

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

Charakterisierung des HCSP: Die Rolle von Snapin und Complexin II in der hoch-calcium- sensitiven Exozytose

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2010

vorgelegt von Tobias Schmidt
geboren am 22.04.1983 in Bottrop

1. Tag der Promotion:
2. Dekan: Prof. Dr. med. Menger
3. Berichterstatter:

Anschrift: Institut für Physiologie
Kirrbergerstraße, Geb. 59
Universitätsklinikum des Saarlandes
66421 Homburg/Saar

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS **VI**

1.1 ZUSAMMENFASSUNG **IX**

1.2 SUMMARY **XI**

2. EINLEITUNG **13**

2.1 NEUROSEKRETION: VOM VESIKEL ZUR BOTSCHAFT 13

2.2 VESIKEL-POOLS: VOM VESIKEL ZUR AUSSCHÜTTUNG 14

2.2.1 DER DEPOT POOL: DP 16

2.2.2 DER UNPRIMED POOL: UPP 16

2.2.3 DER SLOWLY RELEASABLE POOL UND READILY RELEASABLE POOL: SRP UND RRP 17

2.2.4 DER IMMEDIATELY RELEASABLE POOL: IRP 17

2.2.5 DER HIGHLY CALCIUM-SENSITIVE POOL: HCSP 18

2.3 PROTEINE 18

2.3.1 DER SNARE-KOMPLEX: GRUNDLAGEN FÜR DIE FUSION 19

2.3.2 SYNAPTOTAGMIN: DER CALCIUM-SENSOR 21

2.3.3 SNAPIN 22

2.3.4 COMPLEXIN II 23

2.4 ZIEL DER ARBEIT 24

3. MATERIAL UND METHODEN **26**

3.1 MATERIALIEN 26

3.1.1 REAGENTIEN 26

3.1.2 ENZYME 27

3.1.3 LÖSUNGEN UND MEDIEN 28

3.1.3.1 LÖSUNGEN UND MEDIEN FÜR DIE ZELLKULTUR 28

3.1.3.2 LÖSUNGEN UND MEDIEN FÜR DIE VIRUSGENERIERUNG UND -AKTIVIERUNG	29
3.1.3.3 LÖSUNGEN FÜR „WHOLE-CELL“ PATCH-CLAMP EXPERIMENTE	31
3.1.4 VIREN.....	31
3.1.5 MÄUSE	32
3.1.6 PATCH-CLAMP SET-UP.....	32
3.2 METHODEN	33
3.2.1 CHROMAFFINZELLPRÄPARATION UND ZELLKULTUR.....	33
3.2.2 VIRUSGENERIERUNG, -AKTIVIERUNG UND -INFEKTION.....	33
3.2.2.1 VIRUSGENERIERUNG	34
3.2.2.2 VIRUSAKTIVIERUNG	38
3.2.2.3 VIRUSINFEKTION	38
3.2.3 ELEKTROPHYSIOLOGIE.....	39
3.2.3.1 <i>PATCH-CLAMP</i> -TECHNIK UND KAPAZITÄTSMESSUNG	39
3.2.3.2 AMPEROMETRIE	43
3.2.3.3 PHOTOLYSE VON NITROPHENYL-EGTA	44
3.2.3.4 $[Ca^{2+}]_i$ -MESSUNG UND -KALIBRATION	44
3.2.3.5 DATENANALYSE	46
4. ERGEBNISSE	47
4.1 EFFEKTE VON SNAPIN AUF DEN HCSP	47
4.1.1 SNAPIN IN DEPOLARISATIONSEXPERIMENTEN	47
4.1.2 VERGRÖßERUNG DES HCSP DURCH SNAPIN	49
4.1.3 VOLLE FUNKTIONALITÄT VON SNAPIN ERFORDERT PHOSPHORYLIERUNG	51
4.1.4 SELEKTIVE VERGRÖßERUNG DES HCSP DURCH SNAPIN.....	53
4.2 EFFEKTE VON COMPLEXIN II AUF DEN HCSP	56
4.3 SEKRETIONSDYNAMIK BEI DOUBLE-FLASH-EXPERIMENTEN	58
5. DISKUSSION	59
5.1 FREISETZUNGSVERHALTEN DES HCSP	59
5.1.1 HCSP IN DEPOLARISATIONSEXPERIMENTEN	59
5.1.2 HCSP IN FLASH-EXPERIMENTEN.....	60

5.2 VERÄNDERTE ZEITKONSTANTEN IM ZWEITEN FLASH.....	61
5.3 EXKLUSIVER EFFEKT VON SNAPIN AUF DEN HCSP	62
5.4 KORRELATION VON KAPAZITÄTSMESSUNG UND AMPEROMETRIE.....	63
5.5 AUSBLICK	64

<u>6. LITERATURVERZEICHNIS</u>	65
---------------------------------------	-----------

<u>PUBLIKATIONEN</u>	73
-----------------------------	-----------

<u>DANKSAGUNG</u>	74
--------------------------	-----------

<u>LEBENS LAUF</u>	76
---------------------------	-----------

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
BoNT	Botulinum Neurotoxin
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Coulomb
C _x	Kapazität
[Ca ²⁺] _i	Intrazelluläre Calciumkonzentration
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
DC	Gleichstrom
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (deutsch: DNS)
DP	<i>Depot Pool</i>
DPTA	1,3-diamino-2-hydroxypropane-N,N,N',N'-tetraacetic Acid
EDTA	<i>Ethylendiaminetetraacetate</i>
eGFP	<i>enhanced GFP</i>
EGTA	<i>Ethylenbis-(oxyethylennitrilo)-tetraacetic Acid</i>
et al.	<i>et alteres</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
fF	Femtofarad
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HCSP	<i>Highly Calcium-Sensitive Pool</i>
HEPES	<i>2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazine)-ethanesulfonic Acid</i>
Hz	Hertz
I	Stromstärke
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
IRP	<i>Immediately Releasable Pool</i>
kDa	Kilodalton

KO	<i>Knock Out</i>
LDCV	<i>Large Dense Core Vesicle</i>
MOPS	<i>4-Morpholinepropanesulfonic Acid</i>
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
mM	Millimolar
mOsm	Milliosmol
mRNA	messenger RNA
µs	Mikrosekunde
mV	Millivolt
n	Anzahl der Zellen
N	Anzahl der Mäuse
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NP-EGTA	Nitrophenyl-EGTA
NSF	<i>N-ethylmaleimide-sensitive Factor</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pF	Picofarad
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
R	Widerstand
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (deutsch: RNS)
RRP	<i>Readily Releasable Pool</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
SCV	<i>Small Clear Vesicle</i>
SD	<i>Standard Deviation</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
SFV	Semliki-Forest-Virus
SM	Sec1/Munc18 Familie
SNAP-25	<i>Synaptosome Associated Proteine of 25 kDa</i>
SNAP	<i>Soluble NSF Attachment Proteine</i>
SNARE	<i>SNAP Receptor</i>
SRP	<i>Slowly Releasable Pool</i>

SV	<i>Synaptic Vesicle</i>
Tab.	Tabelle
TeNT	Tetanus Neurotoxin
TIRFM	<i>Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy</i>
UPP	<i>Unprimed Pool</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
V _x	Spannung

1.1 Zusammenfassung

Exozytische Vorgänge bilden die Grundlage vieler Prozesse im Metabolismus und besonders in der Informationsverarbeitung und -weiterleitung sowohl von eukaryonten als auch von prokaryonten Zellen. Exozytose von Neurotransmittern und vielen anderen Hormonen stellt eine besonders regulierte und sehr schnelle Form der Exozytose dar. Die Möglichkeit, bestimmte Mengen von Botenstoffen schnell freizusetzen, hängt von der Fähigkeit ab *Pools* mit sofort freisetzbaren Vesikeln zu etablieren. Dies erfordert, dass die Vesikel zwar in einem freisetzbaren Status sind, aber nicht zwangsläufig freigesetzt werden. Ihre Ausschüttung muss getriggert werden. Neurone und neuroendokrine Zellen bilden zwei freisetzbare Vesikel-Pools, den *Readily Releasable Pool* (RRP) und den *Slowly Releasable Pool* (SRP). Der *Readily Releasable Pool* enthält Vesikel, die bei einem physiologischen Stimulus rasch ausgeschüttet werden, während der *Slowly Releasable Pool* als Reserve-Pool dient, aus dem der RRP aufgefüllt wird.

Die molekulare Basis der funktionell unterschiedlichen *Pools* ist bis jetzt nicht bekannt. Während der Generierung von freisetzbaren Vesikeln in Chromaffinzellen der Maus habe ich die Rolle von Snapin untersucht, ein Protein, welches mit dem SNARE-Komplex assoziiert ist und die schnelle Sekretion verstärkt.

Bei der Auslösung von Sekretion durch eine Serie von Depolarisationen konnte ich keinen Effekt durch Snapin feststellen. Dieses Ergebnis legt nahe, dass der RRP nicht das Ziel von Snapin ist. So kam die Frage auf, ob Snapin unter Umständen den *Highly Calcium-Sensitive Pool*, einen *Subpool* des RRP, beeinflusst. Dieser *Highly Calcium-Sensitive Pool* (HCSP) wird nicht durch Depolarisationen freigesetzt und wurde in den Standard-*Flash*-Experimenten, bei denen intrazelluläre Calciumkonzentrationen von 20 μM erreicht werden, lange Zeit übersehen. Trotz einer veränderten Aufmerksamkeit bezüglich des HCSP sind die Eigenschaften dieses *Pools* und die molekularen Grundlagen der erhöhten Calciumsensitivität bis jetzt weitestgehend unverstanden.

Bei der Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in einen niedrigen mikromolaren Bereich durch die Freisetzung von gebundenem Calcium konnte ich selektiv den HCSP aktivieren. Unter diesen Bedingungen vergrößerte die Überexpression von Snapin den freigesetzten *Pool*, ohne die Zeitkonstanten zu verändern. Somit verstärkte Snapin den HCSP, wenn dieser gesondert stimuliert wurde. Um herauszu-

finden, ob Snapin die gesamte Sekretion beeinflusst, verwendete ich ein *Double-Flash*-Protokoll, durch das ich die verbliebenen Vesikel mit normaler Calciumsensitivität zusätzlich freisetzen konnte. Es gab eine große Sekretionsantwort auf den zweiten Flash, eine Sekunde nach der Sekretion des HCSP, mit zwei langsameren Zeitkonstanten. Diese Pools wurden nicht von Snapin vergrößert.

Complexin, ein mit dem SNARE-Komplex assoziiertes Protein, verstärkt ebenfalls die schnelle Sekretion in Chromaffinzellen der Maus. Ich verwendete wiederum das *Double-Flash*-Protokoll, um einen möglichen Effekt von Complexin auf den HCSP nachzuweisen. Im Gegensatz zu Snapin verstärkte Complexin die gesamte Sekretion ohne eine Selektivität für den HCSP zu besitzen.

Meine Ergebnisse zeigen, dass Snapin einen exklusiven Effekt auf den HCSP besitzt und diesen, ohne einen signifikanten Einfluss auf die anderen *Pools* zu haben, selektiv vergrößert. Weiterführende Experimente mit einer phosphomimetischen bzw. nicht phosphorylierbaren Snapinmutante führten zu der Schlussfolgerung, dass Snapin nur im phosphorylierten Zustand voll funktionsfähig ist und die beschriebenen Effekte auf die schnelle Phase der Sekretion besitzt. Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass Calciumdomänen in den verschiedenen Phasen der Sekretion eine wesentliche Rolle spielen und der HCSP einen *Pool* mit einer hohen intrinsischen Calciumsensitivität darstellt. Weiterhin ist Snapin mit diesem *Pool* assoziiert und könnte somit für die erhöhte Calciumsensitivität verantwortlich sein.

Durch die Kombination von Kapazitätsmessungen und dem direkten Nachweis der ausgeschütteten Transmitter mittels Amperometrie konnte gezeigt werden, dass der Großteil der freigesetzten Transmitter dem HCSP zuzuordnen ist. Diese Feststellung lässt auf eine bedeutendere Rolle des HCSP bei der Exozytose schließen, als bis jetzt angenommen wird.

Insgesamt weisen die Ergebnisse darauf hin, dass Snapin direkt für die Etablierung des HCSP benötigt wird. Dieser Pool wird durch calciumabhängige Proteinkinasen aktiviert und spielt so eine Rolle in der Antwort auf einen Stressreiz. Complexin hingegen besitzt keinen selektiven Effekt auf den HCSP, sondern verstärkt die Gesamtheit der direkt freisetzbaren *Pools* und unterstützt somit die Katecholaminfreisetzung als Antwort auf einen normalen Reiz wie auch die Reaktion auf einen Stressreiz.

1.2 Summary

Characterization of the HCSP: The Role of Snapin and Complexin II in Highly Calcium-Sensitive Exocytosis

Exocytosis is the basis for many processes in metabolism and especially in signal processing and transduction in eucaryotic as well as in procaryotic cells. The exocytosis of neurotransmitters and many hormones is a specialized form of exocytosis which is highly regulated and occurs very rapidly. The ability to release controlled amounts of messenger molecules rapidly depends on the ability to establish pools of release-ready vesicles. This requires that vesicles become release-ready but are not constitutively released. Their release must be triggered. Neurons and neuroendocrine cells establish two pools of releasable vesicles, a readily releasable pool (RRP), and a slowly releasable pool (SRP). The readily releasable pool consists of vesicles which can be rapidly released under physiological stimulation, while the slowly releasable pool is a reserve pool used to refill the RRP.

The molecular basis of functional pools of vesicles is not known. I have examined the role of snapin, a protein which associates with the SNARE complex and enhances rapid secretion, in the generation of releasable pools in mouse chromaffin cells.

When secretion was stimulated using a series of depolarizations, I observed no effect on secretion. These results indicate that the RRP is not the target of snapin. So the question raised whether snapin might influence the highly calcium-sensitive pool, a subset of the RRP. This highly calcium-sensitive pool (HCSP) is not activated by depolarization and was overlooked for a long time because the intracellular calcium concentration reaches around 20 μM in standard flash experiments. Despite increased attention to the HCSP, the properties of this pool as well as the molecular basis of its increased calcium-sensitivity are not well understood.

Using an elevation of the intracellular calcium concentration to low micromolar levels, produced by the uncaging of caged calcium, I was able to selectively activate the highly calcium-sensitive pool of vesicles. Under these conditions, overexpression of snapin increased the releasable pool without altering the rates of release. Thus snapin enhances release under conditions favoring the HCSP. To test whether snapin altered release in general, I used a double flash protocol to activate the re-

maintaining secretion with normal calcium-sensitivity. Response to a second flash, a second after activation of the HCSP secretion, caused a strong burst of secretion with two slower release rates. These pools were not enhanced by snapin.

Complexin, a SNARE complex associated protein, enhances the rapid secretion in mouse chromaffin cells as well. I examined whether complexin might also work selectively on the HCSP, again using a double flash activation of secretion. Complexin enhanced overall secretion but showed no selectivity for the HCSP.

My results show that Snapin has a highly selective effect on the HCSP without any significant influence on other pools. Experiments with a phosphomimetic and a non-phosphorylatable snapin-mutant corroborated the conclusion that Snapin functions in the phosphorylated state and showed that it is phosphorylated snapin which preferentially enhances the rapid phase of catecholamine secretion. These results are consistent with the proposed role of calcium domains in different phases of secretion, and support the proposal that the HCSP is indeed a pool with an intrinsic high calcium sensitivity. They also indicate that snapin is associated with this pool of vesicles and may therefore be responsible for the observed increased calcium sensitivity.

By combining capacitance measurements with the direct detection of catecholamine by amperometry it appears that a larger portion of catecholamine release is associated with the highly calcium sensitive pool than was expected. This may indicate a more important role of the HCSP in exocytosis than is currently appreciated.

These results indicate that snapin is directly responsible for the establishment of the highly calcium-sensitive pool. This pool is activated under condition of increased activity when calcium dependent protein kinases are active and thus regulates the stress response. In contrast, complexin had no selective effect on the HCSP and supported the entire releasable pools, which support physiological responses to normal as well as stress related catecholamine release.

2. Einleitung

2.1 Neurosekretion: Vom Vesikel zur Botschaft

Die Ausschüttung von Botenstoffen (Transmittern) spielt eine herausragende Rolle in der körpereigenen Kommunikation. Ohne diesen Prozess wäre die komplexe Informationsverarbeitung und -weiterleitung des zentralen Nervensystems (ZNS) ebenso wenig möglich wie die einfachere Informationsweitergabe durch ein Hormon.

Die Sekretion von Transmittern in den synaptischen Spalt, als chemische Komponente der Reizweiterleitung, wird auf zellulärer Ebene durch die Fusion von transmitterhaltigen Vesikeln mit der synaptischen Membran vermittelt. Durch ein Aktionspotential depolarisiert die Membran, spannungsabhängige Calciumkanäle öffnen und erhöhen innerhalb von Millisekunden die intrazelluläre Calciumkonzentration. Die erhöhte Calciumkonzentration führt schließlich zur Ausschüttung der Transmitter. Dieser Prozess ist von ubiquitärer Bedeutung, da er neben der beschriebenen Reizweiterleitung im Nervensystem, in nahezu jedem Bereich des Stoffwechsels zu finden ist. Eine Ausschüttung von Peptid-Hormonen wie Insulin und Katecholaminen oder generell exo- und endozytotische Vorgänge wären ohne die Fusion von Vesikeln mit einer Membran nicht möglich (Sudhof, 2004). Grundlage dieser Fusion ist eine Gruppe von Proteinen, die einen Komplex bilden, der die zwei Membranen einander annähert und schließlich zur Verschmelzung bringt. Dieser Komplex ist der sogenannte SNARE-Komplex (*Soluble N-Ethylmaleimide-sensitive Attachment Proteine Receptors*) (Sutton et al., 1998; Chen and Scheller, 2001).

Im Rahmen einer intensiven Forschung hat sich der klassische Begriff der Synapse, der eine Kontaktstelle zwischen einer Nervenzelle und ihrer Effektorzelle beschreibt, in den letzten Jahren erweitert. So bezeichnet die immunologische Synapse eine kurzzeitige Kontaktstelle zwischen einer Abwehrzelle und ihrer Zielzelle, die zu deren Vernichtung führt (Bromley et al., 2001). Auch hier sind SNARE-Proteine wesentlich beteiligt (Stow et al., 2006).

In der vorliegenden Dissertation wurde mit Chromaffinzellen gearbeitet. Chromaffinzellen sind Zellen des Nebennierenmarks, die sich durch Chrom-Salze färben lassen und die Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin produzieren und sezernieren. Diese sind in sogenannten *Large Dense Core Vesicles* gespeichert (LDCV). Im Gegensatz zu den z. B. in Neuronen vorkommenden *Small Clear Vesicles* (SCV) stellen

sich die LDCVs in der Elektronenmikroskopie groß und dunkel dar. Phylogenetisch entstammen die Chromaffinzellen denselben Vorläuferzellen wie die Nervenzellen des ZNS, weswegen man das Nebennierenmark als eine Art sympathisches Paraganglion ansehen kann. Diese Verwandtschaft bedingt eine große Ähnlichkeit in ihren funktionellen Eigenschaften, zum einen in Bezug auf ihr Verhalten bei Erregung (Douglas et al., 1967), zum anderen in ihrer Protein- und Ionenkanalausstattung (Biales et al., 1976; Kits and Mansvelder, 2000). Durch ihre günstigen Eigenschaften in der Zellkultur und ihre runde Form eignen sich Chromaffinzellen besonders gut für elektrophysiologische Messungen (siehe auch Material und Methoden). Nichtsdestotrotz lassen sich in Chromaffinzellen gewonnene Ergebnisse aufgrund morphologischer und funktioneller Unterschiede nicht ungefiltert auf das ZNS und seine Zellen übertragen.

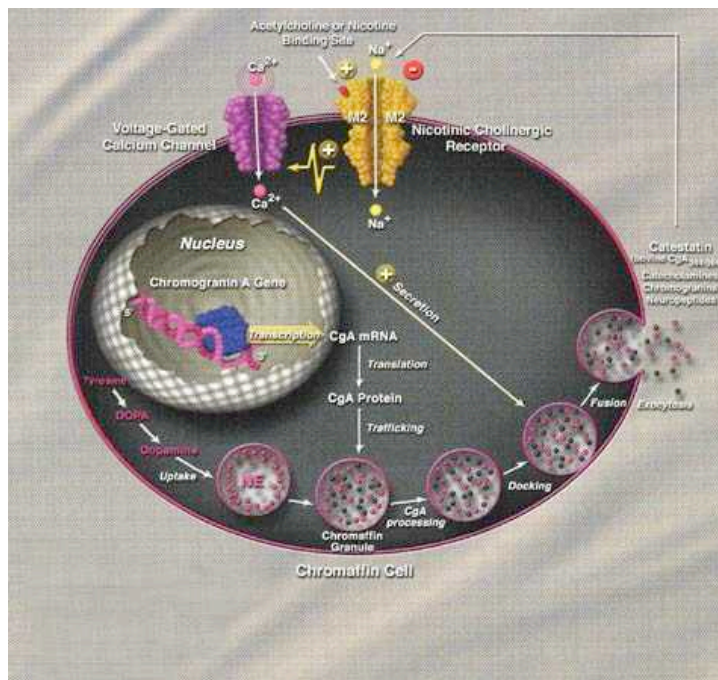


Abb. 1: Schematische Darstellung einer Chromaffinzelle

Durch die Bindung von Acetylcholin öffnen nikotinerge Na^{2+} -Kanäle. Durch den Na^{2+} -Einstrom depolarisiert die Membran und spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle öffnen. Durch den Ca^{2+} -Einstrom und die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern, werden die katecholaminhaltigen Vesikel zur Sekretion gebracht.

Download von:
<http://hypertension.ucsd.edu/>

2.2 Vesikel-Pools: Vom Vesikel zur Ausschüttung

Es existieren unterschiedliche Formen von Vesikel-Pools. Jedes Vesikel durchläuft eine Art Reifung, bevor es sezerniert werden kann. In einem ersten Schritt haften die Vesikel an der Membran an (*Docking*) und werden dann in einen sezernierbaren Zustand gebracht (*Priming*) (Becherer and Rettig, 2006).

Man kann in Chromaffinzellen vier *Pools* von Vesikeln sowohl räumlich als auch kinetisch voneinander unterscheiden: den *Depot Pool* (DP), den *Unprimed Pool* (UPP), den *Slowly Releasable Pool* (SRP) und den *Readily Releasable Pool* (RRP). Diese Unterscheidung wurde durch die Anwendung verschiedener Techniken möglich. Zum einen ist es mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik möglich, die verschiedenen *Pools* kinetisch und in Bezug auf ihre Größe zu unterscheiden (siehe Material und Methoden). Durch die Kenntnis der Kapazität eines einzelnen Vesikel gelingt es, die gesamte Zahl der sezernierten Vesikel zu schätzen (Moser and Neher, 1997a). Zum anderen ermöglicht die *Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy* (TIRFM), die Darstellung der räumlichen Verteilung (Steyer und Almers, 2001) und der Mobilität (Nofal et al., 2007) einzelner Vesikel. Zusätzlich ist es durch die direkte Detektion der ausgeschütteten Katecholamine mittels Amperometrie möglich, ein differenzierteres Bild von der Fusion der Vesikel und der Ausschüttung der Transmitter zu erhalten (vergleiche Material und Methoden).

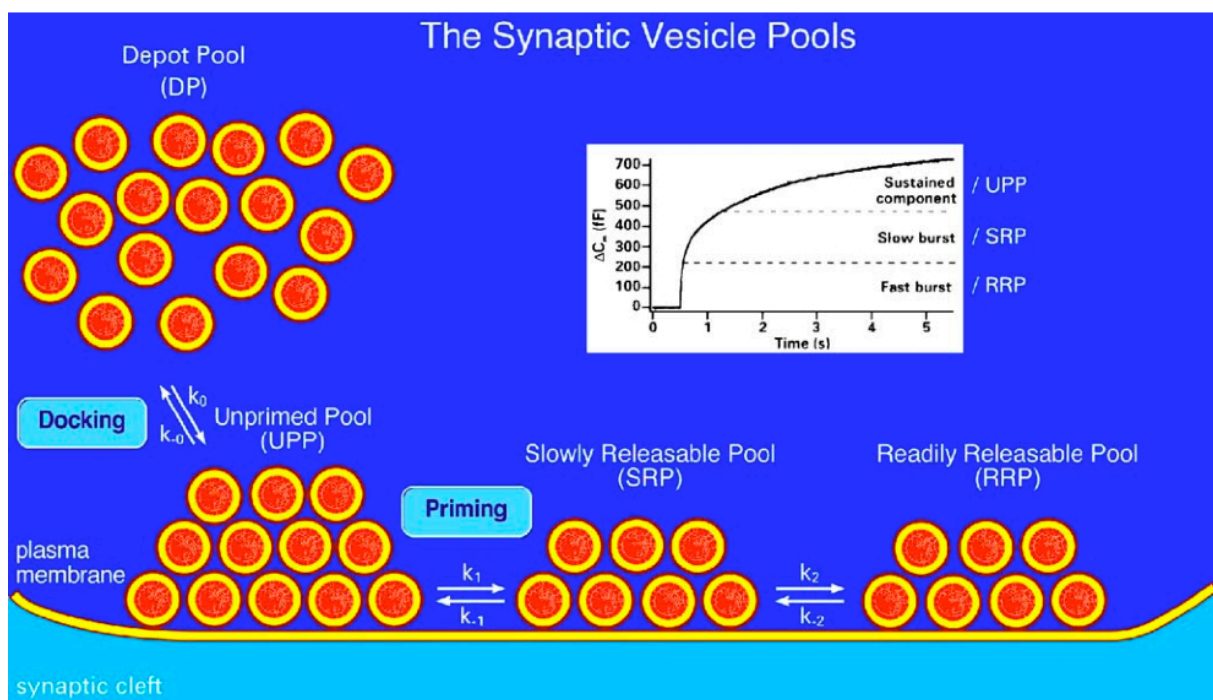


Abb. 2: Vesikel-Pools

Die verschiedenen Vesikel-Pools entsprechen unterschiedlichen Reifungsstadien. Zuerst müssen das *Docking* und *Priming* vollzogen werden, bevor die Vesikel sezerniert werden können. Im Inset ist die Antwort auf eine schlagartige $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung zu sehen. Die unterschiedlichen Phasen der Kapazitätsantwort entsprechen der Freisetzung aus den verschiedenen Pools.

(aus Becherer and Rettig, 2006)

Vergleichend wird in ZNS-Synapsen ebenfalls eine Unterteilung in eine schnelle und eine langsame Komponente vorgenommen (Augustine and Neher, 1992; Sakaba, 2006). Hierbei entspricht der auch als RRP bezeichnete schnelle *Pool* am ehesten der Summe des RRP und SRP in Chromaffinzellen.

2.2.1 Der Depot Pool: DP

Der *Depot Pool* ist mit geschätzten 2000 Vesikeln (in adulten Mäusen) der größte *Pool* (Sorensen, 2004). Seine Vesikel sind weiter als 200 nm von der Membran entfernt und sind somit noch nicht gedockt. Aus dem *Depot Pool* werden die Vesikel des *Unprimed Pool* aufgefüllt.

2.2.2 Der Unprimed Pool: UPP

Haben die Vesikel den Prozess des *Docking* durchlaufen, werden sie dem *Unprimed Pool* zugerechnet. Diese sind dem Namen nach noch nicht geprimed, wie die Vesikel des *Readily Releasable Pool* und des *Slowly Releasable Pool*. Definitionsgemäß befinden sich gedockte Vesikel in einem Abstand von weniger als 200 nm von der Membran (Ashery et al., 2000). Der *Unprimed Pool* umfasst (in adulten Mäusen) ungefähr 750 Vesikel, aus denen der *Slowly Releasable Pool* und der *Readily Releasable Pool* gespeist werden. In der Kapazitätsantwort auf eine schlagartige Erhöhung der intrazellulären Calciumerhöhung stellt sich der *Unprimed Pool* in der sogenannten *Sustained Component* dar (siehe Inset Abb. 2). Nachdem die Vesikel aus den *Primed Pools* (SRP und RRP) freigesetzt wurden, werden die Vesikel des *Unprimed Pool* in einen fusionskompetenten Status und zur Sekretion gebracht. Dies bedingt den linearen Anstieg der *Sustained Component*. Mit Hilfe bildgebender Verfahren wie der TIRF-Mikroskopie ist es möglich, Prozesse wie *Docking* und *Priming* und damit den Übergang zwischen den verschiedenen *Pools* auch visuell sichtbar zu machen (Becherer et al., 2007). Hierbei unterscheidet sich der *Unprimed Pool* von den *Primed Pools* (SRP und RRP) zum Beispiel durch eine erhöhte Mobilität.

2.2.3 Der Slowly Releasable Pool und Readily Releasable Pool: SRP und RRP

Der *Slowly Releasable Pool* und der *Readily Releasable Pool* beinhalten die fusionskompetenten Vesikel. Diese *primed vesicles* werden in der Kapazitätsantwort als *burst* registriert, d. h. unmittelbar auf eine schlagartige intrazelluläre Calciumerhöhung werden diese Vesikel ausgeschüttet. Hierbei entspricht der *Slowly Releasable Pool* dem *Slow Burst* und der *Readily Releasable Pool* dem *Fast Burst* (vergleiche Inset Abb. 2).

Sowohl der SRP als auch der RRP beinhalten ca. 150 Vesikel bei einer intrazellulären Calciumkonzentration von 300 nM. Dabei ist zu beachten, dass die Größe der *Pools* von der basalen Calciumkonzentration abhängig ist (Voets, 2000). Bei einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration von 300 nM auf 20 µM durch einen *Flash* (schlagartige Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration durch einen UV-Blitz; vergleiche 3.2.3.3) wird der RRP mit einer Zeitkonstanten von 20-40 ms und der SRP mit einer Zeitkonstanten von 200 ms geleert.

Die globale Erhöhung des intrazellulären Calcium auf solch hohe Werte löst eine Sekretion aus, die nicht als physiologisch angesehen werden kann. Ein physiologischer Stimulus, also die Depolarisation durch ein Aktionspotential, bringt normalerweise nur die Vesikel des RRP zur Freisetzung.

In genaueren Untersuchungen wurden unterschiedliche *Subpools* des RRP gefunden. So kann man den RRP in verschiedene *Pools* unterteilen: den *Immediately Releasable Pool* (IRP) und den *Highly Calcium-Sensitive Pool* (HCSP).

2.2.4 Der Immediately Releasable Pool: IRP

Dem *Immediately Releasable Pool* lassen sich ungefähr 25 % des RRP (ca. 35 Vesikel) zuordnen. Wahrscheinlich werden bei der Antwort auf ein Aktionspotential hauptsächlich die Vesikel des IRP ausgeschüttet (Horrigan and Bookman, 1994). Der IRP ist definiert als *Pool*, der sich in unmittelbarer Nähe zu den spannungsabhängigen Calciumkanälen befindet, so dass er durch einen kurzen Depolarisationspuls geleert werden kann (Moser and Neher, 1997b; Voets et al., 1999).

2.2.5 Der Highly Calcium-Sensitive Pool: HCSP

Der nur 15 Vesikel umfassende *Highly Calcium-Sensitive Pool* (entspricht ca. 10 % des RRP) entleert sich schon bei intrazellulären Calciumwerten unter 10 μM . Aufgrund seiner hohen Calciumsensitivität und geringen Größe wurde dieser *Pool* in den konventionellen Flash-Experimenten, die Werte weit über 10 μM erreichen, lange übersehen. Er ist nicht identisch mit dem zuvor beschriebenen *Immediately Releasable Pool*, da sich nach Leerung des HCSP der IRP in seiner Größe nicht ändert (Yang et al., 2002). Es ist davon auszugehen, dass die Vesikel des HCSP sich relativ weit von den spannungsabhängigen Calciumkanälen befinden, da es bis heute nicht gelungen ist, den HCSP mit einem Depolarisationsstimulus zu entleeren. Auf der anderen Seite wurde bisher kein dem IRP entsprechendes Korrelat in *Flash*-Experimenten gefunden, so dass es vermutlich die Nähe zu den Calciumkanälen ist, die bestimmt, ob eine bestimmte Vesikelpopulation zur Ausschüttung kommt und weniger deren Calciumsensitivität (Voets et al., 1999).

2.3 Proteine

Der Prozess der Anheftung und der späteren Verschmelzung von Vesikeln mit der Membran ist ein proteinabhängiger Vorgang (Jahn and Sudhof, 1999; Rettig and Neher, 2002). Verschiedene Proteine spielen in den Schritten von der lockeren Anheftung (dem *Docking*) über die Reifung zu fusionskompetenten Vesikeln (dem *Priming*) bis hin zur eigentlichen Fusion eine wesentliche Rolle. Eines der wenigen Proteine mit einer bekannten Funktion im Prozess des *Docking* ist das zur Familie der SM-Proteine (Sec1/Munc18) gehörende Munc 18-1 (Voets et al., 2001b; Toonen et al., 2005). Das *Priming* ist ein Vorgang, der auf der Bildung des SNARE-Komplexes beruht (Bruns and Jahn, 2002; Rizo and Sudhof, 2002; Becherer and Rettig, 2006). Durch den assemblierten SNARE-Komplex werden die Vesikelmembran und die Zielmembran einander angenähert und die Energie bereitgestellt, die für die Fusion nötig ist (Sudhof and Rothman, 2009).

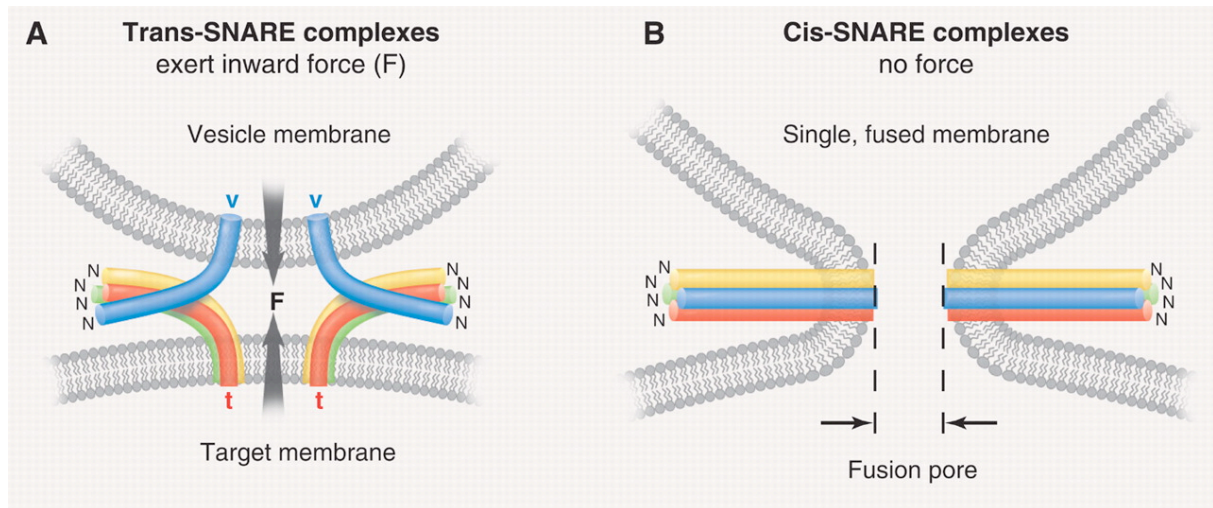


Abb. 3: SNARE-Komplex und Membranfusion

A. Der assemblierte SNARE-Komplex nähert die Vesikelmembran und die Zellmembran einander an. Durch ein reißverschlussähnliches Zusammenziehen der SNARE-Proteine wird die Kraft (F) erzeugt, die die Membranen schließlich zur Verschmelzung bringt.

B. Nach der Fusion der beiden Membranen liegt eine vereinte Membran vor und es wird keine weitere Energie benötigt. Die in dem Vesikel enthaltenen Transmitter diffundieren initial zu einem kleinen Teil durch die Fusionspore. Diese öffnet sich weiter, wodurch der Rest der Transmitter schlagartig freigesetzt wird. Die Schritte von der Formation der Fusionspore bis zur vollständigen Öffnung lassen sich mit Hilfe der Amperometrie nachvollziehen.

(aus Südhof und Rothman, 2009)

2.3.1 Der SNARE-Komplex: Grundlagen für die Fusion

Bei der Fusion von Vesikeln mit der Zellmembran spielen SNARE-Proteine eine überragende Rolle. Sie können in *vesicular* SNAREs (v-SNAREs oder auch R-SNAREs) und *target* SNAREs (t-SNAREs oder auch Q-SNAREs) unterteilt werden, die zusammen einen hochstabilen Komplex bilden, der nicht durch das Detergenz SDS dissoziiert werden kann und erst bei Temperaturen über 90° C denaturiert (Sollner et al., 1993a; Sollner et al., 1993b; Hanson et al., 1997). Zu den vesikulären v-SNAREs zählt das Protein Synaptobrevin. Die an der Zellmembran befindlichen t-SNAREs sind zum einen SNAP-25 (*Synaptosome-associated protein of 25 kD*) und zum anderen Syntaxin. V-SNAREs und t-SNAREs besitzen eine hohe Affinität zueinander und lagern sich im *Zipper*-Modell reißverschlussähnlich vom zytoplasmatischen zum transmembranösen Teil (vom N-terminalen zum C-terminalen Ende) einander an und bringen die beiden Lipiddoppelschichten so nah zusammen, dass sie fusionieren können (Sutton et al., 1998).

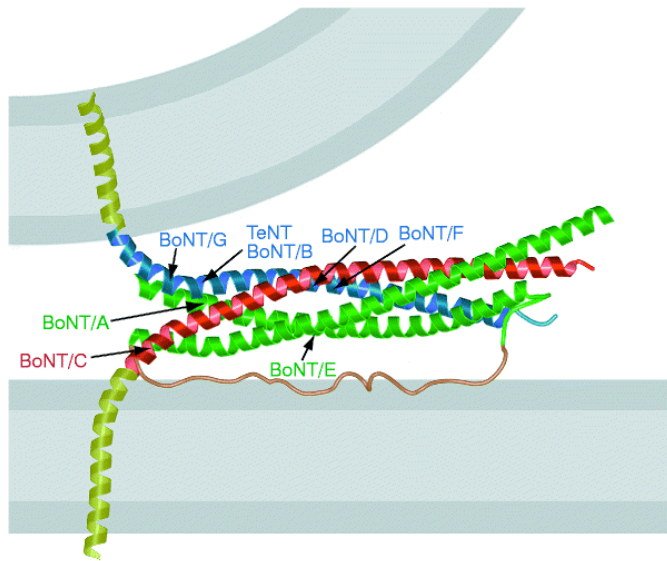


Abb. 4: Kristallstruktur des assemblierten SNARE-Komplex und Angriffspunkte verschiedener Neurotoxine

Die Proteine Synaptobrevin (blau), SNAP-25 (grün) und Syntaxin (rot) bilden ein viersträngiges α -Helix-Bündel. Die transmembranösen Anteile sind gelb gefärbt.

Die jeweiligen Angriffspunkte verschiedener Botulinum- und Tetanus-toxine sind mit Pfeilen gekennzeichnet. So erzeugte Defekte lassen Rückschlüsse auf die genaue Funktionsweise des jeweiligen Proteins zu.

(aus Sutton et al., 1998)

Die Proteine des SNARE-Komplexes bilden die essenzielle Grundlage des Fusionsprozesses. Defekte, die eine Assemblierung des SNARE-Komplexes unmöglich machen, führen damit zu einem vollständigen Fehlen von exozytotischen SNARE-vermittelten Vorgängen (Montecucco and Schiavo, 1994). Auf der anderen Seite führen kleinere Defekte, die eine partielle Funktion zulassen, zu der Möglichkeit, den genauen Funktionsmechanismus des jeweiligen Proteins im Detail zu erforschen (Jahn and Niemann, 1994).

Die SNARE-Proteine stellen somit zwar die Basis für die Ausschüttung von Neurotransmittern dar, sie bedürfen aber zahlreicher weiterer Proteine für eine geregelte Funktion. Zu nennen wären hier der Calcium-Sensor Synaptotagmin und die in dieser Arbeit näher untersuchten Proteine Snapin und Complexin II (siehe Abb. 5).

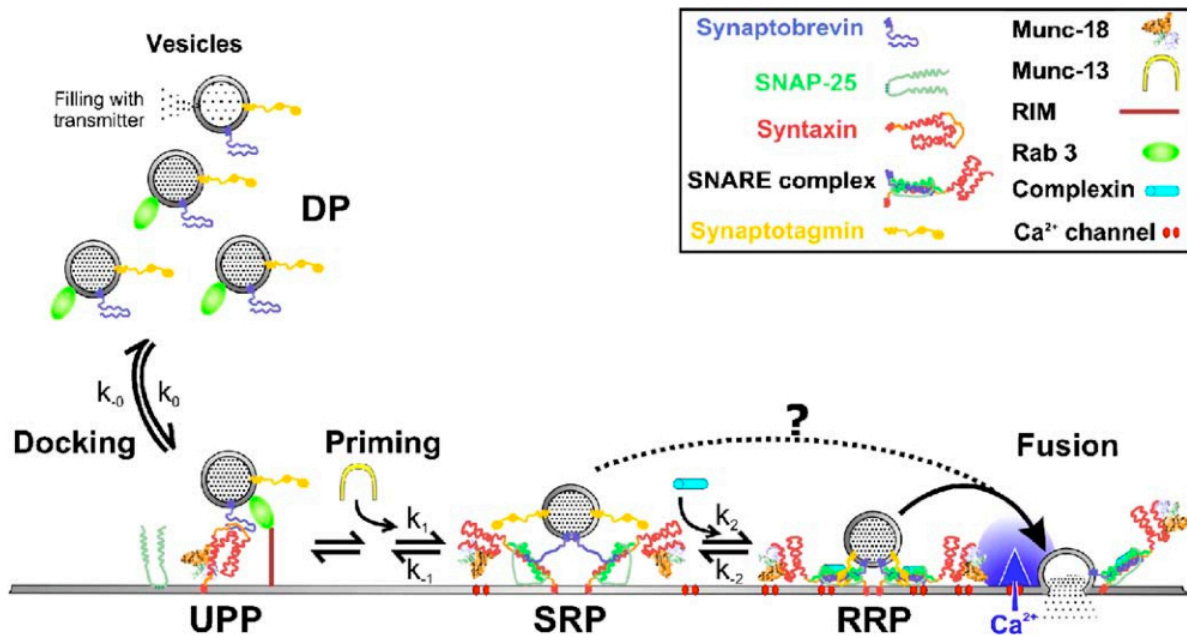


Abb. 5: Proteine, Pools und Fusionsprozess

Beteiligung verschiedener Proteine während des Fusionsprozesses. Besonders zu beachten sind die SNARE-Proteine Synaptobrevin, SNAP-25 und Syntaxin, sowie der Ca²⁺-Sensor Synaptotagmin. Complexin II bindet an den assemblierten SNARE-Komplex und stabilisiert ihn, was durch eine reduzierte Rate k_{-2} zum Ausdruck kommt. Nicht in der Zeichnung findet sich Snapin, welches an SNAP-25 bindet und die Anlagerung von Synaptotagmin an den SNARE-Komplex fördert und so eine erhöhte Ca²⁺-Sensitivität zur Folge hat.

(aus Becherer und Rettig, 2006)

2.3.2 Synaptotagmin: Der Calcium-Sensor

Synaptotagmin ist nach der gängigen Theorie der Calciumsensor der schnellen Exozytose (Brose et al., 1992; Chapman, 2002). Die Ausschaltung von Synaptotagmin I in Chromaffinzellen führt zu einem selektiven Verlust des RRP (Voets et al., 2001a). Synaptotagmin bindet calciumabhängig an SNARE-Proteine (Chapman et al., 1995; Zhang et al., 2002), so dass eine reduzierte Calciumaffinität von Synaptotagmin mit einer verminderten Calciumsensitivität des Fusionsprozesses einhergeht (Fernandez-Chacon et al., 2001). Neuere Ergebnisse weisen darauf hin, dass Synaptotagmin neben der Funktion als Calciumsensor auch eine Aufgabe bei der Verteilung von Vesikeln an der Membran übernimmt. So hilft Synaptotagmin, Vesikel des RRP in der Nähe von spannungsgesteuerten Calciumkanälen anzusiedeln (McNeil and Wu, 2009; Young and Neher, 2009).

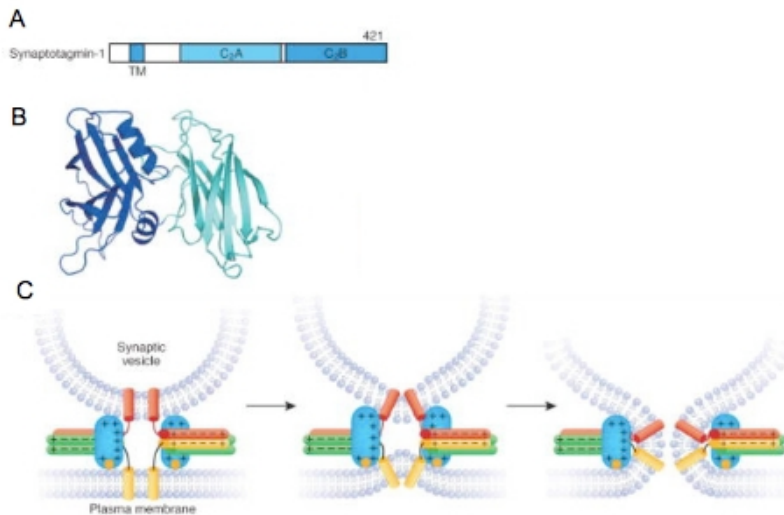


Abb. 6: Synaptotagmin: Struktur und Funktion

A. Domänenstruktur von Synaptotagmin I. Besonders zu beachten sind die Transmembrandomäne (TM), sowie die beiden funktionellen Domänen C₂A und C₂B.

B. Kristallstruktur von Synaptotagmin I ohne Ca²⁺. Die zwei antiparallel zueinander stehenden C₂-Domänen weichen auseinander und geben so auch die Bindungsstelle für Ca²⁺-Ionen an der C₂A-Domäne frei.

C. Vereinfachtes Modell der Interaktion von Synaptotagmin, SNAREs und Membranen. Dargestellt ist nur die C₂B-Domäne (blau), die jeweils 2 Ca²⁺-Ionen (orange) gebunden hat. +/- bezeichnen die Polarität. Angenommen wird eine Interaktion sowohl mit dem c-terminalen SNARE-Komplex, als auch mit beiden Membranen (nicht bewiesen).

(aus Rizo und Rosenmund, 2008)

2.3.3 Snapin

Snapin ist ein SNAP-25-bindendes Protein, das die Anlagerung von Synaptotagmin an den SNARE-Komplex fördert (Ilardi et al., 1999). Die Ausschaltung von Snapin führt zu einer Verminderung der calciumabhängigen Exozytose aufgrund einer verringerten Zahl an fusionskompetenten Vesikeln (Tian et al., 2005). Snapin kann durch die Proteinkinase A (PKA) an Serin 50 phosphoryliert werden. Durch die Phosphorylierung wird die Anlagerung von Snapin und Synaptotagmin mit dem SNARE-Komplex erleichtert und dadurch der exozytotische *burst* vergrößert (Chheda et al., 2001). Die *sustained component* der Kapazitätsantwort wird nicht beeinflusst, was die Annahme, dass Snapin den SNARE-Komplex stabilisiert, bestärkt (Thakur et al., 2004). Snapin interagiert mit zahlreichen weiteren Proteinen und erfüllt wahrscheinlich weitere – zum Teil noch unbekannt – Funktionen auch vor dem eigentlichen Fusionsprozess (Ruder et al., 2005; Wang et al., 2009). In Neuronen wurde

jüngst gezeigt, dass Snapin die Fusion von synaptischen Vesikeln synchronisiert (Pan et al., 2009).

2.3.4 Complexin II

Complexin II ist das einzige in Chromaffinzellen exprimierte Complexin und bindet calciumunabhängig an den SNARE-Komplex, genauer gesagt an der Syntaxin-Synaptobrevin-Kopplungsstelle (Chen et al., 2002). Bis heute sind vier verschiedene Complexine bekannt, die sich in ihrer Struktur nur wenig unterscheiden. Die Ausschaltung von Complexin II führt zu einer stark eingeschränkten Effizienz in der Neurotransmitterausschüttung, welche jedoch durch eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration wieder auf das Ausgangsniveau gehoben werden kann (Reim et al., 2001). Es wird heute angenommen, dass Complexin wahrscheinlich als eine Art Greifer fungiert, der den assemblierten SNARE-Komplex in einem fusionskompetenten (*primed*) Status hält, welcher nur noch einen kleinen Stimulus zur Sekretion benötigt (Sudhof and Rothman, 2009). Diese Annahme resultiert aus verschiedenen Ergebnissen. Auf der einen Seite wurden inhibierende Effekte von Complexin in Neuronen gefunden (Giraud et al., 2006). Andererseits verstärkte Complexin II die Sekretion in Chromaffinzellen (Cai et al., 2008). Sudhof und Rothman gehen in ihrer Übersichtsarbeit davon aus, dass Complexin eine stabilisierende Funktion erfüllt, die nicht nur Fusion durch eine besonders enge Bindung an die Membran erleichtert, sondern vor allem auch spontane Sekretion verhindert. So werden die SNARE-Proteine durch Complexin aktiviert und fixiert. Durch die Bindung von Calcium an Synaptotagmin wird das Complexin wieder gelöst und der Fusionsprozess kann vollendet werden (Pang et al., 2006; Tang et al., 2006; Rizo and Rosenmund, 2008).

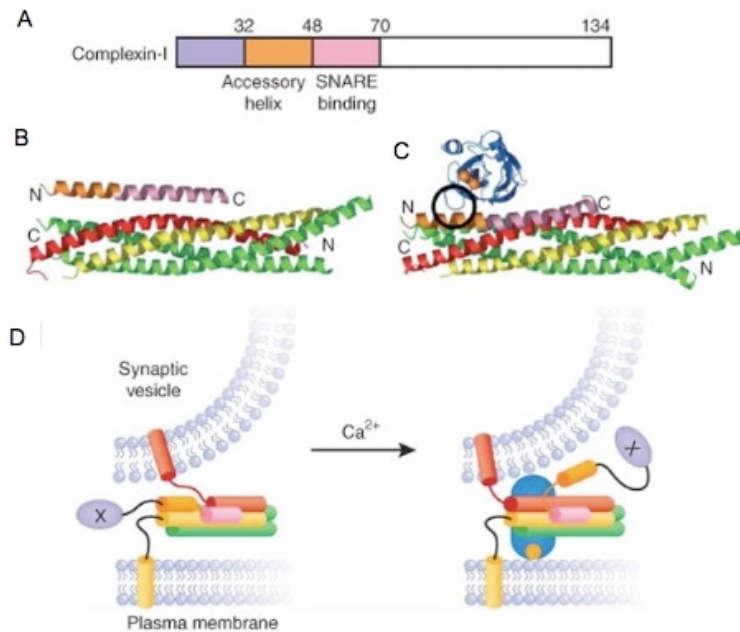


Abb. 7: Complexin: Struktur und Funktion

A. Domänenstruktur von Complexin I.

B. Kristallstruktur eines Complexin-Fragmentes, das antiparallel an den SNARE-Komplex bindet.

C. Bindung der C₂B-Domäne (s. Abb. 6) von Synaptotagmin an den Komplex aus SNAREs und Complexin. Durch den schwarzen Kreis ist die Region gekennzeichnet in der die C₂B-Domäne von Synaptotagmin mit der akzessorischen Helix von Complexin konkurriert.

D. Vereinfachtes Modell (analog zu Abb. 6) der Interaktion von Complexin, SNAREs und Synaptotagmin. Synaptotagmin verdrängt Complexin (N-terminaler Teil X) teilweise aus seiner Bindung und ermöglicht so die Vollendung des Fusionsprozesses. Die genaue Funktion bzw. Interaktion des N-terminalen Teils (X) ist bis jetzt aber nicht bekannt und rein spekulativ.

(aus Rizo und Rosenmund, 2008)

2.4 Ziel der Arbeit

Der HCSP wurde von Yang et al. (2002) als *Pool* von Vesikeln beschrieben, die bereits bei niedrigen intrazellulären Calciumkonzentrationen freigesetzt werden. Yang et al. beschrieben eine Vergrößerung des HCSP durch die Proteinkinase C (PKC). Auch andere Autoren beschrieben den HCSP, sowie eine Vergrößerung durch die Applikation von Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA), einem Aktivator der PKC (Liu et al., 2006). Da durch eine Proteinkinase zahlreiche Proteine phosphoryliert und damit eine Vielzahl an Stoffwechselwegen beeinflusst werden, war es nicht möglich exakte Aussagen über den genauen Mechanismus einer Vergrößerung des HCSP zu treffen.

Das Ziel meiner Arbeit war, den HCSP auf zwei Wegen genauer zu charakterisieren. Zum einen exprimierte ich die Proteine Snapin bzw. Snapinmutanten und Complexin II in Chromaffinzellen der Maus über. Von beiden Proteinen ist bekannt, dass sie einen Effekt auf die Calciumsensitivität des Fusionsprozesses besitzen. Zum anderen versuchte ich durch verschiedene Stimulationsprotokolle eine möglichst exakte Aufspaltung der verschiedenen *Pools* in der Kapazitätsantwort zu erreichen, um so genaue Schlussfolgerungen zu der spezifischen Wirkung der einzelnen Proteine machen zu können.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Reagentien

Albumin	Sigma
Agarose (DNA)	Sigma
Agarose (RNA)	Sigma
Aprotinin	Sigma
ATP-Mg	Sigma
BAPTA	Invitrogen
BPB (Bromphenolblau), Natriumsalz	Serva
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma
CaCl ₂	Sigma
CaCl ₂ (für intrazelluläre Lösung)	Promochrom
Chloroform	Fluka
CsOH	Sigma
L-Cystein	Sigma
DEPC	Sigma
dH ₂ O	Eigene Herstellung
DMEM	Invitrogen
DPTA	Sigma
EDTA	Sigma
EGTA-K	Sigma
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Invitrogen
FCS (Fetal Calf Serum)	Invitrogen
Formaldehyd 37%	Sigma
Formamid	Sigma
Fura-4F	Invitrogen
Furaptra	Invitrogen
D-Glucose	VWR International
L-Glutamic Acid	Sigma

GTP-Na ₂	Sigma
Glycerol	Sigma
HEPES	VWR International
HPLC Wasser	VWR International
ITS-X	Invitrogen
KCl	VWR International
Mito	Labor Schubert&Weiss
MgCl ₂	VWR International
Mops	Sigma
NaCl	VWR International
NaH(PO ₄) ₂	VWR International
NaH ₂ PO ₄	VWR International
NE-Buffer 10 x	Biolabs
NGS	VWR International
Nitrophenyl-EGTA	Eigene Herstellung
Optimem	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
Phenol (DNA)	Sigma
Phenol (RNA)	Carl Roth
RNA-Ladder	Biolabs
Sigma-Wasser	Sigma
Trypsin-EDTA 10 x	Invitrogen
Trypsin-Inhibitor	Sigma
Tryptosephosphat	Invitrogen

3.1.2 Enzyme

Chymotrypsin	Sigma
DNase	Roche
Papain	Worthington
Spel	Biolabs

3.1.3 Lösungen und Medien

3.1.3.1 Lösungen und Medien für die Zellkultur

FCS 10%

900 ml DMEM

2 ml Penicillin/Streptomycin

1 ml Mito

100 ml FCS

Locke's

154 mM NaCl

5,6 mM KCl

0,85 mM NaH₂PO₄

2,15 mM Na₂HPO₄

10 mM D-Glucose

pH = 7,4; 312 mOsm

Enzymlösung

2 mg L-Cystein

10 ml DMEM

0,1 ml CaCl₂ (100 mM)

0,1 ml EDTA (50 mM)

20 U/ml Papain

bei 37° C 20 Minuten mit Carbogengas begasen

Inaktivierungslösung

25 mg Albumin

25 mg Trypsin-Inhibitor

10 ml FCS 10%

Medium

40 ml DMEM

400 µl ITS-X

160 µl Penicillin/Streptomycin

3.1.3.2 Lösungen und Medien für die Virusgenerierung und -aktivierung

Linearisierungslösung

2,5 µl NE-Buffer 2

2,5 µl BSA

1,5 µl Spel

3 µg DNA

auf 25 µl mit Sigma H₂O auffüllen

DEPC-Wasser 0,1%

1 ml DEPC

1 l dH₂O

bei Raumtemperatur inkubiert, danach autoklaviert

5 x MOPS

3,28 g NaAc

20,6 g MOPS

in 800 ml DEPC-Wasser lösen (pH = 7)

+10 ml 0,5 M EDTA (pH = 8)

auf 1 l mit DEPC-Wasser auffüllen

sterilfiltrieren und vor Licht geschützt aufbewahren

Lade-Puffer

10 ml 5 x MOPS

8,5 ml Formaldehyd 37%

25 ml Formamid

2,5 ml Glycerol

10 µl EDTA (0,5 M)

12,5 mg BPB

2,75 ml Sigma H₂O

Optimem + 2,5% FCS

100 ml Tryptosephosphat

20 ml HEPES

25 ml FCS

1 ml Penicillin/Streptomycin
auf 1 l mit Optimem auffüllen, sterilfiltrieren

Optimem + 5% FCS

15 ml Tryptosephosphat
3 ml HEPES
7,5 ml FCS
150 µl Penicillin/Streptomycin
auf 150 ml mit Optimem auffüllen, sterilfiltrieren

HBS

140 mM NaCl
10 mM HEPES
5 mM KCl
10 mM MgCl₂
20 mM CaCl₂
pH = 7,2; 351 mOsm

FCS 10%

Siehe oben.

Optimem ohne FCS + 0,2% BSA

44 ml Optimem
5 ml Tryptosephosphat
1 ml HEPES (1 M)
50 µl Penicillin/Streptomycin
0,1 g BSA

Chymotrypsin

2 mg Chymotrypsin
1 ml HBS

Aprotinin

6 mg Aprotinin
1 ml HBS

3.1.3.3 Lösungen für „Whole-Cell“ Patch-Clamp Experimente

Extrazelluläre Lösung

147 mM NaCl
2,4 mM KCl
10 mM HEPES
1,2 mM MgCl₂
2,5 mM CaCl₂
10 mM D-Glucose
pH = 7,5; 310 mOsm

Intrazelluläre Lösung

100 mM Cs-Glutamat
2 mM Mg-ATP
0,3 mM Na₂-GTP
40 mM Cs-HEPES
5 mM NP-EGTA
4 mM CaCl₂
0,4 mM Furaptra
0,4 mM Fura-4F
pH = 7,2; 300 mOsm

3.1.4 Viren

pSFV1-eGFP
pSFV1-snapin-WT-IRES-eGFP
pSFV1-snapin-S50A-IRES-eGFP
pSFV1-snapin-S50D-IRES-eGFP

alle Snapin-Viren
wurden am MPI für
biophysikalische Chemie,
Göttingen generiert
(Chheda et al., 2001; Tian
et al., 2005)

pSFV1-CPXII-IRES-eGFP

generiert von Katja
Klingler, Physiologisches
Institut, Universität des
Saarlandes

3.1.5 Mäuse

Wildtypmäuse

Mausstall, Physiologisches
Institut, Universität des
Saarlandes

3.1.6 Patch-Clamp Set-Up

Borosilicate Glass GB 150 F 8P

Science Products GmbH

Tubes, Capillary 1.5-1.8 x 100 mm

Kimble Products

Kohlefaser PAN-T650, 5 µm

Amoco Perform. Products

Micropipette Puller P-97

Sutter Instruments

Patch Pipette Puller PA-10

TSE System

Computer

medvis

EPC-7, EPC-9 Patch-Clamp-Verstärker,

HEKA Electronics

mit PULSE Software 8.31

Oszilloskop TDS 2004B

Tektronix

IX70 inverses Mikroskop

Olympus

Fura-Filter FF01-510/84

Olympus

Kamera TVCCD-200

Monacor

Monochromator Polychrom IV

T.I.L.L. Phototronics

UV-Blitz Lampe

Rapp OptoElectronic

Neutralfilter

AHF Analysetechnik

CCTV Monitor

APF Electronics

Mikromanipulatoren

Eigenbau

Druckapplikator

Eigenbau

Absaugpumpe

Wisa

Schwingungsgedämpfter Tisch

Newport

Faraday Käfig

Eigenbau

3.2 Methoden

3.2.1 Chromaffinzellpräparation und Zellkultur

Für die Gewinnung von Chromaffinzellen wurden 0 bis 6 Tage alte neugeborene Wildtypmäuse benutzt. Nach der Vorbereitung aller nötigen Utensilien und Lösungen für die Präparation wurden die benötigten Mäuse aus dem Mausstall geholt und so schonend wie möglich per Dekapitation getötet. Danach wurden nacheinander beide Nebennieren stumpf mit einer Pinzette präpariert und nach der Freilegung unter Zuhilfenahme einer Mikroschere vorsichtig ausgelöst und in einen Tropfen Locke's Lösung in eine Petrischale überführt. Nachdem beide Nebennieren ausgelöst waren, wurden sie unter einem binokularen Mikroskop mit einer Pinzette behutsam von verbliebenem Fett und Bindegewebe gesäubert und in einen frischen Tropfen Locke's Lösung gebracht. Je eine Nebenniere wurde in ein Falcon mit 500 µl Enzymlösung überführt und, abhängig vom Alter, 18-25 Minuten bei 37° C im Schüttelbad inkubiert. Hierauf wurde die Enzymlösung abpipettiert und durch 500 µl Inaktivierungslösung ersetzt, welche zu Präparationsbeginn zusammen mit dem Medium in den Zellinkubator gestellt wurde, und für weitere 4 Minuten im Schüttelbad inkubiert. Die Inaktivierungslösung wurde wiederum abpipettiert und mit 300 µl Medium aufgefüllt. Die verbliebene Nebenniere wurde mit einer feinen Pipettenspitze circa 15-20 Mal trituriert, bis nur noch die Drüsenhülle ungelöst blieb. Je 100 µl dieser Zellsuspension wurden auf ein Deckgläschen mit 25 mm Durchmesser pipettiert und für 30 Minuten im Zellinkubator bei 37° C und 13% CO₂ auf einer 6-Well-Platte inkubiert. Nachdem die Zellen sich so absetzen konnten, wurde jedes Well mit 3 ml Medium aufgefüllt und für mindestens 2 Tage im Zellinkubator belassen. Alle Zellen wurden am zweiten bzw. dritten Inkubationstag gemessen.

3.2.2 Virusgenerierung, -aktivierung und -infektion

Alle Viren waren bereits vorhanden und wurden wie oben angegeben publiziert. Für die Einschleusung der untersuchten Proteine wurde das Semliki-Forest-Virus (SFV) gewählt. Hierbei handelt es sich um ein gut untersuchtes Konstrukt, von dem bekannt ist, effizient Chromaffinzellen zu infizieren und in einem gewissen Zeitrahmen

wenig zytopathisch – vor allem in Bezug auf funktionelle Eigenschaften – auf die Zellen zu wirken (Ashery et al., 1999; Duncan et al., 2002).

Das Semliki-Forest-Virus gehört zur Familie der Togaviridae (α -Viren) und besitzt eine lineare Einzelstrang-RNA mit positiver Polarität, die in der Zelle direkt als mRNA fungiert. Durch eine im Virusplasmid enthaltene interne ribosomale Eintrittsstelle (*Internal Ribosome Entry Site*, IRES) (Pelletier and Sonenberg, 1988) erhielt man einen bicistronischen Vektor, der es erlaubt, das zu untersuchende Protein und das Markerprotein getrennt voneinander zu translatieren. Als Markerprotein wurde das grün fluoreszierende Protein eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) gewählt.

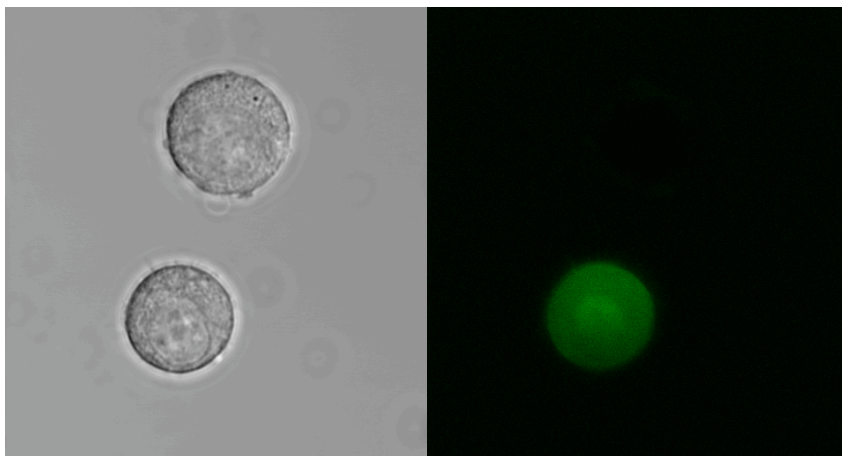


Abb. 8: pSFV1-eGFP infizierte Chromaffinzelle

Bei Anregung mit 488 nm erscheinen infizierte Zellen grün. Diese Zellen exprimieren GFP sowie das gewünschte Protein und wurden für die Experimente ausgewählt.

3.2.2.1 Virusgenerierung

Klonierung

Für die Klonierung wurde das modifizierte pSFV1 Plasmid mit einer internen ribosomalen Eintrittsstelle des Poliovirus verwendet. Dieses pSFV1-PV-IRES Plasmid enthält oberhalb des PV-IRES eine singuläre BamHI- und BssHII-Sequenz und unterhalb eine NruI-Sequenz. Gene, die in dieses Plasmid kloniert werden sollen, brauchen eine Kozak-Sequenz und ein Startcodon. Die für alle Snapin und Complexin II codierenden cDNAs enthielten eine Kozak-Sequenz und wurden in die BamHI-BssHII-Sequenz des pSFV1-PV-IRES subkloniert. Die für das eGFP codierende cDNA enthielt ebenfalls eine Kozak-Sequenz und wurde in die BamHI-BssHII-

Sequenz des pSFV1 Polylinker subkloniert. Die virale RNA wurde durch *in-vitro* Transkription von pSFV1 Plasmiden, die für SFV Nicht-Struktur-Proteine kodieren, und von pSFV-helper2 Plasmiden, die für die Strukturproteine (Capsid- und Hüllproteine) kodieren, vorbereitet.

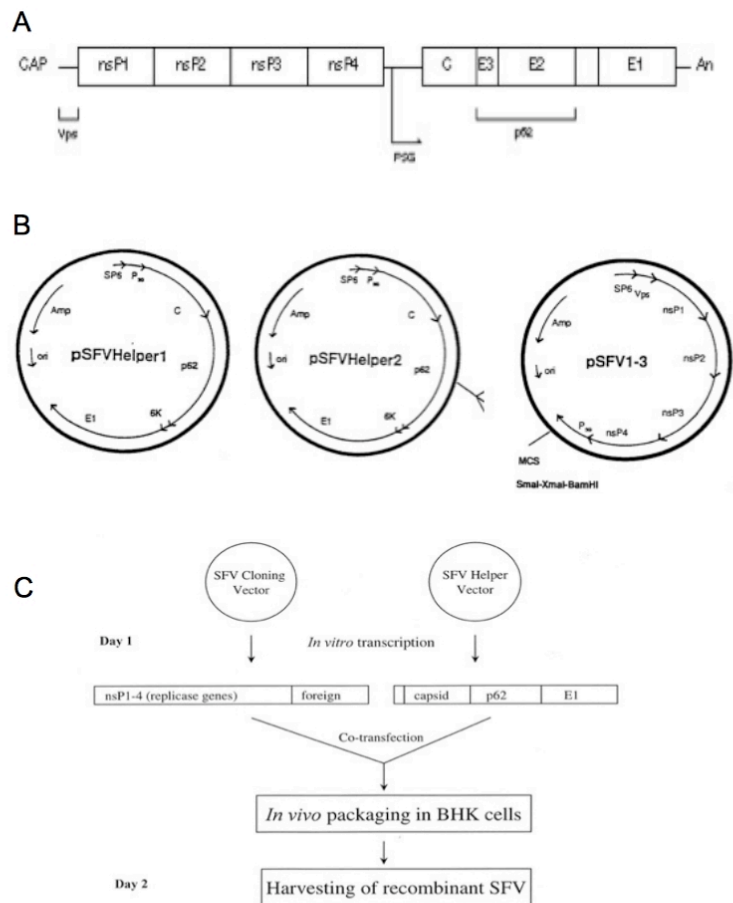


Abb. 9: SFV-Genom (A), DNA-Vektoren zur Generierung von rekombinanten SFV-Partikeln (B) und Generierung von SFV-Partikeln (C)

Das Virusgenom besteht aus den Nichtstrukturproteinen nsP1-4 und den Capsid- und Hüllproteinen C und E1-3, die getrennt voneinander transkribiert werden. Im pSFV-helper2-Plasmid verhindern 3 Punktmutationen in p62 die Proteolyse in E3 und E2. Diese werden erst durch die Zugabe von Chymotrypsin gespalten und das Virus somit infektiös. Die RNA für die Strukturproteine hat kein Verpackungssignal (Vps), weshalb diese nicht in den Viruspartikel aufgenommen werden. Das Virus ist daher nicht replikationsfähig.

An die Nichtstrukturproteine angefügt findet sich das gewünschte Protein (*foreign*), das durch die zusätzlich eingefügte IRES später getrennt transkribiert wird.

(Abb. von Gibco)

Linearisierung der DNA

Die Linearisierung wurde an einer einzelnen Spel-Sequenz unterhalb des Poly-A Schwanz durchgeführt. 25 µl der Linearisierungslösung enthielten 3 µg DNA und wurden für 90 min bei 37° C inkubiert. Um die vollständige Linearisierung zu überprüfen, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. 1 µl DNA wurde in 2 µl 6xLB (Lade-Puffer) und 9 µl Sigma H₂O gelöst und gegen 4 µl 4% λ-Marker als Referenz – ebenfalls in 2 µl 6xLB (Lade-Puffer) und 9 µl Sigma H₂O gelöst – laufen gelassen. Die Elektrophorese wurde für 10 min bei 65 V und anschließend für 50 min bei 80 V durchgeführt. Die DNA wurde nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht bei 312 nm sichtbar gemacht und fotografiert.

Die linearisierte DNA reinigte man mit Phenol/Chloroform und Ethanol auf. 24 µl des restlichen Linearisierungsansatzes wurden mit 200 µl Phenol, 12 µl Chloroform und 176 µl Sigma H₂O gevortext und danach für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert. 200 µl des Überstandes wurden mit derselben Menge Chloroform wiederum gevortext und für 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 20 µl 3 M Natriumacetat und 500 µl kaltem Ethanol (100%) versetzt und in RNA-freie Eppendorfgefäße überführt, um die DNA über Nacht bei -20° C auszufällen. Am nächsten Morgen wurde die DNA für 15-30 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die DNA mit 500 µl kaltem Ethanol (70%) gewaschen. Danach wurde sie gevortext und für weitere 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals verworfen und das gewonnene DNA-Pellet im Excikator getrocknet. Das Pellet wurde in Sigma H₂O resuspendiert und konnte bei -20° C aufbewahrt oder direkt weiterverwertet werden.

In-vitro Transkription

Für die Transkription wurden 5 µl der DNA mit 10 µl 2 x NTP/CAP, 2 µl 10 x *Reaction Buffer*, 2 µl Enzymmix und 1 µl 20 mM GTP (*MMessage mMachine SP6 Kit*, Ambion) gemischt und für 2 Stunden bei 37° C inkubiert. Danach gab man 1 µl DNase dazu und inkubierte die Mischung wiederum für 20 min bei 37° C. Um das Produkt aufzureinigen, wurden 179 µl Sigma H₂O, 200 µl Phenol (hier: Aqua roti Phenol pH 4,5-5 für RNA-Isolierung) und 12 µl Chloroform zugegeben, gevortext und für 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die übrigen Schritte wurden entsprechend der oben beschriebenen DNA-Isolierung durchgeführt. Am nächsten Morgen wurde die RNA zweimal mit kaltem Ethanol gewaschen, gemischt und bei 4° C zentrifugiert und das gewonnene RNA-Pellet in 20 µl Sigma H₂O resuspendiert.

Zur Quantifizierung der gewonnenen RNA führte man eine Gelelektrophorese durch. Für das Gel wurden 0,4 g Agarose in 20 ml DEPC H₂O gelöst und 3 mal kurz in der Mikrowelle aufgekocht. Dieser Ansatz wurde für 2 min im Wärmeschrank bei 37° C geschwenkt und danach mit 5,3 ml 5 x Mops und 4,7 ml Formaldehyd (37%) gemischt und gegossen. 1 µl RNA-Probe wurde mit Lade-Puffer (200 µl Loading Buffer mit 5 µl Ethidiumbromid gevortext) gemischt. Als Marker dienten 3 µl RNA-Ladder gemischt in 8 µl Lade-Puffer. Die Probe und der Marker wurden für 10 min bei 65° C auf dem Heizblock inkubiert. Dann wurden je 10 µl von Probe und Marker auf das Gel aufgetragen. Die Laufzeit in einem Laufpuffer bestehend aus 50 ml 5 x Mops und 200 ml DEPC H₂O betrug 100 min (10 min bei 80 V, danach 90 min bei 100 V). Das Gel wurde photographiert und mit dem RNA-Marker verglichen, um die RNA-Menge abzuschätzen, und die RNA in 10 µg Aliquots geteilt. Diese wurden bei -80° C gelagert.

BHK21 Zellkultur und Elektroporation

Die BHK Zellen wuchsen in Optimem + 2,5% FCS. Um die Zellen zu teilen, wurde das Wachstumsmedium abgesaugt, mit 10 ml Optimem gewaschen und danach 6 ml Trypsin-EDTA hinzugegeben. Nach 1 min waren die Zellen vom Boden gelöst und wurden durch Mischen mit der Pipette vereinzelt. Diese Zellsuspension wurde in 6 ml Optimem + 5% FCS gegeben. Die Zellen wurden insgesamt 3 mal 3 min bei 1300 rpm zentrifugiert und das Pellet jeweils in 10 ml Optimem resuspendiert. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen gezählt und so aufgeteilt, dass man eine Zelldichte von 5×10^5 pro Kulturflasche erreichte. Die Zellen wurden bei 37° C, 5% CO₂ für 2 Tage inkubiert.

Vor der Elektroporation wurden die gleichen Schritte, wie gerade beschrieben, durchgeführt und die Zellen so aufgeteilt, dass man eine Zelldichte von 1×10^7 /ml erhielt. Je 8 µl (8×10^4 Zellen) dieser Zellsuspension wurden in ein *Well* einer *6-Well*-Platte (mit je 3 ml Optimem + 2,5% FCS) für den späteren Virustiterest überführt. Zunächst wurde der Leerwert durch Elektroporation einer Küvette mit 400 µl Optimem ermittelt. Für die Probe gab man 400 µl Zellsuspension (4×10^6 Zellen) zu 10 µg RNA und 10 µg helper2 RNA in eine Küvette. Der Elektroporator (Gene Pulser II, Biorad) wurde auf 360 V, 75 µF und *High Cap* (500 max.) eingestellt und jede Küvette zweimal gepulst. Um die Zellen aus der Küvette zu entnehmen, wurde zweimal je 1 ml Optimem + 2% FCS in die Küvette gegeben, abpipettiert und in eine Kulturflasche überführt. Dann wurden die Zellen bei 31° C, 5% CO₂ für 24 Stunden inkubiert.

Nach dieser Zeit hatte sich das Virus gebildet und war im Medium enthalten. Das Medium wurde in ein Falcon überführt und 5 min bei 4° C mit 2500 rpm zentrifugiert. Das im Überstand enthaltene Virus wurde in 450 µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gelagert.

Virustitertest

Für den Titer test wurde ein Virusaliquot aufgetaut und wie in 3.2.2.2 beschrieben aktiviert. Man setzte eine 1:20 und 1:200 Verdünnung mit Optimem ohne FCS + 0,2% BSA an. Von der für den Titer test vorbereiteten 6-Well-Platte wurde das Medium abgesaugt und jedes Well mit 3 ml Optimem gewaschen. Je 1 ml des verdünnten Virusaliquot wurde in ein Well gegeben und für 90 min bei 37° C, 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde der Überstand erneut abgenommen und durch je 3 ml Optimem mit 2,5% FCS ersetzt und über Nacht bei 37° C, 5% CO₂ inkubiert. Den Titer berechnete man nach Auszählung der fluoreszierenden Zellen unter dem Mikroskop durch die Formel: Anzahl Zellen x Vergrößerungsfaktor x Verdünnung x 2,4 (Verdünnungsfaktor). Der Verdünnungsfaktor errechnete sich aus der Summe der verschiedenen Lösungen dividiert durch das Volumen des Virusaliquots.

3.2.2.2 Virusaktivierung

Die bei -80° C eingefrorenen Virusaliquots (450 µl) wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Jedem Aliquot wurde die gleiche Menge Optimem ohne FCS + 0,2% BSA und 100 µl Chymotrypsin zugesetzt und für 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 110 µl Aprotinin hinzugegeben, um die Chymotrypsinaktivität zu stoppen, und für weitere 4 Minuten inkubiert, bevor das Virus für eine Infektion benutzt wurde. Alle Viren wurden bis maximal drei Tage nach Aktivierung genutzt.

3.2.2.3 Virusinfektion

Die Chromaffinzellen wurden mit je 100 µl aktiviertem Virus für 4 Stunden bei 37° C und 13% CO₂ inkubiert, bevor sie für ein Experiment gebraucht wurden. Die Kontrolle, ob eine Zelle das gewünschte Protein exprimiert, erfolgte während des Experi-

ments. Die im Messaufbau befindlichen Zellen wurden über den Monochromator mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und wiesen bei einer erfolgreichen Infektion grüne Fluoreszenz auf.

3.2.3 Elektrophysiologie

3.2.3.1 *Patch-Clamp*-Technik und Kapazitätsmessung

Die *Patch-Clamp*-Technik ermöglicht es, funktionelle Eigenschaften von Zellen oder Membranen, wie elektrische Ströme oder Exozytose, zu messen und zu untersuchen. Ursprünglich entwickelt, um kleinste Ströme an einzelnen Kanälen zu messen (Neher and Sakmann, 1976), erlauben modifizierte Anwendungen dieser Technik vielfältige Einblicke in die Physiologie von Zellen oder zellfreien Membranstücken (Hamill et al., 1981) und sind in der Lage, auch komplexe Prozesse wie Endo- und Exozytose aufzuzeichnen (Neher and Marty, 1982; Lindau and Neher, 1988).

Nach dem Heranfahren der Patchpipette an die Zelle und der Etablierung einer hochohmigen Abdichtung zwischen Pipettenspitze und Extrazellulärraum (sog. *Giga-Seal*) befindet man sich in der *Cell-Attached*-Konfiguration. Die elektrische Isolation in der Größenordnung von mehreren Giga-Ohm reduziert das Hintergrundrauschen und den Leckstrom auf ein Minimum und ermöglicht es so, zum Beispiel die Aktivität einzelner Ionenkanäle zu registrieren. Wird die Membran unter der Pipettenspitze durch vorsichtiges Saugen durchbrochen, erreicht man die *Whole-Cell*-Konfiguration (siehe Abb. 10 und 11).

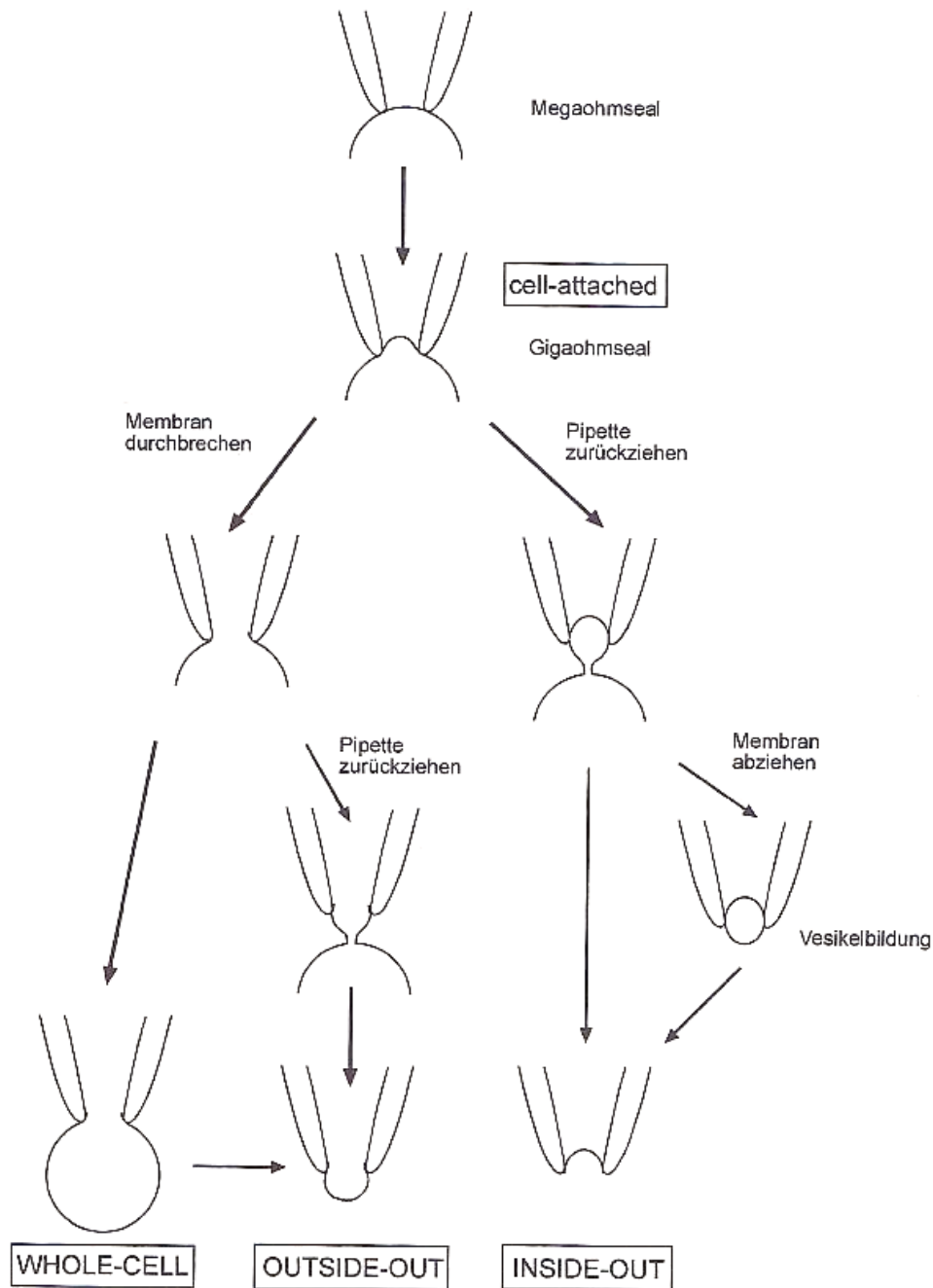


Abb. 10: Schematische Darstellung verschiedener Patch-Konfigurationen
 Modifiziert nach Hamill et al., 1981

Diese ist charakterisiert durch einen niedrigen Serienwiderstand und Leckstrom und erlaubt die Kontrolle des Membranpotentials und des intrazellulären Milieus, da das Zytosol nun mit der Pipettenlösung ausgetauscht wird. So ist es möglich, unter kontrollierten Bedingungen Prozesse zu messen, die die ganze Zelle betreffen. Die *Whole-Cell*-Konfiguration stellt nicht nur eine verbesserte Spannungsklemme (*Voltage-*

Clamp) dar, da im Vergleich zur früheren Methode des Einstechens von Mikroelektroden der Leckstrom stark reduziert ist und so auch kleine Zellen gemessen werden können, sondern gestattet es, über Kapazitätsänderung Exozytose direkt zu messen.

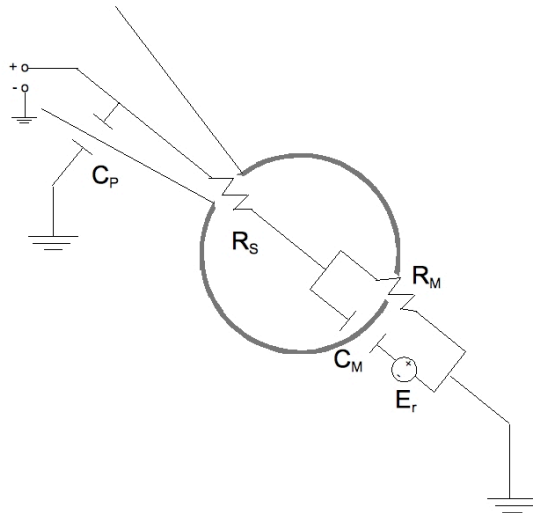


Abb. 11: Schematische Darstellung der elektrischen Eigenschaften einer Zelle im *Whole-Cell-Modus*

Stromkreis bestehend aus Serienwiderstand R_S , Membranwiderstand R_M und Membrankapazität C_M . E_r ist die für das Haltepotential (DC) verantwortliche Spannung. C_P steht für die Kapazität der Pipette.

Prinzipiell ist es möglich, die Kapazität einer Zelle über die Stromantwort auf die Applizierung eines Rechteck-Spannungspulses im *Whole-Cell-Modus* zu errechnen. Grundlage hierfür ist das in Abb. 11 dargestellte elektrische Modell einer Zelle, das eine kugelartige Form ohne Membranausstülpungen voraussetzt.

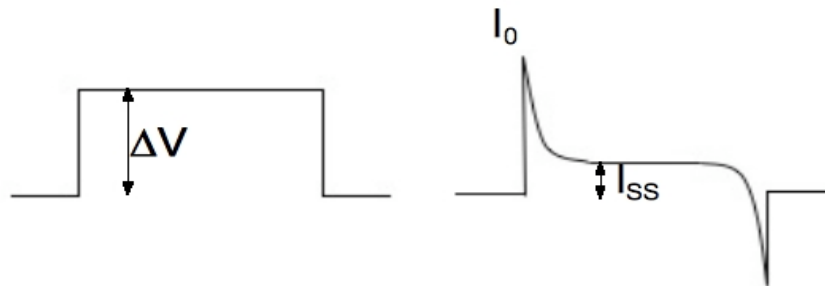


Abb. 12: Stromantwort auf die Applizierung eines Rechteckspannungspulses

Nach der initialen Aufladung des Kondensators (I_0) fließt der Strom im *SteadyState* (I_{SS}).

Der Graph der Stromantwort lässt sich durch die Funktion $I(t) = (I_0 - I_{SS}) e^{-\frac{t}{\tau}} + I_{SS}$ beschreiben. Initial wird der Kondensator aufgeladen und nachdem dies geschehen ist, fließt ein konstanter Strom. Zu Beginn fällt die komplette Spannung über dem Serienwiderstand R_S ab: $I_0 = \frac{\Delta V}{R_S}$.

Nachdem der Kondensator voll geladen ist (*Steady State*), fließt der gesamte Strom über die in Serie geschalteten Widerstände: $I_{SS} = \frac{\Delta V}{R_S + R_M}$. Der Kondensator wird mit der Zeitkonstanten $\tau = R_p C_M$ über die parallele Kombination R_p der Widerstände R_S und R_M geladen:

$$R_p = \frac{R_S R_M}{R_S + R_M}.$$

Aus der Auflösung der obigen Gleichungen lassen sich die drei Parameter R_S , R_M und C_M errechnen:

$$R_S = \frac{\Delta V}{I_0}$$

$$R_M = \frac{\Delta V - R_S I_{SS}}{I_{SS}}$$

$$C_M = \tau \left(\frac{1}{R_S} + \frac{1}{R_M} \right)$$

Die mit dieser Methode (die sog. *Time-Domain*-Technik) beobachteten Kapazitätsänderungen konnten erstmalig mit exozytotischen Vorgängen korreliert werden. Nichtsdestotrotz ist eine solche Kapazitätsmessung fehlerträchtig, da beispielsweise bei der Verwendung von Filtern von den oben genannten idealen Bedingungen abgewichen wird und somit die Parameter nicht mehr korrekt errechnet werden können. Zudem kann unter anderem die nicht berücksichtigte Kapazität der Pipette zu Fehleinschätzungen des Ladestroms I_0 führen.

Ein neuerer und für die hier durchgeführten Experimente genutzter Ansatz stellt die Nutzung eines sinusförmigen Stimulus anstatt des Rechteck-Spannungs-Pulses dar. Durch die Applizierung eines solchen Stimulus auf den in Abb. 11 dargestellten Stromkreis, bestehend aus Widerständen und Kondensatoren, erhält man eine ebenfalls sinusförmige Stromantwort mit einer geänderten Amplitude und einer durch den Kondensator bedingten Phasenverschiebung von 90° . Aufgrund der Gleichartigkeit der Antwort fallen die bei der *Time-Domain*-Technik beobachteten Fehlerquellen größtenteils weg. Wenn man neben dem Sinusstimulus noch ein Haltepotential appliziert, können die drei Parameter R_S , R_M und C_M – ebenso wie mit der *Time-Domain*-Technik, aber exakter – abgeschätzt werden (für Einzelheiten siehe Sakmann, Neher: „*Single-Channel Recording*“, 1995). Die Amplitude und Phasenverschiebung des Stroms werden mithilfe eines phasensensitiven Detektors (*Lock-In*-Verstärker) gemessen und analysiert. Diese Technik wird „Lindau-Neher“-Technik

oder auch „*Sine-Wave + DC*“-Technik genannt. Bedingt durch eine hohe Stimulationsfrequenz erhält man eine höhere zeitliche Auflösung. So ist es möglich, exozytische Prozesse zu registrieren, die sich im Bereich von Millisekunden abspielen (eine Frequenz von 1 kHz bedeutet eine Auflösung von 1 ms).

Für die durchgeführten Experimente wurde eine sinusförmige Anregung mit einer Frequenz von 2 kHz und einer Amplitude von 30 mV appliziert. Das Haltepotential wurde auf -70 mV gesetzt. Es wurden Pipetten mit einem Widerstand von 2-4 M Ω benutzt, die Serienwiderstände <10 M Ω ergeben, um so eine möglichst rauscharme Messung zu gewährleisten.

3.2.3.2 Amperometrie

Neben der oben beschriebenen Kapazitätsmessung besteht die Möglichkeit, die Ausschüttung von Neurotransmittern mittels Amperometrie direkt zu detektieren. Bei dieser Technik wird eine Kohlefaser mit einer Spannung von +800 mV anliegend an die Zelle herangeführt. Verschiedene Neurotransmitter, wie die von Chromaffinzellen oder auch von Neuronen freigesetzten Monoamine, sind oxidierbar (Bruns and Jahn, 1995). Diffundieren diese an die Kohlefaser, wird das Transmittermolekül oxidiert, wodurch ein kleiner Strom über die Faser fließt, der sich messen lässt (Chow et al., 1992). Eine in die Extrazellulärlösung eingetauchte Kohlefaser weist einen hohen Widerstand auf, so dass kaum Strom fließt. Im Gegensatz zur Kapazitätsmessung wird nur die tatsächlich stattfindende Sekretion von Neurotransmittern gemessen, ohne durch eventuell gleichzeitige Endozytose oder Exozytose von leeren Vesikeln ein verzerrtes Bild zu erhalten. Die Kombination von Kapazitäts- und Amperometrie-messungen ermöglicht so eine differenziertere Beobachtung der Ausschüttung von Neurotransmittern als jede Technik für sich. Die Kohlefasern wurden nach dem vorliegenden Protokoll gefertigt (Bruns, 2004) und vor Beginn bzw. nach der Messung an einer Zelle mit einer Mikroschere geschnitten, um eine saubere Detektionsoberfläche zu erhalten. Die Messdaten wurden mit einem EPC-7-Verstärker aufgenommen.

3.2.3.3 Photolyse von Nitrophenyl-EGTA

Um die calciumabhängige Exozytose zu untersuchen, wurde der UV-instabile Calciumchelator NP-EGTA verwendet. Durch einen kurzen UV-Lichtblitz (*Flash*) zerfällt das NP-EGTA ($K_d=80$ nM; Zerfallsprodukt: $K_d=1$ mM) und setzt dadurch schlagartig das gebundene Calcium frei (Ellis-Davies and Kaplan, 1994). Die intrazelluläre Calciumkonzentration wurde in Experimenten mit einem *Flash* auf ~ 5 μ M und in Experimenten mit zwei *Flashes* zunächst auf ~ 5 μ M und dann auf ~ 25 μ M gehoben. Um ein möglichst gleiches Calciumlevel zu erreichen, wurde der zweite *Flash* teilweise mit Neutralfiltern abgeschwächt.

3.2.3.4 $[Ca^{2+}]_i$ -Messung und -Kalibration

Die Überwachung der intrazellulären Calciumkonzentration wurde durch die kombinierte Nutzung zweier calciumsensitiver Fluoreszenz-Farbstoffe gewährleistet. Zum einen wurde Fura-4F mit einer hohen Calcium-Affinität ($K_d=770$ nM) für den nanomolaren Bereich, zum anderen Fura-2 mit einer niedrigen Calcium-Affinität ($K_d=25$ μ M) für den mikromolaren Bereich eingesetzt (Grynkiewicz et al., 1985; Martinez-Zaguilan et al., 1998). Die Mischung dieser beiden Farbstoffe ermöglicht es, über einen weiten Bereich die intrazelluläre Calciumkonzentration präzise zu messen (Regehr and Atluri, 1995; Paredes et al., 2008). Durch die Bindung von Calcium zeigen die beiden Farbstoffe eine Absorptionsverschiebung, die sich bei Anregung im Bereich zwischen 300 nm und 400 nm beobachten lässt. Die Emission wird bei ~ 510 nm gemessen (Abb. 13).

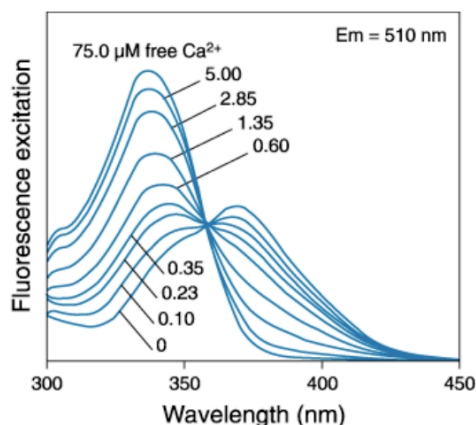


Abb. 13: Anregungsspektrum von Fura-4F

Charakteristisches Spektrum bei unterschiedlichen $[Ca^{2+}]_i$.

Bei Anregung zwischen 300 nm und 400 nm lassen sich 2 Maxima unterscheiden. Die Mischung aus Fura-4F und Fura-2 wird bei 350/380 nm angeregt.

(Download von www.invitrogen.com)

Bei einer alternierenden Anregung der Farbstoffe durch Licht einer Wellenlänge von 350 nm und 380 nm emittiert jeder Farbstoff mit einer gewissen Intensität, die von der freien Calciumkonzentration abhängig ist. Durch die Bildung eines Quotienten aus den Emissionswerten der beiden Farbstoffe bei unterschiedlichen intrazellulären Calciumkonzentrationen erhält man die *Ratio* $r = \frac{E_{380}}{E_{350}}$, die nach Kalibrierung den gesuchten Ca^{2+} -Wert ergibt.

Für die ratiometrische *in vivo*-Kalibrierung wurden Chromaffinzellen mit Intrazellulärlösungen bekannter Calciumkonzentrationen *gepatcht* und im *Whole-Cell*-Modus die Emission gemessen. Das freie Calcium wurde durch die Calcium-Chelatoren BAPTA oder DPTA gepuffert.

Tab. 1: Kalibrierungslösungen

Calcium Calibration Solution of 2-dyes ((Fura-4F and Fura-2) (2006-9-19)

	Sol_1	Sol_2	Sol_3	Sol_4	Sol_5	Sol_6	Sol_7	Sol_8	Sol_9a	Sol_9	Sol_10	Sol_12	Sol_11
Cs/Glu/Hepes (2x)	25.6 µl (PH=7.2, 582 mOsm)	22 µl (PH=7.3, 590 mOsm)	19.4 µl (PH=7.3, 590 mOsm)	17.8 µl (PH=7.3, 590 mOsm)	17.6 µl (PH=7.4, 592 mOsm)	21.8 µl (PH=7.4, 592 mOsm)	21.1 µl (PH=7.5, 598 mOsm)	20 µl (PH=7.7, 608 mOsm)	18.2 µl (PH=8.26, 631 mOsm)	18.6 µl (PH=7.8, 618 mOsm)	15.2 µl (PH=9, 674 mOsm)	14.3 µl (PH=9.43, 706 mOsm)	36.5 µl (PH=7.3, 590 mOsm)
Nucleotides (10x, ATP, 20 mM; GTP, 2 mM, 55 mOsm)	8 µl [2 mM]	8 µl [2mM]	8 µl [2mM]	8 µl [2 mM]	8 µl [2 mM]	8 µl [2 mM]	8 µl [2 mM]	8 µl [2 mM]	8 µl [2 mM]	8 µl [2 mM]	8 µl [2 mM]	8 µl [2 mM]	8 µl [2 mM]
Dye-Mixture (12.5X, Fura-4F, 5 mM; Fura-2, 5 mM)	6.4 µl [0.4 mM]	6.4 µl [0.4 mM]	6.4 µl [0.4 mM]	6.4 µl [0.4 mM]	6.4 µl [0.4 mM]	6.4 µl [0.4 mM]	6.4 µl [0.4 mM]	6.4 µl [0.4 mM]	6.4 µl [0.4 mM]	6.4 µl [0.4 mM]	6.4 µl [0.4 mM]	6.4 µl [0.4 mM]	6.4 µl [0.4 mM]
BAPTA 0.1 M (304 mOsm) purity 80%	28 µl [28 mM]	28 µl [28 mM]	28 µl [28 mM]	28 µl [28 mM]	26 µl [26 mM]	-	-	-	-	-	-	-	-
DPTA 0.1M (316 mOsm) purity 98%	-	-	-	-	-	32 µl [39.2 mM]	32 µl [39.2 mM]	32 µl [39.2 mM]	32 µl [39.2 mM]	32 µl [39.2 mM]	32 µl [39.2 mM]	28 µl [34.3 mM]	-
CaCl ₂ 0.1M (255 mOsm)	-	8.1 µl [10 mM]	13.6 µl [17 mM]	17.2 µl [21.5 mM]	17.6 µl [22 mM]	1.6 µl [2 mM]	2.8 µl [3.5 mM]	4.4 µl [5.5 mM]	7.2 µl [9 mM]	7.2 µl [9 mM]	12 µl [15 mM]	17.6 µl [22 mM]	8 µl [10 mM]
ddH ₂ O	12 µl	7.5 µl	4.6 µl	2.6 µl	4.4 µl	10.2 µl	9.7 µl	9.2 µl	8.2 µl	7.8 µl	6.4 µl	5.7 µl	21.1 µl
Total	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl
Osm calculated	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
[Ca ²⁺] _{free}	0	124 nM	343 nM	721 nM	1.16 µM	3.64 µM	7 µM	12.1 µM	22.6 µM	22.6 µM	47.5 µM	132 µM	7.63 mM
PH	7.15	7.19	7.24	7.15	7.22	7.16	7.17	7.23	7.24	7.05	7.16	7.2	7.17
[Ca ²⁺] _{free} recalculated from PH	0	127 nM	338 nM	735 nM	1.16 µM	4.07 µM	7.68 µM	11.1 µM	20.2 µM	35.32 µM	53.4 µM	132 µM	7.63 mM

Solution with NP-EGTA : [Ca²⁺]_{free} =329 nM, PH=7.23, [Ca²⁺]_{free} recalculated from PH=320 nM, Ratio in vitro is 0.39

Solution with NP-EGTA : [Ca²⁺]_{free} =12.2 µM, PH=7.25, [Ca²⁺]_{free} recalculated from PH=10.58 µM, Ratio in vitro is 0.74

Die erhaltenen Werte wurden halblogarithmisch aufgetragen (Voets, 2000). Die Abhängigkeit der *Ratio* von der intrazellulären Calciumkonzentration lässt sich durch die

$$\text{Funktion } r = r_0 - r_1 \frac{[Ca^{2+}]_i}{[Ca^{2+}]_i + k_1} - r_2 \frac{[Ca^{2+}]_i}{[Ca^{2+}]_i + k_2} \text{ beschreiben.}$$

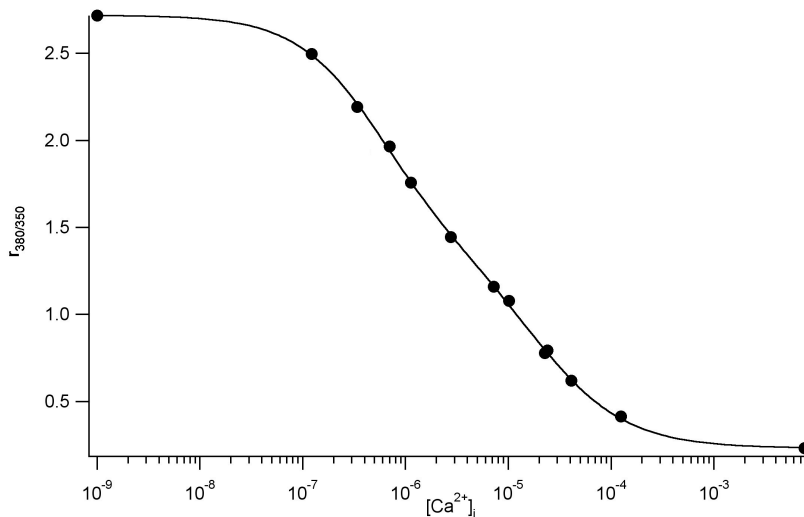


Abb. 14: *In vivo*-Kalibrierungskurve der Ca²⁺-Farbstoffe Fura-4f/Fura2

Für die Kalibrierung wurden die Messergebnisse von 5-10 Zellen pro Ca²⁺-Wert gemittelt. Jede *Ratio* entspricht einem definiertem Ca²⁺-Wert. So ist es möglich, die exakte [Ca²⁺]_i zu ermitteln.

3.2.3.5 Datenanalyse

Die aus den Kapazitätsmessungen gewonnenen Daten wurden mit dem Programm IGOR Pro 6.04 ausgewertet. Die Messkurven wurden mit einer Funktion *gefittet*, die eine oder zwei Exponentialfunktionen und eine lineare Komponente aufweist:

$$f(t) = A_0 + A_f(1 - e^{-\frac{t}{\tau_f}}) + kt$$

$$f(t) = A_0 + A_f(1 - e^{-\frac{t}{\tau_f}}) + A_s(1 - e^{-\frac{t}{\tau_s}}) + kt$$

Hierbei steht A_0 für die Ausgangskapazität. A_f und A_s bzw. τ_f und τ_s stehen für Amplitude bzw. Zeitkonstante der schnellen und langsamen Komponente.

Zur Überprüfung der Signifikanz wurde der Mann-Whitney-U-Test bei dem Vergleich der *Pool*-Größen genutzt. Für die Auswertung der Ratio AF1/AF2 wurde der Wilcoxon-Test (nicht-parametrischer Rangsummentest) gewählt (siehe 4.2).

4. Ergebnisse

4.1 Effekte von Snapin auf den HCSP

Von Snapin wurde berichtet, dass es die schnelle Komponente der Kapazitätsantwort bei *Flash*-Experimenten vergrößert (Thakur et al., 2004; Tian et al., 2005). Ziel war es herauszufinden, ob Snapin hierbei eine besondere Bedeutung für die hochcalcium-sensitive Exozytose hat. Ich überexprimierte Snapin mithilfe des Semliki-Forest-Virus in Chromaffinzellen der Maus. Alle Experimente wurden im *Whole-Cell*-Modus durchgeführt.

4.1.1 Snapin in Depolarisationsexperimenten

Zunächst sollte untersucht werden, ob sich ein Effekt von Snapin durch die Stimulation der Zelle mit Depolarisationen zeigt. Hierfür wurde ein Protokoll bestehend aus einer Serie von 6 kurzen Depolarisationen à 10 ms (0 mV) und 4 langen Depolarisationen à 100 ms (0 mV) gewählt. Ein ähnliches Protokoll wurde von Thomas Voets genutzt, um damit den *Readily Releasable Pool* RRP zu leeren (Voets et al., 1999). Damit die Daten mit den für später geplanten *Flash*-Experimenten besser vergleichbar waren, nutzte ich die gleichen Lösungen sowohl extra- als auch intrazellulär, wie sie auch für die *Flash*-Experimente vorgesehen waren. Da die intrazelluläre Lösung neben dem UV-instabilen Calcium-Chelator NP-EGTA noch Fura-4F-Farbstoff enthielt, war es möglich, die globale intrazelluläre Calciumkonzentration während des gesamten Protokolls zu überwachen. Extrazellulär verwendete ich eine Lösung, die im Vergleich zu normalen Ringerlösungen ein mit 2,5 mM relativ erhöhtes Calcium aufwies. Dies sollte sicherstellen, dass ein großer Konzentrationsgradient über der Membran bestand, um so einen ausreichenden Calcium-Einstrom in die Zelle durch die Depolarisationen zu erreichen.

Durch die Depolarisationen wurde die intrazelluläre Calciumkonzentration schrittweise angehoben und parallel dazu die Kapazitätsantwort registriert (siehe Abb. 15). Da ich (Snapin)-infizierte Zellen mit Wildtypzellen verglich, unterschied sich der Calciumeinstrom bei beiden Zelltypen (Ashery et al., 1999). Die intrazelluläre Calciumkonzentration wurde durch die Depolarisationen bei den Kontrollzellen von $514 \text{ nM} \pm$

26,4 nM auf $1,46 \mu\text{M} \pm 0,13 \mu\text{M}$ und von $604 \text{ nM} \pm 21,2 \text{ nM}$ auf $1,27 \mu\text{M} \pm 0,05 \mu\text{M}$ bei den Snapin-überexprimierenden Zellen gehoben. Es zeigte sich, dass bei annähernd gleichem Calcium mit $36,7 \text{ fF} \pm 5,14 \text{ fF}$ (Kontrollen) bzw. $36,4 \text{ fF} \pm 4,98 \text{ fF}$ (Snapin) kein Unterschied in der Kapazitätsantwort der beiden Gruppen zu sehen war.

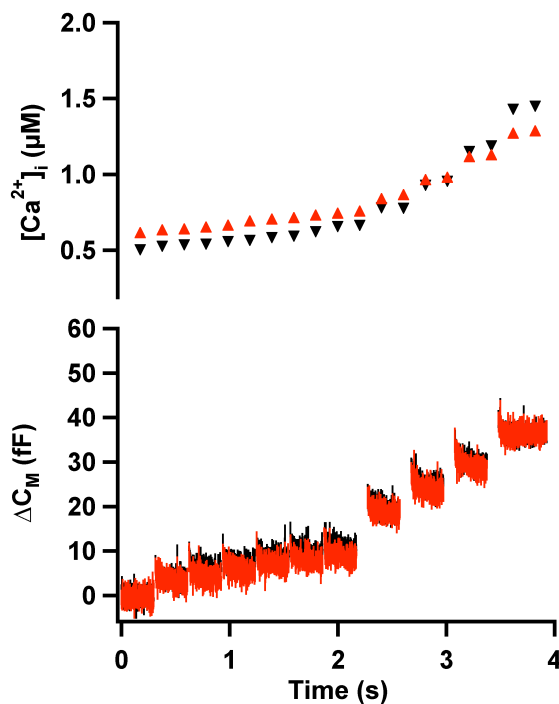


Abb. 15: Kapazitätsantwort von Snapin-überexprimierenden Zellen auf eine Serie von Depolarisationen

Gemittelte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und Kapazitätsantwort ($n=19$, $N=6$). Eine Stimulation aus einer Serie von 6 kurzen (10 ms; 0 mV) und 4 langen (100 ms; 0 mV) Depolarisationen zeigt keinen Unterschied zwischen snapin-überexprimierenden Zellen (rot) und Wildtypzellen (schwarz). Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde während des gesamten Experiments durch Fura-Messungen überwacht.

Nach den Ergebnissen von Yang und Voets konnte man davon ausgehen, dass ich mit diesem Protokoll den *Immediately Releasable Pool* IRP freisetzen konnte (Voets et al., 1999; Yang et al., 2002). Somit schien Snapin keinen Effekt auf diesen *Pool* zu haben. Daraufhin kam die Frage auf, ob mit einer solchen Stimulation tatsächlich nur der IRP oder auch andere *Pools*, wie der *Highly Calcium-Sensitive Pool* HCSP, ausgeschüttet werden. Yan Yang hatte gezeigt, dass der HCSP nicht in der Nähe von Calcium-Kanälen und damit auch nicht durch kurze Depolarisationen freisetzbar war, die die intrazelluläre Calciumkonzentration in Mikrodomänen um die Kanäle sehr viel stärker erhöhen als global (Garcia et al., 2006; Oheim et al., 2006). Da ich das globale Calcium in meinem Versuch präzise kontrollieren konnte, stellte sich die zusätzlich Frage, ob mit dieser Stimulation schon die kritische Schwelle für die Ausschüttung des HCSP erreicht war. Die Antworten auf diese Fragen versuchte ich mit einem an-

deren Stimulationsprotokoll zu finden, bei dem ich das globale Calcium schlagartig durch einen *UV-Flash* erhöhte.

4.1.2 Vergrößerung des HCSP durch Snapin

Um eine genauere Differenzierung der Pools zu ermöglichen, wurde nun ein Protokoll mit einer Kombination aus einem *UV-Flash*, gefolgt nach 300 ms von 11 Depolarisationen à 30 ms (0 mV) verwandt (modifiziert nach Yang). Zu Beginn versuchte ich die Schwelle zu finden, ab der eine schlagartige Sekretion als Antwort auf den *UV-Flash* zu beobachten war. Diese Schwelle variierte von Zelle zu Zelle, lag im Schnitt aber bei ca. 4,5 – 5,0 μM *Postflash*-Calcium. Wenn diese Schwelle nicht erreicht wurde, war entweder keine oder eine linear ansteigende, stetige Sekretion zu sehen. Der HCSP wurde als kleiner *Pool* mit einer schnellen Zeitkonstante beschrieben, so dass ich davon ausgehen konnte, noch nicht den HCSP auszuschütten. Diese Annahme bestärkend wurde eine adäquate (schlagartige) Kapazitätsantwort am besten mit einer einzelexponentiellen Funktion, d. h. mit nur einer Zeitkonstanten, beschrieben. Aufgrund dieser beiden Beobachtungen war nicht nur davon auszugehen, den HCSP auszuschütten, sondern auch ihn in einem Bereich $5 \mu\text{M} > [\text{Ca}^{2+}]_i > 10 \mu\text{M}$ allein zu entleeren. Die auf den *Flash* folgenden Depolarisationen lösten nur eine kleine Antwort aus (siehe Abb. 16).

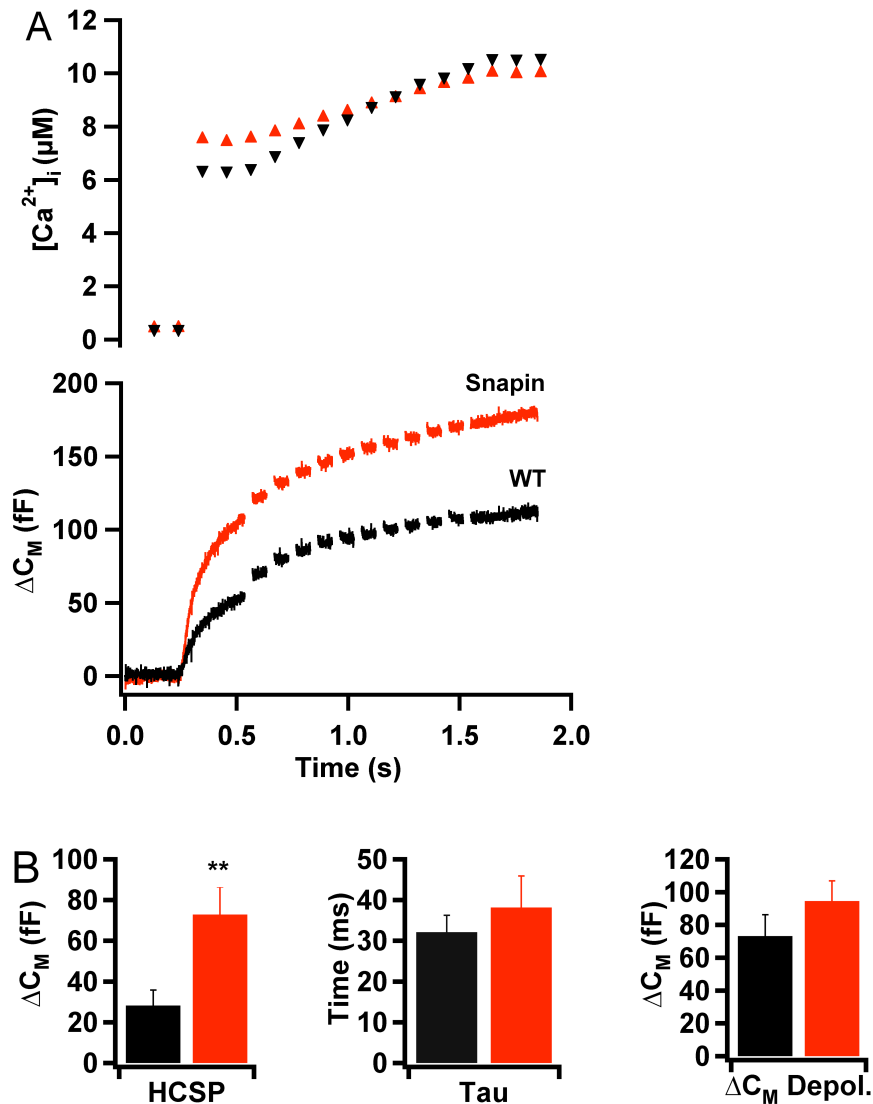


Abb. 16: Kapazitätsantwort von Snapin-überexprimierenden Zellen auf eine Kombination bestehend aus einem UV-Flash und Depolarisationen

A. Gemittelte $[Ca^{2+}]_i$ und Kapazitätsantwort ($n=21$, $N=5$). Flash-Photolyse von Ca^{2+} auf Werte $5 \mu M < [Ca^{2+}]_i < 10 \mu M$ löst eine schlagartige Sekretion aus. Die Kapazitätsantwort ist in den snapin-überexprimierenden Zellen erhöht, wobei die Depolarisationsantwort (11 Depolarisationen je 30 ms, 0 mV) keinen Unterschied zeigt.

B. Quantitative Analyse der HCSP-Größe und -Zeitkonstanten, sowie relative Kapazitätsantwort (ΔC_M) auf die Depolarisationen (** $p < 0,01$)

Bei annähernd gleichem *Preflash*-Calcium (Wildtyp: $396 \text{ nM} \pm 35,2 \text{ nM}$, Snapin: $428 \text{ nM} \pm 22,9 \text{ nM}$) wurde die intrazelluläre Calcium-Konzentration durch den *Flash* auf $6,37 \mu M \pm 0,39 \mu M$ (Wildtyp) bzw. $7,52 \mu M \pm 0,32 \mu M$ (Snapin) gehoben (siehe Abb. 16 a). Die schnelle Komponente der Kapazitätsantwort auf den *Flash* betrug $28,2 \text{ fF} \pm 7,6 \text{ fF}$ (Kontrollen) bzw. $72,9 \text{ fF} \pm 13,6 \text{ fF}$ (Snapin). Die Berechnung der re-

lativen Kapazitätsantwort als Differenz aus der gesamten Sekretion und der gefitteten Amplitude der *Flash*-Antwort, ergab für die Kontrollzellen $73,3 \text{ fF} \pm 13,0 \text{ fF}$ sowie für die snapin-überexprimierenden Zellen $94,6 \text{ fF} \pm 12,3 \text{ fF}$ (siehe Abb. 16 b).

Im Vergleich der snapin-überexprimierenden Zellen zu den Wildtypzellen zeigte sich bei annähernd gleichen Zeitkonstanten ein selektiv vergrößerter HCSP ($p < 0,01$). Die Antwort auf die Depolarisationen zeigte keinen signifikanten Unterschied.

4.1.3 Volle Funktionalität von Snapin erfordert Phosphorylierung

Aus früheren Publikationen ist bekannt, dass die Phosphorylierung von Snapin eine wesentliche Rolle für die Funktionstüchtigkeit dieses Proteins spielt (Thakur et al., 2004). Aufgrund dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, ob die Phosphorylierung auch für den Effekt von Snapin auf den HCSP von Bedeutung ist. Um dies herauszufinden, infizierte ich Chromaffinzellen mit Snapinmutanten, die eine Punktmutation an einem Serin (S50) aufwiesen. Ein anstelle des Serins eingesetztes Alanin (S50A) verhinderte eine Phosphorylierung, wohingegen ein Aspartat (S50D) einen phosphorylierten Status des Snapins simulierte. Für den Vergleich dieser beiden Punktmutationen verwendete ich das Kombinationsprotokoll aus dem vorherigen Experiment (vergleiche Abb. 16).

Bei annähernd gleichem *Preflash*-Calcium (S50A: $438 \text{ nM} \pm 15 \text{ nM}$, S50D: $424 \text{ nM} \pm 20 \text{ nM}$) wurde die intrazelluläre Calcium-Konzentration durch den *Flash* auf $5,98 \text{ } \mu\text{M} \pm 0,35 \text{ } \mu\text{M}$ (S50A) bzw. $5,72 \text{ } \mu\text{M} \pm 0,27 \text{ } \mu\text{M}$ (S50D) gehoben. Die schnelle Komponente der Kapazitätsantwort auf den *Flash* betrug $20,5 \text{ fF} \pm 4,2 \text{ fF}$ (S50A) bzw. $51,2 \text{ fF} \pm 6,8 \text{ fF}$ (S50D). Die Berechnung der relativen Kapazitätsantwort als Differenz aus der gesamten Sekretion und der gefitteten Amplitude der *Flash*-Antwort ergab für die S50A-Zellen $65,1 \text{ fF} \pm 9,8 \text{ fF}$ sowie für die S50D-Zellen $92,1 \text{ fF} \pm 12,9 \text{ fF}$.

Die phosphomimetische Mutante S50D wies bei gleicher intrazellulärer Calciumkonzentration einen signifikant größeren HCSP auf als die unphosphorylierte Mutante S50A. Die Antwort auf die Depolarisationen zeigte wiederum keinen signifikanten Unterschied (siehe Abb. 17).

Somit war davon auszugehen, dass der Phosphorylierungsstatus von Snapin einen wesentlichen Einfluss auf dessen Funktion und damit auf die Wirkung auf den HCSP hat ($p < 0,01$).

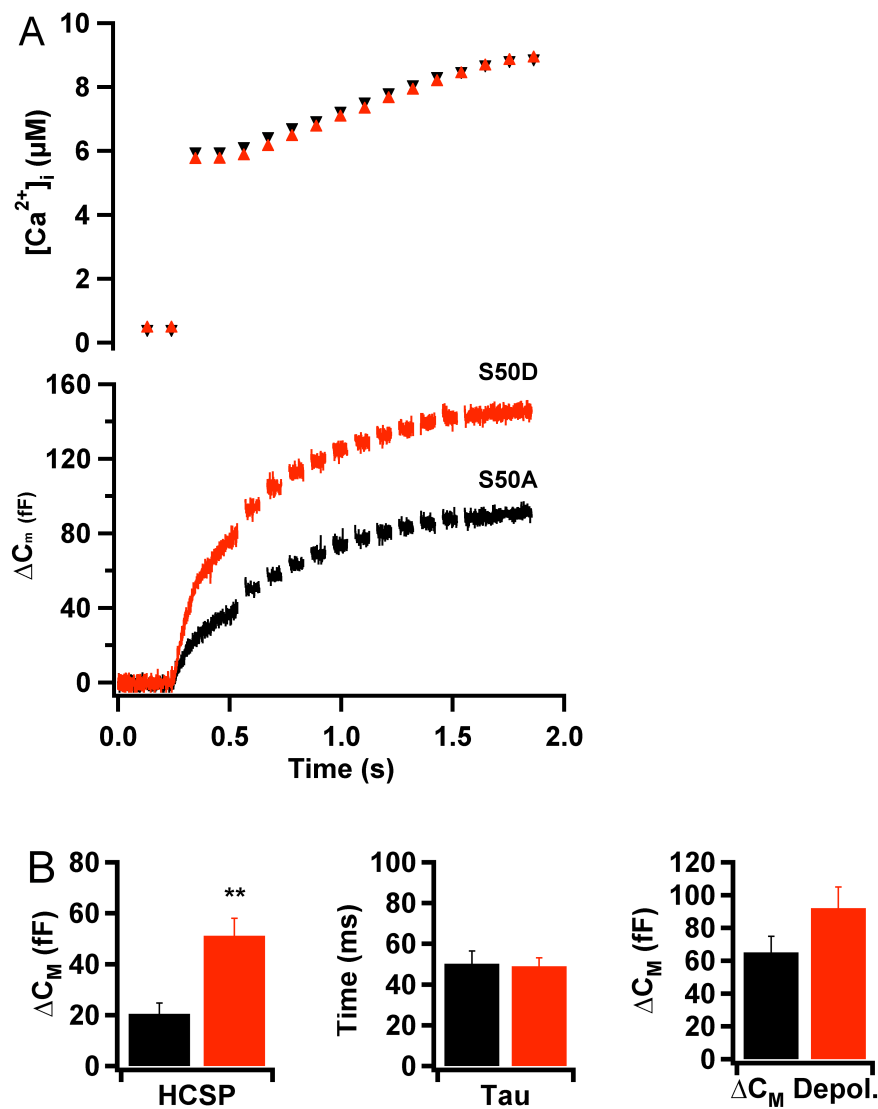


Abb. 17: Kapazitätsantwort von snapin-S50A und snapin-S50D-überexprimierenden Zellen auf eine Kombination bestehend aus einem UV-Flash und Depolarisationen

A. Gemittelte $[Ca^{2+}]_i$ und Kapazitätsantwort ($n=20$, $N=8$). Flash-Photolyse von Ca^{2+} auf Werte $5 \mu M < [Ca^{2+}]_i < 10 \mu M$ löst eine schlagartige Sekretion aus. Die Flashantwort der phosphomimetischen Mutante S50D war vergrößert, was einen Einfluss des Phosphorylierungsstatus nahelegt.

B. Quantitative Analyse der HCSP-Größe und -Zeitkonstanten, sowie relative Kapazitätsantwort (ΔC_M) auf die Depolarisationen. (** $p < 0,01$)

4.1.4 Selektive Vergrößerung des HCSP durch Snapin

In den vorherigen Experimenten zeigte sich eine Vergrößerung des HCSP durch Snapin, aber die nachfolgenden Depolarisationen lösten immer nur eine kleine Kapazitätsantwort aus (vergleiche Abb. 16 u. 17). Da ich davon ausging, nur den HCSP, als Teil des RRP, freizusetzen, war zu vermuten, dass die Depolarisationen nicht in der Lage waren, den Rest des RRP bzw. des SRP zu leeren. Ein eventueller Effekt von Snapin auf diese *Pools* konnte also nicht beurteilt werden. Um alle *Pools* zu leeren, nutzte ich ein neues Protokoll, welches aus zwei UV-*Flashes* bestand. Der erste *Flash* sollte wie in den vorangegangenen Versuchen den HCSP leeren. Ein zweiter *Flash*, im Abstand von einer Sekunde zum ersten, sollte die restlichen *Pools* leeren. Die beiden *Flashes* wurden über einen externen Pulse-Stimulator getriggert und hatten die gleiche Intensität. So konnte die intrazelluläre Calciumkonzentration mit dem ersten *Flash* auf Werte zwischen 3,5-10 μM und mit dem zweiten *Flash* auf Werte zwischen 20-30 μM gehoben werden. Um mit dem zweiten *Flash* das Calcium nicht zu hoch zu treiben, schwächte ich diesen – wenn nötig – durch den Einsatz eines Neutralfilters. Das vorangegangene Experiment hatte den Einfluss der Phosphorylierung gezeigt, so dass ich in diesem Versuch ebenfalls die beiden Snapinmutanten S50A und S50D verglich.

Der erste *Flash* setzte wie zuvor einen kleinen *Pool* frei. Im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten war es jedoch möglich, mit dem zweiten *Flash* eine große Kapazitätsantwort zu erhalten (siehe Abb. 18 a). Um einen Eindruck von der tatsächlich freigesetzten Neurotransmitter-Menge zu erhalten, wurde in diesem Versuch zum ersten Mal der direkte Nachweis der Katecholaminausschüttung mittels Amperometrie verwendet. Hierbei zeigte sich, dass der Hauptteil der sezernierten Katecholamine bereits mit dem ersten *Flash* ausgeschüttet wurde und nur ein sehr kleiner Teil durch den zweiten *Flash* (siehe Abb. 18 b).

Das Ergebnis des vorangegangenen Phosphorylierungsexperimentes bestätigend war als Antwort auf den ersten *Flash* eine vergrößerte Sekretion der phosphomimetischen Snapinmutante zu beobachten, die sich wie zuvor am besten mit einer einzel-exponentiellen Funktion beschreiben ließ.

Die durch den zweiten *Flash* ausgelöste Kapazitätsantwort wurde am besten mit einer doppelexponentiellen Funktion beschrieben, was die Vermutung nahe legte, dass dieser Teil aus zwei Komponenten bestand. So erhielt ich einen kleineren *Pool* mit einer schnellen, sowie einen größeren *Pool* mit einer langsameren Zeitkonstante.

Nach der Hypothese, mit dem ersten *Flash* nur den HCSP zu leeren, war davon auszugehen, dass es sich bei den durch den zweiten *Flash* freigesetzten *Pool*s um den restlichen RRP sowie SRP handelte. Die quantitative Analyse dieser beiden *Pool*s ergab, dass bei gleichen Zeitkonstanten die *Pool*-Größen keinen signifikanten Unterschied zeigten. Hieraus ist zu folgern, dass Snapin selektiv den HCSP vergrößert ($p < 0,001$), aber sowohl auf den Rest des RRP als auch auf den SRP keinen Effekt zu haben scheint.

Tab. 2: Quantitative Analyse der *Pool*-Größen

	Preflash Ca ²⁺	Postflash Ca ²⁺ 1. Flash	HCSP	Postflash Ca ²⁺ 2. Flash	RRP	SRP
S50A	346 nM ± 29 nM	5,69 µM ± 0,43 µM	29,2 fF ± 3,9 fF	27,9 µM ± 1,36 µM	67,6 fF ± 9,5 fF	252,0 fF ± 32,5 fF
S50D	369 nM ± 23 nM	5,70 µM ± 0,30 µM	66,9 fF ± 8,2 fF	27,4 µM ± 1,37 µM	57,2 fF ± 6,2 fF	199,0 fF ± 23,3 fF

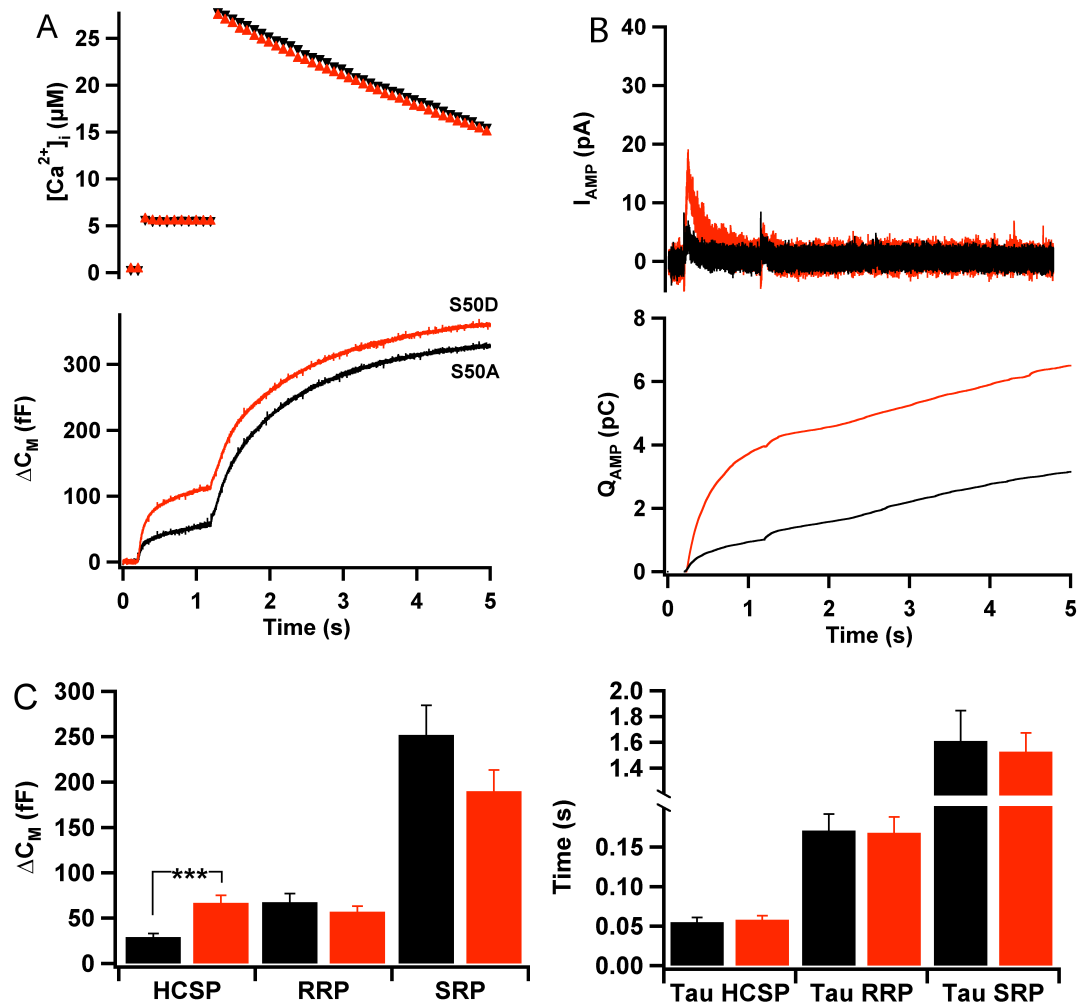


Abb. 18: Exozytose in snapin-S50A und snapin-S50D-überexprimierenden Zellen als Antwort auf einen Double-Flash

A. Gemittelte $[Ca^{2+}]_i$ und Kapazitätsantwort ($n=24$ (S50A), $n=25$ (S50D), $N=12$). Photolyse von Ca^{2+} auf Werte $3,5 \mu M < [Ca^{2+}]_i < 10 \mu M$ mit dem ersten Flash und auf Werte $20 \mu M < [Ca^{2+}]_i < 30 \mu M$ mit dem zweiten Flash löst eine zweizeitige Sekretion aus. Die Flashantwort der phosphomimetischen Mutante S50D ist beim ersten Flash vergrößert. Die Antwort auf den zweiten Flash zeigt keinen signifikanten Unterschied.

B. Gemittelte Amperometrieantwort aus je fünf exemplarischen Zellen. Der größere Teil der Katecholamine wird durch den ersten Flash ausgeschüttet.

C. Quantitative Analyse der Poolgrößen und der jeweiligen Zeitkonstanten. (***) $p < 0,001$

4.2 Effekte von Complexin II auf den HCSP

Nach dem Ergebnis des *Double-Flash*-Versuches schien Snapin selektiv den HCSP zu vergrößern. Daraus ergab sich die Frage, ob nicht auch andere Proteine, welche den exozytotischen *Burst* vergrößern, einen Effekt auf den HCSP haben.

Complexin II ist ein Protein, das calciumunabhängig an den assemblierten SNARE-Komplex bindet und diesen stabilisiert (Sudhof and Rothman, 2009). Es wurde jüngst gezeigt, dass Complexin II, die einzige exprimierte Isoform in Chromaffinzellen, einen verstärkenden Einfluss auf die *burst*-artige Exozytose in Chromaffinzellen besitzt (Cai et al., 2008) und ebenso wie Snapin die Calciumsensitivität erhöht (Reim et al., 2001).

Um die Wirkung von Complexin II auf die verschiedenen *Pools* unterscheiden zu können, verwendete ich wieder das *Double-Flash*-Protokoll (siehe 4.3). Wie zuvor konnte mit dem ersten *Flash* ein kleiner *Pool* mit einer Zeitkonstante und mit dem zweiten *Flash* zwei *Pools* mit einer schnellen bzw. langsamen Zeitkonstanten freigesetzt werden (siehe Abb. 19 a). Ebenfalls vergleichbar wurde in der amperometrischen Detektion der Katecholaminsekretion der Großteil durch den ersten *Flash* freigesetzt (siehe Abb. 19 b).

Tab. 3: Quantitative Analyse der Pool-Größen

	Preflash Ca ²⁺	Postflash Ca ²⁺ 1. Flash	HCSP	Postflash Ca ²⁺ 2. Flash	RRP	SRP
eGFP	284 nM ± 14 nM	5,73 µM ± 0,36 µM	64,5 fF ± 11,7 fF	23,0 µM ± 0,6 µM	57,4 fF ± 6,5 fF	143,0 fF ± 22,7 fF
CPX II	290 nM ± 16 nM	5,92 µM ± 0,33 µM	102,0 fF ± 15,1 fF	23,3 µM ± 0,7 µM	64,1 fF ± 8,9 fF	190,0 fF ± 27,4 fF

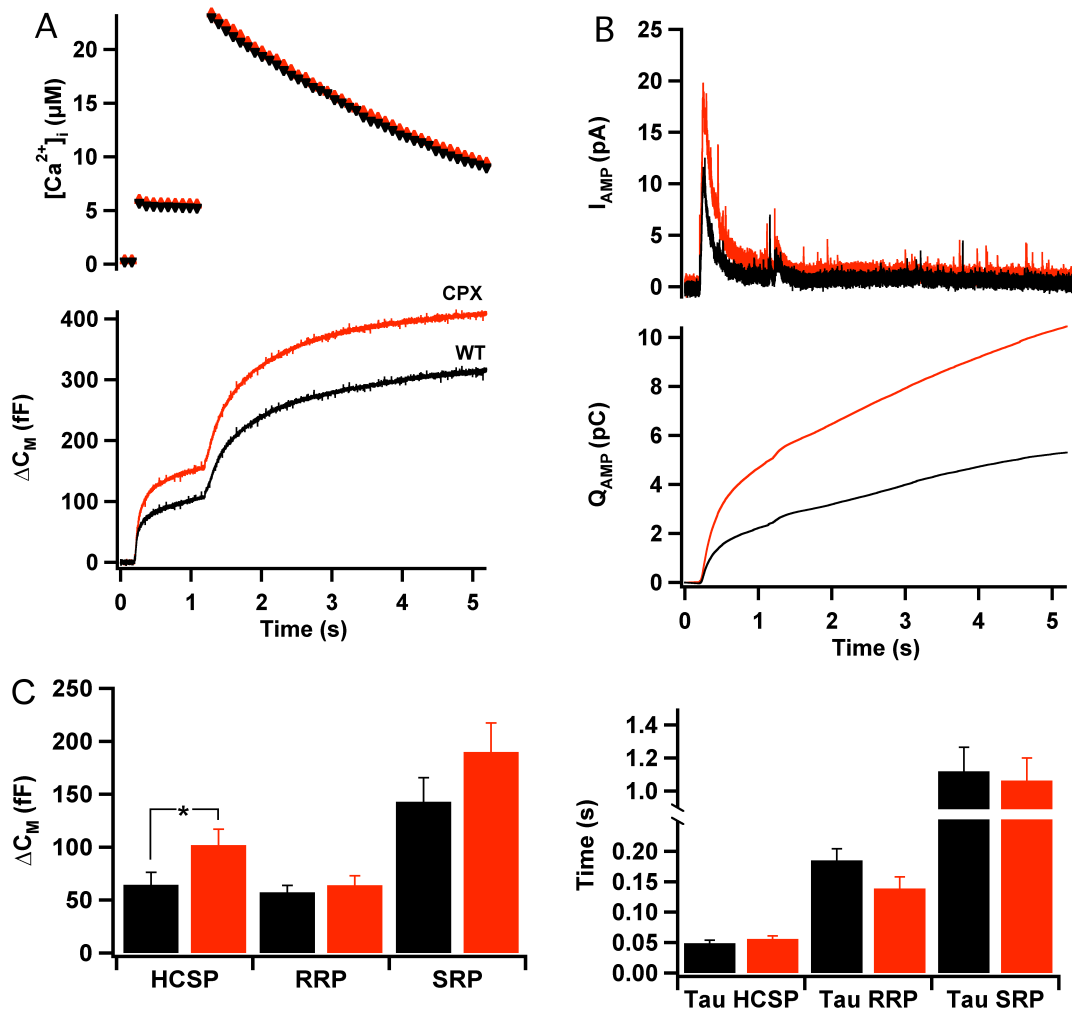


Abb. 19: Exozytose in Complexin II-überexprimierenden Zellen als Antwort auf einen Double-Flash

A. Gemittelte $[Ca^{2+}]_i$ und Kapazitätsantwort (n=26, N=12). Photolyse von Ca^{2+} auf Werte $3,5 \mu M < [Ca^{2+}]_i < 10 \mu M$ mit dem ersten Flash und auf Werte $20 \mu M < [Ca^{2+}]_i < 30 \mu M$ mit dem zweiten Flash löst eine zweizeitige Sekretion aus. Im Gegensatz zu Snapin scheint Complexin II beide Flashantworten zu beeinflussen.

B. Gemittelte Amperometrieantwort. Der größere Teil der Katecholamine wird durch den ersten Flash ausgeschüttet. C, Quantitative Analyse der Poolgrößen und der jeweiligen Zeitkonstanten. (* $p < 0,05$)

Complexin II vergrößerte den HCSP signifikant ($p < 0,05$), aber schien im Gegensatz zu Snapin auch einen Einfluss auf die zweite Flashantwort zu haben. Um diesen Effekt nachzuweisen, der in der quantitativen Auswertung nicht signifikant erschien, verglich ich das Verhältnis der schnellen Komponenten aus beiden *Double-Flash*-

Experimenten. Hierbei fiel auf, dass Snapin die Antwort auf den ersten *Flash* relativ verstärkt ($p < 0,01$). Ein entsprechender Effekt war bei den complexin-überexprimierenden Zellen nicht zu finden, was die Annahme eines selektiven Effekts von Snapin auf den HCSP bestätigt (siehe Abb. 20).

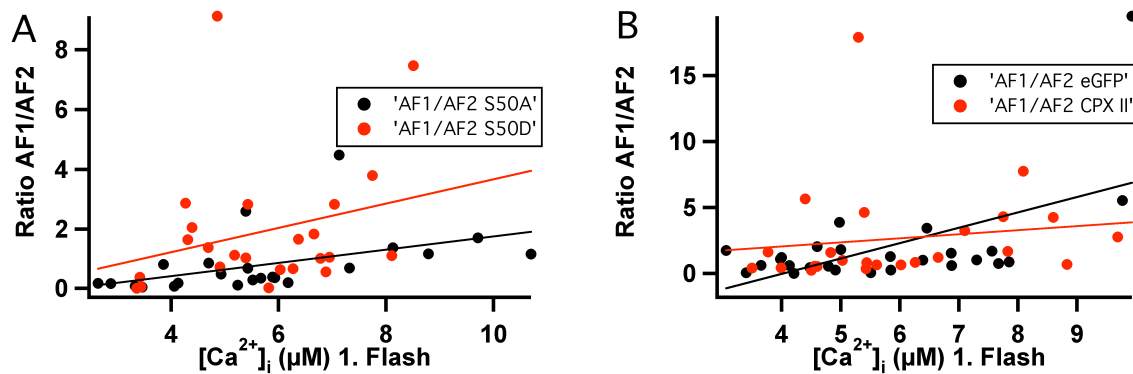


Abb. 20: Verhältnis der schnellen Komponente des ersten Flash (AF1) zum zweiten Flash (AF2)

Die Geraden stellen die jeweiligen Ausgleichsgeraden dar.

A. Verhältnis bei Snapin-S50A- und -S50D-überexprimierenden Zellen. Die Antwort auf den ersten Flash ist relativ verstärkt, was die Annahme eines selektiven Effektes auf den HCSP bestätigt. ($p < 0,01$)

B. Verhältnis bei eGFP- und CPX II-überexprimierenden Zellen. CPX II bewirkt keine Veränderung des Verhältnisses.

4.3 Sekretionsdynamik bei Double-Flash-Experimenten

Aus *Single-Flash*-Experimenten in Kombination mit einer direkten amperometrischen Messung der Katecholaminfreisetzung war bekannt, dass die Kapazitätsantwort gut mit der Amperometrieantwort korreliert. Da in diesen Experimenten in der Regel alle *Pools* entleert wurden, war eine Unterscheidung welcher *Pool* das tatsächliche Korrelat des amperometrischen Signals darstellt bis dato nicht möglich.

Bei den Stimulationen mit einem *Double-Flash* und gleichzeitiger Detektion der Transmitterausschüttung fiel auf, dass fast die gesamte funktionelle Sekretion, d. h. katecholaminhaltige Vesikel, auf einem niedrigen Calciumlevel stattfindet (vergleiche Abb. 18 b u. 19 b). So scheint der HCSP nicht nur in Bezug auf die Calciumsensitivität, sondern gerade in funktioneller Hinsicht von besonderer Bedeutung zu sein.

5. Diskussion

5.1 Freisetzungsverhalten des HCSP

Bei allen durchgeführten Experimenten stellte sich immer die Frage, ob es mit einer bestimmten Stimulationsform generell möglich ist, Sekretion auszulösen, und speziell, um welchen *Pool* es sich bei dieser Sekretion konkret handelt. Ich versuchte, mit unterschiedlichen Protokollen zunächst nur den HCSP zu leeren und später die restlichen *Pools*. Um die unterschiedlichen *Pools* zu differenzieren, war es nötig, mit den jeweiligen Protokollen eine möglichst exakte Separierung der unterschiedlichen *Pools* zu erreichen.

5.1.1 HCSP in Depolarisationsexperimenten

In dem durchgeführten Depolarisationsexperiment war kein Unterschied zwischen den snapin-überexprimierenden und den Wildtyp-Zellen festzustellen (siehe Abb. 15). Aufgrund von Ergebnissen aus anderen Publikationen (Voets et al., 1999; Yang et al., 2002) war davon auszugehen, dass ein Depolarisationsprotokoll nicht in der Lage ist, die nicht in der Nähe von Calciumkanälen lokalisierten Vesikel des HCSP freizusetzen. Diese Feststellung passt zwar zu den von mir gewonnenen Ergebnissen und der Annahme, dass Snapin selektiv den HCSP beeinflusst, aber da ich durch die mit Fura-4F-Farbstoff versetzte intrazelluläre Lösung auf der anderen Seite in der Lage war, die globale intrazelluläre Calciumkonzentration zu bestimmen, stellte sich die Frage, ob ein global auf über 1 mM erhöhtes Calcium, das in Microdomänen rund um Calciumkanäle ein stark erhöhtes Calciumlevel bedeuten muss (Klingauf and Neher, 1997; Garcia et al., 2006; Oheim et al., 2006), wirklich nicht die Vesikel des HCSP erreicht. Auch in einem anderen Depolarisationsexperiment, das mit einer intrazellulären Lösung ohne Fura-4F-Farbstoff und NP-EGTA durchgeführt wurde, konnte kein Unterschied nachgewiesen werden (D. Stevens, unveröffentlichte Ergebnisse).

Ebenso könnte eine langsamere Kinetik des Calciumanstiegs bei einem Depolarisationsstimulus im Vergleich zur schlagartigen Erhöhung durch einen *Flash* einen Unterschied zwischen den Depolarisations- und *Flash*-Experimenten bedingen. Diese

Hypothese ist allerdings reine Spekulation und bedarf weiterer Untersuchungen, wie z. B. Rampenexperimente, die langsam die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöhen und weiterer Depolarisationsexperimente.

5.1.2 HCSP in Flash-Experimenten

Durch die Stimulation mit einem *Flash* gelang es, das intrazelluläre Calcium in einen mikromolaren Bereich zu erhöhen und damit Sekretion auszulösen. Diese Sekretion ließ sich in den unterschiedlichen Experimenten ab einer Schwelle von ca. 4-5 μM intrazellulärer Calciumkonzentration beobachten. Verschiedene andere Arbeiten, die die Freisetzung des HCSP untersuchten, beschrieben – wenn auch in unterschiedlichen Zelltypen – teilweise abweichende Schwellen oder Zeitkonstanten (Yang et al., 2002; Yang and Gillis, 2004; Liu et al., 2006). Wie konnte man also wissen, ob wirklich der HCSP ausgeschüttet wird oder nicht doch ein anderer bzw. mehrere *Pools* freigesetzt werden. Folgende Argumente führten zu der Schlussfolgerung, dass durch die *Flash*-Stimulation in der Tat der HCSP ausgeschüttet wird:

1. Schlagartige Sekretion als Antwort auf einen *Flash*-Stimulus, wurde ab einer Schwelle von einigen μM intrazellulärer Calciumkonzentration beobachtet. Da in einem niedrigeren Bereich keine adäquate, schlagartige Kapazitätsantwort zu registrieren war, ist davon auszugehen, dass es sich bei diesem als ersten freigesetzten *Pool per definitionem* um den HCSP handelt.
2. In allen *Flash*-Experimenten wurde mit dem ersten *Flash* nur ein *Pool* mit einer Zeitkonstanten freigesetzt. In den *Double-Flash*-Experimenten waren neben der Sekretion durch den ersten *Flash* (des mutmaßlichen HCSP) zwei *Pools* in der zweiten *Flash*-Antwort zu beobachten.
3. Unabhängig vom Calciumlevel und der Sekretion im ersten *Flash* wurden im zweiten *Flash* immer zwei *Pools* ausgeschüttet. Das heißt, es ist davon auszugehen, dass unabhängig von der Sekretion des HCSP (als *Subpool* des RRP) immer der RRP bzw. Rest des RRP und der SRP freigesetzt wurden.
4. Die gefundenen *Pool*-Größen entsprechen den zuvor in der Literatur beschriebenen *Pool*-Größen von HCSP, RRP und SRP (Moser und Neher, 1997a; Voets, 2000; Yang et al., 2002).

5.2 Veränderte Zeitkonstanten im zweiten Flash

Wenn man die in den *Double-Flash*-Experimenten (siehe Abb. 18 u. 19) gefundenen Zeitkonstanten für den mutmaßlichen RRP und SRP mit den publizierten Zeitkonstanten (Voets, 2000; Rettig and Neher, 2002) vergleicht, fällt eine Diskrepanz auf: Die Zeitkonstanten in den *Double-Flash*-Experimenten sind um ein Vielfaches langsamer als üblich. Wie kann man also davon ausgehen, mit dem zweiten *Flash* RRP und SRP freizusetzen, und was erklärt die veränderten Zeitkonstanten?

Theoretisch ist es leicht nachzuvollziehen, dass nach dem Leeren eines kleineren *Subpools* mit einer zweiten Stimulation der noch nicht sezernierte Rest ausgeschüttet wird. Um die Schlussfolgerung, dass es sich bei diesem noch nicht sezernierten Rest um den RRP und SRP handelt, besser zu verstehen, hilft folgende Beobachtung: Es wurden mit dem zweiten Flash immer zwei *Pools* mit den vorher beschriebenen langsameren Zeitkonstanten freigesetzt, unabhängig davon, ob und wie viel Sekretion mit dem ersten *Flash* ausgelöst wurde.

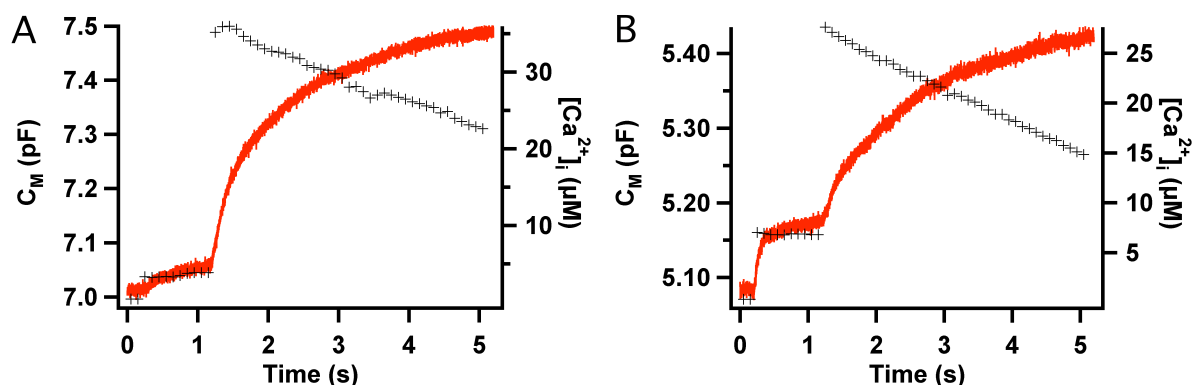


Abb. 21: Zeitkonstanten im 2. Flash unabhängig von $[Ca^{2+}]_i$ und Sekretion im 1. Flash

Beispielzellen mit unterschiedlichen $[Ca^{2+}]_i$ nach dem 1. Flash.

A, 1. Flash: $[Ca^{2+}]_i$ 3,3 μ M, Zeitkonstanten im 2. Flash: τ_{fast} : 0,194; τ_{slow} : 1,530

B, 1. Flash: $[Ca^{2+}]_i$ 7,0 μ M, Zeitkonstanten im 2. Flash: τ_{fast} : 0,087; τ_{slow} : 1,358

Über die Ursachen der im Mittel um den Faktor 7-10 verlängerten Zeitkonstanten kann bei dem jetzigen Kenntnisstand nur spekuliert werden. Es wäre denkbar, dass die Calciumsensoren (z. B. Synaptotagmin) des SNARE-Komplexes aufgrund eines höheren intrazellulären Calciumlevels und/oder bereits stattgefundenener Sekretion gesättigt sind, was zu einem langsameren Ansprechen auf eine (weitere) Calciumerhöhung führt. Um diese These zu verifizieren, bedarf es allerdings weiterer Experi-

mente, die ausgehend von unterschiedlichen Calciumniveaus detailliert die Sekretionsmechanismen und -kinetiken untersuchen.

5.3 Exklusiver Effekt von Snapin auf den HCSP

Die bei den *Double-Flash*-Experimenten (siehe Abb. 18 u. 19) separate Beobachtungsmöglichkeit der unterschiedlichen *Pools* legt im Fall von Snapin die Vermutung nahe, dass dieses Protein einen selektiven Einfluss auf den ersten *Flash* – und damit auf den HCSP – besitzt. Die im zweiten *Flash* zu beobachtende Sekretion verläuft annähernd parallel, so dass hier kein Unterschied zu bestehen scheint. Diese Feststellung ist bei dem Complexin-Experiment nicht zu machen. Im Gegensatz zu Snapin scheint Complexin II einen Effekt auf die gesamte Sekretion zu haben. Um diese Annahme zu bestätigen, wurde eine quantitative Analyse der Verhältnisse der Kapazitätsantworten aus dem ersten und zweiten *Flash* angefertigt (siehe Abb. 20). Dort ist sichtbar, dass Snapin im Kontrast zu Complexin II über den gesamten mikromolaren Bereich das Verhältnis zu Gunsten des ersten *Flash*s beeinflusst. Für seine Funktionalität und damit für den beschriebenen Effekt erforderlich ist, dass Snapin in seiner phosphorylierten Form vorliegt (vergleiche 4.1.3).

Um mit abschließender Sicherheit sagen zu können, dass Snapin einen exklusiven Effekt auf den HCSP hat, wäre die Durchführung eines Snapin-KO-Experiments notwendig. Bei Korrektheit der oben gemachten Annahmen müsste der HCSP in einem Snapin-KO komplett fehlen.

Ebenso interessant erscheint es, weitere Proteine, die einen Effekt auf den HCSP haben könnten, zu untersuchen. Denkbare Kandidaten wären hier der Calciumsensor Synaptotagmin oder der Snapin-Bindungspartner SNAP-25.

5.4 Korrelation von Kapazitätsmessung und Amperometrie

Die in *Flash*-Experimenten zu beobachtenden Kapazitätsänderungen entsprechen der Verschmelzung von Vesikeln mit der Zellmembran und daraus folgender Freisetzung von Neurotransmittern. In wie weit diese Sekretion funktionell ist, d. h. ob und wie viel Neurotransmitter tatsächlich ausgeschüttet werden, lässt sich durch alleinige Kapazitätsmessungen nicht beantworten (Bruns and Jahn, 1995). Die Kombination von Kapazitätsmessungen mit der direkten amperometrischen Detektion von Neurotransmittern ermöglicht es, quantitative Aussagen über die Menge an freigesetzten Neurotransmittern zu machen, die besonders bei den durchgeführten *Double-Flash*-Experimenten interessant erscheinen. So fiel auf, dass der Großteil der Katecholamine mit dem ersten *Flash* und nur sehr wenig mit dem zweiten *Flash* ausgeschüttet wird (siehe Abb. 18 b u. 19 b). Diese Tatsache fiel bisher bei konventionellen *Flash*-Experimenten, die nicht gesondert den HCSP betrachteten, nicht auf. Zwar haben Yang et al. in kombinierten *Flash*-Depolarisations-Experimenten mittels Amperometrie eine annähernd gleiche Menge von Neurotransmittern aus dem HCSP und RRP gefunden (Yang et al., 2007), die ich in meinen Experimenten allerdings nicht bestätigen konnte.

Dennoch bleibt die Rolle des HCSP bei der funktionellen Neurotransmitterausschüttung weiterhin ungeklärt. Freilich könnte man eine besondere Rolle des HCSP bei der physiologischen, d.h. der in einem niedrigen mikromolaren Bereich stattfindenden Sekretion, postulieren. Hierbei stellt sich allerdings die Frage, welche physiologischen Mechanismen für die Calciumerhöhung an diesen, weit von Calciumkanälen entfernten Vesikeln verantwortlich sind, da die globale Calciumerhöhung durch einen *Flash*, selbst in einem mikromolaren Bereich, einen unphysiologischen Vorgang darstellt.

5.5 Ausblick

Aus den durchgeführten Experimenten ergeben sich mehrere Fragestellungen. Zum einen wäre es interessant, sowohl die Rolle von Snapin als auch den Einfluss anderer Proteine auf den HCSP zu untersuchen. Zum anderen scheint es nötig, die Mechanismen der Neurotransmitterausschüttung in einem niedrigen mikromolaren Bereich systematisch zu durchleuchten.

Um einen exklusiven Effekt von Snapin auf den HCSP mit abschließender Sicherheit postulieren zu können, ist die Durchführung eines Snapin-KO-Experimentes erforderlich. Des Weiteren wurde mit Complexin II nur ein Kandidat, von dem ein Einfluss auf die Calciumsensitivität bekannt ist, untersucht. Weitere denkbare Proteine wären der Snapin-Bindungspartner SNAP-25 und der Calciumsensor Synaptotagmin.

Die Diskrepanz zwischen Depolarisations- und Flash-Experimenten warf die Frage auf, ob eine unterschiedliche Kinetik der Calciumerhöhung einen Einfluss auf die Freisetzung verschiedener *Pools* hat. Ebenso fielen veränderte Zeitkonstanten bei den *Double-Flash*-Experimenten auf. Um eine Abhängigkeit von der Calciumerhöhung systematisch zu untersuchen, wären Kombinationen von unterschiedlichen Stimuli vorstellbar. In Bezug auf den in meinen Depolarisationsexperimenten nicht auslösbaren HCSP wäre es interessant, vor einen *Flash* eine Depolarisationsserie zu setzen. Auf der anderen Seite würde eine langsame Calciumerhöhung durch eine Rampe mit nachfolgendem Flash (oder auch Depolarisationen) ein Protokoll darstellen, welches genauere Aussagen über die veränderten Zeitkonstanten zulassen würde.

6. Literaturverzeichnis

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. *Eur J Cell Biol* 78:525-532.

Ashery U, Varoqueaux F, Voets T, Betz A, Thakur P, Koch H, Neher E, Brose N, Rettig J (2000) Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells. *Embo J* 19:3586-3596.

Augustine GJ, Neher E (1992) Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 450:247-271.

Becherer U, Rettig J (2006) Vesicle pools, docking, priming, and release. *Cell Tissue Res* 326:393-407.

Becherer U, Pasche M, Nofal S, Hof D, Matti U, Rettig J (2007) Quantifying exocytosis by combination of membrane capacitance measurements and total internal reflection fluorescence microscopy in chromaffin cells. *PLoS ONE* 2:e505.

Biales B, Dichter M, Tischler A (1976) Electrical excitability of cultured adrenal chromaffin cells. *J Physiol* 262:743-753.

Bromley SK, Burack WR, Johnson KG, Somersalo K, Sims TN, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML (2001) The immunological synapse. *Annu Rev Immunol* 19:375-396.

Brose N, Petrenko AG, Sudhof TC, Jahn R (1992) Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* 256:1021-1025.

Bruns D (2004) Detection of transmitter release with carbon fiber electrodes. *Methods* 33:312-321.

- Bruns D, Jahn R (1995) Real-time measurement of transmitter release from single synaptic vesicles. *Nature* 377:62-65.
- Bruns D, Jahn R (2002) Molecular determinants of exocytosis. *Pflugers Arch* 443:333-338.
- Cai H, Reim K, Varoqueaux F, Tapechum S, Hill K, Sorensen JB, Brose N, Chow RH (2008) Complexin II plays a positive role in Ca²⁺-triggered exocytosis by facilitating vesicle priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:19538-19543.
- Chapman ER (2002) Synaptotagmin: a Ca²⁺ sensor that triggers exocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:498-508.
- Chapman ER, Hanson PI, An S, Jahn R (1995) Ca²⁺ regulates the interaction between synaptotagmin and syntaxin 1. *J Biol Chem* 270:23667-23671.
- Chen X, Tomchick DR, Kovrigin E, Arac D, Machius M, Sudhof TC, Rizo J (2002) Three-dimensional structure of the complexin/SNARE complex. *Neuron* 33:397-409.
- Chen YA, Scheller RH (2001) SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:98-106.
- Chheda MG, Ashery U, Thakur P, Rettig J, Sheng ZH (2001) Phosphorylation of Snapin by PKA modulates its interaction with the SNARE complex. *Nat Cell Biol* 3:331-338.
- Chow RH, von Ruden L, Neher E (1992) Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature* 356:60-63.
- Douglas WW, Kanno T, Sampson SR (1967) Effects of acetylcholine and other medullary secretagogues and antagonists on the membrane potential of adrenal chromaffin cells: an analysis employing techniques of tissue culture. *J Physiol* 188:107-120.

- Duncan RR, Greaves J, Tapechum S, Apps DK, Shipston MJ, Chow RH (2002) Efficacy of Semliki Forest virus transduction of bovine adrenal chromaffin cells: an analysis of heterologous protein targeting and distribution. *Ann N Y Acad Sci* 971:641-646.
- Ellis-Davies GC, Kaplan JH (1994) Nitrophenyl-EGTA, a photolabile chelator that selectively binds Ca^{2+} with high affinity and releases it rapidly upon photolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:187-191.
- Fernandez-Chacon R, Konigstorfer A, Gerber SH, Garcia J, Matos MF, Stevens CF, Brose N, Rizo J, Rosenmund C, Sudhof TC (2001) Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* 410:41-49.
- Garcia AG, Garcia-De-Diego AM, Gandia L, Borges R, Garcia-Sancho J (2006) Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev* 86:1093-1131.
- Giraudo CG, Eng WS, Melia TJ, Rothman JE (2006) A clamping mechanism involved in SNARE-dependent exocytosis. *Science* 313:676-680.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440-3450.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100.
- Hanson PI, Heuser JE, Jahn R (1997) Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes. *Curr Opin Neurobiol* 7:310-315.
- Horrigan FT, Bookman RJ (1994) Releasable pools and the kinetics of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Neuron* 13:1119-1129.

- Ilardi JM, Mochida S, Sheng ZH (1999) Snapin: a SNARE-associated protein implicated in synaptic transmission. *Nat Neurosci* 2:119-124.
- Jahn R, Niemann H (1994) Molecular mechanisms of clostridial neurotoxins. *Ann N Y Acad Sci* 733:245-255.
- Jahn R, Sudhof TC (1999) Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem* 68:863-911.
- Kits KS, Mansvelder HD (2000) Regulation of exocytosis in neuroendocrine cells: spatial organization of channels and vesicles, stimulus-secretion coupling, calcium buffers and modulation. *Brain Res Brain Res Rev* 33:78-94.
- Klingauf J, Neher E (1997) Modeling buffered Ca²⁺ diffusion near the membrane: implications for secretion in neuroendocrine cells. *Biophys J* 72:674-690.
- Lindau M, Neher E (1988) Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells. *Pflugers Arch* 411:137-146.
- Liu HS, Hu ZT, Zhou KM, Jiu YM, Yang H, Wu ZX, Xu T (2006) Heterogeneity of the Ca²⁺ sensitivity of secretion in a pituitary gonadotrope cell line and its modulation by protein kinase C and Ca²⁺. *J Cell Physiol* 207:668-674.
- Martinez-Zaguilan R, Parnami J, Martinez GM (1998) Mag-Fura-2 (Fura-2) exhibits both low (microM) and high (nM) affinity for Ca²⁺. *Cell Physiol Biochem* 8:158-174.
- McNeil BD, Wu LG (2009) Location matters: synaptotagmin helps place vesicles near calcium channels. *Neuron* 63:419-421.
- Montecucco C, Schiavo G (1994) Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. *Mol Microbiol* 13:1-8.
- Moser T, Neher E (1997a) Estimation of mean exocytic vesicle capacitance in mouse adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6735-6740.

- Moser T, Neher E (1997b) Rapid exocytosis in single chromaffin cells recorded from mouse adrenal slices. *J Neurosci* 17:2314-2323.
- Neher E, Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260:799-802.
- Neher E, Marty A (1982) Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:6712-6716.
- Nofal S, Becherer U, Hof D, Matti U, Rettig J (2007) Primed vesicles can be distinguished from docked vesicles by analyzing their mobility. *J Neurosci* 27:1386-1395.
- Oheim M, Kirchhoff F, Stuhmer W (2006) Calcium microdomains in regulated exocytosis. *Cell Calcium* 40:423-439.
- Pan PY, Tian JH, Sheng ZH (2009) Snapin facilitates the synchronization of synaptic vesicle fusion. *Neuron* 61:412-424.
- Pang ZP, Melicoff E, Padgett D, Liu Y, Teich AF, Dickey BF, Lin W, Adachi R, Sudhof TC (2006) Synaptotagmin-2 is essential for survival and contributes to Ca²⁺ triggering of neurotransmitter release in central and neuromuscular synapses. *J Neurosci* 26:13493-13504.
- Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD (2008) Chemical calcium indicators. *Methods* 46:143-151.
- Pelletier J, Sonenberg N (1988) Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334:320-325.
- Regehr WG, Atluri PP (1995) Calcium transients in cerebellar granule cell presynaptic terminals. *Biophys J* 68:2156-2170.

- Reim K, Mansour M, Varoqueaux F, McMahon HT, Sudhof TC, Brose N, Rosenmund C (2001) Complexins regulate a late step in Ca²⁺-dependent neurotransmitter release. *Cell* 104:71-81.
- Rettig J, Neher E (2002) Emerging roles of presynaptic proteins in Ca⁺⁺-triggered exocytosis. *Science* 298:781-785.
- Rizo J, Sudhof TC (2002) Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat Rev Neurosci* 3:641-653.
- Rizo J, Rosenmund C (2008) Synaptic vesicle fusion. *Nat Struct Mol Biol* 15:665-674.
- Ruder C, Reimer T, Delgado-Martinez I, Hermosilla R, Engelsberg A, Nehring R, Dorken B, Rehm A (2005) EBAG9 adds a new layer of control on large dense-core vesicle exocytosis via interaction with Snapin. *Mol Biol Cell* 16:1245-1257.
- Sakaba T (2006) Roles of the fast-releasing and the slowly releasing vesicles in synaptic transmission at the calyx of held. *J Neurosci* 26:5863-5871.
- Sollner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH, Rothman JE (1993a) A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75:409-418.
- Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE (1993b) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362:318-324.
- Sorensen JB (2004) Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Pflugers Arch* 448:347-362.
- Stow JL, Manderson AP, Murray RZ (2006) SNAREing immunity: the role of SNAREs in the immune system. *Nat Rev Immunol* 6:919-929.
- Sudhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27:509-547.

- Sudhof TC, Rothman JE (2009) Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* 323:474-477.
- Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395:347-353.
- Tang J, Maximov A, Shin OH, Dai H, Rizo J, Sudhof TC (2006) A complexin/syntaxin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis. *Cell* 126:1175-1187.
- Thakur P, Stevens DR, Sheng ZH, Rettig J (2004) Effects of PKA-mediated phosphorylation of Snapin on synaptic transmission in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 24:6476-6481.
- Tian JH, Wu ZX, Unzicker M, Lu L, Cai Q, Li C, Schirra C, Matti U, Stevens D, Deng C, Rettig J, Sheng ZH (2005) The role of Snapin in neurosecretion: snapin knock-out mice exhibit impaired calcium-dependent exocytosis of large dense-core vesicles in chromaffin cells. *J Neurosci* 25:10546-10555.
- Toonen RF, de Vries KJ, Zalm R, Sudhof TC, Verhage M (2005) Munc18-1 stabilizes syntaxin 1, but is not essential for syntaxin 1 targeting and SNARE complex formation. *J Neurochem* 93:1393-1400.
- Voets T (2000) Dissection of three Ca²⁺-dependent steps leading to secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron* 28:537-545.
- Voets T, Neher E, Moser T (1999) Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron* 23:607-615.
- Voets T, Moser T, Lund PE, Chow RH, Geppert M, Sudhof TC, Neher E (2001a) Intracellular calcium dependence of large dense-core vesicle exocytosis in the absence of synaptotagmin I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11680-11685.

- Voets T, Toonen RF, Brian EC, de Wit H, Moser T, Rettig J, Sudhof TC, Neher E, Verhage M (2001b) Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking. *Neuron* 31:581-591.
- Wang SC, Lin JT, Chern Y (2009) Novel regulation of adenylyl cyclases by direct protein-protein interactions: insights from snapin and ric8a. *Neurosignals* 17:169-180.
- Yang Y, Gillis KD (2004) A highly Ca²⁺-sensitive pool of granules is regulated by glucose and protein kinases in insulin-secreting INS-1 cells. *J Gen Physiol* 124:641-651.
- Yang Y, Udayasankar S, Dunning J, Chen P, Gillis KD (2002) A highly Ca²⁺-sensitive pool of vesicles is regulated by protein kinase C in adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:17060-17065.
- Yang Y, Craig TJ, Chen X, Ciufo LF, Takahashi M, Morgan A, Gillis KD (2007) Phosphomimetic mutation of Ser-187 of SNAP-25 increases both syntaxin binding and highly Ca²⁺-sensitive exocytosis. *J Gen Physiol* 129:233-244.
- Young SM, Jr., Neher E (2009) Synaptotagmin has an essential function in synaptic vesicle positioning for synchronous release in addition to its role as a calcium sensor. *Neuron* 63:482-496.
- Zhang X, Kim-Miller MJ, Fukuda M, Kowalchuk JA, Martin TF (2002) Ca²⁺-Dependent Synaptotagmin Binding to SNAP-25 Is Essential for Ca²⁺-Triggered Exocytosis. *Neuron* 34:599-611.

Publikationen

Snapin supports highly Ca^{2+} -sensitive catecholamine release in mouse chromaffin cells, T. Schmidt, D. Stevens, C. Schirra, U. Matti, J. Rettig

in preparation

Leonardo DaVinci's Contributions to the Understanding of the Aortic Valve,
T. Schmidt, J. S. Rankin, J. G. Byrne,
STSA Annual Meeting 2010, Florida

in preparation

Danksagung

Zuallererst gebührt mein tiefster Dank Prof. Dr. Jens Rettig. Er hat mir diese Promotion und eine hervorragende wissenschaftliche Grundausbildung ermöglicht und mir jederzeit und in jeglicher Hinsicht zur Seite gestanden und mich unterstützt.

Ich danke Dr. David Stevens für die tagtägliche Unterstützung im Labor und die Einführung in die Elektrophysiologie. Ohne David hätte ich meine Versuche so nicht durchführen können.

Ich danke Dr. Claudia Schirra, die bereitwillig „unseren“ Messplatz mit mir geteilt hat und mir bei der Durchführung meiner Experimente und vor allem beim Ansetzen von Lösungen geholfen hat.

Ich danke Dr. Ulf Matti, Dr. Detlef Hof, Dr. Ute Becherer, PD Dr. Elmar Krause und Dr. Misty Marshall, die mich bei den vielen kleinen Problemen in der Molekularbiologie, an meinem Messplatz, bei der Auswertung der Daten und der Durchführung meiner Experimente stets hilfsbereit unterstützt haben.

Ich danke meinen (zum Teil ehemaligen) Mitdoktoranten bzw. -diplomanten Yuan-yuan Liu, Dr. Mathias Pasche, Varsha Pattu, Sandra Magin, Dr. Stefan Linsler, Dr. Shahira Nofal, Monika Dudenhöffer-Pfeifer, Lisa Weins und Anneka Bost für viele kleine Anregungen, die angenehme und gute Zusammenarbeit und ein wunderbares Laborklima.

Ich danke unserer Sekretärin Bernadette Schwarz und unseren TA's Carolin Bick, Manuela Schneider, Katrin Sandmeier und Reiko Trautmann, dass sie mir auch bei ungewöhnlichen organisatorischen Fragen geholfen und mir Tag für Tag die Arbeit erleichtert haben.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Physiologie für die sehr gute Atmosphäre und die tolle Zeit, die ich in diesem Institut verbringen durfte, bedanken.

Nicht zuletzt danke ich meiner Freundin Sarah Fiebig, die während dieser ganzen Zeit eine manchmal unendlich anmutende Geduld mit mir hatte und meiner Familie, die mich immer bedingungslos unterstützt hat.

Lebenslauf

Name: Tobias Schmidt

Geburtsdatum: 22.04.1983

Geburtsort: Bottrop

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: 1989 bis 1993
St.-Agatha Grundschule, Dorsten

1993 bis 2002
St.-Ursula Gymnasium, Dorsten

Schulabschluss: Abitur 2002

Zivildienst: 2002 bis 2003
Rettungssanitäter, ASB Marl

Studium: April 2004 bis voraussichtlich Ende 2010
Humanmedizin, Universität des Saarlandes

Prüfung: 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung März 2006,
Note: 1,5

Famulaturen: März/April 2007
Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und
Schmerztherapie, PD Dr. H. Krieter
Klinikum Saarbrücken

September 2007
Praxis für Kinderheilkunde, P. Kries
Frankfurt am Main

Juli/August 2008
Rotation Cardiac Surgery
Vanderbilt University, Nashville, Tennessee

September 2008
Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie,
Prof. Dr. H.-J. Schäfers
Uniklinikum Homburg

Förderung: seit 2007
Stipendiat des Cusanuswerks

Besonderheiten: Tutor in Biochemie 2005, Anatomie 2006,
Physiologie 2006-2008

Hobbies: Schwimmen, Fahrradfahren, Lesen