit des RRP der CAPS-defizienten-Maus-Chromaffinzellen ausgleichen konnten, legen eine Wirkung von CAPS ähnlich derer von Munc13 nahe. Munc13, das bei Überexpression in WT-Chromaffinzellen alle Pools dreifach vergrößert (CAPS wirkt v.a. steigernd auf den RRP), führt in CAPS-DKOs interessanterweise zu einer Verringerung der Sekretion und kann erst bei gleichzeitiger Anwesenheit von CAPS 1 seine sekretionssteigernde Wirkung entfalten, was auf eine parallele oder subsequente Wirkung von CAPS und Munc13 hinweist (Y. Liu et al., 2010).

Ein weiterer Hinweis auf eine ähnliche oder aufeinander folgende Wirkung von CAPS und Munc13 im Ablauf der regulierten Exozytose kommt aus Experimenten zur Modifikation von Sekretion an *C.elegans*. Die dortigen Munc13 und CAPS-Homologe *unc13* und *unc31* haben nämlich als Gemeinsamkeit, dass bei ihrem jeweiligen Fehlen eine Steigerung der Sekretion durch aktivierte Proteinkinase C nicht möglich ist. (Nishizaki, Walent, Kowalchuk, & Martin, 1992; J. S. Rhee et al., 2002; D. R. Stevens & Rettig, 2009).

Bei den oben angeschnittenen Experimenten zur Überprüfung des vermuteten Mechanismus von CAPS (Öffnen von Syntaxin) ist bemerkenswert, dass Open-Syntaxin im Gegensatz zum Rescue durch CAPS 1 in CAPS-DKO-Chromaffinzellen nur den RRP und nicht den Sustained Release wiederherstellt. Auch in WT-Chromaffinzellen führt die Expression von Open-Syntaxin zu einer Steigerung des RRP, jedoch interessanterweise auch zu einer Aufhebung des Sustained Release. Sowohl in WT als auch in DKOs wurden weiter Hinweise dafür gefunden, dass die Expression von Open-Syntaxin das Wiederauffüllen von SRP und RRP mit Vesikeln behindert. Eine mögliche Erklärung für die Reduktion des Sustained Release und der damit vermutlich im Zusammenhang stehenden Wiederauffüllung der Pools ist eine verminderte Nachlieferung von Vesikeln an die Zellmembran durch eine Störung des Docking-Vorgangs durch Open-Syntaxin, wie es auch in EM-Aufnahmen beobachtet wurde (Gerber et al., 2008; Y. Liu et al., 2010).

CAPS kann weiter – neben der oben angeführten Anbindung an Syntaxin – mit ebenso hoher Affinität an SNAP-25 binden und auch mit geringerer Affinität eine Bindung zu Synaptobrevin eingehen. Diese Bindungen sind alle 3 gleichzeitig möglich, so dass CAPS auch an den zusammengesetzten SNARE-Komplex binden kann.

CAPS fördert stark die SNARE-Protein-vermittelte Fusion von Liposomen mit Syntaxin/SNAP25-Akzeptorvesikeln und Synaptobrevin-Donorvesikeln. Dafür wird kein Kalzium benötigt und die Kalziumkonzentration hat auch keinen Einfluss auf diesen Fusionsprozess. Die aus dem CAPS-Protein isolierte MUN-Homologie-Domäne hatte dabei ebenfalls keinen fördernden Einfluss auf die Fusionsereignisse, sondern vermittelte in diesen sehr reduzierten Umgebungsbedingungen nur die Bindung von CAPS an Syntaxin. In Zusammenschau dieser Ergebnisse mit der Feststellung, dass CAPS Oligomere bilden kann (Nojiri, Loyet, Klenchin, Kabachinski, & Martin, 2009; Walent, Porter, & Martin, 1992), wurden von den unten genannten Autoren dieser Studien alternative Hypothesen zum Wirkmechanismus vorgeschlagen:

- 1) CAPS clustert Syntaxin/SNAP-25-Dimere als Akzeptorkomplexe für Synaptobrevin, um die Aufeinandertreffenswahrscheinlichkeit der V-SNAREs mit den nur in einer Konzentration von 1-5 Molekülen pro  $\mu\text{m}^2$  vorliegenden T-SNAREs zu erhöhen, 2) CAPS stellt die parallele Ausrichtung von Syntaxin und SNAP-25 sicher und/oder 3) begünstigt das Einsetzen des Synaptobrevin-Moleküls in den Syntaxin-SNAP-25-Akzeptorkomplex (N. J. Daily, Boswell, James, & Martin, 2010; James, Kowalchuk, Daily, Petrie, & Martin, 2009).

Eine früher angenommene Wirkung von CAPS auf den Fusionsprozess (Elhamdani, Martin, Kowalchuk, & Artalejo, 1999) sowie eine Bedeutung für Docking der LDCVs, wie für unc31 in *C.elegans* beobachtet (Hammarlund, Watanabe, Schuske, & Jorgensen, 2008), scheinen in Säugetierchromaffinzellen jedoch nicht zu bestehen (Y. Liu et al., 2008; Speidel et al., 2005).

### **1.3.5.3 Mutationen und Krankheiten**

Mäuse mit fehlendem CAPS 1 sterben kurz nach der Geburt (Speidel et al., 2005), wohingegen Mäuse mit einem KO von CAPS 2 keine Veränderungen von Aussehen, Motorik, Sensorik und Überleben aufweisen.

CAPS-2-KO Mäuse zeigen jedoch Autismus-typische Verhaltensmuster, insbesondere eine deutliche Vernachlässigung ihres Nachwuchses. Dies ist insbesondere interessant, da CAPS 2 in einer Genregion lokalisiert ist, die mit Autismus beim Menschen in Zusammenhang steht. Die Ursache dieser Verhaltensstörung könnte in mangelhaft ausgebildeten Gehirnstrukturen liegen, die durch verminderte CAPS-2-vermittelte-Sekretion von neurotrophen Proteinen hervorgerufen sein könnte. Strukturelle Auffälligkeiten in Gehirnen von CAPS-2-KO-Mäusen sind bekannt (Sadakata et al., 2006) und weisen Ähnlichkeit mit den Veränderungen beim Mangel an den neuronalen Wachstumsfaktoren BDNF und NT3 auf (D. R. Stevens & Rettig, 2009). Da CAPS 2 eine wichtige Rolle bei der Sekretion von BDNF spielt und CAPS-2-KO-Zellen Defizite bei Wachstum und Überleben aufweisen, die wiederum durch BDNF ausgeglichen werden können, ist dies eine attraktive Hypothese (Sadakata et al., 2004; Sadakata et al., 2007). Ob eine CAPS-2-Splice-Variante mit einem fehlenden Exon 3, was durch die damit fehlende Dynactin-Binding-Domäne nicht ausreichend an die Synapse transportiert werden kann, bei Menschen mit autistischen Störungen vermehrt exprimiert wird und dieser mögliche Defekt eine Rolle für die Entstehung dieser Erkrankung spielt, wird kontrovers diskutiert (Eran et al., 2009; Sadakata et al., 2007; Sadakata & Furuichi, 2010). Für eine Assoziation dieser Splice-Variante mit niedrigerer Intelligenz und geringerer Gedächtnisleistung bei psychisch gesunden Menschen liegen aufgrund ebenfalls nur dünnen Datenlage nur Verdachtsmomente vor (Hattori et al., 2012). In einer weiteren Studie in diesem Kontext wurde in Gehirnen von Menschen mit Schizophrenie, jedoch nicht bei Menschen mit affektiven Störungen post-mortem im Gegensatz dazu erhöhte CAPS-2-Genexpressionslevel gefunden, wobei der Anteil der Splice-Variante ohne Exon 3 am Gesamt-CAPS-2 unauffällig war (Hattori et al., 2011).

### **1.3.6 Weitere Moleküle der neuronalen regulierten Exozytose**

Bei dem hochgradig kontrollierten und für den Gesamtorganismus äußerst bedeutsamen Vorgang der regulierten Exozytose im Nervensystem spielt eine Vielzahl von weiteren Effektormolekülen eine Rolle.

Als Kalziumsensor (Trigger) der schnellen Komponente der Sekretion in Chromaffinzellen und manchen Neuronen wurde Synaptotagmin 1 identifiziert. Daneben ist Synaptotagmin 1 wahrscheinlich das Vesikel-assoziierte Protein für den Docking-Vorgang. Auf SVs und LDCVs sitzt weiter Rab3A, der Hauptvertreter einer Familie kleiner GTP-bindender-Proteine, die generell Transportvesikel und sekretorische Vesikel an ihre Zielmembranen leiten. Rab3A interagiert mit Rabphilins und RIMs (Rab3-interacting-molecules). RIMs sitzen an der Zellmembran und haben eine wichtige Funktion bei der Organisation der Active Zone. Am Aufbau der Aktive Zone sind auch die Proteine Bassoon und Piccolo beteiligt. Als sekretionsmodulierende Effektormoleküle sind neben Munc18, Munc13 und CAPS weiter Complexin, Tomosyn, Doc2, Snapin und Synapsin bekannt. Zudem werden im Zusammenhang mit kalziumabhängiger neuronaler Sekretion Granuphilin, Synaptophysin, Synaptogyrin, Scinderin und Mint angeführt (Becherer & Rettig, 2006; Fioravante & Regehr, 2011; Jahn, Lang, & Sudhof, 2003; Schmidt, Schirra, Matti, Stevens, & Rettig, 2013; D. R. Stevens, Schirra, Becherer, & Rettig, 2011; van Weering, Toonen, & Verhage, 2007; Wang, Okamoto, Schmitz, Hofmann, & Sudhof, 1997; Zucker & Regehr, 2002).

## 1.4 Fragestellung

Das Calcium-Dependent-Activator-Protein-for-Sekretion (CAPS) ist ein bedeutender Priming Faktor für die LDCV-Sekretion in Chromaffinzellen. Es fördert selektiv die Transformation von Large-Dense-Core-Vesikeln vom Slowly-Releasable-Pool (SRP) in den Rapidly-Releasable-Pool (RRP). Dies spiegelt sich bei seinem vollständiges Fehlen in CAPS-Doppel-Knock-Out-Chromaffinzellen in einem reduzierten RRP und einer erniedrigten Sustained Rate in Flash-Experimenten wieder.

Da der RRP-Defekt im CAPS-DKO durch Expression der konstitutiv-offenen Form von Syntaxin 1A ausgeglichen werden kann, wurde als Hypothese für den molekularen Funktionsmechanismus von CAPS die Überführung von Syntaxin 1A aus der geschlossenen in die offene Konformation vorgeschlagen. Durch die offene Konformation wird die Bildung des vollständigen SNARE-Komplexes ermöglicht, was wiederum als Hauptschritt der Priming-Reaktion angesehen wird. Diese potentielle Wirkweise von CAPS wird auch durch die vermutlich in der Proteinstruktur enthaltene MUN-Domäne nahegelegt, die CAPS mit dem bekannten Priming-Faktor Munc13 teilt. Die bisher publizierten Ergebnisse zu CAPS, Munc 13 und Open-Syntaxin lassen jedoch noch Raum für weitere Theorien zum Wirkmechanismus von CAPS.

Insbesondere die alternativ vorgeschlagene Funktion von CAPS bei der Zusammenführung der SNARE-Proteine bzw. der Verhinderung von Fehlzusammenlagerungen ist in Anbetracht der Natur der Syntaxin-Moleküle verschiedene, physiologisch bedeutsame aber auch fehlerhafte Interaktionen mit sich selbst und den anderen SNARE-Proteinen einzugehen, eine interessante Option.

Die Wiederherstellung der Sekretion in CAPS-DKO-Chromaffinzellen durch Expression von Open-Syntaxin könnte in diesem Zusammenhang auch unabhängig von der konstitutiv-offenen Konformation durch eine erhöhte Anzahl an Syntaxinmolekülen erklärt werden. Erklärungsmodelle dafür wären eine gesteigerte Bildung von SNARE-Komplexen oder deren physiologisch bedeutsamen Vorstufen durch ein vermehrtes Angebot an Syntaxin an der Zellmembran, Veränderungen in der Clusterarchitektur oder eine Wirkung durch eine funktionelle Domäne des Syntaxin-Moleküls, die nicht von der Konformationsänderung betroffen ist und die durch die Überexpression in größerer Zahl vorliegt.

Um diese Hypothesen zum molekularen Primingmechanismus von CAPS weiter zu untersuchen, gilt es zu überprüfen, ob das Sekretionsdefizit der CAPS-DKO-Chromaffinzellen selektiv nur durch die zusätzliche Expression der konstitutiv-offenen Form von Syntaxin ausgeglichen wird oder ob dieser Effekt auch durch Überexpression von unmodifiziertem Syntaxin 1A erreicht wird und damit unabhängig von der offenen Konformation ist.

Die Durchführung dieser Kontrolluntersuchung ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

## 2 Material und Methoden

Um Doppelungen von Angaben zu vermeiden, wurden die Herstellerangaben der verwendeten Geräte in die Beschreibung der Methoden integriert.

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verwendete Substanzen

##### 2.1.1.1 Reagenzien

<u>Name</u>	<u>Hersteller/ Vertrieb</u>
Agarosepulver 2 %	Carl Roth
Albumin	Sigma
Aprotinin	Sigma
BSA	Sigma
CaCl <sub>2</sub> 1M Standard Lösung	VWR (BDH Prolabo)
CsOH	Sigma
DMEM	Invitrogen
dNTP-Mix	Fermentas
EDTA 50 mM	Sigma
Ethidiumbromid	Carl Roth
FCS	Invitrogen
Furaptra	Invitrogen
Fura-4F	Invitrogen
Glucose	Merck
Glycerol	Carl Roth
Glycin	Merck
HCl	Merck
HEPES	Sigma
HPLC-H <sub>2</sub> O	VWR
ITS-X (100x)	Invitrogen
KCl	Merck
KOH	Merck
L-Cystein	Sigma

L-Glutamat	Sigma
Mg-ATP	Sigma
MgCl <sub>2</sub>	Merck
NaCl	Merck
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	Merck
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	Merck
Na <sub>2</sub> -GTP	Sigma
NaOH	Merck
NGS 2,5 %	Invitrogen
NP-EGTA	Invitrogen
OptiMEM	Invitrogen
PBS	Invitrogen
Pen/Strep	Invitrogen
Paraformaldehyd	Sigma
Quick Extrakt DNA Extraction Solution 1.0	Epicentre
TRIS-Puffer	Carl Roth
Triton X 100	Carl Roth
Trypsin-Inhibitor (Ovoinhibitor)	Sigma
Tryptosephosphat	Invitrogen

### **2.1.1.2 Enzyme**

Chymotrypsin	Sigma
Papain	Worthington Biochemical
Red Taq Polymerase	Sigma
Trypsin/EDTA 10x	Invitrogen

### **2.1.1.3 Antikörper**

Anti-Syntaxin 1A mouse monoclonal	Synaptic Systems
-----------------------------------	------------------

Ein Primärantikörper, hergestellt nach (Barnstable, Hofstein, & Akagawa, 1985), der gegen eine N-terminale Struktur von Syntaxin 1A der Ratte gerichtet ist und keine Bindung an Syntaxin 1B aufweist. Er erkennt auch Komplexe von Syntaxin mit SNAP-25 und Synaptobrevin.

Alexa 647 goat anti-mouse 2 mg/ml

Invitrogen

Ein Sekundärantikörper, gerichtet gegen die schwere Kette von Immunglobulin G und die leichten Ketten aller Immunglobulintypen der Maus.

#### **2.1.1.4 Primer**

Alle Primer von MPI Molekulare Neurobiologie, Göttingen, AGTC Lab

Primer # 1502 5' TGC GGT GGG CTC TAT GGC TTC T 3'

Primer # 1503 5' CTC GAG TGG CCT GAT CTT TGT CA 3'

Primer # 1504 5' TAT GAG GAG TTT ATG TGC GTG GAT3'

Primer # 5471 5' GTA CCA TAG TTC TGT GCC GTG TAA TC 3'

Primer # 5472 5' GGA GGC TCG CAG CTC TTC AAT G 3'

Primer # 4174 5' CGC ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTT 3'

Primer # 1502 und # 1504 binden an CAPS-1-KO-DNA

Primer # 1503 und # 1504 binden an CAPS-1-WT-DNA

Primer # 5472 und # 5471 binden an CAPS-2-KO-DNA

Primer # 4174 und # 5471 binden an CAPS-2-WT-DNA

#### **2.1.2 Zusammensetzung der benötigten Lösungen**

##### **2.1.2.1 Lösungen: Gewinnung der Chromaffinzellen**

###### Inaktivierungslösung

50 ml DMEM

5ml FCS

125 mg Albumin

125 mg Trypsin-Inhibitor

Sterilfiltriert in 2 ml Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

Nach Auftauen bei 37 °C und 13 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### Locke's Medium

154 mM	NaCl
5,6 mM	KCl
0,85 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
2,15 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
10 mM	Glucose

Osmolarität ca. 312 mosmol/l, pH 7,4

### Mastermix für CAPS 1

100 µl	PCR-Puffer 10x
50 µl	dNTP-Mix 2.5 mM
760 µl	HPLC-H <sub>2</sub> O
5 µl	Primer # 1502 (50 pmol/µl)
5 µl	Primer # 1503 (50 pmol/µl)
5 µl	Primer # 1504 (50 pmol/µl)

### Mastermix für CAPS 2

100 µl	PCR-Puffer 10x
50 µl	dNTP-Mix 2,5 mM
755 µl	HPLC-H <sub>2</sub> O
10 µl	Primer # 5471 (50 pmol/µl)
5 µl	Primer # 5472 (50 pmol/µl)
5 µl	Primer # 4174 (50 pmol/µl)

### Papain -Lösung

50 ml	DMEM
10 mg	L-Cystein
0,5 ml	CaCl <sub>2</sub> 100 mM
0,5 ml	EDTA 50 mM

In 2 ml Aliquots bei -20 °C aufbewahrt. Nach Auftauen dieser Grundlösung 20 Units Papain pro 1 ml Papain-Grundlösung (für embryonale Chromaffinzellen 15 U/ml) hinzugefügt und für 20 Minuten mit Carbogen im Wasserbad (37°C) begast. Anschließend sterilfiltriert.

### TAE-Puffer 50x

121 g            TRIS-Puffer  
28,55 ml        Essigsäure 99 %  
50 ml            EDTA 0,5 M (pH 8,0)

auf 500 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> aufgefüllt und sterilfiltriert (pH 8,5).

### Zellkultur-Medium

40 ml            DMEM  
400 µl          ITS-X  
160 µl          Pen/Strep

Bei 37°C und 13% CO<sub>2</sub> inkubiert.

## **2.1.2.2 Lösungen: Transduktion**

### Aprotinin

6 mg/ml Aprotinin  
in HBS (siehe unten)

In 110 µl Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

### Chymotrypsin

2 mg/ml Chymotrypsin  
in HBS (siehe unten)

In 100 µl Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

### HBS

140 mM        NaCl  
20 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
10 mM HEPES  
10 mM MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O  
5 mM          KCl  
in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

Osmolarität 360 mosmol/l, pH 7,2

#### OptiMEM + 0.2% BSA

44 ml	OptiMEM
5 ml	Tryptosephosphat
1 ml	HEPES 1M
50 µl	Pen/Strep
0,1 g	BSA

Sterilfiltriert bei 4°C aufbewahrt.

#### OptiMEM + 2,5 % FCS

100 ml	Tryptosephosphat
20 ml	Hepes 1M
25 ml	FCS
1 ml	Pen/Strep

auf 1000 ml mit OptiMEM aufgefüllt und sterilfiltriert. Bei 4 °C aufbewahrt.

#### OptiMEM + 5 % FCS

15 ml	Tryptosephosphat
3 ml	Hepes 1M
7,5 ml	FCS
150 µl	Pen/Strep

auf 150 ml mit OptiMEM aufgefüllt und sterilfiltriert. Bei 4°C aufbewahrt.

#### Trypsin / EDTA 1x

Trypsin/ EDTA 10x

1:10 verdünnt mit PBS (siehe 2.1.2.4. Lösungen: Immunocytochemie)

### **2.1.2.3 Lösungen: Elektrophysiologie**

#### Extrazellulärlösung

144,5 mM NaCl

10 mM HEPES

3 mM MgCl

2,4 mM KCl

1 mM CaCl

2 mg/l Glucose

Osmolarität 310 - 315 mosmol/l, pH 7,5

#### Intrazellulärlösung für „Flash“-Experimente

12,5 µl NP-EGTA 40 mM

31 µl 2x Glutamat Puffer pH 7,6

22,1/ 22.2 µl HPLC-H<sub>2</sub>O

8 µl ATP/GTP

3,2 µl Furaptra + Fura 4F

3,2/ 3,1 µl CaCl<sub>2</sub>

dabei

#### NP-EGTA 40 mM

100 mM NP-EGTA in 100 mM HEPES

Osmolarität 917 mosmol/l, pH mit KOH angepasst auf pH 7,2

In 400 µl Aliquots bei -80 °C aufbewahrt. Nach Auftauen 600 µl HPLC-H<sub>2</sub>O hinzugegeben und vermischt. Der entstandene 40 mM NP-EGTA-Stock wurde in 12,5 µl Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

#### 2x Glutamat-Puffer

0,3678 g      L-Glutamat  
0,1906 g      HEPES  
8 ml          HPLC-H<sub>2</sub>O  
300 µl        CsOH (50 %)

Osmolarität 589 – 604 mosmol/l, pH mit CsOH angepasst auf pH 7,6

Sterilfiltriert in 50 µl Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

#### ATP/GTP

20 mM        Mg-ATP  
2 mM        Na<sub>2</sub>-GTP  
10 mM       HEPES  
in HPLC-H<sub>2</sub>O

Osmolarität 55 mosmol/l, pH angepasst mit CsOH auf pH 7,2

Sterilfiltriert in 20 µl Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

#### Furaptra + Fura 4F

5 mM        Furaptra (MW 586,68)  
5 mM        Fura 4F (MW 835,96)  
20 mM       HEPES  
in HPLC-H<sub>2</sub>O

In 20 µl Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

#### **2.1.2.4 Lösungen: Immunocytochemie**

Alle Lösungen bis auf das Mounting Medium wurden am Tag der Färbung hergestellt.

#### Blockierungslösung

2,5 %        NGS  
in PBS (siehe unten)

### Formaldehydlösung 4 %

1,5 g Paraformaldehyd in 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> auf 60°C erhitzt und unter Rühren 1 Tropfen 2 M NaOH hinzugefügt. Rühren bis Lösung klar.

Anschließend Zugabe von 37,5 ml PBS (siehe unten).

pH angepasst mit HCl bzw. NaOH auf pH 7,1 – pH 7,4

Sofort nach Herstellung zur Fixierung verwendet.

### Glycin-Lösung 50 mM

0,187675 g Glycin

50 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

### Mounting Medium

6 g Glycerol

2,4 g Mowiol

12 ml TRIS-Puffer 0,2 M

6 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

### PBS

58 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

17 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

83 mM NaCl

in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

Osmolarität angepasst mit NaCl auf 320 mosmol/l,

pH angepasst mit NaOH bzw. HCl auf pH 7,4.

Sterilfiltriert.

### Waschlösung

2,5 % NGS

0,1 % Triton X 100

in PBS

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Gewinnung der Chromaffinzellen

#### 2.2.1.1 Wildtyp- und CAPS-DKO-Mäuse

Die Wildtyp-Chromaffinzellen wurden aus den Nebennieren von 1 – 3 Tage alten (P1 – P3) C57BL6/N (Charles-River)-Mäusen gewonnen.

CAPS-1/CAPS-2-Double-KO-Mäuse (CAPS-DKO) wurden durch Verpaarung von CAPS-1- und CAPS-2-KO-Mäusen generiert.

CAPS-1- und CAPS-2-KO-Mäuse wurden jeweils durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen erzeugt. Als Basis dienten ebenfalls C57BL6/N (Charles-River)-Mäuse (Jockusch et al., 2007; Speidel et al., 2005).

Die CAPS-1-Deletion wurde durch Verpaarung heterozygoter CAPS-1-KO-Mäuse mit homozygoten CAPS-2-KO-Mäusen in die CAPS-2-KO-Linie eingebracht. Die anschließend durch Weiterverpaarung mit CAPS-2-KO-Mäusen in zweiter und folgenden Generationen entstandenen CAPS-1-KO heterozygoten und CAPS-2-KO homozygoten Tiere (CAPS-1/CAPS-2 +/-) wurden für die Züchtung des CAPS-1/CAPS-2 Double-Knock-Outs verwendet.

Jeweils ein Weibchen und ein Männchen der CAPS-1/CAPS-2 +/- Mäuse wurden dafür für zwei Tage in einen gemeinsamen Käfig gegeben und im Fall einer Schwangerschaft die Embryos am 18. oder 19. Schwangerschaftstag (E18 oder E19) per Kaiserschnitt geboren. Dieser Geburtsmodus ist erforderlich, da die nach den Mendelschen Regeln mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:4 vorliegenden CAPS-1/CAPS-2-Double-KO-Mäuse – ebenso wie der homozygote CAPS-1-KO – postpartal nicht überlebensfähig sind. Als erster Tag der Schwangerschaft wurde dabei der Tag des Zusammensetzens in einen gemeinsamen Käfig festgelegt.

#### 2.2.1.2 Zellpräparation und Zellkultur

Neugeborene Wildtyp-Mäuse und schwangere CAPS-1/CAPS-2 +/- Mäuse wurden in CO<sub>2</sub>-Narkose dekapitiert. Die durch den anschließenden Kaiserschnitt geborenen Embryos wurden ebenfalls dekapitiert und auf Eis zwischengelagert.

Mittels Schere und Pinzette wurden möglichst schnell die Nebennieren entnommen, diese in einen Tropfen kaltes Locke's Medium gelegt und unter dem Mikroskop gesäubert. Die von Fett und Blut befreiten Nebennieren wurden in einen frischen Tropfen Locke's Medium überführt und von dort in einen Falcon mit 400 µl Papain-Lösung gegeben. Embryonale Nebennieren der CAPS-

KO-Mäuse wurden 20 – 21 Minuten, Nebennieren der neugeborenen Wildtyp-Mäuse je nach Stadium (P1 – P3) 20 – 23 Minuten in der Papain-Lösung im 37 °C warmen Schüttelbad inkubiert, anschließend die Papainlösung durch die Inaktivierungslösung ersetzt und weitere 4 Minuten inkubiert. Nach dem Austausch der Inaktivierungslösung mit 600 µl Medium wurden die Nebennieren vorsichtig mit einer 200 µl – Pipette trituriert bis nur noch die Bindegewebshülle der Nebenniere als ungelöster Bestandteil vorhanden war. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 100 µl auf UV-Licht-sterilisierte 25 mm - Deckgläser gegeben und in 6-Kammer-Platten für 30 Minuten im Brutschrank bei 37 °C und 13 % CO<sub>2</sub> inkubiert, damit die Zellen am Deckglas anhaften konnten. Nach Zugabe von 3 ml Zellkultur-Medium wurden die Zellen 3 Tage im Brutschrank in Kultur gehalten und am 2. und 3. Tag für Experimente verwendet. Für die Präparation wurden bevorzugt die kleineren und weniger aktiven Embryos verwendet, da diese mit höherer Wahrscheinlichkeit die gewünschten CAPS-DKO- Mäuse sind (Y. Liu et al., 2008).

### **2.2.1.3 Genotypisierung der CAPS-KO-Mäuse**

Um die bei der Verpaarung entstandenen CAPS-DKO-Embryos zu identifizieren, wurde eine Genotypisierung durchgeführt. Zur DNA-Freisetzung wurde dafür auf den abgetrennten Schwanz der zu bestimmenden Maus 100 µl Quick Extrakt pipettiert und dieser damit 6 Minuten im Schüttler bei 65 °C inkubiert. Zur Deaktivierung wurde anschließend die Schüttlertemperatur auf 98 °C umgestellt und einschließlich der Aufheizphase für weitere 10 Minuten inkubiert.

Zu 0,5 µl der auf diese Weise gewonnenen DNA-Probe wurden weiter 18,5 µl eines Mastermix und 1,0 µl Red-Taq-Polymerase gegeben und zur Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in den Mastercycler gradient (Eppendorf AG, Hamburg) eingesetzt.

#### PCR-Programm für CAPS 1

(Anzahl der Zyklen: 40)

1=	94°C	für 5 min
2=	94°C	für 30 s
3=	60°C	für 30 s
4=	72°C	für 30 s
5=	Gehe zu 2, Wiederholungen 39	
6=	72°C	für 7 min
7=	4°C	Halten

#### PCR-Programm für CAPS 2

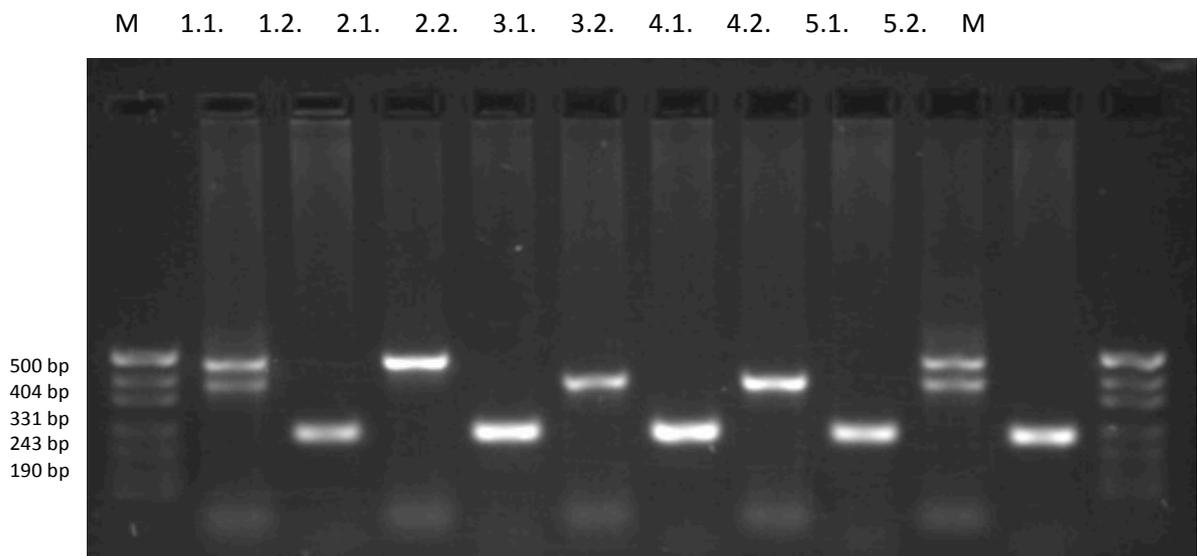
(Anzahl der Zyklen: 30)

1=	94°C	für 3 min
2=	94°C	für 30 s
3=	60°C	für 30 s
4=	72°C	für 1 min
5=	Gehe zu 2, Wiederholungen 29	
6=	72°C	für 7 min
7=	4°C	Halten

Die durch PCR vervielfältigten DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Dafür wurden 0,6 g Agarosepulver 2% mit TAE-Puffer 40mM auf 30 g aufgefüllt und diese Mischung in der Mikrowelle mehrfach zum Kochen gebracht bis das Agarosepulver vollständig gelöst war. Nach Abkühlen auf 37 °C wurden 1,5 µl Ethidiumbromid hinzugefügt, alles gut durchmischt und unter Vermeidung von Luftblasen ein Gel gegossen. Nach 20 Minuten war das Gel ausgehärtet und es konnte damit im 40mM-TAE-Puffer-Bad eine Elektrophorese durchgeführt werden. Dafür wurden jeweils 2 µl PCR-Marker und 10 µl der DNA-Proben in eine Gel-Tasche gegeben und für 45 Minuten eine Spannung von 80 Volt angelegt.

Aufgrund unterschiedlicher Länge der DNA an den CAPS-Genloci entsteht ein typisches Bandenmuster:

CAPS-1-KO-DNA:	465 bp
CAPS-1-WT-DNA:	382 bp
CAPS-2-KO-DNA:	225 bp
CAPS-2-WT-DNA:	153 bp



*Abb. 2.1: Beispiel für eine Genotypisierung mittels Agarose-Gel-Elektrophorese*

*Größenmarker (M) an beiden Rändern. Die getesteten DNA-Proben 1.1. und 1.2. stammen von einer Maus, wobei in 1.1. CAPS-1-DNA und in 1.2. CAPS-2-DNA vervielfältigt wurde. Dieses Schema wird bei Taschen 2.1. bis 5.2. beibehalten.*

*Alle getesteten Mäuse sind CAPS-2-KO-homozygot. Maus 3 und 4 sind homozygot für natürliche CAPS-1-DNA, Maus 2 ist homozygot für CAPS-1-KO-DNA und Maus 1 und 5 sind heterozygot. Nur Maus 2 ist also ein CAPS-DKO.*

## **2.2.2 Transduktion**

Im Rahmen der Experimente erfolgte eine Transduktion der Chromaffinzellen mittels des Semliki Forest Virus (SFV) Systems nach (Ashery, Betz, Xu, Brose, & Rettig, 1999).

Zur Herstellung der SFV-Transduktionssysteme wurden in BHK-Zellen (DSMZ Heidelberg) nach mehrmaligem Waschen mittels Elektroporation parallel RNA für das Semliki-Forest-Virus-Kapsid (pSFV) und die RNA der jeweils zu exprimierenden Proteine eingebracht. Die verwendeten RNA-Konstrukte waren Syntaxin-IRES-eGFP, SyntaxinLE-165/166A-PV-IRES-GFP (Open-Syntaxin) und eGFP. Nach 24 Stunden Inkubation bei 5 % CO<sub>2</sub> und 31 °C wurde der die Viren enthaltende Überstand abpipettiert und in 450 µl Aliquots bei -80 °C eingefroren.

Um vor der Transduktion die erzeugten Viren zu aktivieren, wurden jeweils 450 µl Virusaliquot mit 100 µl Chymotrypsin und 450 µl OptiMEM + 0,2 % BSA bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 40 Minuten erfolgte die Zugabe von 110 µl Aprotinin und weitere Inkubation für 2 – 3 Minuten bei Raumtemperatur.

Für die Transduktion wurden je nach Virus-Charge 70 – 200 µl aktivierte Viruslösung pro Coverslip in die 6-Kammerplatten zu den mit Chromaffinzellen besetzten Deckplättchen einpipettiert.

Die anschließenden Inkubationszeiten im Brutschrank betragen 4,5 Stunden mit pSFV1-Syntaxin-IRES-eGFP und pSFV1-SyntaxinLE-165/166A-PV-IRES-GFP und 3 Stunden mit pSFV-eGFP.

## **2.2.3 Elektrophysiologie**

### **2.2.3.1 Aufbau des Patchclamp-Setups**

Die elektrophysiologischen Messungen wurden mit einem EPC-9 Patchclamp-Verstärker von HEKA Electronics, Lambrecht/Pfalz, und der ebenfalls von HEKA stammenden Software Pulse 8.53 durchgeführt. Die bei den Messungen verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe wurden über den Monochromator Polychrome 4 von TILL Photonics, jetzt FEI Munich, Gräfelfing, angeregt und das Emissionslicht über eine Photodiode verstärkt und gemessen. Zur Spaltung des Kalziumchelators NP-EGTA wurde ein UV-Lichtblitz mit einer Xenon-Bogenlampe von Rapp Opto Electronics, Hamburg, erzeugt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software IGOR Pro 6.04 von Wave Metrics, Lake Oswego, Oregon, USA.

Die verwendeten 3,5 bis 5,5 MΩ-Patchclamp-Pipetten (GB150F-8P, Science Products, Hofheim) wurden mit dem Pipette-Puller P-97 von Sutter Instruments, Novato, California, USA, gezogen. Auf die Pipettenspitze wurde anschließend Modellierwachs der Firma Pluradent, Offenbach aufgetragen und diese dann hitzepoliert.

### **2.2.3.2 Zelloberflächenbestimmung mittels Membrankapazitätsmessung**

Die Größe der Zelloberfläche ist direkt proportional zur elektrischen Kapazität der Zellmembran. 1 cm<sup>2</sup> entspricht dabei ca. 1 µF (Fenwick, Marty, & Neher, 1982).

Die Bestimmung der Größe der Zelloberfläche sowie deren Veränderungen im Rahmen von Endo- und Exozytose sind daher durch Messung der Membrankapazität möglich. Dafür wurden die elektrophysiologischen Experimente in Whole-Cell-Konfiguration durchgeführt und dabei darauf geachtet, dass die Pipettenelektrode durch dichten Kontakt zwischen Pipettenspitze und Zellmembran mit einem Widerstand von über einem Giga-Ω zur Außenelektrode elektrisch isoliert war. Dies erlaubt die Bestimmung der Kapazität der Zelloberfläche mit der Lindau-Neher-Technik, wofür der „sine+dc“-Modus der Software-Erweiterung „software lock-in“ der Patchclamp-Software Pulse 8.53 verwendet und das Membranpotential mittels Voltage-Clamp-Technik auf -70 mV gesetzt wurde (Lindau & Neher, 1988; Neher & Marty, 1982).

### **2.2.3.3 Ratiometrische Kalziumkonzentrationsbestimmung**

nach (Voets, 2000)

Die intrazelluläre Kalziumkonzentration wurde mit Hilfe der kalziumabhängigen Fluoreszenzfarbstoffe Fura2/3 und Fura 4F bestimmt, welche als Bestandteil der Pipettenlösung mit dieser nach Eingehen der Whole-Cell-Patchclamp-Konfiguration in das Zytosol diffundierten. Je nachdem, ob Ca<sup>2+</sup> an die Farbstoffe gebunden ist, liegt ihr Absorptionsmaximum für das Anregungslicht bei einer Wellenlänge von 340 oder 380 nm. Das Emissionsmaximum ist beständig bei 510 nm. Der bedeutsame Unterschied zwischen diesen beiden Farbstoffen besteht in ihrer Affinität für Ca<sup>2+</sup>. Fura 4F weist eine Dissoziationskonstante für Ca<sup>2+</sup> von K<sub>D</sub> = 0,77 µM auf, was Kalziumkonzentrationsbestimmungen im Nanomolarbereich ermöglicht, wohingegen mit Fura2/3 durch dessen K<sub>D</sub> für Ca<sup>2+</sup> von ca. 20 µM Konzentrationen im mikromolaren Bereich aufgelöst werden können (Gee et al., 2000; Hyrc, Bownik, & Goldberg, 2000). Durch kurz aufeinander folgende Anregung der beiden Farbstoffe mit Licht der Wellenlängen 350 und 380 nm kann aus den Intensitäten der jeweiligen Emissionen ein Verhältnis gebildet werden, was einer bestimmten intrazellulären Kalziumkonzentration entspricht (Ratiometrisches Prinzip).

Um eine für das Patchclamp-Setup und die Versuchsanordnung gültige Zuordnung von Intensitätsverhältnissen und intrazellulärer Kalziumkonzentration zu erhalten, wurde eine In-vivo-Kalibrierung durchgeführt.

Es wurden dafür Kalibrierungslösungen unterschiedlicher Kalziumkonzentrationen als Pipettenlösungen erstellt. Ihre Zusammensetzung folgt dem Protokoll der Intrazellulärlösung. Anstelle von NP-EGTA enthalten sie jedoch BAPTA oder DPTA als  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffersubstanzen.

Ca. 3 Minuten nach Eingehen der Whole-Cell-Konfiguration hatte ein kompletter Austausch des Zytosols mit den Kalibrierungslösungen durch Diffusion stattgefunden und es lagen stabile Verhältnisse der Emissionen bei 350 nm (F1) und 380 nm (F2) Anregungslicht vor. Die Aufzeichnung dieser stabilen Emissionsintensitäts-Ratios  $R$  ( $R=F2/F1$ ) führte zu dem in Abbildung 2.2 dargestellten Graphen. Dabei sind zu jeder Kalibrierungslösung mit einer bestimmten Kalziumkonzentration 4 bis 13 Ratios aufgetragen.

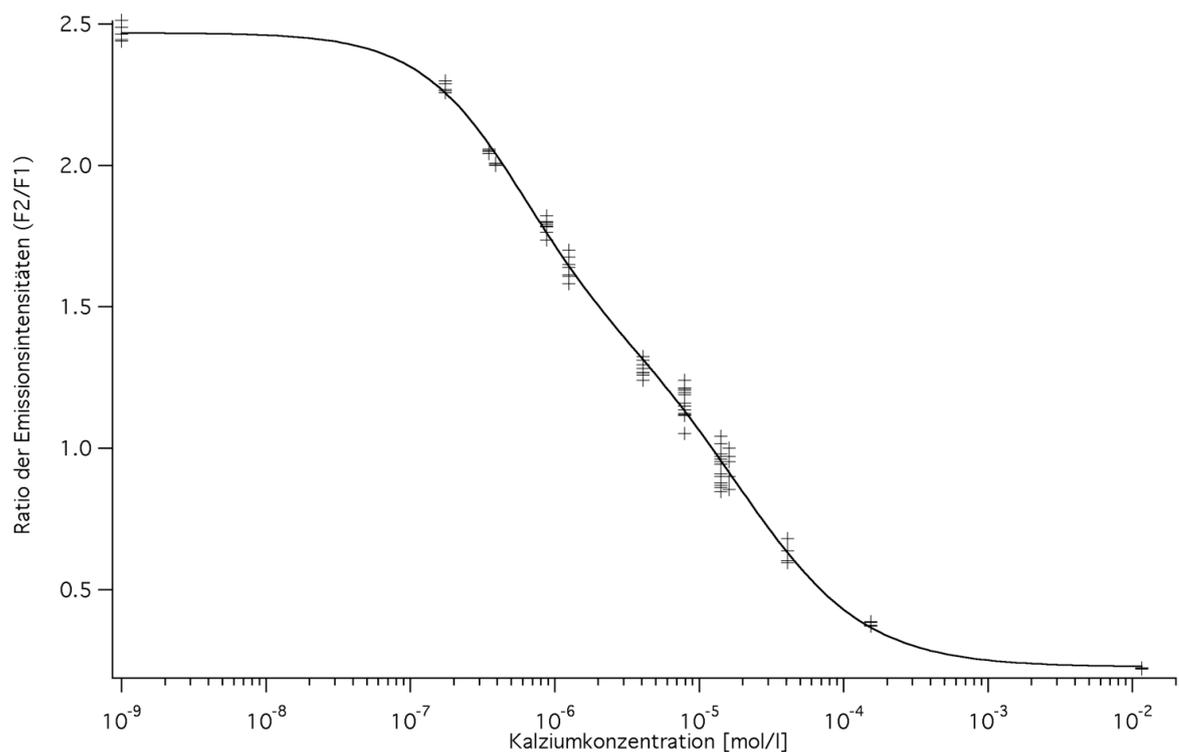


Abb. 2.2: In-vivo-Kalibrierungskurve

Bei gleicher Konzentration an Fura 4F und Furaptra entspricht das Kalziumbindungsverhalten dieser beiden Fluoreszenzfarbstoffe in der Intrazellulärlösung einem Modell mit zwei nicht kooperativen Bindungsstellen. Die Best-Fit-Kurve, durch die aus den Fluoreszenzwerten bestimmten Ratios, lässt sich daher mit einer modifizierten Two-binding-sites-Hill-Gleichung beschreiben. Sie lautet:

$$R(\text{Ratio}) = R_0 - R_1 * ([\text{Ca}^{2+}] / ([\text{Ca}^{2+}] + K_D \text{ Fura-4F})) - R_2 * ([\text{Ca}^{2+}] / ([\text{Ca}^{2+}] + K_D \text{ Furaptra}))$$

Wobei  $R_0$  sich an den gemessenen Emissionsverhältnisse (Ratio) bei 0 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (Maximalwert von R) orientiert. Als Minimalwerte von R werden zur Ermittlung der Bestgerade die Ratios bei sehr hohen Kalziumkonzentrationen, hier 11,6 mM, herangezogen.  $R_1$  und  $R_2$  sind Parameter der Bestgerade, die die errechnete Idealkurve an die Messwertkurve anpassen. Sie entsprechen der Ratio der Emissionsintensitäten bei gesättigter  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle eines Farbstoffs. Bei der verwendeten Bestgerade betragen sie ca. 1,04 und 1,20. Auch die Dissoziationskonstanten der Fluoreszenzfarbstoffe wurden flexibel zur Findung der Bestgerade angepasst. Die  $K_D$  von Fura 4F betrug in der Berechnung 20,4  $\mu\text{M}$ , die  $K_D$  von Furaptra 0,56  $\mu\text{M}$ .

$[\text{Ca}^{2+}]$  bezeichnet die freie intrazelluläre Kalzium-Konzentration, wie sie für die jeweiligen Kalibrierungslösungen errechnet wurde.

#### 2.2.3.4 Kalziumfreisetzung durch UV-Lyse von NP-EGTA

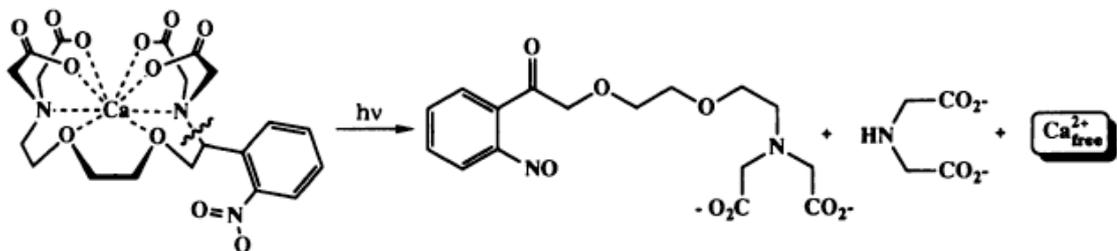


Abb. 2.3:  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung über UV-Spaltung von NP-EGTA (Ellis-Davies & Kaplan, 1994)

Zur Durchführung der Flash-Experimente wurden Kalziumionen im Komplex mit dem photolabilen Kalziumchelator NP-EGTA ( $K_D$  für  $\text{Ca}^{2+}$ : 80 nM) über die Pipettenlösung in die Chromaffinzellen eingebracht. Nach Applikation eines UV-Lichtblitzes durch eine Xenon-Bogenlampe werden diese schlagartig freigesetzt, da die resultierenden Spaltprodukte des NP-EGTA mit einer  $K_D$  von 1 mM eine 12.500-fach niedrigere Affinität für Kalziumionen aufweisen. NP-EGTA ist dabei hochselektiv für  $\text{Ca}^{2+}$  und bindet mit einer  $K_D$  von 9 mM praktisch kein  $\text{Mg}^{2+}$  bei den physiologisch in der Zelle vorherrschenden  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen (Ellis-Davies & Kaplan, 1994).

### **2.2.3.5 Versuchsprotokoll der Patchclamp-Experimente**

Alle Messungen erfolgten bei Raumtemperatur. Die verwendeten Chromaffinzellen wurden während der Patchclamp-Experimente kontinuierlich mit zimmerwarmer Extrazellulärlösung überspült.

Die transduzierten Zellen konnten deutlich anhand der grünen Fluoreszenz des mitexprimierten GFP-Proteins erkannt werden. Messungen von transduzierte Zellen und anscheinend nicht-transduzierten Kontrollzellen auf einem Deckglas wurden nicht durchgeführt.

Als erster Schritt wurde die Patchclamp-Pipette an die Zellmembran mit einer elektrisch isolierten Verbindung zwischen Pipettenspitze und Membran von größer 1 Giga- $\Omega$  angelegt. Nachdem über ein kurzes vorsichtiges Saugen an der Pipette die Membran unter der Pipette ausreichend geöffnet wurde (=Whole-cell-Konfiguration, Zugangswiderstand kleiner 20 M $\Omega$ , Pipettenwiderstand weiterhin größer 1 Giga- $\Omega$ ), konnte die Pippettenlösung (Intrazellulärlösung, ca. 1  $\mu$ l) für 2 Minuten in die Zelle diffundieren, sich dort gleichmäßig über die Zelle verteilen und das Cytoplasma ersetzen. Dies konnte man gut an Anstieg und Plateaubildung der Fluoreszenzintensitäten der Ca<sup>2+</sup>-Farbstoffe Fura 4F und Fura2 erkennen.

Direkt nach Eingehen der Whole-cell-Konfiguration wurde das Membranpotential auf -70 mV eingestellt und mit der Messung der Membrankapazität begonnen. Nach Ablauf von 2 Minuten wurde mit der Xenon-Bogen-Lampe ein UV-Blitzlicht appliziert, wodurch NP-EGTA gespalten und das komplexierte Kalzium homogen über die Zelle verteilt freigesetzt wurde. Die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration wurde kontinuierlich vor und nach dem Flash mit dem oben beschriebenen ratiometrischen Prinzip bestimmt. Zur Bestimmung des Sekretionsverhaltens wurde die Kapazitätsänderung hochauflösend in 1ms-Intervallen über einen Zeitraum von 5 Sekunden in Anschluss an die UV-Licht-Applikation registriert.

### **2.2.3.6 Discarding criteria/ Ausschlusskriterien**

Keinen Eingang in die Auswertung fanden Zellen, die die folgenden Messparameter aufwiesen:

Ausgangsmembrankapazität: < 4pF oder > 11pF

Veränderung der Membrankapazität während der Füllungsphase mit Intrazellulärlösung: >  $\pm$  10%

Pipettenwiderstand (seal): < 1 G $\Omega$

Pipetten-Zugangswiderstand in Whole-cell-Konfiguration: > 20 M $\Omega$

Membran-Leck-Ströme: > 50 pA,

Pre-Flash-[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>: < 300 nM oder > 500 nM

Post-Flash-[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>: < 8  $\mu$ M oder > 30  $\mu$ M

### **2.2.3.7 Datenanalyse**

Die Pools sekretionsbereiter Vesikel können über eine Pool-Size-Analyse diskriminiert und charakterisiert werden. Dafür werden die einzelnen hochaufgelösten Kapazitätskurven der ersten 5 Sekunden nach dem Flash bestmöglich mit der folgenden Gleichung aus zwei überlagerten natürlichen Exponentialfunktionen und einer linearen Komponente beschrieben (nach (Voets, Neher, & Moser, 1999)):

$$f(t) = A_0 + A_F \cdot (1 - \exp(-(t - T_0) / T_F)) + A_S \cdot (1 - \exp(-(t - T_0) / T_S)) + SL \cdot (t - T_0)$$

$A_0$ : Zellkapazität vor dem „Flash“

$T_0$ : Startpunkt der Fit -Kurve auf der Zeitachse

$A_F$ : Amplitude des RRP

$A_S$ : Amplitude des SRP

$T_F$ : Zeitkonstante des RRP

$T_S$ : Zeitkonstante des SRP

SL: Sekretionsrate während der Phase des „Sustained Release“

### **2.2.4 Fluoreszenz-Mikroskopie**

#### **2.2.4.1 Immunocytochemie**

Die Antikörperfärbungen wurden an Chromaffinzellen durchgeführt, die sich zuvor für 2 Tage in Zellkultur befanden. Alle Schritte erfolgten dabei bei Raumtemperatur. Als erster Schritt wurde das Kulturmedium vorsichtig am Rand einer Kammer der 6-Kammer-Platte mit einer 1 ml Pipette abgesaugt bis nur noch eine gerade den Coverslip bedeckende Flüssigkeitsschicht übrig blieb. Diese Restflüssigkeit wurde unter gleichzeitigem Einspülen zimmerwarmer PBS-Lösung von der gegenüberliegenden Seite der Kammer entfernt oder zumindest verdünnt und anschließend vorsichtig über den Rand, damit die Zellen möglichst wenig Strömung ausgesetzt sind, weitere PBS-Lösung bis zu einem Volumen von 3 – 4 ml hinzugefügt. Dieses Vorgehen wird im Folgenden als Waschen der Zellen bezeichnet und an dieser Stelle zweimal wiederholt.

Dann wurde die PBS-Lösung von den Zellen abpipettiert und diese mit 4 %iger Formaldehydlösung überspült. Zur Fixierung der Zellen mit Formaldehyd konnte dieses 20 Minuten einwirken. Anschließend wurde die Formaldehydlösung für 10 Minuten mit Glycinlösung ersetzt, damit ungebundenes Formaldehyd mit Glycin reagiert. Nach darauffolgendem zweimaligen Waschens mit PBS erfolgte der Ersatz der PBS-Lösung mit ca. 3 ml Permeabilisierungslösung, welche für 30

Minuten wirken konnte, bevor sie durch 2 Waschgänge mit Blockierungslösung von den Chromaffinzellen entfernt wurde. Im nächsten Schritt wurden auf ein Stück Parafilm pro Coverslip je 100 µl der mit Blockierungslösung 1:2000 verdünnten Lösung des Anti-Syntaxin 1a - Antikörpers gegeben und die Deckgläser mit den permeabilisierten Zellen nach unten auf diese Tropfen gelegt und für 1 Stunde in einer selbstgebauten lichtundurchlässigen feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dieser Zeit wurden die Coverslips in mit Permeabilisierungslösung gefüllte 6-Kammer-Platten gelegt und 2 mal mit Permeabilisierungslösung gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem 1:2000 mit Blockierungslösung verdünnten Alexa 647 - Antikörpern auf dieselbe Art und Weise für 45 Minuten. Nach zweimaligem Waschen mit Permeabilisierungslösung und zwei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Deckgläser mit den Zellen nach unten auf Objektträger mit 30 µl Mounting Medium gelegt und über Nacht bei 4°C gelagert.

Um die Spezifität der HPC-1 + Alexa 647- Antikörperfärbung zu überprüfen, wurden Aufnahmen von Kontrollzellen erstellt, bei denen bis auf die Inkubation mit HPC-1 Antikörpern alle Schritte des Immunostainingsprotokolls, insbesondere auch die Permeabilisierungen und Alexa 647-Färbungen simultan und identisch durchgeführt wurden. Diese Kontrollzellen zeigten keine Fluoreszenz.

#### **2.2.4.2 Structured Illumination Microscopy**

Structured Illumination Microscopy (SIM) ist ein fluoreszenzmikroskopisches Weitfeld- Verfahren zur Aufnahme von hochauflösenden Bildern unter der durch das Gesetz von Abbe definierten Auflösungsgrenze. Man kann damit gegenüber konventioneller Lichtmikroskopie um den Faktor 2 – 2,5 höhere Auflösungen von ca. 100 nm in x-y-Richtung und ca. 300 nm in z-Richtung erreichen. Dies ist möglich, da sich bei der Überlagerung von Aufnahmen einer Bildebene, die über gitterförmige Beleuchtung aus verschiedenen Positionen entstanden sind, Interferenzmuster bilden (Moiré-Effekt), von denen auf das zu Grunde liegende Muster zurückgerechnet werden kann. Die Interferenzmuster selbst sind dabei deutlich größer als die eigentlichen Strukturen und so können Bildinhalte kleiner als das Diffraktionslimit sichtbar gemacht werden (Gustafsson, 2000).

Die Aufnahmen der gefärbten Chromaffinzellen wurden an einem Prototyp eines SIM-Mikroskops von Zeiss, Oberkochen, Deutschland, durchgeführt und dabei optische Schnitte im Abstand von 144 µm durch die jeweils einzeln aufgenommenen Zellen gelegt. Jede Bildebene in der z-Achse wurde durch ein vorgeschaltetes Gitternetz beleuchtet, welches 3 bzw. 5 verschiedene Positionen durch Drehung an der optischen Achse und jeweils 5 verschiedene Positionen entlang einer Linie in x-y-Richtung einnahm. Insgesamt wurden also 15 bzw. 25 Aufnahmen pro Bildebene angefertigt. Zur Anregung des fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers wurde Licht einer Wellenlänge von 635 nm verwendet. Aufnahme und Prozessierung der Daten erfolgten mit Hilfe der Software ZEN 2009 und ZEN 2010.

#### Hardware des SIM-Mikroskop-Prototyps

#### Firma

EMCCD Kamera iXon EM+885	Andor
Immersion 518F (n = 1,518)	Zeiss
Immersion HI 1,66 (n = 1,661)	Labormuster Zeiss
Inkubator XL LSM 710 S1	Zeiss
Laserlinie 405 nm, 50 mW	Zeiss
Laserlinie 488 nm, 100 mW für LSM Live	Zeiss
Laserlinie 561 nm, 40 mW für LSM Live	Zeiss
Laserlinie 635 nm, 30 mW	Zeiss
Objektiv "Plan-Apochromat" 63x / 1,40 NA Oil DIC M27	Zeiss
Objektiv α "Plan-Fluar" 100x / 1,45 NA Oil M27	Zeiss
Objektiv "Plan-Apochromat" 100x / 1,57 NA HI Oil DIC	Zeiss
X-Cite 120 XL FL Beleuchtungssystem	Lumen Dynamics
Z-Axis Piezo Stage P-737.1SL	Zeiss

#### Software

Zen 2010, Version 6.3.0.11 (offline PC)	Zeiss
Zen 2009, Version 5.5.0.188 (online PC)	Zeiss
ImageJ, Version 1.43	W. Rasband, NIH, USA

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Effekte der Stx1A – Überexpression auf die LDCV-Sekretion im CAPS-DKO

#### 3.1.1 Notwendige Vorbemerkungen

Zur Beantwortung der Fragestellung habe ich Patch-Clamp-Experimente mit Flash-Photolysis – identisch nach Protokollen, Materialien und Setup zu den CAPS-DKO- und Open-Stx-Experimenten von Liu et al. (Y. Liu et al., 2008; Y. Liu et al., 2010) – durchgeführt. Es wurden dabei die Sekretionen von CAPS-DKO- und WT-Chromaffinzellen, bei welchen mittels SFV-Transduktion natürliches Syntaxin 1A überexprimiert wurde, den Sekretionen von Kontrollgruppen gegenüber gestellt.

Die dargestellten Sekretionen sind das Ergebnis von insgesamt 64 Messtagen. Die in die Analyse eingehenden Zellen bzw. Sekretionen wurden anhand der im „Material und Methoden“- Teil angeführten Discarding Criteria selektioniert.

Es zeigte sich jedoch, dass die über Fluoreszenzmessungen bestimmten intrazellulären Kalziumkonzentrationen (Pre-Flash-[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) nahezu durchgehend über dem aus jahrelanger Erfahrung mit den verwendeten Lösungen erwarteten Werten lagen, wohingegen Messungen mit den selben Lösungen an anderen Patch-Clamp-Setups Kalziumwerte im bekannten Bereich ergaben. Die Ursache dafür konnte leider trotz intensiver Nachforschung und aufwändiger Kalibrierung nicht gefunden und behoben werden. Die bei meinen Experimenten registrierten intrazellulären Kalziumkonzentrationen liegen daher größtenteils um den Faktor 2-3 über dem durch die Discarding Criteria vorgegebenen Bereich von 300-500 nmol/l. Dieser Zielbereich entspricht den physiologischen Konzentrationswerten bei welchen, wie auch weiter unten behandelt, Priming der LDCVs stattfindet, ohne dass die durch die Flash-Photolyse hervorgerufene Sekretion durch bereits zuvor stattfindende Autosekretion dezimiert wird (Voets, 2000).

Als weitere Auffälligkeit zeigten die Syntaxin-überexprimierenden Zellen systematisch höhere Kalziumwerte im Vergleich zu ihren Kontrollzellen.

Durch diese Abweichungen und Unterschiede in den für die Modifikation der regulierten Exozytose essentiellen Kalziumwerten und bei häufig nur wenigen messbaren Zellen in einer der beiden Gruppen, ist es nicht möglich, eine Zuordnung von Versuchs- und Kontrollzellen mit einem Unterschied in den Pre-Flash-Kalziumkonzentrationen von weniger als 50 nmol/l und innerhalb der Discarding Criteria pro Messtag zu erstellen.

Bei den bestehenden Zweifeln an der Kalziummessung und nicht augenfällig ersichtlicher Abhängigkeit der Sekretionen von den registrierten intrazellulären Kalziumkonzentrationen, sowie einem unauffälligem Zusammenhang zwischen den Sekretionen verschiedener Messtage, möchte ich zuerst meine Ergebnisse auf die konservativste Art und Weise der Auswertung präsentieren. Dafür fanden, bei immer gleicher Durchführung der Experimente und durchgehend identischen Ansätzen der verwendeten Lösungen, alle gemessenen Sekretionen Eingang in die Auswertung, sofern sie die Discarding Criteria bis auf die Pre-Flash-Kalziumkonzentration erfüllten. Im Rahmen dessen gehe ich auch auf die von Voets et al. (Voets, 2000) berichtete vorzeitig ablaufende Exozytose bei hohen intrazellulären Kalziumkonzentrationen als bedeutsamen Einflussfaktor ein. Im Anschluss zeige ich zum Vergleich zu der Auswertung aller registrierten Sekretionen in einer zusammenfassenden Darstellung die Auswertung der Sekretionen der Zellen, deren Pre-flash-Kalziumkonzentration im Überschneidungsbereich zwischen den Syntaxin-überexprimierenden Zellen (mit generell höher liegenden Werten) und den Kontrollzellen lagen. Dadurch wird eine Vergleichssituation zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe mit nahezu identischen Pre-Flash-Kalziumkonzentrationen erreicht ohne eine subjektive Auswahl von Sekretionen vornehmen zu müssen.

Zudem stelle ich im Überblick die Ergebnisse einer Randomisierung der Sekretionen nach Messtagen dar. Damit wird den unvermeidlichen Unterschieden bei Zellpräparation, Lösungen, Raumtemperatur, genetischer Ausstattung der Versuchstiere, etc. zwischen zwei Messtagen Rechnung getragen, die die Ergebnisse beeinflussen können.

Das Fazit der durchgeführten Versuche soll dann in der Zusammenschau der Ergebnisse der drei verschiedenen Datenzusammenstellungen und der Betrachtung der einbezogenen Störfaktoren, die zusammen die wichtigsten greifbaren Einflüsse auf die Sekretionen umfassen, gezogen werden.

### 3.1.2 Auswertung aller registrierten Sekretionen

In die Auswertung fanden alle registrierten Sekretionen Eingang, die die Discarding Criteria (siehe Material und Methoden) bis auf die Vorgaben zur Pre-Flash-Kalziumkonzentration erfüllten.

#### 3.1.2.1 Flash-induzierte Sekretion im CAPS-DKO bei Stx1A-Überexpression

Die Mittelwertkurven der Flash-induzierten Sekretion der CAPS-DKO-Zellen im Vergleich zu den Syntaxin-überexprimierenden CAPS-DKO-Zellen zeigt Abbildung 3.1. Die abgebildeten Kurven bilden sich aus dem arithmetischen Mittel der Datenpunkte der Kapazitätsmessung innerhalb von 5 Sekunden nach Applikation des UV-Blitzlichts (in der Darstellung bei ca 0,5 Sekunden identisch zum Anstieg der Sekretionskurve).

Die Mittelwerte der simultan registrierten Kalziumkonzentrationen sind gesammelt zum Vergleich am Ende dieses Kapitels aufgeführt, wo sie auf weitere Auswertungen bezüglich dieses wichtigen Faktors überleiten.

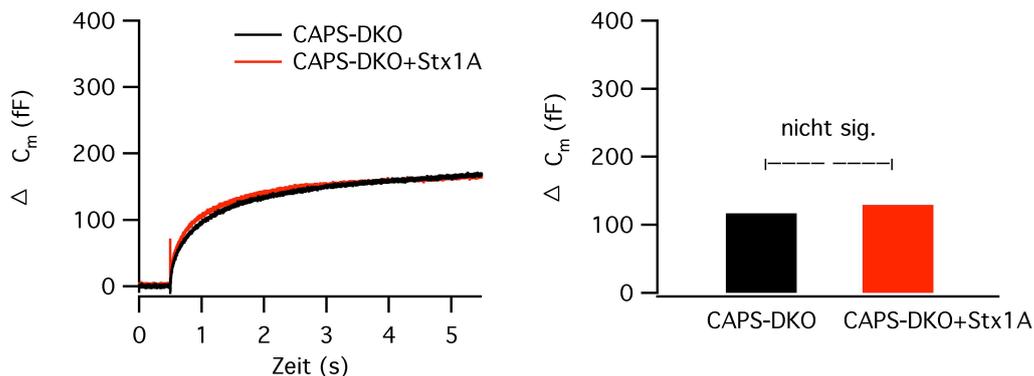


Abb. 3.1: Mittlere Sekretionskurven (links) und mittlere Gesamtsekretion (rechts) von CAPS-DKO-Zellen mit und ohne Stx1A-Überexpression

Die Mittelwertkurven der Sekretion von 36 bzw. 40 CAPS-DKO-Zellen von jeweils 12 Messtagen zeigen einen nahezu identischen Verlauf.

Zur statistischen Auswertung der Sekretion habe ich die maximale Kapazitätsänderung innerhalb des dargestellten 5-Sekunden-Zeitraums jeder einzelnen, in die Auswertung eingegangenen, Chromaffinzelle verwendet. Sie spiegelt die Summe der Ausschüttung des RRP's und SRP's, sowie der kontinuierlichen Nachlieferung und Sekretion von Vesikeln (Sustained Release) wieder. Im Weiteren ist dieser Parameter in Analogie zum entsprechenden englischen Ausdruck in den Publikationen zu diesem Thema als Gesamtsekretion (total secretion) bezeichnet.

Als Testverfahren zur statistischen Überprüfung von Unterschieden in der Gesamtsekretion wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Dieser ist ein nicht parametrisches Rangstufenverfahren, das daher keine Gauss'sche Normalverteilung der Daten voraussetzt (Die Gesamtsekretion ist vermutl. logarithmisch-normalverteilt) und unempfindlich auf Ausreißerwerte reagiert.

Syntaxin-überexprimierende CAPS-DKO-Zellen und ihre CAPS-DKO-Kontrollen zeigen keinen statistisch signifikanten Unterschied in ihrer maximalen Sekretion (Siehe Abb. 3.1).

### 3.1.2.2 Kontrolle der Versuchsbedingungen in Bezug auf Sekretion

Für die Beurteilung dieses Resultats ist bedeutsam, wo das Niveau der Flash-induzierten Sekretionen unter den vorherrschenden Versuchsbedingungen prinzipiell steht. Bei ungünstigen Versuchsbedingungen kann die Sekretionskapazität von Chromaffinzellen insgesamt reduziert sein, wodurch ein theoretisch bestehender Einfluss der Syntaxin-Überexpression nicht ersichtlich werden könnte. Ich habe daher intermittierend zu den CAPS-DKO-Experimenten (je nach Verfügbarkeit der Versuchstiere) auch Flash-Experimente an Wildtyp-Chromaffinzellen durchgeführt.

Die Mittelwerte ihrer Sekretionen sind im Vergleich zu den CAPS-DKO-Zellen (ohne Stx1A-Überexpression) in Abbildung 3.2 dargestellt.

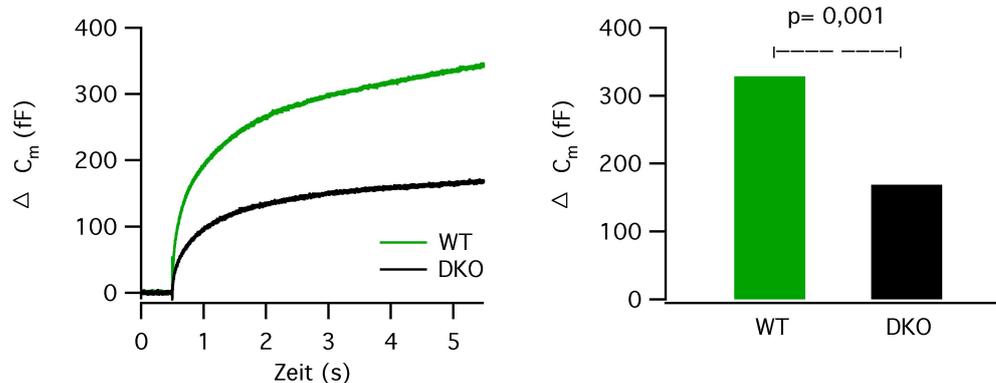


Abb.: 3.2: Mittlere Sekretionskurven und mittlere Gesamtsekretion von Wildtyp (WT) - und CAPS-DKO-Zellen

Die mittlere Sekretionskurve der Wildtypzellen (55 Zellen von 18 Messtagen) entspricht in Verlauf und Ausmaß den aus der Literatur bekannten Sekretionen in Flash-Experimenten. Die Sekretionskurve der CAPS-DKO-Zellen stellt sich gemäß ihrem bekannten Phänotyp mit reduzierter Sekretion, ebenso wie aus der Literatur bekannt, dar (Liu et al. 2008).

Die maximale Kapazitätsänderung in Antwort auf die schlagartige Kalziumfreisetzung durch Flash-Photolysis ist dementsprechend hochsignifikant ( $p=0,001$ ) unterschiedlich zwischen Wildtyp- und CAPS-DKO-Chromaffinzellen.

Die Versuchsbedingungen erlauben also prinzipiell typische Sekretionen.

### 3.1.2.3 Kontrolle auf Effekte der Stx1A-Überexpression im Wildtyp

Als Kontrolle zu den Ergebnissen in der CAPS-Double-Knock-Out-Situation ist es weiter interessant zu wissen, wie Wildtyp-Chromaffinzellen mit folglich vorhandenen CAPS-Molekülen auf vermehrtes Angebot an Syntaxin reagieren, welches außerhalb des SNARE-Komplexes in der geschlossenen Konformation vorliegt und für seine Funktion bei der Membranfusion erst noch in die offene Form überführt werden muss.

Zudem gilt es zu überprüfen, ob auch in Säugetierzellen die konstitutiv offene Form des Syntaxin-Moleküls spezifisch für dessen sekretionssteigernde Wirkung ist oder ob womöglich andere Mechanismen der vermehrten Expression von Syntaxinmolekülen (Clusterbildung, Akzeptorkomplexbildung, etc.) dafür verantwortlich sind.

Um diese Gesichtspunkte zu beachten, wurde im Rahmen von Versuchs-Kontroll-Experimenten die Syntaxin-Überexpression auch in Wildtyp-Zellen durchgeführt. Die Kontrollzellen sind dabei die bereits im darüber stehenden Abschnitt angeführten Wildtypzellen.

Die arithmetischen Mittel der Sekretionskurven und die Auswertung der Gesamtsekretion zeigt Abbildung 3.3.

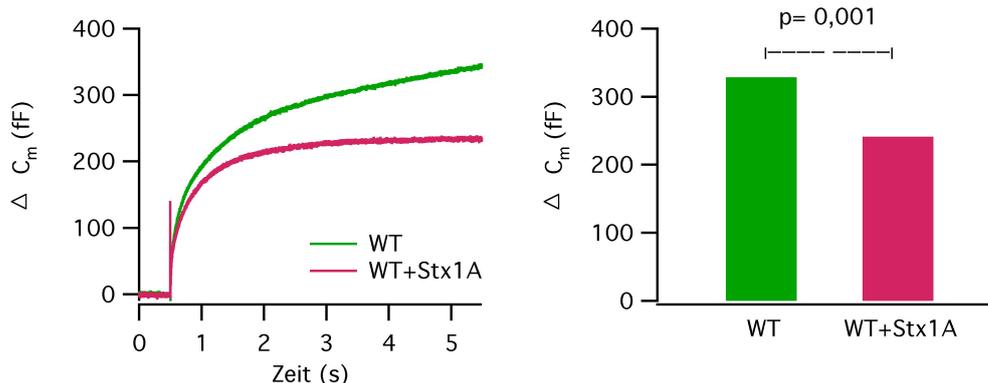


Abb. 3.3: Mittlere Sekretionskurven und mittlere Gesamtsekretion der Wildtyp-Zellen mit und ohne Stx1A-Überexpression

Die zusätzlich Syntaxin 1A exprimierenden Wildtypzellen (39 Zellen von 16 Messtagen) zeigten im Mittel eine geringere Sekretion als die WT- Kontrollzellen. Dieser Unterschied in der Sekretion ist bei der statistischen Prüfung der maximalen Kapazitätsänderung hochsignifikant ( $p=0,001$ ).

### 3.1.2.4 Kontrolle auf Effekte der Virusbelastung auf die Sekretion

Eine einfache Erklärung für die Reduktion der Sekretion in den Syntaxin-überexprimierenden Zellen könnte die Belastung der Zelle durch die Infektion mit den Semliki Forest Viren und/oder die damit verbundene zusätzliche Proteinbildung sein. Um dieser Vermutung nachzugehen und um zu prüfen, ob die erhöhten Kalziumwerte in den Syntaxin-überexprimierenden Zellen möglicherweise ebenfalls damit im Zusammenhang stehen, wurden an einigen Messtagen neben WT-Kontrollen und Stx1A-überexprimierenden Wildtypzellen auch eGFP-überexprimierende WT-Zellen gemessen (44 Zellen von 7 Messtagen). eGFP wird als Bestandteil des verwendeten IRIS-Konstrukts neben Stx1A mit in die Stx1A-überexprimierenden Zellen durch den Semliki-Forest-Virus eingebracht und dient zur Identifikation der transduzierten Zellen durch Fluoreszenz. Die Ergebnisse der Experimente an Wildtyp-Chromaffinzellen zeigt im Überblick Abbildung 3.4.

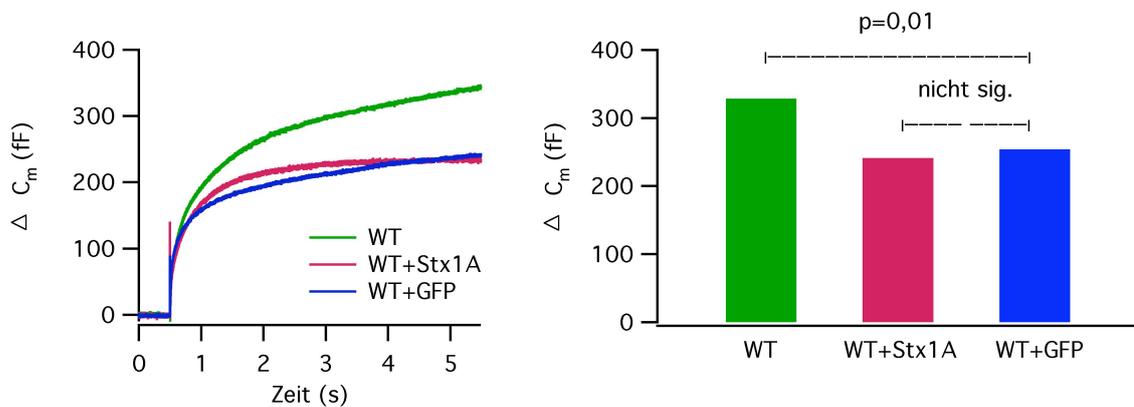


Abb. 3.4: Überblick über die mittleren Sekretionskurven, sowie die mittlere Gesamtsekretion von unmodifizierten Wildtypzellen (WT), Wildtypzellen mit eGFP-Überexpression (WT+GFP) und Wildtypzellen mit sowohl eGFP als auch Stx1A-Überexpression (WT+Stx1A)

Die von dem SFV-befallenen und mit der Produktion von eGFP belasteten Wildtypzellen zeigten im Durchschnitt eine niedrigere Sekretion als die nichttransduzierten WT-Zellen. Das maximale Ausmaß der Sekretion der WT+GFP-Zellen innerhalb der 5-Sekunden-Registrierungszeit ist im Mann-Whitney-U-Test signifikant unterschiedlich ( $p=0,01$ ) zu der maximalen Sekretion der WT-Zellen. Zu den eGFP- und Stx1A-überexprimierenden WT+Stx1A-Zellen bestand kein signifikanter Unterschied.

### 3.1.2.5 Mittlere Pre-Flash- und Post-Flash-Kalziumkonzentrationen

Die mittleren intrazellulären Kalziumkonzentrationen direkt vor und nach Applikation des UV-Blitzlichts zur Kalziumfreisetzung der bisher angeführten Zellgruppierungen zeigt Abbildung 3.5.

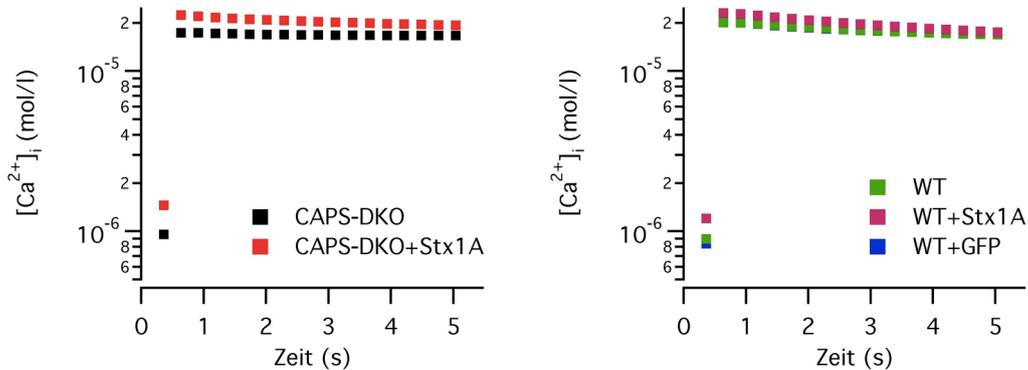


Abb. 3.5: Mittelwerte der registrierten intrazellulären Kalziumkonzentrationen während des 5-Sekunden-Zeitraums der hochaufgelösten Kapazitätsmessung.

Die Mittelwerte der Pre-Flash-Kalziumkonzentrationen (in Klammern: Median) betragen:

CAPS-DKO:	953 nmol/l	(591 nmol/l)
CAPS-DKO+Stx1A:	1,45 $\mu$ mol/l	(1,02 $\mu$ mol/l)
WT:	896 nmol/l	(626 nmol/l)
WT+GFP:	836 nmol/l	(738 nmol/l)
WT+Stx1A:	1,20 $\mu$ mol/l	(907 nmol/l)

Da der Mittelwert bei der vorliegenden, von einer Gauss-Normalverteilung abweichenden Verteilung durch einzelne hohe Pre-Flash-Kalziumkonzentrationen besonders beeinflusst ist, habe ich hier zudem den jeweiligen Median der Verteilung mit angegeben, der das Zentrum der Verteilung der Pre-Flash-Kalziumkonzentrationen besser widerspiegelt.

Die statistische Testung der Unterschiede in den Pre-Flash-Kalziumkonzentrationen mit dem Mann-Whitney-U-Test ergab (Diskussion der Ergebnisse siehe 4.2.2):

CAPS-DKO vs. CAPS-DKO+Stx1A:	Sig. Unterschied bei $p=0,01$
WT vs. WT+Stx1A:	Sig. Unterschied bei $p=0,01$
WT vs. WT+GFP:	Kein signifikanter Unterschied
WT+GFP vs. WT+Stx1A:	Sig. Unterschied bei $p=0,01$

### 3.1.2.6 Berücksichtigung der Autosekretion

Der wichtigste modulatorische Faktor des stochastischen Prozesses der regulierten Exozytose ist, wie in der Einleitung behandelt, die intrazelluläre Kalziumkonzentration. Es wurde berichtet, dass bei einer basalen intrazellulären Kalziumkonzentration von 600 nmol/l die Größe der Flash-induzierten Sekretion durch die Priming-Wirkung von Kalziumionen einen Spitzenwert erreicht. Bei darüber hinausgehenden Pre-Flash-Kalziumkonzentrationen wurde beobachtet, dass die Größe der stimulierten Sekretion, vermutlich durch die bereits im Vorfeld im Übermaß zur Priming-Wirkung stattfindende Vesikelfusionen (Autosekretion), reduziert wird (Voets, 2000). Auch bei nicht sicherer Größenordnung meiner Kalziummessung ist auffällig, dass die Pre-Flash-Kalziumkonzentrationen der Syntaxin-überexprimierenden Zellen systematisch bei höheren Werten lagen. Dadurch, oder auch durch das vermehrte Angebot an Syntaxin, könnte es zu einer im Vergleich zu den Kontrollgruppen stärkeren Autosekretion kommen. Diese potentielle Auswirkung von zusätzlich eingebrachten Syntaxinmolekülen wird neben grundsätzlichen Überlegungen zu seiner zentralen Funktion (Vergrößerte Anzahl von SNARE-Komplexen pro Vesikel erhöht dessen Ausschüttungswahrscheinlichkeit (Mohrmann, de Wit, Verhage, Neher, & Sorensen, 2010)) durch die Beobachtung in Spiel gebracht, dass Open-Syntaxin-exprimierende Chromaffinzellen eine reduzierte Anzahl von gedockten Vesikeln in EM-Aufnahmen aufwiesen (Y. Liu et al., 2010). Eine mögliche Erklärung für diesen Phänotyp wäre vermehrt stattfindende spontane Sekretion.

Ich habe daher die Veränderungen der Membrankapazität von Beginn der Whole-Cell-Konfiguration bis zur Applikation des UV-Blitzlichts weiter untersucht. Die Mittelwerte mit Fehlerbalken (Daten augenscheinlich normalverteilt) mit  $\pm 1$  Standardabweichung (SD) als Streuungsmaß der absoluten Änderungen sind in Abbildung 3.6 gezeigt.

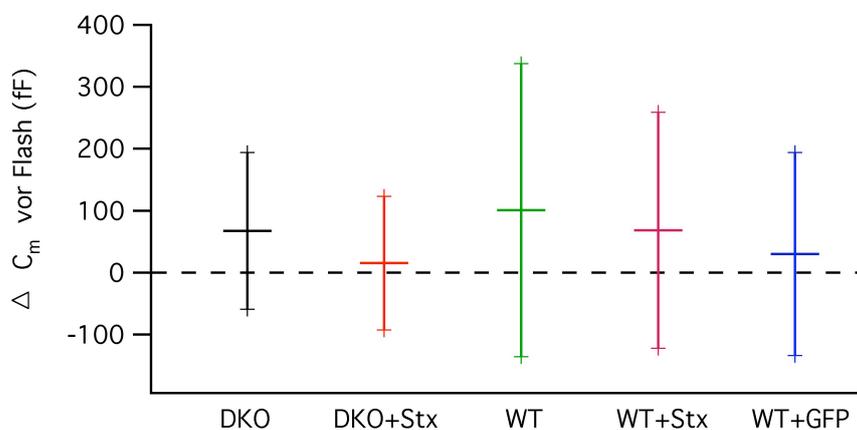


Abb. 3.6: Mittelwert  $\pm 1$  SD der vor dem Flash stattfindenden Kapazitätsänderung

Zwischen den Kapazitätsänderungen der verschiedenen Zellgruppierungen besteht kein signifikanter Unterschied im Mann-Whitney-U-Test.

Ich bin mir bewusst, dass die Messung der Zelloberfläche über die Membrankapazität auch durch elektrophysiologische Faktoren, wie Leitfähigkeiten bzw. Widerstände beeinflusst wird. Systematische und relevante Veränderungen der Zelloberfläche durch Autosekretion sollten sich als Tendenz bei den vorhandenen Zellzahlen dennoch abzeichnen.

Aus der vorliegenden Auswertung ergibt sich kein Hinweis auf vermehrte Autosekretion in den Syntaxin-überexprimierenden Zellen mit dem im Vergleich zu den Kontrollen höherliegenden Pre-Flash-Kalziumkonzentrationen.

Im Durchschnitt zeigten die unmodifizierten Wildtypzellen die größten Veränderungen der Zellkapazität vor dem Flash, sowohl im Mittelwert als auch in der Bandbreite. Die CAPS-DKO-Zellen wiesen, möglicherweise in Entsprechung zu ihrer bekannten reduzierten Sekretionsfähigkeit, geringere Schwankungen der Zellkapazität vor dem Flash auf.

Zu beachten ist, dass Zellen mit Veränderungen der Membrankapazität von mehr als 10 % der Ausgangsmembrankapazität entsprechend der Discarding Criteria nicht mit in die Auswertung aufgenommen wurden. Dies war jedoch nur selten der Fall.

### **3.1.2.7 Berücksichtigung der Unterschiede in der Ausgangsmembrankapazität**

Generell gab es keinen signifikanten Unterschied in der Membrankapazität direkt vor der Flash-induzierten Sekretion der Zellen der verschiedenen Gruppen. Jedoch weisen die Syntaxin-überexprimierenden WT- und CAPS-DKO-Zellen eine im Durchschnitt geringere Ausgangsmembrankapazität auf (WT+Stx1A: 4,82 pF; WT: 5,25 pF; WT+GFP: 5,38 pF; CAPS-DKO+Stx1A: 4,89 pF; CAPS-DKO: 4,96 pF). Dies könnte die bei absoluter Angabe der Sekretion (in fF) niedrigeren Werte gegenüber den Kontrollen erklären.

Die Membrankapazität vor dem Flash wird durch die Größe der Zelloberfläche und durch elektrophysiologische Parameter der Patch-Clamp-Situation bestimmt. Die Messung der Kapazitätsänderung nach dem Flash unterliegt ebenso diesen elektrischen Faktoren. Aufgrund dieses potentiellen technischen Störeinflusses und da mir aus der Literatur nicht bekannt ist, ob es einen natürlichen Zusammenhang zwischen der Größe einer Zelle und ihrem Sekretionsvermögen gibt, habe ich die kapazitätsbestimmten Sekretionen der jeweiligen Zellen zu der direkt vor dem Flash bestimmten Membrankapazität ( $C_{m0}$ ) normalisiert. Damit werden die Sekretionen in Prozent zur Ausgangsmembrankapazität angegeben.

Die Analyse dieser relativen Sekretionen zeigte in der statistischen Auswertung der maximalen Sekretion (siehe Abbildung 3.7) ebenso wie in der Darstellung der mittleren Sekretionskurven keine qualitativen Unterschiede zu der Betrachtung der absoluten Werte. Ebenso unverändert in der Aussage ist auch die Auswertung der relativen Autosekretion.

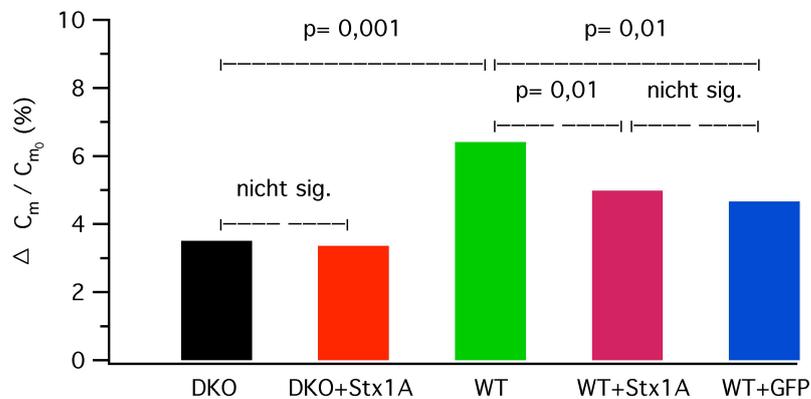


Abb. 3.7: Vergleich der maximalen relativen Sekretionen der verschiedenen Zellgruppierungen.

### 3.1.3 Ergebnisse spezifischer Untergruppen im Überblick

#### 3.1.3.1 Untergruppen mit vergleichbaren Pre-Flash-Kalziumkonzentrationen

Um dem essentiellen Modifikationsfaktor der Sekretion – der intrazellulären Kalziumkonzentration – gerecht zu werden, stelle ich bei systematisch höheren Werten in den Syntaxin-überexprimierenden Zellen in der vorliegende Auswertung nur die Sekretionen von Zellen gegenüber, deren Pre-Flash-Kalziumkonzentrationen im Überschneidungsbereich zwischen Versuchs- und Kontrollzellen, also zwischen 500 und 1000 nmol/l, lag. Dies ermöglicht einen Vergleich von Zellen, die vor der Sekretion nahezu identischen Kalziumstimuli ausgesetzt waren, ohne eine subjektive Auswahl und Zuordnung von Sekretionen vorzunehmen.

Es gehen dadurch 15 CAPS-DKO-, 15 CAPS-DKO+Stx1A-, 16 WT-, 19 WT+Stx1A- und 30 WT+GFP-Zellen in die Auswertung ein. Die mittleren Pre-Flash-Kalziumkonzentrationen sind: CAPS-DKO: 716 nmol/l; CAPS-DKO+Stx1A: 735 nmol/l; WT: 736 nmol/l; WT+St1A: 783 nmol/l; WT+GFP: 739 nmol/l.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.8 auf der folgenden Seite zusammengefasst.

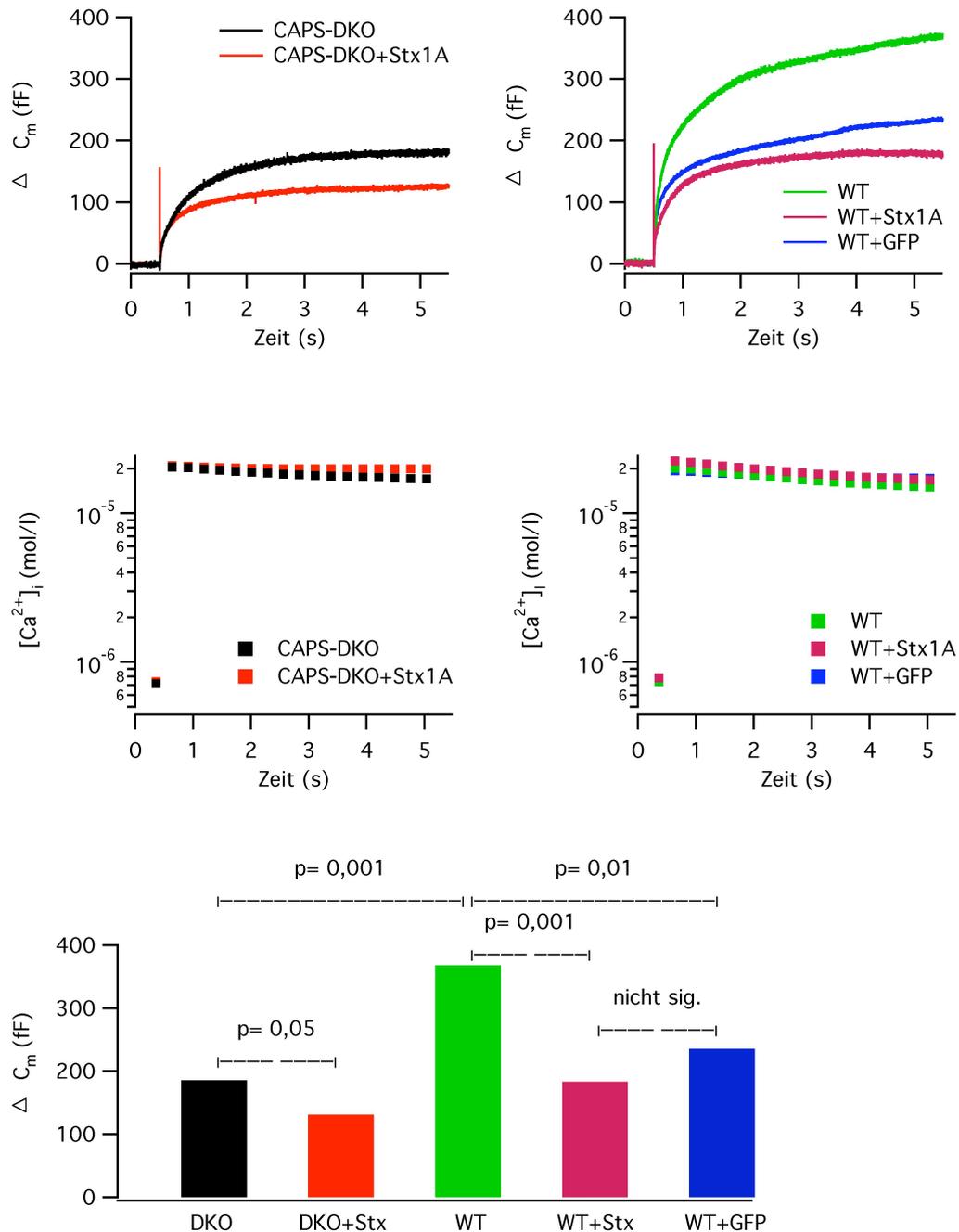


Abb. 3.8: Mittlere Sekretionskurven (oben), Kalziumkonzentrationen (Mitte) und Gesamtsekretionen (unten) von Zellen mit vergleichbarem Pre-Flash-[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>

Es zeigten sich dabei keine qualitativ anderen Ergebnisse als bei der Auswertung aller registrierten Sekretionen, mit der Ausnahme, dass die Syntaxin-überexprimierenden CAPS-DKO-Zellen signifikant (p=0,05) weniger sezernierten als die CAPS-DKO-Kontrollzellen.

Bei der Auswertung der relativen Sekretionen ist dieser Unterschied nicht signifikant. Ansonsten liegen auch dort unveränderte Ergebnisse vor.

Ebenso bestehen keine Auffälligkeiten in der Autosekretion.

### 3.1.3.2 Randomisierung nach Messtagen

Häufig war es der Fall, dass bei am selben Tag durchgeführten Patch-Clamp-Experimenten eine deutlich ungleiche Anzahl von Zellen aus der Versuchs- und der Kontrollgruppe gemessen werden konnte.

Alle Messungen wurden zwar durchgehend nach dem gleichen Versuchsablauf und mit gleichartig hergestellten Lösungen durchgeführt, Unterschiede in der Zusammensetzung der Lösungen, den Zimmertemperaturen, der Güte der Zellpräparation, etc. sind jedoch selbstverständlich nicht auszuschließen und könnten das Auswertungskriterium Sekretion beeinflussen. Insbesondere stammen die Chromaffinzellen von verschiedenen Messtagen auch meist von unterschiedlichen Mäusen mit dementsprechend interindividuellen genetischen Unterschieden. Ebenso wie bei der registrierten Kalziumkonzentration, ist augenscheinlich in den Rohdaten kein starker Einfluss des Messtags als Faktor für die Sekretion zu erkennen und bei der durch andere Faktoren hervorgerufenen Streuung der Werte pro Tag ist es nicht möglich den Einfluss der speziellen Bedingungen eines Messtags herauszurechnen. Ich habe daher eine Randomisierung der Zellen nach Messtagen erstellt. Jeder Zelle eines Messtages wurde dabei eine Zelle der jeweils anderen Gruppe zugeordnet. Um den Bias durch subjektive Auswahl zu verringern und um die Einflüsse der basalen Kalziumkonzentration zu reduzieren, habe ich als Randomisierungspartner für eine Zelle jeweils die Zelle mit der ähnlichsten Pre-Flash-Kalziumkonzentration aus der anderen Gruppe ausgewählt, die bisher noch keiner anderen Zelle zugeordnet ist. Sekretionen von überzähligen Zellen wurden verworfen.

Durch diese Randomisierung sind die Sekretionskurven nur als direkter Vergleich von zwei Gruppen darstellbar.

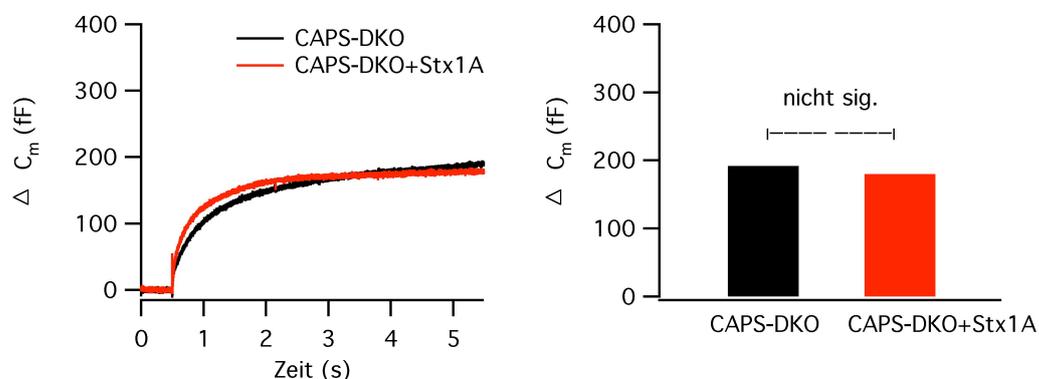


Abb. 3.9: CAPS-DKO vs. CAPS-DKO+Stx1A: Jeweils 20 Zellen aus 8 Experimenten

Pre-Flash- $[Ca^{2+}]_i$ : CAPS-DKO: 931 nmol/l; CAPS-DKO+Stx1A: 1,25  $\mu$ mol/l

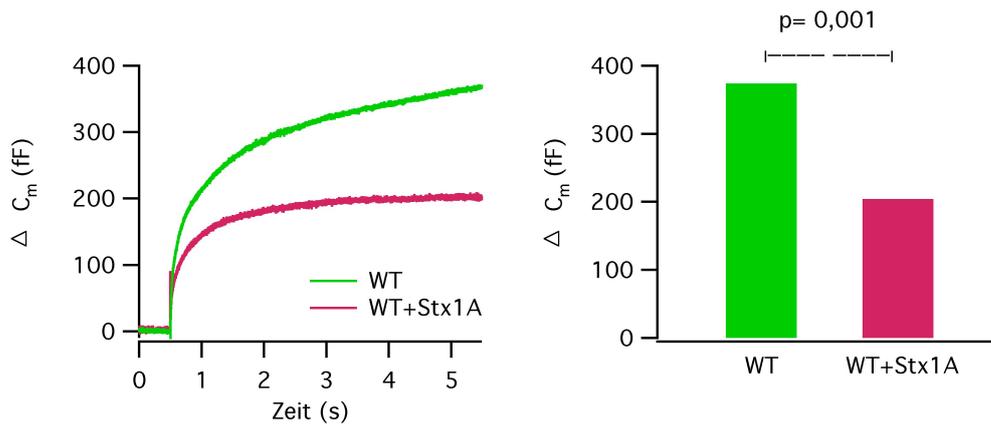


Abb. 3.10: WT vs. WT+Stx1A: Jeweils 24 Zellen aus 11 Experimenten

Pre-Flash- $[Ca^{2+}]_i$ : WT: 918 nmol/l; WT+Stx1A: 1,14  $\mu$ mol/l

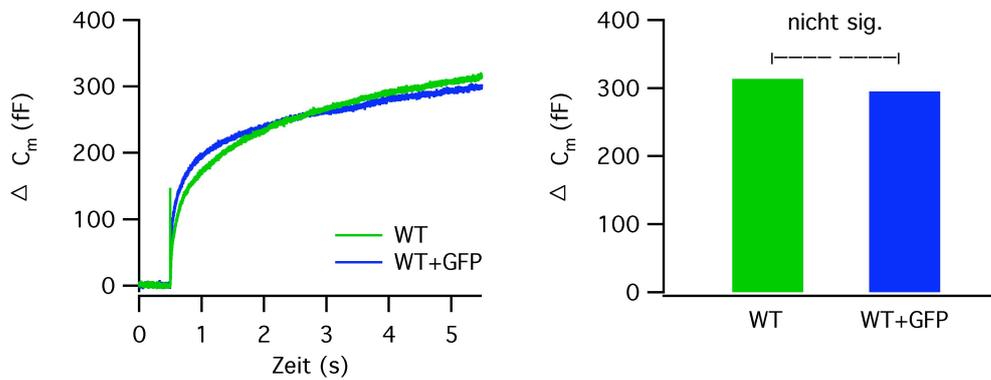


Abb.3.11: WT vs. WT+GFP: Jeweils 24 Zellen aus 7 Experimenten

Pre-Flash- $[Ca^{2+}]_i$ : WT: 623 nmol/l; WT+GFP: 706 nmol/l

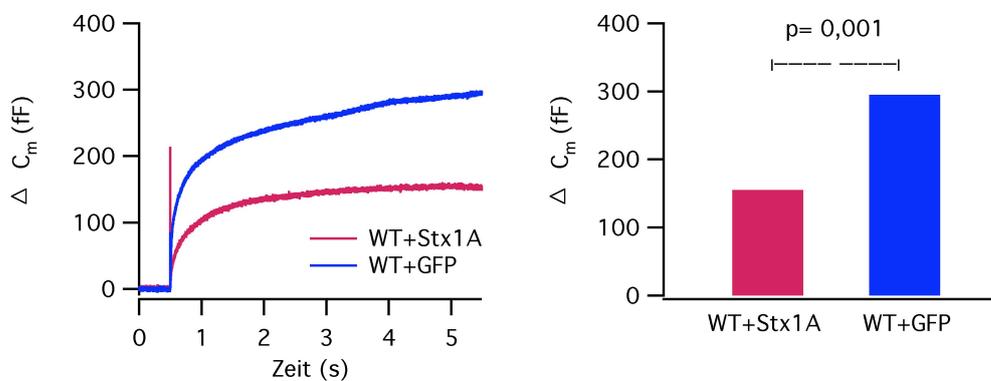


Abb.3.12: WT+GFP vs WT+Stx1A: Jeweils 19 Zellen aus 5 Experimenten

Pre-Flash- $[Ca^{2+}]_i$ : WT+GFP: 898 nmol/l; WT+Stx1A: 892 nmol/l

Die Ergebnisse im Vergleich der CAPS-DKO und CAPS-DKO+Stx1A, sowie der WT und WT+Stx1A-Zellen sind qualitativ unverändert zu den vorhergehenden Auswertungen der beiden Zellauswahlen.

Der Einfluss der alleinigen eGFP-Expression auf die Sekretion im Vergleich zu WT- und WT+Stx1A-Zellen stellt sich jedoch, auch signifikant, umgekehrt zu den obigen Auswertungen dar.

Diese Ergebnisse bestehen auch bei Auswertung der relativen Sekretionen.

Diese Diskrepanz bei der Einordnung der Gesamtsekretion der WT+GFP-Zellen zeigt, dass der Einfluss der Bedingungen unterschiedlicher Messtage, zumindest im Fall von wenigen, teilweise stark gewichteten Messtagen, wie bei der Messung der WT+GFP-Zellen (44 Zellen an 7 Messtagen), beachtet werden muss und meine Auswertungsstrategie mit spezifischen Untergruppen dahingehend sinnvoll und sensitiv ist.

Das meiner Ansicht nach verzerrte Ergebnis der Auswertung aller registrierten Sekretionen bei den WT+GFP-Zellen kommt vermutlich dadurch zu Stande, dass dort ein Messtag mit 9 WT+GFP-Zellen im niedrigen Sekretionsbereich gegenüber einer einzigen höher sezernierenden WT-Kontrollzelle den Mittelwert der Sekretion der WT+GFP-Zellen erniedrigt und zudem viele der überdurchschnittlichen WT-Sekretion aus einer Phase der Experimente stammen, zu der noch keine WT+GFP-Kontrollen durchgeführt wurden.

Bei der Gegenüberstellung von WT+GFP- und WT+Stx1A-Sekretionen ist die Situation prinzipiell ähnlich. Es gibt dort zwar keinen einzelnen Tag, der den Mittelwert der Sekretionen nach oben zieht, generell stammen jedoch viele der über dem Durchschnitt liegenden WT+Stx1A-Sekretionen von Tagen noch ohne WT+GFP-Kontrollzellen, wohingegen an Tagen an denen WT+Stx1A- und WT+GFP-Zellen gemessen wurden, die Sekretionen der WT+GFP-Zellen zum überwiegenden Teil über den Sekretionen der WT+Stx1A-Zellen lagen, aber insgesamt das Niveau der Sekretionen niedriger lag.

Beim Vergleich WT zu WT+Stx1A haben diese Effekte keinen großen Einfluss, da die in die Auswertung eingehenden Sekretionen von einer größeren Zahl an Messtagen über den ganzen Messzeitraum hinweg stammen und es keine Tage mit vielen Zellen gibt, deren Sekretionen außerhalb des mittleren Bereichs der anderen Sekretionen liegen.

Ich schätze die Aussage der Randomisierung nach Messtagen aus diesen Gründen als verlässlicher ein und schreibe die Reduktion der Gesamtsekretion spezifisch der Überexpression von Stx1A-Molekülen zu. Gut denkbar ist für mich jedoch, dass die Belastung durch die Virusinfektion und die Proteinbildung einen zusätzlichen, von Ausmaß und Dauer der Infektion abhängigen, negativen Einfluss auf zelluläre Prozesse wie die Sekretion hat.

Diese Einschätzung wird auch von den Aussagen der Veröffentlichung unterstützt, in der das verwendete SFV-Transduktionssystem für Chromaffinzellen eingeführt wurde (Ashery, Betz, Xu, Brose, & Rettig, 1999). Dort wurde nur eine kleine Verminderung des Readily-Releasable-Pools festgestellt. Eine deutliche Reduktion, wie in meinem Fall beim Vergleich von WT- und WT+Stx1A-Zellen, wäre nur unwahrscheinlich darauf zurück zu führen.

### **3.1.4 Analyse von Burst-Sekretion und Sustained Rate**

Die LDCV-Sekretion von Chromaffinzellen in Folge der schlagartigen Kalzium-Freisetzung in Flash-Experimenten besteht aus einer Burst-Komponente durch Freisetzung der sekretionsbereiten Vesikeln des RRP und SRP, und einer kontinuierlichen Ausschüttung durch gesteigertes Priming mit anschließender Sekretion (Sustained Rate) (Siehe Einleitung 1.2.5.2).

Bei meinen Experimenten ist auffällig, dass die Sekretionen Stx1A-überexprimierender Zellen zumeist einen nahezu horizontalen Verlauf am Ende ihrer Sekretionskurven aufweisen. Diese Auffälligkeit teilen sie mit Open-Stx-exprimierenden WT-Zellen und CAPS-DKO-Zellen mit und ohne Open-Stx-Expression, bei welchen eine signifikant reduzierte Sustained Rate als dafür verantwortlich nachgewiesen wurde (Y. Liu et al., 2008; Y. Liu et al., 2010).

Um dieser Auffälligkeit nachzugehen ist eine Aufschlüsselung nach den verschiedenen Komponenten einer Flash-Sekretionskurve nötig.

Durch einen bedeutenden Anteil an registrierten Sekretionskurven, deren RRP und SRP meiner Ansicht nach mit der von der Software Igor Pro bereit gestellten Funktion zur Pool-Size-Analyse nicht korrekt erfasst werden können, habe ich mich entschieden einen Schritt zurück zu treten und nur eine Unterscheidung zwischen der schnellen Ausschüttung der bereits sekretionsbereiten Vesikel (Burst-Sekretion), ohne Differenzierung zwischen RRP und SRP, und dem Umfang der parallel stattfindenden Nachreifung und Sekretion von Vesikeln (Sustained Rate) zu unterscheiden.

Die im Folgenden angegebene Burst-Sekretion entspricht der Kapazitätsänderung in der ersten Sekunde nach dem Flash und wird damit vor allem durch den steil ansteigenden Teil der Sekretionskurve gebildet.

Sie ist ein gutes Maß für die Größe von RRP und SRP, da diese ihre enthaltenen Vesikel zum allergrößten Teil in diesem Zeitraum sezernieren. Bei üblichen Zeitkonstanten von RRP und SRP von 30 ms bzw. 300 ms sind nach 1 Sekunde bereits 99,99...% bzw. 96,4% des maximalen Sekretionsvolumens dieser Pools erreicht.

Für die Ermittlung der Sustained Rate habe ich mich für das Anlegen einer software-ermittelten Bestgerade (Line-fit) an die Sekretionskurven in den letzten beiden Sekunden des 5-Sekunden-Zeitraums entschieden. In dieser Phase ist die Sekretionskurve in der Regel linear und praktisch nicht mehr von der Sekretion aus dem SRP beeinflusst. Selbst bei sehr langsamen Zeitkonstanten der SRPs wie  $T_{SRP} = 500$  ms oder sogar  $T_{SRP} = 1000$  ms hätte die Sekretion aus dem SRP in 3 Sekunden nach dem Flash bereits 99,75% bzw. 98,2% ihrer gesamten Poolgröße erreicht. Auch bei großen SRP-Pools von 200 fF verbleiben damit nur noch 0,5 fF bzw. 3,6 fF im SRP, die nach der 3. Sekunde sezerniert werden können und dies nur langsam in die Unendlichkeit auslaufend.

Dieses reduzierte Verfahren bot sich insbesondere an, da die Sekretionskurven gelegentlich im mittleren Verlauf zwischen der ersten und dritten Sekunde, wo nach den in der Literatur angegebenen Zeitkonstanten die RRP- und SRP-Pools bereits nahezu vollständig entleert sein sollten, noch eine gewisse Krümmung aufwiesen. Dies kann zur Ursache haben, dass die Sustained Rate nicht über den Zeitraum von 5 Sekunden aufrecht erhalten werden konnte oder es zu einer verlangsamten Sekretion der Vesikel aus den sekretionsbereiten Pools kam.

Dementsprechend ist die Angabe der Burst-Sekretion nur orientierend mit dieser Einschränkung (Möglicherweise verzögerte Entleerung von Pools) gültig und die Aussage über die Sustained Sekretion beschränkt sich auf die Nachlieferungsfähigkeit für gepresste Vesikel nach der 3. Sekunde nach dem Flash.

Beispielhaft sind in Abb. 3.13 die mittleren Burst-Sekretionen der Auswahl „Alle registrierten Sekretionen“ der CAPS-DKO-Zellen dargestellt. Die absolute Werte, auch der Burst-Sekretionen der spezifischen Untergruppen (UG), sowie die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind in den anschließenden Tabellen (Tab. 3.1, Tab. 3.2) angegeben. Im Anschluss folgen nach dem gleichen Schema die Ergebnisse der Analyse der Sustained Rate (Abb. 3.14, Tab.3.3, Tab.3.4). Zudem wird jeweils ein kurzes Fazit angeführt.

## Burst-Sekretion

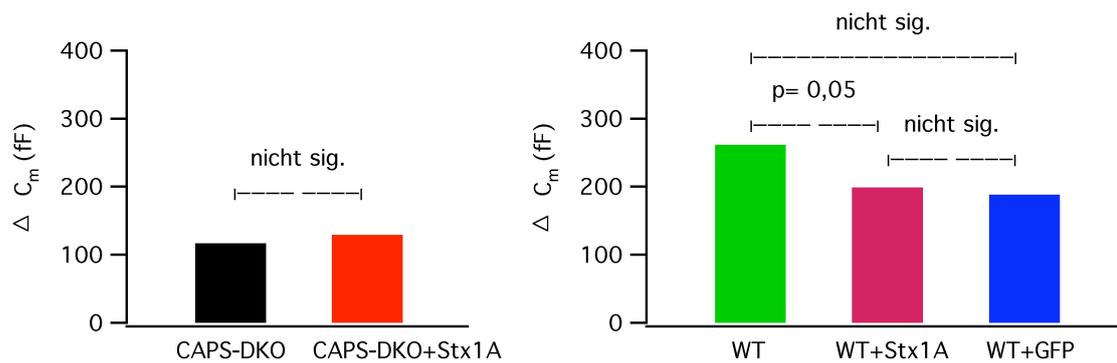


Abb. 3.13: Mittlere Burst-Sekretion aller aufgenommenen CAPS-DKO- und WT-Zellen

Tab. 3.1: Gegenüberstellung der Burst-Sekretionen in fF

Auswertung	DKO	DKO +Stx1A	WT	WT +Stx1A	WT +GFP
Alle aufgenommenen Zellen	117	129	261	199	188
UG mit vgl-baren Pre-Flash- $[Ca]_i$	139	104	267	139	171
<u>UG Randomisierung nach Messtagen:</u>					
CAPS-DKO vs. CAPS-DKO+Stx1A	130	145			
WT vs. WT+Stx1A			260	169	
WT vs. WT+GFP			194		205
WT+GFP vs. WT+Stx1A				124	224

Tab. 3.2: Statistische Prüfung mit dem Mann-Whitney-U-Test

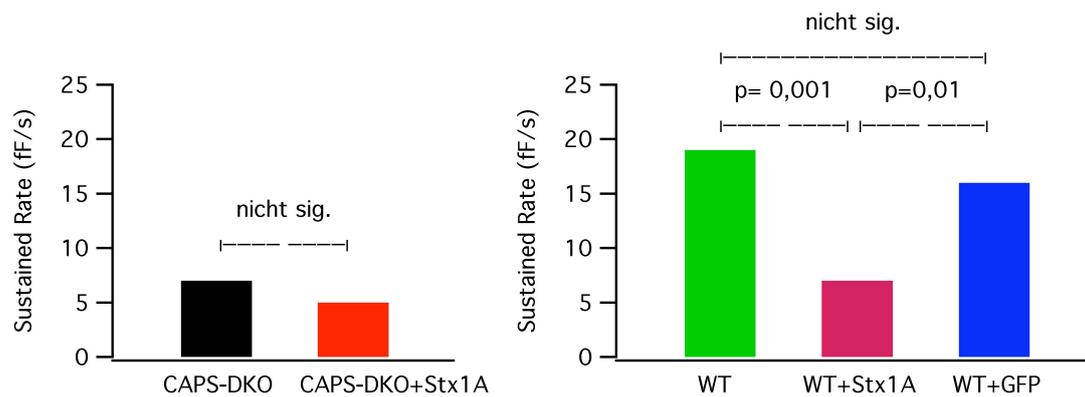
(Kein signifikanter Unterschied mit „ – “ gekennzeichnet)

Vergleich	Alle aufgenommenen Zellen	UG mit vgl-baren Pre-Flash- $[Ca]_i$	UG Randomisierung nach Messtagen
CAPS-DKO > CAPS-DKO+Stx1A	–	–	–
WT > WT+Stx1A	p= 0,05	p= 0,001	p= 0,01
WT > WT+GFP	–	p= 0,01	–
WT+GFP > WT+Stx1A	–	–	p= 0,001

**Fazit:** Die CAPS-DKO-Zellen mit und ohne Stx1A-Überexpression unterscheiden sich nicht in der Größe ihrer Burst-Sekretion. Die Transduktion mit Expression von zusätzlichen Syntaxin-Molekülen hat in allen Auswertungen negative Auswirkungen auf die Größe der sekretionsbereiten Pools in WT-Zellen.

Die Rolle der eGFP-Kontrollzellen ist ähnlich wie bei der Gesamtsekretion unklar.

### **Sustained Rate**



*Abb. 3.14: Mittlere Sustained Rate aller aufgenommenen CAPS-DKO- und WT-Zellen*

*Tab. 3.3: Gegenüberstellung der Sustained Rates in fF/s*

<b>Auswertung</b>	DKO	DKO +Stx1A	WT	WT +Stx1A	WT +GFP
Alle aufgenommenen Zellen	7	5	19	7	16
UG mit vgl-baren Pre-Flash- $[Ca]_i$	6	7	16	7	18
<u>UG Randomisierung nach Messtagen:</u>					
CAPS-DKO vs. CAPS-DKO+Stx1A	9	4			
WT vs. WT+Stx1A			19	4	
WT vs. WT+GFP			17		17
WT+GFP vs. WT+Stx1A				3	12

*Tab. 3.4: Statistische Prüfung mit dem Mann-Whitney-U-Test*

*(Kein signifikanter Unterschied mit „ – “ gekennzeichnet)*

Vergleich	Alle aufgenommenen Zellen	UG mit vgl-baren Pre-Flash-[Ca] <sub>i</sub>	Randomisierung nach Messtagen
CAPS-DKO > CAPS-DKO+Stx1A	p= 0,05	–	–
WT > WT+Stx1A	p= 0,001	p= 0,01	p= 0,001
WT > WT+GFP	–	–	–
WT+GFP > WT+Stx1A	p= 0,01	p= 0,001	p= 0,05

Fazit: Die Syntaxin-überexprimierenden CAPS-DKO-Zellen zeigen gegenüber den CAPS-DKO-Kontrollen eine unveränderte bzw. in der Tendenz niedrigere Rate der Nachreifung von Vesikeln. Die Syntaxin-überexprimierenden WT-Zellen weisen eine in allen erstellten Auswertungen signifikant reduzierte Sustained Rate gegenüber den Kontrollen auf. Dies ist auch im Vergleich mit der ebenfalls durch die Transduktion belastete WT+GFP-Kontrollgruppe durchgehend der Fall.

### **3.1.5 Fazit der elektrophysiologischen Messungen**

In keiner der Ergebnisse der verschiedenen Auswertungen findet sich ein Hinweis auf eine sekretionssteigernde Wirkung durch Syntaxin-Überexpression, weder in WT noch in CAPS-DKO-Zellen. Vielmehr bewirkt die vermehrte Expression von Syntaxin durchgehend eine Reduktion der Sekretion in Flash-Experimenten bei WT-Zellen. Diese Verminderung kommt sowohl durch eine Reduktion der Sekretion der Burst-Phase als auch durch eine verminderte Sustained Rate zu Stande.

Diese fehlende Steigerung bzw. Minderung der Sekretionskapazität bei Syntaxin-Überexpression tritt trotz systematisch erhöhter intrazellulärer Kalziumkonzentrationen auf, die die Bereitstellung sezernierbarer Vesikel prinzipiell fördert. Eine vermehrt stattfindende Autosekretion als Ursache dafür konnte ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse der Gesamtsekretion und der Burst-Sekretion der WT+GFP-Kontrollexperimente im Vergleich mit den WT- und WT+Stx1A-Experimenten sind nicht eindeutig. Daher ist eine klare Ursachenzuschreibung auch nicht möglich. Wie im Abschnitt 3.1.3.2 diskutiert ist es jedoch wahrscheinlich, dass spezifisch die Überexpression der Syntaxin-Moleküle, über eine generelle negative Wirkung der viralen Infektion hinaus, einen mindernden Effekt auf die Gesamtsekretion und die Burst-Sekretion hat.

Die Reduktion der Sustained Rate bei den WT+Stx1A-Zellen ist nach allen angeführten Auswertungen eindeutig eine spezifische Folge der Syntaxin-Überexpression.

## 3.2 Zelluläre Lokalisation von Stx1A und Open-Stx bei Überexpression

Als mögliche Ursache der fehlenden Sekretionssteigerung bei Stx1A-Überexpression in CAPS-DKO- und WT-Chromaffinzellen kommt in Betracht, dass zusätzliches Stx1A im Gegensatz zu Open-Stx nicht die Wirkungsstätte an der Zellmembran erreicht. Hinweise dafür gibt es aus der Literatur, da von Gladychewa et al. (Gladychewa et al., 2007) berichtet wurde, dass Syntaxin bei Überexpression in HEK-Zellen nicht die Zellmembran erreicht, sondern in einem perinukleären Ring oder in einzelnen intrazellulären Ansammlungen akkumuliert, wenn nicht parallel Munc18 überexprimiert wird. Im Gegensatz zu HEK-Zellen bilden die neurosekretorischen Chromaffinzellen Munc18. Es ist jedoch gut denkbar, dass der Transport der Syntaxin-Moleküle an die Zellmembran, z.B. durch die vorhandene Anzahl von Munc18-Molekülen limitiert ist und daher für einen sekretionssteigernden Effekt nicht ausreichend Syntaxin-Moleküle an ihre Wirkstätte gelangen.

Mittels Immunfluoreszenz mit Primär-Antikörpern gegen Syntaxin und SIM-Mikroskopie habe ich Fluoreszenz-Aufnahmen von fixierten Wildtyp-Chromaffinzellen erstellt, die nach SFV-Transduktion wahlweise Stx1A oder Open-Stx überexprimierten. Die Überexpression wurde dabei identisch zu den Elektrophysiologie-Experimenten durchgeführt.

Die folgende Abbildung zeigt drei repräsentative Bilder aus den bei 2 verschiedenen Versuchs-Kontroll-Experimenten (2 Mäuse) von insgesamt 63 Zellen aufgenommenen SIM-Bildern. Alle Konditionen wie Antikörperkonzentrationen, Inkubationszeiten, Laserintensität, Belichtungsdauer und die Parameter der spezifischen Berechnung des SIM- Mikroskops, sowie die Bildeinstellungen der vorliegenden Abbildungen wurden dabei konstant gehalten.

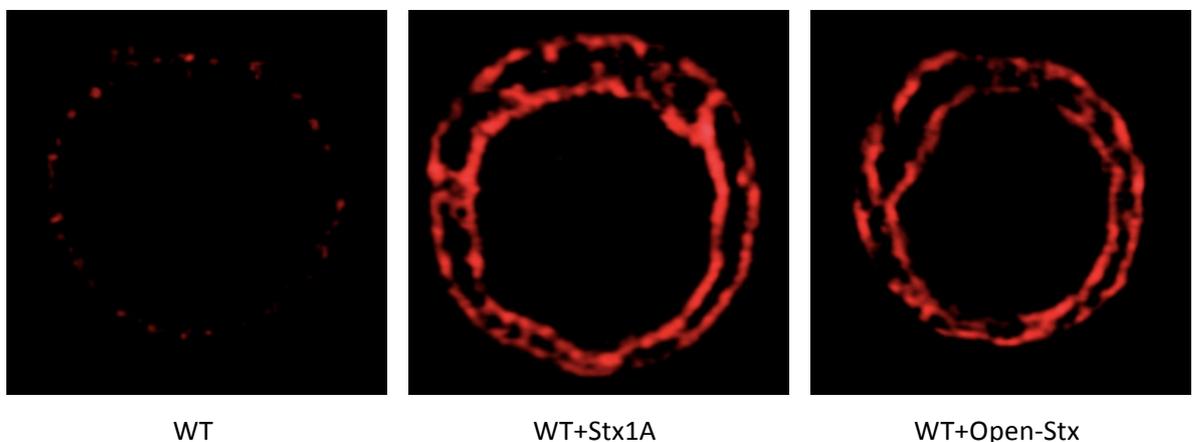


Abb. 3.15: Repräsentative SIM-Aufnahmen mit Antikörperfärbung von Syntaxin-Molekülen bei WT-Chromaffinzellen ohne, mit Stx1A und mit Open-Stx-Überexpression (von links nach rechts)

Alle 25 aufgenommenen nichttransduzierten Wildtypzellen zeigten kleine punktuelle Fluoreszenzen entlang der Zellmembran (über Ko-Staining mit Phalloidin identifiziert).

Anstelle dieses fein gepunkteten Rings, wiesen die Stx1A- und die Open-Stx- überexprimierenden Zellen häufig in allen Richtungen breitere und intensiver fluoreszierenden Strukturen an der Membran auf. Zusätzlich waren meist ebenso stark gefärbte intrazelluläre Strukturen – oft ein zweiter intrazellulärer Ring oder einzelne große punktuelle Ansammlungen – vorhanden. Dieses Muster mit stark gefärbtem Membranbereich und ebenso kräftiger intrazellulärer Immunfluoreszenz zeigten 16 von 20 WT+Stx1A-Zellen und 16 von 18 WT+Open-Stx-Zellen. 4 WT+Stx1A-Zellen und 2 WT+Open-Stx-Zellen zeigten nur unwesentlich gegenüber den WT-Kontrollen stärker leuchtende Randstrukturen bei gleichzeitig kräftig gefärbten intrazellulären Ringen bzw. Ansammlungen. Prinzipielle Unterschiede in der Färbung zwischen Stx1A und Open-Stx-exprimierenden Zellen waren nicht auszumachen. Negativ-Kontrollen ohne Primärantikörper, jedoch mit Sekundärantikörpern, zeigten keine Fluoreszenz.

Die intrazelluläre Lokalisation von Syntaxin mittels Immunfluoreszenz verdeutlicht, dass sowohl Syntaxin 1A als auch Open-Syntaxin bei Expression nach SFV-Transduktion in gleichem Maße vermehrt an der Zellmembran vorliegen.

Ein im Vergleich zu Open-Stx verminderter Transport von Stx1A an die Zellmembran scheidet daher als Ursache für die fehlende Steigerungswirkung der Stx1A-Überexpression in CAPS-DKO- und WT-Zellen aus.

## 4 Diskussion

### 4.1 LDCV-Sekretion und die Interaktion von CAPS und Syntaxin

Um die experimentellen Ergebnisse für die Ableitung von Erkenntnissen über den molekularen Wirkmechanismus von CAPS richtig interpretieren zu können, ist es wichtig die in meinen Experimenten festgestellten Auswirkungen der Überexpression von Syntaxin 1A auf die Sekretion von Wildtyp-Chromaffinzellen, sowie die von Liu et al. (Y. Liu et al., 2008; Y. Liu et al., 2010) publizierten Ergebnisse über die Auswirkungen von Open-Stx-Expression in Wildtyp-Chromaffinzellen zu betrachten, um sie dann bei der Beurteilung der Ergebnisse der Experimente an CAPS-DKO-Chromaffinzellen mit einbeziehen zu können (Die Beschreibung der Effekte von Open-Stx-Expression in CAPS-DKO-Chromaffinzellen wurde ebenfalls von Liu et al., 2010, publiziert).

Daher werde ich im ersten Diskussionsabschnitt vergleichend die Auswirkungen von Open-Syntaxin- und Syntaxin-1A-Überexpression auf die Sekretion in Wildtyp-Chromaffinzellen darstellen und im Anschluss die Ergebnisse der Experimente am CAPS-DKO einordnen.

#### 4.1.1 Sekretion bei (Open-)Syntaxin-Überexpression

Beide Konformationen von Syntaxin haben jeweils spezifische Funktionen für die regulierte Exozytose in Chromaffinzellen. In der offenen Form hat Syntaxin 1A als Teil des SNARE-Komplex eine essentielle Rolle bei der Fusionsreaktion. In der geschlossenen Konformation ist es wichtig für effektives Docking in Chromaffinzellen (siehe Einleitung).

##### Open-Stx-Expression in Wildtyp-Chromaffinzellen

Werden in Chromaffinzellen mittels viraler Überexpression Open-Syntaxin-Moleküle in großem Übermaß an die Membran gebracht, wie es in meinen Immunfluoreszenzbildern deutlich wird, so weisen diese in Flash-Experimente eine Steigerung der Burst-Sekretion mit einem 2-fach vergrößerten RRP bei gleichzeitig reduzierter Sustained Rate auf. Die in der gegenüber der WT-Kontrolle verringerten Sustained Rate zum Ausdruck kommenden Schwierigkeiten bei der Nachbildung sekretionsbereiter Vesikel zeigt sich auch in der Sekretion als Reaktion auf einen zweiten Flash nach einer kurzen Erholungsphase. Dort ist in Open-Syntaxin-exprimierenden Zellen die Sekretion unter WT-Niveau reduziert; WT-Zellen ohne Open-Stx-Expression sezernieren, vermutlich aufgrund gesteigerten Primings durch erhöhtes Pre-Flash- $[Ca^{2+}]_i$ , normal bis gesteigert.

Als weiteren Effekt haben Open-Syntaxin-exprimierende Zellen eine verminderte Zahl von Large-Dense-Core-Vesikeln an der Membran (Docking-Defizit), was auf ein verändertes Gleichgewicht, zwischen On- und Off-Docking oder eine verstärkte spontane Sekretion im Vergleich zum unveränderten Wildtyp hinweist.

#### Stx1A-Überexpression in Wildtyp-Chromaffinzellen

Außerhalb des SNARE-Komplex liegt Syntaxin 1A in der geschlossenen Konformation vor.

Wird natürliches Syntaxin 1A in Überexpression in Wildtyp-Chromaffinzellen eingebracht, so zeigen diese im Gegensatz zur zusätzlichen Expression von Open-Stx keine Steigerung sondern eine Verminderung der Anzahl sekretionsbereiter Vesikel (Burst-Sekretion).

Die Sustained Rate ist, in Analogie mit den Ergebnissen der Open-Syntaxin-Expression, im Wildtypzellen stark erniedrigt, was ebenso auf eine verminderte Kapazität der Nachreifung und Sekretion von fusionskompetenten Vesikeln bei anhaltendem Stimulus (hohe intrazelluläre Kalziumionen-Konzentration) hinweist.

#### Fazit

Dadurch wird klar, dass die Vergrößerung des RRP in Chromaffinzellen spezifisch durch die offene Konformation des Syntaxin-Moleküls hervorgerufen wird und nicht durch die vermehrte Bereitstellung von Syntaxin-Molekülen allgemein.

Die deutliche Reduktion der Sustained Rate unter Wildtyp-Niveau ist hingegen unabhängig von der Konformation des viral zusätzlich exprimierten Syntaxins bzw. tritt bei Überexpression beider Konformationen auf. Diesen Effekt führe ich nach meiner Einschätzung der erstellten Kontrollexperimente (siehe 3.1.3.2) und v.a. aufgrund der homogenen Ergebnisse der Auswertung der Sustained Rate (siehe 3.1.4) spezifisch auf die vermehrt intrazellulär vorhandenen Syntaxin-Moleküle und nicht auf unspezifische Auswirkungen der Transduktion zurück.

#### Einordnung dieser Befunde in das Flussmodell der regulierten Exozytose

Beide, die Verkleinerung der Flash-induzierten Burstsekretion und die verminderte Sustained Rate, können bei Überexpression von unveränderten Syntaxin 1A durch eine Behinderung der Bildung sekretionsbereiter Vesikel im Verlauf des Flussmodells erklärt werden. Durch in der Summe verminderte Vorwärtsraten oder gesteigerte Rückwärtsreaktionen werden in diesem Fließgleichgewicht kleinere RRP und/oder SRP bereitgestellt, nach deren Entleerung infolge der Flash-Photolysis aus dem selben Grund auch nur verlangsamt die Nachbildung fusionskompetenter Vesikel mit sofortiger Sekretion ablaufen kann.

Als zugrunde liegende Ursache dafür kann ein verkleinerter UPP als Grundlage der Bildung sekretionsbereiter Vesikel oder eine Störung der Priming-Reaktion  $UPP \rightarrow SRP \rightarrow RRP$  herangezogen werden. Für eine Reduktion des UPP käme ein, in Anbetracht der Bedeutung geschlossenen Syntaxins für diesen Prozess auf den ersten Blick paradoxer, Docking Defekt in Frage. Durch gut vorstellbare störende Einflüsse auf die Bildung von Vesikel-Akzeptor-Komplexen (siehe unten) bei Syntaxin-Überexpression ist dies jedoch durchaus ein mögliches Szenario. Für eine exakte Einordnung an welcher Stelle des Flussmodells eine Störung vorliegt, wären dementsprechend elektronenmikroskopische Aufnahmen der Anzahl gedockter Vesikel, sowie eine gute Poolsizeanalyse nötig.

Als Bestätigung der Überlegungen, dass vermehrt vorhandenes Syntaxin die Nachproduktion stört, wären zudem Second-Flash-Experimente und repetitive Depolarisationsexperimente mit Induktion von synaptischer Depression geeignet.

Die bei Open-Stx-Expression im WT aufgetretene Verbindung von gesteigerter Burst-Sekretion mit reduzierter Sustained Secretion und reduzierter Sekretion im 2. Flash kann nach meinen Überlegungen durch eine in der Geschwindigkeit reduzierte Wiederauffüllungsreaktion (wie bei Syntaxin 1A-Überexpression) bei gleichzeitig sehr stabilem Endprodukt (=fortgeschrittener SNARE-Komplex) unter Open-Syntaxin Einwirkung oder durch einen im Umfang reduzierten UPP bei gleichzeitig gesteigertem Priming erklärt werden. Als Ursache für einen verminderten UPP kommt ein starkes Verschieben in die sekretionsbereiten Pools (durch Priming-Steigerung durch Open-Stx) bei beschränkter Andockkapazität an der Membran oder ein Docking Defekt in Frage.

Da ein Docking Defekt bei Open-Stx-Expression festgestellt wurde, ist letzteres in Verbindung mit einer gesteigerten Priming Rate vom SRP in den RRP das naheliegendste Erklärungsmodell.

Auch eine Mischung von einerseits gesteigertem Priming durch Open-Stx und an anderer Stelle reduziertem Priming durch unspezifische Stx-Effekte bei gleichzeitigem Docking Defizit ist denkbar. Das erste beschriebene Modell ist eine Variante dieses Prinzips.

Der Docking Defekt wird in der Literatur auf die verschlechterte Interaktion von offenem Syntaxin und Munc18 zurückgeführt. Vor diesem Hintergrund wäre eine elektronenmikroskopische Untersuchung der gedockten Vesikel bei Überexpression von natürlichem Syntaxin 1A zweifach interessant. Einmal um eine potentielle gemeinsame Ursache der reduzierten Sustained Secretion zu überprüfen und um die Bedeutung von Munc18-Stx1A-Interaktionen für das Docking weiter einzuschätzen.

## Mögliche molekulare Mechanismen

Da die fortschreitende Bildung von SNARE-Komplexen als Kern der Priming-Reaktion gilt, ist die attraktivste Erklärung für verstärktes Priming vom SRP in den RRP in Open-Syntaxin-exprimierenden Chromaffinzellen die Umgehung eines raten-limitierenden Schritts, der die Öffnung von Syntaxin und darüber die Transformation von Vesikeln vom SRP in den RRP bewirkt. Durch das Angebot an konstitutiv-offenen Syntaxin-Molekülen wäre die Bildung von SNARE-Komplexen ohne einen solchen limitierenden Schritt möglich. Auch denkbar ist, dass die mit Open-Syntaxin gebildeten SNARE-Komplexe stabiler sind und es weniger zu einem Zerfall nach Bildung kommt.

Würde die Bildung von vollständigen SNARE-Komplexen mittels geöffneten Syntaxinmolekülen jedoch den Übergang von Vesikeln aus dem SRP in den RRP definieren, dann dürfte beim massiven Überwiegen der Open-Syntaxin-Moleküle gegenüber den natürlichen Syntaxinmolekülen (siehe Immunfluoreszenzbilder Kapitel 3.2) in den Flash-Sekretionskurven bei Open-Stx-Expression keine SRP-Komponente enthalten sein. Dies ist jedoch nicht der Fall, sondern vielmehr ist der SRP im Mittel sogar vergrößert. Dies spricht dafür, dass der RRP sich über eine andere Art und Weise vom SRP unterscheidet.

Der im Mittel gesteigerte SRP bei Open-Stx-Expression wird weiter durch eine gesteigerte Rückreaktion bei großem RRP erklärt. Eine Rückreaktion vom RRP in den SRP könnte bei den Experimenten mit Open-Stx jedoch nur ohne Veränderung der offenen Konformation einhergehen. Würde sich der SRP von RRP dementsprechend durch eine Vorstufe des Einbaus von Open-Syntaxin in den SNARE-Komplex unterscheiden, dann müssten jedoch beide Pools, SRP und RRP, durch die Expression von Open-Stx eine Steigerung erfahren. Da der SRP zwar nicht signifikant, aber im Mittel bei Open-Stx-Expression sowohl im WT als auch im CAPS-DKO erhöht ist, ist diese Möglichkeit nach meinen Erfahrungen mit der Poolsize-Analyse und der allgemeinen Variabilität biologischer Experimente dieser Art nicht vollständig ausgeschlossen.

In Anlehnung an die von Mohrmann et al. und Gerber et al. (Gerber et al., 2008; Mohrmann, de Wit, Verhage, Neher, & Sorensen, 2010) geäußerte Einstellung der Ausschüttungswahrscheinlichkeit der Vesikel durch deren Zahl an SNARE-Komplexen, könnte eine größere Zahl von SNARE-Komplexen pro RRP-Vesikel im Vergleich zu SRP-Vesikeln prinzipiell diese Befunde erklären. Eine insgesamt Erhöhung der verfügbaren SNARE-Komplexe durch Vorliegen von Open-Stx, z.B. durch eine stark verminderte Rückreaktion  $k_{-2}$ , könnte bei ausreichender Zahl der zusätzlich pro Vesikel gebildeten SNARE-Komplexe auch eine verstärkte Förderung des RRP

gegenüber dem SRP mit sich bringen. Der 10-fache Unterschied in den Zeitkonstanten von RRP und SRP müsste dann jedoch auch durch einen 10-fachen Unterschied in den jeweils vorhandenen SNARE-Komplexen oder eine unproportional erhöhte Kalziumsensitivität dieser SNARE-Komplexe bedingt sein, was weniger wahrscheinlich erscheint.

Als Ursache für die Reduktion der Neubildung sekretionsbereiter Vesikel bei beiden Syntaxin-Formen durch einen Docking- oder Priming-Defekt kann ich mir nach meiner Kenntnis der Literatur folgende molekulare Mechanismen vorstellen:

- Bildung von falschen SNARE-Protein-Komplexen, z.B. 2:1 Syntaxin- SNAP-25- und 2:1 Syntaxin-Synaptobrevin-Oligomere, wodurch SNAP-25 und Synaptobrevin weniger zur Bildung funktioneller SNARE-Komplexe oder Vesikelakzeptorkomplexe zur Verfügung stehen
- negative Einflüsse der stark vergrößerten Syntaxin-Clustern auf Prozess an der Zellmembran
- Binden von weiteren, mit Syntaxin interagierenden molekularen Effektoren wie z.B. Munc18, welche in Folge durch die Verteilung auf viele Syntaxin-Moleküle nicht mehr ausreichend zusammen finden.

#### **4.1.2 Die Rolle von CAPS für die Sekretion**

Nun gilt es diese Effekte der Syntaxin- und Open-Syntaxin-Expression in WT-Zellen zu beachten, wenn man die Ergebnisse der entsprechenden Experimente in CAPS-DKO-Chromaffinzellen interpretiert.

##### Sekretion in CAPS-DKO-Chromaffinzellen

Von CAPS ist bekannt, dass das Fehlen der beiden CAPS-Isoformen in CAPS-DKO-Mäusen eine reduzierte Burst-Sekretion durch einen verkleinerten RRP, sowie eine erniedrigte Sustained Rate in deren Chromaffinzellen bei Flash-Experimenten zur Folge hat.

Im Flussmodell der neuronalen regulierten Exozytose wird die Ursache für die Reduktion des RRP nach numerischen Simulationen der Ergebnisse der Flash-Experimente an CAPS-DKO-Zellen- und deren Rescue-Experimenten bei der Rate  $k_2/k_{-2}$ , also der Transformation sekretionsbereiter Vesikel vom SRP in den RRP, angesiedelt.

Die reduzierte Sustained Rate der CAPS-DKO-Chromaffinzellen kann jedoch damit nur erklärt werden, wenn man ein paralleles Primingschema zu Grunde legt, indem für den Sustained Release die Vesikel aus dem UPP über einen durch CAPS bewirkten kalziumabhängigen Primingschritt direkt in den RRP transformiert und anschließend sofort sezerniert werden.

Ein Docking Defekt als Ursache für die reduzierte Sustained Rate, analog zum Phänotyp der Open-Stx-Überexpression in WT-Zellen, wurde für CAPS-DKO-Zellen ausgeschlossen.

#### Open-Stx-Expression in CAPS-DKO-Chromaffinzellen

Wie oben mehrfach erwähnt kann die Größe des RRP bei den CAPS-DKO-Zellen durch Open-Stx-Überexpression wieder auf WT-Niveau gehoben werden, wohingegen die erniedrigte Sustained Rate dadurch unbeeinflusst bleibt. Dies entspricht der auch im Wildtyp zu Tage tretenden Wirkung der Open-Syntaxin-Expression auf die Teilschritte des Flussmodells. Die Reaktion im 2. Flash ist dementsprechend sogar unter das Niveau der CAPS-DKO-Kontrollen im 2. Flash reduziert, was durch die zusätzlichen Schwierigkeiten bei der Nachfüllungsreaktion durch Open-Stx-Expression erklärt werden kann.

#### Stx1A-Überexpression in CAPS-DKO-Chromaffinzellen

Die Flash-Sekretion von CAPS-DKO-Chromaffinzellen stellt sich bei Überexpression von natürlichem Syntaxin 1A unverändert gegenüber den CAPS-DKO-Kontrollen dar.

Im Gegensatz zur Stx1A-Überexpression in WT-Zellen bringt die Stx1A-Überexpression im CAPS-DKO damit keine weitere klare Verminderung der sekretionsbereiten Vesikel mit sich. Die potentielle zusätzliche Reduktion der Burst und Sustained Sekretion ist jedoch bei der sowieso geringen Sekretion der CAPS-DKO-Zellen im Rahmen der Variabilität der Flash-induzierten Sekretionen und innerhalb des zeitlich beschränkten 5-Sekunden-Zeitraums der Sekretionsmessung vermutlich einfach nicht abzubilden. Bei der Auswertung der Untergruppen mit vergleichbaren Kalziumkonzentrationen kann man erkennen, dass die Sekretion der CAPS-DKO-Zellen bei Stx1A-Überexpression jedoch tendenziell eher niedriger ist. Dies entspricht auch dem allgemeinen Verteilungsmuster in den Rohdaten.

Eindeutig tritt hervor, dass die Steigerungswirkung auf den RRP von CAPS-DKO-Chromaffinzellen der konstitutiv offenen Form von Syntaxin eigen ist und nicht durch das Vorhandensein von Syntaxin-Molekülen im Übermaß, unabhängig von der Konformation, bewirkt wird.

## Aussagen über den molekularen Wirkmechanismus von CAPS

Damit ist diese wichtige Einschränkung der Aussagekraft der Open-Stx-Rescue-Experimente in CAPS-DKO-Chromaffinzellen ausgeräumt.

Die nun sichere Erkenntnis, dass spezifisch Open-Syntaxin die beobachteten Effekte in CAPS-DKO- und WT-Chromaffinzellen hat, unterstützt die Hypothese, dass CAPS an der Öffnung von Syntaxin beteiligt ist.

Dieses auch für Munc13 herangezogene Modell zur molekularen Mechanistik sieht eine Umlagerung von an Closed-Syntaxin gebundenem Munc18 durch CAPS vor. Das sich bereits in Interaktion mit den anderen SNARE-Proteinen und dem Vesikel befindliche Syntaxin wird in Folge dessen geöffnet, wodurch die Bildung eines fortgeschrittenen SNARE-Komplex möglich wird.

Da CAPS sich als selektiv für die Förderung des Primingschritt SRP → RRP gezeigt hat, müsste durch die Öffnung von Syntaxin der RRP definiert werden. Entsprechend der oben angeführten Argumentation dürfte dann jedoch im Fall der Open-Syntaxin-Expression kein SRP mehr nachzuweisen sein. Dies ist jedoch nicht der Fall. Die Definition von RRP-Vesikeln mit Hilfe der Wirkung von CAPS könnte daher gut möglich über einen anderen Weg erfolgen und Open-Stx statt der Umgehung eines CAPS-abhängigen Schritts auf eine eigenständige Art und Weise seine Steigerungswirkung entfalten.

Für eine alternative oder auch evtl. zusätzliche Wirkung von CAPS an einer anderen Stelle als dem Öffnen von Syntaxin spricht weiter, dass die Expression von Open-Syntaxin im CAPS-DKO nicht die Höhe der Sekretion erreicht, die Open-Syntaxin-Expression im WT erzeugt. Da diese Ergebnisse durch die unterschiedlichen Genotypen selbstverständlich nicht in direkt vergleichenden Versuchs-Kontroll-Experimenten gewonnen wurden, wurde in der Originalpublikation auch keine statistische Prüfung des Vergleichs dieser beiden Sekretionen angestellt. Da die mittleren Sekretionen der Kontrollzellen in beiden Fällen jedoch die typischen, auch von mir reproduzierten Höhen aufweisen, ist kein entscheidender Bias durch die Versuchsbedingungen anzunehmen. Unter Einbeziehung meiner Erfahrungen mit der Streuung und Mittelwertkurvenbildung bei Flash-Sekretionen und der bekanntermaßen durchgeführten Randomisierung nach Messtagen ist ein Unterschied von 150 fF in der mittleren Burst-Sekretion bei jeweils n=24 unwahrscheinlich nur durch zufällige Streuung bedingt.

Dies deutet darauf hin, dass der Mangel an CAPS nicht komplett durch die Einführung der konstitutiv-offenen Form von Syntaxin ausgeglichen werden kann, sondern der CAPS-DKO noch an anderer Stelle des Primingprozesses ein Defizit aufweist.

Die von der Gruppe um T.F. Martin (N. J. Daily, Boswell, James, & Martin, 2010; James, Kowalchuk, Daily, Petrie, & Martin, 2009) vorgeschlagenen alternativen Hypothesen zur molekularen Funktionsweise von CAPS beschreiben jeweils ordnende oder zusammenführende Funktionen für die beteiligten SNARE-Proteine.

Dieses Grundmodell ist bei den vorliegenden Ergebnissen insofern interessant, da damit ein und die selbe Ursache für die in Umfang und Geschwindigkeit verminderte Bereitstellung von sekretionsbereiten Vesikeln für CAPS-DKO und WT+Stx1A-Zellen angegeben werden könnte: Im Fall des CAPS-DKO entsteht diese Reduktion durch ein verlangsamtes Bilden von funktionsfähigen SNARE-Komplexen bzw. deren funktionellen Vorstufen durch den Mangel an den ordnenden Eigenschaften von CAPS; im Fall der Überexpression von Syntaxin-Molekülen ist deren Bildung durch die übermäßig vorliegenden Syntaxin-Molekülen erschwert. Bei Open-Stx-Expression kann dies für den Burst im ersten Flash noch durch ein Verschieben der gedockten Vesikeln in die sekretionsbereiten Pools durch dessen Priming-Wirkung ausgeglichen werden.

Für eine selektiv den RRP steigernde Wirkung kann ich aber in diesem Modell keine Ansatzpunkte erkennen, da die vorgeschlagenen Hypothesen zur Wirkung von CAPS jeweils am Anfang des Primingprozesses angesiedelt sind und daher prinzipiell auf den SRP und den RRP steigernd wirken.

Die vollständige Beschreibung der experimentellen Ergebnisse mit Hilfe der bisher vorgeschlagenen theoretischen Modelle zum molekularen Primingmechanismus von CAPS ist meiner Ansicht nach noch nicht möglich. Weiterentwicklungen der Hypothesen auf Grundlage ergänzender experimenteller Erkenntnisse scheinen mir daher erforderlich.

## 4.2 Kurze Diskussion weiterer Ergebnisse und Beobachtungen

### 4.2.1 Syntaxin-Cluster in WT-Chromaffinzellen

Die Syntaxin-Moleküle präsentieren sich auch in Wildtyp-Chromaffinzellen in kleinen, gut abgegrenzten Ansammlungen (Clustern) an der Membran. Die bisherigen Mikroskopiebilder zu diesem Thema (siehe Kapitel 1.3.2.) wurden nach meiner Kenntnis der Literatur ausschließlich an Zellmembranen von Phäochromozytomzellen erstellt.

### 4.2.2 Stx1A-Überexpression und intrazelluläre Kalziumkonzentration

Zu beobachten war, dass sowohl die Stx1A-überexprimierenden Wildtyp-Zellen, als auch die Stx1A-überexprimierenden CAPS-DKO-Zellen gegenüber den Wildtyp-Kontrollzellen und auch den eGFP-überexprimierenden Wildtypzellen signifikant erhöhte Pre-Flash-Kalziumkonzentrationen aufwiesen. Bei den bestehenden Zweifeln an der Kalziummessung ist eine Einschätzung der tatsächlichen Größenordnung schwierig. Die Tendenz zu höheren Werten ist jedoch auffällig. Dies kann möglicherweise durch die stärkere Belastung der Zellen durch die virale Induktion der Bildung von eGFP und Syntaxin verursacht sein. Auch denkbar sind bei den bekannten Interaktionen von Syntaxin mit Ionenkanälen Effekte, die darauf zurückzuführen sind. Beispielsweise der intrazelluläre Abbau von an Syntaxin gebundenen Kanälen im Zuge der Degradation überzähliger Syntaxin-Moleküle kommt dafür in Frage. Ionen-Kanal-Effekte bei Syntaxin-Überexpression könnten durch elektrophysiologische Methoden oder Calcium-Imaging untersucht werden.

## Literaturverzeichnis

- Albillos, A., Dernick, G., Horstmann, H., Almers, W., Alvarez de Toledo, G., & Lindau, M. (1997). The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature*, 389(6650), 509-512.
- Ann, K., Kowalchuk, J. A., Loyet, K. M., & Martin, T. F. (1997). Novel Ca<sup>2+</sup>-binding protein (CAPS) related to UNC-31 required for Ca<sup>2+</sup>-activated exocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(32), 19637-19640.
- Aoyagi, K., Sugaya, T., Umeda, M., Yamamoto, S., Terakawa, S., & Takahashi, M. (2005). The activation of exocytotic sites by the formation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate microdomains at syntaxin clusters. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(17), 17346-17352.
- Aravamudan, B., Fergestad, T., Davis, W. S., Rodesch, C. K., & Broadie, K. (1999). Drosophila UNC-13 is essential for synaptic transmission. *Nature Neuroscience*, 2(11), 965-971.
- Ashery, U., Betz, A., Xu, T., Brose, N., & Rettig, J. (1999). An efficient method for infection of adrenal chromaffin cells using the semliki forest virus gene expression system. *European Journal of Cell Biology*, 78(8), 525-532.
- Ashery, U., Varoqueaux, F., Voets, T., Betz, A., Thakur, P., Koch, H., et al. (2000). Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells. *The EMBO Journal*, 19(14), 3586-3596.
- Augustin, I., Rosenmund, C., Südhof, T. C., & Brose, N. (1999). Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature*, 400(6743), 457-461.
- Avery, L., Bargmann, C. I., & Horvitz, H. R. (1993). The caenorhabditis elegans unc-31 gene affects multiple nervous system-controlled functions. *Genetics*, 134(2), 455-464.
- Barg, S., Knowles, M. K., Chen, X., Midorikawa, M., & Almers, W. (2010). Syntaxin clusters assemble reversibly at sites of secretory granules in live cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(48), 20804-20809.
- Barnstable, C. J., Hofstein, R., & Akagawa, K. (1985). A marker of early amacrine cell development in rat retina. *Brain Research*, 352(2), 286-290.

- Bar-On, D., Wolter, S., van de Linde, S., Heilemann, M., Nudelman, G., Nachliel, E., et al. (2012). Super-resolution imaging reveals the internal architecture of nano-sized syntaxin clusters. *The Journal of Biological Chemistry*,
- Basu, J., Shen, N., Dulubova, I., Lu, J., Guan, R., Guryev, O., et al. (2005). A minimal domain responsible for Munc13 activity. *Nature Structural & Molecular Biology*, *12*(11), 1017-1018.
- Becherer, U., & Rettig, J. (2006). Vesicle pools, docking, priming, and release. *Cell and Tissue Research*, *326*(2), 393-407.
- Bennett, M. K., Calakos, N., & Scheller, R. H. (1992). Syntaxin: A synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science (New York, N.Y.)*, *257*(5067), 255-259.
- Berwin, B., Floor, E., & Martin, T. F. (1998). CAPS (mammalian UNC-31) protein localizes to membranes involved in dense-core vesicle exocytosis. *Neuron*, *21*(1), 137-145.
- Betz, A., Okamoto, M., Benseler, F., & Brose, N. (1997). Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(4), 2520-2526.
- Bollmann, J. H., & Sakmann, B. (2005). Control of synaptic strength and timing by the release-site Ca<sup>2+</sup> signal. *Nature Neuroscience*, *8*(4), 426-434.
- Borisovska, M., Zhao, Y., Tsytsyura, Y., Glyvuk, N., Takamori, S., Matti, U., et al. (2005). V-SNAREs control exocytosis of vesicles from priming to fusion. *The EMBO Journal*, *24*(12), 2114-2126.
- Brenner, S. (1974). The genetics of caenorhabditis elegans. *Genetics*, *77*(1), 71-94.
- Broadie, K., Prokop, A., Bellen, H. J., O'Kane, C. J., Schulze, K. L., & Sweeney, S. T. (1995). Syntaxin and synaptobrevin function downstream of vesicle docking in drosophila. *Neuron*, *15*(3), 663-673.
- Brunk, I., Blex, C., Speidel, D., Brose, N., & Ahnert-Hilger, G. (2009). Ca<sup>2+</sup>-dependent activator proteins of secretion promote vesicular monoamine uptake. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(2), 1050-1056.
- Burgess, T. L., & Kelly, R. B. (1987). Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annual Review of Cell Biology*, *3*, 243-293.

- Burgoyne, R. D., & Morgan, A. (1998). Analysis of regulated exocytosis in adrenal chromaffin cells: Insights into NSF/SNAP/SNARE function. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 20(4), 328-335.
- Catterall, W. A. (1999). Interactions of presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels and snare proteins in neurotransmitter release. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 868, 144-159.
- Chen, X., Lu, J., Dulubova, I., & Rizo, J. (2008). NMR analysis of the closed conformation of syntaxin-1. *Journal of Biomolecular NMR*, 41(1), 43-54.
- Chen, Y. A., Scales, S. J., & Scheller, R. H. (2001). Sequential SNARE assembly underlies priming and triggering of exocytosis. *Neuron*, 30(1), 161-170.
- Condliffe, S. B., Zhang, H., & Frizzell, R. A. (2004). Syntaxin 1A regulates ENaC channel activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(11), 10085-10092.
- Daily, N. J., Boswell, K. L., James, D. J., & Martin, T. F. (2010). Novel interactions of CAPS (Ca<sup>2+</sup>-dependent activator protein for secretion) with the three neuronal SNARE proteins required for vesicle fusion. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(46), 35320-35329.
- Davies, J. N., Jarvis, S. E., & Zamponi, G. W. (2011). Bipartite syntaxin 1A interactions mediate CaV2.2 calcium channel regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411(3), 562-568.
- de Wit, H., Cornelisse, L. N., Toonen, R. F., & Verhage, M. (2006). Docking of secretory vesicles is syntaxin dependent. *PloS One*, 1, e126.
- de Wit, H., Walter, A. M., Milosevic, I., Gulyas-Kovacs, A., Riedel, D., Sorensen, J. B., et al. (2009). Synaptotagmin-1 docks secretory vesicles to syntaxin-1/SNAP-25 acceptor complexes. *Cell*, 138(5), 935-946.
- Dulubova, I., Sugita, S., Hill, S., Hosaka, M., Fernandez, I., Sudhof, T. C., et al. (1999). A conformational switch in syntaxin during exocytosis: Role of munc18. *The EMBO Journal*, 18(16), 4372-4382.
- Elhamdani, A., Azizi, F., & Artalejo, C. R. (2006). Double patch clamp reveals that transient fusion (kiss-and-run) is a major mechanism of secretion in calf adrenal chromaffin cells: High calcium shifts the

- mechanism from kiss-and-run to complete fusion. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(11), 3030-3036.
- Elhamdani, A., Martin, T. F., Kowalchuk, J. A., & Artalejo, C. R. (1999). Ca<sup>2+</sup>-dependent activator protein for secretion is critical for the fusion of dense-core vesicles with the membrane in calf adrenal chromaffin cells. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(17), 7375-7383.
- Ellis-Davies, G. C., & Kaplan, J. H. (1994). Nitrophenyl-EGTA, a photolabile chelator that selectively binds Ca<sup>2+</sup> with high affinity and releases it rapidly upon photolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(1), 187-191.
- Eran, A., Graham, K. R., Vatalaro, K., McCarthy, J., Collins, C., Peters, H., et al. (2009). Comment on "autistic-like phenotypes in Cadps2-knockout mice and aberrant CADPS2 splicing in autistic patients". *The Journal of Clinical Investigation*, 119(4), 679-80; author reply 680-1.
- Fasshauer, D., & Margittai, M. (2004). A transient N-terminal interaction of SNAP-25 and syntaxin nucleates SNARE assembly. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(9), 7613-7621.
- Fasshauer, D., Sutton, R. B., Brunger, A. T., & Jahn, R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), 15781-15786.
- Fioravante, D., & Regehr, W. G. (2011). Short-term forms of presynaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 21(2), 269-274.
- Gee, K. R., Archer, E. A., Lapham, L. A., Leonard, M. E., Zhou, Z. L., Bingham, J., et al. (2000). New ratiometric fluorescent calcium indicators with moderately attenuated binding affinities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 10(14), 1515-1518.
- Gerber, S. H., Rah, J. C., Min, S. W., Liu, X., de Wit, H., Dulubova, I., et al. (2008). Conformational switch of syntaxin-1 controls synaptic vesicle fusion. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5895), 1507-1510.

- Gladycheva, S. E., Lam, A. D., Liu, J., D'Andrea-Merrins, M., Yizhar, O., Lentz, S. I., et al. (2007). Receptor-mediated regulation of tomosyn-syntaxin 1A interactions in bovine adrenal chromaffin cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(31), 22887-22899.
- Graham, M. E., Washbourne, P., Wilson, M. C., & Burgoyne, R. D. (2001). SNAP-25 with mutations in the zero layer supports normal membrane fusion kinetics. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 24), 4397-4405.
- Grishanin, R. N., Klenchin, V. A., Loyet, K. M., Kowalchuk, J. A., Ann, K., & Martin, T. F. (2002). Membrane association domains in Ca<sup>2+</sup>-dependent activator protein for secretion mediate plasma membrane and dense-core vesicle binding required for Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(24), 22025-22034. doi:10.1074/jbc.M201614200
- Grishanin, R. N., Kowalchuk, J. A., Klenchin, V. A., Ann, K., Earles, C. A., Chapman, E. R., et al. (2004). CAPS acts at a prefusion step in dense-core vesicle exocytosis as a PIP<sub>2</sub> binding protein. *Neuron*, 43(4), 551-562.
- Gustafsson, M. G. (2000). Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of Microscopy*, 198(Pt 2), 82-87.
- Halemani, N. D., Bethani, I., Rizzoli, S. O., & Lang, T. (2010). Structure and dynamics of a two-helix SNARE complex in live cells. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 11(3), 394-404.
- Hammarlund, M., Palfreyman, M. T., Watanabe, S., Olsen, S., & Jorgensen, E. M. (2007). Open syntaxin docks synaptic vesicles. *PLoS Biology*, 5(8), e198.
- Hammarlund, M., Watanabe, S., Schuske, K., & Jorgensen, E. M. (2008). CAPS and syntaxin dock dense core vesicles to the plasma membrane in neurons. *The Journal of Cell Biology*, 180(3), 483-491.
- Hanson, P. I., Heuser, J. E., & Jahn, R. (1997). Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes. *Current Opinion in Neurobiology*, 7(3), 310-315.
- Hata, Y., Slaughter, C. A., & Sudhof, T. C. (1993). Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. *Nature*, 366(6453), 347-351.

- Hattori, K., Tanaka, H., Wakabayashi, C., Yamamoto, N., Uchiyama, H., Teraishi, T., et al. (2011). Expression of  $Ca^{2+}$ -dependent activator protein for secretion 2 is increased in the brains of schizophrenic patients. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 35(7), 1738-1743.
- Hattori, K., Tanaka, H., Yamamoto, N., Teraishi, T., Hori, H., Kinoshita, Y., et al. (2012). Blood CADPS2DeltaExon3 expression is associated with intelligence and memory in healthy adults. *Biological Psychology*, 89(1), 117-122.
- Hay, J. C., & Martin, T. F. (1992). Resolution of regulated secretion into sequential MgATP-dependent and calcium-dependent stages mediated by distinct cytosolic proteins. *The Journal of Cell Biology*, 119(1), 139-151.
- Heidelberger, R., Heinemann, C., Neher, E., & Matthews, G. (1994). Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. *Nature*, 371(6497), 513-515.
- Heinemann, C., Chow, R. H., Neher, E., & Zucker, R. S. (1994). Kinetics of the secretory response in bovine chromaffin cells following flash photolysis of caged  $Ca^{2+}$ . *Biophysical Journal*, 67(6), 2546-2557.
- Horrigan, F. T., & Bookman, R. J. (1994). Releasable pools and the kinetics of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Neuron*, 13(5), 1119-1129.
- Hunt, J. M., Bommert, K., Charlton, M. P., Kistner, A., Habermann, E., Augustine, G. J., et al. (1994). A post-docking role for synaptobrevin in synaptic vesicle fusion. *Neuron*, 12(6), 1269-1279.
- Hyrk, K. L., Bownik, J. M., & Goldberg, M. P. (2000). Ionic selectivity of low-affinity ratiometric calcium indicators: Mag-fura-2, fura-2FF and BTC. *Cell Calcium*, 27(2), 75-86.
- Jahn, R., Lang, T., & Sudhof, T. C. (2003). Membrane fusion. *Cell*, 112(4), 519-533.
- Jahn, R., & Scheller, R. H. (2006). SNAREs—engines for membrane fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(9), 631-643.

- James, D. J., Khodthong, C., Kowalchyk, J. A., & Martin, T. F. (2008). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates SNARE-dependent membrane fusion. *The Journal of Cell Biology*, *182*(2), 355-366. doi:10.1083/jcb.200801056
- James, D. J., Kowalchyk, J., Daily, N., Petrie, M., & Martin, T. F. (2009). CAPS drives trans-SNARE complex formation and membrane fusion through syntaxin interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(41), 17308-17313.
- Jarvis, S. E., & Zamponi, G. W. (2005). Masters or slaves? vesicle release machinery and the regulation of presynaptic calcium channels. *Cell Calcium*, *37*(5), 483-488.
- Jockusch, W. J., Speidel, D., Sigler, A., Sorensen, J. B., Varoqueaux, F., Rhee, J. S., et al. (2007). CAPS-1 and CAPS-2 are essential synaptic vesicle priming proteins. *Cell*, *131*(4), 796-808.
- Knowles, M. K., Barg, S., Wan, L., Midorikawa, M., Chen, X., & Almers, W. (2010). Single secretory granules of live cells recruit syntaxin-1 and synaptosomal associated protein 25 (SNAP-25) in large copy numbers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(48), 20810-20815.
- Koch, H., Hofmann, K., & Brose, N. (2000). Definition of Munc13-homology-domains and characterization of a novel ubiquitously expressed Munc13 isoform. *The Biochemical Journal*, *349*(Pt 1), 247-253.
- Lang, T., Bruns, D., Wenzel, D., Riedel, D., Holroyd, P., Thiele, C., et al. (2001). SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *The EMBO Journal*, *20*(9), 2202-2213.
- Lemmon, M. A. (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nature Reviews.Molecular Cell Biology*, *9*(2), 99-111.
- Lemos, C., Pereira-Monteiro, J., Mendonca, D., Ramos, E. M., Barros, J., Sequeiros, J., et al. (2010). Evidence of syntaxin 1A involvement in migraine susceptibility: A portuguese study. *Archives of Neurology*, *67*(4), 422-427.
- Lerman, J. C., Robblee, J., Fairman, R., & Hughson, F. M. (2000). Structural analysis of the neuronal SNARE protein syntaxin-1A. *Biochemistry*, *39*(29), 8470-8479.

- Leung, Y. M., Kang, Y., Xia, F., Sheu, L., Gao, X., Xie, H., et al. (2005). Open form of syntaxin-1A is a more potent inhibitor than wild-type syntaxin-1A of Kv2.1 channels. *The Biochemical Journal*, 387(Pt 1), 195-202.
- Leung, Y. M., Kwan, E. P., Ng, B., Kang, Y., & Gaisano, H. Y. (2007). SNAREing voltage-gated K<sup>+</sup> and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels: Tuning beta-cell excitability with syntaxin-1A and other exocytotic proteins. *Endocrine Reviews*, 28(6), 653-663.
- Liu, Y., Schirra, C., Edelmann, L., Matti, U., Rhee, J., Hof, D., et al. (2010). Two distinct secretory vesicle-priming steps in adrenal chromaffin cells. *The Journal of Cell Biology*, 190(6), 1067-1077.
- Liu, Y., Schirra, C., Stevens, D. R., Matti, U., Speidel, D., Hof, D., et al. (2008). CAPS facilitates filling of the rapidly releasable pool of large dense-core vesicles. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(21), 5594-5601.
- Loyet, K. M., Kowalchyk, J. A., Chaudhary, A., Chen, J., Prestwich, G. D., & Martin, T. F. (1998). Specific binding of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate to calcium-dependent activator protein for secretion (CAPS), a potential phosphoinositide effector protein for regulated exocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(14), 8337-8343.
- Madison, J. M., Nurrish, S., & Kaplan, J. M. (2005). UNC-13 interaction with syntaxin is required for synaptic transmission. *Current Biology : CB*, 15(24), 2236-2242. doi:10.1016/j.cub.2005.10.049
- Margittai, M., Widengren, J., Schweinberger, E., Schroder, G. F., Felekyan, S., Haustein, E., et al. (2003). Single-molecule fluorescence resonance energy transfer reveals a dynamic equilibrium between closed and open conformations of syntaxin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), 15516-15521.
- Martin-Moutot, N., Charvin, N., Leveque, C., Sato, K., Nishiki, T., Kozaki, S., et al. (1996). Interaction of SNARE complexes with P/Q-type calcium channels in rat cerebellar synaptosomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(12), 6567-6570.
- Mellander, L. J., Trouillon, R., Svensson, M. I., & Ewing, A. G. (2012). Amperometric post spike feet reveal most exocytosis is via extended kiss-and-run fusion. *Scientific Reports*, 2, 907.

- Milosevic, I., Sorensen, J. B., Lang, T., Krauss, M., Nagy, G., Haucke, V., et al. (2005). Plasmalemmal phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate level regulates the releasable vesicle pool size in chromaffin cells. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(10), 2557-2565.
- Misura, K. M., Scheller, R. H., & Weis, W. I. (2000). Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. *Nature*, 404(6776), 355-362.
- Mohrmann, R., de Wit, H., Verhage, M., Neher, E., & Sorensen, J. B. (2010). Fast vesicle fusion in living cells requires at least three SNARE complexes. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6003), 502-505.
- Mohrmann, R., & Sorensen, J. B. (2012). SNARE requirements en route to exocytosis: From many to few. *Journal of Molecular Neuroscience : MN*,
- Moser, T., & Neher, E. (1997). Rapid exocytosis in single chromaffin cells recorded from mouse adrenal slices. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(7), 2314-2323.
- Murray, D. H., & Tamm, L. K. (2009). Clustering of syntaxin-1A in model membranes is modulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and cholesterol. *Biochemistry*, 48(21), 4617-4625.
- Murray, D. H., & Tamm, L. K. (2011). Molecular mechanism of cholesterol- and polyphosphoinositide-mediated syntaxin clustering. *Biochemistry*, 50(42), 9014-9022.
- Neher, E. (1998). Vesicle pools and Ca<sup>2+</sup> microdomains: New tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron*, 20(3), 389-399.
- Neher, E., & Marty, A. (1982). Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(21), 6712-6716.
- Nishizaki, T., Walent, J. H., Kowalchyk, J. A., & Martin, T. F. (1992). A key role for a 145-kDa cytosolic protein in the stimulation of Ca<sup>2+</sup>-dependent secretion by protein kinase C. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(33), 23972-23981.

- Nofal, S., Becherer, U., Hof, D., Matti, U., & Rettig, J. (2007). Primed vesicles can be distinguished from docked vesicles by analyzing their mobility. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(6), 1386-1395.
- Nojiri, M., Loyet, K. M., Klenchin, V. A., Kabachinski, G., & Martin, T. F. (2009). CAPS activity in priming vesicle exocytosis requires CK2 phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(28), 18707-18714.
- Parsons, T. D., Coorssen, J. R., Horstmann, H., & Almers, W. (1995). Docked granules, the exocytic burst, and the need for ATP hydrolysis in endocrine cells. *Neuron*, 15(5), 1085-1096.
- Plattner, H., Artalejo, A. R., & Neher, E. (1997). Ultrastructural organization of bovine chromaffin cell cortex-analysis by cryofixation and morphometry of aspects pertinent to exocytosis. *The Journal of Cell Biology*, 139(7), 1709-1717.
- Pobbati, A. V., Stein, A., & Fasshauer, D. (2006). N- to C-terminal SNARE complex assembly promotes rapid membrane fusion. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5787), 673-676.
- Qu, L., Akbergenova, Y., Hu, Y., & Schikorski, T. (2009). Synapse-to-synapse variation in mean synaptic vesicle size and its relationship with synaptic morphology and function. *The Journal of Comparative Neurology*, 514(4), 343-352.
- Renden, R., Berwin, B., Davis, W., Ann, K., Chin, C. T., Kreber, R., et al. (2001). Drosophila CAPS is an essential gene that regulates dense-core vesicle release and synaptic vesicle fusion. *Neuron*, 31(3), 421-437.
- Rettig, J., & Neher, E. (2002). Emerging roles of presynaptic proteins in ca<sup>++</sup>-triggered exocytosis. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5594), 781-785.
- Rhee, J. S., Betz, A., Pyott, S., Reim, K., Varoqueaux, F., Augustin, I., et al. (2002). Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs. *Cell*, 108(1), 121-133.
- Richmond, J. E., Davis, W. S., & Jorgensen, E. M. (1999). UNC-13 is required for synaptic vesicle fusion in *C. elegans*. *Nature Neuroscience*, 2(11), 959-964.

- Richmond, J. E., Weimer, R. M., & Jorgensen, E. M. (2001). An open form of syntaxin bypasses the requirement for UNC-13 in vesicle priming. *Nature*, *412*(6844), 338-341.
- Rickman, C., Medine, C. N., Dun, A. R., Moulton, D. J., Mandula, O., Halemani, N. D., et al. (2010). T-SNARE protein conformations patterned by the lipid microenvironment. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(18), 13535-13541.
- Rickman, C., Meunier, F. A., Binz, T., & Davletov, B. (2004). High affinity interaction of syntaxin and SNAP-25 on the plasma membrane is abolished by botulinum toxin E. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(1), 644-651.
- Rizo, J., & Rosenmund, C. (2008). Synaptic vesicle fusion. *Nature Structural & Molecular Biology*, *15*(7), 665-674.
- Rizo, J., & Sudhof, T. C. (1998). C2-domains, structure and function of a universal Ca<sup>2+</sup>-binding domain. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(26), 15879-15882.
- Ryan, T. A. (2003). Kiss-and-run, fuse-pinch-and-linger, fuse-and-collapse: The life and times of a neurosecretory granule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(5), 2171-2173.
- Sadakata, T., & Furuichi, T. (2010). Ca<sup>2+</sup>-dependent activator protein for secretion 2 and autistic-like phenotypes. *Neuroscience Research*, *67*(3), 197-202.
- Sadakata, T., Itakura, M., Kozaki, S., Sekine, Y., Takahashi, M., & Furuichi, T. (2006). Differential distributions of the Ca<sup>2+</sup>-dependent activator protein for secretion family proteins (CAPS2 and CAPS1) in the mouse brain. *The Journal of Comparative Neurology*, *495*(6), 735-753.
- Sadakata, T., Mizoguchi, A., Sato, Y., Katoh-Semba, R., Fukuda, M., Mikoshiba, K., et al. (2004). The secretory granule-associated protein CAPS2 regulates neurotrophin release and cell survival. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *24*(1), 43-52.
- Sadakata, T., Washida, M., & Furuichi, T. (2007). Alternative splicing variations in mouse CAPS2: Differential expression and functional properties of splicing variants. *BMC Neuroscience*, *8*, 25. doi:10.1186/1471-2202-8-25

- Sadakata, T., Washida, M., Iwayama, Y., Shoji, S., Sato, Y., Ohkura, T., et al. (2007). Autistic-like phenotypes in *Cadps2*-knockout mice and aberrant *CADPS2* splicing in autistic patients. *The Journal of Clinical Investigation*, *117*(4), 931-943. doi:10.1172/JCI29031
- Schikorski, T., & Stevens, C. F. (2001). Morphological correlates of functionally defined synaptic vesicle populations. *Nature Neuroscience*, *4*(4), 391-395.
- Schmidt, T., Schirra, C., Matti, U., Stevens, D. R., & Rettig, J. (2013). Snapin accelerates exocytosis at low intracellular calcium concentration in mouse chromaffin cells. *Cell Calcium*, *54*(2), 105-110.
- Sheng, Z. H., Rettig, J., Cook, T., & Catterall, W. A. (1996). Calcium-dependent interaction of N-type calcium channels with the synaptic core complex. *Nature*, *379*(6564), 451-454.
- Sieber, J. J., Willig, K. I., Heintzmann, R., Hell, S. W., & Lang, T. (2006). The SNARE motif is essential for the formation of syntaxin clusters in the plasma membrane. *Biophysical Journal*, *90*(8), 2843-2851.
- Sieber, J. J., Willig, K. I., Kutzner, C., Gerding-Reimers, C., Harke, B., Donnert, G., et al. (2007). Anatomy and dynamics of a supramolecular membrane protein cluster. *Science (New York, N.Y.)*, *317*(5841), 1072-1076.
- Smith, C., Moser, T., Xu, T., & Neher, E. (1998). Cytosolic Ca<sup>2+</sup> acts by two separate pathways to modulate the supply of release-competent vesicles in chromaffin cells. *Neuron*, *20*(6), 1243-1253.
- Sollner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H., & Rothman, J. E. (1993). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*, *75*(3), 409-418.
- Sollner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., et al. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*, *362*(6418), 318-324.
- Sorensen, J. B. (2004). Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, *448*(4), 347-362. doi:10.1007/s00424-004-1247-8

- Sorensen, J. B., Matti, U., Wei, S. H., Nehring, R. B., Voets, T., Ashery, U., et al. (2002). The SNARE protein SNAP-25 is linked to fast calcium triggering of exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(3), 1627-1632.
- Sorensen, J. B., Nagy, G., Varoqueaux, F., Nehring, R. B., Brose, N., Wilson, M. C., et al. (2003). Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23. *Cell*, 114(1), 75-86.
- Speese, S., Petrie, M., Schuske, K., Ailion, M., Ann, K., Iwasaki, K., et al. (2007). UNC-31 (CAPS) is required for dense-core vesicle but not synaptic vesicle exocytosis in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(23), 6150-6162.
- Speidel, D., Bruederle, C. E., Enk, C., Voets, T., Varoqueaux, F., Reim, K., et al. (2005). CAPS1 regulates catecholamine loading of large dense-core vesicles. *Neuron*, 46(1), 75-88.
- Speidel, D., Varoqueaux, F., Enk, C., Nojiri, M., Grishanin, R. N., Martin, T. F., et al. (2003). A family of Ca<sup>2+</sup>-dependent activator proteins for secretion: Comparative analysis of structure, expression, localization, and function. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(52), 52802-52809. doi:10.1074/jbc.M304727200
- Stein, A., Weber, G., Wahl, M. C., & Jahn, R. (2009). Helical extension of the neuronal SNARE complex into the membrane. *Nature*, 460(7254), 525-528.
- Stevens, D. R., & Rettig, J. (2009). The Ca<sup>2+</sup>-dependent activator protein for secretion CAPS: Do I dock or do I prime? *Molecular Neurobiology*, 39(1), 62-72.
- Stevens, D. R., Schirra, C., Becherer, U., & Rettig, J. (2011). Vesicle pools: Lessons from adrenal chromaffin cells. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 3, 2.
- Stevens, D. R., Wu, Z. X., Matti, U., Junge, H. J., Schirra, C., Becherer, U., et al. (2005). Identification of the minimal protein domain required for priming activity of Munc13-1. *Current Biology : CB*, 15(24), 2243-2248.
- Steyer, J. A., Horstmann, H., & Almers, W. (1997). Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Nature*, 388(6641), 474-478.

- Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R., & Brunger, A. T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*, 395(6700), 347-353.
- Tandon, A., Bannykh, S., Kowalchuk, J. A., Banerjee, A., Martin, T. F., & Balch, W. E. (1998). Differential regulation of exocytosis by calcium and CAPS in semi-intact synaptosomes. *Neuron*, 21(1), 147-154.
- Teng, F. Y., Wang, Y., & Tang, B. L. (2001). The syntaxins. *Genome Biology*, 2(11), REVIEWS3012.
- Toonen, R. F., de Vries, K. J., Zalm, R., Sudhof, T. C., & Verhage, M. (2005). Munc18-1 stabilizes syntaxin 1, but is not essential for syntaxin 1 targeting and SNARE complex formation. *Journal of Neurochemistry*, 93(6), 1393-1400.
- Toonen, R. F., Kochubey, O., de Wit, H., Gulyas-Kovacs, A., Konijnenburg, B., Sorensen, J. B., et al. (2006). Dissecting docking and tethering of secretory vesicles at the target membrane. *The EMBO Journal*, 25(16), 3725-3737. doi:10.1038/sj.emboj.7601256
- Toonen, R. F., & Verhage, M. (2007). Munc18-1 in secretion: Lonely munc joins SNARE team and takes control. *Trends in Neurosciences*, 30(11), 564-572. doi:10.1016/j.tins.2007.08.008
- Tropeano, M., Wober-Bingol, C., Karwautz, A., Wagner, G., Vassos, E., Campos-de-Sousa, S., et al. (2012). Association analysis of STX1A gene variants in common forms of migraine. *Cephalalgia : An International Journal of Headache*, 32(3), 203-212.
- van Kempen, G. T., vanderLeest, H. T., van den Berg, R. J., Eilers, P., & Westerink, R. H. (2011). Three distinct modes of exocytosis revealed by amperometry in neuroendocrine cells. *Biophysical Journal*, 100(4), 968-977.
- van Weering, J. R., Toonen, R. F., & Verhage, M. (2007). The role of Rab3a in secretory vesicle docking requires association/dissociation of guanidine phosphates and Munc18-1. *PLoS ONE*, 2(7), e616. doi:10.1371/journal.pone.0000616
- Veit, M., Sollner, T. H., & Rothman, J. E. (1996). Multiple palmitoylation of synaptotagmin and the t-SNARE SNAP-25. *FEBS Letters*, 385(1-2), 119-123.

- Voets, T. (2000). Dissection of three Ca<sup>2+</sup>-dependent steps leading to secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron*, 28(2), 537-545.
- Voets, T., Neher, E., & Moser, T. (1999). Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron*, 23(3), 607-615.
- Voets, T., Toonen, R. F., Brian, E. C., de Wit, H., Moser, T., Rettig, J., et al. (2001). Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking. *Neuron*, 31(4), 581-591.
- von Ruden, L., & Neher, E. (1993). A Ca<sup>2+</sup>-dependent early step in the release of catecholamines from adrenal chromaffin cells. *Science (New York, N.Y.)*, 262(5136), 1061-1065.
- Walent, J. H., Porter, B. W., & Martin, T. F. (1992). A novel 145 kd brain cytosolic protein reconstitutes Ca<sup>2+</sup>-regulated secretion in permeable neuroendocrine cells. *Cell*, 70(5), 765-775.
- Walter, A. M., Wiederhold, K., Bruns, D., Fasshauer, D., & Sorensen, J. B. (2010). Synaptobrevin N-terminally bound to syntaxin-SNAP-25 defines the primed vesicle state in regulated exocytosis. *The Journal of Cell Biology*, 188(3), 401-413.
- Wang, Y., Okamoto, M., Schmitz, F., Hofmann, K., & Sudhof, T. C. (1997). Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature*, 388(6642), 593-598.
- Weber, T., Zemelman, B. V., McNew, J. A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., et al. (1998). SNAREpins: Minimal machinery for membrane fusion. *Cell*, 92(6), 759-772.
- Wu, M. M., Llobet, A., & Lagnado, L. (2009). Loose coupling between calcium channels and sites of exocytosis in chromaffin cells. *The Journal of Physiology*, 587(Pt 22), 5377-5391.
- Yang, Y., Udayasankar, S., Dunning, J., Chen, P., & Gillis, K. D. (2002). A highly Ca<sup>2+</sup>-sensitive pool of vesicles is regulated by protein kinase C in adrenal chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26), 17060-17065.
- Zanin, M. P., Phillips, L., Mackenzie, K. D., & Keating, D. J. (2011). Aging differentially affects multiple aspects of vesicle fusion kinetics. *PLoS One*, 6(11), e27820.

- Zenisek, D., Davila, V., Wan, L., & Almers, W. (2003). Imaging calcium entry sites and ribbon structures in two presynaptic cells. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(7), 2538-2548.
- Zhai, R. G., & Bellen, H. J. (2004). The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 19, 262-270.
- Zilly, F. E., Halemani, N. D., Walrafen, D., Spitta, L., Schreiber, A., Jahn, R., et al. (2011). Ca<sup>2+</sup> induces clustering of membrane proteins in the plasma membrane via electrostatic interactions. *The EMBO Journal*, 30(7), 1209-1220.
- Zucker, R. S., & Regehr, W. G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annual Review of Physiology*, 64, 355-405.

## **Danksagung**

An Prof. Dr. Jens Rettig, Dr. David Stevens und Dr. Claudia Schirra für ihre Unterstützung auf allen Ebenen.