

AUS DEM BEREICH PHYSIOLOGIE
THEORETISCHE MEDIZIN UND BIOWISSENSCHAFTEN BZW. KLINISCHE MEDIZIN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES, HOMBURG/SAAR

Die Bedeutung der TRPC1/C4/C5-Kanäle für die synaptische Transmission in hippokampalen Neuronen

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften der Medizinischen Fakultät**

Der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

Vorgelegt von: Barbara Schindeldecker
geb. am: 18.12.1978 in: Landstuhl

Inhaltsverzeichnis

INHALT

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Zusammenfassung	4
1. Summary	5
2. Einleitung	6
2.1. Das Gehirn	6
2.2. Die hippokampale Formation	6
2.3. Aufbau und Funktion der Neurone	7
2.4. Die synaptische Transmission	7
2.5. Aufbau der chemischen Synapse	8
2.6. Glutamat-Rezeptoren	9
2.6.1. AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat)-Rezeptoren	10
2.6.2. Kainat-Rezeptoren	11
2.6.3. N-methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren	12
2.7. Exozytose	13
2.8. SNARE Proteine	14
2.8.1. Der Fusionszyklus	15
2.8.2. v-SNARE-Proteine	16
2.8.3. t-SNARE-Proteine	18
2.8.4. SNARE-regulierende Proteine	19
2.9. Die TRP -Superfamilie	20
2.9.1. Die TRPC -Subfamilie	23
3. Zielsetzung	25
4. Material und Methoden	26
4.1. Material	26
4.1.1. Chemikalien	26
4.1.2. verwendete Kits	27

Inhaltsverzeichnis

4.1.3. Puffer, Medien und Lösungen	27
4.1.4. Antikörper.....	30
4.2. Methoden.....	31
4.2.1. Molekularbiologische Methoden	31
4.2.2. Zellkulturtechniken.....	39
4.2.3. Mauslinien	45
4.2.4. Immunzytochemie.....	45
4.2.5. Proteinbiochemie	46
4.2.6. Elektrophysiologie	50
4.2.7. Statistische Analyse	56
5. Ergebnisse.....	57
5.1. Einfluss der Kanäle TRPC1, TRPC4 und TRPC5 auf die synaptische Transmission hippocampaler Neurone.....	57
5.1.1. Analyse der spontanen Exozytose.....	57
5.1.2. Analyse der Aktionspotential-evozierten Exozytose.....	59
5.1.3. Bestimmung der Synapsendichte in Kulturen TRPC1/C4/C5-triple defizitärer Neurone....	60
5.1.4. Bestimmung der Poolgröße fusionsbereiter Vesikel (RRP) durch einen hyperosmolaren Stimulus	62
5.1.5. Bestimmung der Poolgröße fusionsbereiter Vesikel (RRP) durch hochfrequente Stimulation autaptischer Neurone	64
5.1.6. Überexpression von TRPC-Kanälen in hippocampalen Neuronenkulturen	69
5.1.7. Untersuchung der synaptischen Lokalisation des TRPC1-Kanals in hippocampalen Neuronenkulturen.....	70
5.1.8. Nachweis von TRPC1-YFP und TRPC5-eGFP in infizierten Massenkulturen mittels Western Blot Analyse.....	71
5.1.9. Messung der Spontanaktivität in TRPC1-YFP- und TRPC5-eGFP exprimierenden Massenkulturen.....	72
5.1.10. Einfluss der TRPC1-Überexpression auf die Synaptogenese	76

Inhaltsverzeichnis

5.1.11. Analyse der Aktionspotential-evozierten Antwort in TRPC1-YFP-überexprimierenden autaptischen Neuronen.....	78
5.1.12. EGTA verhindert die TRPC1-abhängige Kurzzeitfazilitation durch Abpuffern des präsynaptischen Kalziums.	84
5.1.13. Vergleichende Analyse potentieller TRPC- Kanalaktivatoren	87
5.1.14. Zusammenfassung Teil 1	94
5.2. Einfluss der Transmembrandomäne des vesikulären SNARE- Proteins Synaptobrevin 2 auf die synaptische Transmission.....	95
5.2.1. Der Verlust des v-SNARE Proteins Synaptobrevin 2 blockiert die synaptische Transmission	95
5.2.2. Expression von Syb2 und mutierten Varianten von Syb2 mittels Lentiviren	96
5.2.3. Morphologische Eigenschaften kultivierter Neurone unter lentiviraler Expression von Syb2 und Varianten mit mutierter TMD von Syb2.....	98
5.2.4. Einfluss der Syb2-Mutationen PolyL und PolyV auf die Exozytose in kultivierten Neuronen	101
5.3. Einfluss der Membran-proximalen Tryptophanreste des vesikulären SNARE- Proteins Synaptobrevin 2 auf die synaptische Transmission	106
5.3.1. Expression von Syb2 und der mutierten Variante W89A/W90A von Syb2 mittels Lentiviren	107
5.3.2. Einfluss der Syb2-Mutation W89A/W90A auf die Exozytose in kultivierten Neuronen	110
6. Diskussion.....	116
6.1. Einfluss der Kanäle TRPC1, TRPC4 und TRPC5 auf die synaptische Transmission hippocampaler Neurone.....	116
6.1.1. Charakterisierung der TRPC1/C4/C5-triple defizitären Neurone	116
6.1.2. Überexpression von TRPC-Kanälen in hippocampalen Neuronenkulturen	119
6.1.3. Vergleichende Analyse potentieller TRPC-Kanalaktivatoren	122
6.2. Bedeutung struktureller Eigenschaften der TMD des v-SNARE-Proteins Syb2 für die synaptische Transmission hippocampaler Neurone	125
6.2.1. Der Verlust des v-SNARE-Proteins Syb2 blockiert die synaptische Transmission	126
6.2.2. Lentivirale Expression von Syb2 und Varianten von Syb2 mit mutierter TMD	126

Inhaltsverzeichnis

6.2.3. Die funktionelle Bedeutung der TMD von Syb2 in der Ca ²⁺ -gesteuerten Exozytose	127
6.3. Einfluss der membran-proximalen Tryptophane von Syb2 auf die synaptische Transmission	130
7. Literaturverzeichnis	133
8. Publikationen/Dank	144
8.1. Publikationen	144
8.2. Danksagung	144
9. Lebenslauf	146

Abkürzungsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor
AP	Aktionspotential
APS	Ammoniumpersulfat
APV	2-Amino-5-phosphonovaleriansäure
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	vom Gehirn stammender neurotropher Faktor (Brain-derived neurotrophic factor)
BSA	Bovines Serum Albumin
CaMKI	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase Typ 1
CAZ	Cytomatrix in der aktiven Zone
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DoKo	Doppelknockout
DTT	Dithiotreitol
E18	Embryonaltag 18
ECL	verbesserte Chemilumineszenz (enhanced chemiluminescence)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EPSC	exzitatorischer postsynaptischer Strom (excitatory postsynaptic current)
fC	femtocoulomb
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
GABA	γ -Aminobuttersäure
GFP	grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hank's buffered salt solution
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hz	Hertz
IP ₃	Inositoltrisphosphat
JMD	Juxtamembrandomäne

Abkürzungsverzeichnis

kDa	kilo Dalton
ko	knockout
M	molar
mEPSC	exzitatorischer postsynaptischer Miniaturstrom (miniature excitatory postsynaptic current)
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
Min.	Minute
mM	millimolar
mRFP	monomeres rot fluoreszierendes Protein (monomeric red fluorescent protein)
mV	Millivolt
MΩ	Megaohm
nA	Nanoampère
NBA	Neurobasal A Medium
ng	Nanogramm
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OD	optische Dichte
P1	Postnataltag 1
pA	Pikoampère
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDL	Poly-D-Lysin
PFA	Paraformaldehyd
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PMSF	Paramethylsulfonylfluorid
R	Rezeptor
RIM	Rab interacting molecule
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
RRP	Pool exozytose-kompetenter Vesikel (readily-releasable pool)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
Syb 2	Synaptobrevin 2
Syphy	Synaptophysin
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin

Abkürzungsverzeichnis

TMD	Transmembrandomäne
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
Trk	Tyrosin-Kinase-Rezeptoren
TRP	transient receptor potential
TTX	Tetrodotoxin
U	Einheiten (units)
UV	ultraviolett
Wt	Wildtyp
YFP	gelb fluoreszierendes Protein (yellow fluorescent protein)

1. ZUSAMMENFASSUNG

Canonical Transient Receptor Potential channels (TRPC-Kanäle) bilden nicht-selektive Ca^{2+} -permeable Kanäle. Sie sind im Gehirn weit verbreitet, aber ihre Funktion ist bisher noch weitgehend unverstanden. In dieser Arbeit werden Kulturen hippokampaler Neurone aus dem Gehirn von Wildtyp- und TRPC1/C4/C5-triple-defizitären Mäusen dazu verwendet, die Bedeutung dieser Kanäle in der synaptischen Transmission zu untersuchen. Anhand von elektrophysiologischen Messungen in autaptischen Kulturen wird gezeigt, dass der Verlust der TRPC1/TRPC4/TRPC5-Kanäle die basale evozierte Neurotransmission, die Poolgröße fusionsbereiter Vesikel und die Wiederauffüllrate dieses Pools erniedrigt. Dagegen wird die Synaptogenese und die quantale Transmitterfreisetzung durch die TRPC-Kanal-Defizienz nicht verändert. Durch Expression von TRPC1 in Wt-Neuronen wird die klassische synaptische Depression während hochfrequenter Stimulation in eine Kurzzeitfazilitierung umgekehrt. Dieser Effekt kann durch Abpuffern des, während hochfrequenter Stimulation präsynaptisch ansteigenden, Kalziums verhindert werden. Gemeinsam mit dem immunzytochemischen Nachweis von TRPC1 in der Präsynapse legen die Daten nahe, dass TRPC-Kanäle einen zusätzlichen Ca^{2+} -Einstrom an der Präsynapse vermitteln und dadurch die synaptische Stärke in Neuronen modulieren. Durch Überexpression von TRPC1 oder TRPC5 in WT- und TRPC1/C4/C5-defizienten Zellen werden Unterschiede in der Oligomerisierung der Kanäle festgestellt. Während TRPC5 funktionelle homotetramere Ionenkanäle bilden kann, ist TRPC1 auf die anderen TRPC-Varianten angewiesen, um als Ionenkanal zu fungieren.

Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor (SNARE)- Proteine vermitteln die Fusion verschiedener Membranen. Die mechanistische Rolle der Transmembrandomäne (TMD) von SNARE-Proteinen und ob diese eine Funktion ausübt, die über die Verankerung in der Membran hinausgeht, ist bisher jedoch noch unbekannt. Hier wird gezeigt, dass die Ca^{2+} -abhängige Exozytose in Neuronen durch Substitution der TMD von Synaptobrevin 2 mit der α -Helix-stabilisierenden Aminosäure Leucin verringert wird, wohingegen die Substitution der Synaptobrevin 2-TMD durch die β -verzweigte Aminosäure Valin die Funktion des Wildtyp-Proteins wiederherstellt. Diese Beobachtungen zeigen, dass β -verzweigte Aminosäuren die konformationelle Flexibilität der TMD erhöhen und dadurch zur erleichterten Fusion synaptischer Vesikel beitragen.

Die Juxtamembranregion von Synaptobrevin 2 enthält zwei hochkonservierte membranständige Tryptophanreste. Substitution dieser amphiphilen Tryptophane durch hydrophobe Alaninreste reduziert die synaptische Transmission ohne die Kinetik der Fusionsereignisse zu verändern. Diese Beobachtungen weisen auf eine verminderte Anzahl fusions-kompetenter Vesikel hin, was sich vermutlich auf eine Veränderung des Insertionswinkels der Synaptobrevin 2- TMD zurückführen lässt.

1. SUMMARY

Canonical transient receptor (TRPC)-channels form non-selective Ca^{2+} - permeable channels. They are widely distributed in the brain but their function is mostly unknown so far. In this thesis, cultures of hippocampal neurons from the brains of wild type and TRPC1/C4/C5-triple-deficient mice are used to investigate the role of these channels in synaptic transmission. Electrophysiological measurements in autaptic cultures show that the loss of TRPC1/TRPC4/TRPC5 channels lowers the basal evoked neurotransmission, the pool size of readily-releasable vesicles and the replenishment rate of this pool. In contrast, neither synaptogenesis nor properties of quantal transmitter release are altered by TRPC channel deficiency. By expressing TRPC1 in Wt neurons, classical synaptic depression is reversed into short-term facilitation during high frequency stimulation. This effect can be prevented by buffering the calcium that increases presynaptically during high frequency stimulation. Together with the colocalization of TRPC1 with the synaptic marker protein synapsin, the data suggest that TRPC channels mediate an additional Ca^{2+} -influx at the presynapse, thereby modulating synaptic strength in neurons. Overexpression of TRPC1 or TRPC5 in Wt- and TRPC1/C4/C5-deficient cells unveiled differences regarding the oligomerisation of the channels. While TRPC5 can form functional homotetrameric ion channels, TRPC1 depends on the other TRPC variants to act as ion channels.

Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor (SNARE) proteins mediate the fusion of different membranes. However, the mechanistic role of the transmembrane domain (TMD) of SNARE proteins and whether it fulfills a function that goes beyond anchoring in the membrane is still unknown. Here it is shown that Ca^{2+} -dependent exocytosis in neurons is reduced by substitution of the TMD of synaptobrevin 2 with the α -helix-stabilizing amino acid leucine, whereas replacement of synaptobrevin 2-TMD by the β -branched amino acid valine restores the function of the wild-type protein. These observations show that β -branched amino acids increase the conformational flexibility of TMD and thereby contribute to the fusion of synaptic vesicles.

The juxtamembrane region of Syb2 contains two highly conserved membrane-bound tryptophan residues. Substitution of these amphiphilic tryptophanes by hydrophobic alanine residues reduces synaptic transmission without altering the kinetics of fusion events. These observations are attributed to the reduced number of fusion-competent vesicles caused by an alteration of the insertion angle of the Syb2- TMD into the membrane.

2. EINLEITUNG

2.1. Das Gehirn

Das menschliche Gehirn stellt ein kompliziertes Netzwerk aus ungefähr 86 Milliarden Nervenzellen dar (Azevedo et al., 2009, Herculano-Houzel, 2009). Einzelne Neurone sind zu neuronalen Schaltkreisen miteinander verbunden, die der Verarbeitung von Sinneswahrnehmungen, Speicherung und Weiterleitung von Informationen dienen und dadurch vielfältige Körperfunktionen steuern. Die Informationsübertragung zwischen verschiedenen Neuronen erfolgt an spezialisierten Kontaktstellen, den Synapsen, von denen jedes einzelne Neuron bis zu mehreren Tausend ausbilden kann.

Neben Neuronen wird ein Großteil der Hirnmasse durch eine weitere Zellgruppe, den Gliazellen, gebildet. Lange Zeit wurde diese Zellpopulation, die man in die vier Hauptgruppen Microglia, Astrozyten, Oligodendrozyten und NG-2-Glia unterteilt, in ihrer Funktion unterschätzt und zunächst als "Nervenkitt" bezeichnet, weil man annahm, dass sie lediglich als Stütz- und Haltezellen dienen. Nach heutigem Kenntnisstand erfüllen Gliazellen eine ganze Reihe weiterer Aufgaben, die von der Aufrechterhaltung der Flüssigkeits- und Ionenhomöostase, der Regulation des pH-Wertes über die aktive Immunabwehr bis hin zur elektrischen Isolation der Nervenzellen reichen (Jakel and Dimou, 2017). Außerdem ist mittlerweile bekannt, dass die Anzahl an Synapsen in der Gegenwart von Astrozyten steigt, was vermutlich auf die Versorgung der Neurone mit Energie und Substanzen, die für die Bildung, Reifung und Stabilisierung funktionaler Synapsen erforderlich sind, zurückzuführen ist (Kawano et al., 2012).

Das Gehirn besteht aus verschiedenen Regionen, denen spezifische Funktionen zugeordnet werden können. Bei den meisten Prozessen ist jedoch die Aktivität und Zusammenarbeit verschiedener Hirnregionen erforderlich. So fließen im Hippokampus Informationen verschiedener sensorischer Systeme zusammen, werden dort verarbeitet und Erinnerungen werden generiert.

2.2. Die hippokampale Formation

Der Hippokampus ist eine kortikale Struktur des Telencephalons und bildet die zentrale Schaltstation des limbischen Systems. Jede Hemisphäre enthält einen Hippokampus, der in die zytoarchitektonisch unterscheidbaren Regionen Subiculum, Cornu Ammonis (CA1-3 Region) und Gyrus Dentatus unterteilt werden kann. Die Projektionen des Gyrus Dentatus und der CA1-3 Region sind überwiegend intrinsisch und miteinander verschaltet, wohingegen das Subiculum die Hauptausgangsstation mit Projektionen auf verschiedene

Einleitung

kortikale und subkortikale Regionen sowie die Amygdala und den Hypothalamus darstellt (Abellan et al., 2014). Hauptsächlich besitzt der Hippokampus glutamaterge Pyramidenzellen, daneben gibt es auch noch eine Reihe hemmender, GABAerger Interneurone, die sich jedoch morphologisch gut von den Pyramidenzellen unterscheiden lassen. Der Hippokampus stellt eine der wenigen Hirnregionen dar, in denen zeitlebens neue Nervenzellen gebildet werden und ist von besonderem wissenschaftlichem Interesse, weil er mit Lernvorgängen, der Bildung von Erinnerungen und der Fähigkeit sich auf neue Begebenheiten einzustellen in Verbindung gebracht wird (Abellan et al., 2014). Schäden in dieser Struktur, wie sie z. B. bei der Alzheimererkrankung auftreten, beeinträchtigen die Gedächtnisbildung und die räumliche Orientierung.

2.3. Aufbau und Funktion der Neurone

Die Aufgabe der Neurone besteht darin, Informationen zu verarbeiten und weiterzuleiten. Um die Funktion der Neurone verstehen zu können, muss zunächst deren Aufbau betrachtet werden. Ein Neuron besteht typischerweise aus einem Zellkörper und mehreren Fortsätzen, die Neurite genannt werden. Bei den Neuriten unterscheidet man nochmals zwischen mehreren kurzen Dendriten und einem langen Axon. Informationen von anderen Nervenzellen werden an den Dendriten empfangen, zum Soma weitergeleitet und am Axonhügel integriert. Über das Axon werden Signale von der Nervenzelle an andere Neurone weitergegeben. Die Informationsübertragung geschieht an hochspezialisierten Kontaktstellen, die man Synapsen nennt.

2.4. Die synaptische Transmission

Nervenzellen geben Informationen kodiert als Änderungen des Membranpotentials weiter. Die Informationsübertragung zwischen verschiedenen Neuronen erfolgt dabei an den Synapsen. Je nachdem, auf welche Art und Weise die Informationsübertragung erfolgt, unterscheidet man zwischen elektrischen und chemischen Synapsen.

In elektrischen Synapsen erfolgt der Informationsaustausch über sogenannte *gap junctions*, die bei Wirbeltieren durch Mitglieder der Proteinfamilie der Connexine gebildet werden. Jeweils sechs Connexine lagern sich dabei zu einem Halbkanal (Connexon) in der Zellmembran zusammen. Der *gap-junction*-Kanal stellt eine Verbindung zwischen dem Zytosol der beiden Zellen dar und ermöglicht den beidseitigen Austausch von Ionen und kleinen Molekülen, d.h. das elektrische Signal wird bei dieser Art der Synapse direkt zwischen den Zellen übertragen und erfährt keine Verzögerung. Elektrische Synapsen sind von besonderer Bedeutung in Herzmuskelzellen, kommen jedoch auch in anderen Organen wie der Leber oder der Retina vor und sind im Gehirn der Säugetiere vor allem während der

Embryogenese weit verbreitet (Revel and Karnovsky, 1967, Saez et al., 2003, Beyer and Berthoud, 2017).

Überwiegend erfolgt die Kommunikation zwischen Neuronen jedoch an chemischen Synapsen. An diesen wird das elektrische Signal zunächst in ein chemisches Signal in Form einer Freisetzung von Transmittermolekülen umgewandelt, das in der nachfolgenden Zelle wieder in ein elektrisches Signal konvertiert wird. Eine chemische Synapse besteht aus der präsynaptischen Terminalie (Bouton), dem synaptischen Spalt und der Postsynapse. Das Ruhemembranpotential einer Nervenzelle liegt bei -70 mV. Erreicht und aufrecht erhalten wird dieses Potential vor allem durch die Aktivität der Na^+/K^+ -Pumpe, die unter Verbrauch von ATP drei Na^+ nach außen und zwei K^+ nach innen transportiert und so einen elektrochemischen Gradienten über die Zellmembran aufbaut (Clausen et al., 2017). Wird die Zelle durch einen Reiz über einen bestimmten Schwellenwert depolarisiert, so kommt es als Reaktion, vor allem über die Erhöhung der Natriumionenleitfähigkeit, zu einem Einstrom positiver Ladung und zur Auslösung eines Aktionspotentials. Diese Depolarisation vom negativen Ruhepotential zu einem positiven Potential breitet sich über die ganze Zelle aus und wird vom Axonhügel, der viele spannungsgesteuerte Natriumkanäle (Marban et al., 1998) enthält, entlang des Axons bis in die präsynaptischen Endigungen weitergeleitet. Dort führt sie zur Öffnung spannungsgesteuerter Kalziumkanäle des N-, P/Q- oder R-Typs (Catterall, 2011). Infolgedessen kommt es aufgrund des hohen Konzentrationsgradienten zwischen intra- und extrazellulärer Kalziumkonzentration zu einem Einstrom von Kalziumionen in die präsynaptische Terminalie, der die Exozytose von transmittergefüllten synaptischen Vesikeln und damit die Freisetzung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt hervorruft (Katz, 1996). Die Transmittermoleküle diffundieren durch den synaptischen Spalt und binden an die, in der postsynaptischen Membran befindlichen, Rezeptormoleküle. Diese ligandengesteuerten Rezeptoren können je nach ihrer Art entweder zu einer Depolarisation (EPSC: exzitatorisches postsynaptisches Potential) oder einer Hyperpolarisation des Membranpotentials (IPSP: inhibitorisches postsynaptisches Potential) der postsynaptischen Zelle führen (Details siehe Abschnitt 2.6.).

2.5. Aufbau der chemischen Synapse

Mittels Elektronenmikroskopie lassen sich die verschiedenen Strukturen der chemischen Synapse gut unterscheiden (Lisman et al., 2007). Die präsynaptische Terminalie enthält hunderte von gleichförmigen Vesikeln mit einem Durchmesser von ca. 40 nm, die mit Transmittermolekülen gefüllt sind (Sudhof and Rizo, 2011). Als aktive Zone bezeichnet man einen bis zu 300 nm großen Bereich der präsynaptischen Terminalie, an der die Transmitterfreisetzung stattfindet. Direkt gegenüber der präsynaptischen aktiven Zone befindet sich auf der postsynaptischen Seite die sogenannte "postsynaptic density" (PSD),

eine proteinreiche Region, die sicherstellt, dass sich die postsynaptischen Rezeptoren in unmittelbarer Nähe zu den Transmitterfreisetzungstellen befinden. Diese subzelluläre Lokalisation wird durch die zahlreichen membranassoziierten Stützproteine wie PSD-93 und PSD-95 (Carlisle et al., 2008, Chen et al., 2011, Zhang and Lisman, 2012, MacGillavry et al., 2013, Meyer et al., 2014) bewerkstelligt, die ein Gerüst bilden, um die Zusammenlagerung von Rezeptoren, Ionenkanälen und Signalproteinen zu gewährleisten. Die aktive Zone in der präsynaptischen Endigung vermittelt die Vesikelfusion. Sie besteht aus der präsynaptischen Membran, einem proteinreichen (elektronendichten) Bereich unter der Membran, der als Cytomatrix in der aktiven Zone (CAZ) bezeichnet wird und langen Filamenten, die sich bis in das Zytoplasma hinein erstrecken (Zhai and Bellen, 2004, Gundelfinger et al., 2015). Die Proteine in der CAZ binden synaptische Vesikel und stellen diese somit zur Fusion an der präsynaptischen Membran bereit. Die CAZ besteht unter anderem aus Zytoskelettproteinen und aus verschiedenen Gerüstproteinen wie z.B. Mitgliedern der ELKS/CAST-Familie (Petzoldt and Sigrist, 2014), RIM (Rab3-interacting molecule)(Graf et al., 2012), RIM-BP (RIM-binding protein) Piccolo und Bassoon (Takao-Rikitsu et al., 2004, Liu et al., 2011a, Sudhof, 2012). Vermutlich dienen diese Gerüstproteine dazu, Nanodomänen in der präsynaptischen Membran zu bilden, um Ca^{2+} -Kanäle, aber auch andere für die Vesikelfusion essentielle Proteine in der präsynaptischen Membran zu positionieren (Petzoldt and Sigrist, 2014). Der synaptische Spalt zwischen der Prä- und der Postsynapse ist ca. 20-40 nm breit und enthält Adhäsionsproteine wie Cadherin und Nectin, die prä- und postsynaptisch gebildet werden und die Synapse durch homophile Interaktionen stabilisieren (Zhai and Bellen, 2004). Chemische Synapsen stellen den Ort der interzellulären Kommunikation dar. Synaptische Verbindungen können in ihrer Stärke moduliert werden, eine Fähigkeit, die man synaptische Plastizität nennt. In diesen fundamentalen Prozess, der dem Lernen und der Gedächtnisbildung zugrunde liegt, könnten TRPC-Kanäle durch ihre Leitfähigkeit für Ca^{2+} involviert sein.

2.6. Glutamat-Rezeptoren

Neurotransmitter werden entsprechend ihrer chemischen Struktur den Klassen Amine, Aminosäuren, Neuropeptide, Lipide, Purine oder Gase zugeordnet (Hyman, 2005). Die synaptische Transmission zwischen Neuronen des Zentralnervensystems erfolgt an den meisten erregenden Synapsen durch den Neurotransmitter Glutamat und an den inhibierenden Synapsen durch die Transmitter Glycin und γ -Aminobuttersäure (Traynelis et al., 2010, Gamlin et al., 2018).

Da in dieser Arbeit der Fokus auf der Untersuchung exzitatorischer Ströme liegt, wird im Folgenden lediglich auf die Glutamatrezeptoren näher eingegangen. Grundsätzlich können

zwei Gruppen von Glutamatrezeptoren unterschieden werden, die ionotropen und die metabotropen Rezeptoren (Traynelis et al., 2010, Scheefhals and MacGillavry, 2018).

Bei den ionotropen Rezeptoren handelt es sich um ligandengesteuerte Ionenkanäle, die bei der Bindung von Glutamat eine kationenselektive Pore bilden. Metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR) sind G-Protein-gekoppelte Proteine, die aus einem Peptid mit 7 Transmembrandomänen bestehen (Nicoletti et al., 2011). Die Bindung des Liganden führt bei dieser Rezeptorklasse zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, die zu einer Modulation von Ionenkanälen führt (Koles et al., 2016). Zur Zeit sind acht mGluRs bekannt, die aufgrund ihrer Sequenzhomologien und intrazellulären Effekte in drei Gruppen unterteilt werden. Die Gruppe I der metabotropen Glutamatrezeptoren werden aus mGluR1 und mGluR5 gebildet. Bindung von Glutamat an diese Rezeptoren führt zu einer über G-Proteine vermittelten Aktivierung der Phospholipase C und induziert die Bildung von IP₃, was wiederum zu einer Mobilisierung intrazellulärer Ca²⁺-Ionen führt. Die Gruppe II der metabotropen Glutamatrezeptoren bestehen aus mGluR2 und mGluR3, wohingegen die Gruppe III-Rezeptoren mGluR4, mGluR6, mGluR7 und mGluR8 beinhalten (Nicoletti et al., 2011). Die Vertreter dieser beiden Gruppen hemmen die Adenylatcyclase und rufen dadurch die Inhibition von spannungsgesteuerten Ca²⁺-Kanälen hervor. Ebenfalls gemeinsam ist den Mitgliedern der beiden Gruppen, dass sie sowohl post- als auch präsynaptisch lokalisiert sind und die Neurotransmission durch ihre Funktion als Autorezeptoren modulieren können, indem sie den Einstrom von Ca²⁺-Ionen regulieren (Lau and Tymianski, 2010).

Die ionotropen Glutamatrezeptoren werden anhand selektiver Agonisten, durch die sie aktiviert werden, in drei Gruppen unterteilt:

2.6.1. AMPA (A-AMINO-3-HYDROXY-5-METHYL-4-ISOXAZOLPROPIONAT)-REZEPTOREN

Diese Rezeptoren sind für die schnelle Komponente des exzitatorischen synaptischen Stroms im Gehirn verantwortlich und zeichnen sich durch eine schnelle Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik, sowie eine schnelle Desensitisierung aus. Durch AMPA-Rezeptoren vermittelte Ströme weisen daher einen schnellen Anstieg und einen schnellen Abfall auf (Lau and Tymianski, 2010). Der AMPA-Rezeptor besteht aus vier Untereinheiten, die unterschiedlich zusammengesetzt sein können (GluA1-4) und einer zentral gelegenen Pore. Im Allgemeinen sind AMPA-Rezeptoren permeabel für Kationen, jedoch verhindert das Vorhandensein der Untereinheit GluA2 den Fluss von Ca²⁺-Ionen durch den Kanal (Koles et al., 2016). Bei den meisten AMPA-Rezeptoren in pyramidalen Neuronen des Hippokampus handelt es sich um Komplexe, die GluA2 enthalten und somit für Ca²⁺ impermeabel sind (Wenthold et al., 1996). Die Untereinheiten des Rezeptors bestehen aus einem extrazellulären N-Terminus, der extrazellulär gelegenen Ligandenbindungsstelle, drei Transmembrandomänen, einer porenbildenden Schleife und dem intrazellulär gelegenen C-Terminus (Lau and Tymianski, 2010). Bindung des Liganden Glutamat an den Rezeptor führt

Einleitung

zu einer Konformationsänderung, wodurch sich der Ionenkanal öffnet und ein rascher Einstrom von vorwiegend Na^+ -Ionen stattfindet. Durch eine weitere Konfigurationsänderung wird der desensitisierte Zustand erreicht, in dem der Kanal trotz Bindung des Liganden nicht geöffnet werden kann (siehe Abb.1). Die funktionellen Eigenschaften der AMPA-Rezeptoren werden durch die Interaktion mit TARP (transmembrane AMPA regulatory protein) und *Cornichon* Proteinen (Boudkkazi et al., 2014, Constals et al., 2015) reguliert, die auch den Transport und die Insertion der AMPA-Rezeptoren in die Plasmamembran beeinflussen. Darüber hinaus können die Eigenschaften der Rezeptoren durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen an der C-terminalen Domäne oder durch alternative Splicevarianten verändert werden (Lomeli et al., 1994, Traynelis et al., 2010).

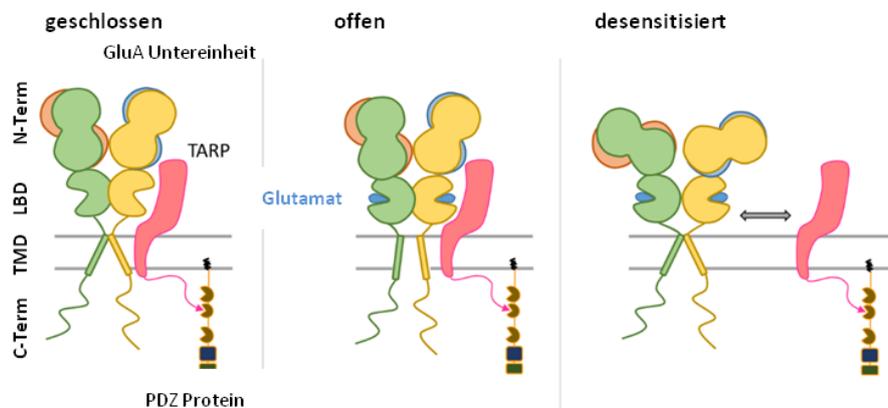


Abb. 1: Aktivitätszustände des AMPA-Rezeptors. AMPA Rezeptoren bestehen aus vier Untereinheiten, von denen jede Glutamat binden kann. Über ihre Transmembrandomäne (TMD) und ihre Ligandenbindungsdomäne (LBD) sind AMPA Rezeptoren eng mit TARP (transmembrane AMPA regulatory protein) assoziiert. TARP wiederum wird durch Bindung an ein PDZ-(postsynaptic density zone) Protein in der Membran immobilisiert. Die drastischen Veränderungen, die an der LBD und an der N-terminalen Domäne in Gegenwart von Glutamat stattfinden, führen zu einer Desensitierung des Rezeptors und vermutlich durch Dissoziation des Komplexes mit TARP zu einer erhöhten Mobilität der AMPA Rezeptoren in der Membran (modifiziert nach (Constals et al., 2015)).

2.6.2. KAINAT-REZEPTOREN

Eine weitere Gruppe der ionotropen Glutamatrezeptoren stellen die Kainat-Rezeptoren dar, die im Gehirn weit verbreitet sind (Koles et al., 2016). Sie werden als Tetramer aus den Untereinheiten GluK1-5 gebildet und weisen ähnliche Eigenschaften wie die AMPA-Rezeptoren auf, sind jedoch weitgehend impermeabel für Ca^{2+} und besitzen eine vergleichsweise langsamere Kinetik. Im Gegensatz zu AMPA-Rezeptoren, die in der postsynaptischen Membran stark angereichert sind, vermutet man, dass sich die Kainat-Rezeptoren sowohl prä- als auch postsynaptisch befinden (Lau and Tymianski, 2010, Koles et al., 2016).

2.6.3. N-METHYL-D-ASPARTAT (NMDA)-REZEPTOREN

NMDA-Rezeptoren sind als Heterotetramere aus den Untereinheiten NR1-3 aufgebaut (Stephenson et al., 2008, Koles et al., 2016). Hinsichtlich ihrer Kanaleigenschaften weisen sie einige wichtige Besonderheiten im Vergleich zu den anderen ionotropen Glutamatrezeptoren auf. Zum einen besitzen sie zwei unterschiedliche Liganden-Bindungsstellen, eine für Glutamat und eine für den Co-Agonisten Glycin, die zur Öffnung des Kanals beide besetzt sein müssen (Seeburg et al., 1995, Hansen et al., 2018). Zum anderen wird ihr Kanal bei negativem Membranpotential durch Mg^{2+} -Ionen blockiert (Mayer et al., 1984, Nowak et al., 1984, Vargas-Caballero and Robinson, 2004). Diese spannungsabhängige Blockade kann nur durch Depolarisation der Zelle aufgehoben werden, die unter physiologischen Bedingungen durch die Aktivität der AMPA- und Kainat-Rezeptoren stattfindet. Der NMDA-Rezeptor weist eine hohe Leitfähigkeit für Kationen auf, wodurch bei Aktivierung des Kanals Na^+ -Ionen und insbesondere Ca^{2+} -Ionen aufgrund des elektrochemischen Gradienten in die Zelle ein- und K^+ -Ionen aus der Zelle ausströmen. Hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen führen zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege, die sowohl physiologische Prozesse, wie Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD), welche die zugrundeliegenden Mechanismen bei der Speicherung von Gedächtnisinhalten und bei Lernvorgängen darstellen, als auch pathologische Prozesse, wie Neurodegeneration und Apoptose einleiten können (Lau and Tymianski, 2010, Koles et al., 2016). Während AMPA-Rezeptoren für die basale synaptische Transmission verantwortlich sind, nehmen die NMDA-Rezeptoren eine tragende Rolle in aktivitätsabhängigen Veränderungen ein. Bei der NMDA-Rezeptor-abhängigen LTP, die eine Form der synaptischen Plastizität darstellt, kommt es zu einer langandauernden Verstärkung der synaptischen Übertragung (Malenka and Bear, 2004). Damit LTP stattfindet, muss es zunächst durch Glutamatfreisetzung und Bindung an AMPA-Rezeptoren zu einer Depolarisation der postsynaptischen Membran kommen. Hochfrequente wiederholte Depolarisationen führen zur Abstoßung des Magnesiumions und rufen dadurch die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren hervor, infolgedessen Ca^{2+} -Ionen in die Zelle einströmen. Durch die erhöhte intrazelluläre Konzentration an Ca^{2+} -Ionen in der Postsynapse werden Signal-Kaskaden in Gang gesetzt, die vor allem über die Aktivierung der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II zu einem verstärkten Einbau von AMPA- und Kainat-Rezeptoren führen (Malenka and Nicoll, 1999, Lisman et al., 2002, Malenka and Bear, 2004). Zudem werden bestehende Rezeptoren durch die CaMKII phosphoryliert und somit permeabler für Ionen, wodurch die postsynaptische Membran für Glutamat sensitiviert wird (Malenka and Nicoll, 1999). Zusätzlich zu den bereits genannten Effekten kommt es in der Spätphase der LTP durch Modifikation des Aktin-Cytoskeletts zu einem physikalischen Wachstum von dendritischen Dornenfortsätzen (Spines), welches mit einer Größenzunahme

der PSD sowie des axonalen Boutons und mit einer Zunahme der Gerüstproteine PSD-95 und Homer1c korreliert (Meyer et al., 2014). Im Gegensatz zur LTP wird die LTD durch eine repetitive aber moderate Aktivierung der NMDA-Rezeptoren ausgelöst, was nur zu einem leichten, aber anhaltenden Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Ionen-Konzentration führt und eine Abschwächung der synaptischen Stärke zur Folge hat (Luscher and Malenka, 2012). NMDA-Rezeptoren können durch verschiedene Antagonisten pharmakologisch inhibiert werden. In dieser Arbeit wurde der kompetitive Antagonist APV (2-Amino-5-phosphonovaleriansäure), der den Rezeptor durch Bindung an der Glutamatbindungsstelle blockiert (Lau and Tymianski, 2010), verwendet, um NMDA-Rezeptor-vermittelte Langzeitpotenzierung zu verhindern (Morris, 1989) und somit eine fokussierte Betrachtung des Einflusses der TRPC-Kanäle auf die AMPA-Rezeptor-vermittelte Transmission zu ermöglichen.

2.7. Exozytose

Kommunikation zwischen Neuronen erfolgt vorwiegend über die Freisetzung von chemischen Signalen, den sogenannten Neurotransmittern, die aus synaptischen Vesikeln ausgeschieden werden. Für diesen Prozess ist es zunächst erforderlich, dass sich die synaptischen Vesikel der Plasmamembran in der aktiven Zone annähern ("docking") und durch spezifische Protein-Protein-Interaktionen für die Ca^{2+} -abhängige Fusion vorbereitet werden ("priming") (Rizo and Rosenmund, 2008, Siksou et al., 2009, Szule et al., 2012, Imig et al., 2014). Erfährt das Neuron nun ein elektrisches Signal, so kommt es bedingt durch den damit verbundenen Ca^{2+} -Einstrom zur Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran und zur Freisetzung des Neurotransmitters in den synaptischen Spalt (Rizo and Xu, 2015). Diesen Vorgang bezeichnet man als Exozytose.

Grundsätzlich kann zwischen zwei verschiedenen Arten der Exozytose unterschieden werden (Kaeser and Regehr, 2014). Die evozierte Exozytose wird durch den Einstrom von Ca^{2+} in die Präsynapse während eines Aktionspotentials ausgelöst. Als Folge des Kalziumanstiegs fusionieren viele synaptische Vesikel gleichzeitig mit der Plasmamembran und setzen ihre Transmittermoleküle frei, wodurch an der Postsynapse ein Strom (EPSC) entsteht.

Die spontane Exozytose findet dagegen ohne vorherige Stimulation der Nervenzelle durch ein Aktionspotential statt und beruht auf der spontanen Fusion einzelner Vesikel mit der Plasmamembran. Die dadurch freigesetzte quantale Transmittermenge löst an der Postsynapse nur einen verhältnismäßig kleinen Strom aus, der deshalb auch als Miniatur-EPSC (mEPSC) bezeichnet wird (Details siehe Übersichtsartikel (Kaeser and Regehr, 2014)).

Eine Gruppe membrangebundener Proteine, die SNARE- (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)-Proteine, sind wesentlich an der Exozytose beteiligt, indem sie die vesikuläre Membran und die Plasmamembran in unmittelbare Nähe zueinander bringen, wodurch die Fusion eingeleitet werden kann (Jahn et al., 2003, Jahn and Scheller, 2006, Stein et al., 2009, Sudhof and Rothman, 2009).

2.8. SNARE Proteine

SNARE- (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)-Proteine regulieren Fusionsreaktionen in den verschiedensten Kompartimenten der eukaryontischen Zelle (Jahn and Scheller, 2006). Sie sind sowohl in der konstitutiven Exozytose, die für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion und zum Zellwachstum benötigt wird, als auch in der regulierten Exozytose involviert, welche für die schnelle Transmitterfreisetzung in Neuronen verantwortlich ist (Carr and Munson, 2007).

Die Bedeutung der SNARE-Proteine für den Fusionsmechanismus wurde ursprünglich anhand der proteolytischen Aktivität spezifischer Neurotoxine entdeckt (Schiavo et al., 1992, Blasi et al., 1993a, Blasi et al., 1993b). Spaltung der neuronalen SNARE-Proteine Synaptobrevin 2, SNAP-25 (25 kDa synaptosome-associated protein) und Syntaxin 1 durch Botulinum- oder Tetanustoxin führte jeweils zur Inhibition der Transmitterfreisetzung, womit erstmals der Nachweis erbracht war, dass diese drei Proteine von fundamentaler Bedeutung für die Fusion synaptischer Vesikel sind.

Die grundsätzliche Struktur der SNARE-Proteine beinhaltet eine C-terminale Transmembrandomäne (TMD), die über einen kurzen Linker mit dem α -helikalen SNARE-Motiv verbunden ist (Fasshauer et al., 1997, Sutton et al., 1998). Dieses Motiv ist das charakteristische Strukturelement aller SNARE-Proteine und besteht aus 60-70 hydrophoben Aminosäuren, die sich in sogenannten heptad repeats periodisch wiederholen. Um Fusionsreaktionen zu vermitteln, müssen bestimmte Kombinationen von SNARE-Proteinen in den verschiedenen Membranen vorhanden sein. Basierend auf der vorwiegenden Lokalisation dieser SNARE-Proteine unterscheidet man zwischen vesikulären Donor- (v-SNARE) und Akzeptormolekülen (t-SNARE). Das vesikuläre SNARE- Protein Synaptobrevin 2 und die beiden Plasmamembranproteine Syntaxin 1 und SNAP-25 sind für die neuronale Exozytose verantwortlich. Die SNARE-Motive dieser Proteine bilden zusammen den SNARE-Komplex (siehe Abb. 2), der im stabilen Zustand als coiled-coil-Struktur aus vier α -Helices vorliegt (Fasshauer et al., 1997, Sutton et al., 1998). Zur Ausbildung des Komplexes werden die SNARE-Motive des v-SNAREs mit den SNARE-Motiven der, in der Plasmamembran vorliegenden t-SNAREs Syntaxin 1 und SNAP-25 miteinander verbunden, wobei jeweils eine Helix von Syntaxin 1 und Synaptobrevin 2 und zwei von SNAP-25

geliefert werden (Jahn and Scheller, 2006, Stein et al., 2009). Die Komplexbildung findet durch reißverschlußartiges Zusammenziehen der vier Helices vom Amino- zum Carboxyterminus statt (Hanson et al., 1997). Stabilität erhält der Komplex fast ausschließlich durch die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Aminosäureseitenketten aller vier Helices. Die Aminosäurereste sind im Kern des Komplexes so angeordnet, dass sie eine regelmäßige Folge planarer Schichten (Layer) bilden, die senkrecht zur Achse des Komplexes stehen. Im Gegensatz zum übrigen SNARE-Motiv, das überwiegend hydrophobe Aminosäuren enthält, liegt in der Mitte des Komplexes eine Ebene (Layer 0) vor, in der drei Glutaminreste und ein Argininrest hydrophile Wechselwirkungen untereinander ausbilden. Sequenzvergleiche von SNARE-Proteinen aus verschiedenen Organismen haben gezeigt, dass die SNAREs generell in zwei Gruppen eingeteilt werden können. Eine Gruppe besitzt in Layer 0 fast ausschließlich die Aminosäure Arginin (R), die zweite Gruppe die Aminosäure Glutamin (Q). Basierend auf dieser Feststellung wurden die SNARE-Proteine in Q- und R-SNAREs unterteilt (Jahn and Scheller, 2006, Carr and Munson, 2007).

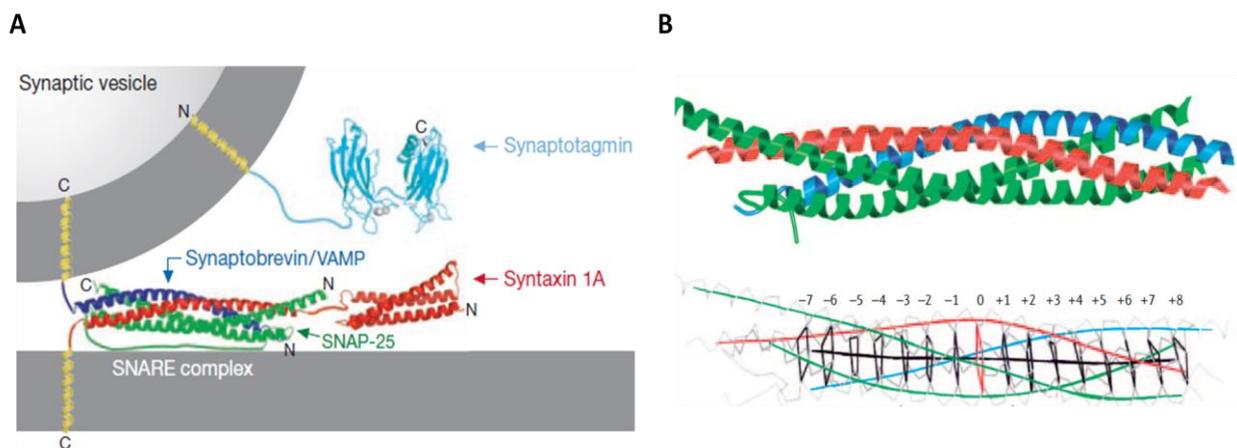


Abb. 2: Der SNARE-Komplex. **A** Der SNARE-Komplex wird aus den Proteinen Synaptobrevin 2, Syntaxin 1 und SNAP-25 gebildet. Zusammen mit dem Ca^{2+} -Sensor Synaptotagmin ist er für die Ca^{2+} -abhängige Exozytose verantwortlich (PDB ID 1SFC (Sutton et al., 1998) und PDB IDs 1BYN (Shao et al., 1998) und 1K5W (Fernandez et al., 2001)). **B** Kristalline Struktur des neuronalen SNARE-Komplexes (oben). Der Komplex enthält die SNARE-Motive von Syntaxin 1 (Qa:rot), SNAP-25 (Qb und Qc: grün) und Synaptobrevin 2 (R:blau). Das Diagramm (unten) zeigt die zentralen Ebenen der interagierenden Aminosäureseitenketten. Nur Ebene 0 enthält hydrophile Aminosäureseitenketten (Jahn and Scheller, 2006) modifiziert nach (Sutton et al., 1998).

2.8.1. DER FUSIONSZYKLUS

SNARE-Proteine unterliegen einem stetigen Zyklus, der die Bildung und Auflösung von Komplexen, sowie die Rückgewinnung der Proteine für das jeweilige Zellkompartiment umfasst. Um effiziente Fusionsreaktionen herbeiführen zu können, müssen die t-SNARE-

Einleitung

Proteine zunächst in Clustern organisiert in der Plasmamembran vorliegen. Aus diesen werden die Akzeptorkomplexe als Dimere aus SNAP-25 und Syntaxin 1 gebildet. Die Verbindung der SNARE-Motive und damit die Ausbildung des SNARE-Komplexes wird durch die Proteine Munc18-1 und Munc13s, vorwiegend durch Interaktion mit Syntaxin1, reguliert (Sudhof and Rizo, 2011, Rizo and Xu, 2015). Nähert sich ein Vesikel der Plasmamembran an, so bilden sich durch die Verbindung der v-SNAREs mit den t-SNAREs zuerst lockere trans-SNARE-Komplexe aus, in denen die vier Helices nur an ihren aminoterminalen Enden miteinander verbunden sind. Weitere regulatorische Proteine wie Synaptotagmin 1, das dem Fusionsprozess seine Ca^{2+} -Empfindlichkeit verleiht und Complexin greifen in den Zyklus ein, um eine unkontrollierte bzw. verfrühte Fusion zu verhindern. Complexin bindet dabei an den Komplex und wirkt vermutlich wie eine Klemme, die eine Fusion verhindert, bevor der Ca^{2+} -Einstrom erfolgt ist (Dhara et al., 2014, Lai et al., 2014). Nach der Öffnung der Kalziumkanäle strömt Ca^{2+} in die Zelle ein und bindet an den Kalziumsensor Synaptotagmin, woraufhin die Complexinklemme gelöst wird und die Fusion fortschreiten kann. Durch reißverschlussartiges Zusammenziehen ("zippering") der Helices vom Amino- zum Carboxyterminus entsteht der stabile trans-SNARE-Komplex, dessen Aufgabe es ist, die elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen den Membranen zu überwinden. Die dazu erforderliche Energie wird durch den thermodynamisch äußerst stabilen SNARE-Komplex geliefert, bei dessen Bildung freie Energie von etwa 20 kcal/mol entsteht (Sudhof and Rothman, 2009). Nach heutigen Erkenntnissen geht man davon aus, dass die Energie, die bei der Entstehung von nur einem bis drei SNARE-Komplexen freigesetzt wird, für die Fusion ausreicht (Mohrmann et al., 2010, van den Bogaart et al., 2010, Sinha et al., 2011). Nach der Fusion geht der trans-SNARE-Komplex in den cis-SNARE-Komplex über, bei dem alle SNARE-Proteine in der Plasmamembran liegen. Dieser Komplex wird, unter Energieverbrauch, durch die Interaktion von NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) mit α -SNAP (soluble NSF attachment protein) wieder in die einzelnen SNARE-Proteine zerlegt, die dann über Endozytose zurückgewonnen werden können (Whiteheart et al., 1994, Otto et al., 1997, Lin and Scheller, 2000).

Im nachfolgenden Abschnitt wird zum besseren Verständnis der Arbeit detaillierter auf die SNARE-Proteine und deren regulatorische Proteine eingegangen.

2.8.2. v-SNARE-PROTEINE

Synaptobrevin 2 (Latein *brevis*= kurz), auch VAMP2 (vesicle associated membrane protein) genannt, wurde erstmals aus dem Gehirn von Ratten isoliert und als kleines integrales Protein mit einem Molekulargewicht von nur 18 kDa in synaptischen Vesikeln identifiziert

Einleitung

(Baumert et al., 1989). Mäuse, die defizient für Synaptobrevin 2 sind sterben direkt nach der Geburt. Hippokampale Neurone aus diesen Tieren weisen eine nahezu blockierte evozierte und spontane Aktivität auf (Schoch et al., 2001). Neben Neuronen wird Synaptobrevin 2 auch in endokrinen Zellen, die zur Sekretion mittels Exozytose bestimmt sind, exprimiert (Baumert et al., 1989). Synaptobrevin 2 ist mit etwa 70 Kopien pro Vesikel eines der häufigsten Proteine synaptischer Vesikel (Takamori et al., 2006) .

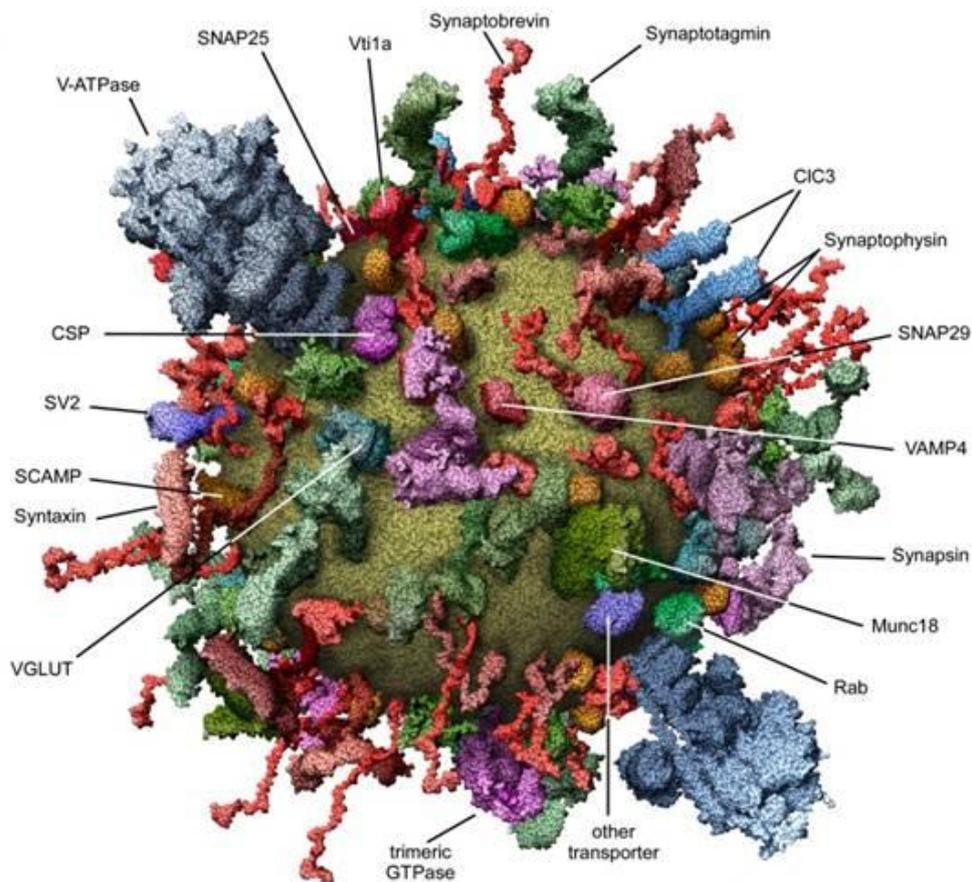


Abb.3: Molekulares Modell eines durchschnittlichen synaptischen Vesikels.

Das Modell basiert auf raumfüllenden Modellen aller Makromoleküle mit nahezu atomarer Auflösung (Takamori et al., 2006).

Mittlerweile wurden viele andere Mitglieder der VAMP-Familie entdeckt, darunter Endobrevin (VAMP 8), das mit Syntaxin 7 und Syntaxin 8 einen Komplex bildet, der die Fusion von Endosomen steuert (Antonin et al., 2000). Proteomstudien zeigten, dass synaptische Vesikel des Zentralnervensystems neben Synaptobrevin 2 auch noch VAMP1 (Synaptobrevin 1), VAMP 3 (Cellubrevin), VAMP4, VAMP7 und vti 1a enthalten (Burre et al., 2006, Takamori et al., 2006), wobei sich diese Isoformen funktionell und in ihrer Lokalisation von Synaptobrevin 2 unterscheiden (Raingo et al., 2012, Ramirez and Kavalali, 2012). Synaptobrevin 1 und 2 stellen die beiden vorherrschenden Isoformen im Zentralnervensystem dar, wobei Synaptobrevin 2 hauptsächlich im Gehirn und Synaptobrevin 1 überwiegend im Rückenmark

Einleitung

exprimiert wird (Elferink et al., 1989). Cellubrevin (VAMP3) wird ubiquitär exprimiert (McMahon et al., 1993). In PC 12-Zellen interagiert Cellubrevin mit Syntaxin 1 und SNAP-25 und scheint eine ähnliche Funktion wie Synaptobrevin 2 zu übernehmen (Chilcote et al., 1995). In chromaffinen Zellen (neuroendokrine Zellen im Nebennierenmark), die sowohl Synaptobrevin 2 als auch Cellubrevin exprimieren sind diese beiden Proteine ebenfalls funktionell redundant (Borisovska et al., 2005).

Durch virale Expression von Cellubrevin konnte die spontane und evozierte Exozytose in Neuronen aus Synaptobrevin 2-knockout Mäusen wiederhergestellt werden (Deak et al., 2006). Genetische Deletion von Cellubrevin und Synaptobrevin 2 führte zu keiner weiteren Verringerung in der synaptischen Transmission gegenüber der Mausmutante, die nur defizient für Synaptobrevin 2 war, was darauf hinweist, dass Cellubrevin im Gegensatz zur Exozytose in chromaffinen Zellen keine physiologische Funktion bei der neuronalen Exozytose einnimmt (Deak et al., 2006).

V-SNARE Proteine besitzen vier funktionell unterscheidbare Domänen. Der N-Terminus umfasst die Aminosäuren 1-30 und reguliert die Exozytosebereitschaft sekretorischer Vesikel (Borisovska et al., 2005). An ihn schließt sich das SNARE-Motiv, bestehend aus 55 Aminosäuren an. Das SNARE-Motiv wird über einen 10 Aminosäuren langen Linker mit der Transmembrandomäne verbunden. Dieser Linker überträgt die mechanische Kraft auf die Transmembrandomäne, was für die Vesikelfusion von Bedeutung ist. Verlängerung der Linkerregion führt vermutlich aufgrund einer abgeschwächten Kraftübertragung zu einer verringerten evozierten Exozytose (Kesavan et al., 2007, Guzman et al., 2010). Die Transmembrandomäne weist eine weitgehend helikale Struktur auf, zeichnet sich aber durch einen hohen Anteil an β -verzweigten Aminosäuren wie Valin und Isoleucin aus, welche die α -Helix destabilisieren und dadurch zur Membranfusion beitragen könnten (Neumann and Langosch, 2011). Die Juxtamembranregion von Syb2 enthält zwei hochkonservierte Tryptophanreste an den Positionen W89/W90. Tryptophane befinden sich aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften häufig am Übergang eines Transmembranproteins von der wässrigen in die lipidhaltige Phase (Al-Abdul-Wahid et al., 2012). Es gibt Hinweise darauf, dass die beiden membran-proximalen Tryptophane für die Positionierung der TMD von Syb2 von Bedeutung sind (Bowen and Brunger, 2006) und möglicherweise einen kritischen Einfluss auf SNARE-Lipid-Interaktionen ausüben (Kweon et al., 2003a, Borisovska et al., 2012).

2.8.3. T-SNARE-PROTEINE

Das Plasmamembranprotein SNAP-25 wird in Neuronen und neuroendokrinen Zellen exprimiert und weist strukturell einige Besonderheiten auf. Es ist ein Q_{bc} -SNARE, das

Einleitung

bedeutet es stellt zwei α -Helices zur Bildung des SNARE-Komplexes zur Verfügung. Die beiden SNARE-Motive befinden sich jeweils am C- und am N-terminalen Ende des Proteins und werden durch eine Cystein-reiche flexible Linkerdomäne miteinander verbunden (Fasshauer et al., 1998, Jahn and Scheller, 2006). SNAP-25 besitzt keine Transmembrandomäne, sondern wird lediglich durch posttranslationale Modifikation von Cysteinen (Palmitoylierung) in der Linkerregion in der Plasmamembran verankert. Es sind zwei Isoformen des Proteins (SNAP-25a und SNAP-25b) bekannt. Diese weisen eine hohe Sequenzhomologie auf, unterscheiden sich aber hinsichtlich der entwicklungsabhängigen Expression (Bark and Wilson, 1994, Boschert et al., 1996). Während im Embryonalstadium zunächst SNAP-25 a exprimiert wird, dominiert die Isoform b im adulten Gehirn. Neueste Befunde unseres Labors liefern Hinweise darauf, dass die Linker-Motive von SNAP-25 eine entscheidende Rolle beim Vesikel-Priming, beim Auslösen der Ca^{2+} -abhängigen Exozytose und bei der Erweiterung der Fusionspore spielen (Shaaban et al., 2019).

Das Plasmamembranprotein Syntaxin 1 hat ein Molekulargewicht von 35 kDa und kommt nur in Neuronen und neuroendokrinen Zellen vor. Syntaxin besteht aus einer C-terminalen Transmembrandomäne, dem SNARE-Motiv (H3-Domäne) einer kurzen Sequenz am N-Terminus, die N-Peptid genannt wird und der N-terminalen H_{abc} -Domäne aus 3 α -Helices (Bennett et al., 1992, Rizo and Xu, 2015). Die H_{abc} -Domäne reguliert die Zugänglichkeit des SNARE-Motivs von Syntaxin 1 für die Bildung des SNARE-Komplexes, indem zwei verschiedene Konformationen erreicht werden können (Rizo and Xu, 2015). In der geschlossenen Konformation beugt sich die H_{abc} -Domäne zurück und bindet reversibel an das SNARE-Motiv von Syntaxin 1, wodurch die Bildung des SNARE-Komplexes verhindert wird. Munc 18-1 interagiert vermutlich sowohl mit dem N-Peptid als auch mit der H_{abc} -Domäne und stabilisiert Syntaxin 1 in der geschlossenen Konformation. Munc 13 überführt die Konformation von Syntaxin 1 von der geschlossenen in die offene Konformation, wodurch das SNARE-Motiv von Syntaxin 1 für die Bildung des SNARE-Komplexes bereitgestellt wird. Es existieren zwei Isoformen des Proteins Syntaxin 1a und Syntaxin 1b, die eine hohe Sequenzhomologie aufweisen, sich aber hinsichtlich ihrer Expressionsmuster unterscheiden (Ruiz-Montasell et al., 1996).

2.8.4. SNARE-REGULIERENDE PROTEINE

Die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Exozytose sekretorischer Vesikel wird durch Proteine vermittelt, die Ca^{2+} binden und zugleich mit den SNARE-Proteinen interagieren. Synaptotagmin 1 ist ein vesikuläres Protein, das den Ca^{2+} -Sensor für die synchrone Transmitterfreisetzung in Neuronen darstellt. Es besteht aus einer N-terminalen TMD und zwei cytoplasmatischen C_2 -Domänen, die eine β -Faltblattstruktur ausbilden und über einen Linker miteinander

verbunden sind. Die C₂A-Domäne von Synaptotagmin bindet drei Ca²⁺-Ionen, wohingegen die C₂B nur zwei Ca²⁺-Ionen bindet (Rizo and Xu, 2015). Proteine mit langsamerer Bindungskinetik für Ca²⁺ wie Synaptotagmin 7 oder Doc2 sind als Ca²⁺-Sensoren bei der asynchronen Transmitterfreisetzung verantwortlich (Kaeser and Regehr, 2014). Eine weitere wichtige Gruppe SNARE-regulierender Proteine stellen die Komplexine dar, von denen bisher vier Isoformen (CplxI bis CplxIV) bekannt sind, die alle überwiegend im Nervensystem exprimiert werden (McMahon et al., 1995, Reim et al., 2005). Die Funktion der Komplexine in der Vesikelfusion wurde bereits in zahlreichen in vitro und in vivo Studien untersucht (siehe Übersichtsartikel (Mohrmann et al., 2015)). Dabei konnten verschiedene funktionelle Strukturkomponenten von Komplexin identifiziert werden, denen man entweder fusionsfördernde oder -hemmende Wirkungen zuschreibt. Die zentrale Helix von Complexin bindet an den SNARE-Komplex und bildet damit die Voraussetzung für die Wirkung von Complexin (McMahon et al., 1995, Bracher et al., 2002). Die fusionsfördernde Funktion von Komplexin wird hauptsächlich durch den endständigen N-Terminus (Aminosäure 1-26) vermittelt, wohingegen die akzessorische α -Helix (Aminosäure 29-47) zusammen mit dem C-Terminus (Aminosäure 73-134) eine zentrale Rolle bei der Inhibierung vorzeitiger Vesikelfusionen spielt (Mohrmann et al., 2015). Nach heutigem Kenntnisstand geht man davon aus, dass Synaptotagmin 1 und CplxI in Wirbeltieren eine antagonistische Rolle einnehmen (Mohrmann et al., 2015). Synaptotagmin 1 aktiviert vermutlich den arretierten Fusionszwischenstadium und fördert die Expansion der Fusionspore ohne Komplexin zu verdrängen.

2.9. Die TRP -Superfamilie

TRP (Transient receptor potential)-Proteine bilden eine Superfamilie von Kationenkanälen, deren erstes Mitglied in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* identifiziert wurde (Montell and Rubin, 1989).

Das *trp*-Gen wird in den Augen der Fliegen exprimiert und wurde dadurch entdeckt, dass ein Lichtreiz in den Photorezeptorzellen der Augen von Fliegen mit einer Mutation im *trp*-Lokus kein anhaltendes, sondern lediglich ein transientes Rezeptorpotential mit einem stark verminderten Ca²⁺-Einstrom auslöste (Hardie and Minke, 1992). Das dafür verantwortliche Genprodukt wurde identifiziert und aufgrund des Phänotyps der Mutante als TRP-Protein bezeichnet. Strukturanalysen zeigten, dass es sich um ein integrales Membranprotein mit mehreren Transmembrandomänen handelt, das eine neue Art von Ca²⁺-permeablen Kationenkanälen darstellt (Montell and Rubin, 1989, Minke, 2010).

Bis heute wurden 27 Mitglieder dieser Proteinfamilie im Menschen und weitere Vertreter in eukaryontischen Modellorganismen entdeckt (siehe Abb.3). Viele von ihnen dienen als zelluläre Sensoren für eine Reihe physikalischer und chemischer Stimuli (Liman et al., 1999,

Einleitung

Wang and Siemens, 2015, Aroke et al., 2020). Sie können sowohl durch exogene Liganden wie Pheromone und pflanzliche Substanzen, aber auch durch intrazelluläre Kationen und Lipid-Komponenten der Plasmamembran reguliert werden (Wu et al., 2010) und spielen bei vielen physiologischen Prozessen wie der Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Homöostase, dem Geschmacks- und Temperaturempfinden, der Knochenentwicklung und der Blutdruckregulation eine Rolle (Freichel et al., 2004, Hoenderop and Bindels, 2008, Dimke et al., 2011).

Anhand von Sequenzhomologien werden die TRP-Proteine in die sieben Subfamilien TRPV („Vanilloid“)-, TRPC („Canonical“)-, TRPM („Melastatin“)-, TRPP („Polycystin“)-, TRPML („Mucolipin“)-, TRPA („Ankyrin“)- und die TRPN („NOMP“)-Subfamilie untergliedert.

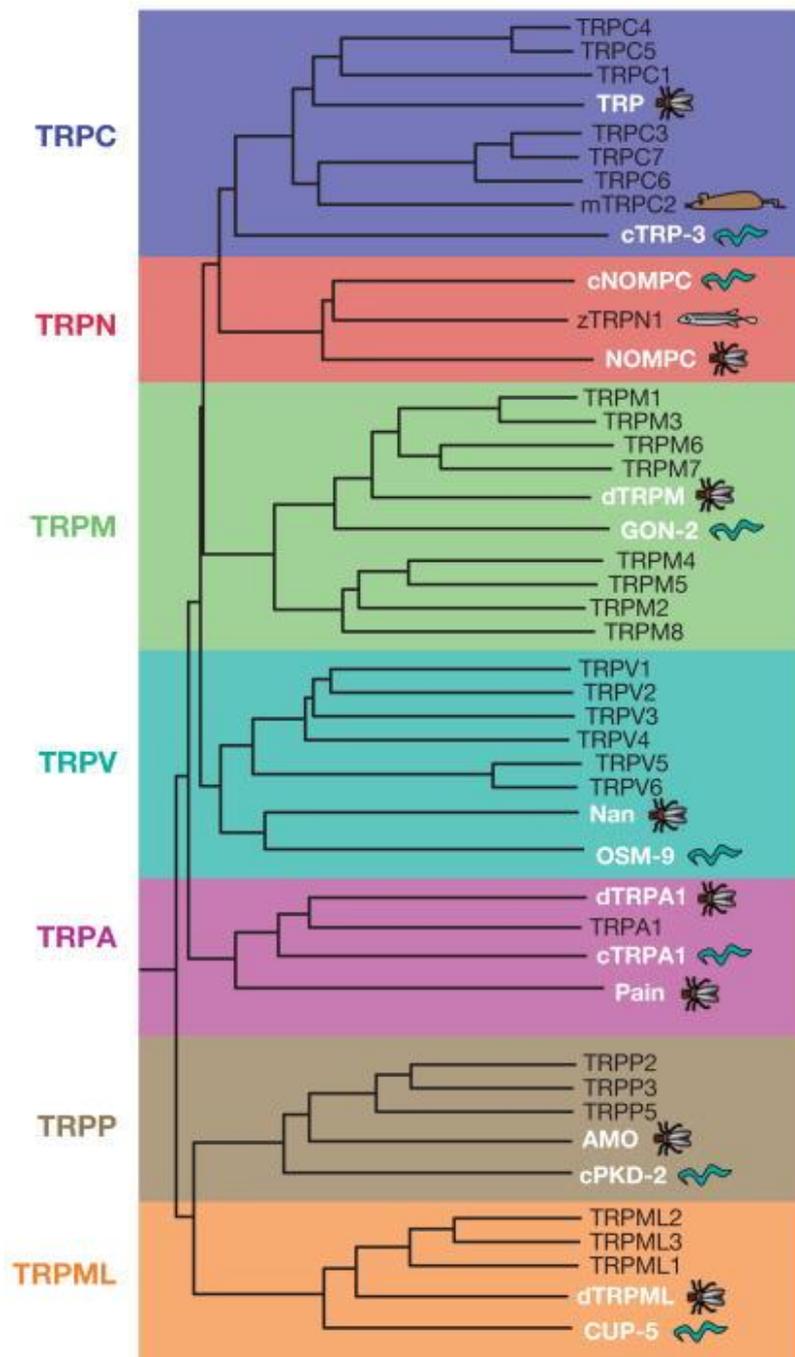


Abb. 3: Phylogenetischer Stammbaum der TRP Proteine. Gezeigt sind überwiegend humane Mitglieder der einzelnen Unterfamilien mit Ausnahme von TRPC2 (Maus) und TRPN1 (Zebrafisch) für die es keinen humanen Vertreter gibt. Vertreter der Subfamilien aus *C. elegans* und *Drosophila melanogaster* werden durch Bilder und Bezeichnung in weißer Schrift hervorgehoben (Venkatachalam and Montell, 2007).

Einleitung

Die Namensgebung der Subfamilie basiert dabei auf der Beschreibung des zuerst entdeckten Proteins der jeweiligen Gruppe (Nilius and Voets, 2005). Als gemeinsame Struktur weisen TRP-Proteine sechs Transmembrandomänen, intrazellulär gelegene C- und N-Termini und eine porenbildende hydrophile Schleife zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne auf. Der funktionelle Kationenkanal wird vermutlich durch die Zusammenlagerung von vier Proteineinheiten gebildet (Tetramerisierung), wodurch eine zentral gelegene Pore in der Membran entsteht (Clapham et al., 2001). Bezüglich der Leitfähigkeit der Pore weisen die TRP-Kanäle hohe Diversitäten auf. Mit Ausnahme von TRPM3 α 1, TRPM4 und TRPM5 sind alle permeabel für Ca²⁺ (Wu et al., 2010). Die Einteilung der TRP-Familie in zwei Gruppen (s. Abb. 4) beruht auf Sequenz- und Topologieähnlichkeiten. Während die Mitglieder der ersten Gruppe, vor allem die TRPCs, die größte Gemeinsamkeit zum ursprünglichen *Drosophila*-Gen besitzen, weisen die Mitglieder der zweiten Gruppe nur einen entfernten Verwandtschaftsgrad auf und unterscheiden sich strukturell zu den Mitgliedern der Gruppe 1 durch eine große Schleife zwischen den Transmembrandomänen eins und zwei (Venkatachalam and Montell, 2007).

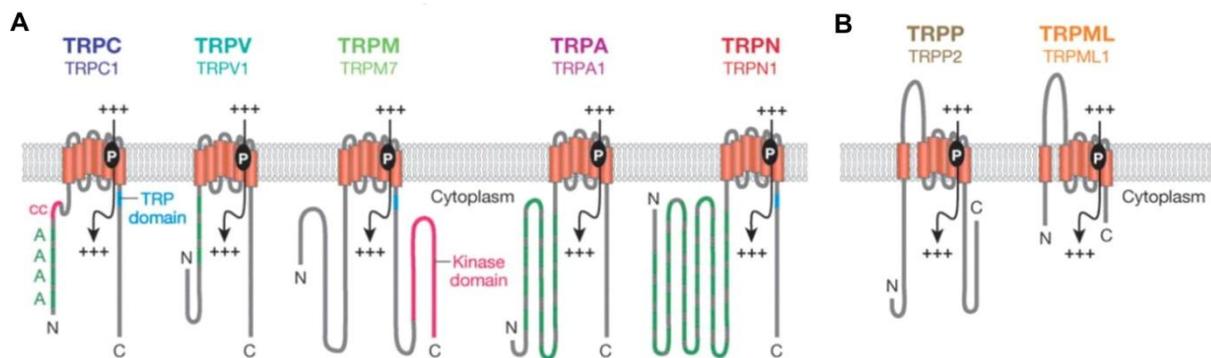


Abb. 4: Die TRP-Superfamilie. **A** Darstellung von Vertretern aus jeder Unterfamilie der ersten und **B** der zweiten Gruppe der TRP-Kanäle. Gezeigt ist die charakteristische 6 TMD-Topologie der Proteine und die Lage der kationenleitenden Porenregion (P). Sowohl N- als auch C-Terminus liegen intrazellulär. A: Ankyrinrepeats (grün), cc: „coiled coil“-Domäne (Venkatachalam and Montell, 2007).

Die Bedeutung der TRP-Kanäle für den Menschen wird durch verschiedene genetische Erkrankungen, die auf Mutationen in TRP-Kanalgenen beruhen, veranschaulicht. Dazu gehört beispielsweise die familiäre fokale sklerosierende Glomerulonephritis, eine Erkrankung der Niere, die auf eine Mutation im *trpc 6*-Gen zurückzuführen ist (Winn et al., 2005).

2.9.1. DIE TRPC -SUBFAMILIE

Die TRPC (canonical)-Subfamilie besteht aus sieben Mitgliedern (TRPC1-7), die nicht-selektive Kationenkanäle bilden. TRPC-Kanäle können durch Stimulation der Phospholipase C über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Venkatachalam and Montell, 2007), als Folge der Entleerung der Ca^{2+} -Speicher (Zitt et al., 1996, Salido et al., 2009) oder durch intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen (Blair et al., 2009, Gross et al., 2009) aktiviert werden. TRPC-Kanäle sind im Gehirn weitverbreitet und in vielfältige neuronale Prozesse wie motorische Koordination (Hartmann et al., 2008), neuronale Erregbarkeit (Faber et al., 2006), Exzitotoxizität (Phelan et al., 2013), Neurogenese und Neuritenwachstum (Greka et al., 2003) involviert.

Basierend auf Sequenzhomologien werden die TRPC-Kanäle den drei Untergruppen TRPC2, TRPC1/TRPC4/TRPC5 und TRPC3/TRPC6/TRPC7 zugeordnet (Wu et al., 2010). *TrpC2* ist im Menschen ein Pseudogen. In Mäusen und Ratten wird *trpc2* ausschließlich in den Hoden und im Vomeronasalorgan exprimiert und ist für das Pheromon-induzierte Aggressionsverhalten verantwortlich (Liman and Innan, 2003, Lucas et al., 2003). Die Kanäle TRPC3/TRPC6/TRPC7 können neben den bereits erwähnten Mechanismen auch direkt durch DAG aktiviert werden, wobei die PKC, welche die TRPC-Kanalaktivität inhibiert, blockiert werden muss (Huang et al., 2011). In heterologen Expressionssystemen konnte gezeigt werden, dass TRPC4 und TRPC5 sowohl homotetramere als auch heterotetramere Kanäle innerhalb der TRPC1/TRPC4/TRPC5-Gruppe bilden können (Hofmann et al., 2002). Interaktionen mit Mitgliedern der TRPC3/TRPC6/TRPC7-Untergruppe konnten jedoch nicht nachgewiesen werden. Anhand von immunhistochemischen Färbungen und in situ-Hybridisierung wurde darüber hinaus gezeigt, dass *trpc1*, *trpc4* und *trpc5* in Subregionen des Hippokampus koexprimiert werden (Strubing et al., 2001, Freichel et al., 2005, Fowler et al., 2007). In heterologen Expressionssystemen wird die TRPC5- und TRPC4-Kanalaktivität durch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verstärkt. Weiterhin ist die Potenzierung der TRPC5-Kanalaktivität von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration abhängig (Blair et al., 2009). In Bezug auf den TRPC5-Kanal konnte eine direkte Aktivierung durch intrazelluläre Ca^{2+} nachgewiesen werden. In dieser Studie wurde auch gezeigt, dass die TRPC5-Kanalaktivität durch Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle über spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle verstärkt wird (Gross et al., 2009). TRPC1-Kanäle werden im Gegensatz dazu nicht direkt durch einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert (Cheng et al., 2011). Die Aktivität der TRPC-Kanäle wird auch durch ihre Exposition auf der Plasmamembran reguliert. TRPC1-Kanäle können durch einen über Orai1-vermittelten lokalen Ca^{2+} -Einstrom in die Plasmamembran inseriert werden (Cheng et al., 2011). Ebenso wird die Insertion von vesikulärem TRPC1 in die Plasmamembran durch Koexpression mit TRPC4 begünstigt (Hofmann et al., 2002). In heterologen Expressionssystemen konnte

Einleitung

gezeigt werden, dass homomere TRPC5-Kanäle, die in Vesikeln unter der Membran vorliegen durch Stimulation des EGF (epidermal growth factor)-Rezeptors in die Plasmamembran integriert werden (Bezzarides et al., 2004). TRPC5 und TRPC4 sind vermutlich beim angeborenen Angstverhalten, das durch Neurone in der Amygdala vermittelt wird, von Bedeutung (Ricchio et al., 2009, Ricchio et al., 2014). Sowohl für TRPC1 als auch für TRPC5 gibt es Hinweise darauf, dass sie das Neuronenwachstum regulieren (Greka et al., 2003, Kerstein et al., 2013). TRPC1/TRPC4/TRPC5-triple-defizitäre Mäuse besitzen ein beeinträchtigt räumliches Arbeitsgedächtnis und weisen eine verminderte Fähigkeit zum Umlernen auf (Broker-Lai et al., 2017). Diese Beeinträchtigungen können vermutlich auf die reduzierte synaptische Transmission in den hippocampalen Neuronen dieser Tiere zurückgeführt werden. Während bekannt ist, dass TRPC1/TRPC4/TRPC5-Kanäle bei der Bildung von Ca^{2+} -Signalen in sekretorischen Zellen involviert sind (Philipp et al., 1998, Strubing et al., 2001, Greka et al., 2003, Bezzarides et al., 2004), ist ihre Rolle bei der Ca^{2+} -abhängigen Transmitterfreisetzung bisher noch weitgehend unklar und wird kontrovers diskutiert (Kim et al., 2003, Ricchio et al., 2014).

3. ZIELSETZUNG

Die Proteine TRPC1, TRPC4 und TRPC5 werden im Hippokampus exprimiert und bilden nicht-selektive Kationenkanäle. Welche Bedeutung diese Ca^{2+} -permeable Kanäle in der Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration spielen ist bisher jedoch noch weitgehend unbekannt, ebenso wie ihre subzelluläre Lokalisation. Um die Rolle der TRPC-Kanäle in der synaptischen Transmission zu untersuchen sollen in dieser Arbeit hippokampale Neuronenkulturen von TRPC1/C4/C5-triple defizitären und Wildtyp-Mäusen mit einer Kombination elektrophysiologischer und fluoreszenzmikroskopischer Methoden untersucht und vergleichend analysiert werden. Um neue Einblicke in die elementaren Mechanismen der TRPC-Kanalaktivierung zu gewinnen soll die Auswirkung eines Überangebots an TRPC-Kanälen auf die synaptische Transmission mit Hilfe eines lentiviralen Expressionssystems untersucht werden. Aufgrund fehlender spezifischer Antikörper gegen TRPC-Kanäle soll die lentivirale Expression von *trpc1* als Fusionskonstrukt mit dem Fluorophor YFP dazu herangezogen werden, die subzelluläre Lokalisation des TRPC1- Proteins anhand hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie zu bestimmen. Um neue Erkenntnisse über die Funktion der TRPC-Kanalaktivierung zu gewinnen, soll darüber hinaus eine spezifische Aktivatorsubstanz für TRPC1/C4/C5-Kanäle gefunden werden.

Die Ca^{2+} -abhängige Vesikelfusion ist das elementare Ereignis für die Freisetzung von Neurotransmittern aus der Präsynapse und bildet damit die Grundlage für die synaptische Transmission. Die molekularen Mechanismen, welche der Exozytose zugrunde liegen im Detail aufzuklären, trägt wesentlich zum Verständnis der Signalgebung und der Plastizität der Informationsverarbeitung im Zentralnervensystem bei. Im zweiten Teil dieser Arbeit soll die Bedeutung der Transmembrandomäne des synaptischen Proteins Synaptobrevin 2 für die Ca^{2+} -gesteuerte Exozytose aufgeklärt werden. Dieses Ziel soll ausgehend von Syb2ko-Neuronen, die nahezu keine Exozytose aufweisen (Schoch et al., 2001), mit einer Kombination aus elektrophysiologischen Messverfahren und Fluoreszenzmikroskopie erreicht werden. Durch lentiviralen Gentransfer sollen Syb2-Varianten mit mutierter TMD in Syb2-ko-Neuronen exprimiert und mit Hilfe elektrophysiologischer Messungen funktionell charakterisiert werden. Dadurch sollen strukturelle Eigenschaften der TMD identifiziert werden, die für die Funktion des Proteins von wesentlicher Bedeutung sind.

Die TMD von Syb2 enthält zwei hochkonservierte Tryptophane am Übergang vom wässrigen zum lipidhaltigen Milieu, welche den Insertionswinkel der TMD von Syb2 in der vesikulären Membran bestimmen. Im dritten Teil dieser Arbeit wird das Ziel verfolgt, die Bedeutung dieser beiden amphiphilen Aminosäuren für die Ca^{2+} -abhängige Exozytose aufzuklären. Es soll dabei analog zur in Teil 2 gewählten Methodik vorgegangen werden.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. Material

4.1.1. CHEMIKALIEN

2-Amino-5-phosphonovaleriansäure	Abcam Biochemicals, UK
Acrylamid/ Bisacrylamid	Roth
Agarose Typ II	Sigma
Agarose	GE Healthcare
Albumin	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Ampicilin	Sigma
Borsäure	Sigma
Bradford -Reagenz	BioRad, USA
brain derived neurotrophic factor	Promega
brain derived neurotrophic factor	Sigma
Cystein	Sigma
Dimethylsulfoxid	Sigma
Dithiotreitol	Roth
EDTA (Ethylendiamin-Tetraacetat)	Sigma
EGTA-AM	Merck
(-)-Englerin A	Roth
Ethidiumbromid	Invitrogen
Glycin	Sigma
Hefeextrakt	Roth
HEPES	Sigma
Kalziumchlorid	Merck
Magnesiumchlorid	Sigma
MITO+Serum Extender	Corning
N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin	BioRad
Natriumborat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Paramethylsulfonylfluorid	Roth
Poly-D-lysine hydrobromide	Sigma
Proteinase K	Qiagen
Riluzol	Sigma
Saccharose	Roth
Sodiumdodecylsulfat	Sigma

Material und Methoden

Tetrodotoxincitrat	Abcam Biochemicals, UK
Tris Base	Sigma
Tris HCl	Roth
Triton X-100	Sigma
Trypsin-Inhibitor	Sigma
Trypton	Roth
Tween -20	Sigma

Salpetersäure wurde von VWR bezogen, alle anderen Säuren und Laugen wurden von der Firma Merck erworben. Vergällter Ethanol wurde aus dem zentralen Chemikalienlager der Universität des Saarlandes erhalten. Ethanol, Methanol, Isopropanol und Aceton wurden in p.A. Qualität vom Hersteller Merck bezogen.

4.1.2. VERWENDETE KITS

Für die Genotypisierung wird das KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit (PEQLab) verwendet. Plasmide werden mit dem PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit (Thermo Fisher Scientific) oder dem Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen) präpariert. Die Durchführung erfolgt jeweils entsprechend den Angaben des Herstellers.

4.1.3. PUFFER, MEDIEN UND LÖSUNGEN

Molekularbiologie

Medien und Puffer für die Molekularbiologie werden mit demineralisiertem Wasser angesetzt.

- LB-Medium: 10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; 1 ml 1 M NaOH; ad 1L
- Agarplatten mit Ampicillin: 10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; 1 ml 1 M NaOH; 3,75 g Agar; 150 mg Ampicillin; ad 1L
- 50x TAE-Puffer: 96,8 g Tris Base; 22,8 ml Eisessigsäure; 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0); ad 400 ml
- 1,8 % Agarosegel: 1,8 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer, nach dem Lösen der Agarose durch Erhitzen der Lösung in der Mikrowelle werden 10 µl Ethidiumbromid zugegeben
- DNase und RNase-freies Wasser für die Molekularbiologie (Sigma)
- SNET-Puffer: 20 mM Tris-HCL; 5 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1 % SDS

Zellkultur

Alle Medien und Lösungen für die Zellkultur wurden, sofern nicht anders vermerkt, von der Firma Thermo Fisher Scientific bezogen. Die verwendeten Kulturmedien werden an der Sterilbank (Safe 2020, Thermo Scientific oder Herasafe, Heraeus) angesetzt und durch einen Sterilfilter (Stericup, Millipore) filtriert. Vor dem Gebrauch werden alle Medien und Lösungen im Wasserbad (Mettler) bei 37 °C aufgewärmt.

- 0,1 M Boratpuffer: 0,05 M H₃BO₃; 0,024 M Na₂B₄O₇ x 10 H₂O; pH-Wert 8,5 mit HCl eingestellt
- Enzymlösung: 2 mg Cystein; 10 ml DMEM; 0,1 µl 100 mM CaCl₂; 200 U Papain (Worthington)
Die Lösung wird 5-10 Min. mit Carbogas equilibriert und dann steril filtriert.
- Inaktivierungslösung: 25 mg Albumin, 25 mg Trypsin-Inhibitor, 1 ml FCS, 9 ml DMEM
- 10 % FCS-Medium: 225 ml DMEM, 25 ml FCS, 250 µl MITO+ *Serum Extender*, 0,5 ml Pen/Strep
- NBA-Medium: 500 ml Neurobasal A, 10 ml B27 Supplement, 5 ml Glutamax, 1 ml Pen/Strep
- Complete-Medium: 225 ml DMEM; 25 ml FCS; 500 µl Pen/Strep; 2,5 ml NEAA (non-essential amino acids); 2,5 ml Sodium Pyruvat

CaPO₄-Transfektion

- 2x HBS: 280 mM NaCl; 50 mM HEPES; 1,5 mM NaH₂PO₄; pH 7,05

Proteinbiochemie

- Homogenisierungspuffer: 130 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Hepes, 2 % (w/v) Triton X 100, 1 mM PMSF, 1x Complete Protease Inhibitor (Roche)
- 4x Trenngelpuffer: 1,5 M Tris HCl; 0,4 % SDS (w/v); pH 8,8
- 4x Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris HCl; 0,4 % SDS (w/v); pH 6,8
- 5x SDS-PAGE Probenpuffer: 0,312 M Tris HCl, 10 % (w/v) SDS, 25 % (w/v) Glycerin, 25 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
- 10x SDS-Elektrophoresepuffer: 0,25 M Tris HCl; pH 8,3; 1,92 M Glycin; 1 % (w/v) SDS)
- Transferpuffer: 1x SDS-Elektrophoresepuffer, 20 % (v/v) Methanol)
- 10x SDS-Elektrophoresepuffer: 0,2 M Tris HCl; pH 8,3; 1,92 M Glycin; 1 % (w/v) SDS

Material und Methoden

- Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific)
- Entwickler: Carestream Kodak autoradiography developer/ replenisher (Sigma)
- Fixierer: Carestream Kodak autoradiography fixer (Sigma)
- 10x PBS: 1,36 M NaCl, 25 mM KCl, 15 mM KH₂PO₄, 65 mM Na₂HPO₄
- Ponceau-Färbelösung: 0,5 % (w/v) Ponceau, 1 % (v/v) Essigsäure, ad 500 ml mit dH_2O
- Blockierlösung: 5 % (w/v) Magermilch; 0,05 (w/v) % Tween 20 in 1x PBS
- Waschlösung: 1 % (w/v) Magermilch; 0,05 % (w/v) Tween 20 in 1x PBS
- TBST : 50 mM Tris HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1 % (w/v) SDS
- Stripping Puffer: 62,5 mM Tris HCl pH 6,8; 2 % (w/v) SDS; 0,7 % β -Mercaptoethanol

Elektrophysiologie

Lösungen für die Elektrophysiologie werden mit doppelt destilliertem Wasser (dH_2O) aus der Reinstwasseranlage (Milli-Q, Merck Millipore) hergestellt und steril filtriert. Kalziumchlorid wird aus einer 1 M Stammlösung (Sigma) entnommen.

- Intrazellulärlösung: 137,5 mM K-Gluconat; 11 mM NaCl; 2 mM MgATP; 0,2 mM Na₂GTP; 1,1 mM EGTA; 11 mM HEPES; 11 mM D-Glucose; pH-Wert 7,3
- Standardextrazellulärlösung: 130 mM NaCl; 10 mM NaHCO₃; 2,4 mM KCl; 2 mM CaCl₂; 2 mM MgCl₂; 10 mM HEPES; 10 mM D-Glucose; pH-Wert eingestellt mit NaOH auf 7,3
- Saccharoselösung: 500 mM Saccharose in Extrazellulärlösung
- BDNF wird in einer Stammlösung mit 0,1 % BSA in Extrazellulärlösung angesetzt, aliquotiert und bis zum Versuchstag bei -20 °C aufbewahrt. Zur Perfusion der Zellen wird eine Endkonzentration von 100 ng/ml BDNF in Extrazellulärlösung mit 0,1 % BSA verwendet.
- Riluzolstammlösung wird in DMSO angesetzt, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Diese wird am Versuchstag mit Extrazellulärlösung auf eine Endkonzentration von 25-50 μM Riluzol verdünnt und für Perfusionsexperimente verwendet.
- (-)-Englerin A wird in einer Stammlösung in DMSO angesetzt, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Zur Perfusion der Neurone wird diese mit Extrazellulärlösung auf eine Endkonzentration von 100 nM verdünnt.

Immunzytochemie

- 1x PBS: 137 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; KH₂PO₄; pH-Wert 7,2-7,4
Osmolarität ~ 290 mOsm/kg

- Fixierlösung: 4 % (w/v) PFA in 1x PBS, pH-Wert 7,4
- Quenching-Puffer: 0,1 g NH₄Cl in 40 ml 1x PBS
- Blocking-Puffer: 7,5 g BSA ; 0,375 g Triton X100; in 250 ml 1x PBS

4.1.4. ANTIKÖRPER

Primärantikörper

Tabelle 1 listet die verwendeten Primärantikörper auf, die zum Nachweis der entsprechenden Proteine mittels Western Blot Analyse oder für Immunfluoreszenzfärbungen verwendet wurden.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Primärantikörper

Antikörper	Wirtstier	Herkunft	Verdünnung Western Blot	Verdünnung Immunfluoreszenz
α-Synaptobrevin 2 (69.1)	Maus monoklonal	R. Jahn	1:1000	1:1000
α-Synaptophysin	Kaninchen polyklonal	Synaptic Systems	/	1:1000
α-Synapsin I	Maus monoklonal	Synaptic Systems	/	1:1000
α-GFP	Kaninchen polyklonal	Synaptic Systems	1:1000	1:1000
α-GAPDH	Kaninchen polyklonal	Sigma	1:2500	/

Sekundärantikörper

Tabelle 2 führt die verwendeten Sekundärantikörper mit den entsprechenden Verdünnungen für die Anwendung im Western Blot oder in der Immunfluoreszenz auf.

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper

Name	Wirtstier	Hersteller	Verdünnung Western Blot	Verdünnung Immunfluoreszenz
HRP-conjugated goat anti-rabbit	Ziege	Pierce	1:1000	
HRP-conjugated goat anti-mouse	Ziege	Pierce	1:1000	
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse	Ziege	Invitrogen		1:2000
Alexa Fluor 543 goat anti-mouse	Ziege	Invitrogen		1:2000
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit	Ziege	Invitrogen		1:2000
Alexa Fluor 543 goat anti-mouse	Ziege	Invitrogen		1:2000

4.2. Methoden

4.2.1. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

4.2.1.1. Transformation von Plasmid-DNS in Bakterien

Plasmid-DNS wird in chemisch-kompetente Bakterien des Stamms *E. coli Stbl3TM* (Invitrogen) transformiert. Dazu wird zunächst ein Ansatz aus 50 µl Bakterien und 500 ng Plasmid-DNS hergestellt und 20 Min. auf Eis inkubiert. Um die Transformationseffizienz zu erhöhen wird danach ein Hitzeschock für eine Minute bei 42 °C im Wasserbad durchgeführt und der Ansatz im Anschluss erneut 10 Min. auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl LB-Medium wird der Ansatz 45 Minuten bei 37 °C auf dem Schüttler bei 450 rpm inkubiert. Es werden 250 µl des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten mit 150 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgt über Nacht in einem 37 °C-Brutschrank.

Zur Transfektion der Neurone werden für Syb2-Wt oder für mutierte Varianten von Syb2 kodierende cDNSS in einen lentiviralen Transfervektor (pRRL.sin.cPPT.CMV.WPRE) kloniert. Um transfizierte Zellen identifizieren zu können wird Syb2 als Fusionskonstrukt mit dem Fluorophor mRFP (monomeric red fluorescent protein) exprimiert, wobei mRFP über einen neun Aminosäuren langen Linker (GGSGGSGGT) an den C-Terminus von Syb2 gekoppelt ist. Die klonierten Konstrukte werden mittels DNS-Sequenzanalyse überprüft (MWG Biotech, Deutschland). Alle verwendeten Konstrukte wurden von Dr. Yvonne Schwarz zur Verfügung gestellt.

4.2.1.5. Genotypisierung

Syb2-knockout Mäuse

Von allen Tieren, die für die Versuche verwendet wurden, musste der Genotyp bestimmt werden. Dazu wird die genomische DNS aus Schwanzbiopsien embryonaler Mäuse zunächst extrahiert, um sie in der anschließenden PCR (polymerase chain reaction) als Matrize einsetzen zu können. Das Gewebestück wird in 400 µl SNET-Puffer, dem 8 µl Proteinase K zugegeben wurden, während mehrstündiger Inkubation im Heizblock (56 °C, 550 rpm) aufgelöst. Nach Abzentrifugieren ungelöster Bestandteile bei 13.000 rpm für 5 Min. wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 400 µl Isopropanol versetzt, um die DNS auszufällen. Die präzipitierte DNS wird durch 10 Min. Zentrifugation bei 13.000 rpm auf dem Boden des Reaktionsgefäßes sedimentiert. Nach Entfernen des Isopropanols wird das DNS-Pellet mit 400 µl 100 % Ethanol gewaschen (13.000 rpm, 5 Min.), bei 37 °C getrocknet und in 200 µl H₂O resuspendiert.

Zur Bestimmung des Genotyps werden zwei getrennte PCR-Reaktionen, eine für das Wt- und eine für das Mutanten-Allel angesetzt (s. Tab.3.).

Tab.3: 1 x PCR-Ansatz für die Syb2-Wildtyp- bzw. Syb2-Mutante-Reaktion

Syb2-Wildtyp Reaktion		Syb2-Mutante Reaktion	
H ₂ O (Sigma)	22 µl	H ₂ O (Sigma)	22 µl
10x PCR Puffer	3 µl	10x PCR Puffer	3 µl
MgCl ₂	0,5 µl	MgCl ₂	0,5 µl
Syn_Wt1 (50 pmol/µl)	0,5 µl	1910 (50 pmol/µl)	0,5 µl
Syn_Wt2 (50 pmol/µl)	0,5 µl	1911 (50 pmol/ µl)	0,5 µl

Material und Methoden

dNTP's (4x 10 µmol)	0,5 µl	dNTP's	0,5 µl
Red Taq Polymerase	3 µl	Red Taq Polymerase	3 µl
27 µl PCR-Mix + 3 µl DNS		27 µl PCR-Mix + 3 µl DNS	

Verwendete Oligonukleotide:

Syb2-Wildtyp Reaktion: Syn_Wt1 5' -GCC CAC GCC GCA GTA CCC GGA TG-3'

Syn_Wt2 5' -GCG AGA AGG CCA CCC GAT GGG AG-3'

Syb2-Mutante Reaktion: 1910 5' -CAC CCT CAT GAT GTC CAC CAC-3'

1911 5' -CAG CAG ACC CAG GCC CAG CG-3'

Die PCR-Reaktion wurde im Thermocycler (T3.000 oder T1, Biometra) gemäß dem folgendem Programm durchgeführt:

Synaptobrevin Wildtyp-Reaktion:

- | | | | | |
|----|-------|-------------|---|-----------|
| 1. | 95 °C | 5 Min. | | |
| 2. | 95°C | 50 s | } | 35 Zyklen |
| 3. | 55 °C | 45 s | | |
| 4. | 65 °C | 1 Min. 30 s | | |
| 5. | 65 °C | 10 Min. | | |

Synaptobrevin Mutanten-Reaktion:

- | | | | | |
|----|-------|---------|---|-----------|
| 1. | 95 °C | 4 Min. | | |
| 2. | 95°C | 30 s | } | 40 Zyklen |
| 3. | 60 °C | 30 s | | |
| 4. | 72 °C | 2 Min. | | |
| 5. | 72 °C | 10 Min. | | |

Die Produkte der PCR-Reaktion werden auf ein 1,8 % (w/v) Agarosegel aufgetragen und unter Einwirkung eines elektrischen Feldes (120V) in Richtung Anode beschleunigt. Im Agarosegel unterliegen die DNA-Fragmente dem Molekularsiebeffekt und werden daher abhängig von ihrer Größe unterschiedlich schnell transportiert. Als Größenstandard wird der 2 log DNS Marker der Firma NEB mitgeführt. Zur Identifizierung der amplifizierten PCR-Produkte enthält das Agarosegel den, in doppelsträngige DNA interkalierenden, Farbstoff Ethidiumbromid. Die amplifizierten PCR-Produkte (erwartete Produktgröße für beide Reaktionen 350 bp, siehe Abb. 5) werden durch Anregung des Ethidiumbromids mit UV-Licht sichtbar gemacht. Die erhaltenen Signale werden mit einer Kamera aufgenommen.

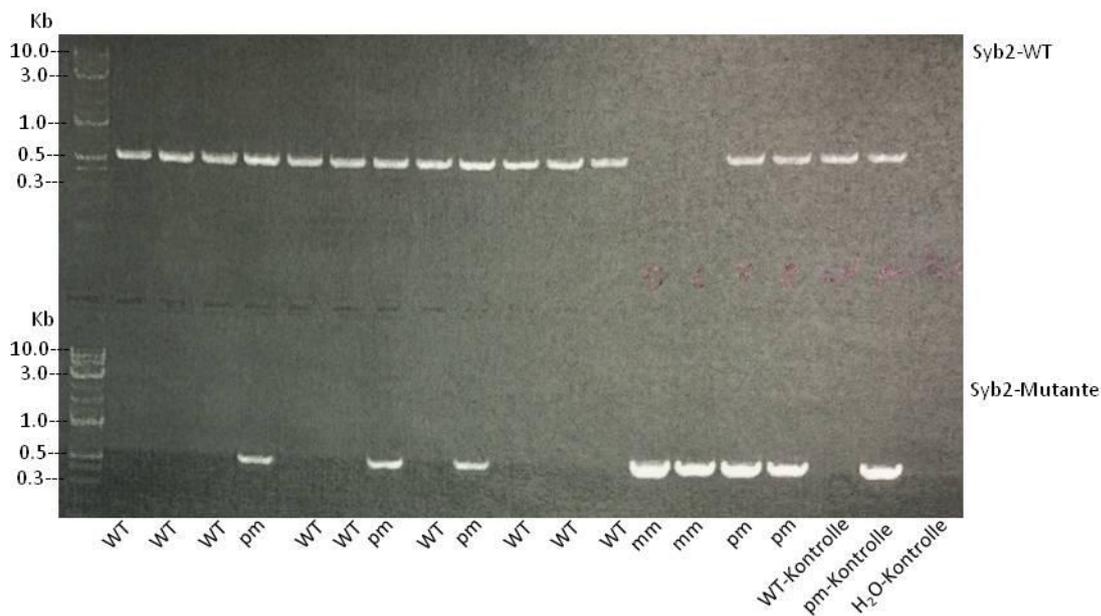


Abb. 5: Beispiel für eine Syb2-Genotypisierungsreaktion. Wt- oder Mutantenallel werden mit Hilfe von zwei getrennten PCR-Reaktionen nachgewiesen. DNA aus Wt-Mäusen liefert nur in der Syb2-Wt-Reaktion ein Amplifikationsprodukt. Aus der DNA von Syb2-knockout-Mäusen (mm) wird nur in der Syb2-Mutantenreaktion ein PCR-Produkt gebildet. Aus der DNA heterozygoter Tiere (pm) wird in beiden Reaktionen ein PCR-Produkt hergestellt. Als Größenstandard wurde der 2-log-DNA-Marker verwendet. DNA von Tieren mit bereits bekanntem Genotyp (Wt und pm) sowie eine Reaktion mit H₂O anstelle von DNA (Leerkontrolle) wurden als Kontrollen mitgeführt.

TRPC1/C4/C5^{3/-} knockout Mäuse

Für die Genotypisierung der TRPC1/C4/C5^{3/-} knockout Mäuse wird das KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit des Herstellers PEQLab verwendet.

Die genomische DNS der Mäuse (P0-P2) wird aus Schwanzbiopsien (0,3- 0,5 cm) erhalten. Dazu wird das Gewebestück in einem Gemisch aus 88 µl H₂O, 10 µl Fast Extract Buffer und 2 µl Fast Extract Enzyme 30 Min. bei 75 °C auf dem Schüttler inkubiert, um das Gewebe aufzulösen. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgt bei 95 °C für 30 Min. Es werden 100 µl H₂O

zugegeben, gemischt und 2 Min. bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in der anschließenden PCR-Reaktion eingesetzt.

Zur Identifizierung des Genotyps werden für TRPC1 und TRPC4 jeweils getrennt eine Mutanten- und eine Wildtyp-Reaktion durchgeführt. Der Nachweis des TRPC5-Wildtyp- bzw. TRPC5-Mutanten-Allels erfolgt in einer gemeinsamen PCR-Reaktion.

In den folgenden Tabellen sind die PCR-Ansätze der verschiedenen Reaktionen dargestellt:

Tab. 4: 1 x PCR-Ansatz für die TRPC1-Wildtyp- bzw. TRPC1-Mutante-Reaktion

TRPC1			
TRPC1-Wildtyp-Reaktion		TRPC1-Mutante- Reaktion	
H ₂ O (Sigma)	13,25µl	H ₂ O (Sigma)	13,25µl
DMSO	1,25 µl	DMSO	1,25 µl
MgCl ₂	0,5 µl	MgCl ₂	0,5 µl
C1_01 (50 pmol)	1,25 µl	C1_02 (50 pmol)	1,25 µl
C1_03 (50 pmol)	1,25 µl	C1_04 (50 pmol)	1,25 µl
Kapa GT Mix	6,25 µl	Kapa GT Mix	6,25 µl
24 µl PCR-Mix + 1 µl DNS		24 µl PCR-Mix + 1 µl DNS	

Tab. 5: 1 x PCR-Ansatz für die TRPC4-Wildtyp- bzw. TRPC4-Mutante-Reaktion

TRPC4			
TRPC4-Wildtyp-Reaktion		TRPC4-Mutante- Reaktion	
H ₂ O (Sigma)	13,25µl	H ₂ O (Sigma)	13,25µl
DMSO	1,25 µl	DMSO	1,25 µl
MgCl ₂	0,5 µl	MgCl ₂	0,5 µl
KO_15 (50 pmol)	1,25 µl	KO_15 (50 pmol)	1,25 µl
KO_40 (50 pmol)	1,25 µl	NeoPa (50 pmol)	1,25 µl

Material und Methoden

Kapa GT Mix	6,25 µl	Kapa GT Mix	6,25 µl
24 µl PCR-Mix + 1 µl DNS		24 µl PCR-Mix + 1 µl DNS	

Tab. 6: 1 x PCR-Ansatz für die TRPC5-Wildtyp-/Mutante-Reaktion

TRPC5	
H ₂ O (Sigma)	13,25µl
DMSO	1,25 µl
MgCl ₂	0,5 µl
C5_08 (50 pmol)	1,25 µl
C5_09 (50 pmol)	1,25 µl
C5_10 (50 pmol)	1,25 µl
Kapa GT Mix	6,25 µl
24 µl PCR-Mix + 1 µl DNS	

verwendete Oligonukleotide:

TRPC1-Wildtyp:	C1_01	5' -GAG ACT GTT GTC ACA AGA TGC- 3'
	C1_03	5' -ACT TTG AGG GCA AAG GTT GCC- 3'
TRPC1-Mutante	C1_02	5' -TCA GTT AAT GTC CCA TTC CGG C- 3'
	C1_04	5' -AGA GGC CAC TTG TGT AGC GC- 3'
TRPC4-Reaktionen:	KO-15	5' -AGA GTG CTC TGA ACC CAC GG- 3'
	KO-40	5' -CTC GCA CCG GAT GCC TTT GC- 3'
	Neo Pa	5' -GCC TGC TCT TTA CTG AAG GCT CT- 3'
TRPC5-Reaktionen:	C5_08	5' -CTA GCC TAG ACA TAC AAC ACA G- 3'
	C5_09	5' -GAC AGC TGA GCT CCC TAT TG- 3'

Material und Methoden

C5_10 5' -CAA GGC CAT CAA TTA CCA GAC-3'

Die PCR-Reaktionen werden im Thermocycler (T3.000 oder T1, Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt:

1.	94 °C	1 Min. 30 s	
2.	94°C	30 s	} 10 Zyklen (* pro Zyklus 0,5 °C weniger)
3.	65 °C*	30 s	
4.	72 °C	30 s	
5.	94 °C	30 s	} 26 Zyklen
6.	60°C	30 s	
7.	72 °C	30 s	
8.	72°C	5 min	

Die amplifizierten Produkte werden wie zuvor bereits beschrieben mittels Gelelektrophorese nachgewiesen (erwartete Bandengröße: TRPC1: Wt 549 bp, Mut 460 bp; TRPC4: Wt 290 bp, Mut 364 bp; TRPC5: Wt 192 bp, Mut 232 bp, siehe Abb. 6).

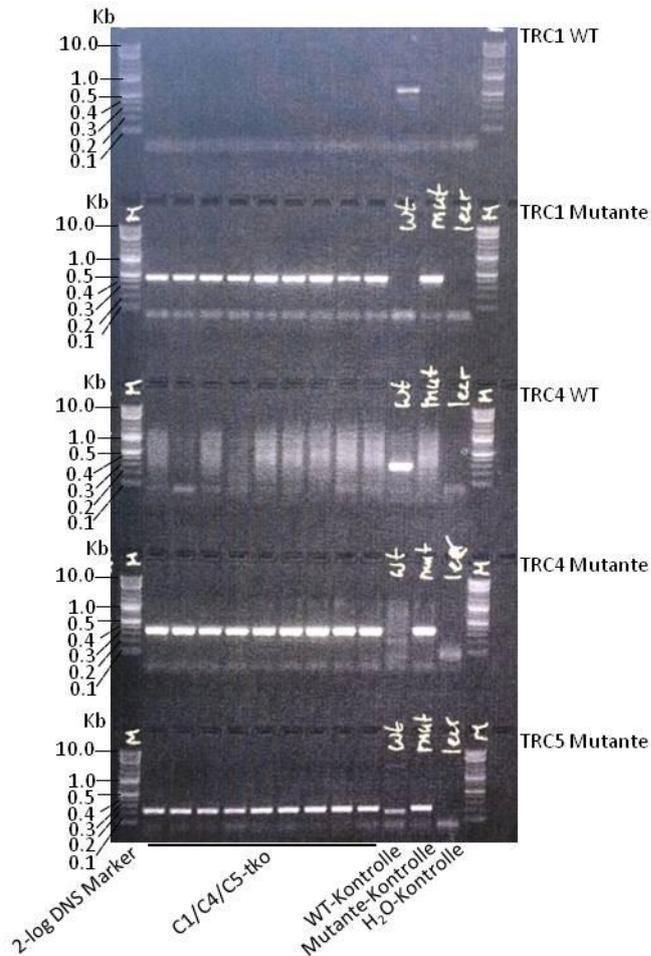


Abb. 6: Beispiel für eine Genotypisierungsreaktion der TRPC1/C4/C5-*tko*-Mauslinie. Anhand von fünf getrennten PCR-Reaktionen wird der Genotyp verschiedener P1-Mäuse bestimmt. Bei allen neun getesteten Tieren handelt es sich um TRPC1/C4/C5-*tko*-Mäuse. Als Kontrolle wurde DNA von Tieren mit bereits bekanntem Genotyp (Wt und TRPC1/C4/C5-Mutante) und eine Leerkontrolle (H₂O) mitgeführt.

4.2.2. ZELLKULTURTECHNIKEN

Zellkulturen aus primären Zellen oder Zelllinien werden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank (LAF, Safe 2020, Thermo Scientific oder Herasafe, Heraeus) hergestellt. Mediumwechsel und Waschschriffe werden mit Hilfe einer Absauganlage durchgeführt.

4.2.2.1. Kontinentale Neuronenkultur

Vorbereitung der Deckgläschen

Zur Herstellung neuronaler Zellkulturen werden kommerziell erhältliche Deckgläschen (25 mm \varnothing , Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG) verwendet. Um das Wachstum der Zellen auf der Glasoberfläche zu ermöglichen, müssen diese mit PDL als Substrat für die Neurone beschichtet werden. Dazu werden die Deckgläschen zunächst in ein Becherglas gegeben und auf einem Orbitalschüttler nacheinander in 65 % HNO₃, 37 % HCL, Aceton, 70 % Ethanol und 100 % Ethanol inkubiert, wobei vor jedem Lösungswechsel ein Waschschrift mit demineralisiertem H₂O erfolgt. Durch diese Behandlung wird die Oberfläche der Deckgläschen hydrophil, was eine gleichmäßige Beschichtung mit der PDL-Lösung ermöglicht. Die gewaschenen Deckgläschen werden bei 150 °C getrocknet und bis zur Verwendung steril aufbewahrt. Am Tag vor der Präparation werden die Deckgläschen in eine Zellkulturplatte mit sechs Vertiefungen gelegt, mit jeweils 100 μ l PDL-Lösung (0,2 mg/ml PDL in 0,1 M Boratpuffer) bedeckt und über Nacht in der Sterilbank inkubiert. Am nächsten Tag werden die Deckgläschen dreimal mit sterilem dH₂O (2 ml/Vertiefung) gewaschen und nach dem letzten Absaugen des Wassers in der Sterilbank bei geöffnetem Deckel getrocknet. Vor dem Ausplattieren der Zellen werden die Platten 20 Min. mit Hilfe von UV-Licht sterilisiert.

Präparation hippokampaler Neurone

Hippokampale Neurone mit genetischem Nullhintergrund für Syb2 (Syb2^{-/-}) werden in E18-Präparationen gewonnen. Dazu wird die schwangere Maus zuerst mit CO₂-Gas getötet und dekapitiert. Die Mausembryonen werden mittels Kaiserschnitt entnommen. Aufgrund ihrer veränderten Morphologie können Syb2-ko (Syb2^{-/-})- Embryonen eindeutig von Wildtyp (Syb2^{+/+})- bzw. heterozygoten (Syb2^{+/-}) Tieren unterschieden werden (s. Abb. 33 Ergebnisse).

Für die Neuronenkultur wird jeweils ein Syb2-ko-Embryo und als Kontrolle ein Wildtyp- oder ein heterozygoter Embryo aus dem gleichen Wurf verwendet. Nach dem Enthaupten des Mausembryos wird die Schädeldecke mit einer kleinen Schere geöffnet und das Gehirn mit Hilfe eines kleinen Löffels vollständig entnommen und in ein Petrischälchen mit eiskalter HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) gelegt. Die Hippokampi werden an einer Sterilbank (NUAIRE Laminar Flow, Zapf instruments) unter Verwendung eines Binokulars (Stemi 2000, Zeiss) herauspräpariert, von den Meningen befreit und in 500 μ l Enzymlösung in einem 15 ml Röhrchen überführt. Die Lösung wird 20 Min. im Wasserbad (Julabo SW21) bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wird die Enzymlösung abgenommen und gegen 400 μ l Inaktivierungslösung ausgetauscht. In dieser Lösung werden die Hippokampi weitere 3 Min. bei 37 °C inkubiert, um die Reaktion des Papains abzustoppen. Nach der Inkubationszeit wird die Inaktivierungslösung entfernt und durch 300 μ l 10 % FCS-Medium ersetzt. Zur Vereinzelung der Zellen werden die Hippokampi zuerst mit der blauen und dann mit der gelben Pipettenspitze trituriert. Nach dem Triturieren wird die Zellsuspension eine

Min. stehen gelassen, um noch vorhandene Zellklümpchen zu sedimentieren. Der Überstand wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 10 % FCS-Medium auf ein Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt. Von dieser Suspension wird die Zellzahl durch Auszählen der Zellen in der Neubauer-Kammer bestimmt. Es werden 68.000 Zellen in 100 µl 10 % FCS-Medium auf die Mitte jedes Deckgläschen pipettiert. Die Neurone werden 20 Min. im 37 °C Brutschrank (Hera cell 150, Heraeus) bei 5 % CO₂ in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit, die dazu dient, dass sich die Zellen in hoher Konzentration auf den Deckgläschen absetzen, werden jeweils 2 ml NBA-Medium pro Vertiefung langsam am Rand des Deckgläschens zugegeben. Danach werden die Kulturplatten bis zur experimentellen Verwendung der Neurone im Brutschrank inkubiert. Bei den Experimenten mit der lebensfähigen TRPC1/C4/C5^{3/-}- Mauslinie werden die Neuronenkulturen nach dem gleichen Verfahren hergestellt, aber anstelle der E18 Embryos werden P0-P2 Tiere und Wildtypmäuse gleichen Alters als Kontrollen verwendet.

4.2.2.2. Astrozytenkultur

Astrozytenkulturen werden aus hippocampalem Gewebe junger Wildtypmäuse (P0-P2) hergestellt. Dazu werden die Hippokampi von 3-4 Mäusen wie unter 4.2.2.1. beschrieben in kaltem HBSS präpariert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zum Ende der Dissektion auf Eis aufbewahrt. Das Gewebe wird mit Hilfe eines sterilen Spatels durch ein Zellsieb (cell strainer, Porengröße 100 µm) gedrückt und somit mechanisch zerkleinert. Dabei wird das Sieb wiederholt mit insgesamt 20 ml kaltem DMEM gespült und die entstehende Zellsuspension in einem 50 ml Röhrchen gesammelt. Die Suspension wird 5 Min. bei 1800 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wird das Zellpellet in 1 ml 10 % FCS-Medium resuspendiert. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren der Suspension mit einer blauen und danach einer gelben Pipettenspitze wird eine Vereinzelnung der Zellen erreicht. Nach Zugabe von 10 µl 10 % FCS-Medium wird die Zellsuspension in eine zuvor mit Collagen-Lösung (0,5 mg/ml Collagen Typ I in dH₂O, BD) beschichtete T-75 Zellkulturflasche pipettiert. Die Astrozyten werden bei 37 °C und 8 % CO₂ im Brutschrank zwischen 7 und 10 Tagen bis zum Erreichen eines konfluenten Wachstums inkubiert. Am Folgetag der Präparation sowie nach 5-7 Tagen wird das Medium ausgetauscht.

4.2.2.3. Autaptische Neuronenkultur

Die autaptische Neuronenkultur liefert ein einfaches System, um Neurone auf Einzelzellebene elektrophysiologisch zu untersuchen. Der große Vorteil der autaptischen Kultur besteht darin, dass in einem Neuron mit einer einzigen Messelektrode sowohl ein

Stimulus gegeben, als auch die synaptische Antwort auf diesen Stimulus in derselben Zelle abgeleitet werden kann. Die Technik beruht auf der Kultivierung einzelner Neurone auf astrozytären Inseln. Auf diesen Inseln entwickeln sich die einzelnen Neurone getrennt voneinander und bilden durch dieses isolierte Wachstum zahlreiche Synapsen auf ihre eigenen Dendriten aus, die man Autapsen nennt (Allen, 2006).

Autaptische Kulturen werden in Anlehnung an eine bereits publizierte Methode (Bekkers and Stevens, 1991) hergestellt. Zunächst werden die gewaschenen hydrophilen Deckgläschen so behandelt, dass auf ihnen Astrozyten-Inseln entstehen können. Dazu wird als nonadhäsives Substrat zuerst eine dünne, gleichmäßige Agaroseschicht aufgetragen (0,15 % Typ II-Agarose, Sigma in d_4H_2O) und 90 Min. im Inkubator bei 53 °C getrocknet. Auf diese Agaroseschicht wird ein Gemisch aus PDL und Collagen (0,48 mg PDL ; 0,72 mg Collagen in d_4H_2O) als Substrat für die Astrozyten mit Hilfe eines Mikrozerstäubers in Form von feinen Tröpfchen aufgesprüht. Die aufgesprühten "Inseln" werden eine Stunde bei RT getrocknet, danach werden die Deckgläschen in die Vertiefungen der Zellkulturplatten gelegt und 20 Min. unter UV-Licht sterilisiert. In der Zwischenzeit wird die konfluente Astrozytenkultur (7-10 Tage in Kultur) zum Passagieren vorbereitet. Dazu wird das Kulturmedium abgenommen und die Zellen werden mit 10 ml 1x PBS gewaschen. Danach werden die Astrozyten 10 Min. im Brutschrank in 6 ml Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Durch die enzymatische Aktivität des Trypsins lösen sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche. Durch Zugabe von 3 ml 10 % FCS-Medium wird die Trypsin-Reaktion abgestoppt. Die Zellsuspension wird in ein 50 ml Röhrchen überführt und 3 Min. bei 1300 rpm bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer sterilen Pasteurpipette über eine Absauganlage entfernt und das Zellpellet wird in 1 ml 10 % FCS-Medium resuspendiert. Nach dem Auszählen in der Neubauer-Kammer, wird eine Zellzahl von 2000 Zellen /ml in 10 % FCS-Medium eingestellt. Von dieser Zellsuspension werden jeweils 2 ml / Vertiefung auf die zuvor vorbereiteten Deckgläschen pipettiert. Die Astrozyten werden im Brutschrank (8 % CO_2) inkubiert, bis ein konfluentes Wachstum auf den Inseln erreicht ist (3-5 Tage). Dann werden die Neurone, wie in Abschnitt 3.2.1. bereits beschrieben, präpariert und eine Zellsuspension von 1000 Neuronen /ml in NBA-Medium hergestellt. Nach Entfernen des Astrozytenmediums werden jeweils 2 ml dieser Neuronensuspension auf die, mit Astrozyten-Inseln bewachsenen Deckgläschen pipettiert. Zur Ausbildung der autaptischen Neurone werden die Zellen im 5 % CO_2 -Brutschrank bei 37 °C inkubiert und nach 7-12 Tagen für elektrophysiologische Messungen verwendet.

4.2.2.4. Auftauen und Kultivierung von HEK 293 FT-Zellen

HEK 293 FT-Zellen werden zur Lagerung mit DMSO versetzt und in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Nach dem Auftauen werden die Zellen in Complete-Medium aufgenommen

und in einer T-75 Zellkulturflasche im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert. Am Tag nach dem Auftauen wird das Medium gewechselt. Das Passagieren der Zellen erfolgt je nach Dichte der Zellen ca. alle drei Tage. Dazu werden die Zellen mit PBS gewaschen und eine Minute mit 6 ml 0,05 % Trypsin-EDTA inkubiert. Dadurch lösen sich die Zellen vom Flaschenboden ab und können nach Abstoppen der Trypsin-Reaktion durch Zugabe von 4 ml Complete-Medium zusammen mit dem Medium in ein 50 ml Röhrchen überführt werden. Die Zellsuspension wird eine Minute bei 1300 rpm zentrifugiert und das hierbei erhaltene Zellpellet wird in Complete-Medium resuspendiert. Anschließend werden die Zellen in der entsprechenden Verdünnung in frischem Complete-Medium ausplattiert und für die weitere Kultivierung im Brutschrank inkubiert.

4.2.2.5. Herstellung von Lentiviren in HEK 293 FT-Zellen

Lentiviren sind behüllte Einzel(+)-Strang-RNA-Viren und gehören zur Familie der Retroviren. In der vorliegenden Arbeit wurden sie als virale Vektoren eingesetzt, um gezielt Gene in neuronale Zellen zu schleusen und dort zu exprimieren. Die Expression des Zielgens wird dabei durch Koexpression einer Fluorophore sichtbar gemacht.

Es werden rekombinante Lentiviren der 3. Generation verwendet, bei denen das Genom mehrfach modifiziert wurde, um replikationsdefiziente Viren zu erhalten, was für die biologische Sicherheit dieser Viren von Bedeutung ist.

Zur Produktion der Lentiviren werden HEK 293 FT-Zellen mit dem Transferplasmid (pLenti), welches das zu untersuchende Gen enthält und drei weiteren, sogenannten Helferplasmiden, transfiziert. Die Helferplasmide pMDLg/pRRE (Addgene #12251) und pRSV-Rev (Addgene #12253) enthalten die Verpackungsgene, wohingegen das Plasmid pMD2.G (Addgene #12259) das codierende Gen für das Hüllprotein des Virus enthält.

Für die Herstellung von Lentiviren werden HEK 293 FT-Zellen in T125-Flaschen (VWR) bis zu einem 70-80 % konfluenten Wachstum kultiviert. Vier Stunden vor der Transfektion der Zellen wird das Medium entfernt und durch antibiotika-freies DMEM ersetzt. Die Transfektion der HEK 293 FT-Zellen erfolgt durch Kalziumphosphat-Cofällung. Dazu werden zunächst 1,8 ml d₂O mit 200 µl einer 1,5 M CaCl₂-Lösung, 45 µg Transferplasmid und je 10 µg der drei Helferplasmide in einem 5 ml Reaktionsgefäß gemischt. Diese Lösung wird dann mit einer sterilen Glaspasteurpipette tropfenweise zu 2 ml 2x HBS-Puffer gegeben. Durch Einbringen von Luftblasen in die Lösung wird eine gleichmäßige Durchmischung erreicht und die, für die Transfektion notwendige, Präzipitatbildung gefördert. Nach 20-30 minütiger Inkubation des Gemischs kann als Indiz für eine gelungene Präzipitatbildung eine leichte Trübung der Lösung festgestellt werden. Die Lösung wird gleichmäßig auf die Oberfläche der HEK293FT-

Zellkultur aufgetropft und durch leichtes Schwenken der Zellkulturflasche verteilt. Nach fünfstündiger Inkubation im Brutschrank werden die Zellen mit PBS gewaschen und danach weitere 48-72 Stunden im Brutschrank in 20 ml Complete-Medium inkubiert. Während dieser Inkubationszeit werden die viralen Partikel gebildet und aus den Hek293FT-Zellen in das Nährmedium abgegeben. Zur Ernte der lentiviralen Partikel wird das Medium abgenommen und zunächst 5 Min. bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um abgelöste Zellen zu entfernen. Der Überstand wird durch Zentrifugieren (Labofuge 400R, Heraeus, Swing-out rotor) in Amicon Ultra Filtereinheiten mit einer Ausschlussgröße 100 kDa (Millipore) auf ca. ein Drittel des Ausgangsvolumens eingeeengt. Die konzentrierte Virensuspension wird in Kryoröhrchen (Greiner) aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

4.2.2.6. Transfektion der Neurone mit Lentiviren

Die Neuronenkulturen werden einen Tag nach der Präparation mit Lentiviren infiziert. Dazu wird 1 ml des Kulturmediums aus der Vertiefung abgenommen und je nach Transfektionseffizienz des Virus zwischen 100 und 300 µl des aufgetauten Lentivirus zugegeben. Die Zellen werden in den Brutschrank zurückgestellt und über Nacht mit den Viren inkubiert. Am nächsten Tag erfolgt ein vollständiger Wechsel des Mediums. Nach erfolgreicher Infektion der Neurone findet die reverse Transkription der viralen RNS, der Einbau in die genomische DNS der Wirtszelle und die Expression der Zielgene statt.

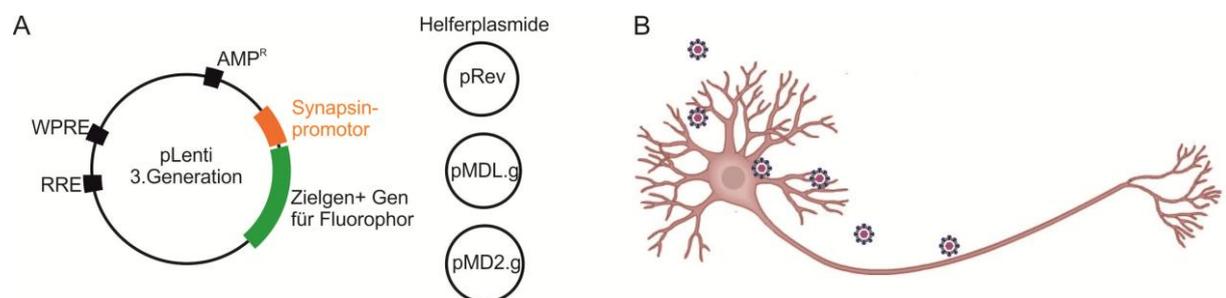


Abb. 7: Herstellung von Lentiviren und Transfektion der Neurone. (A) Zur Produktion der Lentiviren werden HEK 293 FT-Zellen mit dem Transferplasmid (pLenti) und drei weiteren, sogenannten Helferplasmiden, transfiziert. Das Transferplasmid enthält das zu untersuchende Gen, das unter der Kontrolle eines Synapsin-Promotors exprimiert wird. Die Helferplasmide pMDLg/pRRE, pMD2.g und pRSV-Rev enthalten Verpackungsgene und Gene für das Hüllprotein des Virus. (B) Zur Transfektion werden kultivierte Neurone mit den Viruspartikeln inkubiert.

4.2.3. MAUSLINIEN

Für die Kultivierung hippocampaler Neurone und Astrozyten werden B6C57/J Wildtyp-Mäuse verwendet. Die Synaptobrevin 2-knockout (Syb 2^{-/-}) Mauslinie wurde von Thomas Südhof (Howard Hughes Medical Institute, The University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, USA) zur Verfügung gestellt. Da Synaptobrevin 2- defiziente Mäuse direkt nach der Geburt sterben, werden Neurone dieser Mauslinie am Embryonaltag 18 (E18) präpariert. Die TRPC1/C4/C5^{3-/-} Mauslinie wurde von Marc Freichel (Pharmakologisches Institut, Universität Heidelberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Zucht und Haltung der verwendeten Mäuse erfolgte vorwiegend im institutseigenen Tierstall. Ein Teil der TRPC1/C4/C5^{3-/-} Mäuse stammte aus dem Tierstall des Forschungsgebäudes der Universitätsklinik des Saarlandes.

4.2.4. IMMUNZYTOCHEMIE

Bei immunzytochemischen Färbungen werden bestimmte Proteine in einem zellulären Präparat durch eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion nachgewiesen. Durch die Verwendung fluoreszenzmarkierter Sekundäntikörper kann diese Reaktion am Mikroskop detektiert werden.

Die kultivierten Zellen werden 12-14 Tage im Brutschrank inkubiert, dann einmal mit 1x PBS gewaschen und 45 Min. in 4 % Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Die PFA-Lösung wird durch dreimaliges Waschen mit 1x PBS entfernt, danach werden die Zellen 10 Min. mit Quenching-Puffer inkubiert und erneut mit 1x PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, werden die Zellen zunächst eine Stunde in Blocking-Puffer inkubiert. Danach erfolgt die Inkubation der Zellen mit der Primäntikörperlösung (Antikörper in Blocking-Puffer verdünnt) über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Am nächsten Tag werden die Zellen dreimal mit 1x PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen und anschließend 1,5 Stunden mit der Sekundäntikörperlösung (Antikörper in Blocking-Puffer verdünnt) in einer feuchten Kammer bei RT im Dunkeln inkubiert. Ungebundene Sekundäntikörper werden durch viermaliges Waschen in 1x PBS (jeweils 15 Min.) entfernt. Zum Einbetten der Zellen wird jeweils ein Tropfen Glycerin auf gereinigte Objektträger gegeben und die Deckgläschen werden zuerst kurz in d_6H_2O getaucht und dann mit der Zellseite zum Glycerin zeigend, auf die Objektträger gelegt. Die Deckgläschen werden anschließend mit Nagellack auf dem Objektträger fixiert.

Dokumentation und Auswertung der Immunfärbungen

Die Dokumentation der Färbung erfolgt am konfokalen Mikroskop (LSM 510, Carl Zeiss) mit Hilfe der Software AxioVision 2008 (Carl Zeiss) unter Verwendung der folgenden Objektiv:

20x-Objektiv (ohne Öl, num. Ap. 0,75)

40x-Objektiv (Ölimmersionsobjektiv, num. Ap. 1,3)

100 x (Ölimmersionsobjektiv, num. Ap. 1.4)

Die Aufnahmen werden mit der Software ImageJ (Version 1.45) und SigmaPlot 8.0 (Systat Software, Inc) ausgewertet. Immunopositive Signale werden nach Abzug des Hintergrundsignals, bestimmt innerhalb des neuronalen Fortsatzes, mit einer Grenzwert-basierten Detektionsroutine nachgewiesen. Zur Bestimmung des Expressionsniveaus der Syb2-TMD-Mutanten wird die mittlere Fluoreszenzintensität des Syb2-positiven Signals quantifiziert. Für die Bestimmung der Synapsendichte werden Synaptophysin -bzw. Synapsin- positive Signale entlang eines 50 µm langen Abschnittes eines neuronalen Fortsatzes bestimmt.

Epifluoreszenzbilder werden mit der AxioCam MRm-CCD Kamera (Carl Zeiss) unter Verwendung eines 25x- und eines 100x- Ölimmersionsobjektivs an einem Mikroskop des Typs Axiovert 200 (Carl Zeiss) aufgenommen.

4.2.5. PROTEINBIOCHEMIE

4.2.5.1. Herstellung von Zelllysaten

Zum Nachweis von Proteinen mittels Western Blot Analyse werden Zelllysate aus kontinentalen Neuronenkulturen (14 Tage in Kultur) hergestellt. Pro Untersuchungsbedingung werden die Zellen von zwei Deckgläschen in 100 µl Homogenisierungspuffer mit frisch zugefügten Proteaseinhibitoren aufgenommen und eine Stunde auf Eis inkubiert. Um die Zellyse und die Extraktion der Proteine aus der Membran zu verbessern, wird die Zellsuspension mehrfach auf- und abpipettiert. Nach der Inkubationszeit werden die Lysate 10 Min. bei 9.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um die Zellkerne und größere Zellfragmente zu entfernen. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und nach der Bestimmung der Proteinkonzentration in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

4.2.5.2. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford Assay

Die Proteinquantifizierung wird mit dem Protein Assay der Firma Bio-Rad, der auf der Bradford-Methode (Bradford, 1976) basiert, durchgeführt. Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie brilliant blue G-250 bildet im sauren Milieu Komplexe mit kationischen Aminogruppen von Proteinen. Der freie Farbstoff hat ein Absorptionsmaximum bei 465 nm. Durch die Bindung von Protein verschiebt sich sein Absorptionsmaximum auf 595 nm, sodass die Messung der Absorption bei dieser Wellenlänge zur Konzentrationsbestimmung herangezogen werden kann. Als Kalibrierungsgerade dienen die Messwerte von BSA-Lösungen mit bekannten Proteinkonzentrationen.

4.2.5.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE stellt eine geeignete Methode zur Analyse von Proteingemischen dar. Unter denaturierenden Bedingungen werden die Proteine in einem Polyacrylamidgel durch Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Es wird das diskontinuierliche System nach Lämmli (Laemmli, 1970) verwendet, das unter Benutzung eines Tris/Glycin-Puffersystems und eines Gels mit einem Trenn- und einem Sammelabschnitt zu einer erhöhten Trennschärfe führt. Zum Nachweis von TRPC1-YFP bzw. TRPC5-eGFP in lentiviral transfizierten Neuronen wird eine 4%/8% Sammelgel/Trenngel-SDS-PAGE verwendet. Synaptobrevin 2 und die verschiedenen Synaptobrevin 2 Mutanten werden mit Hilfe einer 5%/12% (Sammelgel/Trenngel)-SDS-PAGE analysiert.

Herstellung des Gels:

Die Glasplatten werden im Gelgießstand zusammengebaut. Zur Herstellung des Trenngels werden $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$, Trenngelpuffer und Acrylamid gemäß Tabelle 6 zusammenpipettiert. Durch Zugabe von APS, einem Radikalbildner und TEMED, einem Katalysator wird die Polymerisation gestartet, weshalb die Lösung nach Zugabe dieser Reagenzien unverzüglich zwischen die Platten gegossen werden muss. Um die Ausbildung einer geraden Oberkante des Gels zu gewährleisten, wird das Gel direkt nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet. Das Gel wird zum Auspolymerisieren bei RT stehen gelassen, dann wird der Isopropanol entfernt und die nach Tabelle 7 hergestellte Sammelgellösung auf das Trenngel gegossen und der Kamm eingefügt. Das Gel wird nach der vollständigen Polymerisation direkt verwendet oder in feuchte Tücher verpackt bei 4 °C aufbewahrt.

Tabelle 7: Komponenten für die Herstellung von SDS-Gelen

Komponente	Trenngel		Sammelgel	
	8 %	12 %	4 %	5 %
4x Trenn-bzw. Sammelgelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	0,75 ml	0,75 ml
30 % Acrylamid (29:1)	2,7 ml	4,0 ml	0,8 ml	1,0 ml
dH ₂ O	4,6 ml	3,3 ml	4,3 ml	4,1 ml
TEMED	0,003 ml	0,004 ml	0,006 ml	0,006 ml
10 % APS	0,05 ml	0,1 ml	0,06 ml	0,06 ml

Probenvorbereitung:

Die Proteinproben werden mit 5x SDS-PAGE Probenpuffer versetzt und 5 min. bei 95 °C im Heizblock inkubiert. Zum Nachweis von TRPC-Proteinen werden die Zellen direkt in 1:5 mit Homogenisierungspuffer verdünntem 5x SDS PAGE-Probenpuffer lysiert, um eine höhere Proteinkonzentration zu erreichen. Diese Lysate werden 20 Min. bei 60 °C denaturiert. Der Probenpuffer enthält β -Mercaptoethanol zur Reduktion von Disulfidbrücken und das anionische Detergenz SDS, das dazu dient die Proteine zu denaturieren. Da SDS mit Proteinen Komplexe in einem konstanten Verhältnis von 1,4 g SDS/g Protein bildet, erhalten die Proteine eine negative Ladung, die proportional zu ihrer Masse ist. Die denaturierten Proben werden auf ein SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard wird der EZ-Run™ Prestained Rec Protein Ladder der Firma Fisher Bioreagents verwendet.

Elektrophorese

Durch Anlegen einer Spannung werden die negativ geladenen Protein-SDS-Komplexe in Richtung Anode beschleunigt. Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese werden die Proteine im Sammelgel bei pH 6,8 zwischen den Chloridionen hoher Mobilität (Leitonen) und dem Glycin niedriger Mobilität (Folgeionen) aufkonzentriert. Beim Übergang in das Trenngel (pH 8,8) erhöht sich die negative Ladung des Glycins, wodurch dieses stärker beschleunigt

wird, die Proteine überholt und somit der Konzentriereffekt aufgehoben wird. Erst im Trenngel unterliegen die Proteine dem Molekularsiebeffekt und wandern je nach Größe mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten, wodurch eine größenabhängige Auftrennung des Proteingemischs zustande kommt.

Die Elektrophorese wird in Kammern der Firma BioRad in 1x SDS-Elektrophoresepuffer mit folgendem Programm durchgeführt:

30 Min. bei 80 V, ∞ 120 V

Kurz vor dem Auslaufen der Bromphenolblaufront aus dem Gel wird die Elektrophorese beendet.

4.2.5.4. Western Blot

Als Western Blot bezeichnet man den Transfer von Proteinen aus einem SDS-Gel auf eine Trägermembran mit anschließender Detektion der Proteine durch eine Immunreaktion (Towbin et al., 1979). Nach der Elektrophorese werden die Glasplatten entfernt und das Gel wird in Transferpuffer equilibriert. Vier Filterpapierstücke, die Nitrocellulosemembran und zwei Faser Pads werden ebenfalls in den Transferpuffer gelegt. Der Blot wird auf der Anodenseite beginnend in der Reihenfolge Faserpad-2x Filterpapier-Nitrocellulosemembran-Gel-2x Filterpapier-Faserpad in der Blotkassette zusammengesetzt. Die beladene Kassette wird in die Blot-Apparatur gestellt, welche dann mit kaltem Transfer-Puffer befüllt wird. Der Transfer der Proteine erfolgt durch Anlegen eines elektrischen Feldes das senkrecht zur Gelebene angeordnet ist. Dazu wird eine Spannungsquelle angeschlossen und folgendes Programm verwendet:

1 Std. bei 350 mA

Zum Nachweis von Syb2 wird das Semi-dry Transfervverfahren verwendet. Hierbei wird die Trans-Blot SD Transfer Cell Blot-Apparatur (BioRad) unter Verwendung des folgenden Programms benutzt:

1 Std. bei 12 V

Der Erfolg des Transfers wird durch Färbung der Membran mit Ponceau-Färbelösung überprüft. Dazu wird die Membran 10 Min. mit der Färbelösung inkubiert und anschließend mit deionisiertem Wasser gewaschen. Die Banden des Proteinstandards und die Probenspuren werden mit Bleistift markiert. Danach wird die Membran eine Stunde in Blockierlösung auf dem Schüttler inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren und somit Hintergrundsignale zu verringern. Nach dem Blockieren wird die Membran in Primärantikörperlösung (Antikörper in Waschpuffer verdünnt) über

Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit 1 % Magermilchlösung von der Membran entfernt. Anschließend wird die Membran eine Stunde mit der Sekundärantikörperlösung inkubiert und danach dreimal 10 Min. gewaschen, um ungebundene Sekundärantikörper zu entfernen. Zur Entwicklung der Signale wird die Membran in der Dunkelkammer eine Minute mit einem 1:1 Gemisch aus Oxidationsreagenz und Luminol (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific) inkubiert. Nach dem Entfernen der Lösung wird die Membran in eine Filmkassette gelegt und mit einem Röntgenfilm (GE Healthcare Amersham Hyperfilm ECL) bedeckt. Der Nachweis der Proteine erfolgt durch die Reaktion zwischen dem Enzym Meerrettichperoxidase, das an den Sekundärantikörper gekoppelt ist und dem zugegebenen Reagenz Luminol. Als Folge der Oxidation von Luminol wird Licht emittiert, welches als Signal auf dem Röntgenfilm detektiert wird. Um Signale unterschiedlicher Intensität zu erhalten werden nacheinander Filme mit verschiedenen Expositionszeiten aufgelegt, entwickelt und fixiert.

Entfernen der Antikörper von einer Membran

Zur Wiederverwendung einer Proteinmembran nach einer durchgeführten Immundetektion, werden die gebundenen Antikörper durch stringentes Waschen unter denaturierenden Bedingungen von der Membran entfernt, wobei die geblotteten Proteine jedoch auf der Membran haften bleiben. Die Membran wird viermal 5 Min. in TBST (50 mM Tris HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1 % (w/v) SDS) gewaschen und danach 30 Min. im Wasserbad bei 50 °C in Stripping Puffer (62,5 mM Tris HCl pH 6,8; 2 % (w/v) SDS; 0,7 % β -Mercaptoethanol) inkubiert. Anschließend wird sechsmal 5 Min. in TBST gewaschen und die Membran eine Stunde bei RT in Blockierlösung inkubiert. Die Membran kann nun mit einem anderen Primärantikörper inkubiert werden.

4.2.6. ELEKTROPHYSIOLOGIE

4.2.6.1. Die Patch-Clamp-Technik

Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik lassen sich Ionenströme über die, in der Zellmembran befindlichen Ionenkanäle einer Zelle messen. Aufgrund der hohen zeitlichen Auflösung, der Geschwindigkeit der Signalübertragung und ihrer Präzision kann diese Methode für Strommessungen bis auf Einzelkanalebene verwendet werden. Die Methode wurde von Neher und Sackmann als ein spezielles Voltage-Clamp (Spannungsklemme) -Verfahren entwickelt und stellt heute eine Standardmessmethode in der modernen Elektrophysiologie dar (Neher and Sakmann, 1976).

Beim Voltage-Clamp-Verfahren werden Ströme bei einem konstant gehaltenen Potential mit Hilfe eines Verstärkers, sowie einer intrazellulär und einer extrazellulär platzierten Elektrode gemessen. Das Membranpotential wird dabei durch einen Rückkopplungsmechanismus, der einen kompensatorischen Strom erzeugt, konstant auf einem bestimmten Wert gehalten. Bei der daraus weiterentwickelten Patch-Clamp-Technik wird sowohl zur Messung des Potentials als auch zur Strominjektion nur eine Elektrode benötigt. Ein weiterer Vorteil den diese Technik bietet ist die Minimierung des Hintergrundrauschens. Durch die Herstellung einer dichten Verbindung zwischen Membran und Patchpipette, die man aufgrund des hohen Abdichtungswiderstandes auch als Gigaseal bezeichnet, werden Leckströme zwischen Membranoberfläche und Pipettenspitze auf ein Minimum reduziert.

Das Membranpotential der untersuchten Zelle wird konstant gehalten und der dazu benötigte Kompensationsstrom gemessen. Diese gleichzeitige Strommessung und Potentialkontrolle wird mit Hilfe eines Strom-Spannungswandlers erreicht, dessen Hauptkomponenten der Operationsverstärker und der Referenzwiderstand sind (Abb. 8.). Der Verstärker misst am Eingang kontinuierlich das Membranpotential der gemessenen Zelle. Dieser Wert, welcher der Pipettenspannung (U_{pip}) entspricht wird mit der Kommandospannung (U_{soll}) verglichen, die von der Steuereinheit vorgegeben wird. Stimmen beide Werte überein, so findet kein Stromfluss statt. Kommt es zu Abweichungen zwischen Pipettenspannung und Kommandospannung, so entsteht am Ausgang des Operationsverstärkers eine Spannung, die proportional zu dieser Differenz, aber extrem verstärkt ist. Aufgrund der Spannungsdifferenz fließt ein Strom durch den Rückkopplungswiderstand, der wegen des hohen Eingangswiderstandes des OPV nur in die Pipette, nicht aber in den OPV fließen kann. Der Strom ändert das Potential an der Pipette so lange, bis die Differenz zwischen den beiden Eingängen aufgehoben und das Potential der Pipette gleich dem Kommandopotential ist. Serienwiderstand, Membrankapazität und Pipettenkapazität werden über zusätzliche Regelkreise kompensiert.

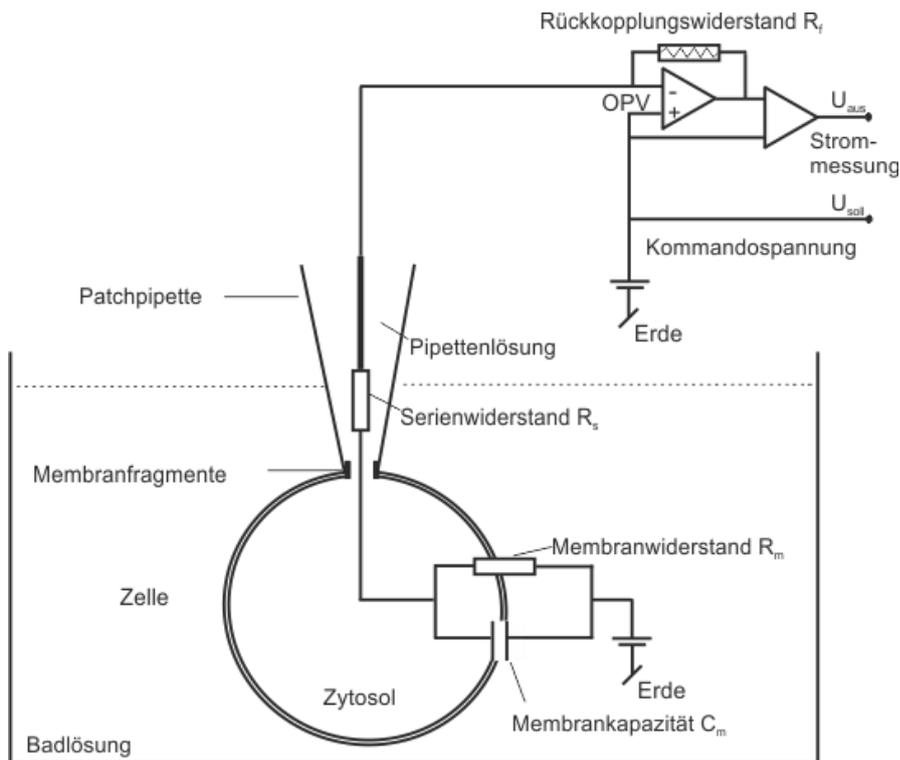


Abb. 8: Schematisches Ersatzschaltbild der Patch-Clamp-Messtechnik. Der Vorverstärker enthält den sogenannten Strom-Spannungswandler, dessen wichtigste Komponenten der Operationsverstärker (OPV) und der Rückkopplungswiderstand (R_f) sind. Membranfragmente, die beim Erreichen der whole-cell-Konfiguration in die Pipette gelangen erhöhen den Serienwiderstand (R_s). U_{soll} : Kommandospannung, U_{aus} : Ausgangsspannung proportional zum Strom, R_m : Membranwiderstand, C_m : Membrankapazität

Bei der praktischen Durchführung einer Patch-Clamp-Messung wird eine Glaspipette mit einem Öffnungsdurchmesser von 1-2 μm auf die Zellmembran aufgesetzt und durch Anlegen eines Unterdrucks eine dichte Verbindung zwischen Zellmembran und Pipettenglas hergestellt. Es entsteht ein sehr hoher Abdichtungswiderstand im Gigaohm-Bereich („Gigaseal“) zwischen dem Pipetteninneren und dem Außenmedium. In diesem Zustand, der auch als „cell-attached“-Modus bezeichnet wird, ist der unter der Pipette liegende Membranfleck (der „Patch“) elektrisch isoliert. Über einen Silber/Silberchloriddraht in der Pipette wird die Verbindung zum hochempfindlichen Vorverstärker hergestellt. Mit diesem wird der Strom, der durch die Ionenkanäle in dem Membranfleck fließt, gemessen. Durch Anlegen eines kurzzeitigen hohen Unterdrucks lässt sich das Membranstück unter der Pipette durchbrechen, sodass ein direkter Zugang zum Zellinneren erreicht wird. Diesen Modus, in dem die Gesamtstromantwort einer Zelle als Summe aller aktiven Kanäle gemessen werden kann, nennt man „whole -cell“-Konfiguration. Über die Öffnung der Pipettenspitze wird die intrazelluläre Lösung gegen eine Lösung mit klar definierten Ionenkonzentrationen in der Patchpipette ausgetauscht und somit der Intrazellulärraum kontrolliert perfundiert. Vom Gigaseal ausgehend können durch verschiedene

Manipulationen des Membranflecks neben der „whole -cell“-Konfiguration auch noch weitere Messkonfigurationen erreicht werden (Abb. 9). Zieht man die Pipette nach der Ausbildung des Gigaseals etwas von der Zelle zurück, so kann man das Membranstück unter der Pipette herausreißen und erhält so einen zellfreien Zugang zu der zytoplasmatischen Seite des Membranflecks („Inside-Out“-Konfiguration). Wird die Pipette jedoch erst nach dem Erreichen der „whole -cell“-Konfiguration von der Zelle zurückgezogen, so schließt sich die geöffnete Membran unter der Pipette spontan wieder und zeigt mit ihrer Außenseite zur Badlösung („Outside-Out“-Konfiguration). Diese „outside-out“-Konfiguration ermöglicht die Untersuchung von Ionenkanälen mit schnellen Aktivierungs- und Deaktivierungskinetiken und deren Modulation. Hingegen ist die „Inside-Out“-Konfiguration geeignet, um die Modulation von Ionenkanälen durch intrazelluläre zytoplasmatische Faktoren zu untersuchen, da Substanzen leicht von außen über die Badlösung appliziert werden können.

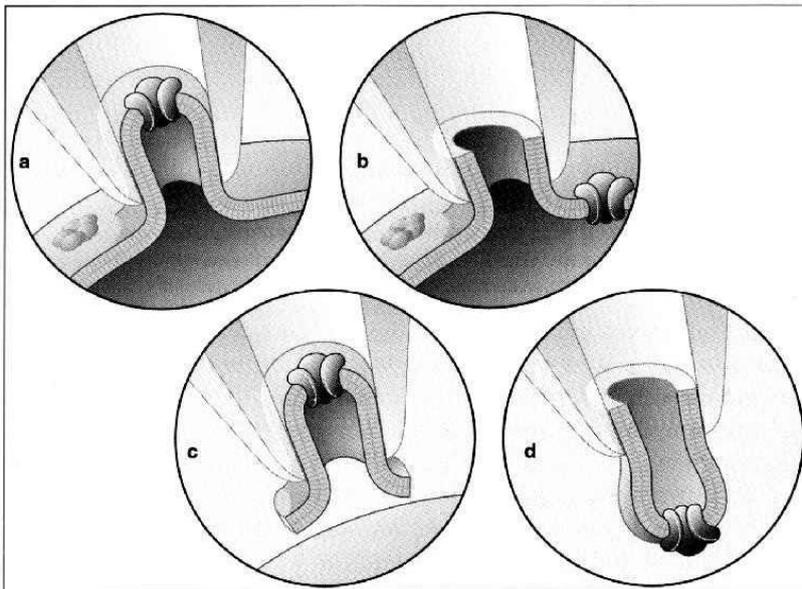


Abb. 9: Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik. Die Abbildung zeigt die vier verschiedenen Patchkonfigurationen. (a) cell-attached, (b) whole-cell, (c) inside-out, (d) outside-out Konfiguration (M. Numberger, A. Draguhn: *Patch-Clamp Technik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1996, ISBN 3-8274-0023-6.)

4.2.6.2. Herstellung von Patchpipetten

Patchpipetten werden aus Borosilikatglas mit Filament (GB150 F-8P, Science Products GmbH) am horizontalen Pipettenziehgerät (Sutter Instruments Co., Model P-87) an jedem Messtag neu gezogen. Dabei werden die Parameter für den Ziehvorgang so variiert, dass die Pipetten den benötigten Widerstand zwischen 3,5 und 5 M Ω aufweisen. Nach dem

Ziehen wird die Pipettenspitze an der Microforge (Polier-Heizelement, Wild Heerbrugg) geglättet, um die Ausbildung des Seals zu erleichtern.

4.2.6.3. Aufbau und Ausstattung des Messplatzes

Der Patch-Clamp-Messplatz besteht aus einem schwingungsgedämpften Tisch, auf dem ein inverses Mikroskop (Zeiss Axiovert 200, Zeiss Objektive: 5x Plan A num. Ap. 0,12; 40x Plan A num. Ap. 1,0; 40x Öl Fluar num. Ap. 1,3) montiert ist. Der bewegliche Objektisch des Mikroskops weist eine Vertiefung auf, in welche die Badkammer mit den Zellen eingelassen wird. Als Messelektrode dient ein chlorierter Silberdraht, auf den eine mit Intrazellulärlösung gefüllte Patchpipette aufgesetzt und im Pipettenhalter fixiert wird. Die Messelektrode stellt die elektrische Verbindung zwischen der Pipettenlösung und dem Vorverstärker (Headstage), der auf einem piezogetriebenen Mikromanipulator (PI Physik Intrumente) befestigt ist, her. Mit Hilfe des Mikromanipulatorsystems kann die Pipette exakt positioniert und an die Zelle herangeführt werden. Der Vorverstärker misst das Stromsignal, liest es als Spannung aus und leitet es an den Hauptverstärker (EPC10, HEKA Elektronik) weiter. Als Referenzelektrode wird eine Silber/Silberchloridelektrode in die Badlösung getaucht. Eine an das Mikroskop angeschlossene Kamera (evolve EMCCD Kamera, Visitron, Germany) überträgt das mikroskopische Bild auf einen Computerbildschirm, über den der Patchvorgang in einer vergrößerten Darstellung kontrolliert wird und gleichzeitig Veränderungen des Pipettenwiderstandes am Oszilloskop beobachtet werden können. Die gesamte Messvorrichtung ist geerdet und wird mit Hilfe eines Faraday-Käfigs gegen Einstreuungen des elektromagnetischen Wechselfeldes, das vom öffentlichen Spannungsnetz erzeugt wird, abgeschirmt. Zur Anregung des verwendeten Fluorophors wird ein Monochromator (Polychrom VDG, Till Photonics) verwendet, der gesteuert über die Software Visiview (Visitron, Germany) Licht der entsprechenden Wellenlänge liefert.

4.2.6.4 Perfusionssystem

Um während der Messung gezielt verschiedene Substanzen auf die Zellen zu applizieren, wird eine selbst hergestellte Perfusionspipette mit einem Öffnungsdurchmesser von ca. 100 μm verwendet. Die Perfusionspipette wird mit Hilfe eines Mikromanipulatorsystems ca. 200-300 μm entfernt von der zu perfundierenden Zelle positioniert. Die Überspülung der Zelle mit der Lösung erfolgt gravitationsgetrieben und wird mit Hilfe elektrisch gesteuerter Ventile über die Software Pulse 8.7.4. (HEKA Electronic) kontrolliert.

4.2.6.5. Aufnahme und Analyse der Daten

Synaptische Ströme werden als Ganzzelleableitungen im Voltage-Clamp-Modus bei -70 mV und RT aufgenommen. Der gemessene exzitatorische Strom (EPSC) wird über AMPA-Rezeptoren vermittelt. Dazu werden Patchpipetten mit einem Pipettenwiderstand von 3.5-5.5 M Ω verwendet. Das Umkehrpotential chloridvermittelter Ströme wird durch die Verwendung der angegebenen Intra- und Extrazellulärlösungen mit dem Haltepotential gleichgesetzt, wodurch GABAerge Ströme minimiert werden und auf GABA_{A/B}-Rezeptorblocker verzichtet werden kann. Die Messungen werden mit einem EPC10 Verstärker (HEKA Elektronik), der über die Software Pulse 8.7.4. (HEKA Elektronik) gesteuert wird, aufgenommen. Für die Analyse werden nur Messungen mit einem Eingangswiderstand von bis zu 15 M Ω und einer Widerstandskompensation von 70-80 % verwendet. Die Stromsignale werden mit einem Tiefpassfilter bei 2,9 kHz (four pole Bessel filter EPC10) gefiltert und mit einer Digitalisierungsrate von 10 oder 50 kHz aufgenommen.

Aktionspotential-evozierte EPSCs werden durch kurzzeitige Membrandepolarisierungen (+10 mV; 0,7 ms) mit einer Frequenz von 0,2 Hz oder 20 Hz hervorgerufen. In einer Zelle werden jeweils zehn depolarisierende Stimuli gegeben und die resultierenden Ströme gemessen. Für die quantitative Analyse wurde der Mittelwert aus den zehn Messungen gebildet.

Der Pool exozytose-kompetenter Vesikel (RRP) wird durch Applikation einer 500 mM Saccharoselösung für 5 s bestimmt. Das Überspülen der autaptischen Zelle mit dieser hyperosmolaren Lösung bewirkt, dass alle Vesikel des RRP's freigesetzt werden und als Folge der Transmitterfreisetzung ein postsynaptischer Strom gemessen werden kann, der Auskunft über die Größe des Pools gibt. Um die Poolgröße präzise zu bestimmen, wird das Integral des Stromflusses berechnet und um den Betrag korrigiert, der den Gleichgewichtszustand zwischen Wiederauffüllen des Pools und Exozytose während der hypertonen Stimulation widerspiegelt (Stevens und Wesseling, 1999). Die Messdaten werden mit Hilfe der Software IgorPro analysiert.

Spontane mEPSCs in Kontinentalkulturen werden in Extrazellulärlösung, versetzt mit 1 μ M TTX (Tetrodotoxin), gemessen. Das Gift blockiert spannungsabhängige Na⁺-Kanäle und verhindert somit das Entstehen von Aktionspotentialen im neuronalen Netzwerk, sodass alle gemessenen Ströme auf die spontane Freisetzung einzelner Vesikel (quantale Ereignisse) zurückgeführt werden können. Zur Analyse der spontanen mEPSCs wird die Software Minianalysis (Synaptosoft, Version 6.0.3) und die Software ABF Utility (Columbia University) verwendet. Durch Anwenden eines Ladungs (>25 fC)- und eines Amplituden (>15 pA)-Kriteriums wird die Detektion falscher Ereignisse, die durch zufällige Fluktuationen der Basislinie entstehen, minimiert.

4.2.7. STATISTISCHE ANALYSE

Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM (Standard error of the mean) dargestellt und n bezieht sich auf die jeweilige Anzahl der analysierten Zellen.

Die statistische Analyse erfolgte mit der Software SigmaPlot 12.0 (Systat Software, Inc.). In Abhängigkeit von der Art des Experiments wurde der ungepaarte *Student's t-test* oder die Varianzanalyse (ANOVA) zum Vergleich des Mittelwerts zwischen den Gruppen angewandt. Abhängig vom p-Wert wurden drei Signifikanzniveaus definiert:

* für $p < 0,05$ „signifikant“

** für $p < 0,01$ „hoch signifikant“

***für $p < 0,001$ „höchst signifikant“

5. ERGEBNISSE

5.1. Einfluss der Kanäle TRPC1, TRPC4 und TRPC5 auf die synaptische Transmission hippokampaler Neurone

TRPC-Kanäle bilden nicht-selektive Kationenkanäle, die eine Depolarisation des Membranpotentials verursachen und einen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle vermitteln (Birnbaumer, 2009). Für die Vertreter der Untergruppe TRPC1/C4/C5 wurde bereits gezeigt, dass sie in mehreren Unterregionen des Hippokampus, wie z.B. der CA1-CA3 Region und im Gyrus Dentatus koexprimiert werden (Freichel et al., 2005). Diese Proteine werden u.a. mit der Neurogenese und dem Neuritenwachstum in Verbindung gebracht (Heo et al., 2012, Kerstein et al., 2013). Ihre Funktion als Kationenkanal und als Regulator der intrazellulären Kalziumkonzentration in Neuronen ist jedoch weitgehend unbekannt.

5.1.1. ANALYSE DER SPONTANEN EXOZYTOSE

Um die Funktion dieser Kanäle in hippokampalen Neuronen zu untersuchen, wurden mit Hilfe der „Patch-Clamp“-Technik elektrophysiologische Messungen in neuronalen Kulturen von Wildtyp- und TRPC1/C4/C5-triple defizitären Mäusen durchgeführt und miteinander vergleichend analysiert.

Zunächst wurden Messungen der spontanen synaptischen Aktivität in Massenkulturen hippokampaler Neurone durchgeführt. Die Aufnahmedauer betrug dabei 60 Sekunden und wurde bei einem Haltepotential von -70 mV in der „whole-cell“-Konfiguration durchgeführt. Um die Ausdifferenzierung der Neurone und die Ausbildung zahlreicher synaptischer Kontakte zu gewährleisten, wurden die Zellen erst nach einer Zeit von 14-17 Tagen in Kultur (14-17 DIC) elektrophysiologisch untersucht. Spontane mEPSCs (miniature excitatory postsynaptic currents) wurden in der Gegenwart von 1 μM Tetrodotoxin (TTX) aufgenommen. In der verwendeten Konzentration blockiert TTX spannungsabhängige Natriumkanäle vollständig und inhibiert somit das Auftreten von Aktionspotentialen, sodass alle detektierten Ereignisse auf die spontane Fusion einzelner Vesikel mit der Plasmamembran zurückzuführen sind. Die Eigenschaften spontaner, exzitatorischer Miniaturströme können durch verschiedene Parameter wie Ladung, Amplitude, Anstiegszeit, Halbwertsbreite, Abfallszeit und Frequenz charakterisiert werden (siehe Abb.10).

Ergebnisse

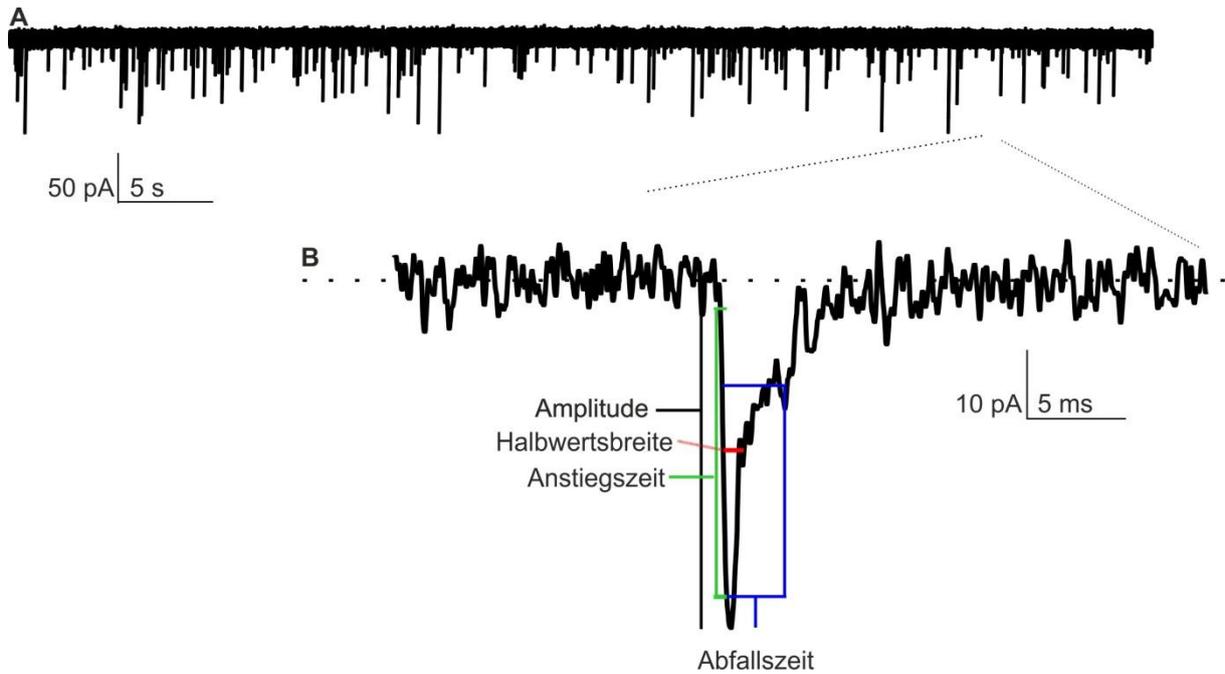


Abb. 10: Beispielhafte mEPSC-Messung. (A) Messung der spontanen mEPSCs über 60 s. Die Frequenz wird als Häufigkeit der Ereignisse pro Sekunde (Hz) angegeben. (B) Der vergrößert dargestellte Einzelpeak demonstriert die Bestimmung der Amplitude und der kinetischen Parameter der mEPSCs. Die Amplitude beschreibt den Strom, der aus der Differenz des detektierten Peakmaximums und der gemittelten Grundlinie bestimmt wird. Die Anstiegszeit (10-90 %) bezieht sich auf das Zeitintervall, in dem ein Ereignis sein Maximum erreicht. Aus der Fläche unter der Kurve (Integral) wird der Ladungstransfer während des Ereignisses berechnet. Als Halbwertsbreite bezeichnet man das Zeitintervall von Beginn des Ereignisses bis zum Erreichen der halbmaximalen Amplitude. Die Zeitspanne vom Maximum der Amplitude bis zum Wiedererreichen der Basislinie wird durch die Abfallszeit (90-37 %) beschrieben.

Die Häufigkeit spontaner mEPSCs war in TRPC1/C4/C5 tko-Neuronen im Vergleich zu der in Wildtyp-Neuronen nicht signifikant verändert (Wt: $1,29 \pm 0,18$ Hz, $n = 66$; TRPCtko: $1,47 \pm 0,15$ Hz, $n = 65$; Abb. 11A und 11B). Daraus kann man den Schluss ziehen, dass die genetische Deletion der Kanäle TRPC1/C4/C5 keine grundlegenden Veränderungen in der präsynaptischen Vesikelfusion in hippocampalen Neuronen hervorruft.

Hinsichtlich der mittleren Amplitude (Wt: $43,4 \pm 1,23$ pA, $n = 66$; TRPCtko: $44,15 \pm 1,41$ pA, $n = 65$) und der mittleren Ladung (Wt: $126,79 \pm 4,19$ fC, $n = 66$; TRPCtko: $136,52 \pm 5,59$ fC, $n = 65$; Abb. 11B) unterschieden sich die Ereignisse nicht. Auch bei der Analyse der kinetischen Parameter Anstiegszeit (Wt: $0,77 \pm 0,019$ ms, $n = 66$; TRPCtko: $0,77 \pm 0,019$, $n = 65$), Halbwertszeit (Wt: $1,91 \pm 0,060$, $n = 66$; TRPCtko: $2,03 \pm 0,082$, $n = 65$) und Abfallszeit (Wt: $5,68 \pm 0,089$, $n = 66$; TRPCtko: $5,834 \pm 0,093$, $n = 65$; Abb. 11B) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Häufigkeitsverteilungen der Parameter Amplitude, Ladung und Anstiegszeit der quantalen Ereignisse zeigten keine Unterschiede zwischen TRPCtko- und Wildtyp-Zellen (Wt: $n = 66$, TRPCtko: $n = 65$; Abb. 11C).

Ergebnisse

Zusammenfassend legt die Analyse der spontanen mEPSCs (Abb. 11) nahe, dass der Verlust der TRPC-Kanäle weder grundlegende Eigenschaften der präsynaptischen Vesikelfusion noch die postsynaptische Rezeptorkomposition beeinflusst.

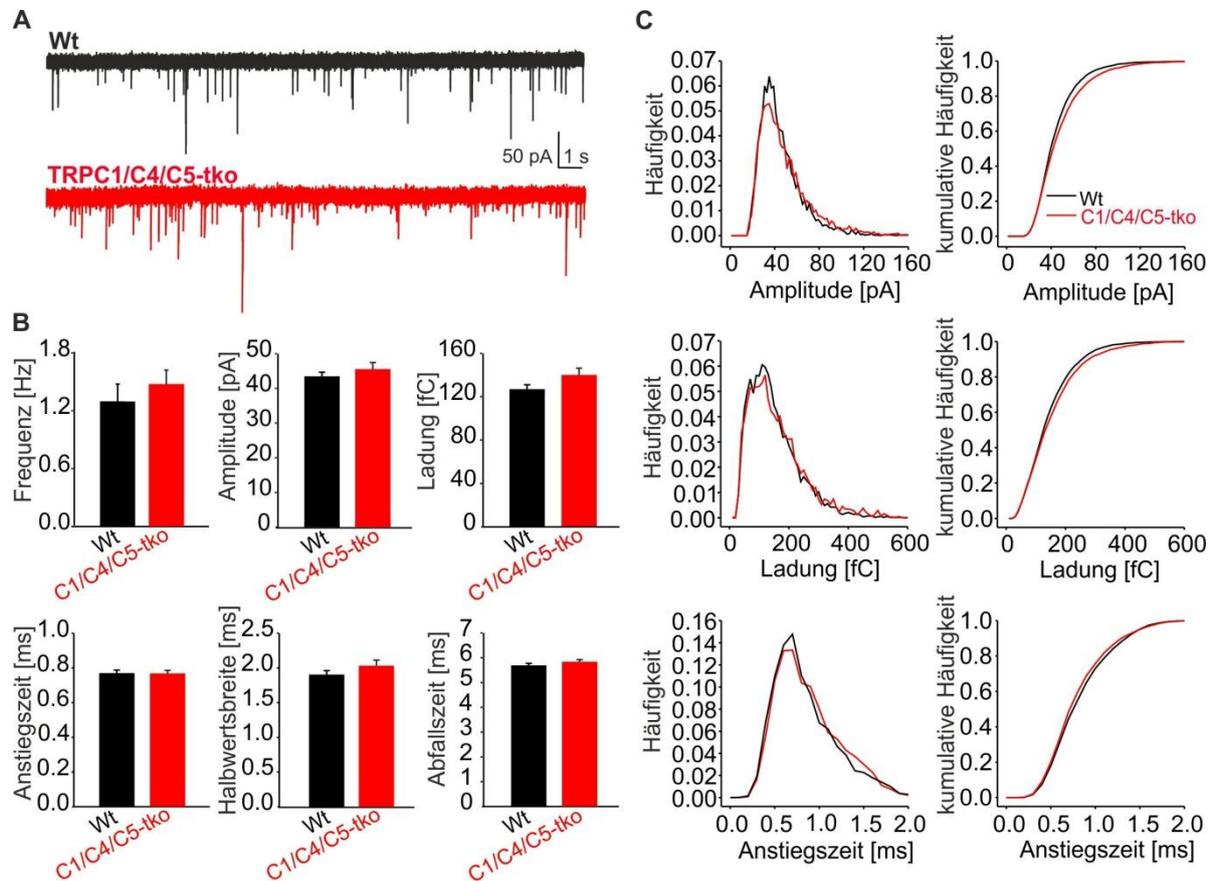


Abb.11: Die quantale Signalgebung in TRPC-defizienten Neuronen ist unverändert.

(A) Repräsentative Aufnahmen der quantalen Ereignisse (mEPSCs) von Wildtyp (schwarz) und TRPC-defizienten (rot) Neuronen in kontinentalen Kulturen. (B) Vergleichende Analyse der mEPSCs, gemessen in Wildtyp (n=66) und TRPC1/C4/C5*tko* (n=65) Neuronen. Die Messwerte zeigen in keinem der untersuchten Parameter signifikante Unterschiede. (C) Häufigkeitsverteilungen von Amplitude, Ladung und Anstiegszeit der mEPSCs (linke Graphen), sowie die entsprechenden kumulativen Häufigkeiten (rechte Graphen) in Wildtyp- (schwarz) und TRPC1/C4/C5*tko* (rot) Neuronen.

5.1.2. ANALYSE DER AKTIONSPOTENTIAL-EVOZIERTEN EXOZYTOSE

Um die physiologische Rolle der TRPC1/C4/C5-Kanäle in der synaptischen Transmission weiterführend zu untersuchen, wurden Messungen in autaptischen hippocampalen Neuronenkulturen durchgeführt (Abb. 12).

Verglichen mit den Kontrollzellen zeigten die TRPC*tko*-Zellen in der Tat eine signifikante Reduktion in der Aktionspotential-evozierten EPSC-Amplitude (Wt: $8,44 \pm 0,80$ nA; n=70,

Ergebnisse

TRPCtko: $6,50 \pm 0,48$ nA; $n=81$; $p=0,035$) um 23 % und in der Ladung (Wt: $87,73 \pm 9,56$ pC, TRPCtko: $65,81 \pm 5,77$ pC; $p=0,04$) ihrer EPSCs um 25 % auf (Abb.12.). Hingegen war die Anstiegszeit nahezu unverändert, was bedeutet, dass die Reduktion der EPSC-Amplitude in den TRPC1/C4/C5-tko-Zellen nicht auf einen Defekt in der Stimulus-Sekretions-Kopplung zurückzuführen ist. Aus den bisherigen Ergebnissen kann man schließen, dass TRPC-Kanäle einen zusätzlichen Beitrag zur evozierten Exozytose leisten. Letzterer könnte entweder auf einer Erhöhung der Poolgröße oder der Freisetzungswahrscheinlichkeit exozytosekompetenter Vesikel beruhen.

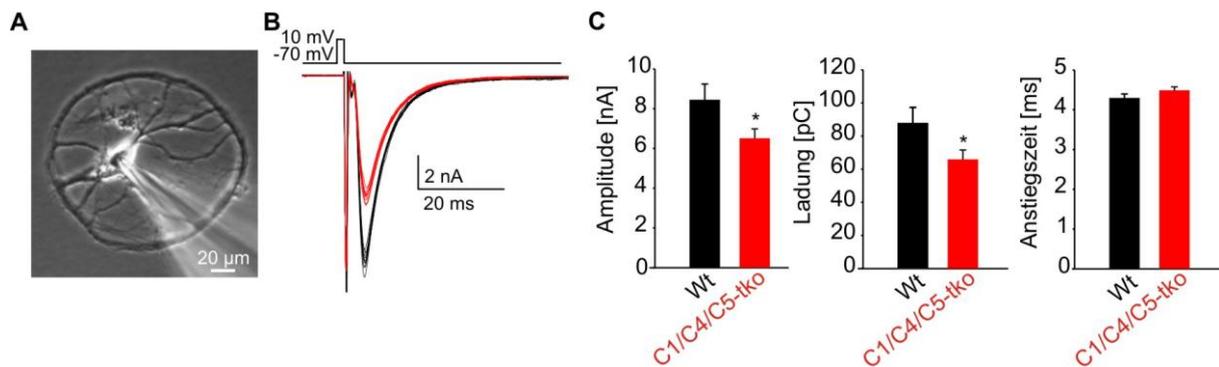


Abb. 12: Der Verlust der TRPC-Kanäle verringert die Aktionspotential evozierte Transmitterfreisetzung in autaptischen Kulturen hippocampaler Neurone. (A) Durchlichtaufnahme einer gepatchten Autapse. (B) Exemplarische Aktionspotential evozierte EPSCs eines Wildtyp- (schwarz) und eines TRPC1/C4/C5- triple knockout (rot) Neurons. (C) Quantitative Analyse der Aktionspotential-evozierten EPSCs in Bezug auf die angegebenen Parameter. TRPC-Defizienz reduziert die Größe der evozierten Antwort ohne die Kinetik zu beeinflussen (Wt $n=70$, TRPC1/C4/C5-tko $n=81$, t-Test).

5.1.3. BESTIMMUNG DER SYNAPSENDICHTE IN KULTUREN TRPC1/C4/C5-TRIPLE DEFIZITÄRER NEURONE

Vorangegangene Arbeiten weisen darauf hin, dass TRPC-Varianten möglicherweise einen Einfluss auf die neuronale Synaptogenese haben (Greka et al., 2003). Insbesondere TRPC 5, das sich im Wachstumskegel von Neuronen befindet, soll das Auswachsen des Neuriten und die Morphologie des Wachstumskegels beeinflussen. Um zu erforschen, ob die Beeinträchtigung der synaptischen Transmission in den TRPC-defizitären Zellen in einer veränderten Synaptogenese begründet liegt, wurde die Synapsendichte in Kontinentalkulturen hippocampaler Neurone anhand immunzytochemischer Färbungen mit Antikörpern gegen das präsynaptische Protein Synapsin bestimmt (Abb.13). Synapsin I ist ein Phosphoprotein, das spezifisch in Nervenendigungen vorkommt und dort an die Membran präsynaptischer Vesikel assoziiert ist. Da es generell in allen Synapsen des zentralen und peripheren Nervensystems vorkommt, ist sein Nachweis zur Bestimmung der

Ergebnisse

Synapsendichte im beschriebenen Versuch geeignet (De Camilli et al., 1983, Thiel, 1993). Die fluoreszierenden Punkte im Netzwerk, am Zellkörper und an den Dendriten der Neurone repräsentieren die zahlreichen Synapsen in der Wt- und in der TRPCtko-Kultur (Abb.13 A, B). Sowohl die Auswertung der Synapsendichte, als auch die Bestimmung der durchschnittlichen Ausdehnung des Synapsinsignals wiesen keine signifikanten Unterschiede auf (Abb.13 C, Wt n= 15; TRPCtko n= 15). Das Ergebnis bestätigt eine frühere Untersuchung der Arbeitsgruppe, bei welcher die Auswirkung des Verlustes der TRPC1/C4/C5-Kanäle auf die Synaptogenese hippocampaler Neurone anhand von Färbungen gegen Synaptophysin ermittelt wurde (Broker-Lai et al., 2017). Synaptophysin gehört zu den am häufigsten vorkommenden Proteinen in der vesikulären Membran und wird daher ebenso wie Synapsin I gerne als Markerprotein zur Anfärbung präsynaptischer Vesikelakkumulationen benutzt (Calhoun et al., 1996, Takamori et al., 2006).

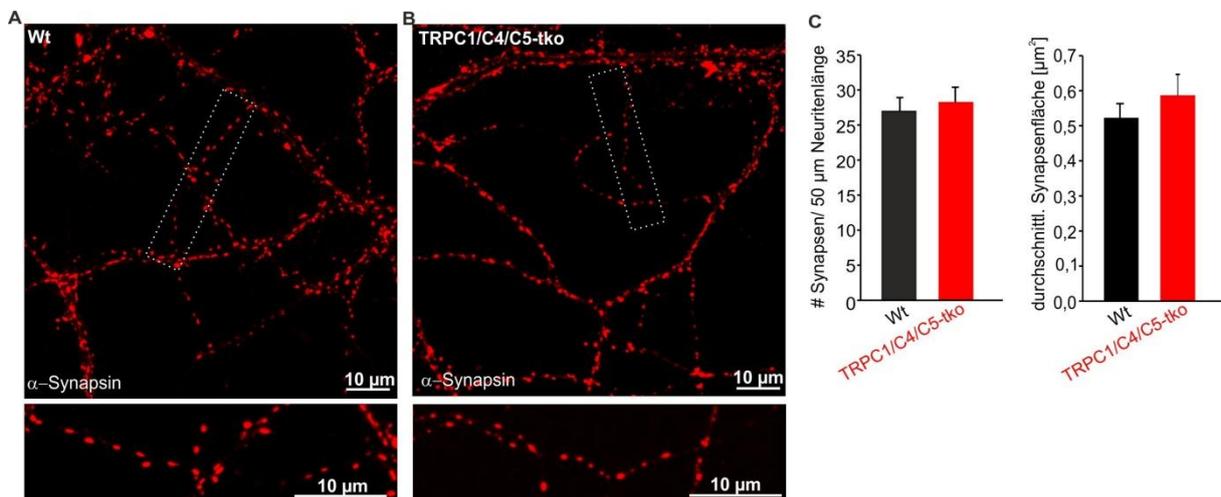


Abb.13: Der Verlust der TRPC1/C4/C5-Kanäle verändert die Synaptogenese hippocampaler Neurone nicht. (A) Exemplarische konfokale Aufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen gegen das synaptische Markerprotein Synapsin I in Massenkulturen hippocampaler Wildtyp- (links) und TRPC1/C4/C5 triple knockout- Neurone (rechts). Ein, verglichen mit dem Wildtyp, ähnliches gepunktetes Auftreten von Synapsin in TRPC1/C4/C5 triple knockout- Neuronen weist auf eine unveränderte Synaptogenese hin. In der weißen Box ist eine höhere Vergrößerung (gepunktete Linie) aus dem Übersichtsbild dargestellt. (B) Die Quantifizierung der Synapsin-positiven Signale entlang eines 50 μ m langen Neuritenabschnitts bestätigt sowohl die unveränderte Anzahl an Synapsen, als auch die unveränderte Größe der Synapsen in TRPC triple knockout- Neuronen (Wt n= 15, TRPC1/C4/C5-tko n= 15).

Zusammenfassend zeigen die bisherigen Befunde, dass der Verlust der TRPC1/C4/C5-Kanäle keinen Einfluss auf die postsynaptischen Rezeptoren (Abb.11), die Synaptogenese (Abb.13) oder die Stimulus-Sekretionskopplung (Abb.12) hat. Eine attraktive Erklärung für die Reduktion der evozierten Transmitterfreisetzung in hippocampalen TRPC-tko-Neuronen

wäre, dass der Verlust der TRPC-Kanäle zu Veränderungen in der präsynaptischen Ca^{2+} -Dynamik und damit einhergehend zu einer Reduktion der Poolgröße fusionskompetenter Vesikel oder der Freisetzungswahrscheinlichkeit führt.

5.1.4. BESTIMMUNG DER POOLGRÖÖE FUSIONSBEREITER VESIKEL (RRP) DURCH EINEN HYPEROSMOLAREN STIMULUS

Ob die reduzierte Aktionspotential-evozierte Transmitterfreisetzung in den TRPC-defizitären Neuronen mit einer Reduktion der Poolgröße fusionsbereiter Vesikel (RRP) oder einer verminderten Freisetzungswahrscheinlichkeit einhergeht, sollte durch hyperosmolare Stimulation untersucht werden. Letztere führt zur Exozytose sämtlicher, sich in fusionsbereitem Zustand befindlichen Vesikel. Die transiente Sekretionsantwort ist auf die Entleerung des Pools exozytose-kompetenter Vesikel zurückzuführen. Die nachfolgende Plateauphase während andauernder Sucrorestimulation spiegelt die unmittelbare Freisetzung neuer Vesikel wieder, die den fusionskompetenten Zustand erreichen. Das Ladungsintegral der transienten Antwort ist somit ein Maß für die Poolgröße fusionskompetenter Vesikel (Stevens and Tsujimoto, 1995, Rosenmund and Stevens, 1996, Stevens and Wesseling, 1998).

Um die Fraktion des exozytose-kompetenten Pools, der durch ein einzelnes Aktionspotential freigesetzt wird exakt zu bestimmen, wird die mittlere Ladung von zehn einzelnen Aktionspotential-evozierten Antworten (Abb. 14 A) zum Gesamtladungstransfer während der Überspülung mit einer hyperosmolaren 500 mM Saccharoselösung (Abb. 14 B) in Bezug gesetzt. Um die Poolgröße präzise zu bestimmen, wird das Integral des Stromflusses berechnet und um den Betrag korrigiert, der den Gleichgewichtszustand zwischen Wiederauffüllen des Pools und Exozytose während der hypertonen Stimulation (Abb. 14 B: ockerfarben unterlegt) widerspiegelt (Stevens und Wesseling, 1999). Zur Berechnung der Freisetzungswahrscheinlichkeit wird der Quotient aus der mittleren Ladung der EPSCs und der Ladung des Pools gebildet.

Ergebnisse

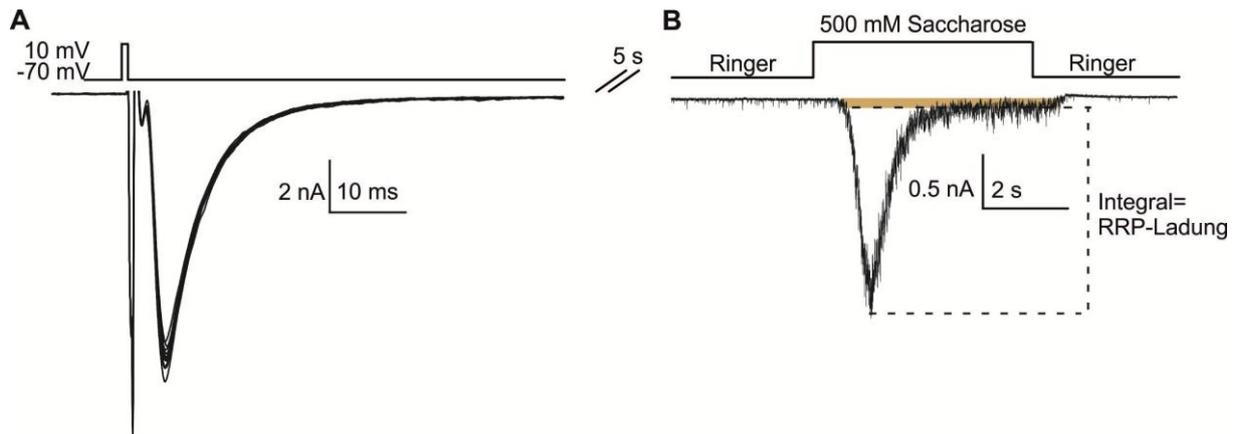


Abb.14: Bestimmung der Poolgröße und der Freisetzungswahrscheinlichkeit in autaptischen Neuronen. (A) 10 Aktionspotential evozierte exzitatorische postsynaptische Ströme (EPSCs) eines Wildtyp-Neurons, gemessen mit einer Frequenz von 0,2 Hz. Die EPSC- Amplitude variiert zwischen den 10 Messungen nur wenig. (B) Fünf Sekunden nach der EPSC-Messung wird dieselbe Zelle mit einer 500 mM Saccharoselösung überspült, wodurch der gesamte Vorrat fusionsbereiter Vesikel freigesetzt wird. Der postsynaptische Strom wird zur Bestimmung der Poolgröße (RRP Ladung) herangezogen. Die Freisetzungswahrscheinlichkeit wird als Quotient aus der Ladung des EPSCs und der Ladung des Pools berechnet.

In guter Korrelation zu Abb.12 weisen die TRPC1/C4/C5-tko-Zellen im Vergleich zu den Wt-Zellen eine signifikante Reduktion in der Amplitude (Wt: $9,48 \pm 1,08$ nA, $n=26$; TRPCtko: $6,38 \pm 0,67$ nA, $n=37$; $p=0,0127$) und in der Ladung (Wt: $104,7 \pm 13,58$ pC; TRPCtko: $68,26 \pm 7,85$ pC; $p=0,016$) der EPSCs auf (Abb. 15 A, C). Die Analyse der Poolgröße durch Applikation einer 500 mM Saccharoselösung in den TRPCtko-Zellen zeigt eine vergleichbare jedoch nicht signifikante Reduktion in der Poolgröße auf (Wt: $2124,5 \pm 375,6$ pC; $n=26$, TRPCtko: $1543,38 \pm 201,39$ pC; $n=37$; Abb. 15 B, C). Dieser Unterschied in der Poolgröße (in TRPCtko-Zellen 27 % Reduktion gegenüber Wt-Zellen) war nur etwas geringer als der Unterschied in der Amplitude (Amplitude um 33% reduziert in TRPCtko-Zellen) oder der Ladung (Ladung um 35% reduziert in TRPCtko-Zellen) und nicht signifikant. In guter Übereinstimmung damit war die Freisetzungswahrscheinlichkeit in den TRPCtko-Zellen verglichen mit den Kontrollzellen nicht verändert (Wt: $0,068 \pm 0,20088$; TRPCtko: $0,071 \pm 0,01$).

Ergebnisse

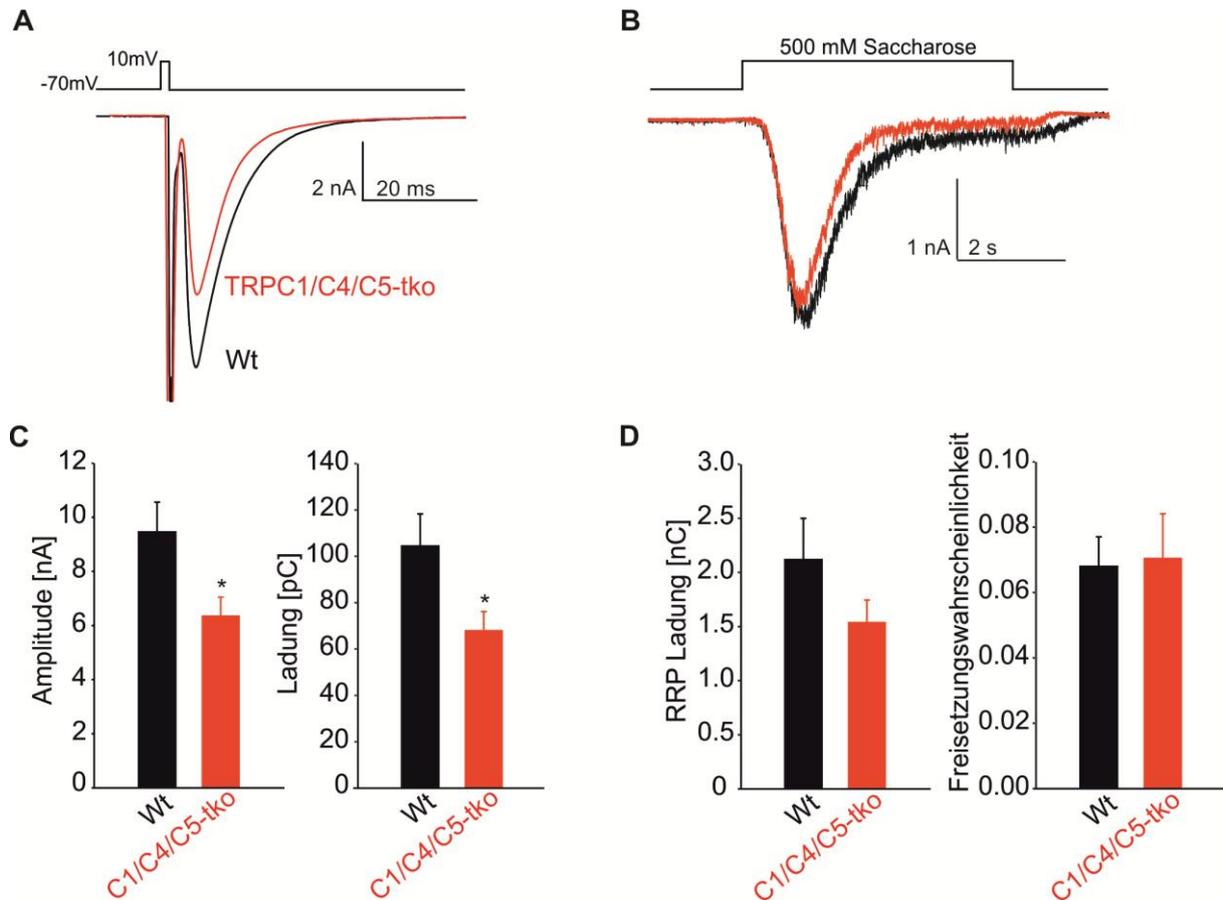


Abb.15: Bestimmung der Poolgröße in TRPC1/C4/C5-tko Neuronen. (A) Repräsentative Darstellung eines Aktionspotential-evozierten EPSCs, gemessen in autaptischen Wildtyp- (schwarz) oder TRPC1/C4/C5-triple- knockout-Neuronen (rot). Nach 5 s wurde die gleiche Zelle zur Ermittlung der Poolgröße durch Perfusion mit einer hyperosmolaren Saccharoselösung stimuliert (B). (B) Exemplarische sekretorische Antwort von Wildtyp- oder TRPC1/C4/C5-tko-Neuronen auf die Stimulation mit einer hyperosmolaren Saccharoselösung. (C) Quantitative Analyse der EPSC- Amplitude und -Ladung. Der evozierte postsynaptische Strom ist in tko-Neuronen gegenüber Wildtyp-Neuronen signifikant reduziert. (D) Quantitative Analyse der RRP-Ladung und der Freisetzungswahrscheinlichkeit. TRPC1/C4/C5-tko-Neurone haben eine mit Wildtyp-Neuronen vergleichbare Freisetzungswahrscheinlichkeit zeigen jedoch einen Trend zu einem kleineren Pool exozytosekompetenter Vesikel (Wt n= 26, TRPCtko n= 37, t-Test).

5.1.5. BESTIMMUNG DER POOLGRÖÖE FUSIONSBEREITER VESIKEL (RRP) DURCH HOCHFREQUENTE STIMULATION AUTAPTISCHER NEURONE

In früheren Studien wurde bereits gezeigt, dass sich die Aktionspotential-evozierte Antwort unter Verwendung des schnellen Ca^{2+} -Puffers BAPTA in der Patchpipette nahezu vollständig blockieren lässt, wohingegen die Antwort auf die hyperosmolare Saccharoselösung durch den Ca^{2+} -Chelator kaum beeinflusst wird (Rosenmund and Stevens, 1996). Das bedeutet auch, dass diese Methode der Poolbestimmung weitgehend Ca^{2+} -unabhängig ist.

Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte jedoch die Rolle der TRPC1/C4/C5-Proteine in der synaptischen Transmission, insbesondere in ihrer Funktion als Ca^{2+} -permeable Kanäle untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde zusätzlich eine alternative Methode verwendet, bei der die Poolgröße durch einen physiologischen Stimulus ermittelt wird (Thanawala and Regehr, 2016). Bei diesem Verfahren werden die Neurone durch eine hochfrequente Folge von Aktionspotentialen stimuliert. Durch diesen Stimulus werden die exozytosekompetenten Vesikel schneller freigesetzt, als sie wieder nachgeliefert werden können. Dies hat eine allmähliche Erschöpfung des Pools zur Folge, wodurch die evozierte Antwort kontinuierlich abnimmt und die am Ende der Messung noch verbleibende Exozytoseaktivität nur noch auf dem Wiederauffüllungsvorgang des RRP's beruht (Abb.16 A).

Die Aktionspotential-evozierte Antwort besteht aus zwei kinetisch unterscheidbaren Komponenten. In der initialen Phase geschieht die Transmitterfreisetzung synchron als Folge des Aktionspotential-induzierten Ca^{2+} -Einstroms. Diese synchrone Exozytose wird von einer verspäteten, auch asynchron genannten Freisetzung begleitet, die mehrere Hundert Millisekunden nach dem Maximum der Ca^{2+} -Transienten anhält (Hagler and Goda, 2001, Kaeser and Regehr, 2014).

Während die synchrone Freisetzung in einem glutamatergen Neuron unter konsekutiver Stimulation typischerweise abnimmt (Abb.16 A₂ a und Abb. 16 B) , steigt die asynchrone Freisetzung durch Akkumulation von Ca^{2+} in der Präsynapse progressiv an und erreicht ihr Maximum gegen Ende der Stimulationsdauer (Abb.16 A₂ b und Abb. 16 B). Die Darstellung der, kumulativ gegen die Stimulusanzahl aufgetragenen, synchronen EPSC-Ladung (Abb. 16 C) zeigt eine sich schnell ändernde anfängliche Phase, in der sich der Pool entleert, der eine lineare Komponente folgt, die das Wiederauffüllen des erschöpften Pools und die sofortige Freisetzung dieser Vesikel repräsentiert. Um die Größe des RRP's unter Ausschluss der Komponente, die das Wiederauffüllen repräsentiert zu ermitteln, wird die Regressionsgerade innerhalb des linearen Graphenabschnitts bestimmt und zum Stimulus Null zurückextrapoliert. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Y-Achse zeigt die initiale RRP-Ladung des gemessenen Neurons an (Otsu et al., 2004, Moulder and Mennerick, 2005).

Ergebnisse

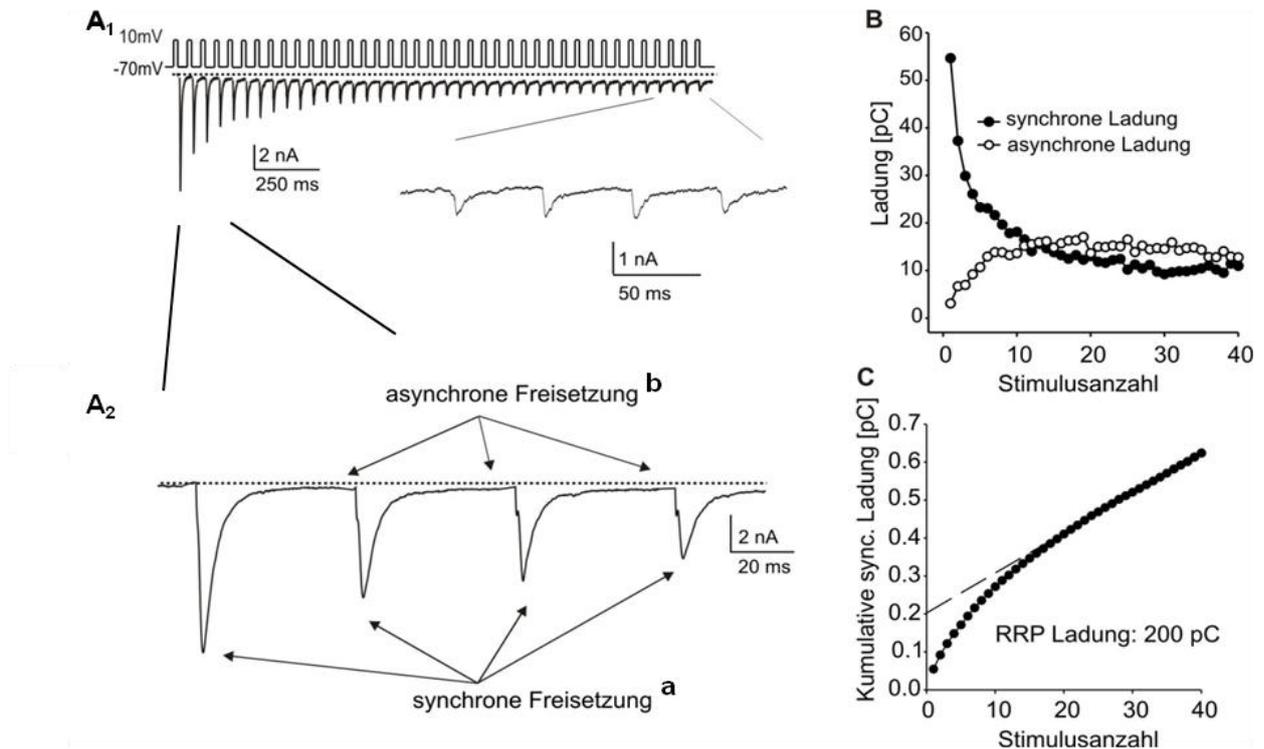


Abb.16: Ermittlung der Poolgröße in autaptischen Neuronen durch hochfrequente Stimulation. (A) Aktionspotential evozierte exzitatorische postsynaptische Ströme einer autaptischen Wildtypzelle, die mit einer Frequenz von 20 Hz durch 40 konsekutive depolarisierende Pulse stimuliert wurde. EPSCs besitzen eine synchrone und eine asynchrone Komponente, die sich in einer Abweichung von der Basislinie (gepunktete Linie) manifestiert. (B) Die synchrone Ladung nimmt im Verlauf der Stimulation schnell bis auf einen Basiswert ab, hingegen steigt die asynchrone Ladung mit fortwährender Stimulation allmählich auf einen Maximalwert an. (C) Aus der, kumulativ gegen die Stimulusanzahl aufgetragenen, synchronen Ladung wird die Poolgröße exozytosekompetenter Vesikel (RRP Ladung) ermittelt. Dazu wird die Regressionsgerade innerhalb des linearen Graphenabschnitts bestimmt und zum Stimulus Null zurückextrapoliert. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Y-Achse zeigt die anfängliche RRP Ladung des gemessenen Neurons an.

Dieses Messprotokoll wurde in parallel hergestellten autaptischen Neuronenkulturen von Wt- bzw. TRPCtko-Tieren angewendet, um mögliche Unterschiede in der Poolgröße, dem Depletionsverhalten, der Freisetzungswahrscheinlichkeit oder dem Verhalten der synchronen bzw. der asynchronen Ladung über den Stimulus hinweg aufzudecken. Die Messungen wurden in einem Zeitfenster durchgeführt, in dem die Neurone zwischen 7 und 11 Tagen in Kultur waren. Die verwendete Extrazellulärlösung enthielt neben 2 mM Mg^{2+} zusätzlich auch noch 50 μM APV, um die NMDA-Rezeptoren zu blockieren und dadurch Effekte durch Langzeitpotenzierung zu unterbinden.

Die TRPC-defizienten Neurone wiesen gegenüber den Wt-Zellen eine signifikante Reduktion in der Amplitude (Wt: $7,94 \pm 1,03$ nA; n=41, TRPCtko: $4,59 \pm 0,522$ nA; n= 36; p=0,007) und in der synchronen Ladung (Wt: $74,23 \pm 11,26$ pC, TRPCtko: $40,423 \pm 4,93$ pC; p= 0,009) des ersten EPSCs auf (Abb. 17 A,B,C). Ähnlich wie die Wt-Zellen zeigten die TRPCtko-Zellen

Ergebnisse

über die Dauer der Messung hinweg eine Verringerung in der Amplitude und im synchronen Ladungstransfer, was durch die Erschöpfung des Pools während der hochfrequenten Stimulation zustande kommt (Abb.17 B₁₋₂). Im Vergleich zu den Kontrollzellen nahm die Antwort in den TRPCtko-Zellen auf niedrigere Werte am Ende der Messung ab. Dagegen nahm die asynchrone Ladung mit fortlaufender Stimulation zu und erreichte bei der Kontrollgruppe deutlich höhere Werte, als bei den TRPCtko-Zellen (Wt: $26,37 \pm 3,82$ pC; TRPCtko: $16,6 \pm 2,24$ pC; $p= 0,036$). Für die Quantifizierung der asynchronen Ladung wurde jeweils der Mittelwert aus den letzten fünf EPSCs gebildet (Abb. 17 B₃ und Abb.17 C₃). Die kumulativ aufgetragene synchrone Ladung wurde zur Bestimmung des initialen Pools fusionsbereiter Vesikel herangezogen. Im Vergleich zu den Kontrollzellen wurde in den TRPCtko-Zellen eine deutlich verringerte Poolgröße ermittelt (Abb.17 D). Diese Reduktion der Poolgröße auf etwa die Hälfte war signifikant (Wt: $432,4 \pm 66,24$ pC, TRPCtko: $233,0 \pm 32,47$ pC; $p= 0,018$). Aus der Ladung des ersten EPSCs geteilt durch die Ladung der ermittelten Poolgröße wurden für Wt- und TRPCtko- Zellen nahezu gleiche Freisetzungswahrscheinlichkeiten (Wt: $0,214 \pm 0,014$, TRPCtko: $0,225 \pm 0,0143$) berechnet (Abb. 17 E). Aus der kumulativ aufgetragenen totalen Ladung (Abb. 17F) konnte die Wiederauffüllrate des RRP's anhand der Steigung der Regressionsgeraden innerhalb des linearen Graphenabschnitts bestimmt werden (Abb. 17 G). Letztere war in den TRPC-defizienten Zellen deutlich geringer als in den Wildtyp-Zellen (Wt: $42,8 \pm 6,49$ pC/Stim., TRPCtko: $29,9 \pm 3,85$ pC/Stim.).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die TRPC1/C4/C5-Kanäle während hoher synaptischer Aktivität die Bereitstellung fusionsbereiter Vesikel beschleunigen und dadurch die Poolgröße erhöhen.

Ergebnisse

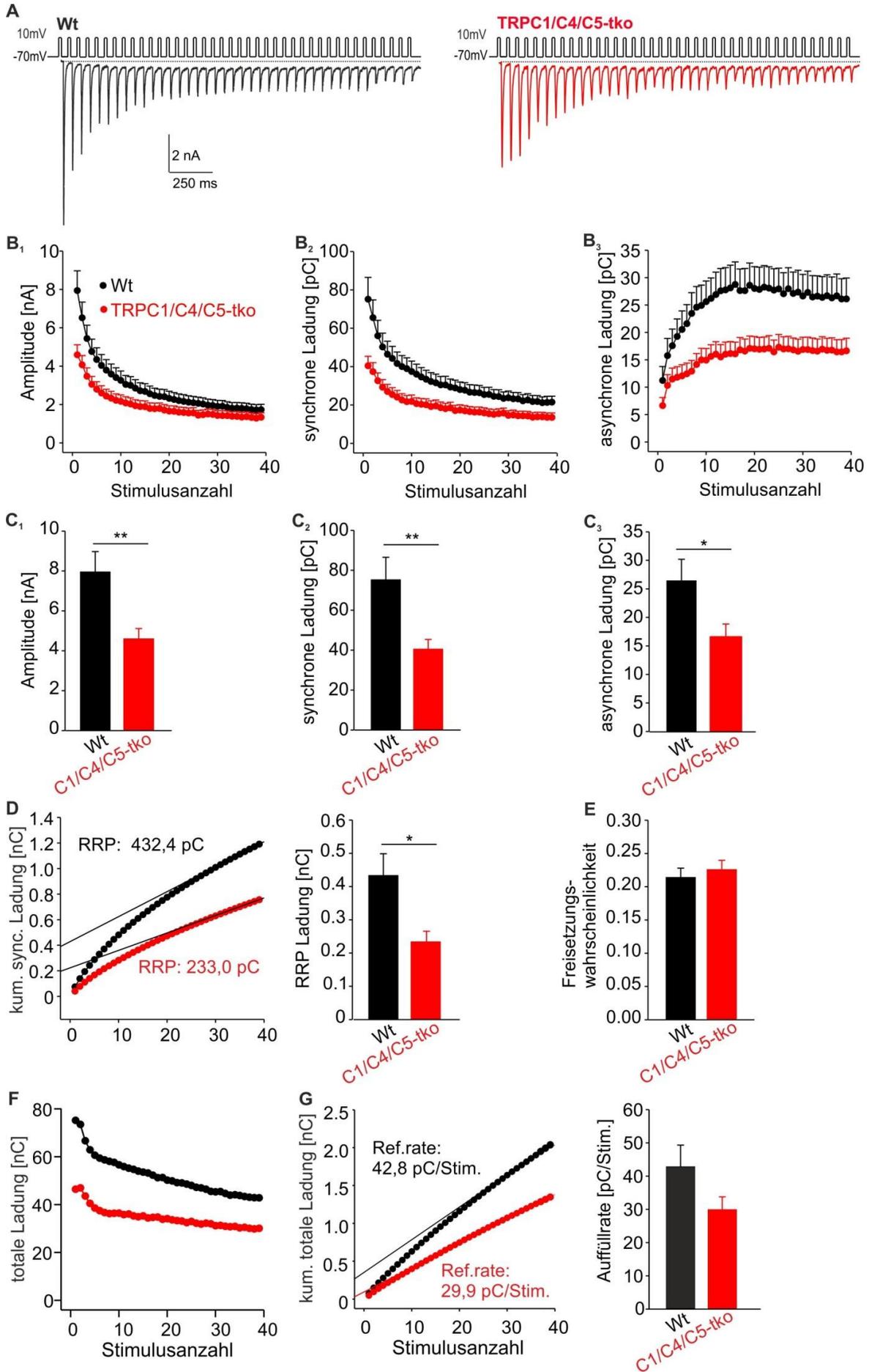


Abb.17: Der Verlust der TRPC-Kanalaktivität reduziert die Poolgröße fusionskompetenter Vesikel. (A) Repräsentative Ableitung eines autaptischen Wt- oder TRPCtko-Neurons bei 20 Hz-Stimulation. (B₁₋₃) Darstellung der Amplitude, der synchronen und der asynchronen Ladung über den Verlauf der Stimulation. TRPCtko-Zellen (n=36) haben im Vergleich zu den Kontrollzellen (n=41) eine reduzierte Antwort (C₁₋₃) Quantitative Analyse der Amplitude, der synchronen und der asynchronen Ladung. (D) Aus der kumulativ aufgetragenen synchronen Ladung wird ein signifikant reduzierter Pool in den TRPCtko-Zellen ermittelt. (E) Die Freisetzungswahrscheinlichkeit in TRPCtko-Zellen unterscheidet sich nicht von der in Wt-Zellen. (F) Totale Ladung über den Verlauf der Stimulation. (G) Aus der Steigung der Regressionsgeraden der kumulativ aufgetragenen totalen Ladung wird die Auffüllrate des Pools bestimmt.

5.1.6. ÜBEREXPRESSION VON TRPC-KANÄLEN IN HIPPOKAMPALEN NEURONENKULTUREN

Um nicht nur die Auswirkungen einer TRPC-Defizienz, sondern auch die Folgen eines Überangebotes an TRPC-Kanälen zu studieren, wurden Lentiviren zur Expression von *trpc1* oder *trpc5* in neuronalen Zellen hergestellt (Abb. 18). Die verwendeten lentiviralen Plasmide waren dabei so konstruiert, dass TRPC1 als Fusionsprotein mit dem Fluorophor YFP und TRPC5 als Fusionsprotein mit dem Fluorophor eGFP translatiert wurde. Beide Fluorophore waren an das C-terminale Ende des jeweiligen TRPC-Proteins gekoppelt. Mit Hilfe eines anti-GFP-Antikörpers konnte sowohl TRPC1-YFP, als auch TRPC5-eGFP nachgewiesen werden. Anhand des Vergleichs zwischen den Immunfluoreszenzfärbungen mit den korrespondierenden Hellfeldaufnahmen konnte für beide Viren eine hohe Transfektionseffizienz nachgewiesen werden. Über 90 % der Neurone waren transfiziert und exprimierten TRPC1-YFP (Abb.18 A₁-A₃) bzw. TRPC5-eGFP (Abb.18 B₁-B₃).

Ergebnisse

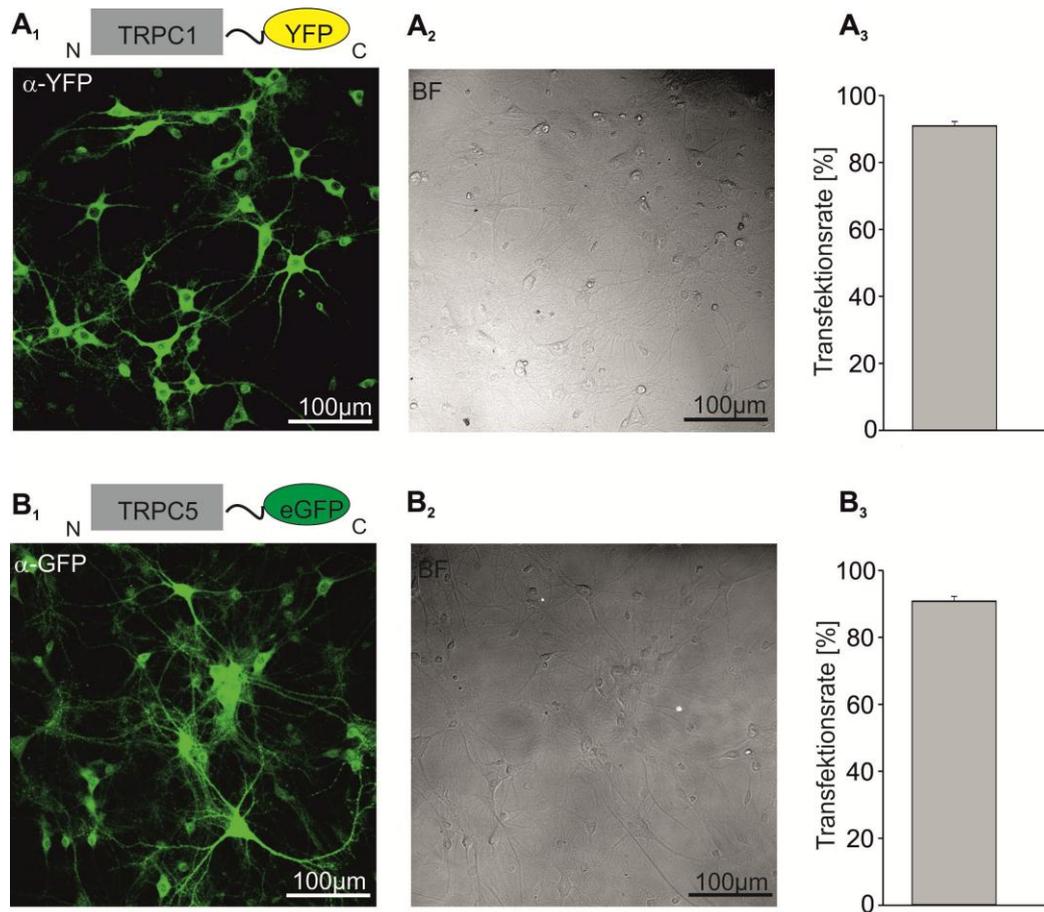


Abb. 18: Lentivirale Expression von TRPC1-YFP oder TRPC5-eGFP in Neuronen. Immunfluoreszenzaufnahmen (20x) von (A) TRPC1-YFP - oder (B) TRPC5-eGFP - exprimierenden Neuronen. Beide TRPC-Varianten werden im Zellsoma und entlang neuronaler Fortsätze nachgewiesen. Der Vergleich mit dem Hellfeldbild zeigt, dass über 90 % der Zellen mit dem jeweiligen Virus transfiziert sind und entweder (A) TRPC1-YFP oder (B) TRPC5-eGFP exprimieren. A₃/B₃ Bestimmung der Transfektionsrate (TRPC1-YFP: n= 5; 88 Zellen; Transfektionsrate 91,0 %, TRPC5-eGFP: n=5 ;94 Zellen; Transfektionsrate 90,7 %).

5.1.7. UNTERSUCHUNG DER SYNAPTISCHEN LOKALISATION DES TRPC1-KANALS IN HIPPOKAMPALEN NEURONENKULTUREN

Aufgrund des Fehlens spezifischer Antikörper gegen TRPC-Proteine wurde die lentivirale Expression von *trpc1*-YFP dazu verwendet, die subzelluläre Lokalisation des TRPC1-Proteins zu bestimmen. Um zu untersuchen, ob dieses Protein in Synapsen hippocampaler Neurone vorkommt, wurden Neuronenkulturen mit dem TRPC1-YFP-Virus infiziert und nach einer Kultivierungsdauer von 14 Tagen immunzytochemisch gegen GFP und Synapsin gefärbt. Die Färbung gegen GFP diente dazu, TRPC1-YFP nachzuweisen, wohingegen mit der Färbung gegen das vesikuläre Markerprotein Synapsin synaptische Strukturen identifiziert werden sollten (De Camilli et al., 1983, Thiel, 1993). Am konfokalen Mikroskop aufgenommene Bilder der Synapsinfärbung zeigen ein charakteristisches punktförmiges

Ergebnisse

Muster auf, das für eine Vesikelakkumulationen in den Synapsen der Neurone spricht. TRPC1-YFP scheint dagegen gleichmäßiger über den gesamten Neuriten verteilt zu sein. Legt man beide Aufnahmen übereinander (Merge), so ist eine klare Kolokalisation der beiden untersuchten Proteine in einigen Strukturen zu erkennen (Abb. 19 C).

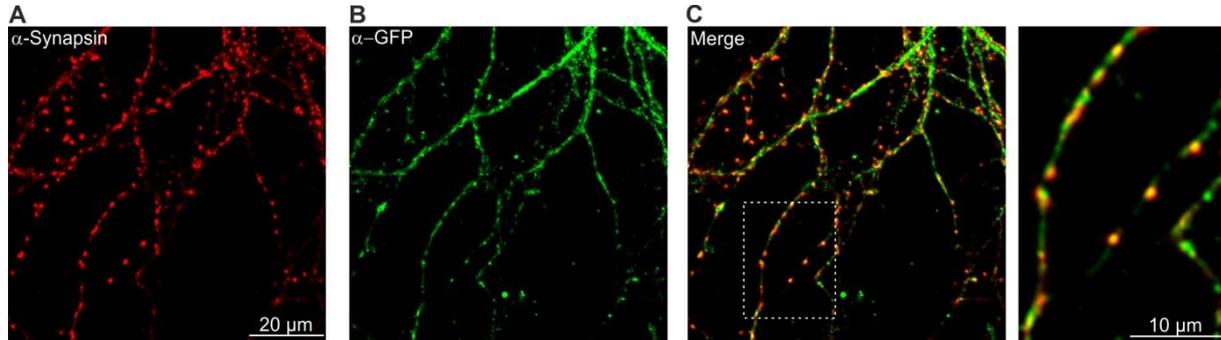


Abb. 19: Synaptische Lokalisation von TRPC1-YFP in kultivierten Neuronen. Konfokale 100x-Aufnahme von TRPC1-YFP exprimierenden Neuronen, die immunzytochemisch gegen Synapsin (rot) und GFP (grün) gefärbt wurden. (A) Synaptische Strukturen werden anhand der Immunfluoreszenzfärbung gegen Synapsin detektiert. (B) Immunfluoreszenzfärbung gegen GFP zum Nachweis der TRPC1-YFP-Expression. (C) Anhand der Doppelfärbung wird die Lokalisation in synaptischen Strukturen nachgewiesen (links 100 x Aufnahme, rechts vergrößerte Darstellung einzelner synaptischer Strukturen).

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass sich TRPC1 nicht nur im Zellsoma und in neuronalen Fortsätzen, sondern wie anhand der Kolokalisation mit dem synaptischen Markerprotein Synapsin gezeigt, auch in synaptischen Strukturen befindet. Dieses Ergebnis ist für die Interpretation der nachfolgenden elektrophysiologischen Daten von Bedeutung.

5.1.8. NACHWEIS VON TRPC1-YFP UND TRPC5-EGFP IN INFIZIERTEN MASSENKULTUREN MITTELS WESTERN BLOT ANALYSE

Um zu überprüfen, ob die Transfektion der Neurone mit dem TRPC1-YFP-bzw. mit dem TRPC5-eGFP-Lentivirus in ausreichender Anzahl zur Herstellung der gewünschten Proteine in den Neuronen führt, wurden Lysate aus den Zellen infizierter Massenkulturen mittels Western Blot analysiert (Abb. 20 A). In Lysaten aus Wildtyp-Zellen, die mit TRPC5-eGFP- (136 kDa), TRPC1-YFP- (115 kDa) oder GFP-Viren (25 kDa) transfiziert wurden, konnte das viral exprimierte Protein in der zu erwartenden Größe detektiert werden. Desweiteren wurde in allen Lysaten aus transfizierten Zellen ein unspezifisches Signal bei einer Größe von ca. 60 kDa erhalten, das auch in Lysaten aus untransfizierten Zellen vorhanden ist und daher nicht auf die virale Expression zurückzuführen ist. Bei allen Lysaten aus transfizierten Zellen wurde ein Produkt bei ca. 50 kDa detektiert, das vermutlich eine Dimerisierung abgespaltener GFP-Produkte darstellt. Als Ladekontrolle wurde nach dem Entfernen der

Ergebnisse

Antikörper von der Membran eine zweite Western Blot Analyse mit einem Antikörper gegen die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt (Abb. 20 B). Die GAPDH ist ein 36 kDa schweres Protein, das als Enzym der Glykolyse die Reaktion von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat katalysiert. Das Gen der GAPDH wird als sogenanntes Haushaltsgen konstitutiv und in allen Zellen exprimiert, weshalb sich der Nachweis dieses Proteins zur Überprüfung der aufgetragenen Proteinmengen eignet. Die Ladekontrolle zeigt, dass alle Spuren des Gels auf die Membran übertragen wurden und dass sich die Proteinmengen der Lysate aus untransfizierten Zellen nicht erheblich von denen aus TRPC1-YFP-transfizierten Zellen unterscheidet. Somit können die erhaltenen Signale tatsächlich auf die Expression von TRPC1-YFP zurückgeführt werden.

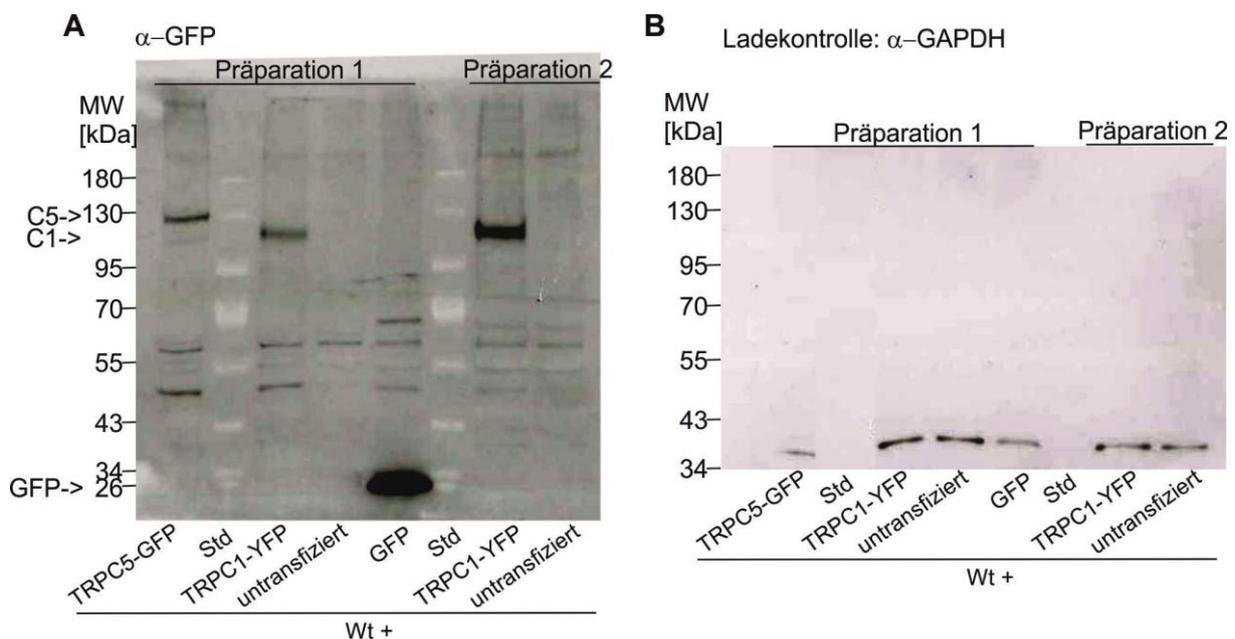


Abb.20: Nachweis der TRPC1-YFP- oder TRPC5-eGFP-Expression in kultivierten Neuronen mittels Western Blot Analyse. (A) Immunoblot mit dem polyklonalen Antikörper α -GFP, der sowohl an GFP, als auch an YFP bindet. Es wurden Lysate aus TRPC5-eGFP (30 μ l)-, TRPC1-YFP (30 μ l)-, und GFP-transfizierten Zellen (20 μ l) vergleichend mit den Lysaten aus untransfizierten Zellen untersucht. TRPC1-YFP, TRPC5-eGFP und GFP werden exprimiert und in der zu erwartenden Proteingröße detektiert. (B) Ladekontrolle mit α -GAPDH (Std= Proteinstandard).

5.1.9. MESSUNG DER SPONTANAKTIVITÄT IN TRPC1-YFP- UND TRPC5-EGFP EXPRIMIERENDEN MASSENKULTUREN

Welche Auswirkungen ein Überangebot des TRPC1-Proteins auf die synaptische Transmission hat, wurde anhand von elektrophysiologischen Messungen untersucht. Dazu wurde die Spontanaktivität in parallel angelegten Massenkulturen hippocampaler Wildtyp-, TRPC1-YFP-exprimierender Wildtyp-, TRPCtko- und TRPC1YFP-exprimierender TRPCtko-

Ergebnisse

Neurone untersucht (Abb. 21). Dabei zeigte sich, dass die Überexpression von TRPC1-YFP in Wildtypzellen zu einer 2,5-fach gesteigerten mEPSC-Frequenz (Wt: $1,049 \pm 0,207$ Hz, $n=25$, Wt+TRPC1YFP: $2,77 \pm 0,434$ Hz, $n=22$, $p=0,00054$) gegenüber den untransfizierten Zellen führt (Abb. 21 A,B). Im Gegensatz dazu veränderte die Expression von TRPC1 in den TRPC-defizienten Zellen die mEPSC-Frequenz nicht (TRPCtko: $0,945 \pm 0,15$ Hz, $n= 22$, TRPCtko+TRPC1-YFP: $0,832 \pm 0,14$ Hz , $n= 18$). Dieser selektiv in Wildtyp-Zellen auftretende Befund schließt mögliche virale Transfektionsartefakte aus und zeigt, dass die Frequenzsteigerung in den transfizierten Wildtyp-Zellen tatsächlich auf die zusätzliche Expression des TRPC1-Proteins zurückzuführen ist. Vorherige Arbeiten in Hek 293-Zellen lieferten Hinweise, dass TRPC1 darauf angewiesen ist, Heterotetramere mit TRPC4 oder TRPC5 zu bilden (Strubing et al., 2001, Hofmann et al., 2002). Nur in Form dieser Komplexe (und nicht als TRPC1-Homotetramer) wird TRPC1 in die Plasmamembran transportiert. Anhand dieser Befunde kann man darauf schließen, dass die anderen TRPC-Varianten benötigt werden, um die mEPSC-Frequenz in TRPC1-YFP-exprimierenden Neuronen zu steigern. TRPC1 fungiert vermutlich nicht alleine als Ionenkanal in der Plasmamembran, sondern agiert als Bestandteil hetero-oligomerer Kanäle zusammen mit TRPC4 oder TRPC5.

Bezüglich der Amplitude (Wt: $38,11 \pm 1,86$ pA, Wt+TRPC1YFP: $45,22 \pm 2,79$ pA, TRPCtko: $41,78 \pm 2,76$, TRPCtko+TRPC1YFP: $43,06 \pm 3,82$ pA), der Ladung (Wt: $87,51 \pm 5,63$ fC, Wt+TRPC1YFP: $113,39 \pm 7,25$ fC, TRPCtko: $103,503 \pm 5,09$ fC, TRPCtko+TRPC1YFP: $111,77 \pm 9,57$ fC) und der Halbwertsbreite (Wt: $1,35 \pm 0,052$ ms, Wt+TRPC1YFP: $1,59 \pm 0,094$ ms, TRPCtko: $1,506 \pm 0,056$ ms, TRPCtko+TRPC1YFP: $1,67 \pm 0,11$ ms) der mEPSCs wurden ebenfalls nur in den TRPC1-YFP-exprimierenden Wildtypzellen leicht erhöhte Werte festgestellt (Abb. 21 B).

Ergebnisse

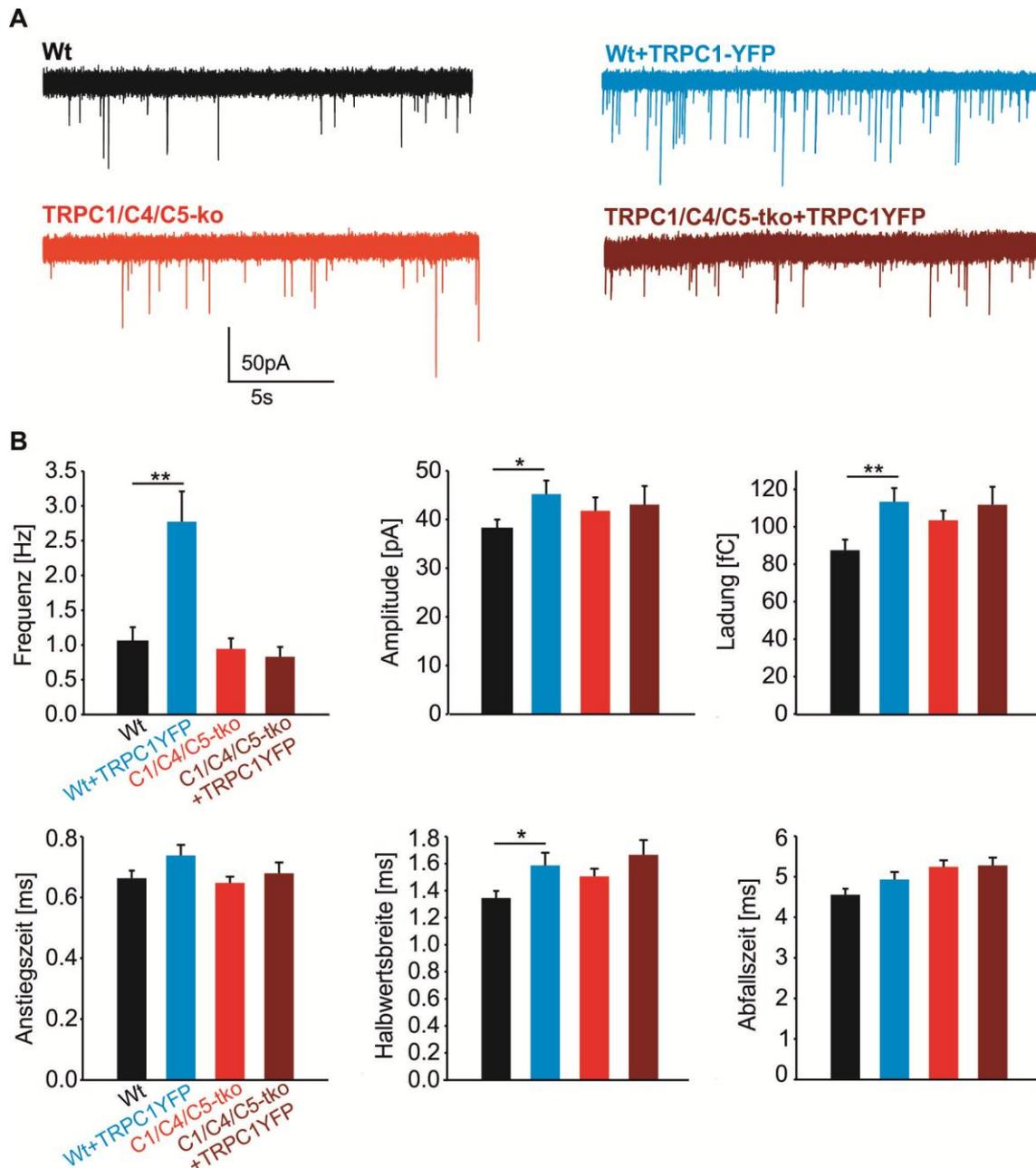


Abb.21: Expression von TRPC1-YFP steigert die mEPSC-Frequenz selektiv in Wildtyp-Zellen. (A) Repräsentative Messungen der Spontanaktivität in Wildtyp (schwarz, n=25)-, TRPC1-YFP-exprimierenden Wildtyp (blau, n=22)-, TRPC1/C4/C5-tko (rot, n=22)- und TRPC1-YFP-exprimierenden TRPC1/C4/C5-tko (dunkelrot, n=18)-Neuronen. (B) Quantitative Analyse der mEPSCs. Die Expression von TRPC1-YFP steigert die Frequenz spontaner Ereignisse selektiv in Wildtyp-Zellen. Andere Parameter wie Amplitude, Ladung und Halbwertsbreite werden durch die TRPC1-Expression nur geringfügig beeinflusst (t-Test zwischen Gruppen der gleichen Zelllinie).

Im Gegensatz zur TRPC1-YFP-Expression führte die Expression von TRPC5-eGFP in neuronalen Massenkulturen nicht nur in den Wildtyp-, sondern auch in den TRPC-defizienten Zellen zu einer deutlichen Steigerung der mEPSC-Frequenz (Abb.22). Das Überangebot an TRPC5 verursachte eine 2,5-fache Frequenzsteigerung gegenüber den untransfizierten Zellen in Wildtyp-(Wt: $1,68 \pm 0,29$ Hz; n= 25, Wt+TRPC5-eGFP: $4,36 \pm 1,18$ Hz; n= 20; p=

Ergebnisse

0,027) und in TRPCtko-Zellen (TRPCtko: $1,76 \pm 0,38$ Hz; $n= 23$; TRPCtko+TRPC5-eGFP: $4,46 \pm 1,01$ Hz; $n= 20$; $p= 0,012$). Dieser Befund legt nahe, dass TRPC5 im Gegensatz zu TRPC1 auch ohne die TRPC-Varianten C1 und C4, als TRPC5-Homotetramer, funktionelle Ionenkanäle bilden kann. Amplitude und Ladung der mEPSCs wurden durch die Expression von TRPC5 nur in den TRPC-defizienten Zellen geringfügig erhöht (Amplitude: TRPCtko: $40,3 \pm 1,85$ pA; TRPCtko+TRPC5-eGFP: $48,2 \pm 2,6$ pA; $p= 0,016$; Ladung: TRPCtko: $92,95 \pm 3,4$ fC; TRPCtko+TRPC5-eGFP: $116,04 \pm 5,63$ fC; $p= 0,00082$). Hinsichtlich der kinetischen Parameter Anstiegszeit, Abfallszeit und Halbwertsbreite unterschieden sich die mEPSCs der verschiedenen Gruppen nicht (Abb. 22 B).

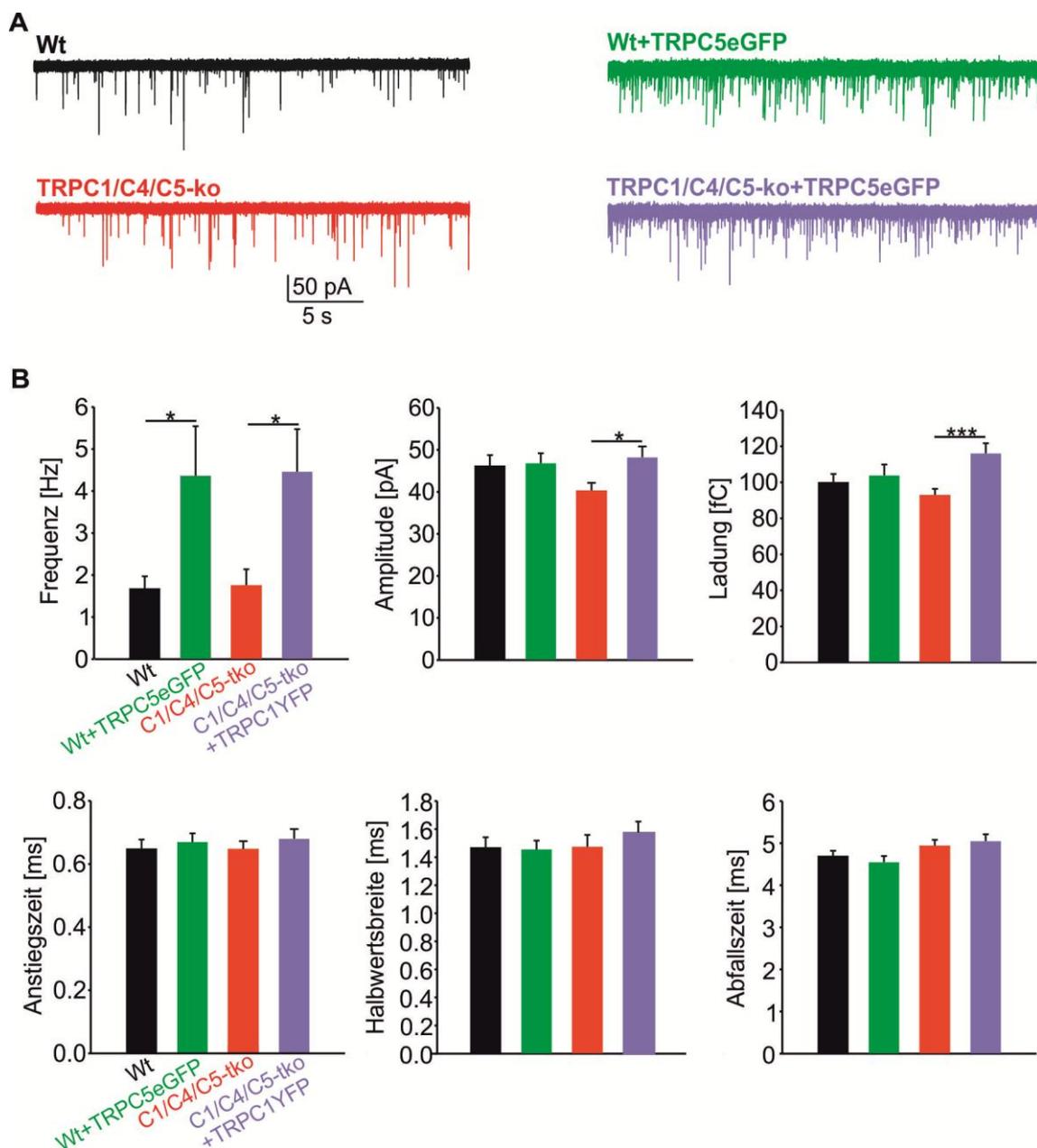


Abb. 22: TRPC5-Überexpression erhöht die Frequenz spontaner Vesikelfusionen. (A) Repräsentative Messungen der Spontanaktivität in Wildtyp (schwarz, n=25)-, TRPC5-eGFP-exprimierenden Wildtyp (grün, n=20)-, TRPC1/C4/C5-*tko*- (rot, n=23) und TRPC5-eGFP-exprimierenden TRPC1/C4/C5-*tko* (lila, n=20)-Neuronen. (B) Quantitative Analyse der quantalen Ereignisse. Die Expression von TRPC5-eGFP steigert die Frequenz spontaner Ereignisse in Wildtyp- und TRPC*tko*-Zellen. Amplitude und Ladung werden durch die TRPC5-Expression nur in den TRPC*tko*-Zellen geringfügig beeinflusst. Die kinetischen Parameter werden durch das Überangebot an TRPC5 nicht beeinflusst (t-Test zwischen Gruppen aus der gleichen Zelllinie).

Zusammenfassend zeigen die Resultate der TRPC1- bzw. TRPC5-Überexpressionsstudien in Massenkulturen, dass ein Überangebot dieser Proteine zu einer Steigerung der synaptischen Transmission in Form einer Frequenzerhöhung der quantalen Ereignisse führt, wohingegen die Kinetik der mEPCs weitgehend unverändert bleibt. Diese Ergebnisse deuten auf eine präsynaptische Funktion der TRPC-Kanäle hin. Im Falle der lentiviralen Expression von TRPC1 weist die selektiv in Wt-Neuronen auftretende Steigerung der spontanen Aktivität auf die Notwendigkeit der Heterotetramerbildung mit TRPC4 oder TRPC5 hin. Dagegen konnte durch TRPC5-Überexpression sowohl in Wt- als auch in TRPC*tko*-Neuronen eine Frequenzsteigerung der spontanen Ereignisse erreicht werden, was verdeutlicht, dass TRPC5 im Gegensatz zu TRPC1 dazu in der Lage ist als Homotetramer funktionelle Ionenkanäle zu bilden.

5.1.10. EINFLUSS DER TRPC1-ÜBEREXPRESSION AUF DIE SYNAPTOGENESE

Um zu überprüfen, ob eine veränderte Synaptogenese für die beobachtete Frequenzsteigerung der spontanen Aktivität in Massenkulturen TRPC1-YFP-exprimierender Wt-Neurone verantwortlich gemacht werden kann, wurde die Synapsendichte in transfizierten und untransfizierten Neuronen aus TRPC*tko*- und Wt-Mäusen bestimmt (Abb. 23). Dazu wurden immunzytochemische Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen das präsynaptische Protein Synapsin I und GFP-Antikörpern zum Nachweis der TRPC1-YFP-Expression durchgeführt.

Die GFP- und Synapsinsignale der Zellen wurden am konfokalen Mikroskop aufgenommen. Für die Auswertung der Signale wurde als Kriterium für identifizierte Synapsen eine Mindestgröße von 3 x 3 Pixel festgelegt. Als positive Synapsinsignale wurden solche bewertet, deren Fluoreszenzintensität nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz 5 x höher als die Standardabweichung des Hintergrundsignals war. Die Synapsinfärbungen wiesen in allen untersuchten Zellgruppen ein charakteristisches punktförmiges Muster auf, das die Vesikelakkumulation in den Synapsen der Neurone widerspiegelt (Abb. 23). Bildausschnittsvergrößerungen der Synapsinfärbungen zeigen, dass sich die Synapsen

Ergebnisse

entlang eines neuronalen Fortsatzes perlschnurartig aneinanderreihen. Die Synapsendichte wurde als Anzahl der Synapsen auf einem 50 μm langen Dendritenabschnitt in unmittelbarer Nähe des Zellsomas bestimmt. Diese unterschied sich zwischen den untersuchten Zellgruppen nur geringfügig und nicht signifikant (Wt: $26,97 \pm 1,95$; $n=20$; Wt+TRPC1-YFP: $25,67 \pm 1,96$; $n=20$; TRPCtko: $28,22 \pm 2,17$; $n=19$; TRPCtko+TRPC1-YFP: $27,21 \pm 1,67$; $n=17$).

Die Ergebnisse dieses Experiments zeigen, dass die Synaptogenese durch lentivirale Expression von TRPC1-YFP nicht verändert wird.

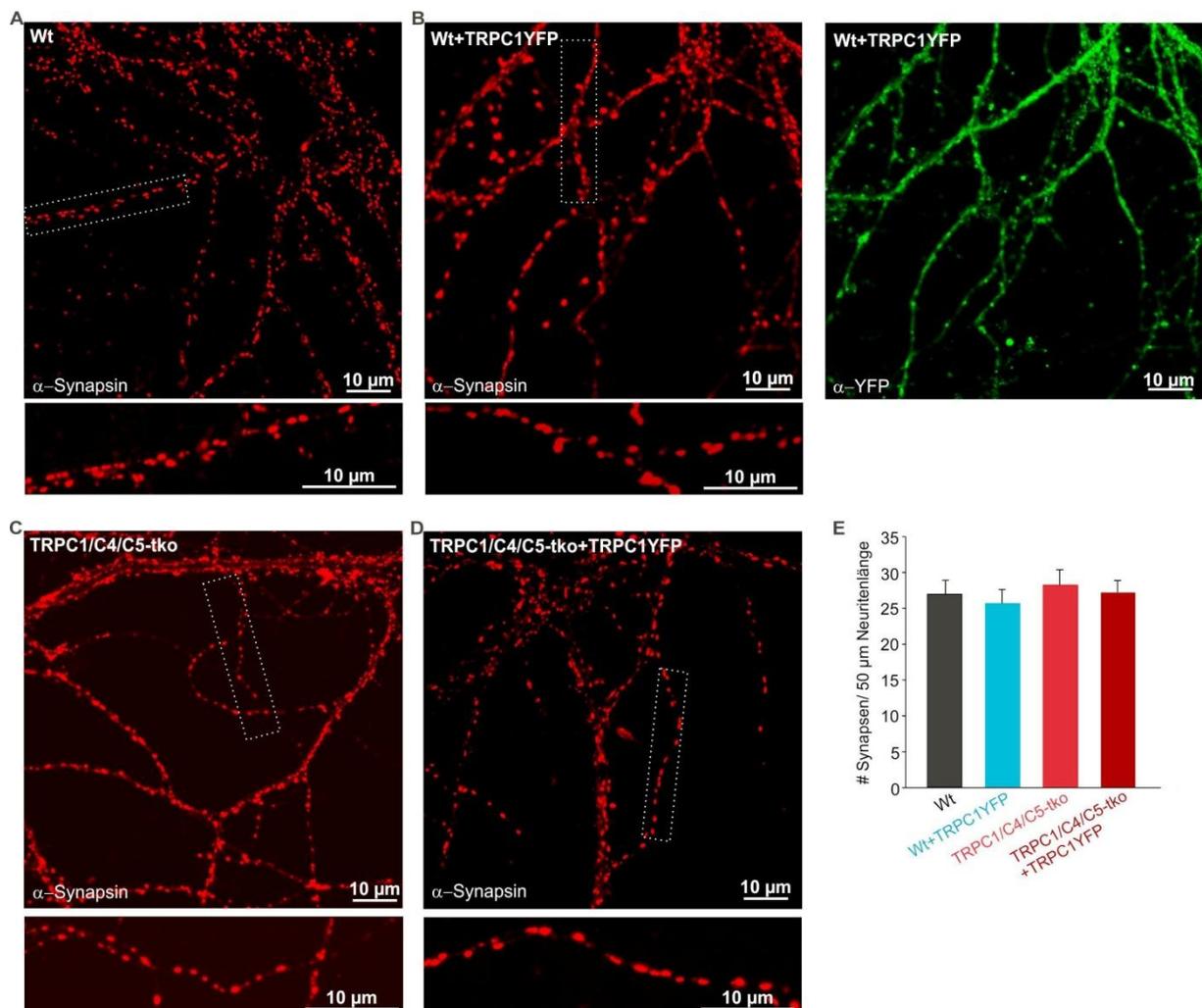


Abb. 23: Lentivirale Expression von TRPC1-YFP hat keinen Einfluss auf die Synaptogenese. (A-D) Exemplarische konfokale 100x-Aufnahmen immunzytochemischer Synapsinfärbungen in Massenkulturen von Wt-, TRPCtko-, TRPC1-YFP-transfizierten Wt- und TRPC1-YFP-transfizierten TRPCtko-Zellen. Unter der jeweiligen Übersichtsaufnahme ist die Nahaufnahme eines Neuriten mit Synapsin-positiven Signalen dargestellt. (E) Quantitative Analyse der Synapsendichte, dargestellt als Synapsenzahl auf einem 50 μm langen Neuritenabschnitt (Wt (schwarz) $n=20$, Wt+TRPC1YFP (blau) $n=20$, TRPCtko (rot) $n=19$, TRPCtko+TRPC1YFP (dunkelrot) $n=17$).

5.1.11. ANALYSE DER AKTIONSPOTENTIAL-EVOZIERTEN ANTWORT IN TRPC1-YFP-ÜBEREXPRIMIERENDEN AUTAPTISCHEN NEURONEN

Um die Auswirkungen einer zusätzlichen Expression von TRPC1 auf die Aktionspotential-evozierte Exozytose zu untersuchen, wurden autaptische Wt-Neurone mit TRPC1-YFP transfiziert. In einem Zeitfenster von 7-11 Tagen *in vitro* wurde die Antwort auf eine 20 Hz-Stimulation parallel in untransfizierten Wt-Zellen und in Wt-Zellen, die mit TRPC1-YFP transfiziert waren, gemessen.

TRPC1-YFP-exprimierende Zellen unterschieden sich hinsichtlich der initialen Werte ihrer Amplitude, ihrer synchronen und asynchronen Ladung nicht von den Kontrollzellen (Amplitude: Wt: $6,74 \pm 1,25$ nA; n= 14; Wt+TRPC1-YFP: $6,84 \pm 0,914$ nA; n= 17; synchrone Ladung: Wt: $57,08 \pm 11,55$ pC; Wt+TRPC1-YFP: $57,06 \pm 8,28$ pC; asynchrone Ladung: Wt: $3,75 \pm 1,1$ pC; Wt+TRPC1-YFP: $4,39 \pm 1,54$ pC) zeigten aber während fortdauernder konsekutiver Stimulation deutliche Unterschiede im Vergleich zu den untransfizierten Zellen (Abb. 24 A, B). Im Gegensatz zu den Kontrollzellen antworteten die TRPC1-YFP-transfizierten Zellen nicht mit einem typischen Depletionsverhalten, sondern wiesen während der ersten Stimuli eine deutliche Steigerung der synaptischen Antwort auf. Diese nahm im weiteren Verlauf ab, jedoch blieben Amplitude und synchrone Ladung am Ende der Messung gegenüber den Wt-Zellen erhöht. Die asynchrone Ladung, welche die Freisetzung zwischen den eigentlichen Stimuli reflektiert, steigerte sich über die Messung hinweg deutlich und erreichte am Ende der Stimulation verglichen mit den Wt-Zellen signifikant höhere Werte (Wt: $21,99 \pm 2,71$ pC; Wt+TRPC1-YFP: $34,46 \pm 5,02$ pC; p= 0,04; Abb. 24 B₃, C₃). Das Verhältnis der Amplitude des zweiten EPSCs zur Amplitude des ersten EPSCs ($Q_{\text{Amp EPSC2/Amp EPSC1}}$) als Maß für die synaptische Fazilitierung, eine Form der Kurzzeitplastizität (Zucker, 1989, Satake et al., 2012) war in den transfizierten Wt-Zellen gegenüber den untransfizierten Zellen signifikant erhöht (Wt: $0,877 \pm 0,04$; Wt+TRPC1-YFP: $1,14 \pm 0,05$; p = 0,00026; Abb. 24 C₁). Die Quantifizierung der Ladung des 10. EPSCs (Wt: $36,84 \pm 6,71$ pC ; Wt+TRPC1-YFP: $73,75 \pm 12,66$ pC; p= 0,022;) und der asynchronen Ladung (Wt: $21,99 \pm 2,71$ pC; Wt+TRPC1-YFP: $34,45 \pm 5,02$ pC; p= 0,04) zeigt, dass die synaptische Transmission während der 20 Hz-Stimulation durch die Expression von TRPC1-YFP gesteigert wird was ebenfalls auf ein verändertes Depletionsverhalten schließen lässt (Abb. 24 C₂, C₃). Aus der kumulativ gegen die Stimulusanzahl aufgetragenen, synchronen Ladung der EPSCs kann der Pool exozytose-kompetenter Vesikel (Wt: $351,61 \pm 66,23$ pC; Wt+TRPC1-YFP: $573,88 \pm 92,25$ pC; p= 0,023; Abb. 24 D) bestimmt werden (Otsu et al., 2004). Die Steigung der Geraden durch die letzten fünf Werte der kumulativ aufgetragenen totalen Ladung wurde zur Berechnung der Auffüllrate des Pools herangezogen (Liu et al., 2013). Diese war in TRPC1-YFP-transfizierten Zellen signifikant erhöht gegenüber den

Ergebnisse

Kontrollzellen (Wt: $41,73 \pm 5,31$ pC/Stim; Wt+TRPC1-YFP: $84,71 \pm 13,33$ pC/Stim; $p = 0,019$; Abb. 24 G). Dagegen war die Freisetzungswahrscheinlichkeit, berechnet als Quotient aus der totalen Ladung des ersten EPSCs und der RRP-Ladung, in den TRPC1-YFP-exprimierenden Zellen erniedrigt (Wt: $0,176 \pm 0,018$; Wt+TRPC1-YFP: $0,122 \pm 0,043$; $p < 0,001$ Abb. 24 G).

Ergebnisse

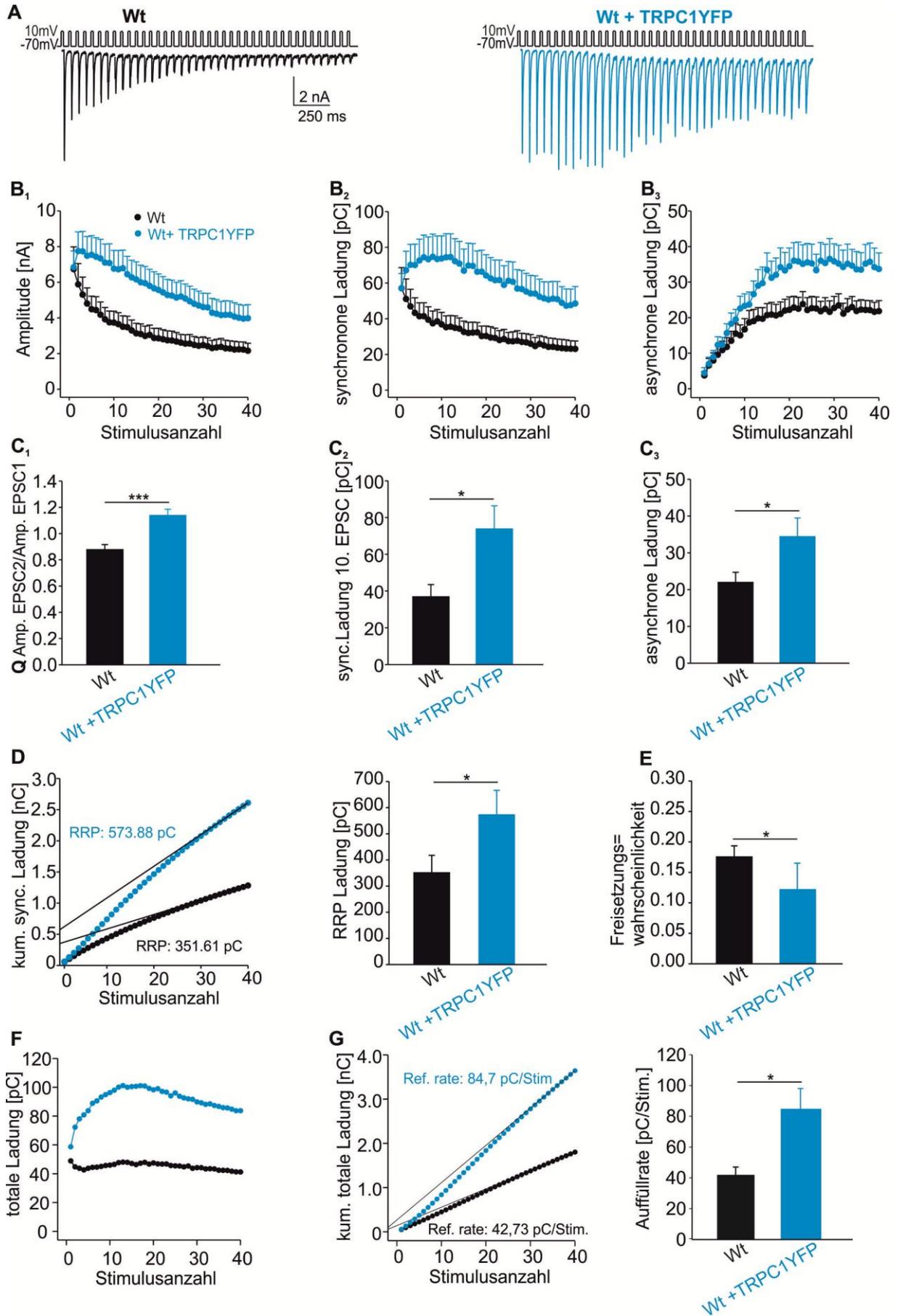


Abb. 24: Expression von TRPC1-YFP in Wildtyp-Neuronen führt zu einer aktivitätsabhängigen Steigerung der synaptischen Transmission. (A) Repräsentative Ableitung eines autaptischen Wt- (schwarz) und TRPC1-YFP-exprimierenden Wt-Neurons (blau) bei 20 Hz-Stimulation. (B₁₋₃) Darstellung der Amplitude, der synchronen und der asynchronen Ladung über den Verlauf der Messung. TRPC1-YFP-transfizierte Wt-Zellen zeigen im Gegensatz zu den Kontrollzellen keine Depression, sondern eine Steigerung der synaptischen Antwort während der ersten 10 Stimuli auf. (C₁₋₃) Quantitative Analyse der synaptischen Bahnung, der synchronen Ladung des 10. EPSCs und der asynchronen Ladung. (D, E) Der Pool exozytose-kompetenter Vesikel ist in TRPC1-YFP-exprimierenden Wt-Zellen erhöht, wohingegen die Freisetzungswahrscheinlichkeit gegenüber Wt-Zellen erniedrigt ist. (F, G) Darstellung der totalen und der kumulativen totalen Ladung über den Verlauf der Messung. Die Auffüllrate des Pools wird anhand der Steigung der Geraden durch die letzten fünf Werte der kumulativ aufgetragenen Ladung bestimmt. TRPC1-überexprimierende Zellen weisen eine erhöhte Auffüllrate des Pools auf (Wt n= 14, WT+TRPC1YFP n= 17, t-Test).

Zusammengefasst zeigen diese Resultate, dass TRPC1 die Bereitstellung freisetzbarer Vesikel in einer aktivitätsabhängigen Art und Weise stark beschleunigt, was mit einer deutlichen Poolvergrößerung und einer Fazilitierung der synaptischen Antwort während hochfrequenter Stimulation einhergeht.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde das gleiche Experiment mit TRPC1/C4/C5-tko-Zellen durchgeführt (Abb. 25). Hierbei zeigten transfizierte und untransfizierte TRPCtko-Zellen über den Verlauf der Messung hinweg ein sehr ähnliches Verhalten bezüglich der Amplitude, der synchronen Ladung und der asynchronen Ladung ihrer EPSCs (Abb. 25 A, B).

Die Amplitude (TRPCtko: $4,68 \pm 0,926$ nA; n= 13; TRPCtko+TRPC1-YFP: $5,09 \pm 1,15$ nA; n= 11) und die synchrone Ladung (TRPCtko: $32,98 \pm 7,00$ pC; TRPCtko+TRPC1-YFP: $39,89 \pm 10,09$ pC) des ersten EPSCs unterschieden sich zwischen den beiden Gruppen nur geringfügig (Abb. 25 A, B). Über den Stimulationsverlauf zeigten transfizierte TRPCtko- und Kontrollzellen ein mit Wt-Zellen vergleichbares Depletionsverhalten, wobei die Amplitude und die synchrone Ladung zu Beginn und am Ende der Messung verglichen mit den Wt-Zellen niedrigere Werte aufwiesen. Während der ersten beiden EPSCs zeigten die transfizierten und die untransfizierten TRPCtko-Zellen eine leichte Fazilitierung, was sich in einem verglichen mit den Wt-Zellen (Abb. 24 C) erhöhten $Q_{\text{Amp EPSC2/Amp EPSC1}}$ widerspiegelt (TRPCtko: $1,04 \pm 0,07$; TRPCtko+TRPC1-YFP: $1,00 \pm 0,06$; Abb. 25 C). Die asynchrone Ladung nahm während der Messung in transfizierten und in untransfizierten Zellen zu und erreichte am Ende ähnliche Werte (TRPCtko: $13,37 \pm 3,48$ pC; TRPCtko+TRPC1-YFP: $17,81 \pm 5,17$ pC; Abb. 24 B₃, C₃) für beide Gruppen. Die Poolgröße (TRPCtko: $247,17 \pm 52,10$ pC; TRPCtko+TRPC1-YFP: $305,01 \pm 72,79$ pC), sowie die Freisetzungswahrscheinlichkeit (TRPCtko: $0,19 \pm 0,06$; TRPCtko+TRPC1-YFP: $0,16 \pm 0,02$) TRPC1-YFP-exprimierender TRPCtko-Zellen unterschied sich nur geringfügig von den untransfizierten TRPCtko-Zellen (Abb. 25 D, E). Für die Auffüllrate des Pools wurden sehr

Ergebnisse

ähnliche Werte in beiden Gruppen ermittelt (TRPCtko: $28,45 \pm 6,52$ pC/Stim; TRPCtko+TRPC1-YFP: $31,51 \pm 6,18$ pC/Stim; Abb. 25 G).

Diese Resultate zeigen, dass die Expression von TRPC1-YFP in TRPC-triple-defizitären Neuronen keine Auswirkung auf die Aktionspotential-evozierte Antwort hat. Dieser Befund passt gut zu den, in Massenkultur erhaltenen Ergebnissen (Abb. 21 und Abb. 22) und unterstützt die Hypothese, dass der TRPC1-Kanal nur im Zusammenspiel mit den anderen TRPC-Varianten physiologisch aktiv werden kann. Die selektiv in WT-Autapsen auftretenden Veränderungen der synaptischen Transmission liefern ein zusätzliches Argument dafür, dass die beobachteten Effekte tatsächlich auf die zusätzliche Expression des TRPC1-Proteins zurückzuführen sind und es sich dabei nicht um Virusartefakte handelt.

In weiterführenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnten ähnliche Effekte wie in den TRPC1-überexprimierenden Zellen auch in TRPC5-eGFP-exprimierenden Wt- und TRPCtko-Zellen beobachtet werden (Schwarz et al., 2019). Zusätzlich wurde in dieser Studie eine neue Mauslinie (TRPC5-IC/eR26- τ -GFP) etabliert und analysiert, bei der die endogene Expression von TRPC5 durch ein coexprimiertes Reportergen sichtbar wird (Schwarz et al., 2019). Wurde die Analyse der gemessenen Zellen auf die nachweislich TRPC5-exprimierenden Neurone beschränkt, so ergab sich im Vergleich zu den TRPCtko-Zellen oder Wt-Zellen ein ähnlicher Phänotyp wie bei der TRPC1- oder TRPC5-Überexpression. Das heißt, in diesen Zellen konnte eine starke Kurzzeitfazilitierung, ein Anstieg des Verhältnisses der Amplitude des zweiten EPSCs zur Amplitude des ersten EPSCs ($Q_{\text{Amp EPSC2/Amp EPSC1}}$), eine Erhöhung des Pools und der Wiederauffüllrate beobachtet werden. Immunzytochemische Färbungen gegen TRPC5 haben zudem gezeigt, dass nur etwa 50 % der hippocampalen Wt-Neurone tatsächlich TRPC5 exprimieren. Daher ist es wahrscheinlich, dass der intermediäre Phänotyp der Wt-Zellen im Vergleich zu TRPCtko- bzw. TRPC1- oder TRPC5-überexprimierenden Zellen dadurch zustande kommt, dass nur ein Teil der untersuchten Wt-Neurone eine endogene Expression von *trpc5* aufweisen.

Ergebnisse

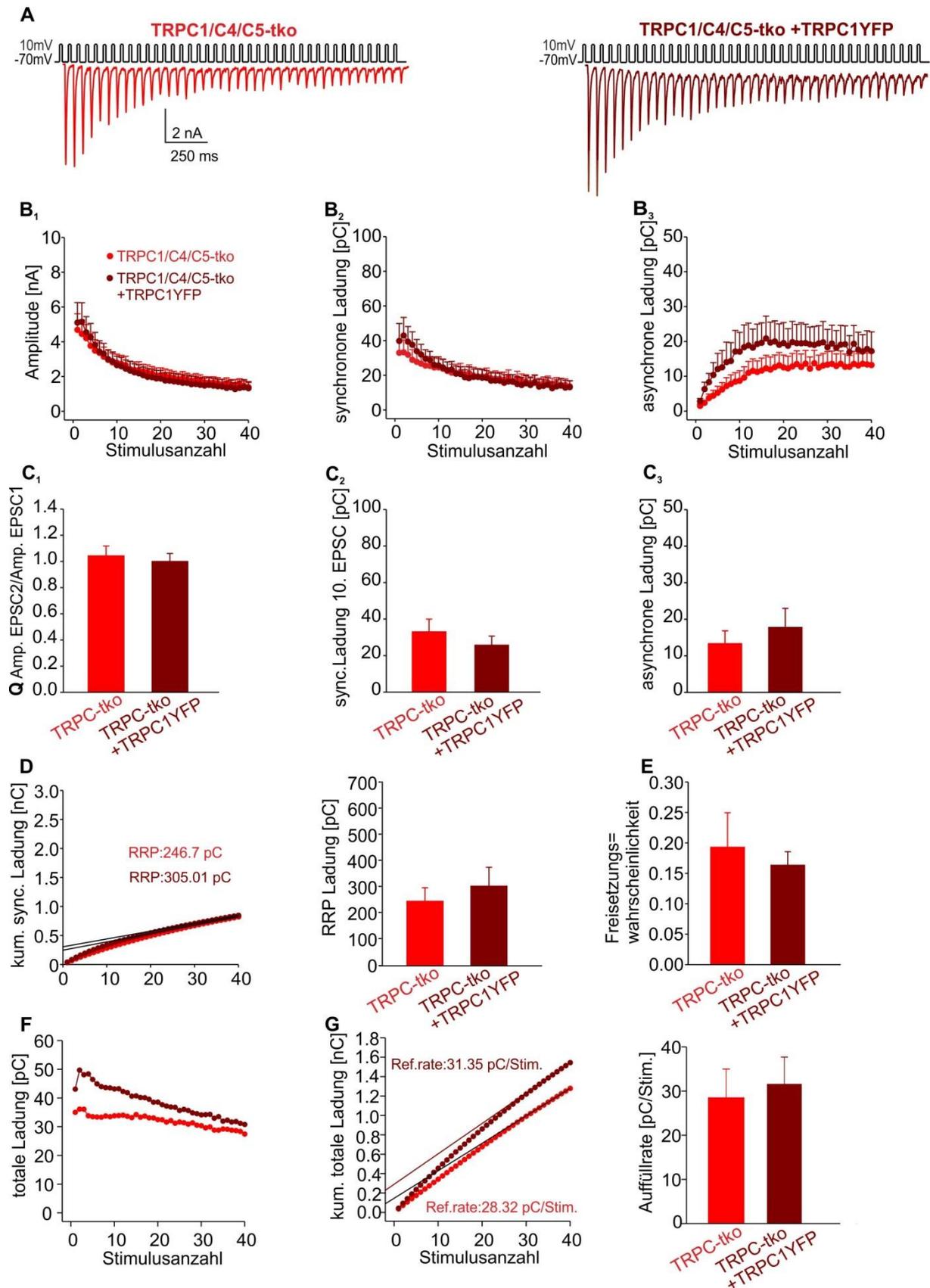


Abb. 25: Expression von TRPC1-YFP in TRPC1/C4/C5-tko-Zellen verändert die Aktionspotential-evozierte Antwort nicht. (A) Repräsentative Ableitung eines autaptischen TRPC-tko- (rot) oder TRPC1-YFP-exprimierenden (dunkelrot) TRPCtko- Neurons bei 20 Hz-Stimulation. (B₁₋₃) Darstellung der Amplitude, der synchronen und der asynchronen Ladung über den Verlauf der Messung. TRPC1-YFP-transfizierte TRPC1/C4/C5-tko-Zellen

Ergebnisse

unterscheiden sich in ihrem Verhalten nicht von den Kontrollzellen. (C₁₋₃) Quantitative Analyse der synaptischen Bahnung, der synchronen Ladung des 10. EPSCs und der asynchronen Ladung. (D) Der Pool exozytose-kompetenter Vesikel ist in TRPC1-YFP-exprimierenden TRPC-*tko*-Neuronen unverändert. (E) Die Freisetzungswahrscheinlichkeit und die Auffüllrate des Pools (G) wird durch die Expression von TRPC1-YFP in TRPC-*tko*-Zellen nicht beeinflusst (TRPC*tko* n= 13, TRPC*tko*+TRPC1YFP n= 11).

5.1.12. EGTA VERHINDERT DIE TRPC1-ABHÄNGIGE KURZZEITFAZILITATION DURCH ABPUFFERN DES PRÄSYNAPTISCHEN KALZIUMS.

Um zu überprüfen, ob die beobachtete Kurzzeitfazilitation in TRPC1-überexprimierenden Wt-Zellen mit einem erhöhten aktivitätsabhängigen Kalziueinstrom in die Präsynapse begründet werden kann, wurden autaptische Wt- und TRPC1-YFP-transfizierte Wt-Neurone mit dem langsamen Kalziumpuffer EGTA beladen (Adler et al., 1991) und vergleichend elektrophysiologisch untersucht (Abb.26).

Dazu wurden die Zellen in Ca²⁺-freier Ringer gewaschen und 5 Min. bei Raumtemperatur mit 300 µM EGTA-AM in Ca²⁺-freier Ringerlösung inkubiert. Der Acetoxymethylester gelangt passiv über die Zytoplasmamembran in die Zelle. Im Zellinneren wird er durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert, sodass dort freies EGTA vorliegt, das die Membran nicht mehr passieren kann (Jalini et al., 2016). Nach einem Waschschrift wurden 20 Hz-Messungen in Ringerlösung mit 2 mM Ca²⁺ durchgeführt (Abb. 26 A).

Während hochfrequenter Stimulation weisen hippokampale Neurone typischerweise eine Zunahme der asynchronen Transmitterfreisetzung auf, die auf eine Akkumulation von Ca²⁺-Ionen in der Präsynapse zurückzuführen ist (Otsu et al., 2004). Gleichzeitig trägt die erhöhte asynchrone Freisetzung zu einer schnelleren Erschöpfung des RRP's unter konsekutiver Stimulation bei. In Gegenwart von EGTA ist der Anstieg der asynchronen Komponente nahezu vollständig blockiert und die synchrone Komponente der Transmitterfreisetzung bleibt auf einem höheren Niveau am Ende der Stimulation erhalten (Abb. 26 B). Die Blockierung der asynchronen Komponente kann dadurch erklärt werden, dass in der Präsynapse akkumulierende Kalziumionen durch EGTA abgepuffert werden. Die synchrone Exozytose wird durch den langsamen Kalziumpuffer in der verwendeten Konzentration jedoch nur wenig beeinflusst (Stevens and Williams, 2007). Weil kaum Vesikel durch asynchrone Exozytose freigesetzt werden, erfährt der RRP der Zelle in Gegenwart von EGTA eine langsamere Depletion, wodurch die synchrone Exozytose länger aufrecht erhalten werden kann (Hagler and Goda, 2001, Otsu et al., 2004). Anhand dieser Unterscheidungsmerkmale wurde beurteilt, ob die Zellen ausreichend mit EGTA beladen waren und die Messungen für die Analyse verwendet werden konnten.

Ergebnisse

Im Gegensatz zum vorangegangenen Experiment (Abb. 24) führte eine TRPC1-Expression nach Präinkubation der Neurone mit EGTA nicht zu einer Veränderung der Kurzzeitplastizität (Abb. 26). TRPC1-YFP-exprimierende Zellen unterschieden sich kaum von untransfizierten Wt-Zellen und wiesen ein ähnliches Verhalten bezüglich der Amplitude (Wt: $5,48 \pm 0,91$ nA; $n=20$; Wt+TRPC1-YFP: $5,62 \pm 1,18$ nA; $n=21$) der synchronen (Wt: $42,90 \pm 10,03$ pC; Wt+TRPC1-YFP: $43,71 \pm 8,24$ pC) und der asynchronen Ladung ihrer EPSCs (Wt: $2,82 \pm 0,75$ pC; Wt+TRPC1-YFP: $1,75 \pm 0,63$ pC) über den Verlauf der Stimulation auf (Abb. 26 C-E). Der leichte Anstieg der synaptischen Transmission gegen Ende der Messung in Gegenwart von EGTA ist voraussichtlich auf die zu erwartende Sättigung des Puffers zurückzuführen.

Die Ergebnisse des EGTA-Experiments lassen den Schluss zu, dass TRPC-Kanäle funktionell an den präsynaptischen Ca^{2+} -Einstrom koppeln und so den effektiven Anstieg des präsynaptischen $[Ca^{2+}]_i$ erhöhen. Die resultierende Erhöhung der Ca^{2+} -abhängigen Wiederauffüllrate führt zur beobachteten Veränderung in der synaptischen Kurzzeitplastizität und zur Stimulus-abhängigen Erhöhung des Pools exozytose-kompetenter Vesikel.

In der Tat konnte in weiterführenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe mit Hilfe des präsynaptisch lokalisierten Calciumsensors Synaptophysin-GCAMP6s gezeigt werden, dass sich das präsynaptische Ca^{2+} -Signal in Wt- und TRPC-überexprimierenden Zellen während der Stimulation deutlich gegenüber TRPC-*tko* Zellen verstärkt (Schwarz et al., 2019).

Ergebnisse

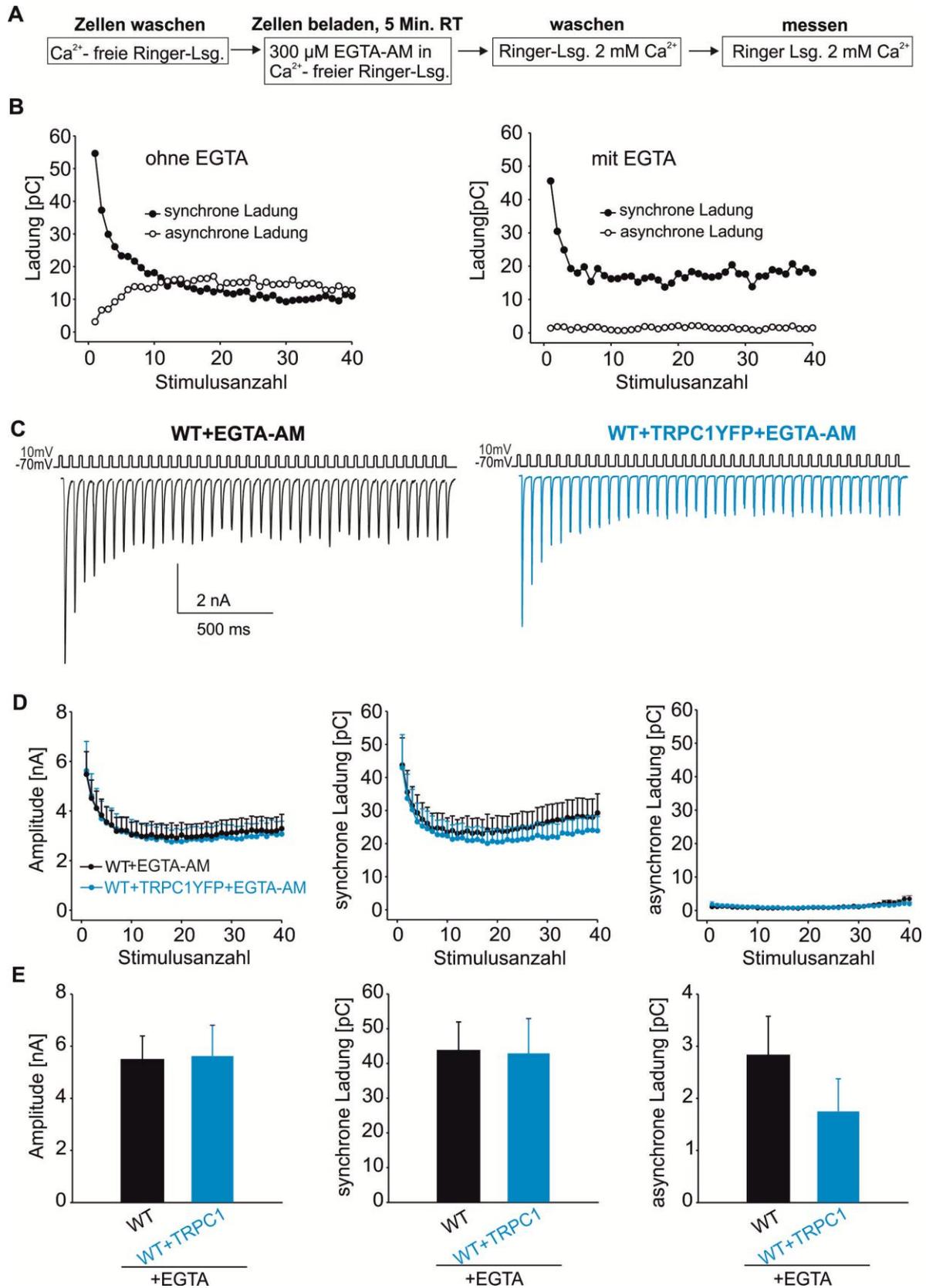


Abb. 26: Die TRPC1-abhängige Kurzzeitfazilitation wird durch Abpuffern des präsynaptischen Kalziumanstiegs verhindert. (A) Darstellung der Versuchsdurchführung. (B) Vergleichende Bestimmung der synchronen und der asynchronen Ladung während einer 20 Hz-Messung in einer Wt-Zelle ohne (links) und mit vorherigem Beladen mit EGTA-AM (rechts). EGTA verhindert die Zunahme der asynchronen Transmitterfreisetzung und

Ergebnisse

reduziert die Abnahme der synchronen Vesikelfusion. (C) Repräsentative 20 Hz- Ableitungen von Wt-Zellen, die mit EGTA-AM beladen wurden. Wt-Zellen (schwarz, n= 20) und TRPC1-YFP-exprimierende Wt-Zellen (blau, n=21) unterscheiden sich nicht. (D) Amplitude, synchrone und asynchrone Ladung verhalten sich über den Verlauf der Messung in Wt und Wt+TRPC1-YFP-Zellen ähnlich. (E) Quantitative Analyse der Amplitude und der synchronen Ladung des ersten EPSCs, sowie der asynchronen Ladung .

Zusammenfassend zeigen die erarbeiteten Befunde eine systematische Abhängigkeit der Größe des Pools exozytose-kompetenter Vesikel (Abb. 27 A; TRPC1/C4/C5-*tko*: $60,39 \pm 7,06$ %, Wt: $100 \pm 13,14$ %, Wt+TRPC1: $141,17 \pm 22,52$ %) von der Menge vorhandener TRPC-Kanäle. Die Erhöhung der Poolgröße ist sehr wahrscheinlich auf eine Steigerung der Auffüllrate des RRP's (Abb. 27 B; TRPC*tko*: $69,38 \pm 7,72$ %; Wt: $100 \pm 11,90$ %; Wt+TRPC1: $199,08 \pm 31,34$ %) bei zunehmender Anzahl an TRPC-Kanäle zurückzuführen (Abb. 27 B).

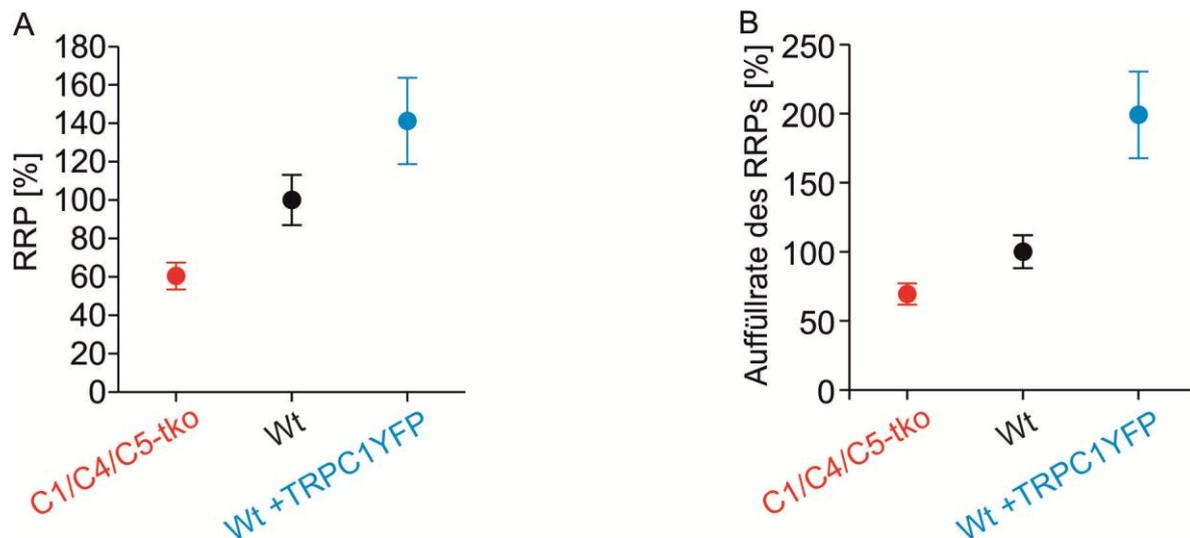


Abb. 27: Die Aktivität der TRPC-Kanäle erhöht die Größe und die Auffüllrate des Pools fusionsbereiter Vesikel. (A) Analyse der prozentualen Poolgröße der TRPC1/C4/C5-*tko*-Neurone (rot, n=49) und der TRPC1-YFP-exprimierenden Wt-Neurone (blau, n= 17) im Vergleich zur Wt-Kontrollgruppe (schwarz, n= 54). Die Poolgröße nimmt mit steigendem Vorhandensein an TRPC-Kanälen zu. (B) Prozentualer Vergleich der Auffüllrate in TRPC*tko*- und TRPC1-überexprimierenden Neuronen zur Auffüllrate in Wt-Neuronen. Die Auffüllrate nimmt mit steigendem Gehalt an TRPC-Kanälen zu.

5.1.13. VERGLEICHENDE ANALYSE POTENTIELLER TRPC- KANALAKTIVATOREN

Insbesondere der Mangel an spezifischen Antikörpern und Aktivatoren/Inhibitoren hat dazu beigetragen, dass unser Wissen über die physiologische Rolle der TRPC-Kanäle noch sehr begrenzt ist. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden u.a. verschiedene Substanzen, die als

Ergebnisse

mögliche Aktivatoren endogen-exprimierter TRPC1/C4/C5-Kanäle in Betracht gezogen werden können, in Patch-Clamp-Experimenten ausgetestet. Dabei diene der unmittelbare Vergleich zwischen Messungen an Wt- und TRPCtko-Neuronen als robuster Test um die Wirksamkeit und Spezifität der Substanz zu überprüfen.

Für die Substanz Riluzol wurde anhand fluorometrischer Ca^{2+} -Messungen bereits gezeigt, dass sie spezifisch heterolog in Hek-Zellen exprimierte TRPC5-Homotetramere und TRPC5/C1-Heterotetramere aktiviert und einen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle verursacht (Richter et al., 2014b). In der gleichen Studie wurde darüber hinaus in TRPC5 endogen exprimierenden Glioblastomzellen, eine Steigerung der Kanalöffnungswahrscheinlichkeiten durch Riluzol nachgewiesen (Richter et al., 2014b). Diese Befunde machten Riluzol zu einem interessanten Kandidaten, um die Auswirkung einer TRPC-Kanalaktivierung auf die synaptische Transmission in Neuronen zu untersuchen. Dazu wurden die quantalen Ereignisse in autaptischen Neuronen während einminütiger Perfusion mit 25-50 μM Riluzol untersucht. Die Eigenschaften quantaler Signale während der Überspülung mit Ringerlösung unmittelbar vor (Ringer) und nach der Perfusion mit Riluzol (Auswaschen), wurden als Referenzwerte herangezogen (Abb. 28). Riluzol induzierte in Wt-Zellen eine rasch eintretende, jedoch nicht signifikante Steigerung der mEPSC-Frequenz, die innerhalb kurzer Zeit durch Auswaschen der Substanz zumindest teilweise umkehrbar war (Ringer: $5,90 \pm 0,1,13$ Hz; Riluzol: $8,17 \pm 1,26$ Hz; Auswaschen: $7,29 \pm 1,13$ Hz; $n=20$ Abb. 28 B, C). In TRPCtko-Zellen wurde jedoch eine vergleichbare Frequenzerhöhung beobachtet (Ringer: $5,66 \pm 1,18$ Hz; Riluzol: $8,04 \pm 1,57$ Hz; $n=20$; Auswaschen: $6,70 \pm 1,31$ Hz; $n=19$; Abb. 28 B, C). Sowohl Amplitude als auch Ladung der mEPSCs veränderten sich durch die Applikation von Riluzol weder in Wt-Neuronen (Amplitude: Ringer: $46,88 \pm 2,56$ pA; Riluzol: $45,89 \pm 2,37$ pA; Auswaschen: $45,53 \pm 2,78$ pA, Ladung: Ringer: $174,37 \pm 12,03$ fC; Riluzol: $169,98 \pm 9,88$ fC; Auswaschen: $172,38 \pm 11,34$ fC) noch in TRPCtko-Neuronen (Amplitude: Ringer: $44,35 \pm 4,64$ pA; Riluzol: $42,40 \pm 3,74$ pA; Auswaschen: $41,31 \pm 3,80$ pA, Ladung: Ringer: $156,23 \pm 21,17$ fC, Riluzol: $150,61 \pm 17,77$ fC Auswaschen: $150,97 \pm 18,05$ fC).

Zusammenfassend konnte mit dem gewählten Ansatz keine TRPC1/C4/C5-spezifische Wirkung von Riluzol nachgewiesen werden.

Ergebnisse

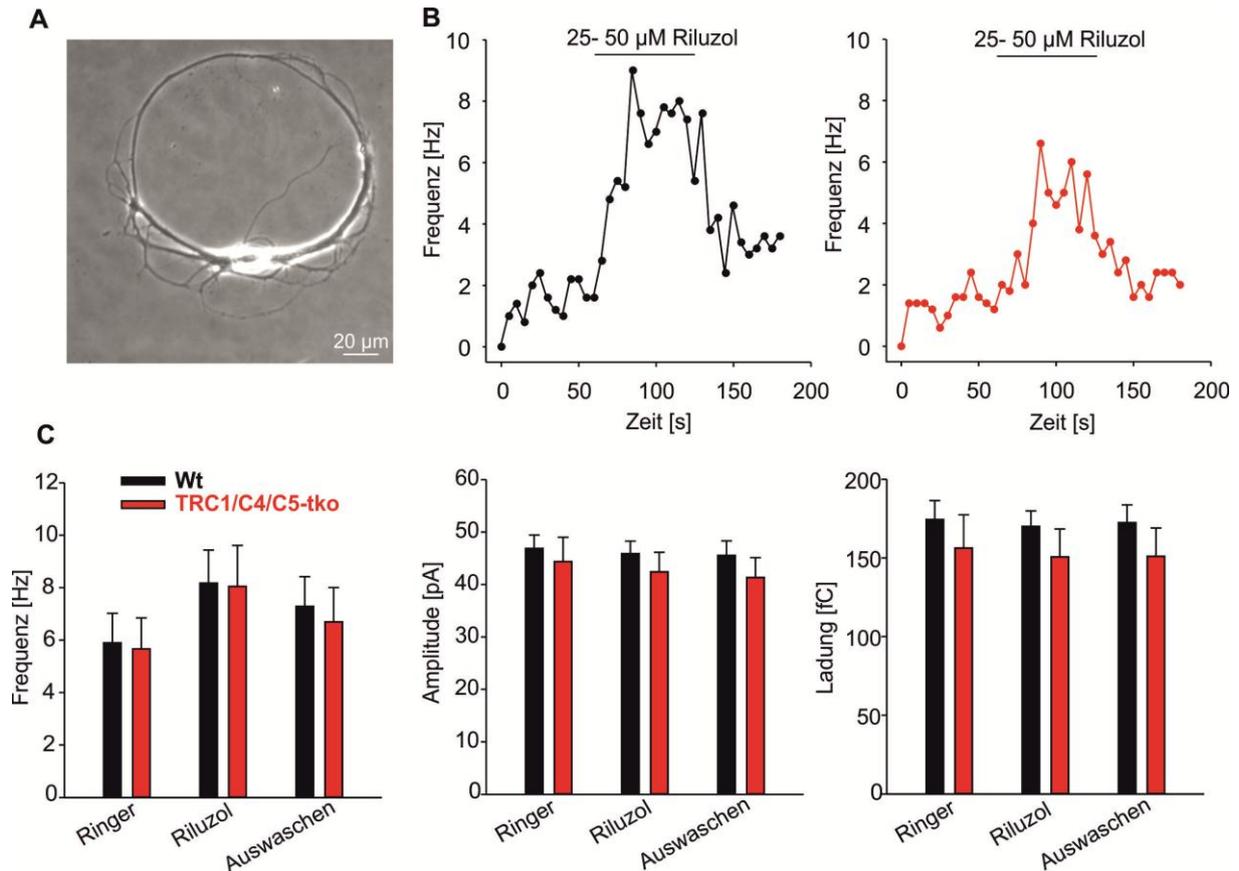


Abb. 28: Riluzol induziert eine TRPC-Kanal unabhängige Frequenzsteigerung der Spontanaktivität. (A) Zur Messung wurden autaptische Neurone verwendet. (B) Exemplarische Darstellung der mEPSC-Frequenz über die gemessene Zeit. Bei Überspülen der Inseln mit Riluzol reagieren Wt- (schwarz, n= 20) und TRPCtko-Neurone (rot, n= 19) mit einer reversiblen Steigerung der mEPSC-Frequenz. (C) Quantitative Analyse der Frequenz, Amplitude und Ladung der mEPSCs. Beide Zellgruppen zeigen hinsichtlich der untersuchten Parameter keine signifikante Änderung durch die Applikation von Riluzol.

Das Sesquiterpen (-)-Englerin A, aus *Phyllanthus engleri* (Ratnayake et al., 2009) ist ein Wirkstoff, für den bereits gezeigt wurde, dass er TRPC4-, TRPC5- und TRPC1/C4-Kanäle in Hek 293 Zellen aktiviert (Akbulut et al., 2015).

Um die Wirkung von Englerin A in primären Nervenzellen zu testen, wurden hippocampale Neurone aus Massenkulturen bei einem Potential von -70 mV in der Spannungs-klemme gehalten und die resultierenden Ströme während Perfusion mit Ringer- oder (-)-Englerin A (EA)-Lösung abgeleitet. (-)-Englerin A führte in den Wt-Zellen innerhalb weniger Sekunden zu einem Einwärtsstrom, der in den TRPCtko-Zellen nicht detektierbar war (Abb.29). Die quantitative Analyse der maximalen Stromamplitude ergab hoch signifikante Unterschiede zwischen Wt- und TRPCtko-Zellen (Wt: $176,67 \pm 51,92$ pA; n= 39; TRPCtko: $0,33 \pm 0,24$ pA; n= 23; Abb. 29 B).

Aus diesem Resultat kann man den Schluss ziehen, dass (-)-Englerin A die Kanäle der TRPC1/C4/C5-Unterfamilie sehr spezifisch und effektiv aktiviert und somit ein wichtiges

Ergebnisse

Werkzeug darstellt, um die physiologische Rolle dieser TRPC-Kanäle weiter aufzuklären.

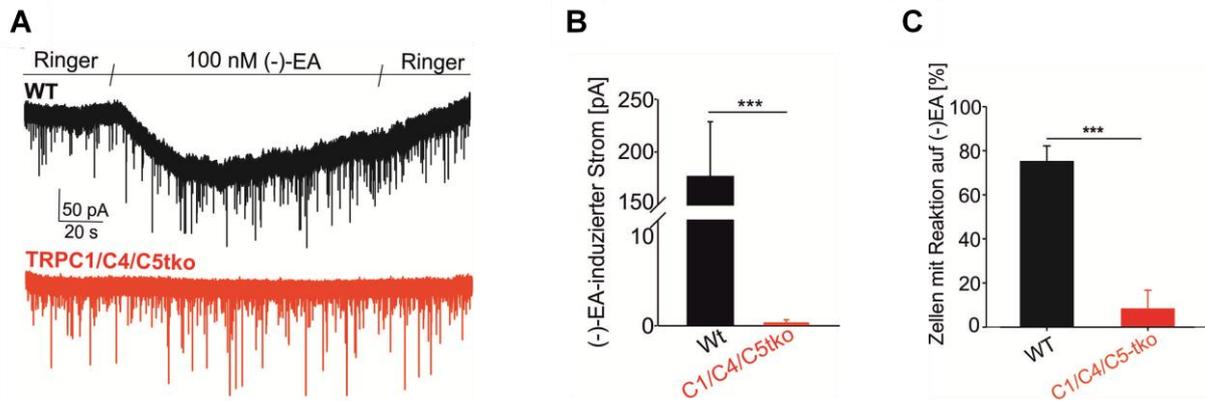


Abb. 29: (-) Englerin A erzeugt einen TRPC-Kanal-spezifischen Einwärtsstrom in hippocampalen Neuronen. (A) Exemplarische Messungen in Wt- (schwarz, n= 39) und TRPCtko-Neuronen (rot, n= 23). Englerin induziert einen spezifisch in Wt-Zellen auftretenden Strom. (B) Quantitative Analyse des Englerin A induzierten Stroms. (C) 75,18 ± 8,3 % der WT-Zellen reagieren auf (-)EA mit einem Einwärtsstrom. Bei den TRPCtko-Zellen reagieren nur 8,3 ± 8,3 % mit einem schwachen Einwärtsstrom auf (-)EA (t-Test).

Anhand von Messungen in autaptischen Kulturen in nachfolgenden Experimenten der Arbeitsgruppe (Schwarz et al., 2019) konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Englerin A neben dem deutlich erkennbaren Einwärtsstrom auch eine Frequenzsteigerung der mEPSCs hervorruft. Letztere Beobachtung legt nahe, dass Englerin A im Rahmen des hier beobachteten Einwärtsstroms auch zu einer Erhöhung der präsynaptischen $[Ca^{2+}]_i$ führt und die Aktivierung der TRPC-Kanäle einen direkten Einfluss auf die Freisetzung von Vesikeln an der Präsynapse hat.

In Massenkulturen konnte keine eindeutige Korrelation zwischen dem Englerin-induzierten Einwärtsstrom und einer Steigerung der mEPSC-Frequenz festgestellt werden (Abb. 30). Dieser Unterschied kann dadurch begründet werden, dass die Massenkultur im Gegensatz zur Autapsenkultur eine gemischte Kultur aus exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen darstellt und dadurch weniger kontrollierbar ist.

Ergebnisse

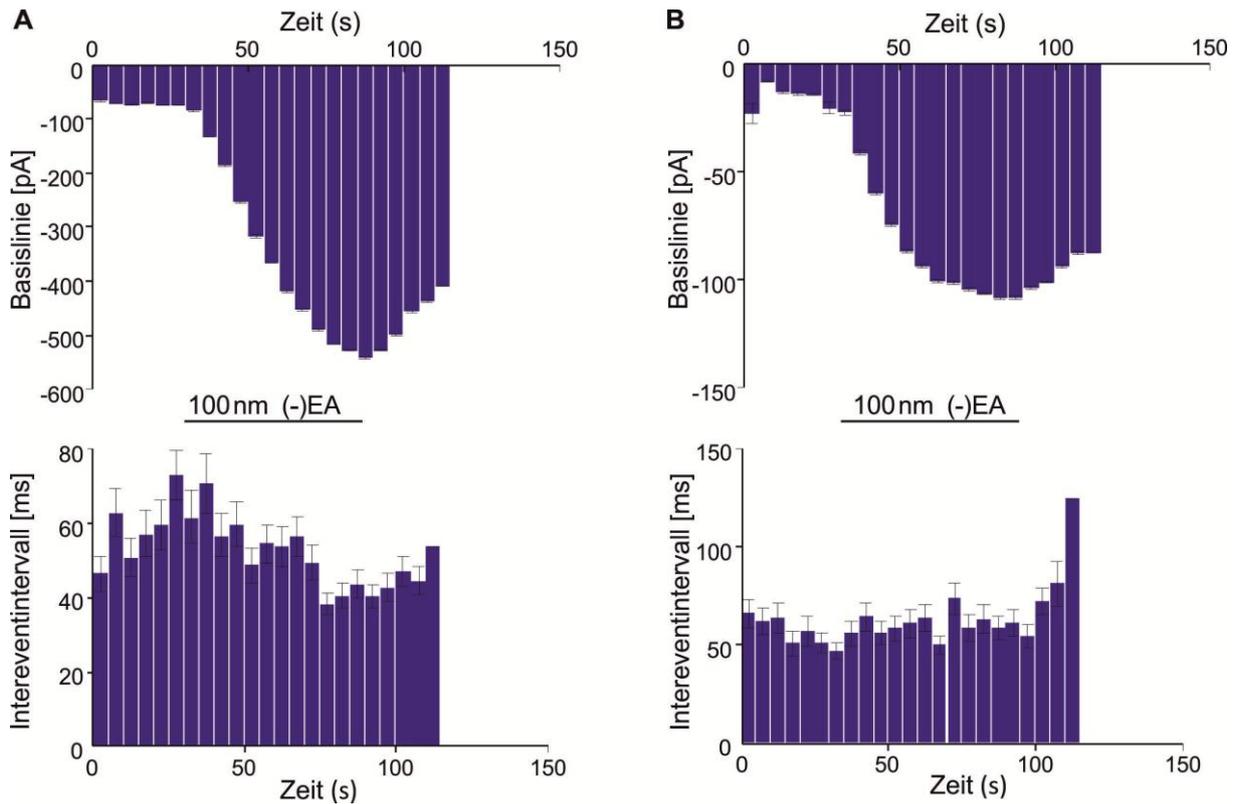


Abb. 30: Der Englerin A-induzierte Einwärtsstrom geht in Massenkultur nicht zwangsläufig mit einer Frequenzsteigerung der mEPSCs einher. Dargestellt ist der Englerin A induzierte Einwärtsstrom als Drift in der Basislinie (oben) im Vergleich zum parallel analysierten Intereventintervall als Maß für die Frequenzänderung (unten). Die Daten wurden jeweils in 5 s Intervallen analysiert. (A) Beispiel für eine Messung bei welcher der EA-induzierte Einwärtsstrom mit einer Frequenzsteigerung einhergeht. (B) Beispiel für eine Messung, bei der (-)EA-induzierter Einwärtsstrom und Frequenz nicht miteinander korrelieren.

Um zu untersuchen, ob der (-)EA induzierte Einwärtsstrom direkt über die Aktivierung der TRPC-Kanäle vermittelt wird und nicht aus einer nachgeschalteten Aktivierung von Glutamatrezeptoren resultiert, wurden Wt- und TRPCtko-Zellen in einem weiteren Experiment in Anwesenheit der Glutamatrezeptorblocker APV und DNQX mit (-)EA perfundiert und die resultierenden Ströme in Massenkulturen abgeleitet (Abb.31). Keine der gemessenen TRPCtko-Zellen, jedoch 73 % der Wt-Zellen reagierten auf (-)EA mit einem Einwärtsstrom, der in seiner Größenordnung den Strömen ohne Glutamatrezeptorblocker entspricht. Durch dieses Resultat wird deutlich, dass TRPC-Kanäle direkt durch (-)EA aktiviert werden und diese Aktivierung unabhängig von einer synaptischen Glutamatfreisetzung ist.

Ergebnisse

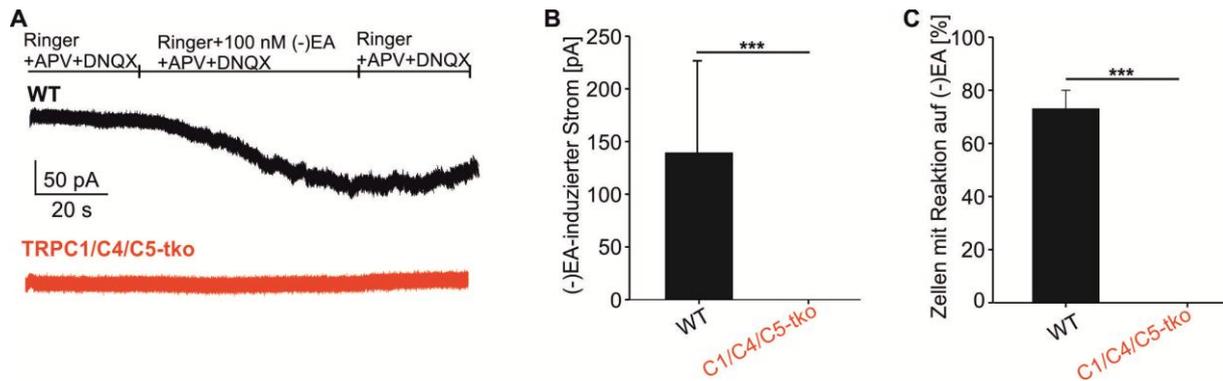


Abb. 31: (-) Englerin A induziert einen Einwärtsstrom, der nicht von einer Glutamatfreisetzung abhängig ist. (A) Exemplarische Messungen in Wt- (schwarz, n= 11) und TRPCtko-Neuronen (rot, n= 11). Englerin induziert in Anwesenheit der Glutamatrezeptorblocker APV (50 μM) und DNQX (30 μM) einen spezifisch in Wt-Zellen auftretenden Strom. (B) Quantitative Analyse des Englerin A induzierten Stroms in WT-Zellen. In TRPCtko-Zellen wurde kein Einwärtsstrom gemessen. (TRPCtko= 0, WT= 138,85 ± 87,1 pA, p < 0,001). (C) 73 ± % 7 der WT-Zellen reagieren auf (-)EA mit einem Einwärtsstrom. TRPCtko-Zellen reagieren nicht auf (-)EA.

Vorangegangene Experimente an hippocampalen Neuronen aus Schnitten und autaptischen Kulturen und lieferten Hinweise darauf, dass das Neurotrophin BDNF (brain-derived neurotrophic factor) zu einer akuten Fazilitierung der Aktionspotential-evozierten Transmission führt und eine verstärkte Langzeitpotenzierung verursacht (Lessmann and Heumann, 1998, Valente et al., 2012). BDNF bindet an den TrkB-Rezeptor, wodurch dieser autophosphoryliert wird und die Aktivierung verschiedener Signalwege einleitet, die für die beobachteten synaptischen Effekte verantwortlich gemacht werden konnten. Der genaue Mechanismus, der diesen BDNF-vermittelten Effekten zugrunde liegt, ist bisher jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt (Abb. 32 A). Durch Aktivierung der PKA oder der CaMKI und CaMKII bewirkt BDNF möglicherweise die Phosphorylierung verschiedener Proteine, wie z.B. Synapsin I oder Rim1 α wodurch eine Erhöhung des Pools fusionsbereiter Vesikel hervorgerufen wird. Die Aktivierung der PLC führt zur Produktion von DAG und IP₃, die beide als TRPC-Kanal-Regulatoren gelten (Amaral et al., 2007, Wu et al., 2010). Darüber hinaus wurde bereits gezeigt, dass BDNF neben der Aktionspotential-evozierten Transmission auch die Frequenz spontaner Freisetzungseignisse steigert (Lessmann and Heumann, 1998, Amaral and Pozzo-Miller, 2012). Diese Effekte waren von der extrazellulären Ca²⁺-Konzentration abhängig und konnten durch den unspezifischen TRPC-Kanal-Inhibitor SKF96365 blockiert werden (Amaral and Pozzo-Miller, 2012).

Diese Befunde legten die Vermutung nahe, dass TRPC-Kanäle in der BDNF-induzierten Veränderung der synaptischen Transmission eine Rolle spielen.

Um BDNF als potentiellen physiologischen Aktivator der TRPC1/C4/C5-Kanäle zu untersuchen, wurde die Aktionspotential-evozierte Antwort autaptischer Neurone bei einer Stimulationsfrequenz von 0,05 Hz vor, während und nach der Perfusion der Zellen mit

Ergebnisse

100 ng/ml BDNF gemessen (Abb. 32). Durch Zugabe von 0,1 % BSA sowohl in der Ringer-, als auch in der BDNF-Lösung sollte die Stabilität des BDNF's gewährleistet und das Adsorbieren des Polypeptids an die Schläuche des Perfusionssystems verhindert werden. Außerdem wurde zu allen verwendeten Lösungen 50 µM APV zugegeben, um Effekte durch Aktivierung von NMDA-Rezeptoren zu unterbinden.

Die akute Zugabe von BDNF führte in den Wt-Zellen zu keiner Veränderung der EPSC-Amplitude (Ringer: $6,05 \pm 0,66$; BDNF: $6,01 \pm 0,64$; Auswaschen: $5,37 \pm 0,54$; $n=30$). Die TRPCtko-Zellen (Ringer: $6,06 \pm 0,92$; BDNF: $5,27 \pm 0,90$; Auswaschen: $4,65 \pm 0,71$; $n=27$) zeigten eine leichte Reduktion ihrer EPSC-Amplituden während der Applikation von BDNF, jedoch konnte kein signifikanter Unterschied zu den in Wt-Zellen analysierten Werten festgestellt werden (Abb. 32 B, C).

Zusammengefasst lassen sich diese Resultate nicht mit den in der Literatur beschriebenen BDNF-induzierten Auswirkungen auf die synaptische Transmission in Einklang bringen. Weder in Wt- noch in TRPCtko-Zellen kam es zu einer signifikanten Veränderung in der synaptischen Antwort, somit konnte BDNF auch nicht als potentieller Aktivator von TRPC-Kanälen identifiziert werden.

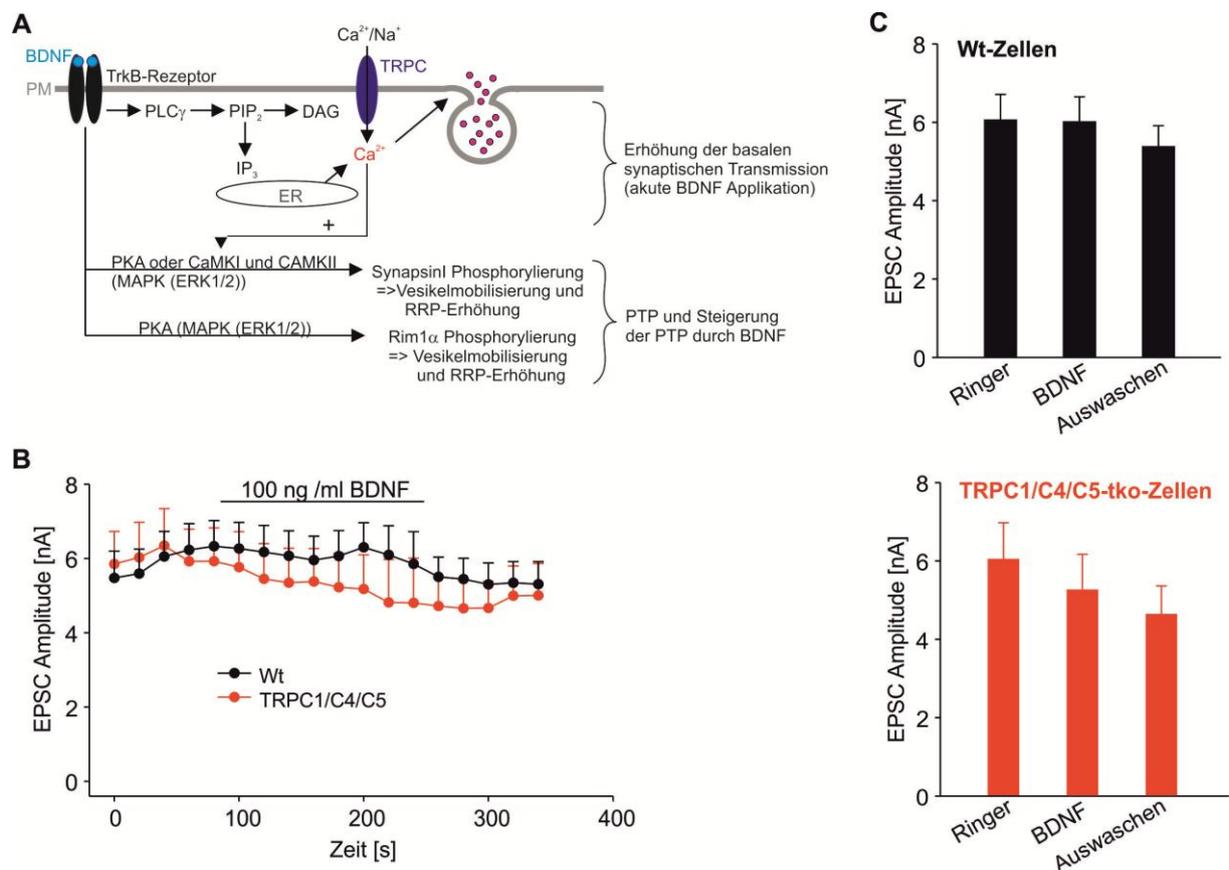


Abb. 32: BDNF hat keinen TRPC-spezifischen Effekt auf die Aktionspotential-evozierte Antwort in hippocampalen Neuronen. (A) Hypothetisches Modell für den Beitrag der TRPC-Kanäle zur BDNF-induzierten Veränderung der präsynaptischen Ca^{2+} -Dynamik und Steigerung der Exozytose. BDNF bindet an den TrkB-Rezeptor und induziert damit die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden. Die Aktivierung der PLC führt zur Spaltung von PIP_2 zu DAG und IP_3 , welches an IP_3R bindet und die Ca^{2+} -Mobilisierung aus dem ER verursacht. TRPC-Kanäle könnten durch DAG oder Ca^{2+} -Ionen aktiviert werden und einen nicht-selektiven Kationeneinstrom verursachen, der zu einer Erhöhung der basalen Transmission führt. Über TRPC-Kanäle zusätzlich einströmende Ca^{2+} -Ionen könnten eine Verstärkung der ebenfalls durch BDNF aktivierten PKA- oder CaMKI/CaMKII-Signalkaskade hervorrufen und die Erhöhung der Vesikelmobilisierung und des RRP durch Phosphorylierung von Synapsin I oder Rim1 α verursachen. (B) Autaptische Neurone wurden mit einer Frequenz von 0,05 Hz stimuliert und mit 100ng/ml BDNF überspült. Wt- und TRPCtko-Neurone zeigten keine signifikante Amplitudenveränderung ihrer EPSCs während der BDNF-Applikation. (C) Quantitative Auswertung der mittleren Amplituden während der Perfusion mit Ringer, BDNF und Perfusion mit Ringer zum Auswaschen des BDNFs (Wt (schwarz) n= 30; TRPCtko (rot) n= 27)

5.1.14. ZUSAMMENFASSUNG TEIL 1

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle der Kanalproteine TRPC1, TRPC4 und TRPC5 in der synaptischen Transmission hippocampaler Neurone untersucht. Mit Hilfe von elektrophysiologischen Messungen und immunzytochemischen Analysen wurde gezeigt, dass der Verlust dieser Proteine zu einer Reduktion der Aktionspotential-evozierten Exozytose und einer Erniedrigung des Pools fusionsbereiter Vesikel führt, ohne die quantale Signalgebung oder die Synaptogenese zu beeinflussen. Anhand von Ableitungen in autaptischen Neuronen nach hochfrequenter Stimulation konnte ermittelt werden, dass die Reduktion der Poolgröße durch eine verringerte Auffüllrate in TRPCtko-Neuronen zustande kommt. Überexpressionsstudien von TRPC5 und TRPC1 in Massenkulturen deckten Unterschiede in der Oligomerisierung der Kanäle auf. Während die lentivirale Expression von TRPC5-GFP zu einer Steigerung der mEPSC-Frequenz sowohl in den Wt-Zellen, als auch in den TRPCtko-Zellen führte, wurde die mEPSC-Frequenz durch Expression von TRPC1-YFP lediglich in den Wt-Zellen, aber nicht in den TRPCtko-Zellen erhöht. Dieses Resultat legt den Schluss nahe, dass TRPC1 im Gegensatz zu TRPC5 nicht als homotetramerer Kanal in der Membran existiert, sondern auf die Anwesenheit der anderen TRPC-Varianten angewiesen ist, um funktionelle Kanäle auszubilden. Expression von TRPC1-YFP in autaptischen Wt-Neuronen verursachte während hochfrequenter Stimulation eine aktivitätsabhängige Fazilitierung der synaptischen Antwort, die mit einer signifikanten Vergrößerung des RRP einherging. Dieser TRPC1-bedingte Effekt konnte durch Abpuffern des präsynaptischen Kalziums mit EGTA-AM verhindert werden. Insgesamt deuten die erarbeiteten Befunde darauf hin, dass die Aktivierung präsynaptischer TRPC-Kanäle einen zusätzlichen Ca^{2+} -

Einstrom verursacht, der eine effizientere und schnellere Mobilisierung von Vesikeln aus dem Reservepool ermöglicht und dadurch zu der beobachteten Kurzzeitplastizität der synaptischen Signalgebung während der hochfrequenten Stimulation führt.

5.2. Einfluss der Transmembrandomäne des vesikulären SNARE- Proteins Synaptobrevin 2 auf die synaptische Transmission

Das vesikuläre Protein Synaptobrevin 2 ist wesentlicher Bestandteil des SNARE-Komplexes, der für die Fusion synaptischer Vesikel mit der Plasmamembran während der Ca^{2+} -gesteuerten Exozytose von essentieller Bedeutung ist (Rizo and Xu, 2015). Die putativ alpha-helikal organisierten Transmembrandomänen (TMDs) der SNARE-Proteine zeichnen sich durch einen hohen Anteil an β -verzweigten Aminosäuren aus, welche die konformationelle Flexibilität der TMD erhöhen (Neumann and Langosch, 2011). Befunde in murinen chromaffinen Zellen zeigten, dass die konformationelle Flexibilität der TMD von Synaptobrevin 2 essentiell für eine effiziente Ca^{2+} -gesteuerte Exozytose ist und die Membranfusion sowie die Erweiterung der Fusionspore bei der Exozytose großer sekretorischer Vesikel aktiv fördert (Dhara et al., 2016). Insbesondere die Substitution der Aminosäuren der N-terminalen Region der Syb2-TMD durch Helix-stabilisierende Leucinreste beeinträchtigte die Exozytose stark und verlangsamte die Erweiterung der Fusionspore. Im Gegensatz dazu konnte durch die Erhöhung der Anzahl Helix-destabilisierender Aminosäurereste innerhalb der Syb2-TMD die normale Sekretion wiederhergestellt werden, wobei die Erweiterung der Fusionspore im Vergleich zum Wt-Protein beschleunigt wurde. Um zu überprüfen, ob dies auch für kleine synaptische Vesikel gilt, wurden Syb 2 Varianten mit mutierter TMD hergestellt und funktionell in Syb2 ko-Neuronen untersucht.

5.2.1. DER VERLUST DES V-SNARE PROTEINS SYNAPTOBREVIN 2 BLOCKIERT DIE SYNAPTISCHE TRANSMISSION

Im Rahmen dieser Studie wurden hippokampale Neurone Syb2-defizitärer Mäuse elektrophysiologisch untersucht (Abb. 33). Dazu wurden neuronale Kulturen aus dem Hippokampus embryonaler Mäuse (E18) hergestellt. Syb2 ko-Mäuse unterscheiden sich morphologisch von Wt- und heterozygoten Mäusen (Schoch et al., 2001) durch eine gekrümmte Körperhaltung und eine Fettansammlung im oberen Bereich des Rückens (Abb. 33 A). Da die Tiere bedingt durch den Genverlust nicht atmen können, sterben sie direkt nach der Geburt. Als Kontrolle wurden bei jedem Experiment neben den Zellen aus Syb2 ko-Embryonen auch die Zellen aus einem Wt- oder einem Syb2-heterozygoten Wurfgeschwister präpariert. Die spontane Vesikelfusion wurde in 13-16 Tage alten Massenkulturen in

Ergebnisse

Anwesenheit von 1 μM TTX in der "whole-cell"-Konfiguration über den Zeitraum einer Minute aufgenommen. Syb2-defizitäre Neurone unterscheiden sich von Wt-Zellen durch eine drastische Reduktion in der Frequenz spontaner Ereignisse (Wt: $1,3 \pm 0,19$ Hz; $n = 54$; Syb2 ko: $0,02 \pm 0,004$ Hz; $n = 16$; $p = 0,0001$; Abb. 33 C). Korrespondierend zur reduzierten mEPSC-Frequenz war auch die Amplitude der Aktionspotential-evozierten EPSCs in Syb2-defizitären Neuronen stark und signifikant verringert (Wt: $7,02 \pm 0,64$ nA; $n = 42$; Syb2 ko: $0,112 \pm 0,02$ nA; $n = 16$; $p < 0,001$; Abb. 33 D).

Diese Resultate stimmen mit vorangegangenen Ergebnissen (Schoch et al., 2001, Guzman et al., 2010) überein und zeigen, dass die synaptische Transmitterfreisetzung in Syb2-ko Neuronen nahezu vollständig blockiert ist.

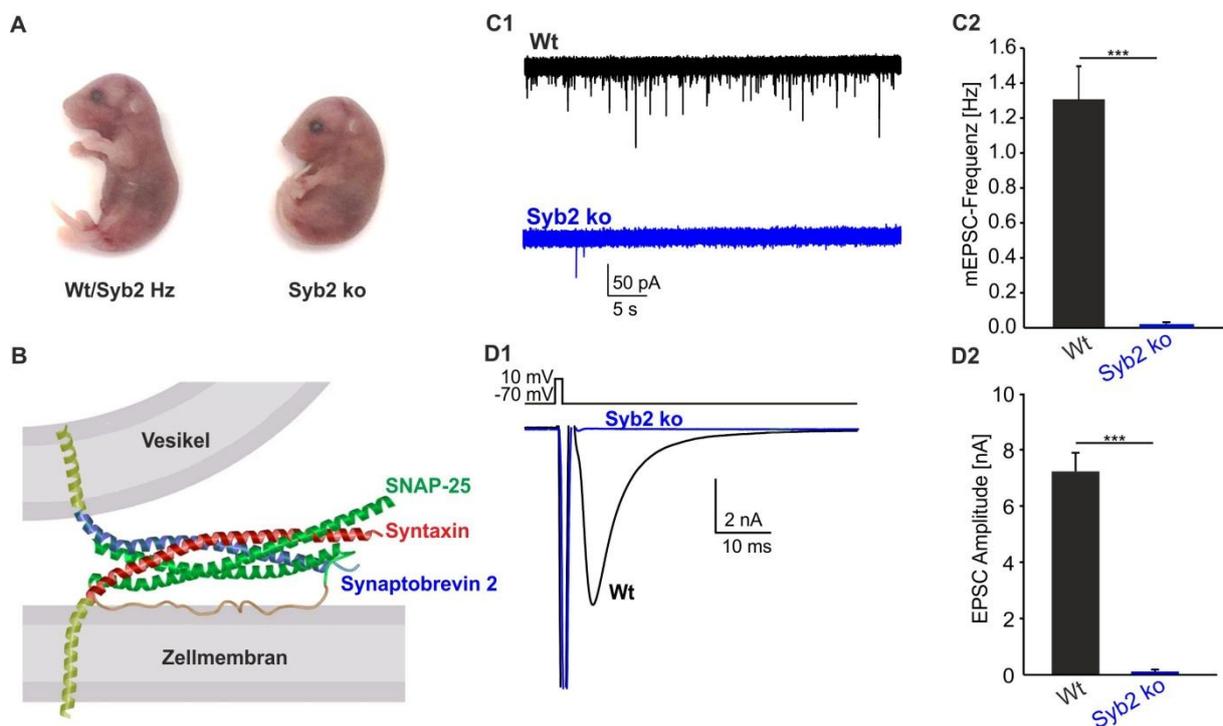


Abb. 33: Der Verlust des v-SNARE-Proteins Synaptobrevin 2 blockiert die synaptische Transmission. (A) Homozygote Syb2-ko Mausembryonen unterscheiden sich morphologisch von Wt- und heterozygot mutierten Embryonen. (B) Der SNARE-Komplex besteht aus dem v-SNARE-Protein Syb2, SNAP-25 und Syntaxin (Sutton et al., 1998). (C₁, D₁) Repräsentative Ableitungen der spontanen und der Aktionspotential-evozierten Exozytose von Wt- (schwarz) und Syb2-ko-Neuronen (blau), gemessen in Massenkultur und autaptischen Neuronen. Die spontane und die Aktionspotential-evozierte Exozytose wird durch das Fehlen von Syb2 nahezu vollständig blockiert. (C₂, D₂) Quantitative Analyse der mEPSC-Frequenz (Wt $n = 54$, Syb2-ko $n = 16$) und der Amplitude der evozierten Antwort (Wt $n = 42$, Syb2-ko $n = 16$).

5.2.2. EXPRESSION VON SYB2 UND MUTIERTEN VARIANTEN VON SYB2 MITTELS LENTIVIREN

Ergebnisse

Frühere in-vitro-Analysen deuten darauf hin, dass isolierte SNARE TMDs die Liposomenfusion aktiv fördern (Langosch et al., 2001). Im Gegensatz dazu wird die Rolle der SNARE TMDs in der Neurotransmission in lebenden Zellen kontrovers diskutiert (Zhou et al., 2013, Chang et al., 2016).

Um die funktionelle Bedeutung der TMD von Syb2 in der Ca^{2+} -abhängigen Exozytose zu untersuchen, wurden die Aminosäurereste der Positionen 97-112 vollständig zu helix-stabilisierenden Leucinresten oder zu helix-destabilisierenden Valinresten mutiert. Diese mutierten Syb2-Varianten wurden mit Hilfe eines lentiviralen Expressionssystems in kultivierten Syb2-ko-Neuronen als Fusionsproteine mit dem Fluorophor mRFP exprimiert. Das Fluorophor war dabei über einen kurzen Linker an das C-terminale Ende von Syb2 gekoppelt und lag deshalb im Lumen des Vesikels vor (Abb. 34 A). Lentivirale Expressionssysteme eignen sich besonders für die gemäßigte Expression von Proteinen in Zellen, die über einen längeren Zeitraum kultiviert werden müssen. Die Fluoreszenz der viral exprimierten Proteine wurde dazu genutzt, Syb2-exprimierende Neurone zu identifizieren und die subzelluläre Verteilung des Proteins mikroskopisch zu untersuchen (Abb. 34 B). In Triton-Extrakten aus transfizierten Neuronen konnte die Integrität der verschiedenen Syb2-Varianten mittels Western Blot Analyse nachgewiesen werden. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers, der gegen ein Antigen aus dem N-terminalen Bereich von Synaptobrevin 2 gerichtet ist (Edelmann et al., 1995). Endogen exprimiertes Synaptobrevin 2 unterscheidet sich von den lentiviral-exprimierten Proteinen um die Größe des koexprimierten Fluorophors mRFP. In untransfizierten Syb2-ko Neuronen wurde kein Synaptobrevin 2 nachgewiesen, was die Spezifität des Antikörpers demonstriert (Abb. 34 C).

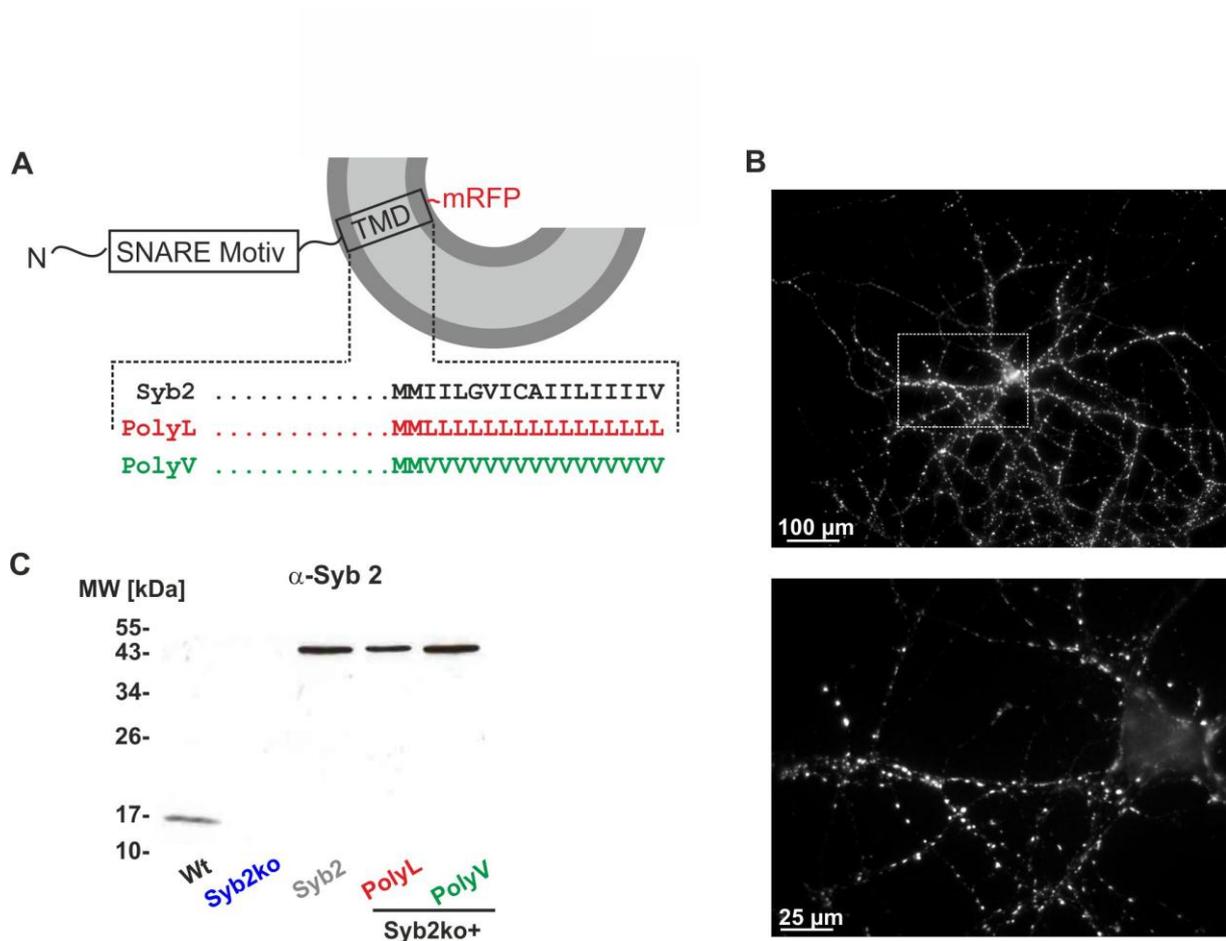


Abb. 34: Expression der Syb2-Varianten in Neuronen. (A) Modell der verwendeten Konstrukte. Die Syb2-Varianten werden als Fusionsproteine mit einem intravesikulär liegenden mRFP-tag exprimiert. Bei den mutierten Varianten wird die Wt-Sequenz der Syb2-TMD durch eine Folge von 16 Leucin-, oder Valinresten ersetzt. (B) Immunfluoreszenzaufnahme eines Syb2-mRFP-exprimierenden Neurons (oben 25x-, unten 100x-Aufnahme). (C) Nachweis der viral in Syb2-ko-Neuronen exprimierten Syb2-mRFP-Konstrukte und des endogen exprimierten Syb2-Wt-Proteins mittels Western Blot Analyse. Es wurden jeweils 16 µg Protein/Gelspur aufgetragen. Alle Proteine werden in der zu erwartenden Größe detektiert.

5.2.3. MORPHOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN KULTIVierter NEURONE UNTER LENTIVIRALER EXPRESSION VON SYB2 UND VARIANTEN MIT MUTIERTER TMD VON SYB2

Um die Expressionsstärke der verschiedenen Syb2 Varianten zu untersuchen, wurden Massenkulturen hippocampaler Syb2-ko-Neurone mit den entsprechenden Lentiviren infiziert und nach einer Kultivierungsdauer von 14 Tagen mit Hilfe von Antikörpern gegen Synaptobrevin 2 immunzytochemisch gefärbt. Neben der Expressionsstärke der Syb2 Varianten sollte ebenfalls untersucht werden, ob die lentivirale Expression die Synaptogenese der kultivierten Zellen verändert. Zu diesem Zweck wurde in den

Ergebnisse

Zellpräparaten parallel ein immunzytochemischer Nachweis des vesikulären Proteins Synaptophysin durchgeführt, anhand dessen die Synapsendichte bestimmt werden konnte. Bilder immungefärbter Neurone wurden sequentiell am Konfokalmikroskop aufgenommen und mit den Wt-Neuronen vergleichend analysiert (Abb. 35).

Die Übersichtsaufnahmen immungefärbter Neurone zeigten für alle untersuchten Syb2-Varianten perlschnurartige Syb2-Signale entlang neuronaler Strukturen auf, die sich in der Nähe des Zellsomas verdichteten. Die Ansammlung von Synaptobrevin und seiner mutierten Varianten in punktförmigen Arealen weist auf eine synaptische Lokalisation der Proteine hin (Abb. 35 A). Hochauflösende Aufnahmen zeigen, dass die punktförmigen Syb2-Signale mit den Synaptophysin-Signalen kolokalisieren und belegen damit die ungestörte Sortierung der untersuchten Syb2-Varianten auf synaptische Vesikel (Abb. 35 B). Wie in Abbildung 35 C gezeigt, unterscheiden sich die mutierten Proteine hinsichtlich des Niveaus der Proteinexpression nicht vom Wildtyp-Protein. Die Synapsendichte entlang eines 50 μm langen Neuritenabschnitts wurde anhand der Anzahl der Synaptophysin-Signale bestimmt. Auch hier deckte die quantitative Analyse keine Unterschiede zwischen den untersuchten Syb2-Varianten auf (Abb. 35 D).

Diese Resultate belegen einerseits, dass das lentivirale Expressionssystem und die Koexpression mit dem Fluorophor mRFP keinen Einfluss auf die Synaptogenese der kultivierten Neurone hat und zeigen andererseits, dass Lokalisation und Expressionsstärke von Synaptobrevin 2 durch die vorgenommenen Mutationen der TMD nicht beeinträchtigt werden.

Ergebnisse

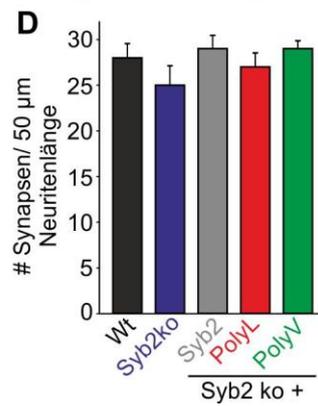
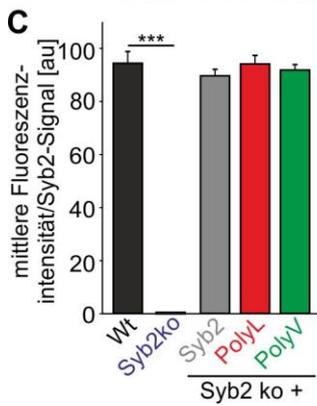
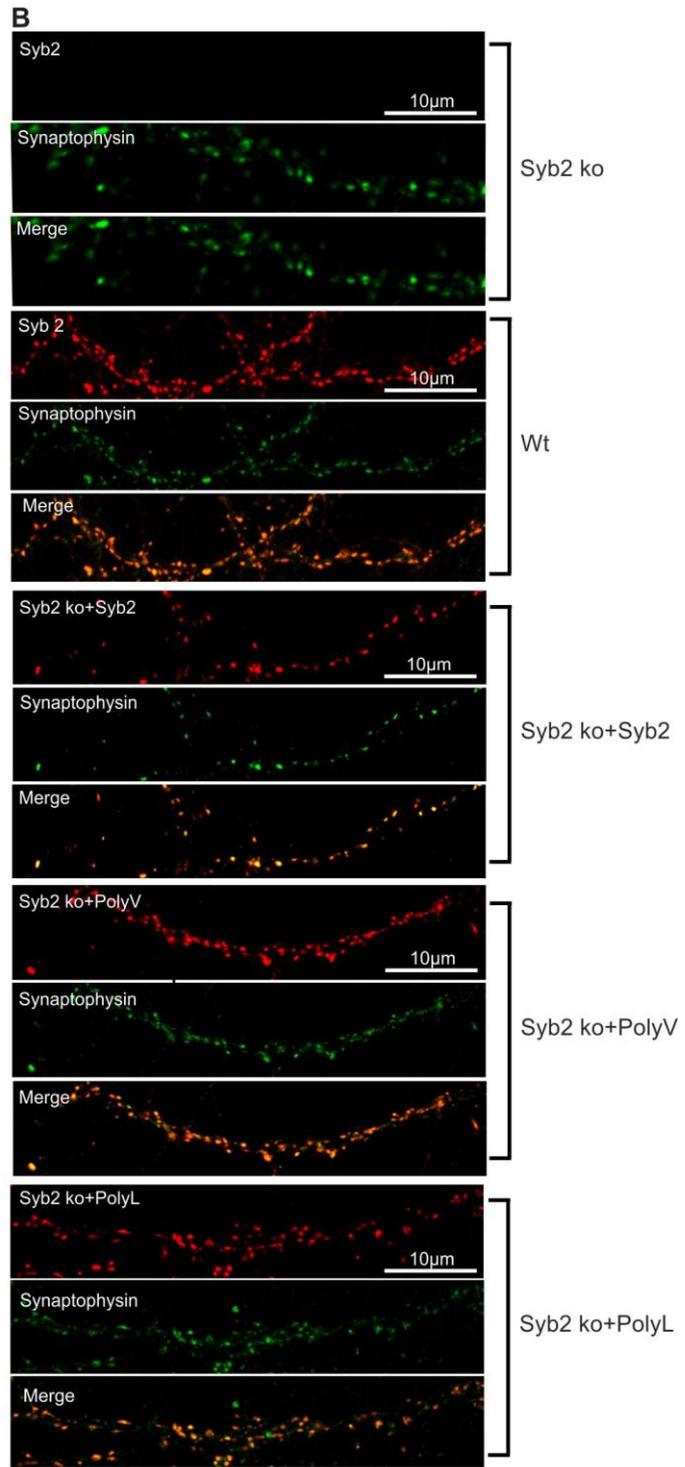
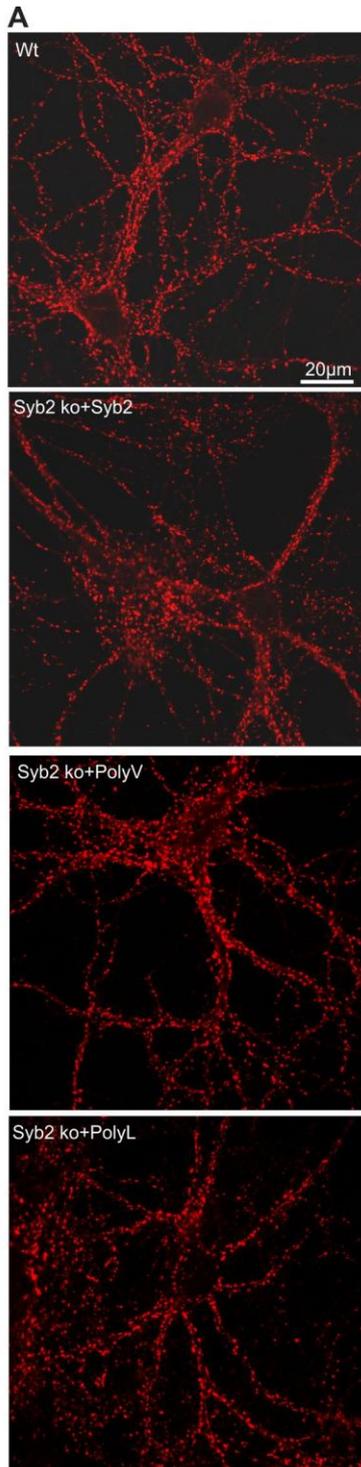


Abb. 35: Lokalisation und Expressionsstärke der verwendeten Syb2-Varianten. (A) Repräsentative konfokale 63x-Aufnahmen von Wt-, oder Syb2-ko-Neuronen, die entweder Syb2-mRFP oder die mutierten Syb2-mRFP-Varianten exprimieren und gegen Syb2 (rot) immungefärbt wurden. (B) Gleichzeitige Färbungen gegen das vesikuläre Markerprotein Synaptophysin (grün) demonstrieren die synaptische Lokalisation des Syb2-Signals. (C) Quantifizierung des Syb2-Immunfluoreszenzsignals in Wt-, Syb2-ko- und transfizierten Syb2-ko- Neuronen. Die mittlere Fluoreszenzintensität in den transfizierten Zellen unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Syb2-Varianten nicht und erreicht die in Wt-Zellen beobachtete Intensität. In Syb2-ko- Neuronen ist kein Synaptobrevin-Signal vorhanden. (D) Die Synapsendichte, bestimmt aus der Anzahl Synapsin-positiver Signale auf einem 50 μm langen Dendritenabschnitt unterscheidet sich zwischen Wt- und Syb2-ko-Neuronen, die entweder Syb2-mRFP oder die mutierten Syb2-Varianten exprimieren, nicht (Wt: n= 18; Syb2-ko: 14; Syb2-ko+Wt: n= 16; Syb2-ko+PolyL: n= 15; Syb2-ko+PolyV: n= 18).

5.2.4.EINFLUSS DER SYB2-MUTATIONEN POLYL UND POLYV AUF DIE EXOZYTOSE IN KULTIVierten NEURONEN

Vorangegangene Studien zeigten, dass SNARE-Proteine eine charakteristische Überrepräsentation β -verzweigter Aminosäuren in ihrer TMD aufweisen (Neumann and Langosch, 2011). Desweiteren gibt es Belege dafür, dass β -verzweigte Aminosäuren wie z. B. Valin oder Isoleucin die konformationelle Flexibilität des Helix- Rückgrates erhöhen (Quint et al., 2010).

Zur Untersuchung der Wirkung von Syb2-TMD-Mutanten wurden Ableitungen an kultivierten Wt-Neuronen, Syb2-ko-Neuronen und PolyL- oder PolyV- exprimierenden Syb2-ko-Neuronen durchgeführt und miteinander vergleichend analysiert (Abb. 36). Die gegenüber Wt-Zellen ca. 100-fache Reduktion der Häufigkeit spontaner Ereignisse in Syb2-ko-Zellen konnte durch lentivirale Expression von Syb2 oder PolyV in Syb2-ko-Zellen vollständig auf Wt-Niveau wiederhergestellt werden (Wt: $1,32 \pm 0,23$ Hz; n= 38; Syb2-ko: $0,019 \pm 0,005$ Hz; n= 8; Syb2-ko+Syb2: $1,46 \pm 0,24$ Hz; n= 52; Syb2-ko+PolyValin: $1,42 \pm 0,31$ Hz; n= 21, Abb. 37 A,B). Im Gegensatz dazu führte die Expression von PolyL in Syb2-ko-Neuronen zu einer verglichen mit Wt-Zellen reduzierten Häufigkeit der spontanen Ereignisse (PolyL: $0,49 \pm 0,12$ Hz; n= 23). Durch die Expression der PolyL-Mutante wurde die mEPSC-Frequenz zwar gegenüber der mEPSC-Frequenz in den Syb2-ko-Zellen um den Faktor 20 gesteigert, jedoch lag diese Frequenz deutlich und signifikant unter den Werten, die in Wt-Zellen und PolyV- oder Syb2-exprimierenden Neuronen erreicht wurden. Dieser Befund legt nahe, dass die Versteifung der Syb2-TMD einen wesentlichen Einfluss auf die Freisetzungswahrscheinlichkeit kleiner synaptischer Vesikel hat. Da sowohl die PolyV- als auch die Poly L-Mutante die Funktion des Wt-Proteins zumindest teilweise wiederherstellen können zeigen die Daten darüber hinaus, dass die Membranfusion in Neuronen vermutlich nicht von konservierten Aminosäureresten an spezifischen Positionen innerhalb der Syb2-

Ergebnisse

TMD abhängt. Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Resultaten überein, die in der gleichen Arbeitsgruppe in Messungen an chromaffinen Zellen aus Syb2/Ceb-DoKo-Mäusen erhalten wurden. Mit Hilfe von Kohlefaseramperometrie und gleichzeitiger Messung der Membrankapazität wurde bei diesen Experimenten gezeigt, dass die PolyL-Mutante im Vergleich zum Wt-Protein die tonische Sekretionsantwort reduziert und die Häufigkeit exozytotischer Ereignisse verringert (Dhara et al., 2016). Im Gegensatz dazu konnte die tonische Sekretion in chromaffinen Zellen durch Syb2-TMD-Mutanten, bei denen die Aminosäurereste der TMD vollständig zu den β -verzweigten Aminosäureresten Valin oder Isoleucin mutiert waren, vollständig wiederhergestellt werden. Kinetische Analysen zeigten darüber hinaus, dass sich die Anstiegszeit und die Halbwertsbreite der amperometrischen Signale mit steigendem Gehalt an β -verzweigten Aminosäuren in der Syb2-TMD verkürzt. Gleichzeitig erhöhte sich die Amplitude der Fusionsereignisse, wohingegen die Ladung nicht verändert wurde. Diese Befunde legten den Schluss nahe, dass β -verzweigte Aminosäuren in der Syb2-TMD die Erweiterung der Fusionspore und dadurch die Katecholaminfreisetzung beschleunigen (Dhara et al., 2016).

Anhand der Bestimmung der Amplitude, der Ladung und der Anstiegszeit der mEPSCs sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob analog zur Fusion sekretorischer Vesikel auch bei der Exozytose kleiner synaptischer Vesikel ein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an β -verzweigten Aminosäuren in der Syb2-TMD und der Fusionskinetik besteht. Bezüglich der mEPSC-Amplitude konnte in den untersuchten Zellgruppen kein Unterschied aufgedeckt werden. Sowohl die mittlere Amplitude, als auch die Verteilung der Ereignisse über den Amplitudenbereich waren durch die Expression von PolyL oder PolyV nahezu unverändert (Abb. 36 B, C). Die quantalen Ereignisse wiesen in allen untersuchten Zellgruppen eine mittlere Ladung im gleichen Größenverhältnis auf, was bedeutet, dass Unterschiede in der Vesikelbeladung vermutlich ausgeschlossen werden können (Abb.36 B.) Hinsichtlich der Anstiegszeiten der mEPSCs lassen sich Wt-Zellen und PolyL- oder PolyV-exprimierende Neurone ebenfalls nicht unterscheiden.

Diese Ergebnisse unterscheiden sich deutlich von den, in chromaffinen Zellen erhaltenen Resultate und zeigen, dass die Flexibilität der Syb2-TMD zwar von besonderer Bedeutung für die Häufigkeit spontaner Vesikelfusionen ist, jedoch bei der Exozytose kleiner synaptischer Vesikel keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Fusionsporenexpansion hat. Dieser Befund kann vermutlich auf die unterschiedliche Membrankrümmung großer sekretorischer und kleiner synaptischer Vesikel zurückgeführt werden.

Ergebnisse

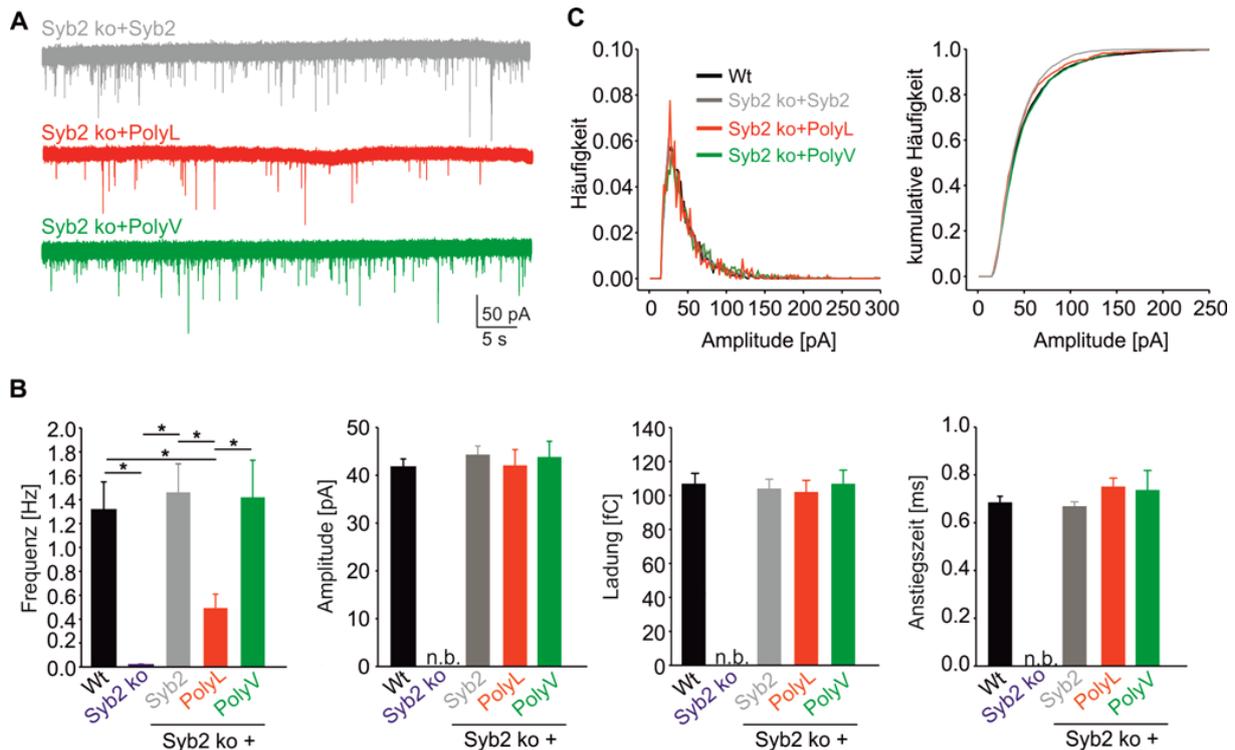


Abb. 36: β - Aminosäuren in der Transmembrandomäne von Synaptobrevin2 regulieren die spontane Fusion synaptischer Vesikel. (A) Repräsentative Messungen der Spontanaktivität in Syb2 ko-Neuronen, die Syb2 oder die mutierten Syb 2- Varianten PolyL oder PolyV, exprimieren. (B) Syb2-Defizienz blockiert die spontane Vesikelfusion. Die PolyL-Mutante reduziert die mEPSC-Frequenz verglichen mit Wt- oder Syb2-exprimierenden Syb2 ko-Neuronen, während die PolyV-Mutante die spontane Transmitterfreisetzung vollständig wiederherstellt. Mittlere Amplitude, Ladung und Anstiegszeit der mEPSCs werden durch die TMD-Mutationen nicht verändert. (C) Häufigkeits- und kumulative Häufigkeitsverteilung der mEPSCs in Bezug auf ihre Amplitude. Die mEPSCs von PolyV- und PolyL- exprimierenden Neurone unterscheiden sich in ihrer Verteilung über den Amplitudenbereich nicht von den quantalen Ereignissen in Wt- und Syb2-exprimierenden Syb2-ko-Neuronen (Wt, schwarz n= 38; Syb2-ko, blau n= 8; Syb2 ko+Wt, grau n= 52; Syb2-ko+PolyL, rot n= 23; Syb2-ko+PolyV, grün n= 21; Kruskal-Wallis nach One-Way Anova; $p < 0,05$).

In zuvor durchgeführten Experimenten der Arbeitsgruppe wurde anhand von Membrankapazitätsmessungen gezeigt, dass PolyL-exprimierende chromaffine Zellen aus Syb2/Ceb-DoKo-Mäusen nur eine reduzierte synchrone Sekretion gegenüber PolyV- oder Syb2-exprimierenden Zellen aufweisen (Dhara et al., 2016). Dabei war die schnelle (RRP) und die langsame (SRP) Komponente der Ca^{2+} -gesteuerten Sekretionsantwort gleichermaßen reduziert und die anhaltende Sekretionsrate verringert, wohingegen keine Veränderung in der Stimulus-Sekretionskopplung beobachtet werden konnte. Mögliche Defekte im Vesikelpriming konnten anhand von Untersuchungen der SNARE-Komplex-Assemblierung unter Verwendung rekombinanter SNARE-Proteine ausgeschlossen werden. Somit wurde der Sekretionsmangel in PolyL- exprimierenden chromaffinen Zellen nicht auf

Ergebnisse

eine gestörte SNARE-Komplexbildung (d. h. auf eine Veränderung des Vesikel-Primings) , sondern auf eine defekte Vesikelfusion zurückgeführt (Dhara et al., 2016).

Als Pendant zur Ca^{2+} -gesteuerten Exozytose in chromaffinen Zellen wurde in dieser Arbeit in einem weiteren Versuchsansatz der Einfluss der Syb2-TMD- Mutationen PolyL und PolyV auf die Aktionspotential-evozierte Transmitterfreisetzung in autaptischen Neuronen untersucht (Abb. 37). Dazu wurden Aktionspotentiale mit einer Frequenz von 0,2 Hz evoziert und die resultierenden EPSCs in Wt-, Syb2-ko- und Syb2-ko-Zellen, die entweder die PolyL- oder die PolyV-Mutante exprimierten, abgeleitet.

Syb2-ko-Neurone wiesen, verglichen mit Wt-Zellen, eine dramatische Reduktion der Aktionspotential-evozierten Exozytose in Bezug auf Amplitude (Wt: $7,07 \pm 0,92$ nA; n= 23; syb2-ko: $0,05 \pm 0,02$; n= 7; $p < 0,001$) und Ladung (Wt: $98,24 \pm 17,47$ pC; Syb2-ko: $0,52 \pm 0,16$ pC; $p < 0,001$) der gemessenen EPSCs auf (Abb.37). Darüber hinaus zeigte die Untersuchung mit einem hypertonen Stimulus, dass Syb2-defiziente Neurone nur einen sehr kleinen Pool fusionsbereiter Vesikel enthalten (Wt: $1957,42 \pm 377,95$ pC; n= 22; Syb2-ko: $93,28 \pm 31,84$ pC; n= 4; $p=0,002$). In guter Korrelation zu den Ergebnissen, die in chromaffinen Zellen erhalten wurden, konnte durch die Expression der PolyValin-Mutante in Syb2-ko-Zellen die Aktionspotential-evozierte Exozytose auf das Niveau der Wt-Zellen angehoben werden (PolyV: Amplitude: $6,85 \pm 1,54$ nA; Ladung: $69,78 \pm 18,57$ nA; n= 12). Korrespondierend zur Aktionspotential-evozierten Antwort konnte auch die Poolgröße fusionsbereiter Vesikel durch die Expression der PolyV-Mutante vollständig wiederhergestellt werden. Im Gegensatz dazu gelang durch die Expression der PolyL-Mutante (Amplitude: $3,38 \pm 0,81$ nA; Ladung: $28,04 \pm 5,96$ pC; n= 13) nur eine partielle Wiederherstellung der synaptischen Transmission in Syb2-ko-Neuronen und PolyL- exprimierende Syb2-ko-Neurone wiesen eine deutliche und signifikante Reduktion in der Poolgröße exozytose-kompetenter Vesikel auf (RRP Ladung PolyL: $671,47 \pm 111,18$ pC, n= 9; RRP Ladung PolyV: $1811,97 \pm 443,93$; n= 11; $p= 0,028$). Auf die Anstiegszeit nahmen die Syb-TMD-Mutationen keinen Einfluss (Abb. 37 A, B1-B3), was bedeutet, dass die Stimulus-Sekretionskopplung nicht von der konformationellen Flexibilität der TMD abhängig ist.

Zusammengefasst zeigen diese Befunde, dass die konformationellen Flexibilität der TMD signifikante Auswirkungen auf die Freisetzungswahrscheinlichkeit synaptischer Vesikel hat, was sich in einer starken Verminderung der Aktionspotential-evozierten Antwort und einer starken Reduktion der Poolgröße fusionsbereiter Vesikel in PolyL-exprimierenden Neuronen zeigt.

Ergebnisse

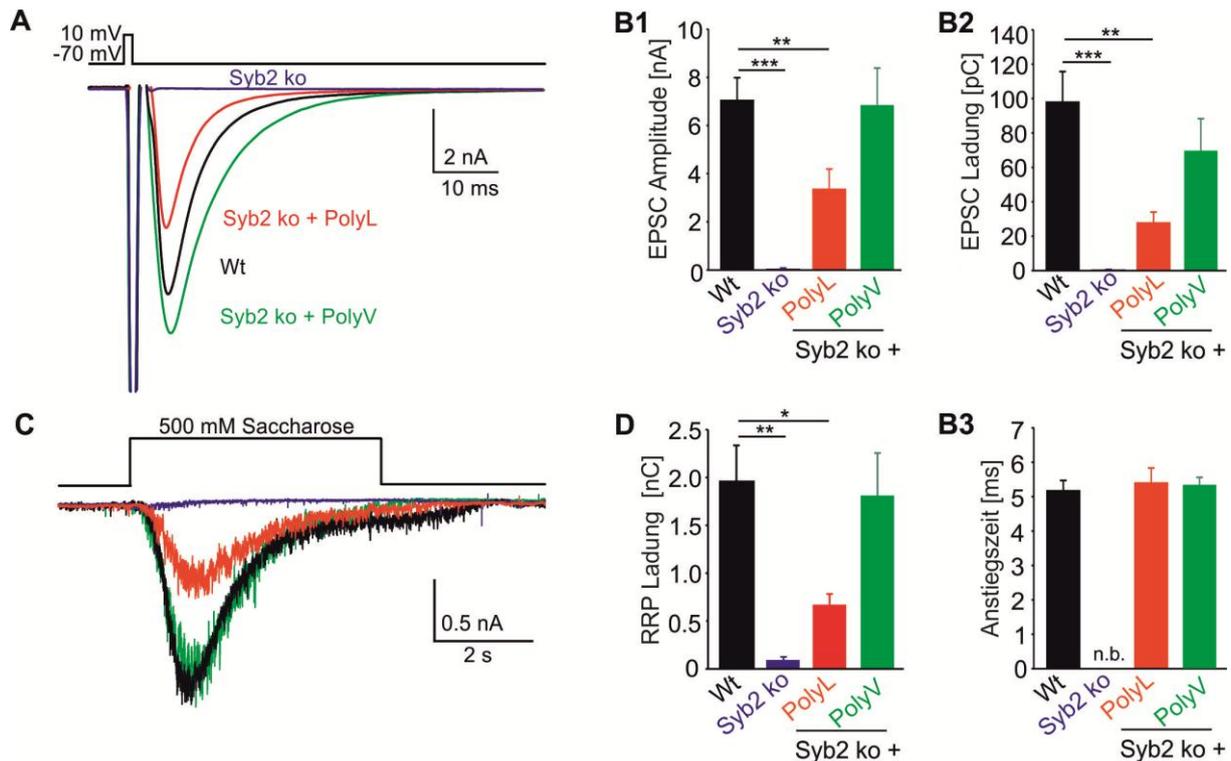


Abb. 37: β -verzweigte Aminosäuren in der Transmembrandomäne von Synaptobrevin 2 regulieren die Aktionspotential evozierte Fusion synaptischer Vesikel. (A) Exemplarische Aktionspotential-evozierte EPSCs von hippocampalen autaptischen Wt- (schwarz, n= 23) und Syb2-ko-Neuronen (blau, n= 7) oder von Syb2-ko-Neuronen, die mutierte Varianten von Syb2 (PolyL, rot, n=13) oder PolyV (grün, n= 12) exprimieren. (B1-B3) Der Verlust von Syb2 blockiert die Aktionspotential-evozierte Exozytose (Syb2-ko). Expression der PolyV-Mutante in Syb2-ko-Neuronen stellt die Amplitude und Ladung der EPSCs wieder her, hingegen führt die Expression der PolyL-Mutante zu einer gegenüber dem Wt reduzierten Aktionspotential-evozierten Exozytose. Die Anstiegszeit wird durch die TMD-Mutationen nicht beeinflusst. (C) Exemplarische Ableitungen, die durch Applikation einer hyperosmolaren 500 mM Saccharoselösung in Wt (schwarz, n= 22), Syb2-ko (blau, n= 4) oder in Syb2-ko-Neuronen, die entweder die PolyL-Mutante (rot, n= 9) oder die PolyV-Mutante (grün, n= 11) exprimieren, evoziert wurden. (D) Quantifizierung des Pools exozytose-kompetenter Vesikel (RRP) anhand der synaptischen Antwort auf den hypertonen Stimulus. Die PolyV-Mutante stellt den RRP vollständig auf Wt-Niveau wieder her. Dagegen ist der RRP in PolyL-exprimierenden Zellen gegenüber den Wt-Zellen reduziert.

In diesem Teil der Arbeit wurde die Bedeutung struktureller Eigenschaften der TMD des v-SNARE-Proteins Synaptobrevin 2 für die neuronale Transmission untersucht. Von genetisch für Syb2-defizitären Neuronen ausgehend, wurden Varianten von Syb2 mit mutierter TMD (PolyV, PolyL) mit Hilfe eines lentiviralen Expressionssystem in Neuronen untersucht. Mittels immunzytochemischer Färbung konnte für alle untersuchten mutierten Syb2-Varianten eine unveränderte synaptische Lokalisation, Expressionsstärke und Synaptogenese nachgewiesen werden. Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten, dass die Syb2-TMD-Mutante PolyValin sowohl die spontane, als auch die Aktionspotential-evozierte Transmission und den Pool fusionskompetenter Vesikel vollständig auf Wt-Niveau wiederherstellen kann. Hingegen konnte durch die Expression der Syb2-TMD-Mutante

PolyLeucin gegenüber Syb2 nur eine reduzierte mEPSC-Frequenz und eine geringere Aktionspotential-evozierte Transmission, sowie eine verminderte Poolgröße erreicht werden. Kinetische Parameter wurden durch die TMD-Mutationen nicht beeinflusst. Die Kombination der Daten legt nahe, dass die konformationelle Flexibilität der TMD von Syb2 für die Initiierung der Fusion in Neuronen von wesentlicher Bedeutung ist, jedoch im Gegensatz zur Sekretion neuroendokriner Zellen keinen Einfluss auf das Freisetzungsprofil kleiner synaptischer Vesikel hat. Dieser Unterschied kommt möglicherweise dadurch zustande, dass die neuronale Exozytose aufgrund der starken Membrankrümmung kleiner synaptischer Vesikel nicht so sehr auf die Beschleunigung der Fusionsporenexpansion durch die TMD angewiesen ist (Dhara et al., 2016).

5.3. Einfluss der Membran-proximalen Tryptophanreste des vesikulären SNARE-Proteins Synaptobrevin 2 auf die synaptische Transmission

Die Linkerregion zwischen dem SNARE-Motiv und der TMD von Synaptobrevin 2 weist an der Grenze zur vesikulären Membran (Positionen 89 und 90) interessanterweise zwei hochkonservierte aromatische Tryptophanreste auf, deren Bedeutung für die Membranfusion bisher noch nicht geklärt ist. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die beiden Tryptophanreste aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften als Membrananker dienen und dazu beitragen, die TMD von Synaptobrevin 2 in ihrer Position in der Membran zu stabilisieren (Bowen and Brunger, 2006, Al-Abdul-Wahid et al., 2012). Eine Studie, bei der die SNARE-Komplexbildung mit Hilfe von site-directed spin labeling in Kombination mit EPR (Elektronen-Paramagnetische-Resonanz)-Spektroskopie untersucht wurde legte nahe, dass die Substitution der Tryptophan-Reste durch hydrophile Serin-Reste die Komplexbildung beschleunigt (Kweon et al., 2003b), was darauf hindeutet, dass die membranennahe Region von Synaptobrevin 2 ein regulatorisches Modul für die SNARE-Assemblierung darstellt. Im Gegensatz dazu konnte in einer Studie von Siddiqui et al. (Siddiqui et al., 2007) nachgewiesen werden, dass die Substitution beider Tryptophane in Synaptobrevin 2 durch Serine keinen Einfluss auf die Effizienz der SNARE-vermittelten Liposomenfusion hat. Experimente an kortikalen Neuronen zeigten wiederum, dass eine Synaptobrevin-Mutante, bei der beide Tryptophanreste durch Alaninreste substituiert wurden, die Ca^{2+} -evozierte Transmitterfreisetzung kaum unterstützt, jedoch die spontane Vesikelexozytose stark fördert (Maximov et al., 2009). Im Gegensatz dazu wurde in einer Studie der Arbeitsgruppe an Chromaffinzellen der Maus gezeigt, dass die Substitution beider Tryptophanreste die Rate der v-SNARE-abhängigen Exozytose bei submikromolarem $[Ca^{2+}]_i$ nicht verändert, aber den Anstieg der Membrankapazität als Reaktion auf einen Ca^{2+} -Stimulus (15-25 μM) stark reduziert (Borisovska et al., 2012). Die genaue Rolle der Tryptophan-Reste bei Fusion und ob diese möglicherweise zu kritischen SNARE-Lipid-Interaktionen während des

Fusionsmechanismus beitragen, ist also bis jetzt noch nicht geklärt. Um die Bedeutung der Tryptophanreste in der Linkerregion von Synaptobrevin 2 für die glutamaterge Exozytose aufzuklären, wurde eine mutierte Syb 2 Variante (W89A/W90A) (Borisovska et al., 2012) hergestellt und in Syb2 ko-Neuronen untersucht.

5.3.1. EXPRESSION VON SYB2 UND DER MUTIERTEN VARIANTE W89A/W90A VON SYB2 MITTELS LENTIVIREN

Die funktionelle Bedeutung der membran-proximalen Tryptophane W89/W90 des v-SNARE Proteins Synaptobrevin in der neuronalen Exozytose wurde anhand einer Mutation dieser beiden Aminosäuren zu hydrophoben Alaninresten untersucht. Analog zur Vorgehensweise in Teil 2 der Arbeit wurde Syb2- oder die mutierte Syb2-Variante WWAA (Abb. 38 A) mit Hilfe eines lentiviralen Expressionssystems in kultivierten Syb2-ko-Neuronen exprimiert und die funktionelle Bedeutung der Mutation anhand elektrophysiologischer Messungen untersucht. Transfizierte Zellen wurden anhand der Fluoreszenz der viral exprimierten Proteine bei einer Anregungswellenlänge von 540 nm identifiziert.

Die verschiedenen Syb2-Varianten wurden in Lysaten aus kultivierten Wt-Neuronen und Syb2-ko-Neuronen, die mit dem Syb2- oder dem WWAA-Virus transfiziert waren mittels Western Blot Analyse nachgewiesen (Abb.38 B). Alle Proteine konnten in der zu erwartenden Proteingröße detektiert werden und zeigten keine Proteindegradation. Es gilt zu beachten, dass sich die viral exprimierten Syb2-Varianten (ca. 45 kDa) von endogen exprimiertem Synaptobrevin (ca. 18 kDa) um die Größe der Fluorophore (ca. 27 kDa) unterscheiden. In untransfizierten Syb2-ko-Neuronen wurde kein Synaptobrevin 2 nachgewiesen (Abb. 38 B). Als Ladekontrolle diente der Nachweis des Proteins Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, ca. 36 kDa). Sie zeigt, dass alle Gelspuren auf die Membran transferiert wurden und dass das Expressionsniveau der beiden mRFP-Fusionskonstrukte Syb2 und WWAA in etwa vergleichbar ist (Abb. 38 B).

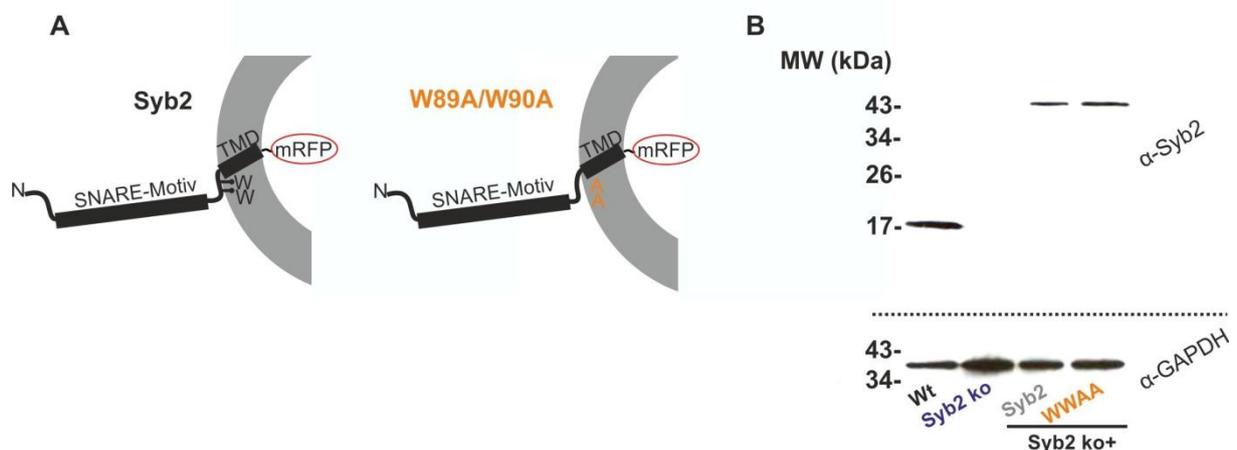


Abb. 38: Expression der W89A/W90A-Mutante von Syb2 in hippocampalen Neuronen. (A) Modell der verwendeten Konstrukte. Die Syb2-Varianten werden als Fusionsproteine mit einem intravesikulär liegenden mRFP-tag exprimiert. Bei der mutierten Variante werden die membran-proximalen Tryptophanreste der Positionen 89 und 90 durch Alaninreste ausgetauscht. (B) Nachweis der viral in Syb2-ko-Neuronen exprimierten Syb2-mRFP-Konstrukte und des endogen exprimierten Syb2-Wt-Proteins mittels Western Blot. Alle Proteine werden in der zu erwartenden Größe detektiert. Die Ladekontrolle (α -GAPDH) zeigt, dass das Expressionsniveau der beiden mRFP-Konstrukte in etwa vergleichbar ist.

Die immunzytochemische Analyse mittels Konfokalmikroskopie zeigt, dass alle untersuchten Syb2-Varianten perlschnurartige Syb2-Signale entlang neuronaler Fortsätze aufweisen (Abb.39). Die Ansammlung von Synaptobrevin und der mutierten Variante in punktförmigen Arealen deutet bereits auf eine synaptische Lokalisation der Proteine hin (Abb. 39 A-D). Darüber hinaus zeigt sich eine sehr deutliche Kolo-kalisation zwischen den Syb2- und den Synaptophysin-Signalen, was eine ungestörte Sortierung aller untersuchten Syb2-Varianten auf synaptische Vesikel belegt (Abb. 39 A-D). Um zu untersuchen, ob die Mutation die Synaptogenese der neuronalen Kultur verändert, wurde die Synapsendichte anhand der Anzahl der Synaptophysin-Signale entlang eines 50 μ m langen Dendritenabschnitts bestimmt. Bei der Auswertung der Synapsendichte konnte kein Unterschied zwischen den untersuchten Syb2-Varianten (Wt: $29,95 \pm 2,04$; n= 10; Syb2-ko: $30,13 \pm 3,69$; n= 10; Syb2-ko + Syb2: $30,18 \pm 2,45$; n= 12; Syb2-ko + WWAA: $27,85 \pm 5,06$; n= 10; Abb. 39 E) detektiert werden. Die quantitative Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität der Syb2-Signale unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Syb2-mRFP-Varianten nicht und erreicht das Niveau der in Wt-Zellen ermittelten Werte (Wt: $63,07 \pm 3,60$; n= 11; Syb2-ko + Syb2: $62,83 \pm 4,37$; n= 15; Syb2-ko + WWAA: $68,22 \pm 4,75$; n= 11; Abb. 39 F). Diese Resultate zeigen, dass Lokalisation und Expressionsstärke von Synaptobrevin 2 durch die vorgenommene Mutation nicht beeinträchtigt werden.

Ergebnisse

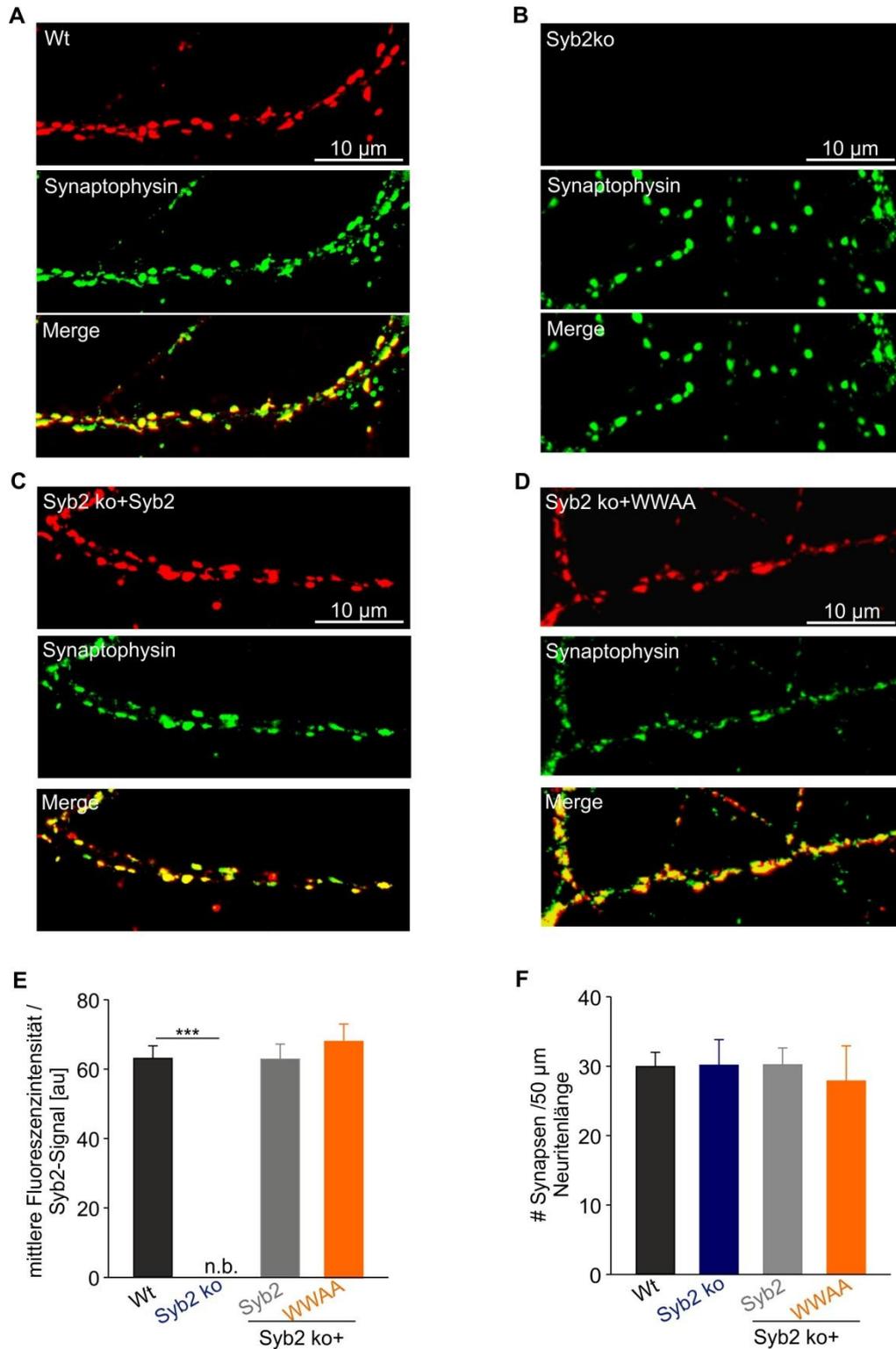


Abb. 39: Lokalisation und Expressionsstärke der verwendeten Syb2-Varianten. (A-D) Repräsentative konfokale 100x-Aufnahmen von (A) Syb2-ko-Neuronen, (B) Wt- oder Syb2-ko-Neuronen, die entweder (C) Syb2-mRFP oder (D) die mutierte Syb2-mRFP-Variante WWAA exprimieren und gleichzeitig gegen Synaptophysin (grün) und Syb2 (rot) immungefärbt wurden. Die Überlappung (Merge) der Immunfluoreszenzsignale gegen Syb2 mit den Signalen gegen das vesikuläre Markerprotein Synaptophysin demonstriert die synaptische Lokalisation der Syb2-Proteine. (E) Quantifizierung des Syb2-Immunfluoreszenzsignals in Wt- (n=11) und transfizierten Syb2-ko-Neuronen (Syb2: n= 15; WWAA: n= 11). Die mittlere Fluoreszenzintensität in den transfizierten Zellen unterscheidet

Ergebnisse

sich zwischen den verschiedenen Syb2-Varianten nicht und erreicht die in Wt-Zellen beobachtete Intensität. In Syb2-ko-Neuronen ist kein Synaptobrevin-Signal vorhanden. (F) Die Synapsendichte, bestimmt aus der Anzahl Synaptophysin-positiver Signale auf einem 50 μm langen Dendritenabschnitt unterscheidet sich zwischen Wt- (n= 10) und Syb2-ko-Neuronen (n= 10) oder Syb2-ko-Zellen, die entweder Syb2-mRFP (n=12) oder WWAA (n=10) exprimieren, nicht.

5.3.2.EINFLUSS DER SYB2-MUTATION W89A/W90A AUF DIE EXOZYTOSE IN KULTIVIERTEN NEURONEN

Ob amphiphile Tryptophane in der Linkerregion von Synaptobrevin 2 physiologisch von Bedeutung sind und einen Einfluss auf die neuronale Exozytose haben, wurde anhand der Syb2-Mutation WWAA in hippocampalen Neuronen untersucht. In einem ersten Versuchsansatz wurde die spontane glutamaterge Exozytose gemessen. Es wurden Ableitungen an kultivierten Wt-Neuronen, Syb2-ko-Neuronen und WWAA- exprimierenden Syb2-ko-Neuronen durchgeführt und miteinander vergleichend analysiert (Abb. 40). Die stark reduzierte Frequenz spontaner Ereignisse in Syb2-ko-Zellen gegenüber Wt-Zellen konnte durch lentivirale Expression von Syb2 in Syb2-ko-Zellen wiederum vollständig wiederhergestellt werden (Wt: $1,03 \pm 0,25$ Hz; n= 16; Syb2-ko: $0,02 \pm 0,007$ Hz; n= 8; Syb2 ko+Syb2: $1,00 \pm 0,17$ Hz; n= 27; Abb. 40 A, B). Im Gegensatz dazu führte die Expression von WWAA in Syb2-ko-Neuronen im Vergleich zu Wt-Zellen zu einer reduzierten Häufigkeit der Ereignisse (WWAA: $0,43 \pm 0,07$ Hz; n= 20). Durch die Expression der WWAA-Mutante konnte die mEPSC-Frequenz zwar gegenüber der mEPSC-Frequenz in den Syb2-ko-Zellen um den Faktor 20 gesteigert werden, jedoch lag die Häufigkeit der spontanen Ereignisse deutlich und signifikant unter den Werten, die in Wt-Zellen oder Syb2 -exprimierenden Syb2-ko-Neuronen erreicht wurden. Die Reduktion der mEPSC-Frequenz könnte durch eine geringere Freisetzungswahrscheinlichkeit oder eine geringere Poolgröße in WWAA-exprimierenden Neuronen verursacht werden. Bezüglich der mEPSC-Amplitude konnten in den verschiedenen Zellgruppen keine bedeutenden Unterschiede festgestellt werden (Wt: $47,04 \pm 3,31$ Hz; Syb2-ko+Syb2: $45,73 \pm 2,52$ Hz; Syb2-ko+WWAA: $42,98 \pm 2,64$ Hz; Abb. 39 A, B). Hinsichtlich der Ladung der mEPSCs lassen sich Wt-Zellen und WWAA- oder Syb2-exprimierende Neurone nicht unterscheiden (Wt: $113,70 \pm 9,19$ pC; Syb2-ko+Syb2: $102,98 \pm 6,45$ pC; Syb2 ko+WWAA: $110,52 \pm 9,80$ pC; Abb. 40 B).

Gegenüber Wt-Zellen war die Verteilung der Ereignisse über den Amplituden- oder Ladungsbereich durch die Expression von Syb2 oder WWAA in Syb2-ko-Neuronen nahezu unverändert (Abb.40 C). In Bezug auf die kinetischen Parameter Anstiegszeit, Halbwertsbreite und Abfallszeit konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Ergebnisse

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die membran-proximalen Tryptophane von Synaptobrevin 2 für die Häufigkeit spontaner Fusionsereignisse von großer Bedeutung sind, jedoch wenig Einfluss auf die Stimulus-Sekretions-Kopplung und die Kinetik der mEPSCs haben.

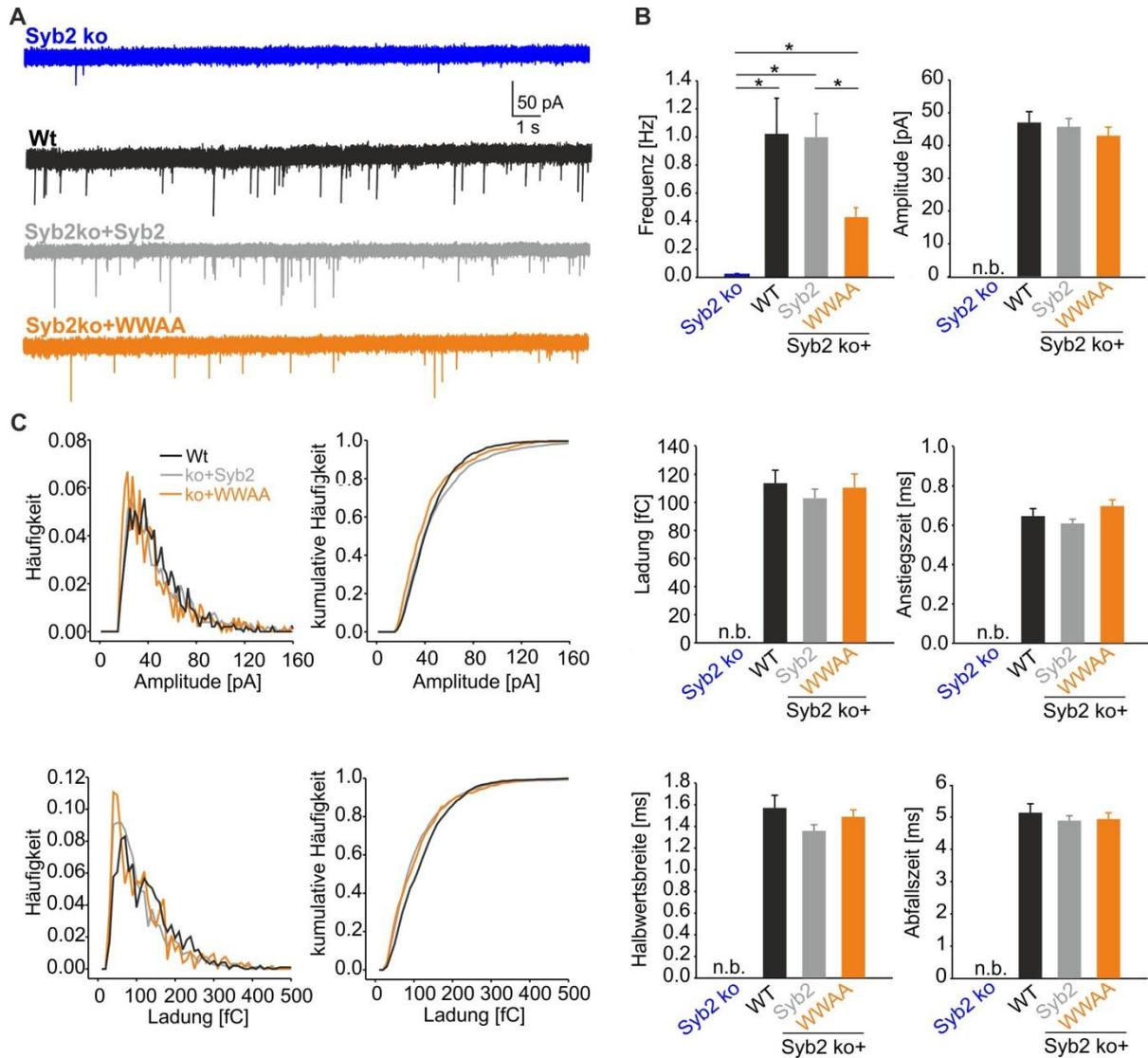


Abb. 40: Austausch der membran-proximalen Tryptophane von Synaptobrevin 2 gegen Alaninreste reduziert die Frequenz spontaner Vesikelfusionen. (A) Repräsentative Ableitungen der Spontanaktivität in Syb2-ko-Neuronen, Wt-Neuronen und Syb2-ko-Neuronen, die Syb2 oder die mutierte Syb 2- Variante W89A/W90A exprimieren. (B) Syb2-Defizienz blockiert die spontane Vesikelfusion. Die W89A/W90A-Mutante reduziert die mEPSC-Frequenz verglichen mit Wt oder Syb2-exprimierenden Syb2-ko-Neuronen. Dagegen nimmt die WWAA-Mutation keinen Einfluss auf die Amplitude, die Ladung oder kinetische Parameter der quantalen Ereignisse. (C) Häufigkeits- und kumulative Häufigkeitsverteilung der mEPSCs in Bezug auf ihre Amplitude. Die mEPSCs von WWAA-exprimierenden Neuronen unterscheiden sich in ihrer Verteilung über den Amplitudenbereich und Ladungsbereich nicht von denen in Wt- und Syb2-exprimierenden Syb2-ko-Neuronen (Wt, schwarz n= 23; Syb2-ko, blau n= 8; Syb2-ko+Wt, grau n= 26; Syb2-ko+WWAA, orange n= 20; Kruskal-Wallis nach One-way Anova, $p < 0,05$).

Ergebnisse

Die Untersuchungen in autaptischen Kulturen zeigen dass, die Substitution der Tryptophane durch Alanine die Aktionspotential-evozierte Transmitterfreisetzung stark beeinträchtigt (Abb. 41). Genetischer Verlust des v-SNARE-Proteins Syb2 führte zu einer starken Verringerung der Aktionspotential-evozierten Exozytose in Bezug auf Amplitude (Wt: $7,43 \pm 0,97$ nA; n= 19; syb2-ko: $0,17 \pm 0,03$ nA; n= 8) und Ladung (Wt: $78,07 \pm 11,81$ pC; syb2-ko: $2,16 \pm 1,6$ pC) der gemessenen EPSCs und reduzierte den Pool fusionsbereiter Vesikel deutlich (Wt: $1347 \pm 309,8$ pC; n= 9; syb2-ko: $16,45 \pm 7,55$ pC; n= 4).

Durch die Expression von Syb2 (Amplitude: $7,80 \pm 1,34$ nA; Ladung: $84,22 \pm 17,66$ pC; n= 13) konnte die Aktionspotential-evozierte Exozytose in Syb2-ko-Zellen leicht über das Niveau der Wt-Zellen (Amplitude: $7,40 \pm 0,98$ nA; Ladung: $78,08 \pm 11,81$ pC; n= 19) angehoben werden. Im Gegensatz dazu stellte die WWAA-Mutante (Amplitude: $2,44 \pm 0,47$ nA; Ladung: $20,50 \pm 3,99$ pC; n= 12) nur ca. ein Drittel der Aktionspotential-evozierten Exozytose der Wt-Zellen wieder her. Die EPSCs in WWAA-exprimierenden Neuronen wiesen die geringste Anstiegszeit auf, was vermutlich auf die geringeren Amplitudenwerte zurückzuführen ist und im Vergleich zu Wt- und Syb2-ko-Zellen, die Syb2 exprimierten nicht signifikant war (Abb. 41 A, B).

Die Poolgröße fusionsbereiter Vesikel wurde durch die Expression von Syb2 vollständig auf das Niveau der Wt-Zellen wiederhergestellt (Syb2-ko+Wt: $1584,18 \pm 612,58$ pC; n= 6). Im Gegensatz dazu führte die Expression der WWAA-Mutante in Syb2-ko-Neuronen zu einer deutlichen und signifikanten Reduktion in der Poolgröße exozytose-kompetenter Vesikel (Syb2 ko+WWAA: $402,33 \pm 184,94$ pC; n= 7; Abb. 41 C,D). Die Freisetzungswahrscheinlichkeit wies keine signifikanten Unterschiede zwischen Wt-Neuronen und Syb2- oder WWAA-exprimierenden Syb2-ko-Zellen auf (Wt: $0,07 \pm 0,017$; Syb2 ko+Syb2: $0,11 \pm 0,03$; Syb2 ko +WWAA: $0,064 \pm 0,015$; Abb. 41 E).

Zusammengefasst zeigen diese Befunde, dass die WWAA-Mutante den Pool exozytosekompetenter Vesikel stark reduziert und die Aktionspotential-evozierte Transmitterfreisetzung signifikant beeinträchtigt.

Ergebnisse

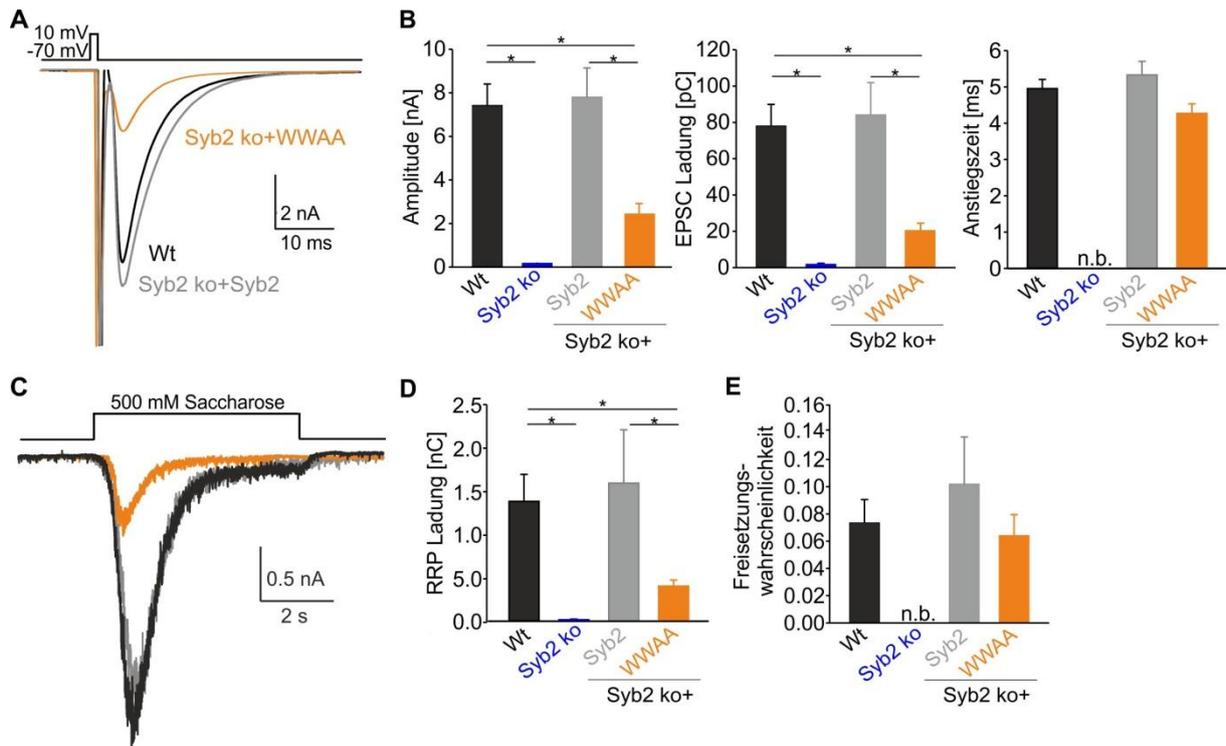


Abb. 41: Membran-proximale Tryptophane von Synaptobrevin 2 stabilisieren den Pool fusionsbereiter Vesikel. (A) Repräsentative Ableitungen der Aktionspotential-evozierten Exozytose in Wt-Neuronen und Syb2-ko-Neuronen, die Syb2 oder die mutierte Syb2-Variante W89A/W90A exprimieren. (B) Expression von Syb2 (Syb2, grau, n=13) stellt die Amplitude und die Ladung der evozierte Antwort in Syb2-ko-Neuronen (blau, n=9) vollständig wieder her. Dagegen führt die Expression der W89A/W89A-Mutante (WVAA, orange, n=12) nur zu einer stark reduzierten Aktionspotential-evozierten Exozytose verglichen mit den Wt-Zellen (schwarz, n=19). Die Anstiegszeit wird durch die W89A/W90A-Mutation nicht beeinflusst. (C) Exemplarische Ableitungen, die durch Applikation einer hypertonen 500 mM Saccharoselösung in Wt (n=9), Syb2-ko (blau, n=4), Syb2-exprimierenden (n=6) oder in WVAA-exprimierenden Syb2-ko-Neuronen (n=8) evoziert wurden. (D) Quantifizierung des Pools exozytose-kompetenter Vesikel (RRP) anhand der synaptischen Antwort auf den hypertonen Stimulus. Expression von Syb2 stellt den RRP vollständig wieder her. Dagegen ist der RRP in WVAA-exprimierenden Zellen gegenüber den Wt-Zellen stark reduziert. Die Freisetzungswahrscheinlichkeit wird durch die WVAA-Mutation nicht verändert (Kruskal-Wallis nach One-way Anova).

In diesem Teil der Arbeit wurde die Bedeutung der membran-proximalen Tryptophane W89/W90 des v-SNARE-Proteins Synaptobrevin 2 für die neuronale Transmission untersucht. Mit Hilfe eines lentiviralen Expressionssystem wurde die mutierte Syb2-Variante W89A/W90A in Syb2-defizienten Neuronen exprimiert und durch elektrophysiologische und immunzytochemische Methoden in Neuronen untersucht. Immunzytochemische Färbungen zeigten, dass die mutierte Syb2-Variante W89A/W90A gleich stark wie Syb2 exprimiert wird und die Synaptogenese in hippocampalen Neuronen nicht verändert. Eine synaptische Lokalisation der W89A/W90A-Mutante konnte durch Kolo-kalisation mit dem vesikulären Markerprotein Synaptophysin in Doppelfärbungen nachgewiesen werden. Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten, dass die lentivirale Expression von Syb2-mRFP in genetischen Nullmutanten für Syb2 sowohl die spontane, als auch die

Ergebnisse

Aktionspotential-evozierte Transmission und den Pool fusionskompetenter Vesikel vollständig auf Wt-Niveau wiederherstellen kann. Dagegen konnte durch die Expression der W89A/W90A -Mutante nur eine reduzierte mEPSC-Frequenz erreicht werden. Kinetische Parameter wurden durch die Substitution der membran-proximalen Tryptophane durch Alaninreste nicht verändert, jedoch konnte eine signifikante Reduktion der Aktionspotential-evozierten Transmission, sowie eine verminderte Poolgröße festgestellt werden. Diese Ergebnisse passen gut zu den Resultaten, die in einer vorangegangenen Studie der Arbeitsgruppe an chromaffinen Zellen erhalten wurden (Borisovska et al., 2012). Die Substitution der beiden hochkonservierten membranständigen Tryptophanreste durch Alanin- oder Serinreste führte in dieser Studie zu einer starken Beeinträchtigung des Vesikelprimings in chromaffinen Zellen, ohne die Kinetik der sekretorischen Antwort und die Eigenschaften der Fusionsereignisse einzelner Vesikel zu verändern. Anhand eines Liposomen-Aggregations-Assays wurde festgestellt, dass der Verlust der beiden membranständigen Tryptophane die Fähigkeit der Membranassoziation von rekombinantem GST-Syb2 (Aminosäuren 1-96 von Syb2, zytoplasmatische Domäne) stark verringert. Die Substitution eines einzelnen Tryptophanrests (W89S- oder W90S-Mutante) führte ebenfalls zu einer deutlichen Abnahme der Membranassoziation. Bemerkenswerterweise hatte der Verlust einzelner Tryptophanreste jedoch keinen Einfluss auf die Sekretion in chromaffinen Zellen, was bedeutet, dass Veränderungen in der Membranbindung der zytoplasmatischen Domäne von Syb2 (ohne TMD), die durch die Tryptophanreste vermittelt werden, entweder mit Syb2 in voller Länge unter in vivo-Bedingungen nicht auftreten oder für das Vesikelpriming nicht relevant sind. Mit Hilfe molekulardynamischer Simulationen, konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die W89A/W90A-Mutation zu einer veränderten Positionierung der Juxtamembrandomäne (JMD) von Syb2 führt und das elektrostatische Potential über der TMD verändert. Für die Simulation wurde ein Modell verwendet, bei dem Syb2-Moleküle (Aminosäurereste 85-116, JMD und TMD) in eine asymmetrische Doppelmembran eingebettet wurden, die in etwa der vesikulären Membranumgebung entspricht. Bei der Simulation mit dem Syb2-Wt-Peptid befanden sich die beiden Tryptophanreste innerhalb der hydrophilen Kopfgruppenregion der Lipide. Im Falle der WWAA-Mutante wurde das Peptid jedoch um ca. 7 Å ins Membraninnere gezogen und die gesamte JMD und der N-terminale Teil der TMD verschob sich in Richtung Membranmitte, wohingegen die Position des C-terminalen Endes der TMD nicht verändert wurde. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass das Syb2-Wt-Protein ein lokales positiv geladenes elektrostatisches Oberflächenpotential direkt über der TMD aufweist, das durch die Deletion der Tryptophane verloren geht. Im Gegensatz zum biochemischen Experiment führte die WWAA-Mutation in der Molekulardynamiksimulation nicht zu einer reduzierten

Ergebnisse

Membranassoziation, was vermutlich auf die Stabilisierung der JMD in der Membran durch die TMD von Syb2 zustande kommt.

Zusammengefasst zeigen die Befunde, dass die beiden Tryptophane in der Juxtamembranregion von Synaptobrevin 2 eine entscheidende Rolle beim Priming der Vesikel spielen und die Position der Juxtamembranregion von Syb2 sowie die Elektrostatik an der Grenzfläche zwischen wässriger und lipidhaltiger Phase steuern. Die Daten unterstützen ein Modell, in dem Tryptophan-vermittelte Protein-Lipid-Wechselwirkungen die Fusion von Membranen erleichtern.

6. DISKUSSION

6.1. Einfluss der Kanäle TRPC1, TRPC4 und TRPC5 auf die synaptische Transmission hippokampaler Neurone

Intrazelluläre Ca^{2+} -Signale sind für eine Vielzahl physiologischer Prozesse in Neuronen verantwortlich. Sie regulieren das Zellwachstum, den Zelltod und die Genexpression und sind an der Verarbeitung von Informationen beteiligt. Als nicht-selektive, Ca^{2+} -permeable Kationenkanäle (Birnbaumer, 2009) leisten TRPC-Kanäle einen wesentlichen Beitrag zur Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, jedoch ist die TRPC-Kanalaktivierung im physiologischen Kontext und deren Bedeutung für die neuronale Informationsübertragung noch weitgehend ungeklärt.

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass TRPC1/TRPC4/TRPC5-Kanäle die schnelle glutamaterge Transmission wesentlich beeinflussen. So wird mit Hilfe von TRPC1/TRPC4/TRPC5-ko-Neuronen aus dem Hippokampus der Maus deutlich, dass der Verlust dieser Kanäle die synaptische Stärke und dadurch die Aktionspotential-evozierte EPSC-Amplitude reduziert (Abb. 12, Abb.15). Weiterführende Untersuchungen zeigen dass, sowohl die Größe als auch die Wiederauffüllrate des Pools fusionsbereiter Vesikel vermindert ist (Abb.17). Dagegen ruft die Überexpression des TRPC1-Kanals und die damit einhergehende erhöhte Ca^{2+} -Leitfähigkeit Veränderungen in der synaptischen Plastizität hervor, wodurch die synaptische Depression während hochfrequenter Stimulation in eine Kurzzeitfazilitation umgewandelt wird (Abb.24). Zusammengefasst unterstützen die Daten ein Modell, in dem TRPC-Kanäle den präsynaptischen Ca^{2+} -Einstrom verstärken und dadurch die Bereitstellung fusionskompetenter Vesikel beschleunigen.

6.1.1. CHARAKTERISIERUNG DER TRPC1/C4/C5-TRIPLE DEFIZITÄREN NEURONE

Einige TRPC-Varianten werden mit dem Neuritenwachstum und der Bildung dendritischer Dornenfortsätze in Verbindung gebracht (Kumar et al., 2012, Heiser et al., 2013, Dhar et al., 2014), weshalb es nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Deletion der TRPC1/TRPC4/TRPC5-Kanäle die Synaptogenese in hippokampalen Neuronen verändert. Für TRPC5 wurde eine Interaktion mit dem Protein Stathmin 2, das im Wachstumskegel von Neuronen angereichert ist, nachgewiesen (Greka et al., 2003). Im Wachstumskegel soll TRPC 5 das Auswachsen des Neuriten und die Morphologie des Wachstumskegels beeinflussen. TRPC1 und TRPC3 stehen darüber hinaus in Verdacht die Bildung dendritischer Dornenfortsätze über einen Leptin-induzierten Mechanismus zu begünstigen

(Dhar et al., 2014). Diese Ergebnisse wurden jedoch vorwiegend an sehr jungen Neuronen in Knockdown-Experimenten erhalten. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wird anhand von immunzytochemischer Färbung 14 Tage alter Kulturen gezeigt, dass TRPC1/TRPC4/TRPC5-*t*ko-Neurone im Vergleich zu WT-Neuronen im ausdifferenzierten Zustand keine Veränderungen bezüglich der Größe und Anzahl der Synapsen aufweisen (Abb. 13; siehe auch (Broker-Lai et al., 2017)). Falls TRPC-Kanäle einen Einfluss auf die Synaptogenese haben sollten, so wird dieser vermutlich während der Reifung der Synapsen kompensiert.

Die Eigenschaften der quantalen Ereignisse geben Auskunft über präsynaptische Parameter wie die vesikuläre Glutamatkonzentration und die Anzahl der Freisetzungstellen aber auch über die Anzahl und Positionierung der Rezeptoren in der Postsynapse. TRPC-defiziente Neurone weisen im Vergleich zu WT-Neuronen keine Veränderungen in der quantalen Signalgebung auf (Abb. 11), was darauf hinweist, dass der Verlust der TRPC1/TRPC4/TRPC5-Proteine die generelle Struktur der Synapse, die Vesikelbeladung und die postsynaptische Signalgebung nicht beeinflusst (siehe auch (Schwarz et al., 2019)). Im Gegensatz dazu reduziert der genetische Verlust der TRPC-Proteine den Aktionspotential-evozierten postsynaptischen Strom (Abb.12, Abb.15, Abb.17, siehe auch (Broker-Lai et al., 2017)). Dieses Ergebnis stimmt sehr gut mit der reduzierten synaptischen Transmission, die in Messungen an Schnitten aus dem Hippokampus von TRPC1/TRPC4/TRPC5-*t*ko-Mäusen beobachtet wurde, überein (Broker-Lai et al., 2017).

Eine Verstärkung des präsynaptischen Ca^{2+} -Einstroms erhöht die Freisetzungswahrscheinlichkeit synaptischer Vesikel und könnte daher für die höhere Amplitude und Ladung der Aktionspotential-evozierten Antwort in *Wt*- gegenüber TRPC-defiziente Neuronen verantwortlich gemacht werden. Dabei könnten TRPC-Kanäle den Ca^{2+} -Einstrom in die präsynaptische Terminalie entweder direkt vermitteln oder durch Depolarisation des Membranpotentials eine erleichterte Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle bewirken und so den Ca^{2+} -Einstrom in die Präsynapse indirekt modulieren. Die Verwendung des Kaliumkanalblockers TEA (Tetraethylammonium) in elektrophysiologischen Messungen führt eine Verlängerung des Aktionspotentials herbei und erhöht nachweislich den Ca^{2+} -Einstrom über spannungsabhängige Kanäle und die synaptische Übertragung während einer hochfrequenten Stimulation (Wang and Kaczmarek, 1998). Unter solchen Bedingungen weisen hippokampale Neurone ein beschleunigtes Depletionsverhalten des Pools während hochfrequenter Stimulation auf (Hagler and Goda, 2001). Die Bestimmung der Freisetzungswahrscheinlichkeit durch zwei unterschiedliche Methoden (Abb.15, Abb.17) brachte jedoch ebenso wie die Untersuchung des Depletionsverhaltens keine Unterschiede zwischen *Wt*- und TRPC1/TRPC4/TRPC5-triple defizitären Neuronen hervor. Dies spricht gegen eine Verlängerung des Ca^{2+} -Einstroms über die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle

durch eine Verlängerung des Aktionspotentials in TRPC-exprimierenden Neuronen. In weiterführenden Studien der Arbeitsgruppe wurde dennoch die Auswirkung einer akuten TEA-Applikation in autaptischen Neuronen im Vergleich zu nicht perfundierten Kontrollzellen, elektrophysiologisch untersucht. Im Vergleich zu den Kontrollzellen wiesen die Zellen nach TEA-Applikation eine erhöhte initiale EPSC-Amplitude, eine insgesamt schnellere synaptische Depression und eine Erhöhung der Freisetzungswahrscheinlichkeit auf (Schwarz et al., 2019). Diese Resultate widersprechen dem TRPC-Phänotyp und zeigen, dass es unwahrscheinlich ist, dass die TRPC-Kanäle den Ca^{2+} -Einstrom indirekt durch eine Modulation spannungsabhängiger Kalziumkanäle bewirken. Sie unterstützen zusammen mit den restlichen Daten vielmehr die Hypothese, dass TRPC Kanäle einen zusätzlichen Ca^{2+} -Einstrom vermitteln, der die Mobilisierung von Vesikeln aus dem Reservepool ermöglicht und so zu einer synaptischen Fazilitierung während der hochfrequenten Stimulation führt (Abb. 24).

Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle sind verantwortlich für den Ca^{2+} -Einstrom, der die Exozytose der transmittergefüllten Vesikel in der präsynaptischen Terminalie auslöst. Über andere Ca^{2+} -Eintrittsmechanismen an der Präsynapse ist jedoch noch wenig bekannt. Es ist vorstellbar, dass durch präsynaptische Aktivität weitere Ca^{2+} -permeable Kanäle aktiviert werden, was zu einer zusätzlichen Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt. Ein solcher Mechanismus wurde für die aktivitätsabhängige Aktivierung der Ca^{2+} -permeablen TRPV1-Kanäle vorgeschlagen, welche die asynchrone Transmitterfreisetzung in afferenten Fasern des Tractus solitarius erhöhen (Peters et al., 2010).

Die Kanalaktivitäten von TRPC4 und TRPC5 können durch intrazelluläres Ca^{2+} potenziert werden (Blair et al., 2009, Gross et al., 2009), daher liegt die Vermutung nahe, dass diese TRPC-Kanäle durch den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration während des Aktionspotentials aktiviert werden und dadurch ihrerseits den Ca^{2+} -Einstrom in die Präsynapse verstärken. Veränderungen in der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration gehen oft mit einer Veränderung der Freisetzungswahrscheinlichkeit (Schneggenburger and Neher, 2000) und der Poolgröße einher (Thanawala and Regehr, 2013). In TRPC1/TRPC4/TRPC5-*tko*-Neuronen konnte kein Unterschied in der Freisetzungswahrscheinlichkeit im Vergleich zu *Wt*-Neuronen nachgewiesen werden. Jedoch beschleunigten TRPC-Kanäle die Wiederauffüllrate bei hochfrequenter Stimulation, was zu einer Erhöhung der Poolgröße fusionsbereiter Vesikel führt (Abb. 24).

Eine attraktive Erklärung für diese Beobachtungen könnte sein, dass sich spannungsgesteuerte Kalziumkanäle an aktiven Zonen anhäufen (Sudhof, 2012), wohingegen sich TRPC-Kanäle an perisynaptischen Stellen befinden und dort die präsynaptische Ca^{2+} -Homöostase und synaptische Plastizität durch einen zusätzlichen Ca^{2+} -Einstrom modulieren (siehe hypothetisches Modell Abb. 42).

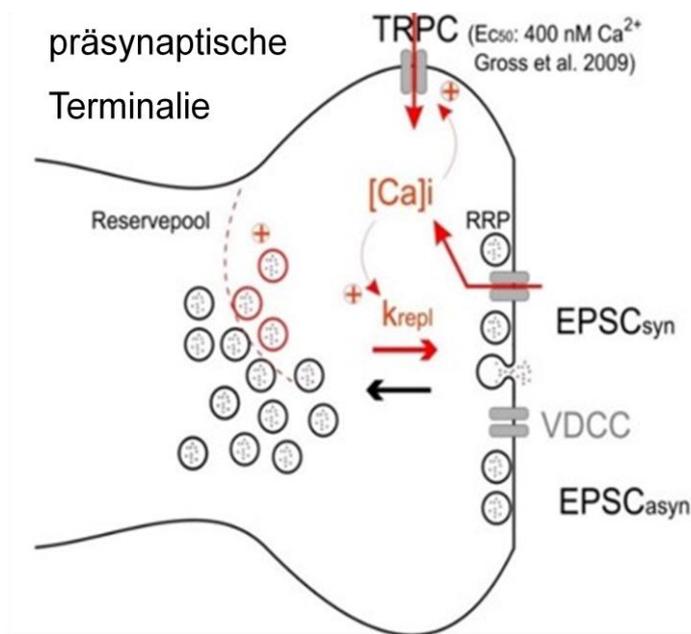


Abb. 42: Hypothetisches Modell zur Funktion der TRPC-Kanäle in der präsynaptischen Ca²⁺-Homöostase. Die Erhöhung der [Ca]_i über spannungsgesteuerte Kalziumkanäle (VDCC=voltage-gated calcium channel) führt zur Freisetzung von Vesikeln aus dem RRP und zur Aktivierung von TRPC-Kanälen in der Präsynapse. TRPC-Kanäle sind distal der aktiven Zone lokalisiert und dadurch gut positioniert, um die Ca²⁺-abhängige Mobilisierung von Vesikeln aus dem Reservepool zu verstärken.

6.1.2. ÜBEREXPRESSION VON TRPC-KANÄLEN IN HIPPOKAMPALEN NEURONENKULTUREN

Die Bestimmung der Lokalisation der TRPC-Kanäle im subzellulären Bereich ist für die funktionelle Analyse dieser Kanäle in Neuronen von essentieller Bedeutung. In der Vergangenheit schlug die exakte Lokalisation dieser Kanäle jedoch häufig aufgrund des Mangels an subtypspezifischen Antikörpern und entsprechenden Knockout-Kontrollen fehl und wird daher kontrovers diskutiert (Strubing et al., 2001, Kim et al., 2003). In dieser Arbeit wurde lentivirale Expression fluorophorgekoppelter TRPC-Varianten dazu verwendet, die Lokalisation der TRPC-Kanäle zu bestimmen. Durch Größenbestimmung der lentiviralen Produkte in Western Blot Analysen konnte bestätigt werden, dass es sich bei den lentiviral exprimierten Proteinen tatsächlich um die zu untersuchenden TRPC-Proteine handelt (Abb.20). Mittels immunzytochemischer Färbung konnte eine Kollokalisierung von TRPC1 mit dem synaptischen Markerprotein Synapsin in Neuronen nachgewiesen werden (Abb. 19),

woraus der Schluss gezogen werden kann, dass sich TRPC1 auch in präsynaptischen Strukturen befindet.

Mittels unabhängiger experimenteller Strategien konnte in dieser Doktorarbeit gezeigt werden, dass TRPC-Kanäle an der Präsynapse vorkommen und dort die synaptische Transmission regulieren. Zum einen führt der genetische Verlust der TRPC1/TRPC4/TRPC5-Kanäle zu einer Reduktion der basalen synaptischen Transmission (Abb.12, Abb.15) und verringert die Größe und die Wiederauffüllrate des Pools exozytose-kompetenter Vesikel während hochfrequenter Stimulation (Abb.17). Hingegen hat die TRPC-Defizienz keinen Einfluss auf die grundlegenden Eigenschaften der quantalen Transmission (Abb.11), was gegen eine Veränderung auf der postsynaptischen Seite spricht. Zum anderen verursacht die Überexpression des TRPC1-Kanals eine Kurzzeitfazilitierung während hochfrequenter Stimulation, die mit einer Vergrößerung des Pools einhergeht (Abb.24) und vermutlich auf einer beschleunigten Wiederauffüllung des Pools beruht. Darüber hinaus führt die Überexpression von TRPC1 (Abb. 21) und TRPC5 (Abb. 22) in Wildtypzellen zu einer Steigerung der mEPSC-Frequenz ohne die Kinetik wesentlich zu beeinflussen, was ebenfalls auf einen präsynaptischen Einfluss der TRPC-Kanäle auf die synaptische Transmission zurückgeführt werden kann. In weiterführenden Studien konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Perfusion autaptischer Neurone mit dem TRPC4/TRPC5-spezifischen Aktivator Englerin A neben einem Einwärtsstrom auch zu einer Frequenzerhöhung der mEPSCs führt (Schwarz et al., 2019), was bedeutet, dass die Aktivierung der TRPC-Kanäle direkt zu einer erhöhten Freisetzung synaptischer Vesikel führt. Letzendlich haben Schwarz et al. mit Hilfe des präsynaptisch lokalisierten Calciumsensors Synaptophysin-GCAMP6s das präsynaptische Ca^{2+} -Signal während einer hochfrequenten Stimulation untersucht (Schwarz et al., 2019). Es konnte gezeigt werden, dass sich das Ca^{2+} -Signal in WT- und TRPC-überexprimierenden Zellen während der Stimulation deutlich gegenüber TRPC-*tko* Zellen verstärkt (Schwarz et al., 2019).

Kürzlich konnte eine Interaktion der Proteine TRPC1, TRPC4 und TRPC5 mittels Coimmunpräzipitation (C1/C4, C1/C5, C1/C4/C5 möglich) in Homogenaten aus Mausgehirn und Hippokampus nachgewiesen werden (Broker-Lai et al., 2017). Daher stellt sich die Frage, ob eine Heteromerisierung dieser Proteine für die Funktionalität der Kanäle erforderlich ist, oder ob die unterschiedlichen TRPC-Varianten funktionell redundante Kanaluntereinheiten darstellen. In Massenkulturen hippokampaler Neurone führte die Überexpression von TRPC5 (Abb.22) in der vorliegenden Arbeit zu einer Frequenzsteigerung der mEPSCs in *Wt*- und in TRPC*tko*-Zellen. Im Gegensatz dazu konnte die mEPSC-Frequenz durch Expression von TRPC1 (Abb. 21) nur in *Wt*-Zellen, jedoch nicht in TRPC*tko*-Zellen gesteigert werden. Dieser Befund zeigt, dass entweder TRPC4 oder TRPC5 oder beide TRPC-Varianten gebraucht werden, um eine TRPC1-vermittelte

Diskussion

Steigerung der synaptischen Transmission zu bewirken. Eine mögliche Erklärung ist, dass TRPC1-Kanäle in Neuronen ebenso wie es bereits in heterologen Expressionssystemen gezeigt wurde, in Abwesenheit anderer TRPC-Varianten in intrazellulären Kompartimenten zurückgehalten werden und nicht in die Plasmamembran gelangen (Hofmann et al., 2002). Die Überexpression von TRPC5 führte hingegen zu einer Frequenzsteigerung der mEPSCs sowohl in Wt- als auch in TRPCtko-Zellen, was bedeutet, dass TRPC5 dazu in der Lage ist, Ca^{2+} -permeable homotetramere Kanäle zu bilden, ein Resultat, dass sich gut mit früheren Studien vereinbaren lässt, die zeigen, dass homotetramere TRPC5-Kanäle in heterologen Expressionssystemen eine hohe Leitfähigkeit besitzen (Strubing et al., 2001).

Die Überexpression von TRPC1 in autaptischen Kulturen führte nur in Wt-Zellen (Abb.24), aber nicht in TRPCtko-Zellen (Abb.25) zu einer Veränderung in der synaptischen Transmission während hochfrequenter Stimulation. Es wurde eine aktivitätsabhängige Steigerung der synaptischen Transmission beobachtet, die mit einer Erhöhung der synchronen und der asynchronen Freisetzung und einer Erhöhung der Poolgröße der fusionskompetenten Vesikel einherging. Dieser Effekt beruht auf einer Verstärkung der Effektivität der Synapse und stellt eine Form der Kurzzeitplastizität dar, die man als Fazilitierung bezeichnet (Zucker and Regehr, 2002). Prozesse, bei denen es über einen kurzen Zeitraum zu einer Verminderung der Effektivität der Synapse kommt werden im Gegensatz dazu als Depression bezeichnet. Kurzzeitplastizität dient dazu, die Stärke der Neurotransmission zu regulieren und stellt damit ein wichtiges Element für die Codierung von Informationen im Nervensystem dar. Fazilitierung tritt innerhalb mehrerer hundert Millisekunden auf und zeichnet sich dadurch aus, dass bei wiederholter Aktivierung der Präsynapse die Amplitude des zweiten EPSCs größer ist als die des ersten EPSCs (Atluri and Regehr, 1996). Sie kommt durch eine Erhöhung der lokalen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zustande und ist im Falle der TRPC1-überexprimierenden Zellen vermutlich durch die aktivitätsabhängige Aktivierung der Ca^{2+} -permeablen TRPC-Kanäle zu erklären. TRPC1-Kanäle können zwar selbst nicht durch Ca^{2+} aktiviert werden (Cheng et al., 2011), es ist jedoch denkbar, dass sich durch die Überexpression von TRPC1 die Stöchiometrie der TRPC1/TRPC4/TRPC5-Kanäle verändert und dadurch mehr Kanäle, die TRPC4- oder TRPC5-Kanaluntereinheiten beinhalten aus intrazellulären Kompartimenten rekrutiert werden und in die Plasmamembran eingebaut werden. TRPC5-Kanäle werden durch intrazelluläres Ca^{2+} selbst in einer konzentrationsabhängigen Art und Weise im submikromolaren Bereich (EC_{50} 635 nM) aktiviert (Gross et al., 2009) und eignen sich daher, um Veränderungen in der intrazellulären Kalziumkonzentration aufzuspüren. Darüber hinaus antworten sie auf Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration innerhalb von Millisekunden, was den Anforderungen als möglicher Vermittler der Kurzzeitplastizität entspricht.

Durch TRPC1-Überexpression wurde eine Kurzzeitplastizität hervorgerufen, die bemerkenswerte Ähnlichkeit zu der Fazilitierung in Munc 13-2 abhängigen Synapsen während einer 10 Hz Stimulation aufweist. Munc13-2 ist in diesen Synapsen für das „priming“ der Vesikel verantwortlich, verursacht eine Fazilitierung während und eine Verstärkung der synaptischen Transmission nach hochfrequenter Stimulation und erhöht den Pool fusionsbereiter Vesikel durch aktivitätsbedingte Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Rosenmund et al., 2002). Interessanterweise werden „priming“-Faktoren, die eine C2-Domäne enthalten wie Doc2b und Munc13 durch eine Ca^{2+} -abhängige Interaktion in die Plasmamembran inseriert (Pinheiro et al., 2016). Auf diese Weise könnte der TRPC-Kanal-vermittelte Ca^{2+} -Einstrom in die beobachtete Kurzzeitfazilitierung und die erhöhte Auffüllrate des Pools umgewandelt werden.

Beladen der Zellen mit EGTA-AM verhindert die TRPC1-abhängige Kurzzeitfazilitierung während hochfrequenter Stimulation (Abb. 26). Da EGTA jedoch ein langsamer Ca^{2+} -Chelator ist und den schnellen Ca^{2+} -Anstieg, der die Exozytose auslöst nur wenig beeinflusst (Atluri and Regehr, 1996), bleibt die synchrone Komponente der Aktionspotential-evozierten Transmission nahezu unverändert. Ausgehend von einer niedrigen EGTA-Konzentration (~ 1 mM) in der Präsynapse sollte der Puffer Ca^{2+} -Ionen mit einer Zeitkonstante von 100 μs binden (Adler et al., 1991). Unter diesen Bedingungen kann Ca^{2+} unter Berücksichtigung eines Ca^{2+} -Diffusionskoeffizienten von $2,2 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 \text{sec}^{-1}$ (Nakamura et al., 2018) mehr als 350 nm ($r^2 = 6 \times D_{\text{Ca}} \cdot T_{\text{Chelation}}$) diffundieren, bevor eine Komplexbildung mit EGTA erfolgt. Diese Überlegung legt die Schlussfolgerung nahe, dass TRPC-Kanäle im Vergleich zu den spannungsabhängigen- Ca^{2+} -Kanälen weiter von der aktiven Zone entfernt lokalisiert sind und von dort aus die Ca^{2+} -abhängige Mobilisierung von Vesikeln aus dem Reservepool verstärken.

Zusammengefasst zeigen die erarbeiteten Befunde, dass TRPC-Kanäle die neuronale Transmission an glutamatergen Synapsen durch Modulation präsynaptischer Ca^{2+} -Signale kontrollieren. Sie deuten darauf hin, dass TRPC-Kanäle den präsynaptischen Ca^{2+} -Anstieg verstärken und die Rate der Vesikelrekrutierung erhöhen, um den Bedarf an Vesikeln während hoher neuronaler Aktivität zu decken.

6.1.3. VERGLEICHENDE ANALYSE POTENTIELLER TRPC-KANALAKTIVATOREN

Ein allgemeines Problem in der TRPC-Kanalforschung stellt das Fehlen pharmakologischer Tools dar. Unspezifische TRP-Kanalaktivatoren und -inhibitoren wie Carbachol und SFK96365 können dazu herangezogen werden, die TRPC-Kanalaktivität in heterologen Expressionssystemen zu untersuchen, sind aber für Untersuchungen in primären Zellen weitgehend ungeeignet. Deshalb sollte in dieser Arbeit nach einem spezifischen Aktivator für

die Proteine der Untergruppe TRPC1, TRPC4, TRPC5 gesucht und mit Hilfe von elektrophysiologischen Messungen in hippokampalen Neuronenkulturen identifiziert werden. Fluorometrische Ca^{2+} -Messungen in heterologen Expressionssystemen lieferten Hinweise auf eine Aktivierung von TRPC5- und TRPC5/TRPC1-Kanälen durch die Substanz Riluzol (Richter et al., 2014a, b). Desweiteren konnte eine Steigerung der Kanalöffnungswahrscheinlichkeit durch Riluzol in Glioblastomzellen, die TRPC5 endogen exprimieren beobachtet werden. Die durch Riluzol beobachteten Effekte waren unabhängig von einer Aktivierung der PLC, was für eine direkte Wirkung der Substanz am TRP-Kanal spricht (Richter et al., 2014b). Riluzol induzierte in autaptischen hippokampalen Wt-Neuronen eine reversible Erhöhung der mEPSC-Frequenz, die jedoch in gleichem Ausmaß auch in TRPCtko-Neuronen zu sehen war und daher nicht auf die alleinige Aktivierung von TRPC1/TRPC4/TRPC5-Kanäle zurückgeführt werden kann (Abb. 28). Da Riluzol eine Reihe von Ionenkanälen, wie z.B. spannungsabhängige Na^{+} - und K^{+} -Kanäle, Ca^{2+} -abhängige K^{+} -Kanäle, sowie Transmitterrezeptoren und Glutamattransporter moduliert (siehe Übersichtsartikel (Bellingham, 2011)), könnte der Effekt jedoch in diesen Zellen maskiert sein und eine direkte Aktivierung der endogen exprimierten TRPC-Kanäle kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

In einer weiteren Studie wurde (-)-Englerin A als möglicherweise spezifischer TRPC4/TRPC5 Aktivator beschrieben (Akbulut et al., 2015). Mittels fluorometrischer Messungen konnte gezeigt werden, dass (-)-Englerin A sowohl endogen in der renalen Krebszelllinie A498 exprimierte TRPC4-Kanäle, als auch durch heterologe Expression in Hek 293-Zellen hergestellte homotetramere TRPC5- und TRPC4-Kanäle sowie heterotetramere TRPC1/TRPC4-Kanäle aktiviert. Die TRPC-Kanalaktivierung wurde dabei bereits im niedrigen Konzentrationsbereich (3-100 nM) erreicht und verursachte eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Ferner wurde eine Abhängigkeit des (-)-Englerin A induzierten Signals von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beobachtet (Akbulut et al., 2015). In dieser Doktorarbeit wurde gezeigt, dass (-)-Englerin A einen selektiven und potenten Aktivator für TRPC1/TRPC4/TRPC5-Kanäle in hippokampalen Neuronen darstellt (Abb. 29). Dieses Ergebnis passt gut zu vorherigen Studien, in denen andere TRPC-Varianten nicht durch (-)-Englerin A aktiviert werden konnten (Akbulut et al., 2015, Carson et al., 2015). Der (-)-Englerin A induzierte Einwärtsstrom, trat nur in Wt-Zellen, aber nicht in TRPC1/TRPC4/TRPC5-tko-Zellen auf (Abb.29) und konnte auch in Gegenwart der Glutamatrezeptorblocker APV und DNQX in ähnlicher Größe und Häufigkeit beobachtet werden (Abb.31). Dies weist darauf hin, dass der (-)-EA-induzierte Strom durch eine direkte Aktivierung von TRPC-Kanälen und nicht über eine nachgeschaltete Aktivierung von Glutamatrezeptoren verursacht wird.

TRPC-Kanäle können durch Stimulation der Phospholipase C über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden (Venkatachalam and Montell, 2007, Abramowitz and Birnbaumer, 2009). Ein solcher Mechanismus wurde für die Aktivierung von TRPC1 in einer Studie an Kleinhirnschnitten aus der Ratte vorgeschlagen (Kim et al., 2003). Die Ergebnisse dieser Untersuchung lieferten Hinweise darauf, dass der langsame exzitatorische postsynaptische Strom in Purkinjezellen, der durch Aktivierung von metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR1) induziert wurde, durch TRPC1-Kanäle vermittelt wird. In pyramidalen Neuronen der lateralen Amygdala konnte ein Zusammenhang zwischen dem durch Aktivierung von Gruppe I metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR1/mGluR5) induzierten Strom und der Aktivität von TRPC-Kanälen nachgewiesen werden (Faber et al., 2006). Da metabotrope Glutamatrezeptoren auch im Hippokampus exprimiert werden (Charpak et al., 1990, Crepel et al., 1994, Lee et al., 2002) und diese bei der Untersuchung der Wirkung von (-)-Englerin A nicht inhibiert wurden, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass der (-)-Englerin A induzierte Strom durch eine indirekte Aktivierung von TRPC-Kanälen über metabotrope Glutamatrezeptoren ausgelöst wurde. Da jedoch zur Aktivierung von metabotropen Glutamatrezeptoren in der Regel eine tetanische Stimulation erforderlich ist (Batchelor et al., 1994, Tempia et al., 1998, Tempia et al., 2001), ist es unwahrscheinlich, dass in dem gewählten Versuchsansatz mGluR aktiviert wurden. Zudem wurde anhand von Messungen in Syb2-Ko-Neuronen, die nahezu keine Glutamatfreisetzung aufweisen (Schoch et al., 2001) in nachfolgenden Experimenten der Arbeitsgruppe gezeigt, dass Englerin A ähnlich große Einwärtsströme in Abwesenheit jeglicher Neurotransmitterfreisetzung hervorruft (Schwarz et al., 2019). Somit kann der beobachtete Einwärtsstrom höchstwahrscheinlich auf eine direkte Aktivierung von TRPC-Kanälen zurückgeführt werden und kommt nicht durch eine indirekte, über mGluR vermittelte Aktivierung von TRPC-Kanälen zustande. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits in vorherigen Studien gemacht, in denen (-)-Englerin A trotz Inhibition der G-Proteinaktivität einen über TRPC1/TRPC4-Kanäle vermittelten Einstrom in Hek-Zellen verursachte (Akbulut et al., 2015).

Die Identifikation von (-)-Englerin A als spezifischen Aktivator von TRPC1/TRPC4/TRPC5-Kanälen bietet neue experimentelle Möglichkeiten zur Funktionsanalyse dieser TRPC-Kanäle in hippokampalen Neuronen. Beispielsweise könnte die Auswirkung der TRPC-Kanalaktivierung auf die Ca^{2+} -Homöostase unter Verwendung Ca^{2+} -sensitiver Farbstoffe oder genetisch codierter Ca^{2+} -Indikatoren untersucht werden.

Der neurotrophe Faktor BDNF wird in glutamatergen Hippokampusneuronen freigesetzt, bindet an den TrkB-Rezeptor und leitet durch die Aktivierung der PLC verschiedene Signalwege ein. Die Aktivierung der PLC führt zur Produktion von DAG und IP_3 , die beide als TRPC-Kanal-Regulatoren gelten (Amaral et al., 2007, Wu et al., 2010). In Hirnschnitten aus BDNF-knockout-Mäusen wurde eine reduzierte basale synaptische Transmission und eine

beeinträchtigte Langzeitpotenzierung in hippocampalen Neuronen beobachtet (Patterson et al., 1996). Durch Perfusion hippocampaler Neurone mit BDNF konnte in früheren Studien eine akute Fazilitierung der spontanen sowie der Aktionspotential-evozierten Transmission und eine verstärkte Langzeitpotenzierung hervorgerufen werden (Lessmann and Heumann, 1998, Amaral and Pozzo-Miller, 2012, Valente et al., 2012). Obwohl diese Wirkung von BDNF mit der in dieser Arbeit gezeigten Wirkung der TRPC-Kanalaktivität auf die synaptische Transmission übereinstimmt, konnten die in der Literatur beobachteten BDNF-induzierten akuten Effekte in hippocampalen Neuronenkulturen nicht reproduziert werden. Somit konnte nicht nachgewiesen werden, dass BDNF als physiologischer Aktivator von TRPC-Kanälen dient. Dennoch könnten TRPC1/TRPC4/TRPC5-Kanäle in einen BDNF-vermittelten Prozess involviert sein, der unter den gewählten Versuchsbedingungen jedoch keinen Effekt auf die synaptische Transmission zeigte. Möglicherweise sind andere Kulturbedingungen, Änderungen in der Applikation der BDNF-Lösung oder andere Stimulationsprotokolle erforderlich, um BDNF-induzierte Effekte auf die synaptische Übertragung aufzuzeigen.

6.2. Bedeutung struktureller Eigenschaften der TMD des v-SNARE-Proteins Syb2 für die synaptische Transmission hippocampaler Neurone

Das v-SNARE-Protein Syb2 ist für die Ausbildung des SNARE-Komplexes (Weber et al., 1998) und die Ca^{2+} -abhängige Transmitterfreisetzung in Neuronen von wesentlicher Bedeutung (Schoch et al., 2001). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die mechanistische Rolle der TMD von Syb2 in der Exozytose synaptischer Vesikel in hippocampalen Neuronen anhand einer Struktur-Funktionsanalyse aufgeklärt werden. Elektrophysiologische Messungen in chromaffinen Zellen der Maus zeigten, dass β -verzweigte Aminosäuren in der TMD von Syb2 die Membranfusion und die Erweiterung der Fusionspore durch Erhöhung der konformationellen Flexibilität der Syb2-TMD fördern. Um zu überprüfen, ob die konformationelle Flexibilität der Syb2-TMD auch für die Exozytose kleiner synaptischer Vesikel förderlich ist, wurde mit Hilfe eines lentiviralen Expressionssystems entweder das Wildtyp-Protein oder eine der Varianten mit mutierter TMD des Syb2-Proteins (PolyL, PolyV) in Syb2-defizienten Neuronen wiedereingeführt. Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten, dass die vollständige Substitution der Aminosäuren der Syb2-TMD durch α -Helix-stabilisierende Leucinreste die Ca^{2+} -abhängige Exozytose stark beeinträchtigt (Abb.37). Hingegen konnte die Exozytose durch Austausch der Aminosäuren der Syb2-TMD gegen Valine, welche die konformationelle Flexibilität der TMD erhöhen, vollständig auf WT-Niveau wiederhergestellt werden. Diese Ergebnisse liefern Hinweise darauf, dass die

konformationelle Flexibilität der TMD von Syb2 für die Fusion synaptischer Vesikel von wesentlicher Bedeutung ist.

6.2.1. DER VERLUST DES v-SNARE-PROTEINS SYB2 BLOCKIERT DIE SYNAPTISCHE TRANSMISSION

Das v-SNARE-Protein Syb2 ist Bestandteil des SNARE-Komplexes, der für die Fusion synaptischer Vesikel von wesentlicher Bedeutung ist (Fang and Lindau, 2014). Genetische Deletion von Syb2 in Mäusen führt zu Letalität und verhindert die synaptische Transmission fast vollständig (Schoch et al., 2001). Dieses Ergebnis konnte anhand von mEPSC-Messungen in Massenkulturen und EPSC-Messungen in autaptischen Kulturen hippocampaler Neurone bestätigt werden (Abb. 33). Dennoch konnte eine geringe Fusionsaktivität sogar in Syb2-ko Neuronen beobachtet werden, was bedeutet, dass Syb2 für die Exozytose in Neuronen nicht essentiell ist. Möglicherweise beruht die verbleibende Exozytosefähigkeit auf der Beteiligung anderer funktionell redundanter Mitglieder der v-SNARE-Familie am Fusionsprozess, wie beispielsweise VAMP4 (Raingo et al., 2012). Cellubrevin ist mit dem v-SNARE Protein Synaptobrevin 2 nahe verwandt und kann seine Funktion in der Exozytose sowohl in chromaffinen Zellen (Borisovska et al., 2005), als auch in Neuronen (Deak et al., 2006) ersetzen. Da die zusätzliche Deletion von Cellubrevin die Exozytosekompetenz in Syb2-ko-Neuronen jedoch nicht noch weiter herabsetzt, ist es unwahrscheinlich, dass die verbleibende exozytotische Aktivität in Syb2-ko-Neuronen durch Cellubrevin vermittelt wird (Deak et al., 2006). In einer Studie an hippocampalen autaptischen Neuronen wurde gezeigt, dass Syb1 in einer Subpopulation von Syb2-ko Neuronen exprimiert wird und dass dieses v-SNARE-Protein vermutlich für die verbleibende Exozytosefähigkeit in Syb2-ko-Neuronen verantwortlich ist (Zimmermann et al., 2014). Insgesamt zeigen die Ergebnisse in Syb2-defizienten Neuronen, dass Exozytose in Abwesenheit kanonischer, exozytotischer SNARE-Komplexe prinzipiell möglich ist, aber nur mit sehr stark reduzierter Fusionsrate stattfindet.

6.2.2. LENTIVIRALE EXPRESSION VON SYB2 UND VARIANTEN VON SYB2 MIT MUTIERTER TMD

Zur Durchführung einer Struktur-Funktionsanalyse wurde die Exozytosefähigkeit in kultivierten Neuronen aus Syb2^{-/-}-Mäusen mit Hilfe eines lentiviralen Expressionssystems wiederhergestellt. Dazu wurden Syb2-ko-Neurone mit Lentiviren infiziert, um das Wildtyp-Protein oder seine mutierten Varianten mit veränderter TMD (PolyV, PolyL) in diesen Zellen zu exprimieren. Lentiviren inserieren ihr RNA-Genom nach reverser Transkription in das Wirtsgenom und eignen sich daher, um im Rahmen eines Gain-of-function-Ansatzes die

Exozytose von ko-Mäusen wiederherzustellen. Bereits in früheren Studien wurden Lentiviren erfolgreich dazu verwendet, v-SNARE-Proteine in kultivierten Neuronen aus Knockout-Mäusen zu produzieren und dadurch ihre Exozytosefähigkeit wiederherzustellen (Deak et al., 2006, Delgado-Martinez et al., 2007, Guzman et al., 2010). Um infizierte Neurone in Patch Clamp-Experimenten identifizieren zu können, wurde viral exprimiertes Syb2 durch C-terminale Fusion mit dem Fluorophor mRFP markiert und durch Anregung von Licht mit einer Wellenlänge von 540 nm dargestellt. Wie von Guzman et al. bereits gezeigt, hat die C-terminale Markierung von Syb2 durch mRFP keinen Einfluss auf die Funktion und korrekte Lokalisation des Proteins (Guzman et al., 2010). Mittels Western Blot Analysen konnten die verschiedenen Syb2-Varianten in den theoretisch erwarteten Größen in Lysaten aus transfizierten Neuronen nachgewiesen werden (Abb. 34). Dies bedeutet, dass alle Fusionskonstrukte exprimiert wurden und als intakte Proteine in der Zelle vorlagen. Immunzytochemische Färbungen gegen Syb2 und Synaptophysin dienten dazu, die morphologischen Eigenschaften der Neuronenkultur unter lentiviraler Expression zu untersuchen (Abb. 35). Anhand der Färbung gegen das vesikuläre Markerprotein Synaptophysin konnte keine Beeinträchtigung der Synaptogenese durch die TMD-Mutation festgestellt werden. Gleichzeitige Färbung gegen Syb2 zeigte, dass die subzelluläre Lokalisation der mutierten Proteine unverändert ist und dass die Expressionsstärke aller Syb2-Varianten auf dem Niveau der Wildtyp-Zellen liegt. Diese Resultate bildeten die Grundlage für die korrekte Interpretation der elektrophysiologischen Daten.

6.2.3. DIE FUNKTIONELLE BEDEUTUNG DER TMD VON SYB2 IN DER Ca^{2+} -GESTEUERTEN EXOZYTOSE

In vitro-Analysen lieferten Hinweise darauf, dass die TMDs der SNARE-Proteine alleine ohne das Vorhandensein einer zytoplasmatischen Domäne die Fusion von Lysosomen vorantreiben können (Langosch et al., 2001). Desweiteren wurde deutlich, dass ein Ersatz der SNARE-TMDs durch einen Lipidanker die Fusion zwischen Liposomen verhindert, was für eine aktive Rolle der TMDs bei der Exozytose spricht (McNew et al., 2000). Die Bedeutung der TMD von Syb2 für die Fusion synaptischer Vesikel wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Zhou et al., 2013, Chang et al., 2016). Im Gegensatz zu Synaptobrevin, das über eine TMD in der Membran verankert ist, unterstützte Lipid-verankertes Syb2 die Exozytose in chromaffinen Zellen, Neuronen und rekonstituierten Proteoliposomen kaum, was die fusiogene Rolle der Syb-2-TMD gleichermaßen verdeutlicht (Chang et al., 2016). Es wurden jedoch auch Resultate erzielt, die gegen eine fusiogene Rolle der SNARE-TMDs sprechen. In einer Studie an kortikalen Neuronen konnte beispielsweise die spontane und die Ca^{2+} -gesteuerte Membranfusion sowohl durch Lipid-verankertes Syntaxin-1 als auch

durch Lipid-verankertes Synaptobrevin-2 ohne TMD effizient gefördert werden. (Zhou et al., 2013). Die funktionelle Bedeutung der Syb2-TMD ist also bisher noch unbekannt. In dieser Arbeit sollte die mechanistische Rolle der Syb2 TMD basierend auf der Hypothese untersucht werden, dass die vermehrt in der TMD von Syb2 auftretenden β -verzweigten Aminosäuren die konformationelle Flexibilität des Helixrückgrats fördern (Quint et al., 2010), wodurch die Anordnung der Lipide in der Membran gestört und dadurch möglicherweise die Fusion vorangetrieben wird (Stelzer et al., 2008). Dazu wurden die Auswirkung der TMD-Mutationen PolyL und PolyV auf die synaptische Transmission anhand von vergleichenden elektrophysiologischen Analysen untersucht. Messungen der spontanen Transmitterfreisetzung zeigten, dass die mEPSC-Frequenz in Syb2-ko Neuronen durch lentivirale Expression von Syb2 oder PolyV vollständig auf das Niveau der WT-Zellen wiederhergestellt werden kann (Abb. 36). Im Gegensatz dazu konnte durch Expression der PolyL Mutante nur eine partielle Wiederherstellung der mEPSC-Frequenz erreicht werden. Dies legt nahe, dass auch die PolyL-Mutante an der Bildung der SNARE-Komplexe beteiligt ist, aber zu geringerer Fusionseffizienz führt. Diese Resultate befinden sich im Einklang mit vorangegangenen Studien, in denen ein Zusammenhang zwischen der konformationellen Flexibilität der SNARE-TMDs und dem Fusionsvermögen von Liposomen aufgezeigt wurde (Langosch et al., 2001, Stelzer et al., 2008) und unterstützen die Hypothese, dass β -verzweigte Aminosäuren in der TMD von Syb2 für die Fusion synaptischer Vesikel förderlich sind. In autaptischen Neuronenkulturen konnte die Aktionspotential-evozierte Exozytose und der Pool fusionsbereiter Vesikel durch Expression der PolyV-Mutante vollständig auf WT-Niveau wiederhergestellt werden, wohingegen durch Expression der PolyL-Mutante nur eine reduzierte Amplitude und Ladung der EPSCs und eine verminderte Größe des Pools exozytose-kompetenter Vesikel erreicht wurde (Abb. 37). Im Gegensatz zu sogenannten Linkermutanten von Syb2, welche die Kraftübertragung vom SNARE-Motiv auf die TMD beeinträchtigen (Guzman et al., 2010), führten die hier untersuchten Fusionsmutanten nicht zu einer Veränderung in der Stimulus-Sekretionskopplung. Der unterschiedliche Phänotyp zwischen Linker- und TMD-Mutanten deutet darauf hin, dass die TMD eine eigenständige, vom SNARE-Motiv unabhängige Funktion während der Fusion ausübt. Vermutlich werden die Vesikel bei der PolyL-Mutante im fusionsbereiten Zustand zurückgehalten, da die Energie zur Verschmelzung der Membranen durch die verringerte Flexibilität der TMD nicht überwunden werden kann. In chromaffinen Zellen führte die TMD-Mutante PolyL zu einer Reduktion der Ca^{2+} -abhängigen Exozytose und verlangsamte die Kinetik der amperometrischen Signale (Dhara et al., 2016). Dagegen konnte die Sekretion durch die PolyV-Mutante vollständig auf Wt-Niveau wiederhergestellt werden und beschleunigte die Expansion der Fusionspore stärker als das Wt-Protein. Eine Mutante, bei der alle Aminosäurereste der TMD von Syb2 gegen die ebenfalls β -verzweigte Aminosäure Isoleucin

ausgetauscht waren, zeigte den gleichen Phänotyp wie die PolyV-Mutante (Dhara et al., 2016), was bedeutet, dass die Vesikelfusion in chromaffinen Zellen nicht von konservierten Valinresten in der Syb2-TMD abhängig ist. Im Gegensatz zu unseren Befunden in chromaffinen Zellen konnte in Neuronen interessanterweise kein Einfluss der TMD-Mutationen auf die Kinetik der Fusionsereignisse beobachtet werden (Abb. 36, Abb. 37). Dieser Unterschied könnte auf der unterschiedlichen Größe der fusionierenden Vesikel in den beiden Zelltypen beruhen. Im Vergleich zu den großen sekretorischen Vesikeln in chromaffinen Zellen (\varnothing 120nm) weisen die kleineren synaptischen Vesikel (\varnothing 40 nm) in Neuronen eine stärkere Krümmung der Lipid-Doppelmembran auf, wodurch die Expansion der Fusionspore erleichtert wird (Zhang and Jackson, 2010). Dieser Effekt übt wahrscheinlich einen so starken Einfluss auf die Kinetik der Fusionsporenerweiterung aus, dass der Einfluss der TMD-Mutation auf die Kinetik der Fusionsereignisse in Neuronen verdeckt wird. Amperometrische Messungen zeigten, dass die initiale Fusionspore mit zunehmender Vesikelgröße stabiler wird (d.h. die amperometrischen Signale weisen eine längere Prespike-Dauer auf) (Zhang and Jackson, 2010). Eine hohe Membrankrümmung in der Fusionspore stellt ein großes energetisches Hindernis für die Erweiterung der Fusionspore dar. Mit zunehmender Vesikelgröße erhöht sich der Anteil gekrümmter Membran innerhalb der Fusionspore, daher ist der Energieaufwand bei der Fusion großer Vesikel höher, als bei der Fusion kleiner Vesikel. Interessanterweise besitzen v-SNARE Proteine, die für die Fusion großer Vesikel verantwortlich sind mehr β -verzweigte Aminosäuren innerhalb der N-terminalen Hälfte ihrer TMDs als solche, die für die Fusion kleiner Vesikel verantwortlich sind ((Dhara et al., 2016), Tabelle1). Die v-SNARE-Proteine VAMP7 und VAMP8 weisen einen Gehalt von mehr als 70 % β -verzweigter Aminosäuren in ihrer TMD-Region auf und sind damit gut geeignet, um die Exozytose von Zymogengranulen und Mastzellvesikeln zu fördern, die große Moleküle wie Interferon (Krzewski et al., 2011) und Hexoaminidase (Wang et al., 2004, Lippert et al., 2007) beinhalten und auf eine Beschleunigung der Fusionsporenerweiterung angewiesen sind. V-SNARE Proteine, die einen mittleren Gehalt an β -verzweigten Aminosäuren (33% bzw. 44%) aufweisen, wie Cellubrevin oder Syb2, sind für die Exozytose von kleineren Vesikeln aus chromaffinen Zellen (Borisovska et al., 2005), lytischen Granulen aus T-Zellen (Matti et al., 2013) oder kleinen synaptischen Vesikeln (Schoch et al., 2001) geeignet. Hingegen vermittelt Syb1 mit einem Gehalt von nur 22 % an β -verzweigten Aminosäuren bevorzugt die Exozytose kleiner synaptischer Vesikel um klassische Neurotransmitter an der NMJ (neuromuscular junction) freizusetzen (Liu et al., 2011b). Somit scheint der Gehalt an α -Helix-destabilisierenden β -verzweigten Aminosäuren innerhalb der N-terminalen Hälfte verschiedener v-SNARE TMDs evolutionär an die Größe der Vesikel angepasst zu sein, um die Erweiterung der Fusionspore zu katalysieren und die Freisetzung verschiedener Moleküle im Kontext diverser

physiologischer Prozesse zu gewährleisten. Möglicherweise beeinflusst dieser Mechanismus auch das Gleichgewicht zwischen einer expandierenden oder nicht-expandierenden Fusionspore, was auf der einen Seite eine effiziente Freisetzung großer Moleküle aus großen Vesikeln sicherstellt und andererseits die Freisetzung kleiner Moleküle sowie ein schnelles Recycling von kleinen synaptischen Vesikeln begünstigt (kiss and run), indem es die Wahrscheinlichkeit einer vollständigen Fusion mit der Plasmamembran verringert.

Mutanten von Syb2, die das lipidverankernde Motiv von CSP- α anstelle einer TMD enthalten, führten sowohl in Neuronen als auch in chromaffinen Zellen im Vergleich zum Wt-Protein nur zu einer unvollständigen Wiederherstellung der Sekretionsfähigkeit (Chang et al., 2016, Dhara et al., 2016). Die im Rahmen dieser Arbeit an hippokampalen Neuronenkulturen erhobenen Daten liefern klare Hinweise für eine aktive Beteiligung der TMD von Syb2 am Fusionsprozess von synaptischen Vesikeln und widerlegen die Annahme, dass diese lediglich als Membrananker dient (Zhou et al., 2013). Die geringere Exozytoseaktivität bei der PolyL-Mutante könnte auch durch den Verlust kritischer Aminosäuren bedingt sein. Die vollständige Wiederherstellung der Exozytose durch die PolyV-Mutante zeigt jedoch, dass weder die konservierte Aminosäure G¹⁰⁰ (Dhara et al., 2016), die bei der Dimerisierung der Syb2-TMDs eine Rolle spielt (Fdez et al., 2010), noch Aminosäuren, welche die Interaktion zwischen der TMD von Syb 2 (I⁹⁸, L⁹⁹, I¹⁰², I¹⁰⁶) und der TMD von Syntaxin1 stabilisieren (Stein et al., 2009), funktionell von Bedeutung sind. Insgesamt zeigen die hier erhaltenen Ergebnisse, dass die TMD von Syb2 eine aktive Rolle während der Vesikelfusion einnimmt, die über die simple Verankerung des Proteins in der Membran hinausgeht. β -verzweigte Aminosäuren in der TMD von Syb2 unterstützen die Vesikelfusion, indem sie die konformationelle Flexibilität der TMD-Helix erhöhen, wodurch die Anordnung der Membranlipide gestört und die Einleitung der Membranfusion erleichtert wird (Dhara et al., 2020).

6.3. Einfluss der membran-proximalen Tryptophane von Syb2 auf die synaptische Transmission

Tryptophane befinden sich aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften in Transmembranproteinen häufig am Übergang vom wässrigen zum lipidhaltigen Milieu (Al-Abdul-Wahid et al., 2012). Die Juxtamembranregion von Syb2 enthält zwei hochkonservierte Tryptophanreste an den Positionen W89/W90, die möglicherweise einen kritischen Einfluss auf die Interaktionen zwischen SNARE-Proteinen und Membranlipiden während der Vesikelfusion haben. Um die Bedeutung der beiden membranständigen Tryptophanreste von Syb2 in der Ca²⁺-abhängigen Exozytose zu untersuchen, wurde eine Mutante, bei der die Aminosäuren W89/W90 gegen hydrophobe Alaninreste ausgetauscht waren mittels

lentiviraler Expression in Syb2-ko Neuronen wiedereingeführt. Anhand von elektrophysiologischen Messungen wurde gezeigt, dass die WWAA-Mutante sowohl die Aktionspotential-evozierte Exozytose, als auch den Pool fusionsbereiter Vesikel gegenüber Wildtypzellen nur in signifikant vermindertem Ausmaß wiederherstellen kann (Abb.41). Auf die Amplitude, Ladung und Kinetik der spontanen Fusionsereignisse hatte die Substitution der beiden Tryptophane durch Alanine keine Auswirkung. Diese Resultate stimmen gut mit den Ergebnissen einer Studie überein, bei der dieselbe Mutation von Syb2 in chromaffinen Zellen untersucht wurde (Borisovska et al., 2012). Anhand von immunhistochemischen Färbungen wurde nachgewiesen, dass die mutierte Variante WWAA subzellulär korrekt lokalisiert war und in gleicher Menge wie das WT-Protein in synaptischen Vesikeln vorlag (Abb.39). Die Mutation hatte keinen Einfluss auf die Synaptogenese der kultivierten hippocampalen Neurone. Mittels Western Blot Analyse wurde gezeigt, dass die WWAA-Variante von Syb2 als intaktes Protein in der Zelle vorlag (Abb. 38). Somit können die Auswirkungen der Substitution der Tryptophane durch Alanine auf einen direkten Einfluss der Mutation auf die Ca^{2+} -abhängige Exozytose zurückgeführt werden und sind nicht durch morphologische Veränderungen der Neuronenkultur oder verminderte Expression der Mutante bedingt. Experimente aus vorangegangenen Studien zeigten, dass die beiden Tryptophanreste in Rekonstitutions-Assays mit Phospholipiden interagieren und für den Neigungswinkel (36°) der TMD von Syb2 in der vesikulären Membran verantwortlich sind (Kweon et al., 2003a, Bowen and Brunger, 2006). Es wurde vermutet, dass die Interaktion der Tryptophanreste mit den Phospholipiden die SNARE-Domäne teilweise in die Membran zieht und dadurch inhibierenden Einfluss auf die Bildung des SNARE-Komplexes nimmt. In Übereinstimmung mit dieser Vermutung wurde in einer Studie mittels EPR (Elektronenspinresonanz) gezeigt, dass die Substitution der Tryptophane durch polare Serinreste die Bildung von SNARE-Komplexen fördert (Kweon et al., 2003a). In späteren Untersuchungen konnte diese Beobachtung jedoch anhand von elektrophysiologischen Messungen in chromaffinen Zellen nicht bestätigt werden, denn in diesen Zellen zeigte die W89S/W90S-Mutante den gleichen Phänotyp wie die W89A/W90A-Mutante und führte zu einer Reduktion in der Poolgröße fusionskompetenter Vesikel (Borisovska et al., 2012). Die Expression der WWAA-Mutante führte in einer Studie an kortikalen Neuronen aus Syb2-ko Mäusen zu einer Verminderung der Aktionspotential-evozierten Exozytose und einer deutlichen Erhöhung der spontanen Transmitterfreisetzung (Maximov et al., 2009). Aufgrund phänotypischer Ähnlichkeit zu Zellen, die für Complexin defizient sind, nahmen die Autoren an, dass die membranproximalen Tryptophanreste für die Funktion von Complexin von Bedeutung wären. Unsere Beobachtungen in chromaffinen Zellen und Neuronen zeigen, dass die Substitution der beiden membranproximalen Tryptophane durch Alanine zu einem

generellen "Priming"-Defizit führt und liefern keine Hinweise auf eine vermeintliche Bedeutung der Tryptophanreste für die Fusionsklemme in der Exozytose.

Abschließende Zusammenfassung:

In dieser Arbeit konnten unter Verwendung genetischer Mausmutanten, lentiviraler Expressionssysteme und pharmakologischer Tools neue Einblicke in die Bedeutung der TRPC1/TRP4/TRPC5-Kanäle für die synaptische Transmission in hippocampalen Neuronen erworben werden (Broker-Lai et al., 2017). Vor allem die Erkenntnis, dass TRPC-Kanäle eine bedeutende Rolle in der synaptischen Plastizität spielen, indem sie das präsynaptische Ca^{2+} -Signal verstärken und dadurch die Wiederauffüllrate des Pools während hoher synaptischer Aktivität beschleunigen, veranschaulicht ihre Bedeutung für die Informationsverarbeitung im zentralen Nervensystem (Schwarz et al., 2019).

Ein weiterer Teil der Arbeit befasste sich mit einer Struktur-Funktionsanalyse des vesikulären SNARE-Proteins Syb2. Mittels lentiviraler Expression wurden mutierte Varianten von Syb2 in Syb2-Ko Neurone eingebracht und so die Funktion teilweise wiederhergestellt (Dhara et al., 2016). Die Untersuchung der TMD-Mutanten, bei der die TMD von Syb2 vollständig durch Leucin oder Valin ersetzt wurde, lieferte die wesentliche Information, dass die TMD bei der Vesikelfusion eine aktive Rolle spielt und β -verzweigte Aminosäuren in der TMD von Syb2 die Vesikelfusion unterstützen, indem sie die konformationelle Flexibilität der TMD-Helix erhöhen.

Durch das Einbringen einer Mutante, bei der die beiden membranständigen Tryptophane (W89/W90) durch Alanine ersetzt wurden, konnte die funktionelle Bedeutung dieser beiden Aminosäuren in der synaptischen Transmission in Neuronen untersucht werden. Es wurde festgestellt, dass die beiden Tryptophane einen wesentlichen Beitrag zur Etablierung des Pools freisetzbarer Vesikel leisten, was vermutlich auf spezifische Protein-Lipid-Interaktionen zurückzuführen ist. Die beiden membranständigen Tryptophanreste von Syb2 bestimmen die Position der JMD und den Neigungswinkels der TMD in der Membran und steuern die Elektrostatik an der Grenzfläche zwischen wässriger und lipidhaltiger Phase, wodurch sie das Priming von Vesikeln erleichtern.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Abellan A, Desfilis E, Medina L (2014) Combinatorial expression of Lef1, Lhx2, Lhx5, Lhx9, Lmo3, Lmo4, and Prox1 helps to identify comparable subdivisions in the developing hippocampal formation of mouse and chicken. *Frontiers in neuroanatomy* 8:59.
- Abramowitz J, Birnbaumer L (2009) Physiology and pathophysiology of canonical transient receptor potential channels. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23:297-328.
- Adler EM, Augustine GJ, Duffy SN, Charlton MP (1991) Alien intracellular calcium chelators attenuate neurotransmitter release at the squid giant synapse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 11:1496-1507.
- Akbulut Y, Gaunt HJ, Muraki K, Ludlow MJ, Amer MS, Bruns A, Vasudev NS, Radtke L, Willot M, Hahn S, Seitz T, Ziegler S, Christmann M, Beech DJ, Waldmann H (2015) (-)-Englerin A is a potent and selective activator of TRPC4 and TRPC5 calcium channels. *Angewandte Chemie* 54:3787-3791.
- Al-Abdul-Wahid MS, Demill CM, Serwin MB, Prosser RS, Stewart BA (2012) Effect of juxtamembrane tryptophans on the immersion depth of Synaptobrevin, an integral vesicle membrane protein. *Biochimica et biophysica acta* 1818:2994-2999.
- Allen TG (2006) Preparation and maintenance of single-cell micro-island cultures of basal forebrain neurons. *Nature protocols* 1:2543-2550.
- Amaral MD, Chapleau CA, Pozzo-Miller L (2007) Transient receptor potential channels as novel effectors of brain-derived neurotrophic factor signaling: potential implications for Rett syndrome. *Pharmacology & therapeutics* 113:394-409.
- Amaral MD, Pozzo-Miller L (2012) Intracellular Ca²⁺ stores and Ca²⁺ influx are both required for BDNF to rapidly increase quantal vesicular transmitter release. *Neural plasticity* 2012:203536.
- Antonin W, Holroyd C, Fasshauer D, Pabst S, Von Mollard GF, Jahn R (2000) A SNARE complex mediating fusion of late endosomes defines conserved properties of SNARE structure and function. *The EMBO journal* 19:6453-6464.
- Aroke EN, Powell-Roach KL, Jaime-Lara RB, Tesfaye M, Roy A, Jackson P, Joseph PV (2020) Taste the Pain: The Role of TRP Channels in Pain and Taste Perception. *International journal of molecular sciences* 21.
- Atluri PP, Regehr WG (1996) Determinants of the time course of facilitation at the granule cell to Purkinje cell synapse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:5661-5671.
- Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, Leite RE, Jacob Filho W, Lent R, Herculano-Houzel S (2009) Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *The Journal of comparative neurology* 513:532-541.
- Bark IC, Wilson MC (1994) Human cDNA clones encoding two different isoforms of the nerve terminal protein SNAP-25. *Gene* 139:291-292.
- Batchelor AM, Madge DJ, Garthwaite J (1994) Synaptic activation of metabotropic glutamate receptors in the parallel fibre-Purkinje cell pathway in rat cerebellar slices. *Neuroscience* 63:911-915.
- Baumert M, Maycox PR, Navone F, De Camilli P, Jahn R (1989) Synaptobrevin: an integral membrane protein of 18,000 daltons present in small synaptic vesicles of rat brain. *The EMBO journal* 8:379-384.
- Bekkers JM, Stevens CF (1991) Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:7834-7838.

Literatur

- Bellingham MC (2011) A review of the neural mechanisms of action and clinical efficiency of riluzole in treating amyotrophic lateral sclerosis: what have we learned in the last decade? *CNS neuroscience & therapeutics* 17:4-31.
- Bennett MK, Calakos N, Scheller RH (1992) Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* 257:255-259.
- Beyer EC, Berthoud VM (2017) Gap junction structure: unraveled, but not fully revealed. *F1000Research* 6:568.
- Bezzierides VJ, Ramsey IS, Kotecha S, Greka A, Clapham DE (2004) Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nature cell biology* 6:709-720.
- Birnbaumer L (2009) The TRPC class of ion channels: a critical review of their roles in slow, sustained increases in intracellular Ca(2+) concentrations. *Annual review of pharmacology and toxicology* 49:395-426.
- Blair NT, Kaczmarek JS, Clapham DE (2009) Intracellular calcium strongly potentiates agonist-activated TRPC5 channels. *The Journal of general physiology* 133:525-546.
- Blasi J, Chapman ER, Link E, Binz T, Yamasaki S, De Camilli P, Sudhof TC, Niemann H, Jahn R (1993a) Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature* 365:160-163.
- Blasi J, Chapman ER, Yamasaki S, Binz T, Niemann H, Jahn R (1993b) Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *The EMBO journal* 12:4821-4828.
- Borisovska M, Schwarz YN, Dhara M, Yarzagaray A, Hugo S, Narzi D, Siu SW, Kesavan J, Mohrmann R, Bockmann RA, Bruns D (2012) Membrane-proximal tryptophans of synaptobrevin II stabilize priming of secretory vesicles. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:15983-15997.
- Borisovska M, Zhao Y, Tsytsyura Y, Glyvuk N, Takamori S, Matti U, Rettig J, Sudhof T, Bruns D (2005) v-SNAREs control exocytosis of vesicles from priming to fusion. *The EMBO journal* 24:2114-2126.
- Boschert U, O'Shaughnessy C, Dickinson R, Tessari M, Bendotti C, Catsicas S, Pich EM (1996) Developmental and plasticity-related differential expression of two SNAP-25 isoforms in the rat brain. *The Journal of comparative neurology* 367:177-193.
- Boudkkazi S, Brechet A, Schwenk J, Fakler B (2014) Cornichon2 dictates the time course of excitatory transmission at individual hippocampal synapses. *Neuron* 82:848-858.
- Bowen M, Brunger AT (2006) Conformation of the synaptobrevin transmembrane domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:8378-8383.
- Bracher A, Kadlec J, Betz H, Weissenhorn W (2002) X-ray structure of a neuronal complexin-SNARE complex from squid. *The Journal of biological chemistry* 277:26517-26523.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72:248-254.
- Broker-Lai J, Kollwe A, Schindeldecker B, Pohle J, Nguyen Chi V, Mathar I, Guzman R, Schwarz Y, Lai A, Weissgerber P, Schwegler H, Dietrich A, Both M, Sprengel R, Draguhn A, Kohr G, Fakler B, Flockerzi V, Bruns D, Freichel M (2017) Heteromeric channels formed by TRPC1, TRPC4 and TRPC5 define hippocampal synaptic transmission and working memory. *The EMBO journal* 36:2770-2789.
- Burre J, Beckhaus T, Schagger H, Corvey C, Hofmann S, Karas M, Zimmermann H, Volkandt W (2006) Analysis of the synaptic vesicle proteome using three gel-based protein separation techniques. *Proteomics* 6:6250-6262.
- Calhoun ME, Jucker M, Martin LJ, Thinakaran G, Price DL, Mouton PR (1996) Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *Journal of neurocytology* 25:821-828.

Literatur

- Carlisle HJ, Fink AE, Grant SG, O'Dell TJ (2008) Opposing effects of PSD-93 and PSD-95 on long-term potentiation and spike timing-dependent plasticity. *The Journal of physiology* 586:5885-5900.
- Carr CM, Munson M (2007) Tag team action at the synapse. *EMBO reports* 8:834-838.
- Carson C, Raman P, Tullai J, Xu L, Henault M, Thomas E, Yeola S, Lao J, McPate M, Verkuyl JM, Marsh G, Sarber J, Amaral A, Bailey S, Lubicka D, Pham H, Miranda N, Ding J, Tang HM, Ju H, Tranter P, Ji N, Krastel P, Jain RK, Schumacher AM, Loureiro JJ, George E, Berellini G, Ross NT, Bushell SM, Erdemli G, Solomon JM (2015) Englerin A Agonizes the TRPC4/C5 Cation Channels to Inhibit Tumor Cell Line Proliferation. *PLoS one* 10:e0127498.
- Catterall WA (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3:a003947.
- Chang CW, Chiang CW, Gaffaney JD, Chapman ER, Jackson MB (2016) Lipid-anchored Synaptobrevin Provides Little or No Support for Exocytosis or Liposome Fusion. *The Journal of biological chemistry* 291:2848-2857.
- Charpak S, Gahwiler BH, Do KQ, Knopfel T (1990) Potassium conductances in hippocampal neurons blocked by excitatory amino-acid transmitters. *Nature* 347:765-767.
- Chen X, Nelson CD, Li X, Winters CA, Azzam R, Sousa AA, Leapman RD, Gainer H, Sheng M, Reese TS (2011) PSD-95 is required to sustain the molecular organization of the postsynaptic density. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:6329-6338.
- Cheng KT, Liu X, Ong HL, Swaim W, Ambudkar IS (2011) Local Ca(2)+ entry via Orai1 regulates plasma membrane recruitment of TRPC1 and controls cytosolic Ca(2)+ signals required for specific cell functions. *PLoS biology* 9:e1001025.
- Chilcote TJ, Galli T, Mundigl O, Edelmann L, McPherson PS, Takei K, De Camilli P (1995) Cellubrevin and synaptobrevins: similar subcellular localization and biochemical properties in PC12 cells. *The Journal of cell biology* 129:219-231.
- Clapham DE, Runnels LW, Strubing C (2001) The TRP ion channel family. *Nature reviews Neuroscience* 2:387-396.
- Clausen MV, Hilbers F, Poulsen H (2017) The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease. *Frontiers in physiology* 8:371.
- Constals A, Penn AC, Compans B, Toulme E, Phillipat A, Marais S, Retailleau N, Hafner AS, Coussen F, Hosy E, Choquet D (2015) Glutamate-induced AMPA receptor desensitization increases their mobility and modulates short-term plasticity through unbinding from Stargazin. *Neuron* 85:787-803.
- Crepel V, Anisztejn L, Ben-Ari Y, Hammond C (1994) Glutamate metabotropic receptors increase a Ca(2+)-activated nonspecific cationic current in CA1 hippocampal neurons. *Journal of neurophysiology* 72:1561-1569.
- De Camilli P, Cameron R, Greengard P (1983) Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. I. Its general distribution in synapses of the central and peripheral nervous system demonstrated by immunofluorescence in frozen and plastic sections. *The Journal of cell biology* 96:1337-1354.
- Deak F, Shin OH, Kavalali ET, Sudhof TC (2006) Structural determinants of synaptobrevin 2 function in synaptic vesicle fusion. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:6668-6676.
- Delgado-Martinez I, Nehring RB, Sorensen JB (2007) Differential abilities of SNAP-25 homologs to support neuronal function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:9380-9391.
- Dhar M, Wayman GA, Zhu M, Lambert TJ, Davare MA, Appleyard SM (2014) Leptin-induced spine formation requires TrpC channels and the CaM kinase cascade in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34:10022-10033.

Literatur

- Dhara M, Mantero Martinez M, Makke M, Schwarz Y, Mohrmann R, Bruns D (2020) Synergistic actions of v-SNARE transmembrane domains and membrane-curvature modifying lipids in neurotransmitter release. *eLife* 9.
- Dhara M, Yarzagaray A, Makke M, Schindeldecker B, Schwarz Y, Shaaban A, Sharma S, Bockmann RA, Lindau M, Mohrmann R, Bruns D (2016) v-SNARE transmembrane domains function as catalysts for vesicle fusion. *eLife* 5.
- Dhara M, Yarzagaray A, Schwarz Y, Dutta S, Grabner C, Moghadam PK, Bost A, Schirra C, Rettig J, Reim K, Brose N, Mohrmann R, Bruns D (2014) Complexin synchronizes primed vesicle exocytosis and regulates fusion pore dynamics. *The Journal of cell biology* 204:1123-1140.
- Dimke H, Hoenderop JG, Bindels RJ (2011) Molecular basis of epithelial Ca²⁺ and Mg²⁺ transport: insights from the TRP channel family. *The Journal of physiology* 589:1535-1542.
- Edelmann L, Hanson PI, Chapman ER, Jahn R (1995) Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *The EMBO journal* 14:224-231.
- Elferink LA, Trimble WS, Scheller RH (1989) Two vesicle-associated membrane protein genes are differentially expressed in the rat central nervous system. *The Journal of biological chemistry* 264:11061-11064.
- Faber ES, Sedlak P, Vidovic M, Sah P (2006) Synaptic activation of transient receptor potential channels by metabotropic glutamate receptors in the lateral amygdala. *Neuroscience* 137:781-794.
- Fang Q, Lindau M (2014) How could SNARE proteins open a fusion pore? *Physiology* 29:278-285.
- Fasshauer D, Otto H, Eliason WK, Jahn R, Brunger AT (1997) Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation. *The Journal of biological chemistry* 272:28036-28041.
- Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT, Jahn R (1998) Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:15781-15786.
- Fdez E, Martinez-Salvador M, Beard M, Woodman P, Hilfiker S (2010) Transmembrane-domain determinants for SNARE-mediated membrane fusion. *Journal of cell science* 123:2473-2480.
- Fernandez I, Arac D, Ubach J, Gerber SH, Shin O, Gao Y, Anderson RG, Sudhof TC, Rizo J (2001) Three-dimensional structure of the synaptotagmin 1 C2B-domain: synaptotagmin 1 as a phospholipid binding machine. *Neuron* 32:1057-1069.
- Fowler MA, Sidiropoulou K, Ozkan ED, Phillips CW, Cooper DC (2007) Corticolimbic expression of TRPC4 and TRPC5 channels in the rodent brain. *PLoS one* 2:e573.
- Freichel M, Vennekens R, Olausson J, Hoffmann M, Muller C, Stolz S, Scheunemann J, Weissgerber P, Flockerzi V (2004) Functional role of TRPC proteins in vivo: lessons from TRPC-deficient mouse models. *Biochemical and biophysical research communications* 322:1352-1358.
- Freichel M, Vennekens R, Olausson J, Stolz S, Philipp SE, Weissgerber P, Flockerzi V (2005) Functional role of TRPC proteins in native systems: implications from knockout and knock-down studies. *The Journal of physiology* 567:59-66.
- Gamlin CR, Yu WQ, Wong ROL, Hoon M (2018) Assembly and maintenance of GABAergic and Glycinergic circuits in the mammalian nervous system. *Neural development* 13:12.
- Graf ER, Valakh V, Wright CM, Wu C, Liu Z, Zhang YQ, DiAntonio A (2012) RIM promotes calcium channel accumulation at active zones of the *Drosophila* neuromuscular junction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:16586-16596.
- Greka A, Navarro B, Oancea E, Duggan A, Clapham DE (2003) TRPC5 is a regulator of hippocampal neurite length and growth cone morphology. *Nature neuroscience* 6:837-845.
- Gross SA, Guzman GA, Wissenbach U, Philipp SE, Zhu MX, Bruns D, Cavalie A (2009) TRPC5 is a Ca²⁺-activated channel functionally coupled to Ca²⁺-selective ion channels. *The Journal of biological chemistry* 284:34423-34432.
- Gundelfinger ED, Reissner C, Garner CC (2015) Role of Bassoon and Piccolo in Assembly and Molecular Organization of the Active Zone. *Frontiers in synaptic neuroscience* 7:19.

Literatur

- Guzman RE, Schwarz YN, Rettig J, Bruns D (2010) SNARE force synchronizes synaptic vesicle fusion and controls the kinetics of quantal synaptic transmission. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:10272-10281.
- Hagler DJ, Jr., Goda Y (2001) Properties of synchronous and asynchronous release during pulse train depression in cultured hippocampal neurons. *Journal of neurophysiology* 85:2324-2334.
- Hansen KB, Yi F, Perszyk RE, Furukawa H, Wollmuth LP, Gibb AJ, Traynelis SF (2018) Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *The Journal of general physiology* 150:1081-1105.
- Hanson PI, Roth R, Morisaki H, Jahn R, Heuser JE (1997) Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell* 90:523-535.
- Hardie RC, Minke B (1992) The *trp* gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 8:643-651.
- Hartmann J, Dragicevic E, Adelsberger H, Henning HA, Sumser M, Abramowitz J, Blum R, Dietrich A, Freichel M, Flockerzi V, Birnbaumer L, Konnerth A (2008) TRPC3 channels are required for synaptic transmission and motor coordination. *Neuron* 59:392-398.
- Heiser JH, Schuwald AM, Sillani G, Ye L, Muller WE, Leuner K (2013) TRPC6 channel-mediated neurite outgrowth in PC12 cells and hippocampal neurons involves activation of RAS/MEK/ERK, PI3K, and CAMKIV signaling. *Journal of neurochemistry* 127:303-313.
- Heo DK, Chung WY, Park HW, Yuan JP, Lee MG, Kim JY (2012) Opposite regulatory effects of TRPC1 and TRPC5 on neurite outgrowth in PC12 cells. *Cellular signalling* 24:899-906.
- Herculano-Houzel S (2009) The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Frontiers in human neuroscience* 3:31.
- Hoenderop JG, Bindels RJ (2008) Calcitropic and magnesiotropic TRP channels. *Physiology* 23:32-40.
- Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T (2002) Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:7461-7466.
- Huang J, Du W, Yao H, Wang Y (2011) TRPC Channels in Neuronal Survival. In: TRP Channels (Zhu, M. X., ed) Boca Raton (FL).
- Hyman SE (2005) Neurotransmitters. *Current biology : CB* 15:R154-158.
- Imig C, Min SW, Krinner S, Arancillo M, Rosenmund C, Sudhof TC, Rhee J, Brose N, Cooper BH (2014) The morphological and molecular nature of synaptic vesicle priming at presynaptic active zones. *Neuron* 84:416-431.
- Jahn R, Lang T, Sudhof TC (2003) Membrane fusion. *Cell* 112:519-533.
- Jahn R, Scheller RH (2006) SNAREs--engines for membrane fusion. *Nature reviews Molecular cell biology* 7:631-643.
- Jakel S, Dimou L (2017) Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Frontiers in cellular neuroscience* 11:24.
- Jalini S, Ye H, Tonkikh AA, Charlton MP, Carlen PL (2016) Raised Intracellular Calcium Contributes to Ischemia-Induced Depression of Evoked Synaptic Transmission. *PloS one* 11:e0148110.
- Kaesler PS, Regehr WG (2014) Molecular mechanisms for synchronous, asynchronous, and spontaneous neurotransmitter release. *Annual review of physiology* 76:333-363.
- Katz B (1996) Neural transmitter release: from quantal secretion to exocytosis and beyond. The Fenn Lecture. *Journal of neurocytology* 25:677-686.
- Kawano H, Katsurabayashi S, Kakazu Y, Yamashita Y, Kubo N, Kubo M, Okuda H, Takasaki K, Kubota K, Mishima K, Fujiwara M, Harata NC, Iwasaki K (2012) Long-term culture of astrocytes attenuates the readily releasable pool of synaptic vesicles. *PloS one* 7:e48034.
- Kerstein PC, Jacques-Fricke BT, Rengifo J, Mogen BJ, Williams JC, Gottlieb PA, Sachs F, Gomez TM (2013) Mechanosensitive TRPC1 channels promote calpain proteolysis of talin to regulate spinal axon outgrowth. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:273-285.

Literatur

- Kesavan J, Borisovska M, Bruns D (2007) v-SNARE actions during Ca²⁺-triggered exocytosis. *Cell* 131:351-363.
- Kim SJ, Kim YS, Yuan JP, Petralia RS, Worley PF, Linden DJ (2003) Activation of the TRPC1 cation channel by metabotropic glutamate receptor mGluR1. *Nature* 426:285-291.
- Koles L, Kato E, Hanuska A, Zadori ZS, Al-Khrasani M, Zelles T, Rubini P, Illes P (2016) Modulation of excitatory neurotransmission by neuronal/glia signalling molecules: interplay between purinergic and glutamatergic systems. *Purinergic signalling* 12:1-24.
- Krzewski K, Gil-Krzewska A, Watts J, Stern JN, Strominger JL (2011) VAMP4- and VAMP7-expressing vesicles are both required for cytotoxic granule exocytosis in NK cells. *European journal of immunology* 41:3323-3329.
- Kumar S, Chakraborty S, Barbosa C, Brustovetsky T, Brustovetsky N, Obukhov AG (2012) Mechanisms controlling neurite outgrowth in a pheochromocytoma cell line: the role of TRPC channels. *Journal of cellular physiology* 227:1408-1419.
- Kweon DH, Kim CS, Shin YK (2003a) Insertion of the membrane-proximal region of the neuronal SNARE coiled coil into the membrane. *The Journal of biological chemistry* 278:12367-12373.
- Kweon DH, Kim CS, Shin YK (2003b) Regulation of neuronal SNARE assembly by the membrane. *Nature structural biology* 10:440-447.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lai Y, Diao J, Cipriano DJ, Zhang Y, Pfuetzner RA, Padolina MS, Brunger AT (2014) Complexin inhibits spontaneous release and synchronizes Ca²⁺-triggered synaptic vesicle fusion by distinct mechanisms. *eLife* 3:e03756.
- Langosch D, Crane JM, Brosig B, Hellwig A, Tamm LK, Reed J (2001) Peptide mimics of SNARE transmembrane segments drive membrane fusion depending on their conformational plasticity. *Journal of molecular biology* 311:709-721.
- Lau A, Tymianski M (2010) Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 460:525-542.
- Lee AC, Wong RK, Chuang SC, Shin HS, Bianchi R (2002) Role of synaptic metabotropic glutamate receptors in epileptiform discharges in hippocampal slices. *Journal of neurophysiology* 88:1625-1633.
- Lessmann V, Heumann R (1998) Modulation of unitary glutamatergic synapses by neurotrophin-4/5 or brain-derived neurotrophic factor in hippocampal microcultures: presynaptic enhancement depends on pre-established paired-pulse facilitation. *Neuroscience* 86:399-413.
- Liman ER, Corey DP, Dulac C (1999) TRP2: a candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:5791-5796.
- Liman ER, Innan H (2003) Relaxed selective pressure on an essential component of pheromone transduction in primate evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:3328-3332.
- Lin RC, Scheller RH (2000) Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annual review of cell and developmental biology* 16:19-49.
- Lippert U, Ferrari DM, Jahn R (2007) Endobrevin/VAMP8 mediates exocytotic release of hexosaminidase from rat basophilic leukaemia cells. *FEBS letters* 581:3479-3484.
- Lisman J, Schulman H, Cline H (2002) The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nature reviews Neuroscience* 3:175-190.
- Lisman JE, Raghavachari S, Tsien RW (2007) The sequence of events that underlie quantal transmission at central glutamatergic synapses. *Nature reviews Neuroscience* 8:597-609.
- Liu H, Chapman ER, Dean C (2013) "Self" versus "non-self" connectivity dictates properties of synaptic transmission and plasticity. *PloS one* 8:e62414.
- Liu KS, Siebert M, Mertel S, Knoche E, Wegener S, Wichmann C, Matkovic T, Muhammad K, Depner H, Mettke C, Buckers J, Hell SW, Muller M, Davis GW, Schmitz D, Sigrist SJ (2011a) RIM-binding

Literatur

- protein, a central part of the active zone, is essential for neurotransmitter release. *Science* 334:1565-1569.
- Liu Y, Sugiura Y, Lin W (2011b) The role of synaptobrevin1/VAMP1 in Ca²⁺-triggered neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction. *The Journal of physiology* 589:1603-1618.
- Lomeli H, Mosbacher J, Melcher T, Hoyer T, Geiger JR, Kuner T, Monyer H, Higuchi M, Bach A, Seeburg PH (1994) Control of kinetic properties of AMPA receptor channels by nuclear RNA editing. *Science* 266:1709-1713.
- Lucas P, Ukhanov K, Leinders-Zufall T, Zufall F (2003) A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction. *Neuron* 40:551-561.
- Luscher C, Malenka RC (2012) NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4.
- MacGillavry HD, Song Y, Raghavachari S, Blanpied TA (2013) Nanoscale scaffolding domains within the postsynaptic density concentrate synaptic AMPA receptors. *Neuron* 78:615-622.
- Malenka RC, Bear MF (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44:5-21.
- Malenka RC, Nicoll RA (1999) Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* 285:1870-1874.
- Marban E, Yamagishi T, Tomaselli GF (1998) Structure and function of voltage-gated sodium channels. *The Journal of physiology* 508 (Pt 3):647-657.
- Matti U, Pattu V, Halimani M, Schirra C, Krause E, Liu Y, Weins L, Chang HF, Guzman R, Olausson J, Freichel M, Schmitz F, Pasche M, Becherer U, Bruns D, Rettig J (2013) Synaptobrevin2 is the v-SNARE required for cytotoxic T-lymphocyte lytic granule fusion. *Nature communications* 4:1439.
- Maximov A, Tang J, Yang X, Pang ZP, Sudhof TC (2009) Complexin controls the force transfer from SNARE complexes to membranes in fusion. *Science* 323:516-521.
- Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB (1984) Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309:261-263.
- McMahon HT, Missler M, Li C, Sudhof TC (1995) Complexins: cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function. *Cell* 83:111-119.
- McMahon HT, Ushkaryov YA, Edelmann L, Link E, Binz T, Niemann H, Jahn R, Sudhof TC (1993) Cellubrevin is a ubiquitous tetanus-toxin substrate homologous to a putative synaptic vesicle fusion protein. *Nature* 364:346-349.
- McNew JA, Weber T, Parlati F, Johnston RJ, Melia TJ, Sollner TH, Rothman JE (2000) Close is not enough: SNARE-dependent membrane fusion requires an active mechanism that transduces force to membrane anchors. *The Journal of cell biology* 150:105-117.
- Meyer D, Bonhoeffer T, Scheuss V (2014) Balance and stability of synaptic structures during synaptic plasticity. *Neuron* 82:430-443.
- Minke B (2010) The history of the *Drosophila* TRP channel: the birth of a new channel superfamily. *Journal of neurogenetics* 24:216-233.
- Mohrmann R, de Wit H, Verhage M, Neher E, Sorensen JB (2010) Fast vesicle fusion in living cells requires at least three SNARE complexes. *Science* 330:502-505.
- Mohrmann R, Dhara M, Bruns D (2015) Complexins: small but capable. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72:4221-4235.
- Montell C, Rubin GM (1989) Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2:1313-1323.
- Morris RG (1989) Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 9:3040-3057.
- Moulder KL, Mennerick S (2005) Reluctant vesicles contribute to the total readily releasable pool in glutamatergic hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:3842-3850.

Literatur

- Nakamura Y, Reva M, DiGregorio DA (2018) Variations in Ca²⁺ Influx Can Alter Chelator-Based Estimates of Ca²⁺ Channel-Synaptic Vesicle Coupling Distance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 38:3971-3987.
- Neher E, Sakmann B (1976) Noise analysis of drug induced voltage clamp currents in denervated frog muscle fibres. *The Journal of physiology* 258:705-729.
- Neumann S, Langosch D (2011) Conserved conformational dynamics of membrane fusion protein transmembrane domains and flanking regions indicated by sequence statistics. *Proteins* 79:2418-2427.
- Nicoletti F, Bockaert J, Collingridge GL, Conn PJ, Ferraguti F, Schoepp DD, Wroblewski JT, Pin JP (2011) Metabotropic glutamate receptors: from the workbench to the bedside. *Neuropharmacology* 60:1017-1041.
- Nilius B, Voets T (2005) TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 451:1-10.
- Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307:462-465.
- Otsu Y, Shahrezaei V, Li B, Raymond LA, Delaney KR, Murphy TH (2004) Competition between phasic and asynchronous release for recovered synaptic vesicles at developing hippocampal autaptic synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:420-433.
- Otto H, Hanson PI, Jahn R (1997) Assembly and disassembly of a ternary complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP-25 in the membrane of synaptic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:6197-6201.
- Patterson SL, Abel T, Deuel TA, Martin KC, Rose JC, Kandel ER (1996) Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron* 16:1137-1145.
- Peters JH, McDougall SJ, Fawley JA, Smith SM, Andresen MC (2010) Primary afferent activation of thermosensitive TRPV1 triggers asynchronous glutamate release at central neurons. *Neuron* 65:657-669.
- Petzoldt AG, Sigrist SJ (2014) Synaptogenesis. *Current biology : CB* 24:R1076-1080.
- Phelan KD, Shwe UT, Abramowitz J, Wu H, Rhee SW, Howell MD, Gottschall PE, Freichel M, Flockerzi V, Birnbaumer L, Zheng F (2013) Canonical transient receptor channel 5 (TRPC5) and TRPC1/4 contribute to seizure and excitotoxicity by distinct cellular mechanisms. *Molecular pharmacology* 83:429-438.
- Philipp S, Hambrecht J, Braslavski L, Schroth G, Freichel M, Murakami M, Cavalie A, Flockerzi V (1998) A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells. *The EMBO journal* 17:4274-4282.
- Pinheiro PS, Houy S, Sorensen JB (2016) C2-domain containing calcium sensors in neuroendocrine secretion. *Journal of neurochemistry* 139:943-958.
- Quint S, Widmaier S, Minde D, Hornburg D, Langosch D, Scharnagl C (2010) Residue-specific side-chain packing determines the backbone dynamics of transmembrane model helices. *Biophysical journal* 99:2541-2549.
- Raingo J, Khvotchev M, Liu P, Darios F, Li YC, Ramirez DM, Adachi M, Lemieux P, Toth K, Davletov B, Kavalali ET (2012) VAMP4 directs synaptic vesicles to a pool that selectively maintains asynchronous neurotransmission. *Nature neuroscience* 15:738-745.
- Ramirez DM, Kavalali ET (2012) The role of non-canonical SNAREs in synaptic vesicle recycling. *Cellular logistics* 2:20-27.
- Ratnayake R, Covell D, Ransom TT, Gustafson KR, Beutler JA (2009) Englerin A, a selective inhibitor of renal cancer cell growth, from *Phyllanthus engleri*. *Organic letters* 11:57-60.
- Reim K, Wegmeyer H, Brandstatter JH, Xue M, Rosenmund C, Dresbach T, Hofmann K, Brose N (2005) Structurally and functionally unique complexins at retinal ribbon synapses. *The Journal of cell biology* 169:669-680.

Literatur

- Revel JP, Karnovsky MJ (1967) Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *The Journal of cell biology* 33:C7-C12.
- Riccio A, Li Y, Moon J, Kim KS, Smith KS, Rudolph U, Gapon S, Yao GL, Tsvetkov E, Rodig SJ, Van't Veer A, Meloni EG, Carlezon WA, Jr., Bolshakov VY, Clapham DE (2009) Essential role for TRPC5 in amygdala function and fear-related behavior. *Cell* 137:761-772.
- Riccio A, Li Y, Tsvetkov E, Gapon S, Yao GL, Smith KS, Engin E, Rudolph U, Bolshakov VY, Clapham DE (2014) Decreased anxiety-like behavior and Galphaq/11-dependent responses in the amygdala of mice lacking TRPC4 channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34:3653-3667.
- Richter JM, Schaefer M, Hill K (2014a) Clemizole hydrochloride is a novel and potent inhibitor of transient receptor potential channel TRPC5. *Molecular pharmacology* 86:514-521.
- Richter JM, Schaefer M, Hill K (2014b) Riluzole activates TRPC5 channels independently of PLC activity. *British journal of pharmacology* 171:158-170.
- Rizo J, Rosenmund C (2008) Synaptic vesicle fusion. *Nature structural & molecular biology* 15:665-674.
- Rizo J, Xu J (2015) The Synaptic Vesicle Release Machinery. *Annual review of biophysics* 44:339-367.
- Rosenmund C, Sigler A, Augustin I, Reim K, Brose N, Rhee JS (2002) Differential control of vesicle priming and short-term plasticity by Munc13 isoforms. *Neuron* 33:411-424.
- Rosenmund C, Stevens CF (1996) Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron* 16:1197-1207.
- Ruiz-Montasell B, Aguado F, Majo G, Chapman ER, Canals JM, Marsal J, Blasi J (1996) Differential distribution of syntaxin isoforms 1A and 1B in the rat central nervous system. *The European journal of neuroscience* 8:2544-2552.
- Saez JC, Contreras JE, Bukauskas FF, Retamal MA, Bennett MV (2003) Gap junction hemichannels in astrocytes of the CNS. *Acta physiologica Scandinavica* 179:9-22.
- Salido GM, Sage SO, Rosado JA (2009) TRPC channels and store-operated Ca²⁺ entry. *Biochimica et biophysica acta* 1793:223-230.
- Satake S, Inoue T, Imoto K (2012) Paired-pulse facilitation of multivesicular release and intersynaptic spillover of glutamate at rat cerebellar granule cell-interneurone synapses. *The Journal of physiology* 590:5653-5675.
- Scheefhals N, MacGillavry HD (2018) Functional organization of postsynaptic glutamate receptors. *Molecular and cellular neurosciences* 91:82-94.
- Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, Rossetto O, Polverino de Laureto P, DasGupta BR, Montecucco C (1992) Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 359:832-835.
- Schneggenburger R, Neher E (2000) Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse. *Nature* 406:889-893.
- Schoch S, Deak F, Konigstorfer A, Mozhayeva M, Sara Y, Sudhof TC, Kavalali ET (2001) SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice. *Science* 294:1117-1122.
- Schwarz Y, Oleinikov K, Schindeldecker B, Wyatt A, Weissgerber P, Flockerzi V, Boehm U, Freichel M, Bruns D (2019) TRPC channels regulate Ca²⁺-signaling and short-term plasticity of fast glutamatergic synapses. *PLoS biology* 17:e3000445.
- Seeburg PH, Burnashev N, Kohr G, Kuner T, Sprengel R, Monyer H (1995) The NMDA receptor channel: molecular design of a coincidence detector. *Recent progress in hormone research* 50:19-34.
- Shaaban A, Dhara M, Frisch W, Harb A, Shaib AH, Becherer U, Bruns D, Mohrmann R (2019) The SNAP-25 linker supports fusion intermediates by local lipid interactions. *eLife* 8.
- Shao X, Fernandez I, Sudhof TC, Rizo J (1998) Solution structures of the Ca²⁺-free and Ca²⁺-bound C2A domain of synaptotagmin I: does Ca²⁺ induce a conformational change? *Biochemistry* 37:16106-16115.
- Siddiqui TJ, Vites O, Stein A, Heintzmann R, Jahn R, Fasshauer D (2007) Determinants of synaptobrevin regulation in membranes. *Molecular biology of the cell* 18:2037-2046.

Literatur

- Siksou L, Varoquaux F, Pascual O, Triller A, Brose N, Marty S (2009) A common molecular basis for membrane docking and functional priming of synaptic vesicles. *The European journal of neuroscience* 30:49-56.
- Sinha R, Ahmed S, Jahn R, Klingauf J (2011) Two synaptobrevin molecules are sufficient for vesicle fusion in central nervous system synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:14318-14323.
- Stein A, Weber G, Wahl MC, Jahn R (2009) Helical extension of the neuronal SNARE complex into the membrane. *Nature* 460:525-528.
- Stelzer W, Poschner BC, Stalz H, Heck AJ, Langosch D (2008) Sequence-specific conformational flexibility of SNARE transmembrane helices probed by hydrogen/deuterium exchange. *Biophysical journal* 95:1326-1335.
- Stephenson FA, Cousins SL, Kenny AV (2008) Assembly and forward trafficking of NMDA receptors (Review). *Molecular membrane biology* 25:311-320.
- Stevens CF, Tsujimoto T (1995) Estimates for the pool size of releasable quanta at a single central synapse and for the time required to refill the pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:846-849.
- Stevens CF, Wesseling JF (1998) Activity-dependent modulation of the rate at which synaptic vesicles become available to undergo exocytosis. *Neuron* 21:415-424.
- Stevens CF, Williams JH (2007) Discharge of the readily releasable pool with action potentials at hippocampal synapses. *Journal of neurophysiology* 98:3221-3229.
- Strubing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE (2001) TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* 29:645-655.
- Sudhof TC (2012) The presynaptic active zone. *Neuron* 75:11-25.
- Sudhof TC, Rizo J (2011) Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3.
- Sudhof TC, Rothman JE (2009) Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* 323:474-477.
- Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395:347-353.
- Szule JA, Harlow ML, Jung JH, De-Miguel FF, Marshall RM, McMahan UJ (2012) Regulation of synaptic vesicle docking by different classes of macromolecules in active zone material. *PLoS one* 7:e33333.
- Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Brügger B, Ringler P, Müller SA, Rammner B, Gräter F, Hub JS, De Groot BL, Mieskes G, Moriyama Y, Klingauf J, Grubmüller H, Heuser J, Wieland F, Jahn R (2006) Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127:831-846.
- Takao-Rikitsu E, Mochida S, Inoue E, Deguchi-Tawarada M, Inoue M, Ohtsuka T, Takai Y (2004) Physical and functional interaction of the active zone proteins, CAST, RIM1, and Bassoon, in neurotransmitter release. *The Journal of cell biology* 164:301-311.
- Tempia F, Alojado ME, Strata P, Knöpfel T (2001) Characterization of the mGluR(1)-mediated electrical and calcium signaling in Purkinje cells of mouse cerebellar slices. *Journal of neurophysiology* 86:1389-1397.
- Tempia F, Miniaci MC, Anchisi D, Strata P (1998) Postsynaptic current mediated by metabotropic glutamate receptors in cerebellar Purkinje cells. *Journal of neurophysiology* 80:520-528.
- Thanawala MS, Regehr WG (2013) Presynaptic calcium influx controls neurotransmitter release in part by regulating the effective size of the readily releasable pool. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:4625-4633.
- Thanawala MS, Regehr WG (2016) Determining synaptic parameters using high-frequency activation. *Journal of neuroscience methods* 264:136-152.
- Thiel G (1993) Synapsin I, synapsin II, and synaptophysin: marker proteins of synaptic vesicles. *Brain pathology* 3:87-95.

Literatur

- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:4350-4354.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews* 62:405-496.
- Valente P, Casagrande S, Nieuws T, Verstegen AM, Valtorta F, Benfenati F, Baldelli P (2012) Site-specific synapsin I phosphorylation participates in the expression of post-tetanic potentiation and its enhancement by BDNF. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:5868-5879.
- van den Bogaart G, Holt MG, Bunt G, Riedel D, Wouters FS, Jahn R (2010) One SNARE complex is sufficient for membrane fusion. *Nature structural & molecular biology* 17:358-364.
- Vargas-Caballero M, Robinson HP (2004) Fast and slow voltage-dependent dynamics of magnesium block in the NMDA receptor: the asymmetric trapping block model. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:6171-6180.
- Venkatachalam K, Montell C (2007) TRP channels. *Annual review of biochemistry* 76:387-417.
- Wang CC, Ng CP, Lu L, Atlashkin V, Zhang W, Seet LF, Hong W (2004) A role of VAMP8/endobrevin in regulated exocytosis of pancreatic acinar cells. *Developmental cell* 7:359-371.
- Wang H, Siemens J (2015) TRP ion channels in thermosensation, thermoregulation and metabolism. *Temperature* 2:178-187.
- Wang LY, Kaczmarek LK (1998) High-frequency firing helps replenish the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Nature* 394:384-388.
- Weber T, Zemelman BV, McNew JA, Westermann B, Gmachl M, Parlati F, Sollner TH, Rothman JE (1998) SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92:759-772.
- Wentholt RJ, Petralia RS, Blahos J, II, Niedzielski AS (1996) Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:1982-1989.
- Whiteheart SW, Rossmagel K, Buhrow SA, Brunner M, Jaenicke R, Rothman JE (1994) N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein: a trimeric ATPase whose hydrolysis of ATP is required for membrane fusion. *The Journal of cell biology* 126:945-954.
- Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawkins AF, Daskalakis N, Kwan SY, Ebersviller S, Burchette JL, Pericak-Vance MA, Howell DN, Vance JM, Rosenberg PB (2005) A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 308:1801-1804.
- Wu LJ, Sweet TB, Clapham DE (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacological reviews* 62:381-404.
- Zhai RG, Bellen HJ (2004) The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal. *Physiology* 19:262-270.
- Zhang P, Lisman JE (2012) Activity-dependent regulation of synaptic strength by PSD-95 in CA1 neurons. *Journal of neurophysiology* 107:1058-1066.
- Zhang Z, Jackson MB (2010) Membrane bending energy and fusion pore kinetics in Ca²⁺-triggered exocytosis. *Biophysical journal* 98:2524-2534.
- Zhou P, Bacaj T, Yang X, Pang ZP, Sudhof TC (2013) Lipid-anchored SNAREs lacking transmembrane regions fully support membrane fusion during neurotransmitter release. *Neuron* 80:470-483.
- Zimmermann J, Trimbuch T, Rosenmund C (2014) Synaptobrevin 1 mediates vesicle priming and evoked release in a subpopulation of hippocampal neurons. *Journal of neurophysiology* 112:1559-1565.
- Zitt C, Zobel A, Obukhov AG, Harteneck C, Kalkbrenner F, Luckhoff A, Schultz G (1996) Cloning and functional expression of a human Ca²⁺-permeable cation channel activated by calcium store depletion. *Neuron* 16:1189-1196.
- Zucker RS (1989) Short-term synaptic plasticity. *Annual review of neuroscience* 12:13-31.

Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. Annual review of physiology 64:355-405.

8. PUBLIKATIONEN/DANK

8.1. Publikationen

Zhang, Q., Schulenburg, T., Tan, T., Lang, B., Friauf, E., and Fecher-Trost, C. (2010). Proteome analysis of a plasma membrane-enriched fraction at the placental feto-maternal barrier. *Proteomics Clinical applications* 4, 538-549.

Dhara, M., Yarzagaray, A., Makke, M., Schindeldecker, B., Schwarz, Y., Shaaban, A., Sharma, S., Bockmann, R.A., Lindau, M., Mohrmann, R., *et al.* (2016). v-SNARE transmembrane domains function as catalysts for vesicle fusion. *eLife* 5.

Broker-Lai, J., Kollwe, A., Schindeldecker, B., Pohle, J., Nguyen Chi, V., Mathar, I., Guzman, R., Schwarz, Y., Lai, A., Weissgerber, P., *et al.* (2017). Heteromeric channels formed by TRPC1, TRPC4 and TRPC5 define hippocampal synaptic transmission and working memory. *The EMBO journal* 36, 2770-2789.

Schwarz, Y., Oleinikov, K., Schindeldecker, B., Wyatt, A., Weißgerber, P., Flockerzi, V., Boehm, U., Freichel, M. and Bruns, D. (2019). TRPC channels regulate Ca²⁺-signaling and short-term plasticity of fast glutamatergic synapses. *Plos Biology*

8.2. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dieter Bruns, für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie aller Materialien und die hervorragende Betreuung während der gesamten Arbeit bedanken. Darüber hinaus danke ich ihm für seine stetige Diskussionsbereitschaft und die hilfreichen Ratschläge, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Herrn Prof. Dr. Frank Schmitz möchte ich mich ganz herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Yvonne Schwarz, die mich während meiner gesamten Doktorandenzeit unterstützt hat. Von ihr habe ich vor allem die verschiedenen Zellkulturtechniken erlernt, sie hat mir aber auch bei anderen experimentellen Techniken, wie

Publikationen/Dank

zum Beispiel der Aufnahme und Analyse von Imaging-Daten mit wertvollen Ratschlägen beiseite gestanden und hat meine Arbeit korrekturgelesen, wofür ich ihr sehr dankbar bin.

Bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich ganz herzlich für die freundliche Aufnahme in die Gruppe und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Insbesondere Herrn Prof. Ralf Mohrmann danke ich für seine Diskussionsbereitschaft und Anregungen, die mir bei der praktischen Arbeit geholfen haben.

Den technischen Assistenten Vanessa Schmitt, Patrick Schmitt und Walentina Frisch danke ich für ihre großartige Unterstützung und Hilfe im Laboralltag.

Ein weiterer Dank geht an Marina Wirth, die mir während der Zeit meiner Doktorarbeit auf vielfältige Art und Weise, insbesondere in organisatorischen Dingen das Leben erleichtert hat.

Den Mitarbeitern im Tierstall, insbesondere Martina Didion und Birgit Bimperling danke ich für die Versorgung und Bereitstellung der Versuchstiere.

Frau Dr. Petra Weissgerber danke ich für die Bereitstellung der TRPC1/C4/C5-*tko*-Mauslinie und Tom Janke für die Genotypisierung eines Teils der verwendeten Tiere dieser Mauslinie.

Ebenso danke ich meinen Eltern, die mich bei der Erreichung meiner Ziele immer unterstützt haben.

Zum Schluss danke ich meinem Mann Michael, der mich während meiner Doktorandenzeit unterstützt hat und immer viel Verständnis dafür gezeigt hat, wenn die Arbeit mal wieder Vorrang hatte.

9. LEBENSLAUF

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Tag der Promotion: 15. Dezember 2021

Dekan: Univ. -Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Dieter Bruns

Prof. Dr. Frank Schmitz