

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

Gleichzeitige Beobachtung der Exozytose in Chromaffinzellen mit einer Kombination von Interner Totalreflektions-Fluoreszenz-Mikroskopie und Membrankapazitätsmessung

Dissertation

zur Erlangung des Grades

eines Doktors der Naturwissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

2009

vorgelegt von

Mathias Pasche

geboren am 26.12.1977 in Kassel

Diplom-Biologe

Homburg

2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Sekretion.....	1
1.2	Das Neuron	2
1.3	Die Chromaffinzelle als Modell für geregelte Exozytose	3
1.4	Molekulare Veränderungen vor einem Fusionsereignis in Chromaffinzellen	6
1.5	Exozytose-relevante Proteine	10
1.6	Priming und relevante Proteine	13
1.7	Docking und involvierte Proteine	15
1.8	Ca ²⁺ und dessen Einfluss auf Docking, Priming und Fusion	18
1.9	Fragestellung.....	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Material	23
2.1.1	Reagenzien	23
2.1.2	Enzyme.....	24
2.1.3	Plasmide.....	24
2.1.4	Medien und Lösungen	25
2.1.4.1	Lösungen für Chromaffinzellpräparation	25
2.1.4.2	Lösungen zur Virusaktivierung.....	26
2.2	Methoden	27
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	27
2.2.1.1	Restriktionsspaltung.....	27
2.2.1.2	Dephosphorylierung von Vektoren	29
2.2.1.3	Agarose-Gelelektrophorese	29
2.2.1.4	Ligation	30
2.2.1.5	Transformation.....	31
2.2.1.6	Plasmid-Mini-Präparation.....	31
2.2.1.7	Plasmid-Maxi-Präparation.....	32
2.2.1.8	Bestimmung der DNA-Konzentration	33
2.2.1.9	Sequenzierung.....	33
2.2.2	Bovine Chromaffinzellpräparation.....	33
2.2.3	Murine Chromaffinzellpräparation.....	34
2.2.4	Transfektion durch Elektroporation von bovinen Chromaffinzellen..	35
2.2.5	Transfektion durch Elektroporation von murinen Chromaffinzellen .	35
2.2.6	Transfektion durch Virusinfektion von bovinen Chromaffinzellen	36

2.2.7	Ratiometrische Fura-Messungen.....	36
2.2.8	Elektrophysiologie	38
2.2.8.1	Ganzzell-Ableitungen - Membrankapazitätsmessungen	38
2.2.8.2	Strom-Spannungs-Kurven.....	40
2.2.8.3	Intrazellulärlösungen – Konstante $[Ca^{2+}]_i$	41
2.2.8.4	Intrazellulärlösungen – Variable $[Ca^{2+}]_i$	41
2.2.8.5	Perforierter Patch.....	42
2.2.8.6	Depolarisationsprotokoll zur Überprüfung der Zellfunktionalität ...	43
2.2.8.7	Stimulation durch Depolarisation	43
2.2.8.8	Stimulation durch UV-Blitzlicht-Photolyse von NP-EGTA.....	43
2.2.8.9	Bestimmung des IRP	45
2.2.8.10	Extrazelluläre Badlösungen	45
2.2.9	TIRFM = Interne Total-Reflektionsfluoreszenz-Mikroskopie	46
2.2.9.1	Aufbau – Mobilitätsexperimente.....	47
2.2.9.2	Aufbau – Experimente zu Ca^{2+} -Mikrodomänen.....	48
2.2.10	Bildanalyse – Mobilität.....	49
2.2.10.1	Mobilitätsexperimente	49
2.2.10.2	Sekretionsexperimente	50
2.2.11	„Caging Diameter“-Analyse	50
2.2.11.1	Analyse der lateralen Mobilität.....	51
2.2.11.2	Analyse der axialen Mobilität	52
2.2.12	Lokalisationsexperimente von Ca^{2+} -Mikrodomänen	53
2.2.13	Bleichexperimente – mRFP vs. mCherry.....	54
2.2.14	Statistische Analyse	55
3	Ergebnisse	56
3.1	Einfluss der $[Ca^{2+}]_i$ auf Poolgrößen	56
3.1.1	Depolarisationen.....	56
3.1.2	Vesikelmobilität.....	58
3.1.2.1	Abhängigkeit lateraler LDCV-Mobilität von der $[Ca^{2+}]_i$	58
3.1.2.2	Abhängigkeit axialer LDCV-Mobilität von der $[Ca^{2+}]_i$	64
3.1.2.3	Korrelation von lateraler und axialer Mobilität	68
3.1.3	Variation der $[Ca^{2+}]_i$ mit NP-EGTA.....	71
3.1.4	Variation der $[Ca^{2+}]_i$ mit Diazo-2	73
3.1.4.1	Ca^{2+} -Strom-Spannungs-Kurven	74
3.1.5	Übergänge zwischen den einzelnen Stadien sind linear	75
3.1.6	Verweildauer von LDCVs an der PM – effizienteres Docking.....	77

3.1.6.1	Vesikelanzahl an der PM pro Aufnahmeperiode und Bild	77
3.1.7	Verweildauer von LDCVs an der PM	78
3.2	Prästimulus-[Ca²⁺]_i und deren Einfluss auf Pools und Mobilität...	80
3.2.1	Prästimulus-[Ca ²⁺] _i entscheidet über die Poolgrößen	80
3.2.1.1	UV-Blitzlicht-Photolyse.....	80
3.2.1.2	Depolarisationen	82
3.2.2	Mobilitätsanalyse sezernierter LDCVs	83
3.2.2.1	Bewegung vor Fusion – Caging Diameter vs. Distanz	84
3.2.3	Sekretion nach UV-Blitzlicht-Photolyse (prästimulus-[Ca ²⁺] _i : 700 nM)	87
3.2.4	Sekretion nach UV-Blitzlicht-Photolyse (prästimulus-[Ca ²⁺] _i : 230 nM)	89
3.2.5	Sekretion nach Depolarisation (prästimulus-[Ca ²⁺] _i : 600 nM)	90
3.3	Kolokalisationsexperimente – Ca²⁺-Mikrodomänen.....	93
4	Diskussion	98
4.1	Methodik	98
4.2	Ca ²⁺ -Abhängigkeit des Primings	100
4.3	Ca ²⁺ -Abhängigkeit des Dockings.....	101
4.4	Übergänge zwischen den Mobilitätsstadien	103
4.5	Ca ²⁺ -abhängiges Verhalten vor Fusion	104
4.6	Variationen der [Ca ²⁺] _i mit Diazo-2 und NP-EGTA	106
4.7	Ca ²⁺ -Mikrodomänen	107
4.8	Ausblick	109
5	Literaturverzeichnis	111
6	Publikationen	122
7	Präsentationen	123
8	Danksagung.....	124
9	Curriculum Vitae.....	125

Zusammenfassung

Die Freisetzung von Neurotransmittern an Synapsen, wie auch die von Peptiden und Hormonen aus neuroendokrinen Zellen, erfolgt durch Ca^{2+} -getriggerte Exozytose. Sekretorische Vesikel, sogenannte „large dense-core vesicles“ (LDCVs), stellen den Großteil der in Chromaffinzellen enthaltenen Vesikel. Sie durchlaufen mehrere molekulare Stadien vor ihrer Fusion. Während „Docking“ einer ersten Verankerung der Vesikel an der Plasmamembran (PM) entspricht, ist „Priming“ notwendig, um die LDCVs fusionskompetent zu machen. Im letzten Schritt erfolgt die durch den Einstrom von Ca^{2+} durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle getriggerte Fusion mit der PM. Die in diesen Prozessen involvierten Proteine sind für Neurone und neuroendokrine Zellen, wie z.B. Chromaffinzellen, vergleichbar.

Im Rahmen meiner Studien untersuchte ich die Auswirkung eines der wichtigsten sekundären Botenstoffe auf Docking, Priming und Fusion: Intrazelluläres Ca^{2+} . Bovine Chromaffinzellen wurden dazu im Ganzzellmodus abgeleitet und über die Patchpipette mit konstanten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) zwischen 0 und 2 μM perfundiert. Parallel wurden die membran-nahen Bewegungen von fluoreszenzmarkierten LDCVs mittels Interner Totalreflektions-Fluoreszenz-Mikroskopie (TIRFM) beobachtet.

Mit Hilfe der so genannten „Caging Diameter“-Analyse konnte ich zeigen, dass LDCVs bei einer $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von 600-800 nM maximal lateral immobilisiert wurden. Mit dieser Immobilisierung ging eine Erhöhung der Menge freisetzbarer Vesikel einher, was mittels Membrankapazitätsmessungen belegt wurde. Ich konnte den Effekt von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf Priming dadurch sowohl mit einem bildgebenden Verfahren, wie auch mit einer elektrophysiologischen Methode qualitativ und quantitativ messen.

Zum ersten Mal wurde von mir gezeigt, dass die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ebenfalls eine Wirkung auf Docking ausübt. LDCVs, die in TIRFM an der PM sichtbar sind, entsprechen den in elektronenmikroskopischen Aufnahmen morphologisch gedockten Vesikeln. Allerdings erlaubt das Verfahren der TIRFM, im Gegensatz zur Elektronenmikroskopie, die Beobachtung von dynamischen Prozessen. Bei erhöhter $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von 400-600 nM fand eine maximale axiale Immobilisierung von LDCVs statt. Zusätzlich wurden weniger kurzzeitig membranständige Vesikel beobachtet. Ich interpretiere die Daten dahingehend, dass bei erhöhten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ eine erhöhte Effizienz des Dockings erreicht wird.

Des Weiteren konnte ich durch Einsatz von zwei unterschiedlichen Stimulationsmethoden – Depolarisation und UV-Blitzlicht-Photolyse von NP-EGTA – zeigen, dass Vesikel vor ihrer Sekretion lateral vollständig unbeweglich waren.

Zusammengefasst konnte ich einen Effekt von $[Ca^{2+}]_i$ aufdecken, der eine Multimodalität im Bezug auf Docking und Priming hat. Entscheidend ist aber die unterschiedliche Ca^{2+} -Abhängigkeit beider Prozesse. Während Docking bei 400-600 nM optimal abläuft, wird Priming maximal bei 600-800 nM $[Ca^{2+}]_i$ gefördert. Es ist sinnvoll, für Docking eine höhere Ca^{2+} -Sensitivität zu haben, als für Priming. Im physiologischen Kontext wird der Zelle dadurch ermöglicht, Priming und Docking zur gleichen Zeit optimal anzusteuern.

Summary

„Simultaneous observation of exocytosis in chromaffin cells with a combination of TIRF-microscopy and membrane capacitance measurements”

Release of neurotransmitter at synapses, as well as release of peptides and hormones from neuroendocrine cells is the consequence of Ca^{2+} -triggered exocytosis. Secretory vesicles, like large dense core vesicles (LDCVs), represent the majority of chromaffin cell vesicles. They have to pass several molecular states before fusion. Vesicles are anchored to the plasma membrane (PM) in a process called docking and rendered fusion competent during priming. Upon influx of Ca^{2+} through voltage-gated Ca^{2+} -channels, fusion of LDCVs with the PM is triggered. These processes are mediated by a multitude of proteins, which are very similar in neurons and neuroendocrine cells.

In my studies I investigated the influence of one of the most important second messengers: intracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Bovine chromaffin cells were patch-clamped in the whole cell configuration and perfused via the patch pipette with constant $[\text{Ca}^{2+}]_i$ between 0 and 2 μM . In parallel, the mobility of fluorescently labeled LDCVs was observed close to the PM with Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (TIRFM).

By using the caging diameter analysis, I was able to show that LDCVs were laterally immobilized to a maximum at an $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of 600-800 nM. Additionally, the pool of releasable vesicles was increased, which was determined by membrane capacitance measurements. Thus, the effect of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ on priming could be quantitatively and qualitatively measured by two independent methods.

More important is the fact that I could show for the first time an effect of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ on docking. LDCVs seen in TIRFM correspond to those which are referred to as morphologically docked in electron microscopy (EM). However, in contrast to EM, TIRFM enables the detection of dynamics in the exocytotic process. In the present study, I demonstrated that an increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ between 400-600 nM leads to maximal axial immobilization of LDCVs. Moreover, at this concentration less vesicles remained for a short period of time at the PM. My interpretation of these data is an increased efficiency of docking at an increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Additionally, I was able to show by application of two different stimulation methods – depolarization and UV-flash photolysis of NP-EGTA – that secreted LDCVs were essentially immobile right before fusion.

In summary, I could show a multimodal effect of $[Ca^{2+}]_i$ on both, docking and priming. Surprisingly, the two processes display a different Ca^{2+} -sensitivity. While docking is optimal at $[Ca^{2+}]_i$ between 400-600 nM, priming works most efficient between 600-800 nM $[Ca^{2+}]_i$. It is reasonable to have a slightly higher Ca^{2+} -sensitivity for docking than for priming in the physiological context. By this, the cell can control both processes at an optimal level.

Abkürzungen

AP	Aktionspotential
α -SNAP	α -Soluble NSF Attachment Protein
ATP	Adenosine Triphosphate
AZ	Aktive Zone
BSA	Bovines Serum Albumin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
[Ca ²⁺]	Ca ²⁺ -Konzentration
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Ca ²⁺ -Konzentration
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CAPS	Calcium-abhängiges Aktivatorprotein für Sekretion
CD	Caging Diameter
CMV	cucumber mosaic virus
DAG	Diacylglycerol
Diazo-2	N-[2-[2-[2-[bis(carboxymethyl)amino]-5-(diazooacetyl)phenoxy]ethoxy]-4-methylphenyl]-N-(carboxymethyl)-, tetrapotassium salt
DMPP	Di-Methylphenylpiperazinium
DMSO	Dimethylsulphoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	Depot Pool
DPTA	Di-Ethylentriaminopentaazetische Säure
DTT	1,4-Dithiotheritol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGTA	Ethylenglycol-tetraazetische Säure
EM	Elektronenmikroskop

ER	Endoplasmatisches Reticulum
FFT	Fast Fourier Transform
FCS	Fetales Kälber-Serum
GA	Golgi-Apparat
GFP	Grünes Fluoreszentes Protein
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IRES	Interne Ribosomale Eintrittsstelle („Entry Site“)
LDCV	Large dense-core vesicle
mCherry	monomerisches rot-fluoreszentes Protein (verbessert)
mRFP	monomerisches rot-fluoreszentes Protein
MHD	Munc Homologie Domäne
MSD	Mean Square Displacement
MyRIP	MyosinVIIA und Rab interagierendes Protein
NP-EGTA	<i>o</i> -nitrophenyl EGTA
NPY	Neuropeptid Y
NSF	N-ethylmaleimid sensitiver Factor
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phorbolester
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PM	Plasmamembran
PMA	Phorbol-12-myristat-13-Azetat
PMCA	Plasmamembran Ca ²⁺ -ATPase
RIM	Rab3 interagierendes Molekül
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Kulturmedium)

RRP	Rapidly Releasable Pool
RT	Raumtemperatur
SCV	Small Clear Vesicle
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SFV	Semliki Forest Virus
SM	Sec1/Munc18 family
SNAP-25	Synaptosome Associated Protein of 25 kD
SNARE	Soluble NSF Attachment Protein Receptor
SRP	Slowly Releasable Pool
STED	Stimulierte Emissions-Depletion Mikroskopie
SV	Synaptisches Vesikel
TIRFM	Totale Interne Reflektions Fluoreszenz Mikroskopie
UPP	Unprimed Pool
UV	ultraviolett
VAMP	Vesicle Associated Membrane Protein
VGCC	Voltage gated Ca ²⁺ channel

1 Einleitung

1.1 Sekretion

Das menschliche Gehirn ist das zentrale Kontrollorgan des Körpers. Informationen werden hier gespeichert, verarbeitet und integriert. Zusätzlich erfolgt die koordinierte Übermittlung dieser Informationen zu allen anderen Körperteilen und Organen. Der Grundbaustein des Gehirns ist die Nervenzelle, auch Neuron genannt. Der Informationsfluss von einem Neuron zum nächsten resultiert aus einem ständigen Umwandlungsprozess von elektrischen zu chemischen Signalen und umgekehrt. Das elektrische Signal basiert auf der Veränderung eines elektrochemischen Gradienten über die Plasmamembran (PM). Dieser Gradient ist auf ein bestimmtes Ruhemembranpotential eingestellt. Wird das Membranpotential so beeinflusst, dass es vom Ruhemembranpotential abweicht, z.B. durch ein Aktionspotential (AP), wird die PM depolarisiert. Erreicht das elektrische Signal die präsynaptische Endigung wird es in ein chemisches Signal umgewandelt. An der Präsynapse, einer hochspezialisierten Zellstruktur, werden Neurotransmitter durch den Prozess der Exozytose freigesetzt. Freigesetzte Neurotransmitter diffundieren über den synaptischen Spalt zur postsynaptischen PM und binden an spezifische Rezeptoren. Anschließend kommt es zu einer direkten oder über verschiedene Signalkaskaden mediierten Öffnung von Ionenkanälen, wodurch das chemische wiederum in ein elektrisches Signal umgewandelt wird (Zucker RS 1999).

Während der Exozytose verschmelzen einzelne intrazelluläre Transportvesikel mit der PM. Man unterscheidet zwei Arten von Exozytose. Als konstitutive Exozytose bezeichnet man den Vorgang zur Aufrechterhaltung der PM-Funktion durch Insertion von integralen Plasmaproteinen. Die regulierte Exozytose dient im Gegensatz dazu zur Freisetzung vesikulärer Ladung und erlaubt eine kontrollierte Ausschüttung von an sich Membran-impermeablen Substanzen. Einer der am besten studierten Vorgänge, bei dem regulierte Exozytose von Bedeutung ist, ist die Freisetzung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt. Dabei verschmelzen synaptische Vesikel (SV) mit der präsynaptischen PM des Neurons. Eines der zentralen Ereignisse, welches der regulierten Exozytose vorangehen muss, ist der Einstrom von Ca^{2+} durch spannungsabhängige Calciumkanäle. Diese öffnen sich in Folge eines ankommenden APs. Durch die so hervorgerufene lokale Erhöhung der intrazellulären Calcium-

konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) wird die Verschmelzung von SV mit der PM unmittelbar ausgelöst. Alles in allem benötigt diese Prozessabfolge weniger als 1 ms. Im Allgemeinen sind Neurotransmitter in synaptischen Vesikeln, sog. „small clear vesicles“ (SCVs), verpackt. Allerdings gibt es noch einen weiteren Vesikeltyp, der durch seine hohe Elektronendichte in elektronenmikroskopischen Aufnahmen charakterisiert wurde und demnach elektronendichte Granula (engl. „large dense core vesicles“, im Folgenden LDCVs) genannt wurde. In Neuronen können sowohl SCVs als auch LDCVs vorkommen (De Potter WP *et al.* 1997).

1.2 Das Neuron

Neurone weisen eine komplexe räumliche Organisation auf. Der Zellkörper beinhaltet den Nukleus und sämtliche Syntheseapparate. Die verzweigten Dendriten stellen die Inputregion dar, die Signale von vorgeschalteten Neuronen erhält. Der Hauptort der regulierten Exozytose liegt in den synaptischen Endigungen des distal vom Zellkörper liegenden Axons, den Outputregionen der Neurone. Diese lokal genau definierten Outputregionen bezeichnet man als Synapsen, die wiederum eine hochspezialisierte Struktur, die Aktive Zone (AZ), enthalten. AZ dienen dazu, den Ort der Exozytose vorzugeben und freisetzbare Vesikel bereitzuhalten (Fejtova A und Gundelfinger ED 2006). Zwischen der Präsynapse des Ausgangsneurons und den postsynaptischen Strukturen des Zielneurons liegt der synaptische Spalt, der eine ungefähre Dicke von 20 nm hat.

In der Regel haben Neurone ein Ruhemembranpotential von ungefähr -80 mV. Im Falle der Initialisierung eines AP öffnen sich spannungsabhängige Na^+ -Kanäle und Na^+ strömt in die Zelle, wodurch die Zelle depolarisiert wird. Das AP pflanzt sich bis zur Nervenendigung, der Synapse, fort. In Folge der Depolarisation öffnen sich dort spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle. Der daraus resultierende Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ dient als Auslöser der Fusion von Vesikeln mit der PM und der Ausschüttung der Neurotransmittermoleküle in den synaptischen Spalt. Per Diffusion translozieren diese Moleküle durch den Spalt und können dann an spezifische Rezeptormoleküle in der postsynaptischen PM binden. Schlussendlich wird dadurch eine spezifische Antwort hervorgerufen (Siegelbaum SA und Kandel ER 1991).

Um die Funktion der Präsynapse und Neurotransmission im Allgemeinen zu studieren, ist das Neuron an sich die optimale Zelle. Die am weitesten verbreitete Technik ist die Messung postsynaptischer Ströme. Über diese indirekte Methode werden Ef-

Effekte gemessen die präsynaptischen Ursprungs sind und dadurch einige Unwägbarkeiten beinhalten können. So ist es z.B. nahezu unmöglich, Effekte von exzessiven Mengen freigesetzten Neurotransmitters zu detektieren, da diese die begrenzte Anzahl von Rezeptoren in der postsynaptischen Membran nach sehr starker Stimulation saturieren. Des Weiteren unterliegt die Reiz-Antwort-Kopplung einem Zeitversatz von mehreren Millisekunden, bedingt durch die räumliche Distanz (synaptischer Spalt) von Prä- und Postsynapse. Vor Allem die Diffusion der Transmittermoleküle sorgt für diese Verzögerung. Um genau diese Problematik zu umgehen, war es notwendig direkte Messmethoden für die Neurotransmitterfreisetzung zu entwickeln, die auf die Präsynapse angewendet werden konnten. Allerdings ist die präsynaptische Endigung mit Elektroden oder anderen Sonden aufgrund ihrer geringen Größe schwer zugänglich. Unterschiedliche Lösungsansätze wurden vorgeschlagen und verwendet, die sich u.a. auf spezialisierte und überdimensionierte Synapsen bezogen (Reticulospinale Riesensynapse im Neunauge (Low P *et al.* 1999); Retinale Bipolarneurone im Goldfisch (Heidelberger R *et al.* 1994); glutamaterge Calyx-von-Held-Riesensynapse im Stammhirn (Borst JG *et al.* 1995); Ribbon-Synapse der inneren Haarzellen (Moser T und Beutner D 2000; Beutner D *et al.* 2001)). Eine äußerst praktische Lösung wurde von Rosenmund und Stevens (1996) eingeführt. Sie legten eine neuronale Zellkultur an, in der einzelne Neurone Synapsen mit sich selbst ausbilden (Autapsen). Durch diese Technik können sowohl excitatorische, wie auch inhibitorische Neurone aus diversen Gehirnarealen (z.B. Hippocampus) studiert werden.

1.3 Die Chromaffinzelle als Modell für geregelte Exozytose

Regulierte Exozytose ist nicht nur auf Neurone limitiert, sondern findet auch in endokrinen und neuroendokrinen Zellen statt. Im Vordergrund steht die Exozytose von LDCVs, deren Zweck es ist, ihren Inhalt in den extrazellulären Raum freizusetzen. So sezernieren β -Zellen des Pankreas z.B. Insulin mittels LDCV-Exozytose ins Blut, um verschiedenste metabolische Prozesse zu kontrollieren, u.a. die Glucose-Konzentration im Blut (Eliasson L *et al.* 2008). Sekretion des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) aus Cardiomyocyten erfolgt bei erhöhtem Druck und Überdehnung der Herzvorhofwand. ANP hat einen Blutdruck senkenden Effekt und wirkt sowohl in der Niere als auch in der glatten Muskulatur der Arteriolen (Dietz JR 2005).

Für die hier präsentierte Studie ist ein anderer Zelltyp mit regulierter Exozytose von Bedeutung. Neuroendokrine Chromaffinzellen des medullären Gewebes der Neben-

nieren sezernieren Katecholamine (u.a. Adrenalin, Noradrenalin) mit Hilfe von LDCVs in den Blutkreislauf. Dies erfolgt vor allem als Antwort auf Stress- und Gefahrensituationen (Kampf- oder Fluchtverhalten, „fight or flight“) und hat die Steigerung der Herzfrequenz, Anstieg des Blutdrucks, eine Erweiterung der Bronchiolen, eine schnelle Bereitstellung von Energiereserven durch Fettabbau (Lipolyse), sowie die Freisetzung und Biosynthese von Glucose zur Folge (Axelrod J und Reisine TD 1984).

Die vier genannten Zelltypen (Neurone, β -Zellen, Cardiomyocyten, Chromaffinzellen) stellen nur einen Bruchteil der Zelltypen dar, die regulierte Exozytose betreiben. Es zeigt aber die Notwendigkeit, genau diesen wichtigen Prozess der geregelten Exozytose exakt zu verstehen.

Neurone und Chromaffinzellen besitzen während der Embryonalentwicklung die gleichen Vorläuferzellen. Induziert durch Wachstumsfaktoren für Fibroblasten und Nerven, differenzieren sich diese Vorläuferzellen zu Neuronen. Glukokortikoide hingegen induzieren die Ausprägung zu Chromaffinzellen (Cole TJ *et al.* 1995). Im Laufe der Embryonalentwicklung wandern die Chromaffinzellen von der Neuralleiste zur Medulla der Nebenniere. Die Nebennieren sind ein Teil des sympathischen Nervensystems und werden durch den *Nervus splanchnicus minor* innerviert. Die Medulla ist der innere Teil der Nebenniere, paarige endokrine Organe, deren Name sich von ihrer cranialen Lage an den Nieren herleiten lässt. Der äußere Kortex ist zuständig für die Steroidsekretion, wohingegen Katecholamine aus den Chromaffinzellen des medullären Gewebes in das Blutsystem abgegeben werden. Katecholamine werden allerdings nicht ausschließlich aus der Medulla freigesetzt; sie werden auch im Gehirn produziert, wo sie als Neurotransmitter dienen. Die Katecholamine (u.a. Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin) erhalten ihre Bezeichnung aufgrund der Tatsache, dass sie alle ein Brenzcatechin (engl.: Catechol) und eine Aminogruppe beinhalten. Es sind drei Klassen von Chromaffinzellen belegt: Adrenalin-, Noradrenalin-sezernierende Zellen, und Zellen, die beide Katecholamine ausschütten (Cahill AL *et al.* 1996; Weiss C *et al.* 1996). I.d.R. wird die Katecholaminsekretion durch Acetylcholin-Ausschüttung des *Nervus splanchnicus minor* ausgelöst.

Mit Chromaffinzellen aus der Nebenniere konnten einige Probleme beim Studium der Exozytose, die für die Neurone beschrieben wurden, elegant umgangen werden (Voets T 2000; Rettig J und Neher E 2002). Viele experimentelle Parameter können

in Chromaffinzellen konstant gehalten und zeitgleich die regulierte Exozytose mit unterschiedlichsten Methoden bei hoher zeitlicher Auflösung zugänglich gemacht werden.

Neben der Tatsache, dass Chromaffinzellen wie Neurone in der Lage sind, APs zu generieren, teilen sie mit diesen auch die Fähigkeit der schnellen synchronen Transmitterfreisetzung. Obwohl die belegten Zeitkonstanten des Freisetzungsprozesses in Chromaffinzellen mit 150-1000 ms (Kasai H und Takahashi N 1999) um den Faktor 10 höher als in Neuronen liegen, besitzen sie jedoch die wichtigsten, für die Exozytose relevanten Proteine (Kits KS und Mansvelder HD 2000).

Die Anatomie der Chromaffinzelle ist allerdings komplett verschieden zu der eines Neurons. Chromaffinzellen sind rund (Abbildung 1), zeigen, zumindest wenn sie einzeln in Kultur gebracht werden, keine Polarisierung und verfügen über keine vergleichbaren Strukturen zu beispielsweise der AZ in Neuronen. Zusätzlich sind einige wenige Proteine, die essentiell für die Sekretion in Neuronen sind, in Chromaffinzellen nicht vorhanden. Nichtsdestotrotz ermöglichen Chromaffinzellen die genaue Studie von Proteinen, die an der regulierten Exozytose beteiligt sind, wodurch das Verständnis der molekularen Interaktionen während der Exozytose wesentlich vertieft wurde.

Die leichte Zugänglichkeit in Kultur und die elektrischen Eigenschaften prädestinieren die Chromaffinzelle dazu, mittels Patch-Clamp-Methoden, v.a. durch Ganzzellableitungen, charakterisiert zu werden. Daraus ergibt sich ein weiterer großer Vorteil, nämlich die Möglichkeit die $[Ca^{2+}]_i$ exakt zu kontrollieren. Ca^{2+} stellt einen der wichtigsten sekundären Botenstoffe bei der Neurotransmission dar. Jedoch erlauben die meisten Neuronentypen aufgrund ihrer geringen Größe und asymmetrischen Form genau dessen exakte Kontrolle nicht. Die $[Ca^{2+}]_i$ ist u.a. von entscheidender Bedeutung, was die Menge an freisetzbaren Vesikeln betrifft (s.u.).

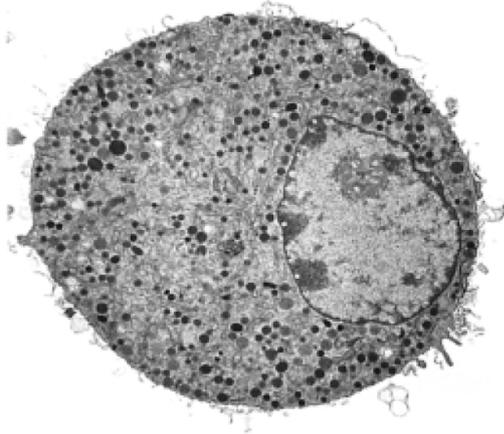


Abbildung 1. Elektronenmikroskopische Aufnahme einer bovinen Chromaffinzelle.

Im Schnitt enthält eine Chromaffinzelle zwischen 20.000 und 30.000 adrenalin- oder noradrenalinhaltige Vesikel. Diese Vesikel erscheinen dunkel und weisen nach Behandlung mit diversen Chromiumsalzen eine hohe Elektronendichte auf: deswegen engl. „large dense core vesicles“ (große Vesikel mit dichtem Kern).

(aus Plattner *et al.*, 1997)

Nicht minder wichtig ist die Tatsache, dass es sich bei Katecholaminen um oxidierbare Substanzen handelt. Über Kohlefaser-Amperometrie ist es möglich, mit hoher Präzision die Freisetzung einzelner LDCVs zu detektieren (Bruns D 2004; Borisovska M *et al.* 2005; Borges R *et al.* 2008; Neher E und Sakaba T 2008). Dabei werden die Katecholamin-Moleküle an der Spitze einer Kohlefaser, an die eine hohe Spannung angelegt ist, oxidiert. Durch die dabei entstehende Potentialänderung kann somit die Transmitterfreisetzung detektiert werden.

1.4 Molekulare Veränderungen vor einem Fusionsereignis in Chromaffinzellen

Bevor ein LDCV mit der PM verschmelzen kann, muss es mehrere molekulare Veränderungen durchlaufen (Abbildung 2). Vesikel reifen im Golgiapparat (GA) und werden dort u.a mit Neuropeptiden ausgestattet. Nach Abspaltung vom GA werden die Vesikel mit Katecholaminen beladen. Dies geschieht z.B. über vesikuläre Monoamintransporter (VMAT1/2), die in der Vesikelmembran lokalisiert sind (Gubernator NG *et al.* 2009). Ab diesem Stadium werden die Vesikel dem sog. Depotpool (DP) zugerechnet. Basierend auf Resultaten aus elektronenmikroskopischen (EM) Aufnahmen beinhaltet der Depotpool all diejenigen Vesikel, die sich weiter als 300 nm von der PM im Cytosol aufhalten (Plattner H *et al.* 1997).

Durch einen Verankerungsprozess an die PM, das sog. „Docking“, verlassen Vesikel den DP und werden nun als gedockt bezeichnet. Gemäß der Definition werden alle Vesikel als morphologisch gedockt bezeichnet, die sich in EM-Aufnahmen näher als 300 nm an der PM befinden (Plattner H *et al.* 1997). Nach dem Docking durchlaufen

Vesikel einen Reifungsprozess („Priming“) der die Vesikel fusionskompetent macht. Beim Docking handelt es sich, wie beim Priming um reversible Prozesse, sowohl in Neuronen, als auch in neuroendokrinen Zellen (Oheim M *et al.* 1998; Zenisek D *et al.* 2000).

In Folge einer lokalen Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ fusionieren geprimte Vesikel mit der PM und entleeren ihren Inhalt in den extrazellulären Raum. Später wird die Membran des fusionierten Vesikels über Endozytose wieder aus der PM abgezogen und recycelt. Das Recycling kann auf zwei Wegen ablaufen. Ein komplett mit der PM verschmolzener Vesikel wird i.d.R. via Endosomen wieder dem GA zugeführt, wohingegen ein Vesikel, das nur eine Fusionspore ausgebildet hatte (Artalejo CR *et al.* 2002), sofort wieder mit Neurotransmittern beladen werden kann und damit direkt wieder zur Verfügung steht.

Die Quantifizierung der verschiedenen Vesikelpopulationen erfolgte mit unterschiedlichen Methoden.

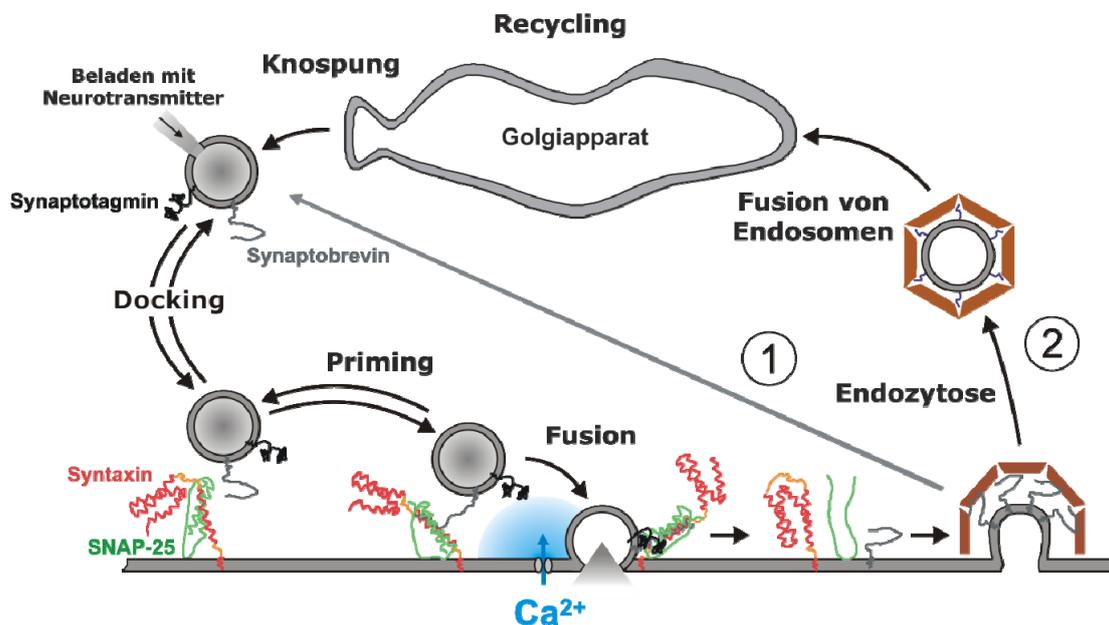


Abbildung 2. Sekretorischer Vesikelzyklus. Nach der Knospung vom Golgiapparat wird das Vesikel mit Neurotransmitter beladen. Im Anschluss daran wird es an der Plasmamembran verankert (Docking) und reift während des Primings zu einem fusionskompetenten Vesikel. Nach Einstrom von Ca^{2+} durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle kann es zur Fusion kommen. Im Folgenden wird das Vesikel endozytiert. Dabei kann es entweder sofort mit Neurotransmitter befüllt werden (1) oder (2) angesäuert und dem Golgiapparat via Endosomen erneut zugeführt werden, um dem Zyklus wieder zur Verfügung zu stehen (Becherer U und Rettig J 2006).

Eine Abschätzung der Vesikelanzahl im Depot- und gedockten Pool erfolgte durch EM-Aufnahmen, wie sie z.B. in Abbildung 3 zu sehen ist. Allerdings erlaubt dieses bildgebende Verfahren weder die Abbildung von dynamischen Präfusionsprozessen, noch die Unterscheidung von geprimten und ausschließlich gedockten Vesikeln.

Die Größe des geprimten Pools wurde durch elektrophysiologische Verfahren, genauer gesagt Membrankapazitätsmessungen ermittelt. Dabei machte man sich die runde Form der Chromaffinzelle und die elektrischen Eigenschaften der PM zu Nutze, die wie ein Kondensator funktioniert. Die gemessene Kapazität korreliert mit der Membranoberfläche, die sich z.B. durch Fusion eines Vesikels (Gong LW *et al.* 2003) mit der PM erhöht. Somit kann Exozytose als Zunahme der Kapazität der PM quantitativ gemessen werden; gleiches gilt für die Abnahme der Kapazität/Oberfläche durch Endozytose.

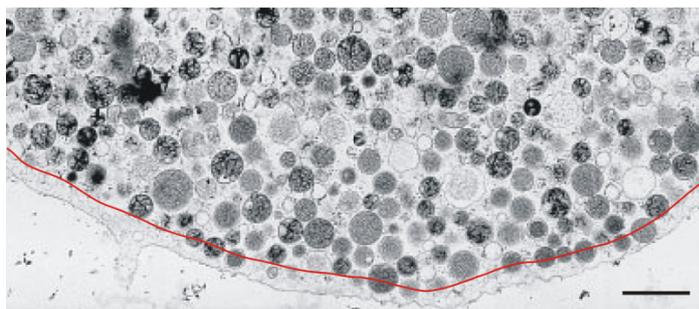


Abbildung 3. EM-Aufnahme einer bovinen Chromaffinzelle nach Hochdruckgefrierfixation. Runde, dunkle Strukturen repräsentieren LDCVs und ihre Verteilung über die Zelle. Die rote Linie zeigt den Abstand von 300 nm zur PM. Skala 1 μm . (aus Plattner *et al.*, 1997)

Zusätzlich konnten Kinetiken und Größen der geprimten Vesikelpools durch eine rasche, sprunghafte Anhebung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ermittelt werden (Rettig J und Neher E 2002). Dazu wurde die Blitzlichtphotolyse von UV-sensitiven Ca^{2+} -Puffern eingesetzt, wobei gebundenes Ca^{2+} durch einen hochenergetischen Lichtpuls freigegeben wurde. In Chromaffinzellen hatte dies eine Erhöhung der Membrankapazität zur Folge, die sich in drei Komponenten unterteilen ließ (Abbildung 4).

Die beiden ersten Komponenten wurden zusammen als sog. exozytotischer Schuss (im Folgenden „burst“) beschrieben. Sie können mathematisch am besten mit je einer Exponentialfunktion beschrieben werden. Die erste Komponente weist eine schnellere Freisetzungsrates (30 Vesikel/s) als die zweite (3 Vesikel/s) auf und wird als sog. schneller „burst“ bezeichnet. Diese schnelle Antwort entspricht der Freisetzung von Vesikeln aus dem schnell freisetzbaren Pool (engl. „rapidly releasable

pool“, RRP). Die zweite Komponente, der sog. langsame „burst“, mit einer um den Faktor zehn geringeren Freisetzungsrates, korrespondiert mit dem langsam freisetzbaren Pool (engl. „slowly releasable pool“, SRP). Beide Pools repräsentieren in ihrer Gesamtheit den geprimten Pool, also alle fusionskompetenten Vesikel zum Zeitpunkt unmittelbar vor der sprunghaften $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung. Die dritte, dauerhaft anhaltende Komponente („sustained component“) ist linear und wesentlich langsamer als die beiden erstgenannten. Es wird angenommen, dass sie den Prozess des Primings, also dem Transfer von Vesikeln des ungeprimten Pools (UPP = gedockte Vesikel) in SRP/RRP und deren sofortige Fusion widerspiegelt. Die dem Docking und Priming zugrundeliegenden Kinetiken, sowie die der entgegengesetzten Prozesse, wurden anhand von Kapazitätsmessungen bestimmt. k_0 und k_{-0} repräsentieren die Raten für das An- und Abdocken. k_1 und k_{-1} sind die Raten für das Priming und den dazugehörigen rückwärts gerichteten Prozess. Die Übergangsraten zwischen RRP und SRP werden durch k_2 , bzw. k_{-2} beschrieben.

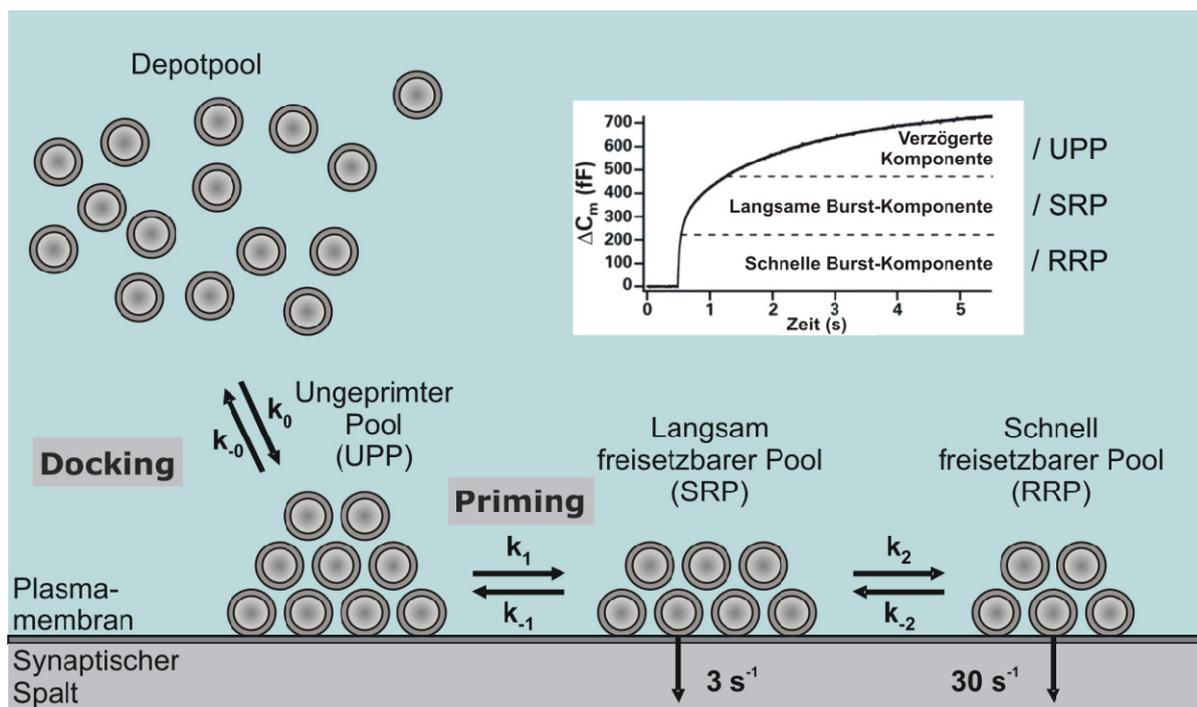


Abbildung 4. Pooldefinition. Infolge einer rapiden stufenweisen Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ zeigt die Membrankapazitätsantwort drei Komponenten (kleines Bild). Die Erhöhung der Membrankapazität ist proportional zur Anzahl fusionierender Vesikel. Die drei Komponenten der Kapazitätsantwort spiegeln drei unterschiedliche Vesikelpools wieder: ungeprimter Pool, langsam und schnell freisetzbarer Pool. (modifiziert von Rettig J und Neher E 2002).

Nofal et al. beschrieben 2007 zum ersten Mal eine Möglichkeit, Docking und Priming von LDCVs in Echtzeit mit einem Mikroskop zu visualisieren. Dabei erlaubte die – auch hier verwendete – „Caging Diameter“(CD)-Analyse die Korrelation der Vesikelbeweglichkeit mit den molekularen Stadien, die ein Vesikel durchlaufen kann. Die CD-Analyse macht es möglich, zu jedem Zeitpunkt einer Vesikellaufbahn Aussagen über das molekulare Stadium, in dem es sich aktuell befindet, zu treffen. Es wurde gezeigt, dass Vesikel im geprimten Zustand immobil sind. Mobilere Zustände wurden dem Docking oder anderen ungeprimten Zuständen zugeordnet. Zusätzlich wurden hiermit Einflüsse von diversen Substanzen, die das Gleichgewicht in der Zelle beeinflussen, untersucht.

Viele Prozesse, die an der Exozytose beteiligt sind, repräsentieren unterschiedlichste molekulare Ereignisse, Interaktionen und Abläufe. Verschiedenste Proteine und sekundäre Botenstoffe verstärken oder inhibieren diese Prozesse und auch die, die der Exozytose vorgeschaltet sind (Translokation von Vesikeln zur PM, Docking, Priming); im Folgenden sollen diese Proteine und deren Prozessierung näher erläutert werden.

1.5 Exozytose-relevante Proteine

Damit Exozytose stattfinden kann, müssen die Lipiddoppelschichten von Vesikel und PM miteinander verschmelzen. Dazu ist es notwendig, die Abstoßungskräfte der sich gegenüberliegenden polaren Kopfgruppen zu überwinden (Oberhauser AF *et al.* 1992; Churchward MA und Coorssen JR 2009), was möglicherweise durch Fusionsvermittelnde Proteine bewältigt wird. Eine Vielzahl der beschriebenen Proteine, die in den Prozess der Membranfusion involviert sind, sind in Gruppen eingeordnet worden, die extrem konservierte Regionen aufweisen (Jahn R *et al.* 2003). Obwohl vieles über die Struktur und den Aufbau eines Großteils der involvierten Proteine bekannt ist, so ist das Verständnis deren exakter Funktion noch unvollständig. Die für die Exozytose wohl bedeutendsten Vertreter sind die SNARE-Proteine.

SNARE steht für „soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor“. Die SNARE-Proteine gehören zu einer großen Superfamilie von mehr als 60 Vertretern, die von Hefe bis Wirbeltieren hochgradig konservierte Domänen enthalten (Pelham HR 1999; Jahn R und Scheller RH 2006). Zur wichtigsten Aufgabe der SNARE-Proteine gehört es, die Fusion von zellulären Transportvesikeln mit der PM oder Zielkompartimenten (z.B. Lysosomen) zu vermitteln. Es gibt zwei Klassen von SNAREs: „*vesicle-*“ oder *v-SNAREs*, die während der Abschnürung vom GA in die Membran

von Transportvesikeln eingebunden werden, und „*target-*“ oder *t-SNAREs*, die in der Membran des Zielkompartiments lokalisiert sind. Eine andere Klassifizierung zieht die strukturellen Eigenschaften der SNAREs in Betracht und unterscheidet zwischen R-SNAREs und Q-SNAREs (Chen YA und Scheller RH 2001). Beide Klassifizierungen (v/t und Q/R) finden häufige Verwendung.

Obwohl die SNAREs überaus variabel in Struktur und Größe sind, so haben doch alle mindestens ein Segment in ihrer zytosolischen Domäne gemein, das sog. SNARE-Motiv. Das SNARE-Motiv besteht aus 60-70 Aminosäuren, die in der Lage sind, reversibel eng aneinanderliegende Vier-Helix-Bündel auszubilden, den sog. „*trans-*“ SNARE-Komplex.

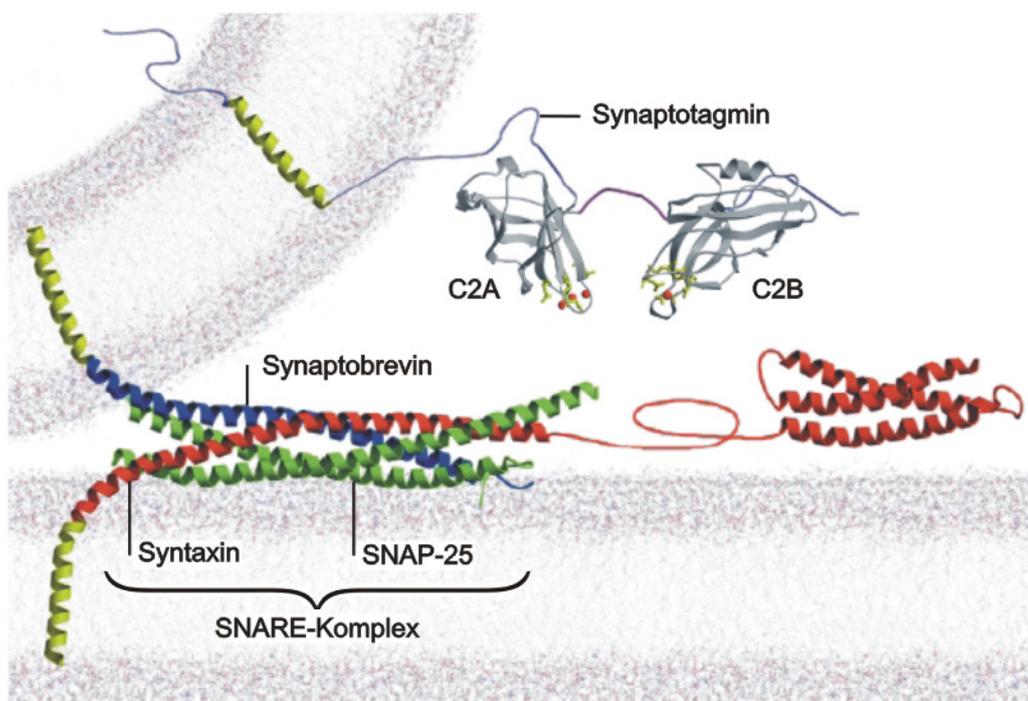


Abbildung 5. Molekulare Komponenten der Exozytose. Der SNARE-Komplex formt sich aus 4 α -Helices, wovon je eine von Synaptobrevin und Syntaxin und zwei von SNAP-25 bereitgestellt werden. Synaptotagmin dient als Ca^{2+} -Sensor und reguliert das Schließen des SNARE-Komplexes (Chapman ER 2002)

Die am besten studierten SNAREs sind die neuronalen SNAREs. In Neuronen existiert vorwiegend der metastabile „*trans-*“ Komplex, der sich aus drei SNAREs zusammensetzt: Syntaxin-1 und SNAP-25 (Synaptosomal-assoziiertes Protein 25), die in der PM sitzen (*t-SNAREs*), sowie Synaptobrevin-2 (auch Vesikel-assoziiertes Membran-Protein = VAMP) in der Vesikelmembran (*v-SNARE*). Syntaxin und Synaptobrevin sind in den jeweiligen Membranen mit ihren C-terminalen Domänen verankert,

wohingegen SNAP-25, das zwei SNARE-Motive zum Kernkomplex beiträgt, über diverse Palmitoyl-Seitenketten in der PM fixiert ist (Washbourne P *et al.* 2002). Zum SNARE-Kernkomplex, der aus einem Bündel von insgesamt 4 α -Helices besteht, tragen Syntaxin-1 und Synaptobrevin jeweils eine α -Helix und SNAP-25 zwei α -Helices bei. Es wurde gezeigt, dass t-SNAREs in abgegrenzten Mikrodomänen oder Clustern vorkommen, die essentiell für die korrekte Funktion der Exozytose in einer Zelle sind (Sollner T *et al.* 1993; Bennett MK und Scheller RH 1994; Hanson PI *et al.* 1997; Sutton RB *et al.* 1998; Lonart G und Sudhof TC 2000; Sieber JJ *et al.* 2007).

Unmittelbar vor der Fusion bildet sich der o.g. „trans“-SNARE-Komplex aus, der sich über ein Zwischenstadium, an dem SNAP-25 und Syntaxin-1 beteiligt sind, formt und final von Synaptobrevin komplettiert wird. Es ist äußerst wahrscheinlich, dass die Ausbildung des „trans“-SNARE-Komplexes die Lücke zwischen den beiden gegenüberliegenden Lipiddoppelschichten von PM und Vesikelmembran überbrückt. Gemäß der „Zipper“-Hypothese (engl.: Reißverschluss) beginnt die Komplexbildung am N-terminalen Ende der involvierten SNARE-Motive und schreitet in Richtung der C-terminal liegenden Membrananker fort (Hanson PI *et al.* 1997; Hay JC und Scheller RH 1997). Es wird angenommen, dass der „trans“-SNARE-Komplex unmittelbar vor dem Fusionsereignis von einem locker gebundenen in ein enger gebundenes Stadium übergeht (Xu T *et al.* 1999). Diese Annahme ist im Einklang mit dem Vorhandensein eines SRP, der ebendieses locker gebundene Stadium widerspiegelt, aus dem Vesikel nur mit einer vergleichbar langsamen Rate fusionieren können. Im Gegensatz dazu würde der enger gebundene Zustand die Exozytose aus dem RRP repräsentieren (Xu T *et al.* 1999). Durch die Annäherung wird der Abstand zwischen beiden Membranen reduziert und es kann, nach Erfüllung weiterer Bedingungen, zur Fusion kommen. Der Ca^{2+} -Einstrom durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle löst die abschließende und vollständige Ausbildung des SNARE-Kernkomplexes aus. Dabei wird für den mutmaßlichen Ca^{2+} -Sensor Synaptotagmin (siehe auch Kapitel 1.7) eine entscheidende Rolle angenommen, in der er nämlich mit dem teilweise, evtl. auch schon vollständig ausgebildeten SNARE-Kernkomplex interagiert (Rizo J und Sudhof TC 1998; Sudhof TC und Rothman JE 2009). Während der Fusion verschmelzen die beiden Membranen und die involvierten SNARE-Komplexe werden nach Fusion als „cis“-SNARE-Komplexe bezeichnet, da sie jetzt in der gleichen Membranschicht verweilen. Der Abbau des SNARE-Komplexes wird durch NSF („N-ethylmaleimide sen-

sitive fusion protein“) und α -SNAPs („soluble NSF-attachment protein“) katalysiert, wodurch die einzelnen SNAREs wieder zu Verfügung stehen (Brunger AT 2001).

1.6 Priming und relevante Proteine

Unterschiedlichste Faktoren sind in der Lage, Priming zu beeinflussen. Positive Effektoren resultieren in einer Erhöhung der Primingraten (k_1 und/oder k_2 , Abbildung 4) oder einer Verringerung der Unprimingraten (k_{-1} und/oder k_{-2} , Abbildung 4); negative dementsprechend umgekehrt.

Effektoren der Primingrate sind z.B. die Vertreter der Complexine, von denen zwei Isoformen existieren: Complexin-I und -II. Mittels genetischer Deletion von beiden Isoformen konnte die Effizienz der Freisetzung extrem vermindert werden. Durch Erhöhung der extrazellulären $[Ca^{2+}]_e$ konnte diese Effizienz wieder auf Wildtyp-Niveau angehoben werden (Reim K *et al.* 2001). Ähnliche Ergebnisse wurden in Mastzellen nach Einsatz von siRNA zum Knockdown von Complexin-II erzielt (Tadokoro S *et al.* 2005). Im Gegensatz dazu verringerte man durch Überexpression von Complexin-II die Sekretion und erhielt einen schnelleren zeitlichen Ablauf von einzelnen Fusionsereignissen, was durch Amperometrie bestimmt worden war (Archer DA *et al.* 2002). Die gefundenen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Complexine auch eine zusätzliche Rolle bei der Ausdehnung der Fusionspore haben. Damit würde den Complexinen eine multimodale Funktion zufallen (Brose N 2008). Durch alleinige Verwendung von elektrophysiologischen Methoden kann dies jedoch nicht abschließend geklärt werden.

Protein Kinase A (PKA) wurde mit Beeinflussung der Unpriming-Rate k_{-1} in Verbindung gebracht. Durch die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ wird die Produktion von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) angekurbelt, wodurch wiederum PKA aktiviert wird. Die konstitutive Aktivität von PKA führt zu einer Phosphorylierung von SNAP-25, die notwendig für die Aufrechterhaltung einer großen Anzahl von Vesikeln im geprierten Pool ist (Nagy G *et al.* 2004).

Verringerung von k_{-1} und somit eine Erhöhung des Primings konnte mit Protein Kinase C (PKC) in Verbindung gebracht werden. Ähnlich der Aktivierung von PKA, steht als Auslöser die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, da PKC über seine C2-Domäne Ca^{2+} bindet. Diacyl Glycerol (DAG, wie Ca^{2+} ein sekundärer Botenstoff) und Phorbol ester (PE), wie z.B. Phorbol-Myristat-Azetat, das DAG imitiert, aktivieren ebenfalls PKC (Newton

AC 2003). Sowohl DAG, als auch PE binden an die C1-Domäne der PKC, die infolge dessen zur PM transloziert. PKC wirkt möglicherweise durch die Phosphorylation von SNAP-25 des Ser-187 (Nagy G *et al.* 2002).

Eine weitere Klasse von Proteinen, die das Priming beeinflussen können und notwendig dafür zu sein scheinen, sind Vertreter der Munc13-Familie: Munc13-1, -2, -3 und -4 (Aravamudan B *et al.* 1999; Augustin I *et al.* 1999; Richmond JE *et al.* 1999; Brose N *et al.* 2000; Stevens DR *et al.* 2005). Sie stellen die Säugetierhomologa der unc-13 dar, eine Familie von Proteinen, die ursprünglich in *C. elegans* gefunden wurden (Brenner S 1974). Die Struktur der Munc13-Vertreter ist hochgradig konserviert. Munc13-Proteine besitzen zwei „Munc-Homologie-Domänen“ (MHD), eine C1-Domäne und zwei (Munc13-1, -2 and -3, neuronenspezifisch) oder drei (Munc13-4) C2-Domänen. Die C2-Domänen fungieren als Ca^{2+} /Phospholipid-Bindungs-Domänen. Die C1-Domäne ist funktionell ziemlich ähnlich der C2-Domäne der PKC, die dort die DAG-Bindungs-Domäne darstellt (Betz A *et al.* 1998; Ashery U *et al.* 1999; Rhee JS *et al.* 2002). Ebenso vergleichbar wie die C2-Domäne ist das generelle Verhalten der Munc13-Proteine mit PKC. Wenn DAG oder dessen synthetische Analoga (Phorbolester) an sie binden, hat das eine Translokation zur PM zur Folge. Die dafür relevante Interaktion von Munc13-1 findet vermutlich mit Syntaxin-1 statt. Es scheint, dass aufgrund dieser Interaktion Munc18 (s.u.) vom N-terminalen Ende von Syntaxin-1 entfernt wird und so die Bildung des SNARE-Kernkomplexes nicht mehr verhindert (Brose N *et al.* 2000). In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass die Funktionsfähigkeit von Munc13 durch Punktmutationen in den MHDs und den C-terminalen Regionen der C2-Domäne der Bindungsstelle zu Syntaxin-1 beeinträchtigt wird (Madison JM *et al.* 2005; Stevens DR *et al.* 2005). Außerdem besitzen die Munc13-Isoformen eine Bindungsstelle für Calmodulin. Ein möglicher Calmodulin/Munc13-Komplex könnte als Ca^{2+} -Sensor oder Effektor fungieren, wodurch eine Modulation des Primings und der synaptischen Effizienz in Folge einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ möglich wäre (Junge HJ *et al.* 2004). So könnte z.B. eine Calmodulin-medierte Erhöhung der Effizienz der Munc13-Vertreter während andauernder synaptischer Aktivität (höhere $[\text{Ca}^{2+}]_i$) dafür sorgen, Syntaxin in seiner offenen Konformation zu halten. Die vorgenannte Interaktion könnte ein Ansatzpunkt für Ca^{2+} im Rahmen von synaptischer Aktivität sein und dadurch Kurzzeit-Plastizität beeinflussen (Junge HJ *et al.* 2004), die von Rest- Ca^{2+} abhängig ist, dass sich bei starker Stimulation langsam akkumuliert (Zucker RS 1999). Im Gegensatz dazu zeigten Augustin *et*

al. (1999), dass sowohl der freisetzbare Pool, als auch die ausgelöste Transmitterfreisetzung in excitatorischen glutamatergen Neuronen von Munc13-1 Knockout-Mäusen um 90% reduziert war. Diese Resultate deuten darauf hin, dass Munc13-1 in Neuronen als Primingfaktor anzusehen ist. Munc13-1, die ubiquitäre Form von Munc13-2 und auch Munc13-4 konnten in Chromaffinzellen mittels RT-PCR auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (C. Schirra, persönliche Kommunikation). Sekretion aus Chromaffinzellen von Dreifach-Knockout-Mäusen (Munc13-1, -2, -3) war jedoch vergleichbar mit der aus Wildtypmäusen gewonnenen Chromaffinzellen (Stevens und Rettig, unveröffentlichte Ergebnisse). Überexprimiert man Munc13-1 in Chromaffinzellen, so konnte die Sekretion beinahe verdreifacht werden, was auf eine deutliche Vergrößerung der geprimten Pools zurückgeführt wurde (Ashery U *et al.* 2000). Es stellt sich die Frage, inwieweit die Munc13-Isoformen, besonders Munc13-4, beim Priming von LDCVs in Chromaffinzellen überhaupt eine Rolle spielen oder ob andere Primingfaktoren in Chromaffinzellen wichtig sind.

DOC2, ein weiteres Protein mit zwei C2-Domänen, ähnlich Synaptotagmin und Munc13, zeigt dagegen eine ausgeprägte Ca^{2+} -Abhängigkeit seiner Aktivität. Es liegt in drei Isoformen (α , β , γ) vor und wurde mit Exozytose assoziiert (Orita S *et al.* 1995; Friedrich R *et al.* 2008). In Folge von Stimulation transloziert das Protein, getragen von einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, an die PM. Dieses Verhalten konnte sowohl für neuroendokrine Zellen, als auch Neurone gezeigt werden (Groffen AJ *et al.* 2006). Speziell DOC2 β ist als Primingfaktor zu sehen, da es Fusionskinetiken einzelner Vesikel verändert. Vor allem aber hat es Auswirkung auf die Ausdehnung der Fusionspore und wechselwirkt auch mit dem in der PM vorhandenen SNARE-Dimer aus SNAP-25/Syntaxin (Friedrich R *et al.* 2008).

CAPS (Ca^{2+} -abhängiges Aktivator-Protein für Sekretion) wurde eine Rolle als Primingfaktor angedacht (Wassenberg JJ und Martin TF 2002). Zu einem späteren Zeitpunkt konnte gezeigt werden, dass CAPS eher am Beladen der Vesikel mit Neurotransmittern beteiligt ist (Speidel D *et al.* 2005). Studien neueren Datums belegen allerdings eine Funktion, die mit der Aufrechterhaltung, bzw. Wiederbefüllung des RRP in Verbindung gebracht werden (Liu Y *et al.* 2008).

1.7 Docking und involvierte Proteine

Da es sich beim Docking um einen dem Priming vorgelagerten Prozess handelt, ist es mittels Membrankapazitätsmessungen nicht eindeutig zugänglich. Wie zuvor be-

schrieben, resultieren die meisten aktuellen Ergebnisse auf Momentaufnahmen in EM (Abbildung 3). Die einzige Analysemethode, die optimal dazu geeignet ist, den dynamischen Dockingprozess in Echtzeit zu beobachten ist die Interne Total-Reflektionsfluoreszenz-Mikroskopie (engl. „Total internal reflection fluorescence microscopy“, TIRFM, für Details siehe Kapitel 2.2.9).

Bis dato ist in Ermangelung von passenden Techniken (ausgenommen TIRFM) nicht viel über Docking-relevante Proteine und deren Funktion bekannt. Des Weiteren weisen einige Proteine, die mit Docking in Verbindung gebracht werden, ein ambivalentes Verhalten auf. Entweder haben sie Auswirkungen auf nacheinander geschaltete Prozesse, wie Docking und Priming, oder regulieren gegenläufige Funktionen eines Prozesses, wie Docking und Undocking. Ein ausschließlich in Docking involviertes Protein konnte bisher nicht beschrieben werden.

Eines dieser ambivalenten Proteine scheint Synaptotagmin-1 zu sein. Über seine Rolle als fusionsauslösender Ca^{2+} -Sensor, welche vermutlich über dessen zwei C2-Domänen mediiert wird, wurde bereits berichtet (siehe Kapitel 1.6). Um an der PM verankert zu werden, muss ein Vesikel über Proteine verfügen, die eine Protein(Granule)-Protein(PM)-Interaktion ermöglichen. Zwei Kandidaten für diese Interaktion stellen Synaptobrevin-2 und Synaptotagmin-1 dar. Basierend auf EM-Aufnahmen wurde darauf geschlossen, dass die Synaptobrevin-2-Knockout Maus keinen Docking-Phänotyp zeigt (Borisovska M *et al.* 2005; Gerber SH *et al.* 2008). Aktuell konnte jedoch in einer Studie von de Wit *et al.* (2009) demonstriert werden, dass Synaptotagmin-1 an einen SNAP-25/Syntaxin-1-Komplex bindet und dadurch anscheinend die strukturelle Grundlage für einen minimalen Dockingkomplex legt. Ob dieser Prozess Ca^{2+} -abhängig ist, ist allerdings noch nicht geklärt (de Wit H *et al.* 2009).

Ebenfalls eine Doppelfunktion hat Munc18-1, das zur Familie der sec1/Munc18 (SM)-Proteine gehört. Es wird in Synapse lokalisiert und bindet an die N-terminale Habc-Domäne von Syntaxin-1, die sich außerhalb des SNARE-Motivs befindet (Toonen RF *et al.* 2006). Durch die Bindung an Syntaxin-1 wird dessen geschlossene Konformation stabilisiert, was Syntaxin-1 von einer Interaktion mit Synaptobrevin und SNAP-25 abhält (Dulubova I *et al.* 1999). Die Annahme, dass bei Deletion von Munc18-1 ein Anstieg der Sekretion zu beobachten sei, fand sich nicht bestätigt. Mehr noch, wurde doch das Gegenteil in Chromaffinzellen beobachtet (Voets T *et al.* 2001). Die gängi-

ge Meinung zu Munc18-1 ist, dass es als Chaperon fungiert und Syntaxin in der PM stabilisiert. Zusätzlich wurde eine Interaktion von Munc18-1 mit Syntaxin beim Docking angenommen. Es scheint, dass es mit dem Aktinnetzwerk wechselwirkt. Dadurch verändert sich die Durchlässigkeit des Kortexes aus filamentösem Aktin (F-Aktin), der eine Barriere zwischen Cytosol und PM ausbildet. So führte Überexpression von Munc18-1 zu einer verstärkten Depolymerisation des kortikalen Aktins und der bereits beschriebenen drastischen Zunahme freisetzbarer Vesikel (Toonen RF *et al.* 2006).

Ebenso scheint Mint (Munc18-1-interagierendes Protein) ein weiteres für das Docking vielversprechendes Protein zu sein (Okamoto M und Sudhof TC 1997). Mint liegt in zwei Isoformen vor, Mint1 (auch in Chromaffinzellen exprimiert) und Mint2. Interaktionsmöglichkeiten bieten sich mit Munc18 über eine N-terminale Munc18-Interaktionsdomäne. Des Weiteren besitzen Mints eine Phosphotyrosin-Bindungsdomäne, welche spezifisch mit Phosphatidylinositol-Phosphaten, die ebenfalls mit Exozytose in Verbindung gebracht werden, wechselwirken. Außerdem verfügen Mints über zwei PDZ-Domänen, die mit Proteinen, die in der PM inseriert sind, interagieren können (Okamoto M und Sudhof TC 1997; Biederer T und Sudhof TC 2000; Ciufo LF *et al.* 2005).

Des Weiteren scheint ein Komplex von Rab3-RIM (Rabs gehören der Superfamilie der Ras-Proteine an; RIM: Rab3 interagierendes Molekül) am Docking beteiligt zu sein (Gracheva EO *et al.* 2008). Es konnte gezeigt werden, dass es durch Überexpression von diversen Rab3-Varianten in PC12-Zellen, einer Zelllinie, die einem Phaeochromocytom der Nebennieren von Ratten entstammt, die Anzahl von gedockten Vesikeln erhöhte (Martelli AM *et al.* 2000). Das gegenteilige Ergebnis konnte durch Depletion erzielt werden (Schluter OM *et al.* 2004; Schluter OM *et al.* 2006). Zu einem ähnlichen Ergebnis führten Experimente in RIM-1-Knockout-Mäusen, in denen eine reduzierte Anzahl gedockter Vesikel beobachtet werden konnte (Schoch S *et al.* 2002; Calakos N *et al.* 2004). In *C. elegans* konnte gezeigt werden, dass der Komplex aus Rab3 und unc10, dem Homolog zu RIM, für die zielgerichtete Lokalisierung von Vesikeln an der AZ sorgt (Gracheva EO *et al.* 2008).

Ein weiterer Vertreter der Ras-Superfamilie ist die GTPase Rab27a, welches mit sekretorischen Vesikeln assoziiert ist (Fukuda M und Kuroda TS 2002). Es rekrutiert MyRIP (MyosinVIIA und Rab interagierendes Protein), das wiederum mit den Aktin-

basierenden Motormolekülen MyosinVIIa und MyosinVa interagiert (Kuroda TS und Fukuda M 2005). Rab27a und MyRIP sind beide von Relevanz für die Bewegung von Granulen im Aktinkortex (Desnos C *et al.* 2003). Es scheint aber auch möglich, dass, ähnlich wie Munc18 und Synaptotagmin-1, MyosinVa eine duale Funktion hat. Neben der Motoraktivität wurde gezeigt, dass eine Störung der MyosinVa-Aktivität durch Störung mittels RNAi zu einer Reduktion der Granulenzahl an der PM führt. Allerdings zeigt diese Behandlung nur eine Auswirkung auf die Verweildauer von Granulen an der PM, die länger als 15 s verweilen (Desnos C *et al.* 2007).

Von Myosin ist der Weg zu Aktin nicht sehr weit. Für das Protein Scinderin wird die Ca^{2+} -abhängige Kontrolle der Aktindynamik in Chromaffinzellen postuliert (Rodriguez Del Castillo A *et al.* 1990). Scinderin besteht aus sechs Scinderin-Domänen und hat drei Aktin-Bindungsstellen, zwei Bindungsstellen für Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2), sowie zwei Bindungsstellen für Ca^{2+} . Die ersten beiden Scinderin-Domänen (1. und 2. Aktin-Bindungsstelle) sorgen dafür, dass kortikales F-Aktin depolymerisiert. So können mehr Vesikel an die PM translozieren und dadurch die sekretorische Antwort erhöhen. Im Gegensatz dazu bewirkt die fünfte Scinderin-Domäne (3. Aktin-Bindungsstelle) die Ausbildung von F-Aktin. Es wurde vorgeschlagen, dass Scinderin als ein molekularer Schalter funktioniert, dessen Einfluss auf das Aktin die Sekretion in einer stimulationsabhängigen und somit Ca^{2+} -abhängigen Art und Weise reguliert (Dumitrescu Pene T *et al.* 2005).

Möglicherweise wird Docking aber auch von anderen Proteinen wie Bassoon und/oder Piccolo mediiert, die als Gerüstproteine der AZ in Neuronen anzutreffen sind (Garner CC *et al.* 2000). Diese Rolle in Chromaffinzellen ist allerdings bisher ungeklärt, scheint für Bassoon aber nicht zuzutreffen (U. Becherer, persönliche Kommunikation)

1.8 Ca^{2+} und dessen Einfluss auf Docking, Priming und Fusion

Erstmals von Setsuro Ebashi beschrieben, führt erst der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in Muskelzellen zu einer Kontraktion der Muskulatur (Ebashi S 1972). Neben den intrazellulären Funktionen ist Ca^{2+} u.a. an der Blutgerinnung und der Aufrechterhaltung der Zellmembranen beteiligt. 99 % des im menschlichen Körper vorhandenen Ca^{2+} (1-1,1 kg insgesamt) liegt in gebundener Form in Knochen und Zähnen vor. Vom restlichen Prozent befindet sich ein Zehntel im Extrazellulärraum, davon 30–55 % an Proteine gebunden, 5–15 % liegen in Form von Komplexen vor (z. B. Calciumhydro-

gencarbonat, Calciumcitrat, Calciumsulfat, Calciumphosphat oder Calciumlactat). Nur die Hälfte davon steht also in frei ionisierter und damit biologisch aktiver Form zur Verfügung, so z.B. als sekundärer Botenstoff der Exozytose (Calvi LM und Bushinsky DA 2008).

Die wichtige Rolle von Ca^{2+} bei der Exozytose wurde in den vorigen Kapiteln beleuchtet. Es dient vorrangig als Auslöser für die Fusion, wenn es nach Einstrom durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle mit Synaptotagmin interagiert. Des Weiteren wirkt Ca^{2+} über cAMP, die damit verbundene Aktivierung von PKA und Phosphorylierung von SNAP-25, auf die Größe des gepimten Vesikelpools ein. Die durch PKC medierte Verringerung der Unpriming-Rate bei Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wirkt in die gleiche Richtung. Die Primingfaktoren Munc13, DOC2 und CAPS sind weitere, ebenfalls durch Ca^{2+} beeinflusste Proteine. Über Ca^{2+} -abhängiges Docking konnte hingegen bisher nur spekuliert werden. Involvierte Proteine, die möglicherweise durch Ca^{2+} beeinflusst werden könnten, stellen Synaptotagmin-1 und Scinderin. Das letztere scheint eher für die Zugänglichkeit von Vesikeln zur PM zu sorgen, ist somit eher als Transporteffekt zu sehen und nicht unbedingt mit Docking in Verbindung zu bringen (Neher E und Sakaba T 2008).

Wie die kurze Zusammenfassung zeigt, sind einige für Fusion und Priming relevante Proteine bekannt, die eine mehr oder minder starke Ca^{2+} -Abhängigkeit aufweisen. Im Hinblick auf Ca^{2+} -abhängiges Docking liegen bisher nicht viele Erkenntnisse vor, was aus dem Problem der Zugänglichkeit dieses Prozesses und dem Fehlen von validen Messmethoden resultiert. Und nicht nur der Dockingprozess ist schwer zugänglich, auch der dynamische Einfluss des sekundären Botenstoffes Ca^{2+} lässt sich bis dato schlecht nachweisen. In fixierten EM-Präparaten verliert man die Dynamik. In *in vitro*-Versuchen, z.B. in Liposomen-Ansätzen, können dagegen grundlegende Charakteristika geklärt werden, allerdings sind oftmals Abweichungen u.a. im zeitlichen Ablauf (z.B. Fusionsraten) zu Ergebnissen aus *in vivo*-Versuchen zu beobachten (Holt M et al. 2008).

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die *in vivo*-Wirkung von Ca^{2+} und dessen Auswirkung auf die Präfusionsschritte. Das die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vor einem Stimulus eine entscheidende Rolle beim Priming und der Fusion spielt, wurde von Voets (2000) in UV-Blitzlicht-Photolyse-Experimenten gezeigt. Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde dabei auf bestimmte prästimulus Konzentrationen (0.25 – 1.5 μM) angehoben, woraufhin eine UV-

Blitzlicht-Photolysereaktion für eine rapide Anhebung der $[Ca^{2+}]_i$ sorgte. Das dabei auf Konzentrationen von $>10 \mu M$ angehobene $[Ca^{2+}]_i$ hatte die Fusion aller fusionskompetenten LDCVs zur Folge, deren Menge und damit die Poolgröße von der prästimulus- $[Ca^{2+}]_i$ abhing. Es wurde ein optimaler Wert für eine maximale Poolbefüllung beschrieben, der bei 700 nM freien $[Ca^{2+}]_i$ lag. Ähnliche Werte konnten durch Ca^{2+} -Rampen-Experimente reproduziert werden, bei denen das $[Ca^{2+}]_i$ langsam von geringen nanomolaren auf mikromolare Konzentrationen (daher Rampe) angehoben und parallel die Membrankapazität verfolgt wurde (Soerensen JB *et al.* 2002; Liu Y *et al.* 2008).

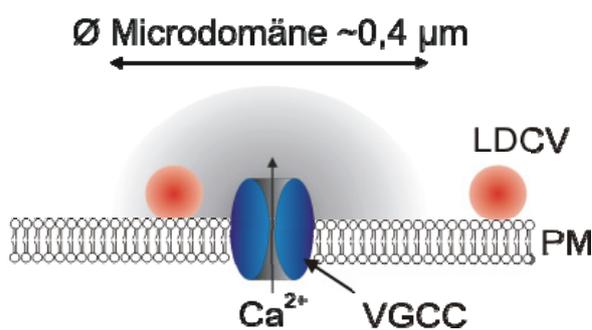


Abbildung 6. Schematische Darstellung einer Ca^{2+} -Mikrodomäne. LDCV, Large Dense Core Vesikel; PM, Plasmamembran; VGCC, spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanal.

Um Sekretion auszulösen, müssen Ca^{2+} -Ionen durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle in die Zellen eindringen. Innerhalb der Zellen liegen endogene Ca^{2+} -Puffer vor, die abhängig von der Stärke der Stimulation für lokal mehr oder minder begrenzte Ca^{2+} -Signale sorgen. Endogene Ca^{2+} -Puffer stellen z.B. Mitochondrien, die PM- Ca^{2+} -ATPase (PMCA) oder der Na^+/Ca^{2+} -Austauscher zu betrachten (Park YB *et al.* 1996). Bei moderater Stimulation (z.B. Ruhebedingungen, AP-Frequenz $\sim 0,5 \text{ Hz}$; Fulop *et al.* 2005) bilden sich sog. Ca^{2+} -Mikrodomänen (Abbildung 6). Diese Mikrodomänen wurden für Chromaffinzellen von Klingauf und Neher (1997) in einem mathematischen Modell nachgebildet. Bei einer Anzahl von ~ 10.000 Ca^{2+} -Kanälen in der PM und einer intrazellulären Ca^{2+} -Pufferkonzentration von $0,5 \mu M$ ergab eine Depolarisation von 20 ms Dauer einen Ca^{2+} -Einstrom, der in einem Umkreis von $<50 \text{ nm}$ um den Kanal eine lokale $[Ca^{2+}]_i$ von $>2 \mu M$ erzeugt. Wurde eine geringere Pufferkonzentration angenommen ($0,1 \mu M$), so wurden Mikrodomänen $>2 \mu M$ berechnet, die einen Radius von bis zu 150 nm um den Ca^{2+} -Kanal besitzen. Mit zunehmender Entfernung von der PM ist jedoch ein steiler Abfall des Konzentrationsgradienten zu beobachten. Bis 20 nm Abstand von der PM, bzw. vom Kanal liegen

noch etwa Konzentrationen von ca. 2 μM vor; bei ca. 75 nm sind es nur noch etwa 0,5 μM .

Diese lokalen Mikrodomänen haben die Idee aufgebracht, dass es, wie in Neuronen um die AZ, spezielle Regionen (sog. „Hotspots“) geben könnte, an denen bevorzugt Sekretion stattfindet. Ein lokaler Einstrom von Ca^{2+} -Ionen konnte in Experimenten beobachtet werden, in denen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit dem Indikator Rhod-2 ($K_d\text{Ca}^{2+}$: 570 nM) gemessen und an verschiedenen Orten der PM mit Amperometrie die Freisetzung von Katecholaminen detektiert wurde (Schroeder TJ *et al.* 1994; Robinson IM *et al.* 1995). Mittels Interferenz-Reflektions-Mikroskopie zur Detektion von Sekretion in Kombination mit Ganzzelleableitungen konnten Wu *et al.* (2009) Hinweise dafür geben, dass es anscheinend nur einen sehr schwach ausgeprägten Zusammenhang zwischen Ca^{2+} -Kanälen, also möglichen Mikrodomänen, und den Sekretionsorten gibt (Wu M *et al.* 2009). Hingegen zeigten Becherer *et al.* (2003), dass sich LDCVs an Ca^{2+} -Kanäle in folge von Ca^{2+} -Einstrom annähern (Becherer U *et al.* 2003). Zusammengefasst ist aber noch nicht final geklärt, ob es Hotspots in Chromaffinzellen überhaupt gibt. Möglicherweise gibt es auch einen Unterschied zwischen vereinzelt Chromaffinzellen in Kultur und Gewebeschnittpräparaten. Die Kopplung zwischen t-SNAREs und Ca^{2+} -Mikrodomänen geht in vereinzelt Zellen, wenn evtl. auch nur marginal, verloren (Lopez I *et al.* 2007). Dies könnte das Nichtvorhandensein von Mikrodomänen in kultivierten Zellen erklären. In anderen Experimenten konnten allerdings lokale Ca^{2+} -Erhöhungen (Mikrodomänen?) nachgewiesen werden, in deren Nähe LDCVs sezerniert wurden.

Gleichzeitig stellt sich auch die Frage, ob sich die Zelle den abfallenden $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Gradienten zu Nutze macht. Ist der Mechanismus des Dockings, bzw. des Transports zur PM auch in irgendeiner Weise durch Ca^{2+} beeinflusst? Die Frage, welche Auswirkungen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf Docking hat, blieb bis jetzt unbeantwortet.

1.9 Fragestellung

Ca^{2+} ist einer der wichtigsten sekundären Botenstoffe, die es im neuronalen und neuroendokrinen System gibt. Mit dieser Arbeit soll das Verständnis vertieft werden, mit dem Ca^{2+} auf die Schritte vor der Fusion einwirkt.

- 1) Welchen Einfluss hat Ca^{2+} auf die laterale und axiale Vesikelmobilität?
- 2) Inwiefern kann das Modell von Nofal *et al.* (2007) auch auf Docking ausgedehnt werden?
- 3) Welche Rückschlüsse lassen sich durch die Verweildauer von LDCVs an der PM auf den Grad des Dockings ziehen?
- 4) Wie verhalten sich LDCVs vor ihrer durch Ca^{2+} -Einstrom ausgelösten Fusion? Welchen Zusammenhang gibt es zwischen Fusionszeitpunkt und Vesikelmobilität?
- 5) Haben Chromaffinzellen in Kultur bevorzugte Sekretionsorte („Hotspots“)?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien

Aprotinin	Sigma
BAPTA	Sigma
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma
Cäsiumhydroxid	Sigma
Diazo-2	Invitrogen
DMEM	Invitrogen
Dithiotreitol (DTT)	Sigma
D-Glucose	Merck
DNase	Roche
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Invitrogen
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen
Fura2	Invitrogen
Fura2-AM	Invitrogen
FuraFF	Invitrogen
Glutaminsäure	Sigma
H ₂ O	Sigma
Isopropanol	Roth
ITS-X	Invitrogen
Mg-ATP	Sigma
Na ₂ -GTP	Sigma
Normal goat serum (NGS)	Invitrogen

NE-Puffer 10x	Biolabs
N-(2-Hydroxyethyl)-1 piperazine-N'-(ethanesulfonic acid) (HEPES)	Sigma
OptiMem1	Invitrogen
10x PCR Buffer	Sigma
Penicilline/Streptomycine	Invitrogen
Puffer P1-3, N3, EB, QBT, QC, QF	Quiagen
RNase Inhibitor	Roche
RPMI	Invitrogen
Trypsin Inhibitor	Sigma

Alle Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt) bezogen.

2.1.2 Enzyme

Agel	Biolabs
Chymotrypsin	Sigma
Collagenase CLS	Biochrom AG
Collagenase F	Sigma
HindIII	Biolabs
NotI	Biolabs
Papain	Sigma
RedTaq-Polymerase	Sigma
Trypsin	Invitrogen
SmaI	Biolabs
SP6-RNA-Polymerase	Roche

2.1.3 Plasmide

Plasmide pSFV1 und pNPY wurden von Dr. Ulf Matti bereitgestellt (Physiologisches Institut, Universität des Saarlands, Homburg, Deutschland).

2.1.4 Medien und Lösungen

2.1.4.1 Lösungen für Chromaffinzellpräparation

Locke's

154 mM NaCl

5.6 mM KCl

0.85 mM NaH₂PO₄ x H₂O

2.15 mM Na₂HPO₄ x H₂O

10 mM glucose

pH 7.4; ~312 mOsm

Dissociation Lösung

80 mM L-Glutaminsäure

55 mM NaCl

6 mM KCl

1 mM MgCl₂

10 mM HEPES

10 mM glucose

pH 7; ~283 mOsm

Collagenaselösung (bovine Präparation)

129,5 U/ml Locke's

Papainlösung (murine Präparation)

45 µl Papain 100 U / 100µl

7,5 µl BSA 10 mg / 100 µl

15 µl DTT 10 mM

in 1,5 ml Dissociation Lösung

Collagenaselösung (murine Präparation)

18,6 µl Collagenase F 15 U / 100 µl

7,5 µl BSA 10 mg / 100 µl

15 µl CaCl₂ 10mM

in 1,5 ml Dissociation Lösung

Inaktivierungslösung (bovine Präparation)

10% FCS in Locke's

Medium

Für zwei 6-Well-Platten:

40 ml DMEM

400 µl ITS-X

160 µl Pen./Strep.

→ frisch angesetzt; 37°C, 9% CO₂

2.1.4.2 Lösungen zur Virusaktivierung

OptiMemI ohne FCS, + 0,2% BSA

OptiMemI 44ml

Tryptosephosphat 5ml

HEPES 1M 1ml

Pen / Strep 50µl

BSA 0,1g

→ steril/ 4°C

Aprotinin

6 mg / ml in HBS (Aliquots, -20°C)

Chymotrypsin

2 mg / ml in HBS (Aliquots;-20°C)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Die in dieser Arbeit beschriebenen Techniken basieren auf der Detektion des von fluoreszenten Proteinen emittierten Lichtes. Während meiner ersten Messperiode hatte ich die Möglichkeit, das für Bleichartefakte anfällige monomerische rot-fluoreszierende Protein (mRFP) (Nagai T *et al.* 2002) gegen die photostabilere Variante mCherry (Shaner NC *et al.* 2004) auszutauschen. Neben der höheren Stabilität ist die Emission von mCherry ebenfalls höher, wodurch ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis erzielt wurde (ca. Faktor 3). Um in den vorhandenen Plasmidkonstrukten mRFP gegen mCherry auszutauschen, wurden einige molekularbiologische Methoden angewendet.

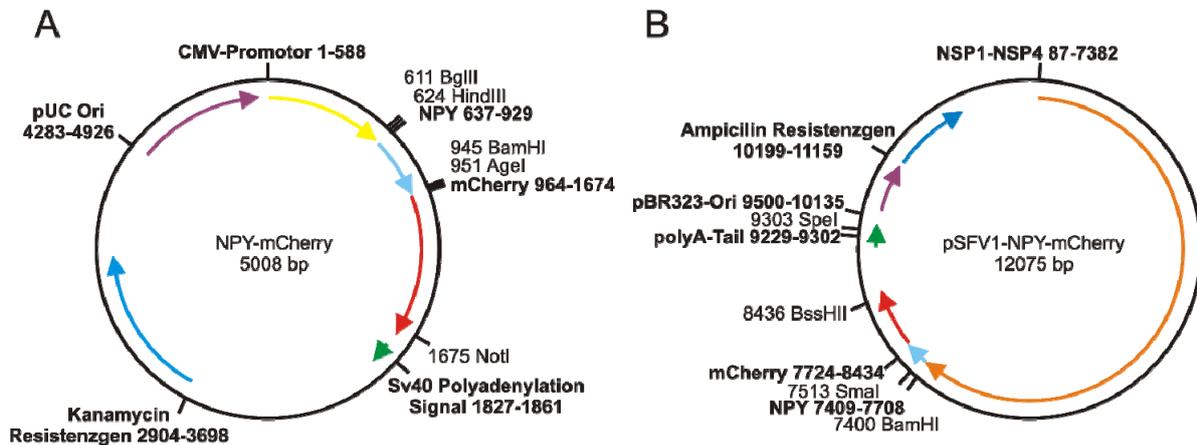


Abbildung 7. Plasmidkonstrukte (A) NPY-mCherry und (B) pSFV1-NPY-mCherry. Eingezeichnet sind die im Folgenden benötigten Schnittstellen für Restriktionsenzyme, sowie Antibiotika-Resistenzen. CMV-Promotor: Promotor des Cucurbit Mosaic Virus.

2.2.1.1 Restriktionsspaltung

Mit der Restriktionsspaltung können entweder gezielt DNA-Fragmente ausgeschnitten oder die korrekte Insertion nach Subklonierung kontrolliert werden. Die Hydrolyse der im Zuckerphosphatrückgrad beider Einzelstränge eines DNA-Doppelstrangs vorkommenden Bindungen zwischen Phosphatgruppe und Desoxyribose ist die Aufgabe von Restriktionsenzymen. Nach erfolgter Spaltung erhält man 5'-Enden mit einer endständigen Phosphatgruppe und 3'-Enden mit einer Hydroxylgruppe.

Die am häufigsten verwendeten TypII-Endonukleasen schneiden die DNA innerhalb einer vom verwendeten Enzym abhängigen, typischen Erkennungssequenz (i.d.R. 4-

8 Basenpaare). Als Produkt entstehen entweder glatte oder 3'-, bzw. 5'-überhängende Enden.

Ein typischer Restriktionsansatz zum Zweck der Analyse hat folgende Zusammensetzung:

5	µl	Plasmid-DNA (Endkonzentration ~1 µg)
2	µl	10× NE-Puffer
0,5	µl	Restriktionsenzym (5 – 10 Units)
12,5	µl	dH ₂ O
<hr/>		
20	µl	→ Inkubation für 2 h bei 37 °C

Unterschiedliche Restriktionsenzyme können den Einsatz von unterschiedlichen NE-Puffern (1-4) erfordern. Bei Verwendung von mehreren unterschiedlichen Enzymen, die unterschiedliche Puffer erzwingen, werden die Restriktionen nacheinander durchgeführt und mit dem jeweiligen Puffer ergänzt.

Der Ansatz eines präparativen Restriktionsverdaus erfolgt analog, unter Einsatz von insgesamt größeren Volumina (5 µg DNA).

Das mCherry-Insert wurde aus dem zur Verfügung stehenden PKC-mCherry-Konstrukt (Abbildung 7 A) ausgeschnitten und als Ersatz für das mRFP in den NPY-Vektor eingesetzt.

NPY-mRFP		PKC-mCherry	
1,3	µl DNA (3-4 µg)	1,3	µl DNA (3-4 µg)
1	µl Agel	1,5	µl Agel
1	µl NotI	1,5	µl NotI
6	µl Puffer O ⁺	5	µl Puffer O ⁺
40,7	µl dH ₂ O	40,7	µl dH ₂ O
<hr/>		<hr/>	
50	µl	50	µl

Um das NPY-mCherry-Konstrukt auch im Semliki-Forest-Virus-System nutzen zu können, wurde das zuvor hergestellte NPY-mCherry-Konstrukt aus dem Vektor ausgeschnitten und anstelle des existierenden NPY-mRFP in den pSFV-1 eingesetzt (Abbildung 7 B).

pSFV-1-NPY-mRFP	NPY-mCherry
1,5 µl DNA (3-4 µg)	1 µl DNA (3-4 µg)
1 µl Smal (glatt)	1 µl HindIII
	1 µl NotI
5 µl Puffer Tango	5 µl Puffer B
42,5 µl dH ₂ O	42 µl dH ₂ O
50 µl	50 µl

2.2.1.2 Dephosphorylierung von Vektoren

Um zu verhindern, dass es zu einer Religation des Vektors nach dem Restriktionsverdau kommt, vor allem wenn nur wie im Falle des pSFV-1 (Kapitel 2.2.1.1) mit einem Enzym geschnitten wurde, führt man eine Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase durch. Diese entfernt die 5'-terminalen Phosphatgruppen des linearen Vektors und beugt so der Rezirkularisierung des Vektors vor. Die Zusammensetzung des Dephosphorylierungsansatzes lautet:

16 µl	DNA-Lösung (~5 µg)
2 µl	10× Dephosphorylierungspuffer
1 µl	Alkalische Phosphatase (Shrimp, 0,1 U/µl)
19 µl	→ Inkubation für 1 h bei 37 °C (Erneute Zugabe der gleichen Enzymmenge nach 30 min)

Im Anschluss wurde das Enzym durch Erwärmung auf 75 °C für 15 min inaktiviert. Mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese wurde das Enzym aus der Probe entfernt.

2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Um die Größe der DNA-Fragmente korrekt zu identifizieren und eine Trennung und Aufreinigung zu ermöglichen, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Durch die negative Ladung ihrer Phosphatgruppen wandert die DNA beim Anlegen einer Spannung zur Anode. Wichtige Faktoren, die bei der Auftrennung von unterschiedlich großen DNA-Fragmenten von Bedeutung sind, sind dabei die Molekülgrößen und die Dichte der Gelmatrix. Hier wurden sowohl für analytische, als auch für präparative Schnitte 1%ige Agarosegele verwendet. Über einen Laufstreckenver-

gleich mit einem zusätzlich aufgetragenen Standard (Lambda-DNA nach *EcoRI/HindIII*-Verdau, bp: 21226, 5148, 4973, 3530, 2027, 1904, 1584, 1330, 983, 831, 564, 125) konnten die Molekülgrößen voneinander unterschieden werden.

Ein typisches 1 %iges Agarosegel wurde durch Vermischen und anschließendes kurzes Aufkochen in einer Mikrowelle von der entsprechenden Menge Agarose mit TAE-Puffer gelöst. Nach einer kurzen Abkühlphase auf 60 °C wurde die Lösung mit 1 µl Ethidiumbromid je 20 ml gemischt und in ein horizontales Gelbett (Easy Cast Electrophoresis System, Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH) geladen. Das erstarrte Gel wurde mit TAE-Laufpuffer überschichtet. Jede DNA-Probe wurde mit einem Sechstel ihres Volumens an Auftragungspuffer für Agarosegele versetzt und die Elektrophorese bei 60 min bei 80 V (Power Pac 200, Biorad) gestartet. Das Ethidiumbromid interkaliert dabei in die DNA, wodurch die DNA-Banden bei Bestrahlung mit UV-Licht (366 nm) sichtbar werden.

2.2.1.4 Ligation

Eine Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit glatten oder komplementären Enden kann durch T4-DNA-Ligase erzeugt werden. Das Enzym katalysiert die Veresterung eines 5'-Phosphorsäureesters mit einer 3'-Hydroxylgruppe. Im Falle der zuvor erfolgten Dephosphorylierung am 5'-Ende mit alkalischer Phosphatase kommt es im rekombinierten DNA-Molekül in beiden Strängen zu je einem Einzelstrangbruch (3'-Hydroxylgruppe Insert ⇔ 5'-Hydroxylgruppe Vektor). Trotz dieser Instabilität lässt sich das DNA-Molekül in eine Bakterienzelle transformieren, wo dann die zelleigenen Reparaturmechanismen die Einzelstrangbrüche beseitigen.

Bei Ligation komplementärer DNA-Enden werden ca. 20 ng Vektor-DNA eingesetzt und dazu im molaren Vektor-Insert-Verhältnis 1:3. Die doppelte Menge Insert-DNA wird verwendet, wenn eine Ligation von glatten Enden erfolgen soll (Vektor-Insert-Verhältnis 1:6). Zu Vektor und Insert wird 2 µl 10× Ligationspuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (1:3 mit dH₂O verdünnt = 2 Units) gegeben. Nach Auffüllen des Ansatzes mit dH₂O auf 20 µl wird dieser für ~3 h bei 16 °C inkubiert. Die Ligation von glatten Enden (pSFV + NPY-mCherry) wurde für 16 h bei 16 °C inkubiert.

In einer Ligationskontrolle wird parallel ein Ansatz ohne Insert-DNA präpariert. Nach erfolgter Transformation dieses Kontrollansatzes dient die Anzahl der Kolonien als Indikator für die Religation des Vektors. Nach der Inkubation wurde das Enzym bei >65 °C für 10 min inaktiviert.

NPY + mCherry			pSFV + NPY-mCherry	
2	µl NPY (~10 ng)	<u>Vektor</u>	2	µl pSFV (~10 ng)
3	µl mCherry (~20 ng)	<u>Insert</u>	6	µl NPY-mCherry (~20 ng)
1	µl T4-DNA-Ligase		1	µl T4-DNA-Ligase
2	µl 10× T4-Ligationspuffer		2	µl 10× T4-Ligationspuffer
12	µl dH ₂ O		9	µl dH ₂ O
<hr/>			<hr/>	
20	µl		20	µl

2.2.1.5 Transformation

Die subklonierte DNA wird in kompetent gemachte *E. coli*-Zellen transformiert (bereitgestellt von Dr. Ulf Matti). 100 µl kompetente *E. coli*-Zellen werden mit z.B. 20 ng Vektor-DNA eines Ligationsansatzes oder 7-10 ng ringförmiger Plasmid-DNA gemischt und für 30 min auf Eis stengelassen. Nach einem 5minütigen Hitzeschock bei 37 °C werden die Bakterien für weitere 10 min auf Eis gegeben. Im Anschluss werden 300 µl 2YT-Medium zum Ansatz pipettiert und für 30 min bei 37 °C und 180 U/min geschüttelt. Während dieser Zeit können die transformierten Bakterien die notwendige Antibiotikaresistenz ausbilden, um auf den 2YT-Agarplatten, auf denen sie in der Folge ausplattiert werden, überleben zu können. Die Agarplatten, die mit dem gewünschten Antibiotikum angesetzt wurden, sorgen nun dafür, dass nur diejenigen Zellen überleben, die gegen das vorhandene Antibiotikum resistent sind. Dies wird als Indikator für eine erfolgreiche Transformation genutzt. Die transformierten Zellen werden bei 37 °C im Wärmeschrank über Nacht kultiviert und wachsen zu Kolonien an.

2.2.1.6 Plasmid-Mini-Präparation

Das *Quiaprep Spin Miniprep Kit* (Quiagen) ermöglicht die schnelle, hochreine Isolation kleiner Mengen (<10 µg pro Kultur) Plasmid-DNA aus Bakterien. Abgewandelt vom *Quiaprep Miniprep Handbook* (Quiagen, 1997) erfolgte diese Prozedur.

2 ml antibiotikumhaltiges 2YT-Medium werden mit einer Einzelzellkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Im Anschluss werden die Bakterienzellen 5 min bei 5000 U/min in einer Tischzentrifuge (5415 C, Eppendorf) pelletiert und in 250 µl Puffer P1 vollständig resuspendiert. Daraufhin werden die Zellen durch Zugabe von 250 µl des alkalischen und detergentzhaltigen Puffers P2, sofortiges Mischen und Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min lysiert und die DNA denaturiert.

Durch die Zugabe von 350 µl Puffer N3 wird die Lösung neutralisiert und auf die richtige Salzkonzentration eingestellt, damit die DNA an die im Folgenden eingesetzte Silicagelmembran binden kann. Das Eppendorfgefäß mit der Lösung wird dabei 4-6 Mal invertiert, um Scheren der genomischen DNA zu verhindern. Die in Puffer P1 enthaltene RNase A zerstört die zelluläre RNA. Im Anschluss wird die Probe bei 14.000 U/min für 10 min mit einer Tischzentrifuge zentrifugiert, wodurch Zellwandbruchstücke und ausgefallene Proteine zusammen mit der genomischen DNA sedimentieren. Die im Überstand befindliche Plasmid-DNA wird dann durch Dekantieren in eine Minizentrifugationssäule überführt. Die Säule befindet sich in einem Auffanggefäß und durch Zentrifugation bei 14.000 U/min für 60 s wird die DNA an die Silicagelmembran gebunden. Der im Auffanggefäß befindliche Durchfluss wird verworfen. Mittels zweier Waschschrte mit 500 µl Puffer PB, bzw. 750 µl Puffer PE wird die DNA von Salzen gereinigt (jeweils 45 s, 14.000 U/min; Verwerfen des Durchflusses). Danach wird die Säule ein letztes Mal trocken zentrifugiert und somit der restliche Waschpuffer entfernt. Die so aufgereinigte DNA wird durch mittiges Auftragen von 50 µl Puffer EB auf die Silicagelmembran, gefolgt von einer einminütigen Inkubation bei Raumtemperatur (RT) und abschließender Zentrifugation in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß eluiert (60 s, 14.000 U/min). Die erhaltene DNA wird auf ein Agarosegel (Kapitel 2.2.1.3) gegeben, analysiert und ohne weitere Aufreinigung in kompetente Zellen transformiert (Kapitel 2.2.1.5) oder sequenziert.

2.2.1.7 Plasmid-Maxi-Präparation

Zur Produktion großer Mengen hochreiner und endotoxinfreier Plasmid-DNA wurde die Maxipräparationsmethode mittels Anionenaustauschersäulen angewendet. Wie auch bei der Mini-Präparation liegt dieser Extraktionsmethode die kombinierte alkalische und SDS-basierte Zelllyse zugrunde. Im Anschluss wird die Plasmid-DNA bei geringer Salzkonzentration und niedrigem pH-Wert an eine Anionenaustauschersäule gebunden, bei mittlerer Salzkonzentration von Verunreinigungen befreit und bei hoher Salzkonzentration eluiert. Es lassen sich so bis zu 4 µg DNA pro ml Kultur gewinnen. Das Protokoll basierte bis auf geringe Abwandlungen auf dem *Plasmid Handbook* von Quiagen (1995).

Von einer 2YT-Agarplatte mit Einzelzellkolonien werden 100 ml LB-Medium (+ 100 µl Antibiotikum) angeimpft und bei 37 °C im Rüttler für 8 h inkubiert. 5 ml dieser Vorkultur werden zu 500 ml LB-Medium (+ 250 µl Antibiotikum) gegeben und über Nacht

bei 37 °C im Rüttler inkubiert. Danach werden die Bakterien 15 min bei 6000 U/min abzentrifugiert (5305, Eppendorf), im Anschluss der Überstand abgenommen und die Zellen in 20 ml Puffer P1 komplett resuspendiert. 20 ml Puffer P2 werden dazugegeben und 5-6 Mal invertiert. Während einer 5minütigen Inkubation bei RT kommt es zur Lyse der Zellen und Denaturierung von DNA und Proteinen. Durch Zugabe von 20 ml Puffer P3 (pH 5,2) und 5-6maligem Invertieren erfolgt die Renaturierung der Plasmid-DNA und, in Folge der hohen Salzkonzentration, das Ausfällen des SDS. Während der 15minütigen Inkubation auf Eis wird die Anionentauschersäule mit 10 ml Puffer QBT equilibriert. Mittels Einsatzes eines Spritzenfilters wird das Präzipitat separiert und der Durchfluss (inkl. Plasmid-DNA) auf den Anionenaustauscher gegeben. Nach Durchlaufen der Lösung, Binden der Plasmid-DNA an die Säule und zweimaligem Waschen mit je 30 ml Puffer QC wird die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert. Die DNA wird mit 10,5 ml 100%igem Isopropanol gefällt und bei 4 °C und 14.000 U/min für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (14.000 U/min, 10 min). Der Überstand wird erneut entfernt und das Pellet leicht angetrocknet. Mit Zugabe von ~450 µl Puffer EB wird die Plasmid-DNA resuspendiert.

2.2.1.8 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration an DNA wird anhand der während der Agarose-Gelelektrophorese in der DNA interkalierten Menge an Ethidiumbromid bestimmt, welche proportional zur Anzahl der vorkommenden Basenpaare ist. Über einen Vergleich der Bandenintensitäten von Probe und mitgelaufenen Standards kann die DNA-Konzentration auf einem Transilluminator (366 nm) abgeschätzt werden.

2.2.1.9 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzanalyse der Plasmide wurde von Fritz Benseler am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin (Göttingen) durchgeführt.

2.2.2 Bovine Chromaffinzellpräparation

Nach Erhalt der bovinen Nebennieren aus einem Schlachthof wurden diese von Fett- und Bindegewebe gereinigt und mit Locke's-Lösung dreimal gespült. Dazu wurde die Locke's-Lösung durch den Veneneingang in die Nebennieren gefüllt und jeweils für 5 min bei 37 °C im Wasserbad (1083, GFL, Burgwedel, Deutschland) geschüttelt.

Zum anschließenden Verdau wurden die Nebennieren mit Collagenase CLS (129,5 Einheiten/ml), abhängig von ihrer Größe, für insgesamt 20-30 min inkubiert. Um einen gleichmäßigen Verdau zu erreichen, wurden die Nebennieren nach der Hälfte der Zeit erneut mit Collagenase befüllt und auf die zuvor oben liegende Seite gelegt. Nach Abstoppen des Verdaus mit 10 ml 10%iger FCS-Lösung wurden die Nebennieren mit einer Schere aufgeschnitten, das medulläre Gewebe ausgetrennt und in eine Petrischale, deren Boden mit 10%iger FCS-Lösung bedeckt war, gegeben. Daraufhin wurde das medulläre Gewebe aufgereinigt, mittels Schere zerkleinert, in ein 50 ml Falconröhrchen gefüllt, mit 10%iger FCS-Lösung auf 50 ml aufgefüllt, 1 min vorsichtig invertiert und bei 95G (Labofuge 400R, Heraeus, Deutschland) für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde danach verworfen und die Zellen zur Vereinzelung durch ein Zellsieb in ein 50 ml Falconröhrchen gestrichen. Nach einminütigem vorsichtigem Schütteln wurden die Zellen für 7 min bei 95G zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 5 ml Locke's-Lösung resuspendiert, in ein 15 ml Falconröhrchen überführt, mit Locke's-Lösung auf 10 ml aufgefüllt und mit einer Pasteurpipette resuspendiert. Im Anschluss an vier erneute Waschschriffe, wiederum mit Locke's-Lösung, und jeweils Zentrifugation von 5 min, die ersten drei bei 70G, der letzte bei 17G, wurden die Zellen ausgezählt. Eine durch Verdünnung erreichte Zelldichte von 3×10^5 Zellen/ml wurde auf Deckgläsern in 6-Kammer-Platten ausplattiert und bei 37°C und 13% CO₂ im Inkubator aufbewahrt. Nach ca. 15 min wurden die einzelnen Kammern mit 3 ml DMEM aufgefüllt und die Zellen bis unmittelbar vor der Messung im Inkubator belassen.

2.2.3 Murine Chromaffinzellpräparation

Für die Colokalisationsexperimente der LDCV-Sekretion wurden Nebennieren von Wildtyp-Mäuse (C57BL/6NCrl, Charles River, Wilmington, USA) verwendet. Die Mäuse wurden mit CO₂ betäubt und dekapitiert. Mit einer groben Pinzette wurden Fell und Haut auf der linken Körperseite auf Höhe der unteren Rippenbögen angehoben, mit einer Schere eingeschnitten und entfernt. Danach wurde die Peritonealhöhle vorsichtig geöffnet, mit einer Feinpinzette und einer Augenschere die Nebenniere herauspräpariert und in einen vorbereiteten eisgekühlten Tropfen Dissociation-Lösung in eine Petrischale transferiert. Für die zweite Nebenniere wurde die Maus auf der linken Körperseite, wiederum unterhalb der Rippenbögen geöffnet. Auch die zweite Nebenniere wurde ebenfalls in einen weiteren Tropfen Dissociation-Lösung

gelagert. Im Anschluss wurden beide Nebennieren von Fett-, Binde- und Kortexgewebe gereinigt und in einen neuen Tropfen Dissociation-Lösung umgebettet. Daraufhin wurden die Nebennieren einmal mittig mit der Augenschere eingeschnitten, um den Enzymen beim Verdau einen besseren Zugang zu ermöglichen. Zum ersten Verdau wurden jeweils zwei Nebennieren in 1 ml Papain-Lösung in ein 15 ml-Falconröhrchen gegeben und für 10 min im Wasserbad (GFL, 1083, Burgwedel, Deutschland) bei 37 °C langsam geschüttelt. Nach Ablauf der 10 min wurde die Papain-Lösung abgenommen und durch die Collagenase-Lösung ersetzt. Nach weiteren 8 min unter vorsichtigem Schütteln bei 37 °C wurden die Nebennieren mit einer Pasteurpipette vorsichtig vortrituriert und, je nach Alter der Tiere, für weitere 4-6 min ins Wasserbad gegeben. Im Folgenden wurden die Nebennieren nacheinander jeweils zehnmal mit einer Pasteurpipette und dann mit einer blauen Eppendorfspitze (1 ml) trituriert, wodurch eine deutliche Eintrübung der Lösung erfolgte. Um die Chromaffinzellen von der Collagenase-Lösung zu trennen, wurden sie für 4 min bei 194G (Labofuge 400R, Heraeus, Deutschland) abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und durch 1 ml DMEM ersetzt.

2.2.4 Transfektion durch Elektroporation von bovinen Chromaffinzellen

Nach der bovinen Zellpräparation (siehe Kapitel 2.2.2) wurde pro Elektroporation eine Verdünnung von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml DMEM angesetzt und mit 20 µg für 3 min auf Eis in 0,4 cm Gene-Pulser-Küvetten inkubiert und mit einem Gene Pulser II (Biorad, Hercules, CA, USA) mit 230 V und 1 mF elektroporiert. Nach einer einminütigen Ruhephase auf Eis wurde die Küvette im Wasserbad für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit einer Pasteurpipette aus der Küvette entnommen. Die Zellen wurden in ca. 2 ml DMEM resuspendiert und bei 70G 2 min abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen erneut in 2 ml DMEM aufgenommen, auf Deckgläsern in einer 6-Kammer-Platte (BD Biosciences, Erembodegem, Belgien) ausplattiert, und die Kammern nach 15 min im Inkubator bei 37°C und 13% CO₂ mit 3 ml DMEM aufgefüllt, wo sie bis zum Versuch verblieben.

2.2.5 Transfektion durch Elektroporation von murinen Chromaffinzellen

Das in Kapitel 2.2.3 erhaltene Pellet wurde resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 194G wurden die Zellen in 100 µl Amaxa-Transfektionslösung und 4-6 µg DNA (NPY-mRFP) aufgenommen, in eine Küvette transferiert und mit dem Amaxa

NucleofectorII (Programm O-09; Lonza/Amaxa, Köln, Deutschland) elektroporiert. Die Zellen wurden in 500 μ l RPMI (vorgewärmt bei 37 °C) überführt, resuspendiert, ausplattiert und für 15 min bei 37 °C und 13 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die einzelnen Kammern der 6-Well-Platten mit 3 ml Kulturmedium aufgefüllt. Zur Messung wurden die Zellen zwischen dem 3. und 5. Tag in Kultur verwendet.

2.2.6 Transfektion durch Virusinfektion von bovinen Chromaffinzellen

LDCVs wurden durch Überexpression von Neuropeptid Y (NPY), dem entweder monomerisches rotfluoreszierendes Protein (mRFP, Nagai *et al.*, 2002) oder das photostabilere mCherry (Shaner *et al.*, 2004) angehängt war, markiert. Zur viralen Expression wurde die NPY-mRFP/mCherry-Sequenz durch PCR in den Vektor pSFV1 kloniert (beschrieben in Ashery *et al.*, 2000) und die entstandenen Konstrukte wurden via DNA-Sequenzierung verifiziert. In einem Zeitfenster von 12 bis 16 h nach der Transfektion hatten die Zellen eine ausreichende Vesikeldichte ($\sim 0,5$ Vesikel/ μ m²), die optimales Tracking und weitergehende Analyse erlaubte. Die Tatsache, dass durch die Virustransfektion nur ein geringer Anteil der gesamten Vesikelpopulation in einer Zelle angefärbt wird, machte diese Transfektionsmethode für die Analyse von nach Stimulation sezernierten Vesikeln ungeeignet. Für diese Studie wurden die Zellen mit dem NPY-mCherry-Konstrukt elektroporiert (siehe Kapitel 2.2.4).

2.2.7 Ratiometrische Fura-Messungen

Messungen mit ratiometrischen Ca²⁺-Indikatoren erlauben eine sehr exakte Bestimmung der Ca²⁺-Konzentration in Echtzeit. Infolge von Ca²⁺-Bindung ändern die Indikatoren über eine Absorptionsverschiebung ihre Emissionscharakteristik. Die Indikatoren werden aufeinanderfolgend mit einer Wellenlänge zwischen 280 und 430 nm angeregt. Während die Emission bei Anregung zwischen 280 und 355 nm mit Erhöhung der [Ca²⁺]_i ansteigt, verringert sich diese bei Anregung zwischen 360 und 440 nm (Abbildung 8) (Grynkiewicz G *et al.* 1985). Um die [Ca²⁺]_i zuverlässig über einen breiten Konzentrationsbereich bestimmen zu können, wurde eine äquimolare Kombination von zwei ratiometrischen Ca²⁺-Indikatoren, Fura-2 und Fura-FF, verwendet. Dabei wurden die beiden Indikatoren so gewählt, dass sie einen breiten Bereich von [Ca²⁺]_i abdeckten. Außerdem sei angemerkt, dass beide Indikatoren gleiche optische Eigenschaften aufweisen, die es ermöglichen, diese parallel einzusetzen. Die unterschiedlichen Affinitäten zu Ca²⁺ (Fura-2 K_d: 224 nM; Fura-FF K_d:

~5,5 μM) erlaubten eine exakte Messung der freien $[\text{Ca}^{2+}]_i$ über einen Bereich von 30 nM bis hin zu 20 μM .

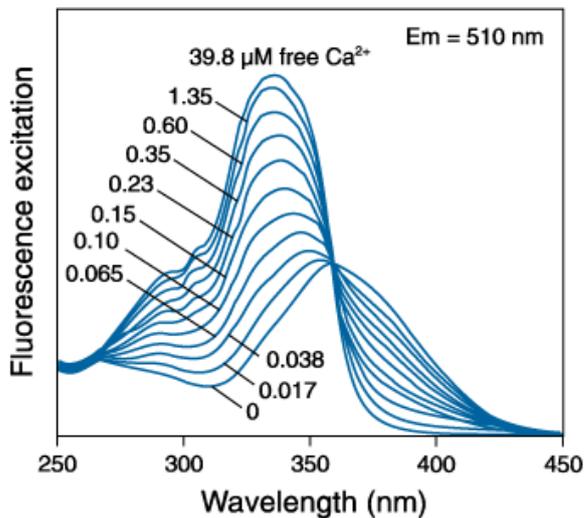


Abbildung 8. Anregungsspektrum von Fura-2 in Lösung bei freier $[\text{Ca}^{2+}]$ von 0 – 39,8 μM . Anregung mit Wellenlängen zwischen 280 und 350 nm erhöhen die gemessene Intensität bei 510 nm mit Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]$, während sich die Emission nach Anregung zwischen 360 und 430 nm entgegengesetzt verhält.

(kopiert von Molecular Probes.com)

Im Rahmen meiner Versuche wurde die Emission bei 510 nm nach alternierender Anregung durch einen Monochromator (Polychrom V, TILL Photonics, Planegg, Deutschland) bei 350 und 380 nm gemessen. Um verlässliche Aussagen über die exakte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu erhalten, wurde eine *in-vivo*-Kalibrierung mit verschiedenen Lösungen bekannter $[\text{Ca}^{2+}]$ durchgeführt, die über die Patchpipette in bovine Chromaffinzellen perfundiert wurden (Neher E und Zucker RS 1993). Die Lösungen wurden mit unterschiedlichen Ca^{2+} -Puffer-Konzentrationen (BAPTA und DPTA) angesetzt, um die entsprechenden freien $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu erhalten.

Die aus mehreren Experimenten erhaltenen Verhältniswerte R (=Intensität bei Anregung mit 350 nm/Intensität bei Anregung mit 380 nm) für diverse $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurden gemittelt und logarithmisch gegen die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dargestellt. R kann mit folgender Funktion beschrieben werden (Abbildung 9):

$$R = R_{\min} - R_1 * [\text{Ca}^{2+}]_i / ([\text{Ca}^{2+}]_i + K_{\text{Fura2}}) - R_2 * [\text{Ca}^{2+}]_i / ([\text{Ca}^{2+}]_i + K_{\text{FuraFF}}),$$

mit R_{\min} als Verhältnis bei $[\text{Ca}^{2+}]_i=0$ M und ($R_{\max}=R_{\min}-R_1-R_2$) erhalten durch Perfusion mit 7,46 mM CaCl_2 . Die Berechnung ergab für $R_{\min}=0,57$, $R_1=2,76$, $R_2=1,67$, $K_{\text{Fura2}}=173$ nM und $K_{\text{Fura-FF}}=2,1$ μM .

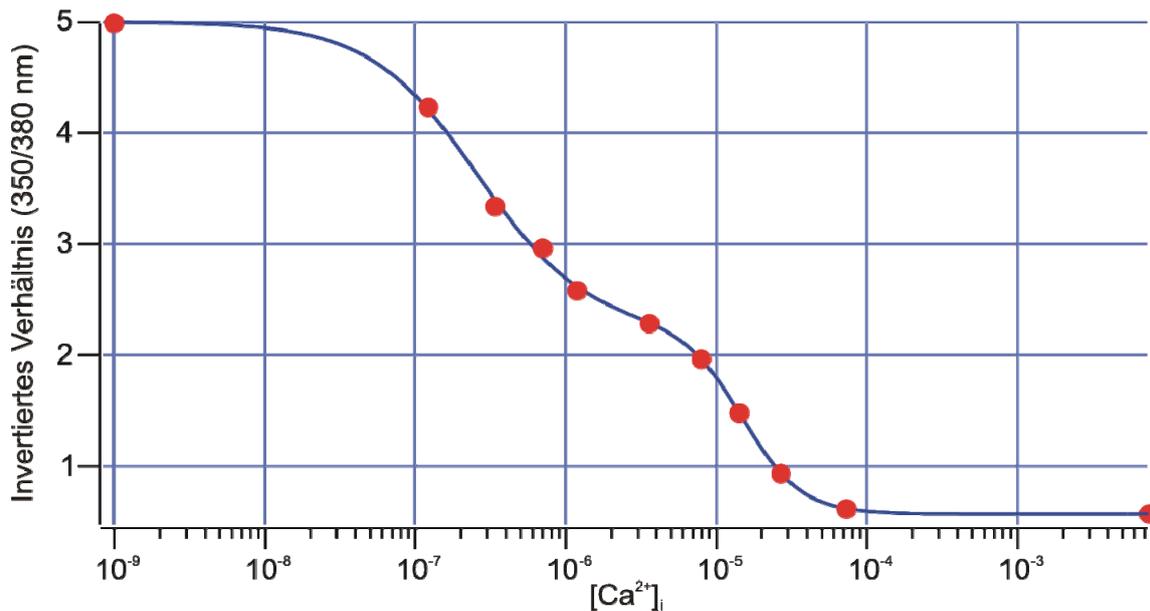


Abbildung 9. *In vivo*-Kalibrationskurve für Fura-2 und Fura-FF. Die Punkte repräsentieren den Mittelwert von 3-5 Messungen der jeweiligen Ca^{2+} -Lösung bei 510 nm Emission nach Anregung bei 350 und 380 nm. Die blaue Linie zeigt die beste, an die Datenpunkte angelegte Kurve.

2.2.8 Elektrophysiologie

Die hier beschriebenen Experimente verbinden die Ganzzell-Membran Kapazitätsmessungen mit der UV-Blitzlicht-Photolyse von NP-EGTA. NP-EGTA bewirkt eine schnelle Freisetzung von hohem $[Ca^{2+}]_i$, und damit synchronisierte Exozytose aller fusionskompetenten Vesikel. Dadurch lassen sich exakte Aussagen über die Kopplung von Stimulus und Sekretion treffen.

2.2.8.1 Ganzzell-Ableitungen - Membrankapazitätsmessungen

Die Patch-Clamp-Technik erlaubt es, elektrische Eigenschaften einer biologischen Membran zu studieren. Ursprünglich zum Studium von Ionenkanälen entwickelt, ergaben sich andere Anwendungen im Bereich der Zellphysiologie (Neher E und Sakmann B 1976), wie z.B. die zeitlich hochauflösende Messung der Membrankapazität (Neher E und Marty A 1982). Die Zellmembran geht eine hochohmige Verbindung ("Gigaseal") mit der Patchpipette ein, was sich rauchmindernd auf das gemessene Signal auswirkt. Dieses Phänomen macht es möglich, selbst einzelne Ionenkanäle innerhalb des Membranareals, das von der Pipette abgedeckt wird, zu messen (sog. "cell-attached"-Modus). Zerstört man die Membran durch kurzen Unterdruck an der Pipette, so ergibt sich ein elektrischer Zugang zum Zellinneren und der Membran-

oberfläche (sog. Ganzzell-Modus; engl. whole-cell). Die Hauptmerkmale der Ganzzelleableitung sind ein niedriger elektrischer Widerstand zwischen Pipettenlösung und dem Zelllumen, wodurch die Möglichkeit besteht, die Membranspannung zu kontrollieren. Außerdem, und dies ist in den hier präsentierten Versuchen besonders relevant, erlaubt es die Perfusion des intrazellulären Mediums mit der Pipettenlösung und somit eine Substitution von intrazellulären Komponenten.

Dabei entsprechen die elektrischen Eigenschaften einer kugelförmigen Zelle, wie z.B. einer isolierten Chromaffinzelle, im Idealfall einem Plattenkondensator (C_m ; m : Membran) mit parallel geschaltetem Widerstand (R_m). C_m ist dabei proportional zur Membranoberfläche, wobei die spezifische Membrankapazität einer biologischen Membran einen Wert von $\sim 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ hat (Cole KS 1968). Verschmilzt ein Vesikel mit der PM, wird dies in der Zunahme der Kapazität ersichtlich (Exozytose). Umgekehrtes gilt für den Fall, dass Membran wieder in die Zelle aufgenommen wird (Endozytose), was in einer Abnahme der Kapazität resultiert. Diese Möglichkeiten machen die Membrankapazitätsmessung zum perfekten Werkzeug, um Exo- und Endozytose zu messen (He L *et al.* 2009).

Als Grundlage der Membrankapazitätsmessung dient die Tatsache, dass eine Veränderung in der Stimulusspannung die Membrankapazität auflädt. Der Strom, der in den Kondensator fließt, kann gemäß der Spannung die sich über den Kondensator aufbaut, quantifiziert werden und spiegelt so die tatsächliche Membrankapazität wieder.

Eine sinusförmige Erregung wird am häufigsten zur zeitlich hochauflösenden Membrankapazitätsmessung verwendet. Dabei ist die angelegte sinusförmig oszillierende Spannung der einzige Stimulus, der bei Reihenschaltung (Widerstand, Kondensator, Induktor) in einem sinusförmigen Ausgangssignal endet. Das Ausgangssignal weist allerdings eine veränderte Amplitude und eine Phasenverschiebung auf. Wenn eine sinusförmige Spannung, definiert als $v(t) = V_0 \cos \omega t$ (mit ω als Frequenz), über einen optimalen Widerstand (R) läuft, ergibt sich der resultierende Strom aus dem Ohm'schen Gesetz: $I_R(t) = v(t)/R = (V_0/R) \cos \omega t$. Die Amplitude des Ausgangsstroms der Sinuswelle ist dabei umgekehrt proportional zum Widerstand. D.h. die über einen idealen Kondensator laufende Sinuswelle weist ein um 90° phasenverschobenes Verhältnis zwischen angelegter Spannung und ausgegebenem Strom auf ($I_C(t) = C dv(t)/dt = -\omega C V_0 \sin \omega t$). Demzufolge trägt die Differenz zwischen Eingangsspannung

und Ausgangsstrom über die Amplitude und Phase die Informationen über die elektrischen Eigenschaften des Schaltkreises. Nichtsdestotrotz ergeben sich aus einer Sinuswelle nur zwei unabhängige Parameter, die zur Bestimmung von drei in der Zelle vorkommenden Parametern herangezogen werden (R_a , R_m und C_m). Zum Überwinden dieses Problems wird am häufigsten das sog. „kombinierte Sinuswelle + Gleichstrom-Protokoll“ (sine wave + DC) verwendet (Lindau M und Neher E 1988). Dabei wird zusammen mit der Stimulus-Sinuswelle ein Gleichstrom appliziert, der eine dritte, unabhängige Komponente bereitstellt (R_a+R_m).

Die Berechnung von R_a , R_m und C_m fußt auf einer komplexen Notation und setzt einen phasen-sensitiven Detektor (sog. lock-in Verstärker) voraus. Dieser bestimmt diese Werte aus den imaginären und realen Komponenten, die aus einem komplexen Admittanzsignals ermittelt werden (Gillis KD 2000). Die Phasenverschiebung und Amplitudenänderung werden dabei jeweils für eine Periode bestimmt. Die zeitliche Auflösung ergibt sich somit aus der Frequenz der applizierten Sinuswelle, wohingegen sich die Genauigkeit der Membrankapazität über die Höhe der Amplitude definiert.

In der hier vorgelegten Arbeit wurden die Chromaffinzellen auf einem Gleichspannungs-Haltepotential von -70 mV gehalten, während die Sinuswelle eine Frequenz von 12,2 kHz hatte. Die Ganzzell-Ableitungen wurden mit Borosilikatglaspipetten (GB150F-8P, Science Products, Hofheim, Deutschland) durchgeführt, deren Serienwiderstand zwischen 3-5 M Ω lag. Die Daten wurden mit einem EPC-9-Patch-Clamp-Verstärker aufgenommen, der durch das Programm PULSE kontrolliert wurde (Heka Elektronik, Lambrecht, Deutschland). Spannungen wurden mit 20 kHz digitalisiert und R_a , R_m und C_m mit dem integrierten Lock-in-Modul der PULSE-Software berechnet. Die Daten wurden mit einer Kombination von zeitlich hochauflösenden Sinuswellen zum Zeitpunkt der Stimulation und geringer auflösenden Sinuswellen zwischen den Stimulationen überwacht, wobei letztere dazu dienten, Veränderungen in C_m im Laufe der Beobachtung zu dokumentieren, die nicht von Stimulationen herrührt. Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur zwischen 20-24°C durchgeführt.

2.2.8.2 Strom-Spannungs-Kurven

Die Strom-Spannungs-Kurve beschreibt den Zusammenhang zwischen Membranpotenzial (bzw. Haltepotenzial) und, bei Ganzzelleableitungen, dem Strom durch die Membran. Bei dem hier verwendeten Protokoll wurde mit einer Frequenz

von 20 Hz für jeweils 25 ms eine Spannung angelegt die, in Schritten von je 10 mV, beginnend vom Ruhemembranpotential (-70 mV) bis auf +20 mV variiert wurde.

Ca²⁺-Ströme wurden in der Plateauphase der Einwärtsströme gemessen. Das Ergebnis wurde über 10 benachbarte Messpunkte gemittelt. K⁺-Auswärtsströme wurden unterdrückt, das in der intrazellulären Lösung K⁺ durch Cs⁺ ersetzt wurde.

2.2.8.3 Intrazellulärlösungen – Konstante [Ca²⁺]_i

Die unterschiedlichen Lösungen hatten mehrere Vorgaben zu erfüllen. Zum einen mussten sie die [Ca²⁺]_i über längere Zeit stabil halten, also ein ausgewogenes Verhältnis von eingesetztem Ca²⁺ und freiem Ca²⁺-Puffer besitzen. Zum anderen musste eben die Konzentration des freien Ca²⁺-Puffers über die Lösungen vergleichbar sein, um eine vergleichbare Größe von Ca²⁺-Mikrodomänen zu erreichen, was wiederum zu vergleichbaren Resultaten hinsichtlich der Sekretion führte. Als Ca²⁺-Puffer wurde EGTA eingesetzt, das eine deutlich langsamere Reaktionskinetik für Ca²⁺-Ionen als BAPTA aufweist. Dadurch ist die Entwicklung ausreichend großer Ca²⁺-Mikrodomänen möglich und Sekretion kann im Falle von Stimulation stattfinden. Im allgemeinen bestanden die Lösungen aus folgenden Substanzen (siehe auch Tabelle 1, in mM): 132-143 Cs-Glutaminsäure, 0,8-5,0 CaCl₂, 2-6,1 EGTA, 1 MgCl₂, 2 Mg-ATP, 0,3 Na₂-GTP, 0,1 Fura2 und 0,1 Fura-FF. Variationen in der Osmolarität, die durch die unterschiedlichen Konzentrationen von Ca²⁺ und EGTA verursacht wurden, wurden mittels Anpassung des eingesetzten Cs-Glutamats auf einen Wert von 300 mOsm gesetzt und der pH-Wert durch Zugabe von CsOH auf 7,25 eingestellt.

2.2.8.4 Intrazellulärlösungen – Variable [Ca²⁺]_i

Neben den fixen [Ca²⁺]_i wurden auch variable Konzentrationen eingesetzt. Es gab zwei verschiedene Ansätze. Einerseits die vorsichtige, aber schnelle und konstante Erhöhung der [Ca²⁺]_i, ausgehend von Ruhekonzentrationen (ca. 100 nM) auf Konzentrationen, die optimales Priming ermöglichen (ca. 700 nM). Dieser Ansatz wurde mit partieller UV-Blitzlicht-Photolyse von NP-EGTA erreicht (Abbildung 10 C). Die NP-EGTA-Lösung setzte sich wie folgt zusammen (in mM): 135 Cs-Glutaminsäure, 5 NP-EGTA, 3 CaCl₂, 2 Mg-ATP, 0,3 Na₂-GTP, 0,1 Fura2 und 0,1 Fura-FF (Osmolarität: 300 mOsm, pH 7,25 mit CsOH eingestellt).

Tabelle 1. Eingesetzte und berechnete Konzentrationen für Mobilitäts- und Sekretionsexperimente. Gezeigt sind die eingesetzten Ca^{2+} - und Pufferkonzentrationen, sowie die berechneten freien Konzentrationen (berechnet mit Freecon-Routine in IGOR).

	Mobilitätsexperimente			Sekretionsexperimente		
				Blitz-Photolyse		Depolarisation
Freies $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (μM)	0,096	0,302	0,597	0,190	0,608	0,620
$[\text{Ca}^{2+}]$ (mM)	0,8	2,6	4,8	3,0	4,5	5,0
Freies [EGTA] (μM)	125	136	133	---	---	134
[EGTA] (mM)	2	3,8	5,9	---	---	6,1
Freies [NP-EGTA] (μM)	---	---	---	193	57,5	---
[NP-EGTA] (mM)	---	---	---	5	5	---

Um eine rasche Absenkung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ herbeizuführen, wurde Diazo-2 verwendet (Adams SR *et al.* 1989) und der entgegengesetzte Weg beschritten. Als Variante von BAPTA ist Diazo-2 mit einer Diazoacetylgruppe an einem der beiden Benzenringe von BAPTA ausgestattet. Diese Diazogruppe verringert die Affinität für Ca^{2+} von $1,4 \times 10^7$ M um den Faktor 30 auf $4,5 \times 10^5$ M. Durch photochemische Reorganisation wird die Diazoacetylgruppe von einem Elektronenakzeptor, zu einem Elektronendonator, wodurch die hohe Affinität erzeugt wird. Neben der Erhöhung der Affinität für Ca^{2+} nach UV-Blitzlicht-Photolyse wird allerdings auch die Affinität für Mg^{2+} erhöht ($K_d(\text{Mg}^{2+})_{\text{vor}}$: 5,5 mM, $K_d(\text{Mg}^{2+})_{\text{nach}}$: 3,4 mM). Die Lösung bestand aus folgenden Substanzen (in mM): 142 Cs-Glutaminsäure, 1,5 Diazo-2, 0,8 EGTA, 1 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 2 Mg-ATP, 0,3 $\text{Na}_2\text{-GTP}$, 0,1 Fura2 and 0,1 Fura-FF (Osmolarität: 300 mOsm, pH 7,25 mit CsOH eingestellt).

2.2.8.5 Perforierter Patch

Um das intrazelluläre Milieu nicht zu stören, aber trotzdem eine Messung der Membrankapazität zu ermöglichen, können Zellen auch im sog. perforierten Patch abgeleitet werden. Hierzu wird das Polyen-Makrolakton Amphotericin B aus *Streptomyces nodosum* (Actinobacterium, Gattung Streptomyceten) in der Pipettenlösung eingesetzt. Amphotericin B wechselwirkt mit der Zellmembran und führt zur Ausbildung von Poren (Durchmesser 0,8 nm). Mit der Erhöhung der Permeabilität der Membran für K^+ ergibt sich so ein elektrischer Zugang zur Zelle.

Die verwendete Lösung setzte sich wie folgt zusammen (in mM): 135 Cs-Glutaminsäure, 9,5 NaCl, 0,5 TEA-Cl, 10 HEPES und 0,53 Amphotericin B (aus Stocklösung in DMSO); 294 mOsm, pH 7,4 mit CsOH. Nach Zusammenpipettieren der Lösung wurde das Amphotericin B/DMSO durch zwei Ultraschallstöße so gelöst, dass noch einige Amphotericin-Kristalle erhalten blieben. Die verwendeten Pipetten hatten einen Widerstand von ca. 3 M Ω . Nach Erreichen des Gigaseals wurde der Eingangswiderstand solange beobachtet, bis er unter 30 M Ω gesunken war (5-20 min). Die Zellen wurden daraufhin in Abständen von einer Minute repetitiv durch 7 Depolarisationen von jeweils 100 ms mit einer Frequenz von 5 Hz auf 0 mV stimuliert, die Sekretion in TIRF aufgezeichnet und später mit Metamorph (Visitron, Puchheim, Deutschland) analysiert (Abbildung 10 D).

2.2.8.6 Depolarisationsprotokoll zur Überprüfung der Zellfunktionalität

Nach der Aufnahme der Vesikelbewegungen, insgesamt 5 min, wurden die Zellen vom Haltepotential bei -70 mV auf 0 mV depolarisiert. Das Protokoll bestand aus drei 10 ms und vier 100 ms langen Depolarisationen, die jeweils durch eine Pause von 100 ms getrennt waren (Abbildung 10 A). Dieses Protokoll ermöglichte einen Zugang zum RRP, aber im Besonderen dessen Subpopulation, repräsentiert im IRP.

2.2.8.7 Stimulation durch Depolarisation

Um eine ausreichende Anzahl von Fusionsereignissen, d.h. sezernierten LDCVs, beobachten zu können, wurde neben der Veränderung im extrazellulären Ca²⁺ und Mg²⁺ auch das Stimulationsprotokoll verändert. 10 s vor dem Ende einer 2-minütigen Beobachtungsphase wurden die Zellen zehnmal für 100 ms mit einer Frequenz von 5 Hz vom Haltepotential bei -70 mV auf 0 mV depolarisiert (Abbildung 10 B i).

2.2.8.8 Stimulation durch UV-Blitzlicht-Photolyse von NP-EGTA

Um den gesamten Pool der sezernierbaren Vesikel zu entleeren, habe ich die UV-Blitzlicht-Photolyse von NP-EGTA eingesetzt. Dazu wurden die Zellen für 2 min im Ganzzellmodus mit einer NP-EGTA-beinhaltenden Lösung perfundiert. Zwei unterschiedliche Lösungen kamen zum Einsatz, die sich jeweils in ihrer freien [Ca²⁺]_i vor Photolyse unterschieden (Tabelle 1). Der UV-Blitz (Rapp OptoElectronic GmbH, Hamburg, Deutschland) wurde für Lösung A (niedrige prästimulus-[Ca²⁺]_i, 230 nM) auf eine Spannung 110 V und eine Blitzdauer von ~1 ms eingestellt, wodurch eine

Ausgangsenergie von berechneten 181 J erzielt wurde. Für Lösung B (hohe prästimulus- $[Ca^{2+}]_i$, 700 nM) wurde ein Neutraldichte-Filter (63% Transmission, AHF Analytentechnik, Tübingen Deutschland) im Strahlengang platziert und die Blitzdauer durch Wechsel des verwendeten Kondensators auf 0,8 ms reduziert. Dadurch hatte der ausgehende Blitz eine Energie von berechneten 76 J. Durch die Anpassung der Ausgangsenergie wurde erreicht, dass das für beide Lösungen erzielte poststimulus- $[Ca^{2+}]_i$ zwischen 7 und 20 μM lag.

500 ms vor dem Auslöseimpuls für die Blitzlampe wurde ein Signal zum EPC-9 gesendet, das eine hochfrequente Sinuswelle zur Membrankapazitätsmessung für insgesamt 5 s startete (Abbildung 10 B ii).

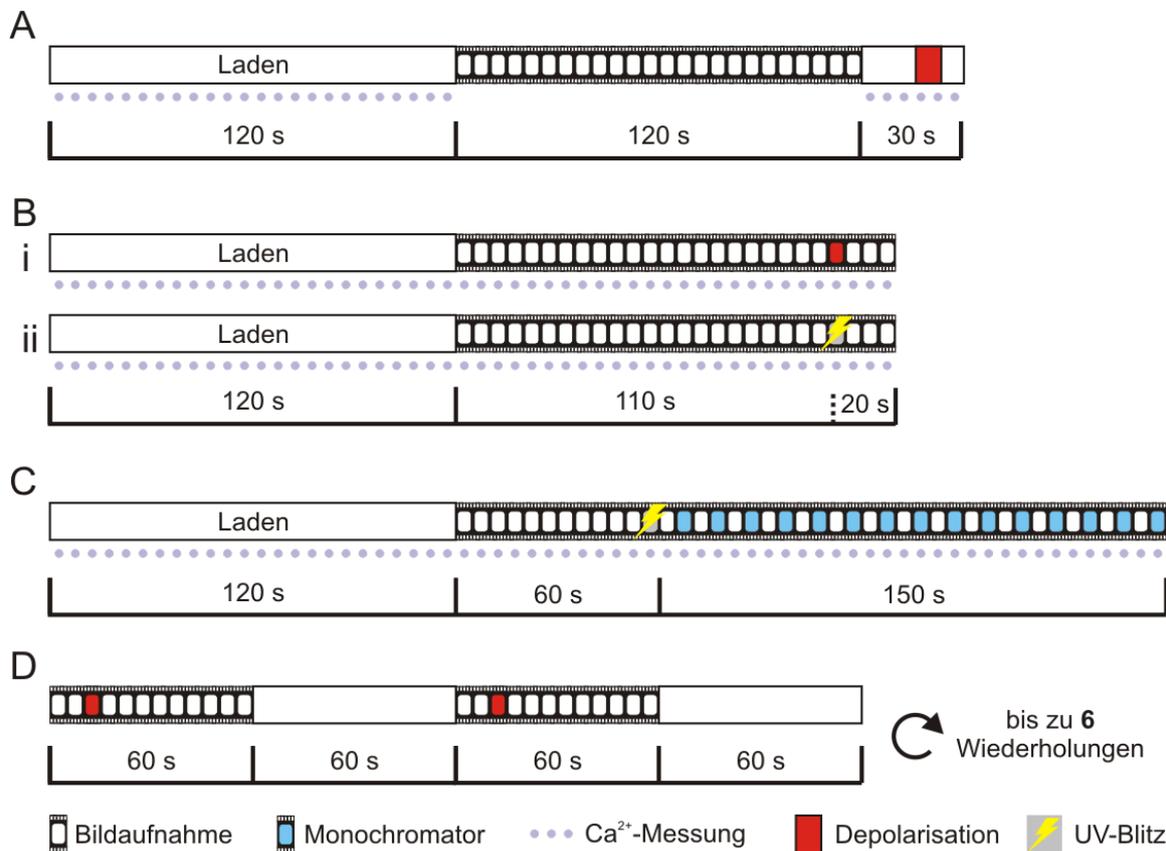


Abbildung 10. Aufnahmeprotokolle. (A) Mobilitätsexperimente bei konstanter $[Ca^{2+}]_i$ (siehe Kapitel 3.1.2). (Bi) Stimulation durch Depolarisation (siehe Kapitel 3.2.5), (Bii) Stimulation durch UV-Blitzlicht-Photolyse (siehe Kapitel 3.2.3 und 3.2.4). (C) Mobilitätsexperimente bei variabler $[Ca^{2+}]_i$ (siehe Kapitel 3.1.3 und 3.1.4). (D) Protokoll zur Bestimmung von Ca^{2+} -Microdomänen (siehe Kapitel 3.3). Jedem einzelnen Protokoll ging das Erreichen des Ganzzellmodus voraus. Die Aufnahmegeschwindigkeit betrug für jeden Film 10 Hz.

2.2.8.9 Bestimmung des IRP

Die Größe des IRPs wurde mittels der Formel berechnet, die von Voets *et al.* (1999) nach Gillis *et al.* (1996) modifiziert wurde. Sie basiert auf dem Verhältnis der Kapazitätzunahme bei den ersten beiden 10 ms Depolarisationen (Gleichung 1).

$$(1) \quad IRP = \frac{(\Delta C_{m1} + \Delta C_{m2})}{\left[1 - \left(\frac{\Delta C_{m2}}{\Delta C_{m1}}\right)\right]}$$

Um einen vergleichbaren Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle zu gewährleisten, wurden die Potentiale dieser beiden Pulse angepasst. Aufgrund von partieller Entleerung der Pools, vorausgesetzt, dass der zweite Stimulus mindestens genauso stark ist wie der erste, deutet ein Verhältnis von $\Delta C_{m2}/\Delta C_{m1}$ von <1 vermutlich auf sekretorische Depression. Ausschließlich jene Zellen, die ein Verhältnis von $<0,7$ aufwiesen, wurden für weitergehende Analysen verwendet, da gänzliche Leerung des Pools eine Voraussetzung zur akkuraten Poolgrößenermittlung ist. Bei den hier beschriebenen Experimenten wurde dieses Kriterium von mehr als 95% aller Zellen erfüllt.

2.2.8.10 Extrazelluläre Badlösungen

Insgesamt wurden für die Versuche drei unterschiedliche Badlösungen verwendet. Für die regulären Trackingexperimente in Virus-infizierten Zellen kam eine Lösung mit geringer $[CaCl_2]$ und erhöhter $[MgCl_2]$ zum Einsatz um eine Variation des intrazellulären Ca^{2+} durch z.B. Leckströme, so klein wie möglich zu halten.

Die Experimente zur Sekretion wurden dagegen mit einer Lösung mit erhöhter $[CaCl_2]$ und verringerter $[MgCl_2]$ durchgeführt, wodurch eine ausreichende Ausdehnung von Ca^{2+} -Mikrodomänen erzielt wurde. Dies hatte eine hohe Effizienz der Sekretion zur Folge und gewährleistete in TIRF eine hohe Trefferquote hinsichtlich sezernierter LDCVs.

Die Experimente mit perforiertem Patch wurden in Gegenwart von ähnlichen Konzentrationen an $CaCl_2$ und $MgCl_2$ durchgeführt. Durch die Verwendung von Amphotericin B und ohne Eingriff in die Komposition des intrazellulären Mediums (auch keine weiteren Ca^{2+} -Puffer) sollten die Ca^{2+} -Mikrodomänen nach Stimulation möglichst groß ausfallen.

Für weitere Details zu den Badlösungen, siehe Tabelle 2. Alle Chemikalien wurden von der Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Tabelle 2. Zusammensetzung der extrazellulären Medien. Für die entsprechenden Experimente wurde v.a. die Konzentration von Ca^{2+} und Mg^{2+} variiert.

in mM (305 mOsm, pH 7,5)	Mobilitätsexperimente	Depolarisation	Perforated Patch
NaCl	144,5	147	148,5
HEPES	10	10	10
Glucose	10	10	10
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1	2,5	2,5
KCl	2,4	2,4	2,8
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	4	1	2

2.2.9 TIRFM = Interne Total-Reflektionsfluoreszenz-Mikroskopie

Wie schon zuvor erwähnt, sind Methoden mit denen man Präfusionsschritte beobachten kann rar. Membrankapazitätsmessungen und Amperometrie geben nur Aufschluss über Priming und Fusion. Docking wurde bisher nur über elektronenmikroskopische Aufnahmen analysiert, gibt aber keine Differenzierungsmöglichkeit für Docking und Priming.

Die Methode der Wahl, die in den letzten Jahren ihren Weg von physikalischen zu biologischen Anwendungsgebieten fand, ist die Interne Total-Reflektionsfluoreszenz-Mikroskopie (TIRFM). TIRFM erlaubt die Abbildung von membrannahen Prozessen in Echtzeit mit einem herausragenden Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Man macht sich hierbei die Eigenschaft von Licht zu Nutze. Beim Auftreffen eines gebündelten Lichtstrahls auf die Grenzfläche zweier Medien mit unterschiedlichen Brechungsindices zeigt dieser, abhängig von Einfallswinkel, unterschiedliches Verhalten.

Trifft das Licht auf dem Weg vom Medium mit höherem Brechungsindex (Glas) in eines mit niedrigerem Brechungsindex (Wasser/Zelle) nahezu senkrecht auf die Grenzfläche, so wird es gebrochen. Den Ausfallwinkel kann man über das Snellius'sche Gesetz berechnen: $n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$, mit n_1 und n_2 als Brechungsindices der zwei Medien, sowie θ_1 und θ_2 als Einfalls- und Ausfallswinkel. Bei Erreichen des kriti-

schen Einfallswinkels (θ_c) wird das Licht parallel zur Grenzfläche gebrochen. Die Größe von θ_c ist abhängig vom Verhältnis der refraktiven Indices der beiden Medien: $\theta_c = \sin^{-1}(n_2/n_1)$ (Abbildung 11 A). Vergrößert man den Winkel, so wird das Licht total reflektiert. Dann tritt das Phänomen auf, dass kurz hinter der Grenzfläche ein dünnes Feld mit elektromagnetischen Eigenschaften erzeugt wird. Die Stärke dieses sog. evaneszenten Feldes nimmt exponentiell mit der Eindringtiefe ab und reicht, abhängig von Wellenlänge und Energie, nur wenige 100 nm in das zweite Medium mit geringeren refraktivem Index (Abbildung 11 B).

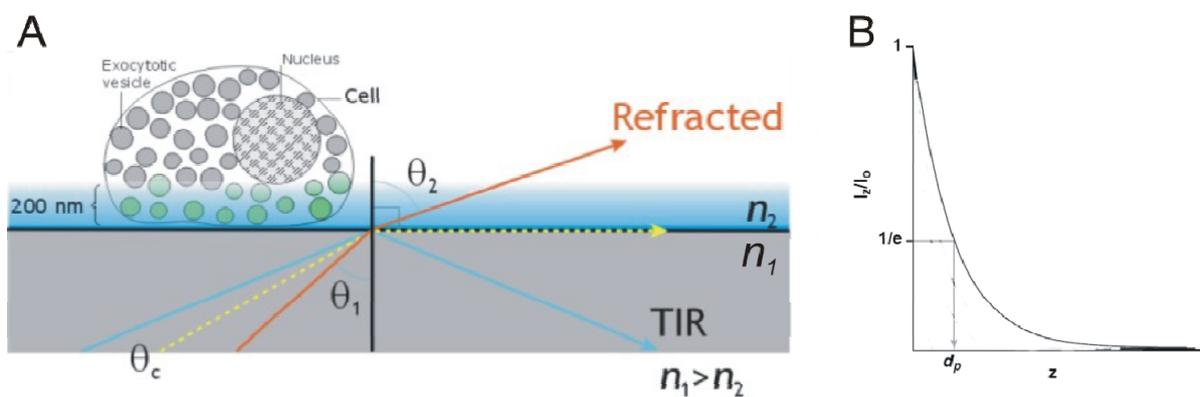


Abbildung 11. TIRF-Prinzip. (A) Licht einer bestimmten Wellenlänge trifft auf die Grenzfläche zwischen zwei Medien mit unterschiedlichen refraktiven Indices. Wenn der Brechungsindex $n_1 > n_2$ und der Einfallswinkel θ_1 größer dem kritischen Winkel θ_c , dann wird das Licht total reflektiert (TIR) und es entsteht eine evaneszente Welle, (B) deren Intensität (I_z/I_0) mit Erhöhung der Eindringtiefe (d_p) von der Grenzfläche exponentiell abnimmt.

Einer der größten Vorteile im Vergleich zu Epifluoreszenz ist das hervorragende Signal-zu-Rausch-Verhältnis, da nahezu keine Hintergrundfluoreszenz auftritt (Oheim M *et al.* 1999; Almers W und Steyer JA 2001; Axelrod D 2001; Toomre D und Manstein DJ 2001). Nebenbei reduziert diese Technik das Bleichen der Fluorophore. In der Vergangenheit wurde mittels TIRFM die Beweglichkeit von Partikeln charakterisiert, Exozytose in Echtzeit und sogar einzelne Proteine visualisiert. Das alles macht TIRFM zu Mittel der Wahl, um Präfusionsschritte und deren molekulare Mechanismen zu beobachten und zu quantifizieren.

2.2.9.1 Aufbau – Mobilitätsexperimente

Bei dem verwendeten TIRF-Mikroskop handelte es sich um ein modifiziertes System basierend auf dem Axiovert 200 der Fa. Zeiss (Göttingen, Deutschland). Ausgestattet

war das Mikroskop mit einem TIRF-Schieber, der die Einkopplung mehrerer unterschiedlicher Laserlinien über einen Port ermöglichte. Bei den verwendeten Lasern handelte es sich um einen Festkörperlaser 85 YCA (561nm, Melles Griot, Carlsbad, CA, USA) und einen Ar⁺-Gaslaser (488nm, 1885F12 Spectra-Physics, Mountain View, CA, USA). Des Weiteren wurde ein Fluor 100×/1,45NA Objektiv der Fa. Zeiss benutzt. Zwischen Mikroskop und Kamera (Andor iXon^{EM}, Pixelgröße 16 µm, Belfast, Nordirland) befand sich ein Strahlteiler, der mit einem dichroitischen Spiegel versehen war, welcher Wellenlängen unterhalb von 560 nm reflektierte, und die Emission von Fura so auf eine Photodiode (Rapp OptoElectronics, Hamburg, Deutschland) leitete. Langwelligeres Licht wurde durchgelassen und konnte so auf den CCD-Chip der Kamera treffen. Die finale Pixelgröße betrug 160×160 nm². Das verstärkte Signal (emCCD-Gain) wurde ausgelesen und auf dem Kontroll-PC gespeichert. Sämtliche Signale, Auslöser und Kontrollfunktionen wurden über eine auf LabView (National Instruments, Austin, TX, USA) basierende Software zeitgenau geregelt. Dabei wurde eine AD/DA-Wandlerkarte verwendet, welche die digitalen Signale zum Auslösen der beiden Laserverschlüsse, der PULSE-Software, der Kamera und außerdem die analogen Signale zum Ansteuern des Monochromators bereitstellte (zum Wechsel der Anregungswellenlänge bei Fura-Messung). Über den AD-Eingang der Karte wurde die gemessene Spannung der Photodiode ausgelesen und das Fura-Intensitätsverhältnis im Aufnahmeprogramm in Echtzeit angezeigt.

2.2.9.2 Aufbau – Experimente zu Ca²⁺-Mikrodomänen

Der Aufbau zur Beobachtung der Kollokalisierung von Fusionsereignissen durch repetitive Stimulationen basierte auf einem inversen Olympus IX 70 Mikroskop (Olympus Life Science GmbH, Hamburg, Deutschland), einem Festkörperlaser (85YCA010, Melles Griot, Carlsbad, CA, USA) mit einer Emission bei 561 nm, der über einen Lichtleiter und den TILL-TIRF Kondensator (T.I.L.L. Photonics, Gräfeling, Deutschland) in das Mikroskop eingekoppelt war. Zwischen Laser und Lichtleiter befand sich ein Akustooptischer Modulator (AOTF)-nC (AA opto-electronic, St-Rémy-les-Chevreuses, Frankreich). Des Weiteren war der Aufbau mit einem Monochromator (Visichrome, Visitron systems GmbH, Puchheim, Deutschland) ausgestattet. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen wurden mit einem Dualband-Filter FITC/Texas red gesetzt (# 51006, AHF Analysentechnik AG, Tübingen, Deutschland). Bei der verwendeten Kamera handelte es sich um eine Micromax 512 BFT (Princeton In-

struments Inc., Trenton, NJ, USA), deren Kontrolle durch Metamorph (Visitron, Puchheim, Deutschland) erfolgte. Als Objektiv diente ein 100×/1,45 NA TIRF Öl-Immersion Objektiv (Olympus, Hamburg, Deutschland). Mit der Kombination Kamera und Objektiv wurde eine Pixelgröße von 130×130 nm² erzielt.

2.2.10 Bildanalyse – Mobilität

2.2.10.1 Mobilitätsexperimente

Die aufgenommenen Videos zur Mobilitätsanalyse wurden mit einer Software analysiert, die von Dr. Detlef Hof entwickelt wurde und auf Labview (National Instruments, Austin, TX, USA) basiert. Die Analyseprozedur war in mehrere Schritte unterteilt.

i) Partikeldetektion

Nach dem Einladen der 16bit-Filme wurden diese gemittelt, um a) einen generellen Eindruck der angehefteten Zelle zu bekommen und b) eine Region auszuwählen, die keine Vesikel enthielt, aber die Hintergrundfluoreszenz der Zelle aufwies. Die mittlere Intensität dieser Region wurde vom jeweils entsprechenden Bild als Hintergrund abgezogen und somit das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert.

Im Anschluss wurden die ungefähren Positionen jedes einzelnen Partikels mithilfe einer Schwellenwertmethode bestimmt. Dabei wurde gefordert, dass jeweils mindestens 3 zusammenhängende Pixel Intensitäten über dem Schwellenwert, i.d.R. festgelegt auf mindestens 30 A.U., aufwiesen. Die Position wurde als Schwerpunkt aller Pixel über dem Schwellenwert ermittelt.

ii) Feinpositionierung

Nach der groben Vorbestimmung der Positionen erfolgte eine exaktere, aber zeitaufwendigere Lokalisierung durch das Centroid-Verfahren. Dabei wurden die individuellen Intensitäten aller Pixel in der Nachbarschaft berücksichtigt und eine Standard-Centroid Gleichung angewandt:

$$X = \frac{\sum X_i \times \text{Pixelwerte}_i}{\sum \text{Pixelwerte}_i}, \quad Y = \frac{\sum Y_i \times \text{Pixelwerte}_i}{\sum \text{Pixelwerte}_i},$$

wobei X_i und Y_i die Pixelkoordinaten darstellen und die Pixelwerte_i die jeweiligen Helligkeitswerte des entsprechenden Pixels wiedergeben. Bei ei-

nem 16-bit-Format hat schwarz den Wert 0 und hellstes weiß 65536. Bei Anwendung dieser Methode erreicht man eine Positionsbestimmung mit Subpixelauflösung, die bis in den einstelligen Nanometer-Bereich gehen kann.

iii) Tracking

Die einzelnen Positionen wurden im Anschluss vom Programm mit folgenden Auflagen verbunden: Ein Vesikel musste mindestens in drei aufeinanderfolgenden Bildern mit maximal drei Pixeln Abstand anzutreffen sein. Dadurch wurde die Detektion von reinem Hintergrundrauschen vermieden. Zusammen mit der x,y-Lageinformation enthielt die erstellte Datei die jeweilige Bildlaufinformation und die Intensität, die, wie später erklärt, für die Analyse der axialen Beweglichkeit notwendig ist.

Im Anschluss wurden die gebildeten Vesikeltrajektorien gesichtet und auf etwaige Fehler untersucht. Fielen die Fluoreszenzintensitäten der Vesikel unter den o.g. Schwellenwert, so konnte es passieren, dass diese Vesikel nicht mehr detektiert wurden, obwohl sie mit bloßem Auge noch einwandfrei zu erkennen waren. Mit Hilfe einer Verschmelzungsroutine wurden diejenigen Trajektorien verbunden, die augenscheinlich zu ein und demselben Vesikel gehörten. Dabei interpolierte die Verschmelzungsroutine die fehlenden Positionen linear. Nach Abspeichern der Dateien wurde die weitere Bearbeitung mit IGOR-Routinen fortgeführt.

2.2.10.2 Sekretionsexperimente

Bei den Experimenten, in denen die Sekretion von Vesikeln durch Stimulation (UV-Blitzlicht-Photolyse oder Depolarisation) hervorgerufen worden war, wurden die Positionen der sezernierten Vesikel einzeln über die Zeit zurückverfolgt. Die Vesikel wurden manuell angewählt. Die Trackingroutine benutzte dazu die gleiche Vorgehensweise wie in Kapitel 2.2.10.1 erläutert, aber die Vesikel wurden vom Zeitpunkt ihrer Sekretion rückwärts in die Vergangenheit bis zum ersten Auftreten zurückverfolgt.

2.2.11 „Caging Diameter“-Analyse

Nachdem die Positionsdaten in IGOR eingelesen worden waren, wurden sie mit Hilfe der „Caging Diameter“-Routine analysiert. Dabei wurden die lateralen und die axialen Bewegungen separat voneinander bearbeitet und später miteinander korreliert.

2.2.11.2 Analyse der axialen Mobilität

Als Grundlage zur Bestimmung der Mobilität in z-Richtung wurde die Fluoreszenzintensität einzelner LDCVs für jedes Einzelbild bestimmt, nachdem der Hintergrund über der Zelle abgezogen worden war. Die Intensitätsermittlung erfolgte um das ermittelte Zentrum aus Kapitel 2.2.10.1 ii. Da der tatsächliche Durchmesser eines Vesikels über dem eines Pixels, aber unter dem eines 3x3 Pixel großen Rasters lag, wurde die Intensität über eine Fläche von 3x3 Pixeln in Verbindung mit einer Wichtung gemäß Gleichung 2 ermittelt:

$$(2) \quad I(x, y) = \frac{1}{G} \cdot \sum_{i=0}^2 \sum_{k=0}^2 g_{i,k} \cdot I(x-1+i, y-1+k)$$

wobei

$$(3) \quad g_{i,k} = \frac{1}{0,5 + (i-1)^2 + (k-1)^2}$$

und

$$(4) \quad G = \sum_{i=0}^2 \sum_{k=0}^2 g_{i,k}.$$

Um die absolute z-Position eines fluoreszenz-markierten Vesikels ermitteln zu können, ist es notwendig, die Funktionen zu kennen, die Aussagen über die Intensitätsverteilung und die individuelle Eindringtiefe der Photonen in die evaneszente Welle zulassen. Die Eindringtiefe (d) der evaneszenten Welle hängt vom Einfallswinkel (θ), der Anregungswellenlänge (λ) und den Brechungsindices der beiden Medien ($n_1 > n_2$) ab:

$$(5) \quad d = \lambda / \left[4\pi \sqrt{(n_1^2 \cdot \sin^2 \theta - n_2^2)} \right]$$

Die Intensität des evaneszenten Feldes fällt exponentiell mit dem Abstand (z) von der Grenzfläche ab

$$(6) \quad I(z) = I_0 e^{-z/d}$$

womit

$$(7) \quad z = -\frac{1}{d} \ln \left(\frac{I}{I_0} \right),$$

wobei I_0 = Intensität bei einer Distanz von 0 nm von der Grenzfläche. Wie zuvor beschrieben, basiert die CD-Methode auf der Messung von Distanzen. Hier wurde eine eindimensionale CD-Analyse in z-Richtung (CD_z) verwendet, die für einen Vesikel im Bild i definiert ist als

$$(8) \quad CD_z = \max_{k=i}^{i+10} (z_i - z_k)$$

Gemäß Gleichung (7) ist dies äquivalent zu

$$(8a) \quad CD_z = \frac{1}{d} \max_{k=i}^{i+10} \left(\ln \left(\frac{I_k}{I_i} \right) \right)$$

Wie man sieht, erscheint der Parameter I_0 , der eine starke Abhängigkeit vom Befüllungszustand der LDCVs mit Fluorophoren aufweist, nicht in den beiden letzten Gleichungen (8 und 8a). Da die Eindringtiefe d aufgrund von Variationen zwischen verschiedenen Messungen nicht absolut konstant gehalten werden konnte, wurde d gleich 1 gesetzt und arbiträre Einheiten (A.U.) verwendet. Diese Variationen können auf leichte Schwankungen in der Eindringtiefe zurückgeführt werden, u.a. weil der Einfallswinkel θ wegen des manuell einzustellenden TIRF-Kondensors von Experiment zu Experiment nie exakt gleich gehalten werden konnte.

Außerdem sei anzumerken, dass für diese Analyse nur diejenigen Zellen herangezogen wurden, die zuvor mit dem NPY-mCherry-Konstrukt transfiziert worden waren, um eine Verfälschung der Resultate aufgrund eines Bleichartefaktes der mRFP-Fluoreszenz zu vermeiden (siehe Kapitel 2.2.13). Die CD-Analyse wurde auch hier mit IGOR (Wavemetrics, Lake Oswego, OR) durchgeführt und, wie im letzten Abschnitt von Kapitel 2.2.10.1 beschrieben, weiterverarbeitet.

2.2.12 Lokalisationsexperimente von Ca^{2+} -Mikrodomänen

Murine Chromaffinzellen wurden im perforierten Patch abgeleitet, wie in Kapitel 2.2.8.5 und Abbildung 10 D dargestellt. Die Position jedes einzelnen sezernierten Vesikels wurde mit Hilfe der Metamorph-Software (Vers. 6.3, Visitron, Puchheim, Deutschland) manuell lokalisiert. Die Positionen wurden für alle Vesikel einer jeden einzelnen Zelle und deren repetitiven Stimulationen in IGOR eingelesen. Im Anschluss wurden die Distanzen von jeder einzelnen zu allen anderen Positionen berechnet.

2.2.13 Bleichexperimente – mRFP vs. mCherry

Für die durchgeführten Experimente war die Verwendung eines photostabilen Fluorophors notwendig. Zu Beginn der Versuchsreihe war mRFP der einzig verfügbare rote Fluorophor im Labor. Es ergab sich die Möglichkeit, an das wesentlich stabilere mCherry zu gelangen (Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Peter Lipp, Anatomie, Uniklinikum des Saarlands). mCherry zeichnet sich durch ähnliche Qualitäten wie mRFP hinsichtlich Anregung (587 nm / 584 nm), Emission (610 nm / 607 nm) und der monomerischen Eigenschaft aus. Allerdings ist es weitaus photostabiler ($t_{0,5 \text{ mCherry}} = 62 \text{ s}$ / $t_{0,5 \text{ mRFP}} = 6 \text{ s}$), d.h. die Fluorophore können häufiger den Anregungs/Emissions-Zyklus durchlaufen, bevor es zur irreversiblen Zerstörung des Fluorophor-Moleküls kommt. Bei der Zerstörung können u.U. auch phototoxische Substanzen freigesetzt werden, die für die Zellen schädlich sind.

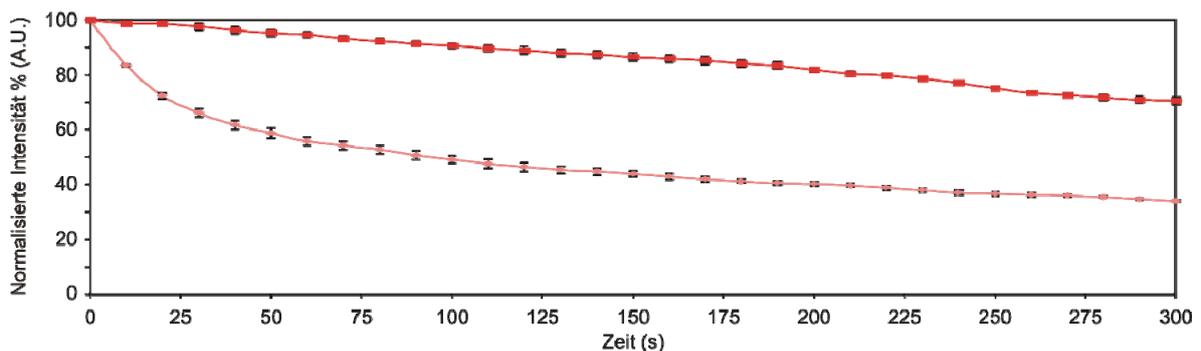


Abbildung 13. Bleichverhalten von mRFP und mCherry. Verlauf der detektierten Emission von mRFP (rosa, N=3) und mCherry (rot, N=3) bei dauerhafter Anregung mit 561 nm über 5 min (Mittelwerte \pm SEM).

Um die Qualität der verbesserten Fluorophore zu bestimmen, wurden Bleichexperimente in mit entweder NPY-mRFP oder NPY-mCherry elektroporierten Chromaffinzellen durchgeführt. Die Emission der Zellen wurde über 5 min bei 10 Hz und 75 ms Belichtungszeit aufgenommen, während die Anregung bei 561 nm erfolgte. Der Laserstrahl hatte während der Experimente einen Einfallswinkel von 0° , wurde somit reflektiert und konnte die Fluorophore ungehindert anregen und im Laufe des Experiments zerstören. Das Ergebnis aus jeweils 3 Zellen ist in Abbildung 13 zu sehen. Während mRFP bereits nach 90 s nur noch 50 % seiner Anfangsintensität besaß, so waren es zum gleichen Zeitpunkt noch ~90 % bei mCherry.

2.2.14 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe von SigmaStat (SPSS Inc., San Rafael, CA, USA) durchgeführt. Dabei wurde der ungepaarte Student's t-test verwendet. Im Falle einer nicht-vorhandenen Normalverteilung wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-Test genutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss der $[Ca^{2+}]_i$ auf Poolgrößen

Für diesen Satz von Experimenten wurden die Zellen mit Semliki-Forest-Virus infiziert, der die Expression von NPY-mRFP oder NPY-mCherry zur Folge hatte. Messungen fanden 12-16 h nach der Transfektion statt, da innerhalb dieses Zeitfensters die optimale Anzahl an Vesikeln ($\sim 0,5$ Vesikel/ μm^2) an der PM vorlag. Als Auswahlkriterien der zu messenden Zelle wurden die Form (rund, voll), die Struktur des Cytoplasmas (keine granuläre Struktur) und die Größe der am Deckglas angehefteten Fläche verwendet. Die Kriterien erfüllenden Zellen wurden dann mit einer konstanter freien $[Ca^{2+}]_i$ über eine Patchpipette im Ganzzellmodus für 2 min perfundiert (Abbildung 10 A). Währenddessen wurde zwar die $[Ca^{2+}]_i$ ratiometrisch gemessen, aber nicht die NPY-Fluoreszenz angeregt, um ein unnötiges Bleichen der Fluorophore zu verhindern. Nach Erreichen einer stabilen $[Ca^{2+}]_i$ (i.d.R. nach 1,5 min) wurde die Vesikelbewegung über einen Zeitraum von 2 min mit einer Aufnahmefrequenz von 10 Hz aufgezeichnet. Daraufhin wurde die $[Ca^{2+}]_i$ in den Zellen erneut überprüft, ohne die Vesikelfluoreszenz anzuregen. Am Ende des Versuchs wurden die Zellen mit einer Folge von Depolarisationen stimuliert (Abbildung 14 A).

3.1.1 Depolarisationen

Eine dieser Studie zugrundeliegende Beobachtung ist es, dass die Erhöhung der Ruhekonzentration des freien intrazellulären Ca^{2+} bis zu einer Konzentration von ca. 700 nM zu einer Vergrößerung der unterschiedlichen Pools freisetzbarer Vesikel zur Folge hat (Voets T 2000). Demzufolge sollten die mit konstanten Ca^{2+} -Konzentrationen über die Patchpipette perfundierten Chromaffinzellen vergleichbare Resultate hinsichtlich der Poolgrößen zeigen. Zusätzlich zur Beobachtung der Poolveränderung, diente der Stimulus in den hier präsentierten Experimenten als Test der Zell-Viabilität, die sich durch einen, wenn auch nur geringen, Anstieg der Membrankapazität auszeichnet.

Die jeweils gemessenen freien $[Ca^{2+}]_i$ wurden zur Einteilung der Zellen in folgende Klassen verwendet (in nM): 0-199, 200-399, 400-599, 600-799 und >800 . Die jeweiligen Kapazitätsänderungen wurden über alle Zellen gemittelt und zeigen eine Zunahme der Anzahl freisetzbarer Vesikel mit Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ bis zu einer Schwel-

lenwertkonzentration, die bei ca. 700-800 nM liegt. Gemäß dem Ansatz von Gillis *et al.* (1996) kann man über das Verhältnis der ersten beiden 10 ms dauernden Depolarisationen den „immedeately releasable“ Pool (IRP), eine Subpopulation des RRP, abschätzen (Abbildung 14 B). Es ergaben sich folgende Werte (in fF): $3,6 \pm 1,7$ (0-199 nM, N=23), $9,2 \pm 6,8$ (200-399 nM, N=19), $15,4 \pm 2,3$ (400-599 nM, N=20), $27,3 \pm 6,6$ (600-799 nM, N=10), $54 \pm 29,4$ (>800 nM, N=12). Signifikant unterschiedlich waren 0-199 nM zu 400-599 nM ($p < 0,001$) und 600-799 nM ($p < 0,001$), 200-399 nM zu 600-799 nM ($p = 0,016$), sowie 400-599 nM zu 600-799 nM ($p = 0,027$).

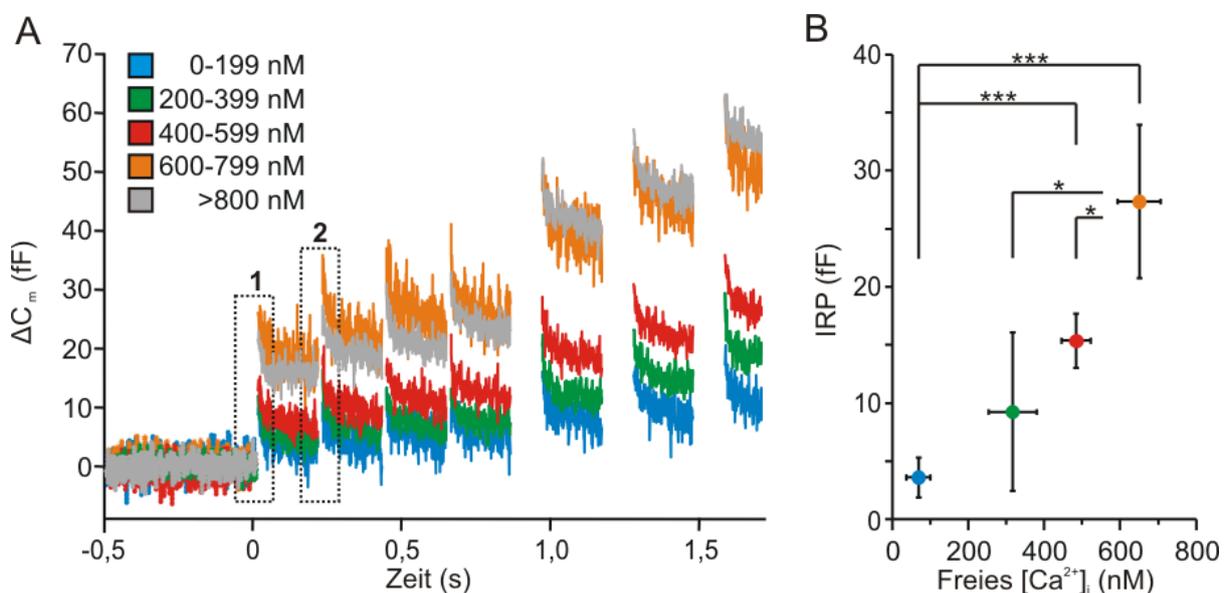


Abbildung 14. $[Ca^{2+}]_i$ beeinflusst den IRP. (A) Gemittelte Kapazitätsantworten auf eine Folge von vier 10 ms und drei 100 ms andauernden Depolarisationen vom Ruhemembranpotential (-70 mV) auf 0 mV. Farblich kodiert sind die $[Ca^{2+}]_i$, mit denen die Chromaffinzellen über die Patchpipette perfundiert wurden. (B) Abschätzung der Größe des IRP, basierend auf dem Verhältnis der Kapazitätsänderungen in Folge der ersten beiden kurzen Depolarisationen (gepunktete Boxen 1 und 2 in A, siehe Kapitel 2.2.8.9). ($N_{0-199}=23$, $N_{200-399}=19$, $N_{400-599}=20$, $N_{600-799}=10$, $N_{>800}=12$, in (B) Mittelwerte \pm SEM der IRP-Abschätzung, sowie Mittelwerte \pm SD der $[Ca^{2+}]_i$, um die Streuung der einzelnen Klassen zu verdeutlichen; ***, $p < 0,001$; *, $p < 0,05$; Student's t-Test).

Mit den hier eingesetzten $[Ca^{2+}]_i$ konnte ich die bereits bekannten Daten von Voets (2000) bestätigen. Eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ hatte bis zu einer Konzentration von ~ 700 nM eine Erhöhung des IRP zur Folge, der bei noch höheren $[Ca^{2+}]_i$ (>800 nM) wieder abnahm. Ich hatte dadurch eine gültige Referenzmessung des Priming-Effekts bei erhöhter $[Ca^{2+}]_i$.

Die verwendeten $[Ca^{2+}]_i$ wirkten sich auf die Poolgrößen aus. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ mit der LDCV-Mobilität in Verbindung zu bringen ist.

3.1.2 Vesikelmobilität

3.1.2.1 Abhängigkeit lateraler LDCV-Mobilität von der $[Ca^{2+}]_i$

Anhand von zwei repräsentativen Beispielen, die mit jeweils unterschiedlichen $[Ca^{2+}]_i$ perfundiert wurden, soll das Prinzip der Auswertung der LDCV-Mobilität gezeigt werden. Die erste Zelle hatte eine freie $[Ca^{2+}]_i$ von 80 nM, während in der zweiten Zelle die Konzentration bei 650 nM lag. Abbildung 15 zeigt exemplarische Aufnahmen der LDCV-Positionen zu verschiedenen Zeitpunkten. Während sich die Positionen der LDCVs in der Zelle bei freier $[Ca^{2+}]_i$ von 650 nM nicht stark veränderten, zeigte die Zelle bei 80 nM ein gegensätzliches Verhalten (Abbildung 15).

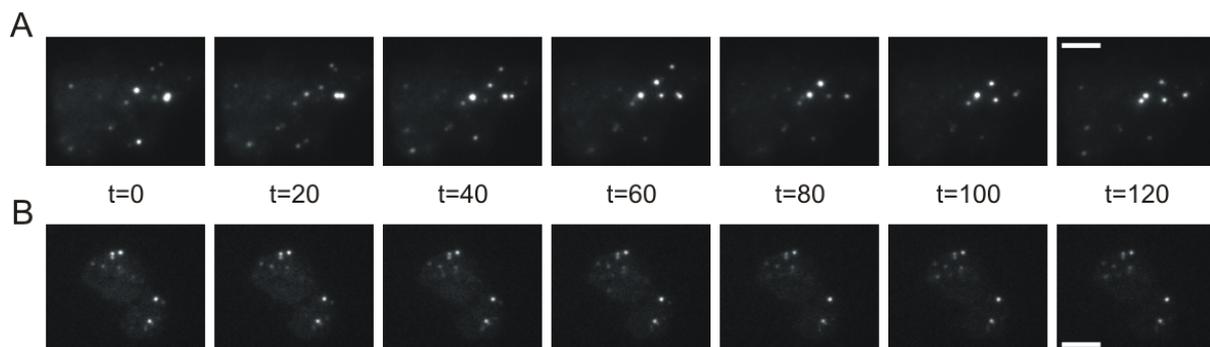


Abbildung 15. Bildserien zweier Beispielszellen bei 80 nM (A) und 650 nM (B) freier $[Ca^{2+}]_i$. Abgebildet sind Aufnahmen der zwei Beispielszellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten über 2 min LDCVs wurden mit NPY-mCherry markiert. Aufnahme-frequenz 10 Hz, Skala: 5 μ m.

In Abbildung 16 sind die lateralen (x, y) Trajektorien der beiden Beispielszellen abgebildet. Die Zelle mit erhöhter $[Ca^{2+}]_i$ hat mehr lokal begrenzte Bewegungen und die totale Anzahl der Vesikel an der PM scheint über den Beobachtungszeitraum von 2 min geringer zu sein ($n_{\sim 80\text{nM}} = 43$; $n_{\sim 650\text{nM}} = 18$).

Zur Quantifizierung der Bewegungen wurde die im Labor etablierte und leicht modifizierte „Caging Diameter“-Analyse (CD) verwendet (Nofal S *et al.* 2007). Dabei berechnet eine Routine für jede einzelne Position die Abstände zu den jeweils 10 nächsten Positionen. Die Routine übernimmt dann den längsten ermittelten Abstand

als CD für die jeweilige Position und stellt diesen in einem Diagramm über die Zeit dar. Diese Methode erlaubt die dynamische Zuordnung und Unterscheidung von variierenden Bewegungsarten: von eindeutig lokaler Immobilität bis hin zu gerichteter, unidirektionaler Bewegung, zu jeweils einem bestimmten Zeitpunkt. Das stellt einen klaren Vorteil gegenüber z.B. der „Mean Square Displacement“-Methode dar (Oheim M und Stuhmer W 2000)

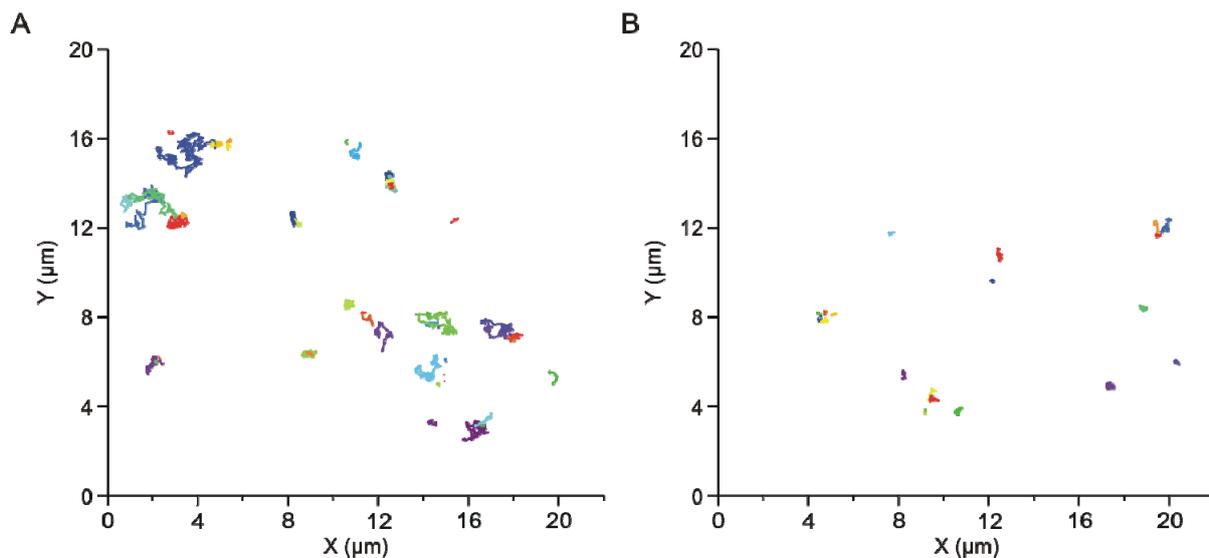


Abbildung 16. Laterale Trajektorien zweier Beispielszellen bei 80 nM (A) und 650 nM (B) freier $[Ca^{2+}]_i$. Abgebildet sind die Trajektorien, die jeweils einzelne LDCVs (farbig codiert) und deren Verlauf im Zeitraum von 2 min repräsentieren.

In Abbildung 17 ist das Ergebnis der CD-Analyse für die beiden in Abbildung 16 gezeigten Beispielszellen zu sehen. Die Beispielszelle mit niedriger $[Ca^{2+}]_i$ (Abbildung 17 A) besitzt 43 Vesikel, die während des 2minütigen Beobachtungszeitraums in der evaneszenten TIRF-Welle auftauchen und ggf. wieder verschwinden (siehe Beispiel Abbildung 17 C). Das Spektrum der CD reicht von LDCVs mit komplett immobilen Phasen bis hin zu Werten von ~ 600 nm, die von mehreren Vesikeln erreicht werden. Die Beispielszelle für die erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ hat im Vergleich dazu weniger Vesikel, die in den 2 min der Beobachtungsdauer an der PM zu beobachten waren und generell kleinere CD-Werte (siehe Beispiel Abbildung 17 D; generelles Maximum: 350 nm).

Eine einfachere Vergleichbarkeit erhält man, wenn man die Häufigkeitsverteilung der lateralen CDs für beide Beispielszellen erzeugt (Abbildung 17 E). Allgemein zeigt sich bei erhöhter $[Ca^{2+}]_i$ ein größerer Beitrag von kleinen CD, wohingegen die Anzahl grö-

ßerer CD reduziert ist. Im kumulativen Histogramm wird diese Immobilisierung durch eine Linksverschiebung klar ersichtlich.

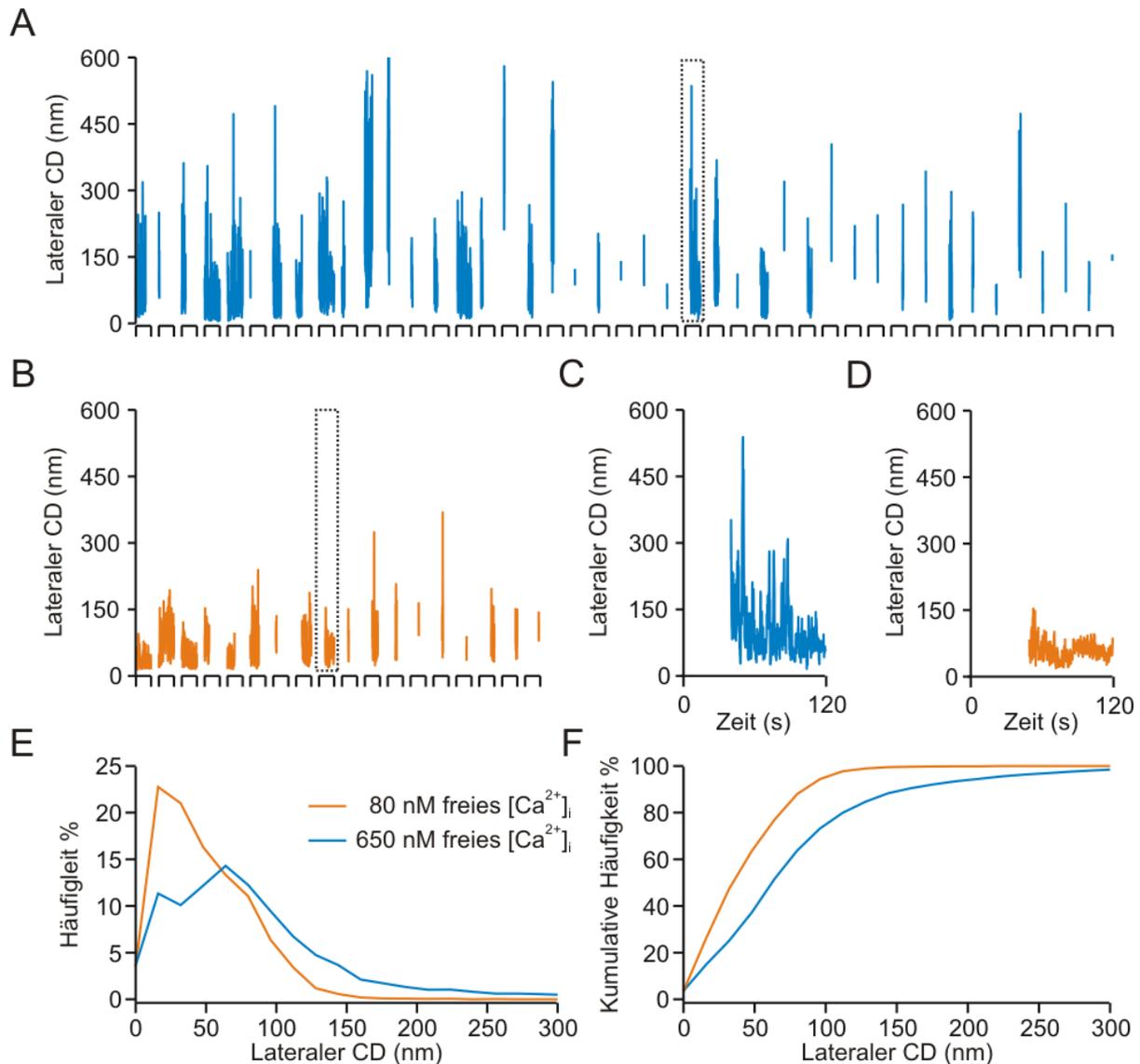


Abbildung 17. Beispiele für die laterale Vesikelmobilität bei niedriger und hoher $[Ca^{2+}]_i$. Alle CD jedes über den Zeitraum von 2 min beobachteten Vesikels je einer Zelle bei 80 nM (A) und 650 nM (B). (C) zeigt den lateralen CD-Verlauf über Zeit eines Beispielvesikels aus (A, gestrichelte Box). (D) zeigt den CD-Verlauf über Zeit eines Beispielvesikels aus (B, gestrichelte Box). (E) Die Häufigkeitsverteilung der CD zeigt einen höheren Anteil von kleineren CD bei höherer $[Ca^{2+}]_i$. Dies wird auch durch die Linksverschiebung im kumulativen Histogramm (F) ersichtlich.

Die gemittelten Verteilungen aller Konzentrationsklassen sind in Abbildung 18 zusammengefasst. Ausschließlich die Zellen, die vor und nach der Beobachtung der Vesikelmobilität stabile $[Ca^{2+}]_i$ zeigten und auf Stimulation mit Depolarisationen mit einer Kapazitätserhöhung antworteten, wurden für diese Analyse erfasst ($N_{0-199 \text{ nM}}$: 23, $N_{200-399 \text{ nM}}$: 19, $N_{400-599 \text{ nM}}$: 20, $N_{600-799 \text{ nM}}$: 10, $N_{>800 \text{ nM}}$: 12). Die CDs wurden in Klassen mit einer Breite von je 16 nm eingeteilt.

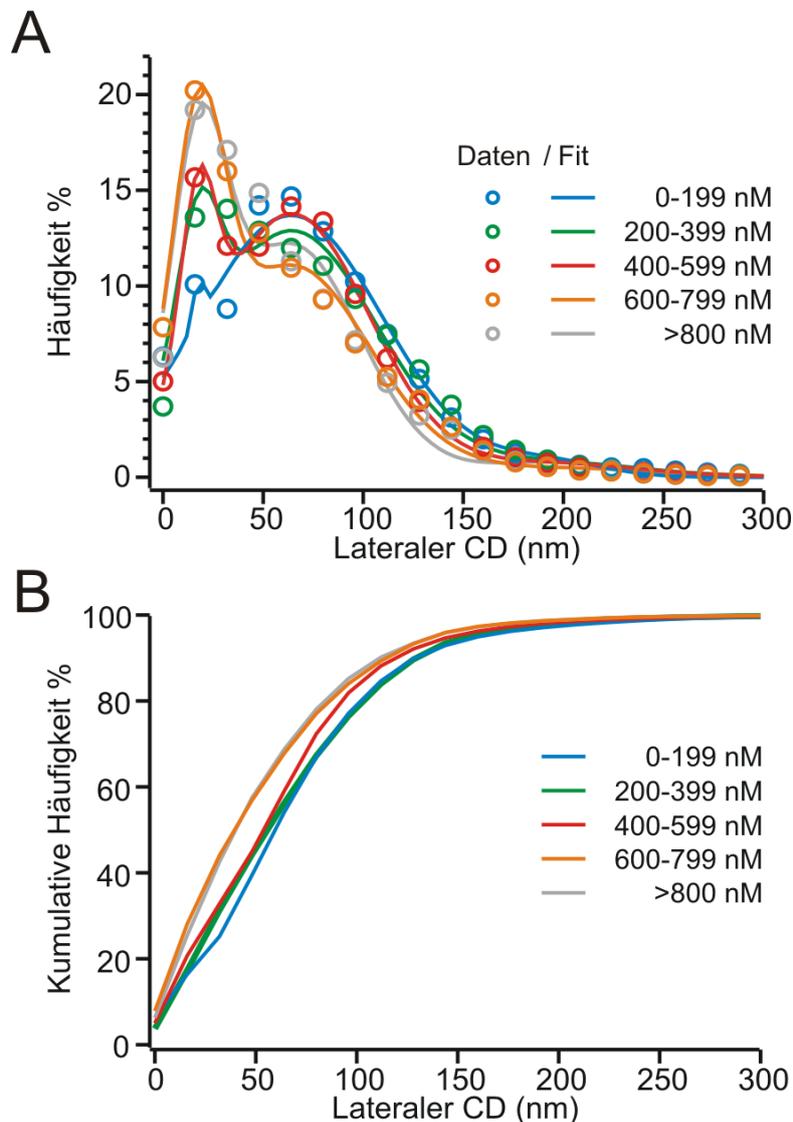


Abbildung 18. Verteilung der lateralen Caging Diameter. (A) Histogramm der CDs (gemittelte Datenpunkte: ●) für die jeweilige $[Ca^{2+}]_i$ (siehe Legende). Linien repräsentieren die beste Kurvenbeschreibung durch eine Kombination von drei Gausskomponenten. (B) Kumulatives Histogramm der CDs für die jeweilige $[Ca^{2+}]_i$. ($N_{0-199 \text{ nM}}$: 23, $n_{0-199 \text{ nM}}$: 902; $N_{200-399 \text{ nM}}$: 19, $n_{200-399 \text{ nM}}$: 541; $N_{400-599 \text{ nM}}$: 20, $n_{400-599 \text{ nM}}$: 571; $N_{600-799 \text{ nM}}$: 10, $n_{600-799 \text{ nM}}$: 275; $N_{>800 \text{ nM}}$: 12, $n_{>800 \text{ nM}}$: 270)

Die Datenverteilung lässt sich am besten mit einer Kombination von drei Gausskomponenten beschreiben. Die Maxima der einzelnen Komponenten liegen bei 16, 56, sowie 192 nm, und haben die in Tabelle 3 genannten Amplituden.

Für die spätere Analyse ist die Zuordnung der Mobilitäten in bestimmte Stadien relevant. Die einzelnen Gausskomponenten aus der Beschreibung der CD-Verteilung in Abbildung 18 wurden zur Charakterisierung der Stadien herangezogen. Allerdings überlagerten sich die jeweils benachbarten Gausskurven mehr oder minder stark. Um eine den Kurven entsprechende Wichtung zu erhalten, wurden die Grenzen zwischen den Stadien über den Mittelpunkt zwischen den Standardabweichungen der jeweils benachbarten Gausskurven berechnet. Die Grenze zwischen der ersten und zweiten Gausskurve wurde auf 45 nm bestimmt, die zwischen zweiter und dritter Kurve auf 112 nm. Alle im Folgenden als lateral immobil bezeichneten Stadien weisen einen CD von <45 nm auf. Diejenigen, deren CD zwischen 45 und 112 nm lag, werden als lateral „gecaget“ klassifiziert, da sie sich wie in einem Käfig gefangen verhalten (engl. „cage“, siehe Nofal *et al.* 2007). Die CD >112 nm werden als lateral frei klassifiziert.

Tabelle 3. Charakteristika der Verteilungsbeschreibung der lateralen Mobilität bei konstanten $[Ca^{2+}]_i$.

$[Ca^{2+}]_i$	Amplituden der Maxima			Integrale der Gausskomponenten		
	1. (16 nm)	2. (56 nm)	3. (192 nm)	1. (%)	2. (%)	3. (%)
0-199 nM	3,03	14,17	0,61	2,0	93,2	4,7
200-399 nM	8,72	12,64	0,63	14,8	79,0	6,2
400-599 nM	9,52	13,91	0,73	13,3	81,2	5,5
600-799 nM	16,31	10,78	1,28	28,4	66,6	4,9
>800 nM	12,78	12,14	0,82	27,5	65,1	7,3

Die beobachtete generelle Immobilisierung bei erhöhter $[Ca^{2+}]_i$ reflektiert den Effekt, der bereits bei den beiden Beispielzellen beobachtet werden konnte. Im Vergleich mit der $[Ca^{2+}]_i$ zwischen 0-199 nM ergab sich eine signifikante Zunahme kleiner CD mit gradueller Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ auf 600-799 nM, die mit einer ebenfalls signifikanten

Reduktion größerer CD einherging. Die Signifikanzen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit separat in Tabelle 4 erfasst.

Die erste Gausskomponente zeigt eine graduelle Zunahme, somit häufigeres Auftreten von Immobilität, mit gradueller Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ bis zu einer Konzentration von 600-799 nM. Entgegengesetztes Verhalten zeigt die zweite Komponente, bei der sowohl Amplitude als auch Integral abnehmen. Die dritte, freie Komponente, deren genereller Beitrag zu den CD äußerst minimal ist, verhält sich in ihren Amplitudenhöhen ähnlich der ersten Komponente.

Wie schon aus den Beispielen in Abbildung 17 F ersichtlich, lässt sich eine allgemeine Immobilisierung auch deutlich im kumulativen Histogramm erkennen und zeigt sich in einer graduellen Linksverschiebung mit Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ (Abbildung 18 B).

Die CD-Verteilung verhält sich vergleichbar zu den Ergebnissen der IRP-Abschätzung. Die maximale Immobilisierung findet bei einem $[Ca^{2+}]_i$ von 700 nM statt, entsprechend der maximalen Poolbefüllung des IRP (Abbildung 14 A). Das Ergebnis der lateralen Mobilität unter dem Einfluss von $[Ca^{2+}]_i$ scheint somit die Vergrößerung der freisetzbaren Pools widerzuspiegeln.

Tabelle 4. Signifikanzen der lateralen CD-Analyse. (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; Student's T-Test).

Datenpunkt	Datenpunkte entsprechen Kreissymbolen in Abbildung 18												
	1	2	3	4	5	6	7	...	16	17	18	19	20
0-199 nM	-	*	***	-	*	*	-		*	-	*	*	-
200-399 nM	-	-	***	-	*	-	-		*	-	-	*	-
400-599 nM	-	*	**	-	-	*	*		-	-	-	-	-
600-799 nM	-	***	***	-	*	*	*		-	-	*	-	-
>800 nM	-	**	***	-	**	*	*		-	-	-	**	-

3.1.2.2 Abhängigkeit axialer LDCV-Mobilität von der $[Ca^{2+}]_i$

Neben der äußerst akkuraten lateralen Positionsbestimmung liefert die TIRFM die Möglichkeit, auch Aussagen über die axiale Beweglichkeit, bzw. Position von fluoreszenten Objekten zu treffen. Dabei macht man sich den exponentiellen Abfall der Lichtenergie in der evaneszenten Welle mit Entfernung von der Grenzfläche zu Nutze. Die Kenntnis der zugrundeliegenden Funktion des Energieabfalls macht es möglich, für jeden einzelnen Fluoreszenz-markierten Vesikel die Bewegungen in der evaneszenten Welle zu bestimmen. Im Gegensatz zur lateralen Mobilität, die Beobachtungen von mehreren Mikrometern erlaubt, ist die axiale Mobilität auf die Dicke der evaneszenten Welle (~ 250 nm bei Anregungswellenlänge 561 nm) begrenzt. Da die einzelnen Vesikel i.d.R. nicht mit der PM verschmelzen, was notwendig wäre, um die genaue Null-Position (LDCV berührt die PM) ermitteln zu können, lassen sich keine Aussagen über die absolute Position der Vesikel im TIRF-Feld treffen. Aus diesem Grund sind die berechneten CD-Werte einheitslos und als relativ anzusehen.

Genau wie die laterale Mobilität ist die axiale Mobilität eine Möglichkeit, Rückschlüsse auf molekulare Stadien zu ziehen. In Abbildung 19 sind die axialen CD derselben zwei repräsentativen Zellen, wie zuvor für die laterale Mobilität verwendet. Wie im Falle der lateralen Mobilität (Kapitel 3.1.2.1), sind bei niedriger $[Ca^{2+}]_i$ mehr Vesikel und größere Beweglichkeiten zu beobachten (Abbildung 19 A), als bei höherer $[Ca^{2+}]_i$ (Abbildung 19 B).

Wiederum wurden auch die CD von zwei einzelnen LDCVs bei niedriger (Abbildung 19 C) und höherer $[Ca^{2+}]_i$ (Abbildung 19 D) vergrößert dargestellt. Die Verteilung aller CD der beiden Zellen zeigt ein vergleichbares Verhalten wie für die Analyse der lateralen Bewegung. Eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ führt zu einem vermehrten Auftreten von kleinen CDs (Abbildung 19 E, orange Linie), und einer Linksverschiebung im kumulativen Histogramm (Abbildung 19 F).

Für die Ermittlung der axialen Mobilität wurden nur diejenigen Zellen verwendet, die zuvor mit SFV infiziert worden waren, der die Expression von NPY-mCherry codierte. Dadurch wurde ein mögliches Bleichartefakt des weniger photostabilen mRFP vermieden, verringerte aber die Zahl der verwertbaren Zellen: $N_{0-199 \text{ nM}} = 12$, $N_{200-399 \text{ nM}} = 7$, $N_{400-599 \text{ nM}} = 11$, $N_{600-799 \text{ nM}} = 10$, $N_{>800 \text{ nM}} = 12$. Die mittlere Verteilung der einzelnen $[Ca^{2+}]_i$ konnte erneut am Besten durch eine Beschreibung mit drei Gausskomponenten erfolgen (Abbildung 20 A). Die ermittelten Maxima befinden sich bei

0,1, 0,35 und 0,7 A.U. und die einzelnen Amplituden und Integrale sind in Tabelle 5 genauer aufgeführt.

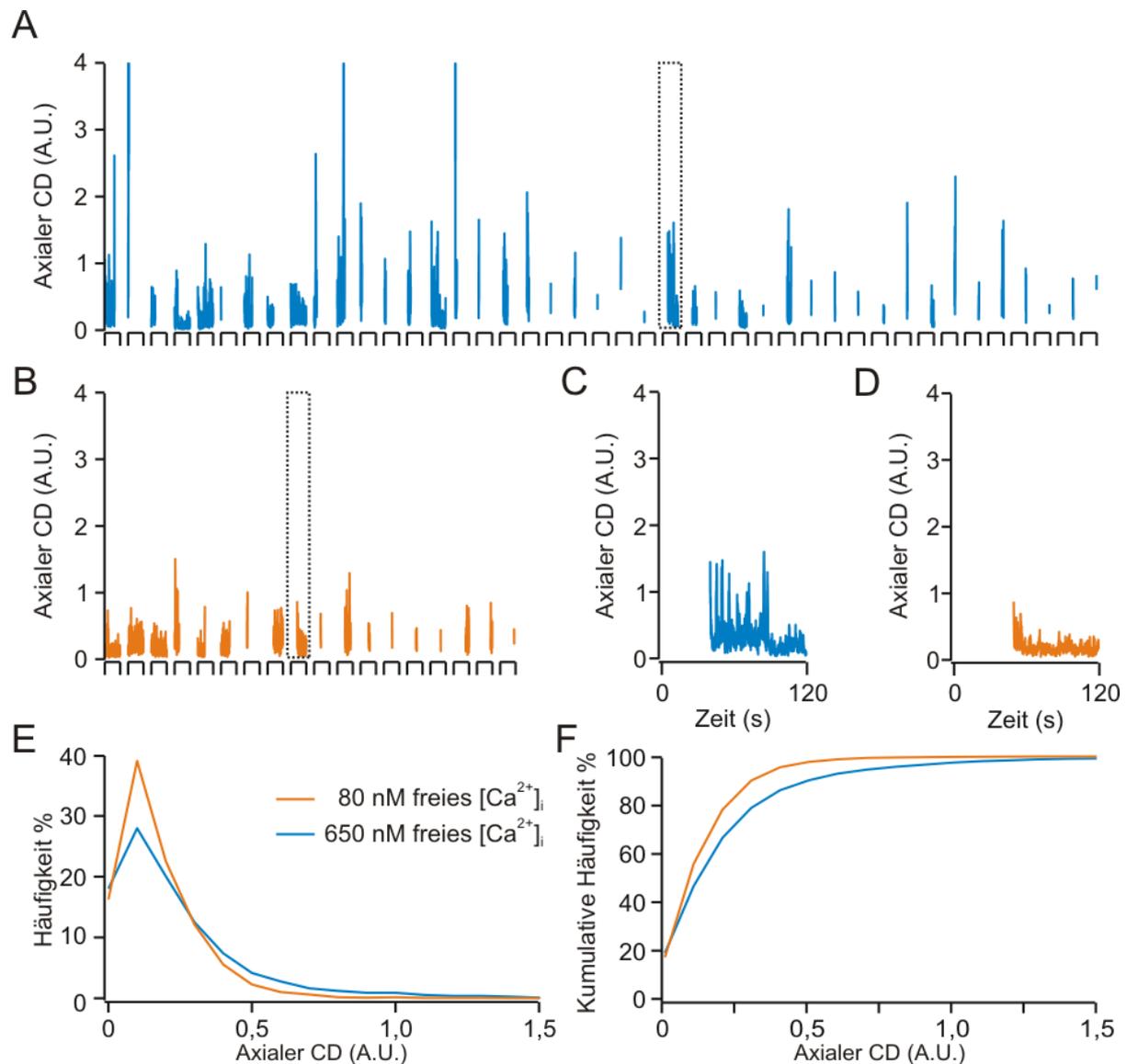


Abbildung 19. Beispiele für die axiale Vesikelmobilität bei niedriger und hoher $[Ca^{2+}]_i$. Alle CD jedes über den Zeitraum von 2 min beobachteten Vesikels je einer Zelle bei 80 nM (A) und 650 nM (B). (C) zeigt den axialen CD-Verlauf über Zeit eines Beispielvesikels aus (A, gestrichelte Box). (D) zeigt den CD-Verlauf über Zeit eines Beispielvesikels aus (B, gestrichelte Box). (E) Die Häufigkeitsverteilung der CD zeigt einen höheren Anteil von kleineren CD bei höherer $[Ca^{2+}]_i$. Dies wird auch durch die Linksverschiebung im kumulativen Histogramm (F) ersichtlich.

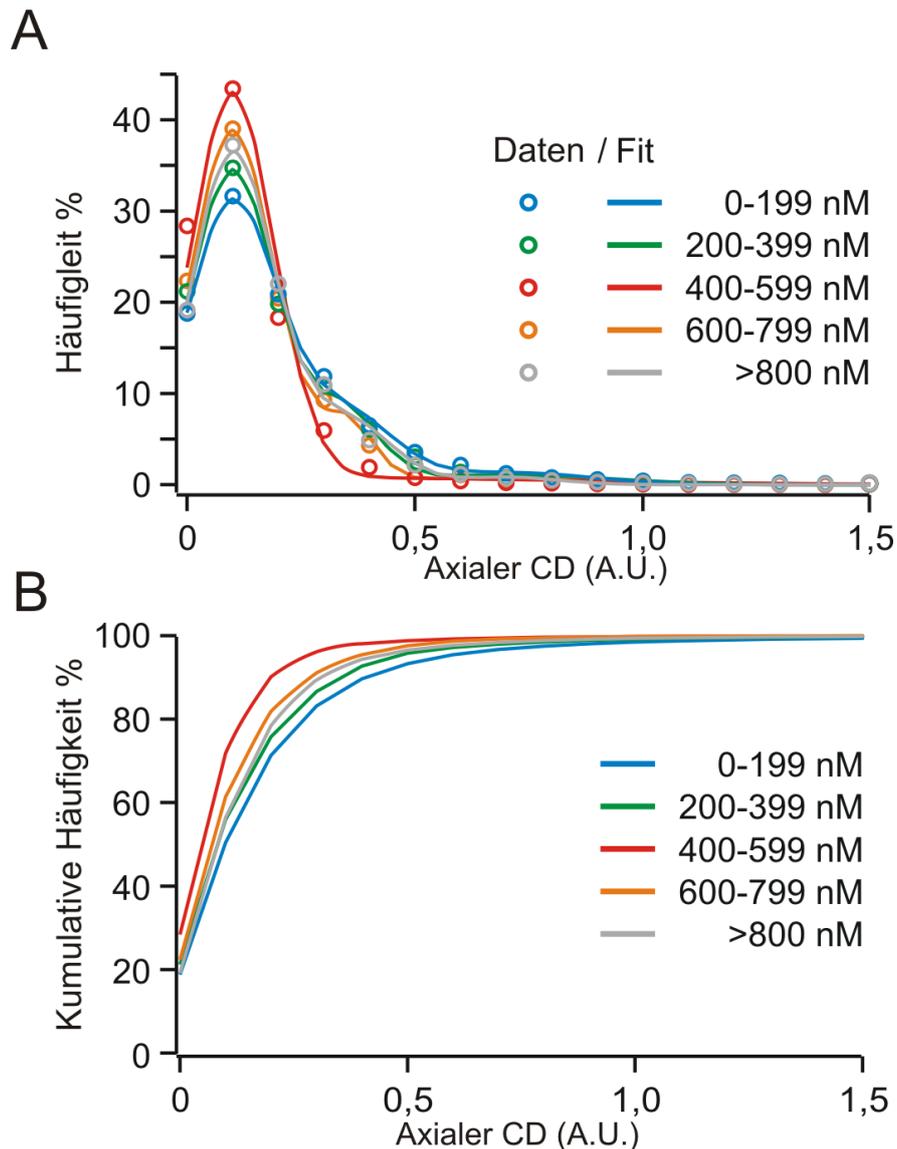


Abbildung 20. Verteilung der axialen Caging Diameter. (A) Histogramm der CD (gemittelte Datenpunkte: \bullet) für die jeweilige $[Ca^{2+}]_i$ (siehe Legende). Linien repräsentieren die beste Kurvenbeschreibung durch eine Kombination von drei Gaußkomponenten. (B) Kumulatives Histogramm der CD für die jeweilige $[Ca^{2+}]_i$. ($N_{0-199 \text{ nM}}$: 12, $N_{200-399 \text{ nM}}$: 7, $N_{400-599 \text{ nM}}$: 11, $N_{600-799 \text{ nM}}$: 10, $N_{>800 \text{ nM}}$: 12)

Die Charakterisierung der einzelnen Stadien erfolgte wieder über die Tatsache, dass die Verteilung der CDs mit den drei o.g. Gaußkomponenten beschrieben werden konnte. Der Vorgehensweise bei der lateralen Mobilität entsprechend, wurden die Grenzen zwischen den Stadien über den Mittelpunkt zwischen den Standardabweichungen der jeweils benachbarten Gaußkurven berechnet. Die Grenze zwischen erster und zweiter Gaußkurve wurde bei 0,25 A.U., die zwischen der zweiten und dritten Kurve bei 0,45 A.U. gesetzt. Alle im Folgenden als axial immobil bezeichneten Stadien weisen einen CD von $<0,25$ A.U. auf. Als axial gecaget werden die klassifi-

ziert, deren CD zwischen 0,25 und 0,45 A.U. lag. Die mit einem CD von $>0,45$ A.U. gelten als axial frei.

Im Detail ist eine Erhöhung der ersten Gausskomponente (Immobilität) mit Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ zu beobachten, die ihr Maximum im Konzentrationsbereich von 400-599 nM hat. Bei weiterer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ verringern sich die Amplitude und prozentual auch das Integral der ersten Gausskomponente. Die zweite und dritte Komponente verhalten sich entgegengesetzt zur ersten. Mit Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ von Ruhekonzentrationen (0-199 nM) bis in den Bereich zwischen 400-599 nM verringerten sich sowohl Amplitude, als auch Integral graduell. Die weitere Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ resultierte wiederum in einer graduellen Erniedrigung von Amplitude und Integral der ersten, sowie Erhöhung beider Parameter der zweiten und dritten Komponente. Die einzige Signifikanz findet sich beim Maximum der ersten Amplitude von 0-199 nM und 400-599 nM ($p=0,046$, Student's T-Test).

Die graduelle Immobilisierung wird auch im kumulativen Histogramm deutlich (Abbildung 20 B). Eine fortschreitende Linksverschiebung von 0-199 nM über 200-399 nM bis hin zu 400-599 nM ist klar ersichtlich. Im Gegensatz zur lateralen Mobilität fällt allerdings eine ebenfalls graduelle Rechtsverschiebung, somit erneute Mobilisierung bei noch höheren $[Ca^{2+}]_i$ auf.

Tabelle 5. Charakteristika der Verteilungsbeschreibung der axialen Mobilität bei konstanten $[Ca^{2+}]_i$.

$[Ca^{2+}]_i$	Amplituden der Maxima			Integrale der einzelnen Gausskomponenten		
	1. (0,1 A.U.)	2. (0,35 A.U.)	3. (0,7 A.U.)	1. (%)	2. (%)	3. (%)
0-199 nM	30,93	7,48	1,34	72,1	21,3	6,6
200-399 nM	34,50	7,49	1,09	78,3	15,1	6,6
400-599 nM	43,37	7,17	0,30	92,5	6,0	1,5
600-799 nM	38,84	6,67	0,82	84,5	10,7	4,7
>800 nM	36,63	7,10	0,82	78,8	18,7	2,5

Die axiale CD-Verteilung weist ein anderes Verhalten auf, als die laterale und die Größe des IRPs. Es wird eine maximale Immobilisierung schon bei 400-599 nM $[Ca^{2+}]_i$ erreicht, die von geringeren Ca^{2+} -Konzentrationen ausgehend, graduell zunimmt. Über der Schwellenkonzentration von 400-599 nM wird eine graduelle Remobilisierung ersichtlich. Es scheint also, dass die axiale Mobilität eine andere Ca^{2+} -Abhängigkeit hat als die laterale Mobilität und die Größe des IRP.

3.1.2.3 Korrelation von lateraler und axialer Mobilität

Ein Zusammenhang von lateraler und axialer Mobilität würde auf die Beobachtung eines gleichgeschalteten Mechanismus hindeuten. Die Tatsache, dass sich die CDs der axialen und lateralen Mobilität nicht gleich verhalten, sondern im Falle der axialen Mobilität eine erneute Erhöhung der Mobilität ab einer gewissen $[Ca^{2+}]_i$ (>600 nM) zu beobachten ist, deutet allerdings auf zwei unabhängige Mechanismen hin. In einer ersten Analyse wurden die lateralen und axialen CDs eines jeden Vesikels gegeneinander dargestellt (Abbildung 21).

Alle Zellen, deren Mobilität sowohl in lateraler, als auch in axialer Richtung ausgewertet wurde, wurden für diese Korrelationsauswertung verwendet. Die Graphen im Einzelnen sind den jeweiligen $[Ca^{2+}]_i$ zugeordnet und resultieren aus der Überlagerung aller beitragenden Zellen (Abbildung 21; A: 0-199 nM (N=12); B: 200-399 nM (N=7); C: 400-599 nM (N=11); D: 600-799 nM (N=10); E: >800 nM (N=12)). Für alle Konzentrationen ist eine lineare Korrelation mit mehr oder minder breiter Streuung zu erkennen, wobei es scheint, dass zwei distinkte Populationen zum Vorschein kommen.

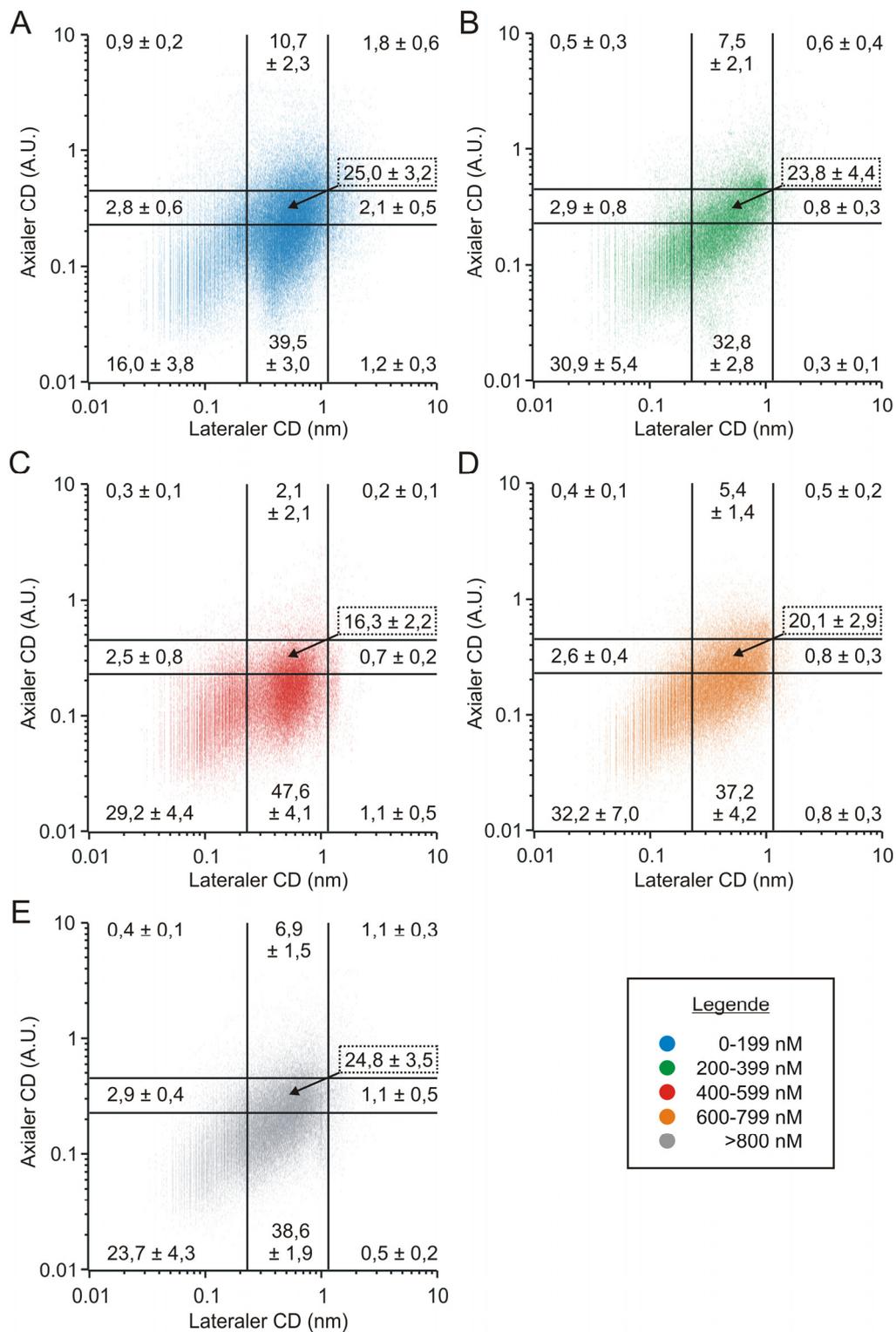


Abbildung 21. Korrelation von lateraler und axialer Mobilität. Jeder laterale CD wurde gegen den entsprechenden axialen CD doppelt-logarithmisch aufgetragen. Linien repräsentieren die aus lateraler und axialer CD-Verteilung ermittelten Grenzen zwischen den unterschiedlichen Stadien. Die Zahlen in den Segmenten der Graphen geben die prozentuale Menge der Punkte in einem Segment \pm SEM an. Die Graphen im Einzelnen sind den jeweiligen $[Ca^{2+}]_i$ zugeordnet: (A) 0-199 nM (N=12), (B) 200-399 nM (N=7), (C) 400-599 nM (N=11), (D) 600-799 nM (N=10) und (E) >800 nM (N=12).

In Abbildung 22 ist die Überlagerungen der Graphen von 0-199 nM (Abbildung 21 A) und 400-599 nM (Abbildung 21 C), sowie 0-199 nM (Abbildung 21 A) und 600-799 nM (Abbildung 21 D) dargestellt. Darin ist das unterschiedliche Verhalten von axialen und lateralen CD mit Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ zu erkennen. Um diese Unterschiede klassifizieren zu können, wurden die in Kapitel 3.1.2.1 und Kapitel 3.1.2.2 ermittelten Grenzen verwendet. Daraus ergaben sich neun Segmente. Segment I vereint alle CDs, die sowohl lateral als auch axial als immobil eingestuft wurden. Segment II entspricht den CDs, die lateral im gecagetem Stadium, allerdings axial immer noch immobil waren. Die folgenden Segmente wurden dementsprechend benannt, bis hin zu Segment IX, welches CDs vereinte, die lateral und axial als frei eingeordnet wurden.

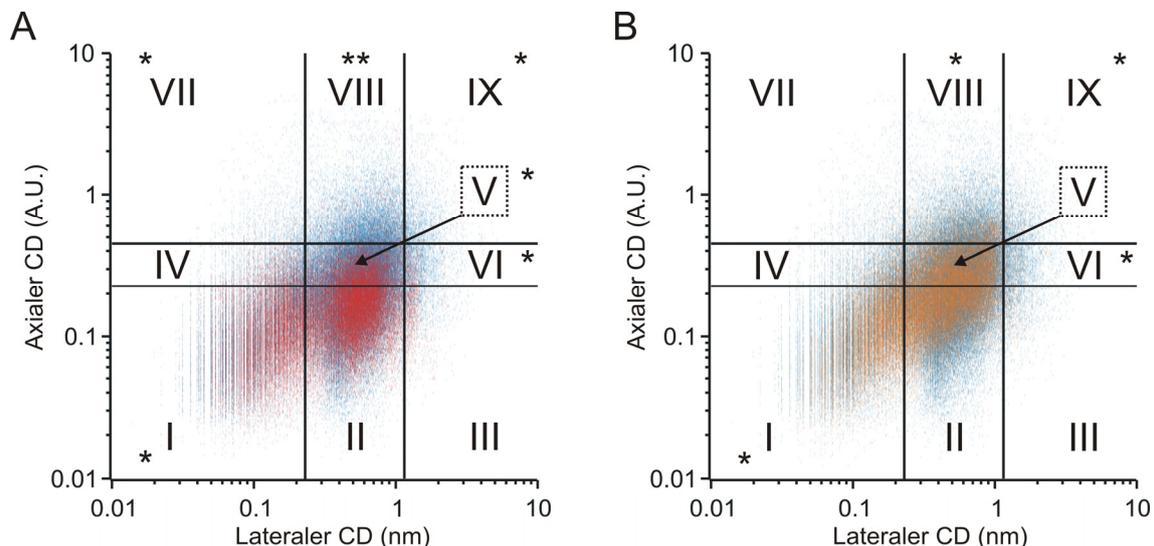


Abbildung 22. Überlagerung der Korrelationsgraphen. (A) ist die Überlagerung der Graphen (A, 0-199 nM) und (C, 400-599 nM) aus Abbildung 21. (B) zeigt die Überlagerung der Graphen (A, 0-199 nM) und (D, 600-799 nM) aus Abbildung 21. Die Segmente ergeben sich aus der Anwendung der Grenzen zwischen den einzelnen axialen und lateralen Mobilitätsstadien. In den einzelnen Segmenten (I-IX) sind die jeweiligen Signifikanzen gezeigt. (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$, ungepaarter Student's t-Test).

In Abbildung 22 A ist in Segment I eine signifikante Zunahme der relativen Häufigkeit von korrelierten CDs mit Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ zu beobachten (0-199 nM $16 \pm 3,8\%$ zu 400-599 nM, $29,2 \pm 4,4\%$). Gleichermäßen verringert sich die relative Anzahl der korrelierten CDs in Segmenten V-IX signifikant ($p_I < 0,036$, $p_V < 0,047$, $p_{VI} < 0,037$, $p_{VII} < 0,043$, $p_{VIII} < 0,008$, $p_{IX} < 0,048$). In der Überlagerung der Korrelationsdarstellungen

von 0-199 nM und 600-799 nM ist eine weitere Zunahme der CDs in Segment I zu erkennen (Abbildung 22 B). Allerdings ist auch, im Vergleich zu Abbildung 22 A, eine erneute Zunahme der axialen freien Bewegung zu beobachten ($p_I < 0,042$, $p_{VI} < 0,035$, $p_{VIII} < 0,024$, $p_{IX} < 0,047$).

Somit führt die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ zu einer maximalen axialen Immobilisierung im Konzentrationsbereich von 400-599 nM, die damit eine andere Ca^{2+} -Abhängigkeit zu haben scheint als die laterale Mobilität (Maximum 600-799 nM) und somit das Priming.

3.1.3 Variation der $[Ca^{2+}]_i$ mit NP-EGTA

Um einen kontrollierten Zugang zu Effekten auf Übergangsraten, Veränderungen der Mobilität usw. in Echtzeit zu bekommen, wurde ein experimenteller Ansatz angedacht, in dem die $[Ca^{2+}]_i$ während einer Messung von einer festen Ruhekonzentration von 100 nM auf ca. 650 nM stufenartig angehoben wurde. Dieser Anstieg wurde durch einen UV-Blitz mit geringerer Intensität erreicht, dem durch eine Feedback-Schleife über die Photodiode weitere Photolyseschnitte mit dem Monochromator (350 nm) folgten. Dadurch konnte die $[Ca^{2+}]_i$ dauerhaft auf der angehobenen Konzentration gehalten werden. Nach einminütiger Beobachtungsphase bei der Ruhekonzentration folgte, nach dem UV-Blitz, eine 2,5minütige Aufnahme bei erhöhter $[Ca^{2+}]_i$.

Die gepaarte Messung der Beweglichkeit bei niedriger $[Ca^{2+}]_i$ und unter optimalen Primingbedingungen (abgeleitet von den konstanten $[Ca^{2+}]_i$, siehe Kapitel 3.1.2) sollte einen besseren Einblick in die Ca^{2+} -abhängige Dynamik von Docking und Priming liefern. Außerdem sollte eine mögliche Zell-zu-Zell-Variabilität, wie in den Aufnahmen bei konstanter $[Ca^{2+}]_i$, verringert werden, da alle gemessenen Zellen ein vergleichbares Verhalten in der Art und Weise ihrer Mobilitätsänderungen zeigen sollten.

In Abbildung 23 sind die Ergebnisse der lateralen CD-Analyse zusammengefasst. Insgesamt wurden 27 Zellen unter diesen Bedingungen gemessen, bzw. die CD von 1292 LDCVs bestimmt. Die CD-Werte wurden zu Beginn der Aufnahme über 1 min und 1,5 min nach der Blitzphotolyse, wiederum für 1 min, ermittelt (Abbildung 10 C). Die Überlagerung aller CD-Verteilungen der einzelnen Zellen bei jeweils niedriger (blau) und hoher (rot) $[Ca^{2+}]_i$ sind in Abbildung 23 A dargestellt. Die gemittelte CD-Verteilung (Abbildung 23 B), wie auch die kumulative Auftragung (Abbildung 23 C), zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Vesikelbeweglichkeit vor und nach

moderater UV-Blitzlicht-Photolyse. Andere Parameter, wie Anzahl der Vesikel an der PM (pro Bild oder pro Aufnahmeperiode) oder die Verweildauer, zeigten variierende Ergebnisse, die eine Interpretation äußerst schwierig machen (Daten nicht präsentiert).

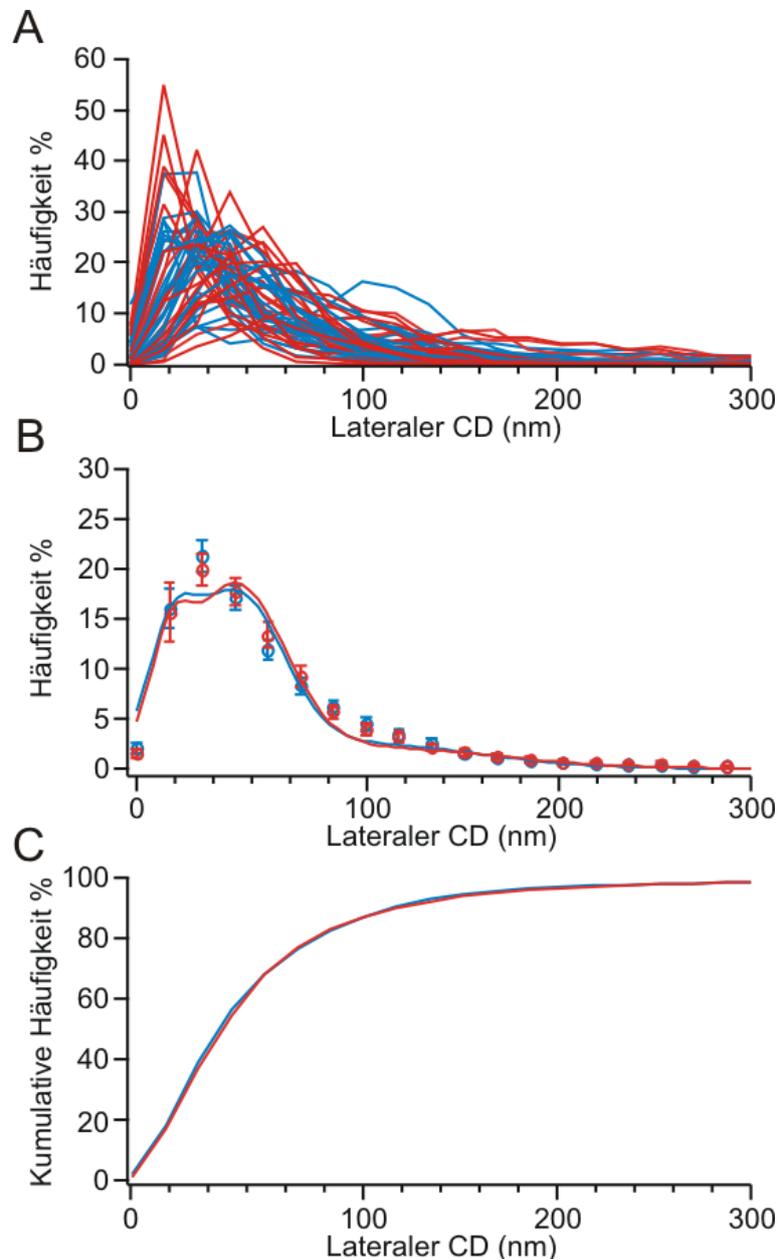


Abbildung 23. Verteilung der lateralen Caging Diameter nach UV-Blitzlicht-Photolyse von NP-EGTA. (A) Histogramme aller CD bei niedrigem (blau) und hohem $[Ca^{2+}]_i$ (rot) berechnet über die erste Minute der Aufnahme und für eine Minute ab 90 s nach dem ersten UV-Blitz. (B) Gemittelte Verteilungen der CD (gemittelte Datenpunkte: ○) bei einer $[Ca^{2+}]_i$ 150 nM vor und ca. 650 nM nach UV-Blitz-Photolyse. Linien repräsentieren die beste Kurvenbeschreibung durch eine Kombination von drei Gaußkomponenten. (C) Kumulatives Histogramm der CD für die jeweilige $[Ca^{2+}]_i$. (N=27, n=1292, Mittelwerte ● ± SEM)

Diese Versuchsanordnung resultierte somit in einem unerwarteten Ergebnis. Die Variation der $[Ca^{2+}]_i$ von 100 nM auf 650 nM in ein und derselben Zelle zeigt keine eindeutige Veränderung, bezüglich ihrer Mobilität.

3.1.4 Variation der $[Ca^{2+}]_i$ mit Diazo-2

Die gepaarte Messung der Beweglichkeit bei hoher, optimale Primingbedingungen bietende $[Ca^{2+}]_i$ und bei Ruhekonzentration (entsprechend den Ergebnissen bei konstanter $[Ca^{2+}]_i$, siehe Kapitel 3.1.2) stellte den komplementären Versuchsansatz zu Kapitel 3.1.3 dar. Die Frage, die es zu beantworten galt, war, ob sich eine Ca^{2+} -abhängige Dynamik von Undocking und Unpriming herausfinden lässt.

Das entgegengesetzte Experiment zu Kapitel 3.1.3 wurde bei diesem Ansatz verfolgt. Der Einsatz von Diazo-2 – BAPTA, welches sich in einem photolysierbaren Käfig befindet – sollte zu einer plötzlichen Erniedrigung der $[Ca^{2+}]_i$ von 600 auf 50 nM führen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde das gleiche Protokoll verwendet, wie unter Kapitel 3.1.3. Insgesamt wurde nach einer 2minütigen Ladephase die Vesikelbewegung für 3,5 min mit 10 Hz aufgezeichnet (Abbildung 10 C). Nach der ersten Minute wurde durch Auslösen eines UV-Blitzes die $[Ca^{2+}]_i$ durch Freisetzung von BAPTA heruntersgesetzt. Durch weitere kontrollierte Photolyseschritte mit dem Monochromator (Belichtung bei 350 nm von variierender Dauer) wurde die $[Ca^{2+}]_i$ durchgehend niedrig gehalten und ein erneuter Anstieg zur Ausgangskonzentration vermieden.

Angemerkt werden muss, dass die Positionsbestimmung in den Experimenten mit Diazo-2 ausschließlich mit der Schwellenwert-, nicht mit der Centroid-Methode durchgeführt worden war, da diese zum Zeitpunkt der Datengenerierung noch nicht zu Verfügung stand (siehe dazu Kapitel 2.2.10). Nachdem die Neuanalyse der NP-EGTA-Experimente zu keiner Veränderung im Ergebnis (Schwerpunkt vs. Centroid) führte, wurde hier von einer Neuanalyse abgesehen.

Wie schon zuvor bei den Experimenten mit NP-EGTA zeigt sich wieder ein unerwartetes Ergebnis. Bei Erniedrigung der $[Ca^{2+}]_i$ auf Ruhekonzentrationen kommt es zu einer erniedrigten Beweglichkeit der Vesikel, was im Gegensatz zu den Ergebnissen der Experimente mit konstanter $[Ca^{2+}]_i$ steht.

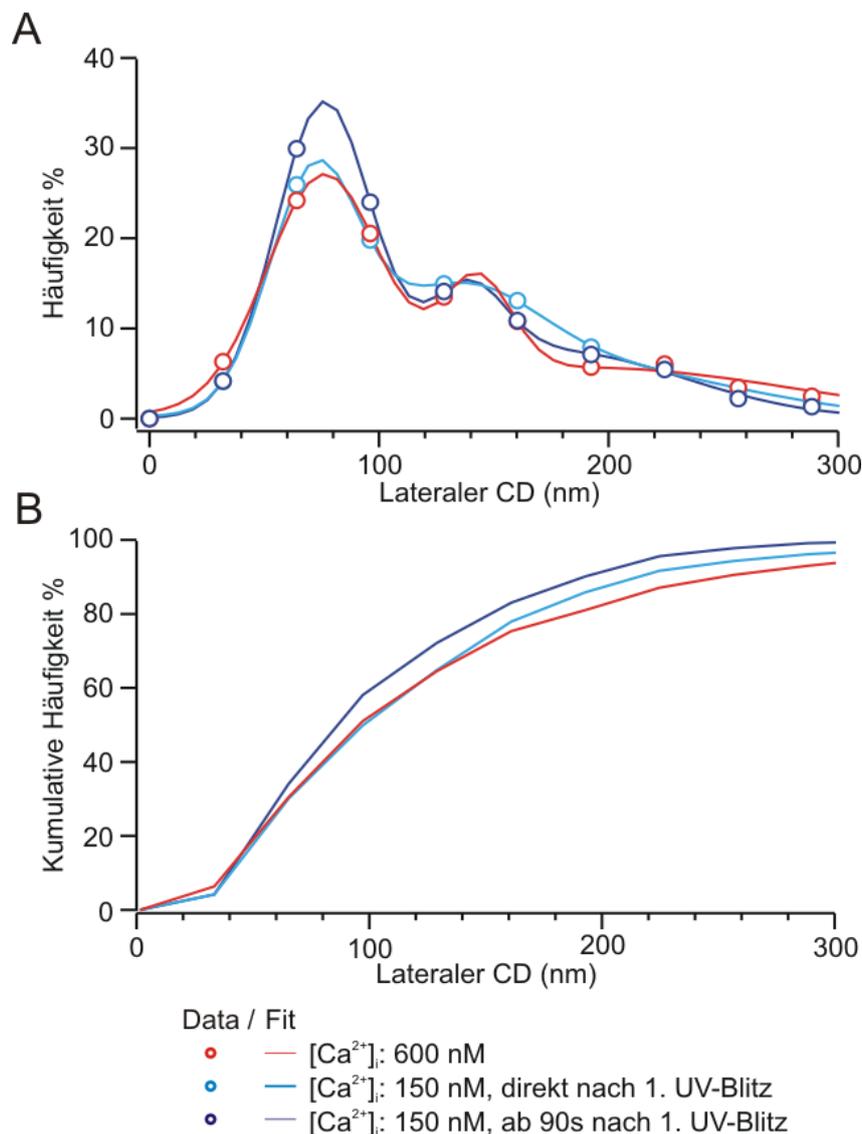


Abbildung 24. Verteilung der lateralen CD nach UV-Blitzlicht-Photolyse von Diazo-2. (A) Gemittelte Verteilung der CD (gemittelte Datenpunkte: ●) bei einer [Ca²⁺]_i von 600 nM vor (rot), ca. 150 nM direkt nach (hellblau) und ab 90 s (dunkelblau) nach der ersten UV-Blitz-Photolyse von Diazo-2. Linien repräsentieren die beste Kurvenbeschreibung durch eine Kombination von drei Gausskomponenten. (B) Kumulatives Histogramm der CD für die jeweilige [Ca²⁺]_i. (N=23, n=923)

3.1.4.1 Ca²⁺-Strom-Spannungs-Kurven

Um die Funktionalität der Zellen zu kontrollieren, wurde für diese im Anschluss an die Aufnahme der Vesikelbeweglichkeit eine Strom-Spannungskurve (IV-Kurve) erstellt. Dazu wurde über die Zellmembran für je 25 ms eine Spannung angelegt, die vom Ruhemembranpotential (-70 mV) in Schritten von je 10 mV bis zu einem Maximum von +20 mV inkrementiert wurde. Zur Auswertung wurden die Ca²⁺-Einwärtsströme ermittelt und gegen die Spannung dargestellt. Im Vergleich zu den Ergebnissen, die

bei konstanten $[Ca^{2+}]_i$ gewonnen wurden zeigen sich klare Unterschiede zu denen mit variierendem Ca^{2+} (Abbildung 25).

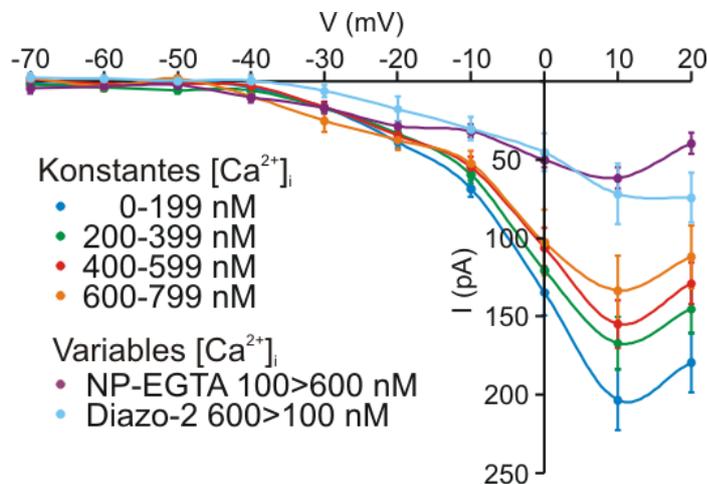


Abbildung 25. Ca^{2+} -Kanal Strom-Spannungs-Kurven.

Am Ende der Mobilitätsmessungen wurden zusätzlich die Daten für IV-Kurven ermittelt. Pulsdauer: 25 ms; Pulsfrequenz: 20 Hz; Ruhemembranpotential: -70 mV; Stufenweise Erhöhung der Spannung um 10 mV auf ein Maximum von +20 mV. Für intrazelluläre Bedingungen, siehe Legende. ($N_{0-200}=23$, $N_{200-400}=19$, $N_{400-600}=20$, $N_{600-800}=10$, $N_{NP-EGTA}=27$, $N_{Diazo-2}=23$, Mittelwerte \pm SEM)

Die Ergebnisse aus den Experimenten mit konstanten $[Ca^{2+}]_i$ zeigen eine graduelle Abnahme des Ca^{2+} -Einstroms mit Erhöhung der intrazellulären $[Ca^{2+}]_i$. Dies ist plausibel, da mit Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ auch eine geringere Triebkraft für Ca^{2+} -Ionen in die Zelle vorliegt. Die IV-Kurven beider Ca^{2+} -Variationsexperimente passen hingegen nicht in dieses Schema. Eigentlich müsste die IV-Kurve in Anwesenheit von photolytisiertem Diazo-2, da sie bei niedriger $[Ca^{2+}]_i$ erstellt wurde, auf dem Niveau der Kurve bei 0-199 nM konstanter $[Ca^{2+}]_i$ liegen. Entsprechendes gilt für die IV-Kurve, die unter erhöhten $[Ca^{2+}]_i$ nach UV-Blitzlicht-Photolyse von NP-EGTA erstellt wurde. Diese sollte im Bereich zwischen der für 400-599 und 600-799 nM $[Ca^{2+}]_i$ erhaltenen IV-Kurven liegen.

Es liegt somit nahe, dass, evtl. ausgelöst durch die andauernde Bestrahlung mit UV-Licht, die Zellen dieser beiden Versuchsreihen nicht mehr funktionell waren. Daher sind auch die Ergebnisse der beiden Datensätze mit Vorsicht zu interpretieren.

3.1.5 Übergänge zwischen den einzelnen Stadien sind linear

In der Vergangenheit wurden diverse Modelle entwickelt, die auf eine lineare Abfolge des Dockings, Primings und der anschließenden Fusion hindeuten (Neher E und Zucker RS 1993; Soerensen JB 2004; Neher E und Sakaba T 2008). Es scheint un-

wahrscheinlich, dass es zu Fusionsereignissen kommt (Allersma MW *et al.* 2004), bei denen einzelne Präfusions-Stadien übersprungen werden.

Ich analysierte die Daten der Zellen mit konstanter $[Ca^{2+}]_i$ dahingehend, dass ich die Reihenfolge der Übergänge zwischen den einzelnen Mobilitätsstadien beobachtete. Die Zellen befanden sich nach 2-minütiger Ladephase im Ca^{2+} -Equilibrium (gilt für $[Ca^{2+}]_i$ zwischen 0 und 799 nM), wodurch keine Schwankungen in den Übergangsmustern zu erwarten waren. Durch Fusion ausgelöstes Priming, bzw. Docking würde diese Übergangsmuster in Richtung des Primings und Dockings bevorzugen, da Unpriming und Undocking vermindert auftreten würden. Basierend auf den Verläufen der CD und den vorher gesetzten Grenzen zwischen den einzelnen Stadien, wurden die Übergänge zwischen den einzelnen Stadien ermittelt (Minimale Verweildauer in einem Stadium: 300 ms).

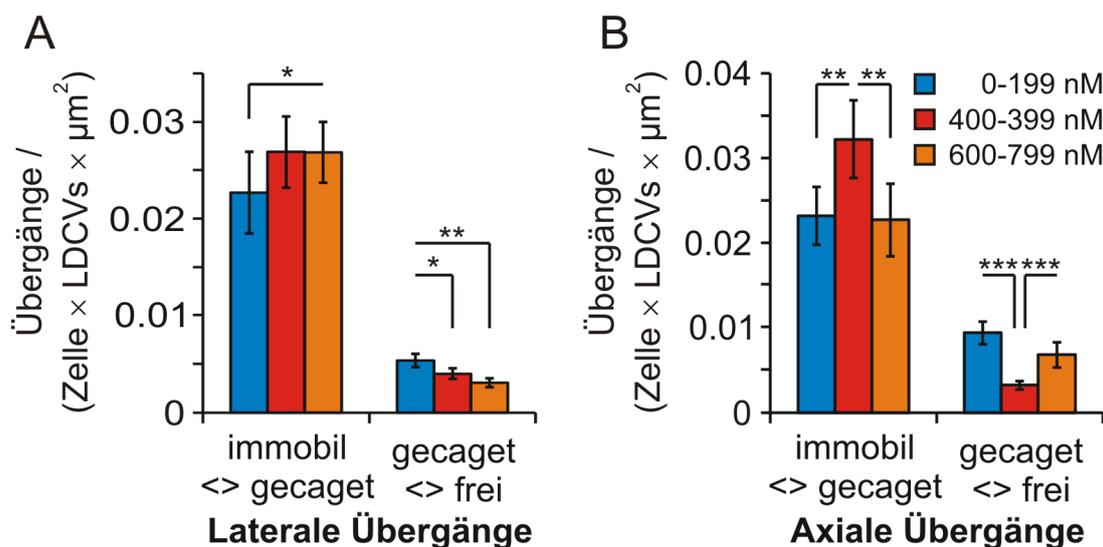


Abbildung 26. Anzahl der Übergänge zwischen den einzelnen Stadien – lateral und axial. Die lateralen (A) und axialen (B) Übergänge zwischen den einzelnen Stadien wurden basierend auf dem Verlauf aller CD ermittelt. (Wilcoxon-Rangsummentest: *, $p < 0,05$; ungepaarter Student's t-Test: **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$)

Das erste Ergebnis zeigt, dass es keine Übergänge zwischen nicht-benachbarten Stadien sowohl lateral, als auch axial gibt ($[Ca^{2+}]_i$: 0-199 nM: $< 0,5\%$; übrige Konzentrationen: $< 0,1\%$). Es liegt also eine Linearität in beiden Richtungen vor, solange man sich im Gleichgewicht befindet.

Die Häufigkeit der lateralen Übergänge zwischen immobilem und gecageten Zustand hat ihr Maximum bei 600-799 nM und ist signifikant größer im Vergleich zu der An-

zahl bei einer $[Ca^{2+}]_i$ von 0-199 nM ($p=0,037$). Es ergeben sich auch signifikant weniger Übergänge bei erhöhter $[Ca^{2+}]_i$ vom gecageten zum freien Stadium und umgekehrt ($p_{400-599nM}=0,041$; $p_{600-799nM}=0,008$) (Abbildung 26 A). Die axialen Übergänge verhalten sich ebenfalls Ca^{2+} -abhängig. Die Übergänge zwischen immobilem und gecagetem Zustand sind im Konzentrationsbereich von 400-599 nM im Vergleich zu Ruhekonzentrationen (0-199 nM; $p=0,003$) und auch zu Konzentrationen im Bereich 600-799 nM ($p=0,005$) signifikant erhöht, wobei die beiden letzteren sich vom Niveau entsprechen (Abbildung 26 B). Die Anzahl axialer Übergänge zwischen gecagetem und freien Zustand bei einer $[Ca^{2+}]_i$ zwischen 400-599 nM ist im Vergleich zu allen anderen Konzentrationen signifikant kleiner ($p<0,001$). Außerdem liegt auch hier die Zahl der Übergänge bei $[Ca^{2+}]_i$ von 600-799 nM auf dem Niveau von $[Ca^{2+}]_i$ zwischen 0-199 nM.

Es scheint, dass die lateralen Übergänge das Ergebnis der lateralen CD-Analyse widerspiegeln. Demgegenüber zeigen die axiale Mobilität und auch die Übergänge zwischen den einzelnen Stadien in axialer Richtung eine andere Ca^{2+} -Abhängigkeit mit einem maximalen Effekt bei einer niedrigeren $[Ca^{2+}]_i$. Es hat den Anschein, dass die axiale Mobilität eher den Zugang zum Docking (gedockt = axial immobil) gewährleisten könnte.

3.1.6 Verweildauer von LDCVs an der PM – effizienteres Docking

Die bisher beschriebenen lateralen Mobilitäten deuten auf einen Effekt von $[Ca^{2+}]_i$ auf Priming hin, wohingegen die axiale Mobilität eine zusätzliche Auswirkung auf Docking widerspiegeln könnte. Wie zuvor bereits erwähnt, ist einer der größten Vorteile der TIRFM die Möglichkeit, Präfusionsvorgänge in Echtzeit zu beobachten.

3.1.6.1 Vesikelanzahl an der PM pro Aufnahmeperiode und Bild

Als Indikator, ob die $[Ca^{2+}]_i$ einen Einfluss auf Docking ausübt, kann die Anzahl von Vesikeln pro Aufnahmeperiode (2 min) verwendet werden. Die Zahl der Vesikel, die an der PM im Zeitraum von 2 min sichtbar sind, ergibt die Summe aller Vesikel, d.h. deren Verweildauern über die gesamte Aufnahmezeit. Um Artefakte durch Größenvariationen der angehefteten Basisfläche der einzelnen Zellen zu umgehen, wurden die Daten auf diese Fläche normiert. Bei Ruhekonzentrationen von Ca^{2+} treten signifikant mehr kurzlebige Vesikel auf, die innerhalb des Aufnahmezeitraums an die PM transportiert werden als bei höheren $[Ca^{2+}]_i$ (Abbildung 27 A).

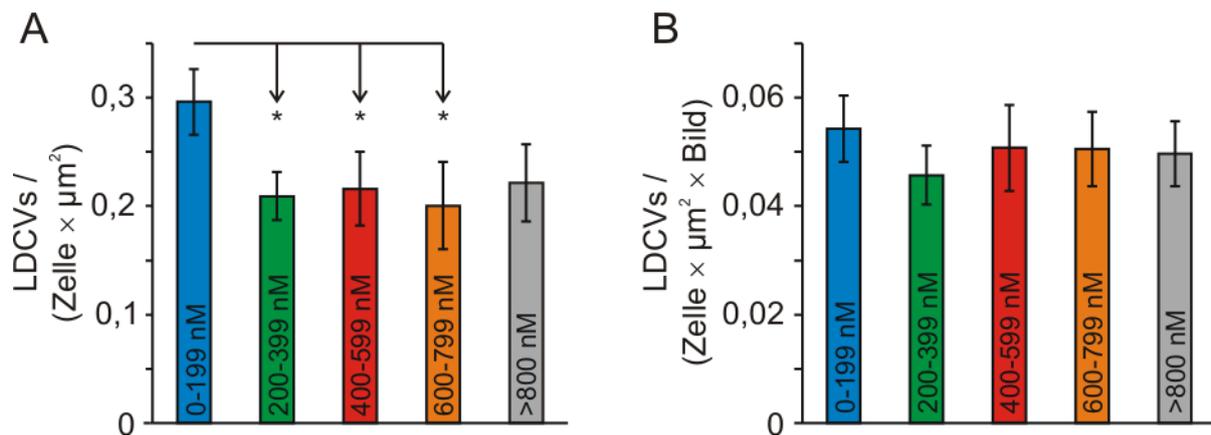


Abbildung 27. Anzahl der LDCVs an der PM pro Aufnahmeperiode (A) und pro Bild (B). Die Anzahl der Vesikel pro Aufnahmeperiode (A, 2 min) und pro Bild (B). ($N_{0-199 \text{ nM}}$: 23, $n_{0-199 \text{ nM}}$: 902; $N_{200-399 \text{ nM}}$: 19, $n_{200-399 \text{ nM}}$: 541; $N_{400-599 \text{ nM}}$: 20, $n_{400-599 \text{ nM}}$: 571; $N_{600-799 \text{ nM}}$: 10, $n_{600-799 \text{ nM}}$: 275; $N_{>800 \text{ nM}}$: 12, $n_{>800 \text{ nM}}$: 270; Mittelwert \pm SEM; *, $p < 0,05$ Wilcoxon-Rangsummentest).

Keine signifikanten Änderungen ergeben sich dagegen bei der Zahl der LDCVs pro Bild; ebenfalls normiert auf die Fläche (Abbildung 27 B). Die Zellen mit jeweils gleicher $[Ca^{2+}]_i$ wurden nicht immer zum gleichen Zeitpunkt nach Transfektion gemessen, sondern innerhalb des Zeitfensters von 12-16 h nach Transfektion. Beide Punkte zusammengenommen bedeuten, dass Artefakte durch unterschiedliche, für eine Konzentration bevorzugte, Zeitfenster nach Virusinfektion (länger = mehr markierte LDCVs pro Bild) ausgeschlossen werden können. Zusätzlich erlaubt dieses Ergebnis die Annahme, dass die Anzahl der Docking-Stellen an der PM über alle Ca^{2+} -Konzentrationen konstant bleibt.

3.1.7 Verweildauer von LDCVs an der PM

Toonen *et al.* (2006) nutzten zur Beschreibung eines Docking-Effektes von Munc18-1 ebenfalls die Verweildauer von LDCVs an der PM als Indikator: Dadurch wurde eine Aktin-medierte Reduktion des Dockings beschrieben werden konnte. Hier wird die Verweildauer ebenfalls als Docking-Indikator verwendet. Für jede Zelle wurde die Verweildauer jedes einzelnen Vesikels bestimmt, auf die Gesamtzahl der Vesikel und die Basisfläche normiert, und anschließend gemittelt. Die Daten wurden daraufhin in einem Histogramm in logarithmisch eingeteilte Klassen gruppiert und gegen die Zeit dargestellt. Die Resultate jeder einzelnen Zelle wurden gemittelt und sind in Abbildung 28 A abgebildet. In den Klassen 4-6 und 8 ist eine signifikante Abnahme von kurzen Verweildauern (einfaktorielle ANOVA auf Rängen, $* < 0,05$) mit erhöhter

$[Ca^{2+}]_i$ zu beobachten. Hingegen veränderten sich die extrem kurzen, sowie Verweildauern länger als 5 s, nicht.

Eine breitere Klasseneinteilung in Verweildauern von $\leq 0,5$ s, $>0,5-5$ s und >5 s zeigt eine konzentrationsabhängige Abnahme von Vesikeln, die zwischen 0,5 und 5 s an der PM verweilen. Dabei wird eine maximale Abnahme für die $[Ca^{2+}]_i$ zwischen 400-599 nM im Vergleich zu den beiden extremen $[Ca^{2+}]_i$ bei 0-199 und >800 nM (Daten nicht präsentiert) beobachtet.

Die Analyse der Verweildauer von LDCVs an der PM spiegelt das Ergebnis der axialen Mobilität wieder. Beides sind Indikatoren für einen Docking-Phänotyp, d.h. eine freie $[Ca^{2+}]_i$ zwischen 400-599 nM führt zu einem effizienteren, bzw. optimalen Docking.

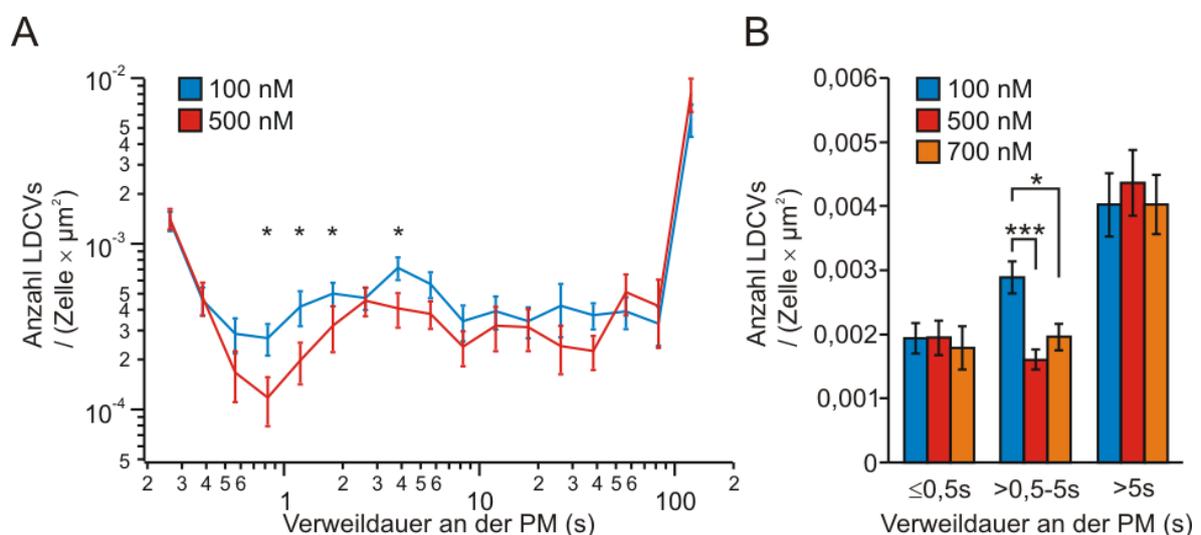


Abbildung 28. Verweildauer von LDCVs an der Plasmamembran. (A) Gemittelte Häufigkeitsverteilung der logarithmisch eingeteilten Verweildauer doppellogarithmisch dargestellt, normalisiert auf die Anzahl der Zellen, LDCVs und die in TIRFM sichtbare Basisfläche. (B) Wie (A), aber mit Klassen von $\leq 0,5$ s, $>0,5-5$ s und >5 s. Man beachte die signifikante konzentrationsabhängige Verringerung des Auftretens von Vesikeln, die zwischen 0,5 und 5 s an der PM verweilen. Die anderen Konzentrationen zeigten keine signifikanten Veränderungen. ($N_{0-200}=23$, $N_{200-400}=19$, $N_{400-600}=20$, $N_{600-800}=10$, $N_{>800}=12$; einfaktorielles ANOVA: *, $p < 0,05$; ungepaarter Student's t-Test: *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$).

3.2 Prästimulus- $[Ca^{2+}]_i$ und deren Einfluss auf Pools und Mobilität

Ca^{2+} hat zusätzlich zum Einfluss auf Priming (Kapitel 3.1.1 und 3.1.2.1) und dem hier beschriebenen Effekt auf Docking (Kapitel 3.1.2.2 und 3.1.6) die Auslöse-Funktion für Fusion über den Ca^{2+} -Sensor Synaptotagmin. TIRFM erlaubt neben dem Studium von Präfusionsschritten auch die Beobachtung vom eigentlichen Fusionsereignis. Ein solches Fusionsereignis ist durch das schnelle Verschwinden der Fluoreszenz innerhalb eines Bildes (<100 ms) charakterisiert und wird zuweilen von einer Wolke des sezernierten Fluorophors begleitet. Um das Verhalten von LDCVs vor Fusion exakter, physiologischer und kontrollierter zu charakterisieren, als dies bisher der Fall war (Allersma MW *et al.* 2006; Lang T 2008), wurden im Folgenden in UV-Blitzlicht-Photolyse- und Depolarisationsexperimenten Exozytose ausgelöst und die LDCV-Mobilität vor Freisetzung aufgenommen.

Es wurden zwei unterschiedliche Stimuli zum Auslösen der Fusion verwendet: UV-Blitzphotolyse von NP-EGTA, die die $[Ca^{2+}]_i$ innerhalb von wenigen Millisekunden auf mikromolare Konzentrationen anhebt, und Depolarisationsfolgen, bei denen spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle öffnen und Ca^{2+} -Einstrom zu einem Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ führt.

3.2.1 Prästimulus- $[Ca^{2+}]_i$ entscheidet über die Poolgrößen

3.2.1.1 UV-Blitzlicht-Photolyse

Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von prästimulus- $[Ca^{2+}]_i$ vor UV-Blitzlicht-Photolyse perfundiert: 230 nM und 700 nM. Beide Konzentrationen waren so gewählt, dass es nicht zum Auslösen von Fusion kam. Wie aber zuvor von Voets (2000) beschrieben, sollten beide Konzentrationen zu einer unterschiedlichen Befüllung der gepumpten Pools (RRP, SRP) führen. Dadurch sollte im Folgenden eine Korrelation mit der Mobilität ermöglicht werden.

Nachdem die Zellen 2 min mit der verwendeten intrazellulären Lösung perfundiert worden waren, wurde die Vesikelmobilität für weitere 2 min beobachtet. 20 s vor dem Ende der Aufnahme wurde der Stimulus ausgelöst (Abbildung 10 C). Die mittleren Kapazitätsantworten nach UV-Blitzlicht-Photolyse sind in Abbildung 29 A dargestellt. Über die Beschreibung des Kapazitätsverlaufs mittels zweier exponentieller und einer linearen Komponente lassen sich Rückschlüsse auf die Befüllungszustände der

freisetzbaren Pools und deren Ca^{2+} -Abhängigkeit ziehen (Rettig J und Neher E 2002), die auch die bereits publizierten Ergebnisse von Voets (2000) bestätigen (Abbildung 29 B-D). Sowohl RRP, als auch SRP zeigen eine 4-fache, signifikante Erhöhung bei erhöhter prästimulus- $[\text{Ca}^{2+}]_i$, wohingegen die lineare Komponente, die den Primingprozess widerspiegelt, signifikant abnimmt.

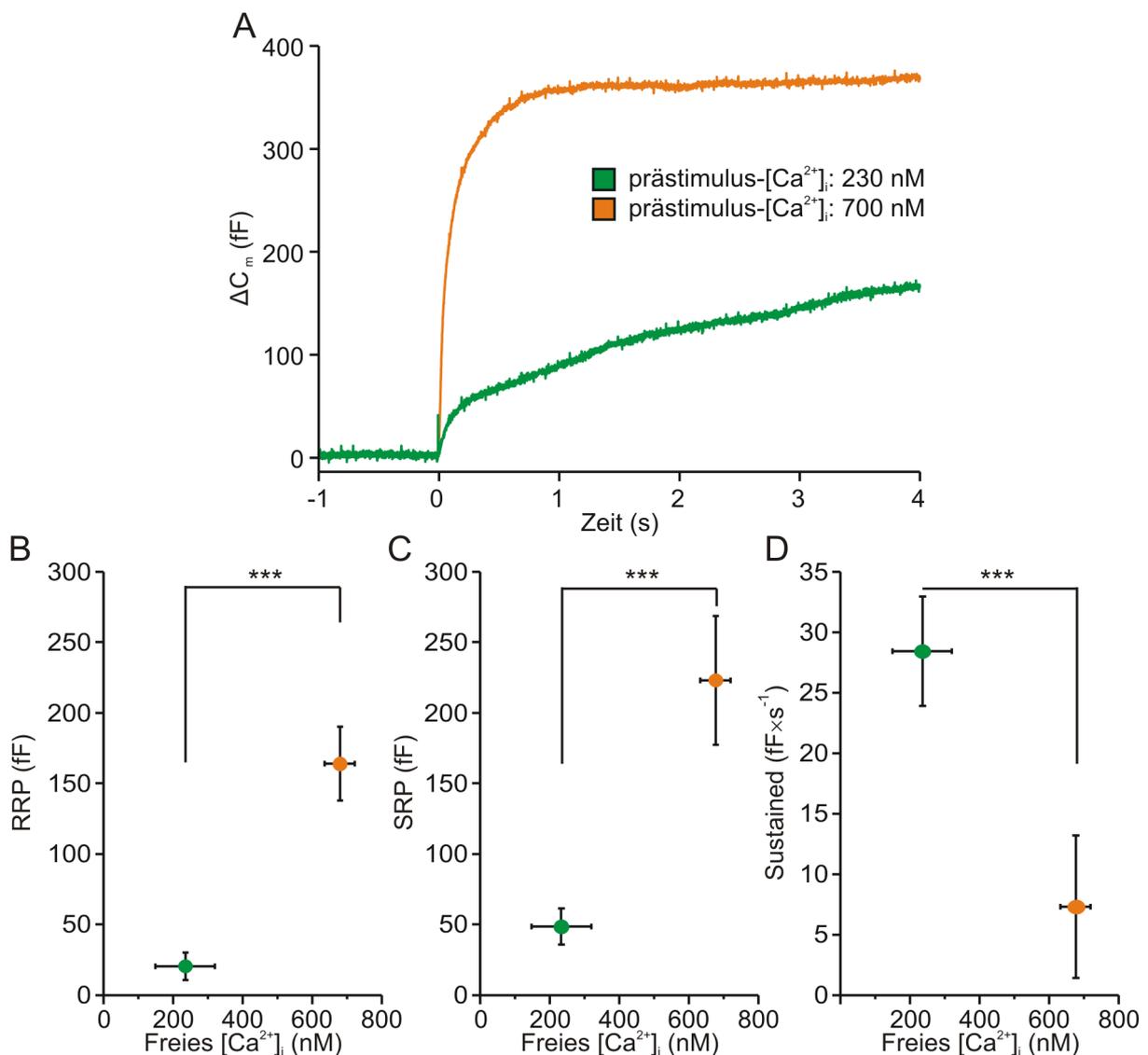


Abbildung 29. Kapazitätsantworten nach UV-Blitzlicht-Photolyse von NP-EGTA mit unterschiedlichen prästimulus- $[\text{Ca}^{2+}]_i$. (A) Mittlere Kapazitätsantwort nach UV-Blitzlicht-Photolyse von 230 nM (grün) und 700 nM (orange) prästimulus- $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Unter Verwendung eines Fits mit zwei exponentiellen und einer linearen Komponente wurden die Größen des RRP (B), SRP (C) und der „sustained“ Komponente bestimmt. ($N_{230 \text{ nM UV}} = 17$, $n_{230 \text{ nM UV}} = 27$; $N_{700 \text{ nM UV}} = 19$, $n_{700 \text{ nM UV}} = 32$; Mittelwerte \pm SEM der Pool-Abschätzungen, sowie Mittelwerte \pm SD der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, um die Streuung der einzelnen Klassen zu verdeutlichen; ***, $p < 0,001$ Wilcoxon-Rangsummentest).

3.2.1.2 Depolarisationen

Vergleichbar zum Vorgehen in Kapitel 3.2.1.1 wurden auch Depolarisationen der Chromaffinzellen durchgeführt. Durch eine Abfolge von 10 Depolarisationen vom Ruhemembranpotential (-70 mV) auf 0 mV mit einer Dauer von je 100 ms bei einer Frequenz von 5 Hz wurden die Zellen stimuliert. Dadurch öffneten sich spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle und das einströmende Ca^{2+} löste Sekretion aus. Die prästimulus- $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde für diese Versuche auf 600 nM eingestellt, um, wie schon bei der Lösung mit hohem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vor UV-Blitzlicht-Photolyse, ein optimales Priming der LDCVs zu erzielen, ohne dabei schon vor der Stimulation Sekretion auszulösen (Abbildung 30 A).

Im Gegensatz zu den Kapazitätsantworten auf plötzliche Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch UV-Blitzlicht-Photolyse ist über die Depolarisation ein nicht ganz so eindeutiger Zugang zu den einzelnen Vesikelpools gegeben. Basierend auf den ersten beiden Kapazitätserhöhungen kann, ähnlich der Berechnung des IRP (siehe Kapitel 2.2.8.9), eine maximale Größe des RRP abgeschätzt werden. Dieser beläuft sich auf 418 ± 193 fF (N=18, $n_{\text{stim}}=23$), ist damit um Faktor 2 höher (allerdings nicht signifikant), als der berechnete RRP nach UV-Blitzlicht-Photolyse mit 700 nM prästimulus- $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Abbildung 30 B).

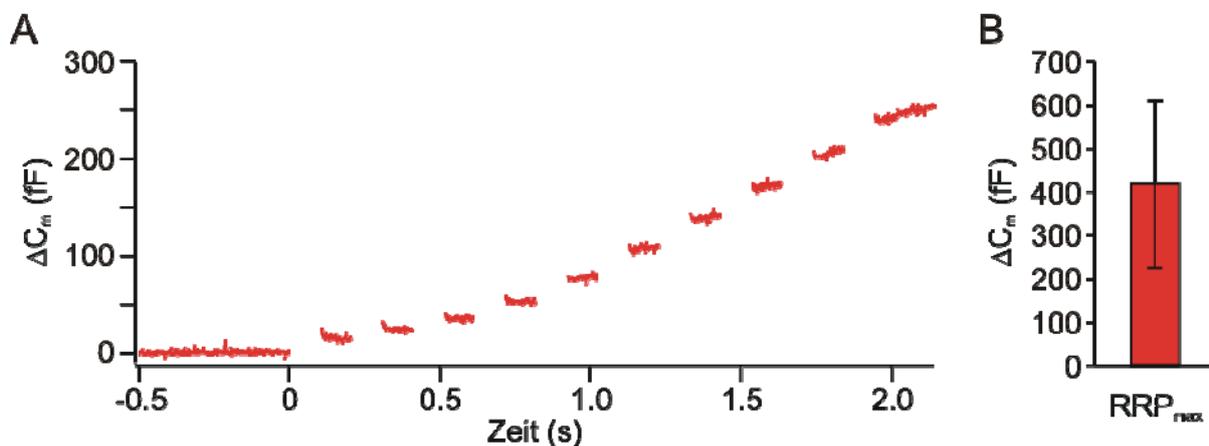


Abbildung 30. Kapazitätsantworten nach Stimulation durch eine Depolarisationsfolge bei einem prästimulus- $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von 600 nM. (A) Mittlere Kapazitätsantwort nach Stimulation durch Depolarisationsfolgen (10 Depolarisationen von -70 mV auf 0 mV, Dauer: 100 ms, Frequenz: 5 Hz) von 600 nM prästimulus $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Die maximale Größe des RRP (B) wurde durch das Verhältnis der ersten beiden Kapazitätsantworten ermittelt (N = 18, $n_{\text{stimuli}} = 23$; Mittelwerte \pm SEM). Für Details siehe Ermittlung des IRP, respektive RRP, Kapitel 2.2.8.9.

3.2.2 Mobilitätsanalyse sezernierter LDCVs

Die in den beiden vorigen Kapiteln (3.2.1.1 und 3.2.1.2) präsentierten Kapazitätsantworten wurden in Zellen generiert, die zuvor mit einem NPY-mCherry exprimierenden Plasmid elektroporiert worden waren. Um einen eindeutigen Beleg für Priming von LDCVs in TIRFM zu bekommen, war es notwendig, das Verhalten von sezernierten Vesikeln vor deren Fusion zu studieren. Nach 3-5 Tagen in Kultur wurden diese Zellen gemessen, das bedeutete mit unterschiedlichen Lösungen intrazellulär über die Patchpipette perfundiert (NP-EGTA: prästimulus- $[Ca^{2+}]_i$ 230 nM und 700 nM; Depolarisationslösung: prästimulus- $[Ca^{2+}]_i$ 600 nM), und auf zwei unterschiedliche Arten Exozytose ausgelöst (UV-Blitzlicht-Photolyse; Depolarisation). Nach einer anfänglichen 2-minütigen Perfusion ohne Anregung der Fluorophore (allerdings ratiometrischer Ca^{2+} -Messung alle 2,5 s), wurde die Bewegung der Fluoreszenz-markierten LDCVs für 2 min aufgezeichnet. Der jeweilige Stimulus erfolgte 20 s vor Ende der Aufnahme. Im Anschluss wurden die Bewegungsmuster derjenigen Vesikel analysiert, die aufgrund des Stimulus sezerniert wurden ($N_{230\text{ nM UV}}=17$, $n_{230\text{ nM UV}}=31$; $N_{700\text{ nM UV}}=19$, $n_{700\text{ nM UV}}=64$; $N_{600\text{ nM Dep}}=18$, $n_{600\text{ nM Dep}}=23$).

Die gemittelte CD-Verteilung aller sezernierten Vesikel, aufgeschlüsselt nach Stimulationsart, ist in Abbildung 31 A dargestellt. Zum Vergleich wurden auch die CD-Verteilungen der konstanten $[Ca^{2+}]_i$ von 0-199 nM und 600-799 nM abgebildet. Deutlich zu erkennen ist die starke Erhöhung der Amplitude der ersten Gausskomponente. Parallel dazu ist eine Abnahme der zweiten und dritten Gausskomponenten zu beobachten. Im kumulativen Histogramm zeichnen sich alle drei gemittelten CD-Verteilungen sezernierter LDCVs durch eine deutliche Linksverschiebung im Vergleich zu den Verteilungen bei konstanter $[Ca^{2+}]_i$ ab.

Anzumerken ist noch eine Besonderheit: der Anteil der Immobilität bei der prästimulus- $[Ca^{2+}]_i$ von 230 nM im Vergleich zu den beiden höheren $[Ca^{2+}]_i$ unerwarteter Weise am größten ist.

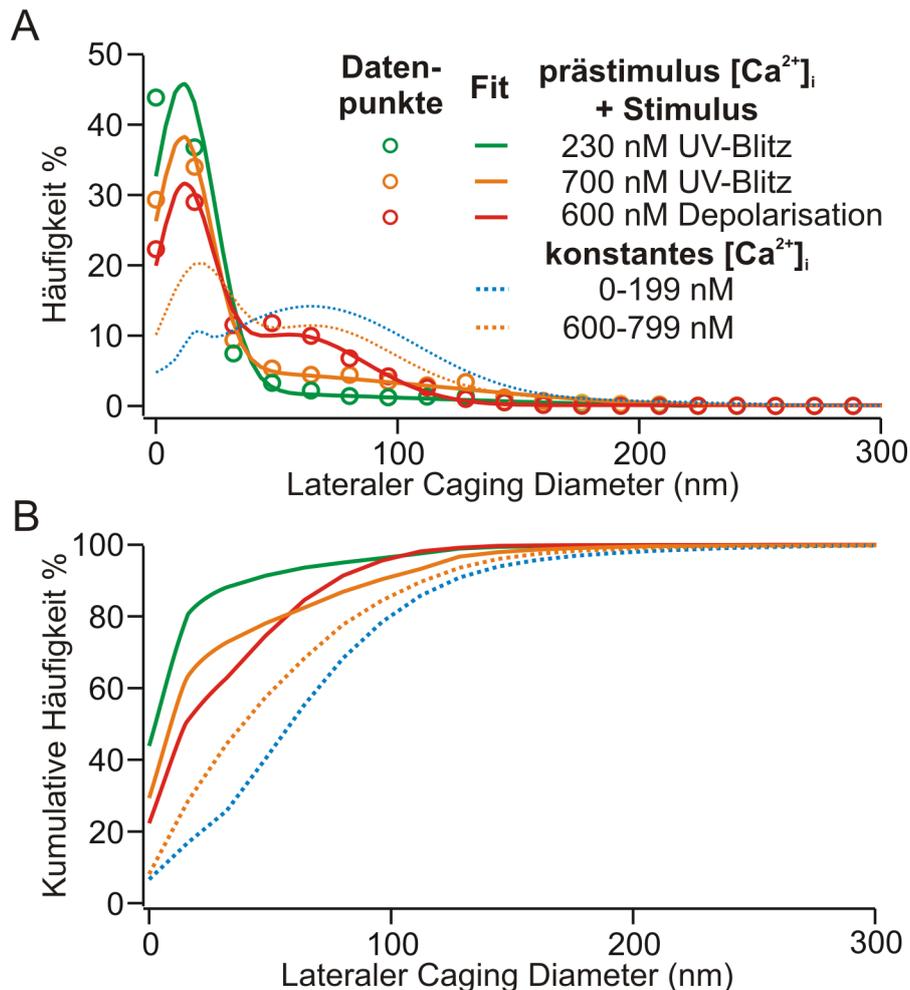


Abbildung 31. CD-Verteilung von sezernierten Vesikeln. (A) Laterale CD-Häufigkeitsverteilung von LDCVs, die nach unterschiedlichen Stimulationsbedingungen mit der PM fusionierten. Kreise repräsentieren die ermittelten Datenpunkte für 230 nM prästimulus- $[Ca^{2+}]_i$ (○), 700 nM prästimulus- $[Ca^{2+}]_i$ (○) und 600 nM prästimulus- $[Ca^{2+}]_i$ (○). Durchgezogene Linien stellen die Kurven dar, die die Verteilung durch 3 Gausskomponenten am besten beschreiben. Zusätzlich sind die beiden Fits der Messungen mit konstanter $[Ca^{2+}]_i$ von 0-199 nM (blau) und 600-799 nM (orange) als gepunktete Linien abgebildet. (B) Kumulative Häufigkeitsverteilung der Datenpunkte aus (A) und der der beiden konstanten $[Ca^{2+}]_i$ von 0-199 nM (blau) und 600-799 nM (orange) als gepunktete Linien. Man beachte die starke Linksverschiebung der CD-Verteilung sezernierter Vesikel für alle Stimulationsbedingungen. ($N_{230 \text{ nM UV}}=17$, $n_{230 \text{ nM UV}}=31$; $N_{700 \text{ nM UV}}=19$, $n_{700 \text{ nM UV}}=61$; $N_{600 \text{ nM Dep}}=19$, $n_{600 \text{ nM Dep}}=53$).

3.2.2.1 Bewegung vor Fusion – Caging Diameter vs. Distanz

Zur Charakterisierung der Beweglichkeit während dynamischer Prozesse, wie dem Priming/Unpriming und Docking/Undocking von LDCVs an die, bzw. von der PM, ist die CD-Analyse das perfekte Werkzeug. Die Verwendung eines gleitenden Zeitfensters macht es aber die Erfassung abrupter Ereignisse, wie z.B. die Fusion von Vesik-

keln mit der PM, schwierig. Der letzte CD einer jeden Trajektorie kann unter Umständen einen zu hohen Wert haben, falls innerhalb der letzte Sekunde ein mehr oder minder großer Schritt auftrat. Dadurch wäre es möglich, dass ein Vesikel zum Zeitpunkt der Fusion fälschlicherweise für mobiler gehalten wurde, als er tatsächlich ist. Abbildung 32 verdeutlicht das Problem. Jeweils die letzten 40 s von drei LDCVs vor Fusion wurden als Trajektorien (Abbildung 32 A-C), CDs (Abbildung 32 D-F) und die entsprechenden Distanzen von Punkt-zu-Punkt dargestellt.

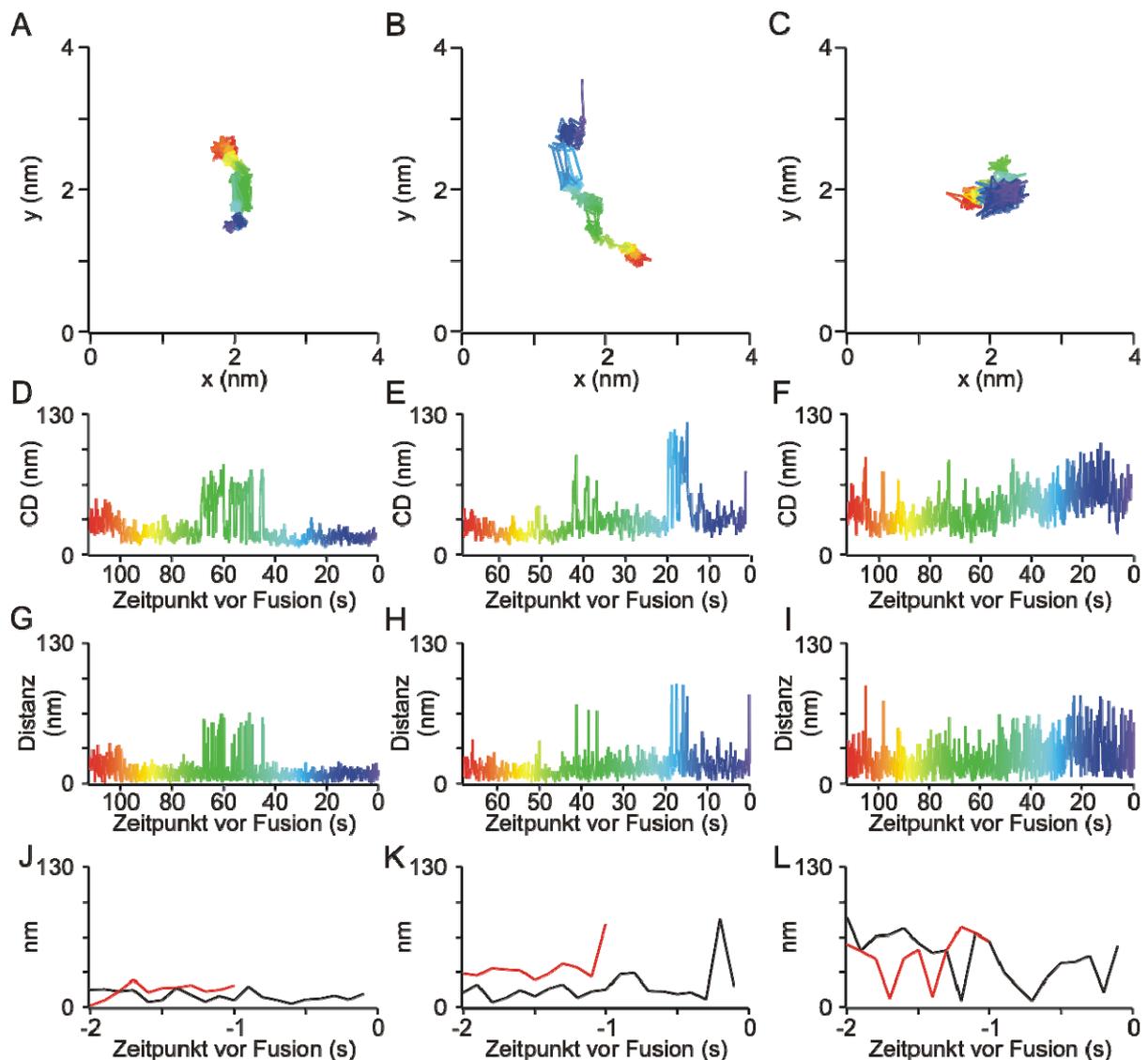


Abbildung 32. Vergleich von Vesikelbewegungen vor Fusion – CD vs. Distanz. (A-C) xy-Trajektorien von drei LDCVs 40 s vor Fusion mit der PM nach Stimulation durch UV-Blitz-Photolyse (prästimulus- $[Ca^{2+}]_i$: 700 nM). Der Farbverlauf gibt den zeitlichen Verlauf wieder. (D-F) Die entsprechenden CD-Werte im zeitlichen Verlauf. (G-I) Schrittweiten zwischen den einzelnen Positionen der zugehörigen LDCVs. (J-L) Die jeweils letzten CD (rot) jedes oben gezeigten LDCVs und die entsprechenden Distanzen (schwarz) innerhalb der letzten 2 s vor Fusion.

3.2.3 Sekretion nach UV-Blitzlicht-Photolyse (prästimulus-[Ca²⁺]_i: 700 nM)

Die durch Blitzphotolyse von NP-EGTA freigesetzten LDCVs (prästimulus-[Ca²⁺]_i: 710 ± 56 nM; poststimulus-[Ca²⁺]_i: 16,3 ± 1,5 μM) wurden hinsichtlich ihrer Bewegung vor Fusion untersucht. In Abbildung 34 A sind die lateralen Trajektorien aller sezernierten LDCVs dargestellt, die unmittelbar vor Fusion immobil waren (N=18, n_{Stimuli}=27, n_{immobil}=53) und Abbildung 34 B diejenigen, die sich im gecageten Zustand befanden (N=17, n_{Stimuli}=27, n_{gecaget}=8).

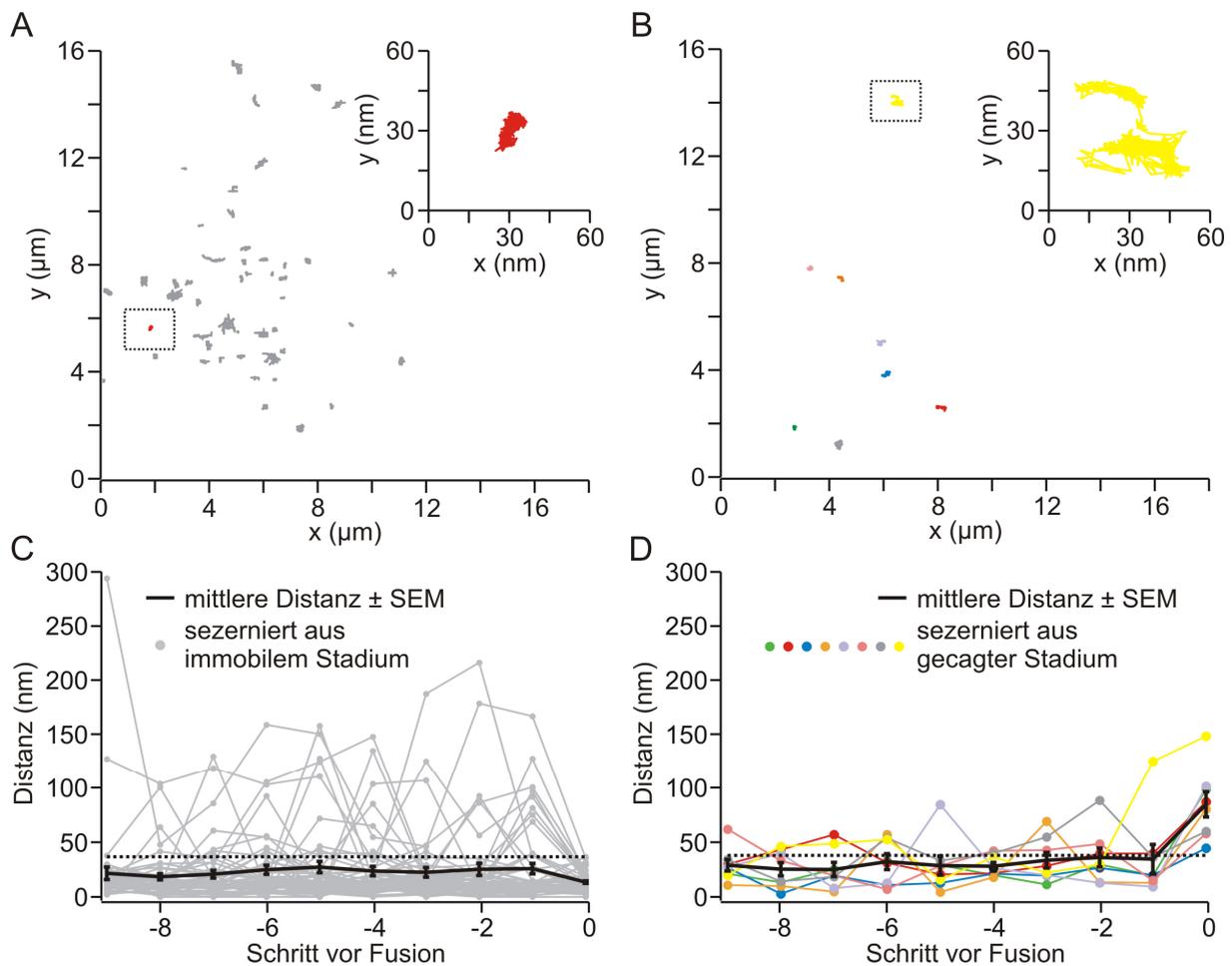


Abbildung 34. Der letzte Schritt vor Fusion nach Stimulation durch UV-Blitzlicht-Photolyse von [Ca²⁺]_i: ~700 nM. (A) xy-Trajektorien von LDCVs, die aus dem immobilen Stadium sezerniert wurden. Kleines Bild: Vergrößerung einer exemplarischen xy-Trajektorie. (B) xy-Trajektorien von LDCVs, die aus dem gecageten Stadium sezerniert wurden. Kleines Bild: Vergrößerung einer exemplarischen xy-Trajektorie. (C) Die letzten 10 Distanzen der aus dem immobilen Zustand sezernierten LDCVs vor Fusion (n=53). Gemittelte Werte ± SEM sind als schwarze Punkte gezeigt. (D) Die letzten 10 Distanzen der aus dem immobilen Zustand sezernierten LDCVs vor Fusion (n=8). Die Farben entsprechen denen in (B). Gemittelte Werte ± SEM sind als schwarze Punkte gezeigt. Die gepunktete schwarze Linie zeigt die Grenze (45 nm) zwischen immobil und gecaget. (Mittelwert ± SEM; ***, p<0,001 ungepaarter Student's t-Test).

Die letzten zehn Schrittweiten aller sezernierten Vesikel bei einer prästimulus- $[Ca^{2+}]_i$ von 700 nM zeigen, dass viele ($n=21$) der aus dem immobilen Zustand sezernierten Vesikel dem gecageten Zustand zugeordnet worden wären, wenn man hierzu den CD-Wert verwendet hätte (Abbildung 34 C, D).

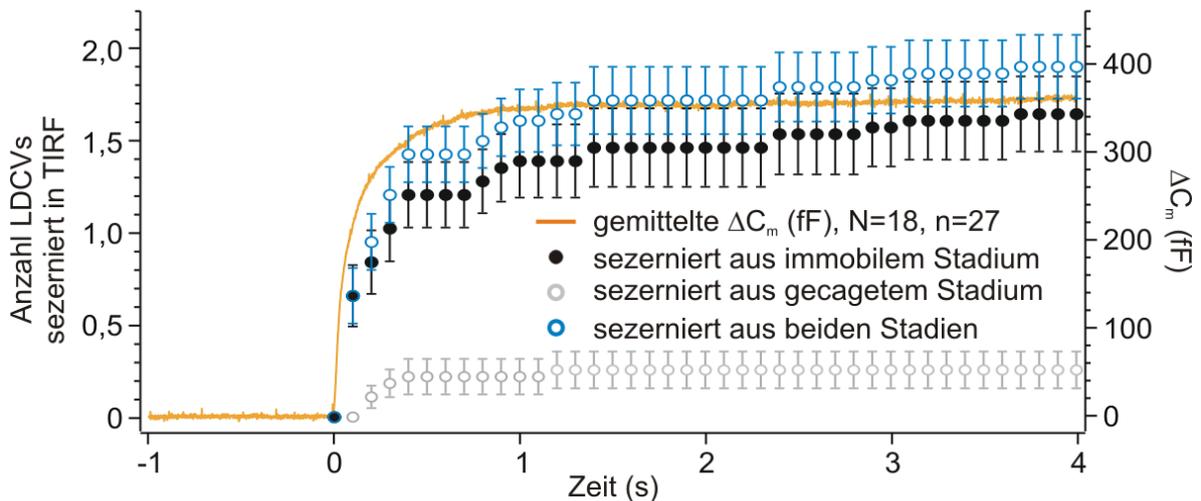


Abbildung 35. Korrelation von Sekretion in TIRF, Membrankapazitätserhöhung und Mobilität der LDCVs vor Fusion nach Stimulation durch UV-Blitzlicht-Photolyse von $[Ca^{2+}]_i$: ~700 nM. Gemittelte Kapazitätsantwort (rechts) und Anzahl in TIRF sezernierter LDCVs (links) wurden gegen die Zeit aufgetragen. Die in TIRF sezernierten LDCVs wurden je nach zurückgelegter Distanz des letzten Schrittes in immobile (●) und gecagete (○) aufgetrennt. Die Skalierung der Kapazitätsantwort wurde dem zeitlichen Verlauf der summierten Ergebnisse (○) von gecagetem und immobilem Stadium vor Fusion angepasst. ($N=18$; $n_{stimuli}=27$; $n_{immobile\ LDCVs}=53$, $n_{gecagete\ LDCVs}=8$; Mittelwerte \pm SEM).

Die auf den Schrittweiten basierende Einteilung in immobile und gecagete Vesikel wurde dazu genutzt, die Kapazitätsantworten in Folge der Stimuli mit dem Zeitpunkt der Stimulation zu korrelieren. Es zeigt sich für die prästimulus- $[Ca^{2+}]_i$ von 700 nM, dass im Schnitt $0,65 \pm 0,15$ Vesikel während der ersten 100 ms nach dem UV-Blitz aus dem immobilen Zustand und keiner aus dem gecageten Zustand sezerniert wurde. Im zeitlichen Verlauf korreliert die Anzahl der Vesikel, die aus dem immobilen Zustand freigesetzt wurden hochgradig mit dem Verlauf der Kapazitätsantwort (Abbildung 35). Wichtet man die Anzahl nach dem Zeitpunkt der Sekretion, so zeigt sich ein deutliches Maximum innerhalb der ersten 100 ms für die aus dem immobilen Zustand sezernierten. Im Gegensatz dazu weisen die aus dem gecageten Zustand freigesetzten Vesikel ein Maximum erst bei 0,5 s auf. Die Beschreibung des zeitlichen Verlaufs der Freisetzung aller in TIRFM sezernierten LDCVs mit einer exponen-

tiellen und einer linearen Komponente ergibt ein vergleichbares Ergebnis zu dem, welches sich für die Beschreibung der Kapazitätsantwort ergibt. Leichte Abweichungen sind in der sehr schnellen Burst-Phase zu Beginn zu erkennen.

3.2.4 Sekretion nach UV-Blitzlicht-Photolyse (prästimulus- $[Ca^{2+}]_i$: 230 nM)

Die gleiche Art von Experimenten wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, wurde mit einer wesentlich geringeren prästimulus- $[Ca^{2+}]_i$ (prästimulus- $[Ca^{2+}]_i$: 230 ± 34 nM; poststimulus- $[Ca^{2+}]_i$: $12,6 \pm 1,7$ μ M) durchgeführt.

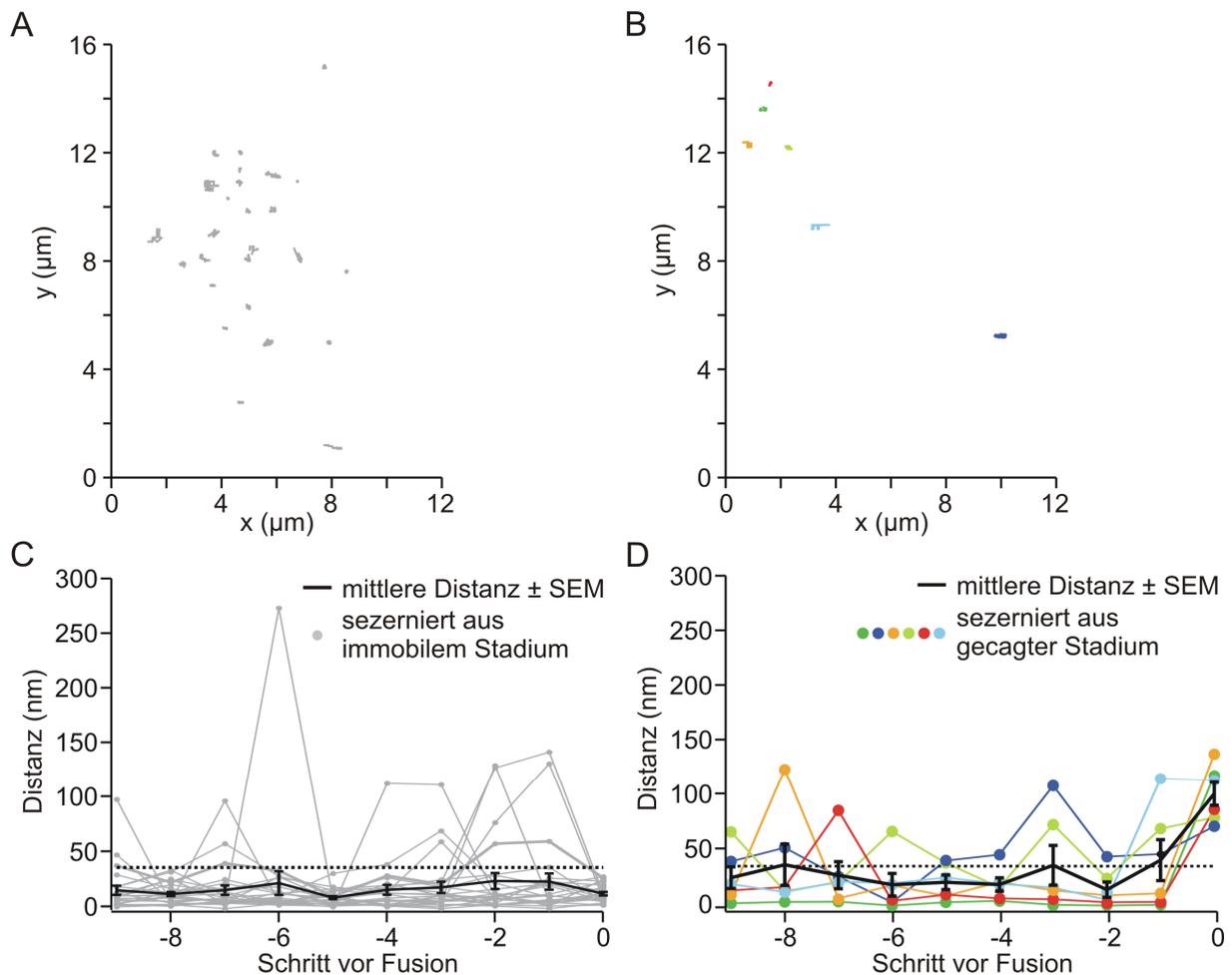


Abbildung 36. Der letzte Schritt vor Fusion nach Stimulation durch UV-Blitzphotolyse von $[Ca^{2+}]_i$: ~230 nM. (A) xy-Trajektorien von LDCVs, die aus dem immobilen Stadium sezerniert wurden. (B) xy-Trajektorien von LDCVs, die aus dem gecagetem Stadium sezerniert wurden. (C) Die letzten 10 Distanzen der aus dem immobilen Zustand sezernierten LDCVs vor Fusion ($n=25$). Gemittelte Werte \pm SEM sind als schwarze Punkte gezeigt. (D) Die letzten 10 Distanzen der aus dem immobilen Zustand sezernierten LDCVs vor Fusion ($n=6$). Die Farben entsprechen denen in (B). Gemittelte Werte \pm SEM sind als schwarze Punkte gezeigt. Die gepunktete schwarze Linie zeigt die Grenze (45 nm) zwischen immobil und gecaget. (Mittelwert \pm SEM; ***, $p < 0,001$ ungepaarter Student's t-Test).

Bei einer ähnlichen Anzahl von Zellen und Stimulationen ($N=17$, $n=20$) wurden hier nur halb so viele Vesikel (31) freigesetzt wie bei der prästimulus- $[Ca^{2+}]_i$ von 700 nM. Davon entstammten 25 Vesikel dem immobilen und nur 6 dem gecageten Zustand (Abbildung 36). Auch die gemittelte Anzahl der Vesikel, die während der ersten 100 ms aus dem immobilen Zustand sezerniert wurden, ist fast 4mal kleiner, als bei einem prästimulus $[Ca^{2+}]_i$ von 700 nM ($0,18 \pm 0,7$ Vesikel). Die ersten aus dem gecageten Zustand freigesetzten LDCVs waren dagegen erst nach mehr als 1,4 s zu beobachten. Beide Einzelverläufe zusammen werden zeitlich wiederum am besten mit einer exponentiellen und einer linearen Komponente beschrieben, wodurch sich ein mit der Kapazitätsantwort fast deckungsgleiches Ergebnis abzeichnet (Abbildung 37).

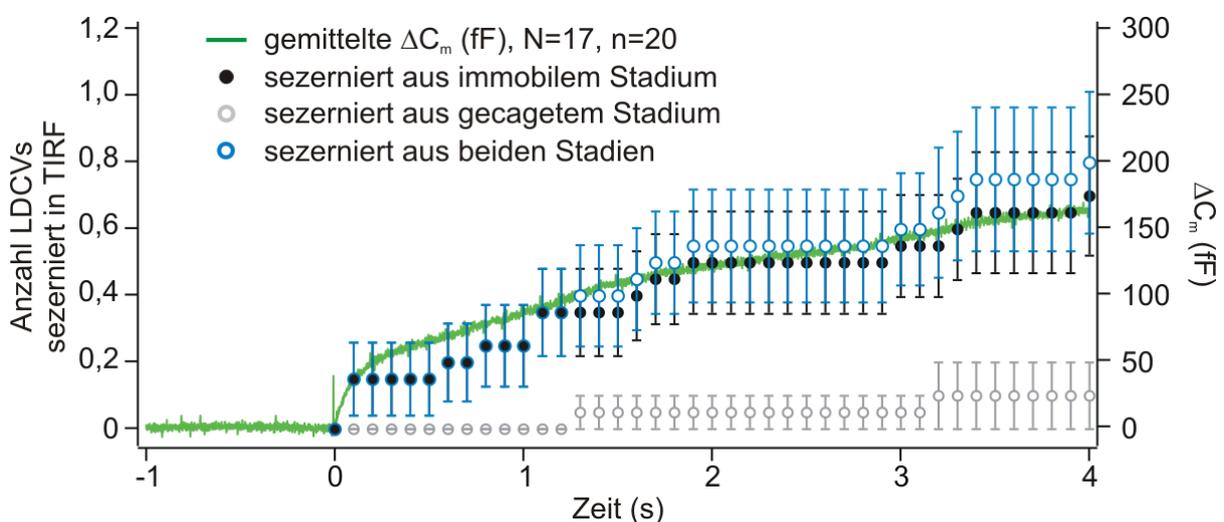


Abbildung 37. Korrelation von Sekretion in TIRF, Membrankapazitätserhöhung und Mobilität der LDCVs vor Fusion nach Stimulation durch UV-Blitzlicht-Photolyse von $[Ca^{2+}]_i$: ~ 230 nM. Die gemittelte Kapazitätsantwort (rechts) und die Anzahl in TIRF sezernierter LDCVs (links) wurden gegen die Zeit aufgetragen. Die in TIRF sezernierten LDCVs wurden je nach zurückgelegter Distanz des letzten Schrittes in immobile (\bullet) und gecagete (\circ) aufgeteilt. Die Skalierung der Kapazitätsantwort wurde dem zeitlichen Verlauf der summierten Ergebnisse (\circ) von gecagetem und immobilem Stadium vor Fusion angepasst. ($N=17$; $n_{\text{stimuli}}=20$; $n_{\text{immobile LDCVs}}=25$, $n_{\text{gecagete LDCVs}}=6$; Mittelwerte \pm SEM).

3.2.5 Sekretion nach Depolarisation (prästimulus- $[Ca^{2+}]_i$: 600 nM)

Zusätzlich zu den UV-Blitzlicht-Photolyse-Experimenten wurden Depolarisationsexperimente durchgeführt, die zwar keinen eindeutigen Zugang zu Poolgrößen erlaubten, aber einen physiologischeren Weg der Stimulation darstellen. Insgesamt wurden 19 Zellen analysiert, die mit einer Intrazellulärlösung perfundiert worden waren, wel-

che auf eine freie $[Ca^{2+}]_i$ von 600 nM eingestellt war (prästimulus- $[Ca^{2+}]_i$: 590 ± 68 nM; globales poststimulus- $[Ca^{2+}]_i$: $7,3 \pm 2,5$ μ M). Insgesamt wurden während der 27 Stimulationen 53 sezernierte LDCVs mittels TIRFM detektiert.

Von diesen insgesamt 53 Vesikeln wurden 42 aus dem immobilen und 11 aus dem gecageten Zustand sezerniert. Die Klassifizierung erfolgte wieder über die letzte Schrittgröße vor Fusion (Abbildung 38).

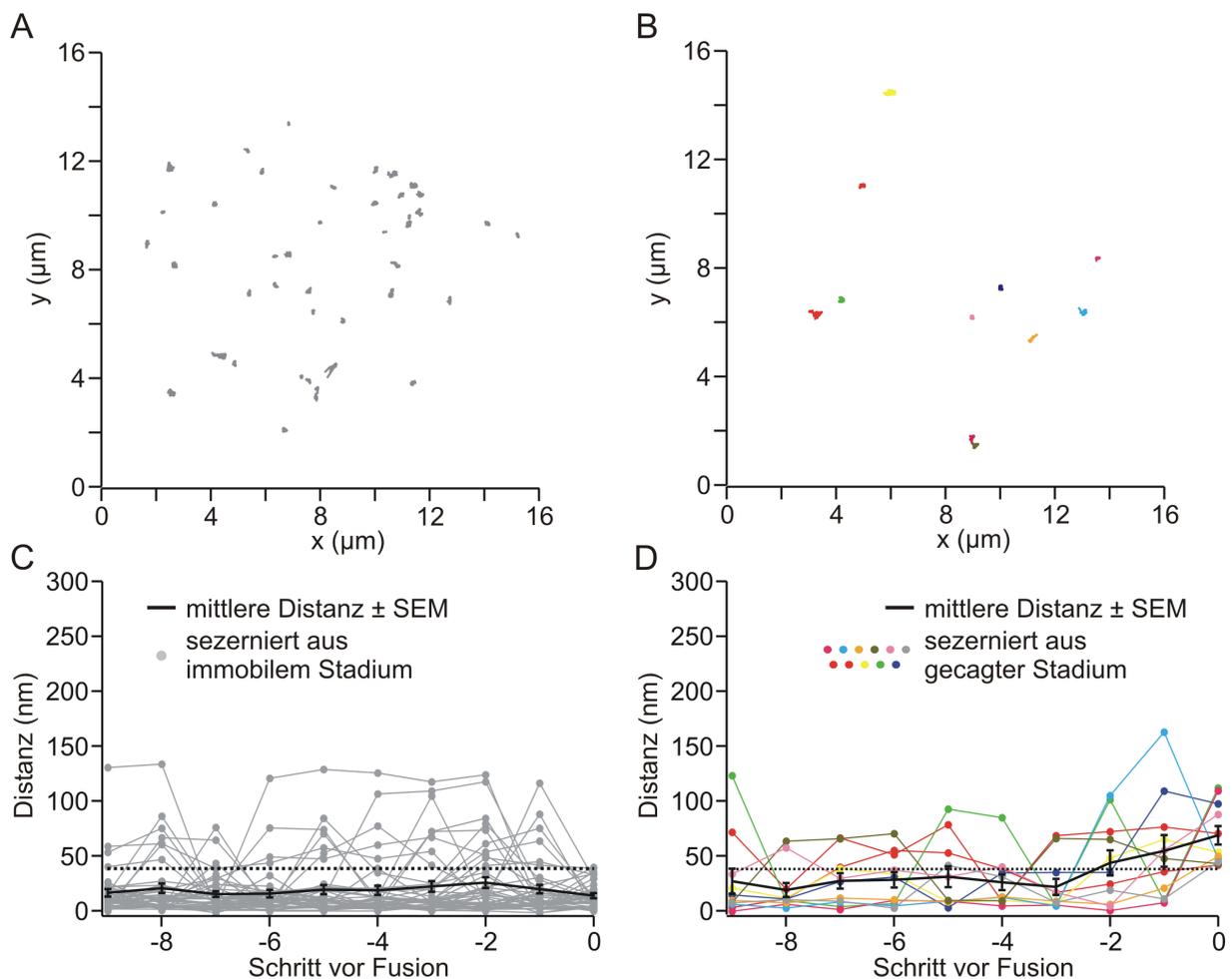


Abbildung 38. Der letzte Schritt vor Fusion nach Stimulation durch 5 Hz-Depolarisation (10×100 ms) prästimulus- $[Ca^{2+}]_i$: ~600 nM. (A) xy-Trajektorien von LDCVs, die aus dem immobilen Stadium sezerniert wurden. (B) xy-Trajektorien von LDCVs, die aus dem gecageten Stadium sezerniert wurden. (C) Die letzten 10 Distanzen der aus dem immobilen Zustand sezernierten LDCVs vor Fusion (n=42). Gemittelte Werte \pm SEM sind als schwarze Punkte gezeigt. (D) Die letzten 10 Distanzen der aus dem immobilen Zustand sezernierten LDCVs vor Fusion (n=11). Die Farben entsprechen denen in (B). Gemittelte Werte \pm SEM sind als schwarze Punkte gezeigt. Die gepunktete schwarze Linie zeigt die Grenze (45 nm) zwischen immobil und gecagete. (Mittelwert \pm SEM; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ ungepaarter Student's t-Test).

Die Korrelation des Zeitpunkts der Sekretion, dem Mobilitätststatus der sezernierten Vesikel und der gemittelten Kapazitätsantwort zeigt ein ähnliches Bild wie bei der UV-Blitzlicht-Photolyse bei 700 nM prästimulus- $[Ca^{2+}]_i$. Wie zu erwarten, korrelierten die aus dem immobilen Stadium sezernierten LDCVs vor allem bei den ersten 8 Stimuli stark mit dem Anstieg der Kapazität (Abbildung 39). Allerdings zeigte sich auch eine anteilig größere Beteiligung der Vesikel aus gecagetem Stadium, als sie bei den UV-Blitzlicht-Photolyse-Experimenten zu beobachten war.

Zusammengefasst zeigen die Experimente mit beiden Stimulationsarten, dass die Mehrzahl der Vesikel vor Fusion immobil sind und somit Priming mit Immobilität gleichzusetzen ist.

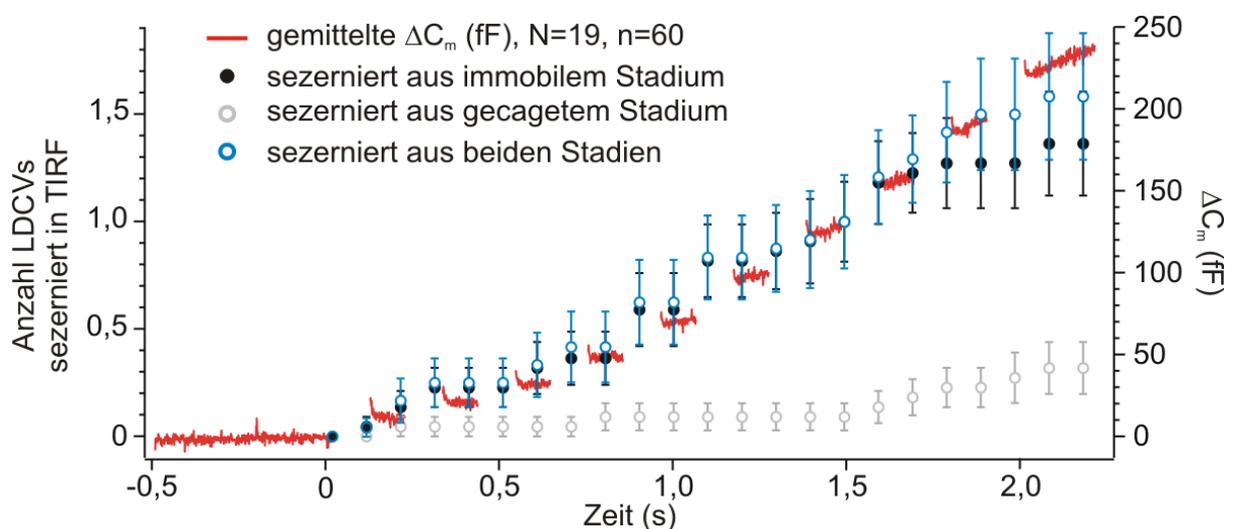


Abbildung 39. Korrelation von Sekretion in TIRF, Membrankapazitätserhöhung und Mobilität der LDCVs vor Fusion nach Stimulation durch Depolarisation. Die gemittelte Kapazitätsantwort (rechts) und Anzahl in TIRF sezernierter LDCVs (links) wurden gegen die Zeit aufgetragen. Die in TIRF sezernierten LDCVs wurden je nach zurückgelegter Distanz des letzten Schrittes in immobile (●) und gecagete (○) aufgetrennt. Die Skalierung der Kapazitätsantwort wurde dem zeitlichen Verlauf der summierten Ergebnisse (○) von gecagetem und immobilem Stadium vor Fusion angepasst. ($N=19$; $n_{\text{stimuli}}=27$; $n_{\text{immobile LDCVs}}=42$, $n_{\text{gecagete LDCVs}}=11$; Mittelwerte \pm SEM).

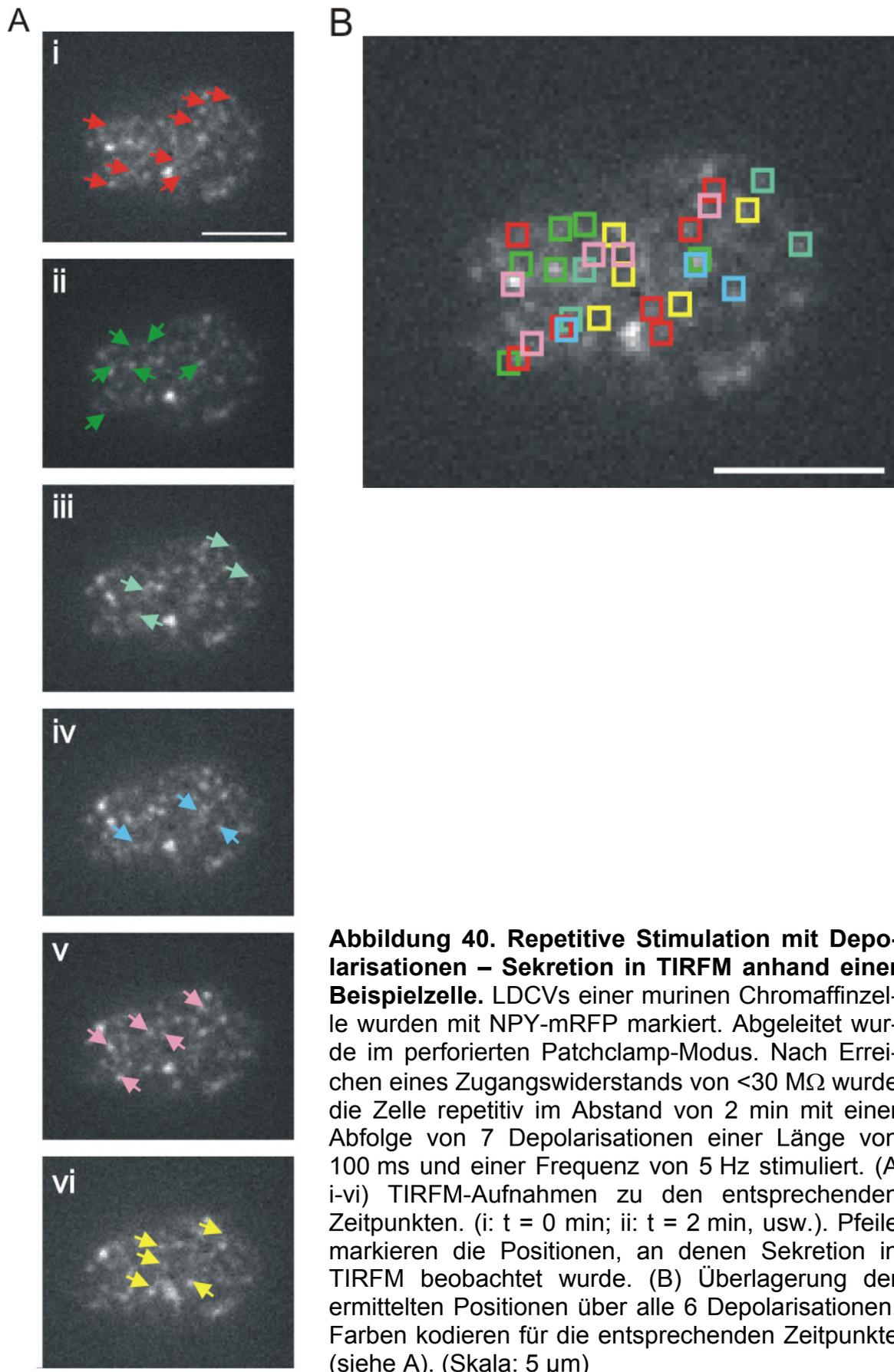
3.3 Kolokalisationsexperimente – Ca²⁺-Mikrodomänen

Neurone verfügen über sog. Aktive Zonen, hochspezialisierte Proteinkomplexe, die eine sehr effiziente Stimulus-Sekretions-Kopplung gewährleisten. Die Tatsache, dass sich bei moderaten Stimulationen lokale Ca²⁺-Mikrodomänen um einen spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanal ausbilden, führte zu der Annahme, dass es ähnliche Mechanismen, sog. „Hotspots“, in Chromaffinzellen geben könnte (Klingauf J und Neher E 1997).

Diverse Arbeiten haben sich schon mit dieser Thematik beschäftigt. Dabei blieben die gewonnenen Ergebnisse meistens eine oder mehrere Antworten schuldig. Entweder war man nicht in der Lage, Ca²⁺-Mikrodomänen zu detektieren oder es fehlt an adäquaten Methoden für die Messung der Sekretion (Schroeder TJ *et al.* 1994; Robinson IM *et al.* 1995; Wu M *et al.* 2009).

Ich habe versucht mittels Ganzzelleableitung im perforierten Patch-Modus unter Einsatz von Amphotericin B so minimal invasiv wie möglich zu arbeiten. Durch die Verwendung von Amphotericin B wurden die abgeleiteten Zellen in ihrem intrazellulären Milieu nicht beeinträchtigt und auch andere Faktoren, z.B. das Cytoskelett, wurden nicht (oder nur leicht) verändert.

LDCVs muriner Chromaffinzellen wurden durch Elektroporation mit dem NPY-mRFP-exprimierenden Plasmid transfiziert. Dadurch wurde nach 3 Tagen in Kultur eine ausreichende Dichte von markierten Vesikeln erzielt. Nach Erreichen des Gigaseals wurde solange gewartet, bis der Zugangswiderstand kleiner als 30 MΩ war. Widerstände kleiner 30 MΩ erlauben unter den perforierten Patch-Bedingungen einen ausreichend guten elektrischen Zugang zur Zelle und die Möglichkeit Membrankapazitätsmessungen durchzuführen.



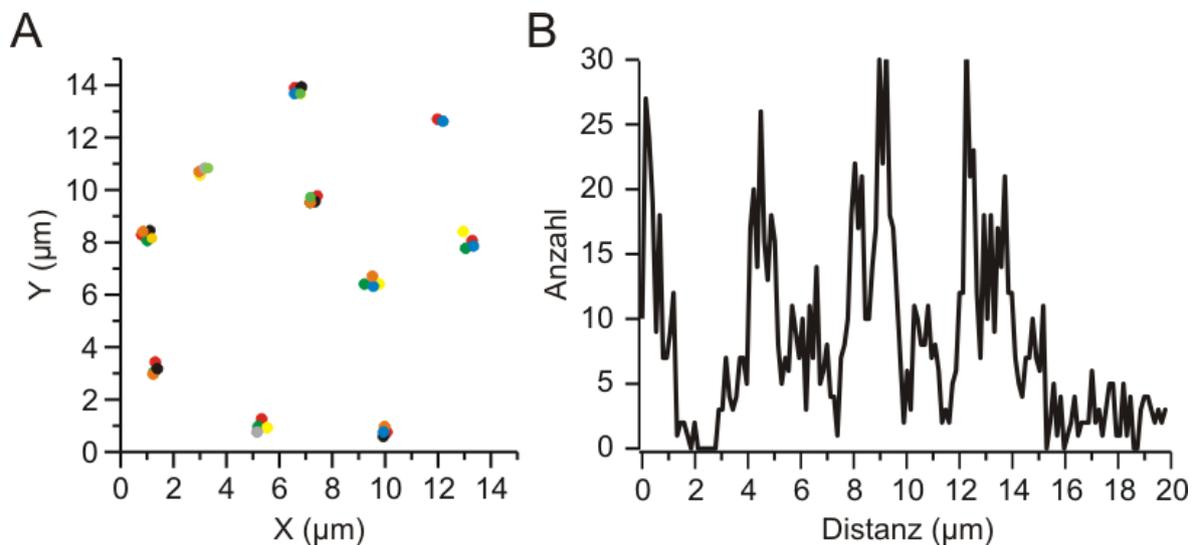


Abbildung 41. Modellierung von Sekretions-Hotspots. (A) Laterale Positionen wurden für dieses Modell so gewählt, dass es zwei Populationen von Vesikeln gab. In der ersten Population (10 distinkte Cluster) wurden die Positionen um das Zentrum eines Clusters mit einem Durchmesser von ca. 400 nm angeordnet. Die zweite Population entsprach einer willkürlichen Positionierung, mit einem Abstand von $>2 \mu\text{m}$. (B) Ergebnis der Analyse von (A). Die Häufigkeiten der Distanzen wurde ermittelt und dargestellt. ($N_{\text{Positionen}}=43$).

Die Zellen wurden gemäß dem Stimulationsprotokoll Abbildung 10 D sofort für eine Minute aufgenommen, und gleich zu Beginn der Aufnahme mit einer Abfolge von 7 Depolarisation von je 100 ms Dauer (Frequenz 5 Hz) stimuliert. Nach einer Ruhephase von einer weiteren Minute wurde das ganze Stimulationsprotokoll bis zu maximal acht Mal wiederholt, bzw. bis die Zellen nicht mehr funktionell waren. Die Positionen in TIRF sezernierter Vesikel wurden in der Analyse detektiert, was an einem Beispiel in Abbildung 40 dargestellt wurde. Insgesamt wurde diese Zelle 6 Mal stimuliert (Abbildung 40 A i-vi). Die sezernierten Vesikel sind mit Pfeilen markiert. Im Anschluss wurden alle Positionen überlagert (Abbildung 40 B).

In einem Modell wurde ein mögliches Szenario aufgezeigt, wie Sekretion von Fluoreszenz-markierten LDCVs im TIRF-Feld bei Existenz von Ca^{2+} -Mikrodomänen aussehen würde (Abbildung 41). Dabei wurde von zwei unterschiedlichen Vesikelpopulationen ausgegangen. Die erste beinhaltete Cluster von Vesikel-Positionen, in denen die Vesikel sehr nahe beieinander lagen. Der Höchstabstand von Vesikeln innerhalb dieser Cluster orientierte sich an den Modellen von Klingauf und Neher (1997). Unter damit vergleichbaren Bedingungen belief sich der Durchmesser einer Ca^{2+} -Mikrodomäne, die sich infolge von Ca^{2+} -Einstrom durch einen spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanal nach Stimulation durch Depolarisation für 20 ms ausbildet, auf 300-

400 nm. Die zweite Vesikelpopulation hatte zufällige Abstände ($>2 \mu\text{m}$). Zur Analyse wurde die Häufigkeit der gemessenen Distanzen zwischen jedem individuellen Vesikel und allen übrigen ermittelt. Die Verteilung der kalkulierten Distanzen zwischen den einzelnen Vesikeln hat eindeutige Maxima, die das vom Modell vorgegebene Muster reproduzieren (Abbildung 41 B). Das erste Maximum ergibt sich dabei aus der Häufigkeit aller kleinen Distanzen ($<400 \text{ nm}$) und spiegelt sich dementsprechend auch in den nachfolgenden Maxima wider.

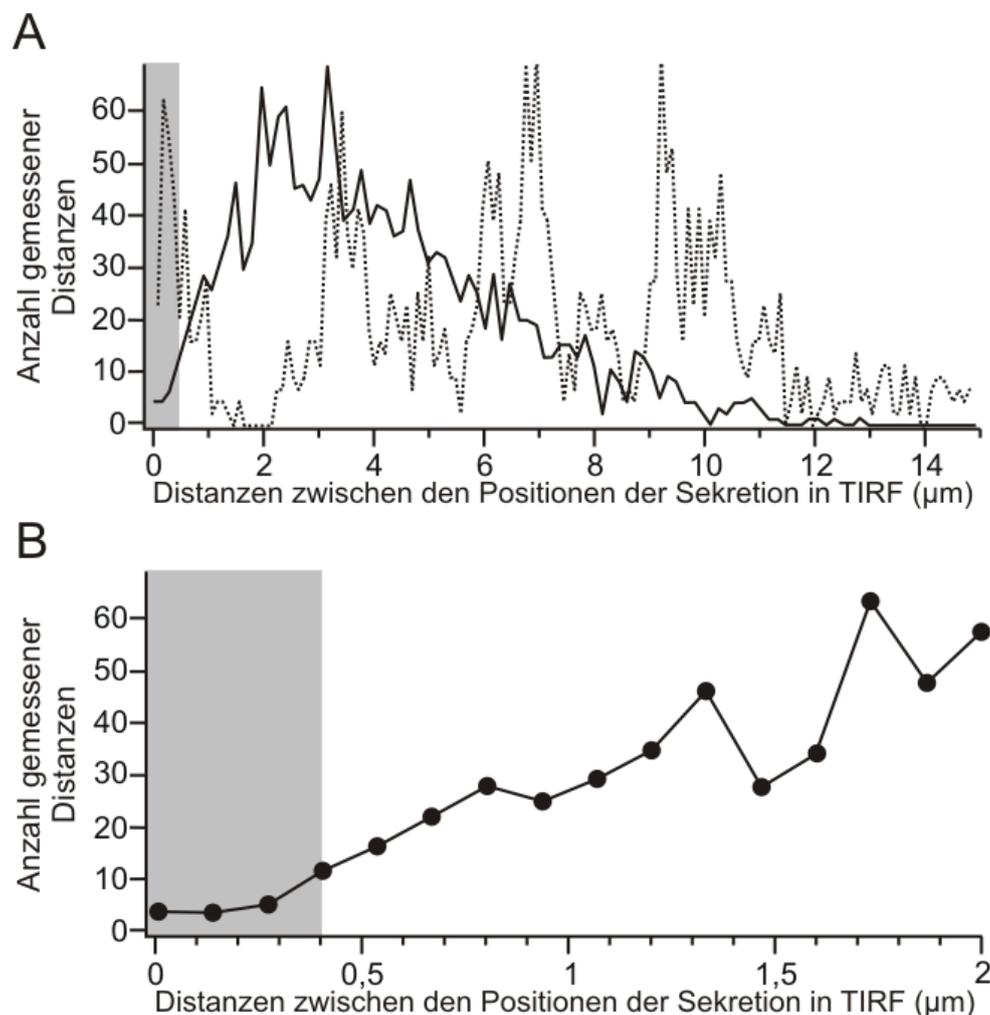


Abbildung 42. Keine bevorzugten „Hotspots“ der Sekretion. (A) Die Ergebnisse aller ermittelten Distanzen von in TIRFM sezernierten LDCVs ($N=26$, $n=156$) wurden in einem Histogramm zusammengefügt (durchgehende Linie). Zum Vergleich dazu ist das Ergebnis des Modells aus Abbildung 41 B (gepunktete Linie) dargestellt. Der grau hinterlegte Bereich repräsentiert den nach Klingauf und Neher (1997) für diese Bedingungen vorgeschlagenen Ca^{2+} -Mikrodomänen-Durchmesser von $<400 \text{ nm}$. (B) ist eine Vergrößerung der Distanzen bis maximal $2 \mu\text{m}$.

Vergleicht man die Ergebnisse des Modells mit denen aus den *in vivo*-Experimenten (N=26, n=156; Abbildung 42 A), so ergibt sich kein vergleichbares Bild (siehe auch Ausschnittvergrößerung Abbildung 42 B). Es offenbart sich ein breit gestreutes Maximum bei ca. 2-4 μm , das damit deutlich abseits des vorhergesagten Bereichs von 100-400 nm liegt.

Die Ergebnisse der in TIRFM sezernierten Vesikel stellen also eher eine Mischpopulation dar, die keine klaren Aussagen über das Vorkommen von Mikrodomänen, bzw. „Hotspots“ zulässt.

4 Diskussion

In der hier vorgelegten Arbeit untersuchte ich die Ca^{2+} -Abhängigkeit von Präfusionsschritten von sekretorischen Granulen in Chromaffinzellen. Mit einer Kombination von TIRF-Mikroskopie, Membrankapazitäts- und ratiometrischen Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gelang es mir, die Ca^{2+} -Abhängigkeit des Docking-Prozesses aufzudecken.

Basierend auf einer Weiterentwicklung der Technik von Nofal *et al.* (2007) konnten Belege für den Einfluss des sekundären Botenstoffs Ca^{2+} auf Priming bestätigt und erstmals auch beim Docking erstellt werden.

4.1 Methodik

Die von Nofal *et al.* (2007) beschriebene, auf Differenzierung von Bewegungsmustern basierende, Methode zur Analyse molekularer Stadien, wie Docking und Priming, wurde prinzipiell beibehalten. Allerdings gab es einige wichtige Modifikationen, die in noch akkurateren Ergebnissen resultieren.

Zur Beobachtung der Vesikelmobilität, die bei Nofal *et al.* (2007) durch virale Überexpression von Neurotoxinen oder Applikation von Phorbol ester beeinflusst worden war, kam eine wichtige Ergänzung. Chromaffinzellen weisen oftmals Schwankungen der globalen endogenen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (50-250 nM) auf. Dieses Erkenntnis basiert auf eigenen Erfahrungswerten, die ich aus Experimenten mit Fura2-AM geladenen bovinen Chromaffinzellen gewinnen konnte. Diese können in der Folge zu einem Verwischen der Mobilitätsergebnisse führen, wodurch mögliche Effekte verloren gehen könnten. Durch die zusätzliche Ganzzelleableitung der Chromaffinzellen mit einer Patchpipette war es zum ersten Mal möglich in TIRFM-Experimenten, das intrazelluläre Milieu einer Zelle vorzugeben, ohne dabei die Zelle gänzlich mit Ionomycin (Porenbildner) oder Digitonin perforieren zu müssen (Augustine GJ und Neher E 1992; Grabner CP *et al.* 2005), oder die Zellen komplett via Ultraschall aufzubrechen (Lang T 2008). Durch die von mir angewandte Methodik kann die Zelle in einem wesentlich physiologischeren Umfeld gehalten werden, wodurch wissenschaftlich sinnvollere Resultate erzielt werden konnten. Des Weiteren war es möglich, über die Patchpipette Substanzen von Interesse in die Zelle zu perfundieren. In meiner Arbeit fiel die Wahl dabei auf einen der wichtigsten sekundären Botenstoffe: Ca^{2+} . Damit ist dieser Versuchsansatz jedoch nicht ausgereizt. Stoffe und Proteine, die während der Präfusi-

onsschritte eine Rolle spielen, wie z.B. ATP oder Calmodulin, können ebenso studiert werden.

Die Membrankapazitätsmessungen erlauben außerdem, die Studie von sekretorischen Ereignissen besser zu dokumentieren und die Viabilität der gemessenen Zellen zu überprüfen (siehe Abbildung 14). So wird die Wahrscheinlichkeit minimiert, eine Zelle in TIRFM zu beobachten, die eine eingeschränkte Funktionalität aufweist. Bei bloßer Beobachtung kann man nur indirekte Rückschlüsse auf deren Vitalität ziehen, wie z.B. auslösen von Sekretion durch Applikation von hohen Kaliumkonzentrationen oder Färbungen mit Trypanblau, wodurch Zellen mit defekter PM eingefärbt werden.

Ein weiterer Faktor, der die Akkuratheit der verwendeten Methodik beeinflusste, fand sich während der Bildanalyse. Während die Positionsbestimmung in Nofal *et al.* (2007) mittels der Schwerpunktmethodik durchgeführt wurde, entschlossen wir uns, für diese Studie zur Centroid-Methode zu wechseln. Durch die Verwendung des Centroid-Algorithmus kann eine wesentlich exaktere Positionsbestimmung der einzelnen fluoreszenten Strukturen, in unserem Fall der mit roten Fluorophoren beladenen sekretorischen Granulen, stattfinden. Durch diese Umstellung wurde eine Subpixel-Auflösung der Position von ca. 20-40 nm Genauigkeit erreicht, die bei der Schwerpunktmethodik, aufgrund der höheren Anfälligkeit für Rauschen, um den Faktor 2-3 höher lag (im Vergleich siehe dazu Abbildung 23, NP-EGTA und Abbildung 24, Diazo-2) (Berglund AJ *et al.* 2008).

Die Anwendung der Centroid-Methode zur Positionsbestimmung erlaubte außerdem, das bei Nofal *et al.* (2007) verwendete gleitende Zeitfenster zur Berechnung des Caging Diameter (CD) von 6 auf 1 s zu verringern. Dies war möglich, da das gewonnene Positionssignal um einiges weniger durch Rauschen beeinflusst wurde (s.o.). Resultierend daraus ergaben sich in der hier präsentierten Studie weitere Verbesserungen. Zum Einen ließen sich durch die Verkürzung des Zeitfensters wesentlich mehr Trajektorien in der Analyse verwenden, die zuvor nicht analysiert werden konnten. Zum anderen wurden lange, bzw. große Bewegungen, die weniger als 6 s dauerten, nicht überbewertet. Da die CD-Analyse die jeweils größte zurückgelegte Distanz innerhalb des verwendeten Zeitfensters misst, sorgt sowohl ein größerer Einzelschritt, als auch eine Folge von Schritten in die gleiche Richtung für einen großen CD-Wert. Durch das einsekündige Zeitfenster wird die Wahrscheinlichkeit, dass ein langer

Schritt zur Kontamination eines CD führt, deutlich reduziert. Mobilitätsvorgänge, die weniger als 1 s benötigen, werden weiterhin unterschätzt. Allerdings ist ein gänzlicher Verzicht auf ein gleitendes Zeitfenster nicht möglich, da dieses notwendig ist, um verschiedenste Bewegungsarten überhaupt unterscheiden zu können (Vergleich „Mean-Square-Displacement“) (Oheim M und Stuhmer W 2000). Zusammengefasst erlauben alle Neuerungen in der Methodik eine akkuratere Messung dynamischer Prozesse.

4.2 Ca^{2+} -Abhängigkeit des Primings

In einer früheren Arbeit (Becherer U *et al.* 2007) konnten wir bereits TIRFM mit Membrankapazitätsmessungen korrelieren. Ebenfalls gezeigt werden konnte auch, dass der Mobilitätsstatus eines Vesikels dessen molekulares Stadium widerspiegelt (Nofal S *et al.* 2007). Dass ausschließlich die laterale Immobilität ein Indikator für Priming ist, ist hingegen neu. In der Tat bedeutet Priming eine vollkommene laterale Immobilität, was durch die verschiedenen Stimulationsexperimente (siehe dazu Kapitel 4.5) belegt werden konnte. Diese Aussage gilt jedoch nicht in die umgekehrte Richtung. Viele Vesikel sind immobil, können aber nicht sezerniert werden und sind *per definitionem* nicht geprimt. Auf diese „toten“ Vesikel wird näher in Kapitel 4.5 eingegangen.

Ich konnte zeigen, dass sich mit einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bis zu einer optimalen Konzentration von ca. 700 nM der Anteil der lateralen Immobilität gegenüber allen gemessenen Beweglichkeiten (gecatet, frei) erhöhte (Abbildung 14, 18). Diese ermittelte Konzentration entspricht der zur optimalen Befüllung der freisetzbaren Pools in Chromaffinzellen (Voets T 2000; Sorensen JB *et al.* 2002).

Der Vergleich der Mobilität von sezernierten LDCVs in TIRF mit den Membrankapazitätsmessungen zeigte, dass die freigesetzten Vesikel aus dem immobilen Pool stammten (Abbildung 31). Die Tatsache, dass die Sekretion von LDCVs im TIRF-Feld nach UV-Blitzlicht-Photolyse von NP-EGTA nur mit einer exponentiellen und einer linearen Komponente beschrieben werden konnte zeigt, dass mit der verwendeten zeitlichen Auflösung von 100 ms pro Bild eine Unterscheidung von Vesikeln des RRP und SRP nicht möglich ist (Abbildung 35, 37 und 39). Dies ist allerdings auch zu erwarten, da der RRP schon innerhalb der ersten 30 ms freigesetzt sein sollte und bereits Sekretion aus dem SRP stattfindet (Rettig J und Neher E 2002). Selbst mit höherer zeitlicher Auflösung sollte diese Unterscheidung schwierig sein, da beide

Populationen vermutlich über eine ähnliche Konstellation des SNARE-Komplexes verfügen, wovon der eine mehr (RRP) und der andere weniger (SRP) eng geschlossen ist. Basierend auf kristallographischen Modellen ist die Distanz zwischen Vesikel- und Plasmamembran weniger als 5 nm, für den Fall, dass der SNARE-Kernkomplex komplett geschlossen ist, und maximal 24 nm, wenn nur die jeweiligen N-Termini eines SNARE-Kernkomplexes verbunden sind (Sutton RB *et al.* 1998). Im letzteren Fall wäre es evtl. möglich, ein Hin- und Herschwingen des LDCVs wie an einer Ankerkette zu beobachten (maximaler Durchmesser <48 nm). Schon ab einer Beteiligung von mehr als zwei SNARE-Kernkomplexen sind die zu erwartenden Freiheitsgrade so gering, dass mit der hier verwendeten Auflösung kein Unterschied in der Bewegung ausgemacht werden könnte. Berücksichtigt man zusätzlich die Erkenntnis, dass auf einem synaptischen Vesikel ca. 70 Synaptobrevin-2-Moleküle zu finden sind, rechnet diese auf eine um Faktor 4 größere LDCV-Membran um, so scheint es doch sehr unwahrscheinlich, dass immer nur ein SNARE-Komplex gebildet wird (Takamori S *et al.* 2006). Diese Annahme wird durch Ergebnisse bestätigt, die Cluster von Syntaxin-1 durch hochauflösende Mikroskopieverfahren (STED, „stimulated emission-depletion microscopy“) belegen, in denen bis zu 75 dicht gepackte Syntaxin-1-Moleküle angenommen werden (Sieber JJ *et al.* 2007).

4.3 Ca^{2+} -Abhängigkeit des Dockings

Die meistgebräuchliche Analysemethode, um Docking-Effekte zu identifizieren, ist z.Zt. die Auswertung von elektronenmikroskopischen Standbildern (de Wit H *et al.* 2009). Die Anzahl von Vesikeln in der Nähe der PM (<300 nm Distanz), bzw. in direktem Kontakt damit, wurde benutzt, um u.a. den Einfluss von Munc18-1 zu ermitteln (Toonen RF *et al.* 2006). Seit kurzem wird auch TIRFM für die Analyse von Docking-Effekten verwendet. TIRFM erlaubt es, dem Priming vorgeschaltete, membran-nahe Vorgänge, wie den Organelltransport vom oder ins Cytosol, mehr aber noch den Verankerungsschritt von sekretorischen Granulen an der Membran dynamisch abzubilden. Wie schon von Toonen *et al.* (2006) demonstriert, lassen sich dadurch Effekte in dynamischen Prozessen, wie eine Reduktion der Verweildauer und der Anzahl von Vesikeln an der PM durch Deletion von Munc18-1, klar darstellen.

Im Falle der Ca^{2+} -Abhängigkeit des Dockings konnte ich zum ersten Mal die Auswirkungen eines sekundären Botenstoffes auf diesen Prozess aufzeigen. Ich fand heraus, dass weniger LDCVs mit kurzen Verweildauern bei einer $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zwischen 400-

599 nM, im Vergleich zu niedrigeren und höheren $[Ca^{2+}]_i$ zu beobachten waren (Abbildung 28). Gleichzeitig ging mit Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ eine Reduktion von Vesikeln an der PM über den 2minütigen Beobachtungszeitraum einher, während die Anzahl von LDCVs pro Bild nicht verändert wurde (Abbildung 27).

Die Tatsache, dass keine Veränderung der Vesikelanzahl pro Bild ($\sim 0,05 \pm 0,01$ LDCVs/ μm^2) beobachtet werden konnte, aber die absolute Anzahl der LDCVs über 2 min mit Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ verringert wurde (LDCVs/ μm^2 : 0-199 nM = $0,3 \pm 0,04$; >200 nM = $\sim 0,2 \pm 0,05$) lässt sich folgendermaßen erklären: da die Zellen aller $[Ca^{2+}]_i$ in einem Zeitraum von 12-16 h nach Virustransfektion gemessen und keine zeitlich bevorzugt wurde, belegt, dass Ca^{2+} eine Auswirkung auf die Effizienz des Dockings hat. Die zeitliche Bevorzugung konnte ausgeschlossen werden, da die Verteilung der Messzeitpunkte für alle Konzentrationen gleich war. Die Zellen, die mit einer $[Ca^{2+}]_i$ zwischen 400-599 nM perfundiert wurden, wiesen anteilig weniger LDCVs auf, die für kurze Zeit (0,5-5 s) membranständig waren. Genau diese kurzlebigen Vesikel machen den Unterschied in der Gesamtanzahl über 2 min aus. In Kombination mit dem Ergebnis der Verteilung der Verweildauern von LDCVs an der PM über den Beobachtungszeitraum von 2 min deutet alles darauf hin, dass der Docking-Prozess durch eine erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ effizienter gemacht wurde. Zusätzlich wurde die axiale Mobilität von LDCVs maximal im Bereich von $[Ca^{2+}]_i$ zwischen 400-599 nM reduziert. Die axiale Immobilität vereint gedockte und geprimte Vesikel. Lateral immobile und gecagete LDCVs waren auch immer axial immobil, was in den Korrelationsgraphen (Abbildung 21) klar ersichtlich ist. Die axiale Mobilität bestätigt als weiterer Docking-Indikator, dass eine $[Ca^{2+}]_i$ zwischen 400-599 nM zum optimalen Docking führt.

Über die genauen molekularen Mechanismen kann nur spekuliert werden, sollte aber mit einer Reihe von Experimenten, die unter vergleichbaren Bedingungen stattfinden, zu klären sein. Es könnte eine von Mint-1 mediierte Interaktion (über dessen Munc18-1-interagierende Domäne) mit Munc18-1 vorliegen. Denkbar wäre auch eine direkte Interaktion mit der PM über die beiden PDZ-Domänen von Mint1 (Okamoto M und Sudhof TC 1997), ähnlich einer Aktiven Zone. Da für diese Interaktionen bisher noch keine Ca^{2+} -Abhängigkeit gezeigt wurde, ist evtl. auch eine andere Interaktion von Relevanz. Aktuell konnte von mehreren Gruppen gezeigt werden, dass Synaptotagmin eine entscheidende Rolle bei der Positionierung von synaptischen Vesikeln an der, bzw. beim Docking von LDCVs an die PM spielt (de Wit H *et al.* 2009; Young SM, Jr. und Neher E 2009). Innerhalb beider Studien wurde der Effekt von Ca^{2+} al-

lerdings nicht visuell belegt (de Wit H *et al.* 2009), bzw. nur untersucht, ob ein Unterschied im Hinblick auf Sekretion vorliegt (Young SM, Jr. und Neher E 2009).

Zum Effekt des Ca^{2+} auf Docking und Priming kann ein weiterer interessanter Punkt adressiert werden. Im Hinblick darauf, dass immer mehr an der Exozytose beteiligten Proteinen eine multimodale Rolle zugeordnet wird (z.B. Munc18-1, Synaptotagmin, Syntaxin), wäre es plausibel, wenn noch mehr am Priming beteiligte Proteine bei vorgeschalteten Schritten wie z.B. Docking involviert wären. Auch wenn nur ein Teil der gesamten Vesikelpopulation in den hier präsentierten Versuchen markiert wurde, so lässt die Beobachtung, dass die Anzahl der Vesikel pro Bild unverändert bleibt, Rückschlüsse auf die Anzahl von möglichen Dockingpositionen zu (Abbildung 27). Angenommen, dass diese Anzahl konstant bleibt, dann sorgt eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nur für eine Umverteilung, bzw. Modifizierung der Dockingstellen, die dann zu Primingloci werden. Das würde aber auch bedeuten, dass die Gesamtmenge gedockter (davon tw. zusätzlich geprimte) LDCVs sich nicht ändert.

4.4 Übergänge zwischen den Mobilitätsstadien

Neher und Zucker (1993) und Sørensen (2004) haben vorgeschlagen, dass die Abfolge der Präfusionsschritte in einer linearen Abfolge stattfindet. Dem Transport der LDCVs an die PM folgt der Verankerungsschritt (Docking), aus dem Vesikel entweder zurück ins Cytosol transportiert oder aber fusionskompetent (Priming) gemacht werden können. Das geprimte Stadium kann dann nur durch Fusion oder aber durch Unpriming in den Pool gedockter Vesikel verlassen werden. Die sequentielle Abfolge dieser Prozesse ist also durchaus zu erwarten. Die involvierten Proteine und Strukturen, die an der Durchführung der Präfusionsschritte beteiligt sind, sind bis dato zum Teil bekannt (s.o.), aber auch zum Teil unbekannt. Durch die Analyse der Übergänge zwischen den einzelnen Stadien, die sich aus der lateralen und axialen CD-Analyse ergaben, konnte ich demonstrieren, dass es fast ausschließlich (>99,5 %) Übergänge vom freien zum gecagetem, vom gecagetem zum immobilen Stadium und umgekehrt gab (Abbildung 26). Somit war ich in der Lage, das erste Mal einen Beleg dafür zu erbringen, dass das angenommene Modell der linearen Abfolge von Präfusionsschritten tatsächlich zutrifft. Dies stimmt, solange sich die Zelle im Gleichgewicht befindet. Es trifft nicht zu für den Fall, wenn das Gleichgewicht durch Fusionsereignisse von LDCVs beeinträchtigt wird (z.B. $[\text{Ca}^{2+}]_i > 800 \text{ nM}$).

4.5 Ca^{2+} -abhängiges Verhalten vor Fusion

Die letzten Sekunden vor der Fusion sekretorischer Granulen mit der PM zeichnen sich durch die Ausbildung einer engen Interaktion des SNARE-Komplexes aus. Diese Interaktion sollte zu einer vollständigen Immobilisierung führen, wie auch schon in Experimenten von Nofal *et al.* (2007) angedeutet. In meinen Versuchen konnte ich durch unterschiedliche Stimuli (UV-Blitzlicht-Photolyse, Depolarisation) zeigen, dass LDCVs vor ihrer Fusion unbeweglich sind.

Ich konnte demonstrieren, dass mehr als 80 % der sezernierten Vesikel, für manche Versuchsbedingungen sogar über 90 % (prästimulus- $[\text{Ca}^{2+}]_i$: 700 nM), aus vollständiger Immobilität sezerniert wurden. Ein geringer Bruchteil zeigte in den letzten Momenten vor der Fusion gecagetes Verhalten. Wie schon in Kapitel 3.2.2 näher erläutert, wurde zur Mobilitätsbestimmung zum Zeitpunkt der Exozytose eine verfeinerte Analyse angewandt. Da der letzte CD-Wert durch vorangegangene größere Werte innerhalb der letzten Sekunde (Zeitfenster) beeinflusst worden sein könnte, wurde die Distanz des letzten Schrittes zur Klassifizierung der Mobilität genutzt. Hier muss angemerkt, dass die allgemeine Aussagekraft der CD-Analyse nicht beeinträchtigt wird. Allerdings handelt es sich bei der Fusion um ein Extremum, das nicht optimal mit der CD-Analyse erfasst werden kann, da es sich um keinen „dynamischen“, sondern einen finalen, randständigen Prozess handelt.

Die verschiedenen Stimuli (UV-Blitzlicht-Photolyse, Depolarisation) stellen eine sehr kontrollierte Art und Weise der Stimulation dar. Die poststimulus- $[\text{Ca}^{2+}]_i$ war in der Regel binnen 3-5 s wieder auf prästimulus Niveau. Degtyar *et al.* (2008) zeigten, dass bei anhaltender Stimulation mit dem Nicotin-Agonisten DMPP über einen Zeitraum von >15 s in PC12-Zellen einmalige, große laterale Bewegungen vor Fusion auftraten. Hierzu sei angemerkt, dass die Verwendung von 20 μM DMPP über einen Zeitraum von mehr als 15 s keineswegs einen physiologischen Stimulus darstellt. Da zusätzlich auch keine Ca^{2+} -Indikatoren verwendet wurden, lässt sich nur mutmaßen, dass während dieser Versuche eine $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von >20 μM erzielt wurde (Degtyar VE *et al.* 2007). Es scheint plausibel, dass dieses Phänomen der Zunahme der Beweglichkeit vor Fusion in meinen Experimenten nicht in großem Ausmaß beobachtet werden konnte.

Ebenfalls beschrieben ist ein abrupter Schritt von Granulen in BON-Zellen (Zelllinie generiert aus einem Pankreastumor) in Richtung der PM (Karatekin E *et al.* 2008).

Die Autoren beobachteten einen 20 nm Schritt in axialer Richtung kurz vor Fusion. Ungefähr 40% aller fusionierten Granulen zeigten diesen Schritt in den letzten 5 s vor Fusion. In meinen Ergebnissen zur Beweglichkeit vor Fusion konnte ich zeigen, dass Vesikel lateral immobil waren. Eine Analyse der axialen Bewegung unmittelbar vor Fusion ergab keinen erkennbaren Unterschied. Vesikel die fusionierten waren sowohl lateral, als auch axial unbeweglich.

Angesprochen werden muss auch das unerwartete Ergebnis der CD-Verteilung sezernierter LDCVs, die jeweils vom ersten sichtbar werden an der PM bis zur Fusion ermittelt worden waren (Abbildung 31). Im Schnitt sind die LDCVs immobil, die aus einer prästimulus- $[Ca^{2+}]_i$ von 230 nM heraus sezerniert wurden, als bei den beiden anderen Konditionen (700 nM + UV-Blitzlicht-Photolyse; 600 nM + Depolarisationen). Vergleicht man die tatsächliche Anzahl der sezernierten Vesikel bei vergleichbarer Zellzahl ($n_{230nM}=31$, $n_{700nM}=61$, $n_{600nM}=53$; $N=18\pm 1$), so könnte man annehmen, dass es sich bei den aus 230 nM $[Ca^{2+}]_i$ sezernierten LDCVs um stabil gepriimte Vesikel handelte. Bei 700 nM $[Ca^{2+}]_i$ konnten auch LDCVs fusionieren, die erst während der Stimulation gepriimt wurden, so dass sie noch kurz vor Sekretion beweglicher waren (gedockt). Gleiches gilt für die Stimulation aus 600 nM $[Ca^{2+}]_i$. Eine andere mögliche Erklärung wäre es, dass unter Bedingungen mit geringer $[Ca^{2+}]_i$ das Unpriming reduziert ist, wodurch LDCVs auch länger im immobilen Stadium gehalten werden würden. Dieser Punkt kann hier nicht final geklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

Problematisch ist die Diskrepanz zwischen der Anzahl an der PM sichtbaren Vesikel, und die Anzahl derer, die tatsächlich freigesetzt werden. Weniger als 10 % aller Fluoreszenz-markierten Vesikel fusionierten infolge eines Stimulus. Diese Beobachtung spiegelt unabhängig davon gewonnene Ergebnisse wieder (Becherer U *et al.* 2007) und wurde ausführlich von Verhage und Sörensen (2009) diskutiert. Jene nicht fusionswilligen Vesikel werden einem Sackgassen-Zustand zugesprochen, nach dem man sie zwar gemäß der EM-Definition morphologisch als gedockt ansähe, aber nicht fusionskompetent wären (Verhage M und Sorensen JB 2008). So konnte z.B. in β -Zellen des Pankreas gezeigt werden, dass durch Überexpression von Granophilin-a oder Rab3a, eine Verringerung der sekretorischen Antwort hervorrief, während die Anzahl der gedockten sekretorischen Granulen erhöht wurde (Torii S *et al.* 2002; Gomi H *et al.* 2005; Tsuboi T und Fukuda M 2006; van Weering JR *et al.* 2007). Möglicherweise dienen diese „toten“ Vesikel als Notreserve für die Zelle, die unter be-

stimmten Bedingungen (z.B. sehr extreme Stimuli; siehe Degtyar *et al.* (2008)) wieder zur Fusion gebracht werden können. Ein Beleg hierfür fehlt allerdings.

4.6 Variationen der $[Ca^{2+}]_i$ mit Diazo-2 und NP-EGTA

Generell unschlüssige Ergebnisse lieferten die Experimente, in denen die $[Ca^{2+}]_i$ während der Versuche durch Photolyse von NP-EGTA (Erhöhung, Kapitel), bzw. Diazo-2 (Erniedrigung) variiert werden sollte. Vergleicht man die Ergebnisse mit den Messungen unter konstanter $[Ca^{2+}]_i$ fehlt die Erniedrigung der Mobilität bei erhöhter $[Ca^{2+}]_i$ durch UV-Blitzlicht-Photolyse von NP-EGTA (Abbildung 23). Freisetzung von BAPTA durch UV-Blitzlicht-Photolyse von Diazo-2 zeigte sogar einen entgegengesetzten Effekt: eine Immobilisierung mit Erniedrigung der $[Ca^{2+}]_i$ auf Ruhekonzentrationen (Abbildung 24).

Die Ca^{2+} -Strom-Spannungs-Kurven (Abbildung 25) unter den unterschiedlichen Versuchsbedingungen sind ein deutliches Zeichen dafür, dass die Zellen in der Versuchsreihen mit NP-EGTA und Diazo-2 nicht mehr in einem funktionellen Zustand waren.

Die beobachteten Effekte von NP-EGTA und auch Diazo-2 könnten ein Problem von Langzeitexperimenten sein. Durch die andauernde, wenn auch vorsichtige UV-Blitzlicht-Photolyse ist es möglich, dass sich phototoxische Nebenprodukte gebildet haben oder eine pH-Veränderung im Cytosol ereignete, wodurch es zu einer Verfälschung der Resultate kam. So wurde gezeigt, dass nach repetitiver UV-Blitzlicht-Photolyse von NP-EGTA mit einem Interstimulus-Interval von 2 min in Wildtyp-Zellen der Maus schon nach dem dritten Stimulus eine drastische Abnahme der freisetzbaren Pools zu beobachten war (Ashery U *et al.* 2000). Selbst eine Verlängerung der Intervallzeiten konnte diesen Effekt nicht rückgängig machen (J. Rettig, persönliche Kommunikation). Das beschriebene Resultat lässt zwei Interpretationsmöglichkeiten zu. Entweder ist die Dockingrate sehr gering, was durchaus zutreffen kann, aber anhand unserer Ergebnisse mit konstanter $[Ca^{2+}]_i$ eher unwahrscheinlich ist. An dieser Stelle ist anzumerken, dass exakte Dockingraten aus den hier präsentierten Daten nicht zugänglich sind (4 Gleichungen mit 5 Unbekannten). Oder aber mit der Menge der Stimuli, bzw. der Photolyse-bedingten Abbauprodukte, bilden sich wie angenommen phototoxische Nebenprodukte. Dieser Punkt bedarf allerdings noch weiterer Klärung.

Im Falle von Diazo-2 wäre ein weiteres Szenario vorstellbar. Wie bereits beschrieben, ändert sich die Affinität für Ca^{2+} , aber auch die für Mg^{2+} nach dessen Photolyse. Zwar liegt der $K_d(\text{Mg}^{2+})_{\text{nach Photolyse}}$ noch bei 3,4 mM (vorher 5,5 mM), aber es wäre möglich, dass die Photolyseeffizienz so hoch war (entgegen meiner Berechnungen), dass das Ca^{2+} zwar gänzlich, ebenso wie Mg^{2+} gebunden wurde. Sollte den Zellen das Mg^{2+} entzogen worden sein, so war ATP nicht mehr in seiner hydrolysierbaren Form (Mg-ATP) vorhanden. Durch diesen Abzug der Mg^{2+} -Ionen würden somit alle ATP-abhängigen metabolischen Prozesse heruntergefahren und die Zelle sozusagen ausgeschaltet. Damit einher gehen würde auch eine Abnahme der Mobilität, da sämtliche Motorproteine kein Substrat mehr zum Verstoffwechself hätten. Es scheint also notwendig, um aus dem Versuchsansatz mit Diazo-2 funktionelle Ergebnisse gewinnen zu können, die eingesetzte Konzentration an Diazo-2 zu reduzieren. Dies hätte allerdings zur Folge, dass die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nicht mehr in den geforderten Konzentrationsbereich gebracht werden könnte.

4.7 Ca^{2+} -Mikrodomänen

Sog. „Hotspots“ der Sekretion, also Orte, an denen es bevorzugt zu Sekretion kommen kann, könnten durch zwei unterschiedliche Wege entstehen. Zum Einen wäre es möglich, dass sich Cluster von t-SNAREs in der PM bilden, wie es am Beispiel von Syntaxin-1 in PC-12-Zellen gezeigt werden konnte (Sieber JJ *et al.* 2007). Ausschließlich an diesen Clustern wäre die Formation eines funktionellen SNARE-Komplexes zwischen Vesikel und PM möglich. Zum Anderen wären Cluster von Ca^{2+} -Kanälen vorstellbar, die bei Depolarisation der Zelle zu einem sehr lokalen, aber dramatischen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führen würden (Neher E und Sakaba T 2008). Von Relevanz könnten dabei unterschiedlichste Ca^{2+} -Kanaltypen sein, die mit der Exozytose in bovinen Chromaffinzellen in Verbindung gebracht wurden. Je nach Art der Stimulation sind dies Ca^{2+} -Kanäle vom L-, N- und P/Q-Typ (Garcia AG *et al.* 2006). Kanälen vom P/Q-Typ wird dabei eine räumlich nähere Verbindung zur sekretorischen Maschinerie als denen vom L-Typ zugeordnet (Lara B *et al.* 1997; Lara B *et al.* 1998). Beide Möglichkeiten, t-SNARE- oder Ca^{2+} -Kanal-Cluster, würden „Hotspots“ der Sekretion zur Folge haben.

Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden bovine Chromaffinzellen in Kultur im perforierten Patch minimal invasiv abgeleitet. Die Zellen wurden repetitiv mit einer

Abfolge von Depolarisationen stimuliert und sämtliche Positionen der dadurch ausgelösten Sekretion von LDCVs wurden genau detektiert (Abbildung 40).

Die von mir durchgeführten Experimente zur Bestimmung von „Hotspots“ kamen zu keinem schlüssigen Ergebnis. Es konnten keine bevorzugten Positionen der Exozytose festgestellt werden. Als Erklärung kann die Möglichkeit herangezogen werden, dass die Art und Weise der Stimulation (Abfolge von sieben 100 ms andauernden Depolarisationen bei 5 Hz) eine zu hohe globale $[Ca^{2+}]_i$ erzeugt hat, wodurch in der PM ein uniformes Ca^{2+} -Signal ausgebildet wurde. Das hätte zur Folge, dass die Einflüsse von Ca^{2+} -Mikrodomänen dadurch verschwinden würden. Dieser Punkt kann jedoch nicht belegt werden, da in Abwesenheit von Ca^{2+} -Indikatoren gearbeitet wurde.

Zusätzlich zu einer möglichen Abschwächung des Stimulus wäre es ratsam (im Falle der Wiederholung dieses Versuches) einen Ca^{2+} -Indikator einzusetzen, der eine geringe Affinität für Ca^{2+} hat. Ein Zwei-Farben-Experiment mit einem niederaffinen Ca^{2+} -Indikator wie z.B. CaRuby (K_dCa^{2+} : 30 μM ; Fluoreszenz vergleichbar zu mRFP) und einem grün-fluoreszenten Vesikelmarker (mTFP, eGFP) könnte diese o.g. Problematik umgehen (Luccardini C *et al.* 2009). Es wäre so möglich, bei ausreichend milden Stimuli, Ca^{2+} -Mikrodomänen bis auf einer Subpixelebene genauestens zu detektieren und dementsprechend mit der Sekretion von LDCVs in Verbindung zu bringen.

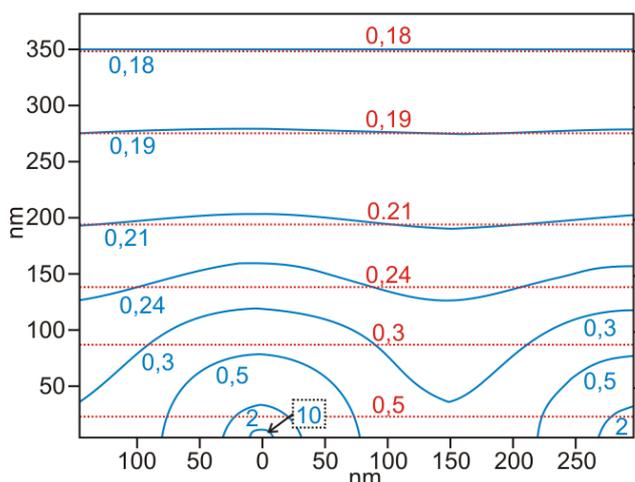


Abbildung 43. Zweidimensionales Modell der Entwicklung von Ca^{2+} -Mikrodomänen. Parameter waren: Ca^{2+} -Kanal-Abstand 300 nm, Depolarisation auf 0 mV für 20 ms, Anwesenheit von 500 μM Fura-2. Vergleich der Ca^{2+} -Gradienten, die durch Mikrodomänen (blau) uniforme Ausbreitung (Hüllenmodell, rot) erzeugt wurden. Zahlen geben die Konzentrationen in μM an.

Modifiziert von Klingauf und Neher (1993)

Bei den hier präsentierten Daten handelt es sich um vereinzelte Chromaffinzellen in Kultur. Es scheint möglich, dass, würden die Chromaffinzellen im Gewebe untersucht werden, eine Polarisierung der Zellen zu beobachten wäre (Lopez I *et al.* 2007) die in Kultur verloren geht. Eventuelle Strukturen, die den AZ der Neurone entsprechen, würden ebenso verloren gehen. Oder aber Präfusionscluster von t-SNARE-Dimeren (Syntaxin/SNAP-25) mit Synaptotagmin, die in Ca^{2+} -unabhängiger Art und Weise eine Plattform für Fusion ausbilden, könnten so in ihrer Lokalisation gestört sein, wodurch sich keine „Hotspots“ ausbilden können (Rickman C *et al.* 2004).

Die von mir beschriebenen Unterschiede in der Ca^{2+} -Sensitivität von Docking (Kapitel 4.3) und Priming (Kapitel 4.2) ergeben unter der Betrachtungsweise von Ca^{2+} -Mikrodomänen aus physiologischer Sicht Sinn. Damit die Zelle in der Lage ist, beide Ca^{2+} -abhängigen Prozesse optimal anzusteuern, die aber in unterschiedlicher Entfernung zur Ca^{2+} -Quelle (Ca^{2+} -Kanal) liegen, bzw. aufgrund der Zellarchitektur und endogener Ca^{2+} -Puffer unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen ausgesetzt werden, ist es notwendig, diese beiden Prozesse mit unterschiedlichen Affinitäten auszustatten (Park YB *et al.* 1996; Babcock DF *et al.* 1997; Duman JG *et al.* 2008). Gemäß den Modellen von Klingauf und Neher (1997) nimmt der Ca^{2+} -Gradient nach Stimulation mit Distanz zur PM rapide ab, an der Membran selbst ergibt sich eine durchgehende Mindestkonzentration (Abbildung 43).

Ich interpretiere meine Ergebnisse dahingehend, dass Priming bei einer $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von ~ 700 nM und Docking bei ~ 500 nM optimal angesteuert werden. Dadurch ist die Zelle in der Lage, bei basaler physiologischer Stimulation (AP-Frequenz: 0.5 Hz), die Fusionsmaschinerie zu einem Maximum einsatzbereit zu halten. (Brandt BL *et al.* 1976; Kidokoro Y und Ritchie AK 1980; Fulop T *et al.* 2005).

4.8 Ausblick

Die Kombination von TIRF-Mikroskopie, Ganzzelleableitungen und ratiometrischen Ca^{2+} -Messungen ermöglichte mir die Untersuchung von membrannahen Präfusionsritten und das gleichzeitige Auslesen von mehreren Viabilitätsparametern. Speziell im Fokus dieser Versuchsanordnung liegen sämtliche Effektoren dieser Präfusionsritte, die über die Patchpipette in die Zellen perfundiert, herausgewaschen oder durch Neurotoxine blockiert werden können. Der Schwerpunkt der Untersuchungen könnte dabei auf weitere sekundäre Botenstoffe (z.B. ATP) gelegt werden,

deren Effekte in nicht-dynamischen Analyseverfahren (EM) nur schwerlich aufzuzeigen wären.

Im Hinblick auf die hier beschriebenen Auswirkungen von Ca^{2+} stellt sich nun die Frage, welches die Interaktionspartner besonders beim Docking sind. Sollte es eine Interaktion mit Synaptotagmin sein, die evtl. auf einer bisher noch nicht verstandenen, aber doch bekannten Beschleunigung der Rekrutierung des Dockings und des Primings basiert, so wäre hier der erste Hinweis, wie dieser Effekt studiert werden könnte (siehe Verhage und Sorensen 2008). Reizvoll wäre im Zusammenhang mit Ca^{2+} auch die nähere Untersuchung des Effekts von Calmodulin auf Präfusionsschritte.

5 Literaturverzeichnis

Adams SR, Kao JPY und Tsien RY (1989). Biologically Useful Chelators That Take UP Ca²⁺ Upon Illumination. *J Am Chem Soc* 111: 7957-7957.

Allersma MW, Bittner MA, Axelrod D und Holz RW (2006). Motion matters: secretory granule motion adjacent to the plasma membrane and exocytosis. *Mol Biol Cell* 17 5: 2424-38.

Allersma MW, Wang L, Axelrod D und Holz RW (2004). Visualization of regulated exocytosis with a granule-membrane probe using total internal reflection microscopy. *Mol Biol Cell* 15 10: 4658-68.

Almers W und Steyer JA (2001). A real-time view of life within 100 nm of the plasma membrane. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 4: 268-75.

Aravamudan B, Fergestad T, Davis WS, Rodesch CK und Broadie K (1999). *Drosophila* UNC-13 is essential for synaptic transmission. *Nat Neurosci* 2 11: 965-71.

Archer DA, Graham ME und Burgoyne RD (2002). Complexin regulates the closure of the fusion pore during regulated vesicle exocytosis. *J Biol Chem* 277 21: 18249-52.

Artalejo CR, Elhamdani A und Palfrey HC (2002). Sustained stimulation shifts the mechanism of endocytosis from dynamin-1-dependent rapid endocytosis to clathrin- and dynamin-2-mediated slow endocytosis in chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 9: 6358-63.

Ashery U, Betz A, Xu T, Brose N und 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 8: 525-32.

Ashery U, Varoqueaux F, Voets T, Betz A, Thakur P, Koch H, Neher E, Brose N und Rettig J (2000). Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells. *Embo J* 19 14: 3586-96.

Augustin I, Rosenmund C, Sudhof TC und Brose N (1999). Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature* 400 6743: 457-61.

Augustine GJ und Neher E (1992). Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 450: 247-71.

Axelrod D (2001). Selective imaging of surface fluorescence with very high aperture microscope objectives. *J Biomed Opt* 6 1: 6-13.

Axelrod J und Reisine TD (1984). Stress hormones: their interaction and regulation. *Science* 224 4648: 452-9.

Babcock DF, Herrington J, Goodwin PC, Park YB und Hille B (1997). Mitochondrial participation in the intracellular Ca²⁺ network. *J Cell Biol* 136 4: 833-44.

- Becherer U, Moser T, Stuhmer W und Oheim M (2003). Calcium regulates exocytosis at the level of single vesicles. *Nat Neurosci* 6 8: 846-53.
- Becherer U, Pasche M, Nofal S, Hof D, Matti U und Rettig J (2007). Quantifying exocytosis by combination of membrane capacitance measurements and total internal reflection fluorescence microscopy in chromaffin cells. *PLoS ONE* 2 6: e505.
- Becherer U und Rettig J (2006). Vesicle pools, docking, priming, and release. *Cell Tissue Res* 326 2: 393-407.
- Bennett MK und Scheller RH (1994). Molecular correlates of synaptic vesicle docking and fusion. *Curr Opin Neurobiol* 4 3: 324-9.
- Berglund AJ, McMahon MD, McClelland JJ und Liddle JA (2008). Fast, bias-free algorithm for tracking single particles with variable size and shape. *Opt Express* 16 18: 14064-75.
- Betz A, Ashery U, Rickmann M, Augustin I, Neher E, Sudhof TC, Rettig J und Brose N (1998). Munc13-1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitter release. *Neuron* 21 1: 123-36.
- Beutner D, Voets T, Neher E und Moser T (2001). Calcium dependence of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse. *Neuron* 29 3: 681-90.
- Biederer T und Sudhof TC (2000). Mints as adaptors. Direct binding to neurexins and recruitment of munc18. *J Biol Chem* 275 51: 39803-6.
- Borges R, Camacho M und Gillis KD (2008). Measuring secretion in chromaffin cells using electrophysiological and electrochemical methods. *Acta Physiol (Oxf)* 192 2: 173-84.
- Borisovska M, Zhao Y, Tsytsyura Y, Glyvuk N, Takamori S, Matti U, Rettig J, Sudhof T und Bruns D (2005). v-SNAREs control exocytosis of vesicles from priming to fusion. *Embo J* 24 12: 2114-26.
- Borst JG, Helmchen F und Sakmann B (1995). Pre- and postsynaptic whole-cell recordings in the medial nucleus of the trapezoid body of the rat. *J Physiol* 489 (Pt 3): 825-40.
- Brandt BL, Hagiwara S, Kidokoro Y und Miyazaki S (1976). Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. *J Physiol* 263 3: 417-39.
- Brenner S (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77 1: 71-94.
- Brose N (2008). For better or for worse: complexins regulate SNARE function and vesicle fusion. *Traffic* 9 9: 1403-13.
- Brose N, Rosenmund C und Rettig J (2000). Regulation of transmitter release by Unc-13 and its homologues. *Curr Opin Neurobiol* 10 3: 303-11.
- Brunger AT (2001). Structural insights into the molecular mechanism of calcium-dependent vesicle-membrane fusion. *Curr Opin Struct Biol* 11 2: 163-73.

- Bruns D (2004). Detection of transmitter release with carbon fiber electrodes. *Methods* 33 4: 312-21.
- Cahill AL, Eertmoed AL, Mangoura D und Perlman RL (1996). Differential regulation of phenylethanolamine N-methyltransferase expression in two distinct subpopulations of bovine chromaffin cells. *J Neurochem* 67 3: 1217-24.
- Calakos N, Schoch S, Sudhof TC und Malenka RC (2004). Multiple roles for the active zone protein RIM1alpha in late stages of neurotransmitter release. *Neuron* 42 6: 889-96.
- Calvi LM und Bushinsky DA (2008). When is it appropriate to order an ionized calcium? *J Am Soc Nephrol* 19 7: 1257-60.
- Chapman ER (2002). Synaptotagmin: a Ca^{2+} sensor that triggers exocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 7: 498-508.
- Chen YA und Scheller RH (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 2: 98-106.
- Churchward MA und Coorssen JR (2009). Cholesterol, regulated exocytosis and the physiological fusion machine. *Biochem J* 423 1: 1-14.
- Ciufo LF, Barclay JW, Burgoyne RD und Morgan A (2005). Munc18-1 regulates early and late stages of exocytosis via syntaxin-independent protein interactions. *Mol Biol Cell* 16 2: 470-82.
- Cole KS (1968). Membrane watching. *J Gen Physiol* 51 5: Suppl:1S-7S.
- Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Kriegstein K, Schmid W, Aguzzi A, Fantuzzi G, Hummler E, Unsicker K und Schutz G (1995). Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev* 9 13: 1608-21.
- De Potter WP, Partoens P, Schoups A, Llona I und Coen EP (1997). Noradrenergic neurons release both noradrenaline and neuropeptide Y from a single pool: the large dense cored vesicles. *Synapse* 25 1: 44-55.
- de Wit H, Walter AM, Milosevic I, Gulyas-Kovacs A, Riedel D, Sorensen JB und Verhage M (2009). Synaptotagmin-1 docks secretory vesicles to syntaxin-1/SNAP-25 acceptor complexes. *Cell* 138 5: 935-46.
- Degtyar VE, Allersma MW, Axelrod D und Holz RW (2007). Increased motion and travel, rather than stable docking, characterize the last moments before secretory granule fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 40: 15929-34.
- Desnos C, Huet S, Fanget I, Chapuis C, Bottiger C, Racine V, Sibarita JB, Henry JP und Darchen F (2007). Myosin va mediates docking of secretory granules at the plasma membrane. *J Neurosci* 27 39: 10636-45.
- Desnos C, Schonn JS, Huet S, Tran VS, El-Amraoui A, Raposo G, Fanget I, Chapuis C, Menasche G, de Saint Basile G, Petit C, Cribier S, Henry JP und Darchen F

- (2003). Rab27A and its effector MyRIP link secretory granules to F-actin and control their motion towards release sites. *J Cell Biol* 163 3: 559-70.
- Dietz JR (2005). Mechanisms of atrial natriuretic peptide secretion from the atrium. *Cardiovasc Res* 68 1: 8-17.
- Dulubova I, Sugita S, Hill S, Hosaka M, Fernandez I, Sudhof TC und Rizo J (1999). A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *Embo J* 18 16: 4372-82.
- Duman JG, Chen L und Hille B (2008). Calcium transport mechanisms of PC12 cells. *J Gen Physiol* 131 4: 307-23.
- Dumitrescu Pene T, Rose SD, Lejen T, Marcu MG und Trifaro JM (2005). Expression of various scinderin domains in chromaffin cells indicates that this protein acts as a molecular switch in the control of actin filament dynamics and exocytosis. *J Neurochem* 92 4: 780-9.
- Ebashi S (1972). Calcium ions and muscle contraction. *Nature* 240 5378: 217-8.
- Eliasson L, Abdulkader F, Braun M, Galvanovskis J, Hoppa MB und Rorsman P (2008). Novel aspects of the molecular mechanisms controlling insulin secretion. *J Physiol* 586 14: 3313-24.
- Fejtova A und Gundelfinger ED (2006). Molecular organization and assembly of the presynaptic active zone of neurotransmitter release. *Results Probl Cell Differ* 43: 49-68.
- Friedrich R, Groffen AJ, Connell E, van Weering JR, Gutman O, Henis YI, Davletov B und Ashery U (2008). DOC2B acts as a calcium switch and enhances vesicle fusion. *J Neurosci* 28 27: 6794-806.
- Fukuda M und Kuroda TS (2002). Slac2-c (synaptotagmin-like protein homologue lacking C2 domains-c), a novel linker protein that interacts with Rab27, myosin Va/VIIa, and actin. *J Biol Chem* 277 45: 43096-103.
- Fulop T, Radabaugh S und Smith C (2005). Activity-dependent differential transmitter release in mouse adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* 25 32: 7324-32.
- Garcia AG, Garcia-De-Diego AM, Gandia L, Borges R und Garcia-Sancho J (2006). Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev* 86 4: 1093-131.
- Garner CC, Kindler S und Gundelfinger ED (2000). Molecular determinants of pre-synaptic active zones. *Curr Opin Neurobiol* 10 3: 321-7.
- Gerber SH, Rah JC, Min SW, Liu X, de Wit H, Dulubova I, Meyer AC, Rizo J, Arancillo M, Hammer RE, Verhage M, Rosenmund C und Sudhof TC (2008). Conformational switch of syntaxin-1 controls synaptic vesicle fusion. *Science* 321 5895: 1507-10.
- Gillis KD (2000). Admittance-based measurement of membrane capacitance using the EPC-9 patch-clamp amplifier. *Pflugers Arch* 439 5: 655-64.

- Gomi H, Mizutani S, Kasai K, Itohara S und Izumi T (2005). Granophilin molecularly docks insulin granules to the fusion machinery. *J Cell Biol* 171 1: 99-109.
- Gong LW, Hafez I, Alvarez de Toledo G und Lindau M (2003). Secretory vesicles membrane area is regulated in tandem with quantal size in chromaffin cells. *J Neurosci* 23 21: 7917-21.
- Grabner CP, Price SD, Lysakowski A und Fox AP (2005). Mouse chromaffin cells have two populations of dense core vesicles. *J Neurophysiol* 94 3: 2093-104.
- Gracheva EO, Hadwiger G, Nonet ML und Richmond JE (2008). Direct interactions between *C. elegans* RAB-3 and Rim provide a mechanism to target vesicles to the presynaptic density. *Neurosci Lett* 444 2: 137-42.
- Groffen AJ, Friedrich R, Brian EC, Ashery U und Verhage M (2006). DOC2A and DOC2B are sensors for neuronal activity with unique calcium-dependent and kinetic properties. *J Neurochem* 97 3: 818-33.
- Grynkiewicz G, Poenie M und Tsien RY (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260 6: 3440-50.
- Gubernator NG, Zhang H, Staal RG, Mosharov EV, Pereira DB, Yue M, Balsanek V, Vadola PA, Mukherjee B, Edwards RH, Sulzer D und Sames D (2009). Fluorescent false neurotransmitters visualize dopamine release from individual presynaptic terminals. *Science* 324 5933: 1441-4.
- Hanson PI, Heuser JE und Jahn R (1997). Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes. *Curr Opin Neurobiol* 7 3: 310-5.
- Hanson PI, Roth R, Morisaki H, Jahn R und Heuser JE (1997). Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell* 90 3: 523-35.
- Hay JC und Scheller RH (1997). SNAREs and NSF in targeted membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol* 9 4: 505-12.
- He L, Xue L, Xu J, McNeil BD, Bai L, Melicoff E, Adachi R und Wu LG (2009). Compound vesicle fusion increases quantal size and potentiates synaptic transmission. *Nature* 459 7243: 93-7.
- Heidelberger R, Heinemann C, Neher E und Matthews G (1994). Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. *Nature* 371 6497: 513-5.
- Holt M, Riedel D, Stein A, Schuette C und Jahn R (2008). Synaptic vesicles are constitutively active fusion machines that function independently of Ca²⁺. *Curr Biol* 18 10: 715-22.
- Jahn R, Lang T und Sudhof TC (2003). Membrane fusion. *Cell* 112 4: 519-33.
- Jahn R und Scheller RH (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 9: 631-43.

- Junge HJ, Rhee JS, Jahn O, Varoqueaux F, Spiess J, Waxham MN, Rosenmund C und Brose N (2004). Calmodulin and Munc13 form a Ca^{2+} sensor/effector complex that controls short-term synaptic plasticity. *Cell* 118 3: 389-401.
- Karatekin E, Tran VS, Huet S, Fanget I, Cribier S und Henry JP (2008). A 20-nm step toward the cell membrane preceding exocytosis may correspond to docking of tethered granules. *Biophys J* 94 7: 2891-905.
- Kasai H und Takahashi N (1999). Multiple kinetic components and the Ca^{2+} requirements of exocytosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354 1381: 331-5.
- Kidokoro Y und Ritchie AK (1980). Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla. *J Physiol* 307: 199-216.
- Kits KS und 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 1: 78-94.
- Klingauf J und Neher E (1997). Modeling buffered Ca^{2+} diffusion near the membrane: implications for secretion in neuroendocrine cells. *Biophys J* 72 2 Pt 1: 674-90.
- Kuroda TS und Fukuda M (2005). Identification and biochemical analysis of Slac2-c/MyRIP as a Rab27A-, myosin Va/VIIa-, and actin-binding protein. *Methods Enzymol* 403: 431-44.
- Lang T (2008). Imaging Ca^{2+} -triggered exocytosis of single secretory granules on plasma membrane lawns from neuroendocrine cells. *Methods Mol Biol* 440: 51-9.
- Lara B, Gandia L, Martinez-Sierra R, Torres A und Garcia AG (1998). Q-type Ca^{2+} channels are located closer to secretory sites than L-type channels: functional evidence in chromaffin cells. *Pflugers Arch* 435 4: 472-8.
- Lara B, Gandia L, Torres A, Olivares R, Martinez-Sierra R, Garcia AG und Lopez MG (1997). 'Wide-spectrum Ca^{2+} channel antagonists': lipophilicity, inhibition, and recovery of secretion in chromaffin cells. *Eur J Pharmacol* 325 1: 109-19.
- Lindau M und Neher E (1988). Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells. *Pflugers Arch* 411 2: 137-46.
- Liu Y, Schirra C, Stevens DR, Matti U, Speidel D, Hof D, Bruns D, Brose N und Rettig J (2008). CAPS facilitates filling of the rapidly releasable pool of large dense-core vesicles. *J Neurosci* 28 21: 5594-601.
- Lonart G und Sudhof TC (2000). Assembly of SNARE core complexes prior to neurotransmitter release sets the readily releasable pool of synaptic vesicles. *J Biol Chem* 275 36: 27703-7.
- Lopez I, Giner D, Ruiz-Nuno A, Fuentealba J, Viniegra S, Garcia AG, Davletov B und Gutierrez LM (2007). Tight coupling of the t-SNARE and calcium channel microdomains in adrenomedullary slices and not in cultured chromaffin cells. *Cell Calcium* 41 6: 547-58.

- Low P, Norlin T, Risinger C, Larhammar D, Pieribone VA, Shupliakov O und Brodin L (1999). Inhibition of neurotransmitter release in the lamprey reticulospinal synapse by antibody-mediated disruption of SNAP-25 function. *Eur J Cell Biol* 78 11: 787-93.
- Luccardini C, Yakovlev AV, Pasche M, Gaillard S, Li D, Rousseau F, Ly R, Becherer U, Mallet JM, Feltz A und Oheim M (2009). Measuring mitochondrial and cytoplasmic Ca²⁺ in EGFP expressing cells with a low-affinity Calcium Ruby and its dextran conjugate. *Cell Calcium* 45 3: 275-83.
- Madison JM, Nurrish S und Kaplan JM (2005). UNC-13 interaction with syntaxin is required for synaptic transmission. *Curr Biol* 15 24: 2236-42.
- Martelli AM, Baldini G, Tabellini G, Koticha D, Bareggi R und Baldini G (2000). Rab3A and Rab3D control the total granule number and the fraction of granules docked at the plasma membrane in PC12 cells. *Traffic* 1 12: 976-86.
- Moser T und Beutner D (2000). Kinetics of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 2: 883-8.
- Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K und Miyawaki A (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* 20 1: 87-90.
- Nagy G, Matti U, Nehring RB, Binz T, Rettig J, Neher E und Sorensen JB (2002). Protein Kinase C-Dependent Phosphorylation of Synaptosome-Associated Protein of 25 kDa at Ser¹⁸⁷ Potentiates Vesicle Recruitment. *J Neurosci* 22 21: 9278-86.
- Nagy G, Reim K, Matti U, Brose N, Binz T, Rettig J, Neher E und Sorensen JB (2004). Regulation of Releasable Vesicle Pool Sizes by Protein Kinase A-Dependent Phosphorylation of SNAP-25. *Neuron* 41 3: 417-29.
- Neher E und 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 21: 6712-6.
- Neher E und Sakaba T (2008). Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron* 59 6: 861-72.
- Neher E und Sakmann B (1976). Noise analysis of drug induced voltage clamp currents in denervated frog muscle fibres. *J Physiol* 258 3: 705-29.
- Neher E und Zucker RS (1993). Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron* 10 1: 21-30.
- Newton AC (2003). Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J* 370 Pt 2: 361-71.
- Nofal S, Becherer U, Hof D, Matti U und Rettig J (2007). Primed vesicles can be distinguished from docked vesicles by analyzing their mobility. *J Neurosci* 27 6: 1386-95.

- Oberhauser AF, Monck JR und Fernandez JM (1992). Events leading to the opening and closing of the exocytotic fusion pore have markedly different temperature dependencies. *Kinetic analysis of single fusion events in patch-clamped mouse mast cells.* *Biophys J* 61 3: 800-9.
- Oheim M, Loerke D, Chow RH und Stuhmer W (1999). Evanescent-wave microscopy: a new tool to gain insight into the control of transmitter release. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354 1381: 307-18.
- Oheim M, Loerke D, Stuhmer W und Chow RH (1998). The last few milliseconds in the life of a secretory granule. Docking, dynamics and fusion visualized by total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM). *Eur Biophys J* 27 2: 83-98.
- Oheim M und Stuhmer W (2000). Interaction of secretory organelles with the membrane. *J Membr Biol* 178 3: 163-73.
- Oheim M und Stuhmer W (2000). Tracking chromaffin granules on their way through the actin cortex. *Eur Biophys J* 29 2: 67-89.
- Okamoto M und Sudhof TC (1997). Mints, Munc18-interacting proteins in synaptic vesicle exocytosis. *J Biol Chem* 272 50: 31459-64.
- Orita S, Sasaki T, Naito A, Komuro R, Ohtsuka T, Maeda M, Suzuki H, Igarashi H und Takai Y (1995). Doc2: a novel brain protein having two repeated C2-like domains. *Biochem Biophys Res Commun* 206 2: 439-48.
- Park YB, Herrington J, Babcock DF und Hille B (1996). Ca²⁺ clearance mechanisms in isolated rat adrenal chromaffin cells. *J Physiol* 492 (Pt 2): 329-46.
- Pelham HR (1999). SNAREs and the secretory pathway-lessons from yeast. *Exp Cell Res* 247 1: 1-8.
- Plattner H, Artalejo AR und Neher E (1997). Ultrastructural organization of bovine chromaffin cell cortex-analysis by cryofixation and morphometry of aspects pertinent to exocytosis. *J Cell Biol* 139 7: 1709-17.
- Reim K, Mansour M, Varoqueaux F, McMahon HT, Sudhof TC, Brose N und Rosenmund C (2001). Complexins regulate a late step in Ca²⁺-dependent neurotransmitter release. *Cell* 104 1: 71-81.
- Rettig J und Neher E (2002). Emerging roles of presynaptic proteins in Ca⁺⁺-triggered exocytosis. *Science* 298 5594: 781-5.
- Rhee JS, Betz A, Pyott S, Reim K, Varoqueaux F, Augustin I, Hesse D, Sudhof TC, Takahashi M, Rosenmund C und Brose N (2002). beta Phorbol Ester- and Diacylglycerol-Induced Augmentation of Transmitter Release Is Mediated by Munc13s and Not by PKCs. *Cell* 108 1: 121-33.
- Richmond JE, Davis WS und Jorgensen EM (1999). UNC-13 is required for synaptic vesicle fusion in *C. elegans*. *Nat Neurosci* 2 11: 959-64.
- Rickman C, Archer DA, Meunier FA, Craxton M, Fukuda M, Burgoyne RD und Davletov B (2004). Synaptotagmin interaction with the syntaxin/SNAP-25 dimer is medi-

- ated by an evolutionarily conserved motif and is sensitive to inositol hexakisphosphate. *J Biol Chem* 279 13: 12574-9.
- Rizo J und Sudhof TC (1998). C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J Biol Chem* 273 26: 15879-82.
- Robinson IM, Finnegan JM, Monck JR, Wightman RM und Fernandez JM (1995). Colocalization of calcium entry and exocytotic release sites in adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 7: 2474-8.
- Rodriguez Del Castillo A, Lemaire S, Tchakarov L, Jeyapragasan M, Doucet JP, Vitale ML und Trifaro JM (1990). Chromaffin cell scinderin, a novel calcium-dependent actin filament-severing protein. *Embo J* 9 1: 43-52.
- Schluter OM, Basu J, Sudhof TC und Rosenmund C (2006). Rab3 superprimes synaptic vesicles for release: implications for short-term synaptic plasticity. *J Neurosci* 26 4: 1239-46.
- Schluter OM, Schmitz F, Jahn R, Rosenmund C und Sudhof TC (2004). A complete genetic analysis of neuronal Rab3 function. *J Neurosci* 24 29: 6629-37.
- Schoch S, Castillo PE, Jo T, Mukherjee K, Geppert M, Wang Y, Schmitz F, Malenka RC und Sudhof TC (2002). RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone. *Nature* 415 6869: 321-6.
- Schroeder TJ, Jankowski JA, Senyshyn J, Holz RW und Wightman RM (1994). Zones of exocytotic release on bovine adrenal medullary cells in culture. *J Biol Chem* 269 25: 17215-20.
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE und Tsien RY (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22 12: 1567-72.
- Sieber JJ, Willig KI, Kutzner C, Gerding-Reimers C, Harke B, Donnert G, Rammner B, Eggeling C, Hell SW, Grubmuller H und Lang T (2007). Anatomy and dynamics of a supramolecular membrane protein cluster. *Science* 317 5841: 1072-6.
- Siegelbaum SA und Kandel ER (1991). Learning-related synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol* 1 1: 113-20.
- Soerensen JB (2004). Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Pflugers Arch* 448 4: 347-62.
- Soerensen JB, Matti U, Wei SH, Nehring RB, Voets T, Ashery U, Binz T, Neher E und Rettig J (2002). The SNARE protein SNAP-25 is linked to fast calcium triggering of exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 3: 1627-1632.
- Sollner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH und Rothman JE (1993). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75 3: 409-18.

- Sorensen JB, Matti U, Wei SH, Nehring RB, Voets T, Ashery U, Binz T, Neher E und Rettig J (2002). The SNARE protein SNAP-25 is linked to fast calcium triggering of exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 3: 1627-32.
- Speidel D, Bruederle CE, Enk C, Voets T, Varoqueaux F, Reim K, Becherer U, Fornai F, Ruggieri S, Holighaus Y, Weihe E, Bruns D, Brose N und Rettig J (2005). CAPS1 Regulates Catecholamine Loading of Large Dense-Core Vesicles. *Neuron* 46 1: 75-88.
- Stevens DR, Wu ZX, Matti U, Junge HJ, Schirra C, Becherer U, Wojcik SM, Brose N und Rettig J (2005). Identification of the minimal protein domain required for priming activity of Munc13-1. *Curr Biol* 15 24: 2243-8.
- Sudhof TC und Rothman JE (2009). Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* 323 5913: 474-7.
- Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R und Brunger AT (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395 6700: 347-53.
- Tadokoro S, Nakanishi M und Hirashima N (2005). Complexin II facilitates exocytotic release in mast cells by enhancing Ca²⁺ sensitivity of the fusion process. *J Cell Sci* 118 Pt 10: 2239-46.
- Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Brügger B, Ringler P, Müller SA, Rammner B, Gräter F, Hub JS, De Groot BL, Mieskes G, Moriyama Y, Klingauf J, Grubmüller H, Heuser J, Wieland F und Jahn R (2006). Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127 4: 831-46.
- Toomre D und Manstein DJ (2001). Lighting up the cell surface with evanescent wave microscopy. *Trends Cell Biol* 11 7: 298-303.
- Toonen RF, Kochubey O, de Wit H, Gulyas-Kovacs A, Konijnenburg B, Sorensen JB, Klingauf J und Verhage M (2006). Dissecting docking and tethering of secretory vesicles at the target membrane. *Embo J* 25 16: 3725-37.
- Torii S, Zhao S, Yi Z, Takeuchi T und Izumi T (2002). Granophilin modulates the exocytosis of secretory granules through interaction with syntaxin 1a. *Mol Cell Biol* 22 15: 5518-26.
- Tsuboi T und Fukuda M (2006). The Slp4-a linker domain controls exocytosis through interaction with Munc18-1/syntaxin-1a complex. *Mol Biol Cell* 17 5: 2101-12.
- van Weering JR, Toonen RF und Verhage M (2007). The role of Rab3a in secretory vesicle docking requires association/dissociation of guanidine phosphates and Munc18-1. *PLoS One* 2 7: e616.
- Verhage M und Sorensen JB (2008). Vesicle docking in regulated exocytosis. *Traffic* 9 9: 1414-24.
- Voets T (2000). Dissection of three Ca²⁺-dependent steps leading to secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron* 28 2: 537-45.

Voets T, Toonen RF, Brian EC, de Wit H, Moser T, Rettig J, Sudhof TC, Neher E und Verhage M (2001). Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking. *Neuron* 31 4: 581-91.

Washbourne P, Thompson PM, Carta M, Costa ET, Mathews JR, Lopez-Bendito G, Molnar Z, Becher MW, Valenzuela CF, Partridge LD und Wilson MC (2002). Genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25 distinguishes mechanisms of neuroexocytosis. *Nat Neurosci* 5 1: 19-26.

Wassenberg JJ und Martin TF (2002). Role of CAPS in dense-core vesicle exocytosis. *Ann N Y Acad Sci* 971: 201-9.

Weiss C, Cahill AL, Laslop A, Fischer-Colbrie R, Perlman RL und Winkler H (1996). Differences in the composition of chromaffin granules in adrenaline and noradrenaline containing cells of bovine adrenal medulla. *Neurosci Lett* 211 1: 29-32.

Wu M, Llobet A und Lagnado L (2009). Loose coupling between calcium channels and sites of exocytosis in chromaffin cells. *J Physiol*.

Xu T, Rammner B, Margittai M, Artalejo AR, Neher E und Jahn R (1999). Inhibition of SNARE complex assembly differentially affects kinetic components of exocytosis. *Cell* 99 7: 713-22.

Young SM, Jr. und 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 4: 482-96.

Zenisek D, Steyer JA und Almers W (2000). Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zones. *Nature* 406 6798: 849-54.

Zucker RS (1999). Calcium- and activity-dependent synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 9 3: 305-13.

6 Publikationen

Becherer U, Pasche M, Nofal S, Hof D, Matti U, Rettig J

Quantifying exocytosis by combination of membrane capacitance measurements and total internal reflection fluorescence microscopy in chromaffin cells

PLoS ONE, 2007 2:e505.

Luccardini C, Yakovleva AV, Pasche M, Gaillard S, Li D, Rousseau F, Ly R, Becherer U, Mallet J-M, Feltz A, Oheim M

Measuring mitochondrial and cytoplasmic Ca^{2+} in EGFP expressing cells with a low-affinity Calcium Ruby and its dextran conjugate

Cell Calcium, 2009 45:275-83

Pasche M, Hof D, Matti U, Rettig J, Becherer U

Optimal docking of LDCVs is obtained at surprisingly low intracellular Ca^{2+}

Eingereicht bei: Neuron, Oktober 2009

Quintana A*, Pasche M*, Al-Ansary D, Junker C, Nuñez L, Villalobos C, Becherer U, Rettig J, Niemeyer B, Hoth M

Calcium microdomains at the immunological synapse: how ORAI channels, mitochondria and calcium pumps generate local calcium signals for T-cell activation

Eingereicht bei: Journal of Cell Biology, Oktober 2009

7 Präsentationen

Pasche M, Hof D, Matti U, Rettig J, Becherer U

Quantifying exocytosis by combination of membrane capacitance measurements and total internal reflection fluorescence microscopy in chromaffin cells

15th Jerusalem Spring School of Life Sciences, Hebrew University of Jerusalem, 2007, Jerusalem, Israel

Pasche M, Hof D, Matti U, Rettig J, Becherer U

A closer look at docking and priming with a combination of TIRFM and patch-clamp technique

Annual Meeting of the Biophysical Society, 2008, Long Beach CA, USA

Pasche M, Hof D, Matti U, Rettig J, Becherer U

Mobility of docked and primed vesicles is changed by intracellular calcium

Joint PhD-Student Symposium, GK1326 + MCBO (Innsbruck), 2008, Obergurgl, Austria

Pasche M, Hof D, Matti U, Rettig J, Becherer U

Intracellular Ca²⁺ in physiological range affects priming & docking of large dense core vesicles

Annual Meeting of the Biophysical Society, 2009, Boston MA, USA

8 Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Jens Rettig dafür bedanken, dass ich in seiner Arbeitsgruppe wirken konnte. Vielen Dank auch für die hervorragende Betreuung und die Möglichkeit, genau das zu machen, was ich schon immer machen wollte.

Dr. Ute Becherer danke ich für ihre effiziente und kompetente Unterstützung während meiner Doktorarbeit. Durch ihre ruhige und ausgeglichene Art war es trotz schlechter Messtage eine äußerst entspannte und produktive Zusammenarbeit.

Dr. Detlef Hof danke ich für die schnellen Problemlösungen und seine Hilfsbereitschaft. Ebenfalls danken möchte ich Dr. Ulf Matti, dessen molekularbiologische Fähigkeiten meine Arbeit zeitlich extrem verkürzt haben.

Dr. Shahira Nofal, Dr. Claudia Schirra, Dr. Misty Marshall, Dr. David Stevens, Dr. Elmar Krause, Dalia Al-Ansary, Yuanyuan Liu, Monica-Dudenhöffer-Pfeiffer, Varsha Pattu, Lisa Weins, Anneka Bost, Sandra Magin und Tobias Schmidt sei an dieser Stelle gedankt für ihre vielschichtigen Kommentare zu allen Problemstellungen, die sich während meiner Arbeit auftaten.

Dank auch an alle technischen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der AG Rettig für eine Rundumbetreuung bei Fragen, Lösungen ansetzen, Mäuse präparieren und vieles, vieles mehr.

Ein ganz besonders großer Dank geht an meine Großeltern Anna und Josef Sellner. Ihr seid mit dafür verantwortlich, dass ich da bin, wo ich heute bin.

Genauso wichtig sind mein Vater Gerhard Pasche und seine Frau Melitta. Vielen Dank für die jahrelange Unterstützung vom Anfang bis zum Ende.

Und zu guter letzt möchte ich mich bei meiner Freundin Anna Drews fürs Aufrichten, Motivieren, Zuhören, Reden, einfach nur Dasein und für die große Portion Geduld bedanken. Besser kann man das nicht machen.

9 Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name: Mathias Christian Manfred Pasche
Geburtsdatum: 26.12.1977
Geburtsort: Kassel
Adresse: Höhenstr. 15, 66894 Käshofen
Nationalität: Deutsch

Ausbildung:

2005 – 2009 Doktorarbeit an der Universität des Saarlandes am Physiologischen Institut
Assoziiertes Mitglied des Graduiertenkollegs 1326 'Calcium-Signalling and Cellular Nanodomains' (GK 1326)

2001 – 2005 Diplom im Fach Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen (Germany)

1998 – 2001 Vordiplom im Fach Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen

1988 – 1997 Abitur am Friedrichsgymnasium in Kassel