

Aus dem Fachbereich Medizinische Physiologie,
Theoretische Medizin der Biowissenschaften der Medizinischen Fakultät der
Universität des Saarlandes, Homburg (Saar)

**Untersuchung der Funktion von mCAPS2 in der Befüllung und
Freisetzung von Katecholaminen in murinen Chromaffinzellen**

**Study on function of mCAPS2 in filling and release
of catecholamines in murine chromaffin cells**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes
2018

vorgelegt von
OLGA RATAI
geboren am 27.05.1987 in Budjonowka

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	6
ABSTRACT	8
1. EINLEITUNG	10
1.1. Neuronale Signalleitung und Exozytose	10
1.2. Entwicklung der Nebennieren und ihre Funktion im Körper	11
1.3. Biosynthese und Reifung der LDCVs	13
1.3.1. SNARE-Komplex und Priming-Faktoren	13
1.3.2. Azidifizierung der LDCVs durch vATPase	15
1.3.3. Befüllung der LDCVs durch VMAT	17
1.4. Entdeckung von CAPS	18
1.4.1. Struktur von CAPS	18
1.4.2. Expression von CAPS ist gewebe- und entwicklungspezifisch	21
1.4.3. Funktion von CAPS	21
1.4.4. Erkrankungen assoziiert mit CAPS2	22
1.5. Ziel der Arbeit	23
2. MATERIALIEN	24
2.1. Chemikalien	24
2.2. Medien	26
2.3. Enzyme	26
2.3. Puffer	27
2.4. Lösungen	27
2.4.1. Präparation von Chromaffinzellen	27
2.4.2. Lösungen für elektrophysiologische Messungen	28
2.4.3. Lösungen zur pH-Kalibrierung	29
2.4.4. Immunocytochemie	29
2.4.5. Proteinbiochemie	30
2.4.6. Lösung für Biochemie	30
2.5. Größenstandards für Proteine und DNA	30
2.6. Oligonukleotide	31
2.6.1. Genotypisierungsprimer für CAPS1 und CAPS2	31

2.6.2.	Klonierungsprimer	31
2.6.3.	Primer zur Sequenzierung der pGADT7-Plasmide	31
2.7.	Restriktionsenzyme	32
2.8.	Primäre und sekundäre Antikörper	32
2.9.	Bakterien	32
2.10.	Zelllinien	33
2.11.	Kits	33
2.12.	Hefestämme und Hefekonstrukte	33
2.13.	Laborgeräte	33
3.	METHODEN	35
3.1.	Arbeiten mit primärer Zellkultur	35
3.1.1.	Präparation von murinen Chromaffinzellen	35
3.1.2.	Elektroporation der Chromaffinzellen	35
3.1.3.	Überexpression von rekombinanten Proteinen mit dem pSFV1-System	36
3.1.4.	Präparation der murinen Chromaffinzellen für die Elektronenmikroskopie	36
3.1.5.	Fixierung von murinen Chromaffinzellen	36
3.2.	Elektrophysiologie	37
3.2.1.	Aufbau des Messplatzes	37
3.2.2.	Herstellung von Patchpipetten	37
3.2.3.	<i>Patch clamp</i> -Technik	38
3.2.4.	Membrankapazitätsmessung	38
3.2.5.	Amperometrie	39
3.3.	Elektronenmikroskopie	40
3.4.	Gentechnische Methoden zur Generierung rekombinanter DNA	42
3.4.1.	Polymerasenkettenreaktion	42
3.4.2.	Elektrophoretische Auftrennung der DNA	43
3.4.3.	Restriktionsverdau der DNA	43
3.4.4.	Dephosphorylierung der DNA	44
3.4.5.	Ligation von DNA-Fragmenten	44
3.4.6.	Hitzeschocktransformation der DNA in kompetente Bakterien	44
3.4.7.	DNA-Isolation aus Bakterien	45
3.4.8.	Genotypisierung	45
3.5.	Proteinbiochemie	46
3.5.1.	Immunozytochemie	46
3.5.2.	Herstellung von Proteinlysaten	47
3.5.3.	Proteinkonzentrationsbestimmung	47
3.5.4.	Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese	48

3.5.5.	Proteintransfer durch Western Blotting	48
3.5.6.	Proteindetektion im Western Blot mittels Antikörper	49
3.6.	Laser-Scanning-Mikroskopie	49
3.6.1.	Aufnahme von fixierten Zellen	49
3.6.2.	Mikroskopie von lebenden murinen Chromaffinzellen (<i>live cell imaging</i>)	50
3.7.	Hefe-Zwei-Hybrid-System	50
3.7.1.	Plattenherstellung und Kultivierung der Hefen	52
3.7.2.	Einbringen der Plasmide in die Hefen durch Elektroporation	52
3.7.3.	Hybridisierung der Hefen	53
3.7.4.	Einfrieren von Hefekulturen	53
3.7.5.	Galaktosidase-Assay	53
3.7.6.	DNA-Isolation aus Hefen	54
3.8.	Tierhaltung	54
3.9.	Bildbearbeitung	54
3.10.	Statistik	54
4.	ERGEBNISSE	55
4.1.	Elektrophysiologische und -chemische Untersuchung der Funktion von mCAPS2a und mCAPS2b an murinen Chromaffinzellen	55
4.1.1.	mCAPS2b fördert die Beladung der LDCVs mit Katecholaminen in DKO-Zellen und verlangsamt die Fusion der LDCVs	57
4.1.2.	In WT Chromaffinzellen hat Überexpression von mCAPS2b keinen Effekt auf LDCV-Beladung und deren Fusionskinetik	60
4.2.	Elektronenmikroskopische Untersuchung von CAPS2b auf den LDCV-Reifungsprozess	61
4.3.	Detektion des vesikulären pHs mit NPY-ClopHensorN(Q69M)	64
4.3.1.	Klonierung des pMax_NPY-ClopHensorN(Q69M)	66
4.3.2.	NPY-ClopHensorN(Q69M) wird korrekt in die LDCVs transloziert	67
4.3.3.	ClopHensorN(Q69M) ist als pH-Sensor photostabil	68
4.3.4.	Erstellen einer pH-Kalibrierungskurve in LDCVs	69
4.3.5.	Untersuchung der Azidifizierung von LDCVs in WT Chromaffinzellen	71
4.3.6.	Die pH-Werte in LDCVs sind in WT und DKO gleich	72
4.3.7.	Gepaarte pH-Bestimmung und Kalibrierung an denselben Zellen	73
4.4.	Exon 22 fördert die Serotonin-Aufnahme durch VMAT1	75
4.4.1.	Klonierung der Konstrukte	75
4.4.2.	mCAPS2b erhöht die Aufnahme des Serotonins durch VMAT1 in CHO-Zellen	76
4.5.	Suchen nach Interaktionspartner von mCAPS2b mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System	77
4.5.1.	Klonierung der Konstrukte	78
4.5.2.	Testen der Funktionalität der mCAPS2-Konstrukte für YTH	79

4.5.3.	Ermittlung der höchsten Screeningeffizienz der Bibliothek	80
4.5.4.	Screening der Bibliothek	81
4.6.	Herstellung des mCAPS2b-Antikörpers und Detektion der endogenen Expression von mCAPS2b	83
4.6.1.	Herstellung des Antikörpers gegen mCAPS2_Exon 22	83
4.6.2.	Testen der erhaltenen Seren	84
4.6.3.	Nachweis der Expression von mCAPS2b	85
5.	DISKUSSION	88
5.1.	Exon 22 in mCAPS2 spielt eine spezifische Rolle bei der Befüllung der LDCVs mit Monoaminen	88
5.2.	mCAPS2b verlangsamt die Fusion der LDCVs in der Ca²⁺-abhängigen Exozytose	90
5.3.	Deletion von CAPS verändert nicht den pH in LDCVs	94
5.4.	Suche nach Proteininteraktionspartnern von CAPS2b für die Befüllung von LDCVs	97
	LITERATURVERZEICHNIS	100
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	110
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	115
	TABELLENVERZEICHNIS	117
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	118
	PUBLIKATIONEN UND KONFERENZBEITRÄGE	120
	DANKSAGUNG	121

Zusammenfassung

Dysregulation der Freisetzung der Stresshormone Adrenalin und Noradrenalin führt zu erhöhtem Blutdruck, zu erhöhter Herzfrequenz, zu Herz- und Gefäßerkrankungen und ist mit Erkrankungen wie Schizophrenie und Autismus assoziiert. Adrenalin und Noradrenalin sind Katecholamine, die in LDCVs (*large dense core vesicles*) gespeichert werden. Die Calcium-abhängige Exozytose der LDCVs ist stark reguliert und beinhaltet einen Komplex von Proteinen, deren Funktion bereits gut erforscht ist. Eins dieser regulatorischen Proteine ist CAPS (*calcium-dependent activator protein for secretion*). Ein Doppel-Knockout von CAPS1 und CAPS2 (DKO) führt in Chromaffinzellen zu einer verminderten Exozytose von LDCVs und einer reduzierten Sekretion von Katecholaminen.

In dieser Arbeit wurden die Spleißvarianten mCARS2a und mCAPS2b in murinen isolierten DKO-Chromaffinzellen exprimiert, um ihre Funktion in der Beladung der LDCVs mit Katecholaminen sowie Exozytose zu untersuchen und miteinander zu vergleichen. Der einzige Unterschied zwischen mCAPS2a und mCAPS2b besteht darin, dass mCAPS2b das 40 Aminosäuren lange Exons 22 innerhalb der MUN-Domäne enthält. Nach Expression in DKO-Zellen zeigten beide Spleißvarianten eine vergleichbare Fusion von Vesikeln. Die Beladung der LDCVs mit Katecholaminen war jedoch nach mCAPS2b-Expression im Vergleich zu mCAPS2a deutlich höher. Daraus lässt sich schließen, dass CAPS2b das Befüllen von LDCVs fördert. Die Überexpression von mCAPS2b in WT-Zellen hatte weder eine Auswirkung auf die LDCV-Beladung noch auf die Gesamtsekretion. Zusätzlich zum Fülleffekt führte die mCAPS2b-Expression in DKO- und WT-Zellen zu einer verlängerten Sekretionszeit der einzelnen Vesikel, was darauf hindeutet, dass der Fusionsprozess selbst verlangsamt wurde. Eine elektronenmikroskopische Untersuchung zeigte, dass CAPS2b-Expression in DKO-Zellen zu einem verkleinerten LDCV-Radius führte, während die LDCVs in WT- und DKO-Chromaffinzellen gleich groß waren. Das Schrumpfen der Vesikel könnte ein Grund für die beobachtete verlangsamte Fusion der LDCVs sein, erklärt jedoch nicht deren erhöhte Befüllung mit Katecholaminen. Deshalb wurde getestet, ob der Füllungsunterschied auf eine Verschiebung im Protonengradienten der Granulen, der für den Transport der Katecholamine in die LDCVs erforderlich ist, zurückzuführen war. Unter Verwendung

eines pH-empfindlichen Fluoreszenzmarkers NPY-ClophensorN(Q69M), der ins vesikuläre Lumen adressiert wurde, wurde kein Unterschied im luminalen pH von Vesikeln in WT- und DKO-Chromaffinzellen festgestellt.

Weitere Untersuchungen mit CHO (*chinese hamster ovarian*)-Zellen, die den vesikulären Monoamintransporter 1 (VMAT1) exprimierten, zeigten, dass Expression von mCAPS2b, aber nicht von mCAPS2a, die Aufnahme von Monoamine erhöhte. Das belegt, dass mCAPS2b die LDCV-Beladung mit Katecholaminen in Anwesenheit von VMAT1 erhöht. Hierfür wurde die Anwesenheit des Exons 22 in der MUN-Domäne von mCAPS2b verantwortlich gemacht. Um den Mechanismus von mCAPS2b-Exon 22 beim Befüllen der LDCVs besser zu verstehen, wurde unter Verwendung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems nach Proteinen gesucht, die mit mCAPS2-Exon 22 interagieren. Das verwendete Screening-System ergab jedoch nur falsch positive Signale, sodass kein direkter Proteininteraktionspartner gefunden wurde. Für zukünftige biochemische Analysen wurde ein Antikörper gegen das Exon 22 hergestellt. Seine Spezifität wurde für mCAPS2b bestätigt und eine endogene Expression von mCAPS2b konnte im Cerebellum postnatal nachgewiesen werden. Mit Hilfe dieses Antikörpers sollte es möglich sein, in Koimmunopräzipitaten Interaktionspartner für mCAPS2b und sein Exon 22 zu identifizieren.

Abstract

Dysregulation of stress hormone release Adrenaline and norepinephrine result in increased blood pressure, increased heart rate, cardiovascular disease, and is associated with conditions such as schizophrenia and autism. Epinephrine and norepinephrine are catecholamines stored in large dense core vesicles (LDCVs). The calcium-dependent exocytosis of LDCVs is highly regulated and involves a complex of proteins whose function is already well understood. One of these regulatory proteins is CAPS (calcium dependent activator protein for secretion). A double knockout of CAPS1 and CAPS2 (DKO) leads to reduced exocytosis of LDCVs and reduced secretion of catecholamines in chromaffin cells.

In this work splice variants mCARS2a and mCAPS2b were expressed in isolated murine DKO-chromaffin cells to investigate and compare their function in exocytosis and loading of LDCVs with catecholamines. The difference between mCAPS2a and mCAPS2b is the 40 amino acid long exon 22, which is only present in the MUN domain of mCAPS2b. The results showed that although the fusion of vesicles was similar, the proportion of catecholamine-loaded vesicles was significantly higher after mCAPS2b expression compared to mCAPS2a. It can be concluded that CAPS2b promotes the filling of LDCVs. Overexpression of mCAPS2b in WT cells had neither an effect on LDCV loading nor on total secretion. In addition to the filling effect, mCAPS2b expression in DKO and WT cells leads to a longer secretion time of individual vesicles, suggesting that the fusion process itself has prolonged. Electron microscopy analysis revealed that CAPS2b expression in DKO cells resulted in a reduced LDCV radius, whereas LDCVs in WT and DKO chromaffin cells do not showed any difference. Shrinkage of the vesicles may be an explanation for the observed slowed vesicle fusion, but not for increased catecholamine loading. Therefore, it was tested whether the filling difference was due to a shift in the proton gradient of the granules required for the catecholamine filling. Using a pH-sensitive fluorescent marker NPY-ClophensorN(Q69M), which was targeted into the vesicular lumen, it was found that there was no difference in the luminal pH of vesicles in WT and DKO chromaffin cells.

Further studies with CHO (Chinese hamster ovarian) cells expressing vesicular monoamine transporter 1 (VMAT1) showed that expression of mCAPS2b, but not of mCAPS2a,

increased monoamine uptake. This demonstrates that mCAPS2b increases the LDCV loading with catecholamines in the presence of VMAT1. This was attributed to the presence of the exon 22 sequence in the mCAPS2b MUN domain. To better understand the mechanism of mCAPS2b in filling of the LDCVs, we searched for proteins interacting with mCAPS2 exon 22 using the yeast two-hybrid system. However, the used screening system gave false positive signals, so no direct protein interaction partner was found. For future biochemical analysis, an antibody against exon 22 was generated. Its specificity was confirmed for mCAPS2b and an endogenous expression of mCAPS2b could be detected in the cerebellum postnatally. With the help of this antibody, it should be possible to identify interaction partners for mCAPS2b and its exon 22 in co-immunoprecipitates.

1. Einleitung

1.1. Neuronale Signalleitung und Exozytose

Als Exozytose wird eine vollständige Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran und der Raustransport der darin enthaltenen Stoffe aus einer Zelle bezeichnet. Dieser Prozess dient der Kommunikation zwischen neuronalen Zellen und beinhaltet häufig Signalübertragung an synaptischen Verbindungen, die aus einer Präsynapse und einer Postsynapse bestehen. Präsynapsen setzen Neurotransmitter frei, die Wechselwirkungen mit Rezeptoren in der Postsynapse eingehen. Die Wirkung ist abhängig vom Neurotransmitter, sowie vom interagierenden Rezeptor in der postsynaptischen Membran. Als Neurotransmitter können Aminosäuren wie Glutamat, γ -Aminobuttersäure (GABA) oder Glycin, biogene Amine (Adrenalin, Noradrenalin, Histamin, Dopamin, Serotonin) oder Neuropeptide (z.B. Neuropeptide, Somatostatine, Endorphine) sezerniert werden. Diese bewirken in Neuronen entweder eine Erregung der Postsynapse durch exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP) oder eine Inhibierung durch ein inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP). Neurohormone, wie Adrenalin und Noradrenalin, werden über das Blut zum Zielorgan transportiert. Durch die Bindung des Neurotransmitters an einen Rezeptor kann eine Depolarisation an der Postsynapse erfolgen. Dabei öffnen zuerst Natriumkanäle, sodass Natrium in das Zellinnere einströmen kann. Das neuronale Ruhepotential von -70 mV erhöht sich. Wird der Schwellenwert von -55 mV überschritten, wird ein Aktionspotential ausgelöst, das heißt die Zelle wird auf $+20$ mV depolarisiert. Die Natriumkanäle schließen und die Kaliumkanäle öffnen, sodass Kaliumionen aus dem Zellinneren nach außen transportiert werden und die Zelle dadurch repolarisiert wird. Dadurch wird das Membranpotential der Zelle wieder auf -70 mV gesenkt. In der nachfolgenden Refraktärzeit, in der die Natrium- und Kaliumionen aktiv zurücktransportiert werden, ist keine erneute Depolarisation möglich. Durch die Spannungsänderung in der Postsynapse können spannungsabhängige Calciumkanäle geöffnet werden. Diese gliedern sich in unterschiedliche Gruppen, abhängig von deren Aktivierung. Die Aktivierung kann durch langanhaltenden (L-Typ) oder transienten (T-Typ) Strom erfolgen. Die Erhöhung der Calcium (Ca^{2+})-Konzentration reguliert viele intrazelluläre Prozesse, wie zum Beispiel die Aktivität von Enzymen, Expression von

Genen, Synthese von Stoffen und der Ca^{2+} -abhängigen Sekretion von Stoffen durch Exozytose. Die Ca^{2+} -Erhöhung dient als sekundärer Botenstoff und führt zu einer Signalkaskade. Dabei sind viele Proteine involviert, die durch eine Ca^{2+} -Bindung ihre Konformation oder Ladung verändern. Hierauf wird in 1.3.1. genauer eingegangen. Der Mechanismus der Ca^{2+} -abhängigen Sekretion ist in Neuronen und neuroendokrinen Zellen vergleichbar. In dieser Arbeit wird das Augenmerk auf die Sekretion von Neurohormonen in murinen Chromaffinzellen gelegt.

1.2. Entwicklung der Nebennieren und ihre Funktion im Körper

Nebennieren sind Hormondrüsen, die zum vegetativen Nervensystem gehören. Sie sitzen auf den Nieren und bestehen aus der Nebennierenrinde und dem Nebennierenmark (Abb. 1). Die Nebennierenrinde reguliert Wasser-, Mineral- und Zuckerhaushalt durch die Synthese und Ausschüttung von Steroidhormonen. Das Nebennierenmark bzw. die Medulla gehört dem sympathischen Nervensystem an und besteht hauptsächlich aus Chromaffinzellen und zu einem geringen Anteil aus multipolaren Ganglienzellen. Die beiden Medullae sind die größten Paraganglien außerhalb des zentralen Nervensystems und sind ein Teil des endokrinen Systems, welches gut durchblutet wird.

Chromaffinzellen entwickeln sich aus der Neuralleiste. Während der embryonalen Entwicklung wandern Zellen aus dem Ektoderm in die Nebennierenrinde, wo sie von dieser komplett eingeschlossen werden und dort das Nebennierenmark bilden. Die Chromaffinzellen haben die gleichen Vorläuferzellen wie Neurone und zählen zu den neuroendokrinen Zellen. Sie werden als chromaffin bezeichnet, da sie eine Braunfärbung nach der Behandlung mit Chromsalzen aufweisen (Carmichael and Winkler, 1985).

Die Aktivierung der Chromaffinzellen erfolgt durch das binden von Acetylcholin an nikotinische Rezeptoren (nAChR) in deren Plasmamembran. Durch eine Depolarisation werden Ca^{2+} -Kanäle geöffnet, die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wird erhöht und die Ca^{2+} -abhängige Exozytose wird initiiert. Die Hauptaufgabe der Chromaffinzellen ist die Biosynthese und Freilassung von Adrenalin und Noradrenalin in die Blutbahn. Die Speicherung dieser Hormone, Neuropeptide und Neurotransmitter erfolgt in sogenannten *Large Dense Core Vesicles* (LDCVs) (Potter et al., 1997). Die LDCVs zeichnen sich durch zwei Merkmale aus. Zum einen sind sie größer als synaptische Vesikel, zum anderen sind

sie in Elektronenmikroskopieaufnahmen deutlich elektronendichter als andere Zellkompartimente.

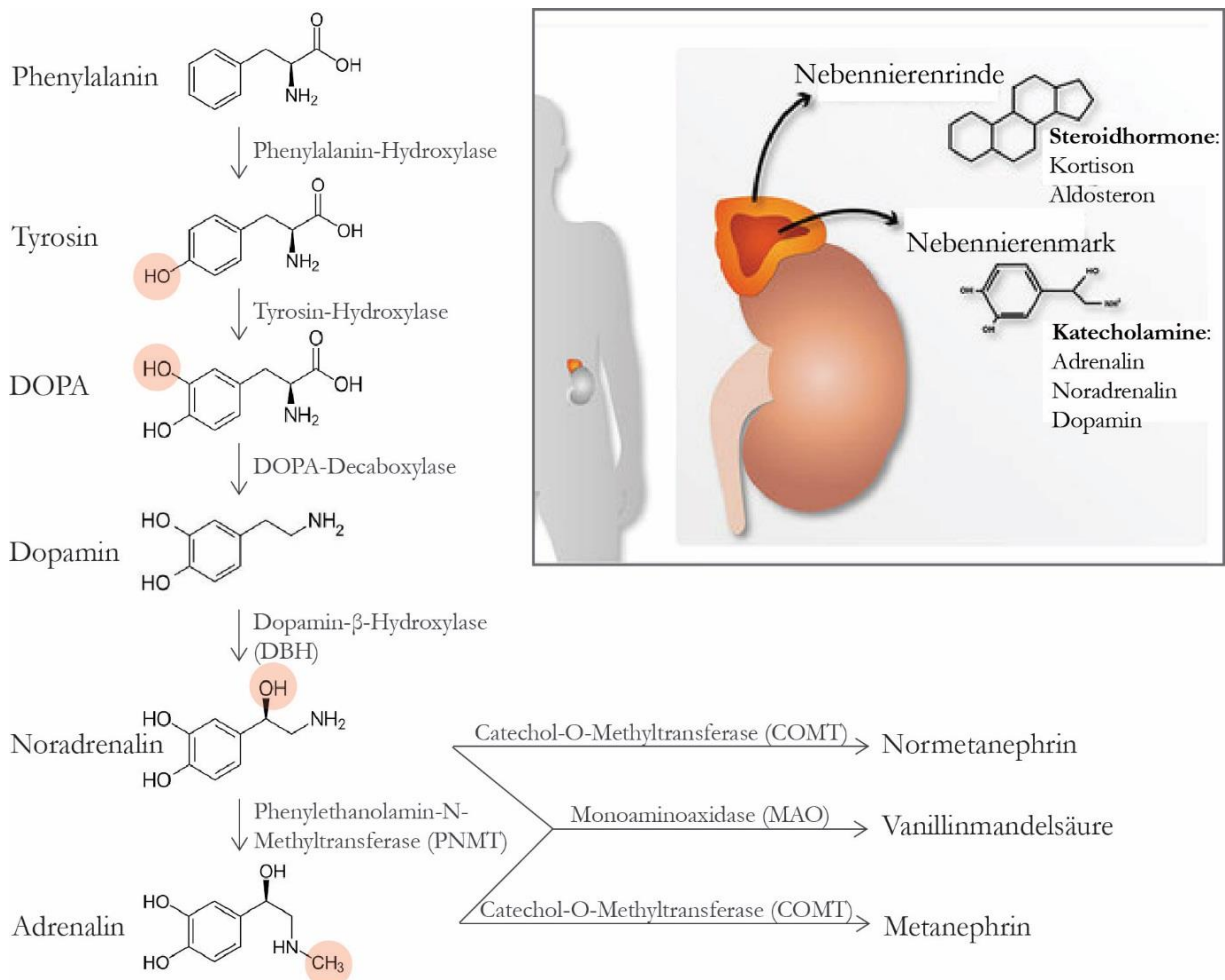


Abbildung 1: Biosynthese und Abbau von Noradrenalin und Adrenalin. Die Biosynthese der Katecholamine erfolgt im Mark der Nebenniere (Bildausschnitt rechts oben; Bildquelle: www.hormon-info.de). Die Nebennieren sitzen kappenartig auf den Nieren. In der Nebennierenrinde werden Steroidhormone synthetisiert. Die Katecholamine werden aus Phenylalanin, über Tyrosin, DOPA zu Dopamin durch Hydroxylierung und Decarboxylierung hergestellt. In LDCVs hydroxyliert DBH Dopamin zu Noradrenalin, welches im Zytoplasma durch PNMT zu Adrenalin umgewandelt wird. Der Abbau von Noradrenalin und Adrenalin erfolgt entweder durch COMT zu Normetanephrin und Metanephrin oder durch MAO zu Vanillinsäure.

In etwa 80 % der Chromaffinzellen wird Adrenalin gebildet, gespeichert und freigelassen, in etwa 20 % ist es Noradrenalin. Der LDCV-Inhalt besteht zu etwa 90 % aus Chromogranin A (CgA). Die restlichen Bestandteile sind unter anderem Monoamine, Adenosintriphosphat (ATP), Neuropeptid Y (NPY) und verschiedene Enzyme wie Dopamin-β-Hydroxylase.

Die Neurotransmitter Adrenalin und Noradrenalin sind strukturell gesehen Monoamine bzw. Katecholamine und werden aus der Aminosäure Phenylalanin über Tyrosin und DOPA durch Hydroxylierung und Decarboxylierung zu Dopamin hergestellt (s. Abb. 1). Dopamin wird durch das Enzym Dopamin- β -Hydroxylase (DBH) im LDCV-Lumen zu Noradrenalin umgesetzt. Das Noradrenalin strömt aus den LDCVs und wird im Zytosol durch das Anhängen einer Methylgruppe am Stickstoff durch die Phenylethanolamin-N-Methyltransferase (PNMT) zu Adrenalin umgewandelt. Im Zytosol bauen die Enzyme Catechol-O-Methyltransferase (COMT) und Monoaminoxidase (MAO) die Hormone Adrenalin und Noradrenalin zu den jeweiligen Meta-Produkten (Metanephrin und Normetanephrin) ab.

Die beiden Stresshormone Adrenalin und Noradrenalin werden nach der Sekretion im Blut bis zum Zielorgan transportiert und lösen dort die „Flucht- oder Kampfreaktion“ aus. Diese führt unter anderem zur Erhöhung der Herzfrequenz und des Blutdrucks sowie bronchialen Erweiterungen und Gluconeogenese.

1.3. Biosynthese und Reifung der LDCVs

Die LDCVs werden am trans-Golgi synthetisiert und abgeschnürt (Burgoyne and Morgan, 2003). Die integralen und granulären Proteine sind zu diesem Zeitpunkt bereits enthalten und müssen gegebenenfalls anschließend modifiziert werden. Die neu gebildeten LDCVs durchlaufen einen Reifungsprozess, bevor sie ihre Fusionskompetenz erlangen. Die meisten LDCVs liegen als ein Reserve-Pool im Zytoplasma vor. Der fusionskompetente Status wird durch Docking und Priming erreicht. Dabei sind viele integrale und zytosolische Proteine beteiligt, auf die in 1.3.1. genauer eingegangen wird. Ein Schritt der Maturierung ist die Azidifizierung des LDCV-Lumens (s. 1.3.2.).

1.3.1. SNARE-Komplex und Priming-Faktoren

In Neuronen und neuroendokrinen Zellen erfolgt die Fusion der LDCVs mit der Plasmamembran nach dem gleichen Mechanismus. Die Fusion der Granulen kann entweder konstitutiv (ohne externen Reiz) erfolgen oder die Folge einer Signalkaskade sein (Burgess and Kelly, 1987). Die regulierte Exozytose erfolgt Ca^{2+} -abhängig (Heinemann et

al., 1993) unter Mitwirkung vieler Proteine. Die Granulen lassen sich in drei Gruppen untergliedern: Reserve-, Docking- und Priming-Pool (Abb. 2) (Ashery et al., 2000).

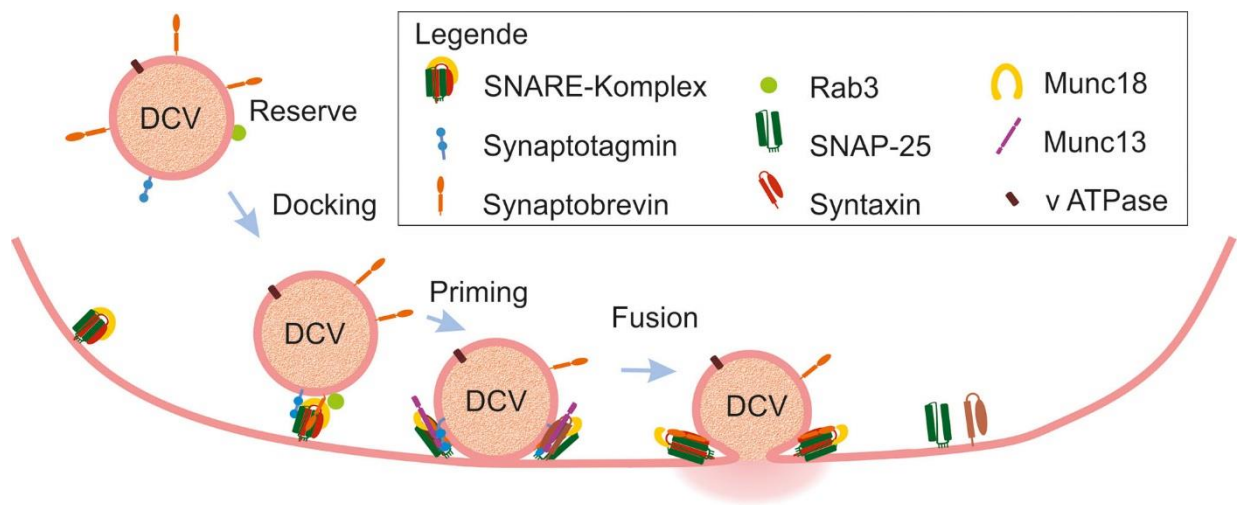


Abbildung 2: Überblick der Reifung und Fusion der LDCVs. Vereinfachte Darstellung der Prozessierung der LDCVs (DCV) aus dem Reserve-Pool, über Docking, Priming bis zur Fusion samt den beteiligten Proteinen (s. Legende). Bild übernommen aus “Synaptische Transmission im Immunsystem” von Rettig und Stevens (2017) Neuroforum, Band 24, Heft 4.

Die meisten Granulen sind im Reservepool, auch Depotpool genannt, und zählen zu den nicht fusionsfähigen Vesikeln. Der Status Docking und Priming wird erreicht, indem zytosolische und integrale Proteine miteinander interagieren. Die Vesikelmembran weist dabei auf elektronenmikroskopischen Bildern einen direkten sichtbaren Kontakt zur Plasmamembran auf (Verhage and Sørensen, 2008). Nach einer intrazellulären Ca^{2+} -Erhöhung erfolgt die Fusion der Granulenmembran mit der Plasmamembran und die Freilassung des Vesikelinhalts in den Extrazellulärraum. Die Sekretion erfolgt unterschiedlich schnell. Die Vesikel im Priming-Pool bilden den RRP (*readily releasable pool*) oder SRP (*slowly releasable pool*) (Rettig and Neher, 2002). Diese Pools sind beide fusionsfähig, unterscheiden sich jedoch in ihrer Fusionskinetik. Die Fusion des RRP passiert etwa zehn Mal schneller, als die des SRPs (Voets et al., 1999).

Die regulierte Exozytose ist die Folge einer Depolarisierung, die zur Öffnung spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle führt und eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirkt. Daraufhin wird das Ca^{2+} durch Ca^{2+} -bindende Proteine (wie das vesikelständige Synaptotagmin oder das zytosolische Complexin) gebunden, wodurch intrazelluläre Prozesse (wie die Formation des SNARE-Komplexes) in Gang gesetzt

werden. Der SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor)-Komplex baut sich aus dem vesikelständigen (v-SNARE) Synaptobrevin (oder VAMP2, vesicular associated membrane protein) und den plasmamembranständigen Proteinen (t-SNAREs; *engl. target* = Ziel) Syntaxin-1A sowie SNAP25 zusammen. Die Komplexbildung erfolgt durch die Interaktion der vier α -Helices der SNARE-Motive der jeweiligen Proteine unter ATP-Verbrauch (Sutton et al., 1998). Die dabei interagierenden Aminosäuren sind Arginin (R) von VAMP2 und Glutamine (Q) von Syntaxin und SNAP-25 (Fasshauer et al., 1998). Weitere Proteine haben einen regulatorischen Einfluss während der regulierten Exozytose. Das Protein Munc-18 bindet das Syntaxin-1A in seiner inaktiven Form (Toonen et al., 2005). Es wird durch das Munc-13 verdrängt, welches die aktive, offene Form des Syntaxin-1A stabilisiert, um dessen Bildung mit den anderen *coil-coiled*-Domänen der SNARE-Motive zu gewährleisten (Betz et al., 1997; Richmond et al., 2001). Das Munc-13 wirkt als Primingfaktor (Man et al., 2015). Bei Munc-13-Abwesenheit erfolgt kein Priming (Augustin et al., 1999; Varoqueaux et al., 2002). Die Munc-13-Domänen MHD1, MHD2 und die C-terminale C2-Domäne sind für die Interaktion mit dem Syntaxin-1A und dadurch für das Priming notwendig (Betz et al., 1997; Stevens et al., 2005). Durch die Interaktion der SNARE-Proteine werden die Plasmamembran und die Vesikelmembran in räumliche Nähe gebracht, wodurch die Bildung einer Fusionspore zwischen den beiden Membranen ermöglicht wird. Die Verschmelzung der Vesikel- und Plasmamembran durch den SNARE-Komplex erfolgt unter Energieverbrauch (Hanson et al., 1997; Sørensen et al., 2006). Durch die Fusionspore kann eine teilweise Freilassung des Vesikelinhaltes erfolgen, sodass das Vesikel wieder von der Zelle recycelt werden kann („kiss-and-run“) (Bost et al., 2017). Ein Vesikel kann aber auch komplett mit der Plasmamembran verschmelzen, wodurch eine komplette Freilassung des gesamten Vesikelinhaltes erfolgt und die Vesikelmembran, samt den darin integralen Proteinen, ein Teil der Plasmamembran wird.

1.3.2. Azidifizierung der LDCVs durch vATPase

Ein Reifungsschritt der Vesikel erfolgt durch die Ansäuerung des Lumens der LDCVs. Der Säuregrad wird durch den pH-Wert wiedergegeben. Der pH-Wert ist eine dimensionslose Zahl zwischen 1 und 14 und definiert sich als der negative dekadische Logarithmus freier

Wasserstoffionen (Protonen). Die Ansäuerung des Lumens wird durch die vakuolare ATPase (vATPase) bewirkt (Abb. 3).

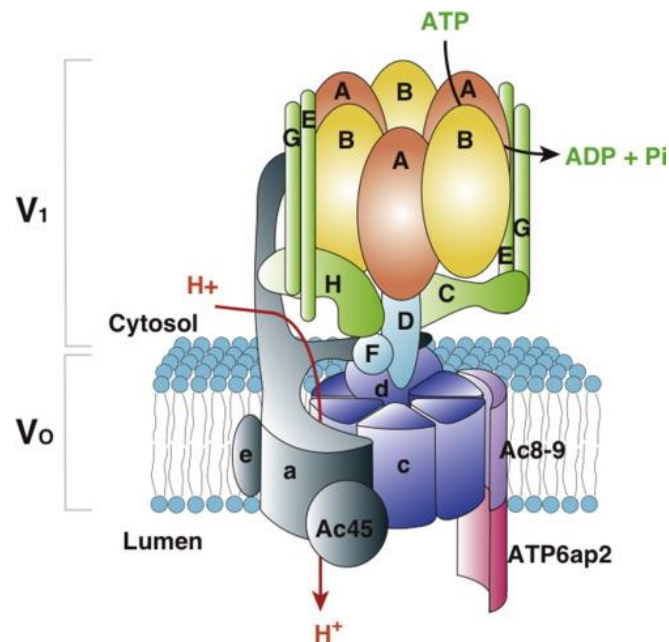


Abbildung 3: Struktur der vATPase. Der vATPase-Komplex besteht aus der zytosolischen V_1 - und der integralen V_0 -Untereinheit. V_1 enthält drei katalytische Domänen aus jeweils einem A und B, an denen die Hydrolyse des ATP zu ADP und Phosphat vonstattengeht. Dies bewirkt die Rotation von V_1 um V_0 , wodurch Protonen aus dem Zytosol in den Vesikellumen transportiert werden. V_1 besteht zusätzlich aus den Einheiten C bis H, V_0 aus a, c, c', c'' und d. V_1 und V_0 sind durch D, F und d miteinander reversibel verbunden. In Säugetieren enthält die vATPase zusätzlich die Proteine Ac45, ATPap6, die essentiell für die Funktion der vATPase sind. (Abbildung übernommen aus Sun-Wada and Wada, 2015).

Diese besteht aus einer granulären V_0 - und einer zytosolischen V_1 -Untereinheit (Sun-Wada and Wada, 2015). Die V_1 -Untereinheit setzt sich aus den Einheiten A bis H zusammen. Die Umsetzung von ATP zu ADP und Phosphat erfolgt an den drei katalytischen Seiten, die aus jeweils einer A- und einer B-Einheit bestehen. Die V_0 -Untereinheit besteht aus den sechs Einheiten a, d, e, c, c' und c''. Die c-Einheiten fungieren als intragranulärer pH-Sensor. Die a-Einheit bewirkt die Rotation der V_1 -Untereinheit um die V_0 -Untereinheit, wodurch die Protonen unter ATP-Verbrauch ins Lumeninnere der Granulen aktiv transportiert werden. Die beiden Untereinheiten sind durch D, F und d miteinander verbunden. Der Zusammenbau von V_0 und V_1 ist reversibel und abhängig von dem intrazellulären pH und der Anwesenheit von Glucose. Nur wenn diese beiden Untereinheiten zusammengebaut sind, kann der ATP-abhängige Protonentransport ins Lumeninnere erfolgen.

Die vATPase bewirkt die Azidizierung in verschiedenen Zellkompartimenten. Die Untereinheiten sind innerhalb einer Zelle stets die gleichen, allein die Einheit a in V_0 variiert je nach Lokalisation innerhalb der Zelle. Davon gibt es vier Varianten: a1 bis a4. In sekretorischen Vesikeln kommt a3 vor, in synaptischen Vesikeln ist es a1 (Marshansky and Futai, 2008).

1.3.3. Befüllung der LDCVs durch VMAT

In Neuronen und neuroendokrinen Zellen erfolgt die Befüllung der Granulen mit den Monoaminen durch vesikuläre Monoamintransporter (VMAT). VMAT wurde 1992 (Erickson et al., 1992) entdeckt. Das Protein besteht aus 515 Aminosäuren und enthält 12 Transmembrandomänen. Es existieren die zwei Isoformen VMAT1 und VMAT2. Beide sind in der Lage alle Monoamine zu binden, unterscheiden sich jedoch in deren Bindungsaffinität zum Substrat. VMAT1 wird im Nebennierenmark und ausschließlich während des Embryonalstadiums im Gehirn (Hansson et al., 1998) exprimiert. VMAT2 wird hingegen hauptsächlich im Zentralen Nervensystem, aber auch in Blutplättchen (Lesch et al., 1993), im Nebennierenmark und in sympathischen Neuronen (Erickson et al., 1996; Peter et al., 1995) exprimiert. Der Transport der Katecholamine erfolgt gegen den Protonengradienten unter ATP-Verbrauch.

VMATs wirken über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. G-Proteine können Monomere oder Heterotrimer sein. Heterotrimer bestehen aus jeweils einer α -, β - und γ -Untereinheit ($G\alpha\beta\gamma$). Es sind verschiedene Untereinheiten bekannt, sodass zahlreiche Zusammensetzungen möglich sind. Deren Mechanismus ist jedoch derselbe: $G\alpha$ liegt mit Guanidindiphosphat (GDP) gebunden mit $G\beta\gamma$ in einem Komplex vor, welcher mit VMAT assoziiert ist. Durch den GEF (Guanidin exchange factor) wird das GDP dissoziiert und ein Guanidintriphosphat (GTP) gebunden. Dadurch löst sich $G\alpha$ ab und das GTP wird durch seine intrinsische GTP-Hydrolyseaktivität zu GDP umgesetzt. Da jetzt wieder ein GDP am $G\alpha$ gebunden vorliegt, bildet es erneut einen Komplex mit $G\beta\gamma$. Speziell die $G\alpha$ -Untereinheit wurde bezüglich ihrer regulatorischen Funktion auf den VMAT untersucht. Dabei wurde das Protein $Go2\alpha$ detektiert, dessen Aktivierung die Hemmung der Monoaminaufnahme zur Folge hat (Pahner et al., 2002). $Go2\alpha$ kolokalisiert mit VMAT1 und VMAT2 auf chromaffinen Granula im Nebennierenmark der Ratte und auf synaptischen Vesikeln in Neuronen.

1.4. Entdeckung von CAPS

Calcium-dependent activator protein for secretion (CAPS) wurde 1992 als ein zytosolisches 145 kDa großes Protein aus einem Gehirnlisat mittels Chromatographie aufgereinigt. Die Inaktivierung des Proteins mit einem spezifischen Antikörper führte zu einer reduzierten Freilassung von Noradrenalin. Es wirkt in neuronalen Zellen mit anderen zytosolischen Komponenten in der Ca^{2+} -abhängigen Sekretion als Dimer unter ATP-Verbrauch (Walent et al., 1992). Dessen Bindungsaffinität zum Ca^{2+} beträgt $K_d=270 \mu\text{M}$. Es ist homolog zum Unc31-Protein in *Caenorhabditis elegans* (Ann et al., 1997). Das Protein ist hoch konserviert und wurde in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) und *Drosophila Melanogaster* beschrieben. Von CAPS existieren in Säugetieren die beiden Isoformen CAPS1 und CAPS2, die zu 80 % homolog sind (Speidel et al., 2003).

1.4.1. Struktur von CAPS

Beide CAPS-Isoformen bestehen aus vier Domänen: DID (Dynactin-interacting domain), PH (Pleckstrin homology)-Domäne, C2-Domäne und MHD (Munc13-homology domain). Von CAPS1 sind vier lange Spleißvarianten bekannt. Von CAPS2 wurden die sechs Spleißvarianten CAPS2a-f publiziert (Abb. 4), die mit Hilfe einer murinen Cerebellum-cDNA-Bibliothek (P6) sequenziert wurden (Sadakata et al., 2007a). Die längste Form davon ist mCAPS2b mit 31 Exons. Es gibt drei lange Spleißvarianten (CAPS2a-c), die die MUN-Domäne enthalten und drei kurze Spleißvarianten (CAPS2d-f), denen diese fehlt. In CAPS2a fehlen die Exons 22 und 25, in CAPS2b das Exon 25 und in 2c die Exons 11 und 22. CAPS2d endet nach dem Exon 13, CAPS2e nach Exon 11. Diese enthalten die ersten drei Domänen DID, C2 und PH. CAPS2f endet nach Exon 4 und enthält nur die DID. Die Proteine mCAPS2a-c besitzen am Ende eine Region, die der Bindung an LDCVs zugeschrieben wird. mCAPS2d-f besitzen am C-Terminus eine alternative Sequenz, die mit keinem identifizierten Exon übereinstimmt.

Die Funktionen der einzelnen Domänen von CAPS sind noch nicht vollständig geklärt. Die DID könnte über das Motorprotein Dynaktin mit dem Zytoskelett interagieren und so die intrazelluläre Translokation des CAPS-Proteins bewirken. Die Sequenz enthält Homologien zu anderen DID von anderen Proteinen, aber dessen Bindung an das Dynaktin wurde bislang noch nicht nachgewiesen. C2-Domänen bestehen aus acht β -Faltblättern und können mit Phospholipiden interagieren. Die Mutation G476E in der C2-

Domäne von CAPS bewirkte eine erniedrigte Rate in der Noradrenalin-Freilassung (Grishanin et al., 2004). C2-Domänen sind nach den EF-Händen (Helix-Loop-Helix-Motiv) die zweithäufigsten Motive für Ca^{2+} -bindung und kommen in etlichen Proteinen vor, wie Phospholipase C (PLC) oder Phosphokinase C (PKC). Die Bindung von Ca^{2+} erfolgt zwischen den Faltblättern 1 und 2 bzw. 3 und 4 mit den Loops 1 bzw. 3. Klassische Ca^{2+} -Bindungsstellen bestehen aus den Aminosäuren Aspartat (D) und Serin (K) (Rizo and Südhof, 1998). Eine Ca^{2+} -bindung verursacht eine Änderung im elektrostatischen Potential des Proteins und dadurch dessen Konformationsänderung. Sequenzvergleiche zeigen, dass in CAPS die meisten dafür notwendigen Aspartate fehlen. Die C2-Domäne ist hier also keine typische (Speidel et al., 2005) und demnach ist deren Rolle noch nicht sicher geklärt. Die PH-Domäne von CAPS1, die eine hohe Homologie mit CAPS2 aufweist, wurde bereits kristallisiert. PH-Domänen haben die Funktion mit verschiedenen Formen der Phosphatidyl-Inositol-Phosphate (PIP) in der Membran zu interagieren. Mutationen in der PH-Domäne von CAPS führten zur verminderten Fusion von Granulen (Kabachinski et al., 2014). Eine funktionelle Analyse ergab, dass eine unvollständige PH-Domäne in CAPS2 den RRP stark reduziert (Nguyen Truong et al., 2014). Dies bedeutet, dass dessen Funktion im Priming durch eine reduzierte Bindung an die Plasmamembran inhibiert wird. Die CAPS2-Spleißvarianten a, b, d und e, die die komplette PH-Domäne enthalten, konnten zu einem bestimmten Teil mit der Membranfraktion assoziiert werden (Sadakata et al., 2007a). Die MUN-Domäne entspricht etwa der Hälfte der langen CAPS2-Spleißvarianten und weist strukturell fast nur α -Helices auf, die dafür bekannt sind starke Protein-Protein-Interaktionen einzugehen. Die MUN-Domäne ist ähnlich der MUN-Domäne von Munc-13, die für dessen Primingfunktion notwendig ist (Basu et al., 2005). Das Exon 21, innerhalb der MUN-Domäne von CAPS, interagiert mit dem SNARE-Protein Syntaxin-1A (James et al., 2009; Parsaud et al., 2013). Am C-terminalen Ende von CAPS sind die Serine an den Positionen 5, 6 und 7 als Phosphorylierungsstellen für die Dimerisierung erforderlich (Nojiri et al., 2009). Das N-Terminale Ende des Proteins enthält eine LDCV-Bindungsdomäne (Grishanin et al., 2002)

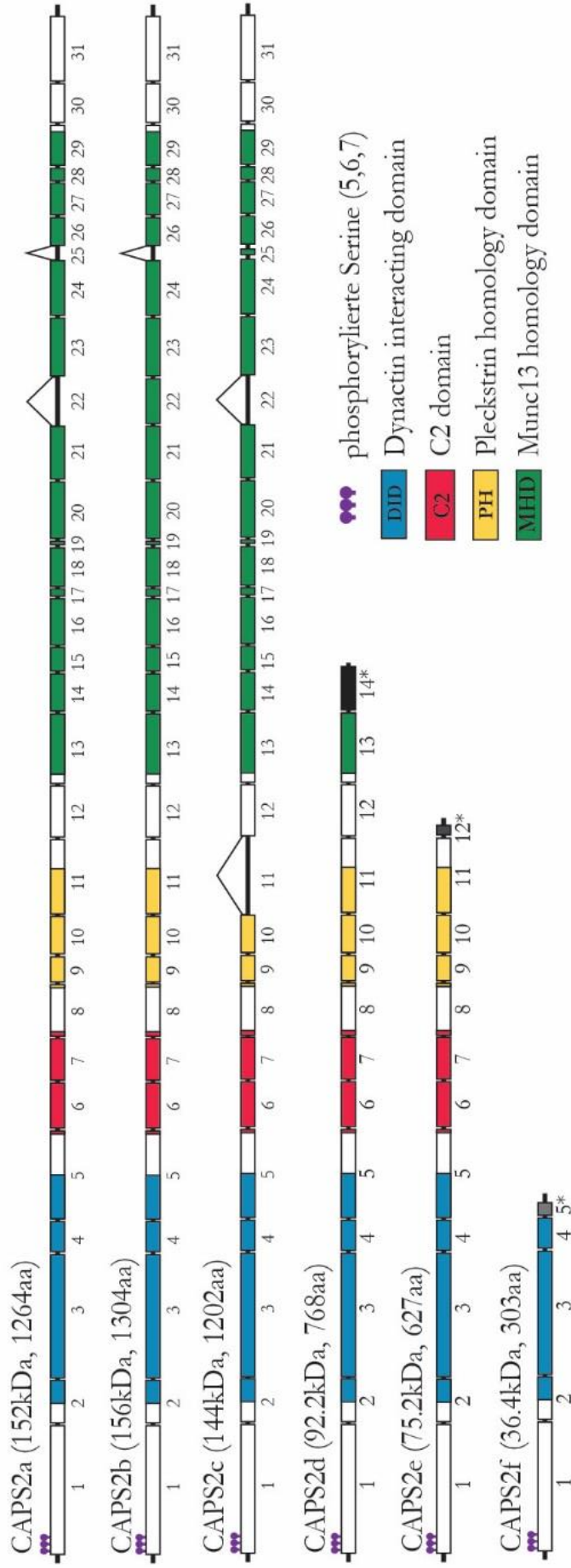


Abbildung 4: Proteinstruktur der Spleißvarianten mCAPS2a-f. Dargestellt sind die nummerierten Exons mit den enthaltenden Domänen DID (dynactin interacting domain; blau), C2 (rot), PH (Pleckstrin homology; gelb) und MHD (Munc13 homology domain; grün). Die Länge der dargestellten Exon ist proportional zur Aminosäurelänge. Am N-terminalen Ende sind an den Positionen 5, 6 und 7 Serine, die phosphoryliert werden können und zur Dimerisierung wichtig sind. Die drei kurzen Spießvarianten mCAPS2d bis mCAPS2f enthalten am C-Terminus alternative Sequenzen (grau).

1.4.2. Expression von CAPS ist gewebe- und entwicklungsspezifisch

Die Expression beider CAPS Proteine wurde vorwiegend im Gehirn und in der Nebenniere nachgewiesen, die von CAPS1 zusätzlich im Pankreas und von CAPS2 in der Lunge, Leber und dem Hoden (Speidel et al., 2003). Die Expression von CAPS ist gewebe- und entwicklungsabhängig. Western Blots zeigten, dass sowohl im Gehirn, als auch in der Nebenniere im Embryonalstadium (E19) vorwiegend CAPS2 exprimiert wird. Im adulten Alter (P30) dominiert die Expression von CAPS1 (Speidel et al., 2005). Der Nachweis der sechs natürlich vorkommenden Spleißvarianten CAPS2a-f ermöglichte es, deren spezifische Expression und Funktion zu untersuchen (Sadakata et al., 2007a). Die stärkste Expression von CAPS2 im Gehirn lag im Cerebellum vor, wobei die einzelnen Spleißvarianten in unterschiedlichen Zellen stärker oder schwächer detektiert werden konnten. CAPS2b zeigte dabei im P21-Alter die stärkste Expression. Im Cerebellum ist die Expression aller Spleißvarianten postnatal bis P21 am stärksten und nimmt danach ab, lediglich die Expression von CAPS2b bleibt auch bei P56 konstant hoch. Anhand von Schnitten konnte das CAPS2-Protein vor allem in zerebralen Körnerzellen lokalisiert werden.

1.4.3. Funktion von CAPS

In bisherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass ein CAPS1/CAPS2-Doppel-knock-out (DKO) sowohl die Fusion der LDCVs als auch die Freilassung von Katecholaminen in Chromaffinzellen signifikant reduziert (Liu et al., 2008). CAPS1-KO, sowie CAPS1/CAPS2-DKO reduziert in hippocampalen Neuronen die Sekretion von Vesikeln (Speidel et al., 2005). Ein CAPS2-KO zeigt im gleichen Zellsystem keine physiologischen Veränderungen bezüglich der Sekretion (Jockusch et al., 2007). CAPS2 hat einen Einfluss auf RRP und SR, CAPS1 zusätzlich auf SRP (Liu et al., 2008, 2010). In hippocampalen Neuronen ist CAPS1 mit Markern für synaptische Vesikel kolokalisiert. Zusätzlich konnte diese Lokalisation in den Synapsen von Säugetieren in Abhängigkeit von Ca^{2+} bestimmt werden (Farina et al., 2015). Um die Funktion der einzelnen mCAPS2-Spleißvarianten a bis f zu untersuchen, wurden Patch Clamp- und Amperometrie-Messungen an Chromaffinzellen in Blitzphotolyse-Experimenten durchgeführt (Nguyen Truong et al., 2014). Alle Spleißvarianten, die eine vollständige PH-Domäne enthalten (mCAPS2a, b, c, e), waren in der Lage den RRP in DKO Chromaffinzellen und Neuronen nach

Überexpression signifikant zu steigern (Nguyen Truong et al., 2014), doch nur mCAPS2b war in der Lage auch die Sekretion von Katecholaminen aus den LDCVs zu erhöhen. Sowohl CAPS1 als auch CAPS2 reguliert durch VMAT1 und VMAT2 die Befüllung von Granulen mit Monoaminen (Brunk et al., 2009). In Abwesenheit von CAPS ist ein Teil der LDCVs leer (Speidel et al., 2005). Dies zeigt, dass CAPS einen Einfluss auf die Befüllung der LDCVs hat, der Mechanismus dazu ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

1.4.4. Erkrankungen assoziiert mit CAPS2

Eine komplette Deletion von CAPS1 bewirkt einen letalen Phänotyp bei Mäusen (Speidel et al., 2005). CAPS1-heterozygote sowie CAPS2-KO-Tiere sind hingegen lebensfähig.

Mutationen im *Unc-31*-Gen verursachen in *C. elegans* Defekte im Nerven- und Bewegungsapparat und führen zu unkoordinierten Bewegungen und Verhalten (Brenner, 1997; Avery et al., 1993). In Säugetieren spielt das Kleinhirn bei der Steuerung motorischer Bewegungen eine wesentliche Rolle. Interessanterweise ist die Expression von CAPS2 im Kleinhirn am stärksten und mit den Neurotrophen BDNF (engl. *brain derived neurotrophic factor*) und NT-3 (Neurotrophin-3) assoziiert. Beide sind relevant für eine korrekte Gehirnentwicklung (Bates et al., 1999).

Autismus ist charakterisiert durch eine Vielzahl von morphologischen Veränderungen im Kleinhirn. In CAPS2-KO-Mäusen konnte eine veränderte Morphologie im Cerebellum (wie eine verminderte Dendritenbildung der Purkinjezellen sowie eine verzögerte Entwicklung der Körnerzellen) und eine reduzierte NT-3-Sekretion nachgewiesen werden (Sadakata et al., 2007b). In einer Studie wurde in 4 von 16 Autismus-Patienten eine Deletion des Exons 3 im CAPS2 (CAPS2 Δ Exon3) auf mRNA-Ebene entdeckt (Sadakata et al., 2007a). Das Exon 3 ist ein Teil der DID. Dessen Dilation hat zur Folge, dass das Protein nicht über Axone der Nervenzellen zur Präsynapse transportiert werden kann (Sadakata and Furuichi, 2010). Darauf basierend wurden qualitative Polymerasekettenreaktionen mit humanem Gewebe aus dem Frontallappen (post mortem) mit verschiedenen Gruppen von Patienten mit psychologischen Erkrankungen durchgeführt. Das Ergebnis war, dass CAPS in Patienten mit Schizophrenie hoch exprimiert vorlag (Hattori et al., 2011).

In einer SNP (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*)-Studie an Schweinen konnte CAPS2 mit anderen Proteinen in einer Gruppe detektiert werden, die ein hoch signifikant assoziiertes

Essverhalten-Merkmal aufweisen (Do et al., 2013). Dies könnte auf die Funktion von CAPS während der Insulinausschüttung zurück zu führen sein. Die Expression beider CAPS-Isoformen konnte in Langerhansschen Inseln, in Insulin produzierenden β -Zellen und Glucagon produzierenden α -Zellen, nachgewiesen werden (Speidel et al., 2008). Auch ein Einfluss von Munc13-1 auf die Sekretion von Insulin in β -Zellen wurde beschrieben (Kang et al., 2006). In CAPS2-KO-Tieren war Insulinsensitivität erhöht und eine Glucose-induzierte Insulinausschüttung erniedrigt. Bei zusätzlicher CAPS1-Heterozygotie konnte zusätzlich ein verminderter Insulingehalt und eine verminderte Vesikeldichte in den β -Zellen beobachtet werden. Diese Daten zeigen, dass CAPS einen Einfluss auf die regulatorischen Mechanismen bezüglich der Exozytose Insulin-haltiger Granulen hat.

1.5. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es die Funktion des mCAPS2-Proteins in der Befüllung der LDCV mit Katecholaminen näher aufzuklären. Dazu wurden folgende Punkte bearbeitet:

- Untersuchung der Ca^{2+} -abhängigen Exozytose und Katecholaminfreisetzung in Abhängigkeit der Spleißvarianten mCAPS2a und mCAPS2b an murinen CAPS1/CAPS2-DKO und Wildtyp Chromaffinzellen mit Hilfe von Patch Clamp- und Amperometrie-Messungen
- Einfluss von mCAPS2b auf die morphologischen Eigenschaften von LDCVs durch elektronenmikroskopische Analyse
- Regulation der Serotonin-Aufnahme in CHO-Zellen durch vakuolaren Monoamintransporter durch die beiden Spleißvarianten mCAPS2a und mCAPS2b
- Zum Verständnis des Mechanismus von CAPS während der LDCV-Befüllung wurde dessen Rolle in der Azidifizierung des LDCV-Lumens mit Hilfe eines pH-Sensors untersucht
- Sichten nach möglichen mCAPS2-Interaktionspartnern mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems (YTH)
- Herstellung eines mCAPS2b spezifischen Antikörpers zur Ermöglichung zukünftiger Untersuchungen von CAPS2b-Interaktionspartner

2. Materialien

2.1. Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Aceton	Roth
Adrenalin	Fischer Scientific
Agarose	Roth
Albumin	Sigma
Ampicillin	Roth
Aprotinin	Sigma
ATZ (3-Amino-1,2,4-triazole)	Sigma
β -Mercaptoethanol	Roth
BSA (<i>bovine serum albumin</i>)	Sigma
CaCl ₂	Becton Dickinson
CCCP (Carbonylcyanid- <i>m</i> -chlorphenylhydrazon)	Sigma Aldrich
Coomassie	Merck
dNTPs	Invitrogen
DTT	Thermo Scientific
EDTA	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Invitrogen
FCS	Invitrogen
Glycerol	Sigma
Glycin	Roth
Glucose	Merck
HCl	Sigma
H-EDTA	Sigma
HEPES	Sigma
Isopropanol	Roth
ITS (Insulin-Transferrin-Selenium)-X	Gibco Life Technologies
Kaliumchlorid	Merck

Kanamycin	Sigma
Kollagen	Becton Dickinson
L-Cystein	Sigma
L-Glutaminsäure	Roth
Lithiumacetat	Sigma
Lowicryl	Science Service
Magermilchpulver	AppliChem
Methanol	Roth
Milchsäure	Sigma
Magnesium-ATP	Sigma
Magnesiumchlorid	Merck
MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure)	Fischer Scientific
Mountingmedium	Sigma
MOPS (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure)	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Natrium-GTP	Sigma
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Sigma
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Sigma
NaOH	Alfa Aesar
NGS (<i>normal goat serum</i>)	Palm Biotech
Nigericin	Sigma
Paraformaldehyd	Merck
Penicillin	Invitrogen
PMSF	Sigma
Ponceau S	Sigma
Proteaseinhibitortablette	Roche
Quick Extract	Epicentre Biotechnologies
Sorbitol	Roth
Streptomycin	Invitrogen
Stripping Buffer	Thermo Scientific
Tris-Cl	Roth
Tris-EDTA	Sigma

Tris-HCl	Roth
Triton-X-100	Sigma
Trypsininhibitor	Sigma
Tween	Roth
Uranylacetat	Science service
Valinomycin (06.15)	Sigma
X-Gal	MP Biomedicals

2.2. Medien

Produkt	Hersteller
LB-Medium	Roth
DMEM	Gibco Life Technologies
DOB	MP Biomedicals
- L (DO Supplement)	Clontech Laboratories
- W (DO Supplement)	Clontech Laboratories
- LW (DO Supplement)	Clontech Laboratories
- ALWH (DO Supplement)	Clontech Laboratories
YPD	Roth

2.3. Enzyme

Enzym	Hersteller
Chymotrypsin	Sigma
Papain	Worthington
Pfu-DNA-Polymerase	Thermo Scientific
T4 DNA Ligase	Thermo Scientific
Trypsin	Invitrogen
SAP (<i>Shrimp alkaline Phosphatase</i>)	Fermentas

2.3. Puffer

Puffer	Hersteller
PBS 1x	Gibco Life Technologies
PBS 10x	Gibco Life Technologies
Pfu-DNA-Polymerase-Puffer	Thermo Scientific
Stripping Buffer	Thermo Scientific
T4 DNA Ligase-Puffer	Thermo Scientific
Transfer Buffer	Novex Life Technologies
Tris-Acetat-Puffer	Novex Life Technologies

2.4. Lösungen

2.4.1. Präparation von Chromaffinzellen

Locke's-Lösung

154 mM NaCl

5,6 mM KCl

0,85 mM NaH₂PO₄ x H₂O

2,15 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O

10 mM Glucose

7,4 pH; ~312 mOsm

Papainlösung

50 ml DMEM

10 mg L-Cystein

0,5 ml 100 mM CaCl₂

0,5 ml 50 mM EDTA

15 bzw. 20 Units Papain

Die Lösung wird in 2 bzw. 3 ml-Aliquots bei -20° C gelagert. Am Versuchstag wird diese im Inkubator bei 37° C und 13 % CO₂ aufgetaut und gleichzeitig begast, bis ein pH von etwa 7,4 erreicht ist. Das dazugegebene Papain wird durch L-Cystein und EDTA aktiviert. Kurz vor der Verwendung wird die Lösung steril filtriert (Porengröße des Filters: 0,2 µm).

Inaktivierungslösung

50 mM DMEM

5 ml FCS

125 mg Albumin

125 mg Trypsininhibitor

Die Lösung wird in 2 bzw. 3 ml-Alliquots bei -20° C gelagert und am Tag des Gebrauchs im Inkubator bei 37° C und 13 % CO₂ aufgetaut und gleichzeitig begast, bis ein pH von etwa 7,4 erreicht ist.

Kulturmedium

20 ml DMEM

200 µl ITS-X

160 µl Penicillin/Streptomycin

Pro 6-Well-Platte werden 20 ml Kulturmedium angesetzt. Das Kulturmedium wird stets frisch angesetzt und im Inkubator bei 37° C und 13 % CO₂ begast, bis ein pH von etwa 7,4 erreicht ist.

2.4.2. Lösungen für elektrophysiologische Messungen

10x Extrazellulärlösung

1520 mM NaCl

24 mM KCl

100 mM HEPES

12 mM MgCl₂ x H₂O

25 mM CaCl₂ x H₂O

pH 7,4 (mit NaOH anpassen)

310 mOsm

Die Lösung wird vor dem Gebrauch 1:10 verdünnt und mit 10 mM Glucose versetzt.

Intrazellulärlösung

110 mM L-Glutaminsäure

9 mM H-EDTA

5 mM CaCl₂

40 mM HEPES

2 mM Mg-ATP
0,3 Na₂-GTP
pH 7,2 (mit 10 % CsOH anpassen)
290 mOsm

2.4.3. Lösungen zur pH-Kalibrierung

30 mM NaCl
100 mM KCl
2 mM MgCl₂
10 mM Glucose
20 mM Milchsäure (für pH4)
20 mM MES (für pH5 und pH6)
20 mM HEPES (für pH7 bis pH9)
10 µM Nigericin
4 µM Valinomycin
5 µM CCCP (Carbonylcyanid-*m*-chlorphenylhydrazon)

Nigericin gehört zu den Polyether-Ionophoren und fungiert als ein H⁺/K⁺-Antiporter, wodurch das Membranpotential zerstört wird. Valinomycin ist ein K⁺-selektiver Cyclopeptid-Ionophor. CCCP agiert als ein Protonophor und hemmt die oxidative Phosphorylierung.

2.4.4. Immunozytochemie

PBS-Calcium-Lösung

58 mM Na₂HPO₄
17 mM NaH₂PO₄
83 mM NaCl
2 mM CaCl₂
0,5 mM MgCl₂

Fixierlösung

2 g PFA-Pulver werden unter dem Abzug unter Rühren in 45 ml Wasser bei 60° C gelöst, wobei der pH mit 1 M NaOH auf 7,4 eingestellt wird. Danach wird die Lösung auf RT

abkühlen gelassen. Es werden 5 ml 10x PBS dazugegeben, die Lösung wird mit Hilfe einer Spritze und einem Filter (0,2 µm) steril filtriert.

2.4.5. Proteinbiochemie

Lysispuffer

50 mM Tris-Cl

50 mM NaCl

250 µM PMSF

1 % Triton X100

1 mM EDTA

1 mM DTT

Auf je 5 ml Lysispuffer wird eine Proteaseinhibitor-Tablette gelöst.

2.4.6. Lösung für Biochemie

TBS (1x)

50 mM Tris-Cl

150 mM NaCl

Die Lösung wird auf pH 7,6 eingestellt und autoklaviert.

TAE (1x)

40 mM Tris

0,11 % (v/v) Essigsäure

1 mM EDTA

Die Lösung wird auf pH 8,5 eingestellt und autoklaviert.

2.5. Größenstandards für Proteine und DNA

Größenstandard

Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder

λ-Marker

Hersteller

Fischer Scientific

Roche

2.6. Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide (Primer) wurden bei Eurofins Genomics bestellt.

2.6.1. Genotypisierungsprimer für CAPS1 und CAPS2

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
Primer 1502	TGCGGTGGGCTCTATGGCTTCT (22 bp)
Primer 1502	CTCGAGTGGCCTGATCTTTGTCA (23 bp)
Primer 1504	TATGAGGAGTTTATGTGCGTGGAT (24 bp)
Primer 5471	GTACCATAGTTCTGTGCCGTGTAATC (26 bp)
Primer 5472	GGAGGCTCGCAGCTCTTCAATG (22 bp)
Primer 4174	CGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTT (24 bp)

2.6.2. Klonierungsprimer

Tabelle 1: Klonierungsprimer unter Angabe von Sequenz und Zielplasmid.

Name	Sequenz 5'-3'	Zielplasmid
IRES_BamHI_BssHII_for	TATAGGATCCGCCACGCGCGCATAAC GGGCTGCAGGAA	pMax_IRES_eGFP
IRES-MluI_rev	GCTAGACGCGTATCTTAACAATGAGG	
NPY_ClaI_for	TATACCATCGATGCGCCACCATGCTA GGTAACAAG	pMax_NPY-ClopHensorN(Q69M)
NPY-NheI_rev	ATGTATACTAGCTAGCCCACATGCA GGGTCTTC	
MUN_EcoRI_for	TATACCGGAATTCGGGTGGTTTAGCC CTGGCCAAG	pGBKT7_mCAPS2a/b_MUN
MUN_BamHI_rev	TATACGCGGATCCTCAGTCATCACCT TCTTCTCC	
Ex22_EcoRI_for	TATACCGGAATTC AAGAACATCGCCA ACAGTCTTCCC	pGBKT7_mCAPS2-Exon 22
Ex22_BamHI_rev	TATACGCGGATCCGGTGGACTCATAT AAAGAAGCC	
rStx1A_NdeI_for	GCGCGGCAGCCATATGATGAAGGAC	pGADT7_rStx1A (1-164)
rStx1A_EcoRI_rev	TATACGGGAATTC TCACTTCCTGCGT GCCTTGC	

2.6.3. Primer zur Sequenzierung der pGADT7-Plasmide

pGADT7_for (3'-5'): TAATACGACTCACTATAGGGCG

pGADT7_AD_rev (3'-5'): AGATGGTGCACGATGCACAG

2.7. Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Hersteller
BamHI	Thermo Scientific
BssHIII	NEB
ClaI	NEB
MluI	Thermo Scientific
NheI	Thermo Scientific
Sfi I A	Thermo Scientific
Sfi I B	Thermo Scientific

2.8. Primäre und sekundäre Antikörper

Tabelle 2: Antikörper für Western Blots und Immunocytochemie unter Angabe von Klonalität, Organismus und Bestelldetails.

Antikörper gegen	Klonalität	Organismus	Hersteller	Bestellnummer
mCAPS2_Ex22	polyklonal	Kaninchen	Martin Jung	---
β -Actin	polyklonal	Maus	Thermo Scientific	#32430
HA (Hämagglutinin)	monoklonal	Maus	Covance	MMS-101P
Maus-IgG-HRP	polyklonal	goat	Thermo fisher	32430
Kaninchen_IgG-HRP	polyklonal	goat	Jackson	111-035-146
Chromogranin A	polyklonal	Kaninchen	Abcam	ab15160
Kaninchen-IgG Alexa Fluor®-647	polyklonal	Ziege	Invitrogen	A21245

2.9. Bakterien

Stamm	Hersteller
DH5 α	Fischer Scientific
Stbl3	NEB

2.10. Zelllinien

Zelllinie	Hersteller
BHK (BHK-21)	DSMZ Heidelberg

2.11. Kits

DNA-Isolation aus Bakterien	Qiagen
DNA-Gel-Isolations-Kit	Qiagen
Neon Transfectionssystem	Thermo Fischer
KAPA2G Fast Hot Start Genotyping Mix	Peqlab

2.12. Hefestämme und Hefekonstrukte

Produkt	Hersteller
Y187	Clontech Laboratories
AH109	Clontech Laboratories
Mate & Plate™ Library – Mouse Brain (Normalized)	Clontech Laboratories
pGBKT7	Clontech Laboratories
pGADT7	Clontech Laboratories

2.13. Laborgeräte

Elektroporator für Chromaffinzellen	Invitrogen, NEON™
Elektroporator für Hefen	BTX ECM399
Feinwaage	Sartorius ENTRIS 124I-1S
Inkubator für Chromaffinzellen	Unity Lab Service, HERA cell 150
Inkubator für Hefen	Memmert
Osmometer	WESCOR Vapro Pressure Osmometer 5520
PCR-Cycler	Eppendorf
pH-Meter	Schott Glas Mainz CG842
Photometer	Eppendorf BioPhotometer <i>plus</i>
Thermoschüttler	BIOER, Mixing Block MB-102

Ultraschallgerät

Vortex

Wasserbad

Zentrifuge (1,5-2,0 ml)

Zentrifuge (2,0-50 ml)

Bandelin SONOREX RK102H

VWR International

GFL, Gesellschaft für Labortechnik

Eppendorf Centrifuge 5415 D

Heraeus Multi Fug IS-R

3. Methoden

3.1. Arbeiten mit primärer Zellkultur

3.1.1. Präparation von murinen Chromaffinzellen

Zur Isolation einzelner Chromaffinzellen werden bei embryonalen (E19) Mäusen nach Dekapitierung die Nieren seitlich des Rückenmarks freigelegt, um die auf ihnen sitzenden Nebennieren zu entnehmen und in 1x Locke´s-Lösung zu sammeln. Es folgt eine 15-minütige Inkubation in 500 µl Papainlösung (20 Units/ml) schüttelnd im Wasserbad bei 37° C. Danach werden die Nebennieren in 500 µl Inaktivierungslösung für vier Minuten bei 37° C im Wasserbad geschüttelt. Dabei inaktiviert das BSA in der Inaktivierungslösung das Papain. Jeweils zwei Nebennieren werden einmal mit dem Kulturmedium gewaschen, in 300 µl Kulturmedium aufgenommen, durch Triturieren vereinzelt und auf sechs Deckgläsern in einer 6-Well-Zellkulturplatte ausplattiert. Nach einer 30-minütigen Adhärenzzeit der Chromaffinzellen werden pro Well 3 ml Kulturmedium dazu gegeben. Die Zellen werden im Inkubator bei 37° C und 13 % CO₂ gelagert und soweit nicht anders beschrieben am zweiten und dritten Tag in Kultur für den Versuch genutzt.

3.1.2. Elektroporation der Chromaffinzellen

Für eine Elektroporation werden pro 6-Wellplatte vier Nebennieren ausplattiert. Die Präparation der Chromaffinzellen erfolgt bis zum Schritt nach dem Triturieren wie in 3.1.1. beschrieben. Danach werden die Zellen im Kulturmedium in einer Tischzentrifuge für 5 Minuten bei 4000 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert, einmal in PBS gewaschen und erneut pelletiert. Zur Elektroporation wird der Kit Neon Invitrogen gemäß der Herstellerangaben verwendet. Diese erfolgt mit 4 µg DNA durch das Anlegen einer einmaligen Spannung von 1400 V für 20 Millisekunden. Dabei entstehen kleine Poren in der Zellmembran, durch die die DNA in die Zelle gelangen kann. Danach werden die Zellen direkt im Kulturmedium (ohne Penicillin und Streptomycin) aufgenommen und, wie in 3.1.1. beschrieben, ausplattiert.

3.1.3. Überexpression von rekombinanten Proteinen mit dem pSFV1-System

Das Semliki-Forest-Virus ist ein Nagetier-Virus. Es wird zur Überexpression bestimmter Proteine genutzt. Das Virus wird aus zwei Vektoren gebildet, dem pSFV-Helper und dem pSFV1. Das Konstrukt pSFV-Helper kodiert Strukturproteine, die zur Bildung viraler Partikel notwendig sind. pSFV1 enthält die Sequenzen für das Transgen, die Replikationsgene und das Resistenzgen Ampicillin. Beide Konstrukte werden durch den SP6-Promoter reguliert. Nach der Elektroporation beider Plasmide (als RNA) in BHK-Zellen, wird das Virus produziert und ins Medium abgegeben. Das Medium mit dem darin enthaltenen Virus wird bei -20° C gelagert.

Vor dem Gebrauch wird das Virus durch die Zugabe von Chymotrypsin für 40 Minuten aktiviert, um es in den infektiösen Zustand zu bringen. Anschließend wird das Chymotrypsin durch Aprotinin für 5 Minuten inaktiviert. Das aktivierte Virus kann bis zu fünf Tagen genutzt werden, bevor dessen Aktivität nachlässt. Zum Infizieren der Zellen werden 100 µl des aktivierten Virus pro 1 Well einer 6-Well-Platte in das Medium gegeben. Die Infektion mit den Viren zur Überexpression der darin kodierten Proteine erfolgte für mCAPS2a und mCAPS2b für 5,5 bis 6 Stunden und für eGFP für 3,5 bis 4 Stunden.

3.1.4. Präparation der murinen Chromaffinzellen für die Elektronenmikroskopie

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung von murinen Chromaffinzellen werden je zwei Nebennieren wie in 3.1.1. bis nach der Inkubation in der Inaktivierungslösung präpariert. Danach erfolgte die Triturierung in 20 µl Kulturmedium. Davon werden je 10 µl auf je 6 mit Kollagen beschichtete Saphierscheiben (Leica) in 4-Well-Platten ausplattiert und für 2 Tage bei 37 °C und 13 % CO₂ kultiviert.

3.1.5. Fixierung von murinen Chromaffinzellen

Zur Fixierung muriner Chromaffinzellen auf einem Deckglas wird das Zellkulturmedium entfernt, es folgen zwei Waschschrte mit PBS (pH 7,4). Anschließend werden die Zellen für 20 Minuten in 4% PFA (in PBS, pH 7,4) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei 5-minütigen Waschschrten mit PBS folgt eine Inkubation mit 50 mM Glycin in PBS für 10 Minuten und danach wieder zwei Waschschrte mit PBS.

3.2. Elektrophysiologie

3.2.1. Aufbau des Messplatzes

Die elektrophysiologischen Aufnahmen werden an einem inversen Olympus-Mikroskop (IX710-S8F) durchgeführt. Dieses steht auf einem schwingungsgedämpften Tisch (Newport), um Vibrationen zu verhindern und wird durch einen Faradaykäfig gegen äußere elektrische Störsignale geschützt. Das Deckglas mit den Zellen wird in einer Messkammer eingespannt und mit Extrazellulärlösung geflutet. Die Messkammer wird für die Messung auf dem Objektisch positioniert, auf welchem die Zellen mit einem 40x Objektiv (Carl Zeiss GmbH) ausgewählt und während der Messung beobachtet werden können. Der Objektisch lässt sich in x/y/z-Richtung bewegen. Die Patchpipette wird an den Mikromanipulatoren befestigt, wodurch sich diese in x/y/z-Ebene bewegen lässt. Die Pipette ist mit dem Messverstärker des EPC9 über eine Elektrode verbunden. Ein chloridierter Silberdraht, der mit dem Verstärker verbunden ist, dient in der Extrazellulärlösung als Badelektrode. Durch die Badelektrode und die Elektrode in der Patchpipette entsteht ein elektrischer Kreislauf, sodass eine Spannung an eine gepatchte Zelle angelegt werden kann. Ein selbst gebautes Perfusionssystem und eine Absaugpumpe erlauben eine stetige Erneuerung der Extrazellulärlösung. Ein Monochromator (Polychrom IV von T.I.L.L. Photonics) ermöglicht das Erkennen von fluoreszierenden Zellen. Alle Geräte am Messplatz sind elektrisch geerdet. Ein Computer ist mit dem Messplatz verbunden. Durch diesen lassen sich die Experimente mit dem Programm PULSE 8.31 (HEKA Elektronik) steuern. Die Auswertung der Daten erfolgt mit der IGOR Pro-Software (WaveMetrics).

3.2.2. Herstellung von Patchpipetten

Die Patchpipetten bestehen aus Borosilikatglas, besitzen eine Länge von 8 cm, einen Außendurchmesser von 1,5 mm und eine Wanddicke von 0,32 mm (Science Products GmbH). Diese werden durch abwechselndes Erhitzen und Ziehen mit Hilfe des Micropipette Pullers P-97 (Sutter Instruments) am Tag des Experimentes hergestellt. Um eine glatte Oberfläche zu erhalten, werden die Pipettenspitzen mittels eines Heizdrahtes poliert. Der Widerstand der verwendeten Patchpipetten beträgt nach allen Herstellungsschritten 3-5 MΩ.

3.2.3. *Patch clamp*-Technik

Die *Patch clamp*-Technik ist eine biophysikalische Messmethode mit der Ionenströme über eine Zellmembran gemessen werden können. Zuerst durch Neher and Sakmann (1976) zur Auswertung einzelner Ionenkanäle in der Membran genutzt, wurde diese durch Hamill et al. (1981) weiterentwickelt. Eine Nervenzelle ist an der Innenseite der Plasmamembran negativ geladen und besitzt ein Membranpotential von -70 mV. Dieses wird aktiv unter anderem durch Natrium/Kalium-ATPasen erzeugt.

Die Experimente erfolgen in der Ganzzelleableitung (engl. *whole cell configuration*). Dazu werden die Patchpipette und die Zelle in räumliche Nähe gebracht, bis die Pipette an der Plasmamembran leicht eindellt. Ein angelegter Überdruck an der Pipette dient zum einen dazu, dass sich die Extrazellulärlösung nicht mit der Pipettenlösung vermengt. Zum anderen bewirkt dieser, dass sich die Zelle nach dem Entlassen leichter an die Pipette ansaugt. Dabei erhöht sich der Serienwiderstand. Die Patchpipette bildet nun mit der Plasmamembran eine Versiegelung (engl. *seal*), aus der sich ein Abdichtungswiderstand im Gigaohmbereich ($10^9 \Omega$) ergibt. Dadurch reduziert sich das Hintergrundrauschen. Durch Unterdruck wird dieser Membranfleck durchbrochen, sodass eine elektrisch isolierte Verbindung zwischen der gesamten Zelle und der Pipettenlösung entsteht. Auf diese Weise kann die Zelle mit bestimmten Lösungen geflutet werden. Zusätzlich kann durch das Anlegen einer Spannung (engl. *voltage clamp*) der Stromfluss durch die Membran detektiert werden. Da die Pipettenlösung das Zytosol ersetzt, ist es wichtig darauf zu achten, dass diese dem Zytosol bezüglich der Zusammensetzung, Osmolarität und dem pH-Wert angepasst wird. Während der Messung sollte die Verbindung zwischen Zelle und Patchpipette stabil bleiben. Bei einer Zellgröße von 4-11 pF soll der Zugangswiderstand zwischen dem Inneren der Pipette und der Außenlösung 5-20 M Ω sowie der Leckstrom zwischen der Pipettenöffnung und der Zelle kleiner als 50 pA betragen.

3.2.4. Membrankapazitätsmessung

Die Kapazitätsmessungen erfolgen nach (Lindau and Neher, 1988) im „sine dc“-Modus der „lock-in“-Pulse-Erweiterungssoftware. Dabei wird ein 1 kHz, 70 mV „peak-to-peak“-sinusoider Stimulus mit einem -70 mV Haltepotential angelegt. Die Plasmamembran trennt die elektrisch leitende Extrazellulärlösung vom Inneren der Zelle. Auf diese Weise wirkt die Zelloberfläche wie ein Kondensator, deren Kapazität messbar ist. Elektrische Kapazität

bezeichnet die Fähigkeit elektrische Ladung in Form von elektrischen Ladungsträgern zu speichern. Die elektrische Kapazität ist proportional zur Oberfläche der biologischen Plasmamembran. Fusionieren die Vesikel mit der Plasmamembran (=Exozytose), vergrößert sich diese um die Oberfläche des Vesikels, was in einem Anstieg der Kapazität detektiert werden kann. Die Kapazität der Zellmembran entspricht etwa $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (Fenwick et al., 1982). Solange die Zelle einen stabilen Zugang besitzt (bezogen auf Serien- und Membranwiderstand), entsteht ein Schaltkreis. Die Berechnung der Kapazität erfolgt mit Hilfe des Serienwiderstandes (R_s), der mit dem Membranwiderstand (R_M) in Serie geschaltet ist und die Qualität des Zuganges zur Zelle beschreibt. Entsteht eine Differenz zwischen der angelegten definierten Sollspannung und der Membranspannung, kann ein Kompensationsstrom gemessen werden, der diese Differenz auszugleichen versucht.

In dieser Arbeit wurden die Zellen in der Ganzzelleableitung mit einer Intrazellulärlösung geflutet, die eine Konzentration von $6 \mu\text{M}$ freiem Ca^{2+} enthielt (Abb. 5). Die Ca^{2+} -Konzentration wurde in vorherigen Experimenten von Ekta Dembla ausgetestet und als die beste bewertet, um die Exozytose hervorzurufen und gleichzeitig die einzelnen amperometrischen Signale voneinander separiert auswerten zu können (Daten nicht veröffentlicht). Die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.2.5. Amperometrie

Die Amperometrie ist eine zeitlich und räumlich hochauflösende elektrochemische Messmethode, durch die eine Katecholaminfreisetzung von Chromaffinzellen an einer Kohlefaser gemessen werden kann (Bruns, 2004). Die Kohlefaserelektroden werden nach dem Protokoll von Bruns (2004) hergestellt. Die Kohlefaser hat einen Durchmesser von $5 \mu\text{m}$, ist an den Vorverstärker EPC-7 Patch Clamp-Verstärker (HEKA Elektronik, DE-Lambrecht) angeschlossen und lässt sich über Mikromanipulatoren in x/y/z-Achse bewegen. Diese wird möglichst nah an die Chromaffinzelle positioniert, sodass die beiden im direkten Kontakt zueinander stehen. An die Kohlefaser wird eine positive Haltespannung von $+800 \text{ mV}$ angelegt (s. Abb. 5), sodass die Orthohydrochinon-Reste sezernierter Monoamine oxidiert werden (Chow et al., 1992). Dadurch werden zwei Elektronen freigesetzt, die amperometrische Stromtransienten entstehen lassen (Elektrolyse-Strom). Der Strom, der notwendig ist, um die Haltespannung von $+800 \text{ mV}$

wiederherzustellen, wird als amperometrisches Signal gemessen, mit 3 kHz gefiltert (8-Pole Festfrequenz Besselfilter) und bei 25 kHz digitalisiert.

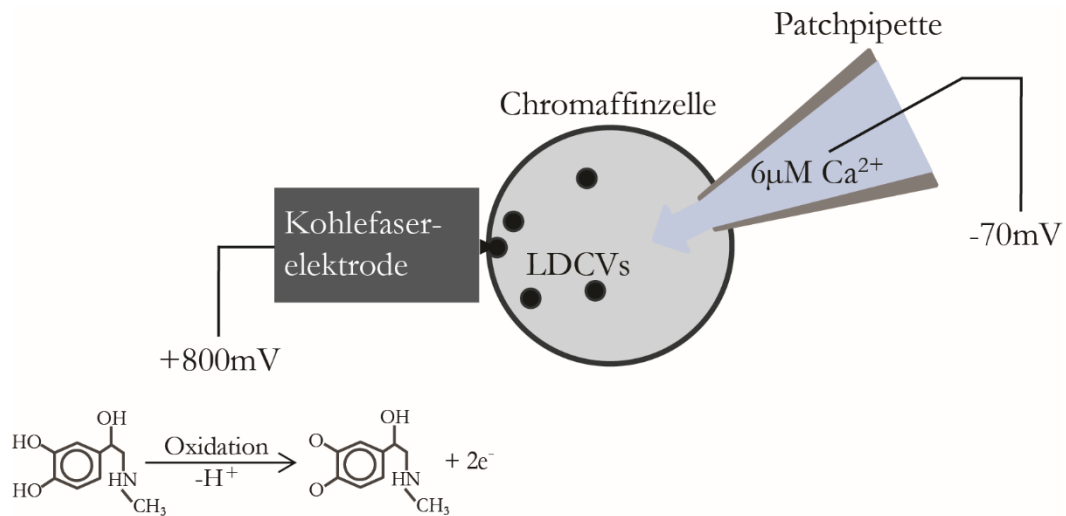


Abbildung 5: Gleichzeitige Messung der Zellkapazität und der amperometrischen Stromtransienten. Murine Chromaffinzellen werden in der Ganzzelleableitung mit intrazellulärem 6 µM Ca²⁺ geflutet, wodurch eine Ca²⁺-abhängige Exozytose der LDCVs ausgelöst und durch eine Kapazitätsmessung als Anstieg dargestellt wird. Gleichzeitig werden an der Kohlefaser die aus den LDCVs freigesetzten Katecholamine oxidiert und als Elektrodenstrom quantitativ detektiert.

Die Kohlefasern werden jeweils vor dem Experiment angeschnitten und durch kurzes Eintauchen in eine 0,5 mM Adrenalinlösung auf deren Sensitivität überprüft. So wird die gleiche Sensitivität der Kohlefasern für Messungen aller Gruppen gewährleistet. Durch jedes einzelne Vesikel (LDCV), das mit der Plasmamembran fusioniert, werden Monoamine freigesetzt. Diese oxidieren an der Kohlefaser und werden als Stromtransiente in Form eines Ausschlags (engl.: *spike*) am Oszilloskop und im Pulse-Programm dargestellt. Somit kann die Sekretion von jedem Vesikel einzeln gemessen und ausgewertet werden. Diese Art der Auswertung wird als *Single Spike*-Analyse bezeichnet.

3.3. Elektronenmikroskopie

Mit der Elektronenmikroskopie wird es möglich in Zellschnitten die subzellulären Strukturen mit einer sehr hohen Auflösung von bis zu 0,1 nm aufzunehmen. Dazu werden die Zellen unter Hochdruck eingefroren, durch Aceton dehydriert und mit Schwermetallen angefärbt. Die Proben werden mit Elektronen bestrahlt und deren Streuung wird detektiert. Die elektronendichten Regionen werden dadurch als dunkle Strukturen sichtbar.

Die einzelnen Deckgläser mit den kultivierten Zellen werden in einem Einzelprobenträger im DMEM-Medium, dem 30 % FCS zugesetzt wurde, unter Hochdruck eingefroren. Die Gefriersubstitution und das Einbetten in Lowicryl erfolgen wie in Matti et al. (2013). Dazu wird zunächst die Temperatur bei den Proben für 2 Stunden automatisch von -130 °C auf -90 °C erhöht. Die Kryosubstitution erfolgt für 20 Stunden zwischen -90 und -70 °C im anhydrierten Aceton und anschließend für weitere 20 Stunden zwischen -70 und -60 °C mit 0,3 % Uranylacetat, welches im anhydrierten Aceton gelöst ist. Bei -60 °C werden die Zellen für jeweils eine Stunde schrittweise mit 30 %, 60 % und 100 % Lowicryl (3:1 K11M/HM20-Mischung mit 0,3 % Uranylacetat) infiltriert. Nach 5 Stunden in 100 % Lowicryl werden die Proben zunächst bei -60 °C für 24 Stunden unter UV-Licht polymerisiert und anschließenden 15 Stunden unter Erhöhung der Temperatur auf 5 °C erwärmt. Die Proben werden bis zur Anfertigung der Ultradünnschnitte bei 4 °C gelagert. Zuerst werden 2-3 ultradünne 70 nm-Schnitte (parallel zum Deckglas) und anschließend ein 400 nm Schnitt mit Hilfe des Leica EM UC7 angefertigt. Die 70 nm-Schnitte werden auf einem mit Pioloform beschichteten Kupfergitter gesammelt, mit Uranylacetat und Bleicitrat nachkontrastiert und mit einem Tecnai 12 Biotwin-Elektronenmikroskop (FEI/Philips) analysiert. Die 400 nm-Schnitte werden nach dem Schneiden auf einen Objektträger überführt, anschließend im Dunkeln für 1 Stunde luftgetrocknet und danach mit Mountingmedium eingebettet. Um einen Fluoreszenzverlust in den Proben zu vermeiden wird die SIM-Analyse innerhalb von 24 Stunden durchgeführt. Die 400 nm-Schnitte werden am supraauflösendem Mikroskop ELYRA PS.1 (Carl Zeiss GmbH) mit einem 63x-Objektiv (Plan-Apochromat, NA1.4) nach der Anregung mit 488 nm und zusätzlich als Durchlichtbild aufgenommen. Die Auswahl der infizierten Zellen wird anhand der Fluoreszenz von eGFP getroffen.

Zur zweidimensionalen Auswertung der 70 nm-Schnitte der Chromaffinzellen werden mehrere Elektronenmikroskopiebilder der Größe 1376x1032 Pixel mit einer CCD-Kamera (MegaView/Olympus) und einer 23000-fachen Auflösung aufgenommen. Die einzelnen Aufnahmen werden mittels MIA (engl.: *Multiple Image Alignment*) Tool der Olympus Software zu einem Bild zusammengefügt. (Version 5.0, Olympus Soft Imaging Solution). Zur Auswertung werden nur Zellen mit einem sichtbaren Nukleus und einer intakten Plasmamembran genutzt. Die LDCVs zeichnen sich durch ihre elektronendichte und dadurch dunkle granuläre Masse aus.

3.4. Gentechnische Methoden zur Generierung rekombinanter DNA

3.4.1. Polymerasenkettenreaktion

Die Polymerasenkettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction* = PCR) dient zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Dazu werden die DNA (als Vorlage = engl. *template*) und die Primerdimere zuerst bei 95 °C zu Einzelsträngen denaturiert (s. PCR-Programm und PCR-Reaktionsansatz). Als Primer werden Oligonukleotide bezeichnet, die am 3'-Ende komplementär zur zu amplifizierenden DNA sein müssen und am 5'-Ende eine Sequenzänderung beinhalten können. Ein Vorwärts- und ein Rückwärtsprimer binden durch die Homologie am 3'-Ende an einen DNA-Abschnitt, der entweder vervielfältigt oder mutiert werden soll. Anschließend folgt eine Anlagerungsphase, die bei einer Primer-spezifischen Temperatur erfolgt. Diese wird nach der Wallace Regel mit der Formel $T_m = 3(C+G) + 2(A+T)$ berechnet. In der darauffolgenden Elongation werden die Primer komplementär zur DNA in 5'-3'-Richtung mit Hilfe der die DNA-Polymerase durch den Einbau von Desoxyribonukleotiden (dNTPs) verlängert. Dieser Schritt ist zeitlich von der Kapazität der Polymerase abhängig. Die hier eingesetzte Pfu-Polymerase hat eine Korrekturlese (engl. *proof reading*)-Funktion und benötigt 1 Minuten pro 1000 Basenpaare (bp). Der Zyklus besteht aus Denaturierung der DNA, Anlagerung der Primer und der anschließenden Elongation und wird 20 bis 35 Mal wiederholt, wobei das DNA-Produkt exponentiell amplifiziert wird. Danach erfolgt ein langer abschließender Elongationsschritt. Zum Schluss wird der Reaktionsansatz bei 4 °C gehalten.

PCR-Reaktionsansatz:

100 ng	DNA
50 µM	Vorwärtsprimer
50 µM	Rückwärtsprimer
10 mM	dNTPs
5 U/µl	Pfu-DNA-Polymerase
5 µl	Pfu-DNA-Polymerase-Puffer
ad 50 µl	dH ₂ O

PCR-Programm:

Startdenaturierung	95° C	5 min
Denaturierung	95° C	30 sek
Anlagerung (T _m)	Primer-abhängig	30 sek
Elongation	72° C	PCR-Produkt-abhängig
Endelongation	72° C	5 min
Ende	4° C	∞

Alle hergestellten Konstrukte wurden sequenziert, um den Erfolg der Klonierung zu überprüfen.

3.4.2. Elektrophoretische Auftrennung der DNA

Die Gelelektrophorese wird eingesetzt, um DNA durch das Anlegen einer Spannung in einem Agarosegel der Größe nach aufzutrennen. Je höher der Prozentsatz der Agarose, desto feinporiger ist das Agarosegel und desto besser werden kurze DNA-Fragmente aufgetrennt. Für die Auftrennung von großen DNA-Fragmenten nutzt man grobporige Gele mit einer geringen Agarosekonzentration. Zur Gelherstellung wird 0,7-2 % Agarose (w/v) in TAE-Puffer durch Aufkochen aufgelöst, auf etwa 50 °C abgekühlt, mit 5 µl Ethidiumbromid pro 100 ml Gel gemischt, in eine Flachbettgelkammer gegossen und für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur polymerisiert.

Die Proben werden mit einem λ- Marker für 30-60 Minuten bei 80-120 V aufgetrennt. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid bindet an die Nukleinsäuren, wodurch dessen Emission nach Anregung mit UV-Licht um den Faktor 50-100 erhöht wird. Die Detektion der DNA-Banden erfolgt im FluorChemM (ProteinSimple) durch Anregung mit UV-Licht.

3.4.3. Restriktionsverdau der DNA

Restriktionsenzyme sind Restriktionsendonukleasen, die DNA an spezifischen Sequenzen erkennen und diese dort durch die Spaltung der Phosphodiesterbindungen schneiden. Dadurch entstehen sogenannte überhängende oder glatte Enden. Schneidet man zwei verschiedene DNA-Fragmente mit gleichem Enzym, kann man diese anschließend durch Ligation verbinden. Ein weiterer Einsatz von Restriktionsenzymen ist die Linearisierung von Plasmiden, um sie besser im Gel aufzutrennen oder durch die Auflösung der Windungen das Binden von Primer zu erleichtern.

3.4.4. Dephosphorylierung der DNA

Nach dem Restriktionsverdau wird die Vektor-DNA am 5'-Ende durch eine alkaline Phosphatase (SAP = engl. *shrimp alkaline phosphatase*) dephosphoryliert. Durch diesen Schritt wird ein Religationsartefakt des Vektors während der Ligation vermindert. Die Enzymbehandlung erfolgte nach Herstellerangaben bei 37 °C für eine halbe Stunde. Danach wurde SAP für 5 Minuten bei 65 °C hitzeinaktiviert.

3.4.5. Ligation von DNA-Fragmenten

Ligation bedeutet das Verbinden zweier DNA-Enden mit komplementären Basen durch das Enzym Ligase. Das 3'-Hydroxy-Ende wird mit dem 5'-Phosphat-Ende zu einer Phosphodiesterbindung verknüpft. Pro Ligrationsansatz werden 50 ng der dephosphorylierten Vektor-DNA und die dreifache molare Menge der einzubringenden DNA (Insert) eingesetzt. Die DNA-Fragmente werden mit 2 µl 10x T4 DNA Ligase-Puffer und 1 µl T4 DNA Ligase auf ein Endvolumen von 20 µl mit Wasser aufgefüllt und für 1 Stunde bei 22 °C oder über Nacht bei 16 °C inkubiert.

3.4.6. Hitzeschocktransformation der DNA in kompetente Bakterien

Als Transformation wird das Einbringen einer nicht-viralen DNA in chemisch kompetente Bakterien (DH5α, Stbl3) bezeichnet. Durch den Hitzeschock werden Poren in der Plasmamembran der Bakterien erzeugt. Diese wird depolarisiert, wodurch die negativ geladene DNA in die Zelle gelangen kann. Dazu wird ein Aliquot der kompetenten Bakterien für 20 Minuten auf Eis aufgetaut, mit 50 ng Plasmid-DNA oder der Hälfte des Ligrationsansatzes vermischt und für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgt für 5 Minuten bei 37 °C. Anschließend werden die Zellen 10 Minuten auf Eis inkubiert, mit 300 µl LB-Medium unter semisterilen Bedingungen vermischt und für 45 Minuten bei 37 °C und 600 rpm in einem Schüttler inkubiert. Der gesamte Ansatz wird auf vorgewärmte LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmedium (LB-Medium mit 60 µM Penicillin oder 100 µM Kanamycin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nur die erfolgreich transformierten Bakterienzellen können als Kolonien herausselektiert werden und auf dem Selektionsmedium wachsen.

3.4.7. DNA-Isolation aus Bakterien

Zur Vermehrung von DNA-Plasmiden, werden die transformierten Bakterien im flüssigen LB-Medium innokuliert (Minikulturen in 1,8 ml LB-Medium in 2,0 ml-Eppendorfreaktionsgefäßen und große Kulturen in 20 ml LB-Medium in 50 ml Falcon™ konischen Zentrifugenröhrchen) und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag werden diese Kulturen pelletiert. Die DNA-Isolation erfolgte nach Herstellerangaben von Quiagen. Die quantitative DNA-Bestimmung erfolgte photometrisch bei 260 nm.

3.4.8. Genotypisierung

Die Herstellung der CAPS1-KO- und CAPS2-KO-Mäusen ist in (Speidel et al., 2005) und (Jockusch et al., 2007) beschrieben. Tiere mit dem Genotyp CAPS1-KO und somit auch CAPS1/CAPS2-DKO sind letal und sterben innerhalb der ersten 30 Minuten nach der Geburt. Um DKO-Tiere zu erhalten, werden CAPS1-heterozygote und CAPS2-KO-Tiere verpaart. Die Chance ein DKO-Tier zu erhalten liegt durchschnittlich bei 25 %.

Die Bestimmung des CAPS1/CAPS2-DKO-Genotyps bei den verwendeten Mäusen erfolgt auf molekulargenetischer Ebene mittels einer PCR. Dazu wird nach der Dekapitierung der Maus etwa 1 cm großes Schwanzstück abgetrennt. Das Gewebe wird mit 50 µl QuickExtract 10 Minuten bei 65 °C und 300 rpm im Thermomixer lysieren, danach 2 Minuten bei 98 °C bei 300 rpm inaktivieren. 2 µl des Lysats werden pro Genotypisierungs-PCR-Ansatz eingesetzt (Tab. 3) und mit Hilfe einer PCR (Tab. 4) amplifiziert.

Tabelle 3: PCR-Ansätze für mCAPS1- und mCAPS2-Genotypisierung.

Eingesetztes Volumen	CAPS1	CAPS2
0,3 µl	Primer 1502	Primer 5471
0,3 µl	Primer 1503	Primer 5472
0,3 µl	Primer 1504	Primer 4174
2 µl	DNA	
7,0 µl	H ₂ O	
12,5 µl	Polymerasemix	

Alle Primer werden in der Stockkonzentration von 50 pmol/µl benutzt. Die Primer 1502 und 1504 detektieren den CAPS1-KO, 1503 und 1504 den CAPS1-WT. Die Primer 5471 und 5472 detektieren den CAPS2-KO, 5471 und 4147 den CAPS2-WT.

Tabelle 4: PCR-Programm für Genotypisierung

	CAPS1			CAPS2		
	Temp.	Zeit	Wiederholung	Temp.	Zeit	Wiederholung
1. Startdenaturierung	95 °C	3 min		95 °C	2 min	
2. Denaturierung	95 °C	30 sek	29	95 °C	30 sek	34
3. Primeranlagerung	65 °C	30 sek		68 °C	30 sek	
4. Elongation	72 °C	30 sek		72 °C	30 sek	
5. Endelongation	72 °C	2 min		72 °C	2 min	
6. Ende	4 °C	∞		4 °C	∞	

Anhand der Größe des PCR-Produktes kann nach der Gelelektrophorese der Genotyp bestimmt werden. Das PCR-Produkt beim CAPS1 WT hat eine Größe von 380 bp und beim KO 465 bp. Die Produkte von CAPS2 WT sind 153 bp und von KO 225 bp groß. Bei heterozygoten Tieren sind beide Banden sichtbar. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgt im 2 %-igen Agarosegel.

3.5. Proteinbiochemie

Proteinbiochemie dient dazu Proteine mittels Elektrophorese aufzutrennen und mit spezifischen Antikörpern nachzuweisen oder anzureichern. Zum einen kann mit einem Western Blot nachgewiesen werden, ob ein spezifisches Protein in einem System korrekt exprimiert vorliegt. Zum anderen kann die endogene Expression von Proteinen überprüft werden. Ein weiterer Einsatz in der vorliegenden Arbeit war das Testen des neu hergestellten Antikörpers auf dessen Funktionalität und Spezifität.

3.5.1. Immunozytochemie

Die in PFA fixierten Zellen (s. 3.1.5.) werden in 0,1 % Triton-X-100/2,5 % NGS in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur durch Triton-X permeabilisiert und mit NGS geblockt und zweimal für 5 Minuten in 2,5 % NGS gewaschen. Der primäre Antikörper wird 1:100 in 2,5 % NGS-PBS verdünnt und in einem Volumen von 100 µl auf Parafilm pipettiert. Das Deckglas wird mit den Zellen nach unten auf diese Antikörperlösung in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zum anschließenden Waschen wird

das Deckglas erneut in die 6-Well-Platte gelegt und dreimal mit PBS/2,5%NGS/0,1%Triton für jeweils 5 Minuten gewaschen. In der Zwischenzeit wird der sekundäre Antikörper 1:2000 in PBS/2,5%NGS vor Sonneneinstrahlung geschützt gehalten. Zur Verminderung der Hintergrundfluoreszenz wird der Antikörper 10 Minuten bei 4 °C und 13000 g zentrifugiert, um mögliche störende Kompartimente zu separieren. Anschließend folgen zwei Waschschriffe mit PBS. Die Deckgläser werden mit destilliertem Wasser kurz gewaschen, um anschließend die Probe auf einem Objektträger im Mounting Medium luftblasenfrei zu positionieren und für 2-3 Stunden zu trocknen. Das Deckglas wird mit Nagellack am Rand des Deckglases versiegelt, um das Austrocknen der Probe zu verhindern. Die Proben können so maximal eine Woche bei 4 °C im Dunkeln gelagert werden, bevor die Aufnahmen am LSM erfolgen.

3.5.2. Herstellung von Proteinlysaten

Proben (Gehirn, Nebennieren, Chromaffinzellen oder BHK-Zellen) werden im Lysispuffer entweder mit Ultraschall (Lab Sonic®M; B. Braun Biotech International; Sartorius Group) oder einem Glaspotter (B. Braun; Melsingen) manuell homogenisiert. Die Proben werden dabei stets auf 4 °C gehalten, um eine Degradation der Proteine zu minimieren. Anschließend werden die Lysate bei 4° C für 45 Minuten invertiert, um die Lyse der Zellen zu verbessern. Danach folgen zwei Zentrifugationsschriffe bei 3000 rpm und 4 °C, um die Zelltrümmer und die nicht lysierten Zellen zu pelletieren. Der Überstand enthält das finale Proteinlysate, welches bei -80° C gelagert oder direkt für eine Proteinkonzentrationsbestimmung und anschließend den Western Blot genutzt wird.

3.5.3. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wird mittels Quick Start™ Bradford am Eppendorf BioPhotometer *plus* nach Anleitung des Herstellers (1-20 µl Probe in 1 ml Farbstoff) durchgeführt. Diese Bestimmung beruht auf der BSA-Kalibrierungskurve nach (Lowry et al., 1951). Das Prinzip ist die Bindung zwischen dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 und den Proteinen. Je höher die Proteinkonzentration ist, desto mehr erfolgt der Farbwechsel des Coomassie-Farbstoffes von rot (positiv geladenen Form) nach blau (negativ geladene Form). Der Farbstoff wird bei 595 nm gemessen. Zur Kalibrierung wird eine BSA (bovine serum albumine)-Verdünnungsreihe in Duplikaten gemessen. Vor dem Messen der Proben wird eine Blank-Probe als Nullwert gemessen. Diese beinhaltet den

Farbstoff und das gleiche Volumen des Lysispuffers wie in der Probe des zu messenden Proteinlysates. Nach einer Reaktionszeit von 5 Minuten erfolgt die Messung von jeder Probe bei 595 nm.

3.5.4. Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen. Die Zugabe von 1 mM Dithiothreitol (DTT), 10 % β -Mercaptoethanol und das Erhitzen für 10 Minuten auf 95° C sorgt für die Denaturierung bzw. Linearisierung der Probe durch die Zerstörung der Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur. Das SDS wirkt als ein anionisches Tensid, welches zum einen die Denaturierung fördert. Zum anderen überlagert es durch die Bindung an die Proteine deren Ladung. Durch diese Bedingungen werden die Proteine, allein ihrer Größe nach, aufgetrennt. Als Trennmasse wird ein diskontinuierliches 3-8 % Tris-Acetat-Gel der Firma NuPAGE benutzt. Die Proben und der Spectra Multicolor Broad Range Protein-Marker werden in die Taschen gefüllt. Durch das Anlegen einer Spannung von 100 V erfolgt die Auftrennung bei Raumtemperatur für 1,5 Stunden im Tris-Acetat-Laufpuffer zuerst im großporigen Sammelgel und anschließend im feinporigen Trenngel.

3.5.5. Proteintransfer durch Western Blotting

Nach der Gelelektrophorese werden die Proteine auf eine Protran® Nitrozellulosemembran BA85 (Whatman) mittels einem Nass-Blot-Verfahren übertragen. Die Proteine haften durch ionische und polare Wechselwirkungen an der Membran. Dieser Vorgang erfolgt im Transferpuffer mit 20 % Methanol im Minigelsystem XCell™ (Invitrogen). Dazu werden drei Schaumstoffschwämme, ein Whatman-Papier, das Gel, die Nitrozellulosemembran, nochmal ein Whatman-Papier und drei Schaumstoffschwämme zuerst im Transferpuffer äquilibriert, dann in der genannten Reihenfolge gestapelt und in die Kammervorrichtung eingespannt. Das Gel wird in Richtung Anode positioniert, um die Proteine bei 40 mA und 4° C für 16 Stunden auf eine Nitrozellulosemembran zu transferieren. Der Transfer wird zum einen durch eine Ponceaus S-Färbung der Membran und zum anderen durch eine Coomassie S-Färbung des Gels überprüft. Mit der Ponceaus S-Färbung wird sichtbar, ob von allen Proben die gleiche Menge aufgetragen wurde. Die Coomassie S-Färbung zeigt die nicht transferierten Proteine im Gel und sollte bestenfalls so schwach wie möglich sein.

3.5.6. Proteindetektion im Western Blot mittels Antikörper

Nach dem Transfer wird das Ponceaus S aus der Membran durch TBS-T abgewaschen. Anschließend erfolgt ein Blockierungsschritt mit einer Milch-Lösung (5 % Milch in TBS-T gelöst), um später unspezifische Bindung der Antikörper zu minimieren. Primäre Antikörper werden für 2 Stunden bei Raumtemperatur in 5 % Milch-Lösung inkubiert, sekundäre Antikörper ebenfalls in 5 % Milch-Lösung für 45 Minuten bei Raumtemperatur (s. Tab. 2).

3.6. Laser-Scanning-Mikroskopie

Die Laser-Scanning-Mikroskopie eignet sich sowohl zur Aufnahme lebender, als auch fixierter Präparate. Dazu rastert ein Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss (LSM780, Carl Zeiss GmbH Göttingen) mit einem fokussierten Laserstrahl die Probe ab. Durch Scan-Spiegel wird das Licht in x und y abgelenkt, und der motorische z-Trieb außerdem die Erstellung von z-Stapeln erlaubt. Dadurch können dreidimensionale Bilder aufgenommen werden. Das System besitzt zur Anregung verschiedene Laser, die Licht der Wellenlängen 405, 458 488, 494, 514, 561 und 633 nm liefern können. Die Messvorrichtung ist auf einem schwingungsgedämpften Tisch der Firma Newport positioniert. Die Auflösung in der x- und y-Achse (Pixeldichte) wird immer so gewählt, dass die höchste theoretische Auflösung des verwendeten Objektivs abgebildet ist (80 nm x 80 nm/Pixel), die z-Achse wird immer auf 1 µm/Ebene eingestellt. Es werden jeweils 16 Bilder aufgenommen und zu einem gemittelt, um das Signal-Hintergrund-Verhältnis (*Signal-to-Noise-Ratio*) zu verbessern. Der digitale Gain ist stets auf 1 und der digitale Offset auf 0 eingestellt. Die Verstärkungsspannung des Multipliers (Mastergain) wird auf 600 V eingestellt. Zur Steuerung des Mikroskops und zur Datenerfassung wird die systemspezifische Imaging-Software ZEN (ZEN 2012, Carl Zeiss GmbH Göttingen) benutzt.

3.6.1. Aufnahme von fixierten Zellen

Zur Überprüfung der korrekten Lokalisation des Sensors NPY-ClopHensorN(Q69M), werden elektroporierte Zellen mit PFA fixiert. Anschließend werden LDCVs mittels Immunozytochemie mit einem Antikörper gegen Chromogranin A markiert. Um eine spektrale Überschneidung (Crosstalk) mit tdTomato zu vermeiden, wird an

Chromogranin A der dunkelrote Fluoreszenzfarbstoff Alexa-647 gekoppelt. Die Aufnahme erfolgt unter den in Tabelle 5 festgehaltenen Bedingungen.

Tabelle 5: Lasereinstellung am LSM für Aufnahmen von fixierten Zellen

Lasereinstellung	Lasereinstellung	Lasereinstellung	Lasereinstellung
Lasereinstellung	Lasereinstellung	Lasereinstellung	Lasereinstellung
488 nm	12 %	493-533	600
633 nm	10 %	638-755	600

Es werden 16 bit-Bilder aufgenommen. Die Pinhole-Öffnung beträgt 90 nm. Es wird ein 63x Öl-Objektiv mit der numerischen Apertur 1.4 Öl DIC M27 (Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC M27) der Firma Carl Zeiss GmbH benutzt.

3.6.2. Mikroskopie von lebenden murinen Chromaffinzellen (*live cell imaging*)

Murine Chromaffinzellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (8 Stunden bis 2 Tage) nach der Elektroporation bezüglich ihres granulären pHs untersucht. Dazu wurden Chromaffinzellen auf Deckgläsern in eine Perfusionskammer überführt, mit Extrazellulärlösung überschichtet und auf dem Kreuztisch des Mikroskops befestigt. Die Aufnahmen erfolgten wie in Tabelle 6 dargestellt. Dazu wird ein 40x Öl-Objektiv mit der numerischen Apertur 1.3 Öl DIC M27 (Plan-Apochromat 40x/1.3 Oil DIC M27) der Firma Carl Zeiss GmbH benutzt.

Tabelle 6: Einstellung am LSM für *live cell*-Mikroskopie

Lasereinstellung	Lasereinstellung	Lasereinstellung	Lasereinstellung
Lasereinstellung	Lasereinstellung	Lasereinstellung	Lasereinstellung
488 nm	5 %	502-556	670
458 nm	5 %	488-567	725
561 nm	7,5 %	652-710	700

3.7. Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das Hefe-Zwei-Hybrid (YTH)-System ist eine Methode zur Identifizierung von direkten Protein-Protein-Interaktionspartnern. Die Untersuchung erfolgt *in-vivo* mit Hilfe der beiden *Saccharomyces cerevisiae* Hefestämme Y187 und AH109.

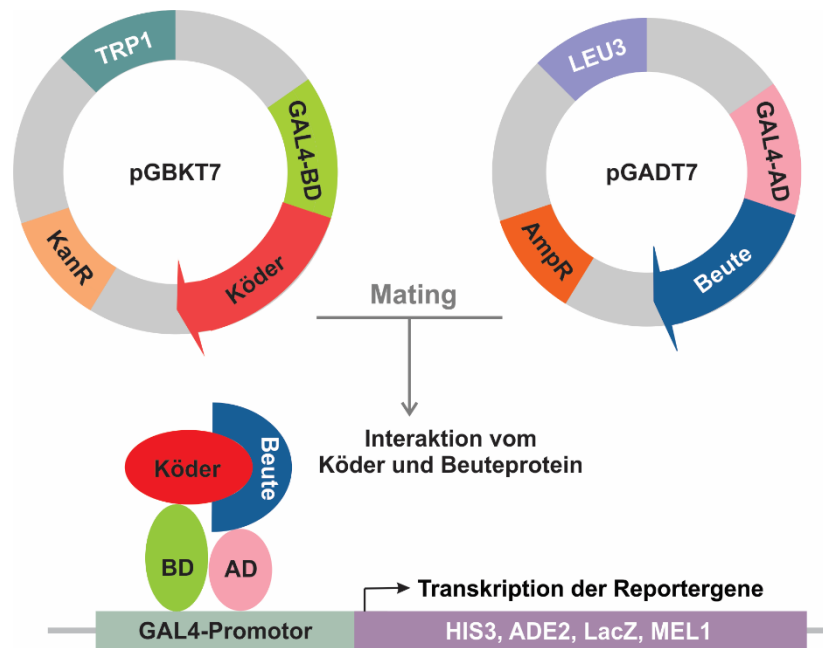


Abbildung 6: Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems. Die GAL4-Bindungsdomäne (BD) entspricht den Aminosäuren 1-147 des Proteins GAL4 und bindet an den GAL4-Promotor. Die GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) entspricht den Aminosäuren 768-881 des GAL4-Proteins und aktiviert den Promotor. Wenn das Köderprotein mit dem Beuteprotein interagiert, werden BD und AD in räumliche Nähe gebracht, wodurch diese die Transkription der Reportergene initiieren.

Dabei wird das „Köder“-Protein im pGBKT7-Plasmid mit GAL4-Bindungsdomäne (BD) als Fusionsprotein in AH109 eingebracht (Abb. 6). Als Selektionsmarker dient hier das TRP1-Gen, das für Phosphoribosylanthranilate-Isomerase kodiert und zur Tryptophanbiosynthese notwendig ist. Nur die Hefen, die das pGBKT7-Plasmid aufgenommen haben, sind fähig auf tryptophanfreiem (-W)-Medium zu wachsen. Das pGADT7-Plasmid beinhaltet das „Beute“-Protein, welches mit der GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) als Fusionsprotein exprimiert wird. Dieses wird in den Y187-Hefestamm eingebracht. Als Selektionsmarker wird im pGADT7-Plasmid das Gen LEU3 exprimiert, welches für 3-Isopropylmalate-Dehydrogenase kodiert. Dieses Enzym ist notwendig zur Leucinbiosynthese und ermöglicht den Hefen das Wachstum auf dem leucinfreiem (-L)-Medium. Findet eine Interaktion zwischen dem Köder- und dem Beute-Protein statt, gelangen GAL4-BD und GAL4-AD in räumliche Nähe und initiieren dadurch im Zellkern die Transkription von Reportergenen. Die Reportergene kodieren für folgende Proteine: HIS3 (dient zur Histidinbiosynthese), ADE2 (dient zur Adeninbiosynthese), lacZ (kodiert β -Galaktosidase) und MEL1 (kodiert α -Galaktosidase).

Durch den Einsatz von bestimmten Selektionsmedien wird nur das Wachsen der erfolgreich transfizierten Hefen begünstigt.

3.7.1. Plattenherstellung und Kultivierung der Hefen

Je 300 ml YPD-Medium werden mit 5,5 g Agar aufgeköcht und in Petrischalen gegossen. Die Selektionsmedien (mit Zugabe von -W, -L, -LW oder -ALWH) werden mit DOB (*Dropout Base*)-Medium nach Herstellerangaben angesetzt und auf einen pH von 5,8 eingestellt. AH109- und Y187-Hefen werden auf YPD kultiviert und müssen spätestens einmal im Monat neu ausgestrichen werden, um deren Vitalität zu erhalten. -ALWH-Platten werden zusätzlich nach dem Erkalten mit 3-Amino-1,2,4-triazole (ATZ) behandelt. ATZ ist ein kompetitiver HIS3-Inhibitor und wird benutzt, um das unspezifische Hefewachstum zu inhibieren.

3.7.2. Einbringen der Plasmide in die Hefen/Elektroporation von Hefen

Die Hefestämme AH109 und Y187 werden vor der Elektroporation kompetent gemacht, um die Plasmide pGADT7 bzw. pGBKT7 aufzunehmen. Dazu wird jeweils eine Kultur von 50 ml YPD-Medium mit den Hefen inokuliert und 24 bis 48 Stunden bei 30° C und 220 rpm im Inkubator wachsen gelassen. Die Hefen werden für 30 Minuten bei 4° C und 3000 rpm abzentrifugiert, anschließend in 30 ml destilliertem Wasser auf Eis gewaschen und erneut 7 Minuten bei 3000 rpm pelletiert. Der Überstand wird erneut verworfen und das Pellet in 30 ml 1 M Sorbitol resuspendiert. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation wird das Pellet in 20 ml Inkubationspuffer für 30 Minuten bei 30° C und 220 rpm inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4° C und 3000 rpm werden die Hefen in dH₂O und Sorbitol gewaschen und in 5 ml 1 M Sorbitol resuspendiert. Jedes Plasmid wird als Duplikat elektroporiert. Dazu werden jeweils 120 µl der Hefen mit jeweils 5 µl pGADT7- oder pGBKT7-Plasmid gut gemischt und für 5 Millisekunden bei 1800 V elektroporiert. Direkt danach werden die Zellen in 1 ml YPD-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 30° C und 950 rpm inkubiert. Anschließend werden die Hefen bei 4° C für 5 Minuten und 3000 rpm pelletiert, in 100 µl YPD resuspendiert und auf -W- oder -L-Platten ausplattiert.

3.7.3. Hybridisierung der Hefen

Die Hybridisierung (=Mating) dient dazu eine Konjugation vom Köder- und Beuteplasmid zwischen den Y187- und AH109-Hefen zu induzieren. Dazu wird jeweils eine Kolonie der beiden Stämme in 1 ml YPD resuspendiert und für 5 Stunden bei 30° C und 950 rpm geschüttelt. Danach werden die Hefen 5 Minuten bei 4° C und 3000 rpm pelletiert, in 100 µl YPD aufgenommen und auf je eine -LW- und eine -ALWH-Platte ausplattiert. Das Wachstum auf dem -LW-Medium zeigt die Konjugationseffizienz an, auf dem -ALWH-Medium die Interaktionsfähigkeit vom Köder- und Beuteprotein. Um eine Autoaktivierung einer der Plasmide auszuschließen, werden die Leervektoren pGADT7 und pGBKT7 und die Negativkontroll-Konstrukte pGADT7_pSE1111 und pGBKT7_pSE1112 parallel mitgeführt. pSE1111 und pSE1112 kodieren die Gene für SNFs (Carbon catabolite-depressing protein kinase), die für den Glukose-Stoffwechsel notwendig sind. Die Serin-Threonin-Proteinkinase wirkt essentiell in der Katabolitrepression.

3.7.4. Einfrieren von Hefekulturen

Zum Erhalt von isolierten Kolonien, werden diese in 1 ml YPD-Medium innokuliert und über Nacht bei 30 °C und 950 rpm wachsen gelassen. Anschließend werden die Kulturen bei 4 °C, 3000 rpm für 5 Minuten pelletiert und in einem Gemisch resuspendiert, welches zur Hälfte aus 100% Glycerol und zur Hälfte aus YPD/-L/-W/-LW/-ALWH-Medium besteht. Nach sofortigem Einfrieren im flüssigen Stickstoff werden die Hefen bei -80 °C gelagert.

3.7.5. Galaktosidase-Assay

Nach der Interaktion vom Köder- und Beuteplasmid wird die Expression der Reportergene MEL1 (kodiert für α -Galaktosidase) oder lacZ (kodiert für β -Galaktosidase) initiiert. Zum Nachweis dieser Expression werden die Hefen von den -ALWH-Platten durch Druck auf eine Membran übertragen, anschließend für 2 Minuten im flüssigen Stickstoff aufgebrochen und dann mit einer Lösung aus BME, Z-Puffer und X-Gal inkubiert. Nur in der Anwesenheit der Galaktosidasen (Reportergene) wird der gelbe Farbstoff X-Gal in den blauen Farbstoff 5'5'-Dibromo-4,4-Dichloro-Indigo und Galaktose umgesetzt.

3.7.6. DNA-Isolation aus Hefen

Die auf dem -ALWH-Medium wachsenden Kolonien werden zuerst in 1 ml YPD-Medium anwachsen gelassen und anschließend in das 10 ml -ALWH-Medium angeimpft. Nach 24 Stunden bei 30° C und 220 rpm Wachstum im Inkubator werden die Hefen bei 1700 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert und in 300 µl Lysispuffer (200 mM NaOH; 1 % SDS) resuspendiert. Die Suspension wird in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 300 µl Glasbeads (0,5mm Glass Beads (Soda Lime), Catalog #11079105 (454 grams), BioSpec Products, Inc.) 6 mal 20 Sekunden mit dem Deckel nach unten auf höchster Stufe stark gemischt, um das Aufschließen der Hefen zu bewirken. Nach Zugabe von 200 µl Phenol-Chloroform wird der Ansatz erneut 1 Minute auf höchster Stufe gemischt und 5 Minuten bei 20000 rpm pelletiert. 450 µl Überstand werden mit 45 µl NaAc (3 M; pH 5,2) und 360 µl Isopropanol vermennt und 30 Minuten bei -20° C präzipitieren gelassen. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 4° C und 14000 rpm wird das Pellet in 70 % Ethanol gewaschen, danach trocknen gelassen, in 10 µl 1 M Tris-HCl (pH 8,5) aufgenommen und bei -20° C gelagert.

3.8. Tierhaltung

Alle Mäuse wurden unter pathogenfreien Bedingungen in der Tierhaltung des CIPMM unter konventionellen Bedingungen gehalten. Der Tag-Nacht-Zyklus betrug jeweils 12 Stunden. Futter und Wasser standen *ad libidum* zur Verfügung.

3.9. Bildbearbeitung

Die Kolokalisationsanalyse erfolgte durch ImageJ mit Hilfe des Plugins JACoP. Dazu wurde der Korrelationseffizient nach Manders und Pearsons gewählt.

3.10. Statistik

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit Excel oder IGOR Pro-Software. Signifikanzberechnungen wurden mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ermittelt. Dargestellte p-Werte stehen für * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4. Ergebnisse

4.1. Elektrophysiologische und -chemische Untersuchung der Funktion von mCAPS2a und mCAPS2b an murinen Chromaffinzellen

In embryonalen murinen CAPS1-KO Chromaffinzellen wurde die Sekretion von leeren LDCVs bereits vermutet (Speidel et al., 2005). In unserem Labor wurden zum ersten Mal Untersuchungen mit einzelnen mCAPS2-Spleißvarianten in DKO Chromaffinzellen durchgeführt. Da diese in verschiedenen verkürzten Varianten natürlich vorkommen, wurden sie zur Klärung der in der Befüllung beteiligten Proteindomäne genutzt. Nach einer intrazellulären Ca^{2+} -Freilassung aus einem NP-EGTA-Komplex durch UV-Blitz-Photolyse wurde die Ca^{2+} -abhängige Exozytose mittels Kapazitätsmessungen, sowie gleichzeitig die Sekretion von Katecholaminen mittels Amperometrie gemessen. Neben dem überraschenden Ergebnis, dass im Gegensatz zu Munc13-1 in CAPS nicht nur die MUN, sondern auch die PH-Domäne wichtig für das Priming ist (Nguyen Truong et al., 2014), wurde zusätzlich gezeigt, dass mCAPS2b die einzige Spleißvariante war, die die Sekretion von Katecholaminen erhöhte (Ratai et al., 2018). Der einzige Unterschied zwischen mCAPS2b und den anderen untersuchten mCAPS2-Spleißvarianten ist das Exon 22 in der MUN-Domäne, welches nur in mCAPS2b vorhanden ist (s. Abb. 4). Der Mechanismus dahinter ist jedoch noch unklar und wurde in folgenden Versuchen untersucht.

Der Genotyp CAPS1/CAPS2-DKO ist letal, deshalb wurden embryonale Chromaffinzellen aus E19-Mäusen (19 Tage nach der Befruchtung) genutzt. Chromaffinzellen sind adhärent und haben einen Durchmesser von etwa 8-10 μm . Wegen ihrer runden Form ohne Fortsätze sind sie elektrisch kompakt und eignen sie sich wegen ihrer optimalen Spannungsklemme besonders für elektrophysiologische *whole cell*-Messungen. Da sie keine Synapsen besitzen und überall an der Zelloberfläche sezernieren, erleichtert es einen direkten Kontakt von der Kohlefaser mit der sezernierenden Oberfläche zu erlangen. Die Zellen wurden am zweiten Tag in Kultur mit dem SFV zur Expression von CAPS2a oder mCAPS2b infiziert, in der Ganzzelleableitung geklemmt und mit der Intrazellulärlösung mit freiem 6 μM Ca^{2+} geflutet. Dadurch wurde die Ca^{2+} -

abhängige Exozytose von LDCVs ausgelöst und die Freisetzung der darin enthaltenen Monoamine hervorgerufen. Die Fusion der Vesikel wurde mittels Kapazitätsmessungen und gleichzeitig die Sekretion der Monoamine mittels Amperometrie gemessen. Die einzelnen amperometrischen Ausschläge (*Single Spike*) wurden aufgenommen und analysiert (SSA; s. Abb. 7) (Wightman et al., 1991). Alle Zellen, die infiziert wurden, exprimierten die im Plasmid kodierte CAPS-Spleißvariante und das eGFP (*enhanced green fluorescent protein*). Anhand der grünen Fluoreszenz des eGFPs wurden die erfolgreich transfizierten Zellen für die Messungen erkannt. Als Kontrolle dienten Zellen aus derselben Präparation, die keiner Inkubation mit einem Virus ausgesetzt wurden. Um biologische Variabilität zu berücksichtigen, wurden nur die Messungen ausgewertet, wenn aus einer Präparation virusbehandelte Zellen und Kontrollen am gleichen Tag gemessen wurden.

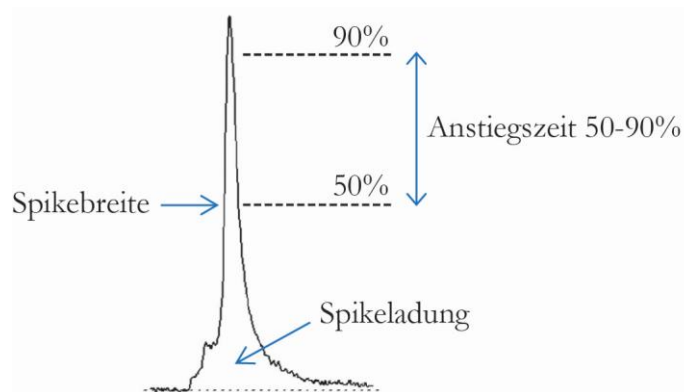


Abbildung 7: Graphische Darstellung der amperometrischen Spike-Parameter. Von jedem amperometrischen Ausschlag (Spike) wurde die Breite auf der halben Höhe bestimmt, die Anstiegszeit und die Spike-Ladung, die dem Integral der Kurve entspricht.

Die SSA erfolgte mit IGOR Pro-Software mit dem Tool „Ampero Stat“. Dabei wurde die Aufnahme jeder Zelle um den Faktor 9 geglättet (d.h. 9 Werte wurden zu einem gemittelt), um das Rauschen des Hintergrunds zu minimieren. Ausschläge, die kleiner als 5 pA waren, wurden nicht berücksichtigt. Ausgewertet wurden die Frequenz der einzelnen Spikes innerhalb der drei-minütigen Aufnahmen, die Integrale der einzelnen Spikes (Spikeladung), die Spike-Breite bei 50 % der Spikeamplitude sowie die Anstiegszeit, die als der Zeitrahmen zwischen 50-90 % der Spikeamplitude definiert wurde (s. Abb. 7).

4.1.1. **mCAPS2b fördert die Beladung der LDCVs mit Katecholaminen in DKO-Zellen und verlangsamt die Fusion der LDCVs**

Die Expression von mCAPS2a und mCAPS2b in DKO-Chromaffinzellen erlaubt es die spezifische Funktion der jeweiligen Spleißvarianten zu untersuchen. Die Infektionsdauer mit pSFV1-mCAPS2a_IRES_eGFP zur Expression von mCAPS2a betrug 5-5,5 Stunden, mit pSFV1_mCAPS2b_IRES_eGFP zur Expression von mCAPS2b 5,5-6 Stunden.

Die Überexpression von mCAPS2a und mCAPS2b erhöhte signifikant und im gleichen Maße die Membrankapazität während einer drei-minütigen Flutung der Zelle mit $6 \mu\text{M}$ Ca^{2+} (DKO= $0,67 \pm 0,04$; DKO+2a= $1,98 \pm 0,15$; DKO+2b= $2,33 \pm 0,16$; Abb. 8A und 8B). Bereits bei der Darstellung von repräsentativen Zellen waren nach der Expression der beiden mCAPS2-Spleißvarianten mehr amperometrische Ausschläge im Vergleich zur DKO-Kontrolle sichtbar (Abb. 8C). Auch die Spike-Frequenz war signifikant erhöht, wobei nach der Expression von mCAPS2b etwa doppelt so viele Ausschläge gemessen wurden wie nach der Expression von mCAPS2a (DKO= $0,12 \pm 0,01$; DKO+2a= $0,25 \pm 0,02$; DKO+2b= $0,40 \pm 0,03$; Abb. 8D). Auf die einzelnen Spikes bezogen, erhöhte nur mCAPS2b die Spike-Ladung um etwa 20 %, mCAPS2a zeigte keinen Effekt (DKO= $86,95 \pm 2,41$; DKO+2a= $88,86 \pm 2,19$; DKO+2b= $103,89 \pm 1,83$; Abb. 8E). Die Ladung ist das Integral der Kurve (s. Abb. 7) und gibt den Füllstand der LDCVs mit den Monoaminen wider.

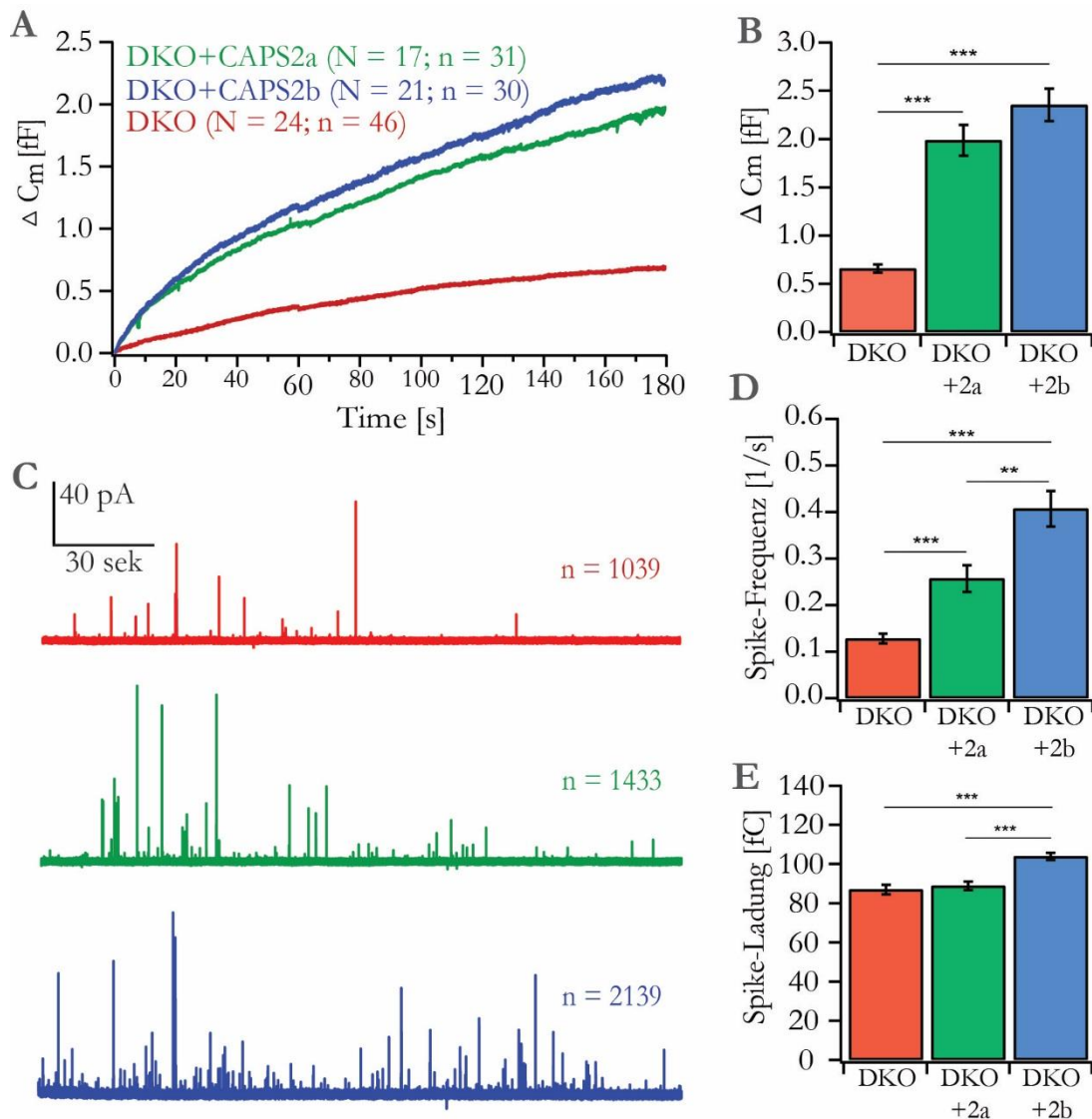


Abbildung 8: mCAPS2b erhöht die Befüllung der LDCVs mit Monoaminen und verlangsamt die Fusion der LDCVs. A und B) Gemittelter Kapazitätsanstieg von unbehandelten DKO Chromaffinzellen (rot) bzw. nach Überexpression von mCAPS2a (grün) oder mCAPS2b (blau) während einer dreiminütigen Perfusion mit $6 \mu\text{M Ca}^{2+}$ (N=Anzahl der Mäuse, n= Anzahl der Zellen). C) Repräsentative amperometrische Aufzeichnungen (n=Anzahl der Spikes) der Zellen aus A und B. D und E) Statistische Auswertung der Spike-Frequenz und der Spike-Ladung, Breite und Anstiegszeit von denselben Zellen aus A und B (Mittelwerte mit Standardfehlern). Die Signifikanzberechnung erfolgte durch Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Betrachtet man die einzelnen Spikeparameter wird deutlich, dass nur mCAPS2b die Spike-Breite (DKO= $4,22 \pm 0,07$; DKO+2a= $4,28 \pm 0,05$; DKO+2b= $4,68 \pm 0,04$; Abb. 9A) und Anstiegszeit (DKO= $0,79 \pm 0,02$; DKO+2a= $0,80 \pm 0,01$; DKO+2b= $0,83 \pm 0,01$; Abb. 9B) signifikant erhöht, wobei mCAPS2a wieder keine Veränderung zu DKO zeigt.

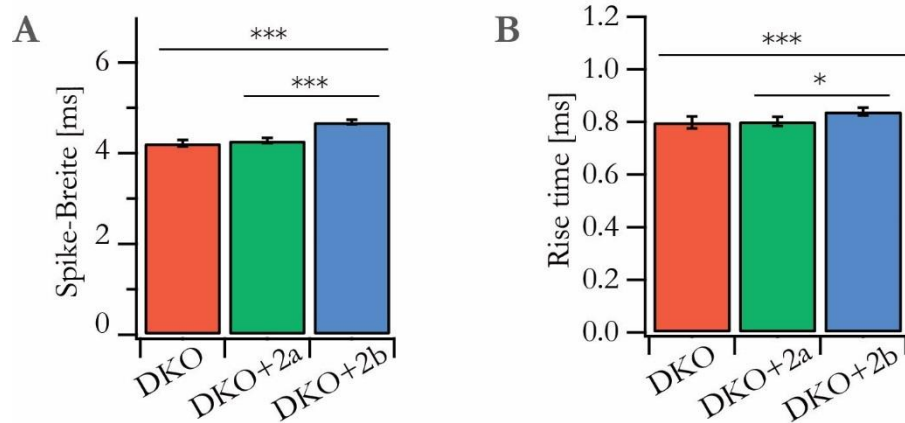


Abbildung 9: mCAPS2b verlangsamt die Fusion der LDCVs. Statistische Auswertung der Spike-Breite und Anstiegszeit von denselben Zellen aus Abb. 8 (Mittelwerte mit Standardfehlern). Die Signifikanzberechnung erfolgte durch Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Um den Unterschied zwischen der gleichen Kapazitätserhöhung und der unterschiedlichen Freisetzung der Katecholamine in Bezug auf mCAPS2a und mCAPS2b deutlicher zu charakterisieren, wurde ein Quotient aus den beiden Werten von jeder einzelnen Zelle gebildet und anschließend gemittelt (Abb. 10).

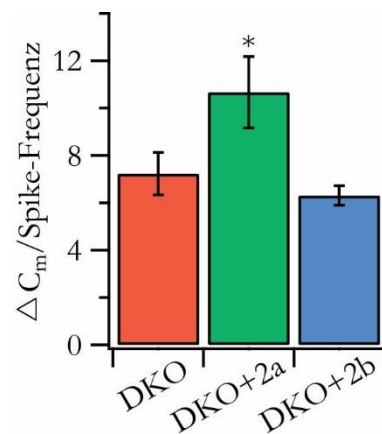


Abbildung 10: mCAPS2a bewirkt eine Sekretion von leeren Vesikeln. Es wurde ein Quotient vom Kapazitätsanstieg und der Spike-Frequenz von jeder einzelnen Zelle gebildet. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern (* $p < 0,05$).

Die Spike-Ladung wurde hier außer Acht gelassen. Dieser Quotient zeigt, dass das Verhältnis zwischen Kapazitätsanstieg und Fusion der mit Katecholaminen gefüllten Vesikeln für mCAPS2b-exprimierende Zellen und der Kontrollzellen (DKO) vergleichbar war. Für mCAPS2a-exprimierende Zellen war dieses Verhältnis hingegen signifikant erhöht.

4.1.2. In WT Chromaffinzellen hat Überexpression von mCAPS2b keinen Effekt auf LDCV-Beladung und deren Fusionskinetik

Eine CAPS2-Überexpression in WT Chromaffinzellen und in DKO-Zellen stabilisiert in Blitzphotolyse-Experimenten den Granulenpool im RRP (Liu et al., 2010). Um zu sehen, ob sich die Spleißvariante mCAPS2b auf die Beladung und Fusion einzelner LDCVs in WT auswirkt, wurde die SSA unter gleichen Bedingungen (s. oben) wiederholt.

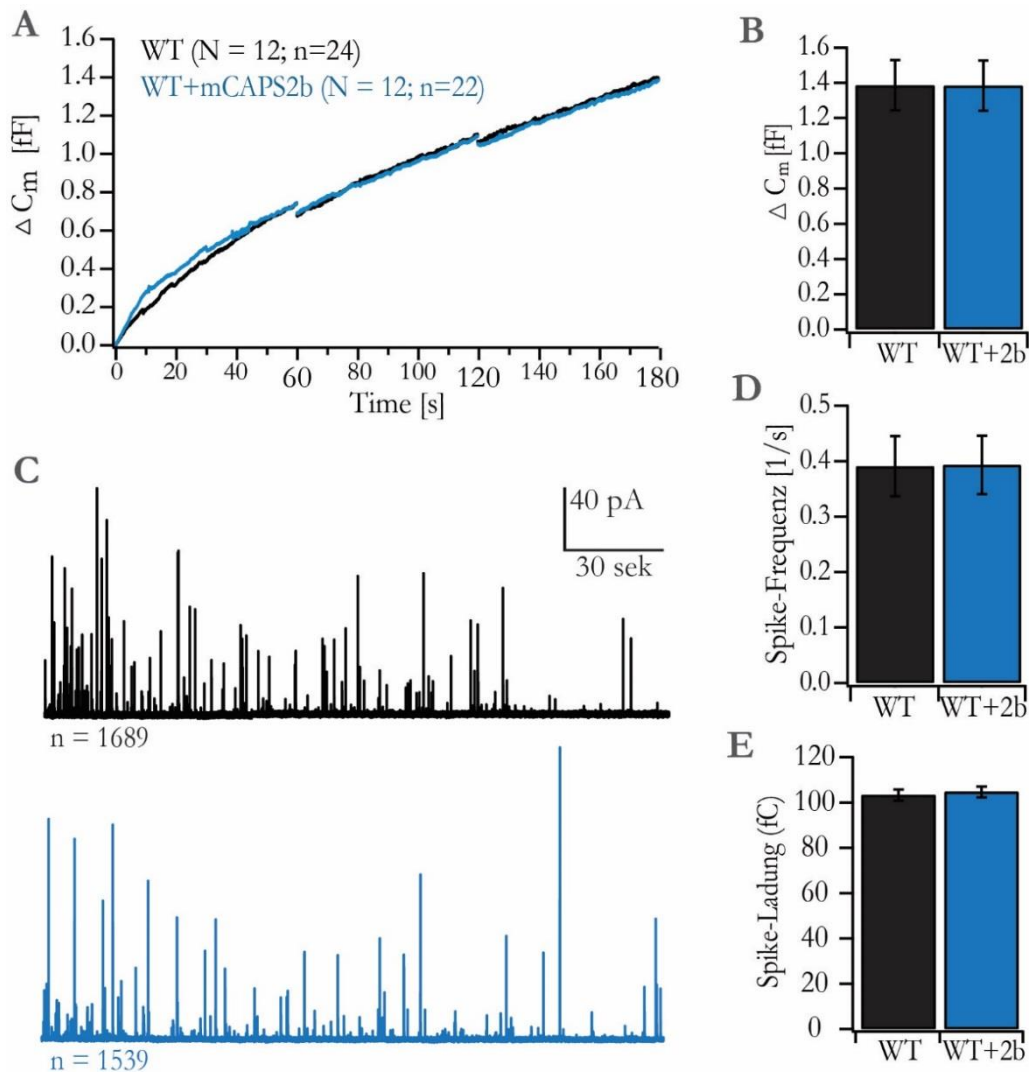


Abbildung 11: mCAPS2b-Überexpression in WT mCC hat keinen Effekt auf die Sekretion oder Befüllung von LDCVs. A und B) Gemittelter Kapazitätsanstieg von unbehandelten WT-Chromaffinzellen (schwarz) bzw. nach Überexpression von mCAPS2b (blau) während einer dreiminütigen Perfusion mit 6 μ M Calcium (N=Anzahl der Mäuse, n= Anzahl der Zellen). C) Repräsentative amperometrische Aufzeichnungen (n=Anzahl der Spikes) der Zellen aus A und B. D und E) Statistische Auswertung der Spike-Frequenz und der Spike-Ladung von denselben Zellen aus A und B (Mittelwerte mit Standardfehlern).

Eine Überexpression des mCAPS2b in WT-Chromaffinzellen verursachte im Vergleich zu den unbehandelten WT-Kontrollzellen weder eine Veränderung in dem Membrankapazitätsanstieg ($WT=1,36\pm 0,14$; $WT+2b=1,38\pm 0,14$), noch in der Spike-Frequenz ($WT=0,39\pm 0,05$; $WT+2b=0,39\pm 0,05$) oder in der Spike-Ladung ($WT=103,31\pm 2,50$; $WT+2b=104,68\pm 2,38$) (Abb. 11).

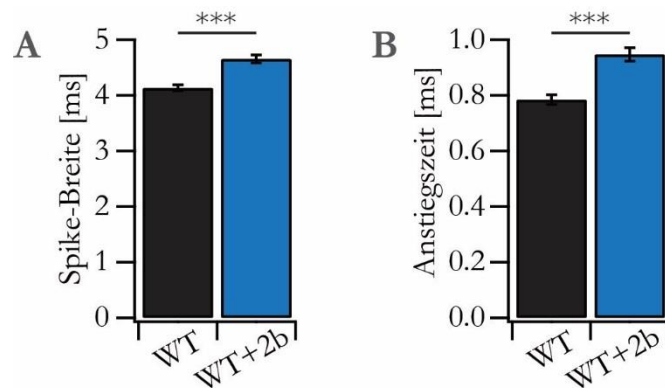


Abbildung 12: mCAPS2b-Überexpression in WT mCC verlangsamt aber die Fusionskinetik. A und B) Statistische Auswertung der Spike-Breite und der Anstiegszeit von denselben Zellen aus Abb. 11 (Mittelwerte mit Standardfehlern). Die Signifikanzberechnung erfolgte durch Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (***) $p < 0,001$.

Betrachtet man die Spikeparameter genauer, sieht man hier, wie auch bei den DKO-Zellen, nach der mCAPS2b-Überexpression eine Erhöhung der Spike-Breite ($WT=4,13\pm 0,05$; $WT+2b=4,65\pm 0,07$) und der Anstiegszeit ($WT=0,78\pm 0,07$; $WT+2b=0,94\pm 0,23$) (Abb. 12).

4.2. Elektronenmikroskopische Untersuchung von CAPS2b auf den LDCV-Reifungsprozess

Dass sich nach der Expression von mCAPS2b die Ladung und Fusionskinetik der LDCVs ändern, könnte darauf beruhen, dass Biogenese oder Reifung der LDCVs beeinflusst wurden. Um dieses zu klären, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen an DKO-Chromaffinzellen, die mCAPS2b mit Hilfe des viralen pSFV1-Expressionssystems exprimierten, durchgeführt. Als Kontrolle dienten unbehandelte DKO-Zellen aus derselben Präparation. Außerdem wurden WT-Zellen als Kontrolle für endogene CAPS-Expression verwendet. Als zusätzliche Kontrolle wurden DKO-Chromaffinzellen nach eGFP-Expression (durch pSFV1) benutzt, um den Effekt der Virusbehandlung zu

überprüfen. Zur Analyse wurden zwei Kriterien festgelegt, die die Granulen als LDCVs spezifizieren: Zum einen sollten die Granulen eine intakte Lipiddoppelmembran besitzen und zum anderen sollten sie elektronendichter als die in der jeweiligen Zelle enthaltenen Mitochondrien sein (Abb. 13). Für die Auswertung wurden in EasyCell (hauseigen geschriebenes Programm) die Membranen des Zytoplasmas, des Zellkerns und der LDCVs erfasst. Somit konnte Fläche der einzelnen Zellen sowie LDCV-Parameter (Dichte, Radius und Entfernung zur Plasmamembran) ermittelt werden. Die analysierten Flächen der gesamten Zellen (Zytoplasma mit Nukleus) und des Zytoplasmas waren in allen untersuchten Gruppen vergleichbar. Genauso die LDCV-Dichte (Anzahl der LDCVs/ μm^2 Zytoplasma) und deren relative Verteilung zur Plasmamembran. Der durchschnittliche Radius der LDCVs war im Vergleich zu den Kontrollgruppen in der mCAPS2b-Gruppe um etwa 10 % kleiner. Dieses wurde genauer untersucht, indem die LDCV-Größe in Abhängigkeit zur Entfernung zur Plasmamembran angeschaut wurde. Direkt an der Plasmamembran (0-100 nm) wiesen LDCVs keinen Unterschied auf. Ab einer Entfernung von 200 nm von der Zytoplasmamembran stieg der Radius in allen Gruppen an. In der Kontrollgruppe betrug der Radius etwa 60 nm, während dieser in den mCAPS2 exprimierenden DKO-Chromaffinzellen etwa 55 nm und somit kontinuierlich um ca. 10 % kleiner war. Die Kontrolle DKO+eGFP zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den DKO. Das zeigt, dass die virale Infektion keine Wirkung auf die Morphologie der Zellen hatte.

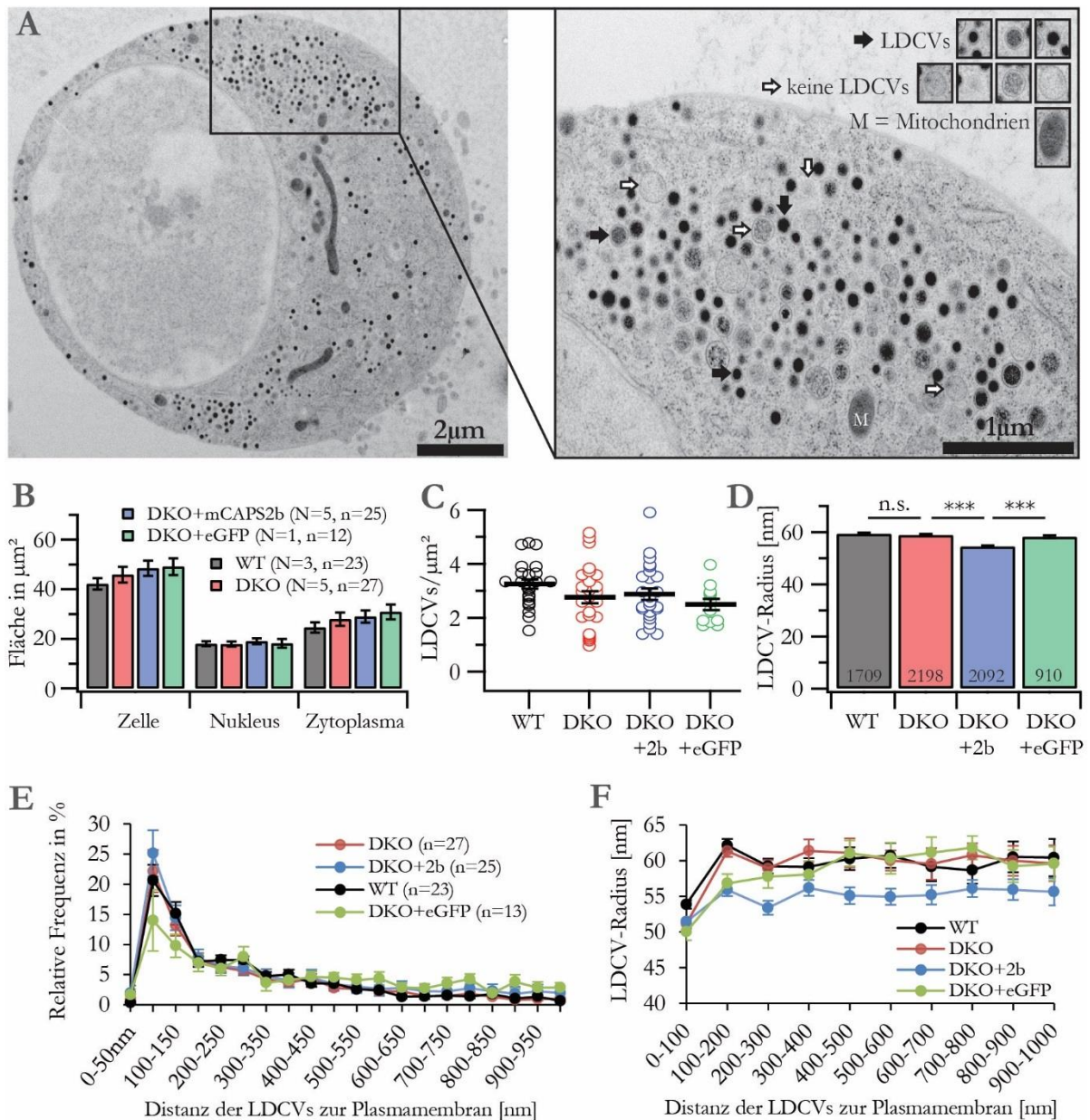


Abbildung 13: mCAPS2b hat keinen Einfluss auf die Dichte der LDCVs und deren Verteilung, bewirkt jedoch eine Verkleinerung von deren Radius. A) Darstellung einer repräsentativen Chromaffinzelle. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt Granulen, die als LDCVs (schwarzer Pfeil) ausgewählt wurden. B) Vergleich der Flächen der ganzen Zellen, vom Nukleus und vom Zytoplasma der WT- und DKO-Zelle und DKO-Zellen nach Überexpression von mCAPS2b oder eGFP (N=Anzahl der Mäuse, n=Anzahl der Zellen). C) Quantitative Auswertung der LDCV-Dichte. Dargestellt sind einzelne Zellen (Kreise) mit Mittelwerten und Standardfehlern. D) Relative Frequenz der LDCVs in Bezug auf deren Entfernung zur Plasmamembran (n=Anzahl der Zellen). E) Gemittelter LDCV-Radius mit jeweiliger Anzahl der ausgewertete LDCVs. F) Relative Verteilung der LDCV-Radien in Bezug auf die Entfernung zur Plasmamembran. Zur Signifikanzberechnung wurde Wilcoxon-Mann-Whitney-Test benutzt (***) $p < 0,001$.

Zur besseren Übersicht sind alle Werte der elektronenmikroskopischen Auswertung in der Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Elektronenmikroskopische Auswertung der ausgewerteten Flächen und der LDCV-Radien. Aufgelistet sind die Mittelwerte mit Standardfehlern.

	WT	DKO	DKO+CAPS2b	DKO+eGFP
Zellgröße	42,18±2,28	45,90±3,17	48,46±3,05	49,13±3,36
Zellkern [μm^2]	18,01±0,96	17,94±0,97	19,06±1,21	18,23±1,73
Zytoplasma [μm^2]	24,61±2,10	27,96±2,67	29,00±2,48	30,89±2,99
LDCVs/ μm^2	3,24±0,17	2,77±0,22	2,88±0,21	2,49±0,71
LDCV-Radius [nm^2]	59,36±0,38	58,94±0,41	54,50±0,31	58,27±0,50

Der detektierte Radius (r) der LDCVs wurde zur Ermittlung der jeweiligen Volumina (V) in die folgende Formel eingesetzt:

$$V = \frac{4}{3} \pi r^3.$$

Auch hier sah man nur in der CAPS2b-Gruppe eine signifikante Abnahme des LDCV-Volumens um etwa 20 % (WT = $610170 \pm 14026 \text{ nm}^3$; DKO = $576409 \pm 1848 \text{ nm}^3$; DKO+2b = $463941 \pm 8775 \text{ nm}^3$; DKO+eGFP = $565449 \pm 14760 \text{ nm}^3$).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Expression von mCAPS2b zwar keinen Einfluss auf die Anzahl und somit Biogenese der LDCVs ausübte, jedoch die Größe der LDCVs reduzierte. In welcher Weise die LDCV-Größe in Verbindung mit deren Befüllung mit Katecholaminen zusammenhängt, konnte durch die morphologische Analyse nicht geklärt werden und wurde in folgenden Versuchen untersucht.

4.3. Detektion des vesikulären pHs mit NPY-ClopHensorN(Q69M)

Die Beladung der LDCVs mit Adrenalin und Noradrenalin erfolgt durch den vesikulären Monoamintransporter (VMAT), der den bestehenden granulären Protonengradienten (innen sauer) nutzt, um Monoamine in das Lumen zu transportieren. In einer vorherigen Arbeit (Eckenstaler et al., 2016) konnte an Neuronen gezeigt werden, dass ein CAPS1-*Knock down* (KD) zur Erhöhung des intravesikulären pHs führt. Da der Protonengradient für die Befüllung der LDCVs mit Monoaminen notwendig ist, wurde in den nachfolgenden Experimenten untersucht, ob die reduzierte Sekretion von Adrenalin und Noradrenalin in DKO-Chromaffinzellen auf eine pH-Disregulation zurückzuführen ist. Dazu wurde der

pH-Sensor ClopHensorN benutzt, um den pH erstmals in LDCVs von WT- und CAPS-DKO-Chromaffinzellen zu bestimmen.

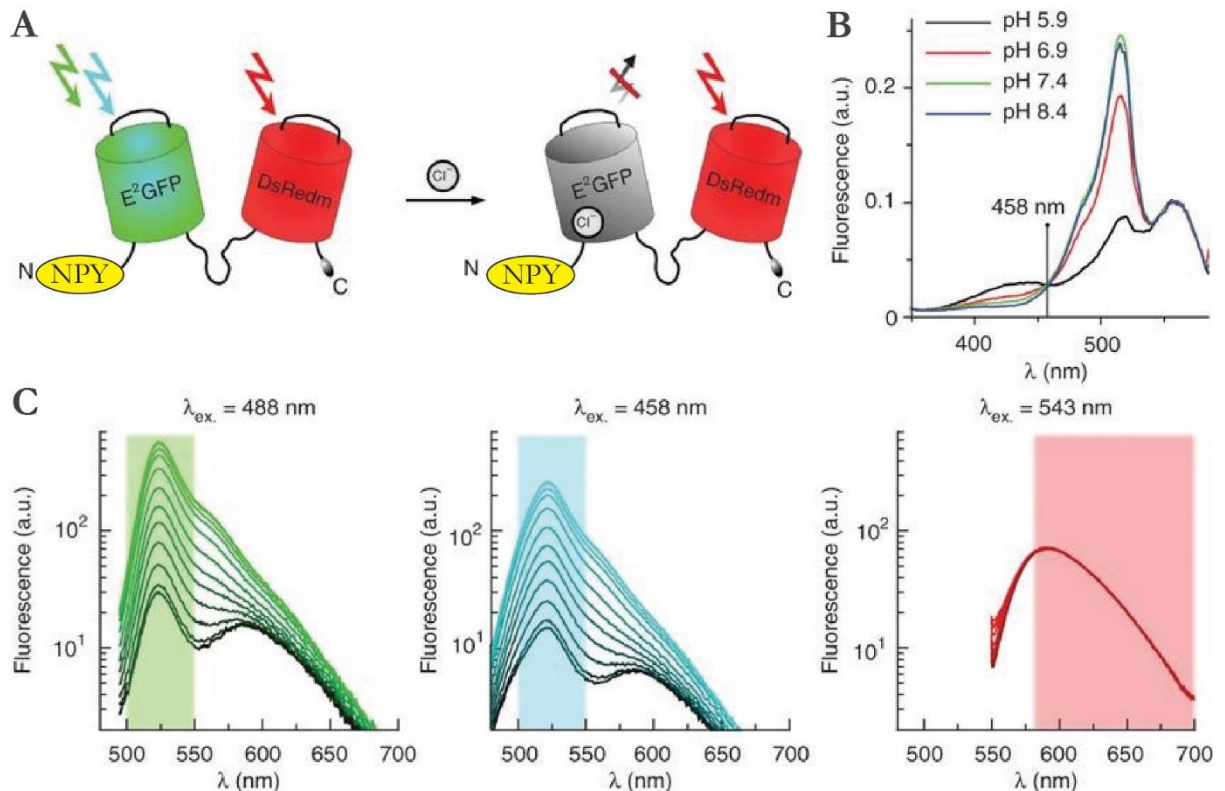


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Sensors ClopHensorN(Q69M) und seinen spektralen Eigenschaften. A) ClopHensorN(Q69M), bestehend aus E²GFP und tdTomato, wurde als Fusionsprotein mit dem N-terminalen NPY als pH-Sensor im LDCV-Lumen benutzt. E²GFP kann mit 488 nm und 458 nm angeregt werden. Eine Chlorid-Bindung reduziert das Fluoreszenz-Signal von E²GFP. TdTomato kann mit 561 nm angeregt werden. Dessen Emission ist pH- und Chlorid-unabhängig. B) Die Stärke der Emission der Anregung mit 488 nm ist pH-abhängig, 458 nm ist ein isosbestischer Punkt. C) Emissionsspektren der drei Anregungswellenlängen mit 488 nm, 458 nm und 561 nm. Die Abbildung wurde aus Arosio et al. (2010) übernommen und teilweise verändert.

ClopHensorN ist ein Fusionsprotein aus E²GFP und tdTomato (tandem Tomato), die durch 20 Aminosäuren verbunden sind. Mit Hilfe des ClopHensorNs ist es möglich zeitgleich die intrazelluläre pH- und Chloridkonzentration ratiometrisch zu bestimmen (Arosio et al., 2010). Ursächlich für die Chloridsensitivität ist eine Mutation der Aminosäure Threonin an der Position 203 zu Tyrosin (T203Y) im E²GFP. Die pH-Sensitivität ist eine intrinsische Eigenschaft fast aller GFP-Derivate. Die Messung erfolgte, indem das Fusionsprotein mit drei Wellenlängen angeregt wurde: das E²GFP mit 488 nm und 458 nm und das tdTomato mit 543 nm (Abb 14). In dieser Arbeit wurde das tdTomato mit 561 nm angeregt. Das Emissionssignal ist nach Anregung mit 488 nm

($E_{488\text{ nm}}$) pH- und chloridabhängig, mit 458 nm ($E_{458\text{ nm}}$) nur chloridabhängig und mit 561 nm ($E_{561\text{ nm}}$) weder pH- noch chloridabhängig. Eine Anionenbindung an das E²GFP verursacht eine Abschwächung des Fluoreszenzsignals, hat jedoch keine Auswirkung auf den Quotienten aus $E_{488\text{ nm}}$ und $E_{458\text{ nm}}$, welches zur pH-Bestimmung verwendet wird. Bei 458 nm liegt der isosbestische Punkt. Die Bindung von H⁺ und Cl⁻ erfolgt kooperativ an das E²GFP. Mit dem Quotienten aus $E_{458\text{ nm}}$ und $E_{561\text{ nm}}$ ist es möglich die Chloridkonzentration zu bestimmen. Es ist zu beachten, dass dieser pH-abhängig ist, was bei der Kalibrierung berücksichtigt werden muss.

4.3.1. Klonierung des pMax_NPY-ClopHensorN(Q69M)

In der Literatur wurde ein pH-Wert in LDCVs im Bereich zwischen 5,5 und 5,7 berichtet (Arosio et al., 2010; Henry et al., 1998; Johnson, 1988). Darauf bezogen war der pK_a von ClopHensorN von 6,78 zu hoch für die intragranuläre Messung. Deshalb wurde in unserem Labor (durch Praneeth Chitirala) eine weitere Mutation (Q69M) im E²GFP eingefügt (Klonierung siehe Ratai et al., 2018), wodurch zum einen der pK_a gesenkt und zum anderen der Sensor stabilisiert werden sollte (vergleiche Griesbeck et al., 2001). Das Konstrukt pMax_ClopHensorN(Q69M) wurde anschließend genutzt, um das LDCV-ständige Neuropeptid Y (NPY) an den N-Terminus des Sensors zu fusionieren und somit das Konstrukt in das Lumen der LDCVs zu adressieren.

Das NPY (bestehend aus Signalpeptid, NPY und C-flankierendem Peptid) wurde aus dem Plasmid pSFV1_NPY-mCherry mit den Primern NPY_ClaI_for und NPY_NheI_rev amplifiziert. Die Anlagerung der Primer erfolgte bei 60 °C und die Elongation betrug 2 Minuten. Aus dem 327 bp langen PCR-Produkt wurde schließlich mit den Restriktionsenzymen ClaI und NheI das NPY isoliert und in den zuvor mit den gleichen Enzymen geschnittenen pMax_ClopHensorN(Q69M) zum pMax_NPY-ClopHensorN(Q69M) ligiert (Abb. 15). Das NPY und ClopHensorN(Q69M) sind durch den Strep-TagII (WSHPQFEK)-linker miteinander verbunden.

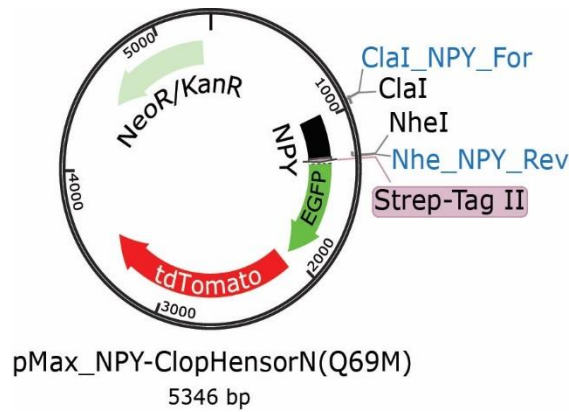


Abbildung 15: Vektorkarte von pMax_NPY-ClopHensorN(Q69M) mit den für die Klonierung genutzten Restriktionsschnittstellen ClaI und NheI, sowie Primern ClaI_NPY_For und NheI_NPY_Rev.

Für alle nachfolgenden pH-Messungen wurden die Chromaffinzellen stets mit pMax_NPY-ClopHensorN(Q69M) elektroporiert und (solange nicht anders beschrieben) nach zwei Tagen in Kultur für Experimente genutzt.

4.3.2. NPY-ClopHensorN(Q69M) wird korrekt in die LDCVs transloziert

Zur Überprüfung, ob NPY-ClopHensorN(Q69M) nach Transfektion tatsächlich in den LDCVs lokalisiert war, wurden Kollokalisationsstudien mit dem LDCV-ständigen Chromogranin A (Machado et al., 2010) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert und anschließend mit einem Primärantikörper gegen Chromogranin A behandelt. Als sekundärer Antikörper wurde anti-rabbit-Fluor Alexa647 benutzt. Die Aufnahme der fixierten Zellen erfolgte am LSM. Die Kollokalisierung wurden mit Hilfe von ImageJ ausgewertet (Abb. 16).

Das NPY, welches an ClopHensorN(Q69M) fusioniert ist, sollte den Sensor in die LDCVs befördern. Dessen Signal (488 nm) sah gepunktet aus. Das mit anti-Chromogranin A markierte Protein diente als Marker für LDCVs und zeigte die gleiche punktierte Verteilung (Abb. 16, obere Reihe). In der unteren Reihe waren die beiden Korrelationskoeffizienten nach Pearsons und Manders dargestellt. Pearsons zeigte eine Kollokalisierung vom überexprimierten NPY-ClopHensorN(Q69M) und dem LDCV-ständigen Chromogranin A von $0,81 \pm 0,22$. Der Korrelationseffizient nach Manders betrug von NPY-ClopHensorN(Q69M) gegen Chromogranin A $0,68 \pm 0,25$ und von Chromogranin A gegen NPY-ClopHensorN(Q69M) $0,36 \pm 0,26$. Es gab mehr Signal von Chromogranin A, welches nicht mit dem ClopHensorN(Q69M) lokalisierte. Diese

Beobachtung ist dadurch zu erklären, dass NPY-ClopHensorN(Q69M) nur in allen nach der Transfektion neu gebildeten LDCVs vorhanden war, während Chromogranin A in allen Vesikel vorkam. Damit konnte nachgewiesen werden, dass das Konstrukt NPY-ClopHensorN(Q69M) korrekt in den LDCVs lokalisiert war.

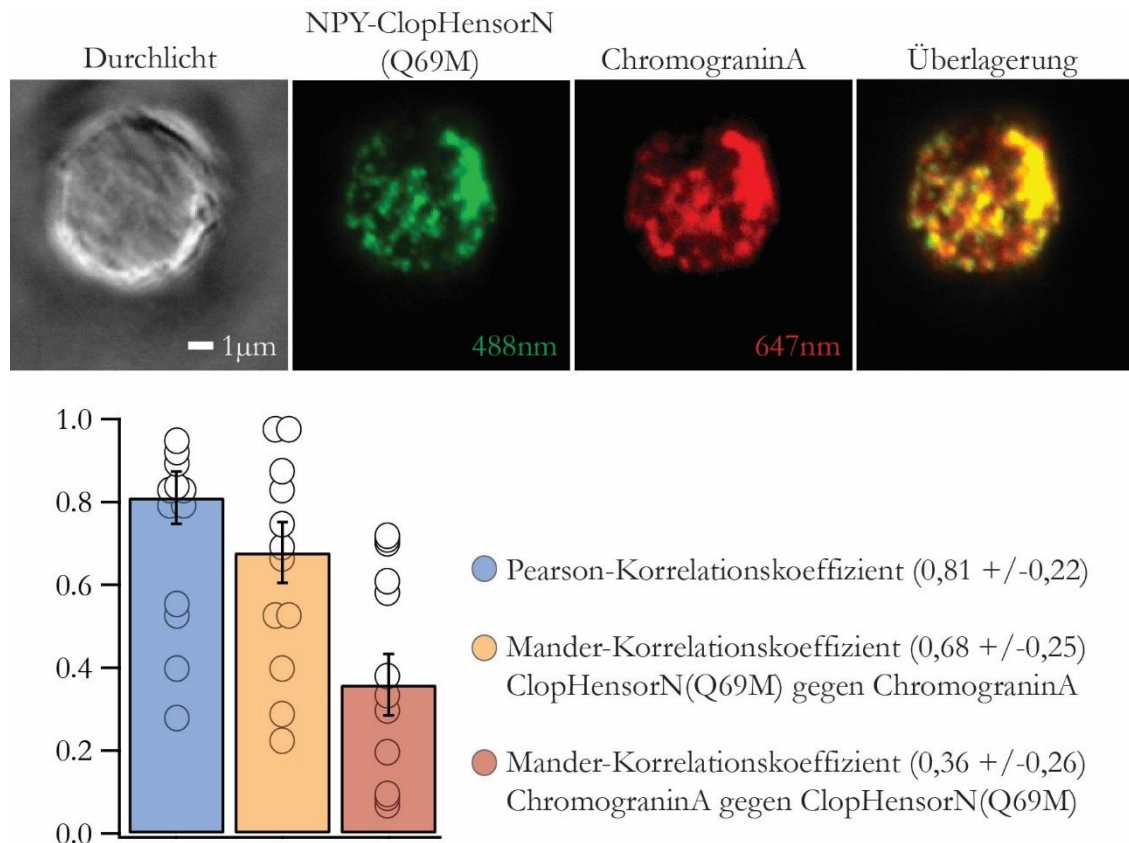


Abbildung 16: NPY-ClopHensorN(Q69M) ist in den LDCVs lokalisiert. In der oberen Reihe ist eine repräsentative Chromaffinzelle dargestellt, die mit NPY-ChlopHensorN(Q69M) elektroporiert wurde. Von links nach rechts sieht man dieselbe Zelle unter verschiedenen Bedingungen: im Durchlicht, nach Anregung mit der Wellenlänge 488 nm (zur Detektion des pH-Sensors) und nach Anregung mit der Wellenlänge 647 nm (zur Detektion des Antikörpers gegen Chromogranin. Das rechte Bild zeigt die Überlagerung der Signale von 488 nm und 647 nm. Im unteren Graph sind die einzelnen Werte (Kreise) und die Mittelwerte (Balken) mit Standardfehlern der einzelnen Korrelationsberechnungen dargestellt. Die Experimente und Auswertung erfolgten aus 11 Zellen aus 2 Mäusen.

4.3.3. ClopHensorN(Q69M) ist als pH-Sensor photostabil

Zur Überprüfung der Photostabilität des Sensors ClopHensorN(Q69M) wurden am LSM von transfizierten lebenden Chromaffinzellen in Extrazellulärlösung nach der Anregung mit 488 nm, 458 nm und 561 nm jeweils fünf aufeinander folgende Aufnahmen gemacht (Abb. 17). Die Auswertung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte mit dem Programm ImageJ innerhalb von ausgewählten Flächen (ROI = engl.: *region of interest*), die genau über

die LDCVs (s. Abb. 16) gelegt wurden. Die Fluoreszenzintensitäten der ersten Aufnahmen der einzelnen Anregungswellenlängen wurden jeweils auf 100 % normiert. Die nachfolgenden Aufnahmen wurden dagegen normalisiert.

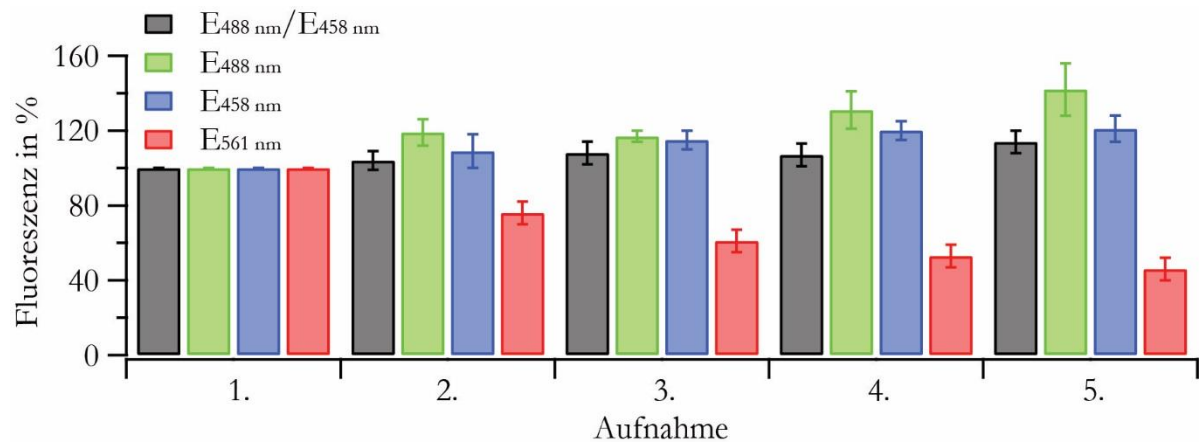


Abbildung 17: Photostabilität vom ClopHensorN(Q69M) in den Granulen. Dargestellt sind die gemittelten Fluoreszenzsignale (normalisierte Intensität +/-SEM) von fünf aufeinander folgenden Aufnahmen der jeweiligen Emissionen nach Anregung mit 488 nm (grün), 458 nm (blau), 561 nm (rot) und dem Quotienten aus E_{488 nm}/E_{458 nm} (schwarz) aus insgesamt 92 LDCVs von 9 Zellen aus einer Maus.

Betrachtete man die Signale der einzelnen Kanäle, wurden die jeweiligen Emissionssignale von 488 nm und 458 nm von E²GFP höher. Deren Quotient, der auch zur pH-Bestimmung genutzt wurde, blieb in etwa stabil. Das Signal von tdTomato war bei allen fünf Aufnahmen deutlich zu sehen, zeigte jedoch einen starken Signalverlust. Innerhalb der fünf Aufnahmen reduzierte sich das Signal auf 46 %. Das rote Signal ist somit nicht für ratiometrische Aufnahmen und somit zur Chloridbestimmung geeignet.

4.3.4. Erstellen einer pH-Kalibrierungskurve in LDCVs

Die granuläre pH-Kalibrierung erfolgte *in-vivo* am LSM. Das Durchlichtbild der Chromaffinzelle und die Emissionssignale nach der Anregung mit 488, 458 und 561 nm sind in Abb. 18A dargestellt.

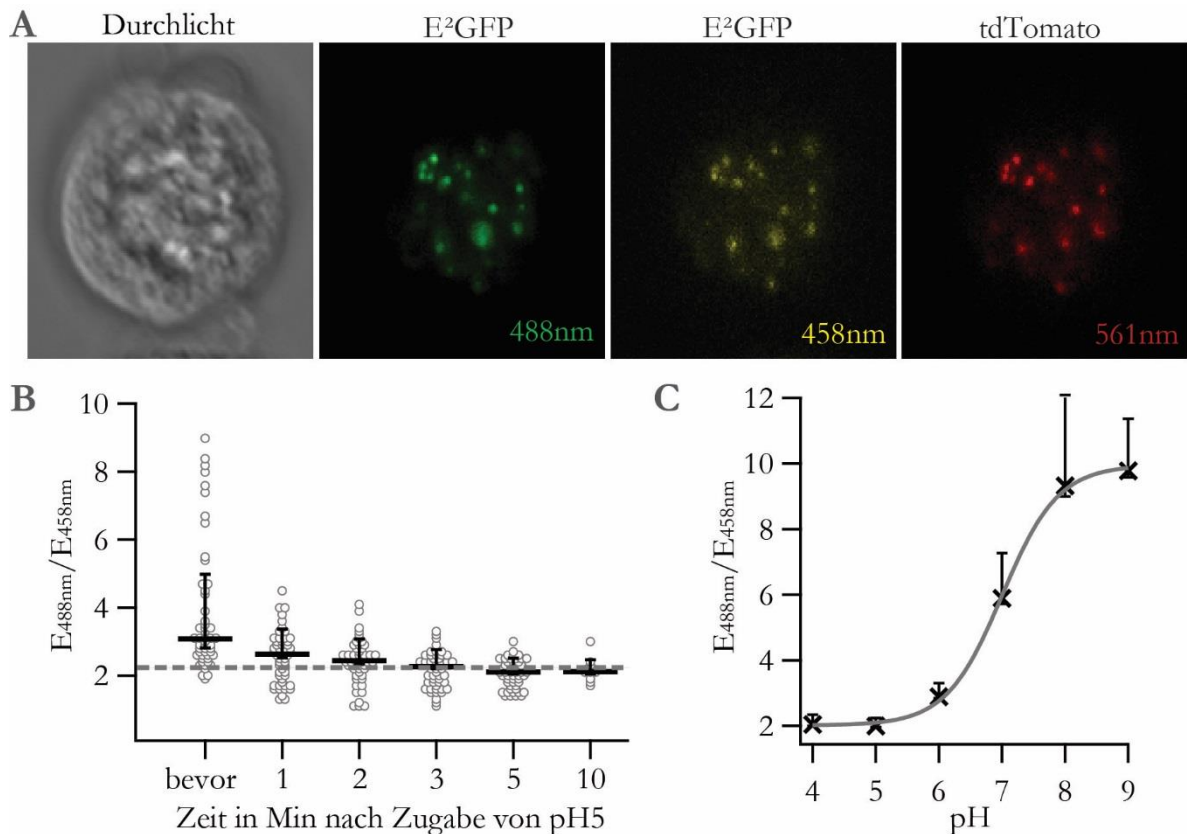


Abbildung 18: pH-Kalibrierung von NPY-ClopHensorN(Q69M) in LDCVs von Chromaffinzellen. A) Elektroporierte Chromaffinzelle mit NPY-ClopHensorN(Q69M). Von links nach rechts: Durchlichtbild, Emission bei 488 nm, 458 nm und 561 nm von derselben Zelle. B) Quotient der Emissionssignale $E_{488\text{ nm}}$ und $E_{458\text{ nm}}$ einzelner LDCVs einer für Protonen permeabilisierten Zelle in Extrazellulärlösung (bevor) und zu unterschiedlichen Zeiten nach Zugabe einer pH5-Kalibrierungslösung. Dargestellt sind pro Zeitpunkt die $E_{488\text{ nm}}/E_{458\text{ nm}}$ -Werte der einzelnen LDCVs (Kreise) und der Mittelwert +Standardabweichung/-Standardfehler. Die gestrichelte graue Linie deutet die vollständige Äquilibration des pH-Wertes in den LDCVs an. Ausgewertet wurden 51 Granulen in 4 Zellen aus 2 Präparationen. C) Granuläre pH-Kalibrierungskurve von NPY-ClopHensorN(Q69M) in LDCVs von Chromaffinzellen. Die Mittelwerte (+Standardfehler/-Standardabweichung) wurden aus 3-4 Zellen und 43-80 LDCVs (pH4: 3 Zellen, 43 LDCVs; pH5: 3 Zellen, 49 LDCVs, pH6: 4 Zellen, 80 LDCVs; pH7: 4 Zellen, 69 LDCVs; pH8: 4 Zellen; 68 LDCVs; pH9: 3 Zellen; 62 LDCV) aus 3 Präparationen bestimmt.

Zuerst wurde die Äquilibrationszeit bestimmt, die nach extrazellulärer pH-Änderung bis zum Erreichen eines stationären Zustandes nötig war (Abb. 18B). Dazu wurden die Zellen zunächst in Extrazellulärlösung aufgenommen („bevor“). Anschließend wurde die Extrazellulärlösung durch die pH-Kalibrierungslösung mit dem pH 5 ersetzt. Die Kalibrierungslösung enthielt Ionophore, die den intrazellulären pH dem pH der der Kalibrierungslösung anpassten. Dieselbe Zelle wurde in den Zeitintervallen von 1, 2, 3, 5 und 10 Minuten wiederholt aufgenommen. Der Quotient der Signalemissionen von

$E^2\text{GFP}$ ($E_{488\text{ nm}}/E_{458\text{ nm}}$) der Granulen wurde ermittelt und als Funktion der Zeit dargestellt. Bereits nach einer Minute konnte eine Veränderung des Quotienten festgestellt werden, der sich nach Minute 3 stabil einstellte.

Zur Erstellung der Kalibrierungskurve (Abb. 18C) wurden elektroporierte Zellen für 5 Minuten in den Kalibrierungslösungen mit den pH-Werten von 4 bis 9 permeabilisiert und anschließend am LSM aufgenommen. Die jeweiligen Quotienten $E_{488\text{ nm}}/E_{458\text{ nm}}$ wurden gemittelt und zur Erstellung der Kalibrierungskurve mit dem Programm IGOR Pro-Software genutzt. Dazu wurde ein sigmoidaler Fit mit folgender Formel benutzt:

$$\text{pH} = \text{base} + (\text{max} / (1 + \exp((x \text{ half} - x)/\text{rate})))$$

mit base (Grundlinie) = 1,91; max (maximaler Wert) = 8,36; x half (Wendepunkt) = 7,2494; rate (Steigung) = 0,459. Das Konfidenzintervall beträgt 0,95.

4.3.5. Untersuchung der Azidifizierung von LDCVs in WT Chromaffinzellen

In folgender Messreihe wurde überprüft, in welchem Zeitraum die LDCVs nach deren Synthese azidifiziert wurden und wie sich dieser pH-Wert während der Zeit veränderte. Dahinter stand die Überlegung, dass nach der Transfektion der Zellen nur neugebildete LDCVs das Fluoreszenzsignal trugen und somit das mittlere Alter der vermessenen LDCVs vom Zeitpunkt der Transfektion bestimmt wurde. Es wurden embryonale WT-Chromaffinzellen mit NPY-ClophensorN(Q69M) elektroporiert und zu verschiedenen Zeitpunkten (8, 24 und 48 h nach Elektroporation) am LSM bezüglich deren pH-Wert in den LDCVs untersucht (s. Methoden: *live cell imaging*). Der gemittelte pH-Wert in den LDCVs nahm zeitabhängig von pH 6,71 (+0,42/-0,065) nach 8 Stunden, über pH 6,45 (+0,41/-0,039) nach 24 Stunden bis pH 6,23 (+0,59/-0,026) nach 48 Stunden kontinuierlich ab (Abb. 19). Unterteilte man diese pH-Werte in Gruppen und betrachtete deren prozentuale Verteilung, befanden sich die meisten Granulen zum ersten Zeitpunkt (8 h nach der Elektroporation) im pH-Bereich zwischen 6,5 und 7. Bei den beiden Zeitpunkten 24 h und 48 h nach der Elektroporation besaßen die meisten Granulen einen pH-Wert zwischen 6 und 6,5. Die stetige Azidifizierung wurde vor allem im pH-Bereich 5,5 bis 6 deutlich. Dieser Pool der LDCVs nahm von 5 % (24 h) auf 17 % (48 h) innerhalb der letzten 24 Stunden um ein dreifaches zu.

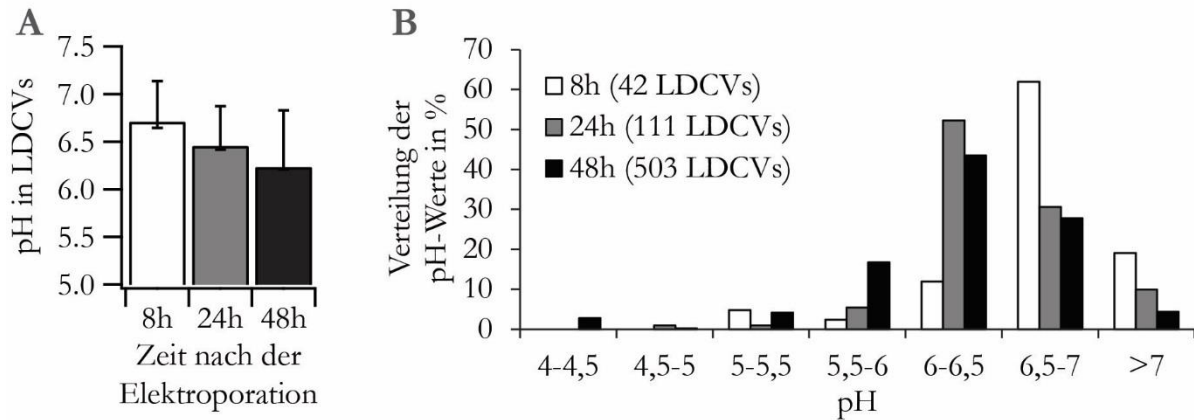


Abbildung 19: Azidifizierungsprozess der LDCVs in embryonalen WT-Chromaffinzellen. A) Zeitabhängige Abnahme der pH-Werte in den LDCVs nach der Elektroporation mit NPY-ClopHensorN(Q69M) (Mittelwerte+Standardabweichung/-Standardfehler). B) Die prozentuale Verteilung der pH-Werte in den LDCVs aus denselben Zellen weist mit zunehmender Zeit auf eine Linksverschiebung der pH-Werte in den sauren Bereich hin.

Vor allem in Abb. 19B wird die eben beschriebene Verschiebung des pHs in den sauren Bereich zum Zeitrahmen von 48 Stunden nach der Elektropartion deutlich. Diese Daten sind zur besseren Übersicht in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Überblick über die Azidifizierung von LDCVs in mCC.

Zeit nach Elektroporation	pH-Bereich						
	4-4,5	4,5-5	5-5,5	5,5-6	6-6,5	6,5-7	>7
8 h	0 %	0 %	5 %	2 %	12 %	62 %	19 %
24 h	0 %	1 %	1 %	5 %	52 %	31 %	10 %
48 h	3 %	0 %	4 %	17 %	44 %	28 %	4 %

4.3.6. Die pH-Werte in LDCVs sind in WT und DKO gleich

Nachdem der hier eingesetzte Sensor NPY-ClopHensorN(Q69M) als funktionell (d.h. korrekt in den LDCVs lokalisiert) und für pH-Messungen als geeignet (stabiler Quotienten $E_{488\text{ nm}}/E_{458\text{ nm}}$ über die Zeit) bestätigt wurde, wurde er zur pH-Bestimmung in LDCVs in embryonalen WT und DKO Chromaffinzellen eingesetzt.

Ein CAPS1-KD führt in Neuronen zur Erhöhung des pHs von 5,6 nach 6,6 in Synapsen (Eckenstaler et al., 2016). Deshalb wurde überprüft, ob in LDCVs von Chromaffinzellen ein ähnlicher Effekt auftritt. Da CAPS1 und CAPS2 sich in ihrer Funktion ergänzen,

wurde hier mit DKO-Zellen gearbeitet. Dazu wurde der granuläre pH in LDCVs von DKO- mit WT-Chromaffinzellen verglichen.

Embryonale WT und DKO Chromaffinzellen wurden am zweiten Tag nach der Präparation und Elektroporation mit NPY-ClopHensorN(Q69M) am LSM (s. LSM *live cell imaging*) gemessen. Für die Analyse wurden ausschließlich LDCVs ausgewertet, die in einem plasmamembrannahen Bereich (1 μm) an der Grenzfläche zum Deckglas lokalisiert waren, um eine mögliche Verfälschung der pH-Werte durch andere Zellkompartimente (wie Golgi oder endoplasmatisches Retikulum) oder unreife LDCVs zu reduzieren. Sowohl der Quotient $E_{488\text{ nm}}/E_{458\text{ nm}}$ der LDCVs als auch die daraus berechneten pH-Werte unterschieden sich zwischen WT- ($\text{pH}=6,26+0,49/-0,02$) und DKO-LDCVs ($\text{pH}=6,21+0,41/-0,01$) nicht (Abb. 20). An der einfachen Gauß-Verteilung wird ersichtlich, dass die pH-Werte in der DKO-Gruppe weniger streuten, die Maxima der beiden Kurven unterschieden sich jedoch nicht signifikant voneinander.

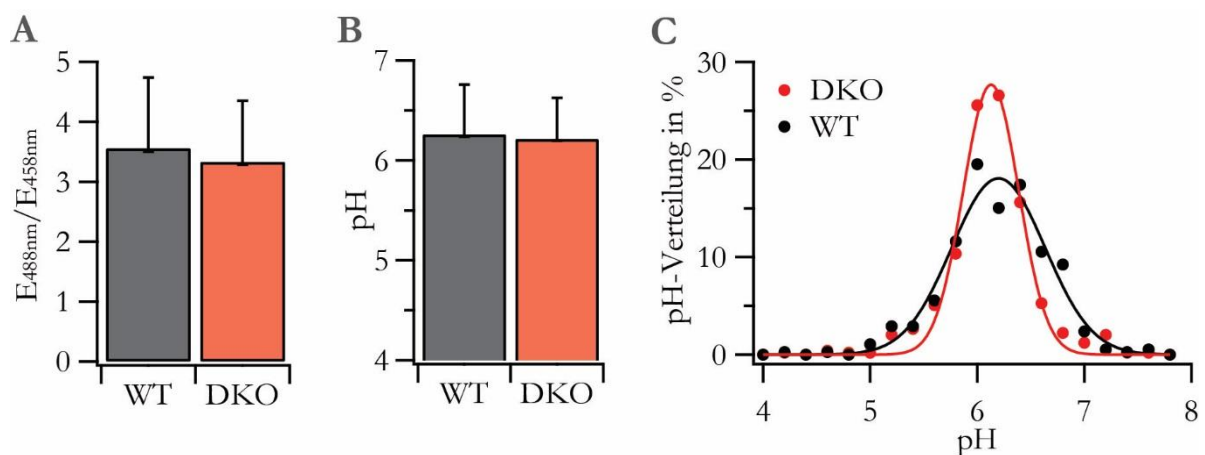


Abbildung 20: Der pH-Wert in LDCVs von WT und DKO Zellen ist unverändert. A und B) Quotient der E²GFP-Emissionssignale ($E_{488\text{ nm}}/E_{458\text{ nm}}$) und die daraus berechneten pH-Werte der LDCVs in embryonalen WT- und DKO-Chromaffinzellen sind nicht signifikant verschieden (Mittelwerte +Standardabweichung/-Standardfehler). C) Einfache Gauß-Verteilung der pH-Werte von LDCVs aus WT und DKO-Chromaffinzellen. DKO: 494 LDCVs, 26 Zellen, 4 Präparationen; WT: 381 LDCVs, 16 Zellen, 3 Präparationen.

4.3.7. Gepaarte pH-Bestimmung und Kalibrierung an denselben Zellen

Laut der Literatur (Arosio et al., 2010; Henry et al., 1998; Johnson, 1988) wurde ein granulärer pH-Wert von 5,5 bis 5,7 erwartet. Mit Hilfe des Sensors ClopHensorsN(Q69M) wurde in der vorliegenden Arbeit ein abweichender Wert von pH 6,2 ermittelt. Um die Diskrepanz zu prüfen, wurde ein weiterer Satz von Experimenten durchgeführt, bei dem

sowohl die pH-Bestimmung in den LDCVs, als auch eine anschließende Eichung an derselben Zelle durchgeführt wurde.

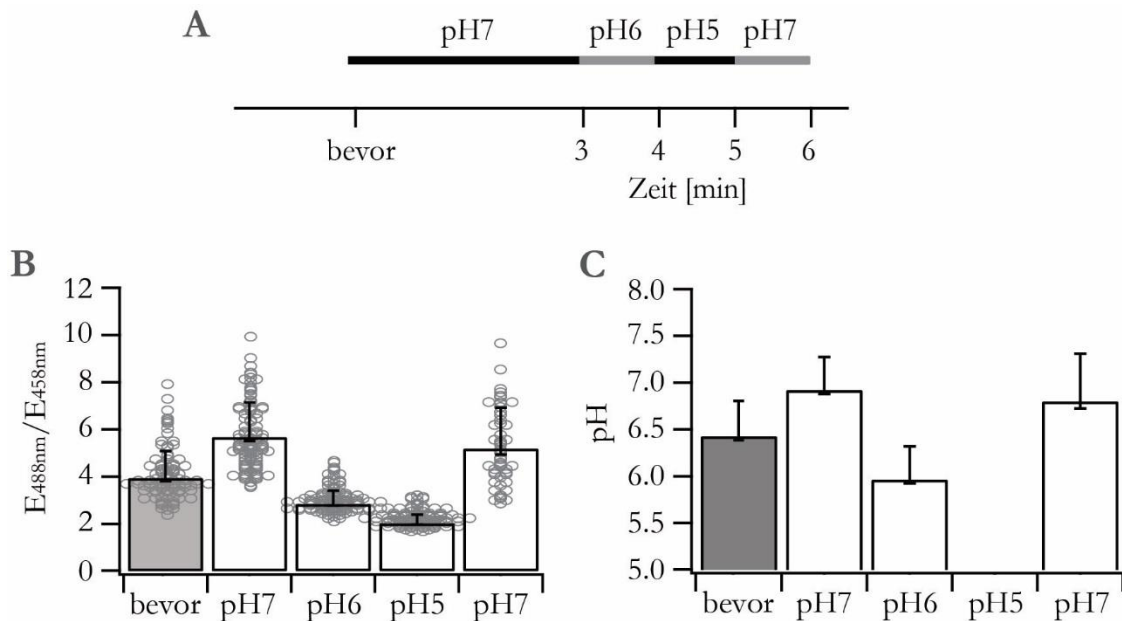


Abbildung 21: pH-Bestimmung und -Kalibrierung an denselben Chromaffinzellen bestätigt den $\text{pH} > 6$ in den LDCVs. Dargestellt ist die granuläre pH-Bestimmung und die darauffolgende pH-Kalibrierung an denselben Chromaffinzellen nach deren Elektroporation mit NPY-ClopHensorN(Q69M). A) Zeitlicher Ablauf des Experiments mit der Inkubationsdauer der jeweiligen pH-Kalibrierungslösungen. B) Quotient der Emissionssignale von $E^2\text{GFP}$ ($E_{488\text{ nm}}/E_{458\text{ nm}}$) einzelner LDCVs (Kreise) zuerst in physiologischer Extrazellulärlösung und anschließend nach Permeabilisierung mit verschiedenen pH-Kalibrierungslösungen (Mittelwerte +Standarsabweichung/ -Standardfehler). C) Errechnete pH-Werte aus B (Mittelwerte +Standarsabweichung/-Standardfehler). Bevor: N=8, n=93; pH7: N=8; n=93; pH6: N=8, n=93; pH5: N=7, n=86; pH7: N=3, n=50.

Diese Versuchsdurchführung ist angelehnt an die Publikation von (Eckenstaler et al., 2016). Dabei wurde eine Zelle in physiologischer Extrazellulärlösung aufgenommen und anschließend daran erfolgte direkt eine pH-Kalibrierung. Dazu wurden murine embryonale WT Chromaffinzellen benutzt. Für die Auswertung wurde für jedes LDCV zunächst der Quotient $E_{488\text{ nm}}/E_{458\text{ nm}}$ in Extrazellulärlösung bestimmt (s. Abb.21, „bevor“). Diese Lösung war physiologisch und enthielt keine Ionophore. Anschließend wurden die Zellen mit den pH-Kalibrierungslösungen für eine bestimmte Dauer in der Reihenfolge pH7 (3 min), pH6 (1 min), pH5 (1 min) und wieder pH7 (1 min) permeabilisiert und äquilibriert. Daraus wurde wieder der Quotient der Emissionssignale von $E^2\text{GFP}$ und der entsprechende pH-Wert ermittelt (Abb. 21). So entstand eine Eichkurve anhand derer die pH-Werte mit der pH-Kalibrierungskurve (s. Abb. 18) umgerechnet wurden. Eine

Mittelung dieser Werte führte zu exakteren Abschätzungen der pH-Werte in den LDCVs. Der hierbei ermittelte pH-Wert von LDCVs in WT- und DKO-Chromaffinzellen lag im Bereich zwischen pH7 und pH6. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe belegen, dass die durch die Zusammenlegung (4.3.5) erhaltenen Werte gereifter LDCVs (pH 6,2) nicht signifikant von den Werten bei der Generierung gepaarter Daten abweichen (pH 6,4).

An der Abbildung 21C wird deutlich, dass der pH-Austausch in den LDCVs funktioniert hat. Die Werte aus der Berechnung des Quotienten aus $E_{488\text{ nm}}/E_{458\text{ nm}}$ der fortlaufenden Kalibrierung an den einzelnen Zellen ergaben exakt die pH-Werte der jeweiligen Kalibrierungslösungen. Allein die Werte des Quotienten $E_{488\text{ nm}}/E_{458\text{ nm}}$ von pH5 konnten nicht alle in pH umgerechnet werden, da die Hälfte dieser unterhalb von 2 und somit außerhalb des Kalibrierungsbereiches lagen. Deren Mittelwert entsprach wie erwartet pH 5. Nach der Inkubation mit der Kalibrierungslösung mit pH 5 kann ClopHensorN(Q69M) den pH 7 korrekt detektieren. Dies zeigt, dass der Sensor auch nach mehreren pH-Wechseln seine Stabilität und Funktionalität beibehält.

4.4. Exon 22 fördert die Serotonin-Aufnahme durch VMAT1

In den amperometrischen Experimenten konnte die Rolle des Exons 22 in der Beladung der LDCVs mit den Katecholaminen gezeigt werden. Da der vesikuläre pH-Wert zwischen WT und DKO unverändert ist, wurde die Regulation vom Exon 22 auf VMAT1 untersucht. Dazu wurden die Konstrukte pMax_mCAPS2a-HA_IRES_eGFP, pMax_mCAPS2b-HA_IRES_eGFP und als Kontrolle pMax_IRES_eGFP kloniert. Es wurden CHO (*chinese hamster ovarien*)-Zellen genutzt, die stabil VMAT1 exprimieren. Diese wurden mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation mit einem der drei Konstrukte transfiziert. Die Zellen wurden mit Steptolysin O (SLO) permeabilisiert, mit radioaktivem Serotonin für 15 Minuten inkubiert und anschließend lysiert. In den Proteinlysaten wurde zum einen die Menge des aufgenommenen Serotonins bestimmt und zum anderen die Gesamtproteinmenge.

4.4.1. Klonierung der Konstrukte

Zur Herstellung des Konstruktes pMax_IRES_eGFP wurde das IRES mit den Primern IRES_BamHI_BssHIII_For und IRES_MluI_Rev und dem Plasmid

pMax_Synaptobrevin_IRES_eGFP amplifiziert, anschließend mit BamHI und MluI geschnitten und mit dem zuvor genauso geschnittenen pMax_Synaptobrevin_IRES_eGFP ligiert. Dadurch wurde das Synaptobrevin_IRES durch IRES ersetzt und somit das Synaptobrevin aus dem Ursprungsplasmid entfernt (Abb. 22).

Zur Herstellung der Konstrukte pMax_mCAPS2a-HA_IRES_eGFP und pMax_mCAPS2b-HA_IRES_eGFP wurden mCAPS2a/b-HA aus pSFV1-mCAPS2a/b-HA_IRES-eGFP mit den Restriktionsenzymen BamHI und BssHII rausgeschnitten und in den zuvor genauso geschnittenen pMax_Synaptobrevin2_IRES_eGFP ligiert. Dadurch wurde das Synaptobrevin durch das mCAPS2a/b-HA ersetzt.

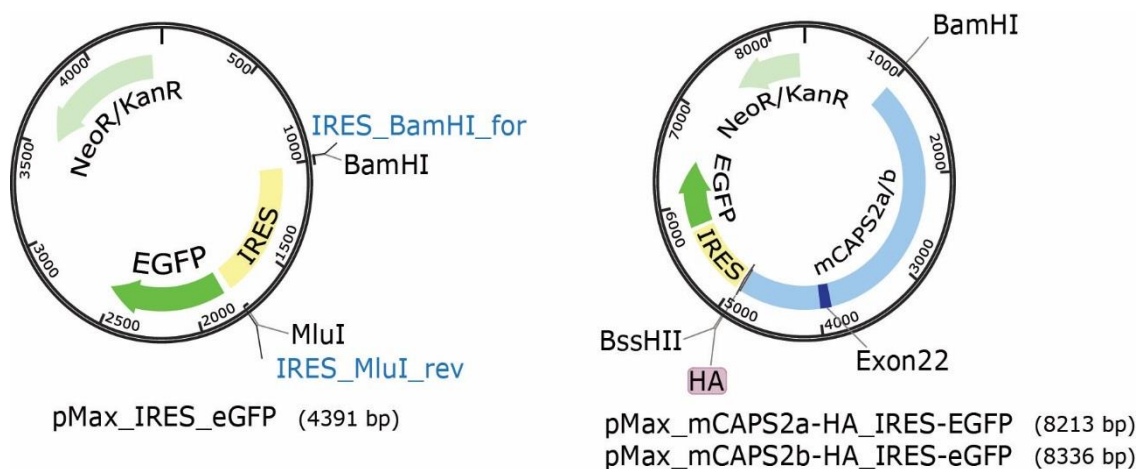


Abbildung 22: Konstrukte zur Überprüfung der Serotoninaufnahme. Von links nach rechts sind die Vektorkarten vom Leervektor pMax_IRES_eGFP und den beiden mCAPS2-Spleißvarianten pMax_mCAPS2a/b-HA_IRES_eGFP mit den benutzten Primern (blau) und Restriktionsstellen (schwarz) dargestellt.

4.4.2. mCAPS2b erhöht die Aufnahme des Serotonins durch VMAT1 in CHO-Zellen

Die Transfektionseffizienz aller Gruppen war vergleichbar (eGFP=46,72±3,07; mCAPS2a=47,45±4,43; mCAPS2b=44,45±3,28 in %; Abb. 23A). Die aufgenommene Serotoninmenge wurde gegen die Gesamtproteinmenge gerechnet. Nur die mit mCAPS2b transfizierten CHO-Zellen zeigten eine signifikante Erhöhung der Serotoninaufnahme. Die Transfektion mit mCAPS2a und eGFP wies keine signifikante Veränderung in der Serotoninaufnahme auf (eGFP=0,27±0,01; mCAPS2a=0,30±0,02; mCAPS2b=0,39±0,04; s. Abb. 23B).

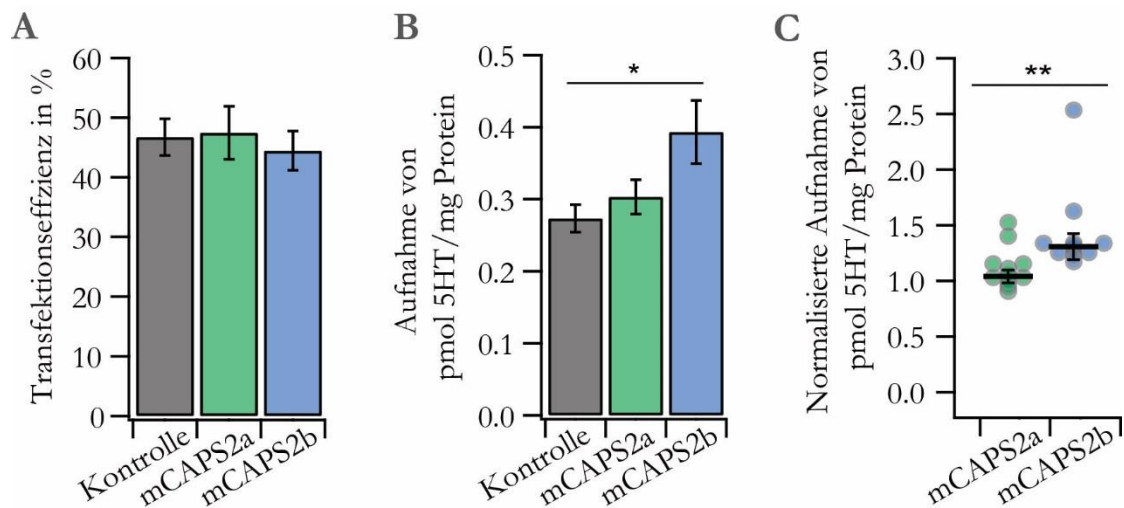


Abbildung 23: mCAPS2b erhöht die Serotoninaufnahme in CHO-Zellen. A) Transfektionseffizienz von mCAPS2a, mCAPS2b und eGFP in CHO-Zellen, die stabil mit VMAT1 transfiziert sind. B) Aufnahme von 5-HT in den drei unterschiedlich transfizierten Gruppen der CHO-Zellen. C) Normalisierte 5HT-Aufnahme der mit mCAPS2a und mCAPS2b transfizierten CHO-Zellen gegen die eGFP-Kontrolle. Dargestellt sind in A und B die Mittelwerte und in C die einzelnen Werte mit Standardfehlern (n=11). Zur Signifikanzberechnung wurde Wilcoxon-Mann-Whitney-Test benutzt (*p<0,05; **p<0,01).

Nach der Normalisierung der Gruppen von mCAPS2a und mCAPS2b gegen die eGFP-Kontrolle wird der Effekt von mCAPS2b in der Monoaminaufnahme noch deutlicher (2a=1,04±0,05; 2b=1,30±0,11; s. Abb. 23C). Diese Daten zeigen, dass sich das Exon 22 in mCAPS2 positiv auf die Regulation des VMAT1 auswirkt. Da dessen Funktion durch eine Vielzahl von Proteinen reguliert wird, war in folgenden Experimenten das Ziel, einen Interaktionspartner von mCAPS2b zu identifizieren. Dadurch sollte der Mechanismus von mCAPS2b in der Befüllung der LDCVs näher aufgeklärt werden.

4.5. Suchen nach Interaktionspartner von mCAPS2b mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System (eng.: *Yeast Two Hybrid* = YTH) wurde benutzt, um in Hefe nach Protein-Interaktionspartnern zu suchen. In diesem Projekt galt es Interaktionspartnern von mCAPS2-Exon 22 zu identifizieren. Zum Auffinden dieser sollte entweder die komplette MUN-Domäne (Exon 13 bis 31) von mCAPS2a und mCAPS2b oder das alleinige Exon 22 als „Köder“ genutzt werden, um mögliche interagierende Proteine („Beute“) zu identifizieren. Exon 21 in mCAPS2 wurde als Interaktionspartner

von rSynatxon1A bestimmt (Parsaud et al., 2013). Deshalb wurde zum Testen der Funktionalität der neu klonierten mCAPS2-Konstrukte das rSyntaxin1A als Beutekonstrukt hergestellt und eingesetzt.

4.5.1. Klonierung der Konstrukte

Zur Untersuchung der Bindungspartner vom Exon 22 des mCAPS2-Proteins wurden drei verschiedene Konstrukte als Köderproteine in den pGBKT7-Vektor kloniert. Zum einen wurden die beiden MUN-Domänen von mCAPS2a und mCAPS2b gegeneinander untersucht, zum anderen das 40 Aminosäuren lange Exon 22. Zum Klonieren dieser Konstrukte wurden die MUN-Domänen mit den Primern CAPS2(Ex13)_EcoRI_for und CAPS2(Ex31)_BamHI_rev amplifiziert (Abb. 24). Die Anlagerung der Primer erfolgte bei 63 °C für 30 Sekunden und die Amplifikation bei 72 °C für 4,5 Minuten. Das Exon 22 wurde mit den Primern Ex22_EcoRI_for und Ex22_BamHI_rev vervielfältigt. Alle drei PCR-Produkte und auch der leere pGBKT7-Vektor wurden mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI geschnitten, miteinander ligiert, in DH5 α transformiert und auf Kanamycin-Platten ausplattiert.

Da bereits bekannt ist, dass das Exon 21 in der mCAPS_MUN-Domäne mit dem zytosolischen Teil des rSyntaxin1A (Aminosäuren 1 bis 264) interagiert, wurde dieses in die pGADT7-Vektor kloniert und als Positivkontrolle zum Testen der CAPS-Konstrukte auf deren Funktionalität genutzt. Für dessen Klonierung wurde das rSyntaxin1A mit den Primern Stx1A_NdeI_for und Stx1A_EcoRI_rev amplifiziert. Die Primeranlagerung erfolgte bei 60 °C und die Amplifikation für 2 Minuten. Das PCR-Produkt und der Leervektor pGADT7 wurden beide mit den Enzymen NdeI und EcoRI geschnitten, beide wurden ligiert, in DH5 α -Bakterien transformiert und auf Ampicillin-Platten ausplattiert.

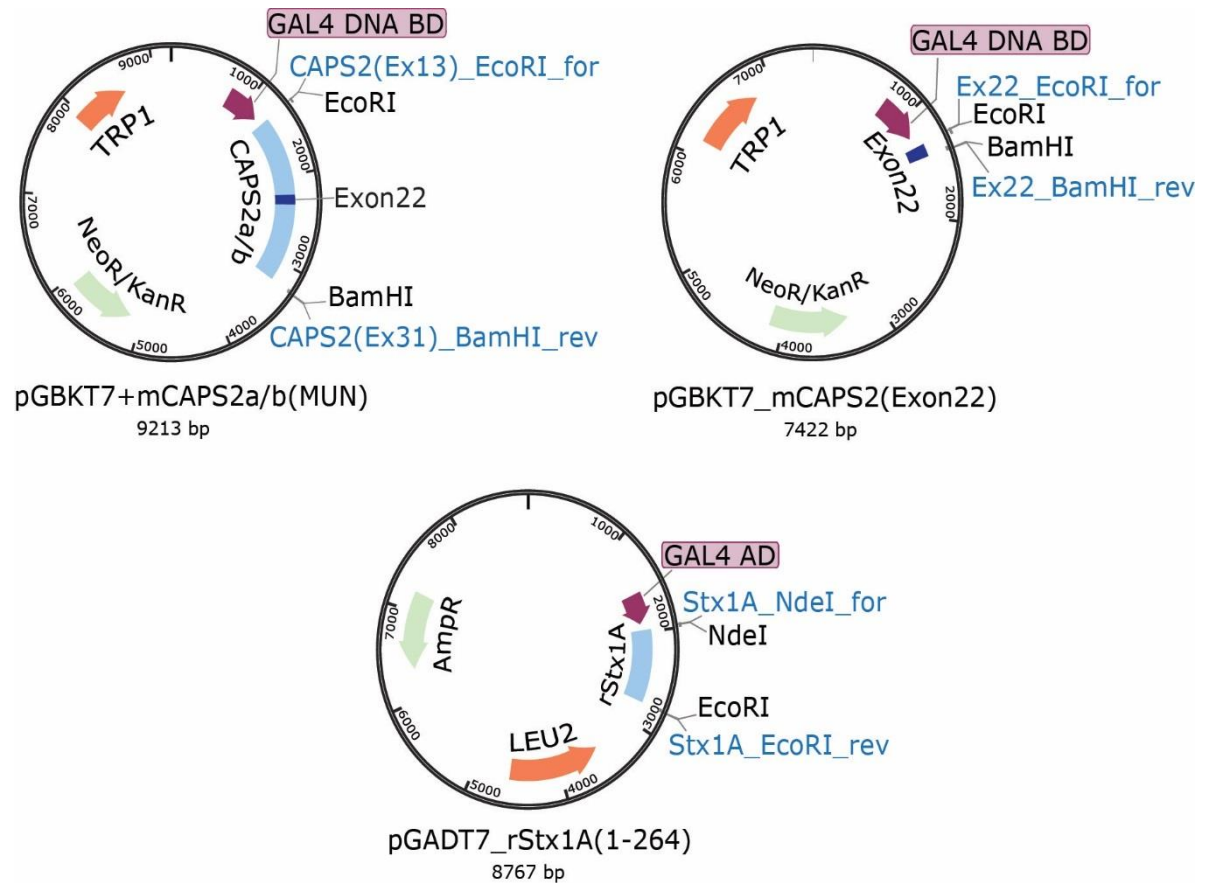
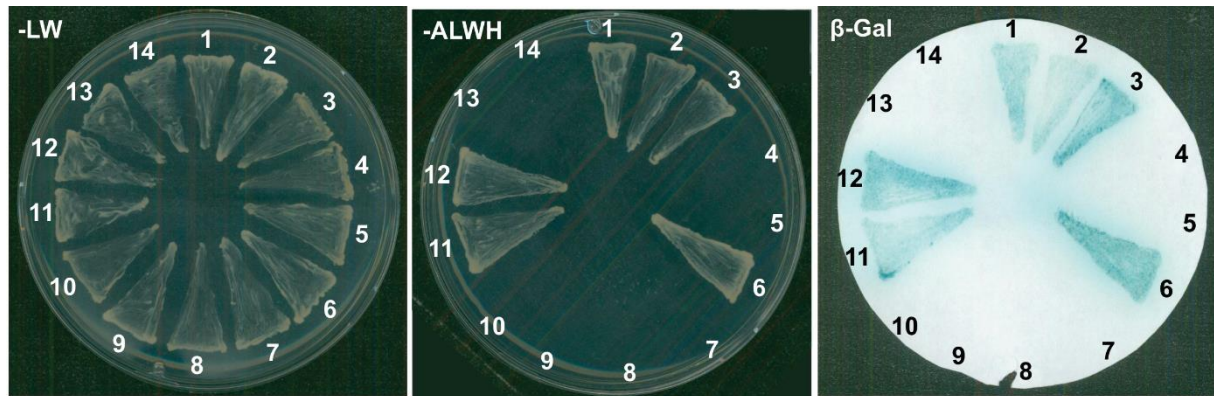


Abbildung 24: Vektorkarten der YTH-Konstrukte mit den verwendeten Restriktionsschnittstellen und Primern.

4.5.2. Testen der Funktionalität der mCAPS2-Konstrukte für YTH

Die neu hergestellten DNA-Konstrukte wurden in Hefe durch Elektroporation eingebracht (s. 3.7.2.). Durch Hybridisierung (s. 3.7.3.) dieser beiden wurde eine Konjugation der Hefe-DNA bewirkt. Die beiden hier verwendeten Konstrukte (mCAPS2a_MUN und mCAPS2b_MUN) enthielten das Exon 21. Die Hybridisierung dieser beiden MUN-Domänen mit rSyntaxin1A ist somit eine Positivkontrolle für die Funktionalität der hergestellten Plasmide und der richtigen Faltung der daraus exprimierten Proteine. Das Exon 22 sollte nicht mit rSyntaxin1A interagieren. Alle Ansätze sind auf dem –LW-Medium angewachsen, somit hat jede Hybridisierung funktioniert (Abb. 25). mCAPS2a_MUN und mCAPS2b_MUN interagierten wie erwartet mit rSyntaxin1A, was man sowohl an dem Wachstum auf den –ALWH-Platten als auch an der Blaufärbung des β -Galalaktosidase-Assays sieht. Das alleinige Exon 22 zeigte eine Interaktion mit rStx1A, dem Leervektor pGADT7 und der Negativkontrolle pSE1111. Das bedeutet, dass dieses

Konstrukt eine Autoaktivierung besitzt und deshalb für die Screening-Experimente ungeeignet ist.



Mating	Köder	Beute	-LW	-ALWH	βGal
1	pGBKT7_mCAPS2a_MUN(Ex13-31)	pGADT7_rStx1A(1-164)	+	+	+
2	pGBKT7_mCAPS2b_MUN(Ex13-31)	pGADT7_rStx1A(1-164)	+	+	+
3	pGBKT7_mCAPS2_Ex22	pGADT7_rStx1A(1-164)	+	+	+
4	pGBKT7_mCAPS2a_MUN(Ex13-31)	pGADT7	+	-	-
5	pGBKT7_mCAPS2b_MUN(Ex13-31)	pGADT7	+	-	-
6	pGBKT7_mCAPS2_Ex22	pGADT7	+	+	+
7	pGBKT7	pGADT7_rStx1A(1-164)	+	-	-
8	pGBKT7_pSE1112	pGADT7_rStx1A(1-164)	+	-	-
9	pGBKT7_mCAPS2a_MUN(Ex13-31)	pGADT7_pSE1111	+	-	-
10	pGBKT7_mCAPS2b_MUN(Ex13-31)	pGADT7_pSE1111	+	-	-
11	pGBKT7_mCAPS2_Ex22	pGADT7_pSE1111	+	+	+
12	pGBKT7_Ribeye(B)	pGBKT7_Ribeye(B)	+	+	+
13	pGBKT7_Ribeye(B)	pGADT7	+	-	-
14	pGBKT7	pGBKT7_Ribeye(B)	+	-	-

Abbildung 25: Nachweis der Funktionalität der CAPS-Konstrukte und deren Interaktion mit rSyntaxin1A für YTH. In der oberen Reihe ist ein Überblick vom Wachstum der Hefen auf den -LW und -ALWH-Platten und dem β-Galaktosidase-Assay der einzelnen Hefe-Hybridisierungen. In der unteren Tabelle sind dieselben Hybridisierungen mit den eingesetzten Konstrukten aufgelistet und bezüglich ihres Wachstums auf -LW und -ALWH-Medium und dem β-Galaktosidase-Assay (βGal) ausgewertet, + bedeutet Hefewachstum, - bedeutet kein Hefewachstum.

4.5.3. Ermittlung der höchsten Screeningeffizienz der Bibliothek

Zum Suchen von Interaktionspartnern wurde eine cDNA-Bibliothek von Clontech genutzt, die aus Gehirnen von adulten Mäusen hergestellt wurde. Dazu wurde mRNA aus dem entsprechenden Gewebe isoliert, in cDNA umgeschrieben, mit Restriktionsenzymen geschnitten, in den pGADT7-Plasmid ligiert und in Hefe eingebracht. Die Größe dieser Konstrukte variiert zwischen 500 und 1200 bp. Die Bibliothek enthält 50.000.000 Konstrukte und ist normalisiert. Das bedeutet, dass von allen cDNAs die gleiche Anzahl vorliegt, unabhängig von der cDNA-Länge.

Um keinen möglichen Interaktionspartner zu übersehen, wird in der Regel die komplette Bibliothek mindestens dreimal komplett durchsichtet, was im Folgenden als Screening bezeichnet wird. Zuerst wurden die besten Bedingungen für die Hybridisierung mit der Bibliothek ausgetestet, um die Effizienz des Screenings zu erhöhen. Dazu wurden Ansätze mit 1 µl der cDNA-Bibliothek und unterschiedlichen Volumina von mCAPS2b_MUN-Hefekultur (OD=0,9) in einem Gesamtvolumen von 500 µl ausgetestet. Von diesem 500 µl Ansatz wurde jeweils 1µl auf je eine -LW-Platte ausplattiert. Nach drei Tagen bei 30 °C wurde die Zahl der gewachsenen Kolonien ermittelt (Tab. 9).

Tabelle 9: Bestimmung der optimalen Screeningeffizienz der cDNA-Bibliothek.

Volumen der cDNA-Bibliothek	Volumen von mCAPS2b (0,9 OD)	YPD-Medium (ad 500 µl)	Anzahl der Hefekolonien aus 1µl vom Gesamtansatz des Matings ausplattiert auf -LW-Platte
1 µl	50 µl	450 µl	32 000 Kolonien
1 µl	100 µl	400 µl	31 000 Kolonien
1 µl	150 µl	350 µl	672 000 Kolonien
1 µl	200 µl	300 µl	150 000 Kolonien
1 µl	450 µl	50 µl	43 000 Kolonien

Die höchste Hybridisierungseffizienz wurde mit 1 µl der Bibliothek und 150 µl der 2b-Hefesuspension mit der optischen Dichte von 0,9 in einem Gesamtvolumen von 500 µl YPD erreicht. Diese Bedingungen wurden für das nachfolgende Screening der Bibliothek mit mCAPS2a-MUN- und mCAPS2b_MUN verwendet.

4.5.4. Screening der Bibliothek

Das Screening der Bibliothek mit den MUN-Domänen von mCAPS2a und mCAPS2b erfolgte nach den optimierten Hybridisierungsbedingungen (s. Tab 9). Die kompletten Ansätze wurden auf jeweils eine 14 cm-große Petrischale mit -ALWH-Medium ausplattiert. Bei jedem Ansatz wurde ein Teil zusätzlich auf -LW-Platte ausgestrichen, um die Effizienz von jeder einzelnen Hybridisierung nach einer Woche zu überprüfen. Nach 7 bis 28 Tagen wurden die Kolonien auf den -ALWH-Platten gepickt und in 1 ml-YPD-Medium innokuliert. Nach 5 Stunden Inkubation bei 30 °C und 900 rpm wurden diese bei 3000 rpm abzentrifugiert und in 1 ml -ALWH-Medium aufgenommen. Am Folgetag wurden die angewachsenen Kulturen zur Hälfte eingefroren. Aus der anderen Hälfte

erfolgte die Isolation der DNA und der darin enthaltenen pGBKT7-Plasmide. Von jeder DNA wurden jeweils 4 Kolonien in Bakterien transformiert, um die DNA-Konzentration und -Reinheit zu erhöhen. Nach der DNA-Isolierung aus den Bakterien wurde diese mit den Restriktionsenzymen Sfi I A und Sfi I A verdaut und in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Ein Bakterium kann jeweils nur eine DNA aufnehmen, eine Hefe mehrere. Wenn eine DNA aus einer gepickten Hefe-Kolonie verschiedene DNA-Größen enthielt, bedeutete dies, dass die Hefe mehrere cDNAs aus der Bibliothek aufgenommen hat. In diesem Fall wurden alle DNAs aus Bakterien mit den verschiedenen Bandengrößen sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte mit den Primern pGADT7_for und pGADT7_AD_rev. Zur sequenzierten DNA wurde in der Datenbank Pubmed das dazugehörige Gen ermittelt (Tab. 10).

Tabelle 10: YTH-Screeningergebnisse von mCAPS2b, mit Auflistung des Gens, des Proteins und dessen Funktion.

Gen	Protein	Funktion
Cct3	Chaperonin containing Tcp1, subunit 3 (gamma)	Chaperone
Apoa1bp (2x)	Apolipoprotein A-1 binding protein	NAD(P)HX epimerase (Naxe)
Lrrc58	Leucine rich repeat containing 58	LLR-Motiv ist an vielen Protein-Protein-Interaktionen beteiligt
Zfr	Zink finger binding protein	Zink-Finger Protein
CLPM11	Cleft lip and palate transmembrane protein 1-like protein	Membranprotein für Apoptose
Orc5	Origin recognition complex, subunit 5	DNA-Replikation, Zellzyklus

Alle detektierten cDNAs aus der Bibliothek haben eine Funktion im Zellzyklus oder in Apoptose. Da keine Verbindung zur Befüllung der LDCVs erkannt wurde, wurden deren Interaktion als unspezifisch eingestuft. Es wurden keine weiteren Verifizierungen durchgeführt, um diese Treffer auf deren Autoaktivierung zu testen. Von mCAPS2a konnten keine Interaktionspartner ermittelt werden. Die Bibliothek wurde mit mCAPS2a sechs Mal, mit mCAPS2b acht Mal gesichtet.

4.6. Herstellung des mCAPS2b-Antikörpers und Detektion der endogenen Expression von mCAPS2b

4.6.1. Herstellung des Antikörpers gegen mCAPS2_Exon 22

Die Bestimmung der Lokalisation und Expression von mCAPS2b hilft dessen Funktion zu verstehen. Das Ziel war es einen Antikörper herzustellen, der spezifisch das Exon 22 des mCAPS2-Proteins detektiert. Da mCAPS1 und mCAPS2 hohe Homologie aufweisen, wurde zuerst die Sequenz der beiden Isoformen verglichen (Abb. 26).

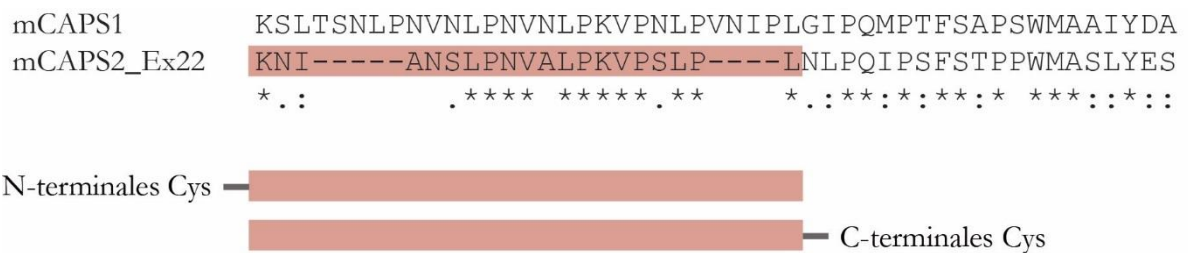


Abbildung 26: Sequenzvergleich des Exons 22 zwischen mCAPS1 und mCAPS2. Das Exon 22 von mCAPS1 enthält in der N-terminalen Hälfte neun Aminosäuren mehr als das mCAPS2. In der zweiten Hälfte sind die letzten 22 Aminosäuren beider Spleißvarianten zu 50 % identisch. Wegen der Diversität wurde der Antikörper gegen die ersten 20 Aminosäuren hergestellt. Zur Stabilität wurde diese Sequenz entweder mit einem N- oder einem C-terminalen Cystein markiert. Beide Varianten wurden zur Immunisierung genutzt.

Beide Sequenzen von mCAPS1 und mCAPS2_Exon 22 sind zu 56 % identisch. Der N-terminale Teil beinhaltet in mCAPS1 neun Aminosäuren mehr und enthält somit die größere Variabilität. Deshalb wurde dieser Sequenzabschnitt gewählt und als ein Peptid synthetisiert. Um dessen Stabilität zu gewährleisten, wurde entweder am C- oder am N-Terminus ein Cystein (Cys) angehängt. Beide Peptide wurden einem Kaninchen wiederholt intravenös injiziert, um die Antikörpersynthese gegen diese Sequenz zu induzieren (Abb. 27). Dem Kaninchen wurde wiederholt Vollblut entnommen, um daraus Serum herzustellen. Das heißt das Vollblut wurde gerinnen gelassen, abzentrifugiert und der Überstand als Immuneserum behalten. Die Immunisierung erfolgte mehrmals und in regelmäßigen Abständen. Vor der ersten Immunisierung wurde das Kontrollserum entnommen und als Negativkontrolle für den Antikörper benutzt.

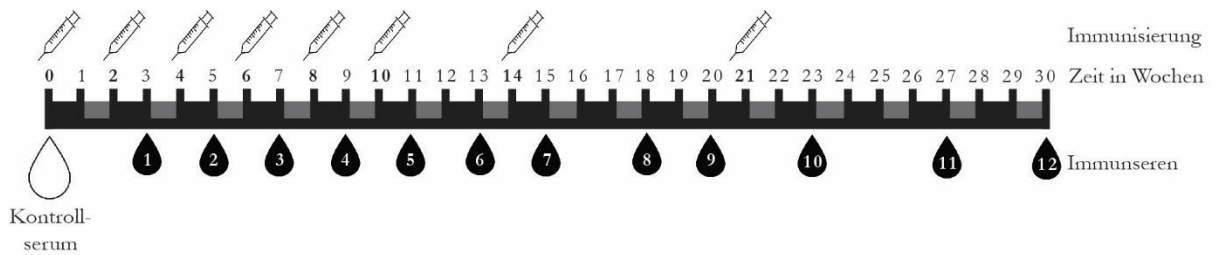


Abbildung 27: Herstellung des mCAPS2_Exon 22-Antikörpers. Zeitlicher Verlauf über die Immunisierung des Kaninchens mit dem mCAPS2_Exon 22-Peptid und Überblick über die Entnahme des Kontrollserums und der Immunsereen.

4.6.2. Testen der erhaltenen Seren

Die gesammelten Immunsereen sollen den gewünschten Antikörper gegen das injizierte Peptid enthalten. Um das zu überprüfen und das sensitivste Serum zu finden, wurden Western Blots durchgeführt. Dafür wurden Proteinlysate aus BHK-Zellen hergestellt, die zuvor mit pSFV1-mCAPS2a-HA_IRES_eGFP bzw. pSFV1_mCAPS2b-HA_IRES_eGFP infiziert wurden, um das entsprechende CAPS-Protein zu exprimieren. Als Kontrolle wurden unbehandelte BHK-Zellen lysiert. Für den Western Blot wurden jeweils 20 µg Protein aufgetragen. Nach einem 2-stündigen Blocken in 5 %-iger Milchlösung wurde die Membran zuerst mit dem anti-mCAPS2-Exon 22 (verschiedene Seren) in einer Verdünnung 1:2000 (in 5 % Milch in TBS-T), anti-β-Actin in der Verdünnung 1:10000 (in 5 % Milch in TBS-T) und den entsprechenden sekundären Antikörpern (mit HRP = *horseradish peroxidase*) markiert, um die Banden anschließend zu visualisieren. Danach wurde die Nitrozellulosemembran mit dem Strippingpuffer behandelt und anschließend mit dem anti-HA und dem entsprechenden sekundären Antikörper inkubiert und erneut entwickelt.

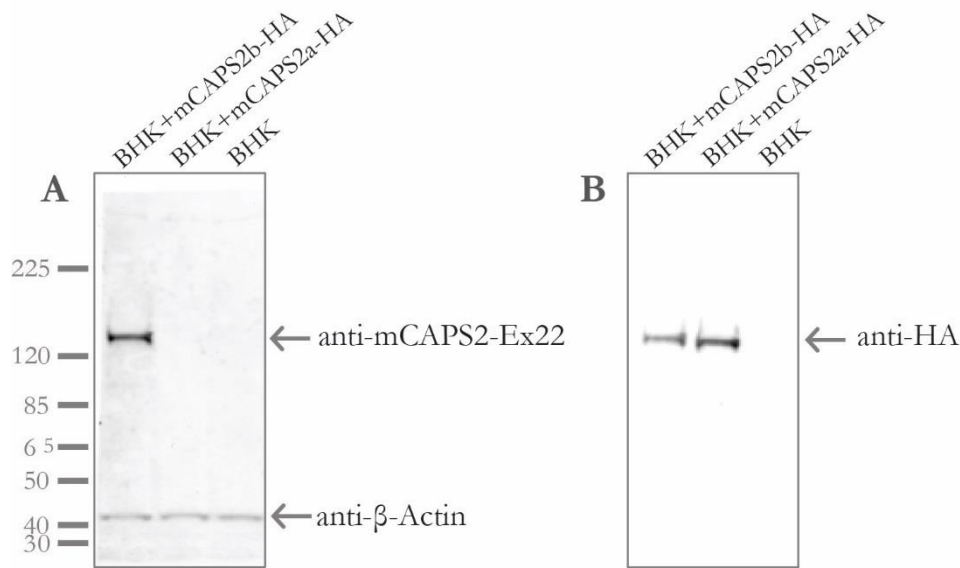


Abbildung 28: CAPS2_Ex22-Antikörper ist spezifisch für CAPS2b. A) Western Blot zur Detektion von mCAPS2b mit dem anti-mCAPS2_Exon 22-Antikörper. Als Ladekontrolle diente β -Actin. B) Detektion von mCAPS2a-HA und mCAPS2b-HA durch den anti-HA-Antikörper.

Der anti-mCAPS2-Exon 22-Antikörper detektiert eine Bande oberhalb von 120 kDa. Auf dieser Höhe wurde mCAPS2b erwartet. Das exprimierte mCAPS2a wurde nicht vom gleichen Antikörper erkannt (Abb. 28A). Die Expression sowohl von mCAPS2a, als auch mCAPS2b konnte mit dem anti-HA nachgewiesen werden (Abb. 28B). Der Antikörper gegen mCAPS2_Ex22 detektiert somit spezifisch mCAPS2b. Als Ladekontrolle diente β -Actin und zeigte, dass alle Proben vergleichbare Mengen an Protein (β -Actin) enthielten. Es wurden die Immunsereen 6 bis 12 ausgetestet mit dem Ergebnis, dass das Serum 9 das beste Signal-Hintergrund-Verhältnis hatte (Daten nicht gezeigt) und deshalb für alle Folgeexperimente benutzt wurde.

4.6.3. Nachweis der Expression von mCAPS2b

Nach der Bestätigung der Spezifität des Antikörpers (4.6.2.) wurde die endogene Expression von mCAPS2b untersucht. Da CAPS gewebe- und entwicklungspezifisch exprimiert wird, wurden aus verschiedenen Geweben in unterschiedlichen Entwicklungsstadien Proteinlysate hergestellt. Für einen Western Blot wurden pro Probe jeweils 30 μ g Protein aufgetragen. In Lysaten war in isolierten Chromaffinzellen (CC), ganze Nebennieren (AG) und im Cerebellum aus embryonalem Stadium (E19) keine mCAPS2b-Expression nachweisbar (Abb. 29). Als Negativkontrolle wurden Proben aus CAPS2- und DKO-Lysaten aufgetragen. In beiden Fällen war eine mCAPS2b-Detektion

nicht nachweisbar. Als nächstes wurde die Expression von mCAPS2 im Cerebellum aus verschiedenen Entwicklungsstadien (E19 bis adult) untersucht. Erst ab einem Alter von 14 Tagen (P14) konnte im Cerebellum von WT-Tieren die Expression des mCAPS2_Ex22 detektiert werden. Auf den Western Blots (s. Abb. 29) waren mehrere Banden zu erkennen. Die oberste Bande läuft auf der gleichen Höhe wie das exprimierte mCAPS2b in Lysaten aus BHK-Zellen (s. 4.6.2.). Die Bande darunter könnten andere Spleißvarianten sein, die auch das Exon 22 enthalten, Abbauprodukte von mCAPS2b oder es könnte eine unspezifische Bindung des Antikörpers sein.

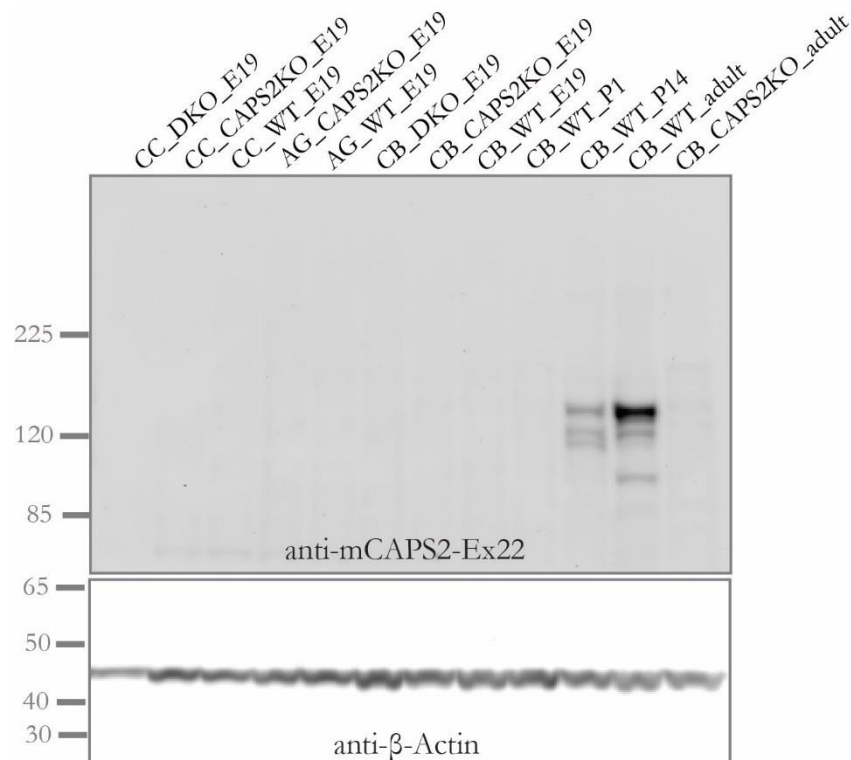


Abbildung 29: Endogene Expression von mCAPS2b im Gewebe. Nachweis der Expression von mCAPS2b in Chromaffinzellen (CC), Nebennieren (AG) und Cerebellum (CB) mit dem Western Blot-Verfahren. Untersucht wurden Gewebe in unterschiedlichen Entwicklungsstadien von E19 (embryonal), über P1 und P14 (1 und 14 Tage nach der Geburt) bis zum adulten Stadium. Als Ladekontrolle diente β -Actin.

Als Negativkontrolle zur mCAPS2b-Expression im Cerebellum aus adulter WT-Maus wurde ein Lysat des Cerebellums aus adulter CAPS2-KO-Maus benutzt. Sie zeigte mit dem anti-mCAPS2-Ex22-Antikörper kein Signal. Es ist bekannt, dass im Cerebellum auch mCAPS1 exprimiert wird (Sadakata et al., 2007a; Speidel et al., 2003). In diesem Western Blot sieht man anhand der „CB_CAPS2KO_adult“-Probe, dass der Antikörper mCAPS1 nicht erkennt und somit spezifisch für mCAPS2 ist. Die Banden der β -Actin-Kontrolle

sind in allen Proben in etwa vergleichbar. Das zeigt, dass von allen Proben ungefähr die gleiche Gesamtmenge Protein aufgetragen wurde.

5. Diskussion

5.1. Exon 22 in mCAPS2 spielt eine spezifische Rolle bei der Befüllung der LDCVs mit Monoaminen

Von mCAPS2 existieren sechs natürlich vorkommende Spleißvarianten. Diese sind unterschiedlich lang und eignen sich deshalb besonders gut zur Identifikation der Funktion einzelner Regionen beziehungsweise Domänen. In entsprechenden CAPS1 und CAPS2-KO (DKO)-Mäusen lassen sich die einzelnen murinen Spleißvarianten an Zellen aus Primärkultur erforschen. Der große Vorteil davon ist, dass das murine System dem humanen sehr ähnlich ist und man im murinen System genetische Manipulationen durchführen kann. Ein DKO-Phänotyp weist in Chromaffinzellen im Vergleich zu WT-Zellen stark reduzierte Exozytose von Vesikeln und entsprechend verminderte Sekretion von Katecholaminen auf (Liu et al., 2008). Sowohl die Expression von CAPS1 als auch CAPS2 in DKO-Zellen stellt den WT-Phänotyp wieder her (Liu et al., 2008, 2010). Die Überexpression von CAPS2 führte sowohl in DKO- als auch in WT-Chromaffinzellen zur signifikanten Erhöhung des RRP (Liu et al., 2010). In vorausgegangenen Experimenten in unserem Labor wurde mCAPS2b als einzige Spleißvariante identifiziert, die nach Expression in DKO-Chromaffinzellen nach einer intrazellulären Ca^{2+} -Erhöhung durch Blitzphotolyse die Sekretion von Katecholaminen signifikant erhöhte (Ratai et al., 2018). Der einzige Unterschied zwischen den beiden Proteinen mCAPS2a und mCAPS2b ist die Anwesenheit des Exons 22 in der MUN-Domäne von mCAPS2b, welches in mCAPS2a fehlt. In dieser Arbeit wurde dieses 40 Aminosäuren kurze Prolin-reiche Exon 22 als regulierende Sequenz auf dessen regulatorische Funktion in der Befüllung von LDCVs mit Monoaminen mittels amperometrischer Auswertung spezifiziert. Das erfolgte durch die Expression der beiden natürlich vorkommenden Spleißvarianten mCAPS2a und mCAPS2b in DKO-Chromaffinzellen. Durch die Auswertung der amperometrischen Ausschläge, die eine quantitative Menge der freigelassenen Monoamine wiedergaben, ließen sich zwei wichtige Schlüsse ziehen. Zum einen konnte mithilfe der Spike-Frequenz gezeigt werden, dass nach der Überexpression von mCAPS2b, im Vergleich zur Überexpression von mCAPS2a und den unbehandelten DKO-Kontrollzellen, deutlich

mehr amperometrische Ausschläge vorhanden waren. Zum anderen wurde nur in den mCAPS2b-Zellen die Ladung pro LDCV hochsignifikant erhöht. Anhand des Quotienten aus dem Kapazitätsanstieg und der Spike-Frequenz wurde nochmal deutlich, dass mCAPS2a die Vesikel fusionieren lässt, diese jedoch weniger Signale an der Kohlefaser liefern, also die LDCVs vermutlich keine Katecholamine enthalten. Das Verhältnis des Kapazitätsanstiegs und der amperometrischen Ausschläge war bei DKO und mCAPS2b vergleichbar. Folglich erhöhten mCAPS2a und mCAPS2b die Fusion von LDCVs, unabhängig davon, ob sie mit Katecholaminen beladen waren oder nicht. In bovinen Chromaffinzellen sind 8 % der LDCVs nicht gefüllt, werden jedoch trotzdem sezerniert (Tabares et al., 2001). Diese führen nicht zu amperometrischen Ausschlägen. mCAPS2a erhöhte anscheinend die Sekretion dieser Population mit leeren Granulen (s. Verhältnis zwischen dem Kapazitätsanstieg und der Spike-Frequenz). Die Biogenese der LDCVs war nicht durch die Expression von CAPS2 beeinflusst, was an der Anzahl bzw. der Dichte der LDCVs in der elektronenmikroskopischen Auswertung von DKO-Zellen mit und ohne Expression von mCAPS2b gezeigt wurde. Zusammenfassend ließ sich durch die SSA belegen, dass mCAPS2b die Befüllung der LDCVs mit Katecholaminen erhöhte. Die Vesikel mussten jedoch nicht mit Katecholaminen gefüllt vorliegen, um in Anwesenheit von mCAPS2a oder mCAPS2b fusioniert zu werden.

Die spezifische Befüllung der LDCVs mit Monoaminen wurde zwar früher schon mit CAPS assoziiert. Der zugrundeliegende Mechanismus war allerdings ungeklärt. Es war bisher auch nicht nachgewiesen, welches Exon bzw. welche Region des CAPS-Proteins für die Regulation der Befüllung verantwortlich ist. In murinen CAPS1-KO Chromaffinzellen war die Kapazität zwar unverändert, die Frequenz der amperometrischen Ausschläge jedoch auf 40 % reduziert (Speidel et al., 2005). Das zeigt, dass CAPS1-Deletion die Fusion der Vesikel nicht beeinflusst, aber ein Teil der Gesamtpopulation der LDCVs keine Katecholamine enthält, dementsprechend leer ist. Der Phänotyp ist vergleichbar mit der mCAPS2a-Expression in DKO-Zellen. In DKO-Chromaffinzellen war im Vergleich zu WT-Zellen die Spike-Frequenz auf 35 % reduziert (Liu et al., 2008), was in etwa dem CAPS1-KO entspricht. Die anderen Spikeparameter waren unverändert. Daraus lässt sich schließen, dass in murinen Chromaffinzellen CAPS1 lediglich einen Einfluss darauf ausübt, ob ein LDCV befüllt wird oder nicht, jedoch nicht auf den Füllungsstand einzelner LDCVs. Da mCAPS2a die Befüllung der LDCVs mit Monoaminen nicht förderte, wurde

in WT-Zellen nur die Überexpression von mCAPS2b überprüft. Hier wurde keine Veränderung in der Spike-Ladung detektiert. Wie bereits oben beschrieben, ist anzunehmen, dass CAPS1 im Embryonalstadium diese Funktion übernimmt.

Die Paraloge CAPS1 und CAPS2 sind zu 80 % homolog (Speidel et al., 2005). Beide Proteine sind fähig, in Neuronen und murinen Chromaffinzellen Granulen in den Priming-Status zu bringen (Jockusch et al., 2007; Liu et al., 2008, 2010; Speidel et al., 2005). Deshalb ist zu erwarten, dass sie gleiche oder ähnliche Aufgaben während der regulierten Exozytose erfüllen. Von CAPS1 gibt es, laut der Datenbank Ensembl, vier Spleißvarianten (Zerbino et al., 2018). Alle enthalten die vier Domänen DID, C2, PH und MUN und sind etwa gleich lang. Alle murinen CAPS1-Spleißvarianten enthalten die Sequenz des mCAPS2-Exon 22, wobei diese Sequenz in CAPS1 um neun Aminosäuren länger ist. Das Exon 22 von mCAPS2 besitzt acht Proline, die homologe Sequenz in mCAPS1 beinhaltet neun. Proline können die Funktion als Helixbrecher haben und prolinreiche Sequenzen legen eine ungeordnete Struktur nahe. Das Exon 22 könnte entweder als eine eigenständige Proteindomäne mit anderen Proteinen interagieren, eine Interaktion mit anderen Proteinen verstärken bzw. ändern, oder Einfluss auf die eigene Proteinstruktur in der MUN-Domäne oder auf anderen Domänen im CAPS-Protein nehmen. Die fünf bekannten Spleißvarianten in *C. elegans* besitzen kein Exon 22. Es könnte eine Erklärung dafür sein, dass bisher kein Befund in Vesikel-Beladung in diesem Organismus detektiert werden konnte (Hammarlund et al., 2008; Lin et al., 2010; Speese et al., 2007) und dieser modulatorische Effekt erst später in der Evolution bei komplexeren Organismen hinzugefügt wurde. Die Überexpression der beiden CAPS-Isoformen wirkt sich unterschiedlich auf die Regulation der einzelnen Vesikel-Pools aus. CAPS2 erhöht hauptsächlich den RRP und CAPS1 alle Vesikel-Pools (Liu et al., 2010). Das lässt darauf schließen, dass beide CAPS-Proteine eventuell unterschiedliche Funktionen in der Zelle übernehmen oder von verschiedenen Mechanismen gesteuert werden.

5.2. mCAPS2b verlangsamt die Fusion der LDCVs in der Ca²⁺-abhängigen Exozytose

Die in Abb. 8 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass mCAPS2a und mCAP2b nach Überexpression in DKO-Chromaffinzellen etwa gleich stark den Kapazitätsanstieg der

Zellen in der Ganzzelleableitung nach einer dreiminütigen Stimulation mit $6 \mu\text{M Ca}^{2+}$ in der Intrazellulärlösung erhöhen. Der etwas höhere Anstieg nach Expression von mCAPS2b war im Vergleich zu dem nach Expression von mCAPS2a nicht signifikant. Beide Proteine steigern die Fusion der LDCVs mit der Plasmamembran in gleichem Maße. Somit haben die beiden untersuchten Spleißvarianten denselben Einfluss auf die Ca^{2+} -abhängige Exozytose beziehungsweise die Fusion der Vesikel. Dieses Ergebnis deckt sich mit den bereits publizierten Daten (Nguyen Truong et al., 2014), in denen gezeigt wurde, dass in Blitzphotolyse-Experimenten kein Unterschied im Kapazitätsanstieg nach der Überexpression von mCAPS2a und mCAPS2b in DKO-Zellen detektiert werden konnte. Bei der Auswertung der amperometrischen Spikeparameter wurde an der längeren Anstiegszeit deutlich, dass die Fusion der LDCVs nach der mCAPS2b-Expression sowohl in DKO- als auch in WT-Chromaffinzellen verlangsamt war. Daraus lässt sich schließen, dass in Anwesenheit von mCAPS2b die Dauer der Porenöffnung beziehungsweise der Verschmelzung der LDCV-Membran mit der Plasmamembran länger andauerte. Die Überexpression von mCAPS2a in DKO-Zellen wies keine Veränderung zu den DKO-Kontrollen auf. Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit bisher publizierten Arbeiten, die zeigen, dass im Embryonalstadium zwischen CAPS1-KO (Speidel et al., 2005), und DKO (Liu et al., 2008) kein Unterschied weder in Spike-Breite, noch in der Anstiegszeit besteht. In CAPS1-KO-Chromaffinzellen waren die amperometrischen Ausschläge zwar breiter, aber der Unterschied zu WT-Kontrollzellen war nicht signifikant. CAPS2-KO wurde bisher noch nicht an murinen Chromaffinzellen untersucht. Das weist darauf hin, dass die verlangsamte Fusion nicht durch CAPS1, sondern durch CAPS2 reguliert wird. Inwiefern mCAPS2b eine stabilisierende Wirkung auf die Fusionspore hat, ist bisher nicht bekannt. Die Verzögerung ist nicht durch den Füllungsstand der LDCVs mit Monoaminen zu erklären, da die Ladung der LDCVs in WT-Zellen nach mCAPS2b-Überexpression nicht verändert war.

CAPS wurde vor allem mit der Exozytose von LDCVs assoziiert (Berwin et al., 1998; Speese et al., 2007). Die Isoform CAPS1 zeigte in Neuronen eine Überlappung mit Markern für synaptische Vesikel (Farina et al., 2015). Für die Primingfunktion von CAPS2 ist die PH-Domäne wichtig (Nguyen Truong et al., 2014). Diese geht Interaktionen mit Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphaten (PI(4,5)P₂) ein (Kabachinski et al., 2014), die sowohl in der Membran der LDCVs, als auch in der Plasmamembran zu finden sind.

Phosphatidylinositolphosphate wurden in EM-Studien in der Nähe von chromaffinen Granulen lokalisiert (Umbrecht-Jenck et al., 2010). Vor allem von CAPS und dem plasmamembranständigen PI(4,5)P2 konnte eine Interaktion nachgewiesen werden (Kabachinski et al., 2014). In Proteininteraktionsstudien (Betz et al., 1997) wurde die Interaktion zwischen dem Exon 21 und dem SNARE-Komplexprotein Syntaxin1 identifiziert. Diese Bindung wurde als Exon 22-unspezifisch definiert. Es wäre jedoch möglich, dass sich das Exon 22 in mCAPS2b an andere Proteine, die an der LDCV-Fusion beteiligt sind, bindet und dadurch die Fusionskinetik verlangsamt. Die MHD-Domäne von CAPS geht mit SNARE-Proteinen Interaktionen ein und ist dadurch in das Priming involviert (Daily et al., 2010; James et al., 2009, 2010; Kabachinski et al., 2014; Khodthong et al., 2011). Die Regulation des Primings könnte Einfluss auf die Porenbildung zwischen Plasma- und Vesikelmembran und somit auf die Fusionskinetik haben. Eine Überexpression von mCAPS2 in WT-Chromaffinzellen erhöhte den RRP (Liu et al., 2010). Das zeigt, dass CAPS2 einen stabilisierenden Effekt auf den RRP hat. Da CAPS und Munc13 Homologien in dieser Domäne aufweisen, sind sie möglicherweise im gleichen molekularen Primingprozess aktiv (Jockusch et al., 2007; Richmond et al., 2001; Zhou et al., 2013). Die beiden Proteine unterscheiden sich in der Bindung an Syntaxin1 (Parsaud et al., 2013) und besitzen verschiedene Aktivitäten in unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen. CAPS und Munc13 agieren demnach in ähnlichen Prozessen, jedoch unter verschiedenen Bedingungen. Es ist auch nicht auszuschließen, dass CAPS und Munc13 zusammen interagieren. Ein Beleg dafür ist eine gesteigerte Sekretion nach der Überexpression von Munc13 in WT-Chromaffinzellen, wobei die Sekretion nach der Munc13-Überexpression in CAPS1-KO-Zellen konstant bleibt (Liu et al., 2010).

Ein weiterer Grund für die veränderte Fusionskinetik könnte eine morphologische Veränderung der LDCVs sein. Dazu wurde an elektronenmikroskopischen Aufnahmen die Morphologie zwischen DKO-Zellen mit und ohne Expression von mCAPS2b verglichen. Als Kontrolle dienten DKO-Zellen nach einer Überexpression von eGFP und WT-Zellen. Von allen vier Gruppen, die mittels Elektronenmikroskopie untersucht wurden, war die analysierte Fläche sowohl vom gesamten Zellschnitt, als auch vom alleinigen Zytoplasma (ohne den Zellkern) ähnlich groß. Die Größe der Zellen hat sich also nicht in Abhängigkeit von der Virusbehandlung verändert. Auch die Dichte, also die Anzahl der LDCVs, bezogen auf die Fläche vom Zytoplasma, war in allen Gruppen ähnlich. Das bedeutet, dass

weder der CAPS-KO, noch die Überexpression des mCAPS2b-Proteins oder die Behandlung mit dem pSFV1-Virus einen Einfluss auf die Biosynthese der LDCVs hatten. Bei der Verteilung waren nach der eGFP-Überexpression weniger Granulen in der Nähe der ersten 150 nm zur Plasmamembran lokalisiert, jedoch nicht signifikant. Dieser Unterschied könnte ein Artefakt sein, denn das hier verwendete Konstrukt zur Expression von eGFP enthielt im Gegensatz zu mCAPS2a und mCAPS2b kein IRES und wurde dadurch stärker exprimiert. Dazu kommt, dass hier nur zwölf Zellen aus zwei biologischen Präparaten ausgewertet wurden und es wegen der stärkeren Abweichung als eine biologische Variabilität eingestuft wurde.

DKO-Chromaffinzellen weisen im Vergleich zu WT-Zellen eine reduzierte Sekretion von Katecholaminen auf. Die Spikeparameter waren jedoch unverändert (Liu et al., 2008). Eine Überexpression von mCAPS2b in DKO-Zellen bewirkte eine Verringerung des LDCV-Radius. Der Radius von den LDCVs war in WT, DKO und DKO nach Expression von eGFP stets gleich. Das bedeutet, dass die LDCV-Größe von mCAPS2b und nicht von der Virusbehandlung reguliert wurde. Elektromikroskopische Aufnahmen zeigten keinen Unterschied zwischen CAPS2-KO und WT in Neuronen (Jockusch et al., 2007). Auch zwischen DKO- (Liu et al., 2008, 2010) und CAPS1-KO-Chromaffinzellen (Speidel et al., 2005) konnte kein morphologischer Unterschied im Vergleich zu WT ausgemacht werden. In dieser Arbeit waren die LDCVs in DKO und WT ebenfalls gleich groß. Da die Spleißvariante mCAPS2b diesen Effekt hervorruft, könnte es sein, dass kein endogenes mCAPS2b im WT im Embryonalstadium vorliegt. Auch die mRNA für mCAPS2b konnte erst postnatal nachgewiesen werden (Nguyen Truong et al., 2014).

Die Granulen direkt an der Plasmamembran sind gedockt (de Wit, 2010) und bereit zu fusionieren. Diese sind mit ca. 50-55 nm Radius (0-100 nm) um etwa 10 % kleiner als die weiter entfernten LDCVs (>100 nm). In Anwesenheit von mCAPS2b blieben die LDCVs durchgängig um etwa 10 % kleiner, unabhängig von der Entfernung zur Plasmamembran, als in den anderen Gruppen. Zum ersten Mal wurde eine einzelne Spleißvariante von CAPS2 identifiziert, die einen Einfluss auf die Morphologie von LDCVs hat. In vorherigen Studien wurde gezeigt, dass die amperometrischen Ausschläge proportional zum Kapazitätsanstieg der Fusion einzelner Vesikel sind (Finnegan et al., 1996; Gong et al., 2003). Deshalb wurde erwartet, dass die Größe der LDCVs proportional zu deren Ladung ist. Die LDCVs sind jedoch nach mCAPS2b-Expression in DKO-Chromaffinzellen kleiner

und enthalten mehr Katecholamine. Warum die LDCVs nach Expression von mCAPS2b kleiner sind, ist unbekannt. Ein CAPS-KO verursacht keine Änderung in der Expression vom LDCV-ständigen Chromogranin A oder den vesikelmembranständigen VMAT und vATPase (Brunk et al., 2009; Speidel et al., 2005). Eine mögliche Erklärung für das Schrumpfen der LDCVs wäre eine Veränderung in der Osmolarität im granulären Lumen. Da die Messung der Chloridkonzentration im LDCV-Lumen durch ClopHensorN(Q69M) wegen der Fluoreszenzstabilität des tdTomato nicht möglich war, bleibt die Frage offen, ob durch den CAPS-KO die Osmolarität des LDCV-Lumens verändert wird und dieser somit einen direkten Einfluss auf das Volumen der LDCVs hat. Es wurde gezeigt, dass je kleiner der Radius der Granulen ist, desto langsamer die Fusion mit der Plasmamembran erfolgte (Bao et al., 2016). Das hängt mit einer höheren Oberflächenspannung von kleineren Vesikeln zusammen, sodass mehr Kraft für die Porenbildung und die Verschmelzung mit der Membran erforderlich ist. Die kleinere LDCVs könnten somit die in 5.1. beschriebene verlangsamte Fusion nach mCAPS2b-Expression erklären.

5.3. Deletion von CAPS verändert nicht den pH in LDCVs

Als ein möglicher Grund für die kleineren LDCVs nach der Überexpression von CAPS2b wurde eine Veränderung in der Osmolarität im Lumen der Granulen vermutet. Zusätzlich war es das Ziel den granulären pH zu bestimmen, da die Befüllung der LDCVs mit Katecholaminen durch den VMAT unter Ausnutzung des Protonengradienten erfolgt. Das Konstrukt pMax_NPY-ClopHensorN(Q69M) sollte als ratiometrischer Farbstoff zur Bestimmung vom pH-Wert und der Chloridkonzentration innerhalb der LDCVs dienen. Dessen richtige Lokalisation wurde mit Hilfe der Co-Färbung mit dem ebenfalls LDCV-ständigen anti-Chromogranin A (Kabachinski et al., 2016) an fixierten Chromaffinzellen durch den Koeffizienten nach Person von 0,8 bestätigt. Nach Maenders war die Korrelation von Chromogranin A mit dem ClopHensorN(Q69M) niedriger als umgekehrt. Das zeigte, dass fast alle Vesikel Chromogranin A besaßen, doch nur in den nach der Elektroporation neu gebildeten LDCVs das ClopHensorN(Q69M) enthalten war. Die Stabilität des Sensors wurde durch fünf aufeinanderfolgende Schritte untersucht. Die beiden Signale des E²GFP nach der Emission mit 488 nm und 458 nm wurden zwar stärker, aber der Quotient dieser beiden blieb in etwa konstant. Die stetige Erhöhung der

Einzelsignale könnte dadurch erklärt werden, dass sowohl die aufgenommenen lebenden Zellen selbst, als auch die darin enthaltenen Kompartimente in Bewegung waren. Da der Quotient $E_{488\text{ nm}}/E_{458\text{ nm}}$ stabil blieb, wurde hiermit bestätigt, dass sich dieser Sensor für die pH-Bestimmung in lebenden Zellen am LSM eignet. Das Signal von tdTomato (561 nm) nahm innerhalb der fünf Aufnahmen stetig ab, sodass weniger als die Hälfte vom Ursprungssignal bei der fünften Aufnahme gemessen werden konnte. Da das E²GFP und tdTomato als ein Fusionskonstrukt vorlagen, sollten sich die Signalintensitäten aller drei Anregungswellenlängen trotz Mobilität der lebenden Zellen gleich verhalten. Das bedeutet, dass wenn sich ein LDCV aus dem Fokus entfernt, die Emissionsstärke sowohl von E²GFP, als auch von tdTomato in gleichem Verhältnis abnehmen sollten. In diesem Experiment wurde deutlich, dass trotz dem leicht zunehmenden Fluoreszenzsignal von E²GFP, die Fluoreszenzintensität von tdTomato stetig sehr stark abnahm. TdTomato weißte somit eine sehr starke Instabilität auf, sodass es nicht verlässlich zur granulären Bestimmung der Chloridkonzentration eingesetzt werden konnte. Auch die in der Primärliteratur (Arosio et al., 2010) angegebene Chloridbestimmung zeigte, dass der Farbstoff zur Chloridbestimmung sowohl bei der zytosolischen Kalibrierung, als auch bei der granulären Konzentrationsbestimmung große Variabilität aufwies.

Es wurde eine drei-minütige Äquilibrierungszeit ermittelt, um den pH in den LDCVs dem pH der pH-Kalibrierungslösung durch die enthaltenen Ionophore anzupassen. Zur Erstellung der pH-Kalibrierungskurve wurde sicherheitshalber eine längere Äquilibrierungszeit von 5 Minuten gewählt, um eine vollständige pH-Anpassung zu gewährleisten. In ratiometrischen Experimenten mit NPY-ClophensorN(Q69M) wurde in LDCVs von DKO- und WT-Chromaffinzellen ein gleicher granulärer pH-Wert von 6,2 ermittelt. Die erhöhte Standardabweichung von 0,4 kommt wahrscheinlich durch die Mobilität der LDCVs zustande, da alle Kanäle separat nacheinander aufgenommen wurden. An der Gauß-Verteilung der einzelnen Werte sieht man deutlich, dass sich die Maxima beider Genotypen überlagern, wobei es innerhalb der Messungen in den WT-Chromaffinzellen mehr Varianz gab. Obwohl hinsichtlich des lumenalen pHs in den LDCVs zwischen WT- und DKO-Chromaffinzellen kein Unterschied festgestellt werden konnte, war der pH-Wert höher als erwartet und bisher publiziert (Henry et al., 1998; Johnson, 1988). Um diesen ermittelten pH-Wert zu überprüfen, wurde ein weiteres Experiment mit WT-Chromaffinzellen durchgeführt, bei dem nach der pH-Messung eine anschließende pH-

Kalibrierung an derselben Zelle folgte. Es wurde wieder ein granulärer pH-Wert im Bereich zwischen pH6 und pH7 bestätigt. Der in diesem Experiment ermittelte pH-Wert ist mit 6,4 um 0,2 Einheiten höher als zuvor bestimmt (s. Abb. 20). Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass hier die Zellen mittig und nicht wie vorher in räumlicher Nähe zur Plasmamembran aufgenommen wurden. Dadurch könnten punktuelle Strukturen mit ausgewertet worden sein, die zum Golgi gehören, oder es wurden noch nicht fertig gereifte LDCVs aufgenommen, deren Lumen noch nicht vollständig azidifiziert wurde.

Der mit dem ClopHensorN bestimmte pH-Wert in LDCVs von PC12-Zellen lag bei $5,6 \pm 0,5$ (Arosio et al., 2010). Hierbei wurde die pH-Kalibrierung zytosolisch durchgeführt. Der Quotient der Emissionswerte von E²GFP ($E_{488 \text{ nm}}/E_{458 \text{ nm}}$) der von uns erstellten pH-Kalibrierungskurve mit einem zytosolischem ClopHensorN(Q69M) waren bei jeder pH-Kalibrierungslösung um jeweils zwei Einheiten erhöht (Daten nicht gezeigt). Es ist nicht auszuschließen, dass der pH-Sensor durch die Bestandteile des Lumens in seinen spektralen Eigenschaften beeinflusst werden könnte. Da es das Ziel war den pH in LDCVs von WT und DKO-Zellen zu ermitteln, wurde in dieser Arbeit eine granuläre Kalibrierung als besser geeignet betrachtet.

Bei der Überprüfung der Azidifizierung der LDCVs in WT-Zellen zu den Zeitpunkten von 8, 24 und 48 Stunden nach der Zellpräparation und Elektroporation des pH-Sensors wurde über die drei Zeitpunkte konstant eine steigende Ansäuerung des LDCV-Lumens detektiert (Abb. 18). Es ist schwer einzuschätzen, ob die Ansäuerung abgeschlossen wurde, da die pH-Mittelwerte stetig und in gleichem Maße abnahmen. Es wären weitere Messzeitpunkte (z. B. drei und vier Tage nach der Elektroporation) notwendig, um eine vollständige Azidifizierung in Form einer pH-Basislinie zu bestimmen. Es kann sein, dass nach 48 Stunden der pH in den LDCVs noch nicht vollständig angepasst wurde. Da die Amperometriedaten (SSA) ebenfalls am Tag zwei in Kultur erstellt wurden und sich die pH-Werte zwischen DKO und WT nicht unterschieden, ist davon auszugehen, dass die Azidifizierung der LDCVs zwischen den DKO- und WT-Zellen ähnlich erfolgte.

Ein interessantes Experiment wäre die Untersuchung des pHs in den LDCVs in DKO-Chromaffinzellen nach Überexpression von mCAPS2b. Mit dem hier eingesetzten ClopHensor(Q69M) war es nicht möglich, da das in dieser Arbeit zur CAPS-Expression verwendete pSFV1-mCAPS2b-IRES-eGFP-Konstrukt sich mit dem pH-sensitiven E²GFP im ClopHensorN(Q69M) spektral überschneidet. Der pKa-Wert des hier benutzten

ClophensorN(Q69M) lag bei 7,1. Der bestimmte pH-Wert von 6,2 lag gerade noch im detektierbaren Bereich der Kalibrierungskurve.

Der VMAT agiert protonenabhängig. Der Protonenimport in die Granulen wird unter anderem durch Chloridionen reguliert (Johnson, 1988; Maycox et al., 1990). Es gibt in SV drei Arten von Protonenaustauschern: VATPase, Chlorid-Protonen-Austauscher (Friedrich et al., 1999; Stobrawa et al., 2001) und Kationen-Protonen-Austauscher (Preobraschenski et al., 2014). Da der pH in den LDCVs in CAPS-KO unverändert ist, liegt es nahe, dass die Chloridkonzentration im CAPS-KO verändert sein könnte. Eine Deletion des Cloridaustauschtransporters CIC3 führt zur reduzierten Exozytose in Chromaffinzellen (Maritzen et al., 2008). Das könnte wegen der Osmolaritätsveränderung auch ein Grund für die kleineren LDCVs sein (siehe oben). Wegen des starken Ausbleichens des tdTomato konnte jedoch keine Cloridkonzentration in den LDCVs bestimmt werden.

5.4. Suche nach Proteininteraktionspartnern von CAPS2b für die Befüllung von LDCVs

Die Befüllung der LDCVs mit Monoaminen erfolgt durch den VMAT unter Nutzung des Protonengradienten. Ob mCAPS2b die Funktion des VMAT steigert, wurde an CHO-Zellen untersucht. Diese exprimieren stabil VMAT1. Dabei wurde die Serotonin-Aufnahme-Fähigkeit in Anwesenheit von mCAPS2a, mCAPS2b und einem eGFP-Leervektor untersucht. Nur mCAPS2b war in der Lage die Serotoninaufnahme zu erhöhen, die Expression von mCAPS2a bewirkte keine Veränderung der Serotoninaufnahme im Vergleich zur eGFP-Kontrolle. In bisherigen Arbeiten wurde bereits der fördernde Effekt sowohl von CAPS1, als auch von CAPS2 auf VMAT1 und VMAT2 dokumentiert (Brunk et al., 2009). In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal das Exon 22 identifiziert, das sich spezifisch auf die Funktion des VMAT auswirkt. Eine Möglichkeit der Regulation des VMATs könnte eine Interaktion von CAPS2b entweder direkt mit VMAT oder mit einem der G-Proteine sein.

Um mögliche Interaktionspartner des mCAPS2-Exon 22 zu identifizieren, wurden diese mittels dem Hefe-Zwei-Hybrid-System gesucht. Die neu klonierten Konstrukte mCAPS2a_MUN und CAPS2b-MUN waren funktionell, was durch die Interaktion mit Syntaxin1 bewiesen wurde. Die Bibliothek wurde mit mCAPS2b acht Mal statt den

üblichen drei Mal gesichtet, um das Übersehen von möglichen Interaktionspartnern zu minimieren. Die sechs gefundenen mögliche Interaktionspartner für das mCAPS2b_MUN wirken in allgemeinen Funktionen in der Zelle, wie Apoptose und Zellzyklus. Es konnte weder in der Literatur noch Proteindatenbanken eine Verbindung dieser Proteine in der Azidifizierung oder Befüllung von Vesikeln sowie Interaktion mit synaptischen Proteinen gefunden werden. Deshalb wurden diese Treffer als falsch positive Interaktionspartner für mCAPS2_MUN eingestuft. Für mCAPS2a konnte kein einziger Interaktionspartner gefunden werden. Es ist überraschend, dass nicht mal Syntaxin1 als Interaktionspartner im Sichten der cDNA-Bibliothek für mCAPS2a_MUN oder mCAPS2b_MUN detektiert wurde, die in den Testdurchläufen eine starke Interaktion zeigten.

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System ist artifiziell. Eine potentielle Bindung soll unter anderen Bedingungen wie im üblichen System erfolgen. Zum einen wird das Protein im Hefesystem exprimiert und gefaltet. Da das daran beteiligte Proteom anders ist, als im Säugetiersystem, kann nicht gewährleistet werden, dass das finale Protein, das als Beute agieren soll, tatsächlich original gefaltet vorliegt. Weiterhin ist die einzubringende Länge des Köder-Proteins, in diesem Fall mCAPS2_MUN, begrenzt. Zu große cDNAs können nicht durch die Poren in der Nukleusmembran in den Zellkern gelangen, um dort die Transkription der Reportergene zu initiieren. Deshalb wurde hier nur die C-terminale Hälfte gewählt. Obwohl die gesamte MUN-Domäne enthalten ist und eine Interaktion mit Syntaxin1 gezeigt wurde, ist nicht sicher, ob die MUN-Domäne in ihrer vorgesehenen funktionellen Form vorliegt. Es könnte sein, dass das Exon 22 andere Domänen oder Sequenzabschnitte im N-terminalen Teil des CAPS-Proteins braucht, um eine Bindung mit anderen Proteinen einzugehen. Eine andere Möglichkeit ist, dass Exon 22 das gesamte CAPS-Protein in dessen Struktur (z.B. durch Ladungsverschiebung) verändert und ein komplett anderer Sequenzabschnitt von CAPS für die Befüllung der LDCVs befähigt wird.

Zum Finden von Proteininteraktionspartnern von mCAPS2b könnte eine Massenspektrometrie verwendet werden. Dazu könnten CHO-Zellen nach Expression von mCAPS2b-HA benutzt werden, da hier bereits eine erhöhte Serotoninaufnahme festgestellt wurde. Das CAPS2b-HA könnte aus dem CHO-Proteinlysat mit dem HA-Antikörper samt den daran gebundenen Interaktionspartnern immunopräzipitiert werden, die anschließend durch Massenspektrometrie identifiziert werden können. Als Negativkontrolle für unspezifische Bindungen bietet sich mCAPS2a-HA an.

Für zukünftige biochemische Versuche wird ein Antikörper gegen mCAPS2b nötig sein. Dazu wurde ein Antikörper neu entwickelt und hergestellt. Dieser wurde als spezifisch für das Exon 22 und als geeignet für Western Blot bestimmt. Im Embryonalstadium konnte weder in isolierten murinen Chromaffinzellen, noch in ganzen Nebennieren eine endogene Expression des mCAPS2b detektiert werden. Das deckt sich mit dem bereits publizierten Befund, dass auf mRNA-Ebene in embryonalen Chromaffinzellen nur CAPS1 und CAPS2e exprimiert wird (Nguyen Truong et al., 2014). Die Expression von CAPS2b konnte erst postnatal (P1, P10, P21) gezeigt werden. Im Cerebellum konnte dessen Expression erst ab dem Alter von P14 detektiert werden. Da die CAPS2-KO-Kontrolle aus adultem Cerebellum keine Bande auf der gleichen Höhe aufwies, bestätigte das wieder die Spezifität des Antikörpers.

Es konnte gezeigt werden, dass im Embryonalstadium in Chromaffinzellen CAPS1 (Speidel et al., 2005) und CAPS2e (Nguyen Truong et al., 2014) exprimiert werden. CAPS1 reguliert die Befüllung der LDCVs und CAPS2e deren Priming-Status. Der hormonelle Haushalt wird pränatal von der Mutter reguliert und die Embryonen kommen nie in eine Kampf- oder Flucht-Situation. Das könnte auch der Grund sein, warum in embryonalen DKO- und WT-Chromaffinzellen die Ladung einzelner LDCVs gleich ist. Eine postnatale Untersuchung von DKO-Chromaffinzellen ist unmöglich, da dieser Genotyp letal ist. Der Vergleich zwischen embryonalen DKO und postnatalen WT-Zellen ist kritisch, da das Proteom postnatal zu unterschiedlich sein könnte.

Literaturverzeichnis

- Ann, K., Kowalchuk, J.A., Loyet, K.M., and Martin, T.F.J. (1997). Novel Ca²⁺-binding Protein (CAPS) Related to UNC-31 Required for Ca²⁺-activated Exocytosis. *J. Biol. Chem.* 272, 19637–19640.
- Arosio, D., Ricci, F., Marchetti, L., Gualdani, R., Albertazzi, L., and Beltram, F. (2010). Simultaneous intracellular chloride and pH measurements using a GFP-based sensor. *Nat. Methods* 7, 516–518.
- Ashery, U., Varoqueaux, F., Voets, T., Betz, A., Thakur, P., Koch, H., Neher, E., Brose, N., and Rettig, J. (2000). Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells. *EMBO J.* 19, 3586–3596.
- Augustin, I., Rosenmund, C., Südhof, T.C., and Brose, N. (1999). Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature* 400, 457–461.
- Bao, H., Goldschen-Ohm, M., Jeggle, P., Chanda, B., Edwardson, J.M., and Chapman, E.R. (2016). Exocytotic fusion pores are composed of both lipids and proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 67–73.
- Basu, J., Shen, N., Dulubova, I., Lu, J., Guan, R., Guryev, O., Grishin, N.V., Rosenmund, C., and Rizo, J. (2005). A minimal domain responsible for Munc13 activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 1017–1018.
- Bates, B., Rios, M., Trumpp, A., Chen, C., Fan, G., Bishop, J.M., and Jaenisch, R. (1999). Neurotrophin-3 is required for proper cerebellar development. *Nat. Neurosci.* 2, 115–117.
- Berwin, B., Floor, E., and Martin, T.F.J. (1998). CAPS (Mammalian UNC-31) Protein Localizes to Membranes Involved in Dense-Core Vesicle Exocytosis. *Neuron* 21, 137–145.
- Betz, A., Okamoto, M., Benseler, F., and Brose, N. (1997). Direct Interaction of the Rat unc-13 Homologue Munc13-1 with the N Terminus of Syntaxin. *J. Biol. Chem.* 272, 2520–2526.

- Bost, A., Shaib, A.H., Schwarz, Y., Niemeyer, B.A., and Becherer, U. (2017). Large dense-core vesicle exocytosis from mouse dorsal root ganglion neurons is regulated by neuropeptide Y. *Neuroscience* *346*, 1–13.
- Brunk, I., Blex, C., Speidel, D., Brose, N., and Ahnert-Hilger, G. (2009). Ca²⁺-dependent Activator Proteins of Secretion Promote Vesicular Monoamine Uptake. *J. Biol. Chem.* *284*, 1050–1056.
- Bruns, D. (2004). Detection of transmitter release with carbon fiber electrodes. *Methods* *33*, 312–321.
- Burgess, T.L., and Kelly, R.B. (1987). Constitutive and Regulated Secretion of Proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.* *3*, 243–293.
- Burgoyne, R.D., and Morgan, A. (2003). Secretory Granule Exocytosis. *Physiol. Rev.* *83*, 581–632.
- Carmichael, S.W., and Winkler, H. (1985). The adrenal chromaffin cell. *Sci. Am.* *253*, 40–49.
- Chow, R.H., von Rüden, L., and Neher, E. (1992). Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature* *356*, 60–63.
- Daily, N.J., Boswell, K.L., James, D.J., and Martin, T.F.J. (2010). Novel Interactions of CAPS (Ca²⁺-dependent Activator Protein for Secretion) with the Three Neuronal SNARE Proteins Required for Vesicle Fusion. *J. Biol. Chem.* *285*, 35320–35329.
- Do, D.N., Strathe, A.B., Ostersen, T., Jensen, J., Mark, T., and Kadarmideen, H.N. (2013). Genome-Wide Association Study Reveals Genetic Architecture of Eating Behavior in Pigs and Its Implications for Humans Obesity by Comparative Mapping. *PLOS ONE* *8*, e71509.
- Eckenstaler, R., Lessmann, V., and Brigadski, T. (2016). CAPS1 effects on intragranular pH and regulation of BDNF release from secretory granules in hippocampal neurons. *J Cell Sci* *129*, 1378–1390.

- Erickson, J.D., Eiden, L.E., and Hoffman, B.J. (1992). Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 10993–10997.
- Erickson, J.D., Schafer, M.K., Bonner, T.I., Eiden, L.E., and Weihe, E. (1996). Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 5166.
- Farina, M., van de Bospoort, R., He, E., Persoon, C.M., van Weering, J.R., Broeke, J.H., Verhage, M., and Toonen, R.F. (2015). Correction: CAPS-1 promotes fusion competence of stationary dense-core vesicles in presynaptic terminals of mammalian neurons. *eLife* *4*, e12968.
- Fasshauer, D., Sutton, R.B., Brunger, A.T., and Jahn, R. (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*, 15781–15786.
- Fenwick, E.M., Marty, A., and Neher, E. (1982). A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J. Physiol.* *331*, 577–597.
- Finnegan, J.M., Pihel, K., Cahill, P.S., Huang, L., Zerby, S.E., Ewing, A.G., Kennedy, R.T., and Wightman, R.M. (1996). Vesicular Quantal Size Measured by Amperometry at Chromaffin, Mast, Pheochromocytoma, and Pancreatic β -Cells. *J. Neurochem.* *66*, 1914–1923.
- Friedrich, T., Breiderhoff, T., and Jentsch, T.J. (1999). Mutational Analysis Demonstrates That ClC-4 and ClC-5 Directly Mediate Plasma Membrane Currents. *J. Biol. Chem.* *274*, 896–902.
- Gong, L.-W., Hafez, I., Toledo, G.A. de, and Lindau, M. (2003). Secretory Vesicles Membrane Area Is Regulated in Tandem with Quantal Size in Chromaffin Cells. *J. Neurosci.* *23*, 7917–7921.

- Griesbeck, O., Baird, G.S., Campbell, R.E., Zacharias, D.A., and Tsien, R.Y. (2001). Reducing the Environmental Sensitivity of Yellow Fluorescent Protein MECHANISM AND APPLICATIONS. *J. Biol. Chem.* 276, 29188–29194.
- Grishanin, R.N., Klenchin, V.A., Loyet, K.M., Kowalchuk, J.A., Ann, K., and Martin, T.F.J. (2002). Membrane Association Domains in Ca²⁺-dependent Activator Protein for Secretion Mediate Plasma Membrane and Dense-core Vesicle Binding Required for Ca²⁺-dependent Exocytosis. *J. Biol. Chem.* 277, 22025–22034.
- Grishanin, R.N., Kowalchuk, J.A., Klenchin, V.A., Ann, K., Earles, C.A., Chapman, E.R., Gerona, R.R.L., and Martin, T.F.J. (2004). CAPS Acts at a Prefusion Step in Dense-Core Vesicle Exocytosis as a PIP₂ Binding Protein. *Neuron* 43, 551–562.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391, 85–100.
- Hammarlund, M., Watanabe, S., Schuske, K., and Jorgensen, E.M. (2008). CAPS and syntaxin dock dense core vesicles to the plasma membrane in neurons. *J. Cell Biol.* 180, 483–491.
- Hanson, P.I., Heuser, J.E., and Jahn, R. (1997). Neurotransmitter release — four years of SNARE complexes. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 310–315.
- Hansson, S.R., Mezey, E., and Hoffman, B.J. (1998). Ontogeny of vesicular monoamine transporter mRNAs VMAT1 and VMAT2. II. Expression in neural crest derivatives and their target sites in the rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 110, 159–174.
- Hattori, K., Tanaka, H., Wakabayashi, C., Yamamoto, N., Uchiyama, H., Teraishi, T., Hori, H., Arima, K., and Kunugi, H. (2011). Expression of Ca²⁺-dependent activator protein for secretion 2 is increased in the brains of schizophrenic patients. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35, 1738–1743.
- Heinemann, C., Rüdén, L. von, Chow, R.H., and Neher, E. (1993). A two-step model of secretion control in neuroendocrine cells. *Pflüg. Arch.* 424, 105–112.

- Henry, J.-P., Sagné, C., Bedet, C., and Gasnier, B. (1998). The vesicular monoamine transporter: from chromaffin granule to brain. *Neurochem. Int.* *32*, 227–246.
- James, D.J., Kowalchyk, J., Daily, N., Petrie, M., and Martin, T.F.J. (2009). CAPS drives trans-SNARE complex formation and membrane fusion through syntaxin interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 17308–17313.
- James, D.J., Khodthong, C., Kowalchyk, J.A., and Martin, T.F.J. (2010). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulation of SNARE function in membrane fusion mediated by CAPS. *Adv. Enzyme Regul.* *50*, 62–70.
- Jockusch, W.J., Speidel, D., Sigler, A., Sørensen, J.B., Varoqueaux, F., Rhee, J.-S., and Brose, N. (2007). CAPS-1 and CAPS-2 Are Essential Synaptic Vesicle Priming Proteins. *Cell* *131*, 796–808.
- Johnson, R.G. (1988). Accumulation of biological amines into chromaffin granules: a model for hormone and neurotransmitter transport. *Physiol. Rev.* *68*, 232–307.
- Kabachinski, G., Yamaga, M., Kielar-Grevstad, D.M., Bruinsma, S., and Martin, T.F.J. (2014). CAPS and Munc13 utilize distinct PIP2-linked mechanisms to promote vesicle exocytosis. *Mol. Biol. Cell* *25*, 508–521.
- Kang, L., He, Z., Xu, P., Fan, J., Betz, A., Brose, N., and Xu, T. (2006). Munc13-1 is required for the sustained release of insulin from pancreatic β cells. *Cell Metab.* *3*, 463–468.
- Khodthong, C., Kabachinski, G., James, D.J., and Martin, T.F.J. (2011). Munc13 Homology Domain-1 in CAPS/UNC31 Mediates SNARE Binding Required for Priming Vesicle Exocytosis. *Cell Metab.* *14*, 254–263.
- Lin, X.-G., Ming, M., Chen, M.-R., Niu, W.-P., Zhang, Y.-D., Liu, B., Jiu, Y.-M., Yu, J.-W., Xu, T., and Wu, Z.-X. (2010). UNC-31/CAPS docks and primes dense core vesicles in *C. elegans* neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *397*, 526–531.
- Lindau, M., and Neher, E. (1988). Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells. *Pflugers Arch.* *411*, 137–146.

- Liu, Y., Schirra, C., Stevens, D.R., Matti, U., Speidel, D., Hof, D., Bruns, D., Brose, N., and Rettig, J. (2008). CAPS Facilitates Filling of the Rapidly Releasable Pool of Large Dense-Core Vesicles. *J. Neurosci.* *28*, 5594–5601.
- Liu, Y., Schirra, C., Edelmann, L., Matti, U., Rhee, J., Hof, D., Bruns, D., Brose, N., Rieger, H., Stevens, D.R., et al. (2010). Two distinct secretory vesicle–priming steps in adrenal chromaffin cells. *J. Cell Biol.* *190*, 1067–1077.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* *193*, 265–275.
- Machado, J.D., Díaz-Vera, J., Domínguez, N., Álvarez, C.M., Pardo, M.R., and Borges, R. (2010). Chromogranins A and B as Regulators of Vesicle Cargo and Exocytosis. *Cell. Mol. Neurobiol.* *30*, 1181–1187.
- Man, K.N.M., Imig, C., Walter, A.M., Pinheiro, P.S., Stevens, D.R., Rettig, J., Sørensen, J.B., Cooper, B.H., Brose, N., and Wojcik, S.M. (2015). Identification of a Munc13-sensitive step in chromaffin cell large dense-core vesicle exocytosis. *eLife* *4*, e10635.
- Maritzen, T., Keating, D.J., Neagoe, I., Zdebik, A.A., and Jentsch, T.J. (2008). Role of the Vesicular Chloride Transporter CIC-3 in Neuroendocrine Tissue. *J. Neurosci.* *28*, 10587–10598.
- Marshansky, V., and Futai, M. (2008). The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* *20*, 415–426.
- Matti, U., Pattu, V., Halimani, M., Schirra, C., Krause, E., Liu, Y., Weins, L., Fang Chang, H., Guzman, R., Olausson, J., et al. (2013). Synaptobrevin2 is the v-SNARE required for cytotoxic T-lymphocyte lytic granule fusion. *Nat. Commun.* *4*, 1439.
- Maycox, P.R., Hell, J.W., and Jahn, R. (1990). Amino acid neurotransmission: spotlight on synaptic vesicles. *Trends Neurosci.* *13*, 83–87.
- Neher, E., and Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* *260*, 799–802.

- Nguyen Truong, C.Q., Nestvogel, D., Ratai, O., Schirra, C., Stevens, D.R., Brose, N., Rhee, J., and Rettig, J. (2014). Secretory Vesicle Priming by CAPS Is Independent of Its SNARE-Binding MUN Domain. *Cell Rep.* *9*, 902–909.
- Nojiri, M., Loyet, K.M., Klenchin, V.A., Kabachinski, G., and Martin, T.F.J. (2009). CAPS Activity in Priming Vesicle Exocytosis Requires CK2 Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* *284*, 18707–18714.
- Pahner, I., Hölting, M., Winter, S., Nürnberg, B., Ottersen, O.P., and Ahnert-Hilger, G. (2002). Subunit composition and functional properties of G-protein heterotrimers on rat chromaffin granules. *Eur. J. Cell Biol.* *81*, 449–456.
- Lesch, K., Gross, J., Wolozin, B., Murphy, D., and Riederer, P. (1993). Extensive sequence divergence between the human and rat brain vesicular monoamine transporter: Possible molecular basis for species differences in the susceptibility to MPP+. *J. Neural Transm. Gen. Sect.* *93*, 75–82.
- Parsaud, L., Li, L., Jung, C.H., Park, S., Saw, N.M.N., Park, S., Kim, M.Y., and Sugita, S. (2013). Calcium-dependent Activator Protein for Secretion 1 (CAPS1) Binds to Syntaxin-1 in a Distinct Mode from Munc13-1. *J. Biol. Chem.* *288*, 23050–23063.
- Peter, D., Liu, Y., Sternini, C., Giorgio, R. de, Brecha, N., and Edwards, R.H. (1995). Differential expression of two vesicular monoamine transporters. *J. Neurosci.* *15*, 6179–6188.
- Potter, W.P.D., Partoens, P., Schoups, A., Llona, I., and Coen, E.P. (1997). Noradrenergic neurons release both noradrenaline and neuropeptide Y from a single pool: The large dense cored vesicles. *Synapse* *25*, 44–55.
- Preobraschenski, J., Zander, J.-F., Suzuki, T., Ahnert-Hilger, G., and Jahn, R. (2014). Vesicular Glutamate Transporters Use Flexible Anion and Cation Binding Sites for Efficient Accumulation of Neurotransmitter. *Neuron* *84*, 1287–1301.
- Ratai, O., Schirra, C., Rajabov, E., Brunk, I., Ahnert-Hilger, G., Chitrala, P., Becherer, U., Stevens, D.R., and Rettig, J. (2018). An alternative exon of CAPS2 influences catecholamine loading into LDCVs of chromaffin cells. *J. Neurosci.* 2040–18.

- Rettig, J., and Neher, E. (2002). Emerging Roles of Presynaptic Proteins in Ca^{++} -Triggered Exocytosis. *Science* 298, 781–785.
- Richmond, J.E., Weimer, R.M., and Jorgensen, E.M. (2001). An open form of syntaxin bypasses the requirement for UNC-13 in vesicle priming. *Nature* 412, 338–341.
- Rizo, J., and Südhof, T.C. (1998). C2-domains, Structure and Function of a Universal Ca^{2+} -binding Domain. *J. Biol. Chem.* 273, 15879–15882.
- Sadakata, T., and Furuichi, T. (2010). Ca^{2+} -dependent activator protein for secretion 2 and autistic-like phenotypes. *Neurosci. Res.* 67, 197–202.
- Sadakata, T., Washida, M., Morita, N., and Furuichi, T. (2007a). Tissue Distribution of Ca^{2+} -dependent Activator Protein for Secretion Family Members CAPS1 and CAPS2 in Mice. *J. Histochem. Cytochem.* 55, 301–311.
- Sadakata, T., Kakegawa, W., Mizoguchi, A., Washida, M., Katoh-Semba, R., Shutoh, F., Okamoto, T., Nakashima, H., Kimura, K., Tanaka, M., et al. (2007b). Impaired Cerebellar Development and Function in Mice Lacking CAPS2, a Protein Involved in Neurotrophin Release. *J. Neurosci.* 27, 2472–2482.
- Sørensen, J.B., Wiederhold, K., Müller, E.M., Milosevic, I., Nagy, G., de Groot, B.L., Grubmüller, H., and Fasshauer, D. (2006). Sequential N- to C-terminal SNARE complex assembly drives priming and fusion of secretory vesicles. *EMBO J.* 25, 955–966.
- Speese, S., Petrie, M., Schuske, K., Ailion, M., Ann, K., Iwasaki, K., Jorgensen, E.M., and Martin, T.F.J. (2007). UNC-31 (CAPS) Is Required for Dense-Core Vesicle But Not Synaptic Vesicle Exocytosis in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* 27, 6150–6162.
- Speidel, D., Varoqueaux, F., Enk, C., Nojiri, M., Grishanin, R.N., Martin, T.F.J., Hofmann, K., Brose, N., and Reim, K. (2003). A Family of Ca^{2+} -Dependent Activator Proteins for Secretion COMPARATIVE ANALYSIS OF STRUCTURE, EXPRESSION, LOCALIZATION, AND FUNCTION. *J. Biol. Chem.* 278, 52802–52809.

Speidel, D., Bruederle, C.E., Enk, C., Voets, T., Varoquaux, F., Reim, K., Becherer, U., Fornai, F., Ruggieri, S., Holighaus, Y., et al. (2005). CAPS1 Regulates Catecholamine Loading of Large Dense-Core Vesicles. *Neuron* *46*, 75–88.

Speidel, D., Salehi, A., Obermueller, S., Lundquist, I., Brose, N., Renström, E., and Rorsman, P. (2008). CAPS1 and CAPS2 Regulate Stability and Recruitment of Insulin Granules in Mouse Pancreatic β Cells. *Cell Metab.* *7*, 57–67.

Stevens, D.R., Wu, Z.-X., Matti, U., Junge, H.J., Schirra, C., Becherer, U., Wojcik, S.M., Brose, N., and Rettig, J. (2005). Identification of the Minimal Protein Domain Required for Priming Activity of Munc13-1. *Curr. Biol.* *15*, 2243–2248.

Stobrawa, S.M., Breiderhoff, T., Takamori, S., Engel, D., Schweizer, M., Zdebik, A.A., Bösl, M.R., Ruether, K., Jahn, H., Draguhn, A., et al. (2001). Disruption of ClC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron* *29*, 185–196.

Sun-Wada, G.H., and Wada, Y. (2015). Role of vacuolar-type proton ATPase in signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta* *1847*, 1166–1172.

Sutton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R., and Brunger, A.T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* *395*, 347–353.

Tabares, L., Alés, E., Lindau, M., and Toledo, G.A. de (2001). Exocytosis of Catecholamine (CA)-containing and CA-free Granules in Chromaffin Cells. *J. Biol. Chem.* *276*, 39974–39979.

Toonen, R.F.G., Vries, K.J.D., Zalm, R., Südhof, T.C., and Verhage, M. (2005). Munc18–1 stabilizes syntaxin 1, but is not essential for syntaxin 1 targeting and SNARE complex formation. *J. Neurochem.* *93*, 1393–1400.

Umbrecht-Jenck, E., Demais, V., Calco, V., Bailly, Y., Bader, M.-F., and Chasserot-Golaz, S. (2010). S100A10-Mediated Translocation of Annexin-A2 to SNARE Proteins in Adrenergic Chromaffin Cells Undergoing Exocytosis. *Traffic* *11*, 958–971.

- Varoqueaux, F., Sigler, A., Rhee, J.-S., Brose, N., Enk, C., Reim, K., and Rosenmund, C. (2002). Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 9037–9042.
- Verhage, M., and Sørensen, J.B. (2008). Vesicle Docking in Regulated Exocytosis. *Traffic* *9*, 1414–1424.
- Voets, T., Neher, E., and Moser, T. (1999). Mechanisms Underlying Phasic and Sustained Secretion in Chromaffin Cells from Mouse Adrenal Slices. *Neuron* *23*, 607–615.
- Walent, J.H., Porter, B.W., and Martin, T.F.J. (1992). A novel 145 kd brain cytosolic protein reconstitutes Ca²⁺-regulated secretion in permeable neuroendocrine cells. *Cell* *70*, 765–775.
- Wightman, R.M., Jankowski, J.A., Kennedy, R.T., Kawagoe, K.T., Schroeder, T.J., Leszczyszyn, D.J., Near, J.A., Diliberto, E.J., and Viveros, O.H. (1991). Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *88*, 10754–10758.
- de Wit, H. (2010). Morphological docking of secretory vesicles. *Histochem. Cell Biol.* *134*, 103–113.
- Zerbino, D.R., Achuthan, P., Akanni, W., Amode, M.R., Barrell, D., Bhai, J., Billis, K., Cummins, C., Gall, A., Girón, C.G., et al. (2018). Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res.* *46*, D754–D761.
- Zhou, K., Stawicki, T.M., Goncharov, A., and Jin, Y. (2013). Position of UNC-13 in the active zone regulates synaptic vesicle release probability and release kinetics. *eLife* *2*, e01180.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
α	Alpha
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Nebenniere (engl.: <i>adrenal gland</i>)
-ALWH	ohne Alanin (A), Leucin (L), Tryptophan (W) und Histidin (H)
AmpR	Resistenzgen gegen Ampicillin
bp	Basenpaare
ATP	Adenosintriphosphat
a.u.	relative Maßeinheit (engl.: <i>arbitrary units</i>)
β	Beta
BD	DNA-Bindungsdomäne
β Gal	Beta-Galaktosidase-Assay
BDNF	Wachstumsfaktor (engl.: <i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
BHK	immortale Zelllinie aus den Nierenzellen eines eintägigen Hamsters (engl.: <i>baby hamster kidney</i>)
BME	β -Mercaptoethanol
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
C	Coulomb
C2	Proteindomäne
Ca ²⁺	Calciumion
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Ca ²⁺ -Konzentration
CAPS	<i>Calcium-dependent activator protein for secretion</i>
CB	Cerebellum
cDNA	komplementäre DNS (engl.: <i>complementary DNA</i>)
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>

CgA	Chromogranin A
CHO	immortalisierte Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Zwerghamsters (engl.: <i>chinese hamster ovary cells</i>)
Cl ⁻	Chloridion
ClC3	spannungsabhängiger Chloridkanal
C _m	Membrankapazität
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
Δ	Delta
D	Aspartat
DBH	Dopamin-β-Hydroxylase
d.h.	das heißt
DH5α	<i>E. coli</i> -Zelllinie zur DNA-Transformation
DID	<i>dynactin interacting domain</i>
DKO	Doppel <i>knock-out</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS) (engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DOB	<i>Dropout Base</i>
DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
DTT	Dithiothreitol
E19	Embryonalstadium; 19 Tage nach der Befruchtung
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
eGFP	<i>enhanced green fluoreccept protein</i>
E ² GFP	eGFP mit der Mutation T203Y
EM	Elektronenmikroskopie
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
et al.	und andere (lat.: <i>et alii</i>)
f-	Femto; 10 ⁻¹⁵
F	Farad
for	Vorwärtsprimer
γ	Gamma

G $\alpha\beta\gamma$	α -, β -, γ -Untereinheiten des G-Proteingekoppelten Rezeptors
G476E	Mutation der Glutaminsäure (E) an der Position 476 zu Glycin (G)
GABA	γ -Aminobuttersäure (engl.: <i>γ-aminobutyric acid</i>)
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	GTP-Austauschfaktor (engl.: <i>GTP exchange factor</i>)
GTP	Guanosintriphosphat
H ⁺	Wasserstoffion
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HRP	Meerrettichperoxidase (engl.: <i>horseradish peroxidase</i>)
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle (engl.: <i>internal ribosomal entry site</i>)
K	Serin
KanR	Resistenzgen gegen Kanamycin
K _d	Dissoziationskonstante
KD	<i>knock-down</i>
kDa	Kilodalton
KO	<i>knock-out</i>
λ	Lambda
$\lambda_{ex.}$	Anregungswellenlänge (engl.: <i>excitatory</i>)
l	Liter
LacZ	Gen für β -Galaktosidase
LDCV	große elektronendichte Vesikel (engl.: <i>large dense-core vesicle</i>)
log.	Logarithmus
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop (engl.: <i>laser scanning microscope</i>)
-LW	ohne Leucin (L) und Tryptophan (W)
μ -	Mikro; 10 ⁻⁶
m-	Milli; 10 ⁻³
M	Molar

MAO	Monoaminoxidase
mCC	murine Chromaffinzellen (engl.: <i>murine chromaffin cells</i>)
MEL1	α -Galaktosidase
MHD	engl.: <i>Mun13-homology domain</i>
min	Minute
Munc	engl.: <i>mammalian uncoordinated protein</i>
n-	Nano; 10^{-9}
nAChR	Nikotinischer Achetylcholinrezeptor
NP-EGTA	o-Nitrophenyl-Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
NPY	Neuropeptid Y
NT-3	Neurotrophin-3
OD	optische Dichte
%	Prozent
π	Kreiszahl; 3,14159265
p-	Pico; 10^{-9}
P1/14/21/30/56	1/14/21/30/56 Tage nach der Geburt (engl.: <i>post natal</i>)
PC12	Zelllinie aus einem Tumor des Nebennierenmarks (Phäochromocytom) der Ratte
PCR	Polymerasenkettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PH	engl.: <i>Pleckstrin homology</i>
pK _a	Säuredissoziationskonstante (engl.: <i>acid dissociation constant</i>)
PKC	Phosphokinase C
PLC	Phospholipase C
PNMT	Phenylethanolamin-N-Methyltransferase
Q	Glutamin
Q69M	Mutation des Methionins (M) an der Position 69 zu Glutamin (Q)
r	Radius
R	Arginin

ref	Rückwärtsprimer
RNA	Ribonukleinsäure (RNS; engl.: <i>ribonucleic acid</i>)
ROI	Bereich von Interesse (engl.: <i>region of interest</i>)
RRP	engl.: <i>readily releasable pool</i>
s	Sekunde
s.	siehe
SFV	Semliki-Forest-Virus
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
SNAP-25	<i>synaptosomal-associated protein 25</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
SNP	Variation einzelner Basenpaare in einem DNA-Strang (engl.: <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SRP	<i>slowly releasable pool</i>
SSA	Auswertung einzelner amperometrischer Ausschläge (engl.: <i>single spike analysis</i>)
Stx1A	Syntaxin 1A
SV	Synaptische Vesikel
T203Y	Mutation des Tyrosins (Y) an der Position 203 zu Threonin (T)
Tab.	Tabelle
TBS-T	<i>Tris-buffered saline</i> -Puffer mit Tween
tdTomato	<i>tandem Tomato</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
VAMP	engl.: <i>vesicle associated membrane protein</i>
vATPase	engl.: <i>vacuolar adenosinetriphosphatase</i>
VMAT	vesikulärer Monoamintransporter (engl.: <i>vesicular monoamine transporter</i>)
WT	Wildtyp
YPD	Hefemedium (engl.: <i>yeast extract peptone dextrose</i>)
YTH	Hefe-Zwei-Hybrid-System (engl.: <i>yeast two hybrid</i>)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Biosynthese und Abbau von Noradrenalin und Adrenalin.	12
Abbildung 2: Überblick der Reifung und Fusion der LDCVs.	14
Abbildung 3: Struktur der vATPase.	16
Abbildung 4: Proteinstruktur der Spleißvarianten mCAPS2a-f.	20
Abbildung 5: Gleichzeitige Messung der Zellkapazität und der amperometrischen Stromtransienten.	40
Abbildung 6: Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems.	51
Abbildung 7: Graphische Darstellung der amperometrischen Spike-Parameter.	56
Abbildung 8: mCAPS2b erhöht die Befüllung der LDCVs mit Monoaminen und verlangsamt die Fusion der LDCVs.	58
Abbildung 9: mCAPS2b verlangsamt die Fusion der LDCVs.	59
Abbildung 10: mCAPS2a bewirkt eine Sekretion von leeren Vesikeln.	59
Abbildung 11: mCAPS2b-Überexpression in WT mCC hat keinen Effekt auf die Sekretion oder Befüllung von LDCVs.	60
Abbildung 12: mCAPS2b-Überexpression in WT mCC verlangsamt die Fusionskinetik.	61
Abbildung 13: mCAPS2b hat keinen Einfluss auf die Dichte der LDCVs und deren Verteilung, bewirkt jedoch eine Verkleinerung von deren Radius.	63
Abbildung 14: Schematische Darstellung des Sensors ClopHensorN(Q69M) und seinen spektralen Eigenschaften.	65
Abbildung 15: Vektorkarte von pMax_NPY-ClopHensorN(Q69M).	67
Abbildung 16: NPY-ClopHensorN(Q69M) ist in den LDCVs lokalisiert.	68
Abbildung 17: Photostabilität vom ClopHensorN(Q69M) in den Granulen.	69
Abbildung 18: pH-Kalibrierung von NPY-ClopHensorN(Q69M) in LDCVs von Chromaffinzellen.	70
Abbildung 19: Azidifizierungsprozess der LDCVs in embryonalen WT-Chromaffinzellen.	72
Abbildung 20: Der pH-Wert in LDCVs von WT und DKO Zellen ist unverändert.	73
Abbildung 21: pH-Bestimmung und -Kalibrierung an denselben Chromaffinzellen bestätigt den pH>6 in den LDCVs.	74
Abbildung 22: Konstrukte zur Überprüfung der Serotoninaufnahme.	76
	115

Abbildung 23: mCAPS2b erhöht die Serotoninaufnahme in CHO-Zellen.	77
Abbildung 24: Vektorkarten der YTH-Konstrukte.	79
Abbildung 25: Nachweis der Funktionalität der CAPS-Konstrukte und deren Interaktion mit rSyntaxin1A für YTH.	80
Abbildung 26: Sequenzvergleich des Exons 22 zwischen mCAPS1 und mCAPS2.	83
Abbildung 27: Herstellung des mCAPS2_Exon 22-Antikörpers.	84
Abbildung 28: CAPS2_Ex22-Antikörper ist spezifisch für CAPS2b.	85
Abbildung 29: Endogene Expression von mCAPS2b im Gewebe.	86

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klonierungsprimer	31
Tabelle 2: Antikörper für Western Blots und Immunocytochemie	32
Tabelle 3: PCR-Ansätze für mCAPS1- und mCAPS2-Genotypisierung	45
Tabelle 4: PCR-Programm für Genotypisierung	46
Tabelle 5: Lasereinstellung am LSM für Aufnahmen von fixierten Zellen	50
Tabelle 6: Einstellung am LSM für <i>live cell</i> -Mikroskopie	50
Tabelle 7: Elektronenmikroskopische Auswertung	64
Tabelle 8: Überblick über die Azidifizierung von LDCVs in mCC	72
Tabelle 9: Bestimmung der optimalen Screeningeffizienz der cDNA-Bibliothek	81
Tabelle 10: YTH-Screeningergebnisse von mCAPS2b	82

Eidesstattliche Erklärung

Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 4

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Teile der Abbildungen oder die Abbildung in modifizierter Form (Abb. 8-29) wurden in *Journal of Neuroscience* veröffentlicht (Ratai et al., 2018).

Die Experimente mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System wurden im Labor von Prof. Dr. Frank Schmitz (Neuroanatomie; Universität des Saarlandes) durchgeführt.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

1. Die Mausezucht wurde von Anja Ludes und Anne Weinland koordiniert.
2. Die Herstellung der Kohlefasern für Amperometrie-Messungen erfolgte durch Katrin Sandmeier.
3. Die Herstellung der pSVF1-Viren erfolgte durch Margarethe Klose.
4. Das Einfrieren, Substituieren, Schneiden und Aufnehmen der Zellen zur elektronenmikroskopischen Auswertung wurde von Dr. Claudia Schirra durchgeführt.
5. Die Serotoninaufnahme-Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gudrun Ahnert-Hilger (Institut für Integrative Neuroanatomie, Charité Universitätsmedizin Berlin) von Elvin Rajabow und Irene Brunk durchgeführt.
6. Die Herstellung des anti-mCAPS2_Exon 22 Antikörpers wurde von Prof. Dr. Martin Jung (Biochemie; Universität des Saarlandes) durchgeführt.
7. Die Transformation des Hefe-Plasmide in Bakterien, die anschließende DNA-Isolation und Sequenzierung erfolgte durch Tamara Paul.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen.

Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe. Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Homburg, 13.11.2018

(Unterschrift des Promovierenden)

(Unterschrift der die Versicherung an Eides statt aufnehmenden Beamtin bzw. des aufnehmenden Beamten)

Publikationen und Konferenzbeiträge

Nguyen Truong, C.Q., Nestvogel, D., Ratai, O., Schirra, C., Stevens D.R., Brose, N., Rhee, J., and Rettig, J. (2014). Secretory Vesicle Priming by CAPS Is Independent of Its SNARE-Binding MUN Domain. *Cell Rep.* 9, 902-909.

Stevens DR, Ratai O, Rettig J. Interactions with membrane lipids and SNARE complex underlie dual roles for Calcium-dependent activator proteins for secretion (CAPS) in large dense-core vesicles (LDCVS) priming. *Physiological Mini Reviews.* 2015 Nov-Dec Vol. 8 N° 6.

Ratai O., Schirra C., Rajabov E., Brunk I., Ahnert-Hilger G., Chitirala P., Becherer U., Stevens D.R. and Rettig J.; An alternative exon of CAPS2 influences catecholamine loading into LDCVs of chromaffin cells, *J. Neurosci.* 2040-18.

Ratai O., Hermainski J., Ravichandran K., Pongs O.; NCS-1 deficiency attenuates insulin receptor expression and causes obesity and diabetes type 2 in mice; *Manuskript in Vorbereitung.*

Poster: O. Ratai, C. Schirra, E. Rajabov, I. Brunk, G. Ahnert-Hilger, D. Stevens, J. Rettig (2017) The Munc13-homology domain of the calcium dependent activator protein for secretion influences monoamine uptake; 96. Meeting der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (Greifswald, DE)

Danksagung

Mein größter Dank gilt Prof. Dr. Jens Rettig dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat an diesem Projekt zu arbeiten und mich dadurch wissenschaftlich weiter zu entwickeln. Abgesehen von der hochklassigen Laborausstattung waren seine konstruktiven Anregungen und sein breites Fachwissen für mich bei der Arbeit unersetzlich.

Ich danke Prof. Dr. Roy Lancaster für die wissenschaftliche Betreuung als Zweitgutachter.

Ein besonderer Dank gilt Dr. David R. Stevens. Ich schätze seine wissenschaftliche Betreuung sehr. Die täglichen Diskussionen haben mich stets motiviert, auch wenn es mal nicht weiter ging.

Ein herzlicher Dank geht auch an Prof. Dr. Olaf H. Pongs. Durch die Arbeit mit ihm habe ich die Biochemie neu kennengelernt.

Ein großer Dank gilt Prof. Dr. Frank Schmitz für die Diskussionen in den Seminaren und dafür, dass ich einen Teil der Versuche in seinem Labor machen durfte.

Danke an Gudrun Ahnert-Hilger und ihr Team für die Zusammenarbeit und das Voranbringen dieses Projektes.

Ich danke Dr. Claudia Schirra für ihre Unterstützung bei den elektronenmikroskopischen Analysen und für ihre wertvollen Ratschläge sowohl in Elektrophysiologie, als auch Biochemie. Ohne die Erfahrung von Dr. Elmar Krause, Dr. Ulrike Hahn und Dr. Ute Becherer in Mikroskopie und Biochemie wäre die Arbeit sowohl langsamer als auch mit weniger Spaß erfolgt. In gleichem Maße danke ich Anja Ludes. Ihre Erfahrung und ihr Wissen waren für mich sehr wertvoll.

Ein persönlicher Dank geht an alle Kollegen, die mich nicht nur bei der täglichen Laborarbeit unterstützt haben, sondern darüber hinaus auch Freunde geworden sind.

Ohne die Unterstützung und Motivation meiner Familie und meiner Freunde wäre eine solche Arbeit nicht möglich gewesen. Ich bin dankbar, dass ihr ein Teil meines Lebens seid.