

# **Regulation der Kalzium-abhängigen Ausschüttung von BDNF aus hippokampalen Neuronen durch CAPS1**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalum  
(Dr. rer. nat)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften  
der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

von **Dipl.-Biochem. Robert Eckenstaler**

geb. am **04.06.1983** in **Saalfeld (Saale)**

Gutachter: **Prof. Dr. Volkmar Leßmann**

**Prof. Dr. Reihnhard Jahn**

eingereicht am: 27.10.2015

verteidigt am: 06.06.2016



# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Der neurotrophe Faktor BDNF	1
1.2	Bildung und Reifung des Neurotrophins BDNF	2
1.2.1	Transkription und Translation von BDNF	2
1.2.2	Expression von BDNF	4
1.2.3	Sortierung von BDNF in den sekretorischen Pfad der Zelle	5
1.2.4	Azidifizierung sekretorischer Granula und proteolytische Spaltung von BDNF	5
1.2.5	Aktivitätsabhängige Ausschüttung von BDNF	6
1.3	Exozytoseprozesse in Neuronen	7
1.3.1	Exozytose von Vesikeln	7
1.3.2	<i>Priming</i> von Vesikeln für die Exozytose	9
1.4	Der <i>Priming</i> -Faktor CAPS1	12
1.4.1	Entdeckung von CAPS1	12
1.4.2	Transkription und Translation von CAPS1	12
1.4.3	Expression von CAPS1	14
1.4.4	Funktionsvielfalt von CAPS1	15
1.5	Fragestellung	16
<b>2</b>	<b>Materialien</b>	<b>18</b>
2.1	Chemikalien	18
2.2	Verbrauchsmaterialien	19
2.3	Geräte	20
2.4	Kits und Enzym- und Reaktionsmixe	21
2.5	Oligonukleotide	22
2.6	Plasmidvektoren	22
2.7	Bakterienstämme / Versuchstiere / Zelllinien	22
2.8	Antikörper	23
2.9	Software	23
2.10	Puffer, Medien und Lösungen	23

<b>3 Methoden</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1 Molekularbiologie</b> .....	<b>26</b>
3.1.1 Design der siRNA-Sequenzen.....	26
3.1.2 Klonierung der siRNA-Sequenzen in den shRNA-Zielvektor .....	26
3.1.3 Herstellen kompetenter <i>E.Coli</i> Bakterien.....	29
3.1.4 Restriktionsreaktionen .....	29
3.1.5 Agarosegelelektrophorese und Geextraktion .....	30
3.1.6 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	30
3.1.7 Anlagerung und Phosphorylierung der Oligonukleotide.....	30
3.1.8 Ligation und Transformation.....	31
3.1.9 Minipräparation der Plasmid-DNA (Vorkultur).....	32
3.1.10 Maxipräparation der Plasmid-DNA (Hauptkultur) .....	32
3.1.11 Anlegen von Glycerin-Dauerkulturen.....	33
<b>3.2 Primäre Zellkultur</b> .....	<b>33</b>
3.2.1 Präparation kortikaler Astrozyten.....	33
3.2.2 Passagieren kortikaler Astrozyten.....	34
3.2.3 Präparation primärer hippokampaler Neurone.....	34
3.2.4 Transfektion mittels Kalziumphosphat-Präzipitation.....	35
<b>3.3 Immunozytochemie</b> .....	<b>36</b>
<b>3.4 Fluoreszenzmikroskopie</b> .....	<b>36</b>
3.4.1 Epifluoreszenz Mikroskopie .....	36
3.4.2 Bildakquise und Bilddatenauswertung.....	37
3.4.3 Videomikroskopische Untersuchungen.....	38
3.4.4 Konfokale Mikroskopie.....	41
3.4.5 FRET-Experimente .....	42
<b>3.5 Neuronale Differenzierung embryonaler Stammzellen</b> .....	<b>43</b>
3.5.1 Herstellen Mitomycin-behandelter Futterzellen .....	43
3.5.2 Einfrieren Mitomycin-behandelter Futterzellen.....	44
3.5.3 Kultivierung der embryonalen Stammzellen auf Futterzellen .....	44
3.5.4 Bildung von Emryoidkörpern .....	44
3.5.5 Neuronale Differenzierung der embryonalen Stammzellen .....	45
3.5.6 Dissoziierung der Embryoidkörper und Kultivierung der neuronal differenzierten Stammzellen.....	45
<b>3.6 Statistik</b> .....	<b>46</b>
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>47</b>
<b>4.1 Quantifizierung des <i>Knock-downs</i> durch CAPS1-shRNA in primären hippokampalen Neuronen</b> .....	<b>47</b>
<b>4.2 Lokalisation von CAPS1 in primären hippokampalen Neuronen</b> .....	<b>49</b>
4.2.1 Das allgemeines Verteilungsmuster von CAPS1.....	49
4.2.2 Die Lokalisation von CAPS1 in synapstischen Strukturen .....	50
4.2.3 Die Lokalisation von CAPS1 in Neuriten.....	52
<b>4.3 Einfluss von CAPS1 auf die Freisetzung von Neurotransmittern</b> .....	<b>55</b>

<b>4.4</b>	<b>Einfluss von CAPS1 auf die Ausschüttung von Neurotrophen</b> .....	<b>58</b>
4.4.1	Basale Eigenschaften BDNF-GFP-beinhaltenender Vesikel.....	58
4.4.2	Fusionsereignisse BDNF-GFP-beinhaltenender Vesikel .....	59
<b>4.4.3</b>	<b>Einfluss synaptischer Aktivität auf Fusionsporenöffnung sekretorischer Granula</b> .....	<b>62</b>
4.4.4	Ausschüttung von BDNF-GFP aus einzelnen Vesikeln .....	63
4.4.5	Einfluss synaptischer Aktivität auf die Ausschüttung von BDNF-GFP .....	68
<b>4.5</b>	<b>Einfluss von CAPS1 auf den vesikulären pH-Wert</b> .....	<b>69</b>
4.5.1	Untersuchung des vesikulären pH-Wertes mit Hilfe von NH <sub>4</sub> Cl.....	69
4.5.2	pH-Titrationsmessungen einzelner BDNF-GFP-beinhaltenender Vesikel .....	73
4.5.3	pH-Titrationsmessungen des Zytosols GFP-transfizierter Neurone .....	75
<b>4.6</b>	<b>Potentielle Interaktion von CAPS1 mit der v-Typ-ATPase</b> .....	<b>77</b>
<b>4.7</b>	<b>Einfluss des durch CAPS1 veränderten pH-Wertes auf die Neurotrophinsekretion</b> .....	<b>80</b>
4.7.1	Einfluss des vesikulären pH-Wertes auf Fusionsporenöffnung.....	80
4.7.2	Einfluss des vesikulären pH-Wertes auf die Ausschüttung von BDNF-GFP .....	83
<b>4.8</b>	<b>Vergleichende Analyse der Ausschüttungsgeschwindigkeit von BDNF-GFP aus sekretorischen Granula</b> .....	<b>84</b>
<b>4.9</b>	<b>Neurotrophinausschüttung aus Zellen transgenen Ursprungs</b> .....	<b>87</b>
4.9.1	Neurotrophinausschüttung aus neuronal differenzierten BDNF-GFP- <i>Knock-in</i> -Stammzellen.....	87
4.9.2	Neurotrophinausschüttung aus hippocampalen Neuronen von BDNF-GFP- <i>Knock-in</i> -Mäusen .....	91
4.9.3	Neurotrophinausschüttung in einem Alzheimer Mausmodell .....	98
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>101</b>
5.1	Lokalisation von CAPS1 und BDNF in primären hippocampalen Neuronen .....	102
5.2	Physiologische Konsequenzen des <i>Knock-downs</i> von CAPS1 .....	104
5.3	Ausschüttung von BDNF aus Zellen transgenen Ursprungs .....	118
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>120</b>
<b>7</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>122</b>
<b>8</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>124</b>

# Abkürzungsverzeichnis

5xFAD	5x <i>Familial Alzheimer's disease</i>
Acc. Nr.	<i>accession number</i>
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
a.u.	<i>arbitrary units</i> , Einheit der absoluten Fluoreszenzintensität
BDNF	<i>Brain derived neurotrophic factor</i>
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAPS1	<i>Calcium-dependent activator protein for secretion</i>
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CMV	Cytomegalievirus
DIV	Tage in Kultur ( <i>days in vitro</i> )
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DsRed	Rot-fluoreszierendes Protein aus <i>Discosoma spec.</i>
eGFP	<i>enhanced</i> (verstärktes) grün-fluoreszierendes Protein
et al.	und andere ( <i>et altera</i> )
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HBS	HEPES-gepufferte Saline
hSyn1	humanes Synapsin 1
Hz	Hertz
IP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphat
kB	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
m	Meter
M	Molar
MAP2	<i>Mikrotubule-associated protein 2</i>
min	Minute
mPBS	Modifiziertes PBS
mRNA	Boten-RNA
n.A.	numerische Apertur
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
P	Postnataler Tag
p75	p75 Neurotrophinrezeptor
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PTF	Tage nach der Transfektion ( <i>post transfection</i> )
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute

s	Sekunde
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
TFB	<i>transformation buffer</i>
Thy1	<i>Thymocyte differentiation antigen 1</i>
TIRF	<i>Total internal reflection fluorescence</i>
U	<i>unit</i>
UV	ultra-violett
V	Volt
VF	Verdünnungsfaktor
YFP	gelb-fluoreszierendes Protein
YPet	<i>YFP for energy transfer</i>
z.B.	zum Beispiel



# 1 Einleitung

## 1.1 Der neurotrophe Faktor BDNF

Der neurotrophe Faktor BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) gehört zur Proteinfamilie der Neurotrophine, die eine Gruppe von strukturell verwandten Wachstumsfaktoren darstellt. Die Gruppe der Neurotrophine wurde aufgrund ihrer Bedeutung für das zentrale Nervensystem entdeckt und umfasst in Säugetieren die weiteren Mitglieder NGF (*nerve growth factor*), NT-3 (*neurotrophin-3*) und NT-4 (*neurotrophin-4*). In Neuronen werden Neurotrophine in sekretorischen Granula (*dense-core vesicle*) dicht verpackt und entlang von Axonen und Dendriten transportiert. Durch Exozytose der sekretorischen Granula können Neurotrophine von somatischen, axonalen oder dendritischen Strukturen entweder konstitutiv oder aktivitätsabhängig ausgeschüttet werden. Um ihre biologische Wirkung zu entfalten, binden die als Homodimere sekretierten Neurotrophine entweder autokrin oder parakrin an Rezeptoren der Trk-Familie (*tropomyosin-related kinase*) (**Ibanez, 1994; Barbacid, 1995; Huang & Reichardt, 2003; Brigadski & Lessmann, 2014**). Diese Rezeptorfamilie besteht aus den Mitgliedern TrkA, TrkB und TrkC, welche selektiv die verschiedenen Neurotrophine binden, wobei der neurotrophe Faktor BDNF den TrkB-Rezeptor aktiviert (**Soppet et al., 1991; Klein et al., 1991**). Die Bindung der Neurotrophine induziert eine Dimerisierung des jeweiligen Trk-Rezeptors, woraufhin die intrinsische Kinaseaktivität des Rezeptors diesen an verschiedenen Tyrosinresten autophosphoryliert. Anschließend kann das Signal auf verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden weitergeleitet werden (**Tao et al., 1998; Lonze et al., 2002; Markus et al., 2002; Minichiello et al., 2002**). Neben den Trk-Rezeptoren können alle Neurotrophine mit geringer Affinität an den p75-Rezeptor binden, einem Rezeptor der Tumornekrosefaktor-Familie (**Bothwell, 1995**).

Durch die Bindung an Trk-Rezeptoren regulieren Neurotrophine wichtige Funktionen, wie die neuronale Differenzierung und das Überleben von Neuronen (**Korsching, 1993; Lewin & Barde, 1996**). Sie sind Schlüsselfaktoren für das Auswachsen des Axons und der Dendriten und beeinflussen die Größe des Somas sowie die Anzahl und die Größe von Synapsen (**Purves et al., 1988; Ruit et al., 1990; Garofalo et al., 1992**). Zusätzlich haben

Neurotrophine Einfluss auf die Stärke einer synaptischen Verbindung, indem sie präsynaptisch die Ausschüttung von Neurotransmittern verstärken und postsynaptisch das Wachstum und die Form von *Spines* beeinflussen (**Lohof et al., 1993; Lessmann, 1998; Kellner et al., 2014**). Über die Bindung an den p75-Rezeptor können jedoch auch apoptotische Signalwege und somit eine gegenteilige Wirkung zum Überleben von Zellen ausgelöst werden (**Teng et al., 2005**).

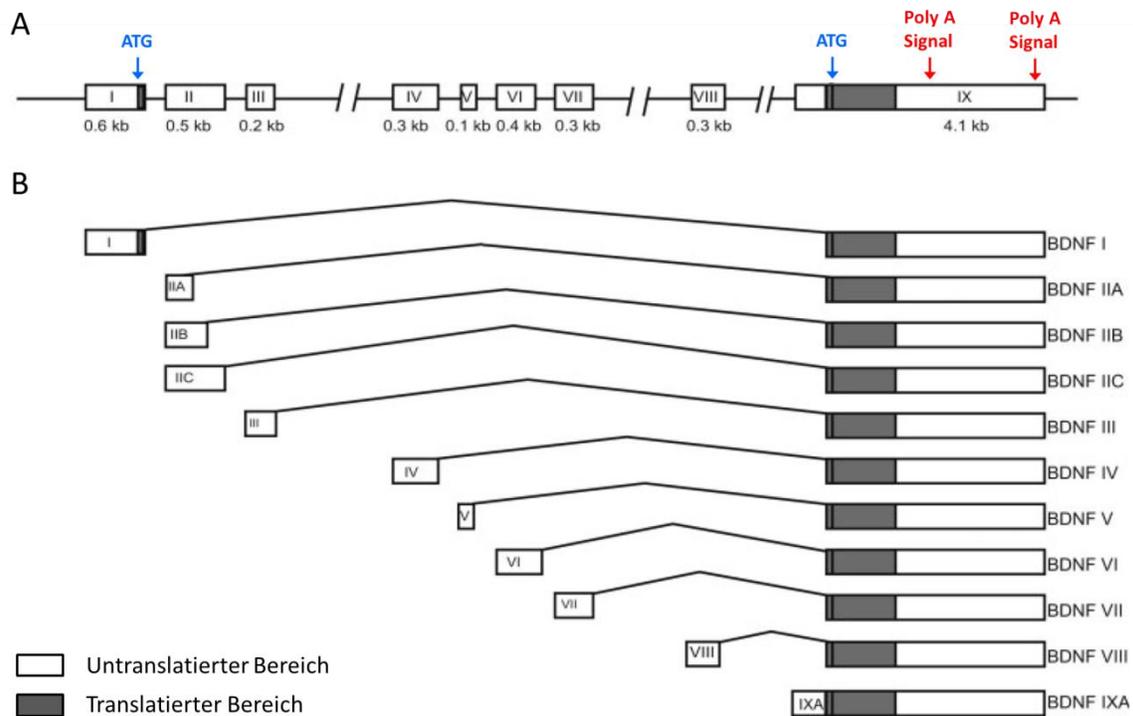
Besonders das Neurotrophins BDNF scheint für das Lernen und die Gedächtnisbildung eine wesentliche Rolle zu spielen. Hierbei stellt die Langzeitpotenzierung (LTP) neuronaler Verbindungen einen grundlegenden molekularen Mechanismus für neuronale Plastizität dar (**Bliss & Lomo, 1973**). Es konnte gezeigt werden, dass ähnliche Stimulationsprotokolle, die LTP an glutamatergen Synapsen induzieren, ebenfalls geeignet sind, um die Ausschüttung von BDNF zu stimulieren (**Aicardi et al., 2004**). Des Weiteren ist in hippocampalen Neuronen von BDNF-*Knock-out*-Mäusen die Ausbildung einer stabilen LTP reduziert und kann durch die exogene Applikation von BDNF wiederhergestellt werden (**Korte et al., 1996; Patterson et al., 1996**). In hippocampalen Neuronen von Wildtyp-Tieren wiederum kann die LTP durch Applikation von *TrkB-receptor-bodies*, einem künstlichen Immunglobulin, welches spezifisch sekretiertes BDNF binden und biologisch inaktivieren kann, inhibiert werden (**Figurov et al., 1996**). Auch in Verhaltensversuchen konnte gezeigt werden, dass BDNF für die Ausbildung des Langzeitgedächtnisses eine entscheidende Rolle spielt (**Bekinschtein et al., 2008**). In konditionellen BDNF-*Knock-out*-Mäusen wurden Defizite beim räumlichen Lernen und im Furchtextinktionslernen gefunden (**Heldt et al., 2007**). Jedoch bereits schon in heterozygoten BDNF-*Knock-out*-Mäusen, die nur etwa die Hälfte des physiologisch verfügbaren BDNFs exprimieren, sind Hippokampus- bzw. Amygdala-abhängige Lernprozesse signifikant beeinträchtigt (**Psotta et al., 2013; Petzold et al., 2015**). Somit spielt der neurotrophe Faktor BDNF eine wichtige Rolle bei Lern- und Gedächtnisprozessen.

## 1.2 Bildung und Reifung des Neurotrophins BDNF

### 1.2.1 Transkription und Translation von BDNF

Das BDNF-Gen der Maus befindet sich auf dem Chromosom 2 (Acc. Nr.: **AY057907.1**). Es besteht aus insgesamt neun verschiedenen Exons (**Abb. 1.1 A**), aus denen durch

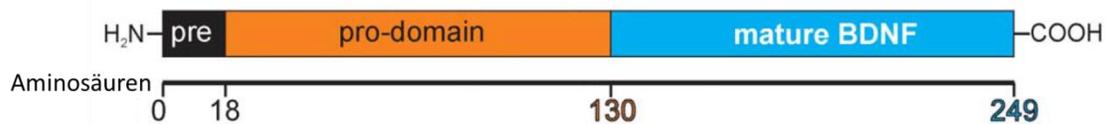
alternatives Spleißen verschiedene Transkriptvarianten entstehen können. Bisher sind insgesamt elf Transkriptvarianten bekannt (**Abb. 1.1 B**), die durch neun verschiedene Promotoren im 5'-Bereich vor den jeweiligen Exons gewebsspezifisch, entwicklungsspezifisch oder aktivitätsabhängig exprimiert werden. Die Sequenz für den offenen Leserahmen des BDNF-Proteins ist in Exon 9 lokalisiert und somit in allen Transkriptionsvarianten enthalten. Neben dem Translationsinitiationskodon (ATG) in Exon 9 gibt es eine alternative Translationsinitiationsstelle in Exon 1. Ebenfalls in Exon 9 befinden sich zwei alternative Polyadenylierungssignale, die die Transkriptlänge im 3'-untranslatierten Bereich verändern können (**Timmusk et al., 1993; Aid et al., 2007**).



**Abb. 1.1: Transkription des murinen BDNF-Gens. (A)** Intron-Exon-Struktur des BDNF-Gens auf Chromosom 2 des murinen Genoms mit jeweils zwei alternativen Translationsinitiationsstellen (blau) und Polyadenylierungssignalen (rot). Exons sind als Kästchen mit römischen Zahlen dargestellt. **(B)** Durch alternatives Spleißen entstehende mRNA-Transkripte. Alle Transkriptvarianten enthalten die in Exon IX codierte Sequenz zur Translation des BDNF-Proteins (grau). Modifiziert nach **Aid et al., 2007**.

Alle BDNF-Transkriptvarianten werden zu einer 249 Aminosäure langen bzw. 257 Aminosäure langen (Exon 1 Variante) Proteinsequenz translatiert (Acc. Nr.: **NP\_001272345; NP\_031566.4**). Die initial translatierte Proteinsequenz stellt dabei einen Vorläufer von BDNF (**Timmusk et al., 1993**), das sogenannte pre-pro-BDNF, dar (**Abb.**

1.2). Die N-terminale pre-Domäne beinhaltet ein Signalpeptid, welches die am Ribosom naszierende Proteinkette in das endoplasmatische Retikulum dirigiert und nach Vollendung der Translation abgespalten wird. Das dadurch entstehende pro-BDNF enthält eine pro-Domäne, die später proteolytisch von „maturen“ (reifen) BDNF abgespalten wird. BDNF bildet unter physiologischen Bedingungen Homodimere aus, jedoch wurde die Röntgenkristallstruktur von BDNF mit Hilfe von BDNF/NT-3 oder BDNF/NT-4 Heterodimeren untersucht (**Robinson et al., 1995; Robinson et al., 1999**).



**Abb. 1.2: Proteinstruktur von BDNF nach der Translation.** Abgebildet ist das Vorläuferprotein von BDNF (pre-pro-BDNF). Die pre-Sequenz wird noch während der Translation des Proteins in das endoplasmatische Retikulum abgespalten. Das so entstandene pro-BDNF wird in einem späteren Schritt proteolytisch zu reifem (maturem) BDNF gespalten. Modifiziert nach **Lessmann & Brigadski, 2009**.

### 1.2.2 Expression von BDNF

Die BDNF-mRNA ist bereits während embryonaler Entwicklungsstadien nachweisbar und erreicht ihr Expressionsmaximum etwa 14 Tage nach der Geburt (**Ernfors et al., 1990**). Dabei ist sie am stärksten im Hippokampus, Cortex und Cerebellum zu finden. Innerhalb des Hippokampus ist sie vor allem in Körnerzellen des *Gyrus dentatus* und Pyramidenzellen der *Cornu ammonis* (CA) exprimiert, wobei in der CA3-CA2 Region eine stärkere Expression als in der CA1 Region zu beobachten ist (**Hofer et al., 1990**). Innerhalb des Neurons können die Spleißvarianten der BDNF-mRNA aktivitätsabhängig in verschiedene Kompartimente transportiert werden (**Chiaruttini et al., 2008**). Obwohl die BDNF-mRNA auch in Dendriten zu finden ist (**Tongiorgi et al., 1997; Chiaruttini et al., 2009**), wird die finale Lokalisation des BDNF-Proteins kontrovers diskutiert. In einigen Studien wird das endogene BDNF-Protein nahezu ausschließlich in axonalen Strukturen beobachtet (**Conner et al., 1997; Dieni et al., 2012**), in anderen Studien war das BDNF-Protein jedoch auch dendritisch lokalisiert (**Wetmore et al., 1991; Dugich-Djordjevic et al., 1995; Schmidt-Kastner et al., 1996**; zusammengefasst in **Edelmann et al., 2014**). In primären neuronalen Kulturen wird überexprimiertes BDNF-Protein sowohl in Axone als auch Dendriten sortiert

und von beiden Strukturen aktivitätsabhängig ausgeschüttet (**Haubensak et al., 1998; Hartmann et al., 2001; Dean et al., 2009; Matsuda et al., 2009**).

### 1.2.3 Sortierung von BDNF in den sekretorischen Pfad der Zelle

Pro-BDNF wird, wie auch andere Proteine des sekretorischen Pfades, über das *trans*-Golgi-Netzwerk in sekretorische Granula verpackt. BDNF kann dabei in sekretorischen Granula des konstitutiven oder des regulierten Sekretionspfades sortiert werden. Beide Pfade unterscheiden sich durch ihre Sensitivität gegenüber dem *Second Messenger* Kalzium (**Halban & Irminger, 1994**). Für die aktivitätsabhängige Ausschüttung von BDNF aus Neuronen ist die Sortierung von BDNF in sekretorische Granula des Kalzium-abhängigen, regulierten Sekretionspfades von Bedeutung. Hierfür ist der im Golgi exprimierte Sortilin-Rezeptor verantwortlich (**Chen et al., 2005**), welcher die pro-Domäne von pro-BDNF erkennt und in Vesikel des aktivitätsabhängigen Sekretionspfades überführt. Die Wichtigkeit der pro-Domäne für diesen Prozess belegen Studien, die im Fall des humanen BDNFs gezeigt haben, dass ein natürlich vorkommender Polymorphismus in der pro-Domäne, bei dem die Aminosäure Valin an Position 66 zu Methionin substituiert wird, zu einer reduzierten Sortierung von BDNF in sekretorische Granula des aktivitätsabhängigen Pfades führte (**Egan et al., 2003**). Auch durch den Austausch der pro-Domäne von NT4 gegen die pro-Domäne von BDNF, konnte eine Lokalisation von NT4 in Vesikeln des aktivitätsabhängigen Sekretionspfades verstärkt werden (**Brigadski et al., 2005**). Neben Sequenzmotiven in der pro-Domäne konnte darüber hinaus ein Sortierungsmotif in der maturen Domäne von BDNF identifiziert werden. In hippokampalen Neuronen vermittelt dieses Sortierungsmotiv eine Interaktion von pro-BDNF mit der im Golgi-Apparat befindlichen Exopeptidase und Sortierungsrezeptor CPE (Carboxypeptidase E), welcher ebenfalls für die Sortierung von BDNF in sekretorische Granula des aktivitätsabhängigen Sekretionspfades bedeutend ist (**Lou et al., 2005**).

### 1.2.4 Azidifizierung sekretorischer Granula und proteolytische Spaltung von BDNF

Der pH-Wert von sekretorischen Granula wird mit Hilfe der v-Typ ATPase auf ein saures Niveau (pH~5,5) eingestellt (**Johnson & Scarpa, 1976; Russell & Holz, 1981**). Die v-Typ-ATPase ist ein multimerer Proteinkomplex, der in der Membran sekretorischer Granula

aber auch synaptischer Vesikel zu finden ist. Er besteht aus einem zytosolisch ausgerichteten, katalytischen  $V_1$ -Komplex, der durch Hydrolyse von ATP die Energie zum Transport von Protonen durch den in der Vesikelmembran sitzenden  $V_0$ -Komplex bereitstellt (**Beyenbach & Wieczorek, 2006**). Entlang der Vesikelmembran wird durch die Aktivität der v-Typ-ATPase ein elektrochemischer Protonengradient aufgebaut, der unter anderem auch für Transportvorgänge über die Vesikelmembran genutzt wird. So werden sekretorische Granula neuroendokriner Zellen mit Hilfe des vesikulären Monoamintransporters (vMAT) durch den Antiport von Protonen mit Monoaminen beladen (**Henry et al., 1994**). In Neuronen hat das saure Milieu sekretorischer Granula eine entscheidende Rolle für die weitere Reifung von BDNF. So stellt der saure pH im Vesikel die optimalen Reaktionsbedingungen für pro-Proteinkonvertasen dar, welche die pro-Domäne von der maturen BDNF-Domäne proteolytisch abspalten können (**Zhou et al., 1999**). Dabei können in sekretorischen Granula hippokampaler Neuronen sowohl ungespaltenes als auch gespaltenes BDNF vorliegen und exozytiert werden (**Yang et al., 2009**). Andere Studien gehen jedoch davon aus, dass nur matures BDNF ausgeschüttet wird und die Reifung von maturem BDNF lediglich intrazellulär erfolgt (**Matsumoto et al., 2008**). Jedoch ist eine extrazelluläre Spaltung des BDNF mit Hilfe der durch tPA (*tissue plasminogen activator*) aktivierten Protease Plasmin (**Pang et al., 2004**) oder durch Matrix-Metalloproteasen (**Lee et al., 2001**) ebenfalls gezeigt worden.

### 1.2.5 Aktivitätsabhängige Ausschüttung von BDNF

BDNF wird aus sekretorischen Granula von Neuronen entweder konstitutiv oder aktivitätsabhängig ausgeschüttet. Um die aktivitätsabhängige Sekretion von BDNF nachzuweisen, wurden verschiedene Methoden etabliert. Durch Verwendung von BDNF-Antikörpern in ELISA-Messungen konnte sekretiertes BDNF aus dem Überstand von entsprechend stimulierten Geweben oder primären Neuronen detektiert werden (**Canossa et al., 1997; Balkowiec & Katz, 2000**). Zwar kann mit dieser Methode die Ausschüttung von BDNF eingeschränkt zeitlich aufgelöst werden, jedoch ist eine räumliche Auflösung des Sekretionsprozesses nicht möglich. Um diese Nachteile zu umgehen, wurde die Ausschüttung von fluoreszenzmarkiertem BDNF aus primären hippokampalen Neuronen untersucht. Hierbei konnte die Sekretion von BDNF sowohl durch hochfrequente elektrische Stimulation der Neurone als auch chemisch, mittels Depolarisation der

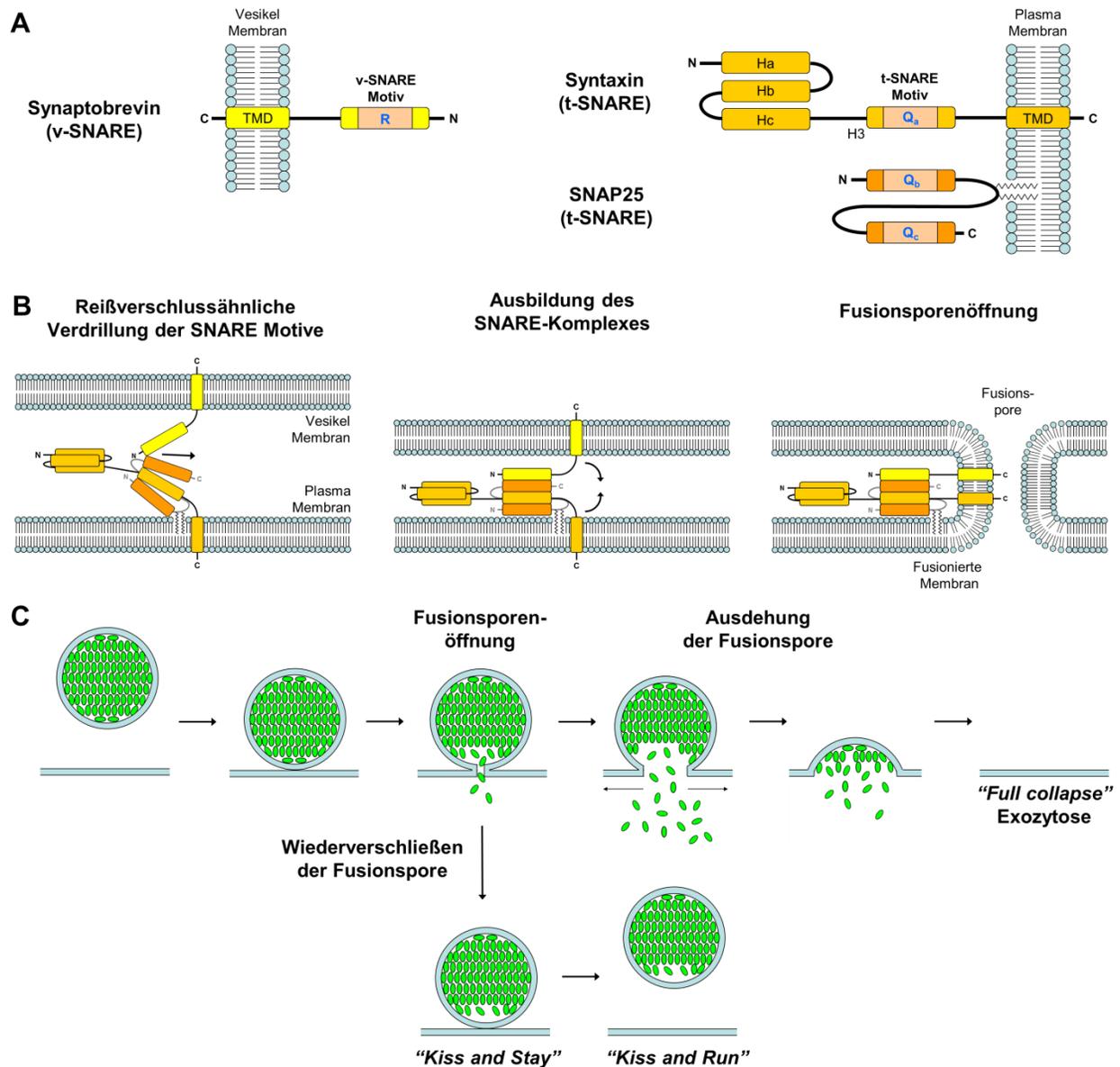
Zellmembran durch Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration, ausgelöst werden (**Hartmann et al., 2001**). BDNF kann dabei sowohl prä- und postsynaptisch als auch extrasynaptisch ausgeschüttet werden (**Brigadski et al., 2005; Dean et al., 2009; Matsuda et al., 2009**). Dabei ist die Sekretion einerseits abhängig von extrazellulärem Kalzium, welches in Dendriten über spannungsgesteuerte L-Typ-Kalziumkanälen in die Zelle einströmt. Nach diesem initialem, Depolarisierungs-induziertem Kalziumeinstrom von außen ist jedoch auch die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Kalziumspeichern essentiell für die Ausschüttung von BDNF. Weiterhin wird die Sekretion durch die Aktivität der Kalzium-Calmodulinkinase II (CaMKII) und eine basale Aktivität der Proteinkinase A (PKA) moduliert (**Kolarow et al., 2007**). Des Weiteren hängt die Kinetik der Ausschüttung sekretorischer Proteine wie BDNF von ihrer Molekülgröße, der Molekülstruktur, der Dichte sowie der Wechselwirkungen der Proteine in der intravesikulären Matrix ab (**Barg et al., 2002; Taraska et al., 2003; Brigadski et al., 2005; de Wit et al., 2009**).

### 1.3 Exozytoseprozesse in Neuronen

#### 1.3.1 Exozytose von Vesikeln

Exozytose ist ein biologischer Vorgang innerhalb einer Zelle, bei dem die Membran eines intrazellulär lokalisierten Vesikels mit der Plasmamembran der Zelle fusioniert und dabei der Inhalt des Vesikels in den extrazellulären Raum freigesetzt wird. Auch für die Integration von Membranbestandteilen und integrale Membranproteinen ist die Exozytose von Vesikeln von Bedeutung (**Lin & Scheller, 2000**). Aufgrund der hohen Energiebarriere für die Fusion zweier Lipiddoppelschichten, findet dieser Vorgang unter Beteiligung spezieller Proteine statt (**Weber et al., 1998**). Hierfür verwendet die Zelle membranständige Proteine (SNAREs), die sowohl an der Vesikelmembran (v-SNARE) als auch an der Zielmembran (t-SNARE) zu finden sind. SNARE-Proteine, die an der Exozytose von synaptischen Vesikeln beteiligt sind, wurden bereits sehr gut charakterisiert (**Jahn & Scheller, 2006**). Hierbei sind das am Vesikel sitzende v-SNARE Protein Synaptobrevin (auch VAMP genannt) sowie die an der Plasmamembran sitzenden t-SNARE Proteine SNAP-25 und Syntaxin bekannt (**Abb. 1.3 A**). Kristallstrukturdaten dieser Proteine konnten zeigen, dass sie einen trinären Komplex ausbilden, den sogenannten SNARE-Komplex, der

durch Verdrillung von insgesamt 4 hydrophoben  $\alpha$ -Helices, den sogenannten SNARE-Motiven der SNARE-Proteine, entsteht (Sutton et al., 1998). Die vollständige Verdrillung dieses Komplexes liefert die für die Fusion von zwei Doppellipidschichten nötige Energie



**Abb. 1.3: SNARE-vermittelte Exozytose von Vesikeln.** (A) Domänenstruktur der an der Exozytose von Vesikeln beteiligten SNARE-Proteine (TMD: Transmembrandomäne, R, Q<sub>a</sub>, Q<sub>b</sub>, Q<sub>c</sub>: SNARE-Motive der jeweiligen SNARE-Proteine; Ha, Hb, Hc, H3: Domänen des Proteins Syntaxin) (B) Schematische Darstellung der Bildung des SNARE-Komplexes und anschließender Fusionsporenöffnung durch Verdrillung der vier  $\alpha$ -helikalen SNARE-Motive der einzelnen SNARE-Proteine (C) Modellhafter Ablauf verschiedener Exozytoseereignisse. Nach Öffnung der Fusionspore kann die Exozytose entweder vollständig („Full collapse“) oder reversibel erfolgen („Kiss and run“ und „Kiss and stay“).

(Parpura & Mohideen, 2008) (Abb. 1.3 B). Dabei bildet sich eine Fusionspore, die sich ausdehnt (Dilatation) und durch die die Ausschüttung des Vesikelinhalts in den extrazellulären Raum erfolgt (Bai et al., 2004). Die vollständige Ausdehnung der Fusionspore führt zu einer ebenfalls vollständigen Verschmelzung der vesikulären Membran mit der Plasmamembran (*Full collapse*) (Abb. 1.3 C). Dadurch vergrößert sich folglich die Oberfläche der Zellmembran um den Membrananteil des Vesikels. Um die Membranoberfläche konstant zu halten und auch um bereits exozytierte Membranproteine zurückzugewinnen, werden diese mittels Endozytose wieder internalisiert (Saheki & De Camilli, 2012). Neben dem *Full collapse*-Szenario werden aber auch Fusionsereignisse mit reversibler Ausbildung der Fusionspore beobachtet. Hierbei wird nach Bildung der Fusionspore diese offen gehalten (Omega-Querschnitt) und der Vesikelinhalt ausgeschüttet. Eine weitere Dilatation der Fusionspore zum vollständigen Kollaps bleibt jedoch aus, so dass diese wieder verschlossen werden kann und der intakte Vesikel entweder angedockt an der Plasmamembran verbleibt (*Kiss and Stay*) oder von der Plasmamembran abdockt (*Kiss and Run*) (Abb. 1.3 C). Der Vorteil einer solchen Form von Exozytose ist, dass nur kleine Mengen des Vesikelinhalts ausgeschüttet werden und die Vesikelkomponenten nicht aufwendig durch Endozytose wiedergewonnen werden müssen (van Kempen et al., 2011).

### 1.3.2 Priming von Vesikeln für die Exozytose

Als *Priming* (Vorbereitung) von Vesikeln werden alle Prozesse bezeichnet, die einen an die Plasmamembran andockten Vesikel für die regulierte Exozytose vorbereiten. Proteine, die zu diesem Prozess beitragen, werden *Priming*-Faktoren genannt. Die Existenz eines *Priming*-Schrittes begründet sich aus Beobachtungen an synaptischen Vesikeln und sekretorischen Granula neuroendokriner Zellen, dass nicht alle an die Plasmamembran andockten Vesikel durch Kalziumeinfluss exozytiert werden können. Angedockte Vesikel benötigen einen weiteren Reifungsschritt (*Priming*), um volle Fusionskompetenz zu erlangen (Rettig & Neher, 2002). Nichtsdestotrotz können Faktoren, die Vesikel an die Plasmamembran andocken auch an dem sich anschließenden *Priming*-Schritt beteiligt sein (Becherer & Rettig, 2006). *Priming*-Faktoren können über zwei verschiedene Mechanismen ihre Funktion ausüben. Einerseits können sie die optimale Proteinfaltung

oder die vollständigen Ausbildung des SNARE-Komplexes durch direkte molekulare Interaktionen unterstützen (**Südhof, 2013**). Andererseits können sie Kalzium-abhängig mit speziellen Phospholipiden der Plasmamembran interagieren und somit den Vesikel an für die Vesikelfusion optimierte Orte der Plasmamembran heranführen (**Martin, 2012**). Aus diesen Erkenntnissen ergeben sich Modelle, wie der *Priming*-Prozess ablaufen kann. Diese sind jedoch noch nicht vollständig verstanden und aufgeklärt.

### 1.3.2.1 Vesikel-*Priming* durch Interaktion mit dem SNARE-Komplex

Das *Priming* durch die Interaktion mit dem SNARE-Komplex wurde für die Exozytose synaptischer Vesikel umfassend untersucht (**Südhof, 2013**). Die Regulation erfolgt dabei in mehreren Interaktionsschritten, wobei das t-SNARE-Protein Syntaxin eine entscheidende Rolle spielt. Es ist das größte SNARE-Protein und besteht aus einer C-terminalen Transmembrandomäne, die es in der Plasmamembran verankert, einer zentralen H<sub>3</sub>-Domäne, die eine hydrophobe  $\alpha$ -Helix des SNARE-Motives enthält und einer N-terminalen H<sub>abc</sub>-Domäne, die aus drei weiteren hydrophoben  $\alpha$ -Helices aufgebaut ist (siehe **Abb. 1.3 a**). Syntaxin kann in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen (**Dawidowski & Cafiso, 2013**). Bei der geschlossenen Form wird durch Rückfaltung der H<sub>abc</sub>-Domäne auf die H<sub>3</sub>-Domäne das SNARE-Motiv in der H<sub>3</sub>-Domäne abgeschirmt und somit die Bildung des SNARE-Komplexes verhindert (**Burkhardt et al., 2008**). Dennoch ist die geschlossene Form von Syntaxin ein essentielles Intermediat für die SNARE-Komplexbildung (**Dulubova et al., 1999**). In der offenen Form von Syntaxin ist die H<sub>abc</sub>-Domäne nicht an der für die SNARE-Komplexbildung notwendigen  $\alpha$ -Helix der H<sub>3</sub>-Domäne assoziiert, so dass sie mit den  $\alpha$ -Helices der anderen SNARE-Proteine SNAP25 und Synaptobrevin interagieren kann. Die Konformationsänderungen von Syntaxin werden unter anderem von den *Priming*-Faktoren Munc18 (Sec1) und Munc13 (*mammalien* Unc13) schrittweise reguliert. Munc18 ist bereits am Andocken der Vesikel an der Plasmamembran beteiligt und bindet an den Komplex aus H<sub>abc</sub>- und H<sub>3</sub>-Domäne des Syntaxins. Dabei wird die geschlossene Form von Syntaxin stabilisiert (**Yang et al., 2000; Misura et al., 2000**). Durch Bindung des *Priming*-Faktors Munc13 am N-Terminus von Syntaxin wird dessen Konformation in die offene Form überführt (**Ma et al., 2011**). Für diesen Prozess ist eine Proteindomäne im C-Terminus von Munc13 essentiell, die sogenannte „*Munc13 homology domain*“ (MHD) (**Betz et al., 1997**). In der offenen Konformation kann das SNARE-Motiv von Syntaxin mit den

SNARE-Motiven der anderen SNARE-Proteine interagieren und durch Verdrillung der  $\alpha$ -Helices den SNARE-Komplexes ausbilden. Dabei wird der SNARE-Komplex von einem weiteren *Priming*-Faktor, dem Complexin, stabilisiert. Complexin besteht aus einer  $\alpha$ -helikalen Hauptdomäne, die anti-parallel an die  $\alpha$ -Helices des SNARE-Komplex bindet und diese stabilisieren kann (**Chen et al., 2002; Xue et al., 2008**). Obwohl die *Priming*-Faktoren Munc18, Munc13 und Complexin an Hand der Exozytose synaptischer Vesikel identifiziert wurden, sind sie auch an der Exozytose sekretorischer Granula beteiligt (**Ashery et al., 2000; Voets et al., 2001; Cai et al., 2008**). Nach vollständigem Vesikel-*Priming* wird der Fusionsprozess der vesikulären Membran und der Plasmamembran durch den Kalziumsensor Synaptotagmin ausgelöst (**Brose et al., 1992**). Hierbei spielt der Einstrom von Kalzium durch spannungsgesteuerter Kalziumkanäle eine entscheidende Rolle. Die Erhöhung der lokalen Kalziumkonzentration wird von Synaptotagmin perzipiert und in eine Konformationsänderung des SNARE-Komplexes umgesetzt, der die vollständige Verdrillung der SNARE-Motive und somit die Membranfusion zur Folge hat.

### 1.3.2.2 Vesikel-*Priming* durch Interaktion mit der Plasmamembran

Eine Reihe von *Priming*-Faktoren zeichnen sich durch charakteristische Protein-Domänen aus, die mit Phospholipiden interagieren können. Der *Priming*-Faktor Munc13 sowie der Kalziumsensor Synaptotagmin besitzen mehrere C2-Domänen. Der Name dieser Domäne stammt von einer konservierten Proteindomäne aus Mitgliedern der Proteinkinase C Familie, die Kalzium-abhängig Phosphatidylserin der Plasmamembran binden können. C2-Domänen binden mit hoher Affinität an Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>)-reiche Regionen der Plasmamembran, wobei vermutet wird, dass diese die Orte der Sekretion innerhalb der Zelle markieren (**Kabachinski et al., 2014**). Diese Membranregionen werden zuvor ATP-abhängig durch die Aktivität der Phosphatidylinositolphosphatkinase I (PIPK) aus Phosphatidylinositol-4-phosphat (PIP) hergestellt und sind essentiell für die Exozytose von Vesikeln (**Eberhard et al., 1990; Hay et al., 1995**). Es wird dabei angenommen, dass die Anreicherung von PIP<sub>2</sub> und des enzymatisch daraus gebildete Diacylglycerol in diesen Membranregionen die Fluidität, Krümmung und Spannung der Plasmamembran so verändern, dass diese leichter ein Fusionsereignis eingehen kann (**Martin, 2012**). Da sowohl der Auslöser des

Vesikelfusionsereignisses Synaptotagmin als auch *Priming*-Faktoren wie Munc13 über C2-Domänen verfügen, wird die Kalzium-abhängige Interaktion mit speziellen Regionen der Plasmamembran ebenso als ein essentieller *Priming*-Schritt angesehen.

## 1.4 Der *Priming*-Faktor CAPS1

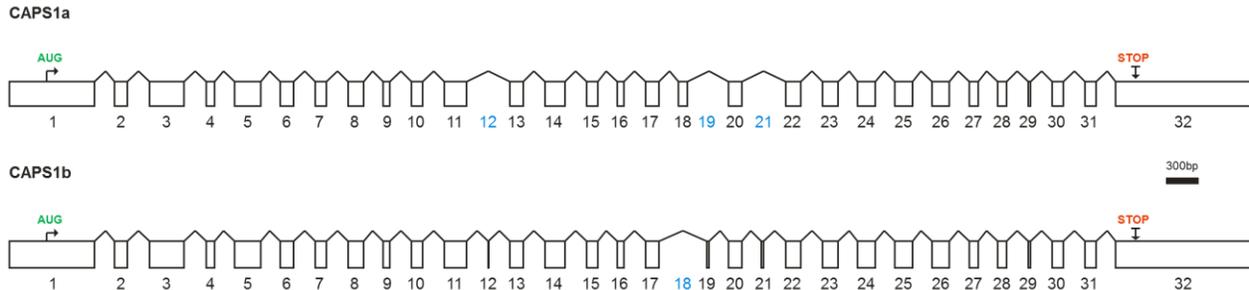
### 1.4.1 Entdeckung von CAPS1

CAPS1 (*Calcium-dependent activator protein for secretion*) wurde ursprünglich als ein 145 kDa großes Protein (p145) beschrieben, welches im Zytosol von Gehirnllysaten der Ratte zu finden war. Einen ersten Einblick auf die Funktion von CAPS1 lieferten Experimente, bei denen das Zytosol von permeabilisierten PC12 Zellen durch zytosolische Fraktionen von Rattengehirnllysaten ersetzt wurde. Dabei konnte gezeigt werden, dass CAPS1 aus Rattenhirnen die Sekretionsprozesse von Zytoplasma-dialysierten PC12 Zellen wiederherstellte (**Walent et al., 1992**). CAPS1 wurde anschließend näher charakterisiert und als wesentlicher Faktor für die Kalzium-abhängige Sekretion in neuroendokrinen PC12 Zellen erkannt (**Ann et al., 1997; Binda et al., 2005; Fujita et al., 2007**). Durch Homologie-Analysen konnten strukturelle Übereinstimmungen zu einem in *Caenorhabditis elegans* beschriebenen Protein (Unc-31) festgestellt werden, welches für die synaptische Transmission in diesen Tieren verantwortlich ist und dessen *Knock-out* zu einem Phänotyp mit unkoordinierten Bewegungen führt (**Avery et al., 1993**). Wenig später wurde eine strukturell verwandte Isoform von CAPS, das vor allem im Cerebellum exprimierte CAPS2, gefunden (**Speidel et al., 2003**).

### 1.4.2 Transkription und Translation von CAPS1

Im Mausgenom ist das CAPS1-Gen auf Chromosom 14 lokalisiert. Die Intron-Exon-Struktur des CAPS1-Gens ist momentan noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch sind zwei Transkriptvarianten validiert, welche durch ein komplexes alternatives Spleißen gebildet werden. Beide Transkripte (CAPS1a und CAPS1b) sind etwa 5,5 kb groß und aus multiplen Exons aufgebaut (**Abb. 1.4**). Der offene Leserahmen erstreckt sich in beiden Transkripten vom ersten bis zum letzten Exon wobei CAPS1a zu einer 1361 Aminosäure langen und CAPS1b zu einer 1355 Aminosäure langen Proteinsequenz translatiert wird (Acc. Nr. **NP\_001036082.1; NP\_036191.2**). Auch das CAPS2-Gen auf Chromosom 6 im Mausgenom

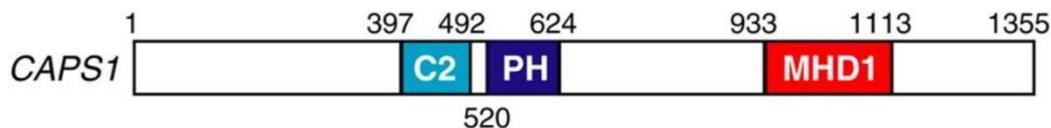
unterliegt einem komplexen Spleißen, wobei hier bereits fünf verschiedene Transkriptvarianten beschrieben worden sind (Sadakata et al., 2007; Truong et al., 2014).



**Abb. 1.4: Transkriptvarianten des CAPS1-Gens.** Struktur der in den Transkriptvarianten von CAPS1 verwendeten Exons (weiße Kästchen). Die Lage des Translationsstartkodons (grün) und des Translationsstopkodons (rot), welche den offenen Leserahmen eingrenzen, sind mit Pfeilen markiert. Die Unterschiede beider Transkriptvarianten beim Spleißen der Exons sind in blau markiert. Durch eine alternative Polyadenylierungsstelle ist das CAPS1b-Transkript um 14 Nukleotide länger. Die Abbildung wurde durch Abgleich der Sequenzdaten beider bisher bekannter Transkriptvarianten von CAPS1 der Maus (Acc. Nr.: NM\_01206; NM\_001042617) erstellt.

Das CAPS1-Protein ist etwa 145 kDa groß und zytosolisch als Homodimer lokalisiert (Walent et al., 1992). Es besteht aus mehreren Domänen, welche verschiedene Funktionen ausüben können (Abb. 1.5). Im zentralen Teil des Proteins befinden sich zwei Domänen, die für die Interaktion von CAPS1 mit der Plasmamembran von Bedeutung sind. Zum einen besitzt CAPS1 eine C2-Domäne, die auch in vielen anderen Exozytose-regulierenden Proteinen enthalten ist (vergleiche 1.3.2.2) und die Kalzium-abhängige Bindung von CAPS1 an Phospholipide der Plasmamembran reguliert (Grishanin et al., 2002). Zum anderen enthält CAPS1 eine PH-Domäne (PH = *Pleckstrin Homology*), die an die Plasmamembran aber auch an die Golgimembran binden kann. Die PH-Domäne ist in der Lage unspezifisch an saure Phospholipide zu binden, kann aber auch hoch selektiv Phosphatidylinositol-(4,5)bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) erkennen und ist essentiell für die *Priming*-Funktion von CAPS (Grishanin et al., 2002; Grishanin et al., 2004; Truong et al., 2014). Im C-terminalen Teil des Proteins befindet sich eine *Munc13 homology domain* (MHD), deren Struktur starke Homologie zu MHD-Domänen des *Priming*-Faktors Munc13 aufweist (vergleiche 1.3.2.1). Wie auch die MHD von Munc13, ist die MHD von CAPS1 in der Lage an Syntaxin zu binden, wobei sich die Bindungsstellen beider Proteine jedoch unterscheiden (Parsaud et al., 2013). Aber auch weitere Interaktionen von CAPS1 mit Synaptobrevin und SNAP25 des

SNRARE-Komplexes sind beschrieben worden (**Daily et al., 2010**). Ob für die *Priming*-Funktion der CAPS-Proteine die Interaktion mit Phospholipiden oder die Interaktion mit Syntaxin entscheidend ist, wird derzeit noch kontrovers diskutiert (**James et al., 2009; Parsaud et al., 2013, Truong et al., 2014**). Im C-Terminus von CAPS1 wurde eine weitere Domäne beschrieben, die in der Lage ist, spezifisch an *Dense-Core*-Vesikel zu binden (**Grishanin et al., 2002**). Hieraus ergab sich die Vermutung, dass CAPS-Proteine selektive *Priming*-Faktoren für sekretorische Granula sein könnten (**Berwin et al., 1998**).



**Abb. 1.5: Proteinstruktur von CAPS1.** Dargestellt ist die 1355 Aminosäuren lange Proteinsequenz der Transkriptvariante CAPS1b. Einzelne Proteindomänen sind farblich markiert und deren Position innerhalb der Proteinsequenz ist durch Zahlen abgegrenzt. CAPS1 bindet über die C2- und PH-Domänen an die Plasmamembran und kann über die MHD1-Domäne an das t-SNARE Protein Syntaxin binden. Über weitere Sequenzmotive im C-terminalen Teil des Proteins kann CAPS1 zusätzlich an die Membran von *Dense-Core*-Vesikeln binden. Abbildung modifiziert nach **Parsaud et al., 2013**.

### 1.4.3 Expression von CAPS1

CAPS1 wird besonders stark in neuronalem Gewebe des Gehirns aber auch in endokrinem Gewebe der Hypophyse, Nebenniere und des Pankreas exprimiert (**Speidel et al., 2003**). Darüber hinaus kann CAPS1 aber auch in einigen Zelltypen des Magens, des Thymus und der Milz gefunden werden (**Sadakata et al., 2007**). Im Gehirn gibt es entwicklungspezifische Unterschiede zwischen beiden Transkriptvarianten von CAPS1. Das etwas größere Protein aus der Transkriptvariante CAPS1a kann im Gehirn von Mäusen bereits während embryonaler Entwicklungsstadien detektiert werden und erreicht seine maximale Expression ab etwa 21 Tage nach der Geburt. Das etwas kleinere Protein der Transkriptvariante CAPS1b hingegen kann erst ab 21 Tagen nach der Geburt detektiert werden. Im adulten Gehirn sind beide Transkriptvarianten in allen Regionen des Gehirns zu finden, wobei die größere Transkriptvariante CAPS1a jeweils stärker exprimiert wird. Im Hippokampus wird CAPS1 sowohl in Körnerzellen des *Gyrus dentatus* als auch in Pyramidenzellen der *Cornu ammonis* (CA) exprimiert. Innerhalb von Gewebeschnitten wurde CAPS1 in axonalen Terminalen gefunden (**Speidel et al., 2003; Sadakata et al., 2007**). In anderen Studien wurde jedoch auch eine Lokalisation von CAPS1 im Soma und in

Dendriten von Neuronen beschrieben (**Sadakata et al., 2010; Tobin et al., 2012**). Die verwandte Isoform CAPS2 ist besonders stark im Cerebellum exprimiert (**Sadakata et al., 2004**), kommt jedoch auch in einem schwächeren Ausmaß im Hippokampus vor. Dort scheint es eine komplementäre Expression von CAPS1 und CAPS2 in verschiedenen hippocampalen Neuronen zu geben (**Sadakata et al., 2007**).

#### 1.4.4 Funktionsvielfalt von CAPS1

Die Funktion von CAPS1 in Säugetieren wurde vor allem an CAPS1- und CAPS2-*Knock-out*-Mäusen untersucht. Homozygote CAPS1-*Knock-out*-Tiere sind dabei zwar morphologisch und histologisch ähnlich dem Wildtyp, versterben jedoch innerhalb von 30 min nach der Geburt (**Speidel et al., 2005**). Primäre Zellkulturen von Chromaffinzellen oder Neuronen zur Untersuchung von CAPS wurden daher aus embryonalen Entwicklungsstadien entnommen. In Chromaffinzellen hatte die Deletion von CAPS1 und CAPS2 eine drastische Verringerung der Exozytose sekretorischer Granula zur Folge (**Liu et al., 2008**), während die Deletion von nur CAPS1 die Exozytose weniger stark beeinträchtigte (**Speidel et al., 2005**). Somit scheint die Anwesenheit von CAPS2 im *Knock-out*-System zumindest partiell die Funktion von CAPS1 ersetzen zu können. In primären Neuronen führten sowohl der *Knock-out* von CAPS1 als auch der Doppel-*Knock-out* von CAPS1 und CAPS2 zu einer drastisch reduzierten Ausschüttung von synaptischen Vesikeln (**Jockusch et al., 2007**), womit die Bedeutung von CAPS1 nicht nur für die Exozytose sekretorischer Granula sondern auch für die Exozytose synaptischer Vesikel gezeigt werden konnte. Zusätzlich zu seiner Funktion bei Exozytoseprozessen, wurde in neuroendokrinen Zellen von CAPS1-*Knock-out*-Tieren eine *Priming*-unabhängige Funktion von CAPS1 bei der Beladung sekretorischer Granula mit Catecholaminen / Monoaminen gefunden (**Speidel et al., 2005; Brunk et al., 2009**). Diese zusätzliche Funktion von CAPS1, konnte jedoch durch siRNA-medierte *Knock-down* von CAPS1 in PC12 Zellen nicht bestätigt werden (**Fujita et al., 2007**). Eine weitere Funktion von CAPS1 wurde von Sadakata und Kollegen (**Sadakata et al., 2013**) an hippocampaler Neuronen aus Gewebeschnitten konditioneller CAPS1-*Knock-out*-Mäuse beobachtet. Hier wurde eine reduzierte Lokalisation von *Dense core* Vesikeln in präsynaptischen Strukturen beobachtet, jedoch war die Anzahl synaptischer Vesikel sowie die Struktur der Synapsen in den CAPS1-*Knock-out*-Mäusen unbeeinträchtigt. Diese

Verteilungsdefizite sekretorischer Granula waren begleitet von einer veränderten Struktur des *trans*-Golgi, welcher letztendlich den Transport sekretorischer Granula kontrolliert. Der *cis*-Golgi wies jedoch keine bedeutenden Veränderungen auf (**Sadakata et al., 2013**). Darüber hinaus konnte eine frühere Publikation von Sadakata und Kollegen eine Interaktion von somatisch lokalisiertem CAPS1 mit Proteinen der ARF4/5 Familie (*ADP-Ribosylation Factor*) zeigen. Die Interaktion von CAPS1 mit diesen für den Vesikeltransport wichtigen Faktoren erfolgt über die PH-Domäne von CAPS1, die an die Golgi-Membran bindet und dann ARF4/5 Proteine an die Golgi-Membran rekrutiert (**Sadakata et al., 2010**). Beide Publikationen zusammen weisen auf eine mögliche Funktion von CAPS1 in der Abschnürung und dem Abtransport der sekretorischen Granula von der Golgi-Membran hin. Zusammengefasst ist zu sagen, dass CAPS1 ein wichtiger *Priming*-Faktor sowohl für sekretorische Granula in endokrinen Zellen als auch für synaptische Vesikel in Neuronen ist. CAPS1 scheint jedoch eine Reihe von weiteren Funktionen zeitlich vor der Exozytose von Vesikeln zu haben.

## 1.5 Fragestellung

Ziel dieser Doktorarbeit war es, die Funktion von CAPS1 während der Sekretion von BDNF bzw. der Exozytose synaptischer Vesikel zu untersuchen. Hierzu sollten primäre hippocampale Neurone der Maus auf Mikrogliainseln angelegt werden, welche innerhalb der Kultur lokale, neuronale Netzwerke ausbilden. Anschließend sollte durch Transfektion mit shRNA-Vektoren gezielt die Expression des Proteins CAPS1 in einzelnen primären Neuronen herunterreguliert werden. Da im Gegensatz zu CAPS1-*Knock-out*-Modellen umliegende untransfizierte Neurone weiterhin CAPS1 exprimieren, sollten so die Auswirkungen der reduzierten CAPS1-Expression in einzelnen Neuronen beobachtet werden, die in einem ansonsten unverändertem neuronalen Netzwerk eingebettet waren.

Zur Untersuchung der Funktion von CAPS1 während der Exozytose synaptischer Vesikel sollten synaptische Boutons der Neurone mit FM-Farbstoffen angefärbt werden. Individuelle mit CAPS1-shRNA transfizierte Neurone sollten anschließend auf ihre Ausschüttung des aufgenommenen FM-Farbstoffes untersucht werden. Zur Untersuchung der Funktion von CAPS1 während der Ausschüttung von BDNF aus sekretorischen Granula sollten individuelle hippocampale Neurone mit shRNA-Vektoren transfiziert werden, die

---

gleichzeitig mit der shRNA fluoreszenzmarkiertes BDNF (BDNF-GFP) koexprimierten. Anschließend sollte sowohl die Fusion sekretorischer Vesikel als auch die Kinetik und die Menge der BDNF-Ausschüttung aus einzelnen Vesikeln untersucht werden. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob der *Knock-down* von CAPS1 noch weitere Effekte auf die Ausbildung von Synapsen sowie die Bildung und Reifung sekretorischer Granula hatte. Neben der Modulation der BDNF Ausschüttung durch CAPS1 sollte auch die Ausschüttung von BDNF in transgenen Expressionssystemen untersucht werden. Hierbei sollten sowohl BDNF-GFP-exprimierende, neuronal differenzierte Stammzellen als auch hippocampale Neurone von BDNF-GFP-*Knock-in*-Mäusen und 5xFAD Mäusen untersucht werden.

## 2 Materialien

### 2.1 Chemikalien

Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma
Agarose	Roche
All-trans-Retinsäure	Sigma
2-Amino-5-phosphonovaleriansäure (D/L-APV)	Tocris Bioscience
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Sigma
Ampicilin	Invitrogen
Arabinosylcytosin (AraC)	Sigma
B27 supplement	Tocris Bioscience
Bafilomycin	Calbiochem
Basal medium eagle (BME)	Gibco
Beta-Mercaptoethanol	Sigma
Bromphenolblau (BPB)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (with glutamax)	Invitrogen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (high glucose)	Invitrogen
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)(with calcium, magnesium, glucose, pyruvate)	Invitrogen
Essigsäure (CH <sub>3</sub> COOH)	Merck
Ethidiumbromid	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich
Flüssiger Stickstoff	Air Liquide
FM1-43	Invitrogen
FM4-64	Invitrogen
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco, PAA
Gelatine	Sigma
GeneRuler 1 kb DNA Leiter	Fermentas
GeneRuler 100 bp DNA Leiter	Fermentas
Glucose	Sigma
Glutamax	Invitrogen
Glutamin	Invitrogen
Glycerol (Glycerin)	GE Healthcare
Glycin	Roth
6,7-Dinitroquinoxalin-2,3-dion (DNQX)	Tocris Bioscience
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Serva
Immumount	Fisher Scientific
Insulin	Sigma
Kaliumacetat (CH <sub>3</sub> COOK)	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Kaliumhydroxid (KOH)	Sigma

Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma
Kanamycin	Invitrogen
Knock-out serum replacement (KOSR)	Invitrogen
Ladepuffer (6x loading dye)	Fermentas
Laminin	Sigma
Leukemia inducing factor (LIF)	<sup>1</sup>
Lysogeny broth (LB) Agar	Sigma
Lysogeny broth (LB) Medium	Sigma
Magnesiumacetat ((CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Mg)	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Roth
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Sigma
Mangan(II)-chlorid (MnCl <sub>2</sub> )	Merck
Mitomycin-C	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma
Natriumpyruvat (Pyruvat)	Invitrogen
Neurobasalmedium (NB)	Gibco
Nigericin	Molecular Probes
N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonsäure (BES)	Sigma
2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES)	Sigma
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Sigma
non-essential amino acids (MEM NEAA)	Invitrogen
Ovomucoid	Roche
Paraformaldehyd (PFA)	Electron Micros. Sci.
Penicillin-Streptomycin	Gibco
Phenolrot	Sigma
Picrotoxin	Sigma
Polyornithin	Sigma
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva
Rubidiumchlorid (RbCl)	Sigma-Aldrich
Salzsäure (HCl)	Sigma
Super optimal broth with catabolite repression (SOC Medium)	Invitrogen
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS )	biomol
Triton X-100 (Triton X)	PlusOneTM
Valinomycin	Sigma-Aldrich

<sup>1</sup> Überstand von rekombinanten, LIF-produzierenden Hek-Zellen (freundlicherweise bereitgestellt von Dr. Julia Leschik, Institut für Physikalische Chemie, Mainz)

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser; 12mm	Marienfeld GmbH
Einweg-UV-Küvette: Uvette	Eppendorf
Filterspritzen: Discardit II	BD

Glasflaschen (Duran R 0,1 - 2 L)	Duran Group
Kryogefäß: Cryovial 1.2 ml	Simport
Kulturröhrchen: 6ml / 15 ml / 50 ml	greiner bio-one
Kulturschalen: 3,5cm / 6cm / 10 cm / 15 cm	Nunc
Leuchtmittel: HXP R 120W/45C Vis	Osram
Messkolben (Duran R 0,5 - 1 L)	Duran Group
Messzylinder (Duran R 0,1 - 1 L)	Duran Group
Metallkanüle: Spinal Needel	BD
Mikrotiterplatte 24-well	Nunc
Objektträger: SuperFrost	Menzel-Gläser
Petrischalen: 3,5cm /6cm	Nunc
pH-Elektrode (BlueLine 28 pH)	SI Analytics
Plastikschlauch DIN EN ISO 544 SD 300	Dayi Plastik
Reaktionsgefäße: 1,5ml / 2ml SafeSeal	Sarsted
Serologische 10 ml Einwegpipette	Sarsted
Skalpell: Einwegskalpell / Skalpellklingen	Feather
Sterilfilter Filtropur s 0.2	Sarstedt
Ventil: StopCock 1 Way Male Slip	Cole-Parmer

### 2.3 Geräte

Autoklaven	2540 EL	Systec
	Varioklav	H+P
Badkammer	Slice mini chamber	Luigs & Neuman
Binokular	Stemi2000	Zeiss
CCD Kamera	CoolSnap HQ <sup>2</sup>	Photometrics
Filterräder & Steuereinheit	LUDL	LEP
Durchlichtlampen	TH4-200	Olympus
	HAL-100	Zeiss
Gelelektrophorese	PowerPac 300	BioRad
	PowerPac Basic	BioRad
	Wide Mini-Sub Cell GT	BioRad
Kaltlichquelle	KL 1500 LCD	Schott
Kreisschüttler ( <i>Vortex</i> )	WhirlMix	Cenco
	MBS 488/543	Zeiss
Kurzbogenlampe	HXP 120C	Zeiss
Inkubatoren	Orbital Inkubator S150	Stuart
	FunctionLine	Heraeus
	CO <sub>2</sub> Inkubator Serie CB	Binder
Laser:	Argon, Helium/Neon	Labos Laser Technik
Laserscanning-Einheit	LSM 780	Zeiss
Magnetrüher:	MR Hei-Standard	Heidolph
Mikromanipulatoren	SM5, SM7	Luigs & Neuman
Mikroskope	Axiovert 35	Zeiss
	BX51WI	Olympus
	Axio Examiner.Z1	Zeiss

Objektive	10x UmPlan FL N	Olympus	
	60x LUMFI	Olympus	
	20x Plan-Apochromat	Zeiss	
	63x Plan-Apochromat	Zeiss	
pH-Meter	Lab 860	Schott instruments	
Sterilbänke	HeraGuard	Heraeus	
	Open LAF Silver Line	Kojair	
	Biowizard	Kojair	
Transilluminatoren	GelDoc 2000	BioRad	
	GenoView	VWR	
Reinstwasseranlage	Milli Q / Milli Q <sup>UF Plus</sup>	MilliPore	
Spektralfilter	89021 BS	Chroma	
	ET 470 / 40x	Chroma	
	ET 572 / 35x	Chroma	
	ET 525 / 50m	Chroma	
	ET 632 / 60m	Chroma	
	400 DCLP	Chroma	
	D 360 / 40x	Chroma	
	D 460 / 50m	Chroma	
Spektralphotometer	SmartSpec Plus	BioRad	
Zentrifugen	Centrifuge 5804R	Eppendorf	
	Mikro 22R	Hettich	
	Mikro 120	Hettich	
	Rotina 420R	Hettich	
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf	
Wasserbäder	EcoLine RE104	Lauda	
	TW8	Julabo	
Zahlkammer	Neubauer	LaborOptic	

## 2.4 Kits und Enzym- und Reaktionsmixe

Alkaline Phosphatase (FastAP)	Fermentas
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
DNase	Roche
Gel Extraction Kit	Qiagen
Papain	Worthington
QIApre Miniprep	Qiagen
Rapid DNA T4 Ligase Kit	Fermentas
Restriktionsenzyme ( <i>Age</i> I, <i>Bsp</i> MI, <i>Bsr</i> GI, <i>Eco</i> RI, <i>Hind</i> III, <i>Pvu</i> I)	Fermentas
Trypsin	Gibco
Trypin-EDTA-Lösung (SAFC)	Sigma
T4 Polynukleotid Kinase Kit	Fermentas

## 2.5 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')
shCAPS1 fw1	GTACAGCTGTTGACAGTGAGCGAGGAAGGAGACACTCGGTGATATTCTGTGAA
shCAPS1 fw2	GCCACAGATGGGAATATCACCGTGTCTCCTTCCTGCCTACTGCCTCGGAA
shCAPS1 rev1	CCCATCTGTGGCTTCACAGAATATCACCGAGTGTCTCCTTCCTCGCTCACTGTCAACAGCT
shCAPS1 rev2	AGCTTTCCGAGGCAGTAGGCAGGGAAGGAGACACGGTGATATT
shGFP fw1	GTACAGCTGTTGACAGTGAGCGAGCAAGCTGACCCTCTGAAGTTCACTGTGAA
shGFP fw2	GCCACAGATGGGTGAAGTTCAGGGTCAGCTTGCCTGCCTACTGCCTCGGAA
shGFP rev1	CCCATCTGTGGCTTCACAGTGAAGTTCAGAGGGTCAGCTTGCCTCGCTCACTGTCAACAGCT
shGFP rev2	AGCTTTCCGAGGCAGTAGGCAGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCA
shCTRL fw1	GTACAGCTGTTGACAGTGAGCGAGTTCTCCGAACGTCTGTCACGTTCTGTGAA
shCTRL fw2	GCCACAGATGGGAACGTGACACGTTCCGAGAACCTGCCTACTGCCTCGGAA
shCTRL rev1	CCCATCTGTGGCTTCACAGAACGTGACAGACGTTCCGAGAACCTCGCTCACTGTCAACAGCT
shCTRL rev2	AGCTTTCCGAGGCAGTAGGCAGGTTCTCCGAACGTGTCACGTT

**Tab. 2.1: Übersicht über alle verwendeten Oligonukleotide.** Die Oligonukleotide wurden als entsalzte Primer von Invitrogen bestellt.

## 2.6 Plasmidvektoren

pBDNF-GFP	modifiziert nach <b>Haubensak et al., 1998</b>
pBDNF-mCherry	modifiziert nach <b>Haubensak et al., 1998</b>
pmCherry-C2	CloneTech
pEGFP-N1	CloneTech
pAAV-6P-SEWB-Control	<b>Christensen et al., 2010</b>
pEF-BOS-CAPS1-YPET-HA	<b>Sadakata et al., 2010</b>
pDsRed-VAMP	<b>Brigadski et al., 2005</b>
pPSD95-DsRed	<b>Brigadski et al., 2005</b>

## 2.7 Bakterienstämme / Versuchstiere / Zelllinien

<i>E.coli</i> C600	Eppendorf
C57BL/6 Mäuse	Charles River
Sprague Dawley Ratten	Charles River
Maus embryonale Fibroblasten (MEF)	Chemicon
Maus embryonale Stammzellen (ES), Linie V6.5	Open Biosystems
mit <i>Knock-in</i> für BDNF-GFP	<b>(Leschik et al., 2013)</b>
BDNF-GFP- <i>Knock-in</i> -Mäuse	genOway
5x FAD Mäuse	<b>(Oakley et al., 2006)</b>

## 2.8 Antikörper

Primärantikörper:	rabbit anti-CAPS1 rabbit anti-CAPS1 mouse anti-MAP2 mouse anti-V0a1	<b>(Sadakata et al., 2004)</b> Synaptic Systems Millipore / Chemicon Santa Crus
Sekundärantikörper:	Alexa Fluor 350 goat-anti-mouse Alexa Fluor 488 goat-anti-rabbit / mouse Alexa Fluor 555 goat-anti-rabbit / mouse Alexa Fluor 633 goat-anti- mouse Cy2 goat-anti-rabbit / mouse Cy3 goat-anti-rabbit / mouse	life technologies life technologies life technologies life technologies Dianova Dianova

## 2.9 Software

Clonemanager	Sci-Ed Software
pDraw32	Acaclone Software
VisiView	Visitron Systems
Metamorph 7.7	Molecular Devices
Office	Microsoft
Origin 9.1G	OriginLab
Corel Draw X4	Corel
SPSS 22	IBM
Photoshop CS6	Adobe
ZEN (LSM 780)	Zeiss

## 2.10 Puffer, Medien und Lösungen

<b>TFB1</b>	30 mM $\text{CH}_3\text{COOK}$ 10 mM $\text{CaCl}_2$ 50 mM $\text{MnCl}_2$ 100 mM $\text{RbCl}$ 15 % Glycerol <i>in <math>\text{H}_2\text{O}</math>, pH=5,8 mit <math>\text{CH}_3\text{COOH}</math></i>	<b>TFB2</b>	10 mM MOPS 75 mM $\text{CaCl}_2$ 10 mM $\text{RbCl}$ 15 % Glycerol <i>in <math>\text{H}_2\text{O}</math>, pH=6,5 mit KOH</i>
<b>TE</b>	10 mM TRIS 1 mM EDTA <i>in <math>\text{H}_2\text{O}</math>, pH=8,0 mit HCl</i>	<b>TRIS-HCl</b>	10 mM TRIS <i>in <math>\text{H}_2\text{O}</math>, pH=8,0 mit HCl</i>
<b>1xTAE</b>	40 mM TRIS 20 mM $\text{CH}_3\text{COOH}$ 1 mM EDTA <i>in <math>\text{H}_2\text{O}</math>, pH=7,8 mit <math>\text{CH}_3\text{COOH}</math></i>	<b>Anlagerungs- puffer</b>	40 mM HEPES 100 mM $\text{CH}_3\text{COOK}$ 2 mM $\text{CH}_3\text{COOMg}$ <i>in <math>\text{H}_2\text{O}</math>, pH=7,4 mit KOH</i>

<b>BME / 10% FCS</b>	10 mM HEPES 5 mM Glucose 1 mM Glutamax 10 % FCS 36 mg/l Insulin <i>in BME Medium</i>	<b>NB / B27</b>	20 ml/l B27 2,5 ml/l Penicillin/ Streptomycin 2 mM Glutamax <i>in BME Medium</i>
<b>2x BBS</b>	50 mM BES 1,5mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 280 MM NaCl <i>in H<sub>2</sub>O, pH=7,06 mit NaOH</i>	<b>PBS</b>	137 mM NaCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,7 mM KCl 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <i>in H<sub>2</sub>O, pH=7,4 mit HCl</i>
<b>mPBS<sup>-/-</sup></b>	10 mM HEPES 10 mM Glucose 1 mM Glutamax 1 mM Pyruvat 1 mM Phenolrot 2,5 ml/l Penicillin/ Streptomycin 6 µg/ml DNase 1 mg/ml BSA <i>in PBS Puffer, pH=7,4</i>	<b>mPBS<sup>+/+</sup></b>	4 mM CaCl <sub>2</sub> 5,8 mM MgCl <sub>2</sub> <i>in mPBS<sup>-/-</sup> Puffer, pH=7,4</i>
<b>HBS<sup>2/1</sup></b>	20 mM HEPES 100 mM NaCl 4 mM KCl 1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM Glucose 2 mM CaCl <sub>2</sub> 1 mM MgCl <sub>2</sub> 10 µM Glycin <i>in H<sub>2</sub>O, pH=7,39 mit NaOH</i>	<b>HBSK<sup>2/1</sup></b>	20 mM HEPES 50 mM NaCl 54 mM KCl 1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM Glucose 2 mM CaCl <sub>2</sub> 1 mM MgCl <sub>2</sub> 10 µM Glycin <i>in H<sub>2</sub>O, pH=7,39 mit NaOH</i>
<b>HBS<sup>0/3</sup></b>	20 mM HEPES 100 mM NaCl 4 mM KCl 1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM Glucose 0 mM CaCl <sub>2</sub> 3 mM MgCl <sub>2</sub> 10 µM Glycin <i>in H<sub>2</sub>O, pH=7,38 mit NaOH</i>	<b>HBS<sup>2/1</sup> mit 50mM NH<sub>4</sub>Cl</b>	20 mM HEPES 50 mM NaCl 4 mM KCl 50 mM NH <sub>4</sub> Cl 1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM Glucose 2 mM CaCl <sub>2</sub> 1 mM MgCl <sub>2</sub> 10 µM Glycin <i>in H<sub>2</sub>O, pH=7,39 mit NaOH</i>

**Pufferzusätze für Spezialanwendungen:**

FM1-43	10 $\mu$ M	DNQX	5 $\mu$ M
FM4-64	10 $\mu$ M	D/L-APV	50 $\mu$ M
Bromphenolblau	0,3 mM	Picrotoxin	100 $\mu$ M
Bafilomycin	1 $\mu$ M		

<b>HBS<sup>2/1</sup> mit 5mM NH<sub>4</sub>Cl</b>	20 mM	HEPES
	95 mM	NaCl
	4 mM	KCl
	5 mM	NH <sub>4</sub> Cl
	1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	10 mM	Glucose
	2 mM	CaCl <sub>2</sub>
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 $\mu$ M	Glycin	
<i>in H<sub>2</sub>O, pH=7,39 mit NaOH</i>		

<b>HBSK<sup>2/1</sup> mit 5mM NH<sub>4</sub>Cl</b>	20 mM	HEPES
	45 mM	NaCl
	54 mM	KCl
	5 mM	NH <sub>4</sub> Cl
	1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	10 mM	Glucose
	2 mM	CaCl <sub>2</sub>
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 $\mu$ M	Glycin	
<i>in H<sub>2</sub>O, pH=7,39 mit NaOH</i>		

<b>MES-haltige Puffer für pH- Wertmessung</b>	20 mM	MES
	4 mM	NaCl
	100 mM	KCl
	1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	10 mM	Glucose
	0 mM	CaCl <sub>2</sub>
	3 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 $\mu$ M	Glycin
10 $\mu$ M	Valinomycin	
4 $\mu$ M	Nigericin	
<i>in H<sub>2</sub>O, pH= 4,00 – 5,00</i>		

<b>HEPES-haltige Puffer für pH- Wertmessung</b>	20 mM	HEPES
	4 mM	NaCl
	100 mM	KCl
	1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	10 mM	Glucose
	0 mM	CaCl <sub>2</sub>
	3 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 $\mu$ M	Glycin
10 $\mu$ M	Valinomycin	
4 $\mu$ M	Nigericin	
<i>in H<sub>2</sub>O, pH= 6,00 – 8,00</i>		

<b>MEF-Medium</b>	10 %	FCS
	1 mM	Pyruvat
	0,1 mM	Non-essential Amino acids
	2,5 ml/l	Penicillin/ Streptomycin
<i>in DMEM (with glutamax)</i>		

<b>ES-Zell- Medium</b>	15 %	FCS
	1 mM	Pyruvat
	0,1 mM	Non-essential Amino acids
	2,5 ml/l	Penicillin/ Streptomycin
2 mM	Glutamin	
0,1 mM	$\beta$ -Mercapto- ethanol	
0,1 %	LIF	
<i>in DMEM (with high glucose)</i>		

<b>Differenzier- ungsmedium</b>	15 %	KOSR
	1 mM	Pyruvat
	0,1 mM	Non-essential Amino acids
	2,5 ml/l	Penicillin/ Streptomycin
	2 mM	Glutamin
<i>in DMEM (with high glucose)</i>		

<b>2x Einfrier- Medium</b>	40 %	MEF-Medium
	40 %	FCS
	20 %	DMSO

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologie

#### 3.1.1 Design der siRNA-Sequenzen

Die siRNA-Sequenzen zur Repression von CAPS1 mittels RNA-Interferenz wurde mit Hilfe der Internetanwendung des *Whitehead* Instituts für Biomedizinische Forschung entworfen (<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/>). Als Zielsequenz diente die murine CAPS1-mRNA für die bekannten Spleißvarianten CAPS1a (Acc. Nr.: **NM\_012061**) und CAPS1b (Acc. Nr.: **NM\_001042617**). Von den durch die Internetanwendung bereitgestellten Kandidaten-siRNA-Sequenzen wurden Sequenzen mit potentiellen unspezifischen Bindungen an andere Transkripte herausselektiert. Aus den verbliebenen Kandidaten wurde eine siRNA-Sequenz ausgewählt, die an beide Spleißvarianten von CAPS1 homolog bindet. Als Negativkontrolle wurde eine siRNA-Kontrollsequenz verwendet, die keine Homologie zu bekannten Säugertranskripten ausweist. Zusätzlich wurde als Positivkontrolle für die Funktionalität der RNA-Interferenz eine bekannte GFP-siRNA verwendet.

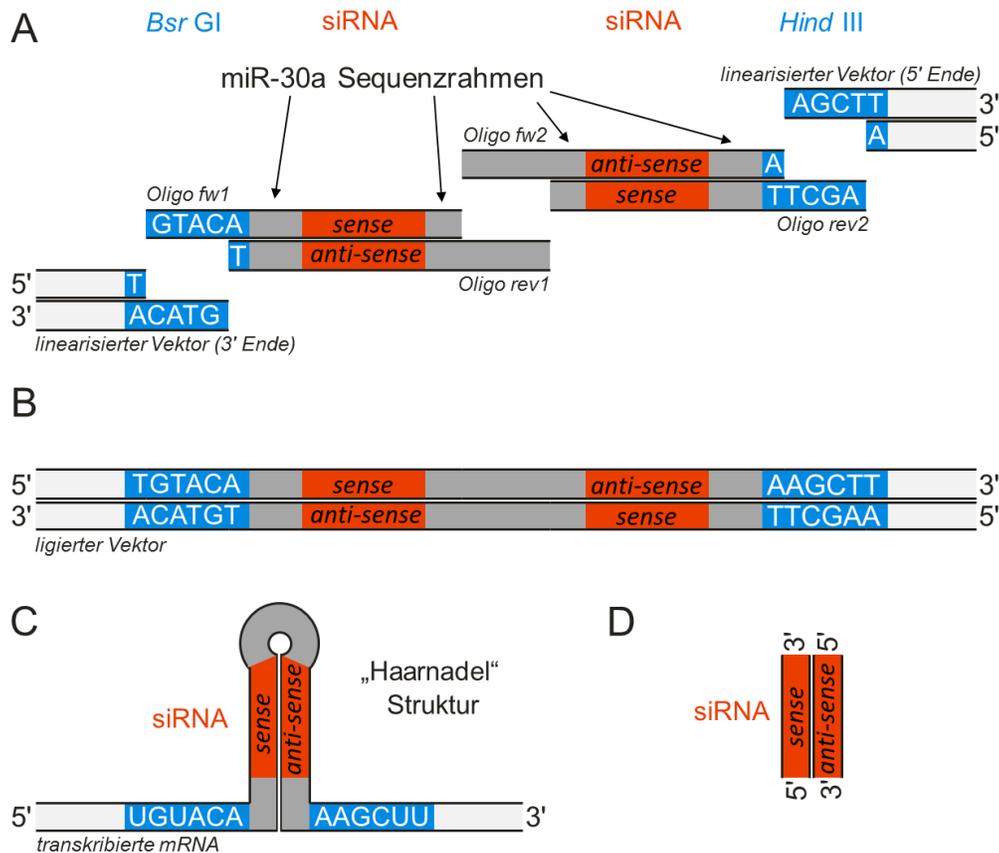
Bezeichnung	Ziel mRNA	Konsensus Sequenz ( <i>anti-sense</i> )	Sequenzursprung
shCAPS1	CAPS1	5'-AUAUCACCGUGUCUCCUUC-3'	Entworfen mit Internetanwendung
shCTRL	-	5'-ACGUGACACGUUCGGAGAA-3'	<i>Non silencing control</i> siRNA, Qiagen, #1022076
shGFP	GFP	5'-GAACUUCAGGGUCAGCUUGC-3'	GFP-22 siRNA, Qiagen, #1022064

Tab. 3.1: siRNA-Ausgangssequenzen für die Konstruktion der shRNA-Vektoren

#### 3.1.2 Klonierung der siRNA-Sequenzen in den shRNA-Zielvektor

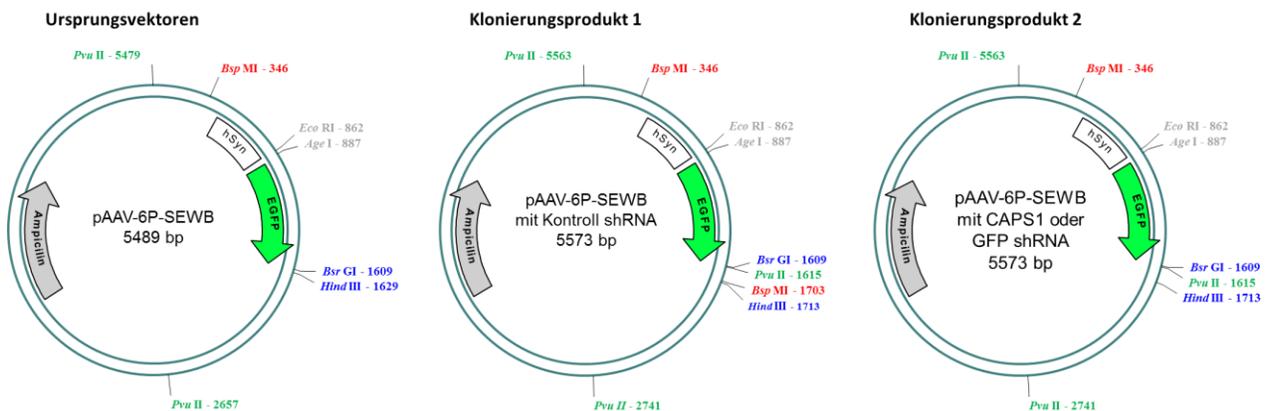
Für den *Knock-down* von Zielproteinen in hippokampalen Neuronen mittels RNA Interferenz wurden spezielle shRNA-Plasmide kloniert, die sowohl die entsprechende siRNA im Sequenzrahmen der Mikro-RNA miR-30a als auch ein Markerprotein zur Identifizierung transfizierter Zellen exprimierten. Dafür wurde zunächst eine doppelsträngige Oligonukleotidsequenz entworfen, die die entsprechende siRNA im miR-30a-Sequenzrahmen enthielt. An den Enden wurden jeweils Sequenzüberhänge entsprechend der Restriktionsschnittstellen von *BsrGI* (5'-Ende) und *HindIII* (3'-Ende)

angefügt, um diese in den durch *BsrGI* und *HindIII* linearisierten Zielvektor einfügen zu können. Aufgrund der Überlänge der Oligonukleotidsequenz wurde diese auf zwei doppelsträngige Teilsequenzen so aufgeteilt, dass die daraus resultierenden Enden zueinander komplementäre Überhänge enthielten. Die so entstandenen Oligonukleotidsequenzen wurden als entsalzte Primer käuflich erworben (Invitrogen) und gemäß 3.1.4 - 3.1.8 in einen mit *BsrGI* und *HindIII* linearisierten Vektor eingefügt (Abb. 3.1 A - B). Aufgrund der Sequenzkomplementarität des miR-30a-Sequenzrahmens und der darin eingefügten siRNA, bildete die transkribierte mRNA an dieser Stelle eine Haarnadelstruktur (*short hairpin*) aus (Abb. 3.1 C), die von der zelleigenen Micro-RNA-Prozessierungsmaschinerie erkannt und zur RNA-Interferenz verursachenden siRNA-Sequenz weiterprozessiert wird (Abb. 3.1 D).



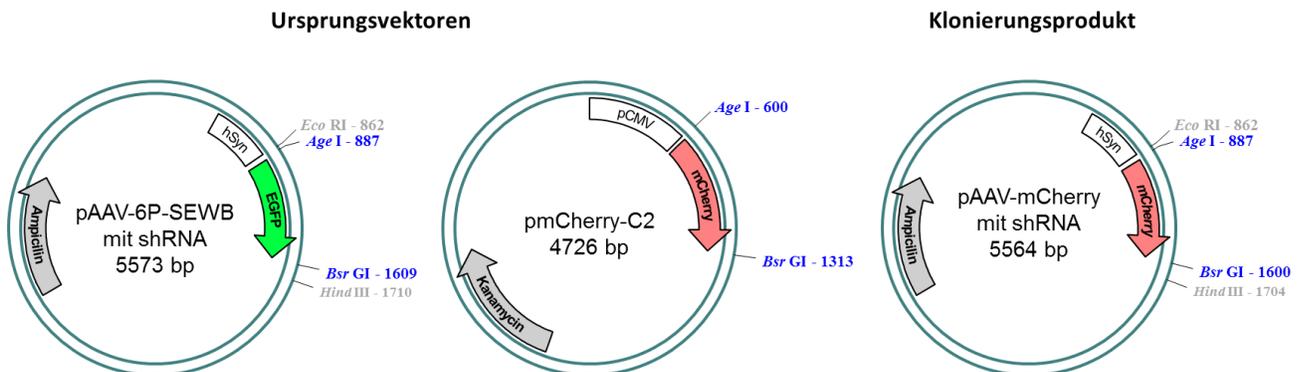
**Abb. 3.1: Klonierung der Oligonukleotide in den shRNA-Vektor.** (A) Schema der Sequenzkomplementarität der Oligonukleotide und des linearisierten Zielvektors. Die Sequenz der Oligonukleotide bestand aus Überhängen entsprechend der Restriktionsenzyme *BsrGI* und *HindIII* (blau), dem Sequenzrahmen der Mikro-RNA miR-30a (grau) und der darin integrierten siRNA-Sequenzen (rot). (B) Entsprechender Sequenzabschnitt nach Ligation in den Zielvektor. (C) Entsprechender Sequenzabschnitt der vom Zielvektor transkribierten mRNA mit miR-30a-Haarnadelstruktur, die von der intrazellulären Micro-RNA Prozessierungsmaschinerie erkannt wird. (D) RNA-Interferenz verursachende siRNA nach der Prozessierung.

Die Oligonukleotide für die shRNA-Sequenz gegen CAPS1 und GFP oder die shRNA mit der Kontrollsequenz wurden in den 3' untranslatierten Bereich der GFP-Transkriptsequenz des Vektors pAAV-6P-SEWB kloniert (vergleiche **Christensen et al., 2010**, freundlicherweise bereitgestellt von Prof. Dr. Gerhard Schratt, Institut für physiologische Chemie, Fachbereich Medizin, Universität Marburg). Der Vektor wurde hierfür mit den Restriktionen *BsrGI* und *HindIII* geschnitten und die Oligonukleotide für die Kontroll-shRNA, CAPS1-shRNA und GFP-shRNA in den Vektor kloniert. Zur Überprüfung des Klonierungserfolges wurden die Restriktionsenzyme *PvuII* und *BspMI* verwendet (**Abb. 3.2**).



**Abb. 3.2:** Klonierung der shRNA Konstrukte in pAAV-6P-SEWB

Um einen shRNA-Vektor mit einem rot fluoreszierenden Marker zu erzeugen, wurde die GFP-Sequenz aus pAAV-6P-SEWB durch die mCherry-Sequenz aus pmCherry-C2 ersetzt. Beide Vektoren wurden mit den Restriktionsenzymen *AgeI* und *BsrGI* geschnitten. Anschließend wurde das 713 bp große Spaltprodukt aus pmCherry-C2 in das ca. 4,8 kB große Spaltprodukt des pAAV-6P-SEWB Vektors kloniert (**Abb. 3.3**).



**Abb. 3.3:** Klonierung von pAAV-mCherry mit den verschiedenen shRNA Konstrukten

Zusätzlich wurden für die Untersuchung der Ausschüttung von BDNF shRNA-Vektoren kloniert, die BDNF-GFP (GFP in Form der fluoreszenzverstärkten Mutante eGFP) exprimierten. Hierzu wurden die Vektoren pAAV-6P-SEWB und pBDNF-EGFP mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *AgeI* geschnitten und das ca. 766 bp große Spaltprodukt mit der BDNF-Sequenz in den linearisierten pAAV-6P-SEWB Vektor kloniert.

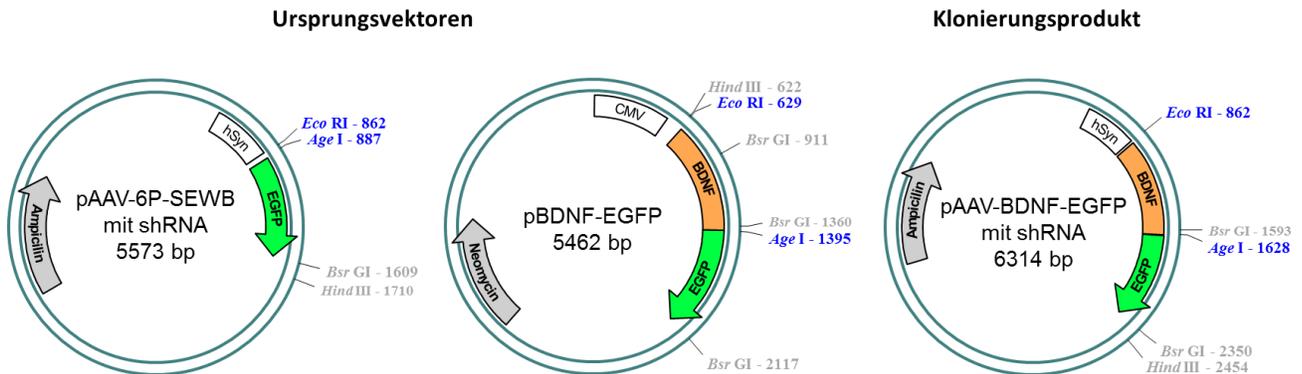


Abb. 3.4: Klonierung von pAAV-BDNF-GFP mit den verschiedenen shRNA-Konstrukten

### 3.1.3 Herstellen kompetenter *E.Coli* Bakterien

*Escherichia coli* Bakterien (*E.coli* Stamm C600) wurden zum Animpfen einer 4 ml Vorkultur aus LB-Medium (ohne Antibiotika-Zusatz) benutzt. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert und am nächsten Tag 1:100 in 100 ml mit 20 mM MgSO<sub>4</sub> versetztem LB-Medium verdünnt. Danach wurde die Kultur weiter im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert, bis sie eine optische Dichte (OD<sub>600</sub>) zwischen 0,4 bis 0,6 aufwies. Die Zellsuspension wurde anschließend für 5 min bei 4500 g und 4 °C zentrifugiert, das entstandene Zellpellet in 40 ml eiskaltem TFB1 Puffer resuspendiert und darin für weitere 5 min bei 4 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation der Zellsuspension wurde das Zellpellet in 4 ml eiskaltem TFB2 Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend in TFB2 Puffer für 15 min bei 4 °C inkubiert und dann zu je 100 µl aliquotiert. Abschließend wurden die Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 3.1.4 Restriktionsreaktionen

Restriktionsansätze hatten ein Volumen von 20 µl und enthielten 1-2 µg Plasmid-DNA. Unabhängig von der Enzymaktivität wurden standardmäßig mindestens 0,5 µl des

jeweiligen Restriktionsenzym verwendet und der Ansatz 1 h bei 37 °C inkubiert. Bei Doppelverdau wurden die Enzymkonzentration, der Enzympuffer und die Reaktionsbedingungen so gewählt, dass möglichst beide Enzyme über eine hinreichende Aktivität verfügten (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/doubledigest>). Für Restriktionsansätze zur Klonierung von Oligonukleotiden wurde der linearisierte Vektor gleichzeitig dephosphoryliert. Dazu wurde dem Restriktionsansatz 1 µl (entspricht 1 U) FastAP (alkaline Phosphatase) zugesetzt, der Ansatz 2 h länger inkubiert und anschließend bei 80 °C für 20 min hitzeinaktiviert.

### 3.1.5 Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion

10 µl der Restriktionsansätze wurden mit Ladepuffer versetzt (*6x loading dye*) und auf ein 1 %-tiges Agarosegel in 1x TAE Puffer geladen. Als Marker wurden eine 1 kb bzw. eine 100 bp Leiter verwendet. Die DNA wurde ca. 45 min bei 90 V aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Anschließend wurden die Gele unter UV-Licht am Transilluminator fotodokumentiert und ggf. Banden ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA aus Gelfragmenten erfolgte mit dem *Gel Extraction Kit* von Qiagen entsprechend der Gebrauchsanweisung.

### 3.1.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration isolierter DNA aus Gelfragmenten oder aufgereinigter Plasmid-DNA wurde spektralphotometrisch bestimmt. Hierzu wurde die DNA 1:10 oder 1:20 in 50 µl Wasser oder TE Puffer verdünnt (Verdünnungsfaktoren: VF=10 oder VF=20) und gegen eine Leerprobe mit 50 µl Wasser oder TE Puffer gemessen. Der Ansatz wurde in eine UV-Küvette pipettiert und die Extinktion bei 260 nm ( $E_{260}$ ) und 280 nm ( $E_{280}$ ) an einem UV-Spektralphotometer gemessen. Die DNA-Konzentration [DNA] und der Reinheitsgrad [RG] wurden an Hand folgender Formeln ermittelt:

$$[\text{DNA}] = 50 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} * \text{VF} * E_{260} \qquad [\text{RG}] = \frac{E_{260}}{E_{280}}$$

### 3.1.7 Anlagerung und Phosphorylierung der Oligonukleotide

Lyophilisierte Oligonukleotide wurden jeweils in 10 mM TRIS-HCL (pH=8.0) zu einer Konzentration von 100 µM aufgenommen und 10 min bei 50 °C gelöst. Die gelösten

Oligonukleotide wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert oder gleich weiterverwendet. Jeweils 100 pmol der entsprechenden Oligonukleotide wurden in 50 µl Anlagerungspuffer pipettiert und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden die Oligonukleotide neu aneinander gelagert, in dem sie für 15 min langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und dann aus Eis gestellt wurden. Die angelagerten Oligonukleotide wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert oder direkt weiterverarbeitet. 2 µl der angelagerten Oligonukleotide wurden in einem 10 µl Ansatz in Anwesenheit von 1 mM ATP und 1 µl (entspricht 5 U) T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert. Hierzu wurde der Ansatz 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend für 10 min bei 70 °C hitzeinaktiviert. Die Konzentration der phosphorylierten Oligonukleotide wurde anhand der ursprünglichen DNA-Menge und den jeweiligen Verdünnungsschritten berechnet.

### 3.1.8 Ligation und Transformation

Die Ligase-Reaktion wurden in einem 20 µl Ansatz und standardmäßig mit 50 ng des linearisierten Vektors durchgeführt. Die Menge der einzusetzenden *Insert*-DNA wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$m_{Insert} = \frac{50\text{ng} * \text{Insertgröße (in kb)}}{\text{Vektorgröße (in kb)}} * \frac{3}{1}$$

Ein Ligationsansatz mit Vektor- und *Insert*-DNA und ein Ansatz mit nur der Vektor-DNA als Negativkontrolle wurden in Anwesenheit der T4-DNA-Ligase für 5 min bei 22 °C inkubiert und dann auf Eis gestellt. Kompetente *E. coli* wurde für 10 min auf Eis aufgetaut und anschließend jeweils 50 µl dieser Zellen in vorgekühlte Kulturröhrchen (6 ml) pipettiert. 5 µl des Ligationsansatzes und der Negativkontrolle wurden jeweils auf die Zellen pipettiert und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 45 s im Wasserbad bei 42 °C inkubiert und dann wieder für 2 min auf Eis gestellt. Zu den Zellen wurden 900 µl SOC-Medium pipettiert und die Kulturröhrchen für 1 h bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Danach wurden 100 µl der Zellsuspension auf Agarplatten mit der dem Plasmid entsprechenden Antibiotikaresistenz (Ampicillin 100 µg/ml oder Kanamycin 30 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag

wurden die Kolonien auf den Agarplatten für den Ligationsansatz und die Negativkontrolle ausgezählt und an Hand des Verhältnisses beider der Ligationserfolg abgeschätzt.

### 3.1.9 Minipräparation der Plasmid-DNA (Vorkultur)

Einzelne Kolonien transformierter *E.coli* Bakterien wurden mit einer Pipettenspitze gepickt und steril in ein Kulturröhrchen (15 ml), befüllt mit 4 ml LB-Medium und der entsprechenden Antibiotikaresistenz (Ampicillin 100 µg/ml oder Kanamycin 30 µg/ml), gegeben. Anschließend wurde die Vorkultur über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 ml der Zellsuspension für das Animpfen einer neuen 100 ml Kultur oder das Anlegen einer Glycerin-Dauerkultur aufgehoben. Die restlichen 3 ml wurden mit 8000 rpm für 3 min zentrifugiert und die Plasmid-DNA aus dem Zellpellet mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* entsprechend der Gebrauchsanweisung aufgereinigt. Die Konzentration der eluierten Plasmid-DNA wurde spektralphotometrisch bestimmt und anschließend wurde die aufgereinigte Plasmid-DNA Restriktionsanalysen unterzogen.

### 3.1.10 Maxipräparation der Plasmid-DNA (Hauptkultur)

Ein steriler Erlenmeyerkolben wurde mit 100 ml LB-Medium und der entsprechenden Antibiotikaresistenz (Ampicillin 100 µg/ml oder Kanamycin 30 µg/ml) befüllt. Anschließend wurden 100 µl der Vorkultur aus transformierten *E.coli* Bakterien in den Erlenmeyerkolben pipettiert und die Flüssigkultur über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Zellsuspension auf zwei Kulturröhrchen (50 ml) aufgeteilt und 15 min bei 6000 g und 4 °C zentrifugiert. Aus dem Zellpellet wurde mit Hilfe des *EndoFree Plasmid Maxi Kits* (Qiagen) die Plasmid-DNA entsprechend der Gebrauchsanweisung aufgereinigt. Das am Ende dieses Prozesses entstandene Pellet aus präzipitierter DNA wurde in Wasser aufgenommen und bei 4 °C über Nacht gelöst. Am nächsten Tag wurde die Konzentration der Plasmid-DNA spektralphotometrisch vermessen und durch weiteres Verdünnen in Wasser auf 1 µg/µl eingestellt. Gegebenenfalls wurde die Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen erneut überprüft. Abschließend wurde die Plasmid-DNA aliquotiert und bis zu ihrer Verwendung bei der Transfektion auf -20 °C gelagert.

### 3.1.11 Anlegen von Glycerin-Dauerkulturen

Ein Kryoröhrchen wurde mit 820 µl der Zellsuspension transformierter *E.coli* Bakterien und 120 µl einer 80 %-tigen Glycerinlösung befüllt. Nach kurzem mischen wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

## 3.2 Primäre Zellkultur

### 3.2.1 Präparation kortikaler Astrozyten

Postnatale Ratten (P0-P3) wurden dekapitiert und die Schädeldecke mit einem Skalpell mittig aufgetrennt. Das Gehirn wurde entnommen und auf eine mit Silikon beschichtete Präparierschale in vorgekühltes mPBS<sup>+/+</sup> überführt. Unter dem Binokular wurde mit dem Skalpell ein Teilstück des Neokortex aus beiden Gehirnhälften präpariert, mehrfach eingeschnitten und in einem mit mPBS<sup>+/+</sup> befülltem Reaktionsgefäß auf Eis gelagert. Anschließend wurde der Puffer durch mPBS<sup>-/-</sup> ersetzt und das Gewebe in Anwesenheit von 0,25 % Trypsin bei 37 °C und 800 rpm im Thermomixer entsprechend **Tab. 3.2** geschüttelt, um Zellverbindungen enzymatisch aufzulösen.

Alter	Hippokampus	Neokortex
P0-P1	8 min	15 min
P2	10 min	16 min
P3	12 min	18 min

**Tab. 3.2: Inkubationszeiten der Trypsinreaktion bei 37 °C**

Das Gewebe wurde anschließend mehrfach trituiert und die Zellsuspension in ein vorgekühltes, mit 3 ml Medium (BME/10 % FCS) befülltes Kulturröhrchen gegeben. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei 4 °C und 1100 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in 3 ml BME/10 % FCS resuspendiert. Anschließend wurde die Zelldichte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt und 2-3 x 10<sup>6</sup> Zellen in einer Kulturschale (6 cm) für ca. 1 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> präplattiert. Die an der Kulturschalenoberfläche adhären Astrozyten wurden von den nicht-adhären Neuronen durch Abnahme des Überstandes getrennt. Anschließend wurde die 6 cm Kulturschale erneut mit 3 ml BME/10 % FCS

befüllt und die Zellen für 2-3 Wochen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Astrozyten wurden bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert und dabei wöchentlich das Medium durch frisches BME/10 % FCS ersetzt (modifiziert nach **Lessmann & Heumann, 1998**).

### 3.2.2 Passagieren kortikaler Astrozyten

Konfluente Astrozytenkulturen wurden zwei Mal in PBS gewaschen und anschließend 7 min mit Trypsin-EDTA-Lösung (0,12 % Trypsin und 0,02 % EDTA) bei 37 °C inkubiert. Um möglichst viele Zellen vom Schalenboden zu lösen, wurde der Schalenboden zuerst mit dem Überstand und anschließend mit 1 ml BME/10 % FCS unter Zuhilfenahme einer Pipette gespült. Die abgelösten Zellen wurden in ein mit 3 ml BME/10 % FCS befülltes Kulturröhrchen gegeben und anschließend für 10 min bei 1100 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 3 ml BME/10 % FCS resuspendiert und anschließend die Zelldichte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. 50.000-80.000 Zellen wurden in eine mit 1 ml BME/10 % FCS befüllte Kulturschale (3,5 cm) auf fünf darin eingelegte Deckgläser ausplattiert. Nach 3 Tagen wurde die Zellteilung durch Zugabe von 3-5 µM AraC inhibiert, so dass die auf den Deckgläsern ausplattierten Astrozyten innerhalb von 2-3 Wochen zu etwa 300 µm breiten, voneinander getrennten Astrozyteninseln heranwuchsen (modifiziert nach **Brigadski et al., 2005**).

### 3.2.3 Präparation primärer hippokampaler Neurone

Postnatale Mäuse (P0-P3) wurden dekapitiert und die Schädeldecke mit einem Skalpell mittig aufgetrennt. Das Gehirn wurde entnommen und in eine Präparierschale mit vorgekühltem mPBS<sup>+/+</sup> überführt. Aus beiden Gehirnhälften wurde mit Hilfe eines Skalpells der Hippokampus präpariert, mehrfach eingeschnitten und in einem mit mPBS<sup>+/+</sup> befülltem Reaktionsgefäß auf Eis gelagert. Anschließend wurde der Puffer durch mPBS<sup>-/-</sup> ersetzt und das Gewebe in Anwesenheit von 0,25 % Trypsin bei 37 °C im Thermomixer bei 800 rpm entsprechend **Tab. 3.2** geschüttelt. Nach Trituration des Gewebes wurde die Zellsuspension zu einem vorgekühltem, mit 3 ml BME/10 % FCS befülltem Kulturröhrchen pipettiert. Die Zellen wurde für 10 min bei 4 °C und 1100 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in 3 ml BME/10 % FCS resuspendiert. Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurde die Zelldichte bestimmt und dann 2 x 10<sup>6</sup> Zellen in einer Kulturschale (6 cm) für ca. 1 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> präplattiert. Die nicht-adhärenenten Neurone wurden durch Abnehmen des Überstandes

von den am Kulturschalenboden adhärierenden Astrozyten getrennt und in ein Kulturröhrchen (15 ml) pipettiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 1100 rpm wurden die Neurone pelletiert und das Zellpellet in 2-3 ml BME/10 % FCS resuspendiert. Anschließend wurden die Neurone auf die im Schritt zuvor präparierten, 2-3 Wochen alten Astrozyteninseln ausplattiert und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert, um adhärente Verbindungen der Neurone mit den Astrozyteninseln aufzubauen. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium von BME/10 % FCS auf NB/2 % B27 umgestellt und die Neurone für ca. 7-9 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert (modifiziert nach **Lessmann & Heumann, 1998**).

### 3.2.4 Transfektion mittels Kalziumphosphat-Präzipitation

Primäre hippokampale Neurone (DIV 7-9) wurden durch Kalziumphosphat-Präzipitation transfiziert. Hierbei wurde bis zu 4,5 µg Plasmid-DNA (1 µg/µl) pro 3,5 cm Kulturschale in einem Reaktionsgefäß in 27,6 µl sterilem Wasser vorgelegt. Unter Verwendung eines Kreisschüttlers (*Vortex*) wurden tropfenweise 4,9 µl einer 2 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung zur DNA-Lösung hinzu pipettiert. Anschließend wurden 37 µl 2x BBS Puffer ebenfalls tropfenweise unter Schütteln hinzu pipettiert und die Lösung für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde ein weiteres Reaktionsgefäß mit 800 µl NB/B27 Medium befüllt und durch Zugabe von 1 µl einer 1 M, sterilen NaOH-Lösung der pH-Wert erhöht. Danach wurden die 74 µl der Transfektionslösung tropfenweise unter Verwendung des Kreisschüttlers zu den 800 µl NB/B27 Medium pipettiert und anschließend die Lösung mit jeweils 2 µl D/L-APV-Lösung (50 mM) und 2 µl DNQX-Lösung (5 mM) versetzt. Danach wurde die Lösung in die Kulturschale (3,5 cm) von 7 bis 9 Tage alten primären hippokampalen Neurone pipettiert, nachdem zuvor das konditionierte Medium aus den Kulturschalen in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß abgenommen wurde. Die Neurone in den Kulturschalen und die 2,0 ml Reaktionsgefäße mit konditioniertem Medium wurden für 2,5 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Neurone zwei Mal in 37 °C warmen HBS<sup>0/3</sup> Puffer gewaschen. Zum Schluss wurde das konditionierte Medium wieder in die Kulturschale der primären Neurone pipettiert und die Neurone bis zu ihrer Verwendung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank gelagert (modifiziert nach **Haubensak et al., 1998**).

### 3.3 Immunozytochemie

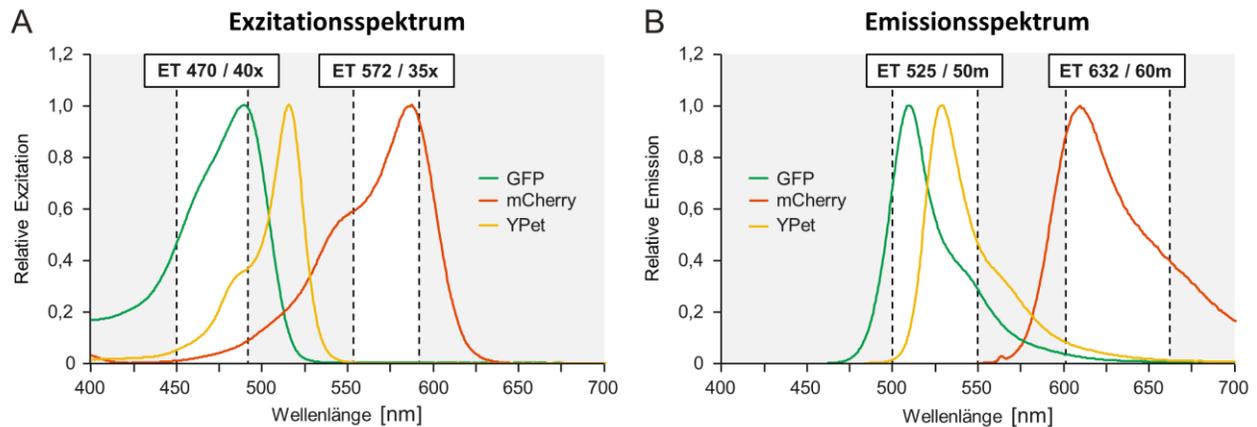
Deckgläser mit primären hippokampalen Neuronen wurden kurz in PBS gewaschen und anschließend mit 4 % PFA in PBS für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Das Fixativ wurde durch dreimaliges Waschen in PBS entfernt und die Lösung anschließend mit 0,3 % Triton X in PBS permeabilisiert. Danach wurden die Zellen erneut zwei Mal in PBS gewaschen und unspezifische Antikörperbindestellen durch Inkubation der Zellen für 30 min in Blockierlösung (10 % BSA; 0,1 % Triton X in PBS) abgesättigt. Die Zellen wurden anschließend für 2h bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper (Verdünnung: 1:1000) in Antikörperlösung (1 % BSA; 0,1 % Triton X in PBS) inkubiert. Als Negativkontrolle wurden einige Deckgläschen mit der Antikörperlösung ohne Primärantikörper inkubiert. Die Zellen wurden vier Mal in PBS gewaschen und danach für 2 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (Alexa Fluor 350, 488, 568 oder 633, 1:1000 verdünnt) in Antikörperlösung inkubiert. Nach viermaligem Waschen der Zellen in PBS wurden die Deckgläser kurz in deionisiertem Wasser eingetaucht und dann mit Immomount auf einem Objektträger eingedeckelt. Gegebenenfalls wurden fixierte Präparate, die nicht mit Antikörpern gefärbt werden sollten, bereits nach dem Auswaschen des Fixativs in Immomount eingedeckelt.

### 3.4 Fluoreszenzmikroskopie

#### 3.4.1 Epifluoreszenz Mikroskopie

Lebendzellaufnahmen in Form von *Timelapse*-Videos oder Einzelbilder aus lebenden oder fixierten Proben wurden an einem aufrechten Epi-Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX51WI) aufgenommen. Als Lichtquelle zur Fluoreszenzanregung diente eine Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe (HXP 120C), dessen Licht durch ein an das Mikroskop montiertes Filterrad gefiltert wurde. Die Positionen des jeweiligen Filters und des *Shutters* wurden von einer zentralen Regeleinheit (LUDL) elektronisch angesteuert. Es wurde jeweils ein Bandpassfiltersatz zur Anregung grüner Fluoreszenz (ET 470 / 40x, ET 525 / 50m) sowie einem Bandpassfiltersatz zur Anregung roter Fluoreszenz (ET 572 / 35x, ET 632 / 60m) verwendet (**Abb. 3.5**). Des Weiteren verfügte das Mikroskop über einen Filtersatz zur Anregung von blauer Fluoreszenz (F31-000 DAPI). Das Mikroskop war mit

einem 10x (n.A. = 0,3) und einem 60x (n.A. = 1,1) Wasserimmersionsobjektiv ausgestattet und wurde elektromechanisch mittels Mikromanipulatoren (Luigs & Neuman) sowohl in der XY- als auch in der Z-Achse in Relation zum Objektisch bewegt. Die Bilder wurden mit einer gekühlten CCD-Kamera (CoolSNAP HQ<sup>2</sup>) aufgenommen.



**Abb. 3.5: Verwendete Bandpassfiltersätze zur Mikroskopie von GFP, YPet und mCherry. (A)** Anregungsspektren der fluoreszierenden Proteine GFP, YPet und mCherry in Relation zu den verwendeten Anregungsfiltern. **(B)** Emissionsspektren von GFP, YPet und mCherry in Relation zu den verwendeten Emissionsfiltern. Der lichtdurchlässige Wellenlängenbereich der Filter ist jeweils als weiße Fläche dargestellt. Daten der Spektren stammen von der freien online Spektraldatenbank „PubSpectra“. Quelle: <http://www.pubspectra.org>.

### 3.4.2 Bildakquise und Bilddatenauswertung

Einzelbilder und *Timelapse*-Videos wurden unter Steuerung der Software VisiView aufgenommen. Die Bildaufnahmefrequenz und die Belichtungszeit reichten je nach Experiment von 0,25 bis 0,1 Hz bzw. 300 bis 2000 ms. Bei *Timelapse*-Aufnahmen wurde der Fokus in z-Richtung manuell stabil gehalten und ggf. korrigiert. Bildinformationen wurden als 14 bit TIF-Dateien entweder als Einzelbilder oder als Bilderstapel gespeichert. Zur Auswertung wurden die Rohbilddaten in Metamorph importiert und Regionen um die zu untersuchenden Zellstrukturen (z.B. Soma, synaptische Boutons, dendritische Regionen, einzelne Vesikel) definiert. Für *Timelapse*-Aufnahmen wurden Regionen ggf. vergrößert um kleine Bewegungen der Strukturen innerhalb der Fokusebene auszugleichen. In der Nähe jeder Region wurde eine weitere Region im Bildhintergrund definiert. Entsprechend der Fragestellung wurden verschiedene Parameter ermittelt. Für Größenbestimmungen wurde die Fläche der entsprechenden Region ermittelt. Bei *Timelapse*-Aufnahmen wurde die

durchschnittliche Fluoreszenzintensität der zu untersuchenden Region bestimmt und davon die durchschnittliche Fluoreszenzintensität des Bildhintergrunds für jeden einzelnen gemessenen Zeitpunkt subtrahiert. Die so erhaltenen Werte wurden auf den Zeitpunkt vor der Stimulation normalisiert. Mittels exponentieller Regression wurde eine Kurve ermittelt, die dem Licht-induzierten Bleichverhalten der Fluoreszenzintensität während der Aufnahme der Basislinie entsprach. Alle Werte wurden anschließend um die Werte der Bleichkurve korrigiert und die so erhaltenen Kurvenwerte von mehreren Regionen pro Zelle gemittelt um die durchschnittliche Fluoreszenzkinetik der entsprechenden Zellstrukturen pro Zelle zu bestimmen. Für die Bestimmung der Zeitkonstante  $\tau$  des exponentiellen Fluoreszenzabfalls wurden Maximalwert (gesetzt als 1) und Minimalwert (gesetzt als 0) der Fluoreszenzintensität umskaliert und anschließend die Werte mit Hilfe folgender Gleichung exponentiell angepasst:

$$F(t) = e^{-\frac{t}{\tau}} \quad \text{mit } F(t) = \text{Fluoreszenzwert zum Zeitpunkt } t$$

Für die Bestimmung der Dichte BDNF-GFP-beinhaltenender Vesikel wurden mehrere Regionen um Neurite des Neurons definiert. Anschließend wurde die Anzahl der BDNF-GFP-beinhaltenenden Vesikel bestimmt und durch den Flächeninhalt der jeweiligen Region dividiert.

### 3.4.3 Videomikroskopische Untersuchungen

#### 3.4.3.1 Lokales Perfusionssystem für das Mikroskop

Für die gezielte Applikation von verschiedenen Lösungen über einzelne Zellen wurde ein lokales Perfusionssystem verwendet (**Lessmann & Dietzel, 1995**). Mit Hilfe von 10 ml Einwegpipetten und abgeschnittenen und glattgefeilten Metallkanülen wurden jeweils eine Zu- und Ablaufpipette konstruiert. An der Spitze wurde eine modifizierte Pipettenspitze aufgesetzt, die sich an ihrer Spitze verjüngt um nur ein möglichst kleines Volumen Flüssigkeit zu- oder ablaufen zu lassen. Bei der Zulaufpipette wurden bis zu 6 Kanülen zu verschiedenen Pipetteneingängen gebündelt, so dass verschiedene Flüssigkeiten nacheinander über die Zelle gespült werden konnten. Die Eingänge wurden über dünne Plastikschläuche an ein höher gelegenes Flüssigkeitsreservoir angeschlossen, welches

durch ein Ventil gesteuert wurde und mit Hilfe des hydrostatischen Drucks die Flüssigkeit in die Zulaufpipette drückt. Der Ablauf bestand aus einer Kanüle, deren Ausgang die Flüssigkeit über einen dünnen Plastikschauch auf ein tiefergelegenes Ausgangsventil entlässt. Vor jeder Messung wurde die Funktionsfähigkeit der Zu- und Ablaufpipette im 10x Objektiv überprüft und der hydrostatische Druck so eingestellt, dass der sichtbaren Flüssigkeitsstrom das Sichtfeld des 60x Objektivs vollständig überspülen konnte.

### 3.4.3.2 Färbung und Entfärbung synaptischer Boutons mit FM-Farbstoffen

Primäre hippokampalen Neuronen wurden in eine 24-Well Mikrotiterplatte überführt und unter Lichtabschluss für 2 min in HBSK<sup>2/1</sup>, versetzt mit 10 µM FM1-43 bzw. FM4-64, inkubiert, um die synaptischen Boutons der Zelle einzufärben. Anschließend wurden die Deckgläser zwei Mal für 2 min in HBS<sup>0/3</sup> gewaschen und danach in eine mit HBS<sup>2/1</sup> befüllte Badkammer überführt. Unter dem Mikroskop wurden FM-gefärbte shRNA-Vektor-transfizierte oder untransfizierte Zellen gesucht und das lokale Perfusionssystem um diese Zellen arrangiert. Die Neurone wurden anschließend durch das 60x Objektiv alle 4 s für 500 ms mit gefiltertem Licht zur Anregung der grünen FM1-43 Fluoreszenz exponiert, das dabei emittierte Licht fotodokumentiert und die Bilder zu einem *Timelapse* Video zusammengesetzt. Zunächst wurde die Zelle für 80 s mit HBS<sup>2/1</sup> überspült, um anhand der Basislinie das Licht-induzierte Bleichverhalten des FM1-43 Farbstoffes zu bestimmen. Anschließend wurde die Zelle 80 s lang mit HBSK<sup>2/1</sup> stimuliert und dann wieder 60 s lang mit HBS<sup>2/1</sup> überspült. Sowohl die Färbung der synaptischen Boutons als auch die Aufnahme der Entfärbekinetik erfolgte bei Raumtemperatur (modifiziert nach **Klau et al., 2001**).

### 3.4.3.3 Fusionsporenöffnung von BDNF-GFP-beihaltenden sekretorischen Granula

Primäre hippokampale Neurone wurden mit BDNF-GFP-kodierenden Vektoren transfiziert und 5 Tage nach der Transfektion in eine mit HBS<sup>2/1</sup> befüllte Badkammer überführt. Nach Identifikation eines transfizierten Neurons wurde das lokale Perfusionssystem um die Zelle arrangiert und die Zelle mit HBS<sup>2/1</sup> Puffer, dem 0,3 mM Bromphenolblau versetzt war, überspült. Durch das 60x Objektiv wurde die Fluoreszenz von BDNF-GFP alle 5 s für 300 bis 1500 ms mit blauem Licht angeregt und das grüne Emissionslicht photodokumentiert. Nach Aufnahme einer 5-minütigen Basislinie wurde das Neuron durch das Überspülen von einem mit 0,3 mM Bromphenolblau versetzten HBSK<sup>2/1</sup> Puffer 5 min stimuliert. Anschließend

wurde die Zelle nochmals für weitere 5 min mit Bromphenolblau-haltigem HBS<sup>2/1</sup> Puffer überspült und das Fluoreszenzlicht photodokumentiert (modifiziert nach **Kolarow et al., 2007**). Für einige Fragestellungen wurde der HBS<sup>2/1</sup> bzw. HBSK<sup>2/1</sup> Puffer durch äquimolaren Austausch von 5 mM NaCl mit NH<sub>4</sub>Cl oder durch Zugabe von 1 µM Bafilomycin modifiziert oder den Puffern Inhibitoren für synaptische Transmission beigefügt (5 µM DNQX, 50 µM D/L-AP5, 100 µM Picrotoxin).

#### 3.4.3.4 Ausschüttung aus BDNF-GFP-beinhaltenden sekretorischen Granula

Die Aufnahme der Ausschüttungskinetik von BDNF-GFP aus sekretorischen Granula erfolgte analog dem in 3.4.3.3 beschriebenen Protokoll zur Fluoreszenzmessung. Jedoch wurden die Zellen mit Bromphenolblau-freiem HBS<sup>2/1</sup> und HBSK<sup>2/1</sup> Puffern überspült und erst nach Abschluss des Messprotokolls ein mit Bromphenolblau-haltiger HBS<sup>2/1</sup> Puffer überspült. Bei einigen Experimenten wurde der HBS<sup>2/1</sup> bzw. HBSK<sup>2/1</sup> Puffer durch äquimolaren Austausch von 5 mM NaCl mit NH<sub>4</sub>Cl oder durch Zugabe von 1 µM Bafilomycin modifiziert oder den Puffern Inhibitoren für synaptische Transmission beigefügt (5 µM DNQX, 50 µM D/L-AP5, 100 µM Picrotoxin).

#### 3.4.3.5 Messungen der Vesikeleigenschaften unter Verwendung von NH<sub>4</sub>Cl

Primäre hippocampale Neurone wurden mit BDNF-GFP-kodierenden Vektoren transfiziert und 5 Tage nach der Transfektion in eine mit HBS<sup>2/1</sup> befüllte Badkammer transferiert. Unter dem Mikroskop wurden die Neurone zunächst mit HBS<sup>2/1</sup> überspült und die Basisfluoreszenz einzelner BDNF-GFP-beinhaltender Vesikel alle 5s bei einer einheitlichen Belichtungszeit von 500 ms gemessen. Danach wurden die Zellen mit HBS<sup>2/1</sup> Puffer überspült, bei dem NaCl äquimolar durch NH<sub>4</sub>Cl ausgetauscht wurde (2 mM, 5 mM, 20 mM oder 50 mM). Abschließend wurde die Zelle erneut mit HBS<sup>2/1</sup> Puffer ohne NH<sub>4</sub>Cl überspült. Für einige Kontrollexperimente wurde der HBS<sup>2/1</sup> Puffer mit 5 mM NH<sub>4</sub>Cl bzw. ohne NH<sub>4</sub>Cl bei verschiedenen pH-Werten (pH 5,00-8,00) überspült. Aus dem Intensitätsanstieg der GFP-Fluoreszenz durch das Überspülen mit 50 mM NH<sub>4</sub>Cl-haltigem HBS<sup>2/1</sup> Puffer wurde mit Hilfe der umgeformten Henderson-Hasselbalch Gleichung (vergleiche **Rangaraju et al., 2014**) der vesikuläre pH-Wert kalkuliert:

$$pH_{Vesikel} = pK_{a(eGFP)} - \log \left[ \left( \frac{1 + 10^{pK_{a(eGFP)} - pH}}{\frac{F_{NH_4Cl=0mM}}{F_{NH_4Cl=50mM}}} \right) - 1 \right]$$

Dabei wurde ein pKa-Wert von eGFP von 6,0 angenommen (siehe **Kneen et al., 1998**). Der in der Gleichung verwendete pH-Wert entsprach dem pH-Wert der Messung (pH = 7,39).  $F_{\text{NH}_4\text{Cl}=0\text{mM}}$  entsprach der vesikulären Fluoreszenzintensität während Aufnahme der Basislinie und  $F_{\text{NH}_4\text{Cl}=50\text{mM}}$  entsprach der vesikulären Fluoreszenzintensität während des Überspülens von 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

#### 3.4.3.6 Messung intrazellulärer pH-Werte

Primäre hippokampale Neurone wurden entweder mit BDNF-GFP bzw. GFP-kodierenden Vektoren transfiziert. Fünf Tage nach der Transfektion wurden die Zellen in eine Badkammer, befüllt mit Kalzium-freiem HBS<sup>0/3</sup>, überführt und die Basisfluoreszenz alle 5s (GFP) oder alle 10s (BDNF-GFP) gemessen. Anschließend wurden die Neurone nacheinander mit fünf Pufferlösungen (MES- oder HEPES-haltige Puffer zur pH-Wertmessung) überspült, die auf verschiedene pH-Werte (pH=8 bis pH=4) eingestellt waren. Den Puffern waren 4  $\mu\text{M}$  Valinomycin und 10  $\mu\text{M}$  Nigericin zugesetzt, so dass Protonen über die Zell- und Vesikelmembran hinweg ausgetauscht werden konnten. Die Plateauwerte der relativen Fluoreszenzveränderung zur Basislinie einzelner Vesikel (BDNF-GFP), dendritischer Regionen (GFP) oder des Somas (GFP) wurden bestimmt und entsprechend dem pH-Wert des Puffers graphisch aufgetragen. Anschließend wurden die Datenpunkte mit Hilfe der Boltzmann-Gleichung (Origin) für sigmoide Kurvenverläufe angepasst und die Anpassungsgleichung benutzt, um den ursprünglichen pH-Wert der entsprechenden Strukturen während der Aufnahme der Basislinie zu extrapolieren.

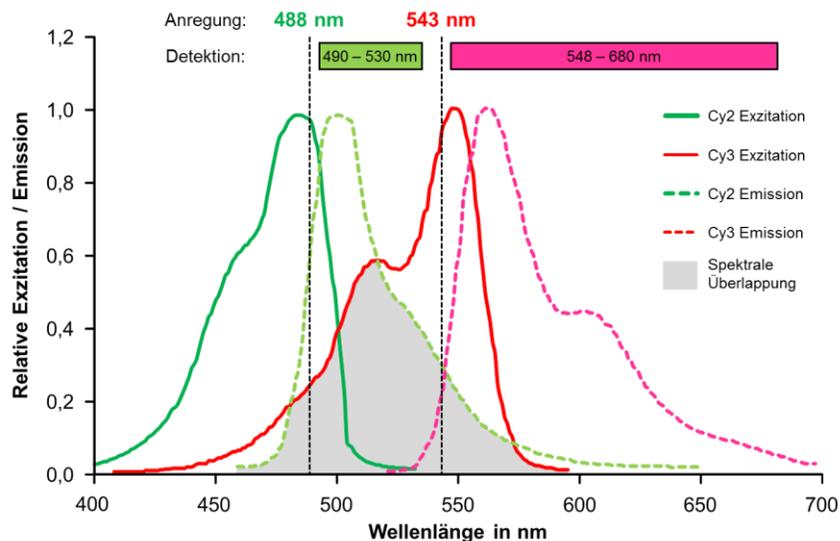
#### 3.4.4 Konfokale Mikroskopie

Für Kolokalisationsstudien wurde ein konfokale *Laserscanning*-Einheit (LSM 780), angebracht an einem aufrechten Mikroskop (Axio Examiner.Z1), verwendet. Fixierte Präparate von transfizierten oder mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbten Zellen wurden unter einem 20x Wasserimmersionsobjektiv (n.A. = 1,0) betrachtet. Anschließend wurde die Fluoreszenz mit Hilfe von Laserlicht (Argon-Laser mit einer Laserlinie von 488 nm; Helium/Neon-Laser mit Laserlinien von 543 nm und 633 nm) angeregt und mehrere Fokalebene (gesamte Schichtdicke 2  $\mu\text{m}$ ) Bildpunkt für Bildpunkt abgetastet. Das Fluoreszenzlicht wurde gefiltert und auf GaAsP- oder PMT-Detektoren detektiert. Die Bildakquise erfolgte mit Hilfe der ZEN-Software (Zeiss) als 12 bzw. 16 bit Bilddatei mit

einer Auflösung von 0,1  $\mu\text{m}$  / Pixel. Die Laser- und Detektorstärke wurden so gewählt, dass die zu untersuchenden Strukturen vom Hintergrund abgrenzbar waren, ohne den Detektor in die Sättigung zu bringen.

### 3.4.5 FRET-Experimente

Für die Untersuchung einer potentiellen Protein-Protein-Interaktion wurden Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) Experimente durchgeführt. Primäre hippokampale Neurone wurden an DIV 14 mit primären Antikörpern gegen CAPS1 bzw. v-Typ-ATPase angefärbt und anschließend mit Sekundärantikörpern gekoppelt an Cy2 (v-Typ-ATPase) oder Cy3 (CAPS1) gegengefärbt. Das bei räumlicher Nähe beider Fluorophore auftretende FRET wurde mit Hilfe des Akzeptorphotobleichens bestimmt. Hierbei wurden zunächst am konfokalem *Laserscanning*-Mikroskop (LSM 780) die Cy2-Immunfluoreszenz (FRET-Donor) und die Cy3-Immunfluoreszenz (FRET-Akzeptor) der hippokampalen Neurone mit Hilfe der 488 nm (10 % Laserstärke) bzw. 543 nm (1 % Laserstärke) Laserlinien photodokumentiert.



**Abb. 3.6: Spektrale Einstellungen der FRET-Messung zwischen Cy2 und Cy3.** Exzitations- und Emissionsspektren der Fluorophore Cy2 (grün) und Cy3 (rot). Sowohl die zur Fluoreszenzanregung verwendeten Laserlinien, als auch der zur Detektion verwendete Wellenlängenbereich, sind kenntlich gemacht worden. Die graue Fläche zeigt die für FRET essentielle spektrale Überlappung des Emissionsspektrums des FRET-Donors (Cy2) mit dem Exzitationspektrums des FRET-Akzeptors (Cy3). Daten der Spektren stammen von der freien online Spektraldatenbank „PubSpectra“. Quelle: <http://www.pubspectra.org>.

Anschließend wurde die Cy3-Fluoreszenz mit Hilfe der 543 nm Laserlinie (100 % Laserstärke) in einer ausgewählten dendritischen Region auf unter 10% seiner initialen Fluoreszenzintensität gebleicht. Nach dem Akzeptorphotobleichen wurde die Cy2- und Cy3-Immunfluoreszenz der Zelle erneut photodokumentiert. Ein FRET-Signal wurde dabei als eine Zunahme der Cy2-Fluoreszenz ausschließlich in der Cy3-gebleichten Region beobachtet. Die FRET-Effizienz innerhalb der Cy2-gebleichten Region wurde mit Hilfe folgender Gleichung bestimmt (vergleiche **König et al., 2006**),

$$FRET_{eff} = \frac{IF_{post} - IF_{pre}}{IF_{post}} \times 100 \%$$

wobei  $IF_{pre}$  die Immunfluoreszenz des FRET-Donors (Cy2) vor und  $IF_{post}$  die Immunfluoreszenz des FRET-Donors (Cy2) nach dem Akzeptorphotobleichen darstellt.

## 3.5 Neuronale Differenzierung embryonaler Stammzellen

### 3.5.1 Herstellen Mitomycin-behandelter Futterzellen

Zur Herstellung von Futterzellen wurden ca.  $5,5 \times 10^6$  MEF-Zellen (*mouse embryonic fibroblasts*, Chemicon) in 20 ml Mef-Medium suspendiert und auf insgesamt acht Kulturschalen (15 cm) ausplattiert und dann für ca. 3-5 Tage bis zum Erreichen eines konfluenten Zellrasens bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurden die Zellen passagiert, in dem sie zweimal in 1x PBS gewaschen, dann mit Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin und 0,53 mM EDTA) für 4 min auf 37 °C vom Schalenboden gelöst und die Trypsinreaktion durch Zugabe von 5 ml Mef-Medium gestoppt wurde. Die Zellen wurden dann für 4 min bei 1000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in 20 ml frischem Mef-Medium resuspendiert. Jeweils ein Viertel der Zellsuspension wurde auf 4 neue Kulturschalen (15 cm) ausplattiert und erneut bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Durch mehrfaches Wiederholen der Passage wurde die MEF-Zellmasse vermehrt. Zur Mitomycinbehandlung wurde das Mef-Medium aus 20 Kulturschalen mit MEF-Zellen durch jeweils 10 ml Mitomycin-C-haltiges (10 µg/ml) Mef-Medium pro Kulturschale ersetzt und die Zellen für 2-4 h bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden anschließend

dreimal in 1x PBS gewaschen und vereint, in dem sie mit Trypsin-EDTA-Lösung vom Schalenboden gelöst, pelletiert und anschließend in insgesamt 50 ml frischem Mef- Medium resuspendiert wurden. Nach Bestimmung der Zelldichte mit Hilfe einer Neubauerzählkammer wurden entweder  $4 \times 10^6$  Zellen aliquotiert und für den späteren Gebrauch eingefroren oder  $3,5 \times 10^6$  Zellen als Mitomycin-behandelte Futterzellen für die Kultivierung embryonaler Stammzellen in 10 ml Mef-Medium auf eine Kulturschale (10 cm) ausplattiert (modifiziert nach **Hogan et al., 1994**).

### 3.5.2 Einfrieren Mitomycin-behandelter Futterzellen

Ca.  $4 \times 10^6$  MEF-Zellen wurden in einem Kryogefäß vorgelegt und das Kulturvolumen auf 500 µl mit Mef-Medium aufgefüllt. Anschließend wurden die Zellen auf Eis gestellt und tropfenweise 500 µl eiskaltes 2x Einfriermedium hinzu pipettiert. Die Zellen wurden dann in  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  temperiertes Isopropanol getaucht, für 1 h bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert und anschließend bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.5.3 Kultivierung der embryonalen Stammzellen auf Futterzellen

$3 \times 10^6$  embryonale Stammzellen der Maus (Linie V6.5, Open Biosystems) wurden auf eine Kulturschale (10 cm) mit Mitomycin-behandelten Futterzellen ausplattiert und in 10 ml ES-Zellmedium, welchem 0,1 % des Pluripotenzfaktors LIF (*leukemia inhibitory factor*) zugesetzt war, für 2-4 Tage bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  und 10 %  $\text{CO}_2$  kultiviert bis mikroskopisch sichtbare Stammzellkolonien auf den Futterzellen gewachsen waren. Anschließend wurde die Mischkultur aus MEF-Zellen und embryonalen Stammzellen passagiert, die Zellsuspension je nach Zelldichte auf 2 bis 3 neue Kulturschalen (10 cm) mit Mitomycin-behandelten Futterzellen aufgeteilt und die Zellen in 10 ml LIF-haltigem ES-Zellmedium erneut bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  und 10 %  $\text{CO}_2$  kultiviert. Durch wiederholtes Passagieren wurden die embryonalen Stammzellen kontinuierlich vermehrt und ggf. embryonale Stammzellen für die Bildung von Embryoidkörpern entnommen (modifiziert nach **Hogan et al., 1994**).

### 3.5.4 Bildung von Emryoidkörpern

Ein Teil der kontinuierlich auf Mitomycin-behandelten MEF-Zellen vermehrten embryonalen Stammzellen wurde nach einem Passagierungsschritt auf eine mit Gelatine (0,1 %) beschichtete Kulturschalen (10 cm) ausplattiert (1:2 verdünnt) und in 10 ml LIF-

haltigem ES-Zellmedium für einen Tag bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Durch einen weiteren Passagierungsschritt (1:2, auf Gelatine ausplattiert) wurde der Anteil der nicht-teilungsfähigen, Mitomycin-behandelten Futterzellen reduziert, während die an Gelatine adhären den embryonalen Stammzellen weiter vermehrt wurden. Anschließend wurden ca. 2 x 10<sup>6</sup> der auf Gelatine kultivierten embryonalen Stammzellen auf eine unbeschichtete Kulturschale (10 cm) in 10 ml LIF-freiem Differenzierungsmedium ausplattiert und für 2 Tage bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> kultiviert, bis die am Schalenboden nicht-adhären ten embryonalen Stammzellen zu mit dem Auge sichtbaren, in der Flüssigkultur schwimmenden Embryoidkörpern zusammen gewachsen waren. Die Embryoidkörper wurden durch schwenken der Kulturschale in der Schalenmitte konzentriert und das Medium vorsichtig am Rand abgesaugt. Das Medium wurde durch frisches Differenzierungsmedium ersetzt und die Zellen für weitere 2 Tage bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> kultiviert (modifiziert nach **Hogan et al., 1994**).

### 3.5.5 Neuronale Differenzierung der embryonalen Stammzellen

Die in der Kulturschale schwimmenden Embryoidkörper wurden vorsichtig mit einer Pipette in ein Kulturröhrchen (15 ml) überführt. Nachdem sich die Embryoidkörper unten abgesetzt hatten, wurde das Medium vorsichtig abgesaugt. Die Zellen wurden dann in 10 ml Differenzierungsmedium, dem 5 µM *all-trans*-Retinsäure zugesetzt war, nochmals für zwei weitere Tage auf unbeschichteten Kulturschalen bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Embryoidkörper wurden erneut mit der Pipette in ein Kulturröhrchen (15 ml) überführt und das Medium abgesaugt. Anschließend wurden die Embryoidkörper auf mit Polyornithin (0,5 mg/ml) beschichtete Kulturschalen (10 cm) in 10 ml NB/B27 ausplattiert und für 7 Tage bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> ohne weiteren Mediumwechsel kultiviert. Während der neuronalen Differenzierung bildeten die äußeren Zellschichten der Embryoidkörper lichtmikroskopisch sichtbare Ausläufer, mit denen sich die Embryoidkörper an das Polyornithinsubstrat anhefteten (modifiziert nach **Hogan et al., 1994**).

### 3.5.6 Dissoziation der Embryoidkörper und Kultivierung der neuronal differenzierten Stammzellen

Die Embryoidkörper wurden in 4 ml PBS mit einem Zellschaber vom Schalenboden gelöst, in ein Kulturröhrchen (15 ml) überführt und für 1 min bei 1200 rpm pelletiert.

Anschließend wurde das Zellpellet in 4 ml DPBS<sup>+/+</sup> resuspendiert und Zell-Zell-Verbindungen in Anwesenheit von 165 U Papain und 1000 U DNase für 45 min bei 37 °C enzymatisch aufgelöst. Die Zellen wurden erneut für 1 min bei 1200 rpm pelletiert und zur Inhibition der Papainreaktion in 5 ml Ovomucoidlösung (0,6 % Ovomuciod; 0,3% BSA) aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen wiederum pelletiert und in 1 ml niedrig konzentrierter Ovomucoidlösung (0,15 % Ovomucoid; 0,0075 % BSA; 300 U DNase) resuspendiert. Durch mehrfaches Trituieren wurden die Zellen der Embryoidkörper vereinzelt und durch kurzes Absetzen lassen von undissoziierten Embryoidkörperfragmenten getrennt. Die vereinzelteten Zellen aus dem Überstand wurden in ein neues Kulturröhrchen (15 ml) überführt und 10 min bei 900 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einer geeigneten Menge NB/B27-Medium (500-1000 µl) resuspendiert und die dissoziierten Zellen auf Polyornithin (0,5 mg/ml) und Laminin (5 µg/ml) beschichtete Deckgläsern bzw. Deckgläsern mit Astrozyteninseln (vergleiche 3.2.3) zu einer Konzentration von ca.  $3,8 \times 10^4$  Zellen / cm<sup>2</sup> ausplattiert und für 7 – 14 Tage bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

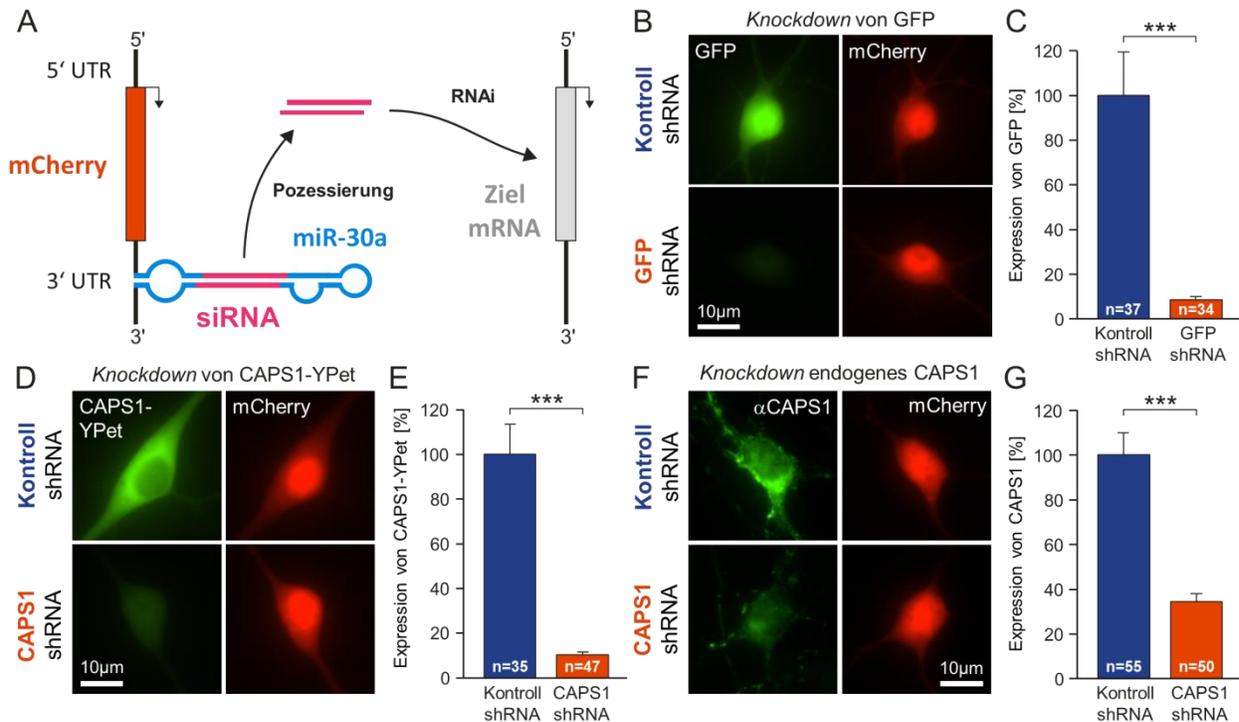
### 3.6 Statistik

Es wurden jeweils mehrere Zellen (n = Anzahl der Zellen) statistisch miteinander verglichen, wobei sich der Wert für eine einzelne Zelle aus dem Mittelwert mehrerer definierter Regionen um entweder synaptische Boutons, Dendriten oder einzelne Vesikel ergab. Für den Vergleich von zwei experimentellen Bedingungen (z.B. Kontroll- und CAPS1-shRNA-transfizierte Neuronen) wurden zweiseitige t-Tests durchgeführt. Für den Vergleich von mehr als zwei experimentellen Bedingungen wurde eine Varianzanalyse (Einweg-ANOVA) mit anschließender Signifikanzzuordnung (*Post-Hoc*-Tukey-Test) durchgeführt. Für den Vergleich mehrerer Gruppen, die potentiell durch zwei verschiedene Faktoren beeinflusst werden konnten, wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (Zweiweg-ANOVA) durchgeführt. Für den statistischen Vergleich von Korrelationen wurden die Korrelationskoeffizienten  $r$  durch Fischer-Z-Transformation umgewandelt und anschließend statistisch miteinander verglichen. Die Berechnung der Signifikanzniveaus (p-Werte) erfolgte in Excel oder SPSS.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Quantifizierung des *Knock-downs* durch CAPS1-shRNA in primären hippocampalen Neuronen

Für die transiente Reduktion der Proteinexpression mittels RNA-Interferenz-Technologie (*Knock-down*) wurden die in 3.1.2 beschriebenen shRNA-Vektoren verwendet. Diese Vektoren stellen RNA-Polymerase II-abhängige shRNA-Plasmide dar, die im 3'-untranslatierten Bereich der Sequenz eines Markerproteins die Sequenz der Rahmenstruktur der mikro-RNA miR-30a kodieren. In diese Rahmenstruktur konnten verschiedene siRNA-Sequenzen gegen Zielproteine sowie Kontrollsequenzen eingefügt werden (**Christensen et al., 2010**). Dabei wird die miR-30a-Rahmenstruktur von der intrazellulären miRNA-Prozessierungsmaschinerie erkannt (**Zeng & Cullen, 2003**) und daraus eine shRNA-Sequenz abgespaltet, die dann zur RNAi-vermittelnden siRNA weiter prozessiert wird (**Abb. 4.1 A**). Um die Funktionalität dieses Expressionssystems zu testen, wurde zunächst ein gegen GFP gerichteter shRNA-Vektor kloniert. Bei der dafür verwendeten siRNA-Sequenz handelte es sich um eine bereits evaluierte siRNA-Sequenz gegen GFP (GFP-22 siRNA, Qiagen). Als Negativkontrolle wurde ein Kontroll-shRNA-Plasmid mit einer ebenfalls evaluierten Kontroll-siRNA-Sequenz kloniert (*Non silencing control* siRNA, Qiagen). Anschließend wurden primäre hippocampale Neurone der Maus mit den jeweiligen Kontroll- bzw. GFP-shRNA-kodierenden Vektoren (Marker: mCherry) und einem GFP-kodierenden Vektor (pEGFP-N1) kotransfiziert. Fünf Tage nach der Transfektion wurden mit Hilfe des Markerproteins mCherry gezielt shRNA-exprimierende Neurone identifiziert und die GFP-Fluoreszenzintensität dieser Neurone am Soma gemessen (**Abb. 4.1 B**). Im Vergleich zu Kontroll-shRNA transfizierten Neuronen (normalisiert auf 100 %) wurde dabei das GFP-Expressionsniveau in GFP-shRNA transfizierten Neuronen signifikant ( $p = 2,5 \times 10^{-5}$ ) auf  $8,5 \pm 1,4$  % reduziert (**Abb. 4.1 C**). Die *Knock-down*-Effizienz der CAPS1-siRNA-Sequenz wurde auf analoge Weise bestimmt, allerdings wurde statt dem GFP-kodierenden Vektor ein CAPS1-YPet kodierender Vektor verwendet (pEF-BOS-CAPS1-YPet-HA, **Sadakata et al., 2010**, freundlicherweise bereitgestellt von Prof. Dr. Teiichi Furuichi, RIKEN Brain Science Institute, Saitama, Japan).



**Abb. 4.1: Quantifizierung der Effizienz des shRNA-vermittelten Knock-downs.** Hippokampale Neurone wurden an DIV 7-8 mit shRNA-Vektoren transfiziert und die Effizienz des Knock-downs 5 Tage nach der Transfektion analysiert. **(A)** Schematische Darstellung des Knock-downs durch den shRNA-Vektor. Die verwendeten shRNA-Vektoren kodierten für ein fluoreszierendes Markerprotein (hier mCherry, rot) zur Selektion transfizierter Zellen sowie für eine siRNA (pink) gegen das Zielprotein im 3'-UTR des Markerproteins. Diese siRNA wurde in den Sequenzrahmen der Mikro-RNA miR-30a (blau) integriert, so dass die transkribierte mRNA eine Haarnadelstruktur (*short hairpin*) ausbildete, die von der intrazellulären Mikro-RNA-Prozessierungsmaschinerie erkannt und zur doppelsträngigen siRNA prozessiert wird. Der *anti-sense*-Strang dieser siRNA bindete an die entsprechende Ziel-mRNA und konnte so die Expression des Zielproteins mittels RNA-Interferenz (RNAi) reduzieren. **(B)** Repräsentative Bilder zweier hippocampaler Neurone, die mit Kontroll- bzw. GFP-shRNA-kodierenden Vektoren (rot-fluoreszierender mCherry-Marker) und einem GFP-kodierenden Vektor (grüne Fluoreszenz) kotransfiziert wurden. GFP-shRNA-transfizierte Zellen zeigten eine reduzierte Expression von GFP. **(C)** Quantifizierung der GFP-Fluoreszenzintensität im Soma von Kontroll- bzw. GFP-shRNA-transfizierten Neuronen (normalisiert auf Kontroll-shRNA, gesetzt als 100 %). **(D)** Repräsentative Bilder zweier hippocampaler Neurone, die mit Kontroll- bzw. CAPS1-shRNA kodierenden Vektoren (rot-fluoreszierender mCherry-Marker) und einem CAPS1-YPet-kodierenden Vektor (grüne Fluoreszenz) kotransfiziert wurden. CAPS1-shRNA-transfizierte Zellen zeigten eine reduzierte Expression von CAPS1-YPet. **(E)** Quantifizierung der YPet-Fluoreszenzintensität im Soma von Kontroll- bzw. CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen. **(F)** Repräsentative Bilder zweier hippocampaler Neurone, die mit Kontroll- bzw. CAPS1-shRNA-kodierenden Vektoren (rot-fluoreszierender mCherry-Marker) transfiziert und mit einem Antikörper gegen endogenes CAPS1 (grüne Fluoreszenz) angefärbt wurden. CAPS1-shRNA-transfizierte Zellen zeigten eine reduzierte CAPS1-Immunfluoreszenz. **(G)** Quantifizierung der CAPS1-Immunfluoreszenzintensität im Soma von Kontroll- bzw. CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen. n = Anzahl der gemessenen Zellen, \*\*\* p < 0,001, Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Hierbei wurde die somatische CAPS1-YPet-Fluoreszenz als Maß für die Expression von CAPS1-YPet gemessen. Im Vergleich zu Kontroll-shRNA-transfizierten Neuronen konnte dabei nach Transfektion der Neurone mit CAPS1-shRNA eine signifikante Reduktion ( $p = 5,8 \times 10^{-10}$ ) der CAPS1-YPet-Expression auf  $10,2 \pm 1,1$  % beobachtet werden (**Abb. 4.1 D-E**). Zusätzlich wurde der *Knock-down* von endogenem CAPS1 in hippokampalen Neuronen bestimmt. Hierzu wurden die Neurone mit jeweils Kontroll- bzw. CAPS1-shRNA-kodierenden Vektoren (Marker mCherry) transfiziert und nach weiteren fünf Tage mit einem Antikörper gegen CAPS1 (Sekundärantikörper gekoppelt an grün-fluoreszierendes Alexa 488) angefärbt. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität der CAPS1-Färbung am Soma gemessen. Auch hier konnte im Vergleich zu Kontroll-shRNA-transfizierten Neuronen eine signifikante Reduktion ( $p = 4,5 \times 10^{-7}$ ) der CAPS1-Immunfluoreszenz am Soma auf  $35,0 \pm 3,7$  % beobachtet werden (**Abb. 4.1 F-G**). Somit konnte in hippokampalen Neuronen sowohl die Überexpression von CAPS1 als auch die endogene Expression von CAPS1 durch die Transfektion mit CAPS1-shRNA-Vektoren erfolgreich reprimiert werden.

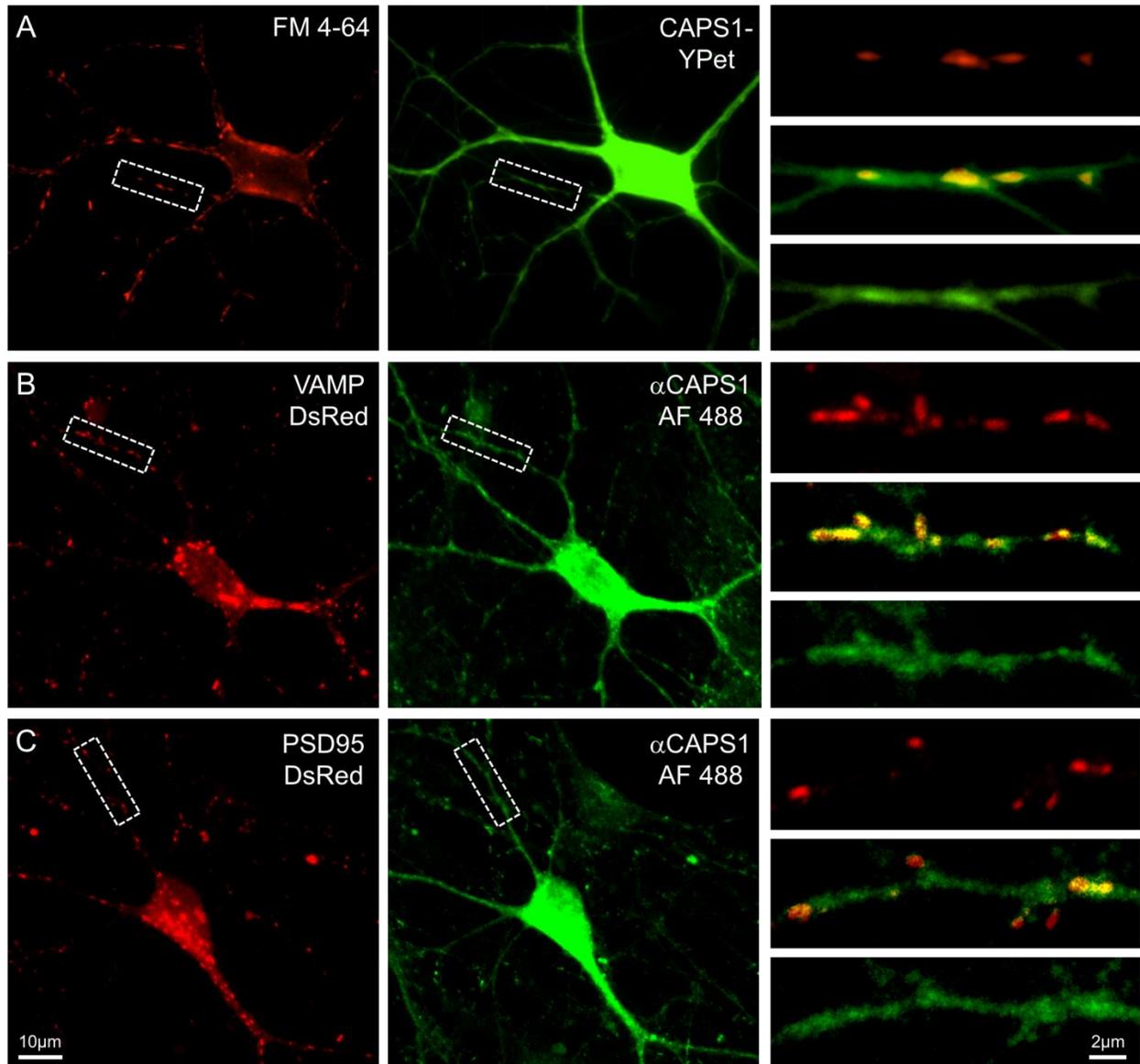
## 4.2 Lokalisation von CAPS1 in primären hippokampalen Neuronen

### 4.2.1 Das allgemeine Verteilungsmuster von CAPS1

Die zelluläre Verteilung von CAPS1 wurde sowohl in lebenden Neuronen nach Transfektion mit CAPS1-YPet als auch in fixierten Präparaten nach immunzytochemischer Färbung mit einem Antikörper gegen das endogene CAPS1-Protein untersucht. Für beide Ansätze ergab sich für CAPS1 ein ähnliches Verteilungsmuster in hippokampalen Neuronen. Am Soma wurde die stärkste CAPS1-YPet-Fluoreszenzintensität bzw. CAPS1-Immunreaktivität beobachtet, wobei der Nukleus jeweils eine geringere Fluoreszenzintensität aufwies (**Abb. 4.1 D, F**). Die Verteilung von CAPS1 setzte sich in den Neuriten fort und wurde in distalen Bereichen zunehmend schwächer. Neben einer homogenen CAPS1-Verteilung entlang einiger der Neuriten, konnte auch eine Konzentrierung von CAPS1 in kleinen Clustern beobachtet werden.

### 4.2.2 Die Lokalisation von CAPS1 in synaptischen Strukturen

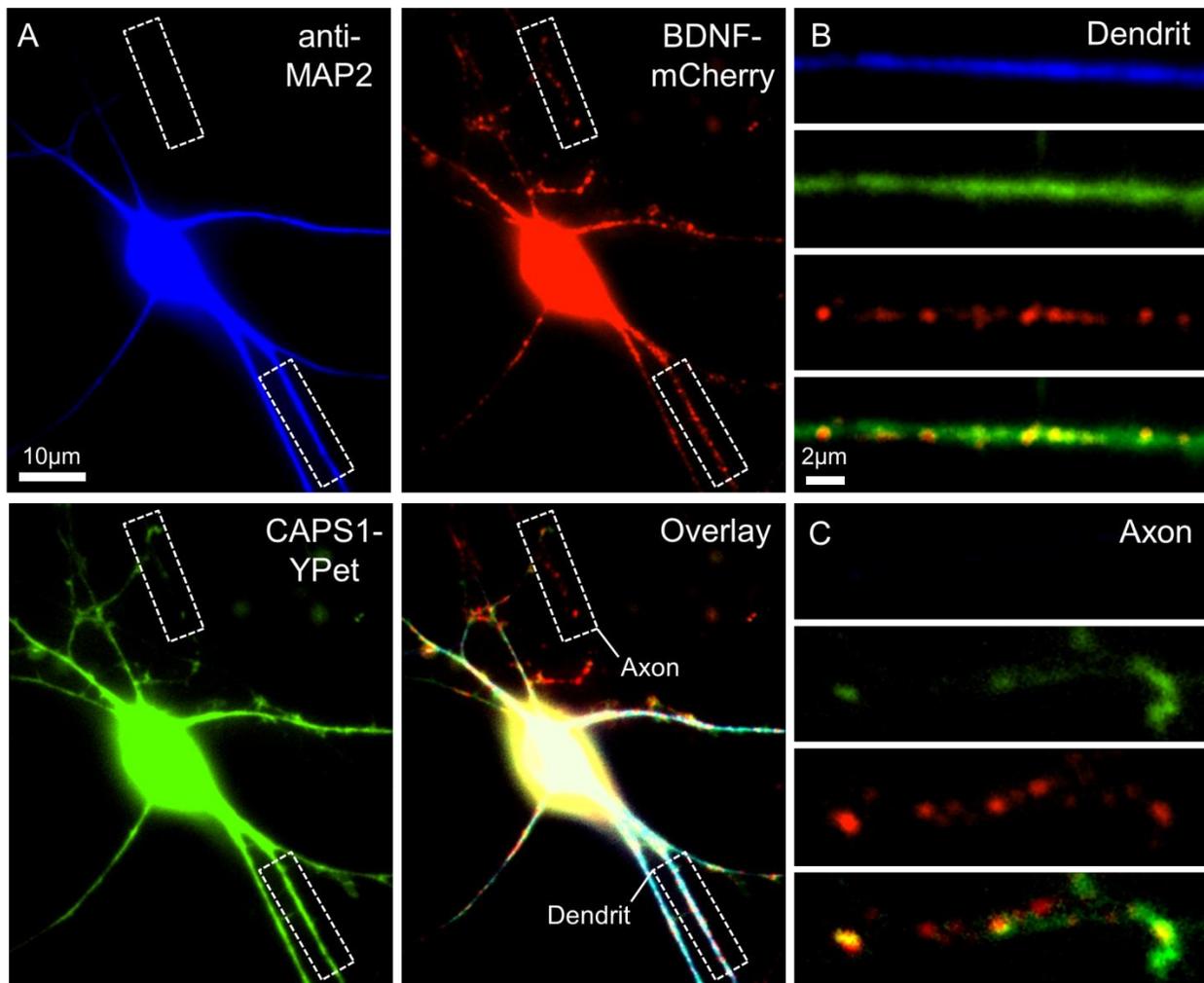
Um eine synaptische CAPS1-Lokalisation zu untersuchen, wurden Kollokalisationsstudien mit verschiedenen synaptischen Markern durchgeführt. Zunächst wurde eine mutmaßliche synaptische Lokalisation von CAPS1 an aktiven Synapsen von lebenden Zellen untersucht. Hierzu wurden hippocampale Neurone (DIV 7-9) mit CAPS1-YPet transfiziert. Fünf Tage nach der Transfektion (PTF 5) wurden die synaptischen Vesikel mit Hilfe des rot-fluoreszierenden Farbstoffs FM 4-64 angefärbt. Dabei konnte eine dominante Kollokalisation der aktiven synaptischen Boutons mit CAPS1-YPet-Clustern beobachtet werden (**Abb. 4.2 A**). Um eine prä- bzw. postsynaptische Lokalisation von endogenem CAPS1 zu untersuchen, wurden hippocampale Neurone mit Plasmiden transfiziert (DIV 10), die den präsynaptischen Marker VAMP bzw. den postsynaptischen Marker PSD95 gekoppelt an rot-fluoreszierendes DsRed exprimierten. Drei Tage nach der Transfektion wurden diese Neurone fixiert und mit einem Antikörper gegen endogenes CAPS1 (**Sadakata et al., 2004**) angefärbt (Sekundärantikörper gekoppelt an grün-fluoreszierendes Alexa 488). Die Färbungen zeigten, dass CAPS1-Cluster häufig mit dem präsynaptischen Marker VAMP kollokalisiert waren (**Abb. 4.2 B**). Für den postsynaptischen Marker PSD95 konnte ebenfalls eine Kollokalisation mit CAPS1 gezeigt werden, jedoch war der Anteil der nicht mit CAPS1 kollokalisierenden postsynaptischen Strukturen wesentlich höher (**Abb. 4.2 C**).



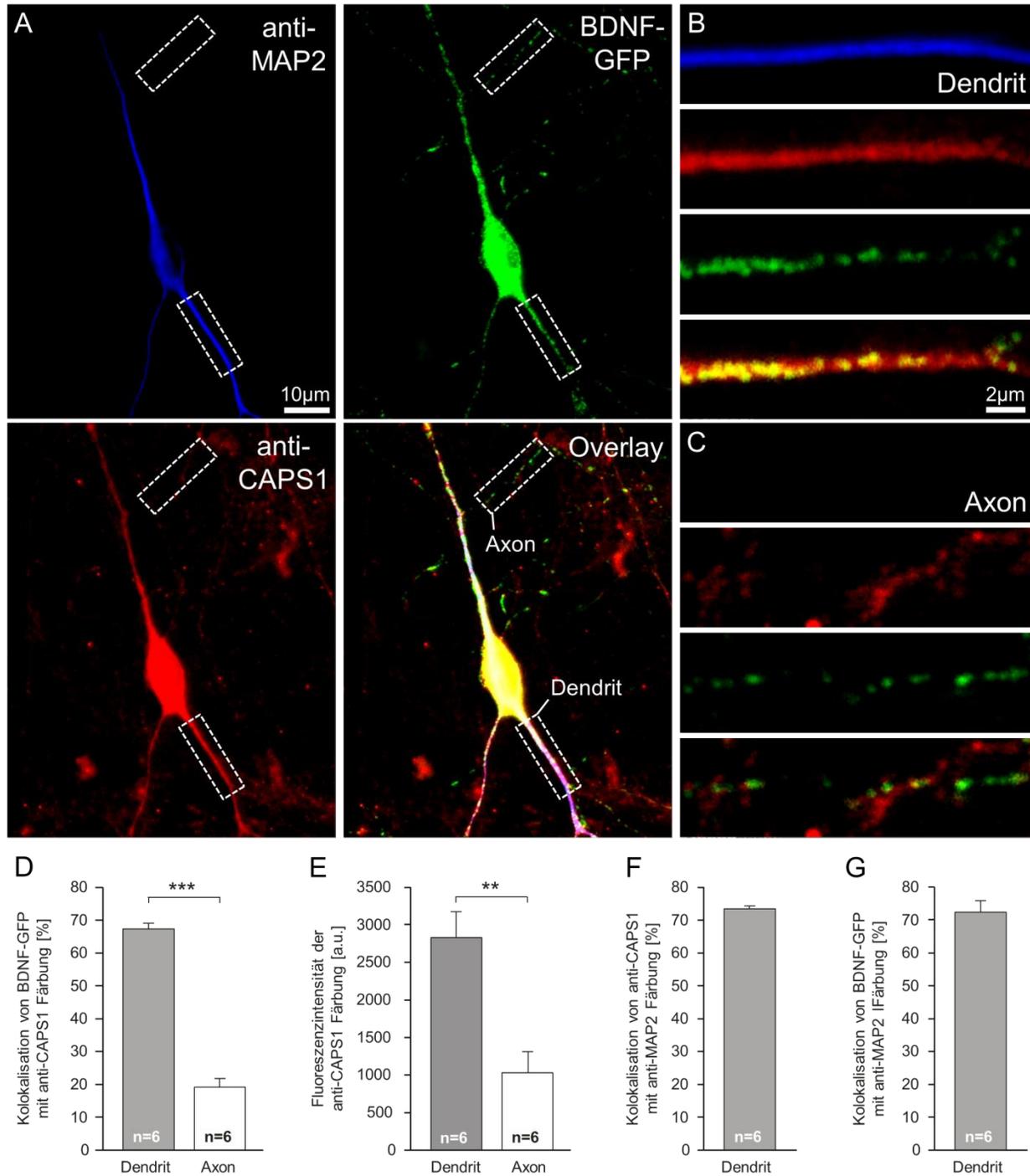
**Abb. 4.2: Kolokalisation von CAPS1 mit synaptischen Markern.** (A) Repräsentative Epifluoreszenzaufnahme eines lebenden hippocampalen Neurons, welches an DIV 7 mit einem CAPS1-YPet-kodierenden Vektor (grün) transfiziert wurde. Fünf Tage nach der Transfektion wurden die aktiven synaptischen Boutons des Neurons mit FM 4-64 (rot) anfärbt. Die Kolokalisation von einzelnen synaptischen Boutons mit CAPS1-YPet ist in der Vergrößerung rechts dargestellt. (B) Repräsentative konfokale Aufnahme eines fixierten hippocampalen Neurons, welches an DIV 10 mit einem Plasmid zur Expression des präsynaptischen Markers VAMP-DsRed (rot) transfiziert und drei Tage später mit einem Antikörper gegen CAPS1 (grün) angefärbt wurde. Die Vergrößerung des markierten Bildausschnitts (rechts) zeigt eine klare Kolokalisation von Clustern des endogenen CAPS1 in präsynaptischen Strukturen. (C) Repräsentative konfokale Aufnahme eines fixierten hippocampalen Neurons, welches an DIV 10 mit einem Plasmid zur Expression des postsynaptischen Markers PSD95-DsRed (rot) transfiziert und drei Tage später mit einem Antikörper gegen CAPS1 (grün) angefärbt wurde. Die Vergrößerung des markierten Bildausschnitts zeigt eine weniger prominente Lokalisation von CAPS1 in postsynaptischen Strukturen.

### 4.2.3 Die Lokalisation von CAPS1 in Neuriten

Im Folgenden wurde eine mutmaßliche Kolo­kalisierung von CAPS1 und BDNF-beinhalten­den vesikulären Strukturen näher untersucht. Hierzu wurden hippokampale Neurone mit Plasmiden für CAPS1-YPet und BDNF-mCherry kotransfiziert und anschließend mit einem Antikörper gegen den dendritischen Marker MAP2 angefärbt (Sekundärantikörper gekoppelt an blau-fluoreszierendes Alexa Fluor 350). Es wurden einzeln liegende Zellen untersucht, bei denen das Axon zweifelsfrei von Dendriten der Zelle unterschieden werden konnte. Dabei konnte gezeigt werden, dass BDNF-mCherry und CAPS1-YPet sowohl in Dendriten als auch im Axon hippokampaler Neurone lokalisiert war (**Abb. 4.3 A**). In Dendriten war eine homogene CAPS1-YPet-Verteilung zu beobachten, die häufig mit BDNF-mCherry kolo­kalisierte (**Abb. 4.3 B**). In axonalen Bereichen wurde eine schwächere Fluoreszenz sowie eine inhomogene Verteilung von CAPS1-YPet in Clustern beobachtet, die gelegentlich mit BDNF-mCherry kolo­kalisiert war (**Abb. 4.3 C**). Für eine quantitative Analyse der Kolo­kalisierung von BDNF-beinhalten­den Vesikeln mit endogenem CAPS1 wurden BDNF-GFP-transfizierte hippokampale Neurone mit einem Antikörper gegen CAPS1 (Synaptic Systems, Sekundärantikörper gekoppelt an rot-fluoreszierendes Alexa Fluor 555) und einem Antikörper gegen MAP2 (Sekundärantikörper gekoppelt an infrarot-fluoreszierendes Alexa Fluor 633, jedoch blau dargestellt) angefärbt (**Abb. 4.4 A**). Die Kolo­kalisierung wurde sowohl in dendritischen Regionen (Neuriten mit BDNF-GFP und MAP2, siehe **Abb. 4.4 B**) als auch in axonalen Regionen (Neuriten mit BDNF-GFP aber kein MAP2, siehe **Abb. 4.4 C**) untersucht. Es konnte dabei beobachtet werden, dass in axonalen Regionen signifikant weniger BDNF-GFP mit der CAPS1-Immunfluoreszenz kolo­kalisiert war als in dendritischen Regionen (**Abb. 4.4 D**; Dendriten:  $67,2 \pm 1,8$  %; Axon:  $19,3 \pm 2,4$  %;  $p = 2,3 \times 10^{-8}$ ). Auch die Fluoreszenzintensität der CAPS1-Färbung war in axonalen Regionen signifikant geringer (**Abb. 4.4 E**; Dendriten:  $2826 \pm 345$  a.u.; Axon:  $1027 \pm 281$  a.u.;  $p = 2,4 \times 10^{-3}$ ). Innerhalb dendritischer Regionen kolo­kalisieren jedoch nur  $73,3 \pm 1,0$  % der CAPS1-Immunfluoreszenz und  $72,4 \pm 3,4$  % der vesikulären BDNF-GFP-Fluoreszenz mit der Immunfluoreszenz des Dendritenmarkers MAP2 (**Abb. 4.4 F-G**). Insgesamt konnte somit eine sowohl axonale als auch dendritische Lokalisation von BDNF-GFP und CAPS1 beobachtet werden, wobei CAPS1 verstärkt in dendritischen Regionen zu finden war und dort häufiger mit BDNF-beinhalten­den Vesikeln kolo­kalisierte.



**Abb. 4.3: Kolokalisation von BDNF-mCherry und CAPS1-YPet in hippocampalen Neuronen.** (A) Repräsentative Epifluoreszenzaufnahme eines lebenden hippocampalen Neurons, welches an DIV 10 mit BDNF-mCherry (rot) und CAPS1-YPet (grün) kodierenden Plasmiden kotransfiziert und nach 3 Tagen mit einem Antikörper gegen den Dendritenmarker MAP2 (blau) angefärbt wurde. In der Bildüberlagerung (unten rechts) ist das Axon der Zelle (Anwesenheit von BDNF-mCherry-beihaltenden Vesikeln bei gleichzeitiger Abwesenheit des Dendritenmarkers MAP2) von den Dendriten unterscheidbar. (B) Vergrößerung des dendritischen Bereichs des Neurons aus (A). BDNF-mCherry-beihaltende Vesikel (rot) kolokalisierten häufig mit der homogenen CAPS1-YPet Fluoreszenz (grün) in Dendriten. (C) Vergrößerung des axonalen Bereichs des Neurons aus (A). Cluster von BDNF-mCherry (rot) zeigten nur sporadisch eine Kolokalisation mit der inhomogenen, clusternden CAPS1-YPet-Fluoreszenz (grün) in freiliegenden Bereichen des Axons.



**Abb. 4.4:** Kolokalisation von BDNF-GFP und endogenem CAPS1 in hippocampalen Neuronen.

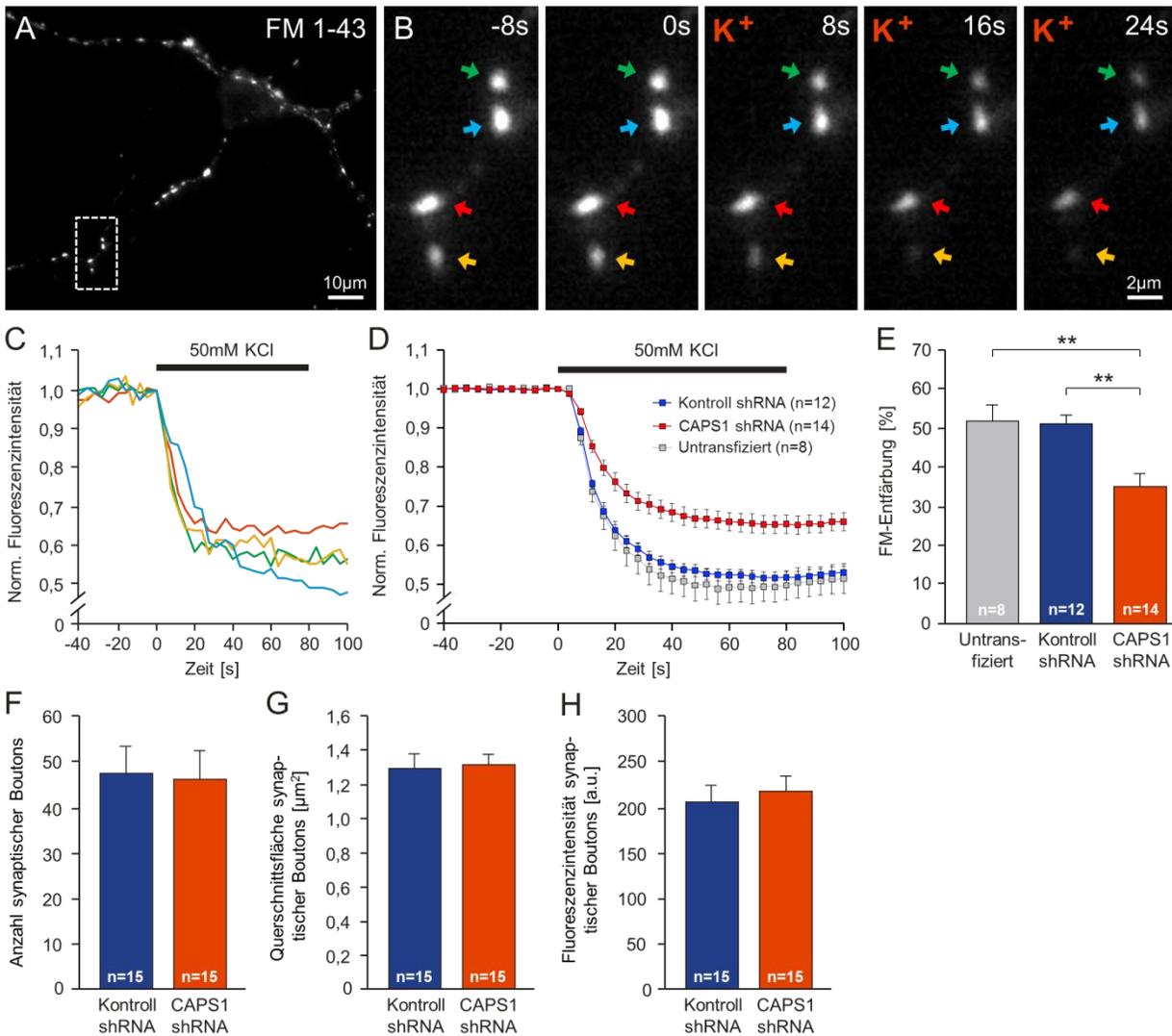
**Fortsetzung der Bildbeschriftung Abb. 4.4:** **(A)** Repräsentative konfokale Aufnahme eines hippocampalen Neurons, das an DIV 8 mit BDNF-GFP (grün) transfiziert und nach 5 Tagen mit Antikörpern gegen CAPS1 (rot) und MAP2 (blau) angefärbt wurde. In der Bildüberlagerung (unten rechts) ist das Axon der Zelle (Anwesenheit von BDNF-GFP-beihaltenden Vesikeln bei gleichzeitiger Abwesenheit des Dendritenmarkers MAP2) von den Dendriten unterscheidbar. **(B)** Vergrößerung des dendritischen Bereichs des Neurons aus (A). BDNF-GFP-beihaltende Vesikel (grün) kolokalisierten mit der starken CAPS1-Immunfluoreszenz (rot) in Dendriten. **(C)** Vergrößerung eines axonalen Bereichs des Neurons aus (A). Die BDNF-GFP-Fluoreszenz (grün) kolokalisierte kaum mit der schwachen, clusternden CAPS1-Immunreaktivität (rot) in Axonen. **(D)** Quantifizierung der Kolokalisation von BDNF-GFP mit der CAPS1-Immunfluoreszenz. In axonalen Regionen war eine signifikant geringere Kolokalisation als in dendritischen Regionen zu beobachten. **(E)** Durchschnittliche absolute Fluoreszenzintensität der CAPS1-Antikörperfärbung. Dendritische Regionen waren signifikant stärker gefärbt als isolierte axonale Bereiche der Zelle. **(F)** Quantifizierung der Kolokalisation der CAPS1-Antikörperfärbung mit dem Dendritenmarker MAP2. Nur  $73,3 \pm 1,0$  % der CAPS1-Immunreaktivität kolokalisierte mit MAP2 in dendritischen Regionen. **(G)** Quantifizierung der Kolokalisation der BDNF-GFP-Fluoreszenz von sekretorischen Granula mit dem Dendritenmarker MAP2. Nur  $72,4 \pm 3,4$  % der vesikulären BDNF-GFP-Fluoreszenz kolokalisierte mit MAP2 in dendritischen Regionen (Dendrit: 45 Regionen; Axon: 37 Regionen). n = Anzahl der gemessenen Zellen, \*\*\* p < 0,001, \*\* p < 0,01, Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

### 4.3 Einfluss von CAPS1 auf die Freisetzung von Neurotransmittern

Eine Kolokalkisation von CAPS1 mit BDNF-GFP-beihaltenden Vesikeln und mit präsynaptischen Boutons (siehe 4.2.2 und 4.2.3) lässt die Beteiligung von CAPS1 sowohl bei der Exozytose von sekretorischen Granula als auch von synaptischen Vesikeln vermuten. Um zunächst den Einfluss von CAPS1 auf die Exozytose synaptischer Vesikel zu untersuchen, wurde die Neurotransmitterausschüttung mit Hilfe von FM-Farbstoffen analysiert. FM-Farbstoffe sind amphiphile styrylbasierende Fluoreszenzfarbstoffe, die reversibel an die äußere Zellmembran binden, diese aber nicht passieren können (**Betz et al., 1995**). Nach Stimulation des Neurons durch Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration in Anwesenheit des FM-Farbstoffs gelangt dieser mittels Endozytose in die aktiven synaptische Boutons der Zelle. Aufgrund des Zyklus synaptischer Vesikel (**Südhof, 2004**) wird ein großer Teil der durch Endozytose aufgenommenen, FM-markierten Vesikel für einen weiteren Ausschüttungsprozess vorbereitet (geprimet). Durch erneute Stimulation des Neurons werden die FM-beladenen synaptischen Vesikel exozytiert und der FM-Farbstoff ausgewaschen. An Hand des Abfalls der Fluoreszenzintensität an den synaptischen Boutons des Neurons kann so die Exozytose von synaptischen Vesikeln in lebenden Zellen visualisieren werden.

In dieser Arbeit wurde die Methode der FM-Entfärbung angewandt, um den Einfluss von CAPS1 auf die Exozytose synaptischer Vesikel zu untersuchen. Schwesterkulturen

hippokampaler Neurone wurden an DIV 7 mit Kontroll- bzw. CAPS1-shRNA-Vektoren transfiziert, die das rot-fluoreszierende Markerprotein mCherry kodierten. Nach weiteren 7 Tagen wurden synaptische Boutons der Neurone mit dem grün-fluoreszierenden FM-Farbstoff (FM 1-43) angefärbt und am Fluoreszenzmikroskop betrachtet (**Abb. 4.5 A-B**). Für die Messung wurden ausschließlich auf einer Astrozyteninsel einzeln liegende, autaptische Neurone ausgewählt, die gleichzeitig den Marker mCherry als Indikator für die Präsenz der jeweiligen shRNA-Vektoren exprimierten. Dadurch wurde gewährleistet, dass FM 1-43 gefärbte synaptische Boutons untransfizierter Neurone das Ergebnis nicht beeinträchtigten. Als zweite Kontrolle wurden Neuronen einer weiteren, nicht mit shRNA-Vektoren transfizierten Schwesterkultur, untersucht. Dadurch sollte überprüft werden, ob bereits die Transfektion einen Einfluss auf den Entfärbeprozess hatte. Die FM-Entfärbung wurde mit Hilfe videomikroskopischer Analyse (*Time Lapse* - Mikroskopie) des Fluoreszenzsignals einzelner FM-gefärbter synaptischer Boutons nach Stimulation der Exozytose gemessen. Hierzu wurden die Zellen durch Applikation einer Pufferlösung, die eine um 50 mM erhöhte Kaliumkonzentration aufwies, depolarisiert. Zur Auswertung wurde der Fluoreszenzverlauf einzelner synaptischer Boutons auf den Fluoreszenzintensitätswert vor Beginn der Stimulation ( $t=0$ ) normalisiert und um das während der Aufnahme der Basislinie auftretende Photobleichen korrigiert (**Abb. 4.5 C**). Anschließend wurde der normalisierte Fluoreszenzverlauf mehrerer synaptischer Boutons für jede gemessene Zelle gemittelt. Die durchschnittliche Kinetik der FM-Entfärbung jeder einzelnen Bedingung (untransfiziert, Kontroll- und CAPS1-shRNA transfiziert) wurde als Mittelwert des Fluoreszenzverlaufs synaptischer Boutons aller gemessenen Zellen bestimmt (**Abb. 4.5 D**). Dabei zeigte der Fluoreszenzverlauf FM-beladener synaptischer Boutons unter allen Bedingungen eine Abnahme der Fluoreszenzintensität direkt nach der Kalium-induzierten Depolarisation der Neurone. Die Überlappung der Kurven des Fluoreszenzverlaufs von untransfizierten Kontrollzellen mit Kontroll-shRNA-transfizierten Zellen deutete auf keinen unspezifischen Effekt der Transfektion auf die FM-Entfärbekinetik hin. Sowohl der Verlauf als auch die Amplitude des Fluoreszenzabfalls (**Abb. 4.5 E**) waren unter beiden Kontrollbedingungen nicht signifikant voneinander verschieden (Untransfiziert:  $51,8 \pm 4,0$  %; Kontroll-shRNA:  $51,2 \pm 2,1$  %;  $p = 0,99$ ).



**Abb. 4.5: Neurotransmitterfreisetzung aus synaptischen Boutons.** Hippokampale Neurone (DIV 7) wurden mit Kontroll- bzw. CAPS1-shRNA-kodierenden Vektoren (Marker: mCherry) transfiziert. Nach weiteren 7 Tagen wurden die synaptischen Boutons der Zelle mit grün-fluoreszierendem FM 1-43 angefärbt und videomikroskopisch untersucht. **(A)** Repräsentatives mit FM 1-43 angefärbtes hippocampales Neuron. **(B)** Ausschnittsvergrößerung von (A) zeigt einzelne, mit farbigen Pfeilen markierte synaptische Boutons der Zelle zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor und nach der Stimulation der Zelle durch die Applikation einer Pufferlösung mit erhöhtem (50 mM) Kaliumgehalt (K<sup>+</sup>). **(C)** Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität der farbig markierten synaptischen Boutons aus (B). Nach der Stimulation ist ein deutlicher Fluoreszenzabfall zu messen. **(D)** Durchschnittliche Entfärbekinetik synaptischer Boutons der verschiedenen Bedingungen gemittelt über mehrere Zellen. In CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen war ein deutlich verschiedener Fluoreszenzverlauf als in beiden Kontrollbedingungen zu beobachten (Untransfiziert: 141 synaptische Boutons, Kontroll-shRNA: 174 synaptische Boutons, CAPS1-shRNA: 184 synaptische Boutons). **(E)** Amplitude des Fluoreszenzintensitätsabfalls 100 s nach der Stimulation. Der *Knock-down* von CAPS1 hatte eine signifikant geringere Entfärbung synaptischer Boutons zur Folge. **(F-H)** Basale Eigenschaften der FM-gefärbten synaptischen Boutons. Die Anzahl synaptischer Boutons im Sichtfeld der Messung (F) sowie die Querschnittsfläche der synaptischen Boutons als Maß für deren Größe (G) als auch die absolute Fluoreszenzintensität FM-gefärbter synaptischer Boutons vor der Stimulation (H) waren nach *Knock-down* von CAPS1 unverändert (Kontroll-shRNA: 693 synaptische Boutons, CAPS1-shRNA: 712 synaptische Boutons). n = Anzahl der gemessenen Zellen, \*\* p < 0,01, Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

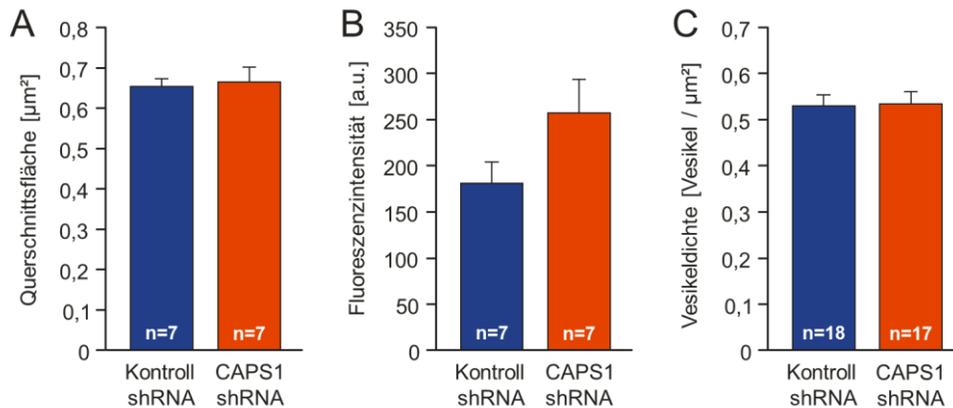
Dahingegen zeigte der Fluoreszenzverlauf FM-gefärbter synaptischer Boutons aus CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen eine signifikant reduzierte Amplitude des Abfalls der Fluoreszenzintensität (CAPS1-shRNA:  $35,4 \pm 3,1$  %;  $p \leq 2,9 \times 10^{-3}$ ). Die Zeitkonstante  $\tau$  des exponentiellen Fluoreszenzabfalls war jedoch vergleichbar groß (Untransfiziert:  $12,6 \pm 1,0$  s; Kontroll-shRNA:  $14,0 \pm 1,0$  s; CAPS1-shRNA:  $17,1 \pm 1,6$  s;  $p = 0,062$ ). Die reduzierte Amplitude der FM-Entfärbekinetik deutete darauf hin, dass die Exozytose von synaptischen Vesikeln in CAPS1-shRNA-transfizierten Zellen beeinträchtigt war. Um gegebenenfalls weitere Unterschiede zwischen CAPS1- und Kontroll-shRNA-transfizierten Zellen zu finden, wurden weitere Parameter der FM-gefärbten synaptischen Boutons bestimmt. Die durchschnittliche Anzahl synaptischer Boutons im Sichtfeld (**Abb. 4.5 F**) sowie die durchschnittliche Größe der synaptischen Boutons (**Abb. 4.5 G**) waren nicht signifikant verschieden. Somit konnte im untersuchten Zeitraum kein offensichtlicher negativer Effekt des *Knock-downs* von CAPS1 auf die Ausbildung von Synapsen beobachtet werden. Die absolute Fluoreszenzintensität der synaptischen Boutons vor Stimulation der Exozytose (**Abb. 4.5 H**) war ebenfalls nicht signifikant verschieden, was auf eine unveränderte Endozytose des FM-Farbstoffs während des Färbeprozesses hinweist. Es konnte somit gezeigt werden, dass nach *Knock-down* von CAPS1 die Exozytose synaptischer Vesikel negativ beeinträchtigt wurde, jedoch die Färbung, die Anzahl und die Größe der synaptischen Boutons nicht verändert waren.

## 4.4 Einfluss von CAPS1 auf die Ausschüttung von Neurotrophenen

### 4.4.1 Basale Eigenschaften BDNF-GFP-beinhaltenender Vesikel

Die Verwendung von BDNF-GFP-kodierenden Vektoren für die Untersuchung der Neurotrophinausschüttung aus sekretorischen Granula wurde bereits in einer Vielzahl von Publikationen beschrieben (**Hartmann et al., 2001; Brigadski et al., 2005**). Im Rahmen dieser Arbeit wurden nun die in **4.1** validierten und in **4.3** verwendeten Kontroll- und CAPS1-shRNA-Vektoren modifiziert, so dass sie statt dem Markerprotein mCherry, BDNF-GFP exprimierten. Um zu untersuchen, ob der *Knock-down* von CAPS1 bereits einen Einfluss auf basale Eigenschaften der BDNF-GFP-beinhaltenenden Vesikeln hatte, wurden hippocampale Neurone mit BDNF-GFP-gekoppelten Kontroll-shRNA bzw. CAPS1-shRNA-

Vektoren transfiziert. Fünf Tage nach der Transfektion wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop fotodokumentiert. Anschließend wurden Regionen um einzelne Vesikel definiert und deren Querschnittsfläche (**Abb. 4.6 A**) als Maß für die Vesikelgröße und deren Fluoreszenzintensität (**Abb. 4.6 B**) als Maß für die Beladung mit BDNF-GFP gemessen. Kein signifikanter Unterschied konnte in der Größe und der Fluoreszenzintensität einzelner Vesikel beider Gruppen beobachtet werden. Anschließend wurde die Dichte der BDNF-GFP-beihaltenden Vesikel zwischen Kontroll- und CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen verglichen (**Abb. 4.6 C**). Dabei konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Insgesamt wurden durch die vergleichende Bildanalyse keine Veränderungen der basalen Vesikeleigenschaften nach *Knock-down* von CAPS1 beobachtet.



**Abb. 4.6: Basale Eigenschaften BDNF-GFP-beihaltender Vesikel.** Hippokampale Neurone (DIV 9) wurden mit BDNF-GFP-kodierenden Kontroll- bzw. CAPS1-shRNA-Vektoren transfiziert. Nach weiteren 5 Tagen wurden basale Eigenschaften der BDNF-GFP-beihaltenden Vesikel aus fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Zellen miteinander verglichen. Quantitative Auswertung der Querschnittsfläche (**A**) und der absoluten Fluoreszenzintensität (**B**) einzelner Vesikel (Kontroll-shRNA: 68 Vesikel, CAPS1-shRNA: 62 Vesikel), sowie der Dichte (**C**) BDNF-GFP-beihaltender Vesikel in Neuriten hippocampaler Neurone (Kontroll-shRNA: 206 Regionen, CAPS1-shRNA: 172 Regionen). Für alle untersuchten Parameter wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen gefunden. n = Anzahl der gemessenen Zellen, Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

#### 4.4.2 Fusionsereignisse BDNF-GFP-beihaltender Vesikel

Um den Einfluss von CAPS1 auf die Ausschüttung von Neurotrophinen zu untersuchen, wurde zunächst die Häufigkeit und die Verteilung von Fusionsereignissen BDNF-GFP-beihaltender sekretorischer Granula analysiert. Hierzu wurden primäre hippocampale Neurone mit BDNF-GFP-kodierenden Kontroll- bzw. CAPS1-shRNA-Vektoren transfiziert und 5 Tage nach der Transfektion videomikroskopisch (*Timelapse*-Aufnahmen) untersucht.

Nach Überspülen der Zelle mit Kontrollpufferlösung wurden die Zellen durch Applikation einer Pufferlösung mit einer um 50 mM erhöhten Kaliumkonzentration depolarisiert. Dadurch wurde die aktivitätsabhängige Ausschüttung einzelner BDNF-GFP-beinhaltenen Vesikel ausgelöst. Um den Moment des Fusionsereignisses zeitlich präzise auflösen zu können, wurde den überspülten Pufferlösungen 0.3 mM Bromphenolblau zugesetzt. Als niedermolekulare Substanz kann extrazelluläres Bromphenolblau rasch in sich öffnende Fusionsporen diffundieren. Da Bromphenolblau die Eigenschaft besitzt, die Fluoreszenz von GFP bei direktem Kontakt auszulöschen (quenchen), konnten so einzelne Fusionsereignisse an Hand des rapiden Fluoreszenzverlustes BDNF-GFP-beinhaltenender Vesikel beobachtet

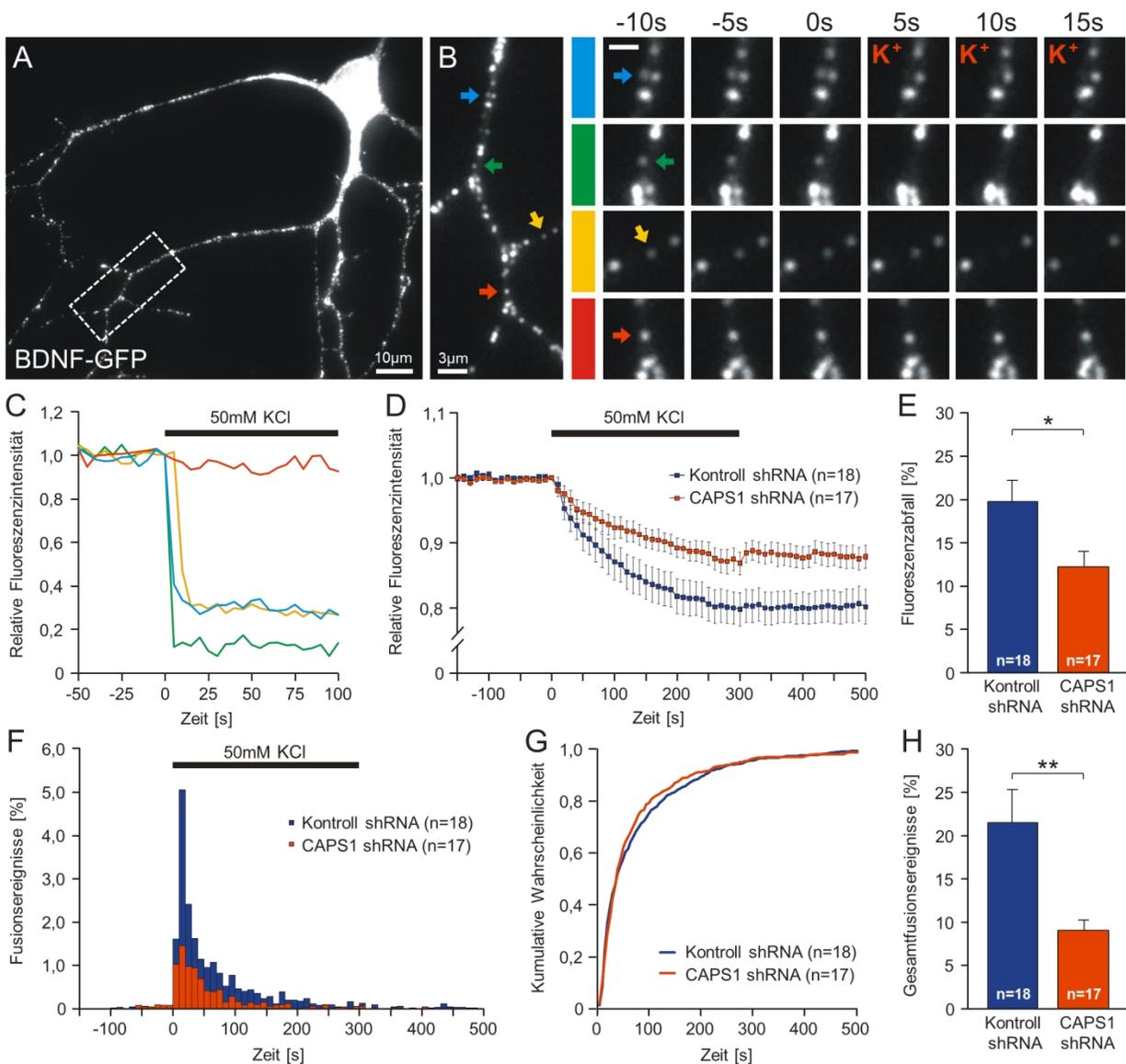


Abb. 4.7: Fusionsporenöffnung in Anwesenheit von Bromphenolblau.

**Fortsetzung der Bildbeschriftung Abb. 4.7:** Hippokampale Neurone (DIV 9) wurden mit BDNF-GFP kodierenden Kontroll- bzw. CAPS1-shRNA-Vektoren transfiziert. Nach weiteren 5 Tagen wurden Vesikelfusionsereignisse in Anwesenheit des GFP-Quenchers Bromphenolblau videomikroskopisch untersucht. **(A)** Repräsentatives hippokampales Neuron transfiziert mit BDNF-GFP. **(B)** Ausschnittsvergrößerung der dendritischen Region aus (A). Die farbkodierte Pfeile markieren einzelne Vesikel, die im rechten Bildkomplex in stärkerer Vergrößerung zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor und nach der Stimulation der Zelle durch die Applikation einer Pufferlösung mit erhöhtem (50 mM) Kaliumgehalt ( $K^+$ ) gezeigt sind (Maßstabsbalken = 1,5  $\mu\text{m}$ ). **(C)** Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität der farbig markierten Vesikel aus (B). Fusionierende Vesikel (blau, grün, gelb) zeichneten sich durch einen rapiden Fluoreszenzabfall auf Grund des Quenchen der intravesikulären BDNF-GFP-Fluoreszenz durch eindringendes Bromphenolblau aus. Nicht-fusionierende Vesikel (rot) unterlagen keiner wesentlichen Fluoreszenzveränderung. **(D)** Durchschnittlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität dendritischer Regionen (Kontroll-shRNA: 206 Regionen, CAPS1-shRNA: 172 Regionen). Nach Stimulation der Zelle wurde durch die Fusion einzelner BDNF-beinhaltenender Vesikel ein Fluoreszenzabfall innerhalb der untersuchten Regionen beobachtet. **(E)** Die Amplitude des Fluoreszenzabfalls in dendritischen Regionen bei 500 s nach der Stimulation war nach *Knock-down* von CAPS1 signifikant reduziert. **(F)** Zeitliche Verteilung der Fusionsereignisse in den gleichen dendritischen Regionen aus (D) in Relation zu der Gesamtvesikelzahl (Kontroll-shRNA: 1346 Fusionsereignisse, CAPS1-shRNA: 542 Fusionsereignisse). **(G)** Die kumulative normalisierte Darstellung der Fusionsereignisse zeigte eine ähnliche zeitliche Verteilung der Fusionsereignisse beider Bedingungen. **(H)** Der prozentuale Anteil aller Fusionsereignissen in Bezug auf die Gesamtvesikelzahl war nach *Knock-down* von CAPS1 jedoch signifikant reduziert. n = Anzahl der gemessenen Zellen, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

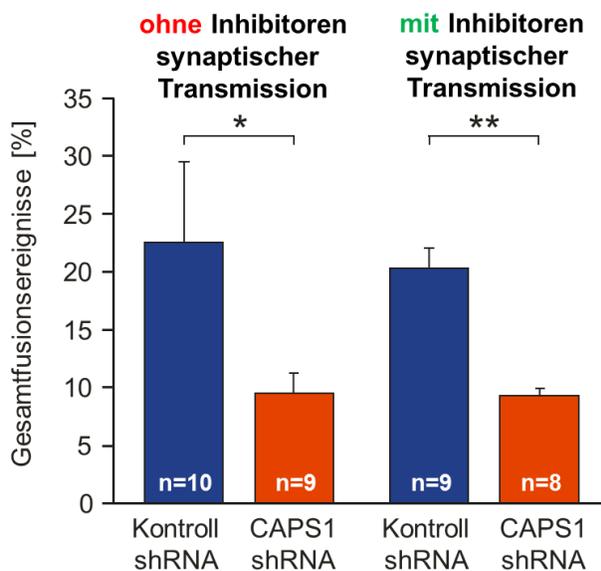
werden (**Abb. 4.7 A-C**, vergleiche **Kolarow et al., 2007**). Für die Auswertung wurden umverschiedene dendritische Abzweigungen des Neurons Regionen definiert, die mehrere BDNF-GFP-Vesikel beinhalteten und anschließend deren Fluoreszenzverlauf gemessen. Auf Grund der Anwesenheit von Bromphenolblau wurde die Gesamtfluoreszenzintensität aller BDNF-GFP-beinhaltenenden Vesikel dieser Region nach Kalium-induzierter Depolarisation um den Fehlbetrag fusionierter Vesikel sukzessive reduziert. Die Kinetik der Fluoreszenzveränderung von Kontroll- im Vergleich zu CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen ist in **Abb. 4.7 D** dargestellt. Obwohl die Zeitkonstanten  $\tau$  des exponentiellen Fluoreszenzabfalls beider Kinetiken nach der Stimulation vergleichbar waren (Kontroll-shRNA:  $\tau = 78,8 \pm 8,5$  s; CAPS1-shRNA:  $\tau = 79,2 \pm 10,0$  s), gab es einen signifikanten Unterschied ( $p = 0,024$ ) in der Amplitude des Fluoreszenzabfalls (**Abb. 4.7 E**). In Kontroll-shRNA-transfizierten Neuronen wurde die Fluoreszenzintensität nach Kalium-abhängiger Stimulation um  $19,7 \pm 2,5$  % reduziert, während der Fluoreszenzabfall in CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen nur  $12,2 \pm 1,8$  % betrug. Dies deutete auf eine verringerte Anzahl von Fusionsereignissen in CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen hin. Um den prozentualen Anteil und die zeitliche Verteilung der Fusionsereignisse genauer zu untersuchen, wurde sowohl die Anzahl als auch das zeitliche Auftreten von Fusionsereignissen in Bezug auf die Gesamtzahl der Vesikel in den definierten

dendritischen Regionen bestimmt. Die Verteilung der Fusionsereignisse ist in **Abb. 4.7 F** dargestellt. Sowohl für Kontroll- als auch für CAPS1-shRNA-transfizierte Neurone wurden die meisten Fusionsereignisse in den ersten 40 Sekunden nach der Kalium-induzierten Stimulation beobachtet. Die Ereignishäufigkeit nahm in Folge anhaltender Stimulation ab und verblieb bis zum Ende der Beobachtung auf niedrigem Niveau. Vor der Stimulation konnten ebenfalls wenige Fusionsereignisse beobachtet werden, die auf Spontanereignisse hindeuteten. Obwohl sich die Verteilung der Fusionsereignisse von Kontroll- sowie von CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen nicht unterschieden (vergleiche kumulative Wahrscheinlichkeit des Auftreten eines Fusionsereignisses, **Abb. 4.7 G**), war die absolute Anzahl der Fusionsereignissen in Relation zur Gesamtvesikelzahl (**Abb. 4.7 H**) signifikant reduziert ( $p = 4,7 \times 10^{-3}$ ). In Kontroll-shRNA-transfizierten Neuronen wurden im Beobachtungszeitraum  $21,5 \pm 3,8$  % aller Vesikel exozytiert, während in CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen nur  $9,0 \pm 1,2$  % aller Vesikel ein Fusionsereignis zeigten. Sowohl die Amplitude als auch der Verlauf der Fluoreszenzkinetik dendritischer Regionen (**Abb. 4.7 D**) spiegelte sich gut in der Verteilung und dem prozentualen Anteil an Fusionsereignissen (**Abb. 4.7 F**) wieder. Die Ergebnisse deuten somit auf eine Verminderung der Exozytose BDNF-GFP-beinhaltenender Vesikel nach *Knock-down* von CAPS1 hin.

#### 4.4.3 Einfluss synaptischer Aktivität auf Fusionsporenöffnung sekretorischer Granula

Bei den für die Messung von Fusionsereignissen verwendeten primären hippocampalen Neuronen handelt es sich um nur partiell autaptische Neurone, die auf Astrozyteninseln synaptische Mikronetzwerke ausbilden (**Klau et al., 2001**). Der Effekt von CAPS1 auf die Fusionsporenöffnung BDNF-beinhaltenender sekretorischer Granula könnte somit durch die in **4.3** beschriebene reduzierte Neurotransmitterausschüttung nach CAPS1-*Knock-down* verursacht worden sein. Um dies zu untersuchen, wurde die Anzahl an Fusionsereignissen von Kontroll- bzw. CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen in Anwesenheit von Inhibitoren sowohl für exzitatorische (AMPA-Rezeptorantagonist DNQX, NMDA-Rezeptorantagonist D/L-AP5) als auch für inhibitorische synaptischer Transmission (GABA<sub>A</sub>-Rezeptorantagonist Picrotoxin) untersucht und mit der Anzahl von Fusionsereignissen in spontanaktiven hippocampalen Kulturen verglichen (**Abb. 4.8**). Es konnte dabei gezeigt werden, dass der Anteil an fusionierenden Vesikeln unter beiden Bedingungen nicht

signifikant voneinander abwich (Kontroll-shRNA ohne Inhibitoren:  $22,5 \pm 6,9$  % und mit Inhibitoren:  $20,2 \pm 1,8$  %). Ebenso war der Anteil der durch *Knock-down* von CAPS1 reduzierten Fusionsereignisse beider Bedingungen vergleichbar (CAPS1-shRNA ohne Inhibitoren:  $9,1 \pm 2,6$  % und mit Inhibitoren:  $9,0 \pm 0,8$  %). Eine signifikante Reduktion ( $p = 1,0 \times 10^{-3}$ ) der Fusionsereignisse zwischen Kontroll- und CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen war jedoch auch während der Inhibition synaptischer Aktivität zu beobachten. Somit konnte gezeigt werden, dass die reduzierte Neurotransmitterfreisetzung durch den *Knock-down* von CAPS1 keinen Einfluss auf die Fusion von BDNF-GFP-beihaltenden Vesikel hatte.



**Abb. 4.8 Fusionsporenöffnung in Anwesenheit von Bromphenolblau mit und ohne Inhibitoren synaptischer Transmission.** BDNF-GFP-transfizierte hippocampale Neurone wurden entsprechend 4.4.2 untersucht. Es wurde der Anteil der fusionierenden Vesikel in Relation zur Gesamtvesikelzahl bestimmt. Inhibitoren synaptischer Transmission wurden in folgenden Konzentrationen den überspülten Puffern zugesetzt: 5  $\mu$ M DNQX; 50  $\mu$ M D/L-AP5; 100  $\mu$ M Picrotoxin. Sowohl mit als auch ohne Inhibition der synaptischen Aktivität wurde die Exozytose sekretorischer Granula durch den *Knock-down* von CAPS1 negativ beeinträchtigt. n = Anzahl der gemessenen Zellen, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

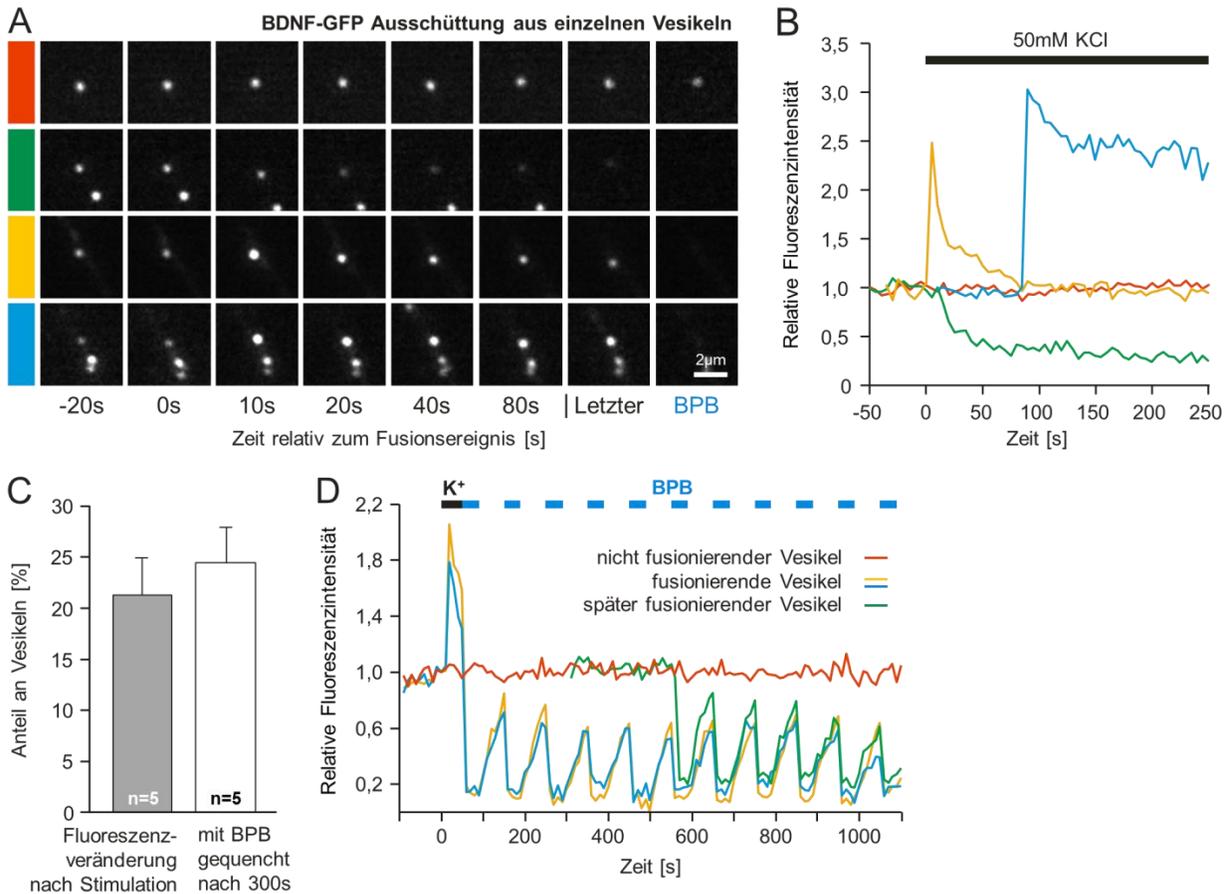
#### 4.4.4 Ausschüttung von BDNF-GFP aus einzelnen Vesikeln

Nach Öffnung der Fusionspore kommt es zur Dilatation dieser, so dass hochmolekulare sekretorische Proteine in den extrazellulären Raum diffundieren können. Die Ausschüttung von BDNF aus einzelnen Vesikeln sowie ein möglicher Einfluss von CAPS1 auf diesen Prozess wurden im Folgenden untersucht. Dabei erfolgte die Analyse der Ausschüttung von BDNF-GFP aus sekretorischen Granula ähnlich der für die Untersuchung von Fusionsereignissen (vergleiche 4.4.2), jedoch wurden die Zellen mit Bromphenolblau-freien Puffern überspült. Dadurch konnte der Fluoreszenzverlauf von BDNF-GFP-beihaltenden Vesikeln auch nach dem Fusionsereignis untersucht werden. Am Ende jeder Messung wurden die Zellen mit Bromphenolblau-haltiger Pufferlösung überspült. Da

Bromphenolblau in der Lage ist, in geöffnete sekretorische Granula zu diffundieren und somit die Fluoreszenz von BDNF-GFP auszulöschen (Quenchen), wurde es als Indikator für den Öffnungszustand der zuvor fusionierten Vesikel eingesetzt.

Wie schon in 4.4.2 beschrieben, traten auch bei diesen Untersuchungen Fusionsereignisse zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Kalium-abhängiger Depolarisation der Neurone auf. Die Fusionsporenöffnung hatte meist eine Veränderung der Fluoreszenzintensität einzelner Vesikel zur Folge. Dabei konnten zwei verschiedene Fluoreszenzverläufe beobachtet werden. In den meisten Fällen (Kontroll-shRNA:  $75,1 \pm 6,9$  %; CAPS1-shRNA:  $70,4 \pm 8,4$  %; nicht signifikant verschieden; siehe **Abb. 4.10 B**) wurde aufgrund der Neutralisation des vesikulären pH-Wertes direkt nach der Fusionsporenöffnung eine transiente Zunahme der intravesikulären Fluoreszenzintensität beobachtet (siehe **Abb. 4.9 A-B**, gelb und blau markierte Vesikel). Dieser Effekt basiert auf der Tatsache, dass GFP ein pH-sensitiver Fluorophor ist, dessen Fluoreszenz bei niedrigen pH-Werten reduziert und bei neutralen pH-Wert erhöht ist (**Patterson et al., 1997**). Nach Öffnung der Fusionspore wird der pH-Wert saurer Vesikel neutralisiert, was zunächst zu einem Anstieg der BDNF-GFP-Fluoreszenzintensität führte. Der transienten Intensitätszunahme folgte ein exponentieller Abfall der vesikulären Fluoreszenzintensität aufgrund von Diffusion von BDNF-GFP aus dem geöffneten Vesikel. In wenigeren Fällen (Kontroll-shRNA:  $24,9 \pm 6,9$  %; CAPS1-shRNA:  $29,6 \pm 8,4$  %; **Abb. 4.10 B**) konnte jedoch ein sofortiger Abfall der Fluoreszenzintensität ohne anfängliche transiente Erhöhung der Fluoreszenzintensität beobachtet werden (siehe **Abb. 4.9 A-B**, grün markierter Vesikel). Dies deutete darauf hin, dass der intravesikuläre pH-Wert dieser Vesikel bereits dem extrazellulärem pH-Wert des Puffers entsprach. Der durchschnittliche Anteil der Vesikel, die nach Kalium-induzierter Depolarisation eine sichtbare Fluoreszenzveränderung ausgelöst durch ein Fusionsereignis zeigten, entsprach  $21,2 \pm 3,6$  % (**Abb. 4.9 C**) und war somit vergleichbar mit dem in 4.4.2 bereits bestimmten Anteil an fusionierenden Vesikeln unter Kontrollbedingungen. Mit  $24,4 \pm 3,5$  % war der durchschnittliche Anteil der Vesikel, deren Restfluoreszenz 300 s nach Beginn der Stimulation durch Applikation von Bromphenolblau ausgelöscht werden konnte, ebenfalls nicht signifikant verschieden (**Abb. 4.9 C**). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei dem beobachteten exponentiellen Fluoreszenzabfall der untersuchten Vesikel um die Ausschüttung von BDNF-GFP, jedoch nicht um ein Wiederverschließen der Fusionspore

mit anschließender Reacidifizierung der Vesikel handelte. Um zu überprüfen, ob Vesikel auch innerhalb des Zeitraums von Stimulation bis zum Ende der Messung keinem Wiederverschließen unterlagen, wurde eine Kontrollmessung durchgeführt, bei der Bromphenolblau nach der Stimulation der Exozytose kontinuierlich ein- und ausgewaschen

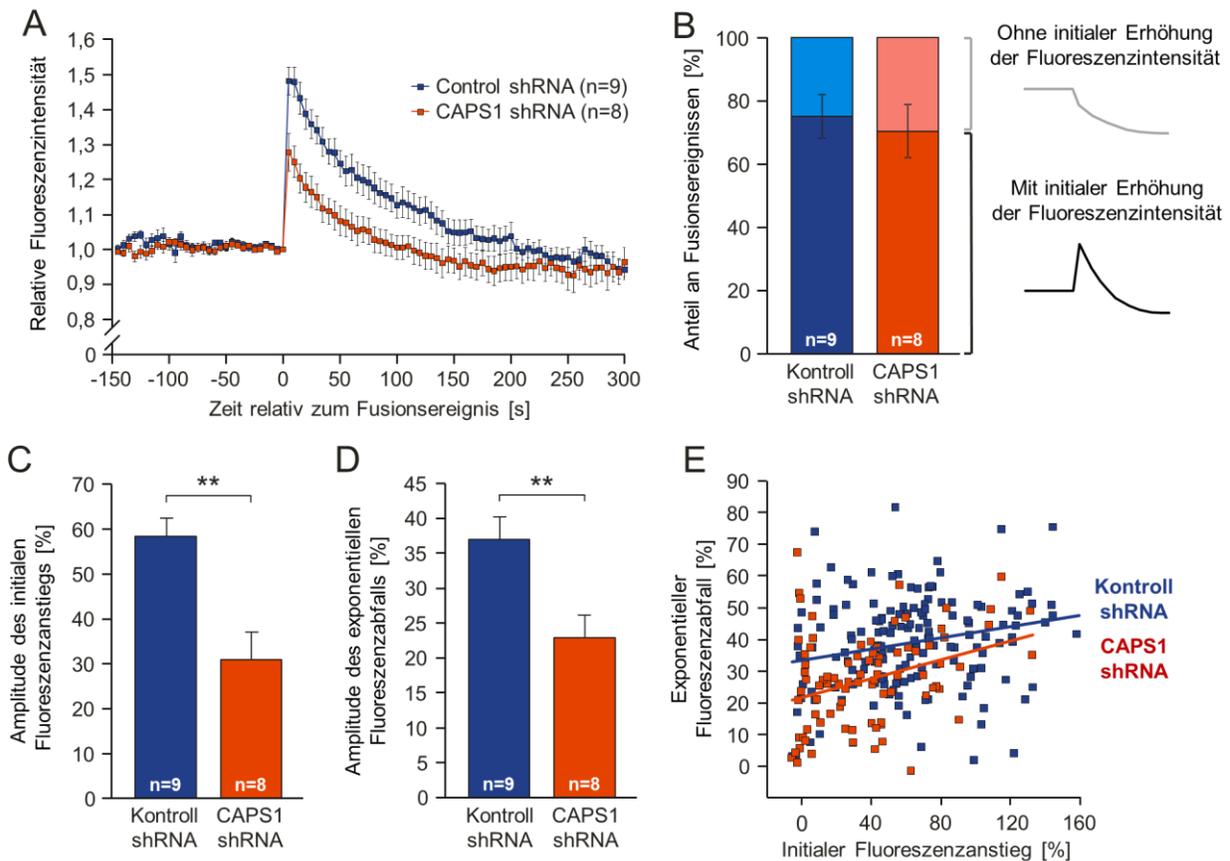


**Abb. 4.9: Ausschüttung von BDNF-GFP aus einzelnen Vesikeln.** (A) *Timelapse*-Aufnahmen einzelner BDNF-GFP-beinhaltender Vesikel, die nach Stimulation der Zellen durch die Applikation einer Pufferlösung mit erhöhtem (50 mM) Kaliumgehalt ( $K^+$ ) ein Fusionsereignis zeigten (grün, gelb, blau) im Vergleich zu einem nicht fusionierenden Vesikel (rot). Die einzelnen Bilder wurden in Relation zum Fusionsereignis ( $t=0$ ) zeitlich verschoben. Die Restfluoreszenz von fusionierten Vesikeln konnte am Ende der Messung durch die Applikation von Bromphenolblau (BPB) ausgelöscht werden. (B) Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität der in (A) dargestellten Vesikel bei nicht-verschobener Zeitskala. Fusionsereignisse traten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beginn der Stimulation auf und zeigten entweder einen transienten Fluoreszenzanstieg nach Fusionsporeöffnung mit sich anschließendem exponentiellen Fluoreszenzabfall (gelb, blau) oder nur einen Fluoreszenzabfall ohne vorherigen Fluoreszenzanstieg (grün). (C) Der Anteil der BDNF-GFP-beinhaltenden Vesikel, die nach der Stimulation eine Fluoreszenzveränderung durch ein Fusionsereignis zeigten, war nicht verschieden vom Anteil der Vesikel, die am Ende der Messung durch Bromphenolblau-Applikation gequencht werden konnten. (D) Verhalten von fusionierenden Vesikeln (grün, gelb, blau) im Vergleich zu einem nicht fusionierenden Vesikel (rot) bei wiederholtem ein- und Auswaschen von Bromphenolblau (BPB). Die Restfluoreszenz einzelner fusionierter BDNF-GFP-beinhaltender Vesikel war noch 1100 s nach der Kalium-induzierter Stimulation sichtbar und hatte während des ganzen Beobachtungszeitraums Kontakt zum extrazellulären Milieu.  $n$  = Anzahl der gemessenen Zellen, Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

wurde (**Abb. 4.9 D**). Hierbei konnte gezeigt werden, dass der BDNF-GFP-Inhalt von Vesikeln nach einem Fusionsereignis während des gesamten Beobachtungszeitraums (1100 s) Kontakt zur extrazellulären Pufferlösung hatte und dessen Restfluoreszenz auch noch lange nach dem Fusionsereignis detektiert werden konnte. Ein Verschließen der Fusionsporen mit anschließender Reacidifizierung konnte in den untersuchten Zellen somit nicht beobachtet werden.

Um nun den Einfluss von CAPS1 auf die Ausschüttung von BDNF zu untersuchen, wurde der Fluoreszenzverlauf von einzelnen BDNF-GFP-beihaltenden Vesikeln nach shRNA-vermitteltem *Knock-down* von CAPS1 analysiert. Da Fusionsereignisse zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Kalium-induzierter Stimulation der Zellen auftraten (siehe **Abb. 4.9 B** und **Abb. 4.7 F**), wurde der Fluoreszenzverlauf zeitlich verschoben und auf den Zeitpunkt vor dem Fusionsereignis normalisiert ( $t = 0$  ist dabei der Zeitpunkt vor dem Fusionsereignis). Die durchschnittliche normalisierte Fluoreszenzkinetik einzelner Vesikel von Kontroll- bzw. CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen ist in **Abb. 4.10 A** dargestellt. Die Ausschüttung von BDNF-GFP wurde als Abnahme der Fluoreszenzintensität gemessen. Dabei wurde der Fluoreszenzabfall einzelner BDNF-GFP-beihaltender Vesikel vom höchsten Fluoreszenzwert nach der Fusionsporenöffnung ausgehend bis zum Ende der jeweiligen Messung (Mittelwert der letzten 5 Fluoreszenzwerte vor Bromphenolblau-Applikation) bestimmt. Es zeigte sich, dass die Amplitude des Fluoreszenzabfalls (Kontroll-shRNA:  $36,9 \pm 3,2$  %; CAPS1-shRNA:  $22,9 \pm 3,2$  %;  $p = 7,0 \times 10^{-3}$ ) nach *Knock-down* von CAPS1 signifikant reduziert war (**Abb. 4.10 D**). Überraschenderweise war jedoch auch der Fluoreszenzanstieg direkt nach der Fusionsporenöffnung (Kontroll-shRNA:  $58,2 \pm 4,0$  %; CAPS1-shRNA:  $30,9 \pm 6,0$  %;  $p = 1,7 \times 10^{-3}$ ) nach *Knock-down* von CAPS1 signifikant reduziert (**Abb. 4.10 C**). Diese Reduzierung konnte nicht mit einer verminderten Häufigkeit von Fusionsereignissen, die allgemein durch einen transienten Anstieg der vesikulären Fluoreszenzintensität charakterisiert waren, begründet werden (**Abb. 4.10 B**). Da der Anstieg der vesikulären Fluoreszenzintensität durch den Neutralisationsschritt nach dem Fusionsereignis bestimmt wird, deutete dieses Ergebnis auf eine Veränderung des vesikulären pH-Wertes nach *Knock-down* von CAPS1 hin. Um zu untersuchen, ob der transiente Fluoreszenzanstieg nach dem Fusionsereignis (pH-Neutralisation) mit dem exponentiellen Fluoreszenzabfall nach der Stimulation (BDNF-GFP-Ausschüttung)

zusammenhing, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt (**Abb. 4.10 E**). Dabei ergab sich nur eine schwache Korrelation zwischen beiden gemessenen Parametern (Kontroll-shRNA:  $r = 0,28$  mit  $p = 3,7 \times 10^{-4}$ ; CAPS1-shRNA:  $r = 0,34$  mit  $p = 1,4 \times 10^{-3}$ ; nach Fischer Z-Transformation nicht signifikant verschieden mit  $p = 0,317$ ). Zusammenfassend wurde beobachtet, dass nach *Knock-down* von CAPS1 die Ausschüttung von BDNF-GFP aus

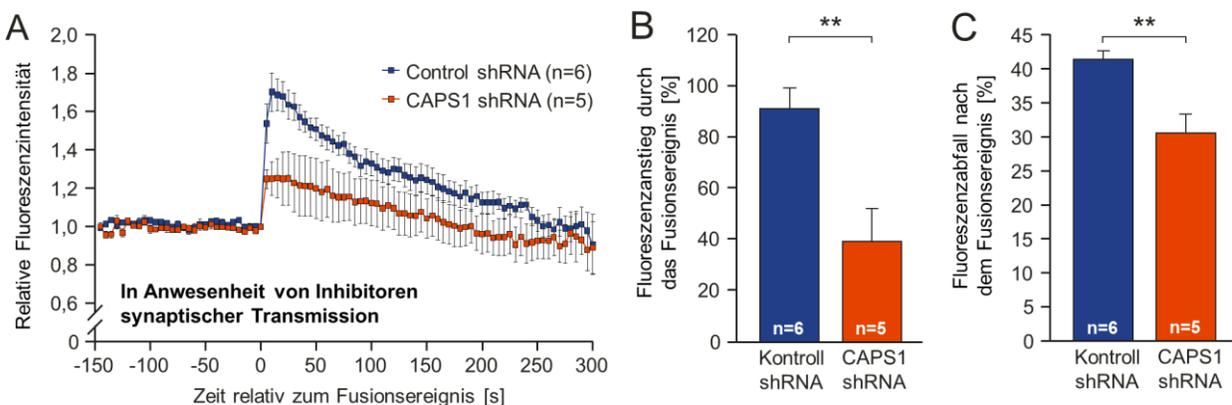


**Abb. 4.10: Ausschüttung von BDNF-GFP aus einzelnen Vesikeln.** Hippokampale Neurone (DIV 9) wurden mit BDNF-GFP-kodierenden Kontroll- bzw. CAPS1-shRNA-Vektoren transfiziert. Nach weiteren 5 Tagen wurde die Ausschüttung von BDNF aus einzelnen Vesikeln videomikroskopisch untersucht. **(A)** Durchschnittlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität einzelner fusionierender BDNF-GFP-Vesikel aus Kontroll-shRNA (110 Vesikel) oder CAPS1-shRNA (57 Vesikel) transfizierten Neurone. Der Fluoreszenzverlauf wurde auf den Zeitpunkt vor dem Fusionsereignis ( $t=0$ ) normalisiert. **(B)** Quantitative Auswertung der Fusionsereignisse. Der prozentuale Anteil an Fusionsereignissen mit bzw. ohne transiente Erhöhung der vesikulären Fluoreszenzintensität war in Kontrolle und *Knock-down* von CAPS1 ähnlich hoch. **(C)** Jedoch war die Amplitude des transienten Fluoreszenzanstiegs nach Fusionsporenöffnung in CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen signifikant reduziert. **(D)** Auch die Amplitude des exponentiellen Fluoreszenzabfalls (entspricht der Ausschüttung von BDNF) einzelner BDNF-GFP-beihaltender Vesikel war nach CAPS1-*Knock-down* signifikant reduziert. **(E)** Korrelation zwischen dem Fluoreszenzabfall durch die Ausschüttung von BDNF-GFP und dem transienten Fluoreszenzanstieg nach Fusionsporenöffnung. In beiden Bedingungen wurden schwache Korrelationen, die nicht signifikant voneinander verschieden waren, bestimmt (Kontroll-shRNA: 159 Vesikel, CAPS1-shRNA: 87 Vesikel).  $n$  = Anzahl der gemessenen Zellen, \*\*  $p < 0,01$ , Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

einzelnen Vesikeln vermindert wurde. Auch die Amplitude des transienten Fluoreszenzanstiegs nach dem Neutralisationsschritt wurde nach *Knock-down* von CAPS1 reduziert. Dies deutete auf eine Erhöhung des vesikulären pH-Wertes in den untersuchten Vesikeln CAPS1-shRNA-transfizierter Neuronen hin.

#### 4.4.5 Einfluss synaptischer Aktivität auf die Ausschüttung von BDNF-GFP

Wie in 4.4.3 für die Fusionsporenöffnung beschrieben, wurde ebenfalls ein möglicher Einfluss der durch den *Knock-down* von CAPS1 verursachten, reduzierten synaptischen Transmission (siehe 4.3) auf die Ausschüttung von BDNF-GFP aus einzelnen Vesikeln untersucht. Hierzu wurde die Experimente zur Ausschüttung von BDNF-GFP in Anwesenheit von Inhibitoren synaptischer Aktivität (DNQX, D/L-AP5, Picrotoxin) wiederholt. Der gemittelte normalisierte Fluoreszenzverlauf einzelner Vesikel von Kontroll- und CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen ist in **Abb. 4.11 A** dargestellt. Wie auch schon in Abwesenheit von Inhibitoren synaptischer Transmission (siehe 4.4.4) war die Amplitude des Fluoreszenzabfalls durch die Ausschüttung von BDNF-GFP (Kontroll-shRNA:  $41,4 \pm 1,3$  %; CAPS1-shRNA:  $30,5 \pm 2,9$  %;  $p = 5,0 \times 10^{-3}$ ) in CAPS1-shRNA-transfizierten Zellen signifikant reduziert (**Abb. 4.11 C**). Auch die Amplitude des transienten Fluoreszenzanstiegs nach Fusionsporenöffnung (Kontroll-shRNA:  $90,6 \pm 8,4$  %; CAPS1-



**Abb. 4.11: Ausschüttung von BDNF-GFP aus einzelnen Vesikeln in Anwesenheit von Inhibitoren synaptischer Transmission.** Die Messung wurden analog zu **Abb. 4.10** durchgeführt, jedoch wurden die Zellen in Anwesenheit von 5  $\mu$ M DNQX, 50  $\mu$ M AP-V und 100  $\mu$ M Picrotoxin gemessen. **(A)** Durchschnittlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität einzelner BDNF-GFP-beinhaltenender Vesikel aus Kontroll-shRNA (50 Vesikel) bzw. CAPS1-shRNA-transfizierten (31 Vesikel) Neurone. Der Fluoreszenzverlauf wurde auf den Zeitpunkt vor dem Fusionsereignis ( $t=0$ ) normalisiert. **(B)** Die Amplitude des transienten Fluoreszenzanstiegs nach Fusionsporenöffnung war erneut in CAPS1-shRNA transfizierten Neuronen signifikant reduziert. **(C)** Auch die Amplitude des exponentiellen Fluoreszenzabfalls (entspricht der Ausschüttung von BDNF) einzelner BDNF-GFP-beinhaltenender Vesikel war nach CAPS1-*Knock-down* signifikant reduziert.  $n$  = Anzahl der gemessenen Zellen, \*\*  $p < 0,01$ , Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

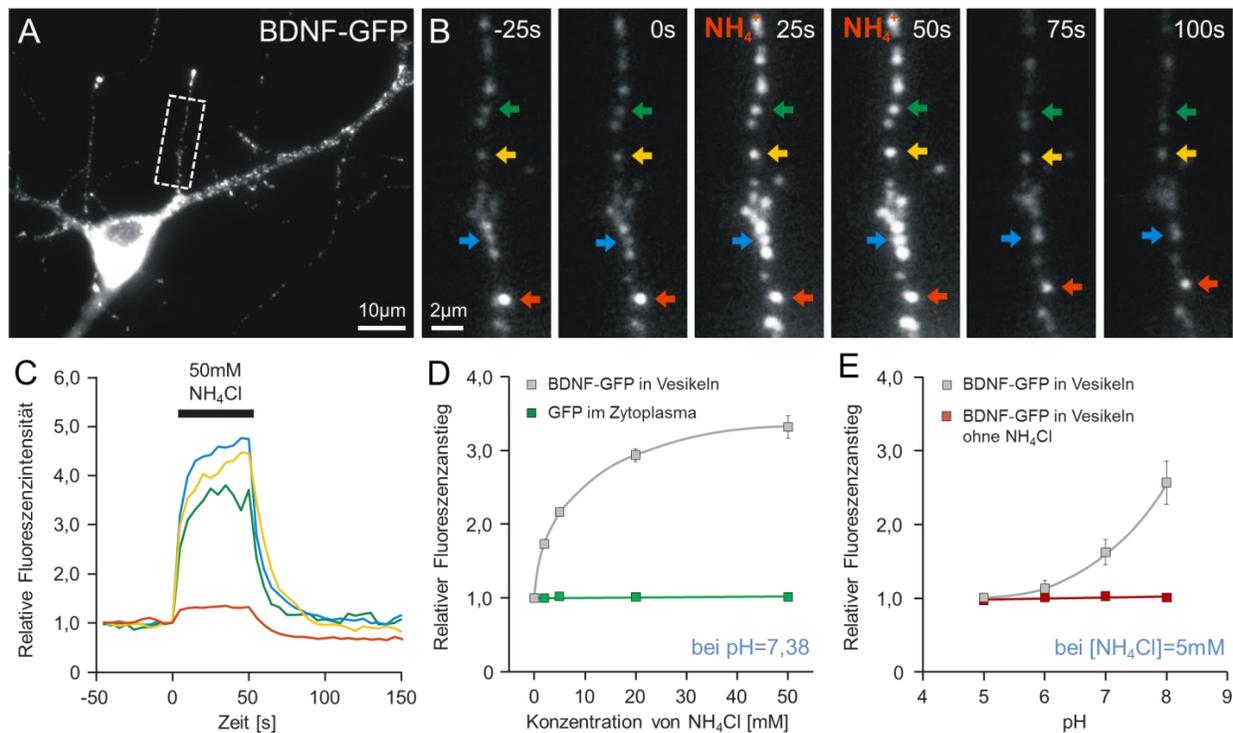
shRNA:  $38,8 \pm 12,9 \%$ ;  $p = 7,0 \times 10^{-3}$ ) war ebenfalls nach *Knock-down* von CAPS1 signifikant reduziert (**Abb. 4.11 B**). Somit war die zuvor beschriebene reduzierte Ausschüttung von BDNF-GFP aus Vesikeln von CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen (**4.4.4**) kein Nebeneffekt der in diesen Neuronen bereits beobachteten reduzierten Neurotransmitterfreisetzung (**4.3**).

## 4.5 Einfluss von CAPS1 auf den vesikulären pH-Wert

### 4.5.1 Untersuchung des vesikulären pH-Wertes mit Hilfe von $\text{NH}_4\text{Cl}$

Um einen möglichen Einfluss von CAPS1 auf den Beladungszustand oder den pH-Wert einzelner sekretorischer Granula näher zu untersuchen, wurden BDNF-GFP-transfizierte Zellen mit Ammoniumchlorid-haltiger ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) Pufferlösung überspült. Extrazellulär appliziertes Ammoniumsalz ( $\text{NH}_4^+$ ) kann innerhalb eines chemischen Gleichgewichtes in wässriger Lösung zu Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) dissoziieren. Dieses membranpermeable Molekül kann in intrazelluläre und intravesikuläre Kompartimente der Zelle diffundieren und durch Aufnahme dortiger Protonen wiederum Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) bilden. Durch die Protonenaufnahme innerhalb saurer Vesikel wird der vesikuläre pH-Wert erhöht (**Boron & De Weer, 1976**). Da GFP ein pH-Wert-abhängiger Fluorophor ist (vergleiche **4.4.4**), kann durch das kurze Überspülen von BDNF-GFP-transfizierten hippocampalen Neuronen mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -haltiger Pufferlösung eine reversible Fluoreszenzzunahme innerhalb der sauren sekretorischen Granula beobachtet werden. Je nach pH-Wert des Vesikels kann diese Fluoreszenzzunahme relativ hoch (**Abb. 4.12 A-C**, blau, gelb und grün markierter Vesikel) oder relativ gering (**Abb. 4.12 A-C**, rotmarkierter Vesikel) ausfallen. Die relative Fluoreszenzerhöhung einzelner BDNF-GFP-beinhaltenender sekretorischer Granula wurde durch das Verhältnis der Fluoreszenz während der  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Überspülung und der Basislinienfluoreszenz vor der  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Applikation bestimmt. Eine Fluoreszenzzunahme trat lediglich in sauren intrazellulären Kompartimenten der Zelle auf (keine Fluoreszenzerhöhung bei zytosolisch lokalisierten GFP in Dendriten). Sie war abhängig von der extrazellulär applizierten  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Konzentration (bei konstantem pH-Wert von 7,38) und erreichte ihre Sättigung bei etwa 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (**Abb. 4.12 D**). Ebenso hatte der pH-Wert der extrazellulär applizierten Ammoniumchloridlösung (bei konstanter Konzentration von

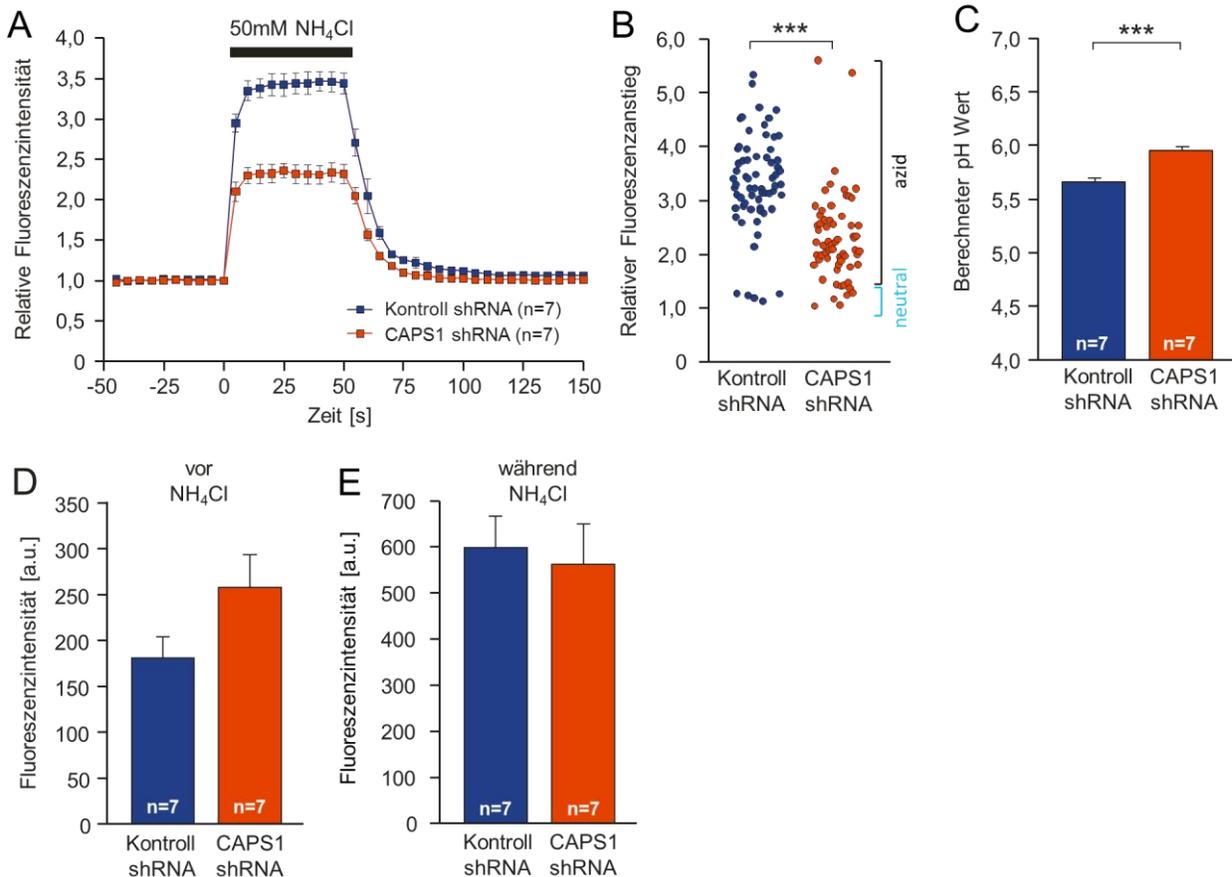
5 mM) einen Einfluss auf die BDNF-GFP-Fluoreszenz (**Abb. 4.12 E**). Ursächlich hierfür ist, dass der extrazelluläre pH-Wert die Lage des chemischen Gleichgewichtes zwischen  $\text{NH}_4^+$  und  $\text{NH}_3$  verschiebt und somit die Menge des gebildeten  $\text{NH}_3$  beeinflusst. So konnte bei hohen extrazellulären pH-Werten mehr  $\text{NH}_3$  in BDNF-GFP-beinhaltende Vesikel diffundieren und eine höhere GFP-Fluoreszenzzunahme beobachtet werden. Eine Veränderung des extrazellulären pH-Wertes in Abwesenheit von Ammoniumchlorid hatte jedoch keinen Einfluss auf die Fluoreszenz von vesikulärem BDNF-GFP (**Abb. 4.12 E**).



**Abb. 4.12: Effekt von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  auf die Fluoreszenzintensität BDNF-GFP-beinhaltender Vesikel.** (A) Repräsentatives Bild eines BDNF-GFP-transfizierten hippocampalen Neurons. (B) Ausschnittsvergrößerung der markierten dendritischen Region aus (A). Die farbkodierten Pfeile markieren einzelne Vesikel zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor, während und nach der Applikation von 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -haltiger Pufferlösung ( $\text{NH}_4^+$ ). (C) Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität der farbig markierten Vesikel aus (B). In den meisten Fällen hatte das Überspülen von  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung eine rasche Zunahme der intravesikulären Fluoreszenzintensität zur Folge. (D)  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -induzierte Zunahme der Fluoreszenzintensität einzelner BDNF-GFP-beinhaltender Vesikel durch Titration verschiedener  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Konzentrationen (graue Kurve). Die Fluoreszenzzunahme erreichte ihre Sättigung bei etwa 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Im Vergleich dazu zeigte zytosolisch lokalisiertes GFP in vergleichbaren dendritischen Regionen von GFP-transfizierten hippocampalen Neuronen keine wesentliche Fluoreszenzintensitätszunahme (grüne Kurve). (E)  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -induzierte Zunahme der Fluoreszenzintensität einzelner BDNF-GFP-beinhaltender Vesikel durch Titration verschiedener pH-Werte einer 5 mM konzentrierten  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung (graue Kurve). Mit steigendem pH-Wert nahm auch die Fluoreszenzintensitätszunahme zu. Im Vergleich dazu zeigte die Titration mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -freien Puffern verschiedener pH-Werte keine wesentliche Fluoreszenzveränderung der BDNF-GFP-beinhaltenden Vesikel (rote Kurve).

Da sich die Fluoreszenzzunahme von BDNF-GFP durch Applikation von 50 mM im gesättigten Bereich befand (**Abb. 4.12 D**), wurde diese Konzentration benutzt, um die Fluoreszenzveränderungen von BDNF-GFP-beihaltenden Vesikeln aus Kontroll- und CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen miteinander zu vergleichen. Der durchschnittliche normalisierte Fluoreszenzverlauf (**Abb. 4.13 A**) zeigte dabei, dass die Applikation von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in CAPS1-shRNA-transfizierte Neurone einen wesentlich niedrigeren Fluoreszenzanstieg zur Folge hatte als in der Kontrolle. Der relative Fluoreszenzanstieg einzelner Vesikel ist in **Abb. 4.13 B** dargestellt. Unter Kontrollbedingungen konnten zwei klar voneinander abgrenzbare Vesikelpopulationen beobachtet werden. Einerseits gab es Vesikel, die durch  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Applikation ihre Fluoreszenz nur wenig veränderten. Diese entsprachen dabei Vesikeln mit einem nahezu neutralem pH-Wert. Andererseits gab es Vesikel, deren Fluoreszenz stark anstieg, was für einen stark aziden pH-Wert dieser Vesikel sprach. Der durchschnittliche Anstieg der vesikulären GFP-Fluoreszenzintensität von CAPS1-shRNA-transfizierten Zellen war signifikant geringer als der Fluoreszenzanstieg von Kontroll-shRNA-transfizierten Zellen (Kontroll-shRNA:  $3,4 \pm 0,1$ ; CAPS1-shRNA:  $2,4 \pm 0,1$ ;  $p = 4,8 \times 10^{-6}$ ; **Abb. 4.13 B**). Da der relative Fluoreszenzanstieg durch  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Applikation von der ursprünglichen Protonenkonzentration in den Vesikeln abhängt, wurde mit Hilfe einer der Hendersen-Hasselbalch-Gleichung abgeleiteten Gleichung (siehe **3.4.3.5**) der vesikuläre pH-Wert berechnet (**Abb. 4.13 C**). Dabei konnte eine signifikante Erhöhung des vesikulären pH-Werts in CAPS1-shRNA-transfizierten Zellen ermittelt werden (Kontroll-shRNA:  $\text{pH}=5,66 \pm 0,03$ ; CAPS1-shRNA:  $\text{pH}=5,95 \pm 0,03$ ;  $p = 3,3 \times 10^{-5}$ ). Der höhere pH-Wert in Vesikeln von CAPS1-shRNA-transfizierten Zellen sollte ebenso eine Erhöhung der absoluten Fluoreszenzintensitätswerte einzelner Vesikel vor dem Überspülen mit 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  bewirken. Dieser Effekt konnte jedoch auf Grund der hohen Varianz der Fluoreszenzintensität einzelner Vesikel nur tendenziell ( $p = 0,097$ ) beobachtet werden (**Abb. 4.13 D**). Da die BDNF-GFP-Fluoreszenz während des Überspülens mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  nicht vom pH-Wert des Vesikels abhängig ist, war die dabei gemessene Fluoreszenzintensität proportional zum BDNF-GFP-Gehalt des Vesikels. Die absolute Fluoreszenzintensität einzelner Vesikel während der  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Applikation (**Abb. 4.13 E**) bei beiden Bedingungen war dabei nicht signifikant voneinander verschieden (Kontroll-shRNA:  $596,9 \pm 67,6$  a.u.;

CAPS1-shRNA:  $560,9 \pm 86,5$  a.u.). Es konnte somit von einer gleichwertigen Beladung der Vesikel mit BDNF-GFP unter beiden Bedingungen ausgegangen werden.



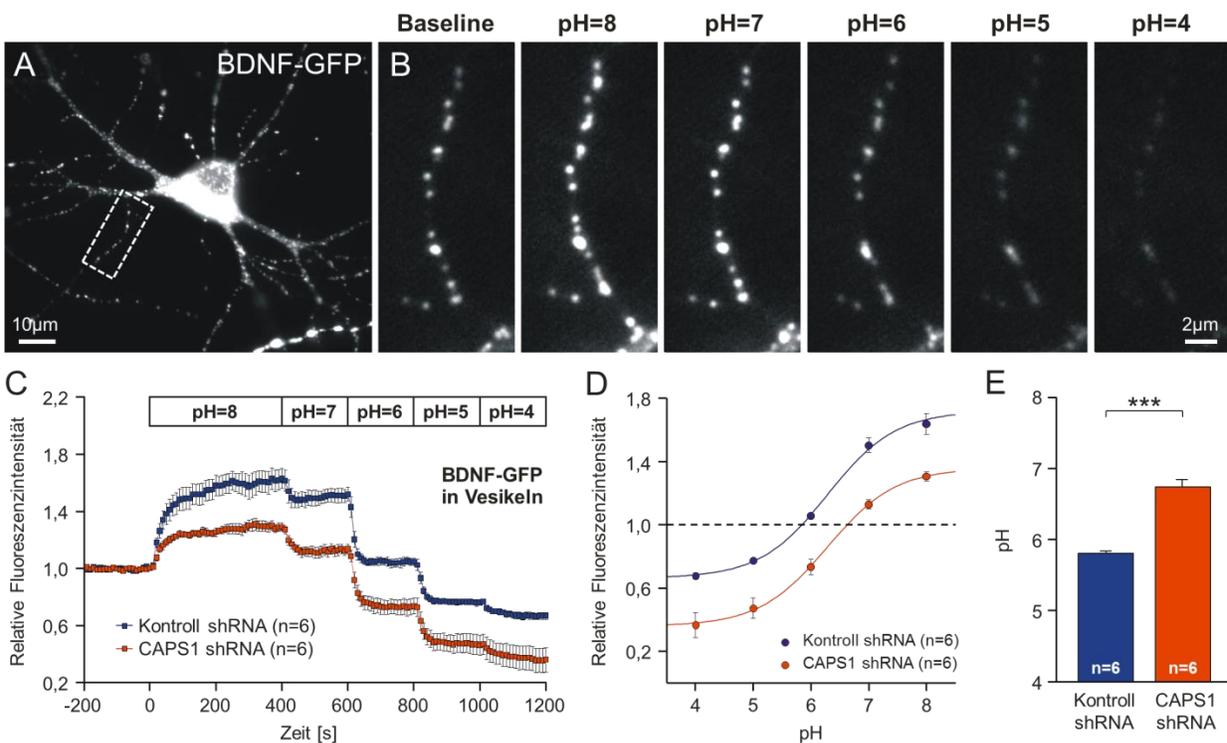
**Abb. 4.13: Einfluss von CAPS1 auf die Fluoreszenzzunahme durch Überspülen von NH<sub>4</sub>Cl.** Hippokampale Neurone (DIV 9) wurden mit BDNF-GFP-kodierenden Kontroll- bzw. CAPS1-shRNA-Vektoren transfiziert. Nach weiteren 5 Tagen wurde die Fluoreszenzintensität einzelner BDNF-GFP-beinhaltender Vesikel nach Überspülen der Zelle mit einer 50 mM NH<sub>4</sub>Cl-haltigen Pufferlösung videomikroskopisch untersucht. **(A)** Durchschnittlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität einzelner BDNF-GFP-beinhaltender Vesikel vor, während und nach dem Überspülen der Zelle mit 50 mM NH<sub>4</sub>Cl-haltiger Pufferlösung (Kontroll-shRNA: 68 Vesikel, CAPS1-shRNA: 62 Vesikel). **(B)** NH<sub>4</sub>Cl-induzierter relativer Anstieg der Fluoreszenzintensität aller gemessener Vesikel. In Kontroll-shRNA-transfizierten Neuronen sind deutlich zwei verschiedene Vesikelpopulationen (pH-neutrale und azide Vesikel) zu erkennen. In CAPS1-shRNA-transfizierten Zellen waren die relativen Fluoreszenzanstiege aller Vesikel reduziert. **(C)** Mit Hilfe der Henderson-Hasselbalch-Gleichung aus den NH<sub>4</sub>Cl-induzierten Fluoreszenzanstiegen berechneter vesikulärer pH-Wert. Der vesikuläre pH-Wert war nach *Knock-down* von CAPS1 signifikant erhöht. **(D-E)** Quantitative Auswertung der absoluten Fluoreszenzintensität BDNF-GFP-beinhaltender Vesikel vor (D) bzw. während (E) der Applikation von NH<sub>4</sub>Cl. Da während der Applikation von 50 mM NH<sub>4</sub>Cl die Fluoreszenzintensität proportional zum GFP-Gehalt des Vesikels ist, deuteten diese Ergebnisse auf eine gleichwertige Beladung der Vesikel mit BDNF-GFP hin. Die absolute Fluoreszenzintensität BDNF-GFP-beinhaltender Vesikel vor der NH<sub>4</sub>Cl-Applikation war jedoch in CAPS1-shRNA-transfizierten Zellen tendenziell erhöht. n = Anzahl der gemessenen Zellen, \*\*\* p < 0,001, Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

#### 4.5.2 pH-Titrationsmessungen einzelner BDNF-GFP-beinhaltenender Vesikel

Der durch vorangegangene Messungen beobachtete Effekt von CAPS1 auf den vesikulären pH-Wert (siehe 4.4.4 und 4.5.1) sollte mit einer anderen Methode zur Bestimmung des vesikulären pH-Wert bestätigt werden. Hierzu wurde durch extrazelluläre Applikation von Puffern verschiedener definierter pH-Werte der Protonengehalt von BDNF-GFP-beinhaltenen Vesikeln verändert und die Fluoreszenzveränderung des GFP-Moleküls als pH-Indikator dokumentiert. Da eine Veränderung des extrazellulären pH-Wertes allein nicht zu einer Veränderung des vesikulären Protonengehalts führte (**Abb. 4.12 E**), musste gewährleistet werden, dass Protonen über die Zell- und Vesikelmembran in bzw. aus den Vesikeln transportiert werden konnte. Hierzu wurde den extrazellulären Puffern der  $H^+/K^+$ -Antiporter Nigericin und der  $K^+$ -Ionophor Valinomycin zugesetzt (**Kneen et al., 1998**). Gleichzeitig wurde die extrazelluläre  $K^+$ -Konzentration auf 100 mM erhöht, um zu gewährleisten, dass Nigericin unabhängig vom  $K^+$ -Gradienten  $H^+$ -Ionen über die Membran transportieren konnte. Um einer bei dieser erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration hervorgerufener, depolarisierungsinduzierter Ausschüttung der BDNF-GFP-beinhaltenen Vesikel vorzubeugen, wurden die extrazellulär applizierten Puffer  $Ca^{2+}$ -frei gehalten.

Für die Untersuchung des Einfluss von CAPS1 auf den vesikulären pH-Wert wurden hippokampale Neurone mit BDNF-GFP-kodierenden Kontroll- bzw. CAPS1-shRNA-Vektoren transfiziert. Zunächst wurde die Basisfluoreszenz von einzelnen BDNF-GFP-beinhaltenen Vesikeln in Valinomycin/Nigericin-freiem Puffer bestimmt. Anschließend wurden schrittweise Valinomycin/Nigericin-haltige Puffer mit verschiedenen, definierten pH-Werten überspült, was zu Fluoreszenzintensitätsänderungen des intravesikulären BDNF-GFPs entsprechend des eingestellten pH-Wertes führte (**Abb. 4.14 A-B**). Der gemittelte Fluoreszenzverlauf einzelner Vesikel von Kontroll- bzw. CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen in Relation zur Basisfluoreszenz ist in **Abb. 4.14 C** dargestellt. Mit Ausnahme der Erstapplikation (pH=8), bei der Nigericin und Valinomycin erst noch in die jeweiligen Membrankomponenten diffundieren mussten, stellte sich das Gleichgewicht zwischen innerem und äußeren pH-Wert innerhalb weniger Sekunden ein. Die Mittelwerte der relativen Fluoreszenzintensität während des Protonengleichgewichtes wurden gegen die entsprechenden pH-Werte aufgetragen und anschließend mit einer sigmoidalen Funktion (Boltzmann-Gleichung, Origin Software) gefittet. Die unterschiedliche Lage der

durchschnittlichen sigmoidalen Anpassungskurve in Relation zur Basislinienfluoreszenz von Kontroll- und CAPS1-shRNA-transfizierten Zellen ist in **Abb. 4.14 D** dargestellt. Um den ursprünglichen vesikulären pH-Wert extrapolieren zu können, wurde der Mittelwert der Basislinie der normalisierten Fluoreszenzintensität in die Gleichung der Anpassungskurve eingesetzt. Der über alle Zellen gemittelte pH-Wert der Vesikel ist in **Abb. 4.14 E** dargestellt. Der vesikuläre pH-Wert aus Kontroll-shRNA-transfizierten Zellen ( $\text{pH} = 5,80 \pm 0,03$ ) war vom vesikulären pH-Wert aus CAPS1-shRNA-transfizierten Zellen ( $\text{pH} = 6,73 \pm$

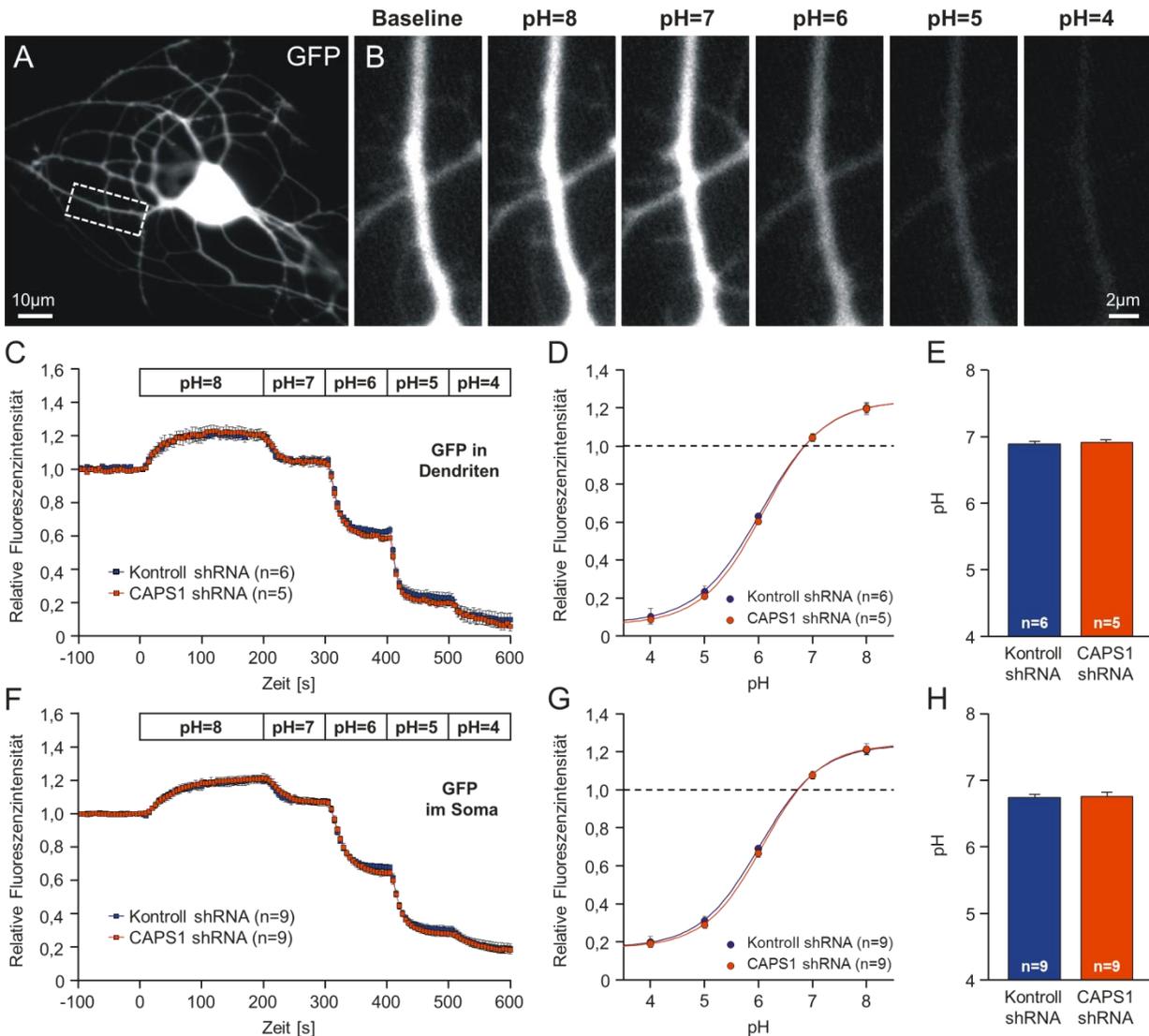


**Abb. 4.14: pH-Titration von BDNF-GFP-beinhaltender Vesikel.** Hippokampale Neurone (DIV 9) wurden mit BDNF-GFP-kodierenden Kontroll- bzw. CAPS1-shRNA-Vektoren transfiziert. Nach weiteren 5 Tagen wurde der pH-Wert einzelner BDNF-GFP-beinhaltender Vesikel videomikroskopisch untersucht. Hierzu wurden verschiedener Puffer mit definierten pH-Werten in Anwesenheit von Nigericin / Valinomycin / 100 mM KCl appliziert. **(A)** Repräsentatives Bild eines BDNF-GFP-transfizierten hippocampalen Neurons. **(B)** Ausschnittsvergrößerung der markierten Region aus (A). Abhängig vom extrazellulär applizierten pH-Wert änderte sich die Fluoreszenzintensität einzelner BDNF-GFP-beinhaltender Vesikel. **(C)** Durchschnittlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität von BDNF-GFP-beinhaltenden Vesikeln (Kontroll-shRNA: 59 Vesikel, CAPS1-shRNA: 57 Vesikel). Durch den Protonentransport über die Zell- und Vesikelmembran wurde der vesikuläre pH-Wert und somit auch die Fluoreszenzintensität von BDNF-GFP-beinhaltenden Vesikeln abhängig vom äußeren pH-Wert verändert. Die Fluoreszenzwerte wurden auf die Basislinienfluoreszenzwerte normalisiert, die in Abwesenheit von Nigericin / Valinomycin / 100 mM KCl aufgenommen wurde. **(D)** Sigmoidale Anpassung der relativen Fluoreszenzintensitätswerte im Moment des Protonengleichgewichts bei den entsprechenden extrazellulär applizierten pH-Werten. **(E)** Aus den sigmoiden Anpassungskurven extrapoliertes pH-Wert von BDNF-GFP-beinhaltenden Vesikeln. Der pH-Wert war nach *Knock-down* von CAPS1 signifikant erhöht. n = Anzahl der gemessenen Zellen, \*\*\*  $p < 0,001$ , Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

0,10) signifikant verschieden ( $p = 7,1 \times 10^{-6}$ ). Obwohl die mit dieser experimentellen Methode bestimmten vesikuläre pH-Werte von den mittels Henderson-Hasselbalch Gleichung berechneten pH-Werten nach Überspülen von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  leicht abwichen (**Abb. 4.13 C**), konnte jedoch erneut eine signifikante Erhöhung des vesikulären pH-Wertes durch den *Knock-down* von CAPS1 beobachtet werden.

### 4.5.3 pH-Titrationsmessungen des Zytosols GFP-transfizierter Neurone

Um zu überprüfen, ob die nach *Knock-down* von CAPS1 verursachten Veränderungen des vesikulären pH-Wertes (siehe **4.5.1** und **4.5.2**) auf allgemeine pH-Wertveränderungen im Zytosol zurückzuführen sind, wurden primäre hippocampale Neurone mit GFP-kodierenden Kontroll- oder CAPS1-shRNA-Vektoren transfiziert. Da GFP vor allem zytosolisch lokalisiert ist, konnte durch Anwendung der gleichen Messmethode wie zur Bestimmung der vesikulären pH-Werte (**4.5.2**) nun der zytosolische pH-Wert in vergleichbaren dendritischen Regionen bestimmt werden (**Abb. 4.15 A-B**). Der gemittelte Verlauf der relative Fluoreszenzintensitätsänderung (**Abb. 4.15 C**) war hierbei für Kontroll- und CAPS1-shRNA-transfizierte Neurone nahezu deckungsgleich. Um den zytosolischen pH-Wert bestimmen zu können, wurden wiederum die relativen Fluoreszenzwerte während des Protonengleichgewichtes bei entsprechenden extrazellulär applizierten pH-Werten aufgetragen und sigmoidal angepasst. Auch die durchschnittlichen Anpassungskurven von Kontroll- und CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen waren nicht verschieden (**Abb. 4.15 D**). Der aus den Anpassungskurven extrapolierte zytosolische pH-Wert dendritischer Regionen ist in **Abb. 4.15 E** dargestellt. Im Ergebnis konnte kein signifikanter Unterschied des zytosolische pH-Werts dendritischer Regionen, vergleichbar zu denen, die für die Messung des vesikulären pH-Wertes verwendet wurden (**4.5.2**), zwischen von Kontroll-shRNA ( $\text{pH} = 6,89 \pm 0,04$ ) und CAPS1-shRNA ( $\text{pH} = 6,91 \pm 0,04$ ) transfizierten Neuronen beobachtet werden. Analog dazu wurde der zytosolische pH-Wert am Soma gemessen (**Abb. 4.15 F-H**). Auch hier wurde kein signifikanter Unterschied ermittelt (Kontroll-shRNA:  $\text{pH} = 6,74 \pm 0,04$ ; CAPS1-shRNA:  $\text{pH} = 6,76 \pm 0,06$ ). Es konnte somit gezeigt werden, dass lediglich der vesikuläre pH-Wert durch den *Knock-down* von CAPS1 beeinträchtigt wurde.



**Abb. 4.15: pH-Wertbestimmung des Zytoplasmas GFP-transfizierter Neurone.** Hippokampale Neurone (DIV 9) wurden mit GFP-kodierenden Kontroll- bzw. CAPS1-shRNA-Vektoren transfiziert. Nach weiteren 5 Tagen wurde der intrazelluläre pH-Wert videomikroskopisch untersucht. Hierzu wurden verschiedene Puffer mit definierten pH-Werten in Anwesenheit von Nigericin / Valinomycin / 100 mM KCl appliziert. **(A)** Repräsentatives Bild eines GFP-transfizierten hippocampalen Neurons. **(B)** Ausschnittsvergrößerung des markierten Bereichs aus (A). Durch die Applikation der verschiedenen Pufferlösungen wurde die Fluoreszenzintensität dendritischer Regionen abhängig vom pH-Wertes des Puffers verändert. **(C)** Durchschnittlicher Verlauf der relativen GFP-Fluoreszenzintensität in dendritischen Regionen (Kontroll-shRNA: 44 Regionen aus 6 Zellen, CAPS1-shRNA: 37 Regionen aus 5 Zellen). Die Fluoreszenzwerte wurden auf die Basisfluoreszenzwerte, die in Abwesenheit von Nigericin / Valinomycin / 100 mM KCl aufgenommen wurde. **(D)** Sigmoidale Anpassung der relativen GFP-Fluoreszenzwerte im Moment des Protonengleichgewichts bei den entsprechenden extrazellulär applizierten pH-Werten. **(E)** Aus den sigmoiden Anpassungskurven extrapolierter pH-Wert des Zytoplasmas in Dendriten. **(F)** Durchschnittlicher Verlauf der relativen GFP-Fluoreszenzintensität im Soma analog zu (C). **(G)** Sigmoidale Anpassung der relativen GFP-Fluoreszenzwerte des Somas analog zu (D). **(H)** Aus den sigmoiden Anpassungskurven extrapolierter pH-Wert des Zytoplasmas im Soma. n = Anzahl der gemessenen Zellen, Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

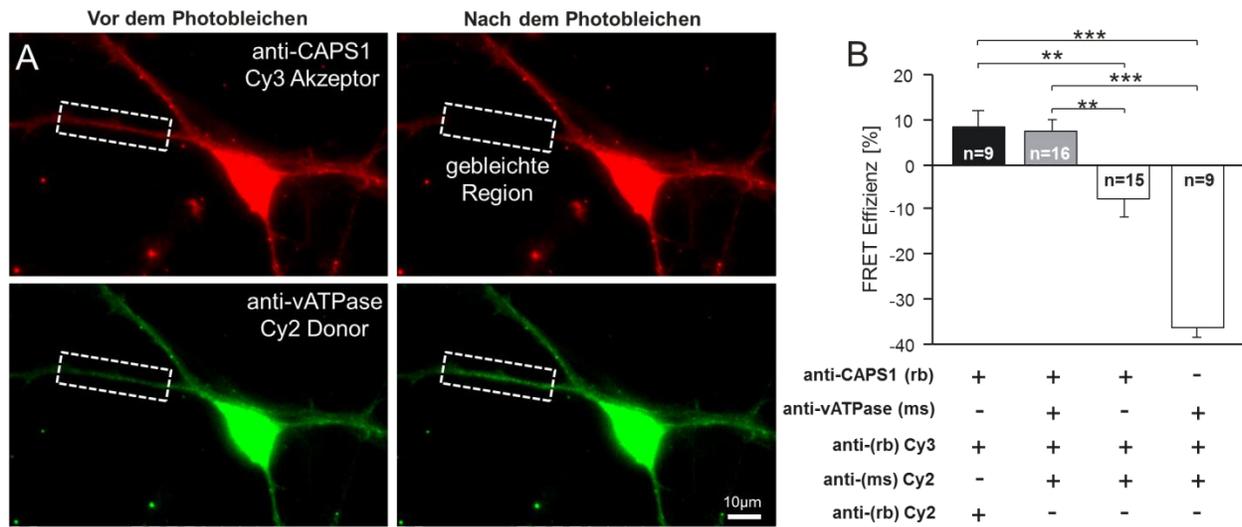
#### 4.6 Potentielle Interaktion von CAPS1 mit der v-Typ-ATPase

Für die Etablierung des sauren pH-Wertes in sekretorischen Granula ist vor allem die v-Typ-ATPase verantwortlich (siehe 1.2.4). Die Erhöhung des pH-Wertes sekretorischer Granula nach *Knock-down* von CAPS1 (siehe 4.5) könnte deshalb auf einem physiologischen Zusammenhang zwischen CAPS1 und der v-Typ-ATPase beruhen. Um eine mutmaßliche Interaktion von CAPS1 und der v-Typ-ATPase zu untersuchen, wurden FRET-Experimente durchgeführt. FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) ist ein physikalischer Effekt, der zwischen zwei fluoreszierenden Molekülen auftreten kann. Grundvoraussetzung ist die räumliche Nähe beider Fluorophore, deren räumliche Orientierung zueinander, sowie eine Überlappung des Emissionsspektrums des FRET-Donormoleküls mit dem Exzitationsspektrum des FRET-Akzeptormoleküls. Sind alle Voraussetzungen für FRET erfüllt, so resultiert die Fluoreszenzanregung des FRET-Donors in einer strahlungsfreien Energieübertragung auf den FRET-Akzeptor, der dabei Licht entsprechend seines Emissionsspektrums emittiert, wohingegen die Fluoreszenz des FRET-Donors gequenchet wird. Mit Hilfe des Akzeptor-Photobleichens kann dabei ein zwischen beiden Fluorophoren vorhandener FRET gemessen werden. Hierbei wird die Fluoreszenz des FRET-Akzeptors auf unter 10 % seiner initialen Intensität geblichen, so dass der Energietransfer des FRET-Donors auf den FRET-Akzeptor unterbrochen wird. Als Resultat kann dabei eine Fluoreszenzzunahme des FRET-Donors beobachtet werden.

Das FRET-Signal zwischen CAPS1 und der v-Typ-ATPase wurde durch indirekte Doppelfärbungen analog zu König und Kollegen bestimmt (König et al., 2006). Hierzu wurden primäre hippocampale Neurone mit Primärantikörpern gegen CAPS1 und v-Typ-ATPase gefärbt und anschließend mit Sekundärantikörpern, an die jeweils der FRET-Donor Cy2 bzw. der FRET-Akzeptor Cy3 gekoppelt waren, gegengefärbt. Mit Hilfe des *Laserscanning*-Mikroskops wurden jeweils die Immunfärbung von CAPS1-Cy3 (rot) und v-Typ-ATPase-Cy2 (grün) des hippocampalen Neurons photodokumentiert (Abb. 4.16 A, links). Anschließend wurde eine dendritische Region ausgewählt und selektiv die rote Fluoreszenz der Immunfärbung gegen CAPS1 innerhalb dieser Region geblichen. Unter Verwendung der gleichen Bildparameter wie zuvor wurden erneut die Immunfärbung von CAPS1-Cy3 (rot) und v-Typ-ATPase-Cy2 (grün) des hippocampalen Neurons

photodokumentiert (**Abb. 4.16 A**, rechts). Bei der Existenz von FRET konnte eine Fluoreszenzintensitätszunahme des Cy2-Donors ausschließlich in der Cy3-Akzeptorgebleichten Region beobachtet werden. Dahingegen blieb die Cy2-Fluoreszenzintensität in den anderen Regionen der Zelle unverändert oder wurde auf Grund des durch die Bildakquise bedingten Photobleichens lediglich geringfügig reduziert. Mit Hilfe der in **3.4.5** beschriebenen Gleichung wurde die FRET-Effizienz in der Akzeptorgebleichten Region bestimmt, über mehrere Zellen gemittelt und mit Kontrollfärbungen verglichen. Als Positivkontrolle wurde eine Einfachimmunfärbung gegen CAPS1 verwendet, bei der beide Sekundärantikörper (Cy2 und Cy3) gegen den primären CAPS1-Antikörper gerichtet waren und somit eine räumliche Nähe beider Fluorophore zu erwarten war. In diesen Färbungen wurde in dendritischen Regionen eine durchschnittliche FRET-Effizienz von  $8,7 \pm 3,4$  % bestimmt (**Abb. 4.16 B**, schwarzer Balken). Für die Doppelimmunfärbung von CAPS1 mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper und v-Typ-ATPase mit einem Cy2-gekoppelten Sekundärantikörper wurde in dendritischen Regionen eine vergleichbar hohe FRET-Effizienz von  $7,6 \pm 2,5$  % bestimmt (**Abb. 4.16 B**, grauer Balken). Dies deutete darauf hin, dass sich die Fluorophore der Zweitantikörper gebunden an CAPS1 oder v-Typ-ATPase in ähnlicher räumlicher Nähe befanden, wie es bei der Positivkontrolle der Fall war. Da eine Kreuzreaktion der Sekundärantikörper an die verwendeten Primärantikörper potentiell falschpositive FRET-Signale ergeben könnte, wurden Negativkontrollen durchgeführt. Diese bestanden aus Immunfärbungen, bei denen entweder der CAPS1 oder der v-Typ-ATPase Primärantikörper ausgelassen, jedoch mit beide Sekundärantikörpern (Cy3 gerichtet gegen CAPS1, Cy2 gerichtet gegen v-Typ-ATPase) gegengefärbt wurde. In Immunfärbungen, bei denen nur der CAPS1-Antikörper verwendet wurde, konnte dabei vereinzelt eine positive FRET-Effizienz bestimmt werden (3 von 15 gemessenen Regionen), jedoch hatte der Großteil der Messungen negative Werte. Im Durchschnitt wurde in dieser Kontrollfärbung eine FRET-Effizienz von  $-7,8 \pm 4,0$  % (**Abb. 4.16 B**, linker weißer Balken) erzielt. Diese Fluoreszenzabnahme lag im Bereich des Photobleichens der nicht-Cy3-gebleichten Kontrollregionen. Dies deutete darauf hin, dass das Photobleichen der im grünen Kanal detektierten unspezifischen Fluoreszenz stärker war als ein falschpositives FRET, welches durch eine unspezifische Bindung des Cy2-Sekundärantikörpers an Cy3-markiertes CAPS1 zustande kommen könnte. In Immunfärbungen bei denen nur der v-Typ-ATPase Antikörper

verwendet wurde, konnten ausschließlich negative Werte für die FRET-Effizienz beobachtet werden. Unter diesen Bedingungen wurde im Durchschnitt eine FRET-Effizienz von  $-36,6 \pm 2,3 \%$  (Abb. 4.16 B, rechter weißer Balken) ermittelt. Es war somit kein falschpositives FRET Signal durch unspezifische Bindung des Cy3-Sekundärantikörpers an die mit Cy2-Sekundärantikörpern markierte v-Typ-ATPase zu beobachten. Insgesamt deuten die FRET-Experimente auf eine räumliche Nähe von CAPS1 mit der v-Typ-ATPase hin, was eine mögliche Interaktion beider Proteine bei der Regulation des vesikulären pH-Wertes erklären könnte.



**Abb. 4.16: FRET-Experiment zur Untersuchung der Interaktion von CAPS1 mit der v-Typ ATPase. (A)** Repräsentatives Bild eines hippocampales Neuron gefärbt gegen CAPS1 (Cy3-FRET-Akzeptor, rot) und v-Typ-ATPase (Cy2-FRET-Donor, grün) vor und nach dem Photobleichen einer ausgewählten dendritischen Region (weiße Markierung). Das Vorhandensein eines FRET zwischen Cy2 und Cy3 konnte durch die Fluoreszenzintensitätszunahme des Cy2-Signals ausschließlich in der Cy3-gebleichten Region nachgewiesen werden. **(B)** FRET-Effizienz dendritischer Regionen in verschiedenen Immunfärbungen. Als Positivkontrolle diente die Färbung von CAPS1 mit Cy2- und Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern gegen CAPS1 (schwarzer Balken). Das zwischen CAPS1 (Cy3 markiert) und v-Typ-ATPase (Cy2 markiert) auftretende FRET-Signal war ähnlich hoch (grauer Balken). Negativkontrollen, bei denen einer der beiden Primärantikörper weggelassen jedoch mit beiden Sekundärantikörpern (Cy3 gegen CAPS1, Cy2 gegen v-Typ-ATPase) angefärbt wurde, zeigten keine positive FRET-Effizienz (weiße Balken). Abkürzungen: rb=rabbit, ms=mouse, entsprechend der Spezies des Primärantikörpers. n = Anzahl der gemessenen Zellen, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

## 4.7 Einfluss des durch CAPS1 veränderten pH-Wertes auf die Neurotrophinsekretion

### 4.7.1 Einfluss des vesikulären pH-Wertes auf Fusionsporenöffnung

Der beobachtete Einfluss von CAPS1 auf den vesikulären pH-Wert könnte potentiell die in 4.4 beschriebenen Störung der Neurotrophinausschüttung beeinflusst bzw. verursacht haben. Um dies auszuschließen, wurden die Untersuchungen zur Fusionsporenöffnung von BDNF-GFP-beihaltenden Vesikel (analog zu 4.4.2) unter Bedingungen wiederholt, bei denen der vesikuläre pH-Wert vor der Fusionsporenöffnung akut neutralisiert wurde.

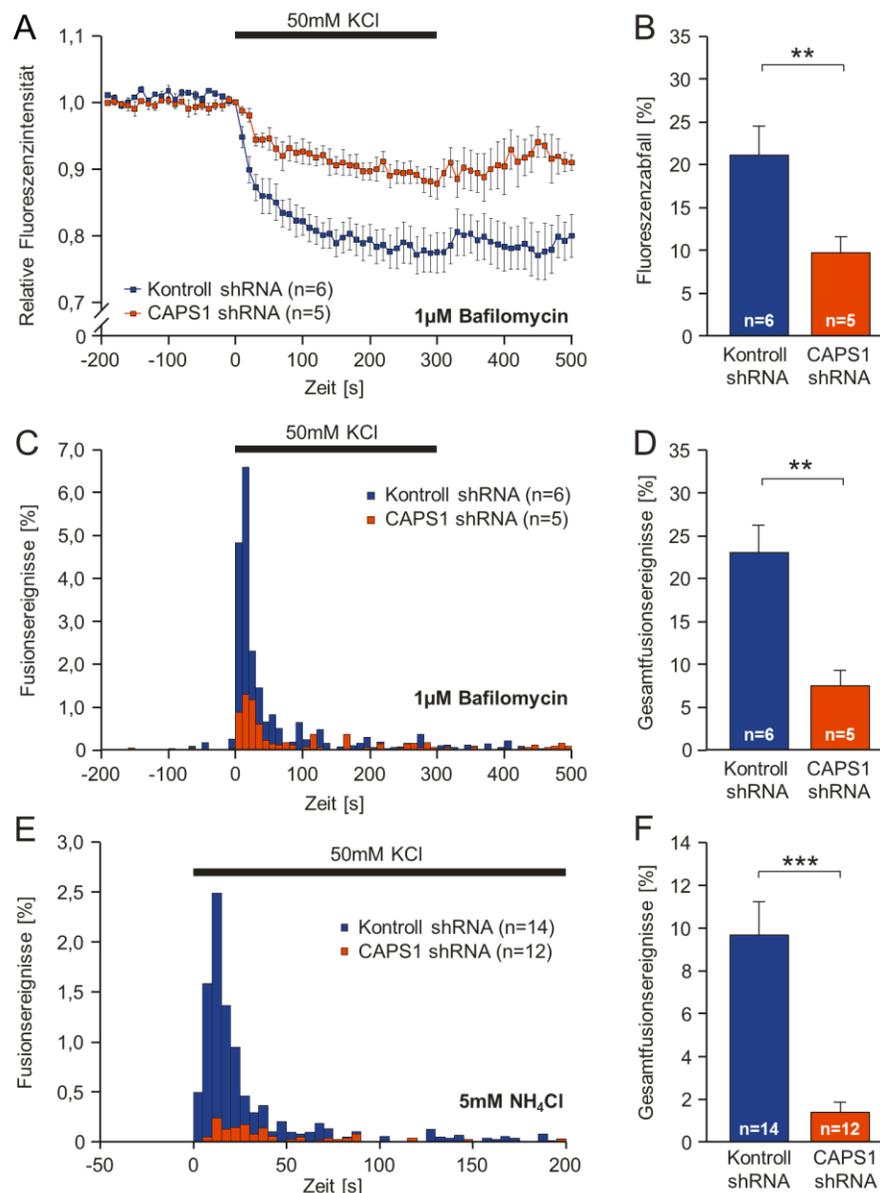


Abb. 4.17: Untersuchung der Fusionsporenöffnung unter pH-neutralisierenden Bedingungen

**Fortsetzung der Bildbeschriftung Abb. 4.17:** Hippokampale Neurone (DIV 9) wurden mit BDNF-GFP-kodierenden Kontroll- bzw. CAPS1-shRNA-Vektoren transfiziert. Nach weiteren 5 Tagen wurden Vesikelfusionsereignisse in Anwesenheit des GFP-Quenchers Bromphenolblau analog zu **Abb. 4.7** videomikroskopisch untersucht. Dabei wurde der vesikuläre pH-Wert entweder durch Inhibition der v-Typ-ATPase nach 30 min Vorinkubation und Messung der Zellen in Anwesenheit von 1  $\mu$ M Bafilomycin oder durch Applikation von 5 mM akut neutralisiert. **(A)** Durchschnittlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität dendritischer Regionen (Kontroll-shRNA: 176 Regionen, CAPS1-shRNA: 138 Regionen) nach Inhibition der v-Typ-ATPase mit Bafilomycin. **(B)** Die Amplitude des Fluoreszenzintensitätsabfalls in dendritischen Regionen 500 s nach der Stimulation war unter CAPS1-Knock-down-Bedingungen erneut reduziert. **(C)** Zeitliche Verteilung von beobachteten Fusionsereignissen der gleichen dendritischen Regionen aus (A) in Relation zu der Gesamtvesikelzahl (Kontroll-shRNA: 340 Fusionsereignisse, CAPS1-shRNA: 113 Fusionsereignisse). **(D)** Prozentualer Anteil aller Fusionsereignissen von (C) im gesamten Beobachtungszeitraum. Nach *Knock-down* von CAPS1 wurden signifikant weniger Fusionsereignisse beobachtet. Sowohl Kontroll- als auch CAPS1-shRNA-transfizierte Zellen hatten jedoch einen ähnlich hohen Anteil von Fusionsereignissen wie vergleichbare Zellen unter nicht-pH-Wert neutralisierenden Bedingungen. **(E)** Zeitliche Verteilung von Fusionsereignissen in dendritischen Regionen bei Zellen deren vesikulärer pH-Wert in Anwesenheit von 5 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  neutralisiert wurde. Die Fusionsereignisse (Kontroll-shRNA: 312 Fusionsereignisse, CAPS1-shRNA: 46 Fusionsereignisse) wurden hier bis 200 s nach der Kalium-induzierten Stimulation der Zelle gemessen. **(F)** Prozentualer Anteil aller Fusionsereignissen von (E) im gesamten Beobachtungszeitraum. Auch in Anwesenheit von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  waren nach *Knock-down* von CAPS1 signifikant weniger Fusionsereignisse zu beobachten. Jedoch war für Kontroll- und CAPS1-shRNA-transfizierte Zellen bereits die Häufigkeit des Auftretens von Fusionsereignissen im Vergleich hippokampalen Neuronen unter nicht-pH-Wert neutralisierenden Bedingungen herabgesetzt. n = Anzahl der gemessenen Zellen, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Hierzu wurden den extrazellulär applizierten Puffern entweder  $\text{NH}_4\text{Cl}$  oder Bafilomycin zugesetzt. Im Fall von Bafilomycin wurden die hippokampalen Neurone mindestens 30 min lang in 1  $\mu$ M Bafilomycin-haltigem Puffer vorinkubiert. Bafilomycin ist ein Protonenpumpeninhibitor, der den ATP-getriebenen Einstrom von Protonen in das Lumen sekretorischer Granula durch die v-Typ-ATPase hemmt. Da saure Vesikel einem leichten Ausstrom von Protonen unterliegen (**Wu et al., 2001**), kann somit der vesikuläre pH-Wert über die Zeit neutralisiert werden. Der Effekt von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  auf den vesikulären pH-Wert wurde bereits in **4.5.1** beschrieben. Da  $\text{NH}_4\text{Cl}$  eine relativ schnelle Veränderung des vesikulären pH-Wertes bewirkt, war eine Vorinkubation der Zellen nicht zwingend notwendig. Um einer zu starken Depolarisierung der hippokampale Neurone durch  $\text{NH}_4\text{Cl}$  vorzubeugen, wurde mit einer relativ geringen  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Konzentration (5 mM) gearbeitet, die dennoch eine ausreichende Neutralisation des vesikulären pH-Wertes ermöglichte (vergleiche **Abb. 4.12 E**).

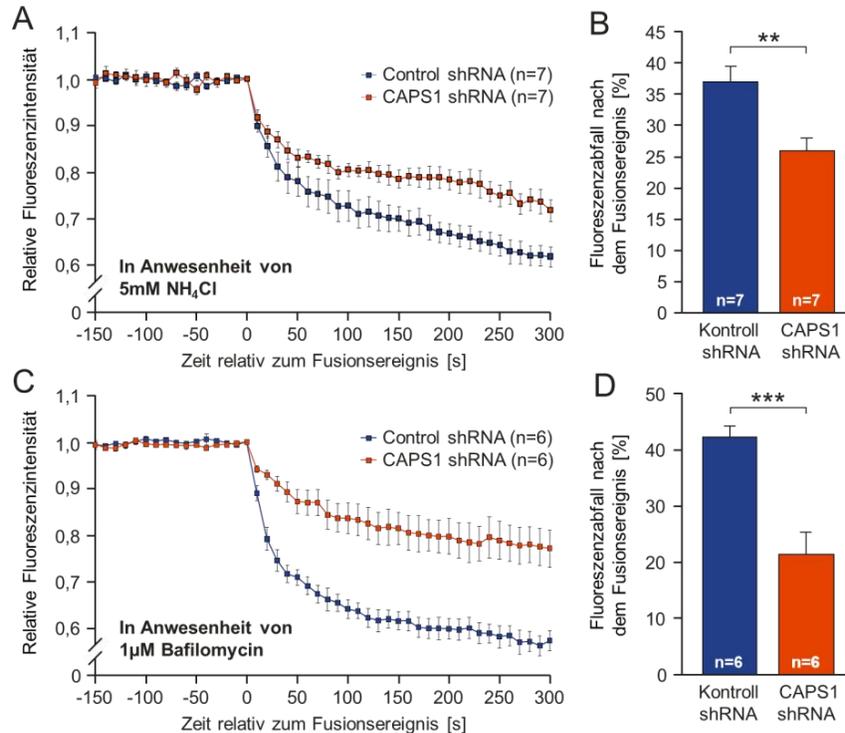
Der Verlauf der Fluoreszenzintensität von dendritischen Regionen aus Neuronen, die mit Kontroll- bzw. CAPS1-shRNA-transfiziert wurden, ist in **Abb. 4.17 A** dargestellt. Unter pH-neutralisierenden Bedingungen mit Hilfe von Bafilomycin war nach *Knock-down* von CAPS1

in dendritischen Regionen, ebenso wie auch schon in **4.4.2** unter nicht-pH-neutralisierenden Bedingungen beschrieben, ein signifikant reduzierter Abfall der Fluoreszenzintensität (Kontroll-shRNA:  $21,1 \pm 3,4$  %; CAPS1-shRNA:  $9,7 \pm 1,9$  %;  $p = 2,2 \times 10^{-2}$ ) nach Kalium-induzierter Stimulation der Zellen zu beobachten (**Abb. 4.17 B**). Da dieser Fluoreszenzabfall durch das Quenchen der Fluoreszenz von fusionierenden BDNF-GFP-beinhaltenen Vesikeln durch Bromphenolblau induziert wurde, deutete dies auf eine reduzierte Anzahl von Fusionsereignissen in CAPS1-shRNA-transfizierten Zellen hin. Um die Fusionsereignisse genauer charakterisieren zu können, wurden wiederum die Anzahl von Fusionsereignissen und deren zeitliches Auftreten in dendritischen Regionen des Neurons bestimmt. Die zeitliche Verteilung der Fusionsereignisse ist in **Abb. 4.17 C** dargestellt. Auch unter pH-neutralisierenden Bedingungen waren die meisten Fusionsereignisse in den ersten 40 s nach der Kalium-induzierten Stimulation zu beobachten. Der Anteil an fusionierenden Vesikeln in Relation zur Gesamtheit aller Vesikel (Kontroll-shRNA:  $22,9 \pm 3,3$  %; CAPS1-shRNA:  $7,5 \pm 1,7$  %;  $p = 3,5 \times 10^{-3}$ ) wurde durch den *Knock-down* von CAPS1 signifikant reduziert (**Abb. 4.17 D**). Als weiteres Kontrollexperiment wurde die Verteilung und der Anteil fusionierender Vesikel innerhalb der ersten 200 s nach der Kalium-induzierter Stimulation unter pH-neutralisierenden Bedingungen mit Hilfe von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  bestimmt (**Abb. 4.17 E-F**). Anders als bei Bafilomycin, welches durch die Inhibition der v-Typ-ATPase den pH-Wert spezifisch in vesikulären Strukturen anhebt, verursacht  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (in Form von membranpermeablem  $\text{NH}_3$ ) auch Veränderungen des pH-Wertes im Zytosol sowie anderen intrazellulären Kompartimenten. Unter Verwendung von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  wurde ebenfalls eine signifikante Reduktion von Fusionsereignissen durch den *Knock-down* von CAPS1 beobachtet (Kontroll-shRNA:  $9,7 \pm 1,6$  %; CAPS1-shRNA:  $1,4 \pm 0,5$  %;  $p = 7,4 \times 10^{-5}$ ), jedoch war auch die Häufigkeit der Fusionsereignisse im Vergleich zu vorherigen Experimenten (**Abb. 4.7 H** und **Abb. 4.17 D**) bereits in der Kontrolle stark reduziert. Dies deutet darauf hin, dass die Applikation von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  an sich das Auftreten von Fusionsereignissen reduzierte, wobei der *Knock-down* von CAPS1 unabhängig davon eine weitere Reduktion der Fusionsereignisse verursachte.

#### 4.7.2 Einfluss des vesikulären pH-Wertes auf die Ausschüttung von BDNF-GFP

Um zu untersuchen, ob die in 4.4.4 beschriebene Reduktion der Ausschüttung von BDNF-GFP aus einzelnen sekretorischen Granula ein Nebeneffekt des durch den *Knock-down* von CAPS1 veränderten, vesikulären pH-Wertes (siehe 4.5) war, wurden auch die Experimente zur Ausschüttung von BDNF-GFP unter pH-neutralisierenden Bedingungen wiederholt. Hierzu wurde die Ausschüttung von BDNF-GFP ebenfalls in Anwesenheit von 5 mM NH<sub>4</sub>Cl oder 1 μM Bafilomycin gemessen (vergleiche 4.7.1). Durch die vorherige Neutralisation des vesikulären pH-Wertes, war die transiente Intensitätszunahme der BDNF-GFP-Fluoreszenz einzelner Vesikel direkt nach Fusionsporenöffnung (siehe 4.4.4) nicht mehr zu beobachten. Da durch Applikation von Bromphenolblau am Ende der Messung ein Wiederverschließen der Fusionspore der untersuchten einzelnen Vesikel ausgeschlossen werden konnte, entsprach der beobachtete Fluoreszenzabfall nach Fusionsporenöffnung der Ausschüttung von BDNF-GFP.

Der durchschnittliche Fluoreszenzverlauf von einzelnen fusionierenden Vesikeln aus Kontroll- bzw. CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen ist in **Abb. 4.18 A** für die Anwesenheit von NH<sub>4</sub>Cl und in **Abb. 4.18 C** für die Anwesenheit von Bafilomycin dargestellt. Der Fluoreszenzabfall einzelner Vesikel nach dem Fusionsereignis, welcher der Ausschüttung von BDNF-GFP entsprach, war auch in Anwesenheit von NH<sub>4</sub>Cl (**Abb. 4.18 B**) nach *Knock-down* von CAPS1 signifikant reduziert (Kontroll-shRNA: 36,9 ± 2,4 %; CAPS1-shRNA: 25,9 ± 2,0 %; p = 3,9 × 10<sup>-3</sup>). Auch in Anwesenheit von Bafilomycin konnte eine reduzierte Ausschüttung von BDNF-GFP (Kontroll-shRNA: 42,4 ± 2,1 %; CAPS1-shRNA: 21,4 ± 3,9 %; p = 7,9 × 10<sup>-4</sup>) aus einzelnen Vesikeln beobachtet werden. Die Amplituden der gemessenen exponentiellen Fluoreszenzabfälle nach Fusionsporenöffnung waren ähnlich hoch wie die bereits bestimmten Amplituden der exponentiellen Fluoreszenzabfälle nach initialer Fluoreszenzzunahme unter nicht-pH-neutralisierenden Bedingungen (vergleiche **Abb. 4.10 D** und **Abb. 4.11 C**). Somit reproduzieren diese Daten den bereits zuvor beobachteten Effekt von CAPS1 auf die Ausschüttung von BDNF-GFP aus einzelnen Vesikeln. Ein möglicher Einfluss des vesikulären pH-Wertes auf die Ausschüttung des Vesikelinhalts an sich konnte jedoch mit diesen Experimenten nicht gezeigt werden.

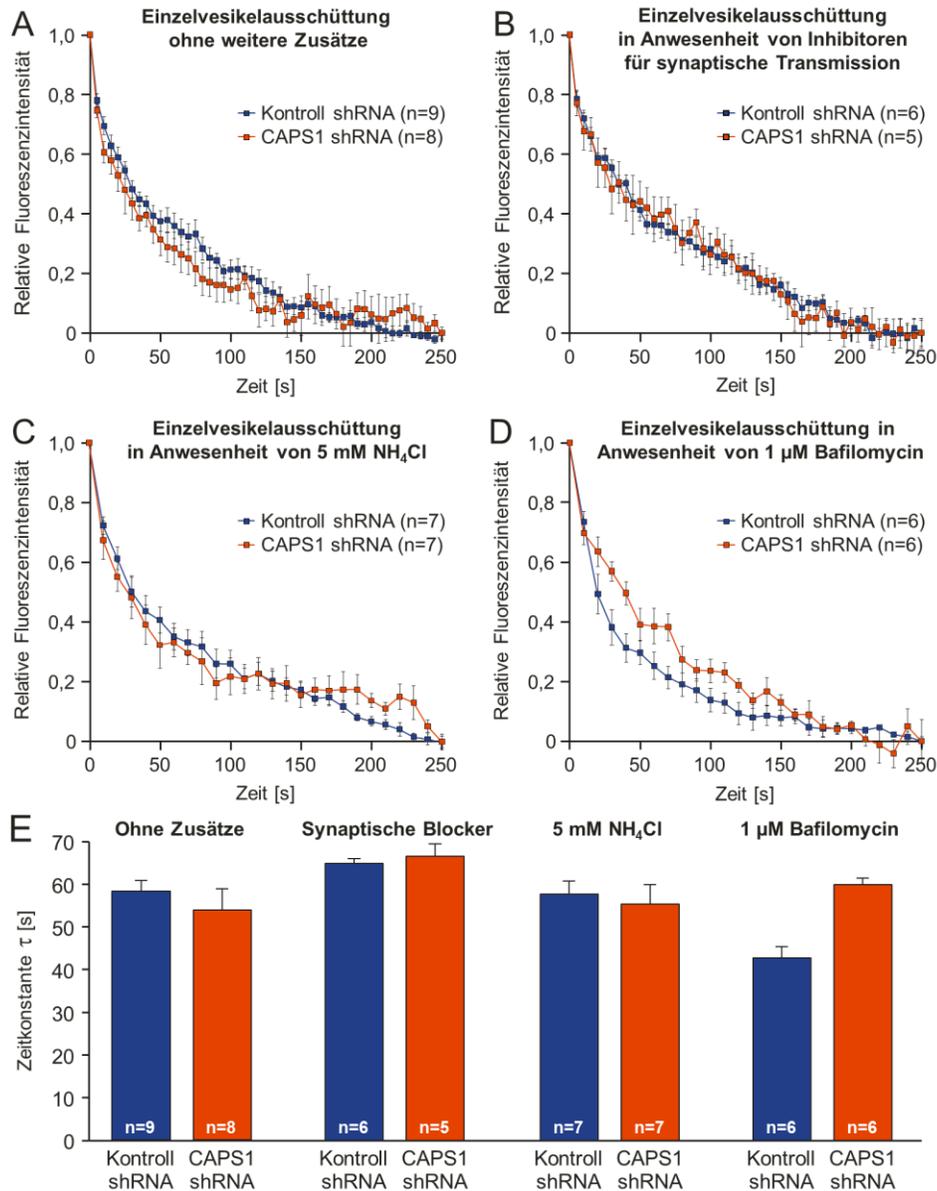


**Abb. 4.18: Untersuchung der BDNF-GFP-Ausschüttung unter pH-neutralisierenden Bedingungen.** Hippokampale Neurone (DIV 9) wurden mit BDNF-GFP-kodierenden Kontroll- oder CAPS1-shRNA-Vektoren transfiziert und die Ausschüttung von BDNF-GFP aus einzelnen Vesikeln unter pH-neutralisierenden Bedingungen analog zu **Abb. 4.10** videomikroskopisch untersucht. Nach Neutralisation des vesikulären pH-Wertes (entweder akut durch 5 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  oder durch Inhibition v-Typ-ATPase durch 30 min Vorinkubation und Messung der Zellen in Anwesenheit von 1  $\mu\text{M}$  Bafilomycin) konnte keine transiente Fluoreszenzzunahme einzelner Vesikel nach Fusionsporenöffnung beobachtet werden. Der exponentielle Abfall der vesikulären Fluoreszenzintensität nach Fusionsporenöffnung entsprach der Ausschüttung von BDNF-GFP. **(A)** Durchschnittliche Kinetik der BDNF-GFP-Ausschüttung einzelner Vesikel aus Kontroll-shRNA (71 Vesikel) oder CAPS1-shRNA-transfizierten (47 Vesikel) Neuronen in Anwesenheit von 5 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Der Fluoreszenzverlauf aller Vesikel wurde auf den Messwert vor dem Fusionsereignis ( $t=0$ ) normalisiert und zeitlich verschoben. **(B)** Amplitude des exponentiellen Abfalls der Fluoreszenzintensität von der Basislinie bis 300 s nach Fusionsporenöffnung aus (A). Die Menge des ausgeschütteten BDNF-GFP pro Vesikel war nach *Knock-down* von CAPS1 signifikant reduziert. **(C)** Durchschnittliche Kinetik der BDNF-GFP-Ausschüttung einzelner Vesikel aus Kontroll-shRNA (61 Vesikel) oder CAPS1-shRNA-transfizierten (44 Vesikel) Neuronen in Anwesenheit von 1  $\mu\text{M}$  Bafilomycin. Auch hier entsprach  $t = 0$  dem Messwert vor dem Fusionsereignis. **(D)** Amplitude des exponentiellen Abfalls der Fluoreszenzintensität von der Basislinie bis 300 s nach Fusionsporenöffnung aus (C). Wiederum war eine reduzierte Ausschüttung von BDNF-GFP aus einzelnen Vesikeln in CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen zu beobachten.  $n$  = Anzahl der gemessenen Zellen, \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

#### 4.8 Vergleichende Analyse der Ausschüttungsgeschwindigkeit von BDNF-GFP aus sekretorischen Granula

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der *Knock-down* von CAPS1 unabhängig von dessen Einfluss auf den vesikulären pH-Wert die Menge des ausgeschütteten BDNF-GFPs aus einzelnen sekretorischen Granula reduzierte (vergleiche **4.4.4**, **4.4.5** und **4.7.2**). Um zu

untersuchen, ob CAPS1 auch die Geschwindigkeit der Ausschüttung von BDNF-GFP beeinflusst, wurde für die Sekretion aus einzelnen Vesikeln die Zeitkonstanten  $\tau$  des exponentiellen Fluoreszenzabfalls im Zeitraum von 0 bis 250 s nach Fusionsporenöffnung bestimmt (vergleiche 3.4.2). Für die Bestimmung der Zeitkonstante  $\tau$  wurden die relativen Fluoreszenzwerte des exponentiellen Fluoreszenzabfalls auf Werte zwischen 1 (höchster Wert nach Fusionsporenöffnung) und 0 (Wert bei 250 s nach Beginn des Fluoreszenzabfalls) skaliert. Die daraus resultierenden durchschnittlichen Fluoreszenzverläufe unter den verschiedenen, bereits beschriebenen Messbedingungen, sind vergleichend in **Abb. 4.19 A-D** dargestellt. Innerhalb der jeweiligen Versuchsbedingungen (verschiedene Behandlung der Neurone mit Zusätzen) zeigte der Verlauf des exponentiellen Fluoreszenzabfalls keinen Unterschied zwischen Kontroll- und CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen. Dies deutet auf keinen Einfluss des *Knock-downs* von CAPS1 auf die Ausschüttungsgeschwindigkeit von BDNF-GFP hin. Die durch exponentielle Anpassung ermittelten Zeitkonstanten sind in **Abb. 4.19 E** dargestellt. Obwohl einzeln betrachtet in Anwesenheit von Bafilomycin eine tendenziell kleiner Zeitkonstante unter Kontrollbedingungen zu beobachten war (Kontroll-shRNA:  $\tau = 42,7 \pm 2,7$  s; CAPS1-shRNA:  $\tau = 59,9 \pm 1,5$  s;  $p = 0,072$ ), gab es weder einen signifikanten Einfluss des *Knock-downs* von CAPS1, noch einen Einfluss der Behandlung der Zellen mit den verschiedenen Zusätzen auf die ermittelten Zeitkonstanten (Einfluss des *Knock-downs* von CAPS1:  $p = 0,66$ ; Einfluss der verschiedenen Behandlung:  $p = 0,57$ ; gekoppelter Einfluss beider Faktoren:  $p = 0,67$ ; Zweifaktorielle Varianzanalyse). Unter physiologischen Bedingungen (Kontroll-shRNA:  $\tau = 58,3 \pm 2,5$  s; CAPS1-shRNA:  $\tau = 53,9 \pm 5,1$  s) wurde eine ähnlich schnelle Kinetik wie in Anwesenheit von 5 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Kontroll-shRNA:  $\tau = 57,7 \pm 3,0$  s; CAPS1-shRNA:  $\tau = 55,2 \pm 4,6$  s) sowie in Anwesenheit von Inhibitoren synaptischer Aktivität (Kontroll-shRNA:  $\tau = 64,9 \pm 1,5$  s; CAPS1-shRNA:  $\tau = 66,5 \pm 3,0$  s) bestimmt. Dies deutete darauf hin, dass die akute Neutralisation des vesikulären pH-Wertes und die Inhibition der Neurotransmission keinen Einfluss auf die Ausschüttung von BDNF-GFP hatten. Zusammenfassend konnte kein Einfluss des *Knock-downs* von CAPS1 auf die Geschwindigkeit der Ausschüttung aus sekretorischen Granula beobachtet werden.



**Abb. 4.19: Bestimmung der Zeitkonstante  $\tau$  der Ausschüttung von BDNF-GFP aus einzelnen Vesikeln.**

Zur Bestimmung der Zeitkonstante  $\tau$  wurde der exponentielle Abfall der Fluoreszenzintensität einzelner Vesikel nach Fusionsporenöffnung vom höchsten Messwert (gesetzt als 1) bis zum Messwert bei 250 s nach dem Fusionsereignis (gesetzt als 0) umskaliert. Diese Umformung wurde für die Kinetik der Ausschüttung von BDNF unter physiologischen Bedingungen (A), unter Inhibition synaptischer Transmission (B), unter pH-neutralisierenden Bedingungen durch 5 mM NH<sub>4</sub>Cl (C) und unter pH-neutralisierenden Bedingungen durch Blockieren der v-Typ-ATPase mittels 1 μM Bafilomycin (D) durchgeführt. Innerhalb der jeweiligen Bedingungen zeigten die exponentiellen Abfälle in der Fluoreszenzintensität einzelner BDNF-GFP-behaltender Vesikel aus Kontroll- bzw. CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen einen ähnlichen Verlauf. (E) Vergleich der unter den verschiedenen Bedingungen bestimmten Zeitkonstanten. Sowohl in Kontroll- und CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen als auch bei verschiedenen Versuchsbedingungen verläuft die Ausschüttung von BDNF-GFP gleich schnell. n = Anzahl der gemessenen Zellen, Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

## 4.9 Neurotrophinausschüttung aus Zellen transgenen Ursprungs

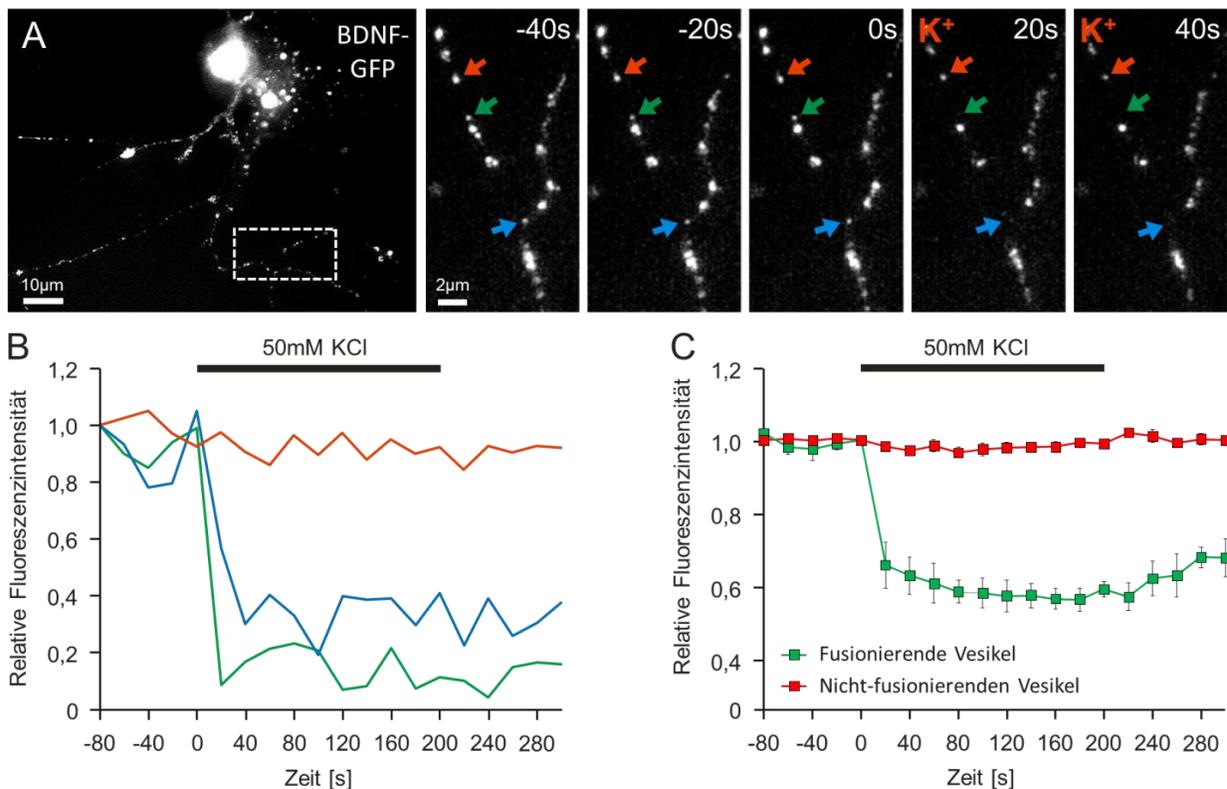
### 4.9.1 Neurotrophinausschüttung aus neuronal differenzierten BDNF-GFP-*Knock-in*-Stammzellen

Die Visualisierung der Neurotrophinausschüttung aus hippocampalen Neuronen kann mit Hilfe von Plasmiden, die für Fusionsproteine kodieren (z.B. BDNF-GFP), ermöglicht werden. Da bei diesen Plasmiden die Expression häufig durch virale Promotoren kontrolliert und durch *Enhancer*-Elemente verstärkt wird, erhöht sich das Expressionslevel des Neurotrophins jedoch über das physiologische Maß hinaus. Um die Ausschüttung von BDNF unter nativen Expressionsbedingungen untersuchen zu können, bieten sich transgene Mausmodelle an, bei denen die Sequenz für BDNF-GFP gentechnisch in die chromosomale DNA integriert wird (*Knock-in*). Ein erstes Untersuchungsmodell waren dabei embryonale Stammzellen der Maus (Linie V6.5), bei denen ein *Knock-in* des BDNF-GFP in den Rosa26-Lokus heterozygot auf Chromosom 6 eingeführt wurde (**Leschik et al., 2013**). Durch den *Chicken*-Aktin Promotor und CMV-*Enhancer* Elemente wurde BDNF-GFP in diesen Zellen überexprimiert. Da die Expression jedoch nur von einem Locus ausging (bei transfizierten Plasmiden sind mehrere Expressionsloci pro Zelle möglich) und nicht durch virale Promotoren forciert wurde, sollte das Expressionsniveau jedoch deutlich geringer als in BDNF-GFP-transfizierten Neuronen sein. Um die Ausschüttung von BDNF aus embryonalen Stammzellen untersuchen zu können, wurden diese zunächst neuronal differenziert (siehe **3.5**). Im Ergebnis wurden dabei Zellen erzeugt, die sowohl in ihren morphologischen als auch in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften primären hippocampalen Neuronen sehr ähnlich waren (**Leschik et al., 2013**).

#### 4.9.1.1 Fusionsporenöffnung in neuronal differenzierten, embryonalen Stammzellen

Durch die Expression von BDNF-GFP konnten in neuronal differenzierten embryonalen Stammzellen, wie auch in Neuronen mit überexprimierten BDNF-GFP, fluoreszenzmarkierte Vesikel beobachtet werden, die entlang der Neuriten transportiert wurden (**Abb. 4.20 A** und **Abb. 4.21 A**). Im Vergleich zu BDNF-GFP-transfizierten hippocampalen Neuronen waren die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen BDNF-GFP-beihaltenden Vesikel jedoch wesentlich geringer, weshalb die Zellen mit höheren Lichtstärken und Belichtungszeiten photodokumentiert werden mussten. Um Vesikelfusionsereignisse in neuronal

differenzierten, embryonalen Stammzellen zu untersuchen, wurden die Zellen durch die Applikation einer Pufferlösung stimuliert, die eine um 50 mM erhöhte Kaliumkonzentration aufwies. Die Fusionsporenöffnung wurde mit Hilfe von Bromphenolblau beobachtet (vergleiche 4.4.2). Durch das Auslöschen der Fluoreszenzintensität einzelner Vesikel (Abb. 4.20 A-B, blau- und grün-markierter Vesikel) kurz nach der Stimulation, konnte das Auftreten von Fusionsereignissen in Abgrenzung zu nicht fusionierenden Vesikeln (Abb. 4.20 A-B, rot-markierter Vesikel) nachgewiesen werden. Auf Grund der relativ geringen Fluoreszenzintensitäten waren die Schwankungen des Fluoreszenzverlaufs einzelner



**Abb. 4.20: Fusionsporenöffnung BDNF-GFP-beinhaltender Vesikel in embryonalen Stammzellen.**

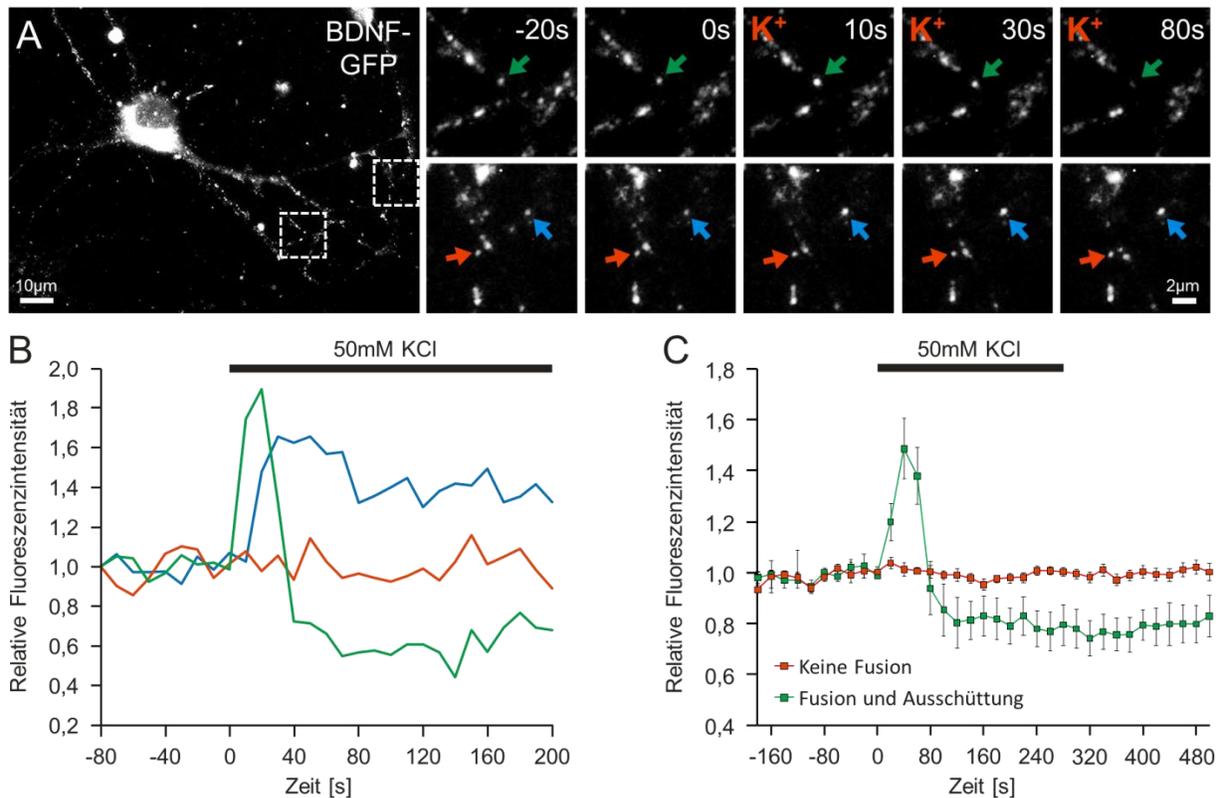
Transgene embryonale Stammzellen, die BDNF-GFP vom Rosa26-Lokus exprimierten, wurden neuronal differenziert. Nach weiteren 14 Tagen in Kultur wurden Fusionsereignisse in Anwesenheit des GFP-Quenchers Bromphenolblau videomikroskopisch untersucht. (A) Repräsentatives Bild einer BDNF-GFP-exprimierenden, neuronal differenzierten embryonalen Stammzelle. Die markierte Region ist rechts in Vergrößerung dargestellt. Einzelne BDNF-GFP-beinhaltende Vesikel vor und nach Stimulation der Zelle durch die Applikation einer Pufferlösung mit erhöhtem (50 mM) Kaliumgehalt ( $K^+$ ) sind mit farbkodierten Pfeilen markiert. Durch die Anwesenheit von Bromphenolblau im extrazellulären Raum wurde die Fluoreszenz BDNF-GFP-beinhaltender Vesikel nach Fusionsporenöffnung gequencht (grüner und blauer Vesikel). (B) Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität der farbkodierten Vesikel aus (A). Fusionierende Vesikel (blau, grün) zeigten einen rapiden Abfall der Fluoreszenzintensität nach Fusionsporenöffnung. (C) Durchschnittlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität von fusionierenden (grün) im Vergleich zu nicht-fusionierenden (rot) Vesikeln. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (Modifiziert nach Leschik et al., 2013).

Vesikel relativ hoch. Dennoch waren diese mit dem Fluoreszenzverlauf von einzelnen Vesikeln aus BDNF-GFP-transfizierten hippocampalen Neuronen vergleichbar (siehe **Abb. 4.7 C**). Um den durchschnittlichen Fluoreszenzverlauf einzelner Fusionsereignisse zu bestimmen, wurde der Fluoreszenzverlauf mehrerer Vesikel aus mehreren Zellen gemittelt (**Abb. 4.20 C**). Dabei konnten nicht-fusionierende Vesikel, die durch Photobleichen nur langsam an Fluoreszenz verloren, von fusionierenden Vesikeln, dessen Fluoreszenz nach Fusionsporenöffnung vollständig ausgelöscht wurde, unterschieden werden. Somit konnten in neuronal differenzierten, embryonalen Stammzellen, die BDNF-GFP vom Rosa26-Lokus exprimierten, die Fusion von einzelnen BDNF-GFP-beihaltenden Vesikeln nachgewiesen werden.

#### **4.9.1.2 BDNF-Ausschüttung in neuronal differenzierten, embryonalen Stammzellen**

Neben der Fusionsporenöffnung wurde darüber hinaus die Ausschüttung von BDNF-GFP nach Kalium-induzierter Stimulation der neuronal differenzierten, embryonalen Stammzellen untersucht (vergleiche **4.4.4**). Da diese Messungen in Abwesenheit von Bromphenolblau durchgeführt wurden, konnte nach Fusionsporenöffnung die Ausschüttung von BDNF-GFP aus einzelnen Vesikeln als Abnahme der Fluoreszenzintensität gemessen werden. Der Verlauf der Fluoreszenzintensität war ebenfalls durch eine transiente Fluoreszenzintensitätszunahme nach Neutralisation des vesikulären pH-Wertes infolge der Fusionsporenöffnung charakterisiert (**Abb. 4.21 A-C**, grün- und blau-markierter Vesikel). Dies deutete darauf hin, dass in den neuronal differenzierten embryonalen, Stammzellen ebenfalls eine Azidifizierung der Vesikel vor dem Fusionsereignis erfolgte. Direkt nach der vesikulären pH-Neutralisation erfolgte ein Abfall der Fluoreszenzintensität einzelner Vesikel, welcher der Ausschüttung von BDNF-GFP entsprach. Bei nicht-fusionierenden Vesikeln (**Abb. 4.21 A-B**, rot-markierter Vesikel) war nach Korrektur des Photobleichens keine Veränderungen der Fluoreszenzintensität zu beobachten. Der Fluoreszenzverlauf der Ausschüttung von BDNF-GFP aus einzelnen, fusionierenden Vesikeln war mit denen, die in BDNF-GFP-transfizierten hippocampalen Neuronen bestimmt wurden (**Abb. 4.10 B**), vergleichbar. Jedoch konnten auf Grund der hohen Schwankungen in der Fluoreszenzintensität, ausgelöst durch die geringe Fluoreszenzintensität der Vesikel, Ausschüttungsprozesse ohne Intensitätszunahme der

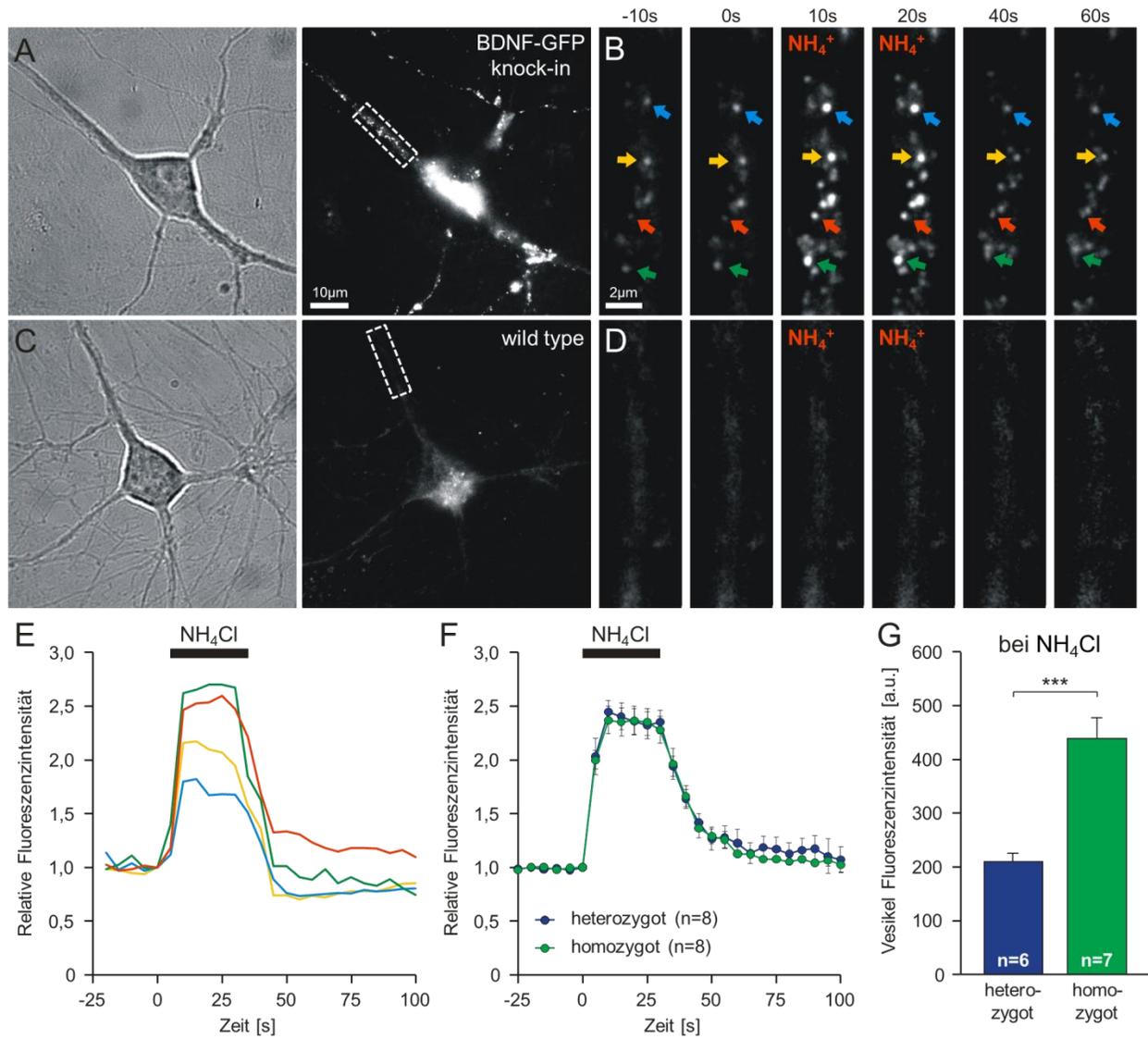
GFP-Fluoreszenz nach dem Fusionsereignis nicht immer eindeutig von nicht-fusionierenden Vesikeln abgegrenzt werden. Der durchschnittliche Fluoreszenzverlauf von fusionierenden im Vergleich zu nicht fusionierenden BDNF-GFP-beinhaltenen Vesikeln ist in **Abb. 4.21 C** dargestellt. Die Ausschüttungskinetik von BDNF-GFP aus neuronal differenzierten Stammzellen, war mit der von BDNF-GFP-transfizierten Neuronen (**Abb. 4.10 D**) vergleichbar.



**Abb. 4.21: Ausschüttung von BDNF-GFP aus sekretorischen Granula neuronal differenzierter, embryonaler Stammzellen.** Transgene embryonale Stammzellen, die BDNF-GFP vom Rosa26-Lokus exprimierten, wurden neuronal differenziert. Nach weiteren 14 Tagen in Kultur wurde die Ausschüttung von BDNF-GFP aus einzelnen Vesikeln videomikroskopisch untersucht. **(A)** Repräsentatives Bild einer BDNF-GFP-exprimierenden, neuronal differenzierten embryonalen Stammzelle. Einzelne Vesikel sind mit farbkodierten Pfeilen markiert. Nach Stimulation der Zelle durch die Applikation einer Pufferlösung mit erhöhtem (50 mM) Kaliumgehalt ( $K^+$ ) war eine transiente Fluoreszenzintensitätszunahme einzelner Vesikel zu beobachten. **(B)** Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität der farbkodierten Vesikel aus (A). Aufgrund der geringen Fluoreszenzintensität einzelner Vesikel unterlag deren Fluoreszenzintensitätsverlauf relativ starken Schwankungen. **(C)** Durchschnittlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität von fusionierenden (grün, blau) bzw. nicht-fusionierenden (rot) Vesikeln. Die Kinetik der Ausschüttung von BDNF-GFP aus einzelnen Vesikeln konnte deutlich vom Fluoreszenzverlauf nicht-fusionierender Vesikel abgegrenzt werden. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (Modifiziert nach **Leschik et al., 2013**).

#### 4.9.2 Neurotrophinausschüttung aus hippocampalen Neuronen von BDNF-GFP-*Knock-in*-Mäusen

Die Experimente mit neuronal differenzierten, transgenen embryonalen Stammzellen, bei denen BDNF-GFP in den Rosa26 Locus eingefügt wurde, konnten zeigen, dass die BDNF-GFP-Ausschüttung auch bei im Vergleich zur Überexpression in Kultur reduzierten Expression visualisiert werden kann (vergleiche **4.9.1**). Obwohl die in embryonalen Stammzellen beobachtete Sekretion von BDNF-GFP vergleichbar zur Ausschüttung von BDNF-GFP aus transfizierten Neuronen war, blieb unklar, ob die Sekretion von endogenem BDNF in hippocampalen Neuronen bei Expression unter Kontrolle der endogenen regulatorischen Elemente des BDNF-Gens ebenso beobachtbar ist. Um die Ausschüttung von endogenem BDNF in hippocampalen Neuronen zu untersuchen, wurde ein weiteres transgenes Mausmodell verwendet (**Leschik et al.**, in Vorbereitung), bei dem die Sequenz von BDNF-GFP in den endogenen BDNF-Locus (Chromosom 2) eingefügt wurde (*Knock-in*). Durch die Verpaarung zweier heterozygoter BDNF-GFP-*Knock-in*-Elterntiere, konnten Nachkommen erzeugt werden, die den BDNF-GFP-*Knock-in* entweder homozygot oder heterozygot exprimierten oder dem Wildtyp entsprachen. Hippokampale Neurone dieser Nachkommen wurden entsprechend **3.2.3** präpariert und separat auf Polyornithin-beschichtete Deckgläser bzw. Astrozyteninseln ausplattiert. Nach 14 Tagen in Kultur wurden die hippocampalen Neurone vergleichend untersucht. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnten relativ schwach grün-fluoreszierende BDNF-GFP beinhaltende Vesikel in hippocampalen Neuronen aus homozygoten und heterozygoten BDNF-GFP-*Knock-in*-Tieren, nicht aber in Neuronen aus Wildtyp Tieren beobachtet werden (**Abb. 4.22 A, C**, gleiche Belichtung und Bildskalierung). Im Vergleich zu mit BDNF-GFP transfizierten Neuronen mussten jedoch zur Visualisierung der Vesikel wesentlich höhere Intensitäten des Anregungslichtes und längere Belichtungszeiten verwendet werden. Die Fluoreszenzintensität dieser Vesikel konnte durch Neutralisation des vesikulären pH-Wertes nach Applikation von 50 mM NH<sub>4</sub>Cl reversibel erhöht werden (**Abb. 4.22 B, E**). Im Gegensatz dazu unterlag die Autofluoreszenz entlang der Neurite von Wildtyp-Neuronen keiner wesentlichen Fluoreszenzveränderung (**Abb. 4.22 D**, gleiche Belichtung und Skalierung wie in **Abb. 4.22 B**). Der durchschnittliche Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität einzelner Vesikel war in heterozygoten und homozygoten BDNF-GFP



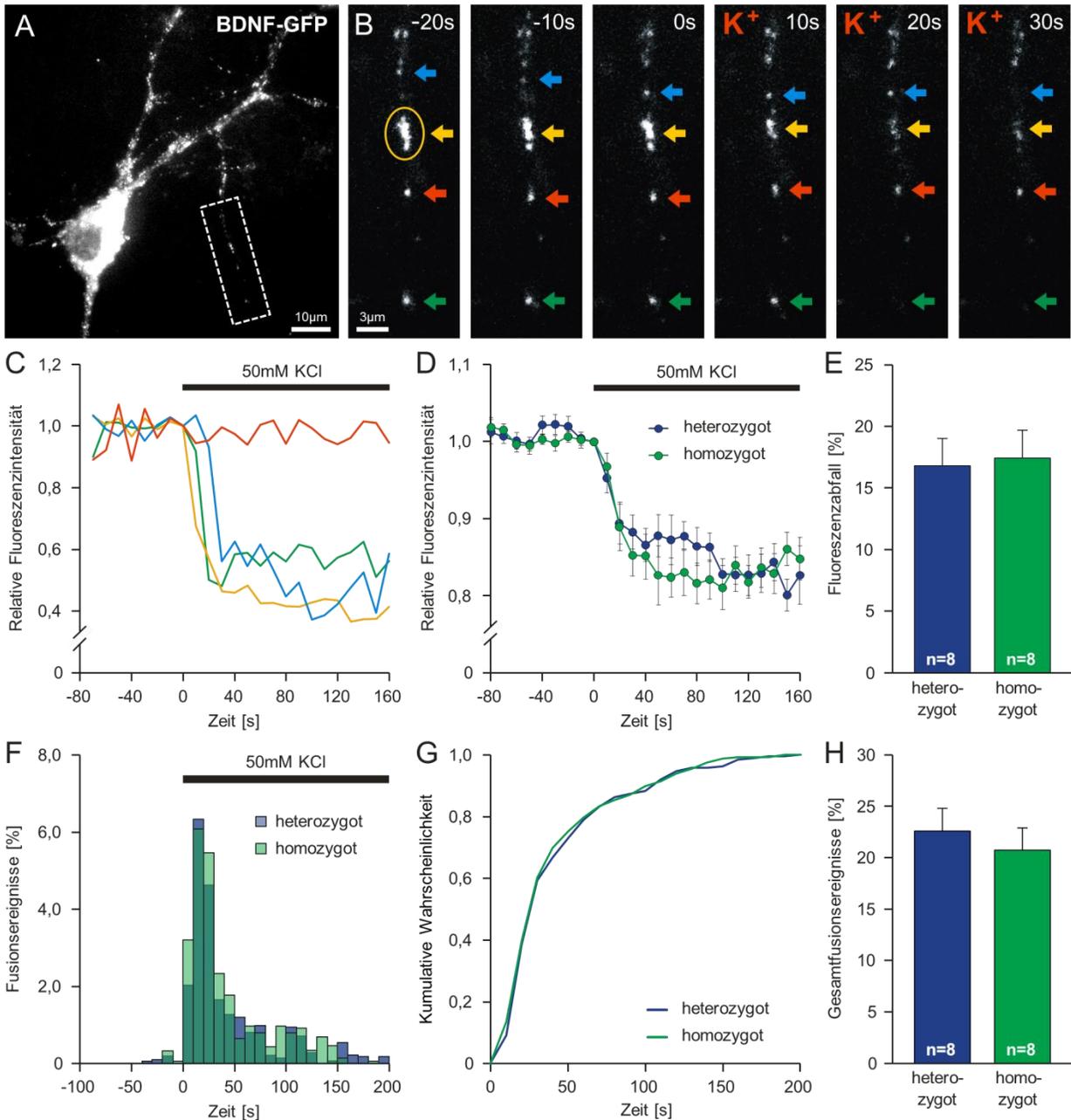
**Abb. 4.22: Untersuchung der hippocampalen Neurone von BDNF-GFP-Knock-in-Mäusen mit Hilfe von  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .** Hippocampale Neurone von BDNF-GFP-Knock-in-Mäusen wurden bis DIV 14 kultiviert und anschließend die Fluoreszenzintensität einzelner BDNF-GFP-beinhaltender Vesikel nach dem Überspülen der Zelle mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -haltiger Pufferlösung videomikroskopisch untersucht. **(A)** Repräsentatives hippocampales Neuron eines homozygoten BDNF-GFP-Knock-in-Tieres. Heterozygote BDNF-GFP-Knock-in-Neurone haben ein vergleichbares Erscheinungsbild. **(B)** Vergrößerung der markierten dendritischen Region aus (A). Durch Überspülen der Zelle mit 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  konnte die Fluoreszenzintensität BDNF-GFP-beinhaltender Vesikel reversibel erhöht werden. **(C)** Repräsentatives hippocampales Neuron eines Wildtyp Tieres. **(D)** Vergrößerung der markierten dendritischen Region aus (C). In Wildtyp Neuronen war lediglich eine unspezifische Autofluoreszenz zu erkennen, die nach Überspülen von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  keine Veränderungen zeigte. **(E)** Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität der farbig markierten Vesikel aus (B). **(F)** Durchschnittlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität einzelner Vesikel (heterozygot: 83 Vesikel, homozygot: 86 Vesikel). Die Fluoreszenzintensitätszunahme einzelner sekretorischer Granula aus Neuronen von homozygoten und heterozygoten BDNF-GFP-Knock-in-Tieren durch Überspülen mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -haltiger Pufferlösung war nicht voneinander verschieden. **(G)** Absolute Fluoreszenzintensität während des Überspülens mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Vesikel aus heterozygoten BDNF-GFP-Knock-in-Tieren fluoreszierten nur etwa halb so stark wie Vesikel aus homozygoten BDNF-GFP-Knock-in-Tieren. n = Anzahl der gemessenen Zellen, \*\*\* p < 0,001, Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

*Knock-in*-Neuronen vergleichbar (**Abb. 4.22 F**), was auf einen ebenso vergleichbaren intravesikulären pH-Wert in beiden Genotypen schließen lässt. Die absoluten Fluoreszenzintensitätswerte von einzelnen Vesikeln während der  $\text{NH}_4\text{Cl}$  Applikation (**Abb. 4.22 G**) waren jedoch in homozygoten BDNF-GFP-*Knock-in*-Neuronen etwa doppelt so hoch (heterozygot:  $209,2 \pm 16,0$  a.u.; homozygot:  $438,0 \pm 38,5$  a.u.;  $p = 3,1 \times 10^{-4}$ ). Da unter diesen Bedingungen die Fluoreszenzintensität unabhängig vom pH-Wert der Vesikel war, kann von einer etwa doppelt so dichten Beladung der sekretorischen Granula mit fluoreszenzmarkiertem BDNF im homozygoten Fall ausgegangen werden. Im heterozygoten Fall sollte dabei nicht-fluoreszenzmarkiertes BDNF vom Wildtyp-Allel die Vesikel zur Hälfte aufgefüllt haben. Da für die Untersuchungen der BDNF-GFP-*Knock-in*-Neurone wesentlich höhere Intensitäten des Anregungslichtes und längere Belichtungszeiten verwendet werden mussten, waren die absoluten Fluoreszenzintensitäten einzelner Vesikel nicht direkt mit denen aus BDNF-GFP-transfizierten Zellen zu vergleichen (siehe **Abb. 4.6 A**). Die Vesikel von homozygoten und heterozygoten BDNF-GFP-*Knock-in*-Tieren hatten etwa die gleiche Querschnittsfläche (heterozygot:  $0,41 \pm 0,02 \mu\text{m}^2$ ; homozygot:  $0,40 \pm 0,03 \mu\text{m}^2$ ), jedoch waren sie kleiner als die von BDNF-GFP-transfizierten Neuronen ( $0,65 \pm 0,02 \mu\text{m}^2$ , vergleiche **Abb. 4.6 A**), was aber indirekt auf die wesentlich geringere Fluoreszenzintensität zurückzuführen sein könnte. Ebenso war die Vesikeldichte in Neuriten zwischen homozygoten und heterozygoten BDNF-GFP-*Knock-in*-Neuronen vergleichbar (heterozygot:  $0,40 \pm 0,04$  Vesikel /  $\mu\text{m}^2$ ; homozygot:  $0,45 \pm 0,04$  Vesikel /  $\mu\text{m}^2$ ). Die Vesikeldichte von homozygoten BDNF-GFP-*Knock-in*-Tieren war nicht signifikant verschieden von der in BDNF-GFP-transfizierten Neuronen ( $0,53 \pm 0,02$  Vesikel /  $\mu\text{m}^2$ ; vergleiche **Abb. 4.6 C**).

#### 4.9.2.1 Fusionsporenöffnung in Neuronen von BDNF-GFP-*Knock-in* Mäusen

Um die Fusionsporenöffnung von BDNF-GFP-Vesikeln aus hippokampalen Neuronen von homozygoten und heterozygoten BDNF-GFP-*Knock-in*-Tieren untersuchen zu können, wurden die Zellen in Anwesenheit von Bromphenolblau durch Applikation einer Pufferlösung stimuliert, die eine um 50 mM erhöhte Kaliumkonzentration aufwies (vergleiche **4.4.2**). Die Fusion einzelner Vesikel konnte dabei als sofortiges Auslöschen der BDNF-GFP-Fluoreszenz beobachtet (**Abb. 4.23 B-C**, blau- und grün-markierter Vesikel) und von nicht-fusionierenden Vesikeln (**Abb. 4.23 B-C**, rot-markierter Vesikel) unterschieden

werden. Der Fluoreszenzintensitätsverlauf einzelner BDNF-GFP-beinhaltenender Vesikel nach Fusionsporenöffnung war mit denen aus BDNF-GFP-transfizierten hippocampalen Neuronen vergleichbar (siehe **Abb. 4.7 B-C**). Um die Häufigkeit und das zeitliche Auftreten von Fusionsereignisse zwischen homozygoten und heterozygoten BDNF-GFP-*Knock-in*-Tieren vergleichen zu können, wurden Regionen um mehrere dendritische Abzweigungen der Zelle definiert. Durch das Auslöschen der Fluoreszenzintensität fusionierter Vesikel



**Abb. 4.23: Fusionsporenöffnung von sekretorischen Granula in BDNF-GFP-*Knock-in*-Mäusen.**

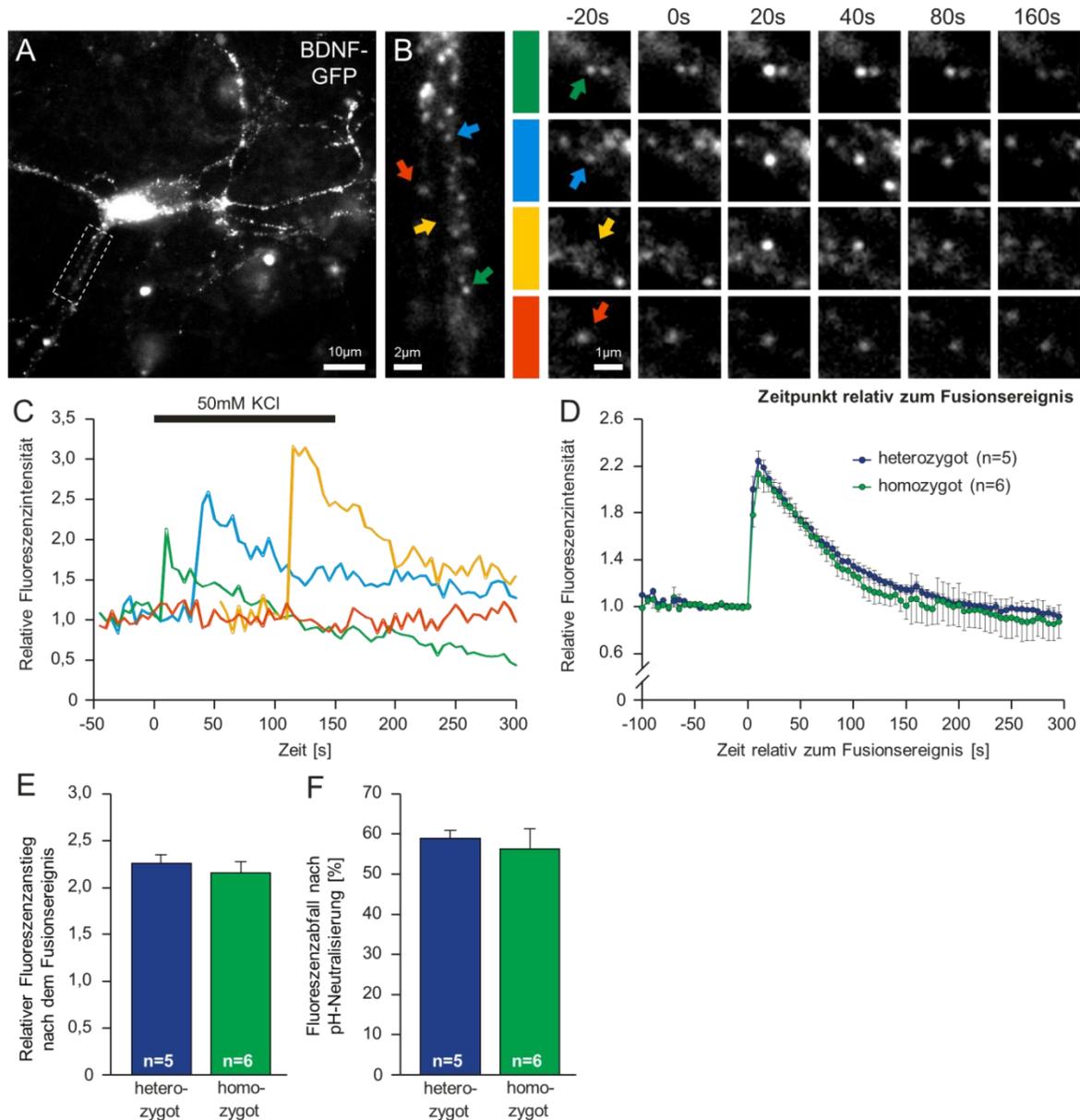
**Fortsetzung der Bildbeschriftung Abb. 4.23:** Hippokampale Neurone von BDNF-GFP-*Knock-in*-Mäusen wurden bis DIV 14 kultiviert und anschließend die Fusion von BDNF-GFP-beinhaltenen Vesikeln in Anwesenheit des GFP-Quenchers Bromphenolblau videomikroskopisch untersucht. **(A)** Repräsentatives hippokampales Neuron einer homozygoten BDNF-GFP-*Knock-in*-Maus. **(B)** Vergrößerung der markierten dendritischen Region aus (A). Die farbkodierte Pfeile markieren einzelne Vesikel oder Vesikelcluster zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor und nach der Stimulation der Zelle durch die Applikation einer Pufferlösung mit erhöhtem (50 mM) Kaliumgehalt ( $K^+$ ). **(C)** Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität der farbig markierten Vesikel aus (B). **(D)** Durchschnittlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität dendritischer Regionen (homozygot: 51 Regionen, heterozygot: 48 Regionen) um BDNF-GFP-beinhaltenen sekretorischen Granula. Durch einzelne Fusionsereignisse wurde die Gesamtfluoreszenz der Regionen nach Kalium-induzierter Stimulation reduziert. **(E)** Die Amplitude des Fluoreszenzintensitätsabfalls in dendritischen Regionen 200 s nach der Stimulation war in beiden Genotypen gleich. **(F)** Zeitliche Verteilung der Fusionsereignisse in dendritischen Regionen in Relation zu der Gesamtvesikelzahl (homozygot: 271 Fusionsereignisse bei 1314 Vesikeln, heterozygot: 192 Fusionsereignisse bei 856 Vesikeln). **(G)** Kumulative Darstellung der Verteilung der Fusionsereignisse. **(H)** Prozentualer Anteil aller Fusionsereignisse im gesamten Beobachtungszeitraum. Hippokampale Neurone aus homozygoten und heterozygoten BDNF-GFP-*Knock-in*-Tieren zeigten weder in der Verteilung noch in der Häufigkeit von Vesikelfusionsereignissen signifikante Unterschiede. n = Anzahl der gemessenen Zellen, Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

wurde die Gesamtfluoreszenzintensität dieser Regionen nach Kalium-induzierter Stimulation exponentiell reduziert (**Abb. 4.23 D**). Der durchschnittliche Fluoreszenzintensitätsverlauf dendritischer Regionen unterschied sich nicht zwischen homozygoten und heterozygoten BDNF-GFP-*Knock-in*-Neuronen. Die Amplitude des Abfalls der Fluoreszenzintensität in diesen Regionen (**Abb. 4.23 E**) war in beiden Genotypen ebenfalls vergleichbar (heterozygot:  $16,8 \pm 2,1$  %, homozygot:  $17,4 \pm 2,3$  %) und nicht signifikant verschieden von der im gleichen Messzeitraum beobachteten Amplitude in BDNF-GFP-transfizierten Zellen ( $16,2 \pm 2,7$  %; vergleiche **Abb. 4.7 D**). Dies deutet auf eine ähnliche Häufigkeit von Fusionsereignissen bei den jeweiligen untersuchten Bedingungen hin. Um den prozentualen Anteil und die Verteilung der Fusionsereignisse zu ermitteln, wurde die Gesamtvesikelzahl in dendritischen Regionen und die Anzahl der Fusionsereignisse sowie deren zeitliches Auftreten bestimmt. Wie auch in BDNF-GFP-transfizierten Neuronen (vergleiche **Abb. 4.7 F**), traten in homozygoten und heterozygoten BDNF-GFP-*Knock-in*-Neuronen die meisten Fusionsereignisse in den ersten 40 s nach der Kalium-induzierten Depolarisation der Zellen auf (**Abb. 4.23 F**). Die Verteilung der Fusionsereignisse unterschied sich nicht zwischen homozygoten und heterozygoten BDNF-GFP-*Knock-in*-Tieren (**Abb. 4.23 F**). Auch der prozentuale Anteil von Fusionsereignissen war in beiden Genotypen ähnlich hoch (heterozygot:  $22,6 \pm 2,2$  %; homozygot:  $20,7 \pm 2,2$  %) und unterschied sich nicht von dem im gleichen Messzeitraum beobachteten prozentualen Anteil an Fusionsereignissen von BDNF-GFP-transfizierten hippokampalen Neuronen ( $19,4$

$\pm 3,7 \%$ ; bei 200s nach Stimulation). Zusammenfassend konnten sowohl in Neuronen von homozygoten als auch heterozygoten BDNF-GFP-*Knock-in*-Tieren die Fusionsporenöffnung nach Quenchen der vesikulären BDNF-GFP-Fluoreszenz durch extrazellulär appliziertes Bromphenolblau beobachtet werden.

#### 4.9.2.2 Neurotrophinausschüttung in Neuronen von BDNF-GFP-*Knock-in*-Mäusen

Um die Ausschüttung von BDNF-GFP zu untersuchen, dessen Expression unter der Kontrolle des endogenem BDNF-Promotors erfolgte, wurden primäre hippocampale Neurone aus BDNF-GFP-*Knock-in*-Tieren in Abwesenheit von Bromphenolblau durch die Applikation einer Pufferlösung stimuliert, die eine um 50 mM erhöhte Kaliumkonzentration aufwies (vergleiche **4.4.4**). Wie auch bei BDNF-GFP-transfizierten hippocampalen Neuronen, zeigte der Fluoreszenzverlauf einzelner fusionierender Vesikel eine Intensitätszunahme der GFP-Fluoreszenz direkt nach dem Fusionsereignis. Dieser folgte anschließend ein exponentieller Fluoreszenzabfall (**Abb. 4.24 B-C**, grün-, gelb und blau-markierter Vesikel), welcher der Ausschüttung von BDNF-GFP entsprach. Außer dem korrigiertem Photobleichen unterlagen im Gegensatz dazu nicht-fusionierende Vesikel keiner Fluoreszenzintensitätsänderung (**Abb. 4.24 B-C**, rot-markierter Vesikel). Die durchschnittliche Kinetik der BDNF-GFP-Ausschüttung von homozygoten und heterozygoten BDNF-GFP-*Knock-in*-Zellen hatte einen ähnlichen Verlauf (**Abb. 4.24 D**). Die durch die Neutralisation des vesikulären pH-Wertes nach dem Fusionsereignis induzierte relative Intensitätszunahme der pH-sensitiven GFP-Fluoreszenz (**Abb. 4.24 F**) war für beide Genotypen etwa gleich hoch (heterozygot:  $2,3 \pm 0,1$ ; homozygot:  $2,2 \pm 0,1$ ). Sie war jedoch größer als die in BDNF-GFP-transfizierten Neuronen betrachtete Intensitätszunahme ( $1,58 \pm 0,04$ , vergleiche **Abb. 4.10 D**). Auf Grund der relativ geringen Fluoreszenzintensität einzelner Vesikel mussten BDNF-GFP-*Knock-in*-Neurone mit wesentlich höheren Intensitäten und Belichtungszeiten des Anregungslichtes als BDNF-GFP-transfizierte Neurone vermessen werden. Da die Fluoreszenzintensität der Vesikel nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz bestimmt wurde, könnte das relativ schlechte Signal-Rausch-Verhältnis und die erhöhte Hintergrundfluoreszenz in Aufnahmen der BDNF-GFP-*Knock-in*-Bedingungen die relative Fluoreszenzzunahme nach Fusionsporenöffnung artifiziell vergrößert haben. Die Amplitude des durch die Ausschüttung von BDNF-



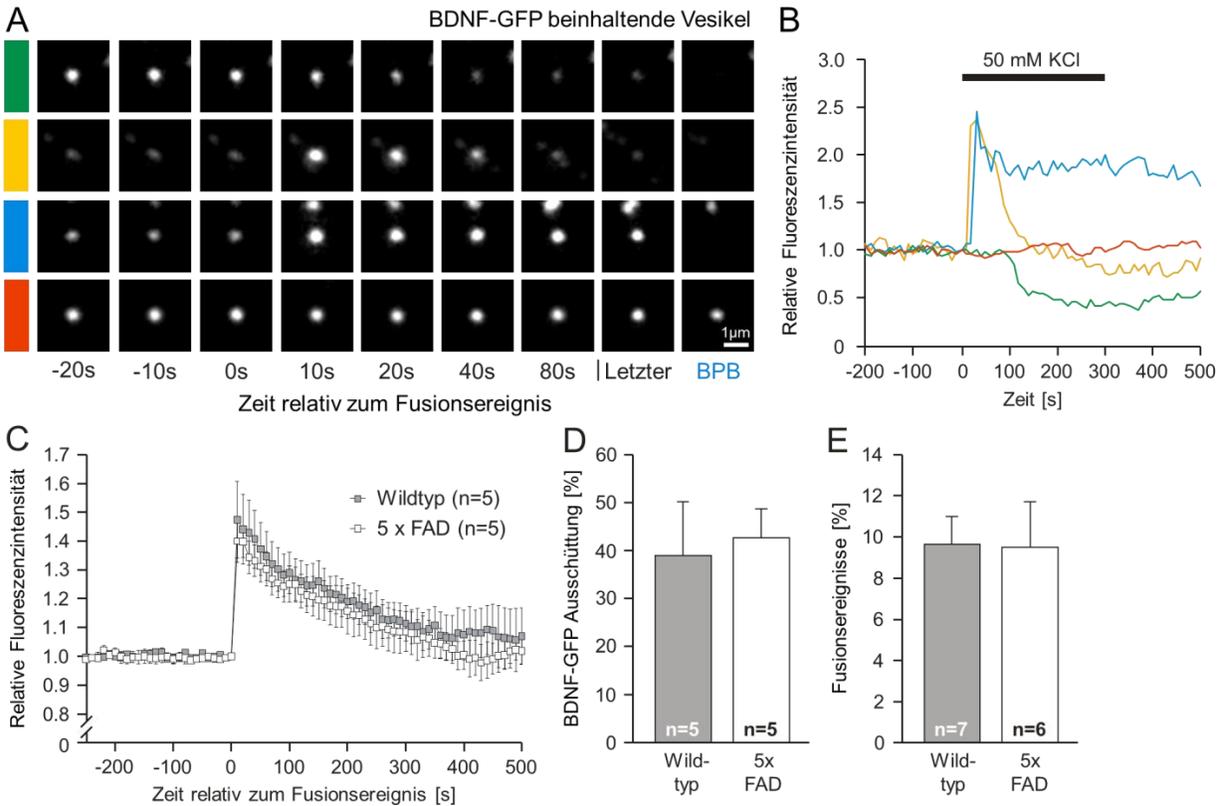
**Abb. 4.24: Ausschüttung von BDNF-GFP aus sekretorischen Granula von BDNF-GFP-Knock-in-Mäusen.** Hippokampale Neurone von BDNF-GFP-Knock-in-Mäuse wurden bis DIV 14 kultiviert und anschließend die Ausschüttung von BDNF-GFP aus einzelnen Vesikeln videomikroskopisch untersucht. **(A)** Repräsentatives hippokampales Neuron einer homozygoten BDNF-GFP-Knock-in-Maus. **(B)** Vergrößerung der markierten dendritischen Region der Zelle aus **(A)**. Der Verlauf der Fusionsereignisse, die mit einzelnen farbkodierten Pfeilen markierten Vesikel, ist rechts in weiterer Vergrößerung dargestellt. **(C)** Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität der einzelnen farbkodierten Vesikel aus **(B)**. **(D)** Durchschnittlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität einzelner BDNF-GFP-beinhaltender Vesikel, die ein Fusionsereignis zeigten (heterozygot: 61 Vesikel; homozygot: 69 Vesikel). **(E)** Amplitude des transienten Anstiegs der Fluoreszenzintensität einzelner BDNF-GFP-beinhaltender Vesikel nach dem Fusionsereignis. **(F)** Amplitude des exponentiellen Abfalls der Fluoreszenzintensität durch die Ausschüttung von BDNF-GFP. In hippokampalen Neuronen von homozygoten und heterozygoten BDNF-GFP-Knock-in-Tieren lassen sich keine signifikanten Unterschiede in der Ausschüttung von BDNF sowie der transienten Fluoreszenzintensitätszunahme BDNF-GFP-beinhaltender Vesikel nach der Fusionsporeöffnung feststellen. n = Anzahl der gemessenen Zellen, Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

GFP verursachten exponentiellen Fluoreszenzabfalls nach der initialen Fluoreszenzintensitätszunahme (**Abb. 4.24 G**) war ebenfalls in beiden Genotypen etwa gleich hoch (heterozygot:  $58,9 \pm 1,9$  %; homozygot:  $56,2 \pm 5,0$  %). In BDNF-GFP-transfizierten hippocampalen Neuronen wurde jedoch eine wesentlich geringere Ausschüttung beobachtet ( $37,6 \pm 1,4$  %, vergleiche **Abb. 4.10 F**). Dies könnte mit der erhöhten Packungsdichte der sekretorischen Granula von BDNF-GFP-transfizierten Neuronen begründet sein. Zusammenfassen ließen sich sowohl in homozygoten, wie auch in heterozygoten BDNF-GFP-*Knock-in*-Neuronen die Ausschüttung von BDNF-GFP vergleichbar zu Neuronen, die mit BDNF-GFP transfiziert wurden, beobachten.

### 4.9.3 Neurotrophinausschüttung in einem Alzheimer Mausmodell

Um die Ausschüttung von BDNF aus hippocampalen Neuronen eines Alzheimer Mausmodells im Vergleich zu Wildtyp Neuronen zu untersuchen, wurde das 5xFAD-Mausmodell verwendet (**Oakley et al., 2006**, freundlicherweise bereitgestellt von Prof. Dr. Klaus Raymann, Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen, Magdeburg). Bei diesem Mausmodell wird das Amyloid-*Precursor* Protein (APP) mit drei für die Ausbildung der Alzheimer Krankheit förderlichen Mutationen und das Presenilin1 (PS1) mit zwei für die Ausbildung der Alzheimer Krankheit förderlichen Mutationen unter der Kontrolle des Neuronen-spezifischen Thy1 Promotors (**Caroni, 1997; Porrero et al., 2010**) exprimiert. Primäre hippocampale Neurone wurden entsprechend **3.2.3** präpariert und auf Polyornithin beschichtete Deckgläser 10 Tage lang kultiviert. Anschließend wurden die Neurone mit einem BDNF-GFP-kodierenden Plasmid (**Haubensak et al., 1998**) entsprechend **3.2.4** transfiziert und die Ausschüttung von BDNF-GFP nach 1-3 Tagen videomikroskopisch analysiert. Die Ausschüttung von BDNF-GFP wurde durch Applikation einer Pufferlösung stimuliert, die eine um 50 mM erhöhte Kaliumkonzentration aufwies. Dabei wurde die Fluoreszenzintensitätsänderung von einzelnen BDNF-GFP-beihaltenden Vesikel gemessen (**Abb. 4.25 A-B**). Am Ende der Messung wurde Bromphenolblau appliziert, um den prozentualen Anteil der fusionierenden Vesikel bestimmen zu können. Die Kinetik der Fluoreszenzveränderung einzelner Beispielvesikel ist in **Abb. 4.25 C** dargestellt. Der Fluoreszenzverlauf der fusionierenden Vesikel war denen aus vorherigen Messungen vergleichbar (**Abb. 4.9 A-B**). Der durchschnittliche Verlauf der Fluoreszenzintensität fusionierender BDNF-GFP-beihaltender Vesikel zeigte zwischen

Wildtyp- und 5xFAD-Neuronen keinen signifikanten Unterschied. Die gemessene Amplitude des exponentiellen Fluoreszenzabfalls, welcher der Ausschüttung von BDNF-GFP entsprach, war ebenfalls für beide Bedingungen nicht signifikant voneinander verschieden (Wildtyp:  $39,0 \pm 11,2 \%$ , 5xFAD:  $42,7 \pm 6,0 \%$ ). Auch der durch Bromphenolblau-Applikation



**Abb. 4.25: BDNF-GFP-Ausschüttung in hippocampalen Neuronen eines Alzheimer Mausmodells.** Hippokampale Neurone von Wildtyp bzw. 5xFAD Mäuse wurden auf Polyornithin kultiviert und an DIV 10 mit einem BDNF-GFP-kodierendem Plasmid transfiziert. Anschließend wurde die Ausschüttung von BDNF-GFP aus einzelnen Vesikeln videomikroskopisch untersucht. **(A)** *Timelapse*-Aufnahmen einzelner BDNF-GFP-beinhaltenender Vesikel eines hippocampalen Neurons einer 5xFAD Maus. Nach Kalium-induzierter Stimulation der Zellen konnten fusionierende Vesikel (grün, gelb, blau) von nicht-fusionierenden Vesikeln (rot) unterschieden werden. Die einzelnen Bilder wurden in Relation zum Fusionsereignis ( $t=0$ ) zeitlich verschoben. Die Restfluoreszenz fusionierter Vesikeln konnte am Ende der Messung durch die Applikation von Bromphenolblau (BPB) ausgelöscht werden. **(B)** Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität der farbig markierten Vesikel aus (A) bei nicht verschobener Zeitskala. Vergrößerung der in (A) markierten Region mit BDNF-GFP-beinhaltenenden sekretorischen Granula vor und nach dem Fusionsereignis. **(C)** Durchschnittlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität einzelner Vesikel aus BDNF-GFP-transfizierten Wildtyp (grau) bzw. 5xFAD (weiß) Neurone. Der Fluoreszenzverlauf wurde auf den Zeitpunkt vor dem Fusionsereignis ( $t=0$ ) normalisiert. **(D)** Die Amplitude des exponentiellen Fluoreszenzabfalls (entspricht der Ausschüttung von BDNF) einzelner BDNF-GFP-beinhaltenender Vesikel war zwischen Wildtyp bzw. 5xFAD Neuronen nicht verschieden. **(E)** Auch der prozentuale Anteil an Fusionsereignissen nach Stimulation war in beiden Genotypen nicht signifikant verschieden. n = Anzahl der gemessenen Zellen, Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

gemessene prozentuale Anteil an fusionierenden Vesikeln (**Abb. 4.25 D**) war zwischen beiden Genotypen vergleichbar (Wildtyp:  $9,6 \pm 1,4$  %, 5xFAD:  $9,5 \pm 2,2$  %). Insgesamt konnte kein Unterschied in der Ausschüttung von BDNF-GFP zwischen Wildtyp Neuronen und Neuronen des Alzheimer Mausmodell (5xFAD) Neuronen beobachtet werden (**Seifert et al.**, in Vorbereitung).

## 5 Diskussion

Die aktivitätsabhängige Ausschüttung von BDNF aus sekretorischen Granula stellt einen essentiellen Schritt für BDNF-mediierte Prozesse z.B. während der Ausbildung neuronaler Plastizität dar. Deshalb ist die Regulation der Ausschüttung von BDNF auch für das Lernen und die Gedächtnisbildung von großer Bedeutung. Die Regulation der aktivitätsabhängigen Exozytose von sekretorischen Vesikeln erfolgt dabei unter anderem über sogenannte *Priming*-Faktoren. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des *Knock-downs* des *Priming*-Faktors CAPS1 auf die Sekretion von BDNF aus primären hippocampalen Neuronen der Maus untersucht. Um die Ausschüttung von BDNF visualisieren zu können, wurden die Neurone mit BDNF-GFP-kodierenden Plasmiden transfiziert, die gleichzeitig eine shRNA gegen CAPS1 oder eine Kontroll-shRNA exprimierten. Obwohl CAPS1 sowohl in Axonen als auch in Dendriten gefunden wurde, kolokalisierte exprimiertes BDNF-GFP vor allem in Dendriten mit CAPS1. Dort spielte CAPS1 sowohl bei der Fusion sekretorischer Granula als auch bei der Freisetzung von BDNF aus einzelnen Vesikeln eine wesentliche Rolle. An axonalen Kontaktstellen autaptischer Neurone kolokalisierte CAPS1 jedoch auch mit dem präsynaptischen Marker VAMP. Mit Hilfe der FM-Entfärbetechnik konnte gezeigt werden, dass CAPS1 auch in präsynaptischen Boutons ein bedeutender Faktor in der Exozytose synaptischer Vesikel ist. Die Funktion von CAPS1 während der verschiedenen Exozytoseprozesse war gepaart mit einer bisher unbekannt Funktion von CAPS1 in der Regulation des pH-Wertes sekretorischer Granula. Dabei wurde nach *Knock-down* von CAPS1 eine Erhöhung des intravesikulären pH-Wertes beobachtet, während der zytosolische pH-Wert unverändert blieb. Die Veränderung des vesikulären pH-Wertes nach *Knock-down* von CAPS1 hatte jedoch keinen direkten Einfluss auf die Funktion von CAPS1 als *Priming*-Faktor sekretorischer Granula. Insgesamt konnte somit gezeigt werden, dass CAPS1 ein wesentlicher Faktor für die Exozytose sekretorischer Granula ist und daneben eine neue, bisher nicht beschriebene Funktion in der Regulation des pH-Wertes sekretorischer Granula besitzt.

## 5.1 Lokalisation von CAPS1 und BDNF in primären hippocampalen Neuronen

Die Funktion des *Priming*-Faktors CAPS1 wurde vor allem in neuroendokrinen Zellen untersucht (Ann et al., 1997; Binda et al., 2005; Speidel et al., 2005; Fujita et al., 2007; Liu et al., 2008). Um den Einfluss von CAPS1 auf neuronale Ausschüttungsprozesse zu analysieren, wurde zunächst die Lokalisation von CAPS1 in hippocampalen Neuronen untersucht. Dabei wurde die Lokalisation sowohl mit Hilfe von überexprimiertem CAPS1-YPet als auch mit Antikörperfärbung gegen das endogene CAPS1 in Relation zum Markerprotein MAP2 bestimmt (4.2). Beide Methoden ergaben ein ähnliches Verteilungsmuster von CAPS1 in primären hippocampalen Neuronen. CAPS1 konnte dabei als zytosolisches Protein gefunden werden, welches besonders stark am Soma, nicht aber im Nukleus lokalisiert war (Abb. 4.1 D, F). Weiterhin war eine starke Expression von CAPS1 in proximalen Dendriten und deren Verzweigungen zu finden (Abb. 4.3 B und Abb. 4.4 B, E). In freiliegenden Bereichen des Axons hingegen war CAPS1 nur sehr schwach zu detektieren (Abb. 4.3 C und Abb. 4.4 C, E). Diese Beobachtungen stehen im Widerspruch zu Lokalisationsexperimenten in akuten Gewebeschnitten des Hippokampus, die CAPS1 stark lokalisiert in axonalen Terminalien hippocampaler Neurone beobachtet haben (Speidel et al., 2003; Sadakata et al., 2007), jedoch auch im Einklang mit Studien, die die Lokalisation von CAPS1 dem somatodendritischen Baum zugeordnet haben (Tobin et al., 2012; Sadakata et al., 2010). Da jedoch nur  $73,3 \pm 1,0$  % der CAPS1-Immunreaktivität mit dem Dendritenmarker MAP2 kolokalisierte (Abb. 4.4 F), ist es durchaus möglich, dass ein Teil der übrigen CAPS1-Immunreaktivität axonalen Kontaktstellen mit Dendriten zuzuordnen ist. Dies wird unterstützt durch die Tatsache, dass präsynaptisches lokalisiertes FM 4-64 oder VAMP2, welches häufig an Dendriten anliegt, ebenfalls häufig mit CAPS1-Immunreaktivität kolokalisierte (Abb. 4.2 A, B). Da jedoch auch der an Dendriten gleichermaßen anliegende postsynaptische Marker PSD95 zum Teil mit CAPS1 kolokalisiert (Abb. 4.2 C), könnte aber auch ein Teil der nicht mit MAP2 kolokalisierenden CAPS1-Immunreaktivität zu Strukturen des Dendriten gehören, bei denen eine MAP2-Immunreaktivität nicht detektiert werden kann (Postsynapsen, aber auch Filopodien). Insgesamt deuten diese Ergebnisse auf eine starke dendritische Lokalisation von CAPS1 hin,

wobei CAPS1 auch in Kontaktstellen des Axons mit Dendriten, jedoch weniger prominent in freiliegenden Axonen, lokalisiert sein kann.

Ebenso wurde die Lokalisation von überexprimiertem BDNF in primären hippocampalen Neuronen untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit BDNF-GFP bzw. BDNF-mCherry-kodierenden Plasmiden transfiziert und die Verteilung von BDNF-beinhaltenden Vesikeln in Relation sowohl zum Markerprotein MAP2 als auch CAPS1 untersucht. Vesikel mit fluoreszenzmarkiertem BDNF wurden dabei in axonalen und in dendritischen Regionen hippocampaler Neurone gefunden (**Abb. 4.3** und **Abb. 4.4**). Fluoreszenzmarkiertes BDNF kolokalisierte sowohl mit CAPS1-YPet als auch endogenem CAPS1 (**Abb. 4.3** und **Abb. 4.4**). Diese Kolokalisation war in Dendriten jedoch wesentlich höher als in Axonen (**Abb. 4.4 D**). Da in dendritischen Regionen jedoch nur  $72,4 \pm 3,4$  % der BDNF-GFP-Fluoreszenz mit dem Dendritenmarker MAP2 kolokalisierte (**Abb. 4.4 G**), ist es auch hier durchaus denkbar, dass ein Teil der anliegenden BDNF-GFP-Vesikel von axonalen Kontaktstellen an Dendriten stammen. Jedoch ist auch eine postsynaptische Lokalisation (**Brigadski et al., 2005**) oder eine Lokalisation in MAP2-freien Strukturen des Dendriten (Filopodien) dieser BDNF-GFP-Vesikel möglich (**Hartmann et al., 2001**). Die Frage, ob BDNF axonal oder dendritisch lokalisiert ist, wird in der Literatur kontrovers diskutiert (**Edelmann et al., 2014**). Obwohl in einigen Studien an Gewebeschnitten des Hippokampus die Lokalisation von BDNF vor allem axonalen Bereichen der Neurone zugeordnet wurde (**Conner et al., 1997; Dieni et al., 2012**), zeigten andere Studien eine Lokalisation von BDNF im somatodendritischen Baum (**Wetmore et al., 1991; Aoki et al., 2000**). In primären hippocampalen Neuronen wurde eine Lokalisation von überexprimiertem BDNF sowohl in Axonen als auch in Dendriten beschrieben (**Haubensak et al., 1998; Hartmann et al., 2001; Dean et al., 2009; Matsuda et al., 2009; Shimojo et al., 2015**). Die Überexpression von BDNF-GFP könnte zwar potentiell zu einer Falschlokalisierung von fluoreszenzmarkiertem BDNF geführt haben. Da jedoch auch primäre hippocampale Neurone aus BDNF-GFP-*Knock-in*-Mäusen ein ähnliches Verteilungsmuster von BDNF wie BDNF-GFP-transfizierte primäre hippocampale Neurone aufwiesen (**Abb. 4.22 A, Abb. 4.23 A, Abb. 4.24 A**), ist davon auszugehen, dass in Kultur BDNF-GFP sowohl axonal als auch dendritisch lokalisiert sein kann.

## 5.2 Physiologische Konsequenzen des *Knock-downs* von CAPS1

Um die Abhängigkeit der BDNF-Sekretion vom *Priming*-Faktor CAPS1 zu untersuchen, wurde die Expression von CAPS1 in hippocampalen Neuronen mittels RNA-Interferenz reduziert. Hierzu wurden shRNA-Vektoren kloniert, die entweder eine Kontroll- oder eine CAPS1-shRNA kodierten. Da diese neue CAPS1-shRNA-Sequenz bisher nicht validiert war, musste zunächst die Effizienz des *Knock-downs* nach Transfektion mit CAPS1-shRNA-Vektoren quantifiziert werden (**4.1**). Dabei konnte sowohl die Expression von CAPS1-YPet als auch die Expression des endogenen CAPS1 Proteins erfolgreich reprimiert werden. Der *Knock-down* von CAPS1 in CAPS1-YPet transfizierten Neuronen wies dabei eine ähnlich hohe *Knock-down*-Effizienz ( $89,8 \pm 1,1$  %) auf, wie der *Knock-down* von GFP durch eine bereits validierte GFP-siRNA-Sequenz in GFP-transfizierten Neuronen ( $91,5 \pm 1,4$  %). Für die physiologische Funktion von CAPS1 war jedoch der *Knock-down* des endogenen CAPS1-Proteins von besonderem Interesse. Mittels Antikörperfärbungen gegen CAPS1 wurde hierbei 5 Tage nach der Transfektion mit CAPS1-shRNA-Vektoren eine Reduzierung der CAPS1-Immunreaktivität am Soma auf  $35,0 \pm 3,7$  % beobachtet (*Knock-down*-Effizienz von  $65,0 \pm 3,7$  %). Die am Soma noch messbare CAPS1-Immunfluoreszenz war nach *Knock-down* der CAPS1-mRNA maßgeblich durch die Geschwindigkeit des Abbaus bereits synthetisierter CAPS1-Proteine bestimmt. Da die Halbwertszeit des CAPS1-Proteins 3,15 Tage beträgt (**Cohen et al., 2013**), war rein mathematisch zu erwarten, dass zum Messzeitpunkt 5 Tage nach der Transfektion noch 33,3 % an Restprotein vorhanden sein werden. Dieser theoretische Wert entsprach nahezu der beobachteten Reduktion der CAPS1-Immunreaktivität auf  $35,0 \pm 3,7$  % in CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen (**Abb. 4.1 F-G**). Somit war zu diesem Messzeitpunkt beinahe die maximal mögliche Reduktion der CAPS1-Expression erreicht.

Der somit validierte CAPS1-shRNA-Vektor wurde anschließend eingesetzt, um die Konsequenzen einer verminderten Expression von CAPS1 auf neuronale Sekretionsprozesse zu untersuchen. Da CAPS1 mit präsynaptischen Markern kolokalisierte (**Abb. 4.2 B**), war eine Beteiligung von CAPS1 an der Exozytose synaptischer Vesikel wahrscheinlich. Um dies zu untersuchen, wurde die Entfärbung von FM-1-43 gefärbten synaptischen Boutons untersucht (**Betz & Bewick, 1993**). Nach *Knock-down* von CAPS1 konnte dabei eine um  $29,1 \pm 4,8$  % reduzierte Amplitude des Fluoreszenzabfalls an

synaptischen Boutons beobachtet werden (**Abb. 4.5 D-E**). Dies deutete auf eine reduzierte Exozytose synaptischer Vesikel hin. Die Erkenntnis, dass CAPS1 ein wichtiger *Priming*-Faktor der Exozytose synaptischer Vesikel sein könnte, wurde erstmal durch Jockusch und Kollegen diskutiert (**Jockusch et al., 2007**). In dieser Studie wurden primäre hippocampale Neurone untersucht, die aus embryonalen Stadien von CAPS1-*Knock-out* bzw. CAPS1/CAPS2-Doppel-*Knock-out*-Mäusen gewonnen und kultiviert wurden. Mit Hilfe von elektrophysiologischen Messmethoden, konnte in beiden Fällen eine reduzierte Ausschüttung von synaptischen Vesikeln, verursacht durch eine Reduktion fusionskompetenter synaptischer Vesikel, nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum *Knock-out* von CAPS1 (**Jockusch et al., 2007**) waren jedoch die Folgen des im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchten *Knock-downs* von CAPS1 auf die Ausschüttung von synaptischen Vesikeln weniger drastisch. Dies ist vermutlich mit der Tatsache zu begründen, dass CAPS1-shRNA-transfizierte Zellen zum Messzeitpunkt noch über eine geringe Menge an CAPS1-Restprotein verfügten. Obwohl CAPS1 und CAPS2 im Hippokampus komplementär exprimiert werden (**Sadakata et al., 2007**), ist in Zellkultur außerdem nicht auszuschließen, dass das Vorhandensein von CAPS2 in CAPS1-shRNA-transfizierten Zellen den Funktionsverlust von CAPS1 kompensiert haben könnte.

CAPS1 wird auch während embryonaler Entwicklungsstadien exprimiert (**Speidel et al., 2003**) und könnte für die Ausschüttung wichtiger Wachstumsfaktoren aus sekretorischen Granula von Neuronen verantwortlich sein. Somit ist nicht auszuschließen, dass im vollständigen *Knock-out* von CAPS1 und CAPS2 entwicklungspezifische Defizite zu dem von Jockusch und Kollegen beschriebenen Phänotyp der verminderten Neurotransmission geführt haben könnte (**Jockusch et al., 2007**). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde jedoch die Auswirkung des *Knock-downs* von CAPS1 auf einzelne autaptische hippocampale Neurone untersucht, die sich vorher unter Wildtyp-Bedingungen entwickeln konnten. Da auch unter diesen Voraussetzungen eine reduzierte Exozytose von synaptischen Vesikeln aus FM-gefärbten synaptischen Boutons beobachtet werden konnte, bestätigt diese Arbeit somit die Ergebnisse von Jockusch und Kollegen in einem Kulturmodell, welches nicht durch potentielle entwicklungspezifische Defizite beeinflusst worden war. Um dennoch einen möglichen akuten Einfluss des *Knock-downs* von CAPS1 auf die Bildung und Reifung von Synapsen zu untersuchen, wurden die Anzahl und die Größe der FM-gefärbten

synaptischen Boutons bestimmt. Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede nach *Knock-down* von CAPS1 beobachtet (**Abb. 4.5 F, G**). Dies deutet auf keine Veränderung bei der Bildung und Reifung der Synapsen in den untersuchten Kulturen primärer hippocampaler Neurone hin und entspricht somit den Beobachtungen in hippocampalen Neuronen aus CAPS1- und CAPS2-*Knock-out*-Tieren, bei denen ebenfalls keine offensichtlichen quantitativen und morphologischen Veränderungen innerhalb von Synapsen gefunden wurden (**Jockusch et al., 2007**). Da auch die Fluoreszenzintensität FM-gefärbter synaptischer Bouton nach *Knock-down* von CAPS1 keine signifikanten Unterschiede zeigte (**Abb. 4.5 H**), deutet dies daraufhin, dass unter den verwendeten Messbedingungen die Endozytose des FM-Farbstoffs von CAPS1 unbeeinflusst war.

Nachdem nach *Knock-down* von CAPS1 eine Verminderung der Exozytose synaptischer Vesikel beobachtet wurde, sollte auch die Ausschüttung von Neurotrophenen aus sekretorischen Granula in primären hippocampalen Neuronen untersucht werden. Zur Visualisierung einzelner sekretorischer Granula, wurden die Zellen mit BDNF-GFP-kodierenden Vektoren transfiziert, die entweder die Kontroll- oder CAPS1-shRNA koexprimieren. Um zunächst zu überprüfen, ob der *Knock-down* von CAPS1 bereits einen Einfluss auf die Bildung und Verteilung von BDNF-GFP-beihaltenden Vesikeln hatte, wurde die Vesikeldichte in Neuriten bestimmt (**Abb. 4.6 C**). Dabei wurde kein Unterschied zur Kontrollbedingung festgestellt. Dies deckt sich mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen in Neuronen (**Jockusch et al., 2007**) und neuroendokrinen Zellen (**Speidel et al., 2005; Fujita et al., 2007**), bei denen nach *Knock-out* bzw. *Knock-down* von CAPS1 ebenfalls keine Veränderungen in der Anzahl oder der Dichte sekretorischer Granula gefunden wurden. Im Gegensatz dazu wurde jedoch in einem konditionellen CAPS1-*Knock-out*-Modell eine verringerte Anzahl von sekretorischen Granula in Synapsen und axonalen Fasern bestimmt (**Sadakata et al., 2013**). In elektronenmikroskopischen Bildern sind *Dense-Core* Vesikel relativ selten zu beobachten, weshalb diese Ergebnisse nicht mit den in **Abb. 4.6 C** gezeigten Fluoreszenz-mikroskopischen Analysen verglichen werden können. Hierbei könnte die Überexpression von BDNF-GFP die Vesikeldichte innerhalb der BDNF-GFP-transfizierten Zellen artifiziell erhöht haben. Da jedoch auch in hippocampalen Neuronen von homozygoten BDNF-GFP-*Knock-in*-Tieren eine ähnliche Vesikeldichte zu beobachten war (**4.9.2**, Zahlenwerte im Text beschrieben), ist anzunehmen, dass die

Überexpression keinen wesentlichen Einfluss auf die Menge der gebildeten sekretorischer Granula hatte.

Ein möglicher Einfluss des *Knock-downs* von CAPS1 auf die Größe der BDNF-GFP-beihaltenden Vesikel wurde durch Analyse der Querschnittsfläche einzelner Vesikel untersucht. Dabei wurde wiederum kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen beobachtet. (**Abb. 4.6 C**). Unter der Annahme einer kreisrunden Querschnittsfläche kann der gemessene Flächeninhalt in den Durchmesser eines Vesikels übersetzt werden. Für beide Bedingungen war der Durchmesser BDNF-GFP-beihaltender sekretorischer Granula etwa 900 nm. In der Literatur wird jedoch mit 100 - 300 nm ein wesentlich kleinerer Durchmesser für sekretorische Granula angegeben (**Lessmann et al., 2003**), der vor allem durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestimmt wurde. Für diese Diskrepanz gibt es verschiedene Gründe. Neben der Möglichkeit, dass mehrere Vesikel einen von einzelnen Vesikeln nicht mehr zu unterscheidenden Vesikelcluster gebildet haben könnten, gibt es auch optische Beschränkungen der Fluoreszenzmikroskopie. Helleuchtende Punktlichtquellen bilden Beugungsmuster, die sich ringförmig um die Lichtquelle ausbreiten (Punktspreizfunktion). Da diese Ringmuster für hell leuchtende BDNF-GFP-beihaltende sekretorische Granula jedoch kleiner sind, als das Auflösungsvermögen des Mikroskops, erscheinen diese Vesikel größer als sie tatsächlich sind (**Oheim, 2004**). Dieser Effekt weitet, abhängig von der Fluoreszenzintensität der Vesikel, deren scheinbaren Durchmesser aus, weshalb in den wesentlich schwächer leuchtenden Vesikeln von homozygoten und heterozygoten BDNF-GFP-*Knock-in-Tieren* eine geringere Querschnittsfläche der Vesikel bestimmt wurde (**4.9.2**, Zahlenwerte im Text beschrieben). Da die durchschnittliche Fluoreszenzintensität und die Vesikeldichte von BDNF-GFP-beihaltenden Vesikeln aus Kontroll-shRNA und CAPS1-shRNA-transfizierten Zellen ähnlich hoch ist (**Abb. 4.6 B-C**), können die Querschnittsflächeninhalte als relative Werte dennoch miteinander verglichen werden. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Größe einzelner sekretorischer Granula durch den *Knock-down* von CAPS1 nicht beeinflusst wurde.

Auch ein möglicher Einfluss des *Knock-downs* von CAPS1 auf die Beladung sekretorischer Granula mit BDNF-GFP wurde untersucht. Da die Fluoreszenzintensität BDNF-GFP-beihaltender Vesikel vom vesikulären pH-Wert abhängt (pH-Sensitivität des GFPs, siehe

4.4.4), konnte die absolute Fluoreszenzintensität, die bei gleicher Bildbelichtung aufgenommen wurde, nicht als Maß für die Beladung der Vesikel mit BDNF-GFP dienen. Deshalb wurden die absoluten Fluoreszenzintensitäten BDNF-GFP-beinhaltenender Vesikel während des Überspülens mit 50 mM Ammoniumchlorid-Lösung miteinander verglichen. Da unter diesen Bedingungen der vesikuläre pH-Wert auf ein einheitliches Niveau neutralisiert wurde, war die gemessene Fluoreszenzintensität proportional zur Beladung der Vesikel mit BDNF-GFP. Diese war zwischen Kontroll- und CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen nicht signifikant verschieden (**Abb. 4.13 B**). Dies deutet daraufhin, dass der *Knock-down* von CAPS1 keinen Einfluss auf die Sortierung von überexprimiertem BDNF-GFP in die sekretorischen Granula hatte. Die Überexpression von BDNF-GFP (mittels hSyn1-Promotor mit nachgeschalteten Expressions-*Enhancer* Elementen des ursprünglichen pAAV-6P-SEWB Plasmids, **Christensen et al., 2010**) an sich hatte jedoch einen Einfluss auf die Beladung der Vesikel mit fluoreszenzmarkiertem BDNF. So wurde unter Verwendung einer etwa 23x höheren Intensität des Anregungslichtes in Vesikeln von homozygoten BDNF-GFP-*Knock-in*-Neuronen, bei denen BDNF-GFP unter dem endogenen BDNF-Promotor exprimiert wurde, eine geringere Fluoreszenzintensität der sekretorischen Granula als bei BDNF-GFP-transfizierten Zellen beobachtet (vergleiche **Abb. 4.22 G** mit **Abb. 4.13 E**). Die absoluten Fluoreszenzintensitäten einzelner Vesikel der beiden Messungen sind auf Grund der unterschiedlichen Belichtungsstärken nicht quantitativ miteinander zu vergleichen. Geht man jedoch von einem linearen Zusammenhang zwischen Anregungslichtstärke und gemessener Fluoreszenz aus, so kann man abschätzen, dass BDNF-GFP-überexprimierende Zellen etwa 30x so viel BDNF in ihre Vesikel verpacken, als unter physiologischen Bedingungen vorhanden wäre.

Nachdem ein möglicher Einfluss des *Knock-downs* von CAPS1 auf die Dichte, die Größe und die Beladung einzelner sekretorischer Granula mit BDNF-GFP nicht bestätigt werden konnte, wurde der Einfluss von CAPS1 auf die Ausschüttung von BDNF aus hippokampalen Neuronen untersucht. Mit Hilfe von Bromphenolblau konnte zunächst ein Einfluss des *Knock-downs* von CAPS1 auf die Anzahl von Fusionsereignissen gezeigt werden. Dabei wurde eine um  $57,9 \pm 5,4$  % reduzierte Häufigkeit von Fusionsereignissen nach CAPS1-*Knock-down* beobachtet (**Abb. 4.7 H**). Die zeitliche Verteilung des Auftretens dieser Fusionsereignisse blieb jedoch unbeeinflusst vom CAPS1-*Knock-down* (**Abb. 4.7 F-G**). Die

Verminderung von Fusionsereignissen spiegelte sich auch in der verminderten Amplitude des exponentiellen Fluoreszenzabfalls in dendritischen Regionen wieder (**Abb. 4.7 D-E**). Da dieser Fluoreszenzabfall vor allem durch das Auslöschen der Fluoreszenz einzelner fusionierter BDNF-GFP-beinhaltenender Vesikel durch den Eintritt von Bromphenolblau bestimmt wurde, konnten die Zeitkonstanten des Fluoreszenzabfalls ebenfalls Auskunft über die Verteilung der Fusionsereignisse geben. Die Tatsache, dass die Zeitkonstanten des Fluoreszenzabfalls in beiden Bedingungen ähnlich hoch waren (**4.4.2**, Werte im Text erwähnt) deutet somit ebenfalls auf eine vergleichbare zeitliche Verteilung der Fusionsereignisse hin. Die nach *Knock-down* von CAPS1 reduzierte Häufigkeit von Fusionsereignissen sekretorischer Granula war jedoch unbeeinflusst von den Effekten des CAPS1-*Knock-downs* auf die Neurotransmission (siehe **4.3**), da in Anwesenheit synaptischer Blocker eine ähnliche hohe Reduktion von Fusionsereignissen zu beobachten war (**Abb. 4.8**). Somit war die Reduktion der Häufigkeit von Fusionsereignissen sekretorischer Granula in einzelnen CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen nicht abhängig vom der synaptischen Aktivität des umliegenden Mikronetzwerks untransfizierten hippocampaler Neurone. Die Funktion von CAPS1 in Fusionsprozessen sekretorischer Granula konnte in einer erst kürzlich erschienenen Studie an CAPS1/CAPS2-Doppel-*Knock-out*-Mäusen belegt werden (**Farina et al., 2015**). Hier wurden Fusionsereignisse jedoch mit Hilfe von Semaphorin-pHluorin oder NPY-pHluorin visualisiert. PHluorin ist eine Mutante des GFP, bei der die pH-Empfindlichkeit der GFP-Fluoreszenz noch weiter verstärkt wurde. Die Fluoreszenz von pHluorin wird durch den sauren vesikulären pH-Wert auf nahezu Hintergrundlevel gequencht, so dass sie vor dem Fusionsereignis unsichtbar bleiben. Nach Vesikelfusion ist jedoch ein starkes Aufleuchten einzelner Vesikel zu beobachten. Insgesamt war durch die Verwendung dieser Konstrukte eine um 60-70 %-tige Reduktion des Auftretens von Fusionsereignissen in Neuronen von CAPS1/CAPS2-Doppel-*Knock-out* Tieren zu beobachten. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit gefundene Reduktion der Fusionsereignissen auf  $57,9 \pm 5,4$  % nach CAPS1-*Knock-down* (**Abb. 4.7 H**) war somit nur geringfügig schwächerer als unter CAPS1/CAPS2-Doppel-*Knock-out*-Bedingungen (**Farina et al., 2015**). Der Unterschied kann damit begründet sein, dass CAPS1-shRNA-transfizierte Neurone zum Zeitpunkt der Messung noch ca. 35 % der physiologischen CAPS1-Proteinkonzentration beinhaltenen (siehe **Abb. 4.1 F-G**). Umso interessanter ist, dass

bereits eine verringerte Dosis der CAPS1-Proteinkonzentration eine so drastische Reduzierung der Fusion sekretorischer Granula zur Folge hatte. Da in CAPS1-shRNA-transfizierten hippocampalen Neuronen potentiell CAPS2 den Funktionsverlust durch den *Knock-down* von CAPS1 ausgeglichen haben könnte, welches durch den CAPS1/CAPS2-Doppel-*Knock-out* verhindert wurde, kann abgeschätzt werden, dass in den untersuchten hippocampalen Neuronen CAPS2 nur eine untergeordnete Rolle für die Fusion sekretorischer Granula spielte. Dafür spricht auch die Tatsache, dass CAPS2 im Hippokampus insgesamt schwächer exprimiert wird (**Speidel et al., 2003**) und häufig in Neuronen vorkommt, die komplementär zu CAPS1-exprimierenden Neuronen liegen (**Sadakata et al., 2007**). Wie auch im Rahmen dieser Doktorarbeit nach *Knock-down* von CAPS1 beobachtet (**Abb. 4.7 F-G**), waren unter CAPS1/CAPS2-Doppel-*Knock-out*-Bedingungen im Vergleich zum Wildtyp keine Unterschiede in der zeitlichen Verteilung der Fusionsereignisse zu erkennen (**Farina et al., 2015**). Eine ähnliche Studie an CAPS2-*Knock-out* Mäusen in primären zerebellaren Neuronen ergab eine vergleichbare Reduktion der Fusion von BDNF-pHluorin-beihaltenden sekretorischen Granula (**Shinoda et al., 2011**), jedoch wurde hierbei eine zeitliche Verzögerung der Fusionsereignisse unter CAPS2-*Knock-out*-Bedingungen beobachtet. Insgesamt zeigten die Ergebnisse dieser Doktorarbeit, dass bereits der *Knock-down* von CAPS1 auf etwa 35 % Restprotein einen signifikanten negativen Einfluss auf die Anzahl von Fusionsereignissen sekretorischer Granula hatte ohne jedoch die zeitliche Verteilung dieser zu beeinflussen.

Die Menge des ausgeschütteten BDNFs wird jedoch nicht allein von der Anzahl an fusionierenden Vesikeln bestimmt. Auch die aus dem Vesikel freigesetzte Menge von BDNF spielt dabei eine wesentliche Rolle. In den in dieser Doktorarbeit durchgeführten Fluoreszenz-mikroskopischen *Time-Lapse*-Messungen wurde Menge des ausgeschütteten BDNF-GFP als exponentieller Fluoreszenzabfall einzelner Vesikel nach Öffnung der Fusionspore (mit oder ohne transienter Fluoreszenzintensitätszunahme) bestimmt. Dabei konnte durch repetitives Ein- und Auswaschen von Bromphenolblau in einzelne Vesikel über einen langen Zeitraum hinweg (**Abb. 4.9 B-C**) ein Wiederverschließen der Fusionspore mit anschließender Reazidifizierung ausgeschlossen werden (vergleiche **Kolarow et al., 2007**). Ob es sich dabei um Fusionsereignisse mit geöffneten Fusionsporen (Omega-Querschnitt) oder um den Inhalt eines voll exozytierten Vesikels (*Full collapse*)

handelte, der an der äußeren Plasmamembran anhaftete, konnten diese Experimente jedoch nicht zeigen. Insgesamt sprechen diese Ergebnisse gegen ein mögliches Auftreten von *Kiss-and-Run* Ereignissen in den untersuchten Zellen. Von besonderem Interesse war die durch den *CAPS1-Knock-down* induzierte Änderung des gemittelten Fluoreszenzintensitätsverlaufs einzelner BDNF-GFP-beinhaltender Vesikel (**Abb. 4.10 A**). Obwohl die Häufigkeit von Vesikelfusionsereignissen, die durch eine transiente Fluoreszenzintensitätszunahme nach Öffnung der Fusionspore identifiziert werden konnten, nicht verändert war (**Abb. 4.10 B**), hatte der initiale Fluoreszenzanstieg nach *CAPS1-Knock-down* eine signifikant verringerte Amplitude (**Abb. 4.10 C**). Der sich anschließende exponentielle Abfall der Fluoreszenzintensität, welcher der Diffusion von BDNF-GFP aus dem Vesikel entsprach, hatte ebenfalls eine signifikant verringerte Amplitude (**Abb. 4.10 D**). Die Reduktion der BDNF-Ausschüttung aus einzelnen Vesikeln nach *CAPS1-Knock-down* war nicht durch eine reduzierte Beladung der Vesikel mit BDNF-GFP zu erklären (siehe **4.5.1** und **Abb. 4.13 E**). Auch trat dieser Effekt unabhängig von den Defiziten in der synaptischen Transmission nach *CAPS1-Knock-down* auf (siehe **4.3**), da Vergleichsexperimente in Anwesenheit synaptischer Transmitter ein ähnliches Ergebnis lieferten (**Abb. 4.11 C**). Die Zeitkonstante des exponentiellen Fluoreszenzabfalls der Ausschüttung von BDNF-GFP hatte unter verschiedenen Messbedingungen jedoch einen vergleichbaren Wert (**Abb. 4.19 E**). Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass der *CAPS1-Knock-down* zwar nicht die Kinetik der BDNF-Ausschüttung, sehr wohl aber die Menge des ausgeschütteten BDNF-GFPs aus einzelnen Vesikeln beeinflusste. Zwar wurde der Einfluss eines *Knock-outs* von *CAPS1* auf das Auftreten von Fusionsereignissen in einer anderen Studie bereits untersucht (**Farina et al., 2015**), eine vergleichbare Analyse des Einflusses von *CAPS1* auf die Kinetik und Amplitude der Ausschüttung sekretorischer Proteine aus einzelnen Vesikeln hippocampaler Neurone wurde jedoch bisher nicht durchgeführt. Die verminderte Ausschüttung von BDNF-GFP aus einzelnen Vesikeln (**Abb. 4.10 D**) unter *CAPS1-Knock-down*-Bedingungen stellt somit eine neue Erkenntnis dar. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine durch den Ausfall von *CAPS1* verringerte Größe der Fusionspore sein. Dies würde zu einem geringeren Abfall der Fluoreszenzintensität des aus dem Vesikel diffundierenden BDNF-GFPs führen, sollte aber auch einen Einfluss auf die Zeitkonstante des exponentiellen Fluoreszenzabfalls haben. Andere Studien gehen jedoch

nicht von einer Beteiligung von CAPS1 an der Dilatation der Fusionspore aus (**Speidel et al., 2005**).

Die allgemeine Kinetik der BDNF-GFP oder BDNF-pHluorin-Ausschüttung wurde bereits in einer Reihe von Studien untersucht. Dabei war vor allem die Geschwindigkeit der Ausschüttung stark voneinander abweichend. In einigen Studien wurden Sekretionsereignisse gezeigt, bei denen ein vollständiger Fluoreszenzabfall in weniger als 20 s beschrieben wurde (**Matsuda et al., 2009**). In anderen Studien wurde ein mit den in dieser Doktorarbeit gefundenen, wesentlich langsameren Zeitkonstanten (**Abb. 4.19 E**) vergleichbarer Fluoreszenzabfall beobachtet (**Hartmann et al., 2001; Brigadski et al., 2005; Kolarow et al., 2007; de Wit et al., 2009; Dean et al., 2009; Shimojo et al., 2015**). Teilweise zeigte die gleiche Studie unterschiedlich schnelle Kinetiken, je nachdem, ob sie mit Weitfeldmikroskopie oder TIRF-Mikroskopie aufgenommen wurden (**Matsuda et al., 2009**). Es ist deshalb anzunehmen, dass unterschiedliche beobachtete Geschwindigkeiten der gemessenen Ausschüttungsprozesse stark durch verschiedene experimentelle Bedingungen einzelner Labore beeinflusst worden waren (z.B. Art der Stimulation, Art der Mikroskopie, Zellkulturbedingungen, Art der Auswertung der Messwerte). Vergleichende Studien, die die Ausschüttung verschiedener fluoreszenzmarkierter sekretorischer Peptide oder Proteine untersuchten, konnten jedoch zeigen, dass diese stark von der Verzögerung der Diffusion auf Grund der Größe des sekretierten Proteins und dessen Wechselwirkungen mit der intravesikulären Matrix abhängt (**Barg et al., 2002; Brigadski et al., 2005; de Wit et al., 2009**). Da BDNF-GFP mit 43 kDa (matures BDNF-GFP) bis 58 kDa (pro-BDNF-GFP) als sekretorisches Fusionsprotein relativ groß ist (**Haubensak et al., 1998**), sollte deshalb eine relativ langsame Kinetik der Ausschüttung zu erwarten sein. In einigen Studien wurde außerdem eine unterschiedliche Kinetik der Ausschüttung von fluoreszenzmarkiertem BDNF in Axonen und Dendriten beschrieben (**Matsuda et al., 2009; Dean et al., 2009**). Hierbei wurden häufig nach MAP2- oder Tau-Färbungen Axone und Dendriten hippocampaler Neurone morphologisch charakterisiert und diese Kriterien anschließend auf Neurone, die in Sekretionsexperimenten gemessen wurden, übertragen. Dabei wurden Fusionsereignisse mit transienter Fluoreszenzintensitätszunahme nach der Fusionsporenöffnung dem Axon und Fusionsereignisse mit sofortigem Fluoreszenzintensitätsabfall den Dendriten zugeordnet. Jedoch sprechen Untersuchungen,

die mit der Fluoreszenzhintergrund-ausblendenden TIRF-Mikroskopie durchgeführt wurden und ebenso eine transiente Fluoreszenzintensitätszunahme der Vesikel nach dem Fusionsereignis in Dendriten zeigten, gegen eine so eindeutige Verteilung der Fusionsereignisse (**Matsuda et al., 2009**). In Experimenten zur Ausschüttung von BDNF wurde auf Grund der Unsicherheit der Identifizierung von Axonen und Dendriten in dem komplexen Neuritenbaum primärer hippocampaler Neurone in dieser Doktorarbeit auf eine ähnliche morphologische Zuordnung ohne anschließende tatsächliche Identifizierung von Axonen und Dendriten durch Markerproteine verzichtet. Die Kolokalisationsstudien von BDNF-GFP mit MAP2 (**Abb. 4.4**) legen jedoch nahe, dass in einem Großteil der hier untersuchten Soma-nahen Neuriten BDNF-GFP dendritisch lokalisiert war.

Neben der Reduktion der Effizienz der BDNF-GFP-Ausschüttung war nach *Knock-down* von CAPS1 an Hand des Fluoreszenzintensitätsverlaufs einzelner fusionierender Vesikel (**Abb. 4.10 A**) ein weiterer, unerwarteter Effekt zu beobachten. So war die Amplitude der transienten Fluoreszenzintensitätszunahme einzelner BDNF-GFP-beinhaltenender Vesikel nach der Fusionsporenöffnung in mit CAPS1-shRNA-transfizierten Zellen signifikant reduziert (**Abb. 4.10 C**). Dieser Effekt deutete auf eine Erhöhung des vesikulären pH-Wertes zumindest in fusionierenden Vesikeln nach *Knock-down* von CAPS1 hin. Eine CAPS1-abhängige Veränderung der initialen Fluoreszenzintensitätszunahme bei der Ausschüttung von BDNF-GFP oder BDNF-pHluorin aus sekretorischen Granula wurde bisher noch nicht beschrieben. Es konnte jedoch in zerebellaren Neuronen von CAPS2-*Knock-out* Mäusen, die mit BDNF-pHluorin transfiziert wurden, ein gleichwertiges Phänomen beobachtet werden (**Shinoda et al., 2011**). Zwar wurde dieser Effekt von Shinoda und Kollegen nicht diskutiert, da jedoch auch hier die initiale Fluoreszenzintensitätszunahme der Vesikel nach Fusionsporenöffnung durch den CAPS2-*Knock-out* stark reduziert wurde, ist es möglich, dass CAPS2 in diesen Neuronen einen ähnlichen Einfluss auf den vesikulären pH-Wert der fusionierten Vesikel hatte. Um zu überprüfen, ob nach *Knock-down* von CAPS1 sekretorische Granula allgemein einer pH-Wertveränderung unterlagen, wurde in der vorliegenden Doktorarbeit der pH-Wert von BDNF-GFP-beinhaltenenden Vesikeln mit Hilfe von zwei verschiedenen Methoden untersucht. Sowohl die Berechnung des intragranularen pH-Wertes nach Überspülen von Ammoniumchlorid (**Abb. 4.13**), wie auch die Bestimmung des vesikulären pH-Wertes durch pH-Titrationsexperimente mit BDNF-GFP als

intrinsischen pH-Indikator (**Abb. 4.14**), ergaben eine signifikante Zunahme des intravesikulären pH-Wertes nach *CAPS1-Knock-down*. In beiden Experimenten war der vesikuläre pH-Wert unter Kontrollbedingungen etwas weniger azid als der mit pH=5,5 angegebene Literaturwert (**Johnson & Scarpa, 1976; Russell & Holz, 1981**). Dies kann jedoch auch auf Unterschiede in den verwendeten Zelltypen oder der zur pH-Wert Bestimmung verwendeten Messmethoden zurückzuführen sein. In neuerer Literatur wird zwischen reifen sekretorischen Granula (pH=5,0-5,5) und unreifen sekretorischen Granula (pH=5,7-6,3) unterschieden (**Wu et al., 2001**). Diese pH-Wertangabe entspricht dabei eher der Streubreite einzelner beobachteter vesikulärer pH-Werte, die den Durchschnittswert der Kontrollbedingung bildeten (**Abb. 4.14 C**). Der Unterschied zwischen dem berechneten pH-Wert mit Hilfe von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  und dem durch pH-Titrationsexperimente bestimmten pH-Wert könnte damit begründet sein, dass das Überspülen von  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , zwar kurzfristig den vesikulären pH-Wert durch Aufnahme dortiger Protonen mittels  $\text{NH}_3$  neutralisiert, jedoch die Behandlung langfristig zu einer Säurebeladung vesikulärer Strukturen führt (**Wu et al., 2001**). Dies sollte nach dem Wiederauswaschen von Ammoniumchlorid zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität BDNF-GFP-beinhaltenender Vesikel unter das Niveau der Basislinie führen. In Einzelfällen war dieser Effekt zwar zu beobachten, jedoch lag die durchschnittliche Fluoreszenzintensität nach dem Auswaschen von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  auf gleichem Niveau der Baseline (**Abb. 4.13 A**). Dies deutet darauf hin, dass es innerhalb des relativ kurzen Zeitraums, in dem die Zellen mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  überspült wurden, zu keiner wesentlichen Säurebeladung der Vesikel gekommen war. Es ist also davon auszugehen, dass vor allem methodische Unterschiede zu den verschiedenen bestimmten pH-Werten geführt haben. Nichtsdestotrotz konnten beide Methoden eine signifikante Veränderung des vesikulären pH-Wertes durch den *Knock-down* von *CAPS1* zeigen. Um zu untersuchen ob die beobachteten Veränderungen des vesikulären pH-Wertes auf Veränderungen des inneren pH-Wertes der Zelle zurückzuführen sind, wurden erneut pH-Titrationsexperimente mit zytosolisch lokalisiertem GFP als intrinsischen pH-Indikator durchgeführt (**Abb. 4.15**). Dabei wurde kein Einfluss des *Knock-downs* von *CAPS1* auf den zytosolischen pH-Wert gefunden. Der im Zytosol von dendritischen Regionen bestimmte pH-Wert ergab dabei ähnliche Werte wie die Messung des zytosolischen pH-Wertes in hippokampalen Neuronen mit Hilfe des pH-Indikators BCECF (**Svichar et al., 2011**). Lediglich am Soma wurde ein

geringfügig saurerer pH-Wert gemessen. Dies lässt sich damit begründen, dass besonders am Soma ein Teil der gemessenen Fluoreszenz von GFP aus dem Golgi-Apparat oder endoplasmatischen Retikulum stammen könnte, welche einen saureren pH-Wert als das Zytosol aufweisen (**Wu et al., 2001**). Der spezifische Effekt des CAPS1-*Knock-downs* auf den vesikulären pH-Wert, deutet auf eine neue, bisher noch nicht beschriebene Funktion von CAPS1 in der Reifung sekretorischer Granula hin. Dabei könnte dieser Sachverhalt eine Erklärung für die in Chromaffinzellen von CAPS1-*Knock-out*-Tieren beobachtete, reduzierte Beladung sekretorischer Granula mit Monoaminen / Catecholaminen geben (**Speidel et al., 2005, Brunk et al., 2009**). Da vesikuläre Monoamintransporter (vMAT) den durch die v-Typ-ATPase bereitgestellten Protonengradienten nutzen, um Monoamine vom Zytosol in sekretorische Granula zu transportieren (**Henry et al., 1994**), könnte eine Erhöhung des vesikulären pH-Wertes in diesen Zellen aus CAPS1-*Knock-out*-Tieren zu einer verringerten Beladung der Vesikel mit Monoaminen geführt haben.

Die pH-Wertveränderung sekretorischer Granula in CAPS1-*Knock-down* Zellen deutet darauf hin, dass CAPS1 an der Regulation des sekretorischen pH-Wertes entweder direkt oder indirekt beteiligt ist. Die direkte Regulation des pH-Wertes setzt jedoch eine Interaktion von CAPS1 mit der v-Typ-ATPase voraus. Da für synaptischen Vesikeln bereits mehrere Interaktionen der  $V_0$ -Untereinheit der v-Typ-ATPase mit Exozytose-relevanten SNARE-Proteinen gezeigt wurden (**Galli et al., 1996; Di Giovanni et al., 2010**), könnten potentiell auch *Priming*-Faktoren wie CAPS1 eine solche Interaktion aufweisen. Um dies zu überprüfen, wurden FRET-Experimente nach König und Kollegen (**König et al., 2006**) durchgeführt (siehe 4.6). Dabei wurde mit Hilfe von Primär- und Cy2- bzw. Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern ein FRET-Signal zwischen CAPS1 und der v-Typ-ATPase bestimmt (**Abb. 4.16 B**). FRET zwischen zwei Fluorophoren ist abhängig von deren räumlicher Nähe zueinander und nimmt mit zunehmender Entfernung drastisch ab. Dabei gibt der Försterradius den Abstand zweier Fluorophore an, bei dem noch 50 % des Energietransfers beobachtet werden kann. Da der Försterradius für das FRET-Paar Cy2-Cy3 5-6 nm beträgt (**Zhao et al., 2010**), deutet das Ergebnis der FRET-Messungen auf den ersten Blick auf eine Räumliche Nähe von CAPS1 und der v-Typ-ATPase hin. Da jedoch die Verwendung von Primär- und Sekundärantikörpern die Größe des am FRET beteiligten Gesamtkomplexes ausweitet, ist es möglich, dass die beobachtet FRET-Signale nicht auf

Grund einer direkten Interaktion zu Stande kamen. Es ist bekannt, dass CAPS1 über eine C-terminale Domänen an sekretorische Granula assoziieren kann (**Grishanin et al., 2002**). Daher ist denkbar, dass nicht die an bzw. in der Vesikelmembran sitzenden Proteine CAPS1 und v-Typ-ATPase, jedoch die an sie gebunden, Cy2- und Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern in ausreichend räumlicher Nähe waren, um ein FRET Signal zu erzeugen. Letztendlich ist mit diesem experimentellen Ansatz auch nicht auszuschließen, dass die Primärantikörper untereinander unspezifische Bindungen zueinander aufgewiesen haben könnten. Deshalb sind, um eine Interaktion von CAPS1 und der v-Typ-ATPase definitiv nachweisen zu können, weitere Experimente wie Koimmunpräzipitationsstudien oder *Pulldown*-Versuche notwendig.

Da Veränderungen des intravesikulären pH-Werts potentiell die Häufigkeit von Vesikelfusionsereignissen und die Menge der Ausschüttung sekretorischer Proteine beeinflusst haben könnte (**Poea-Guyon et al., 2013**), wurden Untersuchungen des Einfluss des pH-Wertes auf die Exozytose BDNF-GFP-beinhaltender Vesikel mit Hilfe von Bafilomycin und  $\text{NH}_4\text{Cl}$  durchgeführt (**Abb. 4.17**). Es konnte dabei gezeigt werden, dass unter pH-neutralisierenden Bedingungen der Einfluss des CAPS1-*Knock-downs* auf die Häufigkeit von Fusionsereignissen sowie die Ausschüttung von BDNF-GFP aus einzelnen Vesikeln erhalten blieb. Die Applikation von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  führte zwar anders als die Applikation von Bafilomycin zu einer drastischen Reduktion der Häufigkeit von Fusionsereignissen bereits unter Kontrollbedingungen. Jedoch wurde die Anzahl an Fusionsereignissen nach *Knock-down* von CAPS1 noch wesentlich stärker herabgesetzt als unter Kontrollbedingungen. Dies deutet auf einen Einfluss der  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Applikation auf die Fusion von Vesikeln an sich hin. Einen ähnlichen konträren Einfluss von Bafilomycin und Ammoniumchlorid auf die Sekretion wurde bereit in einer anderen Studie beschrieben (**Poea-Guyon et al., 2013**). Die Autoren gingen hier davon aus, dass eine Erhöhung des vesikulären pH-Wertes eine Konformationsänderung der  $V_0$ -Untereinheit der v-Typ-ATPase bewirkt. Dabei soll eine für die Exozytose von Vesikeln essentielle Interaktion der v-Typ-ATPase mit den SNARE-Proteinen gestört werden. Da Bafilomycin jedoch direkt an der v-Typ-ATPase bindet, soll unabhängig vom intravesikulären pH-Wert die Exozytose-fördernde Konformation stabilisiert worden sein. Ein andere mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre aber auch, dass der intravesikuläre pH-Wert keinen Effekt auf die

Exozytose hat, jedoch durch die Applikation von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  die Anwesenheit von  $\text{NH}_3$  im Zytosol der Zellen, und die damit verbundene Veränderung des pH-Wertes im Zytosol, die Funktion der zytosolisch exponierten Exozytose-relevanten Proteine negativ beeinflusst haben könnte.

Neben der Häufigkeit von Fusionsereignissen war auch die Menge des ausgeschütteten BDNF-GFP aus einzelnen Vesikeln unter pH-neutralisierenden Bedingungen durch Applikation von Bafilomycin oder  $\text{NH}_4\text{Cl}$  nach *Knock-down* von CAPS1 reduziert (**Abb. 4.18**). Somit konnte die akute Neutralisation des vesikulären pH-Wertes nicht die Defizite in der Ausschüttung aus einzelnen Vesikeln, die bereits unter nicht-pH-neutralisierenden Bedingungen beobachtet wurden (siehe **Abb. 4.10 D** und **Abb. 4.11 C**), ausgleichen. Dies spricht dafür, dass die Veränderung des vesikulären pH-Wertes in CAPS1-*Knock-down* Zellen nicht direkt ursächlich für die Defizite in der Ausschüttung von BDNF-GFP aus sekretorischen Granula in CAPS1-*Knock-down*-Zellen verantwortlich ist. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass Langzeit-Effekte des veränderten pH-Wertes einen indirekten Einfluss auf Menge des ausgeschütteten BDNF-GFPs hatten. So ist es möglich, dass die physiologische Prozessierung von BDNF-GFP durch den veränderten pH-Wert beeinflusst wurde. Da für die Prozessierung von pro-BDNF zu maturem BDNF durch pro-Proteinkonvertasen der saure pH-Wert sekretorischer Vesikel eine wichtige Rolle spielt (**Zhou et al., 1999, Lessmann & Brigadski, 2009**), ist es denkbar, dass im Fall des CAPS1-*Knock-downs* durch die Neutralisation des vesikulären pH-Wertes vermehrt pro-BDNF in den Vesikeln akkumuliert. Pro-BDNF ist größer als matures BDNF und kann durch die Anwesenheit der pro-Domäne potentiell mehr Wechselwirkungen mit anderen Proteinen der Vesikelmatrix eingehen als matures BDNF. Da die Größe und Wechselwirkungen sekretierter Proteine die Sekretionsrate verändern (**Barg et al., 2002; Taraska et al., 2003; Brigadski et al., 2005; de Wit et al., 2009**), könnte somit die Verringerung der BDNF-GFP-Ausschüttung unter CAPS1-*Knock-down*-Bedingungen erklärt werden. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die akute Neutralisation des vesikulären pH-Wertes die CAPS1-abhängigen Defizite in der Fusion einzelner Vesikel wie auch der Ausschüttung von BDNF-GFP aus einzelnen Vesikeln nicht auszugleichen vermochte. Damit stellte die Erhöhung des vesikulären pH-Wertes nach CAPS1-*Knock-down* keine direkte Ursache für die verminderte Exozytoseleistung in CAPS1-shRNA-transfizierten Zellen dar.

### 5.3 Ausschüttung von BDNF aus Zellen transgenen Ursprungs

Neben der Untersuchung des Einfluss von CAPS1 auf die Ausschüttung von Neurotrophinen, wurde auch die Ausschüttung von BDNF in verschiedenen transgenen Mausmodellen untersucht. Dabei wurden zunächst neuronal differenzierte, embryonale Stammzellen untersucht, die einen *Knock-in* von BDNF in den Rosa26 Locus aufwiesen (4.9.1). Diese Zellen waren in morphologischen und elektrophysiologischen Parametern primären neuronalen Zellkulturen sehr ähnlich (Leschik et al., 2013). Obwohl in diesen Zellen die Fluoreszenzintensität BDNF-GFP-beinhaltennder sekretorischer Granula wesentlich geringer war als die von BDNF-GFP-transfizierten Neuronen, konnten auch hier mit Hilfe von Bromphenolblau Einzelvesikelfusionsereignisse beobachtet werden (Abb. 4.20). Auch die Ausschüttung von BDNF-GFP aus einzelnen sekretorischen Granula konnte visualisiert werden (Abb. 4.21). Somit stellt dieses Zellmodell eine neue, bisher noch nicht beschriebene Methode dar, die Ausschüttung von BDNF-GFP in sich neuronal differenzierenden Neuronen zu untersuchen. BDNF-GFP-exprimierende embryonale Stammzellen sind somit ein interessantes Untersuchungsobjekt für Zelltransplantations- und Zelldifferenzierungsstudien. Dabei könnte die Lokalisation oder biologische Wirkung des ausgeschütteten BDNFs aus diesen Stammzellen oder davon abgeleiteten Zellen *in vivo* untersucht werden.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde jedoch auch die Funktionalität der BDNF-GFP-Ausschüttung sekretorischer Granula aus primären hippocampalen Neuronen von homozygoten und heterozygoten BDNF-GFP-*Knock-in*-Tieren charakterisiert (4.9.2). Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen embryonalen Stammzellen mit BDNF-GFP-*Knock-in* in den Rosa26-Lokus, wurde hier BDNF-GFP in den endogenen BDNF-Lokus eingefügt. Dadurch sollte die Expression von BDNF-GFP auf dem physiologischen Expressionsniveau gewährleistet werden und somit potentielle Artefakte der Überexpression (Falschlokalisierung, erhöhte Anzahl der sekretorischen Granula) von BDNF-GFP in transfizierten hippocampalen Neuronen umgangen werden. Insgesamt hatten Neurone von BDNF-GFP-*Knock-In*-Mäusen ein ähnliches Verteilungsmuster von BDNF-GFP wie BDNF-GFP-transfizierte Neurone. Es waren keine Veränderungen in der Dichte und der Verteilung einzelner sekretorischer Granula zu erkennen, jedoch war die Fluoreszenzintensität einzelner BDNF-GFP-beinhaltennder Vesikel in hippocampalen Neuronen von BDNF-GFP-

*Knock-in*-Tieren wesentlich geringer. Ungeachtet dessen konnten auch in hippokampalen Neuronen von homozygoten und heterozygoten BDNF-GFP-*Knock-in*-Tieren Vesikelfusionsereignisse sekretorischer Granula in Anwesenheit von Bromphenolblau (**Abb. 4.23**) und die Ausschüttungskinetik von BDNF-GFP aus einzelnen Vesikeln (**Abb. 4.24**) gemessen werden. Dabei wiesen homozygote und heterozygote Bedingungen keine Unterschiede auf. Darüber hinaus waren die Häufigkeit von Fusionsereignissen und die Kinetik der BDNF-GFP-Ausschüttung aus einzelnen Vesikeln vergleichbar zu BDNF-GFP-transfizierten hippokampalen Neuronen. Das transgene BDNF-GFP-Mausmodell stellt somit eine innovative Möglichkeit dar, die Lokalisation und die Ausschüttung von BDNF unter physiologischen Expressionsbedingungen zu untersuchen.

Neben transgenen Zellen, die durch einen *Knock-in* von BDNF-GFP genetisch modifiziert waren, wurde auch die Ausschüttung von BDNF aus BDNF-GFP-transfizierten hippokampalen Neuronen von transgenen 5xFAD Mäusen untersucht (**4.9.3**). Dieses Alzheimermausmodell exprimiert mutiertes Amyloid-*Precursor* Protein und Presenilin1 unter dem Thy1 Promotor und führt auch in jungen Tieren bereits zum Alzheimerphänotyp (**Oakley et al., 2006**). Im Vergleich zu Wildtyp-Neuronen wurden jedoch keine Veränderungen in der Anzahl von Fusionsereignissen oder der Kinetik der Ausschüttung von BDNF-GFP festgestellt (**Abb. 4.25**). Dies deutet darauf hin, dass die in diesen Tieren Alzheimer-verursachenden Mechanismen keinen Einfluss auf die Ausschüttung von BDNF-GFP hatten. Da für die Kultivierung primärer hippokampaler Neurone relativ junge Tiere (P1-P3) verwendet werden mussten und diese bereits nach 11-13 d in Kultur vermessen wurden, könnte die kurze Inkubationszeit für das Ausbleiben mögliche Defizite in der Ausschüttung von BDNF-GFP induziert durch den Alzheimerphänotyp verantwortlich sein. Zusammenfassend wurde jedoch keine Abhängigkeit der BDNF-GFP-Sekretion von den Faktoren im 5xFAD Mausmodell gefunden, die die Alzheimerkrankheit begünstigen.

## 6 Zusammenfassung

Das Neurotrophin BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) ist ein wichtiger Regulator für eine Vielzahl von Funktionen im Gehirn, wie die neuronale Entwicklung und die synaptische Plastizität. BDNF wird in sekretorischen Granula der Zelle verpackt, transportiert und aktivitätsabhängig ausgeschüttet. Die molekularen Mechanismen aktivitätsabhängiger, neuronaler Ausschüttungsprozesse wurden vor allem an der Exozytose synaptischer Vesikel untersucht, jedoch sind die molekularen Mechanismen der Exozytose sekretorischer Granula in Neuronen noch weitgehend unverstanden.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Funktion des Exozytose-relevanten *Priming*-Faktors CAPS1 (*Calcium-dependent activator protein for secretion*) während der Ausschüttung von BDNF aus primären hippocampalen Neuronen der Maus untersucht. CAPS1 war hauptsächlich im Zytosol des Somas und der Dendriten lokalisiert, konnte jedoch auch kolokalisiert mit präsynaptischen Boutons des Axons gefunden werden. Mittels RNA-Interferenz-auslösenden shRNA-Plasmiden konnte die Expression von CAPS1 erfolgreich herunterreguliert werden. Anschließend wurden die Konsequenzen dieses *Knock-downs* von CAPS1 sowohl auf die Ausschüttung von synaptischen Vesikeln, als auch die Ausschüttung von Neurotrophinen untersucht. Mit Hilfe der FM-Entfärbetechnik konnte dabei eine signifikante Reduktion der Ausschüttung von Neurotransmittern aus synaptischen Boutons von CAPS1-shRNA-transfizierten Neuronen beobachtet werden. Die Ausschüttung von Neurotrophinen wurde mit Hilfe von für BDNF-GFP-kodierenden Plasmiden untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl die Anzahl an Vesikelfusionsereignissen, als auch die Ausschüttung von BDNF-GFP aus einzelnen Vesikeln nach *Knock-down* von CAPS1 signifikant reduziert war. Diese Defizite traten unabhängig von der bereits beobachteten Reduktion der Neurotransmitterausschüttung auf, da Experimente in Anwesenheit synaptischer Blocker ein ähnliches Ergebnis lieferten. Interessanterweise zeigte die Kinetik der BDNF-GFP-Ausschüttung aus einzelnen sekretorischen Granula in CAPS1-shRNA-transfizierten Zellen einen signifikant geringeren transienten Anstieg der pH-sensitiven GFP-Fluoreszenz, der durch die Neutralisation des vesikulären pH-Wertes nach Fusionsporenöffnung induziert wurde. Dies deutete auf einen veränderten pH-Wert der fusionierenden sekretorischen Granula in CAPS1-*Knock-down*-

Zellen hin. Der pH-Wert sekretorischer Granula wurde daher durch zwei Messmethoden bestimmt und eine signifikante Erhöhung des intravesikulären pH-Wertes sekretorischer Granula in CAPS1-shRNA-transfizierten Zellen beobachtet. Dabei blieb jedoch der zytosolische pH-Wert am Soma und in Dendriten nach *Knock-down* von CAPS1 unverändert. Um einen möglichen Einfluss des nach CAPS1 *Knock-down* veränderten vesikulären pH-Wertes auf die Fusion von Vesikeln und die Ausschüttung von BDNF-GFP aus einzelnen Vesikeln zu untersuchen, wurden die entsprechenden Experimente unter Bedingungen wiederholt, bei denen der vesikuläre pH-Wert akut vor der Stimulation der Exozytose neutralisiert wurde. Auch hier zeigte der *Knock-down* von CAPS1 ähnliche Defizite wie unter nicht-pH-neutralisierenden Bedingungen, weshalb ein möglicher Einfluss des nach *Knock-down* von CAPS1 veränderten pH-Wertes auf die Exozytose von sekretorischen Granula nicht bestätigt werden konnte.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass CAPS1 ein wichtiger Faktor sowohl für die Exozytose Neurotransmitter-beinhaltenender synaptischer Vesikel als auch die Exozytose Neurotrophin-beinhaltenender sekretorischer Granula ist. Jedoch scheint CAPS1 zusätzlich eine bisher noch nicht beschriebene Funktion in der Regulation des pH-Wertes sekretorischer Granula zu haben. Der Einfluss von CAPS1 auf den vesikulären pH-Wertes sekretorischer Granula könnte eine Erklärung für die in Chromaffinzellen beobachteten Catecholaminen- bzw. Monoaminen-Beladungsdefizite in CAPS1-*Knock-out* Tieren geben.

## 7 Abstract

The neurotrophin brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is an important regulator of a variety of brain functions including neuronal development and synaptic plasticity. The protein is stored in secretory granules and released in an activity-dependent manner. The molecular mechanisms of activity-dependent neuronal secretion processes were mainly investigated for the exocytosis of synaptic vesicles. However, the molecular mechanisms of secretory granule exocytosis in neurons remained largely elusive.

In the present study the function of exocytosis-relevant priming factor CAPS1 (*Calcium-dependent activator protein for secretion*) on different types of secretion processes were investigated in primary hippocampal neurons from mice. CAPS1 was mainly localized in the cytosol of soma and dendrites but could also be found in pre-synaptic boutons of the axon. The expression of CAPS1 was successfully reduced by RNA interference using a CAPS1-shRNA plasmid. Thereafter, the consequences of CAPS1 knockdown on either the exocytosis of synaptic vesicles or the secretion of neurotrophins were monitored. A significant reduction of neurotransmitter release from pre-synaptic boutons was observed in CAPS1-shRNA transfected neurons using FM-destaining technique. The secretion of neurotrophins was monitored using BDNF-GFP expressing plasmids. Thereby, a significant reduction of the incidence of vesicle fusion events as well as the release of BDNF-GFP from single secretory granules could be measured in CAPS1 knockdown cells. These deficits occurred independently of CAPS1 knockdown-induced reduction in neurotransmission as experiments in the presence of synaptic blockers revealed the same results. Interestingly, the kinetics of BDNF-GFP release from single secretory granules of CAPS1-shRNA transfected neurons showed a significant reduction in the transient increase of pH-sensitive GFP fluorescence after the neutralization of vesicular pH by fusion pore opening. This effect indicated a changed pH value of secretory granules under CAPS1 knockdown conditions. The pH value of secretory granules was then measured using two different methods and a significant increase of vesicular pH in secretory granules could be observed after CAPS1 knockdown. However, cytosolic pH of somatic and dendritic regions was unaffected by CAPS1 knockdown. To investigate a potential influence of the CAPS1 knockdown-induced change in vesicular pH value on vesicle fusion and release of BDNF-GFP from single

secretory granules, experiments were repeated under conditions where the vesicular pH was acutely neutralized before stimulation. Again, CAPS1 knockdown caused similar deficits as observed under non-pH-neutralizing conditions. Therefore a potential direct influence of CAPS1 knockdown-induced change in vesicular pH value on exocytosis of secretory granules could be ruled out.

The results of the present study show that CAPS1 is an important factor for the exocytosis of neurotransmitter-containing synaptic vesicles as well as neurotrophin-containing secretory granules. However, CAPS1 has a previously unrecognized function in regulating vesicular pH of secretory granules. Thereby CAPS1 appears to act already upstream of vesicle exocytosis. This new function of CAPS1 can potentially explain observations in chromaffin cells of CAPS1 knockout animals where loading of secretory granules with catecholamines and monoamines were impaired.

## 8 Literatur

Aicardi,G., Argilli,E., Cappello,S., Santi,S., Riccio,M., Thoenen,H. & Canossa,M. (2004) Induction of long-term potentiation and depression is reflected by corresponding changes in secretion of endogenous brain-derived neurotrophic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 15788-15792.

Aid,T., Kazantseva,A., Piirsoo,M., Palm,K. & Timmusk,T. (2007) Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *Journal of Neuroscience Research*, **85**, 525-535.

Ann,K., Kowalchuk,J.A., Loyet,K.M. & Martin,T.F.J. (1997) Novel Ca<sup>2+</sup>-binding protein (CAPS) related to UNC-31 required for Ca<sup>2+</sup>-activated exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 19637-19640.

Aoki,C., Wu,K., Elste,A., Len,G.W., Lin,S.Y., McAuliffe,G. & Black,I.B. (2000) Localization of brain-derived neurotrophic factor and TrkB receptors to postsynaptic densities of adult rat cerebral cortex. *Journal of Neuroscience Research*, **59**, 454-463.

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

Avery,L., Bargmann,C.I. & Horvitz,H.R. (1993) The *Caenorhabditis elegans* unc-31 gene affects multiple nervous system-controlled functions. *Genetics*, **134**, 455-464.

Bai,J.H., Wang,C.T., Richards,D.A., Jackson,M.B. & Chapman,E.R. (2004) Fusion pore dynamics are regulated by synaptotagmin center dot t-SNARE interactions. *Neuron*, **41**, 929-942.

Balkowiec,A. & Katz,D.M. (2000) Activity-dependent release of endogenous brain-derived neurotrophic factor from primary sensory neurons detected by ELISA in situ. *Journal of Neuroscience*, **20**, 7417-7423.

Barbacid,M. (1995) Neurotrophic Factors and Their Receptors. *Current Opinion in Cell Biology*, **7**, 148-155.

Barg,S., Olofsson,C.S., Schriever-Abeln,J., Wendt,A., Gebre-Medhin,S., Renstrom,E. & Rorsman,P. (2002) Delay between fusion pore opening and peptide release from large dense-core vesicles in neuroendocrine cells. *Neuron*, **33**, 287-299.

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

Bekinschtein,P., Cammarota,M., Katze,C., Slipczuk,L., Rossato,J.I., Goldin,A., Lzquierdo,I. & Medina,J.H. (2008) BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 2711-2716.

Berwin,B., Floor,E. & Martin,T.F.J. (1998) CAPS (mammalian UNC-31) protein localizes to membranes involved in dense-core vesicle exocytosis. *Neuron*, **21**, 137-145.

- Betz,A., Okamoto,M., Benseler,F. & Brose,N. (1997) Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 2520-2526.
- Betz,W.J. & Bewick,G.S. (1993) Optical monitoring of transmitter release and synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *Journal of Physiology*, **460**, 287-309.
- Betz,W.J., Henkel,A. & Smith,C. (1995) Optical Monitoring of Transmitter Release and Synaptic Vesicle Recycling with Fluorescent Dyes. *Journal of Neurochemistry*, **65**, S137.
- Beyenbach,K.W. & Wieczorek,H. (2006) The V-type H<sup>+</sup> ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *Journal of Experimental Biology*, **209**, 577-589.
- Binda,A.V., Kabbani,N. & Levenson,R. (2005) Regulation of dense core vesicle release from PC12 cells by interaction between the D2 dopamine receptor and calcium-dependent activator protein for secretion (CAPS). *Biochemical Pharmacology*, **69**, 1451-1461.
- Bliss,T.V. & Lomo,T. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *Journal of Physiology*, **232**, 331-356.
- Boron,W.F. & De Weer,P. (1976) Intracellular pH Transients in Squid Giant Axons Caused by CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, and Metabolic Inhibitors. *Journal of general physiology*, **67**, 91-112.
- Bothwell,M. (1995) Functional Interactions of Neurotrophins and Neurotrophin Receptors. *Annual Review of Neuroscience*, **18**, 223-253.
- Brigadski,T., Hartmann,M. & Lessmann,V. (2005) Differential vesicular targeting and time course of synaptic secretion of the mammalian neurotrophins. *Journal of Neuroscience*, **25**, 7601-7614.
- Brigadski,T. & Lessmann,V. (2014) BDNF: a regulator of learning and memory processes with clinical potential. *e-Neuroforum*, **5**, 1-11.
- Brose,N., Petrenko,A.G., Südhof,T.C. & Jahn,R. (1992) Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science*, **256**, 1021-1025.
- Brunk,I., Blex,C., Speidel,D., Brose,N. & Ahnert-Hilger,G. (2009) Ca<sup>2+</sup>-dependent Activator Proteins of Secretion Promote Vesicular Monoamine Uptake. *Journal of Biological Chemistry*, **284**, 1050-1056.
- Burkhardt,P., Hattendorf,D.A., Weis,W.I. & Fasshauer,D. (2008) Munc18a controls SNARE assembly through its interaction with the syntaxin N-peptid. *Embo Journal*, **27**, 923-933.
- Cai,H.J., Reim,K., Varoqueaux,F., Tapechum,S., Hill,K., Sorensen,J.B., Brose,N. & Chow,R.H. (2008) Complexin II plays a positive role in Ca<sup>2+</sup>-triggered exocytosis by facilitating vesicle priming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 19538-19543.
- Canossa,M., Griesbeck,O., Berninger,B., Campana,G., Kolbeck,R. & Thoenen,H. (1997) Neurotrophin release by neurotrophins: Implications for activity-dependent neuronal plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 13279-13286.
- Caroni,P. (1997) Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice. *Journal of Neuroscience Methods*, **71**, 3-9.
- Chen,X.C., Tomchick,D.R., Kovrigin,E., Arac,D., Machius,M., Südhof,T.C. & Rizo,J. (2002) Three-dimensional structure of the complexin/SNARE complex. *Neuron*, **33**, 397-409.

- Chen,Z.Y., Ieraci,A., Teng,H., Dall,H., Meng,C.X., Herrera,D.G., Nykjaer,A., Hempstead,B.L. & Lee,F.S. (2005) Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *Journal of Neuroscience*, **25**, 6156-6166.
- Chiaruttini,C., Sonogo,M., Baj,G., Simonato,M. & Tongiorgi,E. (2008) BDNF mRNA splice variants display activity-dependent targeting to distinct hippocampal laminae. *Molecular and Cellular Neuroscience*, **37**, 11-19.
- Chiaruttini,C., Vicario,A., Li,Z., Baj,G., Braiuca,P., Wu,Y., Lee,F.S., Gardossi,L., Baraban,J.M. & Tongiorgi,E. (2009) Dendritic trafficking of BDNF mRNA is mediated by translin and blocked by the G196A (Val66Met) mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 16481-16486.
- Christensen,M., Larsen,L.A., Kauppinen,S. & Schratt,G. (2010) Recombinant adeno-associated virus-mediated microRNA delivery into the postnatal mouse brain reveals a role for miR-134 in dendritogenesis in vivo. *Frontiers in Neural Circuits*, **3**.
- Cohen,L.D., Zuchman,R., Sorokina,O., Muller,A., Dieterich,D.C., Armstrong,J.D., Ziv,T. & Ziv,N.E. (2013) Metabolic Turnover of Synaptic Proteins: Kinetics, Interdependencies and Implications for Synaptic Maintenance. *Plos One*, **8**.
- Conner,J.M., Lauterborn,J.C., Yan,Q., Gall,C.M. & Varon,S. (1997) Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: Evidence for anterograde axonal transport. *Journal of Neuroscience*, **17**, 2295-2313.
- Daily,N.J., Boswell,K.L., James,D.J. & Martin,T.F.J. (2010) Novel Interactions of CAPS (Ca<sup>2+</sup>-dependent Activator Protein for Secretion) with the Three Neuronal SNARE Proteins Required for Vesicle Fusion. *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 35320-35329.
- Dawidowski,D. & Cafiso,D.S. (2013) Allosteric Control of Syntaxin 1a by Munc18-1: Characterization of the Open and Closed Conformations of Syntaxin. *Biophysical Journal*, **104**, 1585-1594.
- de Wit,J., Toonen,R.F. & Verhage,M. (2009) Matrix-Dependent Local Retention of Secretory Vesicle Cargo in Cortical Neurons. *Journal of Neuroscience*, **29**, 23-37.
- Dean,C., Liu,H.S., Dunning,F.M., Chang,P.Y., Jackson,M.B. & Chapman,E.R. (2009) Synaptotagmin-IV modulates synaptic function and long-term potentiation by regulating BDNF release. *Nature Neuroscience*, **12**, 767-2315.
- Di Giovanni,J., Boudkkazi,S., Mochida,S., Bialowas,A., Samari,N., Leveque,C., Youssef,F., Brechet,A., Iborra,C., Maulet,Y., Moutot,N., Debanne,D., Seagar,M. & El Far,O. (2010) V-ATPase Membrane Sector Associates with Synaptobrevin to Modulate Neurotransmitter Release. *Neuron*, **67**, 268-279.
- Dieni,S., Matsumoto,T., Dekkers,M., Rauskolb,S., Ionescu,M.S., Deogracias,R., Gundelfinger,E.D., Kojima,M., Nestel,S., Frotscher,M. & Barde,Y.A. (2012) BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *Journal of Cell Biology*, **196**, 775-788.
- Dugich-Djordjevic,M.M., Peterson,C., Isono,F., Ohsawa,F., Widmer,H.R., Denton,T.L., Bennett,G.L. & Hefti,F. (1995) Immunohistochemical Visualization of Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Rat-Brain. *European Journal of Neuroscience*, **7**, 1831-1839.
- Dulubova,I., Sugita,S., Hill,S., Hosaka,M., Fernandez,I., Sudhof,T.C. & Rizo,J. (1999) A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *Embo Journal*, **18**, 4372-4382.
- Eberhard,D.A., Cooper,C.L., Low,M.G. & Holz,R.W. (1990) Evidence that the inositol phospholipids are necessary for exocytosis. Loss of inositol phospholipids and inhibition of secretion in permeabilized cells caused by a bacterial phospholipase C and removal of ATP. *Biochemical Journal*, **268**, 15-25.

- Edelmann,E., Lessmann,V. & Brigadski,T. (2014) Pre- and postsynaptic twists in BDNF secretion and action in synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, **76**, 610-627.
- Egan,M.F., Kojima,M., Callicott,J.H., Goldberg,T.E., Kolachana,B.S., Bertolino,A., Zaitsev,E., Gold,B., Goldman,D., Dean,M., Lu,B. & Weinberger,D.R. (2003) The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell*, **112**, 257-269.
- Ernfors,P., Ibáñez,C.F., Ebendal,T., Olson,L. & Persson,H. (1990) Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor: developmental and topographical expression in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**, 5454-5458.
- Farina,M., van de Bospoort,R., He,E.Q., Persoon,C.M., van Weering,J.R.T., Broeke,J.H., Verhage,M. & Toonen,R.F. (2015) CAPS-1 promotes fusion competence of stationary dense-core vesicles in presynaptic terminals of mammalian neurons. *Elife*, **4**.
- Figurov,A., PozzoMiller,L.D., Olafsson,P., Wang,T. & Lu,B. (1996) Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature*, **381**, 706-709.
- Fujita,Y., Xu,A.N., Xie,L., Arunachalam,L., Chou,T.C., Jiang,T.D., Chiew,S.K., Kourtesis,J., Wang,L., Gaisano,H.Y. & Sugita,S. (2007) Ca<sup>2+</sup>-dependent activator protein for secretion 1 is critical for constitutive and regulated exocytosis but not for loading of transmitters into dense core vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 21392-21403.
- Galli,T., McPherson,P.S. & DeCamilli,P. (1996) The V-o sector of the V-ATPase, synaptobrevin, and synaptophysin are associated on synaptic vesicles in a triton X-100-resistant, freeze-thawing sensitive, complex. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 2193-2198.
- Garofalo,L., Ribeiro-da-Silva,A. & Cuello,A.C. (1992) Nerve growth factor-induced synaptogenesis and hypertrophy of cortical cholinergic terminals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 2639-2643.
- Grishanin,R.N., Klenchin,V.A., Loyet,K.M., Kowalchuk,J.A., Ann,K. & Martin,T.F.J. (2002) Membrane association domains in Ca<sup>2+</sup>-dependent activator protein for secretion mediate plasma membrane and dense-core vesicle binding required for Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 22025-22034.
- Grishanin,R.N., Kowalchuk,J.A., Klenchin,V.A., Kyoungsook,A., Earles,C.A., Chapman,E.R., Gerona,R.R.L. & Martin,T.F.J. (2004) CAPS acts at a pre-fusion step in dense-core vesicle exocytosis as a PIP<sub>2</sub> binding protein. *Neuron*, **43**, 551-562.
- Halban,P.A. & Irminger,J.C. (1994) Sorting and Processing of Secretory Proteins. *Biochemical Journal*, **299**, 1-18.
- Hartmann,M., Heumann,R. & Lessmann,V. (2001) Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *Embo Journal*, **20**, 5887-5897.
- Haubensak,W., Narz,F., Heumann,R. & Lessmann,V. (1998) BDNF-GFP containing secretory granules are localized in the vicinity of synaptic junctions of cultured cortical neurons. *Journal of Cell Science*, **111**, 1483-1493.
- Hay,J.C., Fiset,P.L., Jenkins,G.H., Fukami,K., Takenawa,T., Anderson,R.A. & Martin,T.F.J. (1995) Atp-Dependent Inositide Phosphorylation Required for Ca<sup>2+</sup>-Activated Secretion. *Nature*, **374**, 173-177.
- Heldt,S.A., Stanek,L., Chhatwal,J.P. & Ressler,K.J. (2007) Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Molecular Psychiatry*, **12**, 656-670.

- Henry, J.P., Botton, D., Sagne, C., Isambert, M.F., Desnos, C., Blanchard, V., Raismanvozari, R., Krejci, E., Massoulie, J. & Gasnier, B. (1994) Biochemistry and Molecular-Biology of the Vesicular Monoamine Transporter from Chromaffin Granules. *Journal of Experimental Biology*, **196**, 251-262.
- Hofer, M., Pagliusi, S.R., Hohn, A., Leibrock, J. & Barde, Y.A. (1990) Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *Embo Journal*, **9**, 2459-2464.
- Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F. & Lacey, E. (1994) Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Huang, E.J. & Reichardt, L.F. (2003) Trk receptors: Roles in neuronal signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, **72**, 609-642.
- Ibanez, C.F. (1994) Structure-Function-Relationships in the Neurotrophin Family. *Journal of Neurobiology*, **25**, 1349-1361.
- Jahn, R. & Scheller, R.H. (2006) SNAREs - engines for membrane fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **7**, 631-643.
- James, D.J., Kowalchuk, J., Daily, N., Petrie, M. & Martin, T.F.J. (2009) CAPS drives trans-SNARE complex formation and membrane fusion through syntaxin interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 17308-17313.
- Jockusch, W.J., Speidel, D., Sigler, A., Sorensen, J.B., Varoqueaux, F., Rhee, J.S. & Brose, N. (2007) CAPS-1 and CAPS-2 are essential synaptic vesicle priming proteins. *Cell*, **131**, 796-808.
- Johnson, R.G. & Scarpa, A. (1976) Internal pH of isolated chromaffin vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, **251**, 2189-2191.
- Kabachinski, G., Yamaga, M., Kielar-Grevstad, D.M., Bruinsma, S. & Martin, T.F.J. (2014) CAPS and Munc13 utilize distinct PIP2-linked mechanisms to promote vesicle exocytosis. *Molecular Biology of the Cell*, **25**, 508-521.
- Kellner, Y., Goedecke, N., Dierkes, T., Thieme, N., Zagrebelsky, M. & Korte, M. (2014) The BDNF effects on dendritic spines of mature hippocampal neurons depend on neuronal activity. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, **6**, 1-17.
- Klau, M., Hartmann, M., Erdmann, K.S., Heumann, R. & Lessmann, V. (2001) Reduced number of functional glutamatergic synapses in hippocampal neurons overexpressing full-length TrkB receptors. *Journal of Neuroscience Research*, **66**, 327-336.
- Klein, R., Lamballe, F., Bryant, S. & Barbacid, M. (1991) The trkb tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4. *Cell*, **66**, 395-403.
- Kneen, M., Farinas, J., Li, Y.X. & Verkman, A.S. (1998) Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator. *Biophysical Journal*, **74**, 1591-1599.
- Kolarow, R., Brigadski, T. & Lessmann, V. (2007) Postsynaptic secretion of BDNF and NT-3 from hippocampal neurons depends on calcium-calmodulin kinase II signaling and proceeds via delayed fusion pore opening. *Journal of Neuroscience*, **27**, 10350-10364.
- König, P., Krasteva, G., Tag, C., König, I.R., Arens, C. & Kummer, W. (2006) FRET-CLSM and double-labeling indirect immunofluorescence to detect close association of proteins in tissue sections. *Laboratory Investigation*, **86**, 853-864.
- Korsching, S. (1993) The neurotrophic factor concept: a reexamination. *Journal of Neuroscience*, **13**, 2739-2748.

- Korte,M., Griesbeck,O., Gravel,C., Carroll,P., Staiger,V., Thoenen,H. & Bonhoeffer,T. (1996) Virus-mediated gene transfer into hippocampal CA1 region restores long-term potentiation in brain-derived neurotrophic factor mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 12547-12552.
- Lee,R., Kermani,P., Teng,K.K. & Hempstead,B.L. (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, **294**, 1945-1948.
- Leschik,J., Eckenstaler,R., Nieweg,K., Lichtenecker,P., Brigadski,T., Gottmann,K., Lessmann,V. & Lutz,B. (2013) Embryonic stem cells stably expressing BDNF-GFP exhibit a BDNF-release-dependent enhancement of neuronal differentiation. *Journal of Cell Science*, **126**, 5062-5073.
- Lessmann,V. (1998) Neurotrophin-dependent modulation of glutamatergic synaptic transmission in the mammalian CNS. *General Pharmacology*, **31**, 667-674.
- Lessmann,V. & Brigadski,T. (2009) Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: An update. *Neuroscience Research*, **65**, 11-22.
- Lessmann,V. & Dietzel,I.D. (1995) 2 Kinetically Distinct 5-Hydroxytryptamine-Activated Cl<sup>-</sup> Conductances at Retzius P-Cell Synapses of the Medicinal Leech. *Journal of Neuroscience*, **15**, 1496-1505.
- Lessmann,V., Gottmann,K. & Malsangio,M. (2003) Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Progress in Neurobiology*, **69**, 341-374.
- 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.
- Lewin,G.R. & Barde,Y.A. (1996) Physiology of the neurotrophins. *Annual Review of Neuroscience*, **19**, 289-317.
- Lin,R.C. & Scheller,R.H. (2000) Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **16**, 19-49.
- Liu,Y.Y., Schirra,C., Stevens,D.R., Matti,U., Speidel,D., Hof,D., Bruns,D., Brose,N. & Rettig,J. (2008) CAPS facilitates filling of the rapidly releasable pool of large dense-core vesicles. *Journal of Neuroscience*, **28**, 5594-5601.
- Lohof,A.M., Ip,N.Y. & Poo,M.M. (1993) Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. *Nature*, **363**, 350-353.
- Lonze,B.E., Riccio,A., Cohen,S. & Ginty,D.D. (2002) Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB. *Neuron*, **34**, 371-385.
- Lou,H., Kim,S.K., Zaitsev,E., Snell,C.R., Lu,B. & Loh,Y.P. (2005) Sorting and activity-dependent secretion of BDNF require interaction of a specific motif with the sorting receptor carboxypeptidase E. *Neuron*, **45**, 245-255.
- Ma,C., Li,W., Xu,Y.B. & Rizo,J. (2011) Munc13 mediates the transition from the closed syntaxin-Munc18 complex to the SNARE complex. *Nature Structural & Molecular Biology*, **18**, 542-U206.
- Markus,A., Zhong,J. & Snider,W.D. (2002) Raf and akt mediate distinct aspects of sensory axon growth. *Neuron*, **35**, 65-76.
- Martin,T.F. (2012) Role of PI(4,5)P2 in Vesicle Exocytosis and Membrane Fusion. *Subcellular Biochemistry*, **59**, 111-130.

- Matsuda,N., Lu,H., Fukata,Y., Noritake,J., Gao,H.F., Mukherjee,S., Nemoto,T., Fukata,M. & Poo,M.M. (2009) Differential Activity-Dependent Secretion of Brain-Derived Neurotrophic Factor from Axon and Dendrite. *Journal of Neuroscience*, **29**, 14185-14198.
- Matsumoto,T., Rauskolb,S., Polack,M., Klose,J., Kolbeck,R., Korte,M. & Barde,Y.A. (2008) Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF. *Nature Neuroscience*, **11**, 131-133.
- Minichiello,L., Calella,A.M., Medina,D.L., Bonhoeffer,T., Klein,R. & Korte,M. (2002) Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron*, **36**, 121-137.
- Misura,K.M.S., Scheller,R.H. & Weis,W.I. (2000) Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. *Nature*, **404**, 355-362.
- Oakley,H., Cole,S.L., Logan,S., Maus,E., Shao,P., Craft,J., Guillozet-Bongaarts,A., Ohno,M., Disterhoft,J., Van Eldik,L., Berry,R. & Vassar,R. (2006) Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: Potential factors in amyloid plaque formation. *Journal of Neuroscience*, **26**, 10129-10140.
- Oheim,M. (2004) A deeper look into single-secretory vesicle dynamics. *Biophysical Journal*, **87**, 1403-1405.
- Pang,P.T., Teng,H.K., Zaitsev,E., Woo,N.T., Sakata,K., Zhen,S.H., Teng,K.K., Yung,W.H., Hempstead,B.L. & Lu,B. (2004) Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science*, **306**, 487-491.
- Parpura,V. & Mohideen,U. (2008) Molecular form follows function: (un)snaring the SNAREs. *Trends in Neurosciences*, **31**, 435-443.
- Parsaud,L., Li,L.J., Jung,C.H., Park,S., Saw,N.M.N., Park,S., Kim,M.Y. & Sugita,S. (2013) Calcium-dependent Activator Protein for Secretion 1 (CAPS1) Binds to Syntaxin-1 in a Distinct Mode from Munc13-1. *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 23050-23063.
- Patterson,G.H., Knobel,S.M., Sharif,W.D., Kain,S.R. & Piston,D.W. (1997) Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophysical Journal*, **73**, 2782-2790.
- Patterson,S.L., Abel,T., Deuel,T.A.S., Martin,K.C., Rose,J.C. & Kandel,E.R. (1996) Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron*, **16**, 1137-1145.
- Petzold,A., Psotta,L., Brigadski,T., Endres,T. & Lessmann,V. (2015) Chronic BDNF deficiency leads to an age-dependent impairment in spatial learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, **120**, 52-60.
- Poea-Guyon,S., Ammar,M.R., Erard,M., Amar,M., Moreau,A.W., Fossier,P., Gleize,V., Vitale,N. & Morel,N. (2013) The V-ATPase membrane domain is a sensor of granular pH that controls the exocytotic machinery. *Journal of Cell Biology*, **203**, 283-298.
- Porrero,C., Rubio-Garrido,P., Avendano,C. & Clasca,F. (2010) Mapping of fluorescent protein-expressing neurons and axon pathways in adult and developing Thy1-eYFP-H transgenic mice. *Brain Research*, **1345**, 59-72.
- Psotta,L., Lessmann,V. & Endres,T. (2013) Impaired fear extinction learning in adult heterozygous BDNF knock-out mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, **103**, 34-38.
- Purves,D., Snider,W.D. & Voyvodic,J.T. (1988) Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system. *Nature*, **336**, 123-128.

- Rangaraju,V., Calloway,N. & Ryan,T.A. (2014) Activity-Driven Local ATP Synthesis Is Required for Synaptic Function. *Cell*, **156**, 825-835.
- Rettig,J. & Neher,E. (2002) Emerging roles of presynaptic proteins in Ca<sup>++</sup>-triggered exocytosis. *Science*, **298**, 781-785.
- Robinson,R.C., Radziejewski,C., Spraggon,G., Greenwald,J., Kostura,M.R., Burtnick,L.D., Stuart,D.I., Choe,S. & Jones,E.Y. (1999) The structures of the neurotrophin 4 homodimer and the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 4 heterodimer reveal a common Trk-binding site. *Protein Science*, **8**, 2589-2597.
- Robinson,R.C., Radziejewski,C., Stuart,D.I. & Jones,E.Y. (1995) Structure of the Brain-Derived Neurotrophic Factor Neurotrophin 3 Heterodimer. *Biochemistry*, **34**, 4139-4146.
- Ruit,K.G., Osborne,P.A., Schmidt,R.E., Johnson,E.M.Jr. & Snider,W.D. (1990) Nerve growth factor regulates sympathetic ganglion cell morphology and survival in the adult mouse. *Journal of Neuroscience*, **10**, 2412-2419.
- Russell,J.T. & Holz,R.W. (1981) Measurement of delta pH and membrane potential in isolated neurosecretory vesicles from bovine neurohypophyses. *Journal of Biological Chemistry*, **256**, 5950-5953.
- Sadakata,T., Kakegawa,W., Shinoda,Y., Hosono,M., Katoh-Semba,R., Sekine,Y., Sato,Y., Tanaka,M., Iwasato,T., Itohara,S., Furuyama,K., Kawaguchi,Y., Ishizaki,Y., Yuzaki,M. & Furuichi,T. (2013) CAPS1 Deficiency Perturbs Dense-Core Vesicle Trafficking and Golgi Structure and Reduces Presynaptic Release Probability in the Mouse Brain. *Journal of Neuroscience*, **33**, 17326-17334.
- Sadakata,T., Mizoguchi,A., Sato,Y., Katoh-Semba,R., Fukuda,M., Mikoshiba,K. & Furuichi,T. (2004) The secretory granule-associated protein CAPS2 regulates neurotrophin release and cell survival. *Journal of Neuroscience*, **24**, 43-52.
- Sadakata,T., Shinoda,Y., Sekine,Y., Saruta,C., Itakura,M., Takahashi,M. & Furuichi,T. (2010) Interaction of Calcium-dependent Activator Protein for Secretion 1 (CAPS1) with the Class II ADP-ribosylation Factor Small GTPases Is Required for Dense-core Vesicle Trafficking in the trans-Golgi Network. *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 38710-38719.
- Sadakata,T., Washida,M., Morita,N. & Furuichi,T. (2007) Tissue distribution of Ca<sup>2+</sup>-dependent activator protein for secretion family members CAPS1 and CAPS2 in mice. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **55**, 301-311.
- Saheki,Y. & De Camilli,P. (2012) Synaptic Vesicle Endocytosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **4**.
- Schmidt-Kastner,R., Wetmore,C. & Olson,L. (1996) Comparative study of brain-derived neurotrophic factor messenger RNA and protein at the cellular level suggests multiple roles in hippocampus, striatum and cortex. *Neuroscience*, **74**, 161-183.
- Shimojo,M., Courchet,J., Pieraut,S., Torabi-Rander,N., Sando,R., Polleux,F. & Maximov,A. (2015) SNAREs Controlling Vesicular Release of BDNF and Development of Callosal Axons. *Cell Reports*, **11**, 1054-1066.
- Shinoda,Y., Sadakata,T., Nakao,K., Katoh-Semba,R., Kinameri,E., Furuya,A., Yanagawa,Y., Hirase,H. & Furuichi,T. (2011) Calcium-dependent activator protein for secretion 2 (CAPS2) promotes BDNF secretion and is critical for the development of GABAergic interneuron network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 373-378.
- Soppet,D., Escandon,E., Maragos,J., Middlemas,D.S., Reid,S.W., Blair,J., Burton,L.E., Stanton,B.R., Kaplan,D.R., Hunter,T., Nikolics,K. & Parada,L.F. (1991) The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkb tyrosine kinase receptor. *Cell*, **65**, 895-903.

- Speidel,D., Bruederle,C.E., Enk,C., Voets,T., Varoqueaux,F., Reim,K., Becherer,U., Fornal,F., Ruggieri,S., Holighaus,Y., Weihe,E., Bruns,D., Brose,N. & Rettig,J. (2005) CAPS1 regulates catecholamine loading of large dense-core vesicles. *Neuron*, **46**, 75-88.
- Speidel,D., Varoqueaux,F., Enk,C., Nojiri,M., Grishanin,R.N., Martin,T.F.J., Hofmann,K., Brose,N. & Reim,K. (2003) A family of Ca<sup>2+</sup>-dependent activator proteins for secretion - Comparative analysis of structure, expression, localization, and function. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 52802-52809.
- Südhof,T.C. (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annual Review of Neuroscience*, **27**, 509-547.
- Südhof,T.C. (2013) Neurotransmitter Release: The Last Millisecond in the Life of a Synaptic Vesicle. *Neuron*, **80**, 675-690.
- Sutton,R.B., Fasshauer,D., Jahn,R. & Brunger,A.T. (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 angstrom resolution. *Nature*, **395**, 347-353.
- Svichar,N., Esquenazi,S., Chen,H.Y. & Chesler,M. (2011) Preemptive Regulation of Intracellular pH in Hippocampal Neurons by a Dual Mechanism of Depolarization-Induced Alkalinization. *Journal of Neuroscience*, **31**, 6997-7004.
- Tao,X., Finkbeiner,S., Arnold,D.B., Shaywitz,A.J. & Greenberg,M.E. (1998) Ca<sup>2+</sup> influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron*, **20**, 709-726.
- Taraska,J.W., Perrais,D., Ohara-Imaizumi,M., Nagamatsu,S. & Almers,W. (2003) Secretory granules are recaptured largely intact after stimulated exocytosis in cultured endocrine cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 2070-2075.
- Teng,H.K., Teng,K.K., Lee,R., Wright,S., Tevar,S., Almeida,R.D., Kermani,P., Torkin,R., Chen,Z.Y., Lee,F.S., Kraemer,R.T., Nykjaer,A. & Hempstead,B.L. (2005) ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75(NTR) and sortilin. *Journal of Neuroscience*, **25**, 5455-5463.
- Timmusk,T., Palm,K., Metsis,M., Reintam,T., Paalme,V., Saarma,M. & Persson,H. (1993) Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron*, **10**, 475-489.
- Tobin,V., Schwab,Y., Lelos,N., Onaka,T., Pittman,Q.J. & Ludwig,M. (2012) Expression of Exocytosis Proteins in Rat Supraoptic Nucleus Neurons. *Journal of Neuroendocrinology*, **24**, 629-641.
- Tongiorgi,E., Righi,M. & Cattaneo,A. (1997) Activity-dependent dendritic targeting of BDNF and TrkB mRNAs in hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, **17**, 9492-9505.
- Truong,C.Q.N., Nestvogel,D., Ratai,O., Schirra,C., Stevens,D.R., Brose,N., Rhee,J. & Rettig,J. (2014) Secretory Vesicle Priming by CAPS Is Independent of Its SNARE-Binding MUN Domain. *Cell Reports*, **9**, 902-909.
- van Kempen,G.T.H., van der Leest,H.T., van den Berg,R.J., Eilers,P. & Westerink,R.H.S. (2011) Three Distinct Modes of Exocytosis Revealed by Amperometry in Neuroendocrine Cells. *Biophysical Journal*, **100**, 968-977.
- Voets,T., Toonen,R.F., Brian,E.C., de Wit,H., Moser,T., Rettig,J., Südhof,T.C., Neher,E. & Verhage,M. (2001) Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking. *Neuron*, **31**, 581-591.
- Walent,J.H., Porter,B.W. & Martin,T.F. (1992) A novel 145 kd brain cytosolic protein reconstitutes Ca<sup>2+</sup>-regulated secretion in permeable neuroendocrine cells. *Cell*, **70**, 765-775.
- Weber,T., Zemelman,B.V., Mcnew,J.A., Westermann,B., Gmachl,M., Parlati,F., Sollner,T.H. & Rothman,J.E. (1998) SNAREpins: Minimal machinery for membrane fusion. *Cell*, **92**, 759-772.

- Wetmore,C., Cao,Y.H., Pettersson,R.F. & Olson,L. (1991) Brain-derived neurotrophic factor: subcellular compartmentalization and interneuronal transfer as visualized with anti-peptide antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 9843-9847.
- Wu,M.M., Grabe,M., Adams,S., Tsien,R.Y., Moore,H.P.H. & Machein,T.E. (2001) Mechanisms of pH regulation in the regulated secretory pathway. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 33027-33035.
- Xue,M.S., Stradomska,A., Chen,H.M., Brose,N., Zhang,W.Q., Rosenmund,C. & Reim,K. (2008) Complexins facilitate neurotransmitter release at excitatory and inhibitory synapses in mammalian central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 7875-7880.
- Yang,B., Steegmaier,M., Gonzalez,L.C. & Scheller,R.H. (2000) nSec1 binds a closed conformation of syntaxin1A. *Journal of Cell Biology*, **148**, 247-252.
- Yang,J.M., Siao,C.J., Nagappan,G., Marinic,T., Jing,D.Q., McGrath,K., Chen,Z.Y., Mark,W., Tessarollo,L., Lee,F.S., Lu,B. & Hempstead,B.L. (2009) Neuronal release of proBDNF. *Nature Neuroscience*, **12**, 113-115.
- Zeng,Y. & Cullen,B.R. (2003) Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *Rna-A Publication of the Rna Society*, **9**, 112-123.
- Zhao,G.L., Neeb,Z.P., Leo,M.D., Pachuau,J., Adebisi,A., Ouyang,K.F., Chen,J. & Jaggar,J.H. (2010) Type 1 IP3 receptors activate BKCa channels via local molecular coupling in arterial smooth muscle cells. *Journal of General Physiology*, **136**, 283-291.
- Zhou,A., Webb,G., Zhu,X.R. & Steiner,D.F. (1999) Proteolytic processing in the secretory pathway. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 20745-20748.



# Anhang

## A. Lebenslauf

### *Angaben zur Person:*

Nachname: Eckenstaler  
Vorname: Robert  
Geburtsdatum: 04.06.1983  
Geburtsort: Saalfeld (Saale)  
Geschlecht: männlich  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### *Wissenschaftlicher Werdegang:*

2003-2008 Studium der Biochemie  
Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg  
Abschluss: Diplom Biochemiker  
seit 2009 Promotion  
Institut für Physiologie, Medizinische Fakultät der  
Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

## B. Publikationen

Leschik,J., **Eckenstaler,R.**, Nieweg,K., Lichtenecker,P., Brigadski,T., Gottmann,K., Lessmann,V. & Lutz,B. (2013) Embryonic stem cells stably expressing BDNF-GFP exhibit a BDNF-release-dependent enhancement of neuronal differentiation. *Journal of Cell Science*, 126, 5062-5073.

Seifert,B., **Eckenstaler,R.**, Ronicke,R., Leschik,J., Lutz,B., Reymann,K., Lessmann,V. & Brigadski,T. (2016) Amyloid-Beta Induced Changes in Vesicular Transport of BDNF in Hippocampal Neurons. *Neural Plasticity*.<sup>1</sup>

**Eckenstaler,R.**, Lessmann,V. & Brigadski,T. (2016) CAPS1 effects on intragranular pH and regulation of BDNF release from secretory granules in hippocampal neurons. *Journal of Cell Science*, **129**, 1378-1390.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> erst nach abgeschlossener Korrektur ergänzte Angaben

## **C. Danksagung**

Ich möchte hiermit Prof. Dr. Volkmar Leßmann danken, dass er es mir ermöglicht hat, das Thema dieser Doktorarbeit am Institut für Physiologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg zu erarbeiten. Neben Prof. Dr. Volkmar Leßmann gilt auch Jun.-Prof. Dr. Tanja Brigadski ein besonderer Dank für die exzellente fachliche Betreuung der Doktorarbeit.

Weiterhin möchte ich Sabine Mücke, Regina Ziegler, Anja Reusch und Margit Schmidt für die hervorragende technische Unterstützung bei meiner Arbeit am Institut danken. Auch möchte ich allen weiteren Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Physiologie für die Bereitstellung eines angenehmen Arbeitsklimas danken.

Ich möchte Dr. Thomas Munsch und Dr. Susanne Meis danken, die im besonderen Maße für mein leibliches Wohl Sorge getragen haben. Auch möchte ich noch meinen Doktorandenkollegen Petra, Julia, Bianca, Laura, Dijana und Efrain für ein angenehmes Miteinander während und außerhalb der Arbeitszeiten danken.

Schlussendlich widme ich diese Arbeit meinem Opa Manfred Deckert, der mit Stolz auf meine akademische Laufbahn geblickt, jedoch die Vollendung dieser Arbeit nicht mehr erleben konnte.

Robert Eckenstaler  
Förderstedter Straße 25  
39112 Magdeburg

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zu dem Thema

**„Regulation der Kalzium-abhängigen Ausschüttung von  
BDNF aus hippokampalen Neuronen durch CAPS1“**

selbständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzen Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades *doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, den 27.10.2015

Robert Eckenstaler