

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

**Untersuchung der Prä-Fusionsschritte von
sekretorischen Granulen in bovinen
Chromaffinzellen:
die Rolle von ATP
und
Charakterisierung von „dead-end“ Vesikeln**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2012

vorgelegt von
Sandra Hugo
aus Speyer

Homburg 2012

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
1.1 Zell-Zell-Kommunikation.....	1
1.2 Chromaffinzellen als Modellzellen für regulierte Exozytose	2
1.3 Exozytose in Chromaffinzellen	4
1.4 Docking und involvierte Proteine	7
1.4.1 SNAP-25, Syntaxin und Synaptotagmin.....	8
1.4.2 Munc18.....	9
1.4.3 Weitere Docking-relevante Proteine.....	11
1.5 Priming und involvierte Proteine.....	12
1.5.1 Complexine.....	13
1.5.2 CAPS.....	14
1.5.3 Proteinkinasen A und C.....	14
1.5.4 Phosphoinositide	14
1.6 Fusion und involvierte Proteine	15
1.7 „Dead-end“ Vesikel.....	17
1.8 Adenosintriphosphat (ATP)	19
1.8.1 Die Rolle von ATP bei der Sekretion in Chromaffinzellen	20
1.9 Zielsetzung der Arbeit.....	22
2. Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Reagenzien	23
2.1.2 Enzyme	24
2.1.3 Medien und Lösungen.....	24
2.1.3.1 Gelelektrophorese	24
2.1.3.2 Präparation von Chromaffinzellen	24
2.1.3.3 Chemische Fixierung und Immuncytochemie.....	25
2.1.3.4 Virusaktivierung	26
2.1.4 Intrazelluläre Lösungen	26
2.1.4.1 Untersuchung der Rolle von ATP bei Docking, Priming und Fusion	26
2.1.4.2 Stimulation mit Depolarisationsreihen oder UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA	27
2.1.4.3 Langzeitstimulation mit hoher $[Ca^{2+}]$	28
2.1.5 Extrazelluläre Lösung.....	28

2.2 Methoden	28
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	28
2.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese	30
2.2.1.2 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	32
2.2.1.3 Bestimmung der DNA-Konzentration im Agarosegel	32
2.2.1.4 Restriktion	32
2.2.1.5 Dephosphorylierung	34
2.2.1.6 Ligationsreaktion	35
2.2.1.7 Transformation	35
2.2.1.8 Plasmid-Mini-Präparation	36
2.2.1.9 Plasmid-Midi-Präparation	36
2.2.1.10 Plasmid-Maxi-Präparation	37
2.2.1.11 Sequenzierung	37
2.2.2 Präparation von Chromaffinzellen aus den Nebennieren vom Rind	37
2.2.3 Markierung von LDCVs in BCC	38
2.2.3.1 Elektroporation	39
2.2.3.2 Virusaktivierung und Transfektion der Zellen	39
2.2.3.3 Fluoreszenzter Falscher Neurotransmitter 511 (FFN511)	41
2.2.4 Chemische Fixierung und Immuncytochemie	41
2.2.5 Strukturierte Beleuchtungsmikroskopie (SIM)	43
2.2.6 Aufbau des Messplatzes	44
2.2.7 Patch-Clamp Technik	46
2.2.8 TIRF-Mikroskopie (TIRFM)	49
2.2.9 Ratiometrische Fura-Messungen	50
2.2.10 Messprotokolle	52
2.2.10.1 Stimulation durch Depolarisationsreihen oder UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA	52
2.2.10.2 Stimulation durch hohe intrazelluläre Calciumkonzentrationen	54
2.2.11 Analyse der Daten	55
2.2.11.1 Bildanalyse	55
2.2.11.2 Die „Caging Diameter“ Analyse	56
2.2.11.3 Verweildauer der LDCVs an der Membran	57
2.2.11.4 Analyse der Sekretion in TIRFM und Identifizierung von „dead-end“ Vesikeln	57
2.2.11.5 Die Veränderung der Membrankapazität als Indikator für Sekretion	58
2.2.11.6 Bestimmung von Sekretionsraten	58
2.2.12 Statistiken	59

3. Ergebnisse	60
Teil 1: Die Rolle von ATP bei Docking, Priming und Sekretion	60
3.1 Einfluss von ATP auf die Sekretion	60
3.2 Dichte der LDCVs in TIRFM in Abhängigkeit von ATP	61
3.3 Abhängigkeit des Dockings von ATP	62
3.4 Die Rolle von ATP beim Priming	63
3.5 Inhibierung von ATP-Bindeproteinen und dessen Auswirkung auf Docking, Priming und Sekretion	65
Teil 2: „Dead-end“ Vesikel	69
3.6 Maturierung und Verteilung von LDCVs	69
3.7 Sekretion bei verschiedenen Arten von Stimuli	74
3.7.1 Stimulation durch Depolarisationsreihen	74
3.7.2 Stimulation durch UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA	77
3.7.3 Sekretion durch Langzeitstimulation mit hoher $[Ca^{2+}]_i$	84
3.8 „Dead-end“ Vesikel: Identifikation und Quantität	88
3.9 Molekularer Mechanismus des „dead-end“ Dockings	90
3.10 Expression von Munc18-2	91
3.10.1 Analyse der Sekretion bei Expression von Munc18-2	92
3.10.2 Quantität der „dead-end“ Vesikel	93
3.11 Expression von Stx1A L165A/E166A	95
3.11.1 Analyse der Sekretion bei Expression von Stx1A L165A/E166A	95
3.11.2 Quantität der „dead-end“ Vesikel	98
3.12 Überexpression von SNAP-25	99
3.12.1 Analyse der Sekretion bei Überexpression von SNAP-25	99
3.12.2 Quantität der „dead-end“ Vesikel	101
4. Diskussion	103
4.1 Die Rolle von ATP bei Docking, Priming und Sekretion	103
4.1.1 Einfluss von ATP auf die Sekretion	103
4.1.2 Inaktivierung von Calciumkanälen durch ATP-Mangel	104
4.1.3 Die Rolle von ATP beim Docking	105
4.1.4 Abhängigkeit des Primings von ATP	106
4.1.5 Inhibierung von ATP-Bindeproteinen und dessen Auswirkung auf Docking, Priming und Sekretion	109
4.2 „Dead-end“ Vesikel	111
4.2.1 Maturierung und Verteilung von LDCVs	111
4.2.2 Sekretion bei verschiedenen Arten von Stimuli	112
4.2.3. Molekularer Mechanismus des „dead-end“ Dockings: Expression von Munc18-2 und Stx1A L165A/E166A, Überexpression von SNAP-25	116

4.2.3.1 Die Rolle von Munc18 bei der Entstehung von „dead-end“ Vesikeln	117
4.2.3.2 Die Rolle von Syntaxin bei der Entstehung von „dead-end“ Vesikeln	119
4.2.3.3 Die Rolle von SNAP-25 bei der Entstehung von „dead-end“ Vesikeln	120
5. Literaturverzeichnis	123
Publikationen und Präsentationen	142
Danksagung	143
Curriculum Vitae	144

Zusammenfassung

Der sekretorische Zyklus von „large dense core vesicles“ (LDCVs) in Chromaffinzellen ist heute weitestgehend bekannt. LDCVs werden im Zytosol der Zellen mit Neurotransmittern befüllt, translozieren zur Plasmamembran (PM) und werden dort verankert, ein Schritt, der Docking genannt wird. Bevor sie mit der PM fusionieren und Neurotransmitter und Peptide freisetzen können, ist ein weiterer Prozess, das Priming nötig. Durch diesen Schritt werden die LDCVs fusionskompetent. Der Einstrom von Calcium in die Zelle durch spannungsabhängige Calciumkanäle verursacht einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und löst die Fusion von LDCV- und Plasmamembran aus. In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, in welchem Schritt des sekretorischen Zyklus das energieliefernde Protein ATP (Adenosintriphosphat) in bovinen Chromaffinzellen von Bedeutung ist. Dazu wurden die Zellen in der Ganzzellaufleitung elektrophysiologisch gemessen und gleichzeitig die Bewegung fluoreszent markierter LDCVs mittels interner Totalreflektions-Fluoreszenz-Mikroskopie (TIRFM) aufgezeichnet. Die Zellen wurden während der Messung mit unterschiedlichen Lösungen perfundiert, welche 2 oder 0 mM ATP enthielten. Die Veränderung der Membrankapazität nach dem Applizieren einer Depolarisationsreihe zeigte eine klare Abhängigkeit der Sekretion von ATP. Mittels Analyse der Verweildauer und der Beweglichkeit von LDCVs an der PM konnte jedoch keine Rolle von ATP bei Docking und/oder Priming nachgewiesen werden.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit den sogenannten „dead-end“ Vesikeln. Bisher ist nichts über diese LDCVs bekannt, weshalb die Aufgabenstellung sowohl ihren Nachweis *in vivo*, als auch die Untersuchung des molekularen Mechanismus des „dead-end“ Dockings beinhaltete. Erneut wurden elektrophysiologische Messungen mit TIRFM kombiniert. Zur Stimulation der Zellen kamen verschiedenen Lösungen mit einer hohen Calciumkonzentration (1, 6 oder 15 μM) zum Einsatz. Die Perfusion der Zellen mit diesen Lösungen für mindestens 5 min und die anschließende Analyse der aufgezeichneten TIRFM-Filme zeigte, dass „dead-end“ Vesikel *in vivo* existieren und einen Anteil von ca. 15% aller LDCVs ausmachen. Ein aus *in vitro* Experimenten bekanntes Phänomen zwischen bestimmten Docking-Faktoren wurde als Ansatz für die Untersuchungen zur Entstehung dieser LDCVs herangezogen. Die SNARE-Proteine (engl. soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) Syntaxin und SNAP-25 (engl. synaptosomal-associated protein of 25 kDa) können nicht nur einen Komplex in einer 1:1 Stöchiometrie bilden, welcher als Akzeptor-Komplex zum Verankern der LDCVs in der PM dient. Zusätzlich kann an diesen Komplex ein zweites Syntaxin-Molekül binden, so dass ein unproduktiver 2:1 Komplex entsteht. Hypothetisch könnten LDCVs an diesen Komplex docken, wodurch der Priming-Schritt blockiert wäre und diese LDCVs keine Fusionskompetenz erlangen könnten. Der

unproduktive Akzeptor SNARE-Komplex könnte somit für die Entstehung von „dead-end“ Vesikeln *in vivo* verantwortlich sein. Das Protein Munc18 ist dafür bekannt, den 1:1 Akzeptor SNARE-Komplex zu stabilisieren und dadurch die Bindung eines zweiten Syntaxin Moleküls zu verhindern. Die Expression der Isoform Munc18-2 führte in bovinen Chromaffinzellen zu einer Abnahme des Anteiles von „dead-end“ Vesikeln von 14% auf 5%, was einen ersten Hinweis darauf gab, dass der vermutete molekulare Prozess zur Entstehung von „dead-end“ Vesikeln der Realität entsprechen könnte. Auch durch die Überexpression von SNAP-25 konnte eine Reduktion der Anzahl von „dead-end“ Vesikeln von 15% auf 5% erzielt werden. Die höhere Konzentration von SNAP-25-Molekülen führte in den Zelle dazu, dass mehr 1:1 als 2:1 Akzeptor SNARE-Komplexe entstehen. Um einen Anstieg des Anteiles von „dead-end“ Vesikeln zu verursachen wurde Syntaxin überexprimiert. Durch die erhöhte Anzahl von Syntaxin-Molekülen in den Zellen konnte eine Verdoppelung des Anteiles der „dead-end“ Vesikel von 15% in Kontrollzellen auf 30% beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass „dead-end“ Vesikel *in vivo* existieren. Die Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass diese LDCVs entstehen, wenn sie an Akzeptor SNARE-Komplexe aus zwei Syntaxin und einem SNAP-25 Molekül docken. Dieser Schritt muss allerdings noch weiter charakterisiert werden, auch um herauszufinden, welches Protein für die Interaktion der LDCVs mit dem Akzeptor SNARE-Komplex verantwortlich ist.

Summary

The secretory cycle of large dense core vesicles (LDCVs) in chromaffin cells is well known. LDCVs are filled with neurotransmitter in the cytosol before they translocate to the plasma membrane and engage in docking. Prior to fusion with the plasma membrane to release neurotransmitters and peptides, an additional step called priming is necessary. Priming allows LDCVs to gain fusion competence. Upon calcium influx through voltage gated calcium channels the intracellular calcium concentration rises, a trigger for fusion of the LDCVs with the plasma membrane.

The aim of this work was to investigate the role of the energy serving molecule ATP (Adenosintriphosphate) in the secretory cycle. To examine this, cells were patch-clamped in the whole-cell configuration and perfused via the patch pipette with solutions containing 2 or 0 mM ATP. Simultaneously, the mobility of fluorescently labelled LDCVs was observed using total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM). The change in membrane capacitance, after applying a train of depolarizations, clearly showed that secretion is dependent on ATP. However, analysis of LDCVs' residence time and mobility at the PM did not show any role for ATP in docking and/or priming.

The second part of this work was about the dead-end vesicles. Until now there is nothing known about these type of LDCVs. That's why the aim of this work was to verify their existence *in vivo* as well as the examination of the molecular mechanism of dead-end docking. Again a combination of electrophysiological measurements and TIRFM was used. Cells were stimulated by perfusion with different concentrations of calcium (1, 6, or 15 μ M) through the patch pipette for at least 5 min. Analysing the TIRFM movies revealed that about 15% of all LDCVs visible at the plasma membrane are dead-end vesicles. It is known from *in vitro* experiments, that the interaction of the SNARE proteins (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) Syntaxin and SNAP-25 (synaptosomal-associated protein of 25 kDa) do not only result in a complex of 1:1 stoichiometry, which acts as anchor for LDCVs in the plasma membrane. Furthermore, a second Syntaxin molecule can interact to build an unproductive acceptor complex. Hypothetically, LDCVs can dock to this unproductive complex, but they cannot be primed to gain fusion competence. Therefore, the 2:1 SNARE acceptor complex could be the reason for the existence of dead-end vesicles *in vivo*. The protein Munc18 is known to stabilize the 1:1 acceptor complex by preventing the binding of a second Syntaxin molecule. The expression of Munc18-2 in bovine chromaffin cells led to a decrease in the amount of dead-end vesicles from 14% in control cells to 5%. This was a first hint, that the hypothesized molecular mechanism of dead-end docking could be real. The overexpression of SNAP-25 also caused a reduction in the amount of dead-end vesicles from 15% to 5%. This could be explained by higher SNAP-25 concentrations in the

cell, which led to the generation of more 1:1 than 2:1 acceptor SNARE complexes. To provoke an increase in the amount of dead-end vesicles, Syntaxin was overexpressed. By increasing the Syntaxin concentration in the cells, the amount of dead-end vesicles was doubled from 15% in control cells to about 30%.

In summary, this work showed for the first time that dead-end vesicles exist *in vivo* and the results strongly point to the unproductive SNARE acceptor complex as serving to dock dead-end vesicles. Further experiments are required to determine which protein mediates the contact between dead-end vesicles and the acceptor SNARE complex.

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMP-PCP	β,γ -Mehtylenadenosine 5'-triphosphat
AOTF	engl. acousto optic tunable filter
AP	Aktionspotential
α/β -SNAP	engl. α/β soluble NSF attachment protein
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraazetische Säure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
$[Ca^{2+}]$	Calciumkonzentration
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Calciumkonzentration
cAMP	zyklisches AMP
CAPS	engl. calcium dependent activator protein for secretion
CD	Caging Diameter
C_m	Membrankapazität
CMV	Cytomegalo-Virus
ΔC_m	Veränderung der Membrankapazität
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
DP	engl. Depotpool, Reserve-Pool
DPTA	Di-Ethylentriaminopentaazetische Säure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGTA	Ethylenglycol-tetraazetische Säure
engl.	englisch
etc.	et cetera
fF	Femtofarad
F	Farad
F-Aktin	filamentöses Aktin
FCS	fetales Kälberserum
FFN511	Fluoreszenter falscher Neurotransmitter 511

GFP	grün fluoreszentes Protein
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde
HEDTA	N-(2-Hydroxyethyl) ethylenediamintriessigsäure
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonisäure
HPLC	engl. high performance liquid chromatography
Hz	Hertz
I	Strom
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
IRP	sofort freisetzbarer Pool (engl. immediately releasable pool)
ITS-X	Insulin-Transferin-Selenium-X
K _d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
kum.	kumulativ
LB Medium	engl. lysogeny broth medium
LDCV	große, elektronendichte Granula (engl. large dense core vesicle)
μ	micro
μs	Microsekunde
μM	Micromolar
M	Molar
m/s	Meter pro Sekunde
mCherry	monomerisches rot fluoreszierendes Protein
min	Minute
Mint	Munc18 interagierendes Protein
Mio	Millionen
mOsm	Milliosmol
mV	Millivolt
N	Anzahl der gemessenen Zellen
NA	numerische Apertur
NGS	normales Ziegenserum
nm	Nanometer
norm.	normalisiert
NP-EGTA	Nitrophenyl EGTA
NPY	Neuropeptid Y
NSF	N-ethylmaleimid sensitiver Faktor

Ori	engl. origin of replication; Replikationsursprung eines Plasmids
p	pico
Pen	Penicillin
pF	Picofarad
PI	Phosphoinositid
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenii
PtdIns	Phosphatidylinositol
PtdIns(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PM	Plasmamembran
RIM	Rab3 interagierendes Molekül
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
RRP	schnell freisetzbarer Pool (engl. rapidly releasable pool)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SCV	engl. small clear vesicles
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
sez.	sezerniert
SFV	Semliki Forest Virus
SIM	Strukturierte Beleuchtungsmikroskopie
SNAP-25	engl. synaptosome associated protein of 25 kDa
SNARE	engl. soluble NSF attachment protein receptor
SRP	langsam freisetzbarer Pool (engl. slowly releasable pool)
Stim	Stimulation
Strep	Streptomycin
SV	synaptische Vesikel
TAE	Tris-Acetat-EDTA
t-SNARE	SNARE Protein auf der Zielmembran
TIRFM	interne Totalreflektions-Fluoreszenz-Mikroskopie (engl. total internal reflection fluorescence microscopy)
U	Ladung
UPP	Pool nicht geprimter LDCVs (engl. unprimed Pool)

UV	Ultraviolett
V	Volt
VMAT	vesikulärer Monoamintransporter
v-SNARE	vesikuläres SNARE Protein
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Zell-Zell-Kommunikation

Die Kommunikation zwischen Zellen ist ein essentieller Prozess im Körper. Im Zuge der Evolution haben sich Mechanismen der Zell-Zell-Kommunikation entwickelt und Organ-, Gewebe- oder Zelltyp-spezifisch angepasst, so dass heute viele Wege der Signalübertragung existieren. Das grundlegende Prinzip lässt sich vereinfachen auf eine Senderzelle, welche ein Signal abgibt und eine Empfängerzelle, die dieses Signal über einen Rezeptor empfängt und verarbeitet. Das wichtigste Organ bei der Signalübertragung ist das Gehirn, welches Informationen verarbeitet und Verhalten koordiniert. Im Gehirn funktioniert die Signalübertragung durch Nervenzellen (Neurone), den Bausteinen des Gehirns. Das Signal wird über einen Fortsatz (Axon) elektrisch weitergeleitet, wobei das elektrische Signal aus der Veränderung des elektrochemischen Gradienten der PM besteht. Wird das Ruhemembranpotential (-80 mV) z. B. durch ein Aktionspotential (AP) depolarisiert, so führt dies zur elektrischen Weiterleitung des Signals entlang des Axons. Dabei spielen spannungsabhängige Natriumkanäle eine wichtige Rolle, welche durch die Veränderung des Membranpotentials aufgrund des APs öffnen und einen Natriumeinstrom ermöglichen, was zur Depolarisation der Zelle führt. Axone können im menschlichen Körper eine Länge von einem Meter erreichen und Signale mit Geschwindigkeiten zwischen 1 und 120 m/s weiterleiten, bis diese die Synapse erreichen (Nicholls J.G., 1992). Damit das elektrische Signal hier auf ein anderes Neuron übertragen werden kann, muss es in ein chemisches Signal umgewandelt werden. Erreicht ein AP die Synapse, so öffnen sich spannungsabhängige Calciumkanäle und es kommt zu einem Einstrom von Calcium (Ca^{2+}) in die Synapse. Der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) löst die Exozytose aus. Bei der Exozytose an Synapsen fusionieren synaptische Vesikel (SVs) mit der PM und entleeren ihren Inhalt (Neurotransmitter) in den synaptischen Spalt, welcher zwei hintereinander geschaltete Neurone trennt. Die Neurotransmitter werden in hoher Konzentration freigesetzt und legen die Strecke bis zur Postsynapse durch Diffusion in weniger als einer Millisekunde zurück. An der Postsynapse befinden sich spezielle Rezeptoren für die freigesetzten Neurotransmitter. Binden diese an die Rezeptoren, so öffnen Ionenkanäle, wodurch das chemische Signal wieder in ein elektrisches umgewandelt und an diesem Neuron weitergeleitet wird (Siegelbaum und Kandel, 1991).

Man unterscheidet zwei Formen der Exozytose. Im Gegensatz zur konstitutiven Exozytose, welche für die Membranbiogenese notwendig ist, werden bei der regulierten Exozytose erst auf ein Signal hin Botenstoffe freigesetzt. Dies erlaubt eine kontrollierte Ausschüttung von

Neurotransmittern aus Vesikeln, wie z. B. an den Synapsen der Neurone. Dort gibt es eine spezielle Struktur, die aktive Zone, welche den Ort der Exozytose darstellt und synaptische Vesikel enthält (Zhai und Bellen, 2004; Fejtova und Gundelfinger, 2006).

1.2 Chromaffinzellen als Modellzellen für regulierte Exozytose

Neben Neuronen zeigen auch andere Zelltypen regulierte Exozytose, wie die in dieser Arbeit verwendeten Chromaffinzellen (Abb. 1). Diese befinden sich in Nebennieren, welche zum sympathischen Nervensystem zählen und durch den *Nervus splanchnicus minor* innerviert werden. Nebennieren bestehen aus einem inneren Gewebe, der Medulla, welche vom Kortex umgeben ist. Die Medulla enthält die Chromaffinzellen und stellt den Ort der Katecholaminsekretion dar. Die Bezeichnung Katecholamin (dazu zählen z. B. Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin) ist auf das enthaltene Brenzcatechin (engl. Catechol) zurück zu führen. Die Katecholamine werden in den Blutkreislauf abgegeben. Sie sind in Granulen enthalten, welche durch ihre hohe Elektronendichte in elektronenmikroskopischen Aufnahmen auffielen und deshalb elektronendichte Granulen (engl. „large dense core vesicles“, LDCVs) genannt wurden. Die Freisetzung der Katecholamine geschieht innerhalb von Millisekunden (Morgan und Burgoyne, 1997) und erfolgt hauptsächlich als Antwort in Stress- und Gefahrensituationen, wodurch Herzfrequenz und Blutdruck steigen, Bronchien erweitert werden und Energiereserven kurzfristig durch Fettabbau (Lipolyse) bereitgestellt werden können. Zusätzlich hat die Ausschüttung von Katecholaminen eine Steigerung der Biosynthese von Glukose, sowie deren Freisetzung zur Folge (Axelrod und Reisine, 1984).

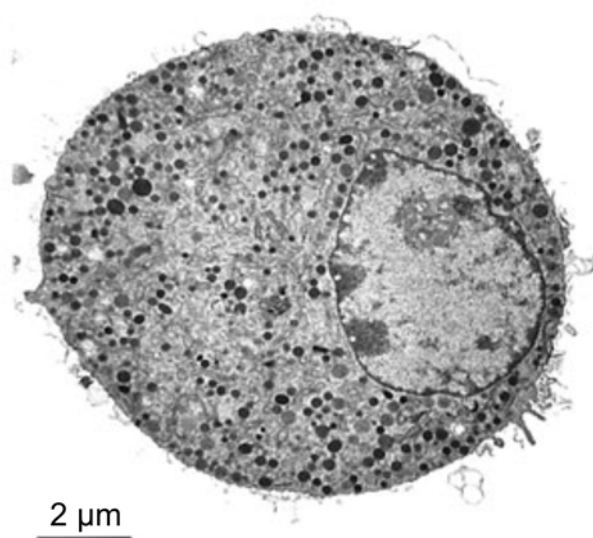


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer bovinen Chromaffinzelle. Deutlich zu erkennen sind der Zellkern sowie die LDCVs, von denen eine Zelle durchschnittlich zwischen 20.000 und 30.000 Stück enthält. (Modifiziert aus Ashery et al., 2000)

Lange Zeit wurde angenommen, dass neuroendokrine Zellen und Nervenzellen des sympathischen Systems von den gleichen Vorläuferzellen abstammen. Jedoch gehen sie

scheinbar von unterschiedlichen Subtypen der Vorläuferzellen aus (Unsicker et al., 2005). Ein weiterer Unterschied zwischen beiden Zelltypen ist der Speicherort der Botenstoffe. Neurone nutzen dazu hauptsächlich synaptische Vesikel mit einem Durchmesser von etwa 40 nm (Südhof, 2004), in welchen kleine chemische Substanzen (Neurotransmitter wie Acetylcholin, Glutamat, etc.) gespeichert sind. Chromaffinzellen haben mit den LDCVs (ca. 350 nm Durchmesser) einen größeren Botenstoffspeicher (Plattner et al., 1997; Oheim et al., 1998). In LDCVs sind auch größere Neuropeptide wie Neuropeptid Y enthalten. Weiterhin unterscheiden sich die Lebenszyklen von SVs und LDCVs. LDCVs werden immer durch Abschnürung vom *trans*-Golgi Netzwerk neu gebildet (Burgoyne und Morgan, 2003), wogegen synaptische Vesikel hauptsächlich aus Recyclingprozessen der präsynaptischen Membran entstehen (Südhof, 2004). Der sekretorische Zyklus in Neuronen und Chromaffinzellen ist sehr ähnlich, da beide Zelltypen hauptsächlich die gleichen Proteine für die regulierte Exozytose nutzen (Burgoyne und Morgan, 1998; Burgoyne und Morgan, 2003; Scalettar, 2006). Jedoch fehlen in Chromaffinzellen die in neuronalen Synapsen vorkommenden Aktiven Zonen. Auch einige Proteine, welche in Neuronen essentiell für die Exozytose sind (z. B. Munc13-1), scheinen in Chromaffinzellen eine geringere Bedeutung zu haben. Die Anatomie beider Zelltypen ist ebenfalls sehr verschieden. Während Neurone verzweigte Dendriten besitzen, die vom Zellkörper mit Nukleus abzweigen, sind Chromaffinzellen sphärisch und ohne jede nachweisbare Polarisierung. Trotz all dieser Unterschiede stellen Chromaffinzellen Modellzellen für die regulierte Exozytose dar, da sie einige Vorteile gegenüber Neuronen zeigen. Ein wichtiger Vorteil ist die Möglichkeit, große Zellmengen zu isolieren. Die runde Anatomie der Chromaffinzellen vereinfacht elektrophysiologische Messungen mit der Patch-Clamp Technik. Zusätzlich bieten Chromaffinzellen die Möglichkeit, Exozytose mit verschiedenen Methoden zu messen. Die aus LDCVs sezernierten Katecholamine sind oxidierbare Substanzen, so dass mittels Kohlefaser-Amperometrie sogar die Freisetzung einzelner LDCVs detektierbar ist (Bruns, 2004; Borisovska et al., 2005; Neher und Sakaba, 2008). Im Gegensatz dazu zeigt in Neuronen die Messung postsynaptischer Ströme, welche die am weitesten verbreiteste Technik zur Untersuchung von Neurotransmission an Neuronen darstellt, einige Probleme. Exzessive Freisetzung von Neurotransmittern kann nicht detektiert werden, da die postsynaptischen Rezeptoren saturieren. Durch die Diffusion der Transmitter von der Prä- zur Postsynapse entsteht außerdem eine Verzögerung der Reiz-Antwort-Kopplung. Eine zusätzliche Messung auf präsynaptischer Seite ist aufgrund ihrer geringen Größe schwierig. Auch die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ ist in Neuronen erschwert, da sich Calciumindikatoren aufgrund der verzweigten Struktur von Neuronen langsam und ungleichmäßig verteilen. Die leichtere Zugänglichkeit in Kultur sowie die elektrischen Eigenschaften machen

Chromaffinzellen zu einem geeigneten Modell, um mittels elektrophysiologischen Methoden charakterisiert zu werden.

1.3 Exozytose in Chromaffinzellen

Bevor LDCVs mit der Plasmamembran (PM) fusionieren können, müssen sie einige molekulare Reifestadien durchlaufen (Abb. 2). Der Lebenszyklus der LDCVs beginnt im Golgi-Apparat, wo sie mit Neuropeptiden beladen werden. Anschließend folgt die Abschnürung vom *trans*-Golgi Netzwerk. In der LDCV-Membran befinden sich bereits Transporter, welche Katecholamine ins Lumen der LDCVs transportieren, wie z. B. der vesikuläre Monoamintransporter (VMAT1/2) (Gubernator et al., 2009). Sind die LDCVs beladen, so zählen sie zum Reserve-Pool (engl. Depotpool, DP). Vom DP ausgehend werden sie zur PM transportiert, wo sie in einem als Docking bezeichneten und reversiblen Schritt verankert werden (Oheim et al., 1998; Verhage und Sørensen, 2008). Zu den gedockten LDCVs zählen diejenigen, welche sich in einem kleineren Abstand als 300 nm an der PM befinden (Plattner et al., 1997; Steyer et al., 1997; Stevens et al., 2011). Nach dem Docking folgt ein Reifeprozess, der Priming genannt wird und ebenfalls reversibel ist. Geprimte LDCVs sind fusionskompetent und können nach einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ mit der PM fusionieren. Dabei wird der Inhalt der LDCVs in den extrazellulären Raum freigesetzt. Die bei der Fusion in die PM integrierte LDCV-Membran wird durch Endozytose wieder verwertet, indem sie durch Endosomen zum Golgi-Apparat transportiert wird. In manchen Fällen fusionieren LDCVs nicht komplett mit der PM, sondern bilden nur kurzzeitig eine Fusionspore aus („kiss-and-run“ Exozytose). In diesen Fällen kann das LDCV sofort wieder mit Neurotransmittern befüllt werden (Artalejo et al., 2002; Holroyd et al., 2002; Taraska et al., 2003; Fulop und Smith, 2006; Ceridono et al., 2011).

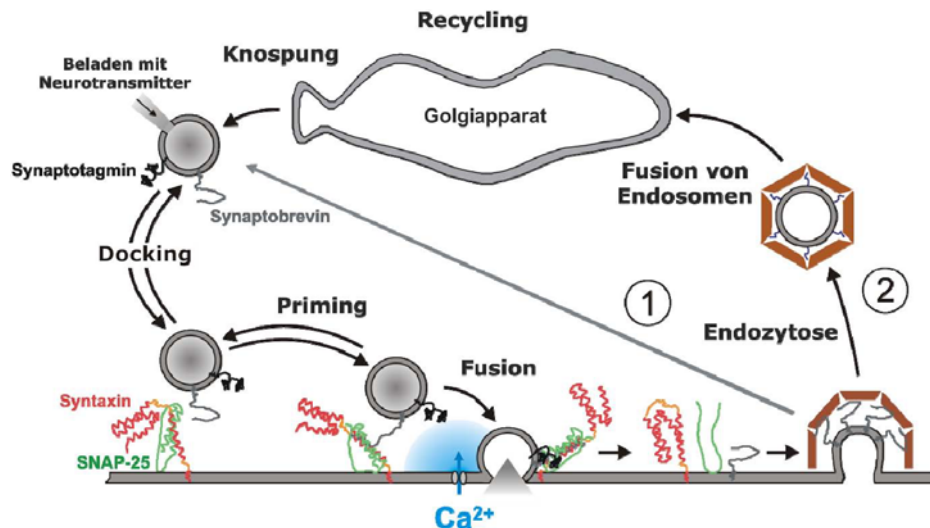


Abb. 2: LDCV-Zyklus in Chromaffinzellen. LDCVs entstehen durch Knospung vom Golgi-Apparat, nach welcher sie im Zytosol mit Neurotransmittern beladen werden. Vor der Fusion mit der PM werden sie dort verankert (Docking) und reifen (Priming) zu fusionskompetenten LDCVs. Öffnen spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle aufgrund eines Reizes, so kommt es zum Ca^{2+} -Einstrom, wodurch die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ steigt und die LDCVs mit der PM fusionieren. Um die Größe der Zellen stabil zu halten wird die LDCV-Membran anschließend endozytiert. Dies geschieht entweder durch erneute Befüllung mit Neurotransmittern, wenn die Fusionspore nur kurz ausgebildet war (1), oder durch Transport mit Endosomen zum Golgi-Apparat (2). (Modifiziert nach Becherer und Rettig, 2006)

LDCVs werden neben dem DP in weitere Pools eingeteilt (Abb. 3). An der PM gedockte und nicht geprimte LDCVs werden zum ungeprimten Pool (engl. unprimed pool, UPP) gezählt. Geprimte LDCVs dagegen gehören entweder zum langsam freisetzbaren Pool (engl. slowly releasable pool, SRP) oder zum schnell freisetzbaren Pool (engl. rapidly releasable pool, RRP), je nach ihrer Freisetzungskinetik. Innerhalb des RRP existiert ein zusätzlicher Pool, der sogenannte sofort freisetzbare Pool (engl. immediately releasable Pool, IRP). Dieser beinhaltet LDCVs in unmittelbarer Nähe von Ca^{2+} -Kanälen, um welche bei Ca^{2+} -Einstrom Mikrodomänen mit erhöhten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ entstehen. Somit sind die LDCVs des IRPs als erstes von höheren $[\text{Ca}^{2+}]_i$ umgeben und zeigen die schnellsten Fusionskinetiken. Der DP und der Pool gedockter LDCVs (d.h. UPP, RRP und SRP) wurden mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen charakterisiert: der DP enthält etwa 2.000 LDCVs, dagegen sind 600-850 LDCVs morphologisch an der PM gedockt (Parsons et al., 1995; Plattner et al., 1997; Oheim et al., 1998; Rettig und Neher, 2002). Da in elektronenmikroskopischen Aufnahmen keine Unterscheidung zwischen den einzelnen Pools gedockter LDCVs möglich ist, wurden die Größen von RRP und SRP mit elektrophysiologischen Messungen bestimmt. Die PM funktioniert elektrisch gesehen wie ein Kondensator, so dass die gemessene Membrankapazität direkt mit der Membranoberfläche und somit mit der Größe der Zelle korreliert (Fenwick et al., 1982). Durch die Fusion eines LDCVs mit der PM nimmt die Größe der Zelle und damit die Membrankapazität zu. Dabei entspricht ein fusionierendes LDCV einem Anstieg der Membrankapazität von 1,9 fF (Dernick et al., 2005). Durch Endozytose

wird die Membranoberfläche reduziert, was sich in einer Abnahme der Membrankapazität zeigt. Um RRP und SRP zu charakterisieren wurde die Blitzlichtphotolyse von UV-sensitiven Puffern eingesetzt (Rettig und Neher, 2002). Dabei liegt Ca^{2+} in der Zelle in hohen Konzentrationen vor, ist aber an Puffer gebunden und wird durch einen UV-Blitz freigesetzt, was zu einem schnellen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt. Die dadurch verursachte Zunahme der Membrankapazität bestand aus drei verschiedenen Komponenten, welche den unterschiedlichen Pools zugeordnet werden konnte (Abb. 3). Die ersten beiden Komponenten bilden zusammen den so genannten „burst“. Dabei ist die Freisetzungsrates der ersten Komponente wesentlich schneller (30 LDCVs/s) als die der zweiten Komponente (3 LDCVs/s) und entspricht der Fusion von LDCVs aus dem RRP (Rettig und Neher, 2002). Sie wird auch als schneller „burst“ bezeichnet. Die Freisetzung von LDCVs aus dem SRP wird der zweiten, langsameren Komponente zugeordnet, welche deshalb auch als langsamer „burst“ bezeichnet wird. Aus der Summe des Anstiegs beider Komponenten lässt sich die Anzahl aller fusionskompetenten, also geprimten, LDCVs zum Zeitpunkt der Stimulation bestimmen. Die dritte Komponente (verzögerte Komponente) ist deutlich langsamer als die beiden ersten und steigt nicht, wie die Komponenten eins und zwei, exponentiell, sondern linear. Sie spiegelt Priming und Fusion von LDCVs aus dem UPP wieder. Unter Verwendung der in elektronenmikroskopischen Aufnahmen festgestellten Anzahl gedockter LDCVs (600-850) und der mittels elektrophysiologischer Messungen errechneten Anzahl von je 100 LDCVs in RRP und SRP ergibt sich eine Größe des UPPs von ca. 400-650 LDCVs (Rettig und Neher, 2002). Somit sind deutlich mehr LDCVs gedockt als fusionskompetent.

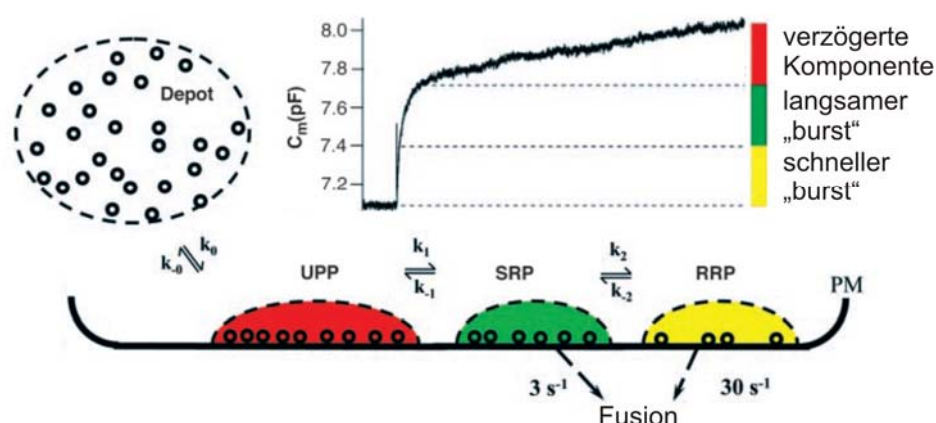


Abb. 3: LDCV-Pools und Kinetiken. Bei Stimulation mit UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA (Nitrophenyl-Ethylenglycol-tetraazetische Säure) zeigt die Membrankapazität drei Komponenten (Graph). Die Fusion aus RRP und SRP werden der schnellen (gelb) und langsamen (grün) Komponente zugeordnet, die verzögerte Komponente entsteht durch Priming und Sekretion der LDCVs aus dem UPP (rot). (Modifiziert nach Rettig und Neher, 2002)

Nicht nur durch Patch-Clamp Techniken, sondern auch mittels Echtzeitvisualisierung von LDCVs ist es möglich, die verschiedenen Stadien im sekretorischen Zyklus von LDCVs zu untersuchen. Mit Hilfe einer Beweglichkeitsanalyse (engl. Caging Diameter Analysis) kann die Mobilität und somit das molekulare Stadium der LDCVs bestimmt werden (Nofal et al., 2007). Demnach sind gedockte LDCVs mobil, während sie durch den Priming-Schritt immobilisiert werden.

Unverzichtbar für die Sekretion von LDCVs sind die SNARE Proteine (engl. soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor). Sie gehören zu einer großen Proteinfamilie, welche die Fusion zwischen intrazellulären Kompartimenten vermitteln und alle das so genannte SNARE-Motiv aufweisen (Jahn und Scheller, 2006). Diese 60-70 Aminosäuren lange Sequenz befindet sich in der zytosolischen Domäne der Proteine und dient der Ausbildung des SNARE-Komplexes (Fasshauer et al., 1998; Jahn und Südhof, 1999; Pelham, 1999; Lin und Scheller, 2000). Die auf den LDCVs aufzufindenden SNARE Proteine heißen v-SNAREs („v“ steht für engl. vesicular), dagegen werden jene, welche sich auf der Membran des Zielkompartimentes befinden, t-SNAREs („t“ steht für engl. target) genannt. Bei der regulierten Exozytose spielen das v-SNARE Synaptobrevin, sowie SNAP-25 (engl. synaptosomal-associated protein of 25 kDa) und Syntaxin (t-SNAREs) eine wichtige Rolle. Die genaue Funktion der einzelnen SNAREs ist in den Kapiteln 1.4, 1.5 und 1.6 beschrieben.

1.4 Docking und involvierte Proteine

Der Docking-Schritt kann auf verschiedene Arten definiert werden. Morphologisch gedockte LDCVs zeichnen sich durch ihren geringen Abstand (weniger als 300 nm) oder den Kontakt zur PM in elektronenmikroskopischen Aufnahmen aus (Plattner et al., 1997, Steyer et al., 1997; Stevens et al., 2011). Aus biochemischer Sicht beinhaltet Docking das Verankern von LDCVs an der PM durch die Ausbildung des Akzeptor SNARE-Komplexes (Xu et al., 1999). Im Gegensatz dazu werden LDCVs als funktionell gedockt bezeichnet, wenn sie aufgrund einer Stimulation mit der PM fusionieren können. Der Docking-Schritt beinhaltet ebenfalls den Transport von LDCVs aus dem DP zur PM.

Am Docking beteiligte Proteine können durch einen Docking-Phänotyp nach Deletion des entsprechenden Genes identifiziert werden. Dieser Phänotyp zeichnet sich durch eine geringe Anzahl von LDCVs an der PM aus, während die Gesamtanzahl aller LDCVs in der Zelle konstant bleibt. Durch die Abnahme der Anzahl von LDCVs an der PM und damit in UPP, RRP und SRP führt die Deletion von Docking-Faktoren außerdem zu einer Reduktion der Sekretion. Die Überexpression von Docking-Faktoren sollte zu einem gegenteiligen

Effekt führen: einer höheren LDCV-Dichte an der PM während die Gesamtzahl der LDCVs in der Zelle unverändert bleibt. Zusätzlich ist nach Stimulation mit UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA eine stärkere Sekretionsantwort in RRP, SRP und der verzögerten Komponente zu erwarten. Die Sekretionskinetiken aus allen Pools sollte unverändert bleiben.

Docking lässt sich mit verschiedenen Techniken, wie Elektronenmikroskopie und Elektrophysiologie, untersuchen. Außerdem eignet sich die TIRFM, mit welcher die Vorgänge direkt an der PM beobachtet werden können.

Viele Proteine, die mit Docking in Verbindung gebracht werden, scheinen auch in weitere Schritte der Sekretion involviert zu sein (z. B. Munc18-1 beim Priming; Gulyás-Kovács et al., 2007). Dies macht die Untersuchung des Docking-Schrittes schwierig, da die Deletion eines Proteines zu vielen Veränderungen in der Zelle führen kann.

1.4.1 SNAP-25, Syntaxin und Synaptotagmin

SNAP-25 und Syntaxin sind beide in der PM lokalisiert und bilden einen 1:1 Komplex, an welchen LDCVs docken und der die Grundlage für das Priming darstellt (Fasshauer und Margittai, 2004; Zilly et al., 2006). Null-Mutanten von SNAP-25 zeigten einen Docking-Phänotyp in Chromaffinzellen, welcher durch Überexpression von SNAP-25 in der Null-Mutante ausgeglichen werden konnte (de Wit et al., 2009). Die Überexpression des Proteins führte in Chromaffinzellen zu variierenden Ergebnissen. Einerseits zeigten Nagy et al. (2004), dass die Größe von RRP und SRP im Vergleich zu Kontrollzellen signifikant erhöht, die verzögerte Komponente jedoch nicht beeinflusst war. Andererseits war in weiteren Publikationen keine Veränderung der Sekretion nach Überexpression von SNAP-25 zu erkennen (Criado et al., 1999; Wei et al., 2000). Die Deletion mehrerer Aminosäuren am C-Terminus von SNAP-25 führte zu einer starken Inhibierung der Sekretion (Criado et al., 1999). Dies deutet darauf hin, dass SNAP-25 neben seiner Funktion beim Docking, auch ins Priming involviert sein könnte.

Der zytosolische Bereich von Syntaxin besteht aus verschiedenen Domänen: einem N-terminalen Peptid (N-Peptid), der H_{abc} Domäne und der H3 Domäne, welche eine der vier Helices des SNARE-Komplexes darstellt. Syntaxin kann zwei verschiedene Konformationen annehmen. Die geschlossene Konformation liegt nach Bindung des Proteins Munc18-1 (siehe 1.4.2) an der H_{abc} Domäne vor, wodurch sich die H3 Domäne auf die H_{abc} Domäne faltet (Pevsner et al., 1994; Dulubova et al., 1999; Misura et al., 2000; Yang et al., 2000). Dabei entsteht zusätzlich eine schwache Bindung zwischen Munc18-1 und dem N-Peptid, wodurch die Interaktion von Syntaxin mit SNAP-25 und Synaptobrevin verhindert wird (Burkhardt et al., 2008). Vermutlich reguliert das N-Peptid die Bindung von Syntaxin-1 und SNAP-25. Beide Proteine können nur interagieren, wenn die Bindung zwischen Munc18-1 und dem N-Peptid nicht vorliegt (Burkhardt et al., 2008). Dabei kann die Interaktion von

Munc18-1 und Syntaxin-1 (Zilly et al., 2006) an der H_{abc} Domäne bestehen bleiben. Im ausgebildeten SNARE-Komplex nimmt Syntaxin die offene Konformation ein (Sutton et al., 1998; Dulubova et al., 1999).

Nach Deletion des Genes, welches für Syntaxin codiert, fand in Neuronen und neuroendokrinen Zellen keine Sekretion mehr statt. Die Anzahl gedockter LDCVs war in Neuronen unverändert, während Chromaffinzellen einen starken Docking-Phänotyp zeigten, welcher dem Phänotyp in Munc18 Nullmutanten entsprach (Voets et al., 2001; de Wit et al., 2006; Toonen et al., 2006). Zusätzlich war die Expression von Munc18-1 an der PM leicht reduziert. Somit ist Syntaxin für den Docking-Prozess in Chromaffinzellen von Bedeutung, wahrscheinlich in Verbindung mit Munc18.

Synaptotagmin ist an verschiedenen Stellen des sekretorischen Zyklus von Bedeutung. Zum Einen ist dieses Protein als Ca²⁺-Sensor für die Exozytose wichtig (Chapman, 2002; Koh und Bellen, 2003). Zum Anderen scheint Synaptotagmin beim Docking involviert zu sein, da Null-Mutanten einen Docking-Defekt zeigten (de Wit et al., 2009). Die Anzahl von LDCVs an der PM war stark reduziert und auch die Sekretion deutlich beeinflusst. Relevant beim Docking ist die Interaktion der C2B Domäne von Synaptotagmin mit SNAP-25 (de Wit et al., 2009). Demnach dockt Synaptotagmin-1 die LDCVs an den Syntaxin-1/SNAP-25 Akzeptor Komplex, was von Munc18-1 unterstützt wird, so dass diese vier Proteine die minimale Docking-Maschinerie darstellen (Abb. 4). Nach Deletion des v-SNAREs Synaptobrevin konnte kein Docking-Phänotyp erzeugt werden, so dass dieses Protein keine Rolle beim Docking zu spielen scheint (Gerber et al., 2008).

1.4.2 Munc18

Munc18 wird zur *sec1/munc18* (SM) Genfamilie gezählt, welche von der Hefe bis zu Säugetieren hoch konserviert ist. In Säugetieren existieren drei Isoformen: Munc18-1, -2 und -3. Munc18-1 wird hauptsächlich in Neuronen und neuroendokrinen Zellen exprimiert (Hata et al., 1993; Garcia et al., 1994; Pevsner et al., 1994), Munc18-2 ist in vielen Geweben, außer dem Gehirn, zu finden. In neuroendokrinen Zellen und Nebennieren der Ratte konnten nur niedrige Expressionslevel dieser Isoform nachgewiesen werden (Hata und Sudhof, 1995; Tellam et al., 1995; Han et al., 2009), während bovine Chromaffinzellen kein Munc18-2 zu enthalten scheinen (Gulyás-Kovács et al., 2007). Munc18-3 wurde in vielen nicht-neuronalen Geweben nachgewiesen (Agrawal et al., 2000).

Munc18-1 ist ein vielversprechender Kandidat für einen Docking-Faktor. In Chromaffinzellen aus Munc18-Null-Mutanten der Maus lag, im Vergleich zu Wildtyp-Zellen, eine zehnfache Abnahme von gedockten LDCVs an der PM vor, während die Gesamtzahl von LDCVs in den Zellen unverändert blieb (Voets et al., 2001; de Wit et al., 2009). Überexpression von Munc18-1 in bovinen Chromaffinzellen führte zu einem Anstieg in der Anzahl gedockter

LDCVs und verstärkter Exozytose, während die Kinetiken der Transmitter-Freisetzung unverändert blieben (Voets et al., 2001; Nili et al., 2006; Toonen et al., 2006). Dabei konnten mehrere Einflüsse von Munc18-1 auf den Docking-Schritt nachgewiesen werden. Direkt am Docking beteiligt ist Munc18-1 durch seine Wirkung auf das filamentöse Aktin (F-Aktin), für welches Munc18-1 eine hohe Affinität zeigt (Bhaskar et al., 2004). Die Dicke des kortikalen F-Aktin Ringes, welcher eine Barriere für LDCVs auf dem Weg zur PM darstellt (Nakata und Hirokawa, 1992; Trifaro et al., 2000), konnte durch Überexpression von Munc18-1 reduziert werden, was einen leichteren Zugang für LDCVs zur PM bedeutet. Im Gegensatz dazu führte die Deletion von Munc18-1 zu einem breiteren F-Aktin Ring (Toonen et al., 2006; de Wit, 2010).

Eine indirekte Rolle beim Docking zeigt Munc18-1 durch seine Chaperon-Funktion für Syntaxin-1. Munc18-1 bindet Syntaxin-1 an dessen N-terminalen H_{abc}-Domäne und sorgt dafür, dass Syntaxin-1 an die PM gelangt. Das Fehlen von Munc18-1 führte zu einer Misslokalisierung von Syntaxin-1, was durch Überexpression von Munc18-1 wieder korrigiert werden konnte (Arunachalam et al., 2008). Die Ausbildung der Bindungen von Munc18-1 mit der H_{abc} Domäne und dem N-Peptid von Syntaxin verhindert eine vorzeitige Interaktion mit Synaptobrevin und SNAP-25 vor dem Erreichen der PM (Pevsner et al., 1994; Dulubova et al., 1999; Misura et al., 2000; Yang et al., 2000; Burkhardt et al., 2008). Dies ist wichtig, da Interaktionen der SNARE-Proteine im Zytosol zu Misslokalisierungen dieser Proteine führen können (Medine et al., 2007; Arunachalam et al., 2008). An der PM unterstützt Munc18-1 die Bildung eines Komplexes aus Syntaxin-1 und SNAP-25 (Abb. 4) (Sutton et al., 1998; Dulubova et al., 1999; Toonen und Verhage, 2007; Burkhardt et al., 2008) und verhindert so die Entstehung eines nicht produktiven Komplexes aus denselben Proteinen in einer Stöchiometrie von zwei Syntaxin- und einem SNAP-25-Molekül (Gulyás-Kovács et al., 2007; de Wit et al., 2009). *In vitro* Experimente zeigten, dass SNAP-25 mit Syntaxin-1 interagieren kann, unabhängig von dessen Bindung an Munc18-1 (Burkhardt et al., 2008). Die Voraussetzung hierfür ist jedoch die Auflösung der schwachen Bindung zwischen Munc18-1 und dem N-Peptid von Syntaxin-1 (Burkhardt et al., 2008). Mit der Interaktion von Syntaxin-1 (gebunden an Munc18-1) und SNAP-25 könnte eine Konformationsänderung des Proteinkomplexes einhergehen, wodurch Munc18-1 vom binären Syntaxin-1-SNAP-25 Komplex gelöst wird. Wahrscheinlich sind an diesem Prozess weitere Proteine beteiligt.

Die Phosphorylierung von Munc18 durch die Proteinkinase C (PKC) kann eine Interaktion von Munc18 und Syntaxin verhindern, da hierdurch die Affinität von Munc18 für Syntaxin reduziert wird (Fujita et al., 1996; Misura et al., 2000; Toonen und Verhage, 2003; Nili et al., 2006). Diese Phosphorylierung kann nur stattfinden, wenn keine Bindung von Syntaxin vorliegt, so dass dieser Prozess lediglich bei der Regulierung von ungebundenem Munc18 eine Rolle spielt (Barclay et al., 2003).

Es wird angenommen, dass Munc18-1 auch beim Priming involviert ist (Gulyás-Kovács et al., 2007). Dies ist wahrscheinlich, da Munc18-1 mit verschiedenen Regionen von Syntaxin-1 (N-terminales Peptid und H_{abc} Domäne) interagieren kann, wenn der SNARE-Komplex ausgebildet ist (Dulubova et al., 2007; Shen et al., 2007; Burkhardt et al., 2008). Munc18-1 könnte so die Bildung des trimären SNARE-Komplexes (siehe 1.5) unterstützen (Meijer et al., 2012) und eine falsche Zusammensetzung der beteiligten Proteine verhindern (Toonen und Verhage, 2007).

Obwohl die Isoform Munc18-2 alle Funktionen von Munc18-1 übernehmen kann, konnte ihr keine Priming-Funktion nachgewiesen werden (Gulyás-Kovács et al., 2007). Die Expression von Munc18-2 konnte die Anzahl gedockter LDCVs in Munc18-1-Null-Mutanten wieder auf das Wildtyp-Niveau heben, während die Größe der Pools geprimter LDCVs im Vergleich zu Wildtyp-Zellen stark reduziert blieb (Gulyás-Kovács et al., 2007).

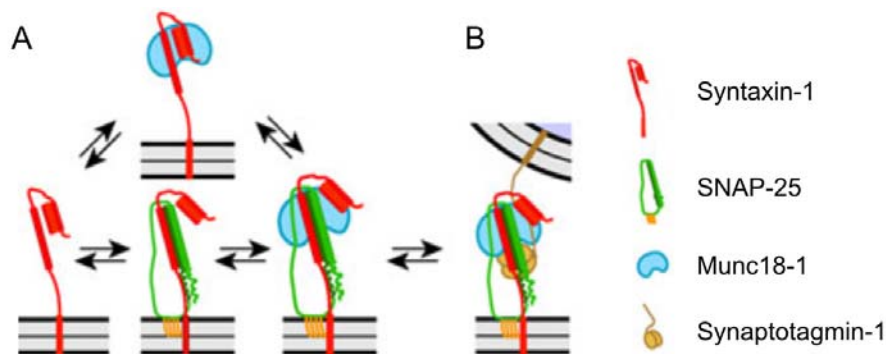


Abb. 4: Modell des minimalen Docking-Komplexes. A) Zuerst entstehen Protein-Komplexe aus Syntaxin-1 (rot) und SNAP-25 (grün), unterstützt von Munc18-1 (blau). B) Synaptotagmin-1 als vesikulärer Docking-Faktor bindet das LDCV an den Akzeptor-Komplex durch Interaktion mit SNAP-25. (Modifiziert nach de Wit et al., 2009)

1.4.3 Weitere Docking-relevante Proteine

Es gibt noch andere Proteine, die scheinbar beim Docking eine Rolle spielen. Dazu gehört z. B. Mint (Munc18-1 interagierendes Protein), welches N-terminal eine Munc18-Interaktionsdomäne aufweist (Okamoto und Sudhof, 1997). Des Weiteren besitzt Mint zwei PDZ Domänen, welche mit Proteinen in der PM interagieren und so am Docking beteiligt sein könnten (Okamoto und Sudhof, 1997; Biederer und Südhof, 2000). Rab3 (zählt zur Superfamilie der Ras-Proteine) und RIM (Rab3 interagierendes Molekül) könnten ebenfalls in den Docking-Schritt involviert sein. Die Überexpression von Rab3-Varianten in der Zelllinie PC12 erhöhte die Anzahl gedockter LDCVs, bei Deletion von *rab3* konnte eine Abnahme gedockter LDCVs beobachtet werden (Martelli et al., 2000; Schluter et al., 2004; Schluter et al., 2006). RIM-1-Knockout Mäuse zeigten eine Reduktion gedockter LDCVs (Schoch et al., 2002; Calakos et al., 2004). Neben Munc18-1 haben weitere Proteine Einfluss

auf das F-Aktin. Durch einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ wird das Protein Scinderin aktiviert (Vitale et al., 1991; Zhang et al., 1996), was zu einer lokalen Auflösung des kortikalen F-Aktins führt, so dass LDCVs an die PM transportiert werden können.

1.5 Priming und involvierte Proteine

Priming ist definiert durch den Transfer von LDCVs vom UPP zu RRP und SRP. Der wichtigste molekulare Prozess dahinter ist die Ausbildung des trimären SNARE-Komplexes aus Synaptobrevin, SNAP-25 und Syntaxin (Abb. 5B) (Jahn und Südhof, 1999; Brunger, 2001; Chen und Scheller, 2001; Bruns und Jahn, 2002; Rizo und Südhof, 2002; Fasshauer, 2003; Walter et al., 2010).

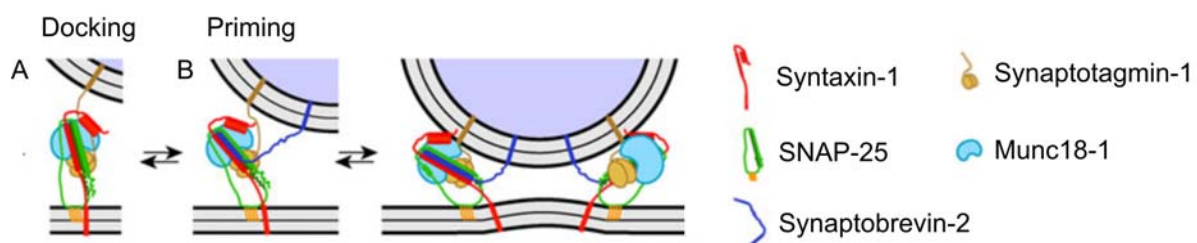


Abb. 5: Modell für Docking und Priming. Ausgehend vom Akzeptor SNARE-Komplex beim Docking-Schritt (A) entsteht der trimäre SNARE-Komplex unter Bindung von Synaptobrevin-2 (dunkelblau) (B). Durch Ausbildung dieses Komplexes werden LDCV- und Plasmamembran in direkte Nähe gebracht. (Modifiziert nach de Wit et al., 2009)

Der SNARE-Kernkomplex besteht aus einer 12 nm langen, verdrehten Struktur, gebildet von vier α -Helices (Abb. 6). Je eine dieser α -Helices stammt von Syntaxin und Synaptobrevin und zwei von SNAP-25, wobei alle Ketten parallel zueinander liegen (Katz et al., 1998; Poirier et al., 1998; Jahn und Südhof, 1999). Syntaxin und Synaptobrevin sind mit ihrem C-terminalen Ende in der Membran verankert, während bei SNAP-25 diverse Palmitoyl-Seitenketten diese Funktion übernehmen (Washbourne et al., 2002). Der SNARE-Kernkomplex bildet sich nach dem Reißverschluss-Prinzip (deshalb auch „Zipper-Hypothese“): zuerst entstehen N-terminale Bindungen zwischen den SNARE-Motiven, welche sich dann bis zum C-terminalen Ende fortsetzen (Sørensen et al., 2006). Dadurch werden die LDCVs nah an die PM bewegt (Hanson et al., 1997; Hay und Scheller, 1997; Fiebig et al., 1999; Pobbati et al., 2006; Sørensen et al., 2006). Wie stark die ausgebildeten Bindungen zwischen den Proteinen während des Primings bereits sind, ist unklar. Es wird angenommen, dass die N-terminale Bindung der SNARE-Proteine während des Primings stattfindet und die vollständige Bindung bis zum C-terminalen Ende als Antwort auf eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ die Formation der Fusionspore induziert (Sørensen et al., 2006).

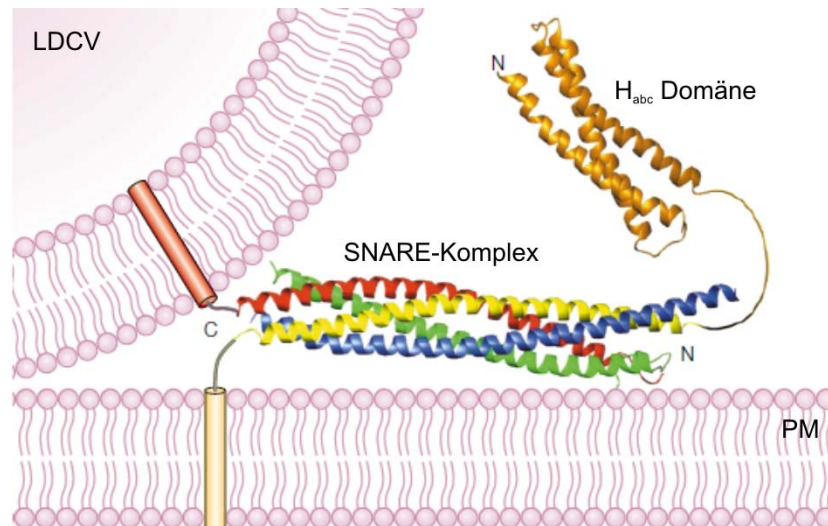


Abb. 6: Modell des ausgebildeten SNARE-Kernkomplexes. Die SNARE Proteine Synaptobrevin (rot), SNAP25 (N-terminus blau, C-terminus grün) und Syntaxin (gelb) bilden den SNARE-Kernkomplex. Dargestellt ist außerdem die H_{abc} Domäne von Syntaxin (orange), welche sich außerhalb des SNARE-Motives befindet. Syntaxin ist in der PM verankert (dargestellt durch den blassgelben Zylinder), Synaptobrevin in der vesikulären Membran (dargestellt durch den roten Zylinder). (Modifiziert nach Rizo und Südhof, 2002)

Um zu vermeiden, dass LDCVs ständig spontan sezernieren, ist das Priming ein stark regulierter Prozess, welcher die Beteiligung verschiedener Proteine erfordert. In diesem Kapitel werden nur einige Primingfaktoren beschrieben, welche für die durchgeführte Arbeit von Bedeutung waren.

1.5.1 Complexine

Complexine sind kleine, hydrophile, zytosolische Proteine, welche in den Isoformen I und II vorkommen und eine starke Bindung zum SNARE-Kernkomplex ausbilden können, wodurch dieser stabilisiert wird (McMahon et al., 1995; Marz und Hanson, 2002). Diese Bindung hat weder Einfluss auf die Konformation des SNARE-Komplexes, noch führt es zur Bildung von SNARE-Komplex-Oligomeren (Sutton et al., 1998; Pabst et al., 2002). Die Deletion beider Isoformen von Complexin führte zu einer Verringerung der Sekretion, wobei nach Erhöhung der extrazellulären $[Ca^{2+}]$ wieder Wildtyp-Niveau erreicht wurde (Reim et al., 2001). Es wird vermutet, dass Complexin die Interaktion der Transmembrandomänen von Synaptobrevin und Syntaxin unterstützt und somit auch die Fusion erleichtert (Hu et al., 2002). Die Überexpression von Complexinen in Chromaffinzellen führte zu einer reduzierten Sekretion und gleichzeitig zu einem schnelleren zeitlichen Ablauf von einzelnen Sekretionsevents, so dass Complexine auch eine Rolle bei der Modulation der Fusionspore spielen könnten (Archer et al., 2002).

1.5.2 CAPS

Dem Protein CAPS (engl. calcium-dependent activator protein for secretion) wurde bereits Einfluss auf den Priming-Schritt nachgewiesen (Wassenberg und Martin, 2002; Liu et al., 2008; Liu et al., 2010). Die Deletion beider Isoformen (CAPS-1 und -2) verursachte eine starke Reduktion des RRP und der verzögerten Komponente der Sekretion (Liu et al., 2008), was vermuten lässt, dass CAPS bei dem Auffüllen und/oder Aufrechterhalten des RRP eine Rolle spielt. Des Weiteren ist CAPS in das Beladen von LDCVs mit Neurotransmittern involviert (Speidel et al., 2005). Diese wichtigen Funktionen führten bei der Deletion eines Alleles der Isoform CAPS-1 zu einem Defizit in der Katecholamin-Sekretion aus LDCVs. Somit scheint CAPS die Hauptrolle beim Priming in Chromaffinzellen zu spielen.

1.5.3 Proteinkinasen A und C

Die Proteinkinasen A (PKA) und C (PKC) können ebenfalls den Priming-Schritt beeinflussen. Dabei spielt Ca^{2+} eine Rolle, da ein Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nicht nur zur Erhöhung der Sekretion aus RRP und SRP führte (Voets, 2000), sondern auch zu einer gesteigerten cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) Produktion, was wiederum PKA aktiviert. In Chromaffinzellen hat dies die Phosphorylierung von SNAP-25 zur Folge, welches für die Aufrechterhaltung der Poolgrößen von RRP und SRP nötig ist (Nagy et al., 2004). Auch PKC wird durch die Bindung von cAMP an dessen C2-Domäne aktiviert. In Chromaffinzellen ist das Auffüllen von RRP und SRP von der PKC-Aktivierung abhängig (Gillis et al., 1996; Smith et al., 1998; Stevens und Sullivan, 1998). PKC phosphoryliert außerdem Munc18-1, was wichtig für das Auffüllen des Pools gedockter LDCVs ist (Nili et al., 2006). Eine weitere Aktivierung von PKC ist durch den sekundären Botenstoff Diacylglycerol (DAG) möglich. Dieser bindet an die C1-Domäne der PKC, wodurch diese zur PM transloziert (Newton, 2003). Die Aktivierung von PKC führt zu einer Reduktion der Unpriming-Rate, so dass PKC zur Stabilität des SNARE-Komplexes beiträgt (Becherer und Rettig, 2006).

1.5.4 Phosphoinositide

Phosphoinositide (PIs) sind vor allem für ihre Rolle in der Signaltransduktion von G-Proteinen bekannt. Jedoch scheinen einige PIs auch bei der Sekretion von Bedeutung zu sein (Eberhard et al., 1990; Hay und Martin, 1992; Hay et al., 1995; Holz et al., 2000). So kann Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ($\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$) die Größe des gepriimten LDCV-Pools regulieren (Milosevic et al., 2005). Die ATP-abhängige Synthese dieses Proteins geht von Phosphatidylinositol (PtdIns) aus, welches durch die PtdIns -4-Kinase oder PtdIns -5-Kinase phosphoryliert wird. Aus den Zwischenprodukten $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ oder

PtdIns(5)P wird schließlich PtdIns(4,5)P₂ synthetisiert, wozu die Enzyme PtdIns(4)P-5-Kinase und PtdIns(5)P-4-Kinase als Katalysatoren benötigt werden (Martin, 1998; Osborne et al., 2001; Di Paolo und De Camilli, 2006, Osborne et al., 2006). Die PtdIns-4-Kinase ist ein integrales Membranprotein der LDCVs (Buckley et al., 1971; Phillips, 1973; Muller und Kirshner, 1975; Husebye und Flatmark, 1988; Osborne et al., 2001). Die PtdIns(4)P-5-Kinase ist mit der PM assoziiert und für die Exozytose von Bedeutung (Holz et al., 2000; Holz und Axelrod, 2002). Es wird angenommen, dass beide Enzyme die Membranen von LDCVs und Zellen verändern, wodurch die LDCVs Fusionskompetenz erreichen. Es ist unklar, wo PtdIns(4,5)P₂ entsteht, welches für den ATP-abhängigen Priming-Schritt benötigt wird (Hay und Martin, 1992; Hay et al., 1995; Parsons et al., 1995; Morimoto und Ogihara, 1996; Holz, 2006). Die höchste Konzentration von PtdIns(4,5)P₂ befindet sich an der PM (Hokin und Hokin, 1964; Eichberg und Dawson, 1965; Whipps et al., 1987; Holz et al., 2000). Ein Einfluss von PIs auf den Priming-Schritt wurde durch weitere Experimente belegt, in welchen die Abwesenheit von PtdIns(4,5)P₂ die Ca²⁺-abhängige Sekretion von neuroendokrinen Zellen inhibierte (Grishanin et al., 2004). Zusätzlich wird das Protein CAPS, welches mit PtdIns(4,5)P₂ interagiert, ebenfalls für das Priming benötigt (Loyet et al., 1998; Renden et al., 2001; Grishanin et al., 2002). Eine Veränderung der Konzentration von PtdIns(4,5)P₂ an der PM führte zur Modifikation der Sekretion durch Veränderung der Anzahl fusionskompetenter LDCVs (Milosevic et al., 2005). Anscheinend bildet PtdIns(4,5)P₂ an der PM mit Syntaxin und SNAP-25 Gruppen, welche die Stellen der Exozytose darstellen. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass PtdIns(4,5)P₂ mit Scinderin interagiert und dessen auflösende Aktivität bezüglich des F-Aktin Netzwerkes reguliert, wobei die Bindung von PtdIns(4,5)P₂ eine inhibierende Wirkung auf Scinderin hat (Del Castillo et al., 1992; Trifaro et al., 2000).

Auch Synaptotagmin-1 interagiert mit PtdIns(4,5)P₂ (Schiavo et al., 1996; Tucker et al., 2003; Bai et al., 2004). Die Bindung der beiden Proteine, welche LDCV-Membran und PM in Nähe hält, geschieht entweder über einen Ca²⁺-abhängigen oder -unabhängigen Mechanismus. Darüber hinaus wurden Interaktionen von PtdIns(4,5)P₂ mit Rabphilin (Chung et al., 1998) und Mints (Okamoto und Südhof, 1997) nachgewiesen.

1.6 Fusion und involvierte Proteine

In Abschnitt 1.5 wurde bereits erwähnt, dass sich während des Primings der SNARE-Kernkomplex ausbildet, bestehend aus dem vesikulären Protein Synaptobrevin und den Plasmamembranproteinen SNAP-25 und Syntaxin. Dieser Komplex wird *trans* SNARE-Komplex genannt (Jahn und Scheller, 2006), da sich die Membrananker der drei Proteine in verschiedenen Membranen befinden: sowohl vesikulär als auch in der PM. Durch

die Ausbildung dieses Komplexes verringert sich der Abstand zwischen LDCV- und PM. Die zuvor, aufgrund der natürlichen Abstoßungskräfte der polaren Enden von Lipiden ausgebildete Lücke ist dadurch ebenfalls kleiner (Hanson et al., 1997; Lin und Scheller, 1997; Churchward und Coorssen, 2009). Dies ist die Voraussetzung für die Ausbildung einer Fusionspore. Durch die Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle in der PM steigt die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in der Nähe dieser Kanäle, was die Fusion von LDCV-Membran und PM zur Folge hat. Dabei spielt der Ca^{2+} -Sensor Synaptotagmin eine entscheidende Rolle, da angenommen wird, dass dieser die Energie für die Fusion beider Membranen liefert (Sørensen et al., 2006). Synaptotagmin scheint dafür mit dem ausgebildeten SNARE-Komplex und/oder der PM zu interagieren, wodurch Vesikel-Membran und PM in unmittelbare Nähe gebracht werden (Südhof und Rothman, 2009). Die beiden Membranen verschmelzen und der Inhalt der LDCVs wird freigesetzt. Nach der Fusion liegen alle SNAREs in einer Membran vor und bilden den *cis* SNARE-Komplex (Jahn und Scheller, 2006). Da der SNARE-Komplex sehr stabil ist wird ein Protein benötigt, um diesen zu trennen. Dieses Protein ist die ATPase NSF (engl. N-ethylmaleimide sensitive fusion protein) welche den 20S Komplex aus SNAREs, NSF und α/β -SNAPs unter ATP-Hydrolyse löst (Söllner et al., 1993). SNAPs (engl. soluble NSF-attachment proteins) sind Adaptorproteine, welche an den SNARE-Komplex binden und von NSF benötigt werden, um mit dem SNARE-Komplex interagieren zu können (Jahn und Scheller, 2006). Anschließend liegen die SNAREs in der *trans*-Konfiguration vor und stehen wieder zur Verfügung (Banerjee et al., 1996; Brunger, 2001).

Wie genau die Fusionspore entsteht konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Stabilisiert wird die Fusionspore von den SNARE- und anderen Proteinen (Abb. 7), wie z. B. Synaptotagmin (Wang et al., 2003), wobei für die schnelle Fusion eines LDCVs mindestens drei SNARE-Komplexe benötigt werden (Mohrmann et al., 2010). Mutationen in der Transmembrandomäne von Syntaxin veränderten den Neurotransmitter-Fluss durch die Fusionspore (Han et al., 2004). SNAP-25 scheint an der Regulierung der Weite der Fusionsporenöffnung beteiligt zu sein und zusammen mit Synaptobrevin die Öffnungsdauer zu regulieren (Borisovska et al., 2005; Fang et al., 2008). Zusätzlich ist Synaptobrevin für die zeitliche Abstimmung der Entstehung einer Fusionspore wichtig. Auch Munc18-1 wird eine Rolle bei der Regulation der Ausdehnung von Fusionsporen zugeordnet. In Chromaffinzellen führte eine mutierte Form von Munc18, welche eine verringerte Affinität für Syntaxin zeigte, zur Veränderung der Kinetiken einzelner Fusionsevents (Fisher et al., 2001). Dies konnte in PC12 Zellen jedoch nicht verifiziert werden, so dass diese Funktion von Munc18 nicht gesichert ist (Schutz et al., 2005).

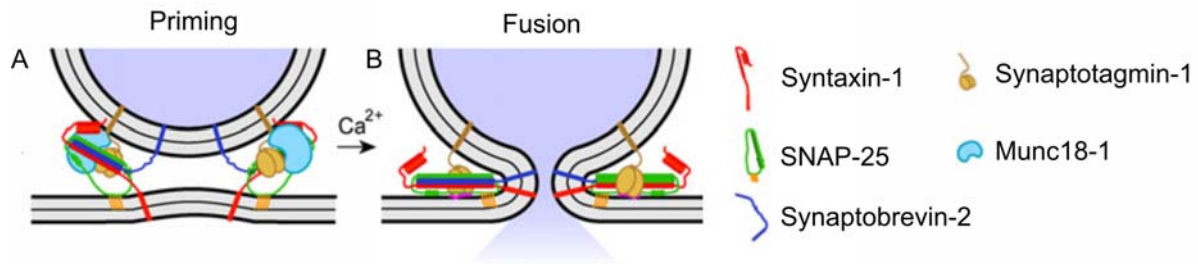


Abb. 7: Modell für die Fusion von LDCVs mit der PM in Chromaffinzellen. Nach der Ausbildung des SNARE-Kernkomplexes und der Annäherung von LDCV- und Plasmamembran beim Priming (A) führt der Einstrom von Ca^{2+} durch spannungsabhängige Kanäle in der PM zur Verschmelzung beider Membranen (B). Der Inhalt der LDCVs wird durch die entstandenen Fusionspore freigesetzt. (Modifiziert nach de Wit et al., 2009)

1.7 „Dead-end“ Vesikel

Nicht sezernierbare LDCVs werden auch „dead-end“ Vesikel genannt. Als erstes prägten Verhage und Sørensen (2008) den Begriff „dead-end Docking“, wobei bis heute unklar ist, ob tatsächlich der Docking-Schritt bei der Entstehung dieser LDCVs eine Rolle spielt. Sie postulierten, dass „dead-end“ Vesikel eine Funktion haben könnten, wie z. B. als Reserve-LDCVs für die Zelle zu dienen. Weiterhin könnte ein ganz bestimmter Stimulus notwendig sein, damit diese LDCVs sezerniert werden können. Möglich ist außerdem, dass „dead-end“ Docking reversibel ist und die so gedockten LDCVs vom SNARE-Komplex gelöst werden können und anschließend den normalen Sekretionsweg durchlaufen. Mit der TIRFM lassen sich Vorgänge direkt an der PM, und somit auch „dead-end“ Vesikel, untersuchen. Pasche et al. (2012) beobachteten in Chromaffinzellen, dass in TIRFM 10% aller LDCVs über 2 min an der PM verweilen und eine geringe Mobilität zeigten, wenn die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zwischen 0,1 und 1 μM lag. Des Weiteren ist bereits bekannt, dass nicht alle gedockten LDCVs fusionskompetent sind (Klenchin und Martin, 2000; Wadel et al., 2007). Es wurde schon einige Male berichtet, dass nicht alle LDCVs, welche mit TIRFM sichtbar sind, als Antwort auf einen Stimulus freigesetzt wurden, z. B. in PC12 Zellen (Steyer et al., 1997; Lang et al., 2000; Johns et al., 2001). Eine Stimulation dieser Zellen über 20 min mit Ba^{2+} führte zu einer maximalen Abnahme der in TIRFM sichtbaren LDCVs von 41% (Johns et al., 2001). Die noch sichtbaren LDCVs in TIRFM nach der Stimulation waren entweder erst während des Experimentes an der PM angekommen und deshalb noch nicht sezerniert. Oder sie waren „dead-end“ Vesikel und über die gesamte Dauer des Experimentes an der PM sichtbar, da sie nicht sezerniert werden konnten. Über den molekularen Mechanismus der Entstehung von „dead-end“ Vesikeln wurde bisher nur spekuliert. Eine Hypothese betrifft die Bildung nicht produktiver SNARE Akzeptor-Komplexe bestehend aus Syntaxin und SNAP-25 in einer 2:1 statt 1:1 Stöchiometrie (Abb. 8), welche eine höhere Stabilität aufweisen (Fasshauer et al., 1997; Fasshauer et al., 1997; Xiao et al., 2001; Zilly et al., 2006;

de Wit, 2010). Diese Komplexe wurden bisher nur *in vitro* nachgewiesen und verhindern die Bindung von Synaptobrevin (Fasshauer und Margittai, 2004; Becherer und Rettig, 2006), da die Bindestelle für dieses Protein durch das zusätzliche Syntaxin-Molekül blockiert wird (Fasshauer et al., 1997; Margittai et al., 2001; Xiao et al., 2001; Zhang et al., 2002). Unklar ist, ob Synaptotagmin diese Komplexe binden kann. Ohne die Interaktion von Synaptotagmin mit dem 2:1 Komplex wäre jedoch kein Docking der LDCVs an der PM möglich.

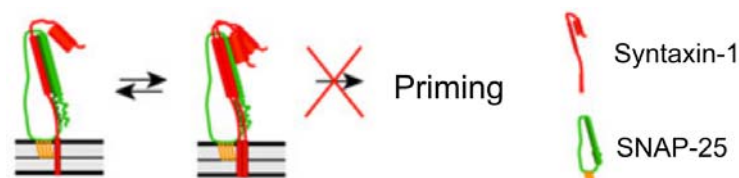


Abb. 8: Modell zur Entstehung nicht produktiver SNARE-Komplexe. Ausgehend von einem 1:1 Komplex aus Syntaxin und SNAP-25 (links) kann durch Anlagerung eines weiteren Syntaxin-Moleküls ein unproduktiver 2:1 Komplex entstehen (rechts). Da das zusätzliche Syntaxin-Molekül die Bindungsstelle für Synaptobrevin-2 blockiert kann kein Priming stattfinden. (Modifiziert nach de Wit et al., 2009)

Verschiedene Faktoren können den 1:1 Komplex aus Syntaxin und SNAP-25 stabilisieren und damit die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von 2:1 Komplexen verringern. Dazu zählt das Protein Munc18 (Zilly et al., 2006; de Wit et al., 2009) und die Überexpression von SNAP-25 (de Wit et al., 2009). Außerdem ist ein C-terminales Fragment von Synaptobrevin (Aminosäuren 49-96) dafür bekannt, den 1:1 Komplex zu binden und zu stabilisieren, unabhängig von dessen Interaktion mit Synaptotagmin-1 (Pobbati et al., 2006). Ob die 2:1 SNARE-Komplexe *in vivo* existieren und welcher molekulare Mechanismus den „dead-end“ Vesikeln zu Grunde liegt ist bis heute unklar und soll in dieser Arbeit untersucht werden.

Neben der Hypothese des „dead-end“ Dockings sind weitere Theorien zur Entstehung nicht sezernierbarer LDCVs denkbar. Eine davon bezieht sich auf die Degradierung von LDCVs zu Endosomen als Voraussetzung für Endozytose. In diesem Stadium könnten sie sich immer noch an der PM befinden und ihre Fluoreszenz wäre in TIRFM sichtbar. Endosomen fusionieren jedoch nicht mit der PM, so dass der Eindruck entstehen könnte, es lägen nicht sezernierbare LDCVs vor. Eine zweite Theorie befasst sich mit dem Mangel an kleinen, zytosolischen Priming-Faktoren, wie z. B. PKC, wodurch funktionell gedockte LDCVs nicht geprimt werden können. Durch lange Perfusionen mit der Patch-Pipette können solche Faktoren aus der Zelle gewaschen werden (Burgoyne, 1995; Smith und Neher, 1997). Ohne Priming und somit Fusionskompetenz können die LDCVs nicht fusionieren.

1.8 Adenosintriphosphat (ATP)

ATP stellt die Hauptenergiequelle der Zellen dar (Lohman et al., 2012). Es ist das energiereichste Molekül, welches vom Organismus selbst synthetisiert werden kann. Als Energieträger ist es schnell verfügbar und als Ko-Substrat vieler Enzyme ein wichtiger Regulator energieliefernder Prozesse. Auch viele Ionenpumpen benötigen ATP, um ein transmembranales Konzentrationsgefälle von Ionen zu erzeugen und aufrecht halten zu können, wie z. B. die Na^+ - K^+ -Pumpe (Campbell und Reece, 2003).

ATP besteht aus einem zentralen Zuckermolekül (Ribose), welches mit Adenin verbunden ist (Abb. 9; Campbell und Reece, 2003). An diese Verbindung (Adenosin genannt) sind drei Phosphatgruppen angelagert, welche die eigentlichen Energieträger von ATP darstellen. Während das erste Phosphat als Ester am 5'-Kohlenstoff der Ribose verankert ist, sind die anderen beiden als Säureanhydride gebunden. Die Bindung des zweiten und dritten Phosphats ist deshalb sehr energiereich und unter Mitwirkung eines Enzyms und Anlagerung eines Wassermoleküls leicht abzuspalten. Die durch die Hydrolyse von ATP gewonnene Energie kann von dem beteiligten Enzym gespeichert und für andere Prozesse verwendet werden (Campbell und Reece, 2003). Diese Reaktion ist reversibel, so dass aus ADP und einem freien Phosphat durch einfache Phosphorylierung bzw. aus Adenosin über drei Phosphorylierungsschritte wieder ATP gebildet werden kann.

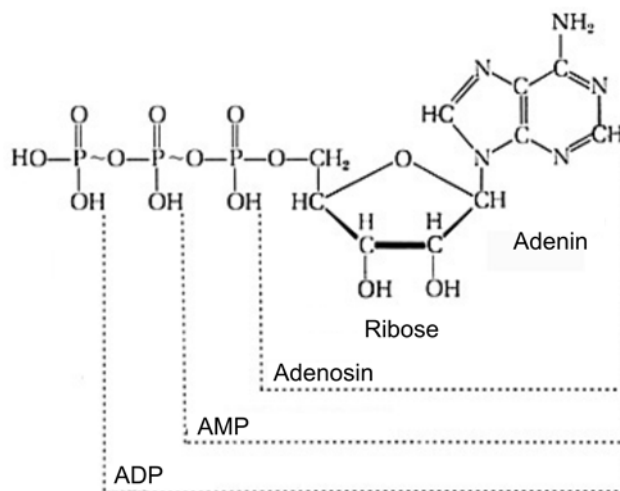


Abb. 9: Struktur eines ATP-Moleküls. An Ribose als zentrales Zuckermolekül ist Adenin gebunden, wodurch Adenosin entsteht. Daran sind drei Phosphatgruppen angelagert, die eigentlichen Energieträger des ATP-Moleküls. (Quelle: <http://textbookofbacteriology.net/>)

ATP liegt in allen lebenden Zellen in einer Konzentration von 10^{-2} – 10^{-3} Mol/l vor, was durch zelluläre Prozesse auf konstantem Niveau gehalten wird.

1.8.1 Die Rolle von ATP bei der Sekretion in Chromaffinzellen

ATP ist während des sekretorischen Zyklus von LDCVs in mehrere Schritte involviert und kann mit verschiedenen Proteinen interagieren. Vor allem beim Priming scheint ATP eine wichtige Rolle zu spielen (Martin und Kowalchyk, 1997; Klenchin und Martin, 2000). Es ist jedoch unklar, ob dies dem Priming nach derzeit gebräuchlicher Definition der SNARE-Komplex Formation entspricht. Ebenfalls unklar ist, wie groß die Rolle von ATP bei der Docking-Reaktion ist.

ATP wird benötigt, um LDCVs aus dem DP zur PM zu transportieren und dort den UPP aufzufüllen. An diesem Vorgang sind sowohl ein Myosin-Aktin- als auch ein Mikrotubuli-vermittelter Transport beteiligt, wobei beide Systeme miteinander arbeiten (Neco et al., 2003). In Chromaffinzellen reichen die Mikrotubuli nur bis zum kortikalen F-Aktin (Lee und Trifaro, 1981; Vitale et al., 1991). Dieses F-Aktin Netzwerk im kortikalen Bereich wirkt wie eine Barriere, so dass sich hier der DP akkumuliert (300-800 nm von der PM entfernt) und somit räumlich von den freisetzbaren LDCVs an der PM getrennt ist. Erst durch Stimulation der Zelle und dem damit verbunden Ca^{2+} -Einstrom wird dieses Netzwerk durchlässig, da das Ca^{2+} -abhängige, F-Aktin auflösende Protein Scinderin aktiviert wird (Vitale et al., 1991; Zhang et al., 1996). Einige F-Aktin Stränge bleiben bestehen, entlang welchen die LDCVs zur PM geführt werden können (Kumakura et al., 1994; Lang et al., 2000). Für diesen Transport ist das Motorprotein Myosin V verantwortlich, welches ATP als Energieträger benötigt (Parsons et al., 1995; Lang et al., 2000; Rose et al., 2002; Neco et al., 2003; Rose et al., 2003; Berberian et al., 2009). Somit beeinflusst ATP die Größe des RRP und die Zeitkonstante des Auffüllens dieses Pools (Lim et al., 1997; Heidelberger et al., 2002). Nach einer Stimulation sind mindestens 120 s nötig, um den Pool wieder aufzufüllen und somit auf eine zweite Stimulation eine vergleichbare große Sekretionsantwort zu erhalten wie nach dem ersten Stimulus (Rose et al., 2003).

Wie bereits erwähnt ist ATP wichtig, damit der SNARE-Komplex nach der Fusion von der ATPase NSF getrennt werden kann und die SNARE-Proteine für weitere LDCVs zur Verfügung stehen (siehe 1.6).

Darüber hinaus ist ATP bei der Phosphorylierung verschiedener Proteine durch diverse Enzyme von Bedeutung (Klenchin und Martin, 2000). Die wichtigste Rolle hierbei spielen die bereits erwähnten Pls, vor allem $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ (siehe 1.5.4). Dieses wird in zwei Schritten unter Verbrauch von ATP synthetisiert und ist in den Prozess des Primings involviert (Hay und Martin, 1992; Hay et al., 1995; Parsons et al., 1995; Morimoto und Ogihara, 1996; Holz, 2006). Die Synthese von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ wird oftmals als wichtigster ATP-abhängiger Priming-Schritt im sekretorischen Zyklus bezeichnet (Eberhard et al., 1990; Bittner und Holz, 2005). Auch verschiedene Kinasen benötigen ATP, z. B. wird Munc18 durch die Proteinkinase II und PKC phosphoryliert (Klenchin und Martin, 2000). Zusätzlich haben

andere Kinasen Einfluss auf die Größe des RRP's (Gillis et al., 1996). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass die SNARE-Proteine Syntaxin, SNAP-25 und Synaptobrevin, sowie Synaptotagmin *in vitro* als Substrate für Proteinkinasen dienen (Nielander et al., 1995; Shimazaki et al., 1996; Risinger und Bennett, 1999). Die Phosphorylierung diverser Proteine könnte sowohl eine Abhängigkeit der Docking-, als auch der Priming-Reaktion von ATP erklären.

ATP tritt auch als Neurotransmitter auf und wird in Neuronen und Chromaffinzellen bei der Fusion freigesetzt. Die Konzentration des ATPs in den LDCVs von Neuronen kann dabei bis zu 1.000 mM betragen (Burnstock, 2006). Die Freisetzung von ATP kann sowohl zur Inhibierung der Sekretion führen (autoinhibitorischer Rückkopplungs-Mechanismus; Lim et al., 1997; Harkins und Fox, 2000; Ulate et al., 2000), als auch stimulierend wirken (Ulate et al., 2000). Bei der Inhibierung bindet exogenes ATP an P2Y purinerge Rezeptoren, welche somit aktiviert werden und spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle über G-Protein vermittelte Kaskaden hemmen. Dadurch werden die Calciumströme stark verringert, was einen negativen Einfluss auf die Sekretion hat (Diverse-Pierluissi et al., 1991; Gandia et al., 1993; Currie und Fox, 1996; Harkins und Fox, 2000; Ulate et al., 2000). Im Gegensatz dazu kann exogenes ATP auch eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verursachen. Dabei bindet es an P2U Rezeptoren, welche die Aktivität der Phospholipase C erhöhen und somit eine Ansammlung von Phosphatidylinositol-1,4,5-trisphosphat verursachen. Dies führt zu einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aus intrazellulären Speichern (Castro et al., 1995; Reichsman et al., 1995), was den letzten, Ca^{2+} -abhängigen Schritt der Exozytose einleitet und zur Vergrößerung des RRP's beiträgt (von Rüden und Neher, 1993; Smith et al., 1998; Smith, 1999). Gleichzeitig kann der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auch die Inaktivierung von Ca^{2+} -Kanälen begünstigen (Ulate et al., 2000). Ebenso sind P2X Rezeptoren an einem stimulierenden Schritt der Exozytose beteiligt. Durch die Aktivierung dieser Rezeptoren über exogenes ATP kann ein nicht-selektiver Kationenstrom induziert werden, welcher einen Ca^{2+} -Influx verursacht und damit die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erhöht (Ulate et al., 2000).

Zusammenfassend scheint ATP an vielen Prozessen beteiligt zu sein. Der Transport vom DP zum UPP wird dabei zum Docking gezählt, während die Phosphorylierung verschiedener Proteine meist dem Priming zugeordnet wird. Die Hydrolyse von ATP durch NSF zur Trennung des *cis* SNARE-Komplexes ist Voraussetzung für die Endozytose von vesikulärer Membran.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

ATP ist als Energieträger für viele Prozesse in den Zellen essentiell. Durch die Verwendung von verschiedenen Zelltypen, Stimuli und Lösungen wurden in der Literatur mehrere Aufgaben dieses Stoffes im Rahmen der Exozytose angegeben. Jedoch veränderten sich über den Zeitrahmen der Publikationen auch die Definitionen von Docking und Priming, und für den Prozess des Dockings existieren immer noch verschiedene Definitionen. In vielen Publikationen ist daher unklar, auf welchen Prozess sich die Ergebnisse genau beziehen. Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob ATP in bovinen Chromaffinzellen an Docking, Priming und/oder Sekretion nach den heute gebräuchlichen Definitionen eine essentielle Rolle spielt.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten die „dead-end“ Vesikel charakterisiert werden. Dies beinhaltete folgende Punkte:

- Entwicklung einer Methode zum Nachweis von „dead-end“ Vesikeln *in vivo*
- Untersuchung des Einflusses der $[Ca^{2+}]_i$ auf den Anteil der „dead-end“ Vesikel
- Analyse des molekularen Mechanismus des „dead-end“ Dockings

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien

Agar-Agar	Roth
Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth
Asparaginsäure	Sigma
AMP-PCP	Sigma
BAPTA	Sigma
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma
DMEM	Invitrogen
DNase	Roche
dNTPs Mix	Fermentas
DPTA	Sigma
EDTA	Sigma
EGTA	Sigma
Ethanol (100%)	Roth
Ethidiumbromid	Roche
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen
FFN511	Prof. Uli Kazmaier
Fura-2	Invitrogen
Fura-FF	Invitrogen
Glutaminsäure	Sigma
HPLC Wasser	Sigma
HEDTA	Sigma
HEPES	Sigma
Isopropanol	Roth
ITS-X	Invitrogen
Kanamycin K-1377 (30mg/ml)	Sigma
λ -Marker (DNA Standard)	Roche
Mg-ATP	Sigma
Mowiol 4-88	Carl Roth
Na ₂ -GTP	Sigma
Normales Ziegenserum (NGS)	Invitrogen
NP-EGTA	Sigma

Opti-MEM	Invitrogen
10x PCR Buffer	Sigma
Paraformaldehyd (16%)	Polyscience, Inc.
Pen/Strep (Pen: 10.000 Einheiten/ml; Strep: 10.000 µg/ml)	Invitrogen
Phalloidin	Sigma
Phenol	Sigma
RNase Inhibitor	Roche
Taxol	Sigma

Alle anderen Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt) bezogen.

2.1.2 Enzyme

Aprotinin	Sigma
Chymotrypsin	Biolabs
Collagenase CLS	Biochrom AG
EcoRV	Fermentas
Klenow-Enzym	Fermentas
NheI	Fermentas
NotI	Fermentas
Shrimp Alkaline Phosphatase	Fermentas
Trypsin	Invitrogen
T4 DNA Ligase	Fermentas

2.1.3 Medien und Lösungen

2.1.3.1 Gelelektrophorese

TAE-Laufpuffer (50x)

242 g Tris

57,1 g Eisessig

100 ml EDTA (0,5 M)

pH 8,5

vor Verwendung mit H₂O_{bidest} verdünnen

2.1.3.2 Präparation von Chromaffinzellen

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

Collagenaselösung

129,5 U/ml, gelöst in Locke's

Inaktivierungslösung

10% FCS in Locke's

Zellmedium

Pro 6-Well-Platte:

20 ml DMEM

200 µl ITS-X

80 µl Pen/Strep

frisch angesetzt, 37°C, 12% CO₂

2.1.3.3 Chemische Fixierung und Immuncytochemie

PBS

58 mM Na₂HPO₄

17 mM NaH₂PO₄

83 mM NaCl

pH 7,4, 320 mOsm

sterilfiltriert, gelagert bei 4°C

vor Verwendung 0,5 mM CaCl₂ und 2 mM MgCl₂ zugeben

Blockierlösung

PBS

0,1% Triton-x-100

2,5% NGS

Antikörper

GM130 (*cis*-Golgi Netzwerk)

monoklonal, BD Bioscience

TGN46 (*trans*-Golgi Netzwerk)

monoklonal, AG Hoth

Montiermedium

2,4 g Mowiol 4-88

6 g Glycerol

6 ml H₂O_{bidest}

18 ml Tris-Puffer (pH 8,5; 0,2 M)

2.1.3.4 Virusaktivierung

Opti-MEM mit 0,2% BSA

44 ml Opti-MEM

5 ml Tryptosephosphat

1 ml HEPES (1M)

50 µl Pen / Strep

0,1 g BSA

sterilfiltriert, gelagert bei 4°C

Aprotinin

6 mg/ml in HBS (Aliquots, gelagert bei -20°C)

Chymotrypsin

2 mg/ml in HBS (Aliquots, gelagert bei -20°C)

2.1.4 Intrazelluläre Lösungen

Alle intrazellulären Lösungen und die zur Herstellung verwendeten Stocklösungen wurden ausschließlich mit HPLC-H₂O hergestellt. Frisch angesetzte Volumina von 5-10 ml wurden sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Vor den Experimenten wurden sie auf Eis aufgetaut.

2.1.4.1 Untersuchung der Rolle von ATP bei Docking, Priming und Fusion

Um die Rolle von ATP bei Docking, Priming und Fusion zu untersuchen, wurden verschiedene Intrazellulär-Lösungen verwendet. In den ersten Versuchen wurden die Zellen

mit einer Lösung, welche 2 mM ATP enthielt, perfundiert (Kontrolle) und die Ergebnisse mit Zellen verglichen, welche mit einer Lösung ohne ATP (0 mM) gemessen wurden. Die Lösung mit ATP enthielt (in mM): 8 NaCl, 140 Asparaginsäure, 1 MgCl₂, 2 MgATP, 0,3 Na₂GTP, 10 HEPES, 2 EGTA und 1,46 CaCl₂. Der pH-Wert lag bei 7,2 und die Osmolarität betrug 305 mOsm. In der Lösung ohne ATP wurde die Asparaginsäure durch 145 mM Glutaminsäure ersetzt. Die Osmolarität lag bei 302 mOsm und der pH-Wert betrug 7,2. Beide Lösungen wurden bei Bedarf mit einer Mischung von Fura-2 und Fura-FF (jeweils 0,1 mM) versetzt, um die $[Ca^{2+}]_i$ messen zu können.

In einer zweiten Strategie sollte das ATP in der Lösung nicht vollkommen entfernt, sondern durch das ATP-Analog AMP-PCP ersetzt werden. Dieser Stoff ist nicht hydrolysierbar, kann also Partnermoleküle von ATP binden, jedoch nicht von diesen gespalten und als Energieträger verwendet werden. Zusätzlich bindet AMP-PCP die Partnermoleküle irreversibel, wodurch verhindert wird, dass das natürlich in der Zelle vorkommende ATP weiterhin als Energiequelle genutzt werden kann. Für Kontrollexperimente wurde die oben erwähnte Lösung mit 2 mM ATP verwendet, unter Zugabe der Ca²⁺-Indikatoren Fura-2 und Fura-FF (jeweils 0,1 mM). Für die Lösung mit AMP-PCP wurden 2 mM AMP-PCP statt 2 mM ATP verwendet und die Konzentration der Asparaginsäure auf 138 mM gesenkt, wodurch eine Osmolarität von 310 mOsm erreicht wurde. Der pH-Wert lag bei 7,2.

2.1.4.2 Stimulation mit Depolarisationsreihen oder UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA

Um zu überprüfen, wie viele LDCVs durch einen kurzen, aber starken Stimulus freigesetzt werden können, wurden zwei verschiedene Arten der Stimulation verwendet. Durch das Applizieren von Depolarisationsreihen öffnen spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle und es kommt zu einem Ca²⁺-Einstrom, was einen der $[Ca^{2+}]_i$ zur Folge hat. Bei der UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA wird die $[Ca^{2+}]_i$ innerhalb weniger Millisekunden auf mikromolare Konzentrationen angehoben und der gesamte Pool von freisetzbaren LDCVs geleert. Für beide Experimente wurde die gleiche intrazelluläre Lösung mit NP-EGTA verwendet. NP-EGTA ist ein photolabiler Chelator mit hoher Selektivität für Ca²⁺ (K_d 80 nM). Durch UV-Licht wird das NP-EGTA gespalten und es entstehen Produkte mit niedriger Ca²⁺-Affinität (K_d 1 mM). Somit werden schlagartig große Mengen an, zuvor gebundenem, Ca²⁺ freigesetzt. Die Lösung enthielt folgende Komponenten (in mM): 98 Glutaminsäure, 2 MgATP, 0,3 Na₂GTP, 80 HEPES, 5 NP-EGTA, 4,5 CaCl₂, 0,1 Fura-2, 0,1 Fura-FF. Die Osmolarität betrug 305 mOsm und der pH-Wert lag bei 7,2.

2.1.4.3 Langzeitstimulation mit hoher $[Ca^{2+}]_i$

Der Einfluss von Ca^{2+} auf die Anzahl von sezernierten LDCVs bzw. nicht sezernierbaren LDCVs wurde durch eine lang anhaltende, hohe $[Ca^{2+}]_i$ untersucht. Dazu wurden drei verschiedene Pipetten-Lösungen eingesetzt, welche 1, 6 oder 15 μM freie $[Ca^{2+}]_i$ enthielten. Die Lösungen bestanden aus (in mM): 2 MgATP, 0,3 Na₂GTP, 10 HEPES und 5 CaCl₂. Aufgrund der unterschiedlichen $[Ca^{2+}]_i$ mussten verschiedene Ca^{2+} -Puffer verwendet werden. Auch die Konzentration der Glutaminsäure variierte, um die jeweilige Osmolarität anzupassen. Somit enthielt die Lösung mit der geringsten $[Ca^{2+}]_i$ den Ca^{2+} -Puffer EGTA (5,9 mM) und 120 mM Glutaminsäure, in der Lösung mit 5 μM freier $[Ca^{2+}]_i$ waren 9 mM HEDTA und 110 mM Glutaminsäure und die Lösung mit der höchsten $[Ca^{2+}]_i$ enthielt den Ca^{2+} -Puffer DPTA (20 mM) und 90 mM Glutaminsäure. Die Osmolaritäten der Lösungen lagen bei 302, 313 bzw. 314 mOsm (geordnet nach Höhe der $[Ca^{2+}]_i$, aufsteigend) und alle Lösungen hatten einen pH-Wert von 7,2.

2.1.5 Extrazelluläre Lösung

Für alle Patch-Clamp Experimente wurde die gleiche extrazelluläre Lösung verwendet. Aus einem 10x Stock (sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C) wurde am Tag des Experimentes eine 1x Verdünnung hergestellt, welche unter Lagerung bei 4°C für ca. 1 Woche verwendet wurde. Die Lösung enthielt (1x konzentriert, in mM): 147 NaCl, 2,4 KCl, 1,2 MgCl₂, 10 HEPES, 2,5 CaCl₂. Die Osmolarität lag bei 305 mOsm und, je nach Osmolarität der verwendeten intrazellulären Lösung, wurden 10-20 mM Glukose hinzugefügt. Sollten die Zellen mit FFN511 (Fluoreszenter falscher Neurotransmitter 511) geladen werden, so enthielt die extrazelluläre Lösung zusätzlich 5 μM FFN511 (siehe 2.2.3.3).

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Bei der TIRFM (siehe 2.2.8) wird ein fluoreszentes Protein angeregt und dessen Emission detektiert. Um die Intensität des verwendeten Fluoreszenzproteins und die Effizienz der Transfektion mittels Elektroporation zu steigern wurde der Vektor, in dem sich das Fluoreszenzprotein mCherry befand (Shaner et al., 2004), ausgetauscht. Der neue Expressionsvektor beruht auf dem pMAX-Vektor (Lonza GmbH, Köln, Deutschland), wurde jedoch von der Arbeitsgruppe von Prof. Hoth (Physiologie, Homburg) modifiziert und zur Verfügung gestellt. Er enthielt eine multiple Klonierungsstelle, eine Kanamycin-Resistenz zur

Selektion und den Cytomegalo-Virus (CMV) Promotor, welcher einen hohen Expressionslevel ermöglicht (Abb. 10B).

Um das ursprüngliche Plasmid pMAX zu vermehren wurde es durch Transformation (siehe 2.2.1.7) in kompetente *E. coli* Bakterien übertragen und anschließend mittels Midi-Plasmid-Präparation (siehe 2.2.1.9) wieder isoliert. Durch Gelelektrophorese (siehe 2.2.1.1) konnte die erfolgreiche Isolation überprüft werden. In den Vektor sollte die kodierende DNA für das Fusionsprotein NPY-mCherry ligiert werden. Das entsprechende DNA-Fragment wurde zuvor aus einem anderen Plasmid (Abb. 10A) mit Restriktionsenzymen isoliert (siehe 2.2.1.4). Das Plasmid pMAX wurde ebenfalls mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut. Um die Effizienz der anschließenden Ligation zu erhöhen wurden unterschiedliche Restriktionsenzyme verwendet, so dass ein glattes DNA-Ende und eines mit Überhang an den Schnittstellen entstanden. Da für das DNA-Fragment (NPY-mCherry) kein passendes Enzym für glatte Enden vorhanden war, wurde der Überhang an der Schnittstelle nach dem Verdau mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I aus *E. coli* zu einem glatten Ende aufgefüllt (siehe 2.2.1.4). Im Anschluss an die Dephosphorylierung (siehe 2.2.1.5) von pMAX wurden alle Proben auf ein präparatives Gel aufgetragen und nach der Elektrophorese daraus extrahiert (siehe 2.2.1.2). Mittels Gelelektrophorese wurden die Ergebnisse der Gelextraktion überprüft und anschließend die Ligation (siehe 2.2.1.6) durchgeführt, um das gewünschte Plasmid pMAX-NPY-mCherry (Abb. 10B) zu erhalten. Nach der Transformation (siehe 2.2.1.7) in kompetente *E. coli* Bakterien wurden mehrere Klone in flüssiges LB-Medium überführt, über Nacht kultiviert und durch eine Mini-Plasmid-Präparation (siehe 2.2.1.8) das Plasmid isoliert. Zur Überprüfung des Konstruktes wurde eine Kontroll-Restriktion durchgeführt. Positive Konstrukte wurden sequenziert (siehe 2.2.1.11), erneut in kompetente *E. coli* Bakterien transformiert und vermehrt. Durch die Endotoxin-freie Maxi-Plasmid-Präparation (siehe 2.2.1.10) konnten große Mengen der Plasmid-DNA isoliert und deren Konzentration anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese bestimmt werden (siehe 2.2.1.3).

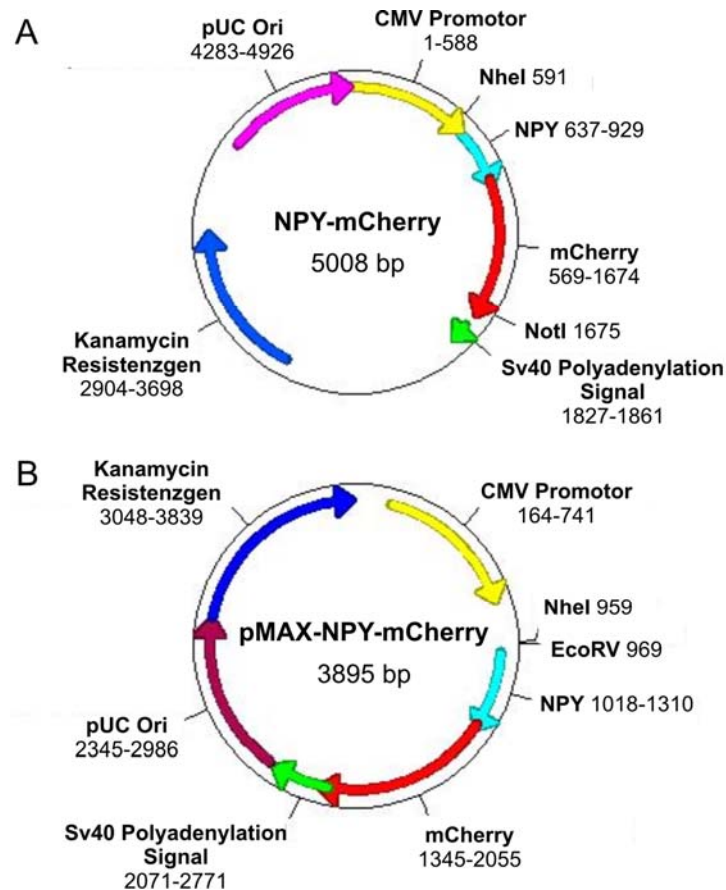


Abb. 10: Plasmidkonstrukte NPY-mCherry und pMAX-NPY-mCherry. Die Gene für NPY-mCherry wurden mit den Enzymen NheI und NotI aus dem Plasmid (A) ausgeschnitten und in den pMAX-Vektor (B) ligiert, welche zuvor durch die Enzyme NheI und EcoRV geöffnet wurde. Mit dem entstandenen Vektor wurden bovine Chromaffinzellen elektroporiert, um LDCVs fluoreszent zu markieren. Legende: Ori: Replikationsursprung (engl. origin of replication) des Plasmids; CMV: Cytomegalo-Virus.

2.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Unter Elektrophorese versteht man die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Ein elektrophoretisches Trennsystem besteht aus einer Gleichspannungsquelle mit zwei Elektroden (Kathoden und Anode), die in direktem Kontakt mit dem Trennmedium stehen. Das Trennmedium, dessen Grundlage eine wässrige Elektrolytlösung bildet, füllt den Raum zwischen den Elektroden. Unterschiedliche Ladung und Größe der Teilchen bewirken eine unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit, wodurch die einzelnen Komponenten eines Substanzgemisches aufgetrennt werden.

Gele aus dem Polysaccharid Agarose verwendet man zur Auftrennung von DNA und RNA. Die Trennung wird durch die im Gel vorhandenen Poren erreicht, die wie ein Sieb wirken und deren Größe die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA bestimmen. Der Durchmesser dieser Poren wird durch die Agarosekonzentration festgelegt und kann zwischen 100 und 300 nm liegen. Beim Anlegen des elektrischen Feldes wandern die aufgrund der Phosphatgruppen negativ geladenen DNA-Fragmente durch die Gelmatrix zur Anode. Die

Wanderungsgeschwindigkeit ist von der Länge und der Konformation der DNA abhängig, so dass niedermolekulare und zirkularisierte Nukleinsäuren schneller wandern als höhermolekulare und lineare Nukleinsäuren.

Gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA-Proben wurden durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Färbung erzeugt die typischen, sichtbaren „Banden“ im Trägermedium. Einzelne Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren dabei zwischen den Basenpaaren der DNA (bis zu drei Moleküle je zehn Basen), wodurch sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid verändert und so die Fluoreszenz des Ethidiumbromids (Emission ca. 590 nm) bei Anregung mit ultravioletttem Licht (260-360 nm) stark erhöht wird. Auf diese Weise leuchten im Agarosegel die Stellen, an welchen sich Nukleinsäuren befinden, hell auf, während Stellen ohne Nukleinsäuren dunkel erscheinen. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur vorliegenden DNA-/RNA-Konzentration, sowie zur Länge der Nukleinsäure.

Die Größen- und Konzentrationsbestimmungen der einzelnen Fragmente erfolgte durch den Vergleich mit den Banden eines Längenstandards, der zusammen mit den Proben auf das Gel aufgetragen wurde. Es wurde der Lambda DNA EcoRI / HindIII Marker verwendet, welcher für DNA mit einer Länge zwischen 125 und 23.100 Basenpaaren geeignet ist. Er entsteht durch den Verdau von Lambda DNA mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII und besteht aus acht Fragmenten unterschiedlicher Größe.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich 1%ige Agarosegele verwendet. Dazu musste die entsprechende Menge Agarose (0,3 g) in 30 ml 1xTAE Puffer suspendiert und durch Erhitzen gelöst werden. Dadurch werden die Fäden aus Agarosepolymeren zu einem Gel vernetzt und es kommt zur bereits erwähnten Porenbildung. War das Agarosepulver vollständig gelöst und die Mischung auf ca. 60°C abgekühlt, so wurden 3 µl Ethidiumbromid zugegeben und das Gel langsam in eine horizontale Gelkammer (Easy Cat Electrophoresis System, Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH) gegossen. Durch das Einsetzen eines Kammes in die noch flüssige Agarose bildeten sich nach dem Gelieren der Agarose Geltaschen aus. Je nach Verwendungszweck des Geles variierte die Größe der Taschen. Für analytische Zwecke (DNA-Konzentrationsbestimmungen, Kontrollgele nach Restriktion oder Plasmid-Isolation) wurden kleine Taschen verwendet, für präparative Zwecke (Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen) große Taschen. Nach dem Abkühlen und Erstarren des Geles wurde es in eine Elektrophoresekammer gelegt, mit TAE-Laufpuffer bedeckt und der Kamm gezogen.

Zur Vorbereitung der Proben wurde die DNA mit 1/6 Volumen Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die DNA wurde für 40-60 min bei 80 Volt (Power Pac 2000, Biorad) aufgetrennt. Zur Dokumentation wurde das Gel auf einen UV-Transilluminator gelegt, das Bandenmuster bei einer Wellenlänge von 366 nm sichtbar gemacht und mit einer Fotodokumentationsanlage fotografiert.

2.2.1.2 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach einer Restriktion muss vor der Ligation das benötigte DNA-Fragment von den anderen Fragmenten getrennt werden. Dazu führt man eine Agarosegelelektrophorese durch, nach welcher die Bande mit der richtigen Größe des DNA-Fragments aus dem Gel extrahiert wird. Durch diesen Schritt werden außerdem Enzyme, Salze der Puffer und Nukleotide aus der Restriktionsreaktion entfernt.

Auf dem UV-Tisch konnten die verschiedenen Banden des präparativen Gels sichtbar gemacht, und die benötigte Bande mit dem Skalpell herausgeschnitten werden. Dabei sollte die DNA nur so kurz wie möglich dem UV-Licht ausgesetzt sein, um Mutationen zu vermeiden. Anschließend wurden die DNA-Fragmente unter Verwendung des „QIAquick Spin Kits“ (Qiagen) aufgereinigt. Dabei wurde die selektive Bindung von DNA in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen und bei neutralem pH-Wert an eine Silika-Gel-Membran ausgenutzt, während Primer, Nukleotide, Salze und Enzyme die Membran ungehindert passierten.

Mittels Gelelektrophorese (siehe 2.2.1.1) wurde der Erfolg der Extraktion überprüft und die Konzentration der DNA geschätzt. Die DNA lagerte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C.

2.2.1.3 Bestimmung der DNA-Konzentration im Agarosegel

Die Bestimmung der DNA-Konzentration war nötig, um eine geeignete Menge an DNA einzusetzen, z. B. bei Ligationsreaktionen oder der Elektroporation. Die Abschätzung der DNA-Konzentration im Agarosegel war für diese Zwecke ausreichend.

Die Bandenstärke der Probe wurde mit der Bandenstärke der ebenfalls auf das Gel aufgetragenen Lambda-DNA visuell verglichen. Die Konzentration der unterschiedlichen Banden der Lambda-DNA war bekannt, so dass unter Berücksichtigung des aufgetragenen Probenvolumens die Konzentration der DNA-Proben errechnet werden konnte.

2.2.1.4 Restriktion

Um den pMAX-Vektor mit dem DNA-Fragment NPY-mCherry ligieren zu können, musste zuvor das DNA-Fragment aus einem anderen Vektor isoliert und der pMAX-Vektor aufgetrennt werden. Dies geschah mit Restriktionsenzymen.

Restriktionsenzyme sind bakterieneigene Endonukleasen, die sequenzspezifisch doppelsträngige DNA erkennen, an diese Stellen binden und den Doppelstrang in der Sequenz schneiden. Dabei spalten sie die Phosphodiesterbindungen beider Einzelstränge eines DNA-Moleküls hydrolytisch. Je nach spezifischer Schnittstelle der Enzyme entstehen glatte (blunt ends) oder überhängende Enden (sticky ends).

Mit den Enzymen EcoRV und NheI (Fermentas) wurde der pMAX-Vektor verdaut und ein kurzes DNA-Fragment ausgeschnitten. Da beide Enzyme unter denselben Bedingungen arbeiten, konnte die zweifach-Restriktion in einem Ansatz durchgeführt werden. Dieser wurde für 2 h bei 37°C inkubiert und die Enzyme anschließend für 20 min bei 65°C inaktiviert.

Der Restriktionsansatz bestand aus:

2,7 µl Vektor-DNA (3,5 µg)

5 µl BSA

5 µl Puffer 4

1 µl NheI

1 µl EcoRV

35,3 µl dH₂O

50 µl

Um das benötigte DNA-Fragment NPY-mCherry zu erhalten wurde der entsprechende Vektor für 1 h bei 37°C mit dem Enzym NotI (Fermentas) inkubiert, um den Vektor am 3'-Ende des Fragmentes zu öffnen.

Der Restriktionsansatz enthielt:

1,2 µl Vektor-DNA (2,5 µg)

5 µl Puffer O

1 µl NotI

42,8 µl dH₂O

50 µl

Aus dieser Restriktion entstanden überhängende 5'-Enden des DNA-Doppelstranges. Der pMAX-Vektor, in welchen das Fragment ligiert werden sollte, konnte jedoch nur mit Enzymen verdaut werden, welche glatte Enden an der Schnittstelle produzierten. Diese beiden Enden konnten somit nicht ligiert werden. Aus diesem Grund wurde das DNA-Fragment mit dem Klenow-Enzym behandelt. Dieses Enzym ist das größere Proteinfragment, welches nach der enzymatischen Spaltung der DNA Polymerase I aus *E. coli* mit Subtilisin entsteht. Das Klenow-Fragment besitzt eine 5'→3' Polymerase-Aktivität und die 3'→5' Exonuklease-Aktivität (Korrekturlese-Funktion). Für das Auffüllen der Enden wurde der gesamte Restriktionsansatz mit 0,5 µl dNTPs und 0,5 µl Klenow-Enzym für 15 min bei RT inkubiert und das Enzym anschließend für 15 min bei 75°C deaktiviert. Die anschließende Aufreinigung der DNA (Protokoll siehe 2.2.1.2) diente zur Entfernung von zuvor verwendeten Enzymen, vor allem aber zur Umpufferung für das folgende Restriktionsenzym.

In die Restriktion wurden eingesetzt:

50 µl DNA

1 µl NheI

6 µl Puffer Y

3 µl dH₂O

60 µl

Der Ansatz wurde für 1,5 h bei 37°C inkubiert, anschließend folgte die Enzyminaktivierung für 20 min bei 65°C.

Durch die Restriktion mit NheI konnte die NPY-mCherry DNA vollständig aus dem Vektor ausgeschnitten und im folgenden Schritt in den Vektor pMAX ligiert werden.

Restriktionen wurde außerdem durchgeführt, um vor der Sequenzierung (siehe 2.2.1.11) zu überprüfen, ob die isolierte DNA das durch die Ligation eingefügte Fragment enthielt. Dazu wurde ein Enzym gewählt, dessen Schnittstellen im Vektor und dem DNA-Fragment zu finden waren. Bei erfolgreicher Klonierung konnten somit auf dem Agarosegel zwei Banden identifiziert werden. Im Falle eines religierten Vektors wäre nur eine Bande erkennbar.

2.2.1.5 Dephosphorylierung

Durch die Linearisierung des Vektors bei der Restriktion entstehen überhängende oder glatte Enden an den Schnittstellen. Wenn die Überlappingssequenzen an beiden Enden identisch oder ähnlich sind bzw. beide Enden glatt sind, so können die Enden während der Ligation wieder miteinander verbunden werden, ohne dass ein DNA-Fragment eingefügt wird. Dies verringert die Effizienz der Ligation deutlich. Zudem verlaufen enzymatische Reaktionen nicht immer zuverlässig und nur einmal geschnittene Vektoren können ebenfalls religieren. Deshalb wurde die Dephosphorylierung mit dem Enzym SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas) durchgeführt. Dieses Enzym stammt aus Eismeergarnelen (*Pandalus borealis*) und dephosphoryliert das 5'-Phosphat von DNA und RNA.

In den Ansatz der Restriktion der pMAX DNA (siehe 2.2.1.4) wurde 1 µl SAP gegeben, gemischt und der Ansatz eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der SAP fand für 15 min bei 75°C statt. Vor der Ligation wurde die DNA mittels Gelextraktion aufgereinigt (siehe 2.2.1.2).

2.2.1.6 Ligationsreaktion

Nach der Restriktion von Plasmid-DNA und DNA-Fragment wurden die beiden Teile miteinander ligiert. Dabei verbindet das Enzym Ligase die 3'-Hydroxy-Enden mit den 5'-Phosphatenden der Nukleinsäuren durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung.

Die optimale Konzentration der DNA für die Ligationsreaktion wurde mit folgender Formel berechnet (Konz. steht für Konzentration):

$$[\text{Konz. Vektor-DNA (ng)} / \text{Länge Vektor-DNA (bp)}] \times \text{Länge DNA-Fragment [bp]} \times 3$$

Daraus ergab sich ein Verhältnis von 15 ng Vektor-DNA und 10 ng NPY-mCherry DNA. Um die Effizienz der Ligation einschätzen zu können, wurde neben dem normalen Ligations-Ansatz auch ein Kontroll-Ansatz ohne NPY-mCherry DNA hergestellt (Negativ-Kontrolle). Zum Ablesen der auf dem Plasmid kodierten Kanamycinresistenz musste der Vektor nur in zirkulärer Form vorliegen, unabhängig davon, ob ein DNA-Fragment eingefügt wurde oder nicht. Somit zeigte der Kontroll-Ansatz nach der Transformation wie hoch der Anteil religierter Vektor-DNA war. Zusätzlich gab die Anzahl der Klone auf den Kontroll-Platten einen Anhaltspunkt, wie viele Klone gepickt werden müssen, um aus mindestens einem Klon die gewünschte DNA mit NPY-mCherry im Vektor isolieren zu können.

Folgende Ligationsansätze wurden verwendet:

Ligation:	Negativ-Kontrolle:
2 µl pMAX DNA	2 µl pMAX DNA
1 µl NPY-mCherry DNA	0 µl NPY-mCherry DNA
2 µl T4 Ligase	2 µl T4 Ligase
2 µl Puffer	2 µl Puffer
13 µl dH ₂ O	14 µl dH ₂ O
20 µl	20 µl

Die Ansätze wurden für mindestens 2 h bei 16°C inkubiert und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.1.7 Transformation

Mit der Transformation ist es möglich, rekombinante DNA in Bakterien aufzunehmen. Einige Bakterien besitzen eine natürliche Kompetenz, durch welche die Aufnahme fremder DNA möglich ist, *E. coli* gehört jedoch nicht dazu. Deshalb müssen die Zellen vor der Transformation mit Calciumchlorid behandelt werden. Durch einen Überschuss an Ca²⁺-Ionen wird die Permeabilität der Zellmembran erhöht, was die Aufnahmefähigkeit der

Zellen für Fremd-DNA steigert. Durch einen Hitzeschock entstehen Poren in der Membran, so dass die DNA aufgenommen werden kann.

Chemisch kompetente Zellen (*E. coli* DH5 α , 100 μ l) wurden auf Eis aufgetaut, mit dem Gesamtansatz der Ligation gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde der Ansatz immer wieder durch vorsichtiges schnipsen am Reaktionsgefäß gemischt. Es folgte der Hitzeschock: 10 min Inkubation bei 37°C. Nach weiteren 10 min auf Eis wurden 300 μ l LB-Medium zum Ansatz gegeben und alles unter schütteln für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend konnten die Proben auf LB-Platten mit Kanamycin (Verdünnung 1:1000) plattiert werden. Das Antibiotikum diente der Selektion von Bakterien mit erfolgreich ligierten Plasmiden, welche die Resistenz gegen Kanamycin enthielten. Dagegen wurden Bakterien, bei denen die Transformation nicht erfolgreich war, durch das Antibiotikum getötet.

Nach dem Plattieren inkubierten die Platten über Nacht bei 37°C. Das Auszählen der Klone ergab 44 potentiell richtige und 16 Klone auf der Kontrollplatte. Mit fünf Klonen wurde die Plasmid-Isolation durchgeführt.

2.2.1.8 Plasmid-Mini-Präparation

Mit der Mini-Präp konnte DNA parallel aus mehreren Klonen isoliert werden, was die Wahrscheinlichkeit erhöhte, bei der Sequenzierung eine korrekte DNA-Sequenz zu erhalten. Von einer LB-Platte wurden ein oder mehrere Klone gepickt und in je 2 ml LB-Medium (versetzt mit 2 μ l Antibiotikum) über Nacht schüttelnd bei 37°C inkubiert. Diese Kultur wurde dann verwendet, um mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers Plasmid-DNA zu isolieren. War die Kontrollrestriktion (siehe 2.2.1.4) der isolierten DNA positiv, so konnte diese sequenziert werden (siehe 2.2.1.11).

2.2.1.9 Plasmid-Midi-Präparation

Die Midi-Präparation wurde zur Anreicherung von Plasmid-DNA durchgeführt. Da zu Beginn der Klonierung nur geringe Mengen der pMAX-DNA zur Verfügung standen, musste diese zur Vermehrung in kompetente *E. coli* Bakterien transformiert und anschließend daraus isoliert werden. Die Plasmid-Midi-Präparation beruht auf demselben Prinzip wie die Plasmid-Maxi-Präparation (siehe 2.2.1.10).

Ein Klon aus der Transformation wurde in 100 ml LB-Medium (versetzt mit 100 μ l Kanamycin) überführt und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag folgte die Isolation der Plasmid-DNA mit dem „Plasmid Midi Kit“ (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers. Die isolierte DNA wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und die Konzentration geschätzt (siehe 2.2.1.3). Anschließend konnte die Restriktion durchgeführt werden.

2.2.1.10 Plasmid-Maxi-Präparation

Mit dem „EndoFree Plasmid Maxi Kit“ (Qiagen) wurde Endotoxin-freie DNA gewonnen. Endotoxine sind Bestandteile der Zellmembran gram-negativer Bakterien wie *E. coli*, die in großen Mengen während der Lyse von Bakterien freigesetzt werden. Die Anwesenheit von Endotoxinen in der Plasmid-Probe verringert die Effizienz einer Transfektion eukaryotischer Zellen erheblich. Deshalb kam zur Isolation von pMAX-NPY-mCherry aus *E. coli* die Endotoxin-freie Maxi-Präparation zum Einsatz.

Eine Kolonie aus der Transformation wurde von der LB-Platte gepickt und in einen 500 ml Kolben mit 250 ml LB-Medium (versetzt mit Kanamycin 1:1000) überführt. Nach 2 h bei 37°C auf dem Schüttler wurde die Vorkultur auf zwei 500 ml Kolben verteilt, um das Wachstum der Bakterien zu fördern. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert und am nächsten Tag die Plasmid-DNA gemäß den Angaben des Herstellers isoliert. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.1.1). Anschließend wurde sie bei -20°C gelagert und zur Transfektion von bovinen Chromaffinzellen mittels Elektroporation verwendet (siehe 2.2.13.1).

2.2.1.11 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzanalyse der isolierten Plasmide aus der Plasmid-Mini-Präparation wurde am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin in Göttingen durchgeführt. Es wurden nur DNA-Proben sequenziert, welche zuvor durch eine Kontrollrestriktion (siehe 2.2.1.4) positiv auf die NPY-mCherry DNA getestet wurden.

2.2.2 Präparation von Chromaffinzellen aus den Nebennieren vom Rind

Nach dem Transport der Nebennieren vom Schlachthof in Zweibrücken am Tag der Präparation wurden im Labor zuerst restliches Bindegewebe und Fett entfernt. Anschließend folgte das Spülen mit 10 ml Locke's Lösung und die Inkubation für 5 min im Schüttelwasserbad (1083, GFL, Burgwedel, Deutschland) bei 37°C. Um das restliche Blut vollständig zu entfernen wurde dieser Schritt drei bis vier Mal wiederholt. Danach folgte der Verdau mit 129,5 Einheiten/ml Collagenase, wobei das Enzym in Locke's gelöst war. Jede Nebenniere wurde zwei Mal mit je 10 ml der Enzym-Lösung gespült und für 8-12 min, je nach Größe der Nebennieren, im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert. Der Verdau stoppte durch Zugabe von je 10 ml 10% FCS. Die Nebennieren wurden anschließend waagrecht geteilt, die Medulla herauspräpariert, von Blutgefäßen und anderen Fremdkörpern gereinigt und in kleine Stücke geschnitten. Das Gewebe wurde in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, mit Locke's auf 20 ml aufgefüllt, für 1 min vorsichtig invertiert und anschließend für 2 min bei

700 rpm zentrifugiert (5702R, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland). Nach dem Absaugen des Überstandes mussten die Zellen im Pellet vereinzelt werden. Dies geschah durch das Drücken der Probe durch einen Nylonfilter. Anschließend wurde das Volumen mit Locke's auf 20 ml aufgefüllt und die Zellsuspension für 7 min bei 700 rpm zentrifugiert. Nach dem Lösen des Pellets wurde dieses in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt, mit Locke's auf 10 ml aufgefüllt und das Pellet gründlich resuspendiert. Es folgten drei weiteren Zentrifugationsschritte bei 700 rpm für 5 min, zwischen welchen jeweils der Überstand entfernt und das Pellet in 10 ml Lockes resuspendiert wurde. Die letzte Zentrifugation erfolgte für 5 min bei 500 rpm. Durch die Zentrifugationen konnte eine relativ reine Kultur aus Chromaffinzellen gewonnen werden. Das Pellet wurde in einem, der Größe angepassten, Volumen (1-3 ml) DMEM Medium (ohne Antibiotikum) resuspendiert. Um die Zellen mit einer optimalen Dichte von $2,5-3 \cdot 10^5$ Zellen/ml plattieren zu können, wurden sie in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und mit DMEM Medium entsprechend verdünnt. Vor der Präparation wurde bereits in jede Kammer einer 6-Kammer-Platte (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) ein Deckglas (Durchmesser 25 mm, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondernheim, Deutschland) gegeben und die geöffneten Platten für 20 min unter UV-Licht sterilisiert. Auf jedes Deckglas der 6-Kammer-Platten wurden nun drei bis vier Tropfen der verdünnten Zellen plattiert und diese für 15 min im Inkubator aufbewahrt. Während dieser Zeit setzten sich die Zellen auf dem Deckglas ab. Anschließend wurden die Kammern mit 3 ml Zellmedium aufgefüllt und bei 37°C und 12% CO₂ gehalten. Drei bis fünf Tage nach dem Plattieren konnten die Zellen für Experimente verwendet werden.

2.2.3 Markierung von LDCVs in BCC

Um LDCVs mittels Fluoreszenz-Mikroskopie sichtbar zu machen wurden die Zellen mit Fluoreszenzproteinen transfiziert. Dazu kamen zwei verschiedene Methoden zum Einsatz, abhängig von den durchzuführenden Experimenten. Die Zellen wurden elektroporiert (siehe 2.2.3.1), um eine möglichst hohe Dichte markierter LDCVs zu erhalten, z. B. für Sekretionsexperimente (siehe 2.2.11.4). Sollte die Beweglichkeit der LDCVs an der PM analysiert werden, mussten einzelne LDCVs klar voneinander abzugrenzen sein, so dass eine geringere Dichte von markierten LDCVs von Vorteil war. Für diese Experimente wurden die Zellen mit einem Virus transfiziert (siehe 2.2.3.2).

Mit beiden zuvor erwähnten Methoden konnte nur ein Teil der LDCVs in den Zellen fluoreszent markiert werden. Um alle LDCVs einer Zelle zu markieren wurde der Farbstoff FFN511 (Fluoreszenter falscher Neurotransmitter) verwendet (siehe 2.2.3.3).

2.2.3.1 Elektroporation

Zur Elektroporation wurde das Neon® Transfection System (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet, da mit diesem Gerät eine hohe Transfektions-Effizienz und eine gute Vitalität der Zellen erzielt werden konnte. Bei der Elektroporation wurden die Zellen kurzen Hochspannungsimpulsen ausgesetzt, wodurch Makromoleküle wie Plasmid-DNA durch temporäre Poren in der Zellmembran in die Zellen diffundieren konnten.

Die benötigte Zellmenge (0,6-0,8 Mio Zellen pro 6-Kammer-Platte) wurde für 5 min bei 1.000 rpm und RT zentrifugiert (5415C, Eppendorf), um das Zellmedium zu entfernen. Nach dem Resuspendieren des Pellets mit 700 µl PBS Puffer erfolgte erneut eine Zentrifugation wie zuvor. Das Pellet wurde in Resuspensions-Puffer aufgenommen, wobei das Volumen des Puffers so angepasst wurde, dass mit zugefügter DNA ein Endvolumen von 10 µl pro Elektroporation entstand. Nach Zugabe der DNA (1,5–3 µg/6-Kammer-Platte) wurde alles gemischt, mit der Elektroporations-Pipette aufgezogen (Pipettenvolumen 10 µl), 3 ml elektrolytischer Puffer in die Küvette gefüllt und die Pipette in die vorgesehene Halterung gestellt. Nach erfolgter Elektroporation (1 Puls, 1100 V, 30 ms) konnten die Zellen in 1 ml Zellmedium ohne Antibiotikum aufgenommen, gemischt und auf den Deckgläsern einer 6-Kammer-Platte ausplattiert werden. Nach 15 min Inkubation bei 37°C und 12% CO₂ wurde jede Kammer mit 3 ml Zellmedium ohne Antibiotikum gefüllt. Frühestens nach drei, aber spätestens nach 24 h wurde das verwendete Zellmedium gegen Medium mit Antibiotikum ausgetauscht.

Zur Elektroporation wurden die Plasmide pMAX-NPY-mCherry (Anregung bei 561 nm) und pMunc18-2-mTFP (Anregung bei 450 nm) verwendet.

2.2.3.2 Virusaktivierung und Transfektion der Zellen

Das verwendete Infektionssystem basierte auf dem Semliki-Forest-Virus (SFV). Bei der Transfektion der Zellen heftet sich das Virus an die Zellmembran der Wirtszelle, da Glykoproteine der viralen Hülle an Rezeptoren der Wirtszellen binden können. Das Virus wird durch Endozytose in die Zelle aufgenommen, wo die virale Hülle mit der endosomalen Membran fusioniert, so dass das Nukleokapsid des Virus in das Zytosol der Zelle entlassen wird. Das Kapsidprotein wird anschließend abgebaut, wodurch die Virusnukleinsäure wirksam werden kann.

Eines der verwendeten, rekombinanten Viren kodierte neben den nichtstrukturellen Proteinen auf seiner RNA zusätzlich für ein Fusionsprodukt aus dem Neuropeptid Y (NPY) und dem fluoreszenten Protein mCherry. Durch die Fusion mit NPY, welches in die LDCVs der Chromaffinzellen transportiert wurde, gelangte auch mCherry dorthin und markierte so die LDCVs fluoreszent bei Anregung mit einer Wellenlänge von 561 nm. Die Gene für

NPY-mCherry wurden mittels PCR in den Vektor pSFV1 kloniert (beschrieben in Ashery et al., 2000). Im Gegensatz zu elektroporierten Zellen war der Anteil von markierten LDCVs nach Infektion mit dem Virus NPY-mCherry deutlich geringer. Nach Elektroporation mit NPY-mCherry befanden sich im Mittel $47,7 \pm 4,7$ fluoreszente LDCVs an der PM, die Inkubation mit den Viren resultierte dagegen in durchschnittlich $8,3 \pm 1,0$ markierten LDCVs in TIRF.

Weitere SFV wurden zur Expression einer mutierten Variante von Syntaxin oder zur Überexpression von SNAP-25 verwendet. In diesen Fällen waren die Gensequenzen der beiden Proteine jeweils über ein IRES-Element (englisch für „internal ribosomal entry site“) an das grün fluoreszente Protein (GFP) gekoppelt. Durch das IRES-Element entstand auf der mRNA eine zweite Bindestelle für Ribosomen, wodurch die Sequenz von Fluoreszenzprotein und Zielprotein getrennt translatiert wurden. Das Fluoreszenzprotein verblieb im Zytoplasma, so dass transfizierte Zellen identifiziert werden konnten. Im Gegensatz dazu wurde das exprimierte Protein an seinen Zielort transportiert. Diese Technik bietet den Vorteil, dass das Fluoreszenzprotein keinen Einfluss auf die Funktion des exprimierten Proteins hat. Anstelle des normal in Zellen vorliegenden Syntaxins wurde eine mutierte Variante verwendet. Die Veränderung der Aminosäuren 165 (von Leucin zu Alanin) und 166 (von Glutaminsäure zu Alanin) führte dazu, dass Syntaxin ausschließlich in der geöffneten Konformation vorlag (im Folgenden wird dieses Protein als Stx1A L165A/E166A bezeichnet). Zur Visualisierung der LDCVs wurden die Zellen vor der Virustransfektion mit pMAX-NPY-mCherry elektroporiert. Alle benötigten Viren waren zu Beginn der Experimente bereits im Labor vorhanden.

Um zu verhindern, dass sich das SFV in den Zellen vermehrt, wurde die genetische Information für die Hüllproteine entfernt. Zusätzlich wurden Punktmutationen in die Hüllproteine eingefügt, wodurch die proteolytische Prozessierung dieser Proteine bei der Generierung des Virus blockiert war. Somit musste das Virus vor der Infektion der Chromaffinzellen erst aktiviert werden, was durch die Protease Chymotrypsin geschah. Dazu wurden zu 450 µl Virus-Suspension dieselbe Menge Opti-MEM und 100 µl Chymotrypsin gegeben. Nach 40 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die zuvor zugegebene Protease mit 110 µl Aprotinin inaktiviert. Anschließend konnte der Virus zur Infektion der Zellen verwendet werden. Je 150 µl des Virus wurden in die entsprechenden Kammern der 6-Kammer-Platte gegeben. Die Zellen wurden nach ca. 10 h (NPY-mCherry und SNAP-25) oder 6 h (Stx1A L165A/E166A) Inkubation bei 37°C und 12% CO₂ mit dem Virus für die Messungen verwendet.

2.2.3.3 Fluoreszenzter Falscher Neurotransmitter 511 (FFN511)

Mit FFN511 sollte untersucht werden, ob das Alter von LDCVs bei der Sekretion eine Rolle spielt. Dafür wurden Chromaffinzellen mit NPY-mCherry elektroporiert und anschließend mit FFN511 geladen. Mit dem Zeitpunkt der Elektroporation war auch das maximale Alter der rot fluoreszenten LDCVs (Anregung bei 561 nm) bekannt. Grün fluoreszierende LDCVs (Anregung bei 450 nm) dagegen waren älter als der Zeitpunkt der Elektroporation. Mit FFN511 konnten alle vorhandenen LDCVs einer Zelle angefärbt werden. FFN511 wird dabei über den relativ unspezifischen, vesikulären Monoamintransporter (VMAT) aus dem Zytosol in die LDCVs transportiert, wobei VMAT auch für den Transport von z. B. Dopamin, Serotonin und Noradrenalin in die LDCVs zuständig ist (Gubernator et al., 2009). Zum Laden wurden die Zellen 15 min bei 37°C mit 10 µM FFN511 inkubiert. Da der Farbstoff nach ca. 30 min aus den LDCVs ausgewaschen war, wurden zusätzlich 5 µM FFN511 zum extrazellulären Medium gegeben.

2.2.4 Chemische Fixierung und Immuncytochemie

Um die Maturierungszeit von NPY-mCherry zu bestimmen und zu erfahren in welchem Zeitraum die Verteilung der LDCVs vom Golgi-Apparat zur PM erfolgt, sollten die LDCVs boviner Chromaffinzellen mit möglichst hoher Auflösung zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion visualisiert werden. Dies wurde mit struktureller Beleuchtungsmikroskopie (kurz SIM, siehe 2.2.5) umgesetzt. Da bei dieser Art der Mikroskopie das finale Bild der ganzen Zelle aus vielen Einzelbildern konstruiert wurde, durfte während der Aufnahmen keine Bewegung in den Zellen bzw. der Zellen selbst statt finden. Um dies zu verhindern, wurden die Zellen chemisch fixiert. Mittels Immuncytochemie wurden bestimmte Proteine markiert.

Die Zellen wurden jeweils stündlich zwischen 5 und 12 h, sowie 24 und 48 h nach der Elektroporation mit NPY-mCherry fixiert. Um einen Bezugspunkt in der Zelle zu erhalten wurde der Golgi-Apparat mit Antikörpern markiert. Dabei kam die indirekte Immunmarkierung zum Einsatz, bei welcher die primären Antikörper spezifische Epitope erkennen und binden. Durch sekundäre Antikörper, welche an die primären Antikörper binden und mit einem Fluophor gekoppelt sind, können die gebundenen Epitope sichtbar gemacht werden. Im Gegensatz zur direkten Immunmarkierung, bei welcher der primäre Antikörper bereits mit einem Fluophor gekoppelt ist, bietet die hier verwendete Methode eine höhere Sensitivität durch bessere Signalverstärkung.

Für die chemische Fixierung wurde das Deckglas mit den Zellen zu den erwähnten Zeitpunkten mehrmals mit PBS gewaschen, um das Zellmedium vollständig zu entfernen. Es folgte die Fixierung der Zellen mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA, Polyscience, Inc.,

Warrington, PA, USA) für 20 min bei RT. Durch die Inkubation mit Formaldehyd kam es zur irreversiblen Vernetzung von Proteinen und deren Seitenketten, so dass die Zellen konserviert wurden und alle Proteine an ihrer ursprünglichen Position in der Zelle erhalten blieben. Anschließend wurde drei Mal für je 3 min mit PBS gewaschen, um das Fixativ zu entfernen. Durch eine zehnminütige Inkubation mit 50 mM Glycin (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde noch vorhandenes, überschüssiges PFA gebunden. Anschließend musste das Glycin wieder entfernt werden, was durch drei dreiminütige Waschschrte mit PBS geschah. Es folgte die Permeabilisierung der Zellen mit einer Lösung aus 0,1% Triton (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 5% NGS (Ziegenserum, engl. natural goat serum; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in PBS für 30 min bei RT. Triton X-100 ist ein nicht ionisches Tensid, welches den Antikörpern über Löcher in der PM den Zugang in die Zelle ermöglicht. Sowohl die Lösung zur Permeabilisierung der Zellen, als auch verschiedene weitere Lösungen, welche in späteren Schritten verwendet wurden, enthielten NGS. Dies wurde eingesetzt, um unspezifische Bindungen von Antikörpern und somit falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Auch die Lösung, welche nach der Permeabilisierung verwendet wurde, enthielt 5% NGS in PBS und wurde drei Mal für je 3 min mit den Zellen inkubiert. Die Zellen konnten anschließend mit dem primären Antikörper inkubiert werden, wobei darauf zu achten war, dass die richtige Konzentration des Antikörpers verwendet wurde. Ist die eingesetzte Konzentration zu hoch, so kommt es zu unspezifischen Bindungen, ist sie zu gering, werden nicht alle oder eventuell gar keine Epitope gebunden. Die Antikörper zur Markierung des Golgi-Apparates wurden 1:100 (GM130) und 1:300 (TGN46) in PBS mit 5% NGS verdünnt und jeweils 100 µl auf ein Stück Parafilm gegeben. Die Deckgläser wurden mit der Zellseite nach unten auf diesen Tropfen gelegt und in einer feuchten Kammer für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden nicht gebundene Antikörper mit der Blockierungslösung in drei Schritten für je 3 min entfernt und eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers durch das in der Lösung enthaltene NGS verhindert. Auch der sekundäre Antikörper musste in geeigneter Verdünnung verwendet werden, um unspezifische Markierung zu vermeiden, weshalb eine 1:2000 Verdünnung (in PBS mit 5% NGS) eingesetzt wurde. Ebenfalls wichtig bei der Auswahl des sekundären Antikörpers ist der Organismus, aus welchem der primäre Antikörper stammt. Die verwendeten sekundären Antikörper banden primäre Antikörper aus der Maus (GM130) oder dem Kaninchen (TGN46). Die Deckgläser mit den Zellen wurden mit der Zellseite nach unten auf einen 100 µl Tropfen des sekundären Antikörpers gelegt und für 45 min im Dunkeln inkubiert, um das gebundene Fluophor nicht zu bleichen. Auch alle folgenden Inkubationsschritte wurden im Dunkeln durchgeführt. Nach der Inkubationszeit wurde wie zuvor blockiert und die nicht gebundenen Antikörper in fünf Waschschrten entfernt. Zum Schluss wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Um das Deckglas

auf einem Objektträger zu montieren, wurde er vorher kurz in Wasser getaucht und auf einen Tropfen (20 µl) Montiermedium gelegt, mit der Zellseite zum Objektträger. Dieses spezielle, leicht viskose Medium dient dazu die Proben für längere Zeit zu konservieren. Im Gegensatz zu Wasser verdampft es nicht und die Zellen trocknen nicht aus. Zusätzlich schützt es die verwendeten Fluophore vor dem Ausbleichen. Nach ca. 45 min bei 37°C oder der Lagerung bei RT über Nacht war das Montiermedium getrocknet und das Deckglas wurde an den Rändern mit Klarlack versiegelt, um einen zusätzlichen Schutz vor dem Austrocknen der Zellen zu bieten. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.2.5 Strukturierte Beleuchtungsmikroskopie (SIM)

Das Auflösungsvermögen eines Lichtmikroskopes wird durch die Welleneigenschaft des Lichts begrenzt. Nach dem Abbeschen Gesetz (Abbe, 1873) lässt sich das Auflösungsvermögen mit der Formel $d = \lambda / 2 \cdot NA$ bestimmen, wobei λ der Wellenlänge des verwendeten Lichts entspricht und NA die numerische Apertur darstellt, was bedeutet, dass die Auflösung durch die Beugung begrenzt ist. Unter optimalen Bedingungen, bei Verwendung von violetterem Licht (Wellenlänge 0,4 µm), kann theoretisch eine Auflösungsgrenze von etwas weniger als 0,2 µm erreicht werden. In der Praxis jedoch sind die kleinsten Objekte, welche gerade noch im konventionellen Mikroskop einzeln erkennbar sind, Bakterien mit einer Größe von 0,5 µm. Kleinere Strukturen können aufgrund der Welleneigenschaften des Lichts nicht mehr einzeln aufgelöst werden. Mittlerweile gibt es jedoch erfolgreiche Ansätze, Mikroskope und die mikroskopische Abbildung so zu modifizieren, dass eine Auflösung jenseits des Abbeschen Gesetzes möglich wird. So können mit der strukturierten Beleuchtungsmikroskopie (Structured Illumination Microscopy, SIM) Bilder erzeugt werden, welche annähernd zweimal höher aufgelöst sind, als es die Beugungsgrenze zulässt. Somit sind Auflösungen in der z-Ebene von 250 nm und der xy-Ebene von weniger als 100 nm möglich.

Bei der SIM wird ein optisches Gitter mit einem definierten, sinusförmigen Muster in der Objektebene im Anregungsstrahl positioniert. Da sich das Gitter im Lichtweg befindet, wird es auch in der Fokusebene der Probe abgebildet. Durch entsprechende Differenzbildung entsteht ein konfokales Signal mit Tiefendiskriminierung. Die Gitterkonstante legt dabei die axiale Auflösung fest, die NA bestimmt die laterale Auflösung. Um ein SIM-Bild von einer Ebene der Zelle zu erhalten, wurden die Informationen mehrerer Einzelbildern miteinander verrechnet. Das Gitter im Lichtweg wurde während den Aufnahmen in der Objektebene verschoben, so dass insgesamt 15 Einzelaufnahmen entstanden. Dies geschah durch fünf konsekutive, laterale Verschiebungen in drei Phasenlagen (jeweils um 60° rotiert). Damit Zellen vollständig mit SIM aufgenommen werden konnten, wurde der beschriebene Vorgang

in mehreren Ebenen der z-Richtung durch die ganze Zelle wiederholt. Die Interferenzmuster der Einzelaufnahmen wurden anschließend mit einem speziellen Algorithmus zu einem hochauflösenden Bild verrechnet (Zen-Software). Die Pixelgröße der Aufnahmen betrug 80 nm, konnte durch Verrechnung zum hochauflösenden Bild jedoch auf 40 nm reduziert werden.

Das verwendete Mikroskop war ein Prototyp der Firma Zeiss. Die Aufnahmen wurden mit einem 63x Öl Immersions-Objektiv bei verschiedenen Wellenlängen (488, 561 und 647 nm, je nach eingesetztem Fluophor) durchgeführt. Dabei wurden Belichtungszeit und Stärke des Lasers entsprechend variiert, um ein möglichst kontrastreiches Bild zu erhalten und gleichzeitig das Ausbleichen der Proben während der Aufnahmen zu vermeiden.

Um die Verteilung von LDCVs unterschiedlichen Alters zu untersuchen, wurden Aufnahmen von lebenden Zellen mit SIM durchgeführt. Dies war nur möglich, wenn sich die markierten LDCVs während einer Aufnahme nicht bewegten. Dazu wurden die Zellen 12 h bei 37°C mit 1 μ M Phalloidin inkubiert, was zur Blockierung der Polymerisierung von Aktin führte. Zusätzlich wurde die Polymerisierung von Tubulin durch die Inkubation der Zellen mit 1 μ M Taxol für 15 min bei 37°C inhibiert. Die Zellen wurden mit 5 μ M FFN511 bei 37°C geladen, um alle LDCVs der Zelle anzufärben.

2.2.6 Aufbau des Messplatzes

Für die kombinierten Experimente aus Elektrophysiologie und TIRFM kamen aufgrund verschiedener Anforderungen zwei Messplätze zum Einsatz. Für die meisten Experimente wurde ein invertiertes Mikroskop (Zeiss Axiovert 200, Göttingen, Deutschland) verwendet, welches auf einem pneumatisch betriebenen, schwingungsgedämpften Tisch aufgebaut war. Dieser war nötig, um Bewegungen zwischen Patchpipette und Präparat durch Erschütterungen und Schwingungen aus der Umgebung zu verhindern. Zusätzlich war der Messstand von einem Faradayschen Käfig umgeben, der elektrische Störungen abschirmte und somit das Signal-Rausch-Verhältnis optimierte. Zum Betrachten der Zellen wurden ein 10x Okular und ein Fluor 100x/1,45 NA Objektiv der Firma Zeiss verwendet. An das Mikroskop war über einen Strahlteiler eine schwarz/weiß Kamera (Andor iXonEM, Pixelgröße 16 μ m, Belfast, Nordirland) angeschlossen. Der Strahlteiler trennte durch einen dichroischen Filter die emittierenden Wellenlängen von angeregten Fluophoren. In dieser Arbeit reflektierte er Wellenlängen unter 560 nm, so dass die Emissionen des Fura (für Ca^{2+} -Messungen, siehe 2.2.9) am Filter auf eine Photodiode (Rapp OptoElectronics, Hamburg, Deutschland) gespiegelt wurden. Langwelligeres Licht konnte den Filter passieren und gelangte auf den CCD-Chip der Kamera. Durch einen TIRF-Schieber konnten mehrere Laserlinien über einen Port eingekoppelt werden. Neben dem zumeist verwendeten

Festkörperlaser 85 YCA (561 nm, Melles Griot, Carlsbad, CA, USA) war der Messtand außerdem mit einem Argon-Gaslaser (488 nm, 1885F12 Spectra-Physics, Mountain View, CA, USA) ausgestattet. Ebenfalls an das Mikroskop angeschlossen war ein Monochromator (Polychrom V, TILL Photonics, Planegg, Deutschland), welcher für ratiometrische Ca^{2+} -Messungen eingesetzt wurde (siehe 2.2.9).

Mit der Kamerasoftware, welche auf Labview (National Instruments, Austin, TX, USA) basierte, wurden sämtliche ausgehenden Signale und Auslöser gesteuert. Dabei kam eine AD/DA Wandlerkarte zum Einsatz, welche die digitalen Signale zur Regulierung der Laserverschlüsse und zum Auslösen von Kamera und PULSE-Software umsetzte. Bei Ca^{2+} -Messungen wurde das analoge Signal zum Wechseln der Wellenlänge des Monochromators (Polychrom V, TILL Photonics, Planegg, Deutschland) durch die Wandlerkarte erzeugt, die gemessene Spannung der Photodiode über den AD-Eingang der Karte ausgelesen und die Fluoreszenzintensität der Ca^{2+} -Indikatoren im Kameraprogramm in Echtzeit angezeigt.

Der zweite Messplatz verfügte über einen Argon Laser (Spectra-Physics, Darmstadt, Deutschland), durch den Fluoreszenzproteine (unter anderem) mit einer Wellenlänge von 450 nm angeregt werden konnten. Dies war für die Experimente, in welchen Munc18-2-mTFP exprimiert wurde und beim Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffes FFN511 nötig. Es stand ein invertiertes IX 70 Mikroskop (Olympus Life Science GmbH, Hamburg, Deutschland) zur Verfügung. Ein Festkörperlaser (85YCA010, Melles Griot, Carlsbad, USA) mit einer Emission von 561 nm war über einen Lichtleiter und einen TILL-Kondensor (T.I.L.L. Photonics, Gräfeling, Deutschland) in das Mikroskop eingekoppelt. Des Weiteren war der Messstand mit einem Akustooptischen Modulator (AOTF, Visitron Systems, Puchheim, Deutschland) ausgestattet. Das emittierte Licht gelangte in eine QuantEM 512SC Kamera (Photometrics, Tucson, AZ, USA), welche durch das Programm Metamorph (Visitron, Puchheim, Deutschland) gesteuert wurde. Durch die Kombination von Kamera und einem 100x/1,45 NA TIRF Öl-Immersions Objektiv (Olympus, Hamburg, Deutschland) konnte eine finale Pixelgröße von 160 nm erreicht werden.

Mit Hilfe eines Perfusionssystems wurden die Zellen während den Experimenten mit frischer Badlösung perfundiert, was die Verwendungszeit eines Deckglases mit Zellen erheblich verlängerte. Die im Bad sitzende Absaugung hielt das Flüssigkeitslevel über den Zellen konstant.

Als Messverstärker diente an beiden Messplätzen ein EPC-9 mit zugehörigem Vorverstärker, an dem die Patchpipette befestigt wurde. Die Pipette konnte über einen Grobtrieb und einen Mikromanipulator kontrolliert werden. Ein chlorierter Silberdraht diente als Pipettenelektrode und stellte den Kontakt zur intrazellulären Lösung her, während die Badelektrode mit dem Vorverstärker verbunden war. Seitlich am Pipettenhalter wurde an einer Öffnung ein dünner

Kunststoffschlauch angebracht, dessen Ende mit einer Spritze verbunden war. Über diese Spritze konnte ein Überdruck in der Patchpipette erzeugt werden.

Die für die Patch-Clamp Technik benötigten Pipetten aus Borosilicatglas wurden mit einem Puller (Flaming/Brown Micropipette Puller P-97, Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA) hergestellt. Von Länge und Durchmesser der Pipettenspitze war der Pipettenwiderstand abhängig, welcher zwischen 3 und 5 Megaohm lag. Um saubere Pipetten zu erhalten, wurde während des Umhüllens der Pipettenspitze mit Wachs (zur elektrischen Isolierung) über eine Spritze Überdruck in der Pipette angelegt. Anschließend folgte das Polieren der Pipette durch Hitze, um die Spitze vom Wachs zu befreien.

Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und alle Komponenten des Systems waren elektrisch geerdet.

2.2.7 Patch-Clamp Technik

Die Patch-Clamp Technik, welche 1976 erstmals von Neher und Sakmann publiziert wurde (Neher und Sakmann, 1976), ist eine Methode zur Beobachtung und Analyse von einzelnen Ionenkanalströmen (engl. single cell recording) oder dem Strom einer ganzen Zelle (engl. whole cell recording). Sie ermöglicht auch die zeitlich hochauflösende Messung der Membrankapazität (Neher und Marty, 1982). Die Technik ist eine Weiterentwicklung der Spannungsklemme (Voltage-Clamp) und stellt heute die Basis für zahlreiche Methoden der modernen Elektrophysiologie dar.

Um Zellströme mit der Patch-Clamp Technik zu messen, wurde ein Deckglas mit den darauf angewachsenen bovinen Chromaffinzellen in eine Messkammer gelegt und diese vorsichtig mit extrazellulärem Medium geflutet. Die Patch-Pipette wurde mit 2,75 µl intrazellulärer Lösung befüllt, auf der Pipettenelektrode montiert und ein Überdruck im Inneren der Pipette angelegt. Dann wurde die Pipette in die Badlösung getaucht und unter Sichtkontrolle mit Hilfe des Mikromanipulators an die ausgewählte Zelle herangeführt, bis die Spitze auf der Zellmembran aufsetzte. Dieser Kontakt („on-cell“ Konfiguration) löste einen Anstieg des Widerstandes aus, was durch einen Abfall des vom Verstärker ausgesandten Kontrollstromes erkennbar war. Durch das Ablassen des zuvor erzeugten Überdruckes entstand ein Unterdruck und das Membranstück („patch“) unter der Pipette wurde teilweise in die Pipette gesaugt (Abb. 11a). Dadurch ergab sich ein extrem hoher Abdichtwiderstand von mehreren Gigaohm gegen das extrazelluläre Medium, der sogenannte „Gigaseal“. Der Gigaseal verminderte das Hintergrundrauschen, da die Leckströme zwischen Membranoberfläche und Pipettenspitze auf ein Minimum reduziert wurden. Ausgehend von dieser Basis-Konfiguration gelangt man zu drei Folge-Konfigurationen, welche unterschiedliche Arten der Messung ermöglichen.

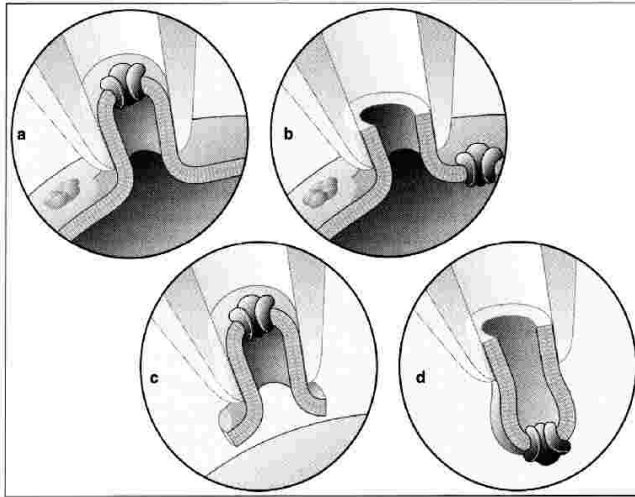


Abb. 11: Konfigurationen der Patch-Clamp Technik. Ausgehend von der „on-cell“ Konfiguration (a) können verschiedene Folge-Konfigurationen erreicht werden. Durch leichten Unterdruck in der Pipette wird das Membranstück zerstört und die Zelle kann in der Ganzzelleableitung (b) gemessen werden. Wird die Pipette in der „on-cell“ Konfiguration langsam zurück gezogen, so löst sich das Membranstück unter der Pipette aus der restlichen Membran, wodurch man zur „inside-out“ Konfiguration gelangt (c). Aus der Ganzzelleableitung kann die „outside-out“ Konfiguration (d) erreicht

werden, wenn die Pipette langsam von der Zelle entfernt wird. Das Membranstück unter der Pipette löst sich von der Zelle und die Membran schließt sich wieder, allerdings ist nun die ursprünglich zyttoplasmatische Seite dem Pipetteninneren zugekehrt. (Quelle: Numberger M., 1996)

In der „inside-out“ (Abb. 11c) und „outside-out“ (Abb. 11d) Konfiguration wird das Membranstück von der Zelle abgezogen, so dass nur Ströme über diesen Membranfleck gemessen werden. Dabei besteht ein Kontakt zwischen Pipetteninhalt und der Innen- (inside-out) oder Außenseite (outside-out) der Zellmembran.

In dieser Arbeit wurde ausschließlich eine dritte Methode, die Ganzzelleableitung („whole-cell“ Konfiguration, Abb. 11b) verwendet, bei welcher der Membranfleck unter der Pipettenspitze durch einen kurzen Unterdruck in der Pipette zerstört wurde, ohne die Verbindung zur Zelle zu verlieren. Bei dieser Konfiguration wurden keine Einzelkanalströme, sondern die Gesamtstromantwort einer Zelle als Summe aller aktiven Kanäle gemessen. Des Weiteren entstand auf diesem Weg eine Verbindung zwischen dem Inneren der Pipette, also der intrazellulären Lösung, und dem Zytosol der Zelle, während beide gegen die Außenlösung durch den hohen Widerstand des Gigaseals isoliert waren. Diese Konfiguration bietet somit die Möglichkeit, über die Pipettenlösung die Zelle von innen her zu manipulieren, so dass die Ionen-Konzentrationen (z. B. von ATP) in der Zelle durch die Zusammensetzung des intrazellulären Mediums in etwa vorgegeben werden kann.

In der Ganzzelleableitung wurde das Membranpotential der untersuchten Zelle konstant bei -70 mV gehalten und der dazu notwendige Kompensationsstrom gemessen (Voltage Clamp). Die gleichzeitige Strommessung und Potentialkontrolle wurde durch eine Strom-Spannungswandlung bewerkstelligt, deren wichtigste Komponenten der Operationsverstärker und der Referenzwiderstand waren (Abb. 12). Der Verstärker hat am Eingang kontinuierlich das Membranpotential der Zelle gemessen (U_{Pip}). Dieser Wert entsprach der Pipettenspannung und wurde mit der Kommandospannung (U_{Soll}), welche von der Steuereinheit vorgegeben war, verglichen. Bei Übereinstimmung der beiden Werte floss kein Strom durch das System. Abweichungen durch Veränderungen von U_{Pip} oder U_{Soll}

verursachten am Verstärkerausgang eine Spannung, welche der Differenz der beiden Werte entsprach. Es floss aufgrund der Spannungsdifferenz so lange kein Strom über den Referenzwiderstand, bis diese am Verstärkereingang aufgehoben war. Erst mit Hilfe des Referenzwiderstandes war somit eine Reaktion auf Spannungswechsel im Mikrosekundenbereich (μs) möglich, was unerlässlich für die hohe zeitliche Auflösung bei der Strommessung war. Störgrößen, wie die Membrankapazität oder die Pipettenkapazität, wurden über weitere Rückkopplungskreise kompensiert.

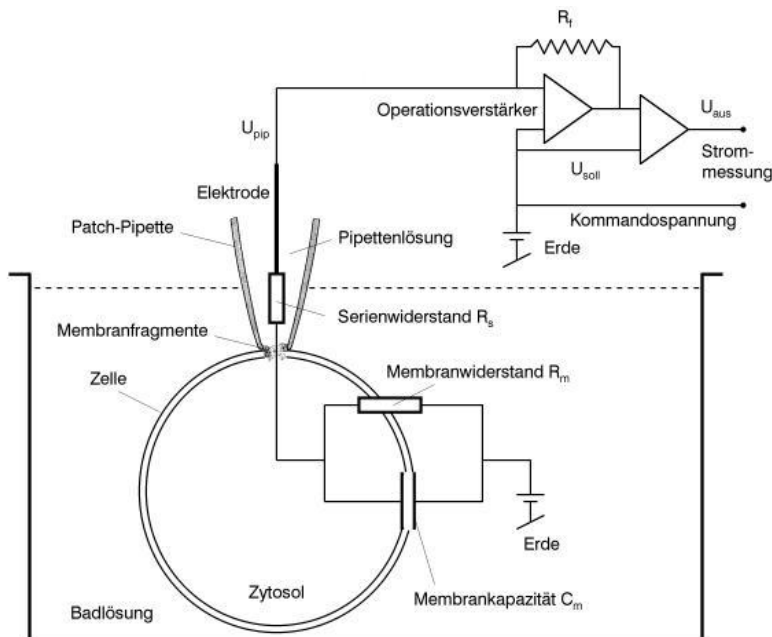


Abb. 12: Vereinfachtes Schaltbild eines Patch-Clamp Verstärkers und Ersatzschaltbild der Ganzzellableitung. Legende: R_f : Rückkopplungswiderstand, U_{soll} : Kommando- oder Sollspannung, U_{pip} : Pipettenpotential, U_{aus} : Ausgangsspannung, proportional zum Strom. Der Schaltkreis des Verstärkers, welcher einen Strom-Spannungswandler darstellte, war nahe der Pipette im Vorverstärker untergebracht. (Quelle: Numberger M., 1996)

Die Zelle funktioniert als eine Art Plattenkondensator mit parallel geschaltetem Widerstand (R_m), so dass die Zellmembran als Barriere dient, um positive und negative Ladungen räumlich zu trennen. Die Kapazität der Zelle (also die Ladungsmenge, welche benötigt wird, um sie mit einem bestimmten elektrischen Potential zu versehen) ist dabei proportional zur Membranoberfläche, wobei die spezifische Kapazität einer biologischen Membran mit $\sim 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ angegeben wird (Cole, 1968). Eine Veränderung in der Stimulusspannung lädt die Membrankapazität auf und der Strom, welcher durch die Spannung des Kondensators quantifiziert werden kann, stellt die tatsächliche Membrankapazität dar. Somit lässt die Änderung der gemessenen Membrankapazität direkte Rückschlüsse auf die Größe der Zelle zu. Die Kapazität steigt, wenn ein LDCV mit der PM fusioniert (Exozytose) oder sinkt, wenn Teile der Membran wieder in die Zelle aufgenommen werden (Endozytose). Somit ist die Patch-Clamp Technik sehr gut geeignet, um Endo- und Exozytose zu messen (He et al., 2009).

Zur Membrankapazitätsmessung verwendet man die Lock-in-Technik, bei der eine sinusförmige, oszillierende Spannung an die Zelle angelegt wird (Lindau und Neher, 1988). Wie oben bereits beschrieben spielt der Verstärker eine wichtige Rolle, da dort das

sinusförmige Referenzsignal mit dem Messsignal multipliziert und in einen Tiefpass integriert wird. Wichtig dabei ist die Phasenverschiebung der beiden Signale, da die Sinuswelle eine Phasenverschiebung von 90° erfährt, wenn sie über einen idealen Kondensator läuft. Dabei ist die Amplitude der Sinuswelle umgekehrt proportional zum Widerstand. Unterscheiden sich Referenzsignal und Messsignal in ihrer Frequenz, so liefert der Lock-in-Verstärker kein Ausgangssignal. Nur bei gleichen Frequenzen entsteht am Verstärker ein Ausgangssignal, wodurch sich bei Verwendung einer geeigneten Referenzfrequenz die entsprechende Komponente aus dem Messsignal herausfiltern lässt.

2.2.8 TIRF-Mikroskopie (TIRFM)

Interne Totalreflektions-Fluoreszenz (TIRF) ist ein optischer Effekt, welcher an Übergängen von Medien mit verschiedenen refraktären Indizes auftritt (Abb. 13). Wenn ein Lichtstrahl von einem Medium mit hohem refraktären Index (z. B. Glas, $n_1=1,8$) in ein Medium mit niedrigem refraktären Index (z. B. Wasser, $n_2=1,35$) übergeht, kommt es zur Totalreflektion für bestimmte Einfallswinkel, welche größer als der sogenannte „kritische Winkel“ (θ_c) sind. Dieser Winkel lässt sich nach dem Snell'schen Gesetz berechnen: $n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$ mit n_1 und n_2 als Brechungsindizes der beteiligten Medien und θ_1 und θ_2 als Einfalls- und Ausfallswinkel. Dabei ist der kritische Winkel abhängig von den refraktären Indizes der Medien am Übergangspunkt: $\theta_c = \sin^{-1}(n_2 / n_1)$. Für die Grenzfläche von Glas und Wasser ergibt sich daraus ein Winkel θ_c von $63,85^\circ$. Ein geringer Teil des einfallenden Lichtes dringt an der Grenzfläche als elektromagnetisches Feld, der sogenannten evaneszenten Welle, in das flüssige Medium ein und breitet sich parallel zur Oberfläche aus.

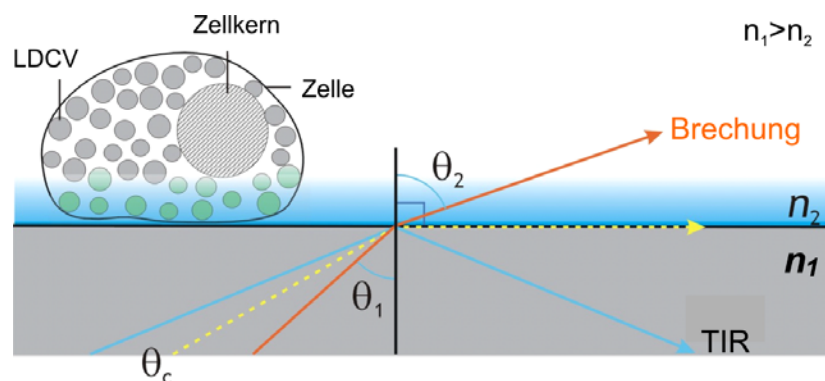


Abb. 13: Schema der Anregung von Fluophoren mit TIRFM. Je nach Einfallswinkel θ wird der Lichtstrahl an der Grenzfläche von Glas (n_1) zu Wasser (n_2) entweder gebrochen (rote Linie, Einfallswinkel θ_1 ist kleiner als der kritische Winkel θ_c), totalreflektiert (TIR = total internal reflection, blaue Linie, Einfallswinkel θ_2 ist größer als θ_c) oder breitet sich parallel zur Glasoberfläche aus (gelbe Linie, kritischer Einfallswinkel θ_c) und kann Fluophore in diesem Bereich anregen.

Die Intensität der evaneszenten Welle nimmt exponentiell mit zunehmender Distanz zur Grenzfläche ab, wodurch nur die Fluophore, welche nah (~bis zu 300 nm) an der Glasoberfläche sind, angeregt und somit sichtbar werden. Die Eindringtiefe hängt dabei von der Polarisierung des Lichtes ab und wird mit größerem Winkel θ_c kleiner. Durch die geringe Eindringtiefe gelangt kein Licht in das Zelllumen, so dass sich ein sehr hohes Signal-Rausch-Verhältnis für den beobachteten Bereich ergibt (Oheim et al., 1999; Axelrod, 2001; Steyer und Almers, 2001; Toomre und Manstein, 2001). In Abb. 14 wird dies deutlich.

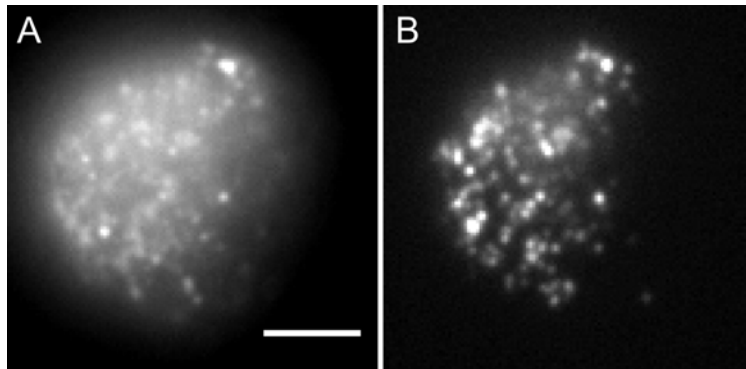


Abb. 14: Beispiel einer Zelle in Epifluoreszenz und TIRFM. Im Gegensatz zur Epifluoreszenz (A) ist das Fluoreszenz-Signal der markierten LDCVs mit TIRFM (B) verstärkt, da die Eindringtiefe des Lasers verringert ist und nur Fluophore direkt an der am Deckglas angewachsenen Membran angeregt. Somit wird die diffuse Fluoreszenz, welche von

außerhalb der Fokusebene liegenden, angeregten Fluoreszenzproteinen verursacht wird, vermieden. Skala: 5 μm

Ein weiterer Vorteil der TIRFM ist das geringe Ausbleichen von Fluophoren, welche sich außerhalb der TIRF-Ebene befinden.

Zusammengefasst ermöglicht diese Technik die Untersuchung von Ereignissen, welche direkt an der Zellmembran geschehen und ist damit die perfekte Methode, um Exozytose zu beobachten.

2.2.9 Ratiometrische Fura-Messungen

Mit Hilfe ratiometrischer Ca^{2+} -Indikatoren kann die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sehr genau bestimmt und in Echtzeit gemessen werden. In dieser Arbeit wurde dazu eine Mischung der beiden Ca^{2+} -Indikatoren Fura-2 und Fura-FF verwendet. Fura bindet Ca^{2+} und bildet dadurch Chelate. Dabei geht das Anregungsmaximum von Fura-2 und Fura-FF von 363 nm (calciumfrei) zu 335 nm (calciumgesättigt) über, das Emissionsmaximum bleibt jedoch unverändert bei 510 nm. In Abb. 15 sind die Anregungsspektren von Fura-2 (Abb. 15A) und Fura-FF (Abb. 15B) gezeigt.

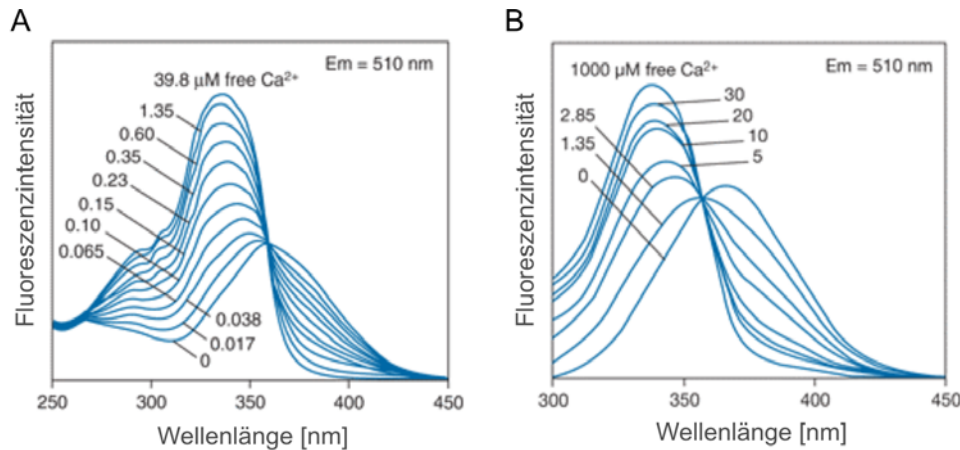


Abb. 15: Veränderung der Fluoreszenzintensität von Fura-2 und Fura-FF bei unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen. Die Emissionsraten von Fura-2 (A) und Fura-FF (B) wurde bei 510 nm gemessen, die Anregungswellenlängen lagen im Spektralbereich zwischen 250 und 450 nm (A) bzw. 300 und 450 nm (B). (Quelle: www.invitrogen.com)

Beide Indikatoren zeigen bei einer Wellenlänge von $\lambda_{ip} = 357,5 \text{ nm}$ den sogenannten isosbestischen Punkt. Werden die Indikatoren mit 357,5 nm angeregt, so bleibt die Fluoreszenzintensität bei einer Änderung der Ca^{2+} -Ionenkonzentration konstant. Verwendet man eine kürzere Wellenlänge ($\lambda_k < \lambda_{ip}$), so verstärkt sich mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration die Fluoreszenzintensität, während sie für längere Anregungswellenlängen ($\lambda_l > \lambda_{ip}$) bei zunehmender Ca^{2+} -Konzentration abnimmt (Gryniewicz et al., 1985). Dieses gegenläufige Verhalten kann ausgenutzt werden, wenn die Probe mit zwei Wellenlängen angeregt wird. Die erste wählt man im Wellenlängenbereich $\lambda_k < \lambda_{ip}$ und die zweite im Bereich $\lambda_l > \lambda_{ip}$. Während den Experimenten wurde deshalb alternierend mit Wellenlängen von 350 und 380 nm angeregt. Aus dem Verhältnis der jeweiligen Fluoreszenzintensitäten bei beiden Wellenlängen kann eine quantitative Aussage über die Ca^{2+} -Konzentration getroffen werden.

Der Unterschied zwischen Fura-2 und Fura-FF liegt in ihrer Bindungseigenschaft für Ca^{2+} . Fura-2 hat mit einer niedrigen Bindungskonstante (K_d) von 224 nM eine hohe Affinität zu Ca^{2+} und ist somit nur zur Messung von geringen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (bis 1 μM) geeignet. Um auch höhere Konzentrationen messen zu können, benutzt man eine Mischung aus Fura-2 und Fura-FF, da letzteres mit einer hohen K_d von 5,5 μM bei $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von 0,5-50 μM verwendbar ist.

Aus der gemessenen Intensität der Emission von Fura-2 und Fura-FF bei 350 nm und 380 nm wurde die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ berechnet. Dazu musste zuvor eine *in vivo* Kalibration mit mehreren Lösungen bekannter $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durchgeführt werden, welche einen Bereich von 0 bis 8 mM abdeckten und über die Patch-Pipette in die Zellen perfundiert wurden (Neher und Zucker, 1993). Die Verhältnisse der Fluoreszenzintensität bei 350 nm zu 380 nm aus drei bis fünf Messungen wurden gemittelt und logarithmisch gegen die bekannte, zugehörige $[\text{Ca}^{2+}]_i$

dargestellt. Durch die Kalibrationskurve (Abb. 16) konnte jedem gemessenen Wert der Fluoreszenzintensität von 350 zu 380 nm die entsprechende $[Ca^{2+}]_i$ zugeordnet werden.

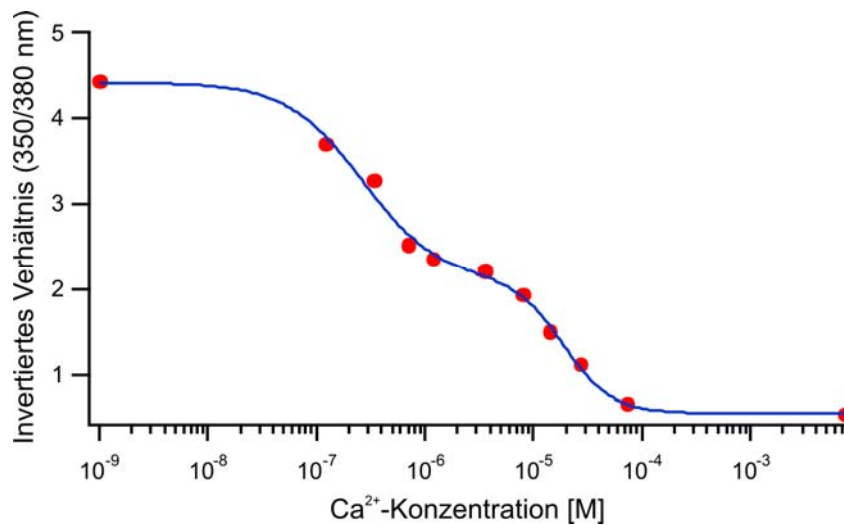


Abb. 16: *In vivo* Kalibrationskurve für Fura-2 und Fura-FF. Mit verschiedenen Intrazellulärlösungen wurde für bekannte $[Ca^{2+}]_i$ das Fluoreszenzverhältnis von 350 zu 380 nm bei 510 nm Emission ermittelt (rote Punkte). Die blaue Kurve zeigt den Fit der Kalibrationskurve. Dargestellt sind gemittelte Werte.

2.2.10 Messprotokolle

Die Messungen aller Konditionen einer Experimentenreihe fanden am selben Tag statt, so dass die Ergebnisse vergleichbar waren. Jede Experimentenreihe wurde an Zellen verschiedener Präparationen aus mehreren Wochen durchgeführt.

2.2.10.1 Stimulation durch Depolarisationsreihen oder UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA

Depolarisationsreihen und UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA wurden eingesetzt, um den Einfluss von ATP auf Docking, Priming und Exozytose in bovinen Chromaffinzellen zu untersuchen. Weiterhin wurden diese Stimulus-Arten verwendet, um die Menge an sezernierten LDCVs in TIRFM als Antwort auf den Stimulus zu analysieren. Dazu wurden die Zellen entweder durch einen Virus (zur Analyse von Docking und Priming) oder durch Elektroporation (zur Sekretionsanalyse) mit NPY-mCherry transfiziert waren. Sollte der Einfluss des Alters von LDCVs auf die Sekretion untersucht werden, so wurden elektroporierte Zellen zusätzlich mit FFN511 geladen. In diesem Fall wurden zeitgleich Aufnahmen mit TIRFM bei 561 nm (zur Anregung von NPY-mCherry) und 450 nm (Anregungswellenlänge von FFN511) durchgeführt.

In Patch-Clamp Experimenten wurde nach Beginn der Ganzzellableitung 2 min gewartet, um ein Equilibrium zwischen Pipettenlösung und Zytosol herzustellen (Abb. 17A). In dieser Phase wurden die Membrankapazität und, wenn Ca^{2+} -Indikatoren in der Pipettenlösung vorhanden waren, zusätzlich die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aufgezeichnet. In den Experimenten zur Untersuchung des Einflusses von ATP auf Docking, Priming und Sekretion folgte der Ladephase eine zweiminütige Aufnahme der LDCVs in TIRFM (10 Hz). Diese Filme dienten der Analyse von Beweglichkeit und Verweildauer der LDCVs an der PM (siehe 2.2.11.1 bis 2.2.11.3). Anschließend wurde ein einminütiger TIRFM Film aufgenommen, wobei nach 30 s eine Depolarisationsreihe von -70 mV auf 0 mV appliziert wurde. Jede Depolarisation dauerte 100 ms und zwischen 2 Depolarisationen lagen ebenfalls 100 ms (5 Hz). In der Zwischenpulsphase wurde die Membrankapazität mit Hilfe einer Sinuswelle gemessen. In manchen Experimenten kam mehr als eine Depolarisationsreihe zum Einsatz (Abb. 17B). Im Anschluss an die Ladephase folgte dann eine Aufnahme der LDCV-Bewegung mit TIRFM und 10 Hz für 90 s, wobei nach 49 s eine Reihe von zehn Depolarisationen appliziert wurde. Nach einer Ruhephase von 30 s, in welcher die Membrankapazität gemessen wurde, folgte erneut die zuvor beschriebene Aufnahme mit Stimulation. Dieser Ablauf von Erholungsphase und Stimulation wurde bis zu sechs Mal wiederholt.

Das Messprotokoll, bei welcher die UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA zum Einsatz kam, glich dem oben beschriebenen (Abb. 17B). Lediglich die Art des Stimulus unterschied sich. Der UV-Blitz (Rapp OptoElectronic GmbH, Hamburg, Deutschland) wurde mit einer Spannung von 110 V und einer Blitzdauer von 1 ms appliziert. Auch hier fanden bis zu sechs Wiederholungen von Ruhephase, zur Regeneration der LDCV-Pools, und Stimulation statt. Für beide Arten der Stimulation wurde über die gesamte Dauer der Experimente die ratiometrische Fura-Messung (siehe 2.2.9) durchgeführt.

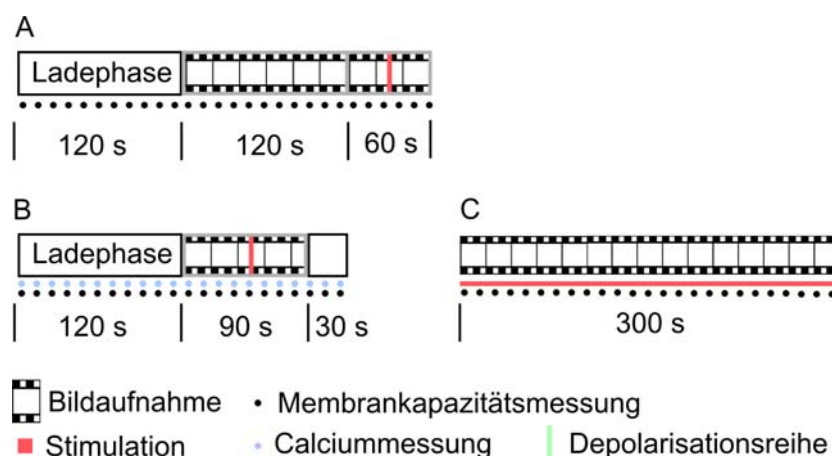


Abb. 17: Messprotokolle. A) Stimulation mit einer Depolarisationsreihe zur Untersuchung des Einflusses von ATP auf Docking, Priming und Sekretion. Es wurden zwei TIRFM Filme aufgenommen. Der erste diente der Analyse von LDCV-Mobilität und -Verweildauer an der PM. Im zweiten Film wurden die Zellen mit Depolarisationen stimuliert und anschließend die Sekretion analysiert. B) Stimulation durch Depolarisationsreihen oder UV-Blitzlichtphotolyse

von NP-EGTA. Der Wechsel zwischen Bildaufnahmen und Pause wurde bis zu sechs Mal wiederholt. C) Stimulation durch 1, 6 oder 15 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$. War nach 300 s noch keine Plateauphase in der Membrankapazität erreicht, so wurde eine zusätzliche Aufnahme für weitere 300 s gestartet. Bei stabiler Membrankapazität wurde am Ende der Messung eine Depolarisationsreihe appliziert.

2.2.10.2 Stimulation durch hohe intrazelluläre Calciumkonzentrationen

Zur Identifizierung von „dead-end“ Vesikeln sollte die Sekretion von allen sezernierbaren LDCVs hervorgerufen werden. Die LDCVs der Zellen waren durch Elektroporation mit NPY-mCherry markiert. Die ersten Versuche mit 1 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zeigten, dass eine Stimulationsdauer von 5 min ausreichte, um bei den meisten Zellen eine Plateau-Phase der Membrankapazität zu erreichen. Während dieser Phase fand keine weitere Sekretion statt. Diese Zeitspanne wurde für die folgenden Experimente mit 6 bzw. 15 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ übernommen. Die TIRFM-Aufnahmen wurden gestartet, sobald der Zugang zur Zelle über die Patch-Pipette bestand und in den meisten Fällen nach 5 min gestoppt. War zu diesem Zeitpunkt keine Plateau-Phase der Membrankapazität erreicht, so wurde das Experiment für weitere 5 min fortgesetzt. Während den TIRFM-Aufnahmen erfolgte zeitgleich die elektrophysiologische Messung der Zellen mit dem Programm PULSE, welches unter anderem die Veränderung der Membrankapazität aufzeichnete. Nach Erreichen der Plateau-Phase wurden zehn Depolarisationen appliziert um zu überprüfen, ob weitere Sekretion ausgelöst werden konnte. Nur Zellen, welche keine Veränderung der Membrankapazität als Antwort auf die Depolarisationsreihe zeigten, wurden für die Analyse verwendet. Mehrere Experimente wurden nach Zugabe der Ca^{2+} -Indikatoren Fura-2 und Fura-FF (je 0,1 mM) zu den jeweiligen Pipettenlösungen durchgeführt, um zu messen, innerhalb welcher Zeitspanne die vorgegebene $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in den Zellen erreicht werden konnte. Die Ca^{2+} -Messungen zeigten, dass die gewünschte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bereits wenige Sekunden nach Beginn der Ganzzelleableitung erreicht war. Ein Schema des Messprotokolles ist in Abb. 17C dargestellt.

Zur Messung der doppelt transfizierten Zellen (NPY-mCherry zusammen mit Munc18-2-mTFP / SNAP-25-GFP / Syntaxin-GFP) kam ausschließlich die Lösung mit 6 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zum Einsatz, da sich diese Lösung zuvor als optimal für Sekretionsexperimente erwiesen hatte. Transfizierte Zellen wurden durch ihre Fluoreszenz bei 450 nm (Munc18-2-mTFP) bzw. 488 nm (SNAP-25-GFP/ Syntaxin-GFP) identifiziert.

2.2.11 Analyse der Daten

2.2.11.1 Bildanalyse

Für die Untersuchung der Rolle von ATP bei Docking und Priming wurden die TIRFM-Filme mit einer Software analysiert, welche von Dr. Detlef Hof entwickelt wurde und auf Labview (National Instruments, Austin, TX, USA) basierte. Diese Software diente dazu, LDCVs zu detektieren und die Veränderung ihrer Positionen über die Zeit zu bestimmen. Die Daten waren für die spätere Analyse der LDCV-Mobilität an der PM, der so genannte „Caging Diameter Analyse“, mit dem Programm IGOR notwendig.

Im ersten Schritt dieser Analyse wurde die Helligkeit der Filme gemittelt. Im Anschluss daran konnte eine geeignete Region ausgewählt werden, welche im Hintergrund und somit außerhalb der Zelle lag. Die mittlere Fluoreszenz-Intensität dieser Region wurde von jedem Bild des Filmes abgezogen, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern. Im zweiten Schritt wurde eine erste, ungefähre Positionsbestimmung jedes Partikels mit Hilfe der Schwellenwertmethode durchgeführt. Als Grundlage galt, dass die Intensität von mindestens drei nebeneinander liegenden Pixeln einen Schwellenwert überschreiten musste, damit diese Pixel als LDCVs erkannt wurden. Die Positionen wurden dabei als Schwerpunkt aller Pixel über dem Schwellenwert ermittelt und mit Hilfe der Centroid-Methode überarbeitet und verfeinert. Dieses zeitaufwendige Verfahren berücksichtigte die individuelle Intensität aller Pixel in der Umgebung und wendete dabei eine Standard-Centroid-Gleichung an. Es galt:

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

wobei X_i und Y_i als Pixelkoordinaten die jeweiligen Helligkeitswerte der Pixel (Pixelwerte_i) wiedergaben. Bei Anwendung der Centroid-Methode konnten Positionen mit Subpixelauflösung bestimmt werden, welche bis in den einstelligen Nanometer-Bereich gingen und eine Genauigkeit von 20-40 nm zeigten.

Nachdem die Positionen bestimmt waren, mussten weitere Voraussetzungen erfüllt sein, damit LDCVs als solche detektiert wurden. Ein LDCV musste in mindestens drei aufeinanderfolgenden Bildern zu erkennen sein und durfte nicht mehr als drei Pixel Abweichung zwischen seinen Mittelpunkten in aufeinander folgenden Bildern aufweisen. Da sich LDCVs nicht schnell bewegen, konnte durch diese Bedingungen die fälschliche Detektion von reinem Hintergrundrauschen verhindert werden.

Im letzten Schritt wurden alle entstandenen LDCV-Trajektorien kontrolliert um Fehler zu beheben. Es kam vor, dass die Fluoreszenzintensität eines LDCVs kurzzeitig unter den festgelegten Schwellenwert fiel, obwohl es sich noch an der PM befand und per Auge weiterhin verfolgbar war. In diesen Fällen wurden die entstandenen Trajektorien eines

LDCVs mit Hilfe einer Verschmelzungsroutine verbunden. Dies geschah durch das lineare Interpolieren der fehlenden Positionen.

Die weitere Analyse zur LDCV-Mobilität fand mit dem Programm IGOR statt.

2.2.11.2 Die „Caging Diameter“ Analyse

Die zuvor erhaltenen Positionsdaten wurden in IGOR geladen und die „Caging Diameter“ Analyse durchgeführt.

Der Caging Diameter (CD) war definiert als die längste Distanz, welche ein LDCV innerhalb eines Zeitfensters von 1s (also 10 Bildern) zurücklegte. Die Routine startete an der ersten Position eines LDCVs analysierte von dort aus alle Distanzen, welche dieses LDCV innerhalb des Zeitfensters von 1 s zurücklegte (Abb. 18). Die längste Distanz galt als CD für die entsprechende Position. Dieser Vorgang wurde für alle Positionen des LDCVs wiederholt. Alle LDCVs, welche kürzer als 1 s zu sehen waren, wurden nicht in die Analyse einbezogen und auch die letzten neun Positionen eines LDCVs ließen sich nicht bestimmen.

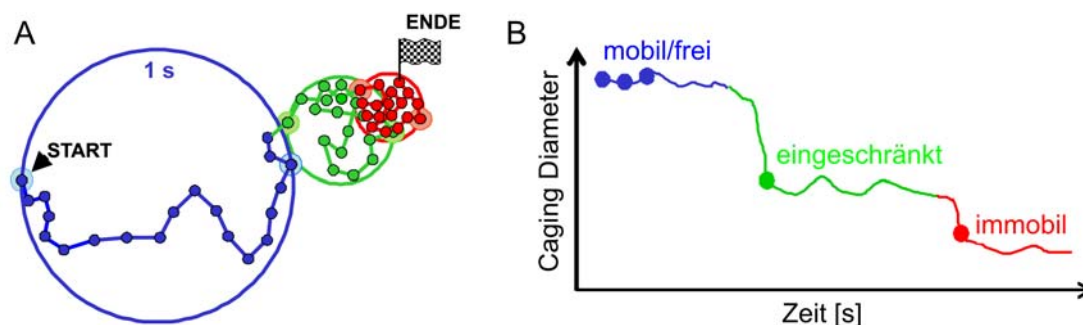


Abb. 18: Schema der „Caging Diameter“ Analyse. (A) Trajektorien eines artifiziellen LDCVs. Jeder Punkt markiert eine Position, welche das LDCV über die Zeit eingenommen hatte. Der Startpunkt zeigt das Auftauchen des LDCVs im TIRFM-Film, der Endpunkt markiert den Zeitpunkt des Verschwindens. Die Kreise markieren den Zeitraum einer Sekunde. Zusätzlich zeigen sie die weiteste Entfernung, welche das LDCV in dieser Zeit zurück gelegt hat (Positionen, welche den Kreis schneiden). Der Radius des Kreises stellt somit den CD dar, der über die Zeit geringer wird (blau: hohe bzw. freie Beweglichkeit, grün: eingeschränkte Beweglichkeit, rot: Immobilität). (B) Errechneter Verlauf des CDs über die Zeit für das LDCV aus (A).

Aus den kalkulierten CDs aller LDCVs einer Zelle wurde die Häufigkeitsverteilung berechnet, auf die Summe der CDs normiert und in einem regulären und einem kumulativen Histogramm aufgetragen. Die so entstandenen Histogramme aller Zellen, deren Messung unter denselben Bestimmungen statt fanden, wurden gemittelt und in einem Graphen dargestellt.

2.2.11.3 Verweildauer der LDCVs an der Membran

Durch die Untersuchung der Verweildauer von LDCVs an der PM sollte festgestellt werden, ob ATP einen Docking- oder Priming-Effekt hervorruft. Bereits bei der Beweglichkeitsanalyse wurde berechnet, wie lange die analysierten LDCVs detektierbar waren, bevor sie mit der PM fusionierten. Diese Daten konnten nun mit dem Programm IGOR weiter verarbeitet werden. Für jedes LDCV einer Zelle wurde die Verweildauer bestimmt und auf die Basisfläche der Zelle normiert. Die Verweildauern aller LDCVs einer Zelle wurden gemittelt und auf die Anzahl der analysierten LDCVs normiert. Die erhaltenen Daten wurden in ein logarithmisches Histogramm gegen die Zeit aufgetragen und gemittelt.

2.2.11.4 Analyse der Sekretion in TIRFM und Identifizierung von „dead-end“

Vesikeln

Das Programm „ImageJ“ wurde zur Analyse von TIRFM Filmen nach Stimulation der Zellen mit einer hohen $[Ca^{2+}]_i$ verwendet.

Die TIRFM-Aufnahmen wurden visuell auf Sekretion untersucht und der Zeitpunkt der Fusion im Film notiert. Sezernierte LDCVs verloren innerhalb von ein bis zwei Bildern ihre Fluoreszenz, da das Fluoreszenzprotein NPY-mCherry bei der Fusion des LDCVs mit der PM freigesetzt wurde. Somit war es möglich, Sekretion zu detektieren und von LDCVs, welche sich langsam (innerhalb drei oder mehr Bilder) in Richtung Zytosol bewegen, zu unterscheiden. Die kumulative Anzahl der sezernierten LDCVs in TIRFM wurde für jede Zelle auf die Größe ihrer Basisfläche normalisiert. Dies war notwendig, da bei Zellen mit einer großen Basisfläche in der Regel mehr LDCVs in TIRFM sichtbar waren. Damit stieg auch die Wahrscheinlichkeit, dass in TIRFM Sekretion auftrat, was ohne Normalisierung zu einer Verfälschung der Daten führen könnte. (Abb. 19).

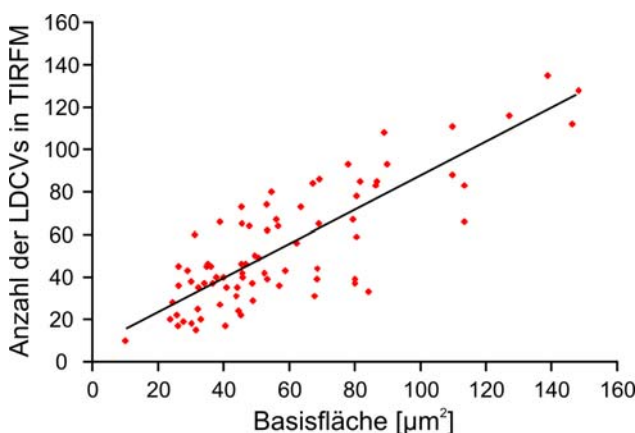


Abb. 19: Korrelation zwischen Größe der Basisfläche und Anzahl der LDCVs in TIRFM. Die Zellen wurden mit NPY-mCherry elektroporiert und die Anzahl der LDCVs in TIRFM gezählt. Gezeigt ist ein Korrelationsplot, wobei jeder Punkt die Werte einer Zelle darstellt. Es besteht ein eindeutiger Zusammenhang zwischen den beiden untersuchten Größen. (N=79)

In einem weiteren Normalisierungsschritt wurden die zuvor berechneten Werte mit dem Mittelwert der Basisfläche aller Zellen multipliziert. Die Daten aller Zellen einer Messreihe wurden gemittelt und die erhaltenen Werte gegen die Zeit aufgetragen.

Im ersten und letzten Bild der TIRFM-Filme wurden die LDCVs gezählt und deren Anzahl notiert. Alle LDCVs aus dem letzten Bild wurden visuell rückwärts durch den Film verfolgt, um den Zeitpunkt ihres Auftauchens an der PM festzustellen. Dabei wurden sie in zwei Klassen unterteilt: Neuankömmlinge, welche während des Filmes an die PM translozierten und „dead-end“ Vesikel, die bereits zu Beginn des Experimentes erkennbar waren und somit bis zum ersten Bild des Filmes zurück verfolgt werden konnten. Auch diese Werte wurden auf die Größe der Basisfläche der jeweiligen Zellen normalisiert, mit der Größe der mittleren Basisfläche aller Zellen multipliziert und gemittelt.

2.2.11.5 Die Veränderung der Membrankapazität als Indikator für Sekretion

Die elektrischen Eigenschaften der Zellen wurden über die gesamte Dauer der Experimente aufgezeichnet. Bei Experimenten, in denen es um die Sekretion von LDCVs als Antwort auf einen kurzen Stimulus (Depolarisationen oder UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA) ging, wurde die Veränderung der Membrankapazität in einer Zeitspanne von 0,5 s vor dem Stimulus, bis 2,5 s (Depolarisation) bzw. 8 s (UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA) aufgezeichnet. Sollte die Zelle mit einer hohen $[Ca^{2+}]$ perfundiert werden, so begann die Aufzeichnung der Membrankapazität mit dem Beginn der Ganzzellaufzeichnung und endete frühestens nach 5 min.

Für alle Experimente fand die Analyse der Membrankapazität mit dem Programm IGOR statt. Die Daten wurden eingelesen, gegen die Zeit aufgetragen und alle Werte einer Messreihe gemittelt. Der erste Messpunkt der Membrankapazität wurde auf Null gesetzt, um die Veränderung der Membrankapazität (ΔC_m) aller Zellen einer Messreihe mitteln zu können.

2.2.11.6 Bestimmung von Sekretionsraten

Um die Zeitkonstanten der Sekretion verschiedener Konditionen vergleichen zu können, sollten die Sekretionsraten bestimmt werden. Sowohl die Kurven der Membrankapazität als auch die kumulative Sekretion in TIRFM zeigten jedoch zu viele Wechsel in ihrem Anstieg, so dass nur die maximalen Sekretionsraten zu Beginn der Messungen berechnet werden konnten. Die Membrankapazität der meisten Zellen zeigte einen maximalen Anstieg zwischen 10 und 100 s nach Messbeginn, so dass hier mit einem linearen Fit im Programm IGOR die Zeitkonstante bestimmt wurde. Bei der kumulativen Sekretion gab es sehr starke Unterschiede zwischen den Zellen, so dass der Bereich des maximalen Anstiegs für jede Zelle individuell gewählt wurde. Er lag zwischen 0 und 200 s nach Messbeginn. Die Werte für alle Zellen einer Kondition wurden gemittelt.

2.2.12 Statistiken

Die statistische Analyse wurde im Programm SigmaStat (SPSS Inc., San Rafael, CA, USA) mit dem „Student's t-test“ durchgeführt. Waren die Daten nicht normal verteilt, so führte SigmaStat den „Mann-Whitney rank sum test“ durch. Fehlerbalken zeigen stets den SEM (Standardfehler des Mittelwertes).

3. Ergebnisse

Teil 1: Die Rolle von ATP bei Docking, Priming und Sekretion

Die genaue Rolle von ATP vor der Exozytose ist bisher noch immer unklar, da ATP in mehrere Prozesse involviert zu sein scheint. In dieser Arbeit sollte deshalb geklärt werden, ob ATP für den Prozess des Dockings und/oder Primings von Bedeutung ist.

3.1 Einfluss von ATP auf die Sekretion

Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass ohne ATP eine Reduktion der Sekretion vorlag (Parsons et al., 1995; Xu et al., 1998; Xu et al., 1999). Im Gegensatz dazu hatte ATP in anderen Experimenten keinen Einfluss auf die sekretorische Maschinerie (Ulate et al., 2000), bzw. war erst bei wiederholten Stimulationen von Bedeutung (Heidelberger et al., 2002). Um diese Diskrepanz in der Literatur aufzuklären wurden in dieser Arbeit bovine Chromaffinzellen mit der Patch-Clamp Technik gemessen und mit einer Reihe von zehn aufeinander folgenden Depolarisationen stimuliert. Dabei kamen zwei verschiedene intrazelluläre Lösungen zum Einsatz, welche entweder 2 mM (Kontrolle) oder 0 mM ATP enthielten. Die Veränderungen in der Membrankapazität wurden für alle Zellen einer Kondition gemittelt und die Mittelwerte in Abb. 20 dargestellt.

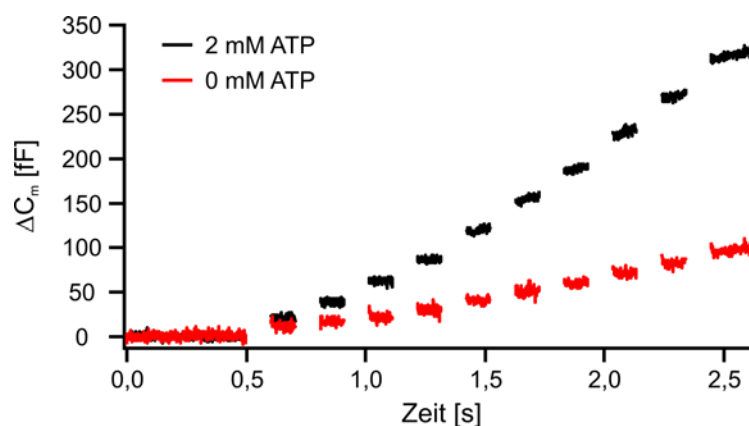


Abb. 20: Veränderung der Membrankapazität als Antwort auf zehn aufeinander folgende Depolarisationen. 2 min nach Beginn der Ganzzellableitung wurden die Zellen bei 0,5 s depolarisiert und die Membrankapazität aufgezeichnet. Die Größe jeder Zelle zu Beginn der Stimulation wurde genullt. Dargestellt sind die gemittelten Antworten der Zellen gemessen mit 2 mM ATP (schwarz) oder 0 mM ATP (rot) in der intrazellulären Lösung. (N=23)

In Abb. 20 ist erkennbar, dass das Fehlen von ATP in der intrazellulären Lösung zu einer Reduktion des Anstieges der Membrankapazität als Antwort auf die Depolarisationsreihe führte. Während mit ATP eine Zunahme der Membrankapazität von 320 ± 57 fF erreicht wurde, stieg die Membrankapazität in Zellen ohne ATP in der Patchpipette nur um 100 ± 25 fF ($p < 0,001$). Ohne ATP war die Sekretion um ca. 69% reduziert. Dies zeigte eine Abhängigkeit der Sekretion von ATP.

Es war bekannt, dass das Fehlen von ATP in der Pipettenlösung zur Inaktivierung von Ca^{2+} -Kanälen führte (Elhamdani et al., 1995; Elhamdani et al., 1995a). Die geringere Anzahl aktiver Ca^{2+} -Kanäle in Zellen gemessen ohne ATP hatte in den erwähnten Publikationen eine reduzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im Vergleich zu Kontrollzellen zur Folge, was die Ursache der verminderten Sekretion dieser Zellen erklären könnte. Die Analyse der in dieser Arbeit gemessenen Ströme durch Ca^{2+} -Kanäle bestätigte dies (Abb. 21).

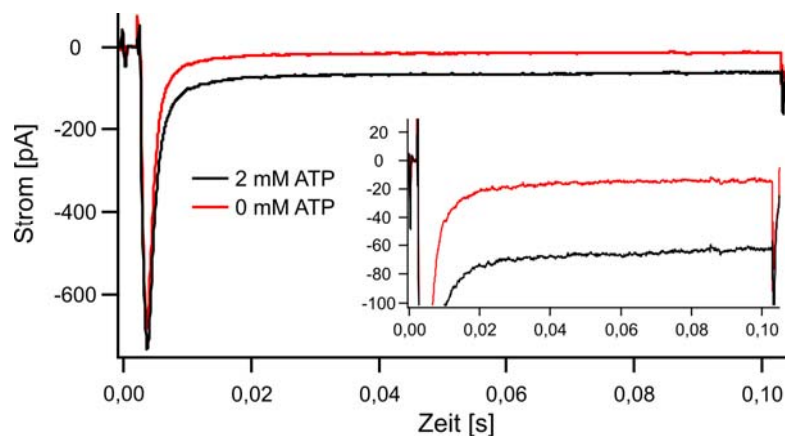


Abb. 21: Ströme der Zellen gemessen nach der Depolarisationsreihen. Nach der Depolarisationsreihe wurde in jeder Zelle der Stromfluss durch die Ionenkanäle gemessen. Ein Teilbereich des Graphen wurde vergrößert und ist im kleinen Graphen dargestellt. Dort wird die Inhibierung der Ca^{2+} -Ströme in Zellen gemessen ohne ATP deutlich. Aufgetragen sind gemittelte Werte ($N=23$).

Die Zellen, welche mit 0 mM ATP in der Pipettenlösung gemessen wurden, zeigten eine deutliche Inaktivierung der Ca^{2+} -Kanäle (Abb. 21). In Kontrollzellen wurden Ca^{2+} -Ströme von $-69,7 \pm 17,4$ pA gemessen, ohne ATP waren diese Ströme signifikant auf $-14,1 \pm 10,0$ pA reduziert ($p=0,02$). Somit konnten die verringerten Ca^{2+} -Ströme eine Ursache der reduzierten Sekretion bei ATP-Mangel sein.

3.2 Dichte der LDCVs in TIRFM in Abhängigkeit von ATP

Ein weiterer Grund für die Reduktion der Sekretion könnte eine Verringerung der Dichte von LDCVs an der PM in Abwesenheit von ATP sein. Der DP von LDCVs, welcher sich hinter dem kortikalen F-Aktin befindet, beinhaltet den größten Anteil von LDCVs der Zelle. Nach

einer Stimulation werden LDCVs aus diesem Pool zur PM transportiert, um dort den UPP aufzufüllen. Der Transport vom DP zum UPP ist ATP-abhängig (von Rüden und Neher, 1993; Parsons et al., 1995) und benötigt Myosin V als molekularen Motor (Rose et al., 2002; Rose et al., 2003). Das Fehlen von ATP kann somit zu einer Abnahme von LDCVs an der PM führen.

Um den Einfluss von ATP auf die Dichte der LDCVs an der PM zu untersuchen, wurden die LDCVs der Zellen mit NPY-mCherry fluoreszent markiert (Virusinfektion). Während der elektrophysiologischen Messung und Perfusion der Zellen mit einer der zwei verschiedenen intrazellulären Lösungen wurden die markierten LDCVs in TIRFM aufgenommen. Anschließend wurde die Anzahl der LDCVs pro Bild bzw. pro Zelle während der Aufnahmedauer von 2 min analysiert, auf die Basisfläche der jeweiligen Zelle in TIRFM normalisiert und die Werte einer Kondition gemittelt (Abb. 22).

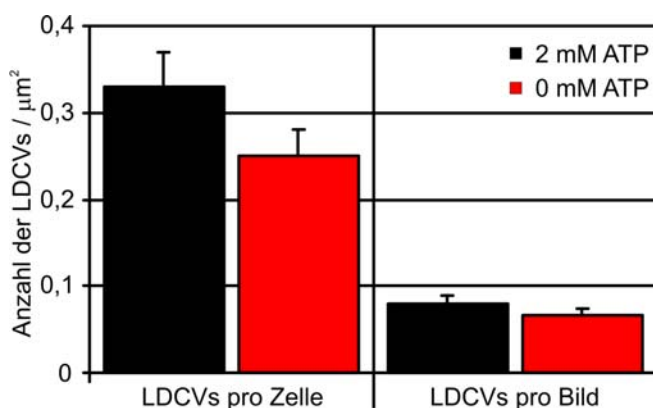


Abb. 22: Anzahl der LDCVs pro Zelle und Bild in Abhängigkeit von ATP. Die Zellen wurden für 2 min mit 2 mM ATP (schwarz) oder 0 mM ATP (rot) perfundiert und die Anzahl der LDCVs in TIRFM analysiert. Die Werte wurden für jede Zelle auf ihre Basisfläche normiert. Gezeigt sind gemittelte Werte für jede Kondition. (N=23)

Mit einer Konzentration von 2 mM ATP in der Pipettenlösung lag der Mittelwert der Dichte von LDCVs in TIRFM pro Zelle und μm^2 bei $0,33 \pm 0,04$ (Abb. 22). In den einzelnen Bildern befanden sich durchschnittlich $0,08 \pm 0,01$ LDCVs pro μm^2 an der PM. Ohne ATP in der Intrazellulärlösung veränderten sich die Werte kaum. Im Durchschnitt konnten $0,25 \pm 0,03$ LDCVs pro Zelle und μm^2 bzw. $0,07 \pm 0,01$ LDCVs pro Bild gezählt werden. Somit lag kein Einfluss von ATP auf die Dichte der LDCVs an der PM vor.

3.3 Abhängigkeit des Dockings von ATP

Die beobachtete, unveränderte Dichte der LDCVs an der PM in Zellen ohne ATP im Vergleich zu Kontrollzellen bedeutete gleichzeitig, dass die Anzahl gedockter LDCVs mit und ohne ATP identisch blieb. Ein Einfluss von ATP auf das Docking kann nicht nur durch das Zählen gedockter LDCVs untersucht werden, sondern auch durch Analyse der Verweildauer von LDCVs an der PM (Toonen et al., 2006; Pasche et al., 2012). Nur gedockte LDCVs halten sich längere Zeit an der PM auf, während nicht gedockte LDCVs in der evaneszenten

Welle der TIRFM auftauchen, diese aber nach kurzer Zeit wieder verlassen. Eine Veränderung von langen bzw. kurzen Verweildauern zwischen zwei Konditionen deutet somit auf einen Docking-Effekt hin.

Für jedes LDCV einer Zelle wurde die Verweildauer bestimmt, auf die Basisfläche und die Anzahl der LDCVs an der Basisfläche normiert und die Ergebnisse gemittelt. Die Daten wurden nach der Verweildauer in Klassen gruppiert und logarithmisch dargestellt (Abb. 23).

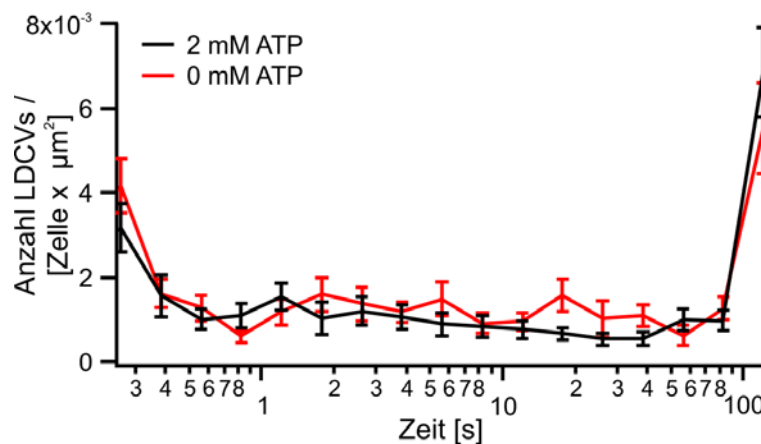


Abb. 23: Verweildauer von LDCVs an der PM in Abhängigkeit von ATP. Gezeigt sind die Verweildauern der LDCVs an der PM in Anwesenheit (2 mM, schwarz) oder Abwesenheit (0 mM, rot) von ATP, logarithmisch aufgetragen gegen die Zeit. Die einzelnen Zellen wurden auf ihre Basisfläche in TIRFM und die Anzahl der sichtbaren LDCVs in TIRFM normiert. Die gezeigten Werte sind für jede Kondition gemittelt. (N=23)

Wie in Abb. 23 erkennbar, zeigten sich kaum Unterschiede zwischen beiden Konditionen. War ATP in der intrazellulären Lösung vorhanden, so konnten durchschnittlich $3,2 \cdot 10^{-3} \pm 0,3 \cdot 10^{-3}$ LDCVs mit der kürzesten Verweildauer von 2,6 s identifiziert werden. Der größte Anteil, nämlich $6,8 \cdot 10^{-3} \pm 0,5 \cdot 10^{-3}$ LDCVs, verweilten für 121,15 s (die längste gemessene Zeit) an der PM. Der Verlauf der Verweildauer ist vergleichbar mit bereits publizierten Daten, in denen der Hauptanteil der LDCVs ebenfalls sehr kurze bzw. sehr lange Verweildauern aufwiesen (Pasche et al., 2012). Ohne ATP in der Pipettenlösung waren durchschnittlich $4,2 \cdot 10^{-3} \pm 0,3 \cdot 10^{-3}$ LDCVs für eine kurze Zeitspanne (2,6 s) an der PM sichtbar. $5,5 \cdot 10^{-3} \pm 0,5 \cdot 10^{-3}$ LDCVs hielten sich für 121,15 s an der PM auf. Die Ergebnisse bestätigten den vorherigen Eindruck, dass ATP keine Rolle beim Docking zu spielen scheint.

3.4 Die Rolle von ATP beim Priming

Da die Reduktion der Sekretion unter ATP-Mangel nicht durch einen Defekt beim Docking erklärt werden konnte, musste eine Veränderung im Priming-Schritt vorliegen. Erst durch das Priming werden gedockte LDCVs fusionskompetent. Die Anzahl der gedockten LDCVs

würde bei Inhibierung des Primings identisch bleiben, während die LDCVs nicht mit der PM fusionieren können, was zu einer Reduktion der Sekretion führt.

Anhand der Beweglichkeit von LDCVs an der PM können Rückschlüsse auf den Docking- und Priming-Schritt gezogen werden (Nofal et al., 2007). So zeigen nicht gedockte LDCVs eine hohe Mobilität, welche sich durch Docking und Priming jeweils verringert. Um eine Veränderung der Beweglichkeit von LDCVs in Zellen gemessen mit oder ohne ATP detektieren zu können wurde der Caging Diameter (CD), welcher ein Maß für die Beweglichkeit darstellt, für alle LDCVs in den TIRFM-Filmen analysiert. Die CDs aller Zellen einer Kondition wurden gemittelt und in einem Histogramm (Abb. 24A und 24B) bzw. einem kumulativen Histogramm (Abb. 24C) dargestellt.

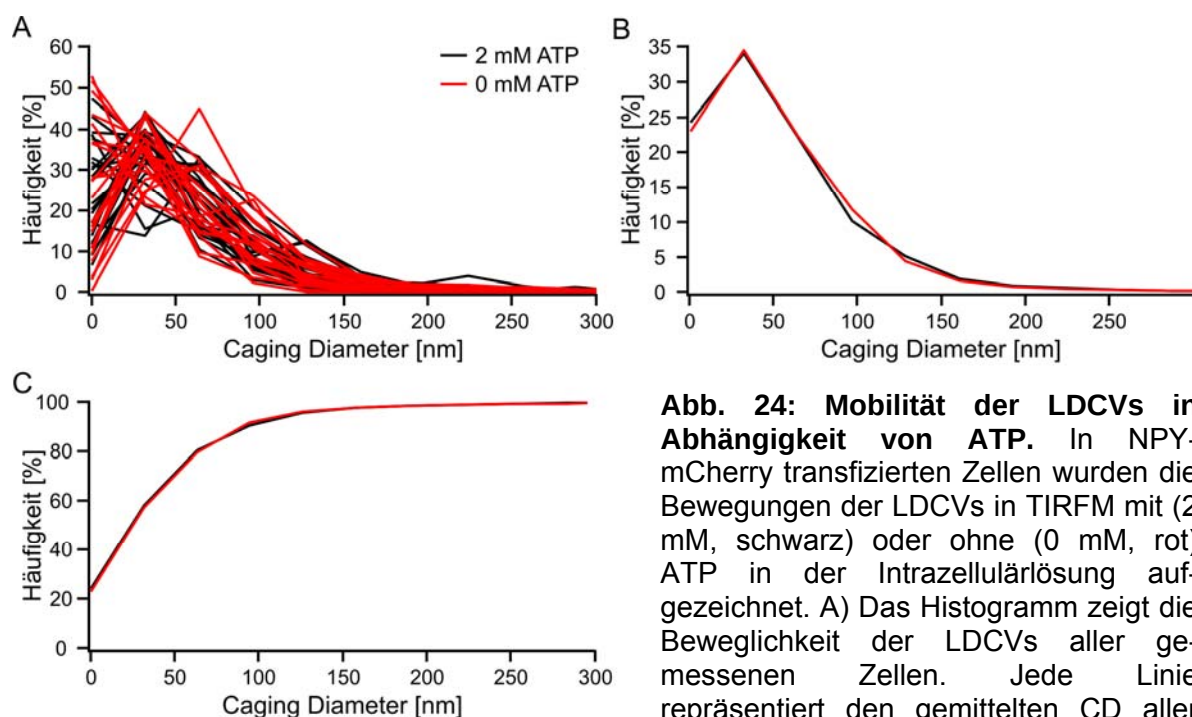


Abb. 24: Mobilität der LDCVs in Abhängigkeit von ATP. In NPY-mCherry transfizierten Zellen wurden die Bewegungen der LDCVs in TIRFM mit (2 mM, schwarz) oder ohne (0 mM, rot) ATP in der Intrazellulärlösung aufgezeichnet. A) Das Histogramm zeigt die Beweglichkeit der LDCVs aller gemessenen Zellen. Jede Linie repräsentiert den gemittelten CD aller

LDCVs einer Zelle. B) Beweglichkeit der LDCVs, aufgetragen als Häufigkeit der vorkommenden Bewegungen. Gezeigt sind gemittelte Werte aller Zellen. C) Kumulatives Histogramm von (B). (N=23)

Abb. 24A zeigt die CDs aller gemessenen Zellen, welche aus den Mittelwerten der CDs aller LDCVs einer Zelle errechnet wurden. Zur besseren Übersicht wurden die CDs aller Zellen einer Kondition gemittelt (Abb. 24B). Trägt man die CDs kumulativ auf (Abb. 24C), so lassen sich Unterschiede zwischen zwei Konditionen leicht erkennen, da dies zu einer Links- oder Rechtsverschiebung des Graphen führt. In diesen Experimenten fand keine Verschiebung der CDs statt, so dass kein Einfluss von ATP beim Priming vorlag.

In dieser Arbeit zeigte ATP weder Einfluss auf Docking, noch auf Priming. Dies ist aus mehreren Gründen unwahrscheinlich: 1. In den durchgeführten Patch-Clamp Experimenten zeigte die Reduktion der Sekretion ohne ATP im Vergleich zu Kontrollzellen mit ATP klar eine Involvierung von ATP im sekretorischen Zyklus; 2. Es wurde bereits mehrfach

nachgewiesen, dass ATP für verschiedene Prozesse vor der Sekretion von Bedeutung ist (siehe 1.8). Es ist möglich, dass die in den Zellen vorhandene ATP-Konzentration selbst bei Verwendung einer Pipettenlösung ohne ATP ausreichte, um den Docking- und Priming-Schritt aufrecht zu erhalten, jedoch zu Defiziten bei der Fusion führte. Um dies auszuschließen wurden die zuvor durchgeführten Experimente unter Einsatz eines nicht hydrolysierbaren ATP-Analoges wiederholt.

3.5 Inhibierung von ATP-Bindeproteinen und dessen Auswirkung auf Docking, Priming und Sekretion

Das nicht hydrolysierbare ATP-Analog AMP-PCP (β,γ -Mehtylenadenosin 5'-triphosphat) kann alle Proteine, mit denen ATP interagiert, in derselben Weise binden. Da das ATP-Analog nicht hydrolytisch gespalten werden kann ist die Energiegewinnung blockiert (Yount, 1975). Durch die Bindung von AMP-PCP wird die Interaktion der gebundenen Proteine mit ATP verhindert, so dass die zytosolische ATP-Konzentration irrelevant ist.

Für diese Experimente wurde eine neue Intrazellulärlösung hergestellt, in welcher 2 mM AMP-PCP anstelle von ATP enthalten waren. In Kontrollzellen wurde die Intrazellulärlösung mit einer ATP-Konzentration von 2 mM verwendet. In den vorherigen Experimenten konnte nach zehn Depolarisationen keine Plateauphase der Sekretion erreicht werden (Abb. 20), weshalb die Anzahl der Depolarisationen in den folgenden Experimenten auf 18 erhöht wurde (Abb. 25). Dies sollte zeigen, ob unter Verwendung von AMP-PCP eine verfrühte Plateauphase hervorgerufen werden konnte.

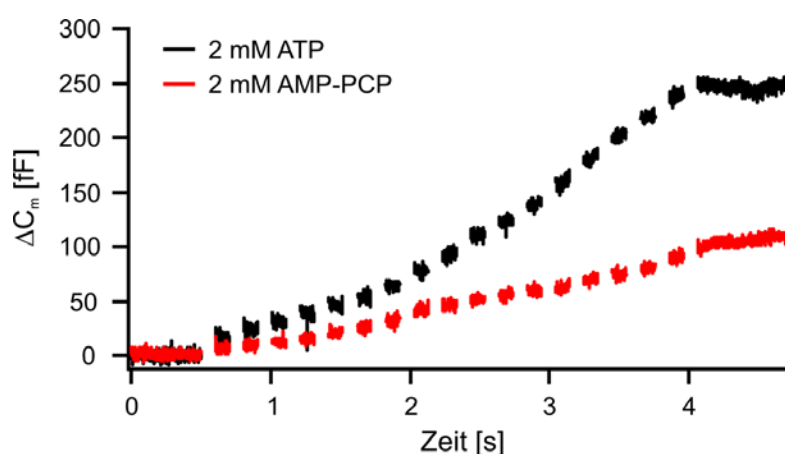


Abb. 25: Einfluss des ATP-Analoges auf die Sekretionsantwort nach Stimulation mit 18 Depolarisationen. Die Zellen wurden 2 min in der Ganzzellableitung gehalten und anschließend bei 0,5 s mit einer Depolarisationsreihe stimuliert. Die Größe jeder Zelle zu Beginn der Stimulation wurde auf Null gesetzt. Dargestellt sind die gemittelten Werte der Zellen gemessen mit 2 mM ATP (schwarz) oder 2 mM AMP-PCP (rot) in der intrazellulären Lösung. (N=10)

In Kontrollzellen wurde aufgrund der Depolarisationsreihe eine Erhöhung der Membrankapazität von 252 ± 73 fF erreicht (Abb. 25), was eine Reduktion gegenüber der Sekretion der Kontrollzellen in den Experimenten zuvor darstellte (Abb. 20). Mit AMP-PCP in der Patchpipette war die Sekretion, im Vergleich zu Kontrollzellen, um 66% auf 112 ± 34 fF reduziert ($p > 0,001$). Dieser Wert ist vergleichbar mit der Sekretion in Zellen gemessen mit 0 mM ATP in der Pipettenlösung (Abb. 20). In Anwesenheit des ATP-Analoges konnte die Reduktion der Sekretion im Vergleich zum vorigen Experiment somit nicht verstärkt, aber die Abhängigkeit der Sekretion von ATP bestätigt werden. Mit Erhöhung der Anzahl von aufeinander folgenden Depolarisationen konnte eine Plateauphase hervorgerufen werden, die jedoch bei beiden Konditionen am Ende der Stimulation auftrat.

Auch in dieser Experimentenreihe sollte überprüft werden, ob eine Inaktivierung von Ca^{2+} -Kanälen durch das Fehlen von ATP verursacht wurde. Die entsprechenden Ionenströme sind in Abb. 26 dargestellt.

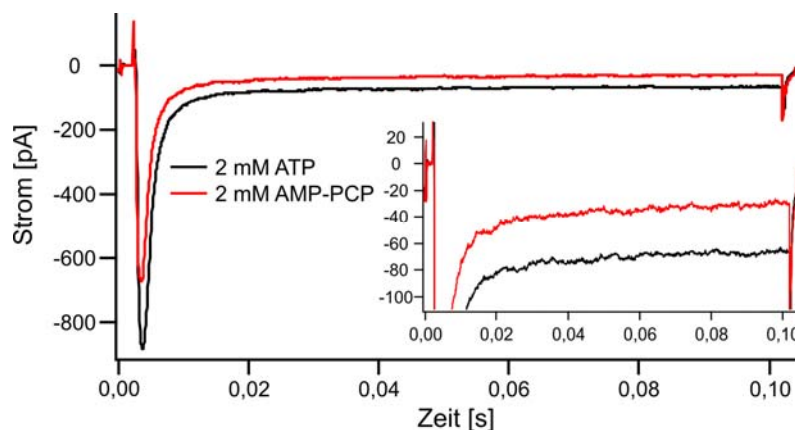


Abb. 26: Ströme der Zellen gemessen nach der Depolarisationsreihe. Nach der Depolarisationsreihe wurde in jeder Zelle der Stromfluss durch die Ionenkanäle gemessen. Der kleine, eingefügte Graph zeigt eine Vergrößerung, wodurch eine Reduktion der Ca^{2+} -Ströme in Zellen gemessen mit AMP-PCP deutlich wird. Aufgetragen sind gemittelte Werte ($N=10$).

Die Ca^{2+} -Ströme in Zellen mit AMP-PCP in der Pipettenlösung (Abb. 26) zeigten eine ähnliche Reduktion wie in Zellen gemessen ohne ATP (Abb. 21). Die Analyse der Ionenströme ergab einen Stromfluss von $-69,2 \pm 14,9$ pA durch Ca^{2+} -Kanäle in Anwesenheit von ATP, und Ca^{2+} -Ströme von $-31,4 \pm 9,2$ pA wenn ATP durch AMP-PCP ersetzt wurde. Dieser Unterschied ist nicht signifikant ($p=0,07$), so dass die Reduktion der Sekretion unter Verwendung von AMP-PCP im Vergleich zu Kontrollzellen nicht alleine durch die Inaktivierung von Ca^{2+} -Kanälen erklärt werden kann. Deshalb sollte untersucht werden, ob in Anwesenheit des ATP-Analoges aufgrund eines ATP-Mangels in den Zellen eine Abnahme der Anzahl von LDCVs an der PM vorlag. Die Anzahl der LDCVs pro Zelle und Bild ist in Abb. 27 dargestellt.

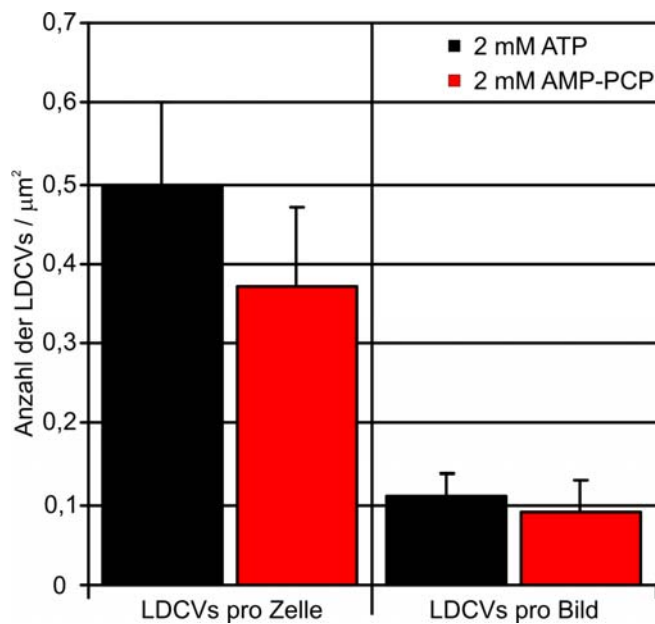


Abb. 27: Einfluss von AMP-PCP auf die Anzahl der LDCVs pro Zelle und Bild. Die Zellen wurden für 2 min mit einer Lösung mit 2 mM ATP (schwarz) oder 2 mM AMP-PCP (rot) perfundiert. Die Anzahl der LDCVs in TIRFM wurde analysiert, für jede Zelle auf die Größe ihre Basisfläche normiert und für alle Zellen einer Kondition gemittelt. (N=5)

In Kontrollzellen befanden sich durchschnittlich $0,51 \pm 0,11$ LDCVs pro Zelle und μm^2 an der PM und es konnten $0,11 \pm 0,03$ LDCVs pro Bild in TIRFM gezählt werden (Abb. 27). Unter Verwendung des ATP-Analoges reduzierte sich die Anzahl der LDCVs pro Zelle und μm^2 leicht auf $0,37 \pm 0,10$, während die Zahl der LDCVs pro Bild und μm^2 , vergleichbar zu den Kontrollzellen, bei $0,09 \pm 0,04$ lag. Diese Werte sind vergleichbar mit dem vorherigen Experiment, in welchem Pipettenlösungen mit 2 und 0 mM ATP verwendet wurden (Abb. 22). Auch mit dem ATP Analog konnte keine Notwendigkeit von ATP beim Docking nachgewiesen werden, so dass dies nicht die Reduktion der Sekretion erklären konnte. Die Verweildauer von LDCVs an der PM wurde analysiert um weitere Rückschlüsse auf eine Rolle von ATP beim Docking ziehen zu können (Abb. 28).

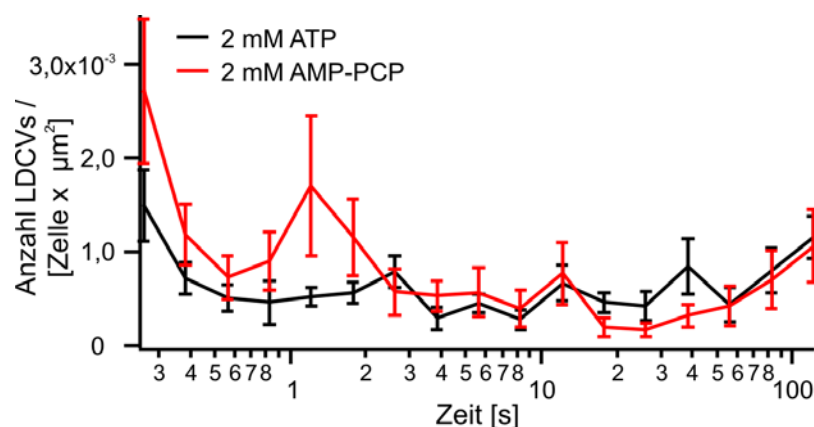


Abb. 28: Verweildauer von LDCVs an der PM in Abhängigkeit von ATP. Die Zellen wurden mit 2 mM ATP (schwarz) oder 2 mM AMP-PCP (rot) in der Pipettenlösung perfundiert. Gezeigt sind die mittleren Verweildauern aller gemessenen Zellen, normalisiert auf die Anzahl LDCVs und die mit TIRFM sichtbare Basisfläche, logarithmisch dargestellt. (N=5)

In Kontrollzellen konnten pro Zelle und μm^2 $1,5 \cdot 10^{-3} \pm 0,4 \cdot 10^{-3}$ LDCVs mit einer kurzen Verweildauer detektiert werden, während $1,2 \cdot 10^{-3} \pm 0,2 \cdot 10^{-3}$ LDCVs pro Zelle und μm^2 die maximale Verweildauer von 121,15 s zeigten (Abb. 28). Unter Verwendung von AMP-PCP in der Pipettenlösung fand eine nicht signifikante Veränderung der Kurve statt, so dass gehäuft kurze Verweildauern ($2,7 \cdot 10^{-3} \pm 0,7 \cdot 10^{-3}$ LDCVs pro Zelle und μm^2) auftraten, während die Anzahl von LDCVs mit längeren Verweildauern unverändert blieb (AMP-PCP: $1,1 \cdot 10^{-3} \pm 0,4 \cdot 10^{-3}$ LDCVs; ATP: $1,2 \cdot 10^{-3} \pm 0,2 \cdot 10^{-3}$ LDCVs, angegebene Werte jeweils pro Zelle und μm^2). Auch dieses Experiment zeigte, dass ATP für das Verankern von LDCVs an der PM nicht nötig war, weshalb erneut der Priming-Schritt mit Hilfe der Caging Diameter Analyse untersucht wurde (Abb. 29).

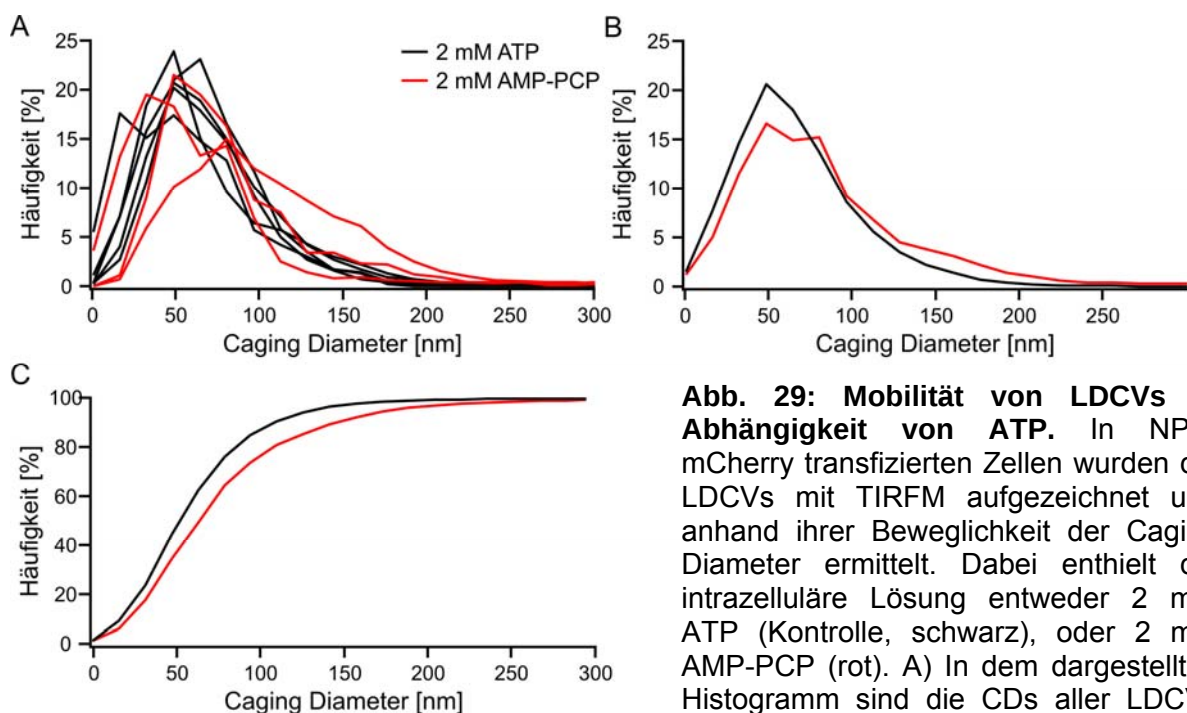


Abb. 29: Mobilität von LDCVs in Abhängigkeit von ATP. In NPY-mCherry transfizierten Zellen wurden die LDCVs mit TIRFM aufgezeichnet und anhand ihrer Beweglichkeit der Caging Diameter ermittelt. Dabei enthielt die intrazelluläre Lösung entweder 2 mM ATP (Kontrolle, schwarz), oder 2 mM AMP-PCP (rot). A) In dem dargestellten Histogramm sind die CDs aller LDCVs der gemessenen Zellen zu sehen, wobei

jede Linie den gemittelten CD aller LDCVs einer Zelle repräsentiert. Die Werte aus (A) wurden für jede Kondition gemittelt und in (B) graphisch dargestellt. C) Kumulatives Histogramm von (B). (N=5)

Die Häufigkeitsverteilung der LDCV-Bewegungen (Abb. 29B) zeigte eine Erhöhung der Anzahl größerer Caging Diameter unter Verwendung von AMP-PCP, was sich in einer Verschiebung der kumulativen Häufigkeit nach rechts widerspiegelte (Abb. 29C). Es konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden, so dass keine Rolle von ATP beim Priming vorlag.

Da nach fünf Messungen mit ATP oder AMP-PCP in der Pipettenlösung kein deutlicher Unterschied erkennbar war, wurden die Experimente eingestellt.

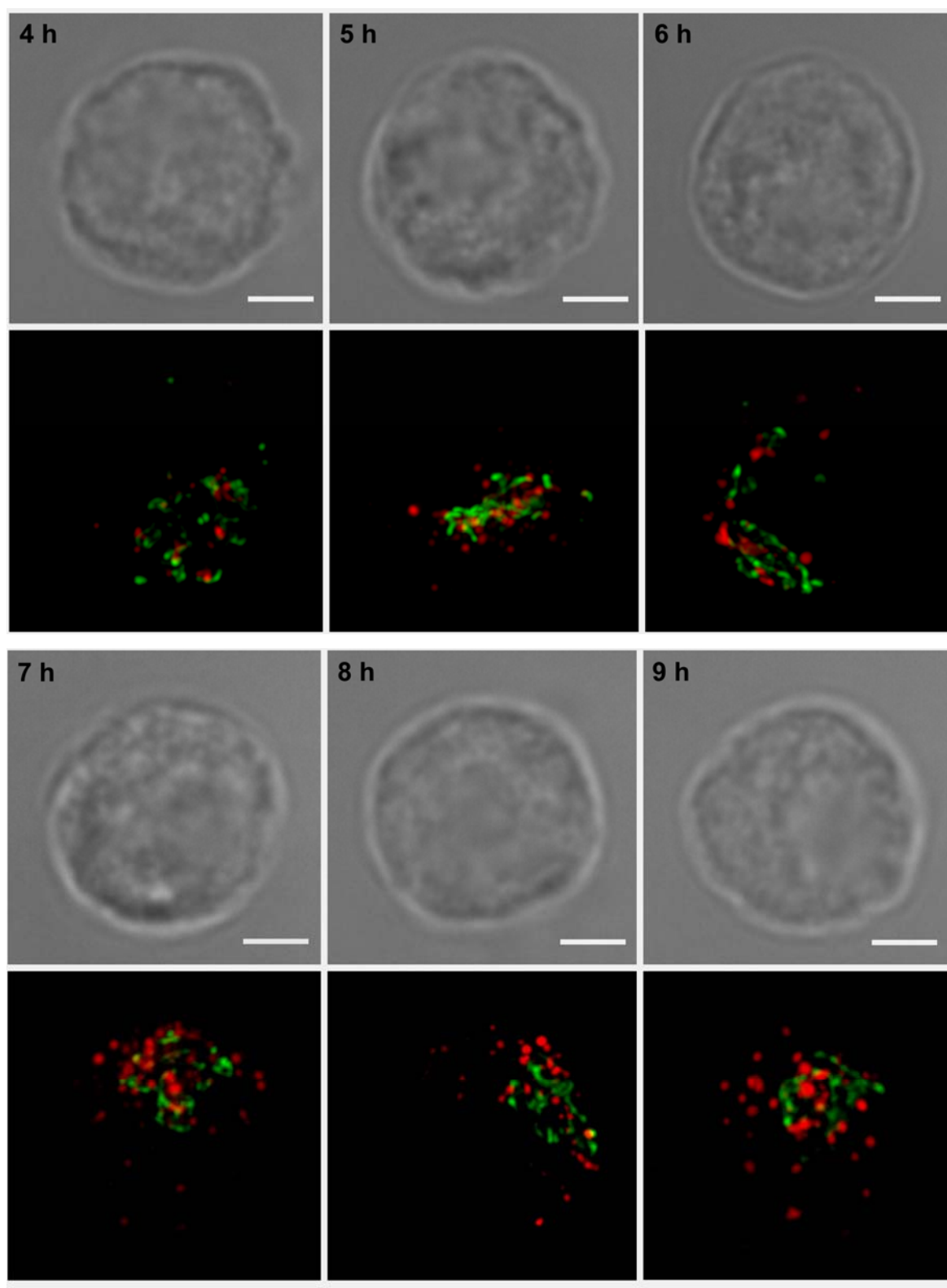
Teil 2: „Dead-end“ Vesikel

In den Experimenten zur Untersuchung der Rolle von ATP auf Docking und Priming wurden die Zellen durch Depolarisationsreihen stimuliert. Beim Betrachten der TIRFM-Filme fiel auf, dass nur sehr wenig LDCVs nach einem Stimulus sezerniert wurden. Die Anzahl der in TIRFM sichtbaren LDCVs vor und nach der Stimulation unterschied sich kaum. Daraus ergab sich die Frage, ob die nach der Stimulation an der PM verbliebenen LDCVs nicht sezernierbar waren, oder ob der verwendete Stimulus ungeeignet war, um mehr LDCVs freizusetzen. Diesen Fragestellungen sollten im folgenden Projekt nachgegangen werden.

3.6 Maturierung und Verteilung von LDCVs

Um nicht sezernierbare LDCVs identifizieren zu können, sollte in den folgenden Experimenten möglichst viel Sekretion in TIRFM beobachtet werden. Aus diesem Grund wurden die Zellen nicht, wie zuvor, durch das Semliki-Forest-Virus transfiziert, sondern mittels Elektroporation. Durch diese Technik ist sowohl der Anteil transfizierter Zellen, als auch die Anzahl markierter LDCVs pro Zelle deutlich höher als bei Einsatz des Virus. Da das Alter der LDCVs einen Einfluss auf ihre Sekretionswahrscheinlichkeit haben könnte, sollte untersucht werden, wie schnell sich die LDCVs nach ihrer Entstehung am Golgi-Apparat innerhalb der Zelle und an der PM verteilen. Erst bei einer hohen Dichte von LDCVs in TIRFM waren Sekretionsexperimente sinnvoll, da die Wahrscheinlichkeit, in TIRFM Sekretion beobachten zu können, mit steigender Anzahl von LDCVs zunahm (eigene Beobachtung).

Verschiedene Faktoren bestimmten den zeitlichen Abstand zwischen Knospung der LDCVs vom Golgi-Apparat bis hin zu in TIRFM sichtbaren, fluoreszenten LDCVs an der PM. Dazu zählte das Überwinden der Strecke vom Golgi-Apparat bis zur PM nach der Entstehung der LDCVs. Zusätzlich benötigte das Fluoreszenzprotein mCherry, Zeit zum Maturieren, da die Fluoreszenz erst nach korrekter Faltung des Proteins entstand. Um die zurückgelegte Strecke der LDCVs einschätzen zu können, wurden nicht nur die LDCVs selbst, sondern zusätzlich der Golgi-Apparat mit Antikörpern markiert. Für die Experimente wurden Zellen mit NPY-mCherry elektroporiert, zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion fixiert, der Golgi-Apparat markiert und die Zellen mit SIM visualisiert. Jeweils eine exemplarische Zelle ist für jeden Zeitpunkt der Fixierung in Abb. 30 dargestellt.



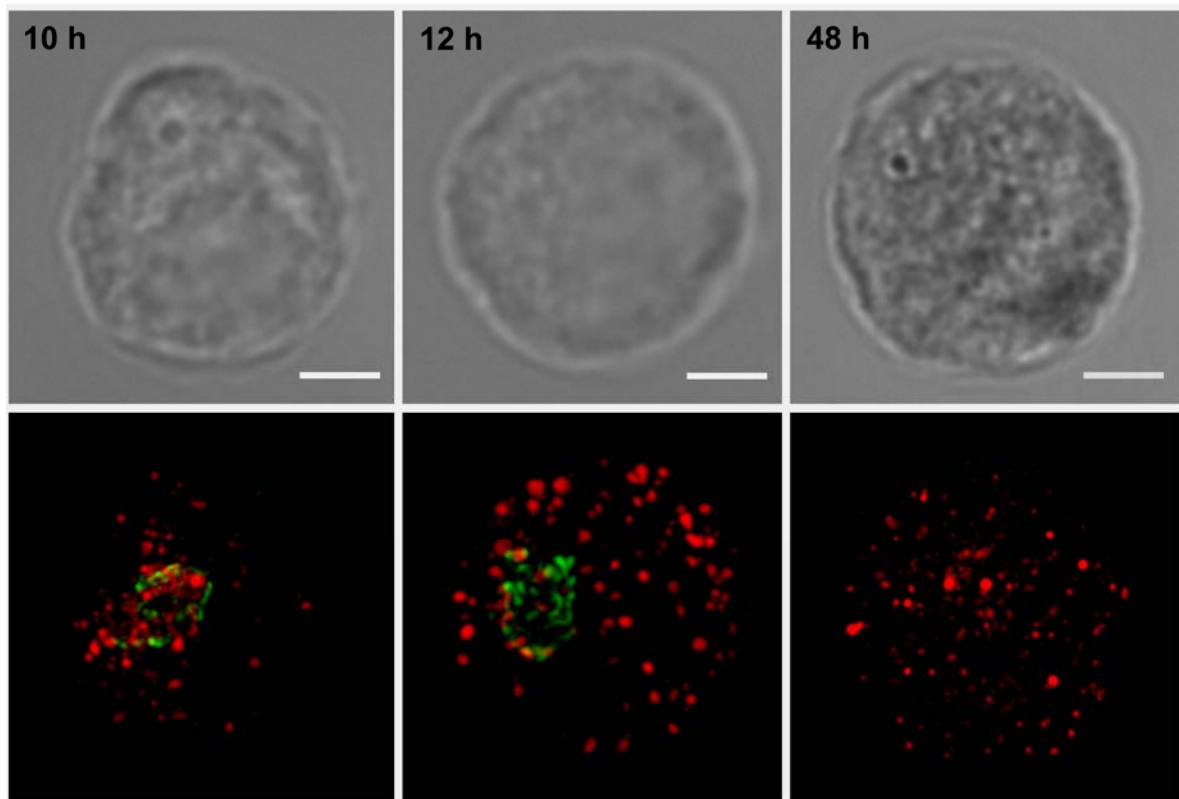


Abb. 30: Zeitverlauf der Verteilung von LDCVs vom Golgi-Apparat zur PM. Chromaffinzellen wurden mit NPY-mCherry (rot) elektroporiert und zu den angegebenen Zeitpunkten chemisch fixiert. Zusätzlich fand eine Antikörperfärbung des Golgi-Apparates (grün) statt. Gezeigt sind Durchlicht-Bilder der exemplarischen Zellen sowie eine Projektion der maximalen Intensität von SIM-Aufnahmen der ganzen Zelle. Bei der Fixierung nach 48 h wurde keine Markierung des Golgi-Apparates durchgeführt. Skala: 5 μ m

Wie Abb. 30 zeigt, waren bereits 4 h nach der Transfektion von bovinen Chromaffinzellen mit NPY-mCherry markierte LDCVs zu erkennen. Die Anzahl der fluoreszenten LDCVs nahm im Laufe der Zeit zu, wobei diese sich zwischen 4 und 6 h nach der Elektroporation ausschließlich am Golgi-Apparat aufhielten. Nach 7 h begannen sie sich entlang der PM zu verteilen. Zwischen den Bildern aufgenommen 7 und 9 h nach der Transfektion ist kein Unterschied zu erkennen. Danach erhöhte sich die Anzahl der erkennbaren LDCVs deutlich und nach 12 h lies sich bereits die Zellform anhand der Verteilung von LDCVs erkennen. Der früheste Zeitpunkt zur Durchführung von Sekretionsexperimenten schien 12 h nach der Elektroporation zu sein.

Ein weiteres Experiment war der Nachweis, dass NPY-mCherry markierte LDCVs repräsentativ für alle LDCVs der Zelle waren und somit keinen besonderen Pool innerhalb der Zelle darstellten. Um dies zu untersuchen wurden mit NPY-mCherry elektroporierte Zellen zusätzlich mit dem fluoreszenten Farbstoff FFN511 geladen. Dieser färbt alle LDCVs in der Zelle an, so dass die Verteilung von grünen LDCVs (nur mit FFN511 markiert) und rot-grünen LDCVs (mit NPY-mCherry und FFN511 markiert) innerhalb einer Zelle verglichen werden konnte. Grüne LDCVs waren älter als rot-grüne, wobei letztere höchstens so alt

waren wie der zeitliche Abstand der Fixierung zur Elektroporation. Wie zuvor bei den Maturierungsexperimenten sollten hier Bilder mit der SIM-Technik aufgenommen werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass FFN511 nicht fixiert werden konnte, da der Farbstoff durch die vielen Waschschr tte aus der Zelle ausgewaschen wurde. Die Aufnahme von lebenden, unfixierten Zellen mit SIM war nur möglich, wenn sich die LDCVs nicht bewegten, da die vollständige Aufnahme einer ganzen Zelle mehrere Minuten dauerte. Die Zellen wurden deshalb vor den Aufnahmen mit Taxol und Phalloidin inkubiert. Taxol stabilisiert Tubulin und inhibiert dessen Polymerisierung, Phalloidin hat denselben Effekt auf Aktin (Thuret-Carnahan et al., 1985; Bittner und Holz, 2005). Die LDCVs konnten somit nicht mehr entlang dieser Netzwerke transportiert werden.

Ekta Dembla, eine Praktikantin in unserer Abteilung, hat diese Experimente durchgeführt. Abb. 31 zeigt eine exemplarische Zelle, sowie die Analyse der Verteilung von FFN511- und NPY-mCherry markierten LDCVs.

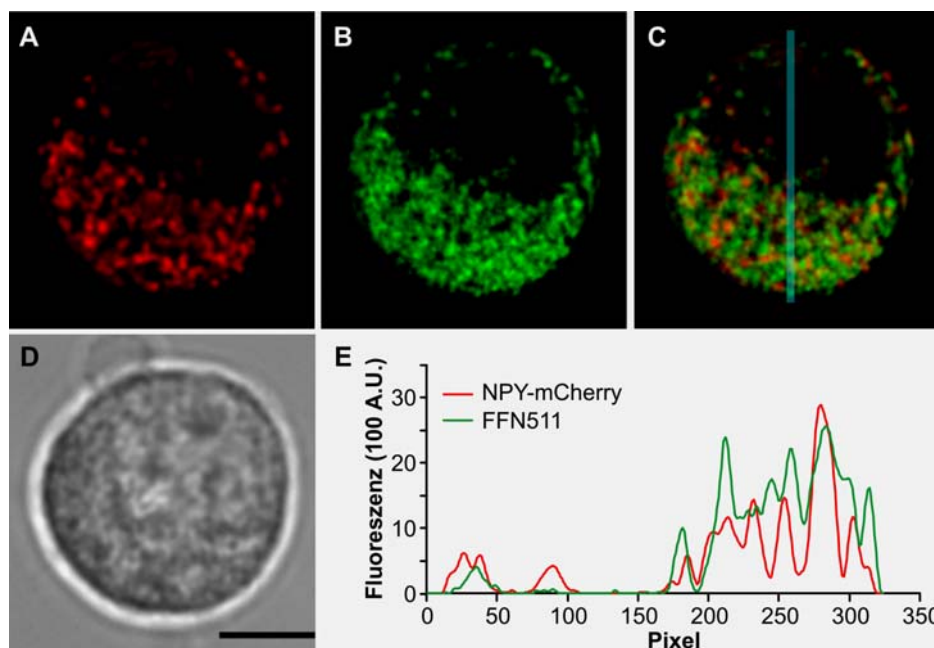


Abb. 31: Verteilung von unterschiedlich markierten LDCVs innerhalb einer Zelle. Chromaffinzellen wurden mit NPY-mCherry elektroporiert und mit FFN511 geladen. Nach der Inkubation mit Phalloidin und Taxol konnten SIM-Aufnahmen erstellt werden. A) B) SIM-Aufnahmen einer exemplarischen Zelle, markiert mit NPY-mCherry (rot) und FFN511 (grün). Die Überlagerung beider Fluoreszenzen ist in (C) dargestellt. Entlang der blauen Linie wurde die Intensität beider Fluoreszenzen gemessen und in (E) dargestellt. D) Durchlichtbild der exemplarischen Zelle. Skala: 5 μm

Vergleicht man Abb. 31A und B, so ist eine deutlich höhere Dichte der grün fluoreszenten LDCVs im Gegensatz zu NPY-mCherry markierten LDCVs erkennbar, da FFN511 alle LDCVs der Zelle anfärbte. Nach der Überlagerung beider Fluoreszenzen waren einige gelbe LDCVs erkennbar, welche mit NPY-mCherry und FFN511 markiert waren (Abb. 31C). Für die Auswertung der Verteilung grüner und rot-grüner LDCVs innerhalb der Zelle wurde die

Fluoreszenzintensität beider Wellenlängen entlang einer Linie durch die Zelle gemessen (Abb. 31C). Die Verteilung der Fluoreszenz von NPY-mCherry- und FFN511-markierten LDCVs innerhalb der Zelle war ähnlich (Abb. 31E), was zeigte, dass mit NPY-mCherry markierte LDCVs keinen gesonderten Pool innerhalb einer Zelle darstellten. Das Ergebnis lässt außerdem darauf schließen, dass das Alter der LDCVs für ihre Verteilung innerhalb der Zelle keine Rolle spielte. Für eine genauere Analyse wurde die Position der LDCVs innerhalb verschiedener Bereiche der Zelle ausgewertet. Jede Zelle wurde dafür mit vier bis fünf Ringen unterschiedlicher Radien in mehrere Regionen unterteilt. Innerhalb der Ringflächen wurde der Anteil der beiden Fluoreszenzen ermittelt und in einem Korrelationsplot aufgetragen. Die Ergebnisse sind in Abb. 32 dargestellt.

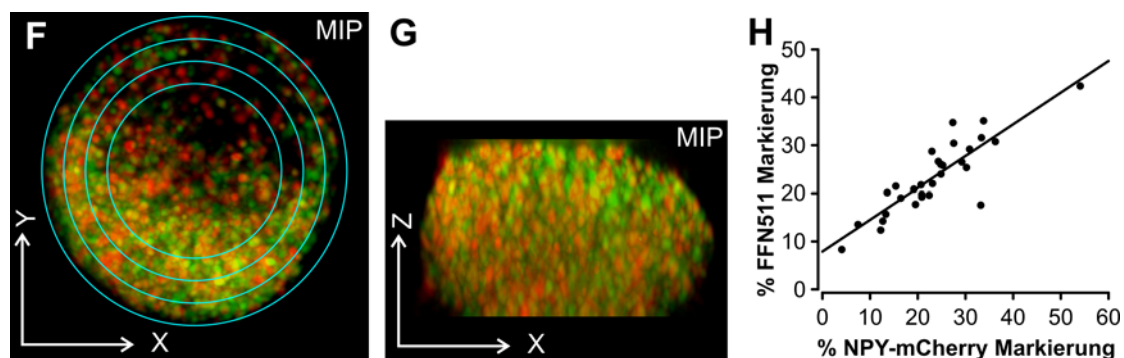


Abb. 32: Verteilung von LDCVs unterschiedlichen Alters ermittelt anhand eines Korrelationsplots. Die Verteilung von NPY-mCherry- und FFN-markierten LDCVs ist in einer Projektion der maximalen Fluoreszenzintensität (engl. maximum intensity projection, MIP) in (A) und (B) dargestellt, wobei (A) die Projektion der XY-Ebene und (B) die XZ-Ebene zeigt. Anhand von Ringen mit unterschiedlichen Radien (wie in (A) demonstriert) wurde der Anteil beider Fluoreszenzen über die Zelle berechnet und in einem Korrelationsplot (C) dargestellt. Skala: 5 μ m (N=7)

Der Korrelationsplot in Abb. 32C zeigte erneut keinen Unterschied zwischen der Verteilung von unterschiedlich markierten LDCVs innerhalb der Zelle. Die Berechnung des Pearsons Korrelations-Koeffizienten, welcher ein Maß für den Grad eines linearen Zusammenhangs zwischen zwei Merkmalen darstellt, ergab einen Wert von 0,87 ($p < 0,001$). Der Korrelations-Koeffizient kann Größen zwischen -1 und +1 annehmen. Werte von +1 oder -1 sind als vollständiger positiver bzw. negativer linearer Zusammenhang zwischen den beiden Merkmalen zu interpretieren. Im Gegensatz dazu weisen Werte gegen Null darauf hin, dass kein linearer Zusammenhang besteht. Somit zeigten die in dieser Arbeit ermittelten Werte einen linearen Zusammenhang beider Fluoreszenzen. Innerhalb der Zelle waren LDCVs unterschiedlichen Alters demnach gleichmäßig verteilt, was den vorherigen Eindruck (Abb. 31) bestätigte.

3.7 Sekretion bei verschiedenen Arten von Stimuli

Die zuvor durchgeführten Experimenten zeigten, dass mit pMAX-NPY-mCherry markierte LDCVs keine spezielle Fraktion innerhalb der Zelle darstellten: Dieses Plasmid konnte somit für die Markierung der LDCVs zur Charakterisierung von „dead-end“ Vesikel verwendet werden. Zuerst sollte getestet werden, welches Maß an Sekretion verschiedene Arten von Stimuli auslösen konnten und wie viele LDCVs nach der Stimulation an der PM mit TIRFM erkennbar blieben. Dabei wurde sowohl die Sekretion an der Basisfläche in TIRFM, als auch die Veränderung der Membrankapazität als Antwort auf einen Stimulus analysiert.

3.7.1 Stimulation durch Depolarisationsreihen

Die Zellen wurden zu Beginn mit Depolarisationen stimuliert, um die zuvor beobachtete, geringe Anzahl von sezernierten LDCVs zu reproduzieren. In diesen Experimenten kamen jedoch bis zu sechs hintereinander folgende Depolarisationsreihen zum Einsatz. Damit sollte untersucht werden, ob sich die Menge der Sekretion bei mehreren aufeinander folgenden Stimulationen änderte. Zwischen zwei Stimulationen lagen mindestens 2 min, welche für das Auffüllen der Pools freisetzbarer LDCVs an der PM ausreichend war (von Rüden und Neher, 1993; Smith et al., 1998). Zusätzlich wurde ein zweiter Stimulus verwendet, nämlich die UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA. Um die Ergebnisse beider Experimentenreihen besser vergleichen zu können, wurde für beide Arten der Stimulation die gleiche Pipettenlösung mit NP-EGTA verwendet.

Für die Experimente wurden Zellen mit NPY-mCherry elektroporiert. Die gemittelte Veränderung der Membrankapazität als Antwort auf die Stimulationen ist in Abb. 33 gezeigt.

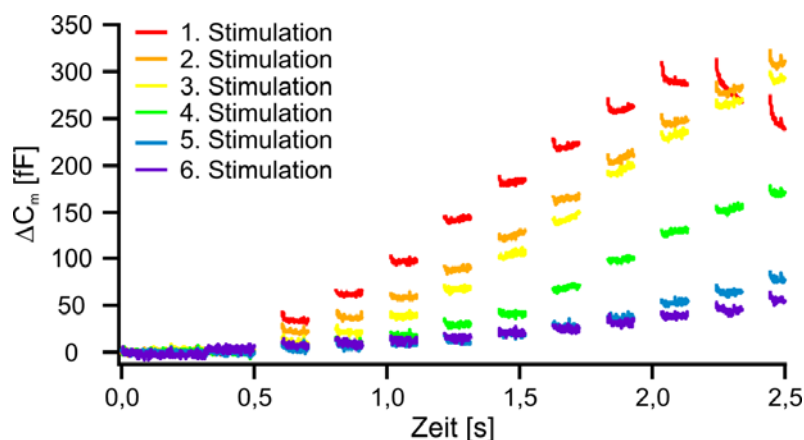


Abb. 33: Veränderung der Membrankapazität als Antwort auf sechs Depolarisationsreihen. Mit NPY-mCherry transfizierte Chromaffinzellen wurden in der Ganzzellableitung gemessen und sechs Mal mit einer Depolarisationsreihe bei 0,5 s stimuliert. Die Veränderung der Membrankapazität wurde analysiert und für jede Stimulation gemittelt. (N=23)

In Abb. 33 fällt auf, dass der Anstieg der Membrankapazität nach der dritten Stimulationsreihe mit zunehmender Zahl von Depolarisationsreihen reduziert war. Nach der ersten Stimulation wurde im Durchschnitt eine maximale Zunahme der Membrankapazität von 307 ± 48 fF erreicht, die Stimulationen zwei und drei verursachten einen ähnlichen Anstieg von 309 ± 48 fF und 292 ± 42 fF. Danach nahm die Sekretion deutlich ab, so dass mit dem vierten Stimulus nur noch eine Zunahme der Membrankapazität von 171 ± 39 fF erreicht wurde. Die fünfte und sechste Stimulation zeigte erneut eine Abnahme in der Membrankapazitätsantwort im Vergleich zu den vorherigen Stimulationen, hier konnte nur noch eine Veränderung von 79 ± 25 fF und 57 ± 31 fF erreicht werden.

Während den Stimulationen wurde gleichzeitig eine Aufnahme der angehefteten Zellfläche mit TIRFM durchgeführt, um die LDCVs an der PM zu beobachten und deren Sekretion analysieren zu können. Die Anzahl der sezernierten LDCVs jeder Zelle wurden auf die Größe der in TIRFM sichtbaren Basisfläche normalisiert. Anschließend wurden die Werte mit dem Mittelwert der Basisfläche aller Zellen aus beiden Experimenten (Stimulation mit Depolarisation und UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA, $45 \mu\text{m}^2$) multipliziert, alle Werte einer Kondition gemittelt und als kumulativer Plot dargestellt (Abb. 34).

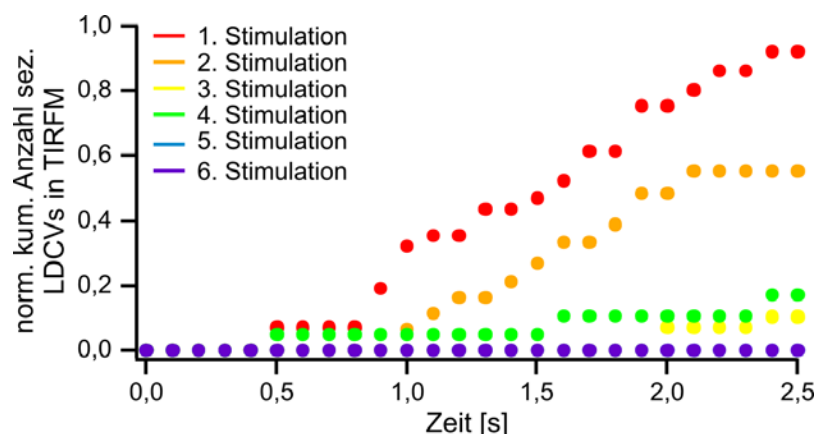


Abb. 34: Normalisierte, kumulative Anzahl sezernierter LDCVs in TIRFM bei Stimulation mit sechs Depolarisationsreihen. Die Zellen wurden insgesamt sechs Mal stimuliert und die Anzahl der sezernierten LDCVs jeder Zelle auf ihre Basisfläche normalisiert. Die Daten jeder Kondition wurden mit der mittleren Basisfläche aller Zellen der Experimente multipliziert und gemittelt. (N=23)

Abb. 34 zeigt bereits nach der ersten Stimulation ($0,9 \pm 0,3$ sezernierte LDCVs) eine 33%ige Abnahme der Sekretion während der zweiten Stimulation auf $0,6 \pm 0,2$ sezernierte LDCVs. Die dritte bis sechste Depolarisationsreihe löste kaum noch Sekretion in TIRFM auf, es konnten durchschnittlich $0,2 \pm 0,1$ (dritte Stimulation), $0,2 \pm 0,2$ (vierte Stimulation), 0 (fünfte Stimulation) und $0,1 \pm 0,1$ (sechste Stimulation) sezernierte LDCVs in den Filmen detektiert werden. Die geringe Anzahl sezernierter LDCVs in TIRFM, welche schon in den Experimenten aus Teil 1 der Arbeit beobachtet wurde, konnte somit reproduziert werden.

Es wurde zuvor publiziert, dass in TIRFM beobachtete Sekretion von LDCVs mit der Sekretion der gesamten Zelle, gemessen durch die Veränderung der Membrankapazität, korrelierte (Becherer et al., 2007). Um dies genauer zu untersuchen und die Veränderung der Membrankapazität nach der Stimulation mit der Anzahl sezernierter LDCVs in TIRFM besser vergleichen zu können, wurden die Daten beider Analysen in einem Graph dargestellt (Abb. 35). Die Antworten der Zellen auf die fünfte und sechste Stimulation wurden in diesem Diagramm nicht berücksichtigt, da dort kaum Sekretion auftrat.

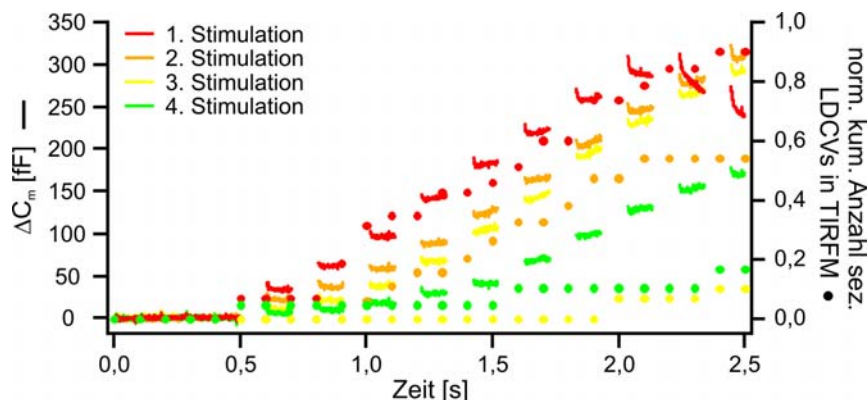


Abb. 35: Veränderung von Membrankapazität und Sekretion in TIRFM während vier Reihen von Depolarisationen. Während den Depolarisationsreihen wurde die Sekretion von fluorescent markierten LDCVs in TIRFM (Kreise) beobachtet und die Veränderung der Membrankapazität (Striche) gemessen. Die Anzahl der sezernierten LDCVs in TIRFM wurde auf die Basisfläche der jeweiligen Zelle normalisiert und mit der durchschnittlichen Basisfläche aller Zellen multipliziert. Die gemittelten Werte wurden kumulativ aufgetragen. (N=23)

Die Veränderung der Membrankapazität und die kumulative Sekretion in TIRFM zeigten als Antwort auf die erste Stimulation (Abb. 35, rot) einen ähnlichen Verlauf. Bei Stimulation zwei (orange) war durch die Abnahme der Anzahl sezernierter LDCVs ein deutlicher Unterschied im Verlauf der Sekretion in TIRFM im Vergleich zur Membrankapazität erkennbar. Dieser setzte sich mit steigender Anzahl an Stimulationen fort. Eine Korrelation zwischen sezernierten LDCVs in TIRFM und Sekretion der gesamten Zelle konnte somit nur für die erste Stimulation bestätigt werden.

Eine mögliche Erklärung für die abnehmende Sekretion mit steigender Anzahl von Depolarisationsreihen war die Inaktivierung von Ca^{2+} -Kanälen (Cens et al., 1999; Catterall, 2000; Wykes et al., 2007). Dies tritt laut Literatur bei andauernder Stimulation verstärkt auf, so dass der Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle und damit die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu gering ist, um Sekretion auszulösen. Um dies zu untersuchen wurden die Ca^{2+} -Ströme der gemessenen Zellen analysiert (Abb. 36).

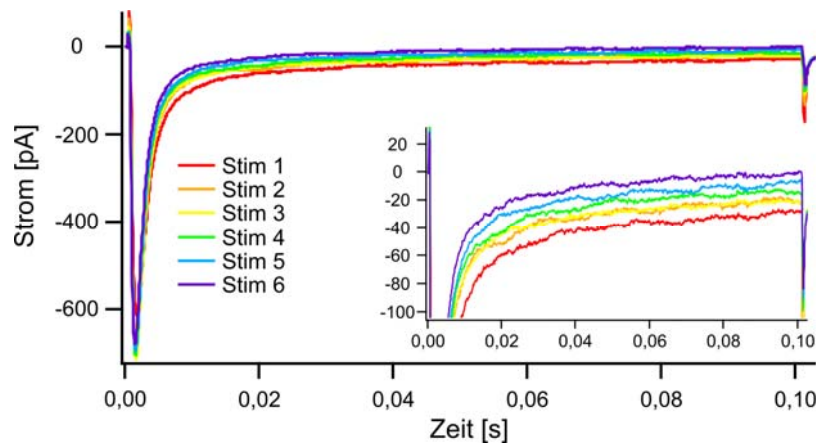


Abb. 36: Ströme der Zelle gemessen nach sechs aufeinander folgenden Depolarisationsreihen. Nach jeder der sechs Stimulationen (Stim) wurde der Stromfluss durch die Ionenkanäle gemessen. Ein Teilbereich des Graphen wurde vergrößert und ist als kleiner Graph dargestellt. Dort wird die Inhibierung der Ca^{2+} -Ströme mit zunehmender Anzahl der Stimulationen deutlich. Aufgetragen sind gemittelte Werte. (N=19)

Wie erwartet kam es durch die wiederholten Depolarisationen der Zellen zu einer Inaktivierung der Ca^{2+} -Kanäle (Abb. 36). Nach der ersten Stimulation wurden Ca^{2+} -Ströme von $-28,9 \pm 9,2$ pA gemessen, welche durch die zweite Depolarisationsreihe um 30,5% auf $-20,1 \pm 7,9$ pA reduziert wurden ($p=0,149$, gepaarter t-test). Ein ähnlicher Wert konnte nach der dritten Stimulation ermittelt werden, hier betrug der Ca^{2+} -Strom $-20,7 \pm 8,9$ pA. Nach der vierten Depolarisationsreihe fand eine weitere Reduktion um 28,5% auf $-14,8 \pm 9,2$ pA statt ($p=0,062$, gepaarter t-test). Bezogen auf die gemessenen Ströme nach der ersten Stimulation betrug die Abnahme der Ca^{2+} -Ströme nach der vierten Stimulation sogar 48,8% ($p=0,026$, gepaarter t-test). Die Ströme sanken nach der fünften und sechsten Depolarisationsreihe weiter auf $-7 \pm 9,4$ pA und $-2,7 \pm 8,2$ pA ($p=0,004$ bzw. $p=0,002$, gepaarter t-test). Gegenüber der ersten Messung stellen diese Werte Reduktionen von 75,7% und 90,7% dar. Die Abnahme der Ca^{2+} -Ströme konnte somit für die Reduktion der Sekretion bei wiederholter Stimulation verantwortlich sein. Zur Verifizierung dieser Annahme wurden weitere Experimente durchgeführt, in welchen die Stimulation der Zellen mittels UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA statt fand.

3.7.2 Stimulation durch UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA

Im Gegensatz zur Stimulation mit Depolarisationsreihen war bei Verwendung der UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA die Sekretion unabhängig vom Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle. Die Pipettenlösung enthielt in diesem Fall eine hohe $[\text{Ca}^{2+}]$, wobei das Ca^{2+} in gebundener Form, an den Puffer NP-EGTA, vorlag. Durch den UV-Blitz wurde das Ca^{2+} schlagartig freigesetzt. Als Auslöser für Exozytose war somit ausreichend Ca^{2+} in der Zelle vorhanden, unabhängig von Ca^{2+} -Kanälen in der PM. Wenn die beobachtete Reduktion der Ca^{2+} -Ströme bei Stimulation mit Depolarisationsreihen die Ursache für die Abnahme der

Sekretion darstellte, so sollte durch die Stimulation der Zellen mit UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA eine Reduktion der Sekretion umgangen werden.

Mit NPY-mCherry elektroporierte Zellen wurden mehrmals hintereinander stimuliert und die Veränderung der Membrankapazität analysiert (Abb. 37).

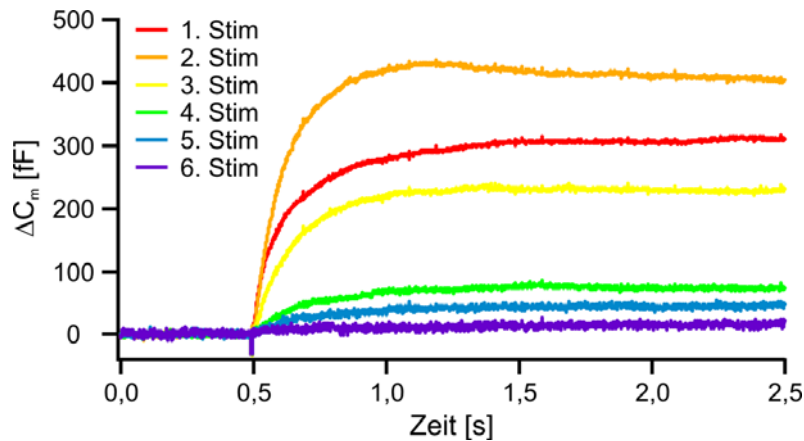


Abb. 37: Veränderung der Membrankapazität während sechs Folgen von UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA. Mit NPY-mCherry transfizierte Chromaffinzellen wurden in der Ganzzellaufleitung sechs Mal bei 0,5 s durch UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA stimuliert. Die Veränderung der Membrankapazität wurde für jede Zelle analysiert und für jede Stimulation (Stim) gemittelt. (N=23)

Die erste Stimulation mit UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA verursachte einen Anstieg der Membrankapazität von 310 ± 81 fF, nach dem zweiten Stimulus wurde eine Zunahme der Membrankapazität von 406 ± 91 fF erreicht (Abb. 37). Nach der dritten Stimulation, bei welcher die Zellgröße um 230 ± 64 fF zunahm, trat eine starke Abnahme der Membrankapazitätsantworten auf die folgenden Stimulationsreihen auf. Durch die vierte und fünfte Stimulation stieg die Membrankapazität um 76 ± 36 fF und 45 ± 33 fF an. Der sechste Stimulus verursachte einen Anstieg der Membrankapazität von lediglich 13 ± 11 fF. Auch mit UV-Blitzlichtphotolyse kam es demnach zu einer Abnahme der Sekretion nach der dritten Stimulation, vergleichbar mit der Stimulation durch Depolarisationsreihen (Abb. 33). Die zuvor beobachtete Reduktion der Ca^{2+} -Ströme konnte somit nicht für diesen Effekt verantwortlich sein.

Die Analyse der in TIRFM sezernierten LDCVs ist in Abb. 38 dargestellt.

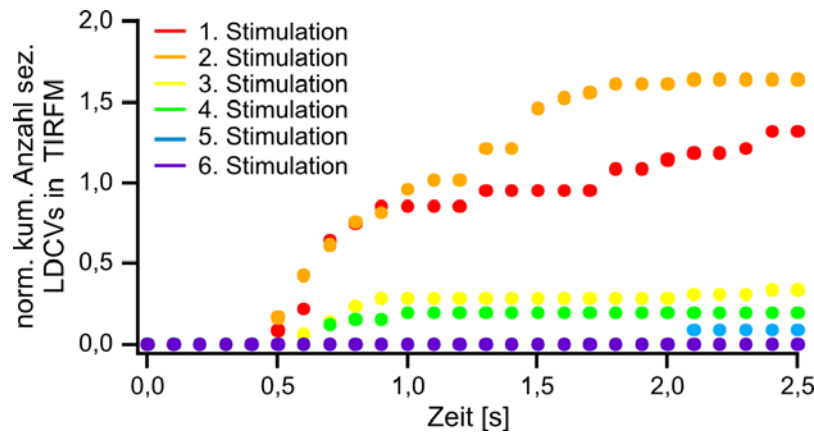


Abb. 38: Normalisierte, kumulative Sekretion in TIRFM nach Stimulation mit UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA. Die Zellen wurden sechs Mal in einem Abstand von je 2 min stimuliert. Die kumulative Anzahl sezernierter LDCVs in TIRFM wurde auf die Basisfläche jeder Zelle normalisiert und anschließend mit der mittleren Basisfläche aller Zellen aus der Experimentenreihe multipliziert und gemittelt. (N=23)

Wie schon bei den Membrankapazitätsantworten (Abb. 37) nahm auch die Anzahl sezernierter LDCVs in TIRFM im Verlauf der Experimente ab (Abb. 38). Die erste und zweite Stimulation verursachten mit $1,3 \pm 0,5$ bzw. $1,7 \pm 0,4$ sezernierten LDCVs die höchsten Sekretionswerte. Während der dritten bis sechsten Stimulation konnte kaum noch Sekretion in TIRFM beobachtet werden (dritte Stimulation: $0,4 \pm 0,2$; vierte Stimulation: $0,2 \pm 0,1$; fünfte Stimulation: $0,1 \pm 0,1$; sechste Stimulation: 0 sezernierte LDCVs). Im Vergleich zur zweiten Stimulation war die Anzahl der sezernierten LDCVs nach der dritten Stimulation um 76,5% reduziert. Dies ist vergleichbar mit einer Abnahme der Sekretion in TIRFM von der zweiten zur dritten Depolarisationsreihe um 66,7% (Abb. 34).

Auch bei dieser Art der Stimulation sollte die Korrelation der Sekretion in TIRFM mit der Sekretion der ganzen Zelle untersucht werden, wofür die Veränderung der Membrankapazität und die kumulative Sekretion in TIRFM für die erste bis vierte Stimulation in einem Graphen aufgetragen wurden (Abb. 39).

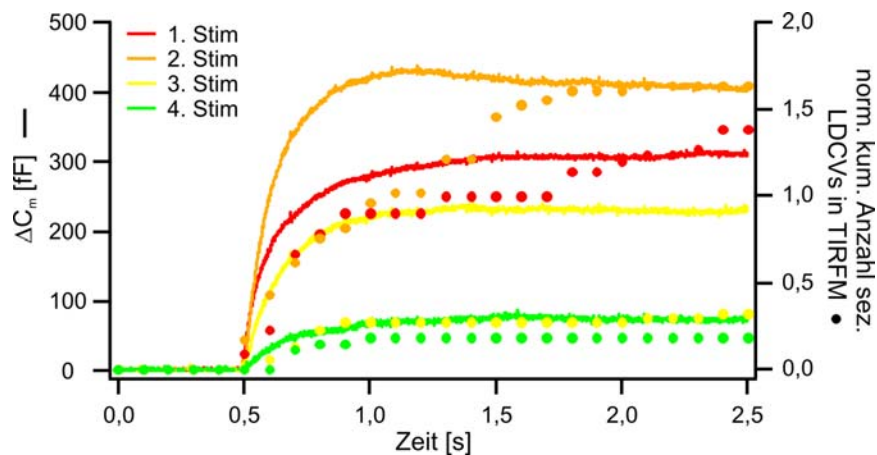


Abb. 39: Veränderung von Membrankapazität und Sekretion in TIRFM während vier Stimulationen durch UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA. Während den Stimulationen (Stim) wurde die Sekretion von fluorescent markierten LDCVs in TIRFM (Kreise) beobachtet und die Veränderung der Membrankapazität (Striche) gemessen. Die Anzahl sezernierter LDCVs in TIRFM wurde auf die Basisfläche der jeweiligen Zelle normalisiert, mit der durchschnittlichen Basisfläche aller Zellen multipliziert und kumulativ aufgetragen. Gezeigt sind gemittelte Werte. (N=23)

Beim Vergleich der Sekretion in Membrankapazität und TIRFM für den ersten und zweiten Stimulus fiel auf, dass die Membrankapazität jeweils schneller stieg als die kumulative Sekretion in TIRFM (Abb. 39). Durch die gewählte Skalierung der Achsen schienen die Kurven von Membrankapazität und Sekretion in TIRFM am Ende jedoch eine vergleichbare Höhe zu erreichen. Dies war bei der dritten Stimulation nicht mehr der Fall. Die Antworten auf den vierten Stimulus waren ähnlich, wobei die Sekretion in TIRFM später einsetzte als die Sekretion der gesamten Zelle. Somit lag auch hier keine vollständige Korrelation von Sekretion in TIRFM und Sekretion der gesamten Zelle vor.

Es stellte sich somit die Frage, warum die Sekretion in TIRFM nach der ersten bzw. zweiten Stimulation nicht mehr mit der Veränderung der Membrankapazität korrelierte. Ein Grund hierfür könnte das Alter der LDCVs sein. Es wurde bereits mehrfach postuliert, dass in Zellen zuerst jüngere LDCVs sezerniert werden (Duncan et al., 2003; Tsuboi et al., 2010). Bezogen auf die hier durchgeführten Experimente bedeutete dies, dass als Antwort auf die ersten Stimulationen präferentiell neue, mit NPY-mCherry markierte LDCVs sezerniert würden und danach erst vermehrt ältere, nicht markierte LDCVs. Mit TIRFM konnte lediglich die Sekretion der neuen, markierten LDCVs beobachtet werden. Da vor der ersten Stimulation noch viele junge LDCVs an der PM waren und somit wenig, oder gar keine älteren, nicht markierten LDCVs sezerniert wurden, führte dies zu der beobachteten Korrelation der Sekretion von Membrankapazität und TIRFM. Bei den folgenden Stimulationen müssten dann mehr ältere, nicht fluorescent markierte LDCVs in TIRFM mit der PM fusionieren. Dies würde keine Korrelation zwischen Membrankapazität und Sekretion in TIRFM erlauben, da mit den Membrankapazitätsmessungen alle sezernierten LDCVs aufgezeichnet wurden, unabhängig von ihrem Alter. Obwohl dieser Hypothese die zu Beginn gezeigte, gleichmäßige

Verteilung von älteren und jüngeren LDCVs widersprach (Abb. 30-32), sollte sie genauer untersucht werden. Dazu wurden NPY-mCherry transfizierte Zellen wieder mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff FFN511 geladen. Alte LDCVs (grün fluoreszent) konnten so von neuen LDCVs (rot und grün fluoreszent) unterschieden werden (Abb. 40), wobei das Alter der neuen LDCVs dem zeitlichen Abstand der Messungen zur Elektroporation entsprach. Ausschließlich mit FFN511 markierte LDCVs waren demnach älter als der zeitliche Abstand zur Elektroporation.

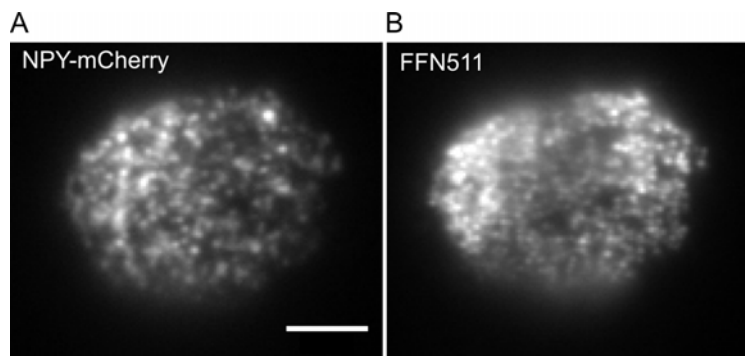


Abb. 40: Exemplarische bovine Chromaffinzelle mit NPY-mCherry transfiziert und FFN511 geladen. Die Fluoreszenz des NPY-mCherry ist in (A) zu erkennen, (B) zeigt die Färbung derselben Zelle mit FFN511. Skala: 5 μ m

In Abb. 40A sind weniger LDCVs fluoreszent markiert als in Teilabbildung B, da mit FFN511 alle LDCVs einer Zelle geladen wurden. Die Zellen mit drei aufeinander folgenden Depolarisationsreihen stimuliert und dabei sowohl die Veränderung der Membrankapazität, als auch die LDCVs an der PM in TIRFM zeitgleich mit zwei verschiedenen Wellenlängen (561 nm zur Anregung von NPY-mCherry und 450 nm für FFN511) aufgezeichnet. Anschließend folgte die Analyse der Sekretion in TIRFM, wobei anhand der beiden Filme zwischen alten und neuen LDCVs unterschieden wurde. Dabei sollte untersucht werden, ob sich das Verhältnis von alten und neuen sezernierten LDCVs mit steigender Anzahl von Stimulationen ändert. Das Ergebnis des Experimentes ist in Abb. 41 zu sehen.

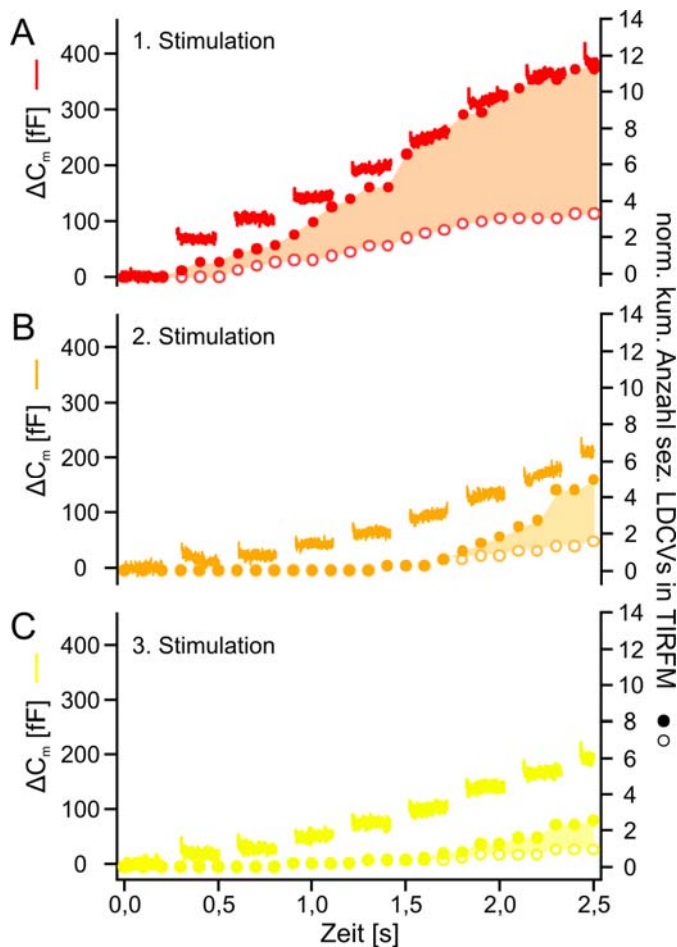


Abb. 41: Veränderung von Membrankapazität und Sekretion junger und alter LDCVs während Stimulation mit drei Depolarisationsreihen. NPY-mCherry exprimierende Zellen wurden mit FFN511 geladen und mit drei Depolarisationsreihen, im Abstand von jeweils 2 min, stimuliert. Sekretion wurde mittels Membrankapazität gemessen und mit TIRFM visualisiert. Gezeigt sind der durchschnittliche Anstieg der Membrankapazität (Linien) und die kumulative Sekretion in TIRFM (Kreise) als Antwort auf den ersten (A), zweiten (B) und dritten (C) Stimulus. Dabei wurde zwischen Sekretion von NPY-mCherry (○) und der Summe der Sekretion beider Fluophore (●) unterschieden. Die farbigen Flächen markieren den Anteil FFN-geladener, sezernierter LDCVs. (N=5)

Abb. 41 zeigt, dass die Sekretion von FFN511-markierten LDCVs einen Anteil von $69,6 \pm 34,8\%$ (erste Stimulation), $68,2 \pm 29,1\%$ (zweite Stimulation) und $63,5 \pm 9,3\%$ (dritte Stimulation) ausmachte. Das Verhältnis von jungen zu alten, sezernierten LDCVs änderte sich demnach mit zunehmender Anzahl von Stimulationen nicht, so dass der Unterschied zwischen sezernierten LDCVs in TIRFM und Veränderung der Membrankapazität nicht anhand des Alters der LDCVs erklärt werden konnte.

Die Verwendung der UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA sollte zeigen, ob die durch mehrere Depolarisationsreihen verursachte Reduktion der Ca^{2+} -Ströme die Ursache für die Abnahme der Sekretion darstellte (Abb. 33-35). Obwohl die Sekretion hier unabhängig vom Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle war, lag eine Abnahme der Sekretion mit steigender Anzahl von Stimulationen vor (Abb. 37-39). Somit war auszuschließen, dass einzig die reduzierten Ca^{2+} -Ströme im Falle der depolarisierten Zellen die Abnahme der Sekretion verursachten. Es bestand die Möglichkeit, dass die Anzahl der LDCVs an der PM durch die Sekretion nach der Stimulation verringert wurde. In diesem Fall befänden sich mit zunehmender Anzahl von Stimulationen weniger LDCVs an der PM, wodurch weniger LDCVs sezerniert werden könnten. Um dies zu überprüfen wurde die Anzahl der LDCVs in TIRFM direkt vor und nach jeder Stimulation analysiert. Bilder exemplarischer Zellen sind in Abb. 42 zu sehen.

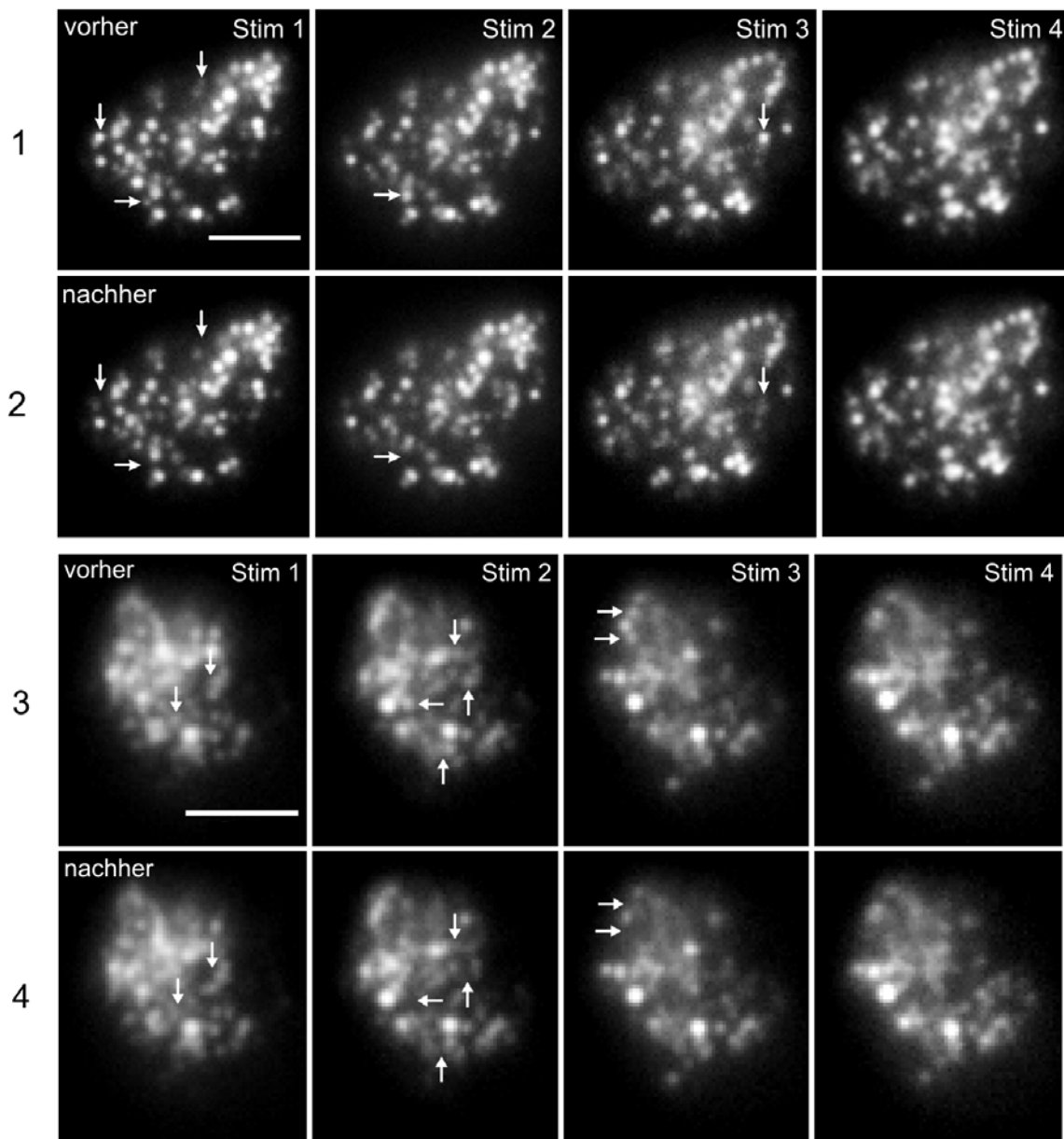


Abb. 42: Sekretion von LDCVs in TIRFM während der Stimulation mit Depolarisationsreihen oder UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA. Gezeigt sind Bilder exemplarischer Zellen aufgenommen direkt vor (Zeilen eins und drei) und nach (Zeilen zwei und vier) der Stimulation (Stim) durch Depolarisationsreihen (Zeilen eins und zwei) oder UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA (Zeilen drei und vier). Die Pfeile markieren LDCVs, welche aufgrund der Stimulation mit der PM fusionierten und somit nach der Stimulation nicht mehr erkennbar waren. Stim: Stimulus; Skala: 5 µm.

In den TIRFM-Bildern in Abb. 42 ist erkennbar, dass sich die Anzahl der LDCVs an der PM mit zunehmender Anzahl von Stimulationen nicht deutlich veränderte. Nach Analyse der LDCV-Dichte in TIRFM ergaben sich die in Tab. 1 eingetragenen Werte.

Tab. 1: Anzahl der in TIRFM erkennbaren LDCVs vor und nach Stimulation. Die Werte wurden für jede Zelle auf ihre Basisfläche und die mittlere Basisfläche aller Zellen normalisiert. Angegeben sind Mittelwerte jeder Kondition. Stim: Stimulus, Depol: Depolarisationen, UV-Blitz: UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA. (N=23)

	vor Stim. 1	nach Stim. 1	vor Stim. 2	nach Stim. 2	vor Stim. 3	nach Stim. 3	vor Stim. 4	nach Stim. 4
Depol.	28 ± 2	27 ± 2	29 ± 1	28 ± 1	29 ± 1	29 ± 1	29 ± 1	29 ± 1
UV-Blitz	32 ± 3	32 ± 3	30 ± 3	29 ± 3	29 ± 3	28 ± 3	30 ± 3	30 ± 3

Die Werte in Tab. 1 belegten, dass keine Abnahme der LDCV-Dichte an der PM durch die Stimulationen stattfand. Die durchschnittliche Anzahl an LDCVs pro Zelle blieb über vier Stimulationen konstant; unabhängig von der verwendeten Art der Stimulation. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass eine Abnahme der Sekretion nach mehrmaliger Stimulation durch die Reduktion der Anzahl von LDCVs an der PM verursacht wurde. Des Weiteren zeigte diese Analyse, dass durch Depolarisationsreihen und UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA in dieser Arbeit nicht alle gedockten LDCVs freigesetzt werden konnten.

3.7.3 Sekretion durch Langzeitstimulation mit hoher $[Ca^{2+}]_i$

Bei den zuvor verwendeten Arten der Stimulation konnte nur wenig Sekretion in TIRFM beobachtet werden. Es war anzunehmen, dass die nach den Stimulationen an der PM verbliebenen LDCVs, zumindest teilweise, sezernierbar waren, da es für die Zellen sehr uneffizient wäre, so viele nicht sezernierbare LDCVs herzustellen. Somit eigneten sich diese Techniken nicht, um nicht sezernierbare LDCVs zu identifizieren. Für die folgenden Experimente wurde deshalb ein starker, lang anhaltender Stimulus verwendet, um mehr Sekretion auszulösen und somit die Anzahl von mit TIRFM sichtbaren LDCVs am Ende des Experimentes stark zu reduzieren. Dazu wurden drei verschiedenen Intrazellulärlösungen hergestellt, welche eine freie intrazelluläre $[Ca^{2+}]_i$ von 1, 6 oder 15 μM aufwiesen. Die niedrigste verwendete $[Ca^{2+}]_i$ reicht gerade aus, um Sekretion hervorzurufen, 6 μM $[Ca^{2+}]_i$ wurde als intermediärer Wert gewählt und bei 15 μM $[Ca^{2+}]_i$ fand maximale Sekretion statt (Sørensen et al., 2002; Tian et al., 2005). Bovine Chromaffinzellen wurden mit NPY-mCherry elektroporiert und mit der Patch-Clamp Technik in der Ganzzelleableitung gemessen. Für eine lang anhaltende Stimulation wurden die Zellen mindestens 5 min mit den Lösungen perfundiert. Die Veränderung der Membrankapazität (Abb. 43A) und die Sekretion der LDCVs in TIRFM (Abb. 43B) wurden über die gesamte Dauer des Experimentes aufgezeichnet. In TIRFM sezernierte LDCVs wurden quantifiziert, für jede Zelle auf die Größe ihrer Basisfläche normalisiert und mit der mittleren Größe der Basisfläche aller gemessenen Zellen (für alle drei $[Ca^{2+}]_i$, 53 μm^2) multipliziert.

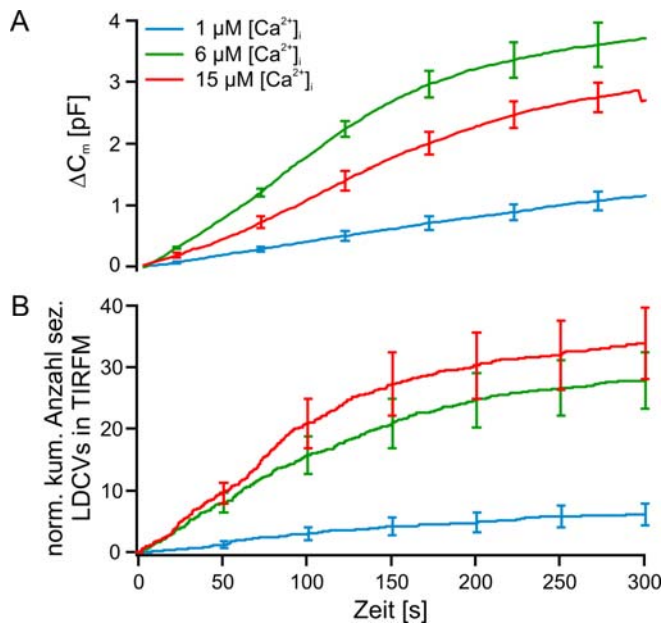


Abb. 43: Veränderung von Membrankapazität und Sekretion in TIRFM bei Stimulation mit hoher $[Ca^{2+}]_i$. (A) Zunahme der Membrankapazität während 5 min Langzeitstimulation mit 1 (blau), 6 (grün) oder 15 (rot) μM $[Ca^{2+}]_i$. Die Werte wurden für jede Kondition gemittelt. (B) Normalisierte, kumulative Sekretion in TIRFM über 5 min Stimulationsdauer. Die Werte sind für jede Zelle auf die Größe ihrer Basisfläche normalisiert und mit der mittleren Basisfläche aller Zellen multipliziert. (N=16 für 1 und 6 μM $[Ca^{2+}]_i$ bzw. 17 für 15 μM $[Ca^{2+}]_i$).

Der gemittelte Verlauf der Membrankapazität in Abb. 43A zeigt, dass mit 1 μM $[Ca^{2+}]_i$ durchschnittlich nur ein Anstieg von $1,15 \pm 0,17$ pF erreicht wurde, während die beiden anderen Lösungen deutlich mehr Sekretion hervorriefen. Wurden die Zellen mit 6 μM $[Ca^{2+}]_i$ perfundiert, so stieg die Membrankapazität über 5 min um $3,71 \pm 0,53$ pF, während die höchste verwendete $[Ca^{2+}]_i$ eine durchschnittliche Vergrößerung der Zellen um $2,70 \pm 0,18$ pF erzeugte. Es fiel auf, dass mit 6 μM $[Ca^{2+}]_i$ in der Patchpipette ein stärkerer Anstieg in der Membrankapazität auftrat als mit 15 μM $[Ca^{2+}]_i$. Dies lässt sich durch eine stärkere Endozytose bei höherer $[Ca^{2+}]_i$ erklären. Vermehrte Exozytose wird von den Zellen mit gehäufte Endozytose kompensiert, was in einer Reduktion der Membrankapazität resultierte (Engisch und Nowicky, 1998). Da die Membrankapazität nur die Gesamtveränderung der Zellgröße wiedergab, konnte zwischen Endo- und Exozytose nicht unterschieden werden.

Am Ende jedes Experimentes wurden die Zellen mit einer Depolarisationsreihe stimuliert um zu überprüfen, ob alle sezernierbaren LDCVs durch die Langzeitstimulation freigesetzt wurden. Nur bei Zellen gemessen mit 1 μM $[Ca^{2+}]_i$ konnte durch die Depolarisationsreihe ein weiterer Anstieg der Membrankapazität verursacht werden (Abb. 44).

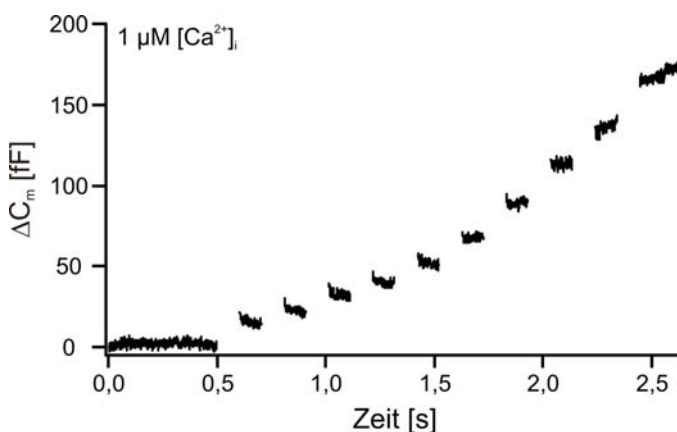


Abb. 44: Veränderung der Membrankapazität als Antwort auf zehn Depolarisationen. Die applizierte Depolarisationsreihe konnte einen Anstieg der Membrankapazität verursachen, nachdem die Zellen zuvor über 5 min mit 1 μM $[Ca^{2+}]_i$ stimuliert wurden. Die Sekretionsantwort aller Zellen wurde gemittelt. (N=16)

Der durchschnittliche Anstieg der Membrankapazität als Antwort auf zehn Depolarisationen (Abb. 44) betrug $173,55 \pm 39,7$ fF. Bei Verwendung höherer $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fand keine Veränderung der Membrankapazität nach Stimulation mit einer Depolarisationsreihe statt (Daten nicht gezeigt). Die niedrigste, eingesetzte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ war somit nicht ausreichend, um innerhalb von 5 min alle sezernierbaren LDCVs freizusetzen.

Die Anzahl der sezernierten LDCVs in TIRFM war bei Stimulation mit $15 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ am höchsten (Abb. 43B). Mit $1 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurden im Durchschnitt $6,1 \pm 1,8$ LDCVs sezerniert, während mit 6 und $15 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ die Freisetzung von $27,8 \pm 4,5$ und $34,2 \pm 5,5$ LDCVs pro Zelle detektiert wurde. Die Sekretion in TIRFM war somit bei Verwendung von $15 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ höher im Vergleich zur Perfusion mit $6 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p=0,328$), so dass die geringere $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ausreichte, um nahezu maximale Sekretion auszulösen.

Um zu überprüfen, ob der zeitliche Verlauf der Sekretion in TIRFM mit der Veränderung der Membrankapazität korrelierte, wurden beide Kurven einer Kondition in einem Graphen dargestellt (Abb. 45). Für einen besseren Vergleich zeigen die Achsen aller drei Graphen dieselbe Skalierung.

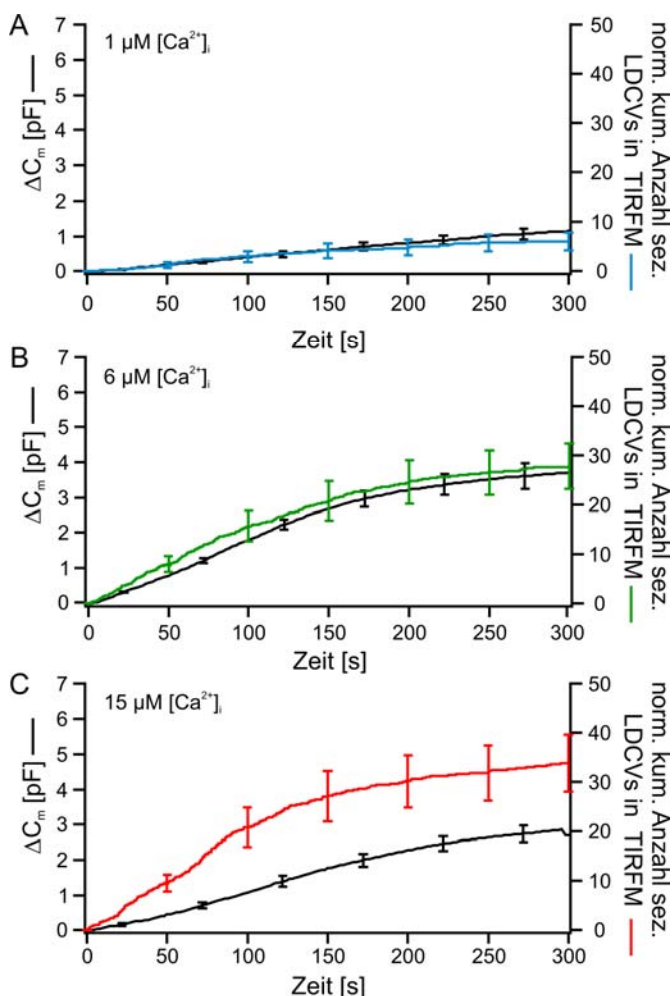


Abb. 45: Veränderung von Membrankapazität und Sekretion in TIRFM für Zellen gemessen mit 1, 6 und $15 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Mit NPY-mCherry transfizierte Zellen wurden für 5 min mit 1 (A), 6 (B) oder $15 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (C) stimuliert. Während der gesamten Stimulationszeit wurden sowohl die Veränderung der Membrankapazität, als auch die Sekretion an der Basisfläche der Zellen mit TIRFM aufgezeichnet. Die farbigen Linien zeigen den normalisierten, kumulativen Verlauf der Sekretion in TIRFM, welcher für jede Zelle auf die Größe ihrer Basisfläche normalisiert und mit der durchschnittlichen Basisfläche aller Zellen multipliziert und gemittelt wurde. Schwarze Linien zeigen die gemittelte Veränderung der Membrankapazität. (N=16 für 1 und $6 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bzw. 17 für $15 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_i$)

Für die geringste verwendete $[Ca^{2+}]_i$ bestand eine Korrelation zwischen Veränderung der Membrankapazität und Sekretion in TIRFM (Abb. 45A), der zeitliche Verlauf der beiden Kurven ist nahezu identisch. Die Membrankapazität stieg linear mit einer Rate von $4,00 \pm 0,01 \text{ fF} \cdot \text{s}^{-1}$, die Sekretion zeigte ebenfalls einen linearen Anstieg wobei die Rate $0,03 \pm 0,001 \text{ LDCVs} \cdot \text{s}^{-1}$ betrug.

Auch für mit $6 \text{ } \mu\text{M}$ $[Ca^{2+}]_i$ gemessene Zellen korrelierten Verlauf von Membrankapazität und Sekretion in TIRFM (Abb. 45B). Die maximale Sekretionsrate betrug $18,91 \pm 3,03 \text{ fF} \cdot \text{s}^{-1}$ und $0,19 \pm 0,04 \text{ LDCVs} \cdot \text{s}^{-1}$. Bei der höchsten eingesetzten $[Ca^{2+}]_i$ war ein deutlicher Unterschied im Verlauf der beiden Kurven zu erkennen (Abb. 45C), es trat wesentlich mehr Sekretion in TIRFM auf verglichen mit der Zunahme der Membrankapazität. Deshalb wurden in diesem Fall keine Raten bestimmt.

Die durchgeführten Experimente zeigten, dass die Zunahme der Membrankapazität bei Messungen mit $1 \text{ } \mu\text{M}$ $[Ca^{2+}]_i$ in der Pipette einen ähnlichen Wert erreichte wie bei Stimulation der Zellen mit Depolarisationsreihen oder UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA. Addiert man die Veränderung der Membrankapazität als Antwort auf die erste bis sechste Stimulation, so wurde mit Depolarisationsreihen insgesamt ein Anstieg von $1,2 \pm 0,2 \text{ pF}$ erreicht, während nach sechs UV-Blitzlichtphotolysen von NP-EGTA eine Zunahme der Membrankapazität von $1,1 \pm 0,3 \text{ pF}$ vorlag. Mit 6 und $15 \text{ } \mu\text{M}$ $[Ca^{2+}]_i$ hingegen war $3,2$ und $2,3$ Mal mehr Exozytose in der Membrankapazität erkennbar. Vergleicht man die Anzahl der sezernierten LDCVs, so war der Wert bereits bei Stimulation mit $1 \text{ } \mu\text{M}$ $[Ca^{2+}]_i$ $3,3$ - und $1,7$ -fach erhöht im Vergleich mit der Summe aller sezernierten LDCVs durch Depolarisationsreihen ($1,9 \pm 0,9$ sezernierte LDCVs pro Zelle) und UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA ($3,7 \pm 1,3$ LDCVs pro Zelle). Damit wurde das Ziel, mit einem lang anhaltenden, starken Stimulus möglichst viel Sekretion von LDCVs in TIRFM hervorzurufen, erreicht. Mit 6 und $15 \text{ } \mu\text{M}$ $[Ca^{2+}]_i$ in der Pipettenlösung schienen außerdem alle sezernierbaren LDCVs freigesetzt zu werden, da nach der applizierten Depolarisationsreihe am Ende des Experimentes keine Veränderung der Membrankapazität auftrat. Um zu überprüfen, ob nach der Langzeitstimulation die Anzahl gedockter LDCVs an der PM reduziert war, wurde die Dichte der Anzahl der LDCVs in TIRFM vor und nach den Experimenten analysiert. In Abb. 46 sind exemplarische Zellen für jede Kondition abgebildet.

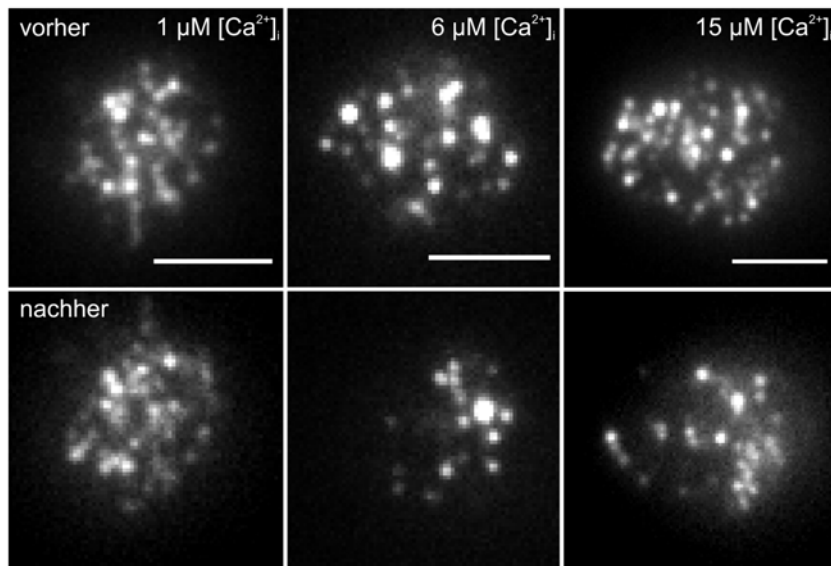


Abb. 46: Veränderung der LDCV-Dichte in TIRFM vor und nach Stimulation mit 1, 6 und 15 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Mit NPY-mCherry transfizierte Zellen wurden über 5 min mit hoher $[\text{Ca}^{2+}]_i$ stimuliert. Die Bilder exemplarischer Zellen wurden zu Beginn und nach der Stimulation mit TIRFM aufgezeichnet. Skala: 5 μm

Wie in Abb. 46 zu erkennen, veränderte sich die Dichte der LDCVs in TIRFM bei Stimulation mit 1 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nicht. Durchschnittlich waren zu Beginn des Experimentes 48 ± 4 LDCVs mit TIRFM visualisierbar, nach 5 min Stimulation befanden sich 44 ± 4 LDCVs in TIRFM an der PM. Im Gegensatz dazu wurde die Dichte der LDCVs durch Perfusion mit 6 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von 44 ± 3 LDCVs um $30 \pm 5\%$ auf 29 ± 7 LDCVs reduziert. Auch mit 15 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fand eine ähnliche Reduktion ($29 \pm 5\%$) von 52 ± 4 auf 37 ± 4 LDCVs an der PM in TIRFM statt. In den nächsten Schritten sollte untersucht werden, ob alle am Ende des Experimentes in TIRFM sichtbaren LDCVs sogenannte „dead-end“ Vesikel darstellten.

3.8 „Dead-end“ Vesikel: Identifikation und Quantität

Da keine Publikationen über „dead-end“ Vesikeln bestehen, musste zunächst ein Kriterium festgelegt werden, um diese identifizieren zu können. Verhage und Sørensen postulierten, dass diese LDCVs nicht funktionell gedockt sind und somit nicht gepreimt werden können, oder zumindest eine geringere Priming-Wahrscheinlichkeit zeigen und deshalb nicht mit der PM fusionieren (Verhage und Sørensen, 2008). „Dead-end“ Vesikel könnten somit einen eigenen LDCV-Pool an der PM darstellen. Somit müssten „dead-end“ Vesikel, wenn überhaupt, eine sehr langsame Undocking-Rate zeigen, und kein schnelles Docking und Undocking vorliegen, da bei letzterem kein identifizierbarer Pool entstehen könnte. Auf die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente bezogen bedeutete dies, dass „dead-end“ Vesikel während der gesamten Stimulationszeit, also in den TIRFM Filmen vom ersten bis zum letzten Bild, an der PM sichtbar sein mussten, da ihre Undocking-Rate gegen Null tendiert. Nach den ersten verwendeten Arten der Stimulation (Depolarisation und UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA) fand nur sehr wenig Sekretion statt (Abb. 34 und 38).

Dagegen zeigten Langzeitstimulationen, dass deutlich mehr LDCVs pro Zelle freisetzbar waren (Abb. 43B und 45). Aus diesem Grund wurden für die Analyse der „dead-end“ Vesikel nur Zellen verwendet, welche mit einer $[Ca^{2+}]_i$ von 6 oder 15 μM über die Pipette perfundiert wurden. Zellen gemessen mit 1 μM $[Ca^{2+}]_i$ konnten nicht berücksichtigt werden, da durch die Depolarisationsreihe am Ende der Langzeitstimulation ein weiterer Anstieg der Membrankapazität vorlag. Diese $[Ca^{2+}]_i$ reichte demnach nicht aus, um alle sezernierbaren LDCVs freizusetzen. Eine Analyse der nicht freisetzbaren LDCVs in diesen Zellen wäre verfälscht.

Zur Quantifizierung von „dead-end“ Vesikeln wurden die TIRFM-Aufnahmen erneut analysiert, ausgehend vom letzten Bild. Alle LDCVs, welche dort sichtbar waren, wurden durch den fünfminütigen Film per Auge zurück verfolgt, bis der Zeitpunkt ihres Auftauchens bzw. das erste Bild des Filmes erreicht war. Waren sie im ersten Bild des Filmes schon zu sehen, mussten es nicht sezernierbare LDCVs sein, erreichten sie die PM während des Filmes, wurden sie als Neuankömmlinge bezeichnet. Es war wichtig, zwischen diesen beiden Gruppen zu unterscheiden, da die Neuankömmlinge theoretisch sezernierbar waren, aber möglicherweise erst nach länger andauernder Stimulation, welche über die 5 min Gesamtdauer hinaus ginge.

Um einen Prozentsatz von „dead-end“ Vesikeln zu errechnen, wurde die Dichte der LDCVs zu Beginn des Filmes bestimmt. Zusätzlich wurde analysiert, wie viele LDCVs im letzten Bild des Filmes, nach 5 min Stimulation, noch an der PM zu sehen waren und wie viele LDCVs während der Langzeitstimulation insgesamt sezerniert wurden. Alle Werte wurden für jede Zelle auf die Größe ihrer Basisfläche und die mittlere Basisfläche aller Zellen der Experimentenreihe ($53 \mu m^2$) normalisiert. Die Ergebnisse einer Kondition wurden gemittelt und in Abb. 47 und Tab. 2 dargestellt.

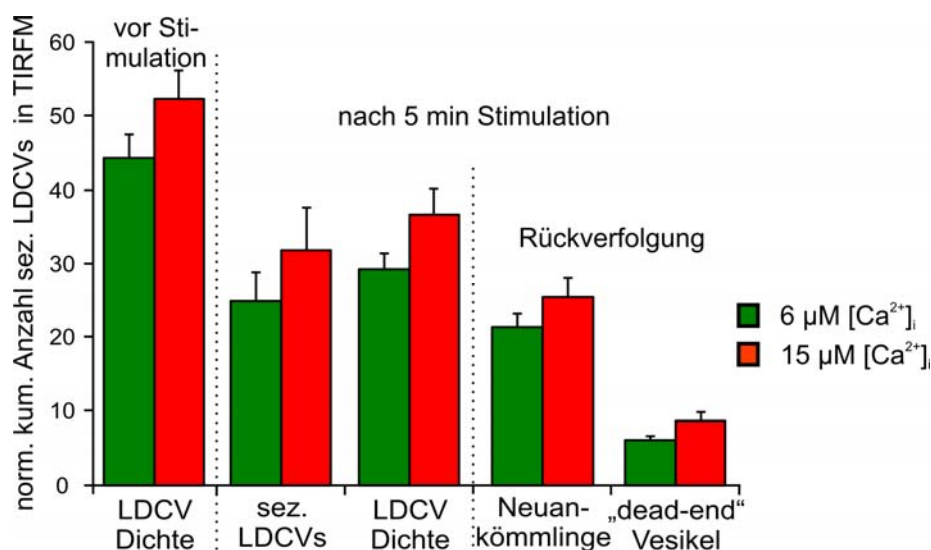


Abb. 47: Anzahl der LDCVs in verschiedenen Kategorien. In TIRFM-Filmen von Zellen perfundiert mit 6 (grün) oder 15 μM $[Ca^{2+}]_i$ (rot) wurden die Anzahl der LDCVs für

verschiedene Kategorien analysiert. Gezeigt sind die Dichte der LDCVs vor der Stimulation, die Anzahl sezernierter LDCVs und die Anzahl der LDCVs an der PM nach der Stimulation. LDCVs, welche am Ende der fünfminütigen Stimulation an der PM zu sehen waren wurden entweder in Neuankömmlinge (wenn sie zu Beginn des Experimentes nicht in TIRFM zu sehen waren) oder „dead-end“ Vesikel (wenn sie am Anfang des Filmes sichtbar waren) eingeteilt. Die Anzahl der LDCVs in den verschiedenen Kategorien wurde für jede Zelle auf die Größe ihrer Basisfläche normalisiert, mit der durchschnittlichen Basisfläche aller Zellen multipliziert und gemittelt. (N=16 für 6 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$; N=17 für 15 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$)

Abb. 47 zeigt keinen Unterschied zwischen beiden Konditionen in der Anzahl der LDCVs in unterschiedlichen Kategorien. Für den besseren Vergleich sind die Zahlenwerte aus Abb. 47 in Tab. 2 eingetragen.

Tab. 2: Anzahl der LDCVs in verschiedenen Kategorien. Beschreibung siehe Abb. 47.

$[\text{Ca}^{2+}]_i [\mu\text{M}]$	LDCVs vor Stimulation	sezernierte LDCVs	LDCVs nach Stimulation	Neuankömmlinge	„dead-end“ Vesikel
6	$44,4 \pm 3,1$	$24,8 \pm 4,0$	$29,3 \pm 2,1$	$21,3 \pm 1,8$	$6,1 \pm 0,6$
15	$52,2 \pm 3,9$	$31,8 \pm 5,9$	$36,6 \pm 3,5$	$25,3 \pm 2,7$	$8,7 \pm 1,2$

Aus den erhaltenen Werten (Tab. 2) lies sich berechnen, dass $14,2 \pm 1,5\%$ bzw. $16,8 \pm 2,1\%$ aller LDCVs in Zellen, welche mit 6 bzw. 15 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ perfundiert wurden, „dead-end“ Vesikel darstellten. Dieser Prozentsatz ist jeweils auf die Dichte der LDCVs in TIRFM vor der Stimulation bezogen. Die „dead-end“ Vesikel waren nicht freisetzbar und die von ihnen besetzten Docking-Stellen an der PM wurden somit für andere, funktionelle LDCVs blockiert.

3.9 Molekularer Mechanismus des „dead-end“ Dockings

Nachdem eine Methode zur Identifizierung von „dead-end“ Vesikeln gefunden wurde, sollte der Entstehungs-Mechanismus dieser LDCVs genauer untersucht werden. Eine Theorie dazu befasste sich mit dem Auswaschen zytosolischer Faktoren über die Patchpipette, wodurch Primingfaktoren in der Zelle in limitierter Menge vorlagen. Funktionell an der PM gedockte LDCVs konnten somit den Priming-Schritt nicht durchlaufen und waren nicht fusionskompetent. Ein Auswaschen zytosolischer Faktoren war bei dem lediglich fünfminütigen Experimenten eher unwahrscheinlich, sollte aber trotzdem überprüft werden. Dazu wurde die Verweildauer sezernierter LDCVs in TIRFM analysiert. Ein aufkommender Mangel von Primingfaktoren müsste sich durch eine Verlängerung der Aufenthaltszeiten von LDCVs an der PM mit anhaltender Dauer der Experimente zeigen, da zu Beginn noch ausreichend Primingfaktoren vorhanden waren. In Abb. 48 sind Kymogramme je einer exemplarischen Zelle gemessen mit 6 oder 15 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gezeigt.

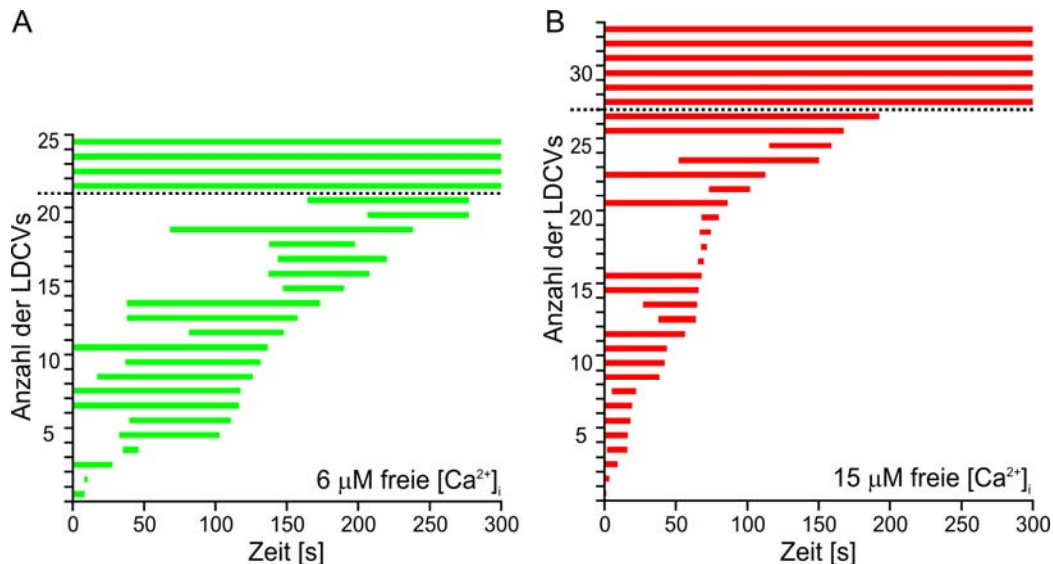


Abb. 48: Kymogramme exemplarischer Zellen perfundiert mit 6 oder 15 µM freier $[Ca^{2+}]_i$. Die Zellen wurden mit 6 (A) oder 15 µM $[Ca^{2+}]_i$ (B) stimuliert. Die Aufenthaltsdauer sezernierter LDCVs an der PM in TIRFM wurde analysiert und für eine exemplarische Zelle als Kymogramm dargestellt. Jeder Balken steht für ein LDCV und die Zeitspanne, welche es bis zur Sekretion an der PM verbracht hat. Da „dead-end“ Vesikel über die gesamte Dauer der Stimulation an der PM erkennbar waren, sind sie als durchgehender Balken dargestellt.

Wie in den Kymogrammen in Abb. 48 erkennbar veränderte sich die Aufenthaltsdauer von LDCVs in TIRFM während der Experimente nicht. Es lag keine Verlängerung der Verweildauern mit steigender Dauer der Experimente vor. „Dead-end“ Vesikel haben demnach keinen Priming-Defekt, was eine molekulare Ursache beim Docking vermuten lässt.

3.10 Expression von Munc18-2

Aus der Literatur war bekannt, dass 2:1 Komplexe aus Syntaxin-1 und SNAP-25 *in vitro* entstehen können (Fasshauer et al., 1997; Xiao et al., 2001; Zilly et al., 2006). Dockt ein LDCV an diesen unproduktiven Komplex, so war vorstellbar, dass es als „dead-end“ Vesikel endete. Ein Interaktionspartner von Syntaxin-1 ist Munc18-1, welches als Chaperon dafür sorgt, dass Syntaxin die PM erreicht und dort mit SNAP-25 einen funktionellen Akzeptor SNARE-Komplex bildet (Gulyás-Kovács et al., 2007; de Wit et al., 2009). Dabei wurde für Munc18 eine stabilisierende Wirkung auf den funktionellen 1:1 Syntaxin-SNAP-25 Komplex gezeigt (Weninger et al., 2008; de Wit et al., 2009). Um zu untersuchen, ob Munc18 durch diese Stabilisierung einen Einfluss auf die Anzahl nicht sezernierbarer LDCVs hat, wurde dieses Protein in den Zellen exprimiert. Dafür kam die Isoform Munc18-2 zum Einsatz, da dieses Protein nicht, wie Munc18-1, in den Priming-Schritt involviert ist und durch die Expression somit nur Veränderungen im Docking verursacht wurden (Gulyás-Kovács et al., 2007).

Bovine Chromaffinzellen wurden mit NPY-mCherry elektroporiert. Kontrollzellen exprimierten aufgrund einer Transfektion mit einem Semliki-Forest-Virus zusätzlich GFP. Für die Expression von Munc18-2-mTFP kam eine Doppel-Elektroporation zum Einsatz. Munc18-2-mTFP exprimierende Zellen konnten anhand ihrer grünen Fluoreszenz bei Anregung mit einer Wellenlänge von 450 nm identifiziert werden. Die Zellen wurden mit $6 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ perfundiert, da diese Lösung nahezu maximale Sekretion hervorrufen konnte (siehe Abb. 43A), jedoch im Vergleich zu höherer $[\text{Ca}^{2+}]_i$ keine beträchtliche Endozytose zeigte. Wie zuvor wurden die Zellen 5 min mit der Pipettenlösung perfundiert. Während dieser Zeit fand die Aufzeichnung der Membrankapazität und der mit NPY-mCherry markierten LDCVs in TIRFM statt.

3.10.1 Analyse der Sekretion bei Expression von Munc18-2

Die Auswertung von Membrankapazitätsmessung und Sekretion in TIRFM sollte aufzeigen, ob eine Veränderung der Sekretion durch Expression von Munc18-2 hervorgerufen wurde (Abb. 49). Die kumulative Anzahl sezernierter LDCVs wurde für jede Zelle auf ihre Basisfläche normalisiert, mit der mittleren Basisfläche aller Zellen ($49 \mu\text{m}^2$) multipliziert und gemittelt.

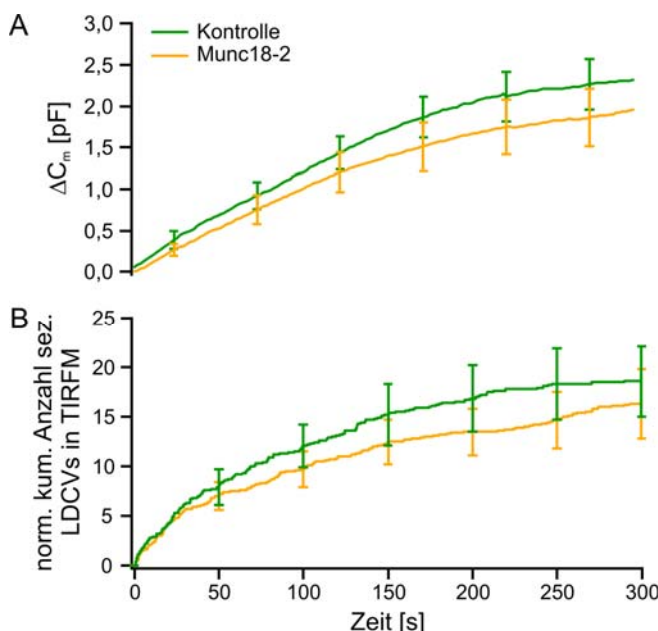


Abb. 49: Veränderung von Membrankapazität und Sekretion in TIRFM während 5 min Stimulation mit $6 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Alle Zellen wurden mit NPY-mCherry elektroporiert und exprimierten zusätzlich entweder GFP (Kontrollzellen, grün), oder Munc18-2 (orange) A) Durchschnittliche Veränderung der Membrankapazität aller Zellen, normalisiert auf ihre Anfangsgröße. B) In TIRFM detektierte Sekretion für beide Konditionen. Die Werte wurden für jede Zelle auf die Größe ihrer Basisfläche in TIRFM normalisiert sowie mit der durchschnittlichen Basisfläche aller Zellen multipliziert. Gezeigt sind gemittelte Werte. (N=13)

In Kontrollzellen stieg die Membrankapazität im Mittel um $2,3 \pm 0,3$ pF und es wurden $18,6 \pm 3,6$ LDCVs in TIRFM sezerniert (Abb. 49). Wurde Munc18-2 in den Zellen exprimiert, so lag eine Zunahme der Membrankapazität um $2,0 \pm 0,4$ pF vor und es konnten $16,3 \pm 3,5$ sezernierte LDCVs in TIRFM detektiert werden. Zwischen beiden Konditionen lag kein Unterschied in der Sekretion vor.

Um die Zeitkonstanten der Sekretion einer Kondition besser vergleichen zu können wurden die Membrankapazität und Sekretion in TIRFM gemeinsam in einem Graph dargestellt (Abb. 50).

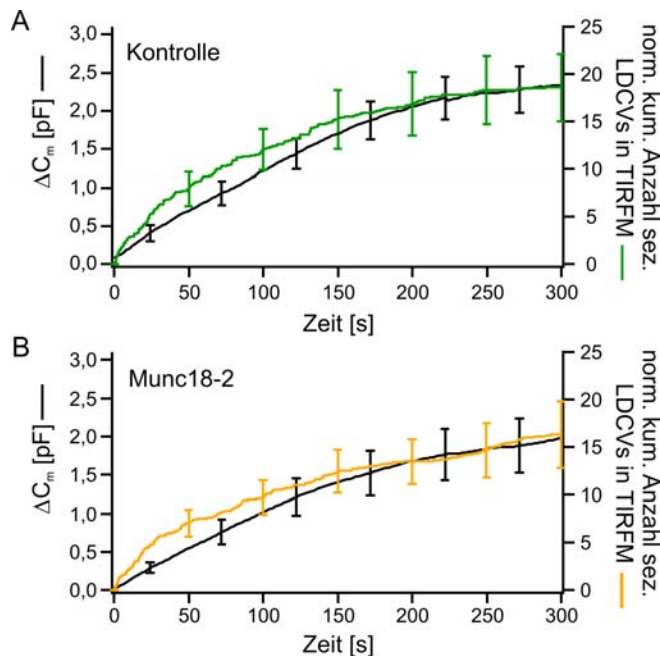


Abb. 50: Veränderung von Membrankapazität und Sekretion in TIRFM für Zellen perfundiert mit 6 μM $[\text{Ca}^{2+}]$. Alle Zellen exprimierten NPY-mCherry und zusätzlich GFP (A) oder Munc18-2 (B). Während 5 min Perfusion mit 6 μM $[\text{Ca}^{2+}]$ wurden sowohl Membrankapazität als auch die LDCVs an der PM in TIRFM aufgezeichnet. Die Membrankapazität wurde gemittelt (schwarze Linien). Die farbigen Linien zeigen den normalisierten, kumulativen Verlauf der Sekretion in TIRFM, für jede Zelle auf die Größe ihre Basisfläche normalisiert und mit der mittleren Basisfläche aller Zellen multipliziert und gemittelt. (N=13)

Aus der jeweiligen Steigung der Kurven in Abb. 50 konnten die maximalen Sekretionsraten berechnet werden. In Kontrollzellen lagen diese bei $10,73 \pm 1,57 \text{ fF} \cdot \text{s}^{-1}$ und $0,21 \pm 0,04 \text{ LDCVs} \cdot \text{s}^{-1}$. Die maximalen Sekretionsraten nach Expression von Munc18-2 waren $10,45 \pm 2,14 \text{ fF} \cdot \text{s}^{-1}$ und $0,15 \pm 0,04 \text{ LDCVs} \cdot \text{s}^{-1}$. Somit lag kein Unterschied in den Sekretionsraten von Kontrollzellen und Munc18-2 exprimierenden Zellen vor. Anhand der bisherigen Ergebnisse war demnach auszuschließen, dass die Expression von Munc18-2 einen Einfluss auf die Anzahl sezernierter LDCVs hatte.

3.10.2 Quantität der „dead-end“ Vesikel

Um zu untersuchen, ob Munc18 einen Einfluss auf die Anzahl der „dead-end“ Vesikel hatte, wurden die TIRFM Filme wie unter 3.8 beschrieben analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 51 dargestellt.

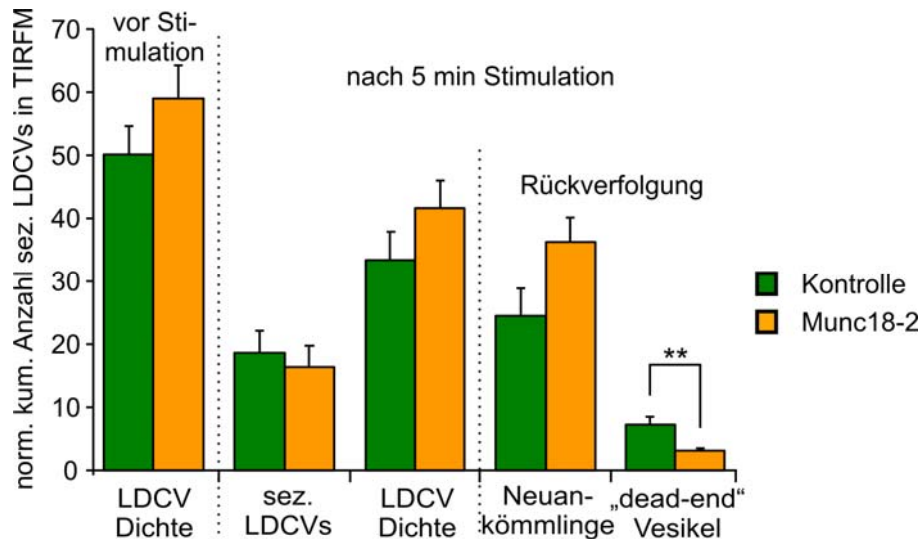


Abb. 51: Anzahl der LDCVs in verschiedenen Kategorien nach Expression von Munc18-2. In Chromaffinzellen wurde NPY-mCherry und zusätzlich GFP (Kontrolle, grün) oder Munc18-2 (orange) exprimiert. In den während der Perfusion mit 6 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aufgezeichneten TIRFM-Filmen wurde die Anzahl der LDCVs für verschiedene Kategorien analysiert. Gezeigt sind die Dichte der LDCVs vor der Stimulation, die Anzahl sezernierter LDCVs und die Anzahl der LDCVs an der PM nach der Stimulation. LDCVs, die am Ende der fünfminütigen Stimulation noch an der PM zu sehen waren wurden entweder in Neuankömmlinge (wenn sie während des Experimentes in TIRFM erschienen) oder „dead-end“ Vesikel (wenn sie schon am Anfang des Filmes sichtbar waren) eingeteilt. Die Anzahl der LDCVs in den verschiedenen Kategorien wurde für jede Zelle auf die Größe ihrer Basisfläche normalisiert, mit der durchschnittlichen Basisfläche aller Zellen multipliziert und gemittelt. (N=13; ** p=0,005)

Abb. 51 zeigte eine deutliche Reduktion der Anzahl von „dead-end“ Vesikeln in Munc18-2 exprimierenden Zellen. Zum besseren Vergleich sind die Werte aus Abb. 51 in Tab. 3 eingetragen.

Tab. 3: Anzahl der LDCVs in verschiedenen Kategorien nach Expression von Munc18-2. Beschreibung siehe Abb. 51.

	LDCVs vor Stimulation	sezernierte LDCVs	LDCVs nach Stimulation	Neuankömmlinge	„dead-end“ Vesikel
Kontrolle	50,1 ± 4,5	18,6 ± 3,6	33,3 ± 4,5	34,5 ± 4,3	7,1 ± 1,3
Munc18-2	59,0 ± 5,2	16,3 ± 3,4	41,7 ± 4,3	36,3 ± 3,9	3,1 ± 1,3

Aus den Werten in Tab. 3 wurde der Anteil nicht sezernierbarer LDCVs berechnet, welcher in Kontrollzellen bei $14,4 \pm 2,7\%$ lag, bezogen auf die Dichte der LDCVs zu Beginn des Experimentes. Wurde Munc18-2 in den Zellen exprimiert, so fiel der Anteil von „dead-end“ Vesikeln auf $5,4 \pm 0,6\%$. Der Unterschied ist hoch signifikant ($p < 0,001$). Die Anzahl von Neuankömmlingen in Munc18-2-mTFP exprimierenden Zellen war leicht, jedoch nicht signifikant erhöht. Die Anzahl der LDCVs zu Beginn des Experimentes und nach 5 min Stimulation zeigten keinen Unterschied zwischen beiden Konditionen.

Die Expression von Munc18-2 führte zu einer Reduktion der Anzahl von „dead-end“ Vesikeln um 2/3 verglichen mit Kontrollzellen. Dies bekräftigte die Theorie, dass diese LDCVs durch Docking an dem 2:1 Syntaxin-SNAP-25 Akzeptor-Komplex entstehen. Munc18 scheint den produktiven 1:1 SNARE Akzeptor-Komplex zu stabilisieren, so dass weniger „dead-end“ Docking Komplexe entstanden.

3.11 Expression von Stx1A L165A/E166A

Nachdem die Expression von Munc18-2 zu einer Abnahme der Anzahl nicht sezernierbarer LDCVs führte, sollten weitere, möglicherweise in den Prozess des „dead-end“ Dockings involvierte Proteine überexprimiert werden. Wichtig war dies außerdem, da Munc18 mehrere, verschiedene Funktionen im Prozess des Dockings hat (siehe 1.4.2). Somit musste überprüft werden, dass die Abnahme der Anzahl nicht sezernierbarer LDCVs ausschließlich auf die Stabilisierung des 1:1 Akzeptor SNARE-Komplexes zurück zu führen war. Im Gegensatz zu Munc18 spielt Syntaxin eine direkte Rolle bei der postulierten Entstehung des unproduktiven 2:1 Syntaxin-SNAP-25 Komplexes. Die Überexpression dieses Proteins sollte durch das gesteigerte Verhältnis von Syntaxin zu SNAP-25 zu einer erhöhten Entstehungsrate von „dead-end“ Docking Komplexen führen. Die Überexpression von Syntaxin in bovinen Chromaffinzellen war jedoch problematisch, da Munc18 benötigt wird, um Syntaxin vom Golgi-Apparat zur PM zu transportieren. Somit wird Munc18 bei Überexpression von Syntaxin zu einem limitierenden Faktor und der größte Anteil des überexprimierten Syntaxins verbleibt im Golgi-Apparat (Rowe et al., 1999). Aus diesem Grund wurde nicht Syntaxin-1, sondern eine mutierte Form dieses Proteins für die Expression eingesetzt (Syntaxin1A L165A/E166A). Durch die eingeführten Mutationen liegt Syntaxin in der Zelle in der geöffneten Konformation vor (deshalb auch „open“ Syntaxin genannt) und kann unabhängig von Munc18 zur PM transportiert werden (Dulubova et al., 1999).

3.11.1 Analyse der Sekretion bei Expression von Stx1A L165A/E166A

Wie zuvor wurden die Zellen durch Elektroporation mit NPY-mCherry transfiziert, um markierte LDCVs mit TIRFM beobachten zu können. Für Kontrollzellen erfolgte die Transfektion mit einem SFV, welches für GFP kodierte. Auch zur Expression von Stx1A L165A/E166A kam ein SFV zum Einsatz. Die Zellen wurden mit 6 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ für mindestens 5 min stimuliert und während dieser Zeit sowohl Membrankapazität als auch die markierten LDCVs in TIRFM aufgenommen. Die Membrankapazität wurde für jede Zelle auf ihre Anfangsgröße normalisiert. Mit der kumulativen Anzahl sezernierter LDCVs fand eine Normalisierung auf die Größe der Basisfläche jeder Zelle in TIRFM statt. Anschließend

wurden die Werte mit der durchschnittlichen Größe der Basisfläche aller gemessenen Zellen ($79 \mu\text{m}^2$) multipliziert und gemittelt. Abb. 52 zeigt die Veränderung der Membrankapazität und die kumulative Sekretion in TIRFM während der Stimulation.

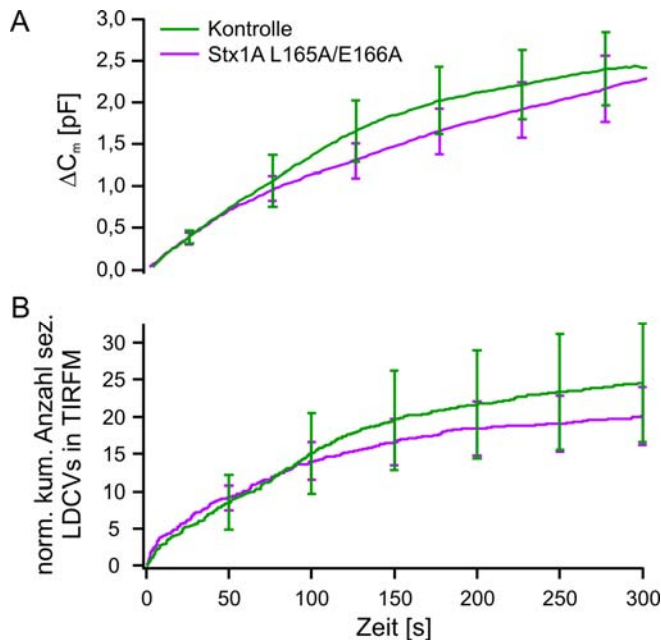


Abb. 52: Veränderung von Membrankapazität und Sekretion in TIRFM während 5 min Stimulation mit $6 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Alle Chromaffinzellen wurden mit NPY-mCherry und zusätzlich entweder mit GFP (Kontrollzellen, grün), oder Stx1A L165A/E166A (lila) transfiziert. A) Durchschnittliche Veränderung der Membrankapazität aller Zellen, normalisiert auf ihre Anfangsgröße. B) Kumulative Sekretion in TIRFM für beide Konditionen. Die Werte wurden für jede Zelle auf die Größe ihrer Basisfläche in TIRFM normalisiert, mit der durchschnittlichen Basisfläche aller Zellen multipliziert und gemittelt (Kontrolle: $N=14$; Stx1A L165A/E166A $N=15$)

In Abb. 52 ist zu erkennen, dass keine signifikante Veränderung der Sekretion nach Expression von Stx1A L165A/E166A vorlag, weder in der Membrankapazität (Abb. 52A), noch in der Anzahl sezernierter LDCVs in TIRFM (Abb. 52B). Nach 5 min Stimulation mit $6 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ war die Membrankapazität in Kontrollzellen im Durchschnitt um $2,4 \pm 0,3$ pF gestiegen. In dieser Zeit konnte die Sekretion von durchschnittlich $24,3 \pm 7,9$ LDCVs in TIRFM beobachtet werden. Nach Expression von Stx1A L165A/E166A stieg die Membrankapazität um $2,3 \pm 0,2$ pF und $19,8 \pm 3,8$ LDCVs fusionierten in TIRFM. Zum besseren Vergleich des zeitlichen Verlaufs von Membrankapazität und TIRFM wurden beide Kurven für jede Kondition zusammen in einem Graphen dargestellt (Abb. 53).

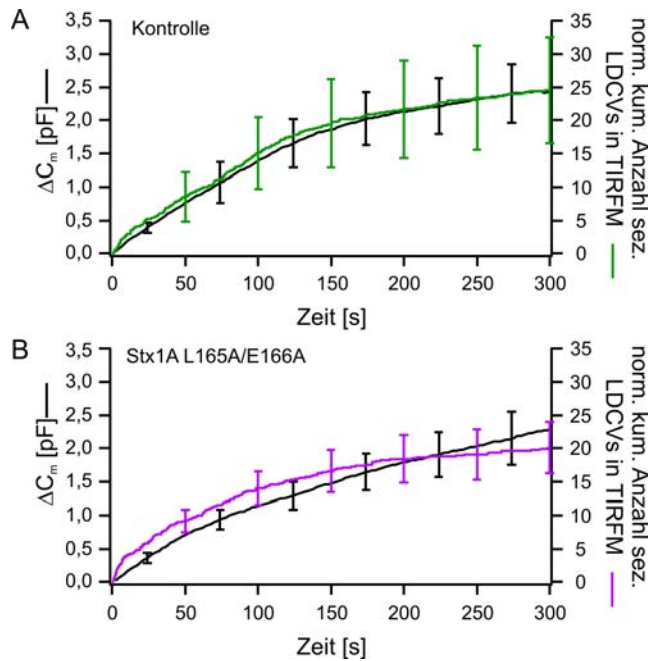


Abb. 53: Veränderung von Membrankapazität und Sekretion in TIRFM für Zellen perfundiert mit $6 \mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$. Alle Zellen wurden mit NPY-mCherry und zusätzlich entweder mit GFP (A, Kontrollzellen) oder Stx1A L165A/E166A (B) transfiziert. Die Membrankapazität wurde für jede Zelle auf ihre Anfangsgröße normalisiert und gemittelt. Die kumulative Anzahl sezernierter LDCVs in TIRFM wurde für jede Zelle auf die Größe ihrer Basisfläche normalisiert, mit der mittleren Basisfläche aller Zellen multipliziert und gemittelt (Kontrolle: $N=14$; Stx1A L165A/E166A $N=15$)

Wie in Abb. 53 zu erkennen korrelierte der zeitliche Verlauf von Sekretion in TIRFM und Membrankapazität für beide Konditionen. Anhand der Steigung der Kurven wurden die maximalen Sekretionsraten errechnet. Unter Kontrollbedingungen lag die maximale Sekretionsrate für die Membrankapazität bei $13,73 \pm 1,59 \text{ fF} \cdot \text{s}^{-1}$ und in TIRFM wurden $0,16 \pm 0,06 \text{ LDCVs} \cdot \text{s}^{-1}$ sezerniert. Nach Expression von Stx1A L165A/E166A entstanden nur geringe Veränderungen dieser Werte. Die Membrankapazität nahm maximal mit $10,90 \pm 1,59 \text{ fF} \cdot \text{s}^{-1}$ zu, während die Sekretion in TIRFM mit $0,17 \pm 0,03 \text{ LDCVs} \cdot \text{s}^{-1}$ statt fand. Somit lag keine Modifikation der Sekretionskinetiken nach Expression von Stx1A L165A/E166A vor.

3.11.2 Quantität der „dead-end“ Vesikel

Wieder wurde die unter 3.8 beschriebene Analyse zur Quantifizierung der „dead-end“ Vesikel durchgeführt. Die Ergebnisse sind in einem Diagramm dargestellt (Abb. 54).

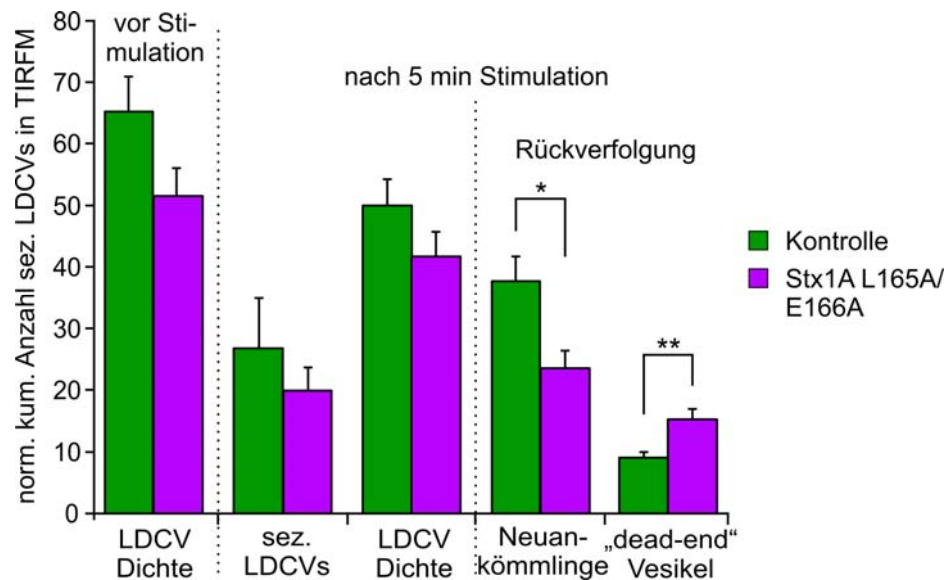


Abb. 54: Anzahl der LDCVs in verschiedenen Kategorien nach Expression von Stx1A L165A/E166A. In Chromaffinzellen wurden NPY-mCherry und zusätzlich GFP (Kontrolle, grün) oder Stx1A L165A/E166A (lila) exprimiert. In den während der Perfusion mit 6 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aufgezeichneten TIRFM-Filmen wurde die Anzahl der LDCVs für verschiedene Kategorien analysiert. Gezeigt sind die Dichte der LDCVs vor der Stimulation, die Anzahl sezernierter LDCVs und die Anzahl der LDCVs an der PM nach der Stimulation. LDCVs, die am Ende der fünfminütigen Stimulation noch an der PM zu sehen waren wurden entweder in Neuankömmlinge (wenn sie während des Experimentes in TIRFM erschienen) oder „dead-end“ Vesikel (wenn sie schon am Anfang des Filmes sichtbar waren) eingeteilt. Die Anzahl der LDCVs in den verschiedenen Kategorien wurde für jede Zelle auf die Größe ihrer Basisfläche normalisiert, mit der durchschnittlichen Basisfläche aller Zellen multipliziert und gemittelt. (Kontrolle: N=14; Stx1A L165A/E166A: N=15, * p=0,024; ** p=0,002)

Wie in Abb. 54 zu sehen lag in Stx1A L165A/E166A exprimierenden Zellen eine signifikante Zunahme der Anzahl von „dead-end“ Vesikeln vor. Zum besseren Vergleich sind die Werte aus Abb. 54 in Tab. 4 eingetragen.

Tab. 4: Anzahl der LDCVs in verschiedenen Kategorien nach Expression von Stx1A L165A/E166A. Beschreibung siehe Abb. 54.

	LDCVs vor Stimulation	sezernierte LDCVs	LDCVs nach Stimulation	Neuankömmlinge	„dead-end“ Vesikel
Kontrolle	63,4 ± 6,1	24,3 ± 7,9	46,6 ± 4,0	34,4 ± 3,7	9,0 ± 1,0
Stx1A L165A/E166A	51,5 ± 5,2	19,9 ± 3,8	41,7 ± 4,0	23,5 ± 2,8	15,2 ± 1,7

Die Expression von Stx1A L165A/E166A führte zu einer signifikanten Veränderung des Anteiles von „dead-end“ Vesikeln von $15,0 \pm 1,0\%$ in Kontrollzellen auf $30,0 \pm 2,0\%$

($p < 0,001$). Zusätzlich lag nach Expression von Stx1A L165A/E166A eine signifikante Abnahme der Anzahl von Neuankömmlingen vor ($p = 0,024$). Die Anzahl der LDCVs zu Beginn des Experimentes war leicht, jedoch nicht signifikant reduziert. Die Dichte der LDCVs nach 5 min Stimulation sowie die Anzahl sezernierter LDCVs zeigten keinen Unterschied zwischen beiden Konditionen.

Die beobachtete Zunahme der Anzahl von nicht sezernierbaren LDCVs in Stx1A L165A/E166A exprimierenden Zellen war ein weiterer Hinweis darauf, dass diese LDCVs durch Verankerung an den unproduktiven 2:1 Akzeptor-Komplex entstehen. Das für diesen Prozess mit Syntaxin interagierende Protein ist SNAP-25, weshalb dieses Protein ebenfalls überexprimiert wurde.

3.12 Überexpression von SNAP-25

Die Überexpression von SNAP-25 sollte einen weiteren Hinweis auf den molekularen Mechanismus des „dead-end“ Dockings geben. Wenn der nicht funktionelle 2:1 SNARE Akzeptor-Komplex zur Entstehung von nicht sezernierbaren LDCVs führte, so wäre durch die Überexpression von SNAP-25 ein ausgewogeneres Verhältnis von Syntaxin und SNAP-25 an der PM zu erwarten. Dies sollte eine Abnahme der Anzahl von „dead-end“ Vesikeln zur Folge haben.

3.12.1 Analyse der Sekretion bei Überexpression von SNAP-25

Die verwendeten Zellen exprimierten zur Markierung der LDCVs alle NPY-mCherry. Zur Überexpression von SNAP-25 wurden die Zellen zusätzlich mit einem SFV transfiziert, welches für die SNAP25-DNA kodierte. Kontrollzellen wurden ebenfalls mit einem SFV infiziert, so dass sie GFP exprimierten. Wie zuvor wurden die Zellen zur Stimulation mit $6 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ für mindestens 5 min perfundiert und während dieser Zeit sowohl Membrankapazität als auch die markierten LDCVs in TIRFM aufgenommen. Die Membrankapazität wurde für jede Zelle auf ihren Anfangswert normalisiert. Die kumulative Anzahl sezernierter LDCVs in TIRFM wurde für jede Zelle mit der Größe ihrer Basisfläche in TIRFM normalisiert und mit der durchschnittlichen Größe der Basisfläche aller Zellen multipliziert ($78 \mu\text{m}^2$). Abb. 55 zeigt die Veränderung der Membrankapazität und die kumulative Sekretion in TIRFM während der Stimulation.

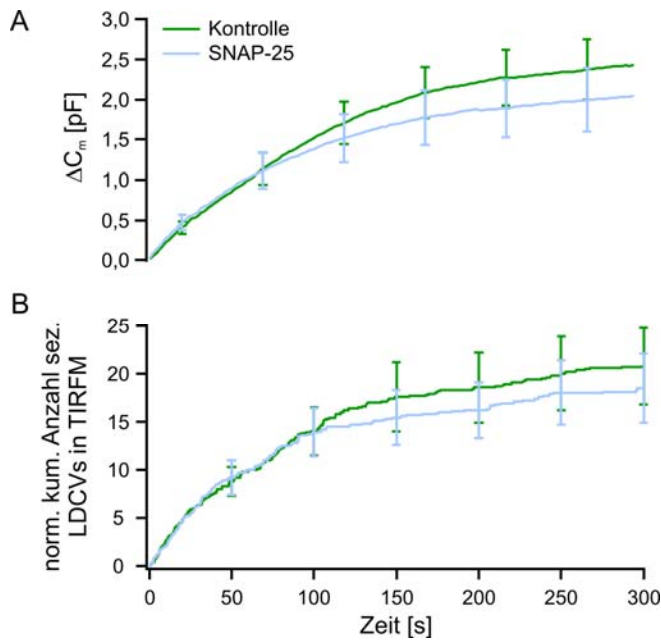


Abb. 55: Veränderung von Membrankapazität und Sekretion in TIRFM während 5 min Stimulation mit 6 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Alle Zellen wurden mit NPY-mCherry und zusätzlich entweder mit GFP (Kontrollzellen, grün), oder SNAP-25 (hellblau) transfiziert. A) Durchschnittliche Veränderung der Membrankapazität aller Zellen, normalisiert auf ihre Anfangsgröße. B) In TIRFM detektierte Sekretion für beide Konditionen. Die Werte wurden für jede Zelle auf die Größe ihrer Basisfläche in TIRFM normalisiert sowie mit der durchschnittlichen Basisfläche aller Zellen multipliziert. Gezeigt sind gemittelte Werte. (Kontrolle: N=13; SNAP-25: N=14)

In Abb. 55 ist keine Veränderung der Sekretion nach Überexpression von SNAP-25 zu erkennen. Sowohl die Membrankapazität (Abb. 55A) als auch die Anzahl sezernierter LDCVs in TIRFM (Abb. 55B) zeigten keinen Unterschied zwischen beiden Konditionen. Unter Kontrollbedingungen fand über 5 min Stimulation ein Anstieg der Membrankapazität um $2,4 \pm 0,4$ pF statt und $20,8 \pm 4,0$ LDCVs fusionierten mit der PM in TIRFM. Bei Überexpression von SNAP-25 änderten sich die Werte kaum. Die Membrankapazität nahm um $2,1 \pm 0,4$ pF zu und $18,5 \pm 3,6$ Sekretionsevents konnten mit TIRFM beobachtet werden. Zum besseren Vergleich des zeitlichen Verlaufs von Membrankapazität und TIRFM wurden beide Kurven einer Kondition in einem Graphen dargestellt (Abb. 56).

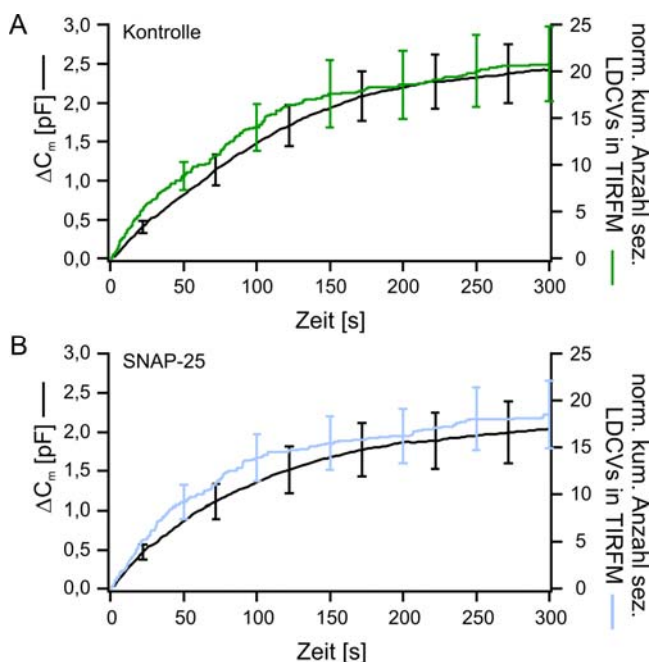


Abb. 56: Veränderung von Membrankapazität und Sekretion in TIRFM für Zellen perfundiert mit 6 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Alle Zellen wurden mit NPY-mCherry und zusätzlich entweder mit GFP (A, Kontrollzellen) oder SNAP-25 (B) transfiziert. Die Membrankapazität wurde für jede Zelle auf ihre Anfangsgröße normalisiert und gemittelt. Die kumulative Anzahl sezernierter LDCVs in TIRFM wurde auf die Größe der Basisfläche jeder Zelle normalisiert, mit der mittleren Basisfläche aller Zellen multipliziert und gemittelt. (Kontrolle: N=13; SNAP-25: N=14)

Die maximalen Sekretionsraten, berechnet aus dem Anstieg der Kurven in Abb. 56, betrugen für Kontrollzellen $14,3 \pm 2,5 \text{ fF} \cdot \text{s}^{-1}$ und $0,19 \pm 0,06 \text{ LDCVs} \cdot \text{s}^{-1}$. In SNAP-25 überexprimierenden Zellen wurden Raten von $13,3 \pm 2,8 \text{ fF} \cdot \text{s}^{-1}$ und $0,13 \pm 0,06$ sezernierten LDCVs pro Sekunde erreicht. Somit war kein Unterschied in der Sekretionskinetik zwischen beiden Konditionen vorhanden, was bedeutet, dass die Überexpression von SNAP-25 keinen Einfluss auf die Sekretion hatte.

3.12.2 Quantität der „dead-end“ Vesikel

Erneut sollte die Anzahl der „dead-end“ Vesikel untersucht werden. Dazu wurde die Analyse wie unter 3.8 durchgeführt und das Ergebnis in Abb. 57 dargestellt.

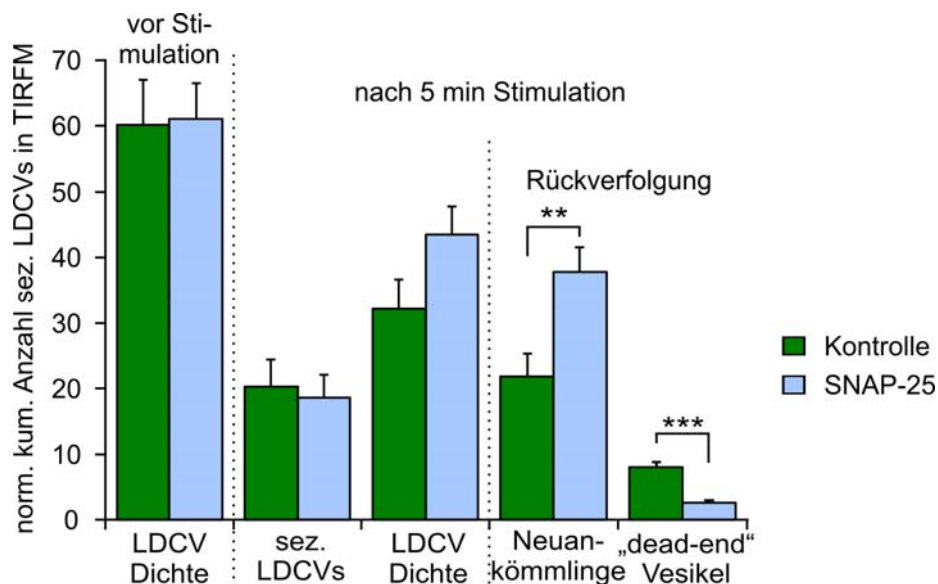


Abb. 57: Anzahl der LDCVs in verschiedenen Kategorien nach Überexpression von SNAP-25. In Chromaffinzellen wurden NPY-mCherry und zusätzlich GFP (Kontrolle, grün) oder SNAP-25 (hellblau) exprimiert. In den während der Perfusion mit $6 \mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$ aufgezeichneten TIRFM-Filmen wurde die Anzahl der LDCVs für verschiedene Kategorien analysiert. Gezeigt sind die Dichte der LDCVs vor der Stimulation, die Anzahl sezernierter LDCVs und die Anzahl der LDCVs an der PM nach der Stimulation. LDCVs, die am Ende der fünfminütigen Stimulation noch an der PM zu sehen waren wurden entweder in Neuankömmlinge (wenn sie während des Experimentes in TIRFM erschienen) oder „dead-end“ Vesikel (wenn sie schon am Anfang des Filmes sichtbar waren) eingeteilt. Die Anzahl der LDCVs in den verschiedenen Kategorien wurde für jede Zelle auf die Größe ihrer Basisfläche normalisiert, mit der durchschnittlichen Basisfläche aller Zellen multipliziert und gemittelt. (Kontrolle: N=13; SNAP-25: N=14; ** $p=0,004$; *** $p<0,001$)

In Abb. 57 ist zu erkennen, dass die Überexpression von SNAP-25 zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl von „dead-end“ Vesikeln führte. Zusätzlich waren im letzten Bild des TIRFM Filmes mehr Neuankömmlinge zu erkennen. Zum besseren Vergleich sind die Werte aus Abb. 57 in Tab. 5 eingetragen.

Tab. 5: Anzahl der LDCVs in verschiedenen Kategorien nach Überexpression von SNAP-25. Beschreibung siehe Abb. 57

	LDCVs vor Stimulation	sezernierte LDCVs	LDCVs nach Stimulation	Neuankömmlinge	"dead-end" Vesikel
Kontrolle	60,2 ± 6,8	20,3 ± 4,1	32,2 ± 4,4	21,8 ± 3,6	8,0 ± 0,8
SNAP-25	61,1 ± 5,3	18,5 ± 3,6	43,5 ± 4,3	37,9 ± 3,7	2,6 ± 0,4

Der Anteil nicht sezernierbarer LDCVs lag in Kontrollzellen bei $15,2 \pm 2,0\%$, bezogen auf alle in TIRFM sichtbaren LDCVs zu Beginn der Experimente. Wurde SNAP-25 überexprimiert, so enthielt der Pool von „dead-end“ Vesikeln nur noch $4,6 \pm 0,6\%$ aller LDCVs ($p < 0,001$). Im Gegensatz dazu stieg der Anteil der Neuankömmlinge von $36,2 \pm 6,0\%$ in Kontrollzellen auf $62,0 \pm 6,1\%$ in SNAP-25 überexprimierenden Zellen ($p = 0,004$). Ein leichter, nicht signifikanter Anstieg war nach Überexpression von SNAP-25 auch in der Dichte der LDCVs nach Stimulation zu erkennen ($p = 0,81$). Sowohl die LDCV-Dichte zu Beginn des Experimentes als auch die Anzahl sezernierter LDCVs in TIRFM zeigten keine Veränderungen zwischen beiden Konditionen.

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse, dass SNAP-25 einen Einfluss auf die Anzahl nicht sezernierbarer LDCVs hatte. Bei Überexpression dieses Proteins war die Anzahl der „dead-end“ Vesikel um 2/3 reduziert, vergleichbar mit der Reduktion nicht sezernierbarer LDCVs nach Expression von Munc18-2 (Abb. 51 und Tab. 3).

4. Diskussion

4.1 Die Rolle von ATP bei Docking, Priming und Sekretion

Mit den durchgeführten Experimenten konnte keine Rolle von ATP bei Docking oder Priming nachgewiesen werden. Sowohl die Beweglichkeitsanalyse, als auch die Dichte und Verweildauer von LDCVs an der PM zeigten keinen Unterschied zwischen Zellen gemessen mit oder ohne ATP. Im Gegensatz dazu war die Sekretion ohne ATP, oder mit dem nicht hydrolysierbaren ATP-Analog AMP-PCP, deutlich reduziert im Vergleich zu Kontrollzellen gemessen mit ATP.

4.1.1 Einfluss von ATP auf die Sekretion

Die Stimulation der Zellen ohne ATP resultierte in einer Reduktion der Sekretion um 69% (Abb. 20), was auf eine Abhängigkeit der Sekretion von ATP hinweist. Dies ist in Übereinstimmung mit mehreren Publikationen (Parsons et al., 1995; Xu et al., 1998; Xu et al., 1999). In der Literatur wurde außerdem gezeigt, dass die Kinetiken der LDCV-Freisetzung in Chromaffinzellen auch bei ATP-Mangel unverändert blieben im Vergleich zu Kontrollzellen (Holz et al., 1989; Bittner und Holz, 1992; Hay und Martin, 1992; Parsons et al., 1995; Heidelberger, 1998; Kawasaki et al., 1998; Schweizer et al., 1998; Xu et al., 1999). Dies bedeutet, dass die von Ca^{2+} als Stimulus ausgelöste Sekretion ATP-unabhängig ist und ATP an einem oder mehreren Schritten vor der Fusion beteiligt sein muss. Der intrazelluläre ATP-Mangel kann deshalb als direkte Ursache für die in dieser Arbeit beobachtete Reduktion der Sekretion ausgeschlossen werden. Stattdessen sollten unter ATP-Mangel ATP-abhängige Schritte vor der Fusion (Docking und/oder Priming) beeinträchtigt sein, obwohl dies hier nicht nachgewiesen werden konnte.

In Abwesenheit von ATP waren die Ca^{2+} -Ströme in den hier durchgeführten Experimenten signifikant reduziert (Abb. 21, ausführlichere Diskussion siehe 4.1.2), was eine niedrigere $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zur Folge hatte, verglichen mit Kontrollzellen. Ob dies die alleinige Ursache für die Abnahme der Sekretion in Zellen gemessen ohne ATP war, ist unklar. Deshalb werden in diesem Abschnitt weitere mögliche Ursachen diskutiert.

In den Experimenten dieser Arbeit wurde eine Depolarisationsreihe appliziert. Die Pools der gedockten LDCVs sollten zu Beginn des Experimentes gefüllt sein, so dass ein Mangel an LDCVs an der PM als Ursache für die reduzierte Sekretion auszuschließen war. Dies konnte durch die Quantifizierung der LDCVs an der PM belegt werden, da keine Veränderung der LDCV-Dichte zwischen beiden Konditionen vorlag (Abb. 22). Erst bei wiederholten Stimulationen wäre eine Reduktion der Anzahl sichtbarer LDCVs in TIRFM zu erwarten,

wenn die durch Exozytose geleerten LDCV-Pools (UPP, RRP, SRP) an der PM wegen ATP-Mangels nicht aufgefüllt werden können. Nicht nur die Anzahl gedockter LDCVs ist für die Stärke der Sekretionsantwort entscheidend, sondern vor allem die Größe der Pools geprimter LDCVs (RRP und SRP), was unter Punkt 4.1.4 diskutiert wird. Mit Hilfe einer Formel kann die Größe des RRP berechnet werden (Voets et al., 2001, modifiziert nach Gillis et al., 1996). Diese Berechnung beruht auf dem Verhältnis der Kapazitätzunahme der ersten beiden Depolarisationen einer Reihe (ΔC_{m1} und ΔC_{m2}). Um zuverlässige Poolgrößen zu erhalten, muss das Verhältnis von $\Delta C_{m2}/\Delta C_{m1}$ kleiner als 1 sein, da dies auf eine vollständige Leerung des RRP als Antwort auf den Stimulus hinweist. Dies war in den hier durchgeführten Experimenten nicht gegeben, so dass auf die Bestimmung der Poolgröße des RRP verzichtet wurde. Somit kann keine Aussage bezüglich der Auswirkung des ATP-Mangels auf die Größe des RRP getroffen werden.

ATP wird von der ATPase NSF benötigt, um den SNARE-Komplex aus der *cis*-Konfiguration zu lösen, so dass diese in der *trans*-Konfiguration wieder reorganisiert werden können (Banerjee et al., 1996; Brunger, 2001). Dies ist einerseits wichtig als vorbereitender Schritt für die Endozytose (Heidelberger, 2001; Heidelberger et al., 2002). Andererseits werden SNARE-Proteine durch diesen Schritt für neue LDCVs zugänglich gemacht. Ohne ATP in der Zelle kann NSF den SNARE-Komplex nicht lösen, weshalb weniger Docking-Stellen für neue LDCVs vorhanden sind. Dies sollte sich in einer Reduktion der Anzahl gedockter LDCVs zeigen, was wiederum Auswirkung auf die Anzahl fusionskompetenter LDCVs hätte. Damit SNARE-Komplexe in der *cis*-Konfiguration in der PM vorliegen, müssen zuvor LDCVs fusioniert sein. Obwohl spontane Sekretion in bovinen Chromaffinzellen vorkommt, ist dieser Prozess in Ruhe selten (eigene Beobachtungen). Nach dem Applizieren der Depolarisation wurden in dieser Arbeit keine weiteren TIRFM-Filme aufgenommen. Des Weiteren lag keine Veränderung in der Anzahl gedockter Vesikel bei Verwendung der Lösung ohne ATP oder mit AMP-PCP vor (Abb. 22 und 27). Eine Inhibierung von NSF durch den ATP-Mangel kann somit als Ursache für die verminderte Sekretion im Vergleich zu Kontrollzellen ausgeschlossen werden.

4.1.2 Inaktivierung von Calciumkanälen durch ATP-Mangel

Da die Poolgrößen der gemessenen Zellen nicht berechnet werden konnten bleibt unklar, ob eine verringerte Poolgröße des RRP ohne ATP bzw. mit AMP-PCP vorlag. Die beobachtete Reduktion der Sekretion unter ATP-Mangel könnte auf die Inaktivierung von Ca^{2+} -Kanälen zurück zu führen sein (Abb. 21). In der Literatur wurde ein Rückgang der Aktivität vieler verschiedener Kanäle (u.a. spannungsabhängige Calciumkanäle) beschrieben, wenn kein ATP appliziert wurde (Elhamdani et al., 1995; Elhamdani et al., 1995a). Diese Inhibierung

wurde durch die Zugabe von ATP, phosphorylierbaren Agenzien oder der katalytischen Untereinheit von PKA in die Pipettenlösung unterdrückt (Kostyuk, 1984; Yatani et al., 1987; Ono und Fozzard, 1992; Elhamdani et al., 1995). Darüber hinaus berichteten Elhamdani et al. (1995) von einer Phase der verstärkten Aktivität von Calciumkanälen zu Beginn der Ganzzellaufleitung, welche durch die Verwendung von 2 mM ATP in der Pipettenlösung verlängert wurde. Verantwortlich für diese verstärkte Aktivität war die Aktivierung zusätzlicher Calciumkanäle, wodurch diese sich, als Antwort auf einen Stimulus, öffnen konnten. Ohne vorherige Aktivierung blieben die Kanäle dagegen geschlossen. Bei der Rekrutierung von Calciumkanälen sind die Hydrolyse von ATP und ein G-Protein nötig. ATP könnte dabei die Affinität des G-Proteins für den Calciumkanal erhöhen, wodurch die Phase der Inaktivierung der Calciumkanäle erst später eintritt (Elhamdani et al., 1995). Die Inaktivierung betrifft alle Arten von Calciumkanälen (Elhamdani et al., 1995a), auch die in Chromaffinzellen vorkommenden Kanäle des L-, P- und N-Typs (Bossu et al., 1991; Artalejo et al., 1994). Es wurde außerdem gezeigt, dass die Phosphorylierung von Calciumkanälen des L-Typs durch PKA für die Aktivität dieser Kanäle von Bedeutung ist (Armstrong und Eckert, 1987). Es scheinen jedoch weitere, komplexe Phosphorylierungsschritte wichtig zu sein (Elhamdani et al., 1995). Die reduzierte Sekretion unter ATP-Mangel bzw. mit AMP-PCP in der Pipettenlösung kann somit, zumindest teilweise, durch die Inaktivierung von Calciumkanälen sowie durch eine verringerte Anzahl aktiver Calciumkanäle erklärt werden.

4.1.3 Die Rolle von ATP beim Docking

Die unveränderte Anzahl von gedockten LDCVs in TIRFM in Zellen ohne ATP deutete bereits darauf hin, dass der Docking-Schritt nicht von ATP abhängig war, in Übereinstimmung mit Heidelberger et al. (2002). Dies war jedoch unerwartet, da ATP für den Transport von LDCVs aus dem DP zur PM mittels Myosin V benötigt wird (Desnos et al., 2007). Es stellte sich deshalb die Frage, ob in den Zellen zusätzliche, ATP-unabhängige Motorproteine für den Transport von LDCVs existieren. Darauf weisen diverse Experimente in der Literatur hin, in welchen trotz Inhibierung einer leichten Kette von Myosin (Ryan, 1999) oder nach Mutation von Myosin V (Schnell und Nicoll, 2001) keine Defizite in der Anzahl gedockter LDCVs erkennbar waren. Ein ATP-unabhängiger Transport von LDCVs zur PM würde erklären, warum die Anzahl gedockter LDCVs unter ATP-Mangel nicht reduziert war. Eine weitere Erklärung, warum das Entfernen von ATP aus der Pipettenlösung keine Auswirkung auf den Docking-Schritt zeigte, beruht auf einer geringen Anzahl von fluoreszent markierten LDCVs zum Zeitpunkt der Experimente. Dies war durch die verwendete Transfektionsmethode (SFV) verursacht und notwendig, um die Beweglichkeitsanalyse durchführen zu können. Im Durchschnitt befanden sich im ersten Bild des TIRFM-Filmes $6,8 \pm 0,8$ markierte LDCVs mit ATP und $7,5 \pm 0,6$ LDCVs ohne ATP an der PM. Ein leichter

Docking-Defekt in Zellen ohne ATP könnte somit übersehen werden. Darüber hinaus war die Sekretion unter ATP-Mangel um fast 70% reduziert, im Vergleich zu Zellen gemessen mit ATP (Abb. 20). Durch diese stark verringerte Sekretion änderte sich auch die Dichte der LDCVs an der PM während einer Stimulation kaum. Dies hatte zur Folge, dass der Bedarf des Auffüllens der LDCV-Pools an der PM in Zellen gemessen ohne ATP in der Pipettenlösung geringer war, im Vergleich zu Kontrollzellen. Auch dieser Fakt könnte einen Docking-Defekt überdecken, vor allem wenn tatsächlich ein zweiter, ATP-unabhängiger LDCV-Transport existiert, welcher das Auffüllen der Pools gedockter LDCVs, zumindest teilweise, gewährleisten kann. Auch der Zeitfaktor scheint eine Rolle zu spielen. Laut Steyer et al. (1997) dauert der Transport von LDCVs aus dem Zytoplasma an die PM ungefähr 7 min. Die Dauer der Messungen lag in dieser Arbeit jedoch bei 5 min pro Zelle (Messprotokoll siehe Abb. 17A), so dass das Auffüllen der Pools gedockter LDCVs erst nach dem Ende der Experimente geschah und somit nicht in den aufgezeichneten TIRFM-Filmen detektiert werden konnte.

Zur genaueren Untersuchung des Einflusses von ATP auf den Docking-Schritt wurde die Verweildauer von LDCVs an der PM analysiert. Gedockte LDCVs können durch lange Verweildauern identifiziert werden, während nicht gedockte LDCVs nur kurz an der PM verweilen (Toonen et al., 2006). Beide Konditionen zeigten jedoch eine ähnliche Anzahl von LDCVs mit kurzen und langen Verweildauern (Abb. 23), so dass Docking ein ATP-unabhängiger Schritt zu sein scheint.

4.1.4 Abhängigkeit des Primings von ATP

Geprimte LDCVs befinden sich in RRP und SRP. Laut Literatur ist der RRP zu Beginn von Messungen ausreichend gefüllt, und ein ATP-Mangel hat zu diesem Zeitpunkt keine Auswirkungen auf die Größe des RRP (Holz et al., 1989; Bittner und Holz, 1992; Parsons et al., 1995; Xu et al., 1998; Klenchin und Martin, 2000; Heidelberger et al., 2002; Olsen et al., 2003). Mehrere Publikationen zeigten, dass die Anzahl der LDCVs im RRP ohne ATP bis zu 4 min stabil war, was eine geringe Unpriming-Rate vermuten lässt (Baker und Knight, 1978; Dunn und Holz, 1983; Parsons et al., 1995). Eine Auswirkung des ATP-Mangels erkennt man erst nach längerer Inkubation (ca. 5 min) der Zellen in Medium ohne ATP. Solch eine Prä-Inkubation wurde bereits mit Chromaffinzellen durchgeführt (Xu et al., 1998; Xu et al., 1999). Xu et al. (1998) zeigten, dass nach 5 min Inkubation der Zellen ohne ATP und unter Verwendung von AMP-PCP in der Pipettenlösung die Sekretion vollständig inhibiert war. In einer anderen Publikation der Gruppe führte die Stimulation mittels UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA in Zellen perfundiert mit einem ATP-Analog zu einer stark eingeschränkten Sekretion aus dem RRP (Xu et al., 1999). ATP wird demnach benötigt, um eine hohe Anzahl von LDCVs im RRP aufrecht zu erhalten. Unter ATP-Mangel findet in den Zellen ein

Unpriming bereits geprimter LDCVs statt (Hay et al., 1995). Dieses Unpriming führt zu einer Reduktion der Poolgröße des RRP, da dieser ohne ATP nicht wieder aufgefüllt werden kann. In dieser Arbeit verging bis zur Stimulation eine Zeitspanne von 5 min, laut Literatur ausreichend für die Unpriming-Reaktion. Somit könnte das Unpriming die Ursache für die reduzierte Sekretion unter ATP-Mangel darstellen. Mit dem Unpriming veränderte sich die Anzahl geprimter und fusionskompetenter LDCVs, während die Anzahl gedockter LDCVs gleich blieb. Eine Änderung vom geprimten in den gedockten Zustand sollte zu einer Erhöhung der Beweglichkeit von LDCVs führen (Nofal et al., 2007). In der durchgeführten Beweglichkeitsanalyse war jedoch keine Veränderung zu erkennen (Abb. 24). Andere Gruppen publizierten, dass die Beweglichkeit von Granulen ohne ATP um 20% reduziert war, und ATP die Beweglichkeit langsamer Granulen sogar erhöhte (Allersma et al., 2006; Holz, 2006; Holz und Axelrod, 2008). Dies würde bedeuten, dass ATP in den Prozess des Primings involviert ist. Die TIRFM-Filme, welche zur Mobilitätsanalyse von LDCVs zum Einsatz kamen, wurden 2 min nach Beginn der Ganzzelleableitung aufgenommen. Es wäre denkbar, dass eine Zeitspanne von 2 min zu kurz war, um das Unpriming einer ausreichenden Anzahl von LDCVs zu verursachen, so dass ein Effekt in der Beweglichkeitsanalyse aller LDCVs erkennbar wäre. Zwar zeigte die Sekretion (appliziert 5 min nach Beginn der Messungen) eine deutliche Reduktion ohne ATP, bis dahin vergingen jedoch, im Vergleich zur Beweglichkeitsanalyse, weitere 3 min. Somit könnte das aufgetretene Unpriming durch die hohe Anzahl von geprimten LDCVs zu Beginn der Experimente überdeckt werden.

Das Entfernen von ATP aus der Zelle hat negative Auswirkungen auf wichtige Phosphorylierungsschritte, bei welchen ATP als Phosphatquelle benötigt wird. So wurde von verschiedenen Gruppen festgestellt, dass das Fehlen von ATP in der Zelle zu einer Abnahme des PM-assoziierten $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ führte (Eberhard et al., 1990; Holz et al., 2000; Grishanin et al., 2004). Des Weiteren konnte ein Verlust von kortikalem Aktin unter ATP-Mangel beobachtet werden (Bittner und Holz, 2005; Holz, 2006). Eine Reduktion der $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ Konzentration in Zellen hatte sowohl eine Abnahme der Sekretionsantwort (Grishanin et al., 2004), als auch eine reduzierte Interaktion mit anderen Proteinen zur Folge. Die Interaktionspartner von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ sind z. B. Synaptotagmin, (Schiavo et al., 1996), CAPS (Loyet et al., 1998; Grishanin et al., 2002), Rabphilin (Chung et al., 1998) oder Mints (Okamoto und Südhof, 1997). Welche Folgen die verminderte Interaktion zwischen $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ und seinen Partnern hat, ist noch nicht vollständig geklärt, denkbar wäre aber eine eingeschränkte Funktion der jeweiligen Interaktionspartner. So könnte z. B. die Bindung von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ an CAPS einen geringeren Abstand von PM und LDCVs zur Folge haben, da CAPS auf der Membran von LDCVs zu finden ist (Berwin et al., 1998; Grishanin et al.,

2002). Es wurde bereits gezeigt, dass $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ für die Aktivität von CAPS und dessen Bindung an die Membran von Granulen in PC12 Zellen essentiell ist (Grishanin et al., 2004). Die Ursache hierfür könnte eine Konformationsänderung von CAPS sein, welche durch die Bindung an $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ verursacht wird und so wiederum die Interaktion mit anderen Proteinen ermöglicht (Loyet et al., 1998). Die ATP-abhängige Synthese von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ ist somit für einen späten Priming-Schritt, in welchen CAPS involviert sein könnte, nötig. Auch für die anderen Interaktionspartner wurde postuliert, dass sie durch Bindungen mit $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ an ihren spezifischen Wirkungsort gelangen (Martin, 2001) und $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ zusätzlich einen verstärkten Kontakt zwischen Fusions-Partnermembranen verursacht (Klenchin und Martin, 2000).

$\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ und andere Pls interagieren außerdem mit verschiedenen Proteinen des Zytoskelettes (Martin, 1997; Wurmser et al., 1999; Yin und Janmey, 2003). Besonders das Aktin-Zytoskelett reagiert sensitiv auf Verringerungen der Konzentration von intrazellulärem $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ (Bittner und Holz, 2005). Wie bereits erwähnt konnte nach Entfernen des ATPs in den Zellen ein Verlust von kortikalem Aktin nachgewiesen werden. $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ stimuliert die Polymerisierung von Aktin (Lassing und Lindberg, 1988) und inhibiert depolymerisierende Faktoren (Janmey und Stossel, 1987; Ojala et al., 2001). Aufgrund der berichteten Abnahme der $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -Synthese als Folge von fehlendem ATP kam es, laut Literatur, zur Depolymerisierung von Aktin und einer erhöhten Beweglichkeit von LDCVs (Oheim und Stuhmer, 2000; Ng et al., 2002). Somit wäre der Schritt des Primings stark abhängig von der $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ Konzentration, woraus die Notwendigkeit von ATP für diesen Schritt resultieren sollte. Dieser Schluss wird in der Literatur vertreten, wo postuliert wurde, dass die ATP-abhängige Synthese von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ die Hauptaufgabe von ATP im sekretorischen Zyklus darstellt, um die Sekretion aufrecht zu erhalten. (Eberhard et al., 1990; Hay und Martin, 1993; Hay et al., 1995; Bittner und Holz, 2005). Dies konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da die Beweglichkeitsanalyse keine Veränderungen unter ATP-Mangel im Vergleich zur Kontrollsituation zeigte (Abb. 24).

Es ist unwahrscheinlich, dass ATP weder beim Docking, noch beim Priming eine Rolle spielt, da dieses Molekül die wichtigste energiereiche Verbindung des Zellstoffwechsels darstellt und vor allem als temporärer Speicher chemischer Energie bei vielen Zellprozessen von Bedeutung ist. Zusätzlich lässt die Literatur vermuten, dass ATP vor allem für das Priming essentiell ist (Martin und Kowalchyk, 1997; Klenchin und Martin, 2000). Somit stellt sich die Frage, warum die Analyse der LDCV-Mobilität in den aufgezeichneten TIRFM-Filmen keine Unterschiede zwischen Zellen mit und ohne ATP zeigte. Eine Erklärung wäre die zu Beginn diskutierte Stabilität des RRP, auch ohne ATP. Wenn nach Entfernen des ATPs die Poolgröße des RRP für bis zu 4 min gewährleistet ist, wäre die Beweglichkeitsanalyse an

bereits geprimten LDCVs durchgeführt worden, so dass kein Unterschied zu Kontrollzellen mit ATP erkennbar sein kann. Ein anderer Grund für einen fehlenden Effekt des ATP-Mangels bei Docking und Priming ist, dass das gesamte endogene ATP nicht sofort zu Beginn der Messungen ausgewaschen war. Die Konzentration des Energieträgers wäre somit zu Beginn der TIRFM Aufnahmen (nach 2 min, siehe Messprotokoll, Abb. 17A) in den Zellen noch hoch genug, um Docking und Priming zu unterstützen (Abb. 23 und 24), während bei der Sekretion Defizite erkennbar waren (Abb. 20). Laut Parsons et al. (1995) sind jedoch 96% des freien ATPs in Chromaffinzellen nach 2 min und 96% des gesamten ATPs in der Zelle nach 6 min aufgebraucht, so dass nach der zweiminütigen Ladephase der Zellen und zu Beginn der TIRFM-Aufnahmen nur noch 4% des ATPs frei in der Zelle vorliegen sollte. Um zu überprüfen, ob die intrazelluläre ATP-Konzentration für einen fehlenden Effekt bei Docking und Priming ohne ATP verantwortlich war, wurde für die folgenden Experimente ein nicht hydrolysierbares ATP-Analog eingesetzt. Solche Analoge agieren in der Zelle wie ATP und können von denselben Interaktionspartnern, wie ATPasen und Kinasen, gebunden, nicht aber zur Energiegewinnung hydrolysiert werden und blockieren somit die Bindestellen für noch vorhandene ATP-Moleküle in den Zellen (Yount, 1975).

4.1.5 Inhibierung von ATP-Bindeproteinen und dessen Auswirkung auf Docking, Priming und Sekretion

Die Sekretion in Zellen perfundiert mit AMP-PCP in der Pipettenlösung war um 56% reduziert verglichen mit der Sekretion von Kontrollzellen (Abb. 25). Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der Literatur (Xu et al., 1998; Xu et al., 1999). Permeabilisierte Chromaffinzellen zeigten sogar einen vollständigen Verlust der Exozytose nach Inkubation der Zellen mit dem ATP-Analog für 5 min (Xu et al., 1998; Xu et al., 1999). Auch die Inhibierung von Glykolyse und Atmungskette, aus welchen ATP gewonnen wird, resultierte in einer Inhibierung der Sekretion (Holz et al., 1989).

Die Analyse der Ca^{2+} -Ströme ergab in den hier durchgeführten Experimenten keine signifikante Inaktivierung in Anwesenheit von AMP-PCP im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 26). Dies ist durch die geringe Anzahl von gemessenen Zellen (N=10) zu erklären. Zumindest teilweise sollte die Inaktivierung von Ca^{2+} -Strömen deshalb die beobachtete Reduktion der Sekretion in Zellen ohne ATP verursacht haben.

Die Verweildauer von LDCVs an der PM zeigte bei Verwendung von AMP-PCP keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrollsituation (Abb. 28). Auch die LDCV-Mobilität zeigte nur leichte Abweichungen (Abb. 29). Da nach je fünf gemessenen Zellen auch in den Experimenten mit AMP-PCP kein Unterschied in Docking und Priming

zwischen beiden Konditionen zu erkennen war, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt. Dies erklärt die hohen Standardfehler in Abb. 27 und 28 sowie den unterschiedlichen Verlauf der Kurven von Kontrollzellen zwischen der ersten (2 bzw. 0 mM ATP) und der zweiten (2 mM ATP oder AMP-PCP) Experimentenreihe (vergleiche Abb. 23 und 28 bzw. Abb. 24 und 29).

Die Ergebnisse der Experimente dieser Arbeit lassen die Schlussfolgerung zu, dass die ATP-Konzentration in den Zellen zu Beginn der TIRFM-Aufnahmen bereits niedrig war, da die zuvor gezeigte Reduktion der Sekretion ohne ATP hier mit AMP-PCP reproduziert wurde. Dabei konnte kein Unterschied in Docking und Priming zwischen den Konditionen mit ATP bzw. AMP-PCP hervorgerufen werden.

Die in beiden Experimentenreihen aufgetretene Reduktion der Sekretion zeigt, dass mindestens einer der Schritte, welche der Fusion von LDCVs mit der PM vorausgehen, von ATP abhängig ist. Da weder beim Docking, noch beim Priming eine ATP-Abhängigkeit nachgewiesen werden konnte, scheinen die verwendeten Methoden nicht exakt genug zu sein, um ein Einwirken von ATP zu detektieren. Um zu überprüfen, ob ein Effekt von ATP durch die verwendete Analyse-Methode verschleiert wurde, wurden sowohl die Beweglichkeitsanalyse als auch die Analyse der Verweildauer von LDCVs an der PM erneut durchgeführt, jedoch ohne die Verschmelzungsroutine einzusetzen (siehe 2.2.11.1). Das Ergebnis zeigte jedoch ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Konditionen, weder bei Verwendung der Lösungen mit 0 und 2 mM ATP, noch in Anwesenheit von AMP-PCP (Daten nicht gezeigt).

Eine weitere Erklärung für das Fehlen von Veränderungen bei Docking und Priming ohne ATP wäre die Verwendung von Ersatzstoffen in der Zelle. Es ist unklar, ob es Stoffe gibt, welche an Stelle von ATP von der Zelle verwendet werden können. Falls solche Stoffe existieren könnten auch unter ATP-Mangel die wichtigsten, ATP-abhängigen Schritte aufrecht erhalten werden. Denkbar ist außerdem, dass mit Hilfe von GTP (Guanosintriphosphat) ATP gewonnen werden kann. GTP ist in den Zitronensäure-Zyklus involviert und somit auch in die ATP-Produktion (Elhamdani et al., 1995a; Detimary et al., 1997). Die GTP-Konzentration in den Zellen ist allerdings so gering, dass dies keine Bedeutung haben sollte (P. Lipp, persönliche Kommunikation). Deshalb wurde die Auswirkung von GTP auf die intrazelluläre ATP-Konzentration als unbedeutend angesehen. Nicht zu vernachlässigen hingegen sind diverse Phosphorylierungsschritte durch Kinasen, welche in der Regel ATP als Phosphatquelle benötigen. So können zum Beispiel Syntaxin, SNAP-25, Synaptotagmin oder Munc18-1 phosphoryliert werden (Nielander et al., 1995; Fujita et al., 1996; Shimazaki et al., 1996; Risinger und Bennett, 1999; Nili et al., 2006). Die Proteinkinase C spielt bei der Sekretion eine wichtige Rolle, da die Aktivierung dieses

Enzyms Exozytose stimuliert, während mittels PKC-Inhibitoren die Sekretion eingeschränkt ist (Klenchin und Martin, 2000). PKC ist in den Priming-Schritt involviert. Ihr Substrat könnte SNAP-25 sein, was jedoch bisher nicht verifiziert wurde (Gillis et al., 1996; Stevens und Sullivan, 1998; Genoud et al., 1999). Phosphorylierungen sind für die Regulation vieler Proteine wichtig und können verschiedene Auswirkungen haben. Es ist denkbar, dass unter ATP-Mangel aufgrund fehlender Phosphorylierungen gegenläufige Prozesse stattfinden, weshalb keine Folgen des ATP-Mangels bei Docking und Priming nachgewiesen werden konnten.

4.2 „Dead-end“ Vesikel

4.2.1 Maturierung und Verteilung von LDCVs

Anhand NPY-mCherry markierter und fixierter Zellen wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass eine gleichmäßige Verteilung von LDCVs in den Zellen vorliegt (Abb. 30). Nach der Knospung vom *trans*-Golgi Netzwerk wanderten die LDCVs durch das Zytoplasma zur PM, wo sie nach 12 h bereits gleichmäßig verteilt waren. Allerdings war die Dichte der LDCVs an der PM nach 48 h deutlich höher, was für Sekretionsexperimente von Vorteil ist. Zusätzlich konnten die Zellen frühestens 48 h nach der Präparation mittels Patch-Clamp Technik gemessen werden. Zu einem früheren Zeitpunkt war das Erreichen eines Gigaseals zwischen Zelle und Pipette nicht möglich. Am besten eigneten sich die Zellen zur Messung daher zwischen 60 und 90 h nach Elektroporation, so dass die Experimente in diesem Zeitraum statt fanden.

Mit dem Farbstoff FFN511 konnte in dieser Arbeit außerdem gezeigt werden, dass kein Altersgradient von LDCVs innerhalb der Zelle existiert und NPY-mCherry markierte LDCVs keinen speziellen Pool darstellen (Abb. 31 und 32, Experimente durchgeführt von Ekta Dembla). Die Aufnahmen zeigten auch hier eine gleichmäßige Verteilung von LDCVs, sowohl im Zytoplasma als auch an der PM, unabhängig vom Alter der LDCVs. Diese Ergebnisse widersprechen den Beobachtungen von Duncan et al. (2003), dass sich an der PM hauptsächlich neue LDCVs (jünger als 16 h) aufhalten, während die älteren LDCVs (älter als 16 h) tiefer im Zytoplasma auftreten. Aus den hier durchgeführten Experimenten lässt sich dagegen schließen, dass ältere LDCVs nicht gezielt von der PM entfernt werden. Die Analyse der Fluoreszenzverteilung in Abhängigkeit des Zellbereiches zeigte keinen höheren Anteil NPY-mCherry markierter LDCVs im äußeren Ring (Abb. 32). Ob das Alter eines LDCVs Auswirkung auf dessen Fusionskompetenz hat, wurde in einem anderen Experiment untersucht und wird im folgenden Kapitel diskutiert.

4.2.2 Sekretion bei verschiedenen Arten von Stimuli

Mehrmalige Stimulation der Zellen mit Depolarisationsreihen führte zu einer starken Reduktion der Membrankapazitätsantwort ab der vierten Stimulationsreihe (Abb. 33). Dieser Effekt trat auch nach Stimulation durch UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA auf (Abb. 37). Zwischen zwei aufeinander folgenden Stimulationen wurde jeweils ein zeitlicher Abstand von mindestens 2 min für das Auffüllen der Pools geprimter LDCVs aus dem UPP eingehalten. Daher kann ein Leeren der geprimten LDCV-Pools nicht für die verringerte Sekretion verantwortlich sein (von Ruden und Neher, 1993; Smith et al., 1998; Rose et al., 2003). Dies wurde durch die vergleichbar starke Sekretion als Antwort auf den ersten und zweiten Stimulus belegt, wo 2 min scheinbar ausreichten, um die Pools geprimter LDCVs nach der Sekretion aufzufüllen (Abb. 33 und 37). Nur eine Leerung des UPP würde zu einer reduzierten Sekretionsantwort führen, da RRP und SRP nicht mehr aus diesem Pool aufgefüllt werden könnten. Die Analyse der Anzahl gedockter LDCVs in TIRFM zeigte jedoch keine Veränderung mit steigender Anzahl von Stimulationen (Abb. 42 und Tab. 1), was gegen ein Defizit in der Anzahl gedockter LDCVs und ein Leeren des UPP spricht. Auch die Inaktivierung von Ca^{2+} -Kanälen (Cens et al., 1999; Catterall, 2000; Wykes et al., 2007) kann als Ursache für die geringe Sekretion bei zunehmender Anzahl von Stimulationen ausgeschlossen werden. Dieser Effekt hat keinen Einfluss auf die Sekretion bei Verwendung von UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA. In diesem Fall ist in der Zelle bereits eine hohe $[\text{Ca}^{2+}]$ vorhanden, allerdings an den Ca^{2+} -Puffer EGTA gebunden. Durch den applizierten UV-Blitz wird das Ca^{2+} freigesetzt, so dass kein Ca^{2+} -Einstrom durch Kanäle in die Zelle nötig ist, um Sekretion auszulösen. Als Erklärung bleibt das Ausdünnen zytosolischer Faktoren durch die Perfusion mit der Patchpipette (Gillis et al., 1996; Smith et al., 1998; Nagy et al., 2004). Dadurch können Zellfunktionen, welche erst ab einer bestimmten Konzentration von zytosolischen Faktoren ablaufen, verloren gehen (Burgoyne, 1995; Smith und Neher, 1997; Rosa et al., 2010). Energiereiche Stoffe wie ATP oder GTP waren davon nicht betroffen, da diese in ausreichender Konzentration in der Pipettenlösung vorhanden waren. Bis zum Zeitpunkt der vierten Stimulation, bei welcher eine Reduktion der Membrankapazitätsantwort vorlag (Abb. 33 und 37), wurden die Zellen bereits 8 min in der Ganzzelleableitung gehalten und über die Pipette perfundiert. Es ist somit vorstellbar, dass kleine, zytosolische Faktoren, wie Kinasen (PKC, PKA) oder Complexin, ausgewaschen wurden bzw. ihre Konzentration zu gering war, um den Priming-Schritt vollständig aufrecht zu halten. Dockingfaktoren dagegen scheinen nicht im gleichen Maße beeinflusst zu sein, da sich die Anzahl von LDCVs an der PM nicht änderte (Tab. 1). Somit entstand der Eindruck, dass ausreichend fusionskompetente LDCVs vorhanden waren, wobei diese zwar an der Membran verankert, jedoch nicht geprimt waren. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigten bereits andere Gruppen (Ashery et al., 2000; Voets et al., 2001) dass Chromaffinzellen auf zwei

Stimulation mit UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA mit einem vergleichbaren Anstieg der Membrankapazität reagieren, während nach der dritten und vierten Stimulation eine signifikante Reduktion der Membrankapazitätsantwort vorlag. Auf die fünfte Stimulation reagierten die Zellen nicht mehr (Abb. 33 und 37). Ashery et al. (2000) erklärten dies einerseits ebenfalls mit dem Auswaschen zytosolischer Faktoren, welche für die Sekretion benötigt werden. Andererseits postulierten sie, dass wiederholte Stimulationen die Pools gedockter LDCVs leeren. Dies führten sie allein auf die verminderte Sekretion nach der zweiten UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA zurück. Der postulierte Mangel an gedockten LDCVs wurde als Ursache nicht durch weitere Experimente belegt. Mittels TIRFM konnte in dieser Arbeit jedoch gezeigt werden, dass sich auch nach dem zweiten Stimulus eine vergleichbare Menge von LDCVs an der PM befand, wie vor dem ersten Stimulus (Abb. 42 und Tab. 1).

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente führen zu der Schlussfolgerung, dass die LDCVs, welche sich nach der sechsten Stimulation noch an der PM befanden, nicht alle zu den „dead-end“ Vesikeln gezählt werden konnten. Ein Großteil davon wäre theoretisch sezernierbar, wenn zytosolische Faktoren nicht durch die Perfusion mit der Pipettenlösung verdünnt worden wären. Sezernierbare und nicht sezernierbare LDCVs lassen sich demnach hier nicht unterscheiden.

Laut Literatur korreliert die Sekretion in TIRFM mit der Sekretion der gesamten Zelle, wobei letzteres mittels Membrankapazität gemessen wurde (Becherer et al., 2007). In der Publikation wurde die durchschnittliche Anzahl sezernierter LDCVs mit dem prozentualen Anteil, den die Basisfläche in TIRFM von der Gesamtgröße der Zelle ausmacht, verrechnet. Somit lässt sich die Anzahl sezernierter LDCVs der gesamten Zelle berechnen und mit dem Anstieg der Membrankapazität vergleichen. Die Basisfläche in TIRFM von Zellen stimuliert mit Depolarisationsreihen betrug in den durchgeführten Experimenten im Durchschnitt $44,1 \pm 1,8 \mu\text{m}^2$, die Zellgröße lag im Mittel bei $5,46 \pm 0,23 \text{ pF}$. Daraus ergibt sich, mit einem Umrechnungsfaktor von $1 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Almers, 1978), eine Zellfläche von $545,7 \pm 23,2 \mu\text{m}^2$. Demnach machte die Basisfläche $8,33 \pm 0,42\%$ der Gesamtgröße der Zelle aus. Pro sezerniertem LDCV nimmt die Membrankapazität um $1,9 \text{ fF}$ zu (Dernick et al., 2005). Nach der ersten Depolarisationsreihe fusionierten in den hier durchgeführten Experimenten durchschnittlich $0,92 \pm 0,29$ LDCVs in TIRFM (Abb. 34), was eine Zunahme der Membrankapazität von $1,75 \pm 0,55 \text{ fF}$ ergibt. Da dieser Wert lediglich für die $8,33\%$ der Basisfläche in TIRFM gilt, muss er auf die gesamte Zellgröße umgerechnet werden. Daraus ergibt sich ein Wert von $21,0 \pm 6,6 \text{ fF}$. Die Zunahme der Membrankapazität nach der ersten Depolarisationsreihe betrug $258 \pm 49 \text{ fF}$, was ungefähr den zehnfachen Wert der Sekretion in TIRFM darstellt, in Übereinstimmung mit der Literatur (Becherer et al., 2007). Es liegt

demnach eine Korrelation der beiden Werte vor. Dies ist bei der zweiten Stimulation nicht mehr der Fall, hier errechnen sich $12,5 \pm 4,6$ fF aus der Sekretion in TIRFM, der Anstieg der Membrankapazität betrug jedoch 310 ± 48 fF, deutlich mehr als das Zehnfache. Auch für die folgenden Stimulationen ergibt sich keine Korrelation. Die Umrechnung der Sekretion an der Basisfläche in TIRFM zur Sekretion der gesamten Zelle kann auch nach Stimulation mit UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA verwendet werden. In diesen Experimenten hatte die Basisfläche der Zellen im Durchschnitt eine Größe von $47,17 \pm 4,49 \mu\text{m}^2$. Die durchschnittliche Zellgröße betrug $6,15 \pm 0,22$ pF, gleichzusetzen mit $615 \pm 22 \mu\text{m}^2$. Demnach betrug der Anteil der Basisfläche $7,7 \pm 0,7\%$ der Gesamtfläche der Zelle. Durch $1,3 \pm 0,5$ sezernierte LDCVs in TIRFM nach dem ersten UV-Blitz (Abb. 38) ergibt sich ein Anstieg der Membrankapazität von $2,5 \pm 1,0$ fF an der Basisfläche und $32,5 \pm 13,0$ fF für die gesamte Zelle. Die Membrankapazität stieg nach dem ersten Stimulus um 310 ± 81 fF, ungefähr das Zehnfache. Für die zweite Stimulation ergeben sich Werte von $43,0 \pm 9,6$ fF für die umgerechnete Sekretion in TIRFM, im Vergleich zu einem Anstieg der Membrankapazität von 406 ± 92 fF. Die Korrelation ist nach dem dritten UV-Blitz nicht mehr vorhanden, da die umgerechnete Sekretion in TIRFM $10,9 \pm 4,0$ fF betrug, die Membrankapazität aber um 230 ± 60 fF zunahm. Wieder zeigt sich eine Reduktion der Sekretion in TIRFM im Vergleich zur Veränderung der Membrankapazität um 53%, vergleichbar mit der Berechnung der Korrelation für die zweite Depolarisationsreihe, wo die Reduktion bei 60% lag (Abb. 35 und 39). Dass die Sekretion in TIRFM mit der Veränderung der Membrankapazität nach Depolarisationen nur für den ersten, bei Einsatz von UV-Blitzlicht aber für zwei Stimulationen korreliert, kann nicht auf die Inhibierung der Ca^{2+} -Ströme nach wiederholten Depolarisationen zurückgeführt werden. Die Ströme waren nach der ersten und zweiten Depolarisation vergleichbar groß (Abb. 36). Bei Becherer et al. (2007) wurde die Korrelation nur auf einen Stimulus untersucht, so dass mittels Membrankapazität gemessene Sekretion und Sekretion in TIRFM scheinbar nach mehreren aufeinanderfolgenden Stimulationen nicht mehr korrelieren. Dies ist auch beim Vergleich des zeitlichen Verlaufs der Sekretionskurven zu erkennen (Abb. 35 und 39). Unter Verwendung von Depolarisationsreihen zeigten Sekretion in TIRFM und Membrankapazität einen vergleichbaren Zeitverlauf für die erste Stimulation (Abb. 35). In Übereinstimmung mit den errechneten Werten ist diese Korrelation bei der Sekretionsantwort auf die zweite Depolarisationsreihe nicht mehr vorhanden. Bei Stimulation mit UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA unterscheiden sich die Kinetiken der Sekretion in TIRFM und der Sekretion der gesamten Zelle (Abb. 39). Während die Summe aller sezernierten Vesikel für die ersten beiden Stimuli mit dem erreichten Wert der Membrankapazität vergleichbar sind, scheint die erste Phase der Sekretion in TIRFM langsamer zu verlaufen verglichen mit der gesamten Sekretion der Zelle.

Eine Ursache für die verringerte Sekretion in TIRFM könnte die Entstehung von Membranınvasionen sein. Die Zellen sind nicht immer komplett flach an das Deckglas angewachsen (Oheim et al., 1998) und durch jedes sezernierte LDCV wird der Umfang der Zelle größer. An der Basisfläche der Zelle, wo diese an das Deckglas angeheftet ist, kann sich die PM nur durch Invaginationen vergrößern, so dass Teile der Basisfläche nicht mehr in der evaneszenten Welle liegen können. Fusionieren dort fluoreszent markierte LDCVs mit der PM, können sie mit TIRFM nicht mehr detektiert werden. Trotzdem verursachen sie einen Anstieg der Membrankapazität, was zu der fehlenden Korrelation beitragen könnte. Diese Hypothese kann experimentell nicht überprüft und somit nicht belegt werden.

Dass die Sekretion älterer und somit nicht markierter LDCVs für die rasche Abnahme sezernierter LDCVs in TIRFM verantwortlich ist, konnte durch die Experimente widerlegt werden. Das Alter von LDCVs scheint in dieser Arbeit weder einen Einfluss auf deren Verteilung innerhalb der Zelle (Abb. 31 und 32), noch auf ihre Sekretion zu haben (Abb. 41). Im Widerspruch dazu wurde in PC12 Zellen und bovinen Chromaffinzellen gezeigt, dass präferentiell junge LDCVs sezerniert werden (unabhängig von Zellart und Fluoreszenzprotein). Verursacht wurde dies durch die Tatsache, dass sich junge LDCVs an der PM aufhalten, während ältere LDCVs tiefer im Zytoplasma zu finden waren (Duncan et al., 2003; Tsuboi et al., 2010). Eine Unterscheidung nach Alter von LDCVs bei der Sekretion wäre für die Zellen sinnvoll, wenn vesikuläre Komponenten über die Zeit altern und die Funktionalität der LDCVs damit eingeschränkt wäre. Ein weitaus wichtigerer Punkt ist allerdings die Reaktion der Zelle auf das Ein- und Ausschalten von Genen. Die Selektion von jungen LDCVs für die Sekretion würde sicherstellen, dass die Aktivierung von Genen eine zeitnahe Auswirkung hat. Das gegenteilige Ergebnis der hier durchgeführten Experimente sowie der Widerspruch zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen kann nicht erklärt werden.

Um zu belegen, dass die LDCVs, welche nach wiederholter Stimulation mit Depolarisationsreihen oder UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA noch mit TIRFM sichtbar waren, nicht alle „dead-end“ Vesikel darstellen, wurde eine Langzeitstimulation mit hohem $[Ca^{2+}]_i$ eingesetzt. Mit dieser Art der Stimulation sollte maximale Sekretion induziert werden. In der Tat konnte die starke, lang anhaltende Stimulation der Zellen deutlich mehr Sekretion auslösen als in den Experimenten zuvor (vergleiche Abb. 33 und 37 mit Abb. 43A). Erneut wurde die Korrelation zwischen Sekretion in TIRFM und Veränderung der Membrankapazität untersucht. Am Ende der Langzeitstimulation für Zellen gemessen mit $1 \mu M [Ca^{2+}]_i$: ergaben sich Werte von $1,3 \pm 0,3$ pF (Abb. 43B, errechnet aus der Sekretion in TIRFM) und $1,2 \pm 0,2$ pF (Abb. 43 A, Anstieg der Membrankapazität). Diese Korrelation spiegelte sich auch in den maximalen Sekretionsraten von Membrankapazität und TIRFM wieder. Zellen

gemessen mit $6 \mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$ zeigten eine Zunahme der Membrankapazität um $3,7 \pm 0,5 \text{ pF}$, umgerechnet aus der Sekretion in TIRFM ergab sich ein Wert von $4,8 \pm 0,8 \text{ pF}$. Der Unterschied zwischen beiden Werten kann durch leichte Endozytose erklärt werden. Wurden die Zellen mit $15 \mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$ perfundiert, so lag keine Korrelation vor, da die Membrankapazität durch Endozytose deutlich verringert wurde (Abb. 45C).

Trotz der starken Sekretion wurden nicht alle in TIRFM sichtbaren LDCVs während der Langzeitstimulation freigesetzt. Dies lag nicht an einem Defizit des Auffüllens von LDCV-Pools an der PM während des Experimentes. Stattdessen existiert ein Pool nicht sezernierbarer LDCVs, welcher ca. 15% aller LDCVs in Zellen perfundiert mit 6 oder $15 \mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$ beinhaltet (Abb. 47). Dass bei den verwendeten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ eine nahezu identische Anzahl von LDCVs als „dead-end“ Vesikel identifiziert wurde deutet darauf hin, dass die Entstehung dieser LDCVs ein Ca^{2+} -unabhängiger Schritt ist. Im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten konnten die am Ende der Messungen in TIRFM sichtbaren LDCVs bei Langzeitstimulation nicht durch ein Auswaschen zytosolischer Faktoren entstanden sein. Die Dauer der Experimente mit hohen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ war mit 5 min deutlich kürzer als zuvor bei wiederholter Verwendung von kurzen, starken Stimuli. Überträgt man die Dauer von 5 min auf die Experimente mit Stimulation durch Depolarisationsreihen bzw. UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA, so wäre dort zu diesem Zeitpunkt der zweite Stimulus appliziert. Die Veränderung der Membrankapazität nach dem zweiten Stimulus war mit dem ersten Stimulus vergleichbar, so dass zu diesem Zeitpunkt die Konzentration zytosolischer Faktoren ausreichend war. Des Weiteren zeigte die Verweildauer von LDCVs an der PM keine Veränderung über die Dauer der Experimente (Abb. 48), was im Falle eines Auswaschens von Primingfaktoren zu erwarten wäre. Somit lag die Vermutung nahe, dass ein molekularer Mechanismus die Ursache für die Entstehung von „dead-end“ Vesikel darstellte.

4.2.3. Molekularer Mechanismus des „dead-end“ Dockings: Expression von Munc18-2 und Stx1A L165A/E166A, Überexpression von SNAP-25

In der Literatur werden hauptsächlich kurze, starke Stimuli, wie Depolarisationen und UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA eingesetzt. Wie bereits diskutiert eignen sich diese Methoden nicht, um „dead-end“ Vesikel zu identifizieren. Aus diesem Grund wurden die Zellen zur Untersuchung des molekularen Mechanismus von „dead-end“ Docking einer starken Langzeitstimulation mit $6 \mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$ ausgesetzt. Bei einer solchen Stimulation ist keine Unterscheidung der Sekretionsantwort in „burst“ und verzögerte Komponente möglich, wie sie nach Applikation der UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA durchgeführt wird (Voets et al., 2001). Dies macht es schwierig, die Ergebnisse der hier durchgeführten Experimente mit der Literatur zu vergleichen. Die Stimulation hielt unter Verwendung hoher $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 5 min

an, während die Dauer der UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA wenige Sekunden beträgt. Somit ist die Sekretion in den hier durchgeführten Experimenten am ehesten mit der verzögerten Komponente vergleichbar, welche das Ende der Sekretionsantwort nach einem kurzen, starken Stimulus beschreibt. Aus diesem Grund wurde in der folgenden Diskussion nur diese Komponente bei Vergleichen zwischen Literatur und erzielten Ergebnissen herangezogen.

Verschiedene Gruppen erwähnten im Zusammenhang mit „dead-end“ Vesikeln den Docking-Schritt (Verhage und Sørensen, 2008) und einen nicht produktiven SNARE-Komplex aus zwei Syntaxin- und einem SNAP-25-Molekül (de Wit et al., 2009), weshalb dieser Gedanke hier aufgegriffen wurde. Der produktive SNARE Akzeptor-Komplex (1:1 Syntaxin und SNAP-25) wird durch verschiedene Proteine stabilisiert, wie Munc18, SNAP-25 und ein C-terminales Fragment des Proteins Synaptobrevin (Fasshauer und Margittai, 2004; Pobbati et al., 2006; de Wit et al., 2009). Tatsächlich führte die Expression von Munc18-2 und die Überexpression von SNAP-25 in dieser Arbeit zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl von in TIRFM identifizierten „dead-end“ Vesikeln (Abb. 51 und 57). Die Expression von Stx1A L165A/E166A hatte den gegenteiligen Effekt und resultierte in einem signifikanten Anstieg der Anzahl von „dead-end“ Vesikeln (Abb. 54). Diese Ergebnisse bekräftigen die Theorie zur Entstehung des unproduktiven SNARE-Komplexes aus zwei Syntaxin und einem SNAP-25 Molekül. Gleichzeitig wies die Veränderung der Anzahl von „dead-end“ Vesikeln in allen drei Experimenten darauf hin, dass diese keine Endosomen darstellen. Es ist unwahrscheinlich, dass die Überexpression bzw. Expression von drei verschiedenen Proteinen die Degradierungsrate von LDCVs veränderte, wenn keines dieser Proteine eine bekannte Funktion bei der Degradierung von LDCVs hat.

4.2.3.1 Die Rolle von Munc18 bei der Entstehung von „dead-end“ Vesikeln

Munc18 ist ein wichtiges Chaperon von Syntaxin und transportiert dieses Protein zur PM (Rowe et al., 2001; Medine et al., 2007; Rickman et al., 2007; Han et al., 2010; Han et al., 2011). In der Literatur wurde bereits mehrfach gezeigt, dass ein Defizit von Munc18 in Neuronen und neuroendokrinen Zellen die Konzentration von Syntaxin an der PM um bis zu 70% reduzierte (Verhage et al., 2000; Voets et al., 2001; Weimer und Jorgensen, 2003; Toonen et al., 2005; Arunachalam et al., 2008; de Wit et al., 2009; Han et al., 2009). Voets et al. (2001) publizierten, dass nach der Überexpression von Munc18-1 in bovinen Chromaffinzellen keine Veränderung der Syntaxin-Konzentration an der PM vorlag. Eine höhere Syntaxin-Konzentration an der PM sollte durch die veränderte Stöchiometrie die Bildung von unproduktiven 2:1 Komplexen aus Syntaxin und SNAP-25 begünstigen. In diesem Fall wäre ein Anstieg in der Anzahl von „dead-end“ Vesikeln zu erwarten. Diesem

Prozess wirkt Munc18 als Stabilisator des 1:1 Komplexes entgegen (Zilly et al., 2006; de Wit et al., 2009). In PC12 Zellen wurde ein Verhältnis von Syntaxin-1 und Munc18-1 von 20:1 nachgewiesen, so dass unter natürlichen Bedingungen Munc18 den limitierenden Faktor für den Transport von Syntaxin zur PM darstellt (Schutz et al., 2005). Dies lässt außerdem vermuten, dass Syntaxin-1 nach der Überexpression von Munc18 keinen limitierenden Faktor darstellt, was im Widerspruch zu der publizierten, unveränderten Konzentration von Syntaxin an der PM steht (Voets et al., 2001). In dieser Arbeit war durch die Expression von Munc18-2 eine Abnahme der Anzahl nicht sezernierbarer LDCVs zu beobachten (Abb. 51). Im Bezug auf die Konzentration von Syntaxin an der PM kann dies durch zwei Theorien erklärt werden. Entweder war die Syntaxin-Konzentration an der PM nach Expression von Munc18-2 nicht verändert, so dass der 1:1 Akzeptor SNARE-Komplex durch Munc18-2 stabilisiert wurde und weniger 2:1 Komplexe entstanden. In der anderen Theorie würde die Expression von Munc18-2 zu einer Erhöhung der Syntaxin-Konzentration an der PM führen. In diesem Fall müsste die Stabilisierung des 1:1 SNARE-Komplexes durch Munc18-2 einer verstärkten Ausbildung unproduktiver 2:1 Akzeptor-Komplexe durch mehr Syntaxin-Moleküle überlegen sein. Beide Theorien resultieren in der beobachteten Reduktion der Anzahl von „dead-end“ Vesikeln. Leider waren alle Versuche, die Syntaxin-Konzentration an der PM in Munc18-2 exprimierenden Zellen zu bestimmen, nicht erfolgreich. Somit kann nicht verifiziert werden, welche der zwei beschriebenen Situationen in Munc18-2 exprimierenden Zellen vorlag.

Eine weitere Ursache könnte für die von Voets et al. (2001) berichtete, unveränderte Konzentration von Syntaxin-Molekülen an der PM nach Überexpression von Munc18-1 verantwortlich sein. Denkbar wäre eine Regulierung der Bindung von Munc18 und Syntaxin vor dem Erreichen der PM. Dies könnte z. B. durch die Phosphorylierung von Munc18 mittels PKC geschehen, wodurch die Interaktion von ungebundenem Munc18 mit Syntaxin verhindert wird (Fujita et al., 1996; Misura et al., 2000; Toonen und Verhage, 2003; Nili et al., 2006).

Außer der Anzahl nicht sezernierbarer LDCVs zeigten die in dieser Arbeit aufgezeichneten TIRFM-Filme keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Munc18-2-exprimierenden Zellen (Abb. 51). In der Literatur wurde dagegen mit Hilfe von EM-Bildern ein leicht verstärkter Docking-Phänotyp nach Überexpression von Munc18-1 entdeckt (Nili et al., 2006; Toonen et al., 2006). Dafür ist auch das Ausdünnen des F-Aktins bei Überexpression von Munc18-1 verantwortlich, was einen schnelleren Transport von LDCVs aus dem DP zur PM möglich macht (Toonen et al., 2006; de Wit et al., 2009). Dies hat eine Erhöhung der Anzahl gedockter LDCVs zur Folge. Die Definition von morphologisch gedockten LDCVs in EM Bildern besagt, dass sich diese in Kontakt mit der PM befinden, oder nur einen geringen Abstand zu ihr haben (weniger als 100 nm) (Weimer und Jorgensen, 2003). Die TIRFM

erlaubt einen Einblick in die Zelle mit einer Tiefe bis zu 300 nm (Axelrod, 1981; Johns et al., 2001; Karatekin et al., 2008). Nach Überexpression von Munc18-1 blieb die Gesamtzahl der LDCVs pro Zelle in der Literatur unverändert im Vergleich zu Kontrollzellen (Nili et al., 2006; Toonen et al., 2006). Ein geringer Unterschied in der Anzahl gedockter LDCVs kann durch die recht hohe Eindringtiefe von TIRFM übersehen werden, wenn die Gesamtzahl von LDCVs unverändert bleibt. Dies erklärt, warum in den hier durchgeführten Experimenten die Expression von Munc18-2 keine Auswirkung auf die Größe der Pools gedockter LDCVs hatte.

Neben der erhöhten Anzahl gedockter LDCVs verursachte die Überexpression von Munc18-1 in der Literatur zusätzlich eine verstärkte Sekretion in Chromaffinzellen (Voets et al., 2001; Nili et al., 2006; Toonen et al., 2006; Gulyás-Kovács et al., 2007). Die verzögerte Komponente der Sekretionsantwort war in diesen Publikationen signifikant erhöht, was durch die gesteigerte Anzahl gedockter LDCVs und ein schnelleres Auffüllen der membranären Vesikelpools erklärbar war. Im Gegensatz dazu führte die Expression von Munc18-2 in bovinen Chromaffinzellen zu einer signifikanten Reduktion der verzögerten Sekretionsphase (Gulyás-Kovács et al., 2007). Die Autoren postulieren, dass dies an der starken Konkurrenz des exprimierten Munc18-2 mit dem natürlich in den Zellen vorhandenen Munc18-1 um die Bindung mit Syntaxin lag. Obwohl nach Expression von Munc18-2 die Sekretion in dieser Arbeit nicht signifikant verändert war, ist eine Tendenz in Übereinstimmung mit Gulyás-Kovács et al. (2007) zu erkennen. Die Sekretion in Munc18-2 exprimierenden Zellen blieb leicht hinter der von Kontrollzellen zurück (Abb. 49).

4.2.3.2 Die Rolle von Syntaxin bei der Entstehung von „dead-end“ Vesikeln

In dieser Arbeit wurde eine mutierte Form von Syntaxin exprimiert (Stx1A L165A/E166A), welche nur in der offenen Konformation vorliegt. Somit spielte Munc18-1 als limitierender Faktor keine Rolle für den Transport von Syntaxin zur PM (Dulubova et al., 1999). *In vitro* wurde dagegen gezeigt, dass Stx1A L165A/E166A und Munc18-1 eine starke Bindung eingehen können, welche keinen negativen Einfluss auf die Ausbildung des SNARE-Komplexes hatte (Burkhardt et al., 2008). Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass diese Bindung essentiell ist, um den Transport von Stx1A L165A/E166A zur PM zu ermöglichen. Die Expression des mutierten Syntaxins führte in Publikationen zu Veränderungen im Docking und/oder der Sekretion im Vergleich zum Wildtyp und zu Mutanten, in welchen dieses Protein exprimiert wurde (Gerber et al., 2008; Liu et al., 2010). Dies belegt, dass ausreichend Syntaxin Moleküle die PM und damit den Ort des Dockings und der Sekretion erreichen.

Eine Alternative zur Verwendung von Stx1A L165A/E166A stellt die Ko-Expression von Munc18-1 und Syntaxin-1 dar, wodurch ein Defizit von Munc18-1 umgangen wird (Rowe et

al., 2001). Dies war hier nicht möglich, da die Expression von Munc18-2 eine Reduktion der Anzahl von „dead-end“ Vesikeln zeigte und von der Expression des Syntaxins der gegenteilige Effekt erwartetet wurde. Eine gleichzeitige Expression von Munc18 hätte den Effekt von Syntaxin somit verdecken können.

Die Expression von Stx1A L165A/E166A führte in dieser Arbeit zu einer leichten, jedoch nicht signifikanten Reduktion der Sekretion (Abb. 52). Diese Tendenz stimmt mit der Literatur überein, wo von einer signifikanten Abnahme der verzögerten Sekretionskomponente nach Expression von Stx1A L165A/E166A in Chromaffinzellen berichtet wurde (Gerber et al., 2008; Liu et al., 2010). Die verringerte Sekretion ging in der Literatur einher mit einer Reduktion der Anzahl gedockter LDCVs, was auch in dieser Arbeit der Fall war. Die Anzahl der LDCVs in TIRFM in Stx1A L165A/E166A exprimierenden Zellen war zu Beginn der Experimente um 18,7% reduziert ($p=0,069$; Abb. 54 und Tab. 4). Da sich die Gesamtzahl der LDCVs pro Zelle nach Expression von Stx1A L165A/E166A laut Literatur nicht veränderte (Gerber et al., 2008), erklärt dies die Detektion eines nur leichten Effektes im Docking in dieser Arbeit.

Die Expression von Stx1A L165A/E166A führte bei Stimulation mit $6 \mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$ zu einer signifikanten Zunahme der nicht sezernierbaren LDCVs (Abb. 54 und Tab. 4). Der Anteil von „dead-end“ Vesikeln stieg von $15,0 \pm 1,9\%$ in Kontrollzellen auf $30,0 \pm 2,0\%$ in Stx1A L165A/E166A exprimierenden Zellen, was eine Verdopplung darstellt (Abb. 54; $p<0,001$). Gleichzeitig nahm die Anzahl von Neuankömmlingen ab, so dass die Austauschrate von LDCVs an der PM nach Expression von Stx1A L165A/E166A reduziert war. Da mehr SNARE-Komplexe von nicht sezernierbaren LDCVs blockiert waren, konnten weniger Neuankömmlinge an freie Akzeptor-Komplexe docken.

4.2.3.3 Die Rolle von SNAP-25 bei der Entstehung von „dead-end“ Vesikeln

Auch bei Überexpression von SNAP-25 zeigten die Zellen keinen Unterschied in der Anzahl sezernierter LDCVs (Abb. 55). Dies ist in Übereinstimmung mit der Literatur, wo in bovinen Chromaffinzellen die Überexpression von SNAP-25 zu keiner Veränderung der verzögerten Komponente nach Stimulation mit UV-Blitzlichtphotolyse von NP-EGTA führte (Criado et al., 1999; Wei et al., 2000; Nagy et al., 2004). Im Gegensatz dazu zeigten SNAP-25 überexprimierende murine Chromaffinzellen eine deutlich erhöhte verzögerte Sekretionskomponente (Sørensen et al., 2003), so dass es hier Unterschiede zwischen Zellen verschiedener Spezies zu geben scheint. Im Docking war dagegen kein Unterschied nach Überexpression von SNAP-25 in murinen Chromaffinzellen zu erkennen (de Wit et al., 2009), vergleichbar mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Die Anzahl gedockter LDCVs änderte sich nach Überexpression von SNAP-25 nicht (Abb. 57).

Die Anzahl der Neuankömmlinge zeigte nach Überexpression von SNAP-25 eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 57). Dies zeichnete sich bei Expression von Munc18-2 bereits ab, war dort aber nicht signifikant (Abb. 51). Die Erhöhung der Anzahl von Neuankömmlingen führte dazu, dass die Dichte der LDCVs nach 5 min Stimulation sowohl bei Expression von Munc18-2 als auch bei Überexpression von SNAP-25 leicht, jedoch nicht signifikant erhöht war. Die (Über-)Expression jedes der beiden Proteine führte in dieser Arbeit zu einer Reduktion der Anzahl von „dead-end“ Vesikeln. Dadurch waren mehr funktionelle SNARE-Komplexe vorhanden, an welche LDCVs docken konnten. Nach der Fusion standen diese Komplexe erneut zur Verfügung. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen war die Anzahl fusionierter LDCVs nach Expression von Munc18-2 oder Überexpression von SNAP-25 jedoch nicht verändert. Erklärbar ist dies, wenn in den Zellen ein oder mehrere Primingfaktoren in limitierter Anzahl vorliegen. Trotz mehr funktioneller SNARE-Komplexe könnten nicht mehr LDCVs den Priming-Schritt durchlaufen, Fusionskompetenz erhalten und fusionieren. Die gedockten LDCVs müssen allerdings nicht fusionieren um den SNARE-Komplex für neue LDCVs nutzbar zu machen. Der Docking-Schritt ist reversibel, so dass gedockte LDCVs die PM wieder in Richtung Zytosol verlassen können (Oheim et al., 1998), was zu einer Erhöhung der Anzahl von Neuankömmlingen führen kann. Die Anzahl der LDCVs, welche die PM ohne Fusion verlassen und sich Richtung Zytosol bewegen, konnte in dieser Arbeit nicht analysiert werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass dieser Wert in Zellen, welche SNAP-25 überexprimierten oder Munc18-2 exprimierten, erhöht war.

Eine weitere Erklärung für die erhöhte Anzahl von Neuankömmlingen nach Überexpression von SNAP-25 oder Expression von Munc18-2 wäre die Entstehung zusätzlicher Docking-Stellen für LDCVs während den Messungen. Die Anzahl der Neuankömmlinge wurde im letzten Bild der TIRFM-Filme bestimmt, also nach 5 min Stimulation. Zu Beginn der Experimente lagen die (über)exprimierten Proteine bereits in erhöhter Konzentration vor, hier war die Anzahl der LDCVs in TIRFM jedoch unverändert im Vergleich mit Kontrollzellen (Abb. 51 und 57). Somit scheint die Entstehung neuer Docking-Stellen unabhängig von den (über)exprimierten Proteinen, aber abhängig von Ca^{2+} bzw. von den hohen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induziert zu sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass der nicht produktive SNARE-Komplex *in vivo* existiert und für die Entstehung von „dead-end“ Vesikeln verantwortlich sein könnte. Um dies zu beweisen, müssten weitere Experimente durchgeführt werden, zum Beispiel die Expression eines C-terminalen Fragmentes von Synaptobrevin. Für dieses wurde bereits gezeigt, dass es den 1:1 Komplex stabilisiert und damit die Bildung von 2:1 Komplexen verhindert (Pobbati et al., 2006). Dieses Experiment sollte ähnliche Ergebnisse wie die

Expression von Munc18-2 und die Überexpression SNAP-25 zeigen, welche ebenfalls den 1:1 Komplex stabilisieren. Daraus könnte geschlossen werden, dass alle drei Proteine denselben Mechanismus beeinflussen und nicht sezernierbare LDCVs tatsächlich durch die Bildung der nicht produktiven SNARE-Komplexe entstehen. Es ist jedoch unklar, ob Fragmente von Synaptobrevin in den Zellen erhalten oder sofort degradiert werden. Nach der Proteolyse von Synaptobrevin durch das Tetanus-Toxin konnten die einzelnen Fragmente nicht nachgewiesen werden (Link et al., 1992). Diese Frage müsste vor Beginn der Experimente geklärt werden.

Des Weiteren sollte untersucht werden, welches vesikuläre Protein in den Prozess des „dead-end“ Dockings involviert ist. Es wurde postuliert, dass die Bindung des zweiten Syntaxin-Moleküls an den 1:1 Komplex die Bindungsstelle für Synaptobrevin-2 blockiert, so dass kein Priming möglich ist (Fasshauer et al., 1997; Margittai et al., 2001; Xiao et al., 2001; Zhang et al., 2002). Da die LDCVs an den 2:1 Komplex binden können und Synaptotagmin beim Docking eine Rolle spielt, ist zu vermuten, dass Synaptotagmin für die Bindung von LDCVs an nicht produktive SNARE-Komplexe verantwortlich ist. Ob Synaptotagmin überhaupt an den 2:1 Komplex binden kann, ist jedoch nicht bekannt.

In weiteren Experimenten sollte die Hypothese von Verhage und Sørensen untersucht werden, welche besagt, dass die „dead-end“ Vesikel aus ihrem Zustand wieder freigesetzt werden können, um anschließend den regulären Sekretionszyklus zu durchlaufen (Verhage und Sørensen, 2008). Denkbar wäre z. B. eine Phosphorylierung bestimmter Proteine als „Signal“ zur Sekretion an Stelle einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. Die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ von 6 auf 15 μM zeigte in den hier durchgeführten Experimenten keine Veränderung der Anzahl nicht sezernierbarer LDCVs, so dass dies für die Modulation des molekularen Mechanismus ausgeschlossen werden kann. In allen durchgeführten Messungen dieser Arbeit war der Anteil an „dead-end“ Vesikeln in Kontrollzellen sehr konstant. Ihr Anteil in bovinen Chromaffinzellen lag stets bei ca. 15% (Tab. 2-5), was ein Hinweis darauf ist, dass ein Mechanismus zur Regulation der Entstehung dieser nicht sezernierbaren LDCVs existiert. Dies lässt auch vermuten, dass „dead-end“ Vesikel eine Funktion erfüllen, da ein Regulationsmechanismus ansonsten keinen Sinn machen würde.

5. Literaturverzeichnis

Abbe, E. (1873). "Beiträge zur Theorie des Mikroskops und ihrer mikroskopischen Wahrnehmung." Arch Mikrosk Anat **9**: 411-468.

Agrawal, A., R. Adachi, M. Tuvim, X. T. Yan, A. H. Teich und B. F. Dickey (2000). "Gene structure and promoter function of murine Munc18-2, a nonneuronal exocytic Sec1 homolog." Biochem Biophys Res Commun **276**(3): 817-822.

Allersma, M. W., M. A. Bittner, D. Axelrod und R. W. Holz (2006). "Motion matters: secretory granule motion adjacent to the plasma membrane and exocytosis." Mol Biol Cell **17**(5): 2424-2438.

Almers, W. (1978). "Gating currents and charge movements in excitable membranes." Rev Physiol Biochem Pharmacol **82**: 96-190.

Archer, D. A., M. E. Graham und R. D. Burgoyne (2002). "Complexin regulates the closure of the fusion pore during regulated vesicle exocytosis." J Biol Chem **277**(21): 18249-18252.

Armstrong, D. und R. Eckert (1987). "Voltage-activated calcium channels that must be phosphorylated to respond to membrane depolarization." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(8): 2518-2522.

Artalejo, C. R., M. E. Adams und A. P. Fox (1994). "Three types of Ca²⁺ channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells." Nature **367**(6458): 72-76.

Artalejo, C. R., A. Elhamdani und H. C. Palfrey (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): 6358-6363.

Arunachalam, L., L. Han, N. G. Tassew, Y. He, L. Wang, L. Xie, Y. Fujita, E. Kwan, B. Davletov, P. P. Monnier, H. Y. Gaisano und S. Sugita (2008). "Munc18-1 is critical for plasma membrane localization of syntaxin1 but not of SNAP-25 in PC12 cells." Mol Biol Cell **19**(2): 722-734.

Ashery, U., F. Varoqueaux, T. Voets, A. Betz, P. Thakur, H. Koch, E. Neher, N. Brose und J. Rettig (2000). "Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells." Embo J **19**(14): 3586-3596.

Augustin, I., C. Rosenmund, T. C. Sudhof und N. Brose (1999). "Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles." Nature **400**(6743): 457-461.

Axelrod, D. (1981). "Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence." J Cell Biol **89**(1): 141-145.

Axelrod, J. und T. D. Reisine (1984). "Stress hormones: their interaction and regulation." Science **224**(4648): 452-459.

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

- Bai, J., W. C. Tucker und E. R. Chapman (2004). "PIP2 increases the speed of response of synaptotagmin and steers its membrane-penetration activity toward the plasma membrane." Nat Struct Mol Biol **11**(1): 36-44.
- Baker, P. F. und D. E. Knight (1978). "Calcium-dependent exocytosis in bovine adrenal medullary cells with leaky plasma membranes." Nature **276**(5688): 620-622.
- Banerjee, A., V. A. Barry, B. R. DasGupta und T. F. Martin (1996). "N-Ethylmaleimide-sensitive factor acts at a prefusion ATP-dependent step in Ca²⁺-activated exocytosis." J Biol Chem **271**(34): 20223-20226.
- Barclay, J. W., T. J. Craig, R. J. Fisher, L. F. Ciufo, G. J. Evans, A. Morgan und R. D. Burgoyne (2003). "Phosphorylation of Munc18 by protein kinase C regulates the kinetics of exocytosis." J Biol Chem **278**(12): 10538-10545.
- Becherer, U. und J. Rettig (2006). "Vesicle pools, docking, priming, and release." Cell Tissue Res **326**(2): 393-407.
- Becherer, U., M. Pasche, S. Nofal, D. Hof, U. Matti und J. Rettig (2007). "Quantifying exocytosis by combination of membrane capacitance measurements and total internal reflection fluorescence microscopy in chromaffin cells." PLoS ONE **2**(6): e505.
- Berberian, K., A. J. Torres, Q. Fang, K. Kisler und M. Lindau (2009). "F-actin and myosin II accelerate catecholamine release from chromaffin granules." J Neurosci **29**(3): 863-870.
- Berwin, B., E. Floor und T. F. Martin (1998). "CAPS (mammalian UNC-31) protein localizes to membranes involved in dense-core vesicle exocytosis." Neuron **21**(1): 137-145.
- Betz, A., M. Okamoto, F. Benseler und N. Brose (1997). "Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin." J Biol Chem **272**(4): 2520-2526.
- Bhaskar, K., M. M. Shareef, V. M. Sharma, A. P. Shetty, Y. Ramamohan, H. C. Pant, T. R. Raju und K. T. Shetty (2004). "Co-purification and localization of Munc18-1 (p67) and Cdk5 with neuronal cytoskeletal proteins." Neurochem Int **44**(1): 35-44.
- Biederer, T. und T. C. Südhof (2000). "Mints as adaptors. Direct binding to neurexins and recruitment of munc18." J Biol Chem **275**(51): 39803-39806.
- Bittner, M. A. und R. W. Holz (1992). "A temperature-sensitive step in exocytosis." J Biol Chem **267**(23): 16226-16229.
- Bittner, M. A. und R. W. Holz (2005). "Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate: actin dynamics and the regulation of ATP-dependent and -independent secretion." Mol Pharmacol **67**(4): 1089-1098.
- Borisovska, M., Y. Zhao, Y. Tsytsyura, N. Glyvuk, S. Takamori, U. Matti, J. Rettig, T. Südhof und D. Bruns (2005). "v-SNAREs control exocytosis of vesicles from priming to fusion." Embo J **24**(12): 2114-2126.
- Bossu, J. L., M. De Waard und A. Feltz (1991). "Inactivation characteristics reveal two calcium currents in adult bovine chromaffin cells." J Physiol **437**: 603-620.
- Brunger, A. T. (2001). "Structural insights into the molecular mechanism of calcium-dependent vesicle-membrane fusion." Curr Opin Struct Biol **11**(2): 163-173.

- Bruns, D. und R. Jahn (2002). "Molecular determinants of exocytosis." Pflugers Arch **443**(3): 333-338.
- Bruns, D. (2004). "Detection of transmitter release with carbon fiber electrodes." Methods **33**(4): 312-321.
- Buckley, J. T., Y. A. Lefebvre und J. N. Hawthorne (1971). "Identification of an actively phosphorylated component of adrenal medulla chromaffin granules." Biochim Biophys Acta **239**(3): 517-519.
- Burgoyne, R. D. (1995). "Fast exocytosis and endocytosis triggered by depolarisation in single adrenal chromaffin cells before rapid Ca²⁺ current run-down." Pflugers Arch **430**(2): 213-219.
- Burgoyne, R. D. und A. Morgan (1998). "Analysis of regulated exocytosis in adrenal chromaffin cells: insights into NSF/SNAP/SNARE function." Bioessays **20**(4): 328-335.
- Burgoyne, R. D. und A. Morgan (2003). "Secretory granule exocytosis." Physiol Rev **83**(2): 581-632.
- Burkhardt, P., D. A. Hattendorf, W. I. Weis und D. Fasshauer (2008). "Munc18a controls SNARE assembly through its interaction with the syntaxin N-peptide." Embo J **27**(7): 923-933.
- Burnstock, G. (2006). "Historical review: ATP as a neurotransmitter." Trends Pharmacol Sci **27**(3): 166-176.
- Calakos, N., S. Schoch, T. C. Sudhof und R. C. Malenka (2004). "Multiple roles for the active zone protein RIM1alpha in late stages of neurotransmitter release." Neuron **42**(6): 889-896.
- Campbell, N. A., J. B. Reece (2003). "Biologie". Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 3. Auflage
- Castro, E., J. Mateo, A. R. Tome, R. M. Barbosa, M. T. Miras-Portugal und L. M. Rosario (1995). "Cell-specific purinergic receptors coupled to Ca²⁺ entry and Ca²⁺ release from internal stores in adrenal chromaffin cells. Differential sensitivity to UTP and suramin." J Biol Chem **270**(10): 5098-5106.
- Catterall, W. A. (2000). "Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 521-555.
- Ceridono, M., S. Ory, F. Momboisse, S. Chasserot-Golaz, S. Houy, V. Calco, A. M. Haeberle, V. Demais, Y. Bailly, M. F. Bader und S. Gasman (2011). "Selective recapture of secretory granule components after full collapse exocytosis in neuroendocrine chromaffin cells." Traffic **12**(1): 72-88.
- Cens, T., S. Restituito, S. Galas und P. Charnet (1999). "Voltage and calcium use the same molecular determinants to inactivate calcium channels." J Biol Chem **274**(9): 5483-5490.
- Chapman, E. R. (2002). "Synaptotagmin: a Ca²⁺ sensor that triggers exocytosis?" Nat Rev Mol Cell Biol **3**(7): 498-508.
- Chen, Y. A. und R. H. Scheller (2001). "SNARE-mediated membrane fusion." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 98-106.

- Chung, S. H., W. J. Song, K. Kim, J. J. Bednarski, J. Chen, G. D. Prestwich und R. W. Holz (1998). "The C2 domains of Rabphilin3A specifically bind phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate containing vesicles in a Ca²⁺-dependent manner. In vitro characteristics and possible significance." J Biol Chem **273**(17): 10240-10248.
- Churchward, M. A. und J. R. Coorssen (2009). "Cholesterol, regulated exocytosis and the physiological fusion machine." Biochem J **423**(1): 1-14.
- Cole, K. S. (1968). "Membrane watching." J Gen Physiol **51**(5): 1-7.
- Criado, M., A. Gil, S. Viniegra und L. M. Gutierrez (1999). "A single amino acid near the C terminus of the synaptosome-associated protein of 25 kDa (SNAP-25) is essential for exocytosis in chromaffin cells." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(13): 7256-7261.
- Currie, K. P. und A. P. Fox (1996). "ATP serves as a negative feedback inhibitor of voltage-gated Ca²⁺ channel currents in cultured bovine adrenal chromaffin cells." Neuron **16**(5): 1027-1036.
- de Wit, H., L. N. Cornelisse, R. F. Toonen und M. Verhage (2006). "Docking of secretory vesicles is syntaxin dependent." PLoS One **1**: e126.
- de Wit, H., A. M. Walter, I. Milosevic, A. Gulyás-Kovács, D. Riedel, J. B. Sørensen und M. Verhage (2009). "Synaptotagmin-1 docks secretory vesicles to syntaxin-1/SNAP-25 acceptor complexes." Cell **138**(5): 935-946.
- de Wit, H. (2010). "Molecular mechanism of secretory vesicle docking." Biochem Soc Trans **38**(1): 192-198.
- de Wit, H. (2010). "Morphological docking of secretory vesicles." Histochem Cell Biol **134**(2): 103-113.
- Dernick, G., L. W. Gong, L. Tabares, G. Alvarez de Toledo und M. Lindau (2005). "Patch amperometry: high-resolution measurements of single-vesicle fusion and release." Nat Methods **2**(9): 699-708.
- Desnos, C., S. Huet, I. Fanget, C. Chapuis, C. Bottiger, V. Racine, J. B. Sibarita, J. P. Henry und F. Darchen (2007). "Myosin Va mediates docking of secretory granules at the plasma membrane." J Neurosci **27**(39): 10636-10645.
- Detimary, P., C. Xiao und J. C. Henquin (1997). "Tight links between adenine and guanine nucleotide pools in mouse pancreatic islets: a study with mycophenolic acid." Biochem J **324**(2): 467-471.
- Di Paolo, G. and P. De Camilli (2006). "Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics". Nature **443**(7112):651-657.
- Diverse-Pierluissi, M., K. Dunlap und E. W. Westhead (1991). "Multiple actions of extracellular ATP on calcium currents in cultured bovine chromaffin cells." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(4): 1261-1265.
- Dulubova, I., S. Sugita, S. Hill, M. Hosaka, I. Fernandez, T. C. Sudhof und J. Rizo (1999). "A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18." Embo J **18**(16): 4372-4382.

- Dulubova, I., M. Khvotchev, S. Liu, I. Huryeva, T. C. Sudhof und J. Rizo (2007). "Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(8): 2697-2702.
- Duncan, R. R., J. Greaves, U. K. Wiegand, I. Matskevich, G. Bodammer, D. K. Apps, M. J. Shipston und R. H. Chow (2003). "Functional and spatial segregation of secretory vesicle pools according to vesicle age." Nature **422**(6928): 176-180.
- Dunn, L. A. und R. W. Holz (1983). "Catecholamine secretion from digitonin-treated adrenal medullary chromaffin cells." J Biol Chem **258**(8): 4989-4993.
- Eberhard, D. A., C. L. Cooper, M. G. Low und R. W. Holz (1990). "Evidence that the inositol phospholipids are necessary for exocytosis. Loss of inositol phospholipids and inhibition of secretion in permeabilized cells caused by a bacterial phospholipase C and removal of ATP." Biochem J **268**(1): 15-25.
- Eichberg, J. und R. M. Dawson (1965). "Polyphosphoinositides in myelin." Biochem J **96**(3): 644-650.
- Elhamdani, A., J. L. Bossu und A. Feltz (1995). "ATP and G proteins affect the runup of the Ca²⁺ current in bovine chromaffin cells." Pflugers Arch **430**(3): 410-419.
- Elhamdani, A., J. L. Bossu und A. Feltz (1995a). "ADP exerts a protective effect against rundown of the Ca²⁺ current in bovine chromaffin cells." Pflugers Arch **430**(3): 401-409.
- Engisch, K. L. und M. C. Nowycky (1998). "Compensatory and excess retrieval: two types of endocytosis following single step depolarizations in bovine adrenal chromaffin cells." J Physiol **506**(3): 591-608.
- Fang, Q., K. Berberian, L. W. Gong, I. Hafez, J. B. Sørensen und M. Lindau (2008). "The role of the C terminus of the SNARE protein SNAP-25 in fusion pore opening and a model for fusion pore mechanics." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(40): 15388-15392.
- Fasshauer, D., D. Bruns, B. Shen, R. Jahn und A. T. Brunger (1997). "A structural change occurs upon binding of syntaxin to SNAP-25." J Biol Chem **272**(7): 4582-4590.
- Fasshauer, D., H. Otto, W. K. Eliason, R. Jahn und A. T. Brunger (1997). "Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation." J Biol Chem **272**(44): 28036-28041.
- Fasshauer, D., R. B. Sutton, A. T. Brunger und R. Jahn (1998). "Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15781-15786.
- Fasshauer, D. (2003). "Structural insights into the SNARE mechanism." Biochim Biophys Acta **1641**(2-3): 87-97.
- Fasshauer, D. und M. Margittai (2004). "A transient N-terminal interaction of SNAP-25 and syntaxin nucleates SNARE assembly." J Biol Chem **279**(9): 7613-7621.
- Fejtova, A. und E. D. Gundelfinger (2006). "Molecular organization and assembly of the presynaptic active zone of neurotransmitter release." Results Probl Cell Differ **43**: 49-68.
- Fenwick, E. M., A. Marty und E. Neher (1982). "A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine." J Physiol **331**: 577-597.

- Fiebig, K. M., L. M. Rice, E. Pollock und A. T. Brunger (1999). "Folding intermediates of SNARE complex assembly." Nat Struct Biol **6**(2): 117-123.
- Fisher, R. J., J. Pevsner und R. D. Burgoyne (2001). "Control of fusion pore dynamics during exocytosis by Munc18." Science **291**(5505): 875-878.
- Friedrich, R., A. J. Groffen, E. Connell, J. R. van Weering, O. Gutman, Y. I. Henis, B. Davletov und U. Ashery (2008). "DOC2B acts as a calcium switch and enhances vesicle fusion." J Neurosci **28**(27): 6794-6806.
- Fujita, Y., T. Sasaki, K. Fukui, H. Kotani, T. Kimura, Y. Hata, T. C. Sudhof, R. H. Scheller und Y. Takai (1996). "Phosphorylation of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 by protein kinase C: its implication in regulating the interaction of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 with syntaxin." J Biol Chem **271**(13): 7265-7268.
- Fulop, T. und C. Smith (2006). "Physiological stimulation regulates the exocytic mode through calcium activation of protein kinase C in mouse chromaffin cells." Biochem J **399**(1): 111-119.
- Gandia, L., A. G. Garcia und M. Morad (1993). "ATP modulation of calcium channels in chromaffin cells." J Physiol **470**: 55-72.
- Garcia, E. P., E. Gatti, M. Butler, J. Burton und P. De Camilli (1994). "A rat brain Sec1 homologue related to Rop and UNC18 interacts with syntaxin." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(6): 2003-2007.
- Genoud, S., W. Pralong, B. M. Riederer, L. Eder, S. Catsicas und D. Muller (1999). "Activity-dependent phosphorylation of SNAP-25 in hippocampal organotypic cultures." J Neurochem **72**(4): 1699-1706.
- Gerber, S. H., J. C. Rah, S. W. Min, X. Liu, H. de Wit, I. Dulubova, A. C. Meyer, J. Rizo, M. Arancillo, R. E. Hammer, M. Verhage, C. Rosenmund und T. C. Sudhof (2008). "Conformational switch of syntaxin-1 controls synaptic vesicle fusion." Science **321**(5895): 1507-1510.
- Gillis, K. D., R. Mossner und E. Neher (1996). "Protein kinase C enhances exocytosis from chromaffin cells by increasing the size of the readily releasable pool of secretory granules." Neuron **16**(6): 1209-1220.
- Grishanin, R. N., V. A. Klenchin, K. M. Loyet, J. A. Kowalchuk, K. Ann und T. F. Martin (2002). "Membrane association domains in Ca^{2+} -dependent activator protein for secretion mediate plasma membrane and dense-core vesicle binding required for Ca^{2+} -dependent exocytosis." J Biol Chem **277**(24): 22025-22034.
- Grishanin, R. N., J. A. Kowalchuk, V. A. Klenchin, K. Ann, C. A. Earles, E. R. Chapman, R. R. Gerona und T. F. Martin (2004). "CAPS acts at a prefusion step in dense-core vesicle exocytosis as a PIP_2 binding protein." Neuron **43**(4): 551-562.
- Groffen, A. J., E. C. Brian, J. J. Dudok, J. Kampmeijer, R. F. Toonen und M. Verhage (2004). " Ca^{2+} -induced recruitment of the secretory vesicle protein DOC2B to the target membrane." J Biol Chem **279**(22): 23740-23747.
- Groffen, A. J., R. Friedrich, E. C. Brian, U. Ashery und M. Verhage (2006). "DOC2A and DOC2B are sensors for neuronal activity with unique calcium-dependent and kinetic properties." J Neurochem **97**(3): 818-833.

- Gryniewicz, G., M. Poenie und R. Y. Tsien (1985). "A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties." J Biol Chem **260**(6): 3440-3450.
- Gubernator, N. G., H. Zhang, R. G. Staal, E. V. Mosharov, D. B. Pereira, M. Yue, V. Balsanek, P. A. Vadola, B. Mukherjee, R. H. Edwards, D. Sulzer und D. Sames (2009). "Fluorescent false neurotransmitters visualize dopamine release from individual presynaptic terminals." Science **324**(5933): 1441-1444.
- Gulyás-Kovács, A., H. de Wit, I. Milosevic, O. Kochubey, R. Toonen, J. Klingauf, M. Verhage und J. B. Sørensen (2007). "Munc18-1: sequential interactions with the fusion machinery stimulate vesicle docking and priming." J Neurosci **27**(32): 8676-8686.
- Han, G. A., N. T. Malintan, B. M. Collins, F. A. Meunier und S. Sugita (2010). "Munc18-1 as a key regulator of neurosecretion." J Neurochem **115**(1): 1-10.
- Han, G. A., N. T. Malintan, N. M. Saw, L. Li, L. Han, F. A. Meunier, B. M. Collins und S. Sugita (2011). "Munc18-1 domain-1 controls vesicle docking and secretion by interacting with syntaxin-1 and chaperoning it to the plasma membrane." Mol Biol Cell **22**(21): 4134-4149.
- Han, X., C. T. Wang, J. Bai, E. R. Chapman und M. B. Jackson (2004). "Transmembrane segments of syntaxin line the fusion pore of Ca^{2+} -triggered exocytosis." Science **304**(5668): 289-292.
- Han, L., T. Jiang, G. A. Han, N. T. Malintan, L. Xie, L. Wang, F. W. Tse, H. Y. Gaisano, B. M. Collins, F. A. Meunier und S. Sugita (2009). "Rescue of Munc18-1 and -2 double knockdown reveals the essential functions of interaction between Munc18 and closed syntaxin in PC12 cells." Mol Biol Cell **20**(23): 4962-4975.
- Hanson, P. I., J. E. Heuser und R. Jahn (1997). "Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes." Curr Opin Neurobiol **7**(3): 310-315.
- Harkins, A. B. und A. P. Fox (2000). "Activation of purinergic receptors by ATP inhibits secretion in bovine adrenal chromaffin cells." Brain Res **885**(2): 231-239.
- Hata, Y., C. A. Slaughter und T. C. Südhof (1993). "Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin." Nature **366**(6453): 347-351.
- Hata, Y. und T. C. Südhof (1995). "A novel ubiquitous form of Munc-18 interacts with multiple syntaxins. Use of the yeast two-hybrid system to study interactions between proteins involved in membrane traffic." J Biol Chem **270**(22): 13022-13028.
- Hay, J. C. und T. F. Martin (1992). "Resolution of regulated secretion into sequential MgATP-dependent and calcium-dependent stages mediated by distinct cytosolic proteins." J Cell Biol **119**(1): 139-151.
- Hay, J. C. und T. F. Martin (1993). "Phosphatidylinositol transfer protein required for ATP-dependent priming of Ca^{2+} -activated secretion." Nature **366**(6455): 572-575.
- Hay, J. C., P. L. Fiset, G. H. Jenkins, K. Fukami, T. Takenawa, R. A. Anderson und T. F. Martin (1995). "ATP-dependent inositolide phosphorylation required for Ca^{2+} -activated secretion." Nature **374**(6518): 173-177.
- Hay, J. C. und R. H. Scheller (1997). "SNAREs and NSF in targeted membrane fusion." Curr Opin Cell Biol **9**(4): 505-512.

- He, L., L. Xue, J. Xu, B. D. McNeil, L. Bai, E. Melicoff, R. Adachi und L. G. Wu (2009). "Compound vesicle fusion increases quantal size and potentiates synaptic transmission." Nature **459**(7243): 93-97.
- Heidelberger, R. (1998). "Adenosine triphosphate and the late steps in calcium-dependent exocytosis at a ribbon synapse." J Gen Physiol **111**(2): 225-241.
- Heidelberger, R. (2001). "ATP is required at an early step in compensatory endocytosis in synaptic terminals." J Neurosci **21**(17): 6467-6474.
- Heidelberger, R., P. Sterling und G. Matthews (2002). "Roles of ATP in depletion and replenishment of the releasable pool of synaptic vesicles." J Neurophysiol **88**(1): 98-106.
- Hokin, L. E. und M. R. Hokin (1964). "The Incorporation of ^{32}P from Triphosphate into Polyphosphoinositides (Gamma- ^{32}P) Adenosine and Phosphatidic Acid in Erythrocyte Membranes." Biochim Biophys Acta **84**: 563-575.
- Holroyd, P., T. Lang, D. Wenzel, P. De Camilli und R. Jahn (2002). "Imaging direct, dynamin-dependent recapture of fusing secretory granules on plasma membrane lawns from PC12 cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(26): 16806-16811.
- Holz, R. W., M. A. Bittner, S. C. Peppers, R. A. Senter und D. A. Eberhard (1989). "MgATP-independent and MgATP-dependent exocytosis. Evidence that MgATP primes adrenal chromaffin cells to undergo exocytosis." J Biol Chem **264**(10): 5412-5419.
- Holz, R. W., M. D. Hlubek, S. D. Sørensen, S. K. Fisher, T. Balla, S. Ozaki, G. D. Prestwich, E. L. Stuenkel und M. A. Bittner (2000). "A pleckstrin homology domain specific for phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PtdIns-4,5-P₂) and fused to green fluorescent protein identifies plasma membrane PtdIns-4,5-P₂ as being important in exocytosis." J Biol Chem **275**(23): 17878-17885.
- Holz, R. W. und D. Axelrod (2002). "Localization of phosphatidylinositol 4,5-P(2) important in exocytosis and a quantitative analysis of chromaffin granule motion adjacent to the plasma membrane." Ann N Y Acad Sci **971**: 232-243.
- Holz, R. W. (2006). "Analysis of the late steps of exocytosis: biochemical and total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) studies." Cell Mol Neurobiol **26**(4-6): 439-447.
- Holz, R. W. und D. Axelrod (2008). "Secretory granule behaviour adjacent to the plasma membrane before and during exocytosis: total internal reflection fluorescence microscopy studies." Acta Physiol (Oxf) **192**(2): 303-307.
- Hu, K., J. Carroll, C. Rickman und B. Davletov (2002). "Action of complexin on SNARE complex." J Biol Chem **277**(44): 41652-41656.
- Husebye, E. S. und T. Flatmark (1988). "Phosphatidylinositol kinase of bovine adrenal chromaffin granules: kinetic properties and inhibition by low concentrations of Ca^{2+} ." Biochim Biophys Acta **968**(2): 261-265.
- Jahn, R. und T. C. Südhof (1999). "Membrane fusion and exocytosis." Annu Rev Biochem **68**: 863-911.
- Jahn, R. und R. H. Scheller (2006). "SNAREs - engines for membrane fusion." Nature Reviews **7**: 631-643.
- Janmey, P. A. und T. P. Stossel (1987). "Modulation of gelsolin function by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate." Nature **325**(6102): 362-364.

- Junge, H. J., J. S. Rhee, O. Jahn, F. Varoqueaux, J. Spiess, M. N. Waxham, C. Rosenmund und N. Brose (2004). "Calmodulin and Munc13 form a Ca^{2+} sensor/effector complex that controls short-term synaptic plasticity." Cell **118**(3): 389-401.
- Johns, L. M., E. S. Levitan, E. A. Shelden, R. W. Holz und D. Axelrod (2001). "Restriction of secretory granule motion near the plasma membrane of chromaffin cells." J Cell Biol **153**(1): 177-190.
- Karatekin, E., V. S. Tran, S. Huet, I. Fanget, S. Cribier und J. P. Henry (2008). "A 20-nm step toward the cell membrane preceding exocytosis may correspond to docking of tethered granules." Biophys J **94**(7): 2891-2905.
- Katz, L., P. I. Hanson, J. E. Heuser und P. Brennwald (1998). "Genetic and morphological analyses reveal a critical interaction between the C-termini of two SNARE proteins and a parallel four helical arrangement for the exocytic SNARE complex." Embo J **17**(21): 6200-6209.
- Kawasaki, F., A. M. Mattiuz und R. W. Ordway (1998). "Synaptic physiology and ultrastructure in comatose mutants define an in vivo role for NSF in neurotransmitter release." J Neurosci **18**(24): 10241-10249.
- Ke, B., E. Oh und D. C. Thurmond (2007). "Doc2beta is a novel Munc18c-interacting partner and positive effector of syntaxin 4-mediated exocytosis." J Biol Chem **282**(30): 21786-21797.
- Klenchin, V. A. und T. F. Martin (2000). "Priming in exocytosis: attaining fusion-competence after vesicle docking." Biochimie **82**(5): 399-407.
- Koh, T. W. und H. J. Bellen (2003). "Synaptotagmin I, a Ca^{2+} sensor for neurotransmitter release." Trends Neurosci **26**(8): 413-422.
- Kostyuk, P. G. (1984). "Intracellular perfusion of nerve cells and its effects on membrane currents." Physiol Rev **64**(2): 435-454.
- Kumakura, K., K. Sasaki, T. Sakurai, M. Ohara-Imaizumi, H. Misonou, S. Nakamura, Y. Matsuda und Y. Nonomura (1994). "Essential role of myosin light chain kinase in the mechanism for MgATP-dependent priming of exocytosis in adrenal chromaffin cells." J Neurosci **14**(12): 7695-7703.
- Lang, T., I. Wacker, I. Wunderlich, A. Rohrbach, G. Giese, T. Soldati und W. Almers (2000). "Role of actin cortex in the subplasmalemmal transport of secretory granules in PC-12 cells." Biophys J **78**(6): 2863-2877.
- Lassing, I. und U. Lindberg (1988). "Specificity of the interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and the profilin:actin complex." J Cell Biochem **37**(3): 255-267.
- Lee, R. W. und J. M. Trifaro (1981). "Characterization of anti-actin antibodies and their use in immunocytochemical studies on the localization of actin in adrenal chromaffin cells in culture." Neuroscience **6**(10): 2087-2108.
- Lim, W., S. J. Kim, H. D. Yan und J. Kim (1997). " Ca^{2+} -channel-dependent and -independent inhibition of exocytosis by extracellular ATP in voltage-clamped rat adrenal chromaffin cells." Pflugers Arch **435**(1): 34-42.

- Lin, R. C. und R. H. Scheller (1997). "Structural organization of the synaptic exocytosis core complex." Neuron **19**(5): 1087-1094.
- Lin, R. C. und R. H. Scheller (2000). "Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 19-49.
- Lindau, M. und E. Neher (1988). "Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells." Pflugers Arch **411**(2): 137-146.
- Link, E., L. Edelmann, J. H. Chou, T. Binz, S. Yamasaki, U. Eisel, M. Baumert, T. C. Sudhof, H. Niemann und R. Jahn (1992). "Tetanus toxin action: inhibition of neurotransmitter release linked to synaptobrevin proteolysis." Biochem Biophys Res Commun **189**(2): 1017-1023.
- Liu, Y., C. Schirra, D. R. Stevens, U. Matti, D. Speidel, D. Hof, D. Bruns, N. Brose und J. Rettig (2008). "CAPS facilitates filling of the rapidly releasable pool of large dense-core vesicles." J Neurosci **28**(21): 5594-5601.
- Liu, Y., C. Schirra, L. Edelmann, U. Matti, J. Rhee, D. Hof, D. Bruns, N. Brose, H. Rieger, D. R. Stevens und J. Rettig (2010). "Two distinct secretory vesicle-priming steps in adrenal chromaffin cells." J Cell Biol **190**(6): 1067-1077.
- Lohmann, A. W., M. Billaud und B. E. Isakson (2012). "Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall". Cardiovascular Research **95**:269–280
- Loyet, K. M., J. A. Kowalchuk, A. Chaudhary, J. Chen, G. D. Prestwich und T. F. Martin (1998). "Specific binding of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate to calcium-dependent activator protein for secretion (CAPS), a potential phosphoinositide effector protein for regulated exocytosis." J Biol Chem **273**(14): 8337-8343.
- Madison, J. M., S. Nurrish und J. M. Kaplan (2005). "UNC-13 interaction with syntaxin is required for synaptic transmission." Curr Biol **15**(24): 2236-2242.
- Margittai, M., D. Fasshauer, S. Pabst, R. Jahn und R. Langen (2001). "Homo- and heterooligomeric SNARE complexes studied by site-directed spin labeling." J Biol Chem **276**(16): 13169-13177.
- Martelli, A. M., G. Baldini, G. Tabellini, D. Koticha, R. Bareggi und G. Baldini (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): 976-986.
- Martin, T. F. (1997). "Stages of regulated exocytosis." Trends Cell Biol **7**(7): 271-276.
- Martin, T. F. (1998). "Phosphoinositide lipids as signalling molecules: Common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation and membrane trafficking". Annu Rev Cell Dev Biol **14**: 231-264
- Martin, T. F. (2001). "PI(4,5)P(2) regulation of surface membrane traffic." Curr Opin Cell Biol **13**(4): 493-499.
- Marz, K. E. und P. I. Hanson (2002). "Sealed with a twist: complexin and the synaptic SNARE complex." Trends Neurosci **25**(8): 381-383.
- McMahon, H. T., M. Missler, C. Li und T. C. Sudhof (1995). "Complexins: cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function." Cell **83**(1): 111-119.

- Medine, C. N., C. Rickman, L. H. Chamberlain und R. R. Duncan (2007). "Munc18-1 prevents the formation of ectopic SNARE complexes in living cells." J Cell Sci **120**(24): 4407-4415.
- Meijer, M., P. Burkhardt, H. de Wit, R. F. Toonen, D. Fasshauer und M. Verhage (2012). "Munc18-1 mutations that strongly impair SNARE-complex binding support normal synaptic transmission." Embo J **31**(9): 2156-2168.
- Milosevic, I., J. B. Sørensen, T. Lang, M. Krauss, G. Nagy, V. Haucke, R. Jahn und E. Neher (2005). "Plasmalemmal phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate level regulates the releasable vesicle pool size in chromaffin cells." J Neurosci **25**(10): 2557-2565.
- Misura, K. M., R. H. Scheller und W. I. Weis (2000). "Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex." Nature **404**(6776): 355-362.
- Mohrmann, R., H. de Wit, M. Verhage, E. Neher und J. B. Sørensen (2010). "Fast vesicle fusion in living cells requires at least three SNARE complexes." Science **330**(6003): 502-505.
- Morgan, A. und R. D. Burgoyne (1997). "Common mechanisms for regulated exocytosis in the chromaffin cell and the synapse." Semin Cell Dev Biol **8**(2): 141-149.
- Morimoto, T. und S. Ogihara (1996). "ATP is required in platelet serotonin exocytosis for protein phosphorylation and priming of secretory vesicles docked on the plasma membrane." J Cell Sci **109**(1): 113-118.
- Muller, T. W. und N. Kirshner (1975). "ATPase and phosphatidylinositol kinase activities of adrenal chromaffin vesicles." J Neurochem **24**(6): 1155-1161.
- Nagy, G., K. Reim, U. Matti, N. Brose, T. Binz, J. Rettig, E. Neher und J. B. Sørensen (2004). "Regulation of Releasable Vesicle Pool Sizes by Protein Kinase A-Dependent Phosphorylation of SNAP-25." Neuron **41**(3): 417-429.
- Nakata, T. und N. Hirokawa (1992). "Organization of cortical cytoskeleton of cultured chromaffin cells and involvement in secretion as revealed by quick-freeze, deep-etching, and double-label immunoelectron microscopy." J Neurosci **12**(6): 2186-2197.
- Neco, P., D. Giner, M. del Mar Frances, S. Viniegra und L. M. Gutierrez (2003). "Differential participation of actin- and tubulin-based vesicle transport systems during secretion in bovine chromaffin cells." Eur J Neurosci **18**(4): 733-742.
- Neher, E. und A. Marty (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): 6712-6716.
- Neher, E. und B. Sakmann (1976). "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres." Nature **260**(5554): 799-802.
- Neher, E. und R. S. Zucker (1993). "Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells." Neuron **10**(1): 21-30.
- Neher, E. und T. Sakaba (2008). "Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release." Neuron **59**(6): 861-872.
- Newton, A. C. (2003). "Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm." Biochem J **370**(Pt 2): 361-371.

- Ng, Y. K., X. Lu und E. S. Levitan (2002). "Physical mobilization of secretory vesicles facilitates neuropeptide release by nerve growth factor-differentiated PC12 cells." J Physiol **542**(2): 395-402.
- Nicholls J.G., M. A. R. (1992). "From neuron to brain: a cellular and molecular approach to the function of the nervous system." Sunderland, Mass, Sinauer Associates.
- Nieler, H. B., F. Onofri, F. Valtorta, G. Schiavo, C. Montecucco, P. Greengard und F. Benfenati (1995). "Phosphorylation of VAMP/synaptobrevin in synaptic vesicles by endogenous protein kinases." J Neurochem **65**(4): 1712-1720.
- Nili, U., H. de Wit, A. Gulyás-Kovács, R. F. Toonen, J. B. Sørensen, M. Verhage und U. Ashery (2006). "Munc18-1 phosphorylation by protein kinase C potentiates vesicle pool replenishment in bovine chromaffin cells." Neuroscience **143**(2): 487-500.
- Nofal, S., U. Becherer, D. Hof, U. Matti und J. Rettig (2007). "Primed vesicles can be distinguished from docked vesicles by analyzing their mobility." J Neurosci **27**(6): 1386-1395.
- Numberger M., D. A. (1996). "Patch-Clamp Technik." Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Oheim, M., D. Loerke, W. Stuhmer und R. H. Chow (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., D. Loerke, R. H. Chow und W. Stuhmer (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): 307-318.
- Oheim, M. und W. Stuhmer (2000). "Tracking chromaffin granules on their way through the actin cortex." Eur Biophys J **29**(2): 67-89.
- Ojala, P. J., V. Paavilainen und P. Lappalainen (2001). "Identification of yeast cofilin residues specific for actin monomer and PIP2 binding." Biochemistry **40**(51): 15562-15569.
- Okamoto, M. und T. C. Südhof (1997). "Mints, Munc18-interacting proteins in synaptic vesicle exocytosis." J Biol Chem **272**(50): 31459-31464.
- Olsen, H. L., M. Hoy, W. Zhang, A. M. Bertorello, K. Bokvist, K. Capito, A. M. Efanov, B. Meister, P. Thams, S. N. Yang, P. Rorsman, P. O. Berggren und J. Gromada (2003). "Phosphatidylinositol 4-kinase serves as a metabolic sensor and regulates priming of secretory granules in pancreatic beta cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5187-5192.
- Ono, K. und H. A. Fozzard (1992). "Phosphorylation restores activity of L-type calcium channels after rundown in inside-out patches from rabbit cardiac cells." J Physiol **454**: 673-688.
- Orita, S., A. Naito, G. Sakaguchi, M. Maeda, H. Igarashi, T. Sasaki und Y. Takai (1997). "Physical and functional interactions of Doc2 and Munc13 in Ca²⁺-dependent exocytotic machinery." J Biol Chem **272**(26): 16081-16084.
- Osborne, S. L., F. A. Meunier und G. Schiavo (2001). "Phosphoinositides as key regulators of synaptic function." Neuron **32**(1): 9-12.
- Osborne, S. L., P. J. Wen und F. A. Meunier (2006). "Phosphoinositide regulation of neuroexocytosis: adding to the complexity." J Neurochem **98**:336-342.

- Pabst, S., M. Margittai, D. Vainius, R. Langen, R. Jahn und D. Fasshauer (2002). "Rapid and selective binding to the synaptic SNARE complex suggests a modulatory role of complexins in neuroexocytosis." J Biol Chem **277**(10): 7838-7848.
- Parsons, T. D., J. R. Coorssen, H. Horstmann und W. Almers (1995). "Docked granules, the exocytic burst, and the need for ATP hydrolysis in endocrine cells." Neuron **15**(5): 1085-1096.
- Pasche, M., U. Matti, D. Hof, J. Rettig und U. Becherer (2012). "Docking of LDCVs Is Modulated by Lower Intracellular [Ca(2+)] than Priming." PLoS One **7**(5): e36416.
- Pelham, H. R. (1999). "SNAREs and the secretory pathway-lessons from yeast." Exp Cell Res **247**(1): 1-8.
- Pevsner, J., S. C. Hsu, J. E. Braun, N. Calakos, A. E. Ting, M. K. Bennett und R. H. Scheller (1994). "Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex." Neuron **13**(2): 353-361.
- Pevsner, J., S. C. Hsu und R. H. Scheller (1994). "n-Sec1: a neural-specific syntaxin-binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(4): 1445-1449.
- Phillips, J. H. (1973). "Phosphatidylinositol kinase. A component of the chromaffin-granule membrane." Biochem J **136**(3): 579-587.
- Plattner, H., A. R. Artalejo und E. Neher (1997). "Ultrastructural organization of bovine chromaffin cell cortex-analysis by cryofixation and morphometry of aspects pertinent to exocytosis." J Cell Biol **139**(7): 1709-1717.
- Pobbati, A. V., A. Stein und D. Fasshauer (2006). "N- to C-terminal SNARE complex assembly promotes rapid membrane fusion." Science **313**(5787): 673-676.
- Poirier, M. A., W. Xiao, J. C. Macosko, C. Chan, Y. K. Shin und M. K. Bennett (1998). "The synaptic SNARE complex is a parallel four-stranded helical bundle." Nat Struct Biol **5**(9): 765-769.
- Reichsman, F., S. Santos und E. W. Westhead (1995). "Two distinct ATP receptors activate calcium entry and internal calcium release in bovine chromaffin cells." J Neurochem **65**(5): 2080-2086.
- Reim, K., M. Mansour, F. Varoqueaux, H. T. McMahon, T. C. Sudhof, N. Brose und C. Rosenmund (2001). "Complexins regulate a late step in Ca²⁺-dependent neurotransmitter release." Cell **104**(1): 71-81.
- Renden, R., B. Berwin, W. Davis, K. Ann, C. T. Chin, R. Kreber, B. Ganetzky, T. F. Martin und K. Broadie (2001). "Drosophila CAPS is an essential gene that regulates dense-core vesicle release and synaptic vesicle fusion." Neuron **31**(3): 421-437.
- Rettig, J. und E. Neher (2002). "Emerging roles of presynaptic proteins in Ca⁺⁺-triggered exocytosis." Science **298**(5594): 781-785.
- Rickman, C., C. N. Medine, A. Bergmann und R. R. Duncan (2007). "Functionally and spatially distinct modes of munc18-syntaxin 1 interaction." J Biol Chem **282**(16): 12097-12103.

- Risinger, C. und M. K. Bennett (1999). "Differential phosphorylation of syntaxin and synaptosome-associated protein of 25 kDa (SNAP-25) isoforms." J Neurochem **72**(2): 614-624.
- Rizo, J. und T. C. Südhof (2002). "Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion." Nat Rev Neurosci **3**(8): 641-653.
- Rodriguez Del Castillo, A., M. L. Vitale und J. M. Trifaro (1992). "Ca²⁺ and pH determine the interaction of chromaffin cell scinderin with phosphatidylserine and phosphatidylinositol 4,5,-biphosphate and its cellular distribution during nicotinic-receptor stimulation and protein kinase C activation." J Cell Biol **119**(4): 797-810.
- Rosa, J. M., L. Gandia und A. G. Garcia (2010). "Permissive role of sphingosine on calcium-dependent endocytosis in chromaffin cells." Pflugers Arch **460**(5): 901-914.
- Rose, S. D., T. Lejen, L. Casaletti, R. E. Larson, T. D. Pene und J. M. Trifaro (2002). "Molecular motors involved in chromaffin cell secretion." Ann N Y Acad Sci **971**: 222-231.
- Rose, S. D., T. Lejen, L. Casaletti, R. E. Larson, T. D. Pene und J. M. Trifaro (2003). "Myosins II and V in chromaffin cells: myosin V is a chromaffin vesicle molecular motor involved in secretion." J Neurochem **85**(2): 287-298.
- Rowe, J., N. Corradi, M. L. Malosio, E. Taverna, P. Halban, J. Meldolesi und P. Rosa (1999). "Blockade of membrane transport and disassembly of the Golgi complex by expression of syntaxin 1A in neurosecretion-incompetent cells: prevention by rbSEC1." J Cell Sci **112**(12): 1865-1877.
- Rowe, J., F. Calegari, E. Taverna, R. Longhi und P. Rosa (2001). "Syntaxin 1A is delivered to the apical and basolateral domains of epithelial cells: the role of munc-18 proteins." J Cell Sci **114**(18): 3323-3332.
- Ryan, T. A. (1999). "Inhibitors of myosin light chain kinase block synaptic vesicle pool mobilization during action potential firing." J Neurosci **19**(4): 1317-1323.
- Scalettar, B. A. (2006). "How neurosecretory vesicles release their cargo." Neuroscientist **12**(2): 164-176.
- Schiavo, G., Q. M. Gu, G. D. Prestwich, T. H. Sollner und J. E. Rothman (1996). "Calcium-dependent switching of the specificity of phosphoinositide binding to synaptotagmin." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(23): 13327-13332.
- Schluter, O. M., F. Schmitz, R. Jahn, C. Rosenmund und T. C. Sudhof (2004). "A complete genetic analysis of neuronal Rab3 function." J Neurosci **24**(29): 6629-6637.
- Schluter, O. M., J. Basu, T. C. Sudhof und C. Rosenmund (2006). "Rab3 superprimes synaptic vesicles for release: implications for short-term synaptic plasticity." J Neurosci **26**(4): 1239-1246.
- Schnell, E. und R. A. Nicoll (2001). "Hippocampal synaptic transmission and plasticity are preserved in myosin Va mutant mice." J Neurophysiol **85**(4): 1498-1501.
- Schoch, S., P. E. Castillo, T. Jo, K. Mukherjee, M. Geppert, Y. Wang, F. Schmitz, R. C. Malenka und T. C. Sudhof (2002). "RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone." Nature **415**(6869): 321-326.

- Schutz, D., F. Zilly, T. Lang, R. Jahn und D. Bruns (2005). "A dual function for Munc-18 in exocytosis of PC12 cells." Eur J Neurosci **21**(9): 2419-2432.
- Schweizer, F. E., T. Dresbach, W. M. DeBello, V. O'Connor, G. J. Augustine und H. Betz (1998). "Regulation of neurotransmitter release kinetics by NSF." Science **279**(5354): 1203-1206.
- Shaner, N. C., R. E. Campbell, P. A. Steinbach, B. N. Giepmans, A. E. Palmer und R. Y. Tsien (2004). "Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein." Nat Biotechnol **22**(12): 1567-1572.
- Shen, J., D. C. Tareste, F. Paumet, J. E. Rothman und T. J. Melia (2007). "Selective activation of cognate SNAREpins by Sec1/Munc18 proteins." Cell **128**(1): 183-195.
- Shimazaki, Y., T. Nishiki, A. Omori, M. Sekiguchi, Y. Kamata, S. Kozaki und M. Takahashi (1996). "Phosphorylation of 25-kDa synaptosome-associated protein. Possible involvement in protein kinase C-mediated regulation of neurotransmitter release." J Biol Chem **271**(24): 14548-14553.
- Siegelbaum, S. A. und E. R. Kandel (1991). "Learning-related synaptic plasticity: LTP and LTD." Curr Opin Neurobiol **1**(1): 113-120.
- Smith, C. und E. Neher (1997). "Multiple forms of endocytosis in bovine adrenal chromaffin cells." J Cell Biol **139**(4): 885-894.
- Smith, C., T. Moser, T. Xu und E. Neher (1998). "Cytosolic Ca²⁺ acts by two separate pathways to modulate the supply of release-competent vesicles in chromaffin cells." Neuron **20**(6): 1243-1253.
- Smith, C. (1999). "A persistent activity-dependent facilitation in chromaffin cells is caused by Ca²⁺ activation of protein kinase C." J Neurosci **19**(2): 589-598.
- Söllner, T., M. K. Bennett, S. W. Whiteheart, R. H. Scheller und J. E. A. Rothman (1993). "A protein assembly-disassembly pathway *in vitro* that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation and fusion." Cell **75**: 409-418.
- Sørensen, J. B., U. Matti, S. H. Wei, R. B. Nehring, T. Voets, U. Ashery, T. Binz, E. Neher und J. Rettig (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.
- Sørensen, J. B., G. Nagy, F. Varoqueaux, R. B. Nehring, N. Brose, M. C. Wilson und E. Neher (2003). "Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23." Cell **114**(1): 75-86.
- Sørensen, J. B., K. Wiederhold, E. M. Muller, I. Milosevic, G. Nagy, B. L. de Groot, H. Grubmüller und D. Fasshauer (2006). "Sequential N- to C-terminal SNARE complex assembly drives priming and fusion of secretory vesicles." Embo J **25**(5): 955-966.
- Speidel, D., C. E. Bruederle, C. Enk, T. Voets, F. Varoqueaux, K. Reim, U. Becherer, F. Fornai, S. Ruggieri, Y. Holighaus, E. Weihe, D. Bruns, N. Brose und J. Rettig (2005). "CAPS1 regulates catecholamine loading of large dense-core vesicles." Neuron **46**(1): 75-88.
- Stevens, C. F. und J. M. Sullivan (1998). "Regulation of the readily releasable vesicle pool by protein kinase C." Neuron **21**(4): 885-893.

- Stevens, D. R., Z. X. Wu, U. Matti, H. J. Junge, C. Schirra, U. Becherer, S. M. Wojcik, N. Brose und J. Rettig (2005). "Identification of the minimal protein domain required for priming activity of Munc13-1." Curr Biol **15**(24): 2243-2248.
- Stevens, D. R., C. Schirra, U. Becherer und J. Rettig (2011). "Vesicle pools: lessons from adrenal chromaffin cells." Front Synaptic Neurosci **3**: 2.
- Steyer, J. A., H. Horstmann und W. Almers (1997). "Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells." Nature **388**(6641): 474-478.
- Steyer, J. A. und W. Almers (2001). "A real-time view of life within 100 nm of the plasma membrane." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(4): 268-275.
- Südhof, T. C. (2004). "The synaptic vesicle cycle." Annu Rev Neurosci **27**: 509-547.
- Südhof, T. C. und J. E. Rothman (2009). "Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins." Science **323**(5913): 474-477.
- Sutton, R. B., D. Fasshauer, R. Jahn und A. T. Brunger (1998). "Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution." Nature **395**(6700): 347-353.
- Taraska, J. W., D. Perrais, M. Ohara-Imaizumi, S. Nagamatsu und W. Almers (2003). "Secretory granules are recaptured largely intact after stimulated exocytosis in cultured endocrine cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 2070-2075.
- Tellam, J. T., S. McIntosh und D. E. James (1995). "Molecular identification of two novel Munc-18 isoforms expressed in non-neuronal tissues." J Biol Chem **270**(11): 5857-5863.
- Thuret-Carnahan, J., J. L. Bossu, A. Feltz, K. Langley und D. Aunis (1985). "Effect of taxol on secretory cells: functional, morphological, and electrophysiological correlates." J Cell Biol **100**(6): 1863-1874.
- Tian, J. H., Z. X. Wu, M. Unzicker, L. Lu, Q. Cai, C. Li, C. Schirra, U. Matti, D. Stevens, C. Deng, J. Rettig und Z. H. Sheng (2005). "The role of Snapin in neurosecretion: snapin knock-out mice exhibit impaired calcium-dependent exocytosis of large dense-core vesicles in chromaffin cells." J Neurosci **25**(45): 10546-10555.
- Toomre, D. und D. J. Manstein (2001). "Lighting up the cell surface with evanescent wave microscopy." Trends Cell Biol **11**(7): 298-303.
- Toonen, R. F. und M. Verhage (2003). "Vesicle trafficking: pleasure and pain from SM genes." Trends Cell Biol **13**(4): 177-186.
- Toonen, R. F., K. J. de Vries, R. Zalm, T. C. Südhof und M. Verhage (2005). "Munc18-1 stabilizes syntaxin 1, but is not essential for syntaxin 1 targeting and SNARE complex formation." J Neurochem **93**(6): 1393-1400.
- Toonen, R. F., K. Wierda, M. S. Sons, H. de Wit, L. N. Cornelisse, A. Brussaard, J. J. Plomp und M. Verhage (2006). "Munc18-1 expression levels control synapse recovery by regulating readily releasable pool size." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(48): 18332-18337.
- Toonen, R. F., O. Kochubey, H. de Wit, A. Gulyás-Kovács, B. Konijnenburg, J. B. Sørensen, J. Klingauf und M. Verhage (2006). "Dissecting docking and tethering of secretory vesicles at the target membrane." Embo J **25**(16): 3725-3737.

- Toonen, R. F. und M. Verhage (2007). "Munc18-1 in secretion: lonely Munc joins SNARE team and takes control." Trends Neurosci **30**(11): 564-572.
- Trifaro, J., S. D. Rose, T. Lejen und A. Elzagallaai (2000). "Two pathways control chromaffin cell cortical F-actin dynamics during exocytosis." Biochimie **82**(4): 339-352.
- Tsuboi, T., T. Kitaguchi, S. Karasawa, M. Fukuda und A. Miyawaki (2010). "Age-dependent preferential dense-core vesicle exocytosis in neuroendocrine cells revealed by newly developed monomeric fluorescent timer protein." Mol Biol Cell **21**(1): 87-94.
- Tucker, W. C., J. M. Edwardson, J. Bai, H. J. Kim, T. F. Martin und E. R. Chapman (2003). "Identification of synaptotagmin effectors via acute inhibition of secretion from cracked PC12 cells." J Cell Biol **162**(2): 199-209.
- Ulate, G., S. R. Scott, J. Gonzalez, J. A. Gilabert und A. R. Artalejo (2000). "Extracellular ATP regulates exocytosis in inhibiting multiple Ca(2+) channel types in bovine chromaffin cells." Pflugers Arch **439**(3): 304-314.
- Unsicker, K., K. Huber, G. Schutz und C. Kalcheim (2005). "The chromaffin cell and its development." Neurochem Res **30**(6-7): 921-925.
- Verhage, M., K. J. de Vries, H. Roshol, J. P. Burbach, W. H. Gispen und T. C. Sudhof (1997). "DOC2 proteins in rat brain: complementary distribution and proposed function as vesicular adapter proteins in early stages of secretion." Neuron **18**(3): 453-461.
- Verhage, M., A. S. Maia, J. J. Plomp, A. B. Brussaard, J. H. Heeroma, H. Vermeer, R. F. Toonen, R. E. Hammer, T. K. van den Berg, M. Missler, H. J. Geuze und T. C. Sudhof (2000). "Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion." Science **287**(5454): 864-869.
- Verhage, M. und J. B. Sørensen (2008). "Vesicle docking in regulated exocytosis." Traffic **9**(9): 1414-1424.
- Vitale, M. L., A. Rodriguez Del Castillo, L. Tchakarov und J. M. Trifaro (1991). "Cortical filamentous actin disassembly and scinderin redistribution during chromaffin cell stimulation precede exocytosis, a phenomenon not exhibited by gelsolin." J Cell Biol **113**(5): 1057-1067.
- Voets, T. (2000). "Dissection of three Ca²⁺-dependent steps leading to secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices." Neuron **28**(2): 537-545.
- Voets, T., R. F. Toonen, E. C. Brian, H. de Wit, T. Moser, J. Rettig, T. C. Sudhof, E. Neher und M. Verhage (2001). "Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking." Neuron **31**(4): 581-591.
- von Ruden, L. und E. Neher (1993). "A Ca-dependent early step in the release of catecholamines from adrenal chromaffin cells." Science **262**(5136): 1061-1065.
- Wadel, K., E. Neher und T. Sakaba (2007). "The coupling between synaptic vesicles and Ca2+ channels determines fast neurotransmitter release." Neuron **53**(4): 563-575.
- Walter, A. M., K. Wiederhold, D. Bruns, D. Fasshauer und J. B. Sørensen (2010). "Synaptobrevin N-terminally bound to syntaxin-SNAP-25 defines the primed vesicle state in regulated exocytosis." J Cell Biol **188**(3): 401-413.

- Wang, C. T., J. C. Lu, J. Bai, P. Y. Chang, T. F. Martin, E. R. Chapman und M. B. Jackson (2003). "Different domains of synaptotagmin control the choice between kiss-and-run and full fusion." Nature **424**(6951): 943-947.
- Washbourne, P., P. M. Thompson, M. Carta, E. T. Costa, J. R. Mathews, G. Lopez-Bendito, Z. Molnar, M. W. Becher, C. F. Valenzuela, L. D. Partridge und M. C. Wilson (2002). "Genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25 distinguishes mechanisms of neuroexocytosis." Nat Neurosci **5**(1): 19-26.
- Wassenberg, J. J. und T. F. Martin (2002). "Role of CAPS in dense-core vesicle exocytosis." Ann N Y Acad Sci **971**: 201-209.
- Wei, S., T. Xu, U. Ashery, A. Kollwe, U. Matti, W. Antonin, J. Rettig und E. Neher (2000). "Exocytotic mechanism studied by truncated and zero layer mutants of the C-terminus of SNAP-25." Embo J **19**(6): 1279-1289.
- Weimer, R. M. und E. M. Jorgensen (2003). "Controversies in synaptic vesicle exocytosis." J Cell Sci **116**(18): 3661-3666.
- Weninger, K., M. E. Bowen, U. B. Choi, S. Chu und A. T. Brunger (2008). "Accessory proteins stabilize the acceptor complex for synaptobrevin, the 1:1 syntaxin/SNAP-25 complex." Structure **16**(2): 308-320.
- Whipps, D. E., A. E. Armston, H. J. Pryor und A. P. Halestrap (1987). "Effects of glucagon and Ca²⁺ on the metabolism of phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in isolated rat hepatocytes and plasma membranes." Biochem J **241**(3): 835-845.
- Wurmser, A. E., J. D. Gary und S. D. Emr (1999). "Phosphoinositide 3-kinases and their FYVE domain-containing effectors as regulators of vacuolar/lysosomal membrane trafficking pathways." J Biol Chem **274**(14): 9129-9132.
- Wykes, R. C., C. S. Bauer, S. U. Khan, J. L. Weiss und E. P. Seward (2007). "Differential regulation of endogenous N- and P/Q-type Ca²⁺ channel inactivation by Ca²⁺/calmodulin impacts on their ability to support exocytosis in chromaffin cells." J Neurosci **27**(19): 5236-5248.
- Xiao, W., M. A. Poirier, M. K. Bennett und Y. K. Shin (2001). "The neuronal t-SNARE complex is a parallel four-helix bundle." Nat Struct Biol **8**(4): 308-311.
- Xu, T., T. Binz, H. Niemann und E. Neher (1998). "Multiple kinetic components of exocytosis distinguished by neurotoxin sensitivity." Nat Neurosci **1**(3): 192-200.
- Xu, T., U. Ashery, R. D. Burgoyne und E. Neher (1999). "Early requirement for alpha-SNAP and NSF in the secretory cascade in chromaffin cells." Embo J **18**(12): 3293-3304.
- Yang, B., M. Steegmaier, L. C. Gonzalez, Jr. und R. H. Scheller (2000). "nSec1 binds a closed conformation of syntaxin1A." J Cell Biol **148**(2): 247-252.
- Yatani, A., J. Codina, Y. Imoto, J. P. Reeves, L. Birnbaumer und A. M. Brown (1987). "A G protein directly regulates mammalian cardiac calcium channels." Science **238**(4831): 1288-1292.
- Yin, H. L. und P. A. Janmey (2003). "Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton." Annu Rev Physiol **65**: 761-789.

Yount, R. G. (1975). "ATP analogs." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **43**: 1-56.

Zhai, R. G. und H. J. Bellen (2004). "The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal." Physiology (Bethesda) **19**: 262-270.

Zhang, L., M. G. Marcu, K. Nau-Staudt und J. M. Trifaro (1996). "Recombinant scinderin enhances exocytosis, an effect blocked by two scinderin-derived actin-binding peptides and PIP2." Neuron **17**(2): 287-296.

Zhang, F., Y. Chen, D. H. Kweon, C. S. Kim und Y. K. Shin (2002). "The four-helix bundle of the neuronal target membrane SNARE complex is neither disordered in the middle nor uncoiled at the C-terminal region." J Biol Chem **277**(27): 24294-24298.

Zilly, F. E., J. B. Sørensen, R. Jahn und T. Lang (2006). "Munc18-bound syntaxin readily forms SNARE complexes with synaptobrevin in native plasma membranes." PLoS Biol **4**(10): e330.

Publikationen und Präsentationen

Borisovska M, Schwarz Y, Dhara M, Yarzagaray A, Hugo S, Narzi D, Siu S, Kesavan J, Mohrmann R, Böckmann R und Bruns D

Membrane-proximal tryptophanes of synaptobrevinII stabilize priming of secretory vesicles

Eingereicht bei: Journal of Neuroscience, Juni 2012

Hugo S, Peglow M, Dembla E, Halimani M, Matti U, Rieger H, Rettig J und Becherer U

Deciphering dead-end docking of large dense core vesicles in chromaffin cells

Eingereicht bei: The EMBO Journal, August 2012

Hugo S, Pasche M, Matti U, Hof D, Rettig J und Becherer U

How dead are dead-end vesicles: can the exocytosis of unreleasable vesicles be induced?

Ninth Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, 2011, Göttingen, Deutschland

Hugo S, Matti U, Hof D, Rettig J und Becherer U

The unreleasable pool of vesicles

SFB894/MCBO/GK1326 Joint Meeting 2011, Homburg (Saar), Deutschland

Hugo S, Matti U, Hof D, Rettig J und Becherer U

The unreleasable pool of vesicles

Annual Meeting of the Society of Neuroscience 2011, Washington D.C., USA

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Jens Rettig danken, dass er mir ermöglicht hat, in seiner Arbeitsgruppe die Aufgabenstellungen dieser Dissertation zu bearbeiten. Die vielen fachspezifischen Gespräche haben einen Großteil zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Dr. Ute Becherer gilt mein Dank für die Betreuung dieses Projektes. Sie hatte stets viele Ideen bei der Umsetzung der Experimente, wenn diese mal wieder nicht durchzuführen waren wie ursprünglich geplant. Ihre aufmunternden Worte halfen mir, anstrengende Zeiten durchzustehen und die gemeinsamen Diskussionen haben mein wissenschaftliches Denken stark gefördert.

Ein großer Dank an Anneka Bost und Mathias Pasche, die ebenfalls in der Gruppe „TIRFM“ tätig waren. Beide hatten stets ein offenes Ohr für fachspezifische und -unspezifische Probleme. Auch den anderen Mitgliedern des Labors sei an dieser Stelle gedankt für all die Gespräche, Hilfestellungen, Denkanstöße und Unterstützung.

Weiterer möchte ich unseren technischen Assistentinnen Margarete Klose, Carolin Bick, Katrin Sandmeier, Manuela Schneider, Reiko Trautmann, Anja Ludes, Anne Weinland und der Azubi Nathalie Höfs danken. Ohne sie wäre der Laboralltag um einiges stressiger und ihr Fachwissen in vielen Bereichen macht es möglich, auch vermeintlich dumme Fragen schnell zu beantworten.

Auch unserer Sekretärin Bernadette Schwarz gilt mein Dank, dafür dass sie das Unmögliche möglich macht.

Einen Großteil zum Gelingen dieser Arbeit haben auch meine Eltern, Herbert und Angela Magin, beigetragen. Ihr stetiges Interesse an der Arbeit, die Unterstützung in jeglicher Hinsicht sowie die aufmunternden Worte sind mit nichts zu bezahlen.

Vor allem aber gilt mein Dank meinem Ehemann Michael Hugo. Danke für deine unendliche Geduld, dein Verständnis und deine Unterstützung. Egal wie schwer mein Tag war, du hattest stets aufmunternde Worte auf den Lippen, mit denen du mich jederzeit zum schmunzeln bringen konntest. Danke fürs Zuhören, Aufrichten, Reden und einfach fürs Dasein!

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Sandra Hugo, geb. Magin
Geburtsdatum: 13.06.1984
Geburtsort: Speyer
Adresse: Fabrikstr. 15, 67655 Kaiserslautern
Nationalität: deutsch

Ausbildung

2008 – 2012	Promotion Physiologisches Institut der Universität des Saarlandes Assoziiertes Mitglied des Graduiertenkolleg 1326 „Calcium-Signaling and Cellular Nanodomains“
2003 – 2008	Studium Biologie, Technische Universität Kaiserslautern, Abschluss Diplom
1994 – 2003	Allgemeine Hochschulreife Hans-Purmann-Gymnasium Speyer