

Aus dem  
CharitéCentrum für Grundlagenmedizin  
Institut für Neurophysiologie  
Direktor Prof. Dr. rer. nat. Jörg R. P. Geiger

## **Habilitationsschrift**

# **Komposition und Dynamik der Freisetzungsstellen für Neurotransmitter**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Physiologie,

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. rer. nat. Alexander Matthias Walter

Eingereicht: Dezember 2020

Dekan: Prof. Dr. Axel Radlach Pries, MD

1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Hallermann, Leipzig

2. Gutachter: Prof. Dr. Valentin Stein, Bonn

# Inhalt

Abkürzungen .....	3
1. Einleitung .....	4
2. Eigene Arbeiten.....	11
2.1 Transmitterfreisetzung durch kalziumregulierte, sequenzielle Reaktionen .....	11
2.2 Molekulare Charakterisierung der Freisetzungstellen synaptischer Vesikel.....	30
2.3 Modulation der Transmitterfreisetzung durch Signallipide .....	61
2.4 Regulation vesikulärer Freisetzungstellen zur homöostatischen synaptischen Potenzierung.....	104
2.5 Schnelles Vesikel Priming ermöglicht Kurzzeitplastizität trotz heterogener Distanzen zwischen Freisetzungstellen und Kalziumkanälen .....	123
3 Diskussion .....	175
4 Zusammenfassung .....	182
5 Literaturangaben.....	185
Danksagung .....	199
Erklärung .....	200

## Abkürzungen

AP: Aktionspotential

BRP: Bruchpilot

CAST: Calpastatin

CAPS: calcium-dependent activator protein for secretion

ELKS: protein rich in the amino acids E, L, K and S

KZD: Kurzzeitdepression

KZF: Kurzzeitfazilitierung

LZP: Langzeitpotenzierung

N: Anzahl synaptischer Freisetzungstellen

NT: Neurotransmitter

PH: Pleckstrin Homologie

PHP: präsynaptische homöostatische Potenzierung

PI(4,5)P<sub>2</sub>: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

DAG: Diacylglycerin

p: Wahrscheinlichkeit

PKC: Protein Kinase C

PPM: parallel pool model

pV<sub>r</sub>: vesikuläre Freisetzungswahrscheinlichkeit

q: Quantum

SPM: sequential pool model

RIM: rab3 interacting molecule

RBP: RIM binding protein

RRP: readily releasable pool

UV: ultraviolet

SNAP25: synaptosomal-associated protein of 25kDa

SNARE: soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor

SPM: sequenzielles pool Model

STED: stimulated emission depletion

STF: short term facilitation

STD: short term depression

SRP: slowly releasable pool

VAMP: vesicle associated membrane protein

## 1. Einleitung

Für das Überleben des Organismus, aber auch für sein Verhalten, ist die Kommunikation von Nervenzellen (Neuronen) essenziell. Innerhalb von Neuronen werden Informationen häufig elektrisch kodiert, jedoch können diese Signale in den meisten Fällen nicht genutzt werden, um Informationen von Zelle zu Zelle zu übertragen. Stattdessen werden hierfür chemische Botenstoffe, Neurotransmitter, benutzt. Diese werden an der Synapse, der Kontaktstelle zwischen Zellen, vom präsynaptischen Neuron freigesetzt und mittels Rezeptorproteinen der postsynaptischen Zelle wahrgenommen. Einerseits muss diese synaptische Transmission schnell erfolgen, damit z.B. auf sensorische Informationen aus der Umwelt sofort adäquat reagiert werden kann. Andererseits erfolgt an den meisten Synapsen des Nervensystems untrennbar mit der Übertragung auch eine Verarbeitung der Information, weshalb Synapsen oft als die kleinste Signalverarbeitungseinheit angesehen werden (Abbott and Regehr, 2004). Insbesondere sind die Übertragungstärken an Synapsen keineswegs konstant sondern können sich mit hoher Dynamik auf verschiedenen Zeitskalen verändern (Citri and Malenka, 2008). Dieser Eigenschaft unterliegen die Fähigkeiten, die Übertragung auch bei Störungen aufrechterhalten zu können, zeitliche Informationen zu filtern, oder ein Gedächtnis zu bilden.

In den hier vorgestellten Forschungsarbeiten widme ich mich der Frage, wie die präsynaptische Freisetzungsmaschinerie molekular aufgebaut ist und die Ausschüttung von Neurotransmittern so reguliert wird, um eine physiologische Signalübertragung zu gewährleisten. Diesen Fragestellungen gehe ich mit einer Kombination aus experimentellen und theoretischen Ansätzen nach. Mittels genetischer Manipulationen werden die Komponenten der Freisetzungsmaschinerie untersucht. Die funktionelle Charakterisierung erfolgt mit elektrophysiologischen Methoden, sowie Lebend-Mikroskopie (engl. live cell imaging). Die molekulare Organisation wird mit Konfokal- und hochauflösender STED (stimulated emission depletion) Mikroskopie untersucht. Ziel ist es, die experimentell

gewonnenen Daten zu nutzen, um mathematische Modelle zu entwickeln, die die funktionellen Eigenschaften abbilden. Solche Modelle können dann genutzt werden, um Vorhersagen zu treffen und Hypothesen zu generieren, die dann wiederum experimentell untersucht werden können.

Elektrische Signale werden im Nervensystem typischerweise mittels Aktionspotentialen (APs, schnellen De- und Repolarisationen des Membranpotentials) innerhalb einer Nervenzelle übertragen (Kandel et al., 1991). Dies ermöglicht die rasche und nahezu verlustfreie Reizweiterleitung auch über längere Distanzen, z.B. entlang der Axone eines Motoneurons zur synaptischen Verbindung am Muskel, bei dem eine Bewegung ausgelöst werden soll. Damit an der Synapse ein Signal an eine Empfängerzelle ausgesendet werden kann, werden transmittergefüllte, synaptische Vesikel durch das AP freigesetzt (Sudhof, 2013b). Obwohl die meisten Synapsen über große Mengen synaptischer Vesikel verfügen, ist jeweils nur ein Bruchteil davon in der Lage, in Folge einer Stimulation Neurotransmitter auszuschütten. Hierfür ist es zunächst nötig, dass die Vesikel an die Plasmamembran der Zelle andocken („Docking“) und dass sie molekular zur Fusionsfähigkeit reifen („Priming“)(Kaeser and Regehr, 2017; Verhage and Sorensen, 2008). Gedockte und geprimte Vesikel schütten Transmitter aus, wenn die vesikuläre Membran mit der Plasmamembran verschmilzt (Jahn and Fasshauer, 2012). Dies kann in Reaktion auf ein AP ausgelöst werden, denn das AP führt an der Synapse zur Öffnung spannungsgesteuerter Kalziumkanäle und zu einem Kalziumeinstrom. Dieser erhöht, zeitlich und räumlich eng begrenzt, die Kalziumkonzentration, was die Vesikelfusion auslösen kann (Eggermann et al., 2012; Neher and Sakaba, 2008). Die Wahrscheinlichkeit, dass ein AP Vesikelfusion auslöst wird als „vesikuläre Freisetzungswahrscheinlichkeit“ („vesicular release probability“,  $pV_r$ ) bezeichnet (Atwood and Karunanithi, 2002; Bohme et al., 2018). Aus klassischen Studien ist bekannt, dass die Neurotransmitterfreisetzung stark vom Kalziumeinstrom abhängt (Dodge and Rahamimoff, 1967). Dieser kooperative Effekt wird der sukzessiven Assoziation

mehrerer Kalziumionen an den Fusionssensor des Vesikels zugeschrieben (Neher and Sakaba, 2008). Freigesetzte Transmitter aktivieren postsynaptische Rezeptoren, die ihrerseits Änderungen der Membranleitfähigkeit und des Membranpotentials der postsynaptischen Zelle auslösen können (Kandel et al., 1991).

Eine für das Nervensystem essenzielle Eigenschaft ist, dass Synapsen nicht starr in ihrer Übertragung sind, sondern dass sich ihre Übertragungsstärke verändern kann (Abbott and Regehr, 2004; Citri and Malenka, 2008). Diese sog. synaptische Plastizität ist beispielsweise wichtig, um Informationen zu speichern (Kandel et al., 2014). Ein prominentes Beispiel ist die sog. Langzeitpotenzierung (LZP), die zur langfristigen Erhöhung der Transmissionsstärke führt und mit Gedächtnisbildung in Verbindung gebracht wird (Nicoll, 2017). Andererseits ist synaptische Potenzierung auch nötig, um Störungen der Informationsübertragung entgegenzuwirken: Wenn beispielsweise die Sensitivität postsynaptischer Transmitter-Rezeptoren abnimmt droht das Signal verlorenzugehen. Dies kann durch eine präsynaptische homöostatische Potenzierung (PHP) der Transmitterausschüttung ausgeglichen werden um die Signalübertragung aufrechtzuerhalten (Davis and Goodman, 1998; Davis and Muller, 2015; Lazarevic et al., 2013; Turrigiano, 2012). Eine weitere wichtige Form der synaptischen Plastizität ist die sog. Kurzzeitplastizität, die auf einer Zeitskala von Millisekunden bis zu Sekunden auftritt und für die Kodierung zeitlicher Information relevant ist (Regehr, 2012). Treffen an einer Synapse beispielsweise schnell hintereinander zwei APs ein, so kann die Übertragung beim zweiten AP stärker oder schwächer ausfallen als beim ersten. Bei einer Verstärkung spricht man von „Bahnung“ oder „Kurzzeitfazilitierung“ (KZF, engl. „short term facilitation“), bei einer Abschwächung von „Kurzzeitdepression“ (KZD, engl. „short term depression“) (Fioravante and Regehr, 2011; Zucker and Regehr, 2002).

Neurotransmitter werden nicht an beliebigen Stellen der synaptischen Membran freigesetzt, sondern nur an spezialisierten Freisetzungstellen („release sites“). Die Tatsache, dass die Anzahl der Freisetzungstellen in der Synapse begrenzt ist, ergibt sich aus den klassischen Arbeiten von Bernard Katz zur quantalen Transmitterfreisetzung (Del Castillo and Katz, 1954; Fatt and Katz, 1952), für die er 1970 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet wurde. Eine der zentralen Erkenntnisse der Arbeiten von Katz und Kollegen war, dass es eine minimale, quantale Einheit der synaptischen Transmission gibt, die der postsynaptischen Erregung durch die Transmittermenge eines Vesikels entspricht. Insgesamt wurde die Stärke der synaptischen Übertragung (z.B. des postsynaptischen Stroms,  $I$ ) nach der Gleichung  $I = p \cdot N \cdot q$  definiert. Hierbei bezeichnet „ $N$ “ die Anzahl synaptischer Freisetzungstellen, „ $p$ “ die Wahrscheinlichkeit, dass es zur Exozytose an einer Freisetzungstelle kommt ( $p$  ist mit  $pV_r$  äquivalent wenn alle Freisetzungstellen besetzt sind, ansonsten muss die Besetzungswahrscheinlichkeit  $\delta$  berücksichtigt werden:  $p = \delta \cdot pV_r$  (Del Castillo and Katz, 1954; Malagon et al., 2020; Pulido and Marty, 2018; Vere-Jones, 1966)) und „ $q$ “ (Quantum) die Erregung (z.B. der ausgelöste Strom) der Postsynapse durch die Transmitter eines Vesikels. Da es pro Freisetzungstelle nur zwei mögliche Ereignisse gibt (Exozytose oder keine Exozytose) folgt die synaptische Übertragung statistisch einer Binomialverteilung, was experimentell gezeigt wurde (Clements and Silver, 2000; McLachlan, 1978; Scheuss and Neher, 2001; Vere-Jones, 1966; Zucker, 1973).

Die Freisetzung chemischer Transmitter ist für das Überleben des Organismus essentiell. Daher verwundert es nicht, dass die Gene, die Komponenten der Freisetzungsmaschinerie exprimieren, evolutionär hochkonserviert sind. Docking, Priming und Fusion synaptischer Vesikel hängt von den sogenannten SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor) Proteinen ab (de Wit et al., 2009; Imig et al., 2014; Jahn and Scheller, 2006; Verhage and Sorensen, 2008). Die SNARE Proteine

Syntaxin-1 und SNAP25 (synaptosomal-associated protein of 25 kDa) sind auf der Plasmamembran lokalisiert und können mit dem vesikulären SNARE Protein Synaptobrevin-2/VAMP2 (vesicle associated membrane protein 2) einen sehr stabilen SNARE Komplex bilden (Jahn and Fasshauer, 2012). Die hierdurch freiwerdende Energie ermöglicht die Vesikelfusion (Sudhof, 2013b). Für die Bildung des neuronalen SNARE Komplex sind weiterhin die Proteine (M)Unc13 und (M)Unc18 (wobei das „M“ im Falle von Säugetieren für „Mammalian“ vorangestellt wird) nötig (Rizo and Xu, 2015; Sudhof and Rothman, 2009). Die Exozytose wird durch das vesikuläre Kalziumbindende Protein „Synaptotagmin“ an die Erregung durch das Aktionspotential (und dem daraus resultierenden Kalzium-Einstrom) gekoppelt (Sudhof, 2013a; Walter et al., 2011; Yoshihara et al., 2003). Darüber hinaus regulieren die Zytomatrixproteine „rab3 interacting molecule“ (RIM), RIM-Binding Protein (RBP) und ELKS/CAST („protein rich in the amino acids E, L, K, S/Calpastatin) bzw. dessen *Drosophila* Homolog Bruchpilot (BRP) durch ihre zahlreichen Interaktionen mit z.B. Kalziumkanälen, (M)Unc13 und den Vesikeln die räumliche Nähe der Interaktionspartner (Ackermann et al., 2015; Gundelfinger and Fejtova, 2012; Sudhof, 2012; Walter et al., 2018).

Die Fusion transmittergefüllter Vesikel an den Freisetzungstellen bedarf der Verschmelzung der vesikulären und der Plasmamembran (Sudhof and Rothman, 2009). Neben einer einfachen Funktion als Barriere zwischen Zellkompartimenten, können sog. Signallipide der Lipid-Doppelschicht selbst zur Signalübertragung beitragen. An der Synapse sind vor allem das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P<sub>2</sub>) und das Diacylglycerin (DAG) für die Freisetzung von Transmittern relevant (McLaughlin and Murray, 2005; Miller et al., 1999; Rhee et al., 2002). Beide Lipide sind metabolisch eng aneinander gekoppelt und werden in prominenten Signalkaskaden („second messenger pathways“) über G-Protein gekoppelte Rezeptoren reguliert, die die Aktivität des Enzyms Phospholipase C (PLC) steuern, dass PI(4,5)P<sub>2</sub> zu DAG umsetzt (McLaughlin and Murray, 2005).



Regulatorische Proteine können DAG mittels sog. C1 Domänen binden, was zur Aktivierung führen kann. Typische Effektorproteine sind die Isoformen der Protein Kinase C (PKC), die zur Phosphorylierung verschiedener Substrate führen und vielschichtige zelluläre Reaktionen regulieren (Newton, 2010). Die Phosphorylierung synaptischer Proteine führt in vielen Fällen zu einer Veränderung der Transmissionseigenschaften (de Jong et al., 2016; Meijer et al., 2018; Nagy et al., 2002; Nili et al., 2006; Wierda et al., 2007). Neben der PKC-vermittelten Phosphorylierung kann DAG auch direkt das synaptische Protein (M)Unc13 über dessen C1 Domäne binden was die Energiebarriere der Vesikelfusion herabsetzt und somit synaptische Übertragung modulieren (Basu et al., 2007; Rhee et al., 2002; Schotten et al., 2015). Auch PI(4,5)P<sub>2</sub> beeinflusst synaptische Transmission. Beispielsweise moduliert PI(4,5)P<sub>2</sub> spannungsgesteuerte Kalziumkanäle (Suh et al., 2010) und daraus resultierende Änderungen des AP-vermittelten Kalziumeinstroms verändern pV<sub>r</sub>. Darüber hinaus binden Synaptotagmin und (M)Unc13 mittels sog. C2 Domänen in Gegenwart erhöhter Kalziumkonzentrationen PI(4,5)P<sub>2</sub> (Brose et al., 1992; Fernandez et al., 2001; Shin et al., 2010). Physiologisch sind die PI(4,5)P<sub>2</sub> bindenden Domänen hochrelevant: Die C2B Domäne Synaptotagmins ist essentiell, um Kalziumvermittelte Vesikelfusion auszulösen und die C2B Domäne (M)Unc13s erhöht die Wahrscheinlichkeit dafür (Mackler et al., 2002; Shin et al., 2010). Ein weiteres synaptischen Protein, das im Vesikelpriming fungiert ist „calcium-dependent activator protein for secretion“ (CAPS). Es bindet PI(4,5)P<sub>2</sub> mittels einer sog. PH-Domäne (PH: Pleckstrin Homologie)(Loyet et al., 1998) und reguliert Vesikel Docking und Priming (Hammarlund et al., 2008; Liu et al., 2008; Loyet et al., 1998).

Trotz detaillierter Kenntnisse der Synapsenphysiologie und der beteiligten Komponenten besteht weiterhin die größte Schwierigkeit darin, zu verstehen, wie diese Komponenten molekular zusammenwirken, um die Transmission zu regulieren. Ein solches Verständnis ist jedoch nötig, um Dysfunktionen zu verstehen. Denn Mutationen in den o.g. Proteinen werden mit schweren neurologischen Erkrankungen assoziiert (Chai et al., 2016;

Lipstein et al., 2017; Stamberger et al., 2016; Verhage and Sorensen, 2020). Der Begriff der „Synaptopathien“ versinnbildlicht dies (Grant, 2012).

In den hier vorgestellten Arbeiten untersuche ich die molekularen Mechanismen, mit denen Freisetzungstellen für Neurotransmitter reguliert werden. Hierfür wurden zwei Modellsysteme genutzt, chromaffine Zellen der Maus und die neuromuskuläre Endplatte in Larven der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Chromaffine Zellen entspringen denselben Vorgängerzellen wie Neurone, erlauben aber experimentell eine genauere Charakterisierung mit speziellen elektrophysiologischen Methoden. Fruchtfliegen haben verglichen mit Säugetieren zwar ein simpleres Nervensystem, jedoch ist der Prozess der Transmitterfreisetzung ähnlich und die beteiligten Proteine sind weitestgehend konserviert. Daher kann Forschung in diesem Modellsystem auch Rückschlüsse auf humane Krankheiten erlauben, da die meisten (75 %) krankheitsrelevanten Gene konserviert sind (Pandey and Nichols, 2011).

Wichtige Erkenntnisse meiner Arbeit sind, dass (1) Neurosekretion in sequenziellen Reifungsschritten moduliert werden kann, dass (2) (M)Unc13 die synaptischen Freisetzungstellen definiert, dass (3) Transmitterfreisetzung durch Signallipide der Plasmamembran potenziert wird, dass (4) synaptische Plastizitätsmechanismen via Unc13 operieren, und (5) dass die Besetzung/Aktivität der Freisetzungstellen schnell reguliert werden kann.

## **2. Eigene Arbeiten**

### **2.1 Transmitterfreisetzung durch kalziumregulierte, sequenzielle Reaktionen**

In dieser Studie untersuchte ich die Kalziumabhängigkeit der Transmitterausschüttung. Dies kann am genauesten in Experimenten bestimmt werden, die „patch-clamp“ Elektrophysiologie mit sogenanntem Kalzium „uncaging“ und Kalzium „imaging“ kombinieren (Bollmann et al., 2000; Heidelberger et al., 1994; Heinemann et al., 1994; Schneggenburger and Neher, 2000). Bei der „patch-clamp“ Technik wird durch eine Elektrode ein elektrischer Kontakt zum Zellinneren hergestellt. Die Elektrode besteht aus Glas und ist mit einer Lösung gefüllt, die dem Zytosol der Zelle ähnelt. Bei diesen speziellen Experiment wird zusätzlich ein Kalziumchelator zugesetzt, der zunächst Kalzium bindet, aber unter Beleuchtung mit ultraviolettem (UV) Licht zerstört wird. Hierdurch wird sehr rapide (< ~1ms) die Kalziumkonzentration durch die Photolyse des Chelators („uncaging“) erhöht. Die genaue Kalziumkonzentration wird im Experiment zudem mit zusätzlich in der Pipettenlösung vorhandenen, UV-beständigen, fluoreszierenden Kalziumindikatoren gemessen (Grynkiewicz et al., 1985; Heinemann et al., 1994). Gleichzeitig wird elektrophysiologisch die Menge und Geschwindigkeit der freigesetzten Transmitter bestimmt (z.B. durch die Messung des postsynaptischen Stroms oder der Zunahme der präsynaptischen Membrankapazität, die proportional zur Zelloberfläche ist, welche sich durch die Vesikelfusion vergrößert)(Lindau and Neher, 1988; Neher and Sakaba, 2001; Wolfel and Schneggenburger, 2003).

In „uncaging“ Experimenten in chromaffinen Zellen und in Neuronen wurde zudem beobachtet, dass es drei Phasen der Transmitterausschüttung gibt (Heinemann et al., 1994; Voets, 2000; Voets et al., 1999; Wolfel et al., 2007). Dies führte zur Annahme, dass es drei verschiedene kinetische „pools“/Quellen von Vesikeln gibt. Die schnellste Phase wurde dem „readily releasable pool“ (RRP) zugeschrieben, die mittlere Phase dem „slowly releasable

pool“ (SRP) und die langsamste Phase der Repopulation von RRP und SRP aus einem größeren „depot“ oder „reserve pool“ (Rettig and Neher, 2002; Voets, 2000). Da in diesem Model RRP und SRP unabhängig voneinander agieren, wird es als „parallel pool Model“ (PPM) bezeichnet. Eine zentrale Annahme ist, dass RRP und SRP jeweils über eigene Kalziumsensoren freigesetzt werden, die in sich in der Kalziumbindegeschwindigkeit unterscheiden, was die unterschiedlichen Freisetzungsgeschwindigkeiten erklären kann (Voets, 2000; Voets et al., 1999). Die kalziumvermittelte Exozytose der RRP-Vesikel wird Synaptotagmin-1 (chromaffine Zellen, Pyramidalneurone) (Burgalossi et al., 2010; Sorensen et al., 2003; Voets et al., 2001) und Synaptotagmin-2 (Calyx von Held Synapse)(Sun et al., 2007) zugeschrieben, da die Null-Mutation des Proteins vor allem zum Verlust des RRP führte. Aus dem PPM könnte man erwarten, dass die korrespondierende Null-Mutation des SRP Kalziumsensors zu einem selektiven Verlust dieser langsameren Komponente führen sollte. Jedoch ist keine solche genetische Manipulation bekannt. Dies schließt nicht aus, dass solch ein spezieller Kalziumsensor für die direkte und unabhängige (parallele) Freisetzung des SRP existiert. Da jedoch schon viele Kandidatenproteine erfolglos untersucht wurden sollten auch andere mögliche Modelle evaluiert werden.

Daher wurde in der hier vorliegenden theoretischen Arbeit untersucht, ob ein alternatives, „sequenzielles pool Model“ (SPM), in dem ein Kalziumsensor die Reaktion zwischen den sequenziell gelagerten Vesikelstadien beeinflusst, ebenfalls als Erklärung dienen könnte. Hierzu wurden SPM und PPM mit Experimentaldaten der kalziumvermittelten Vesikelfusion in chromaffinen Zellen der Maus Nebenniere verglichen (Walter et al., 2013; Walter et al., 2010). Beide Modelle machten ähnlich gute Vorhersagen für die Vesikelfusion bei einmaliger Stimulation in wildtypischen Zellen (Walter et al., 2013). Hingegen zeigten sich Unterschiede beim Vergleich von Experimentaldaten von Zellen, in denen das SNARE Protein Synaptobrevin-2 mutiert wurde (Walter et al., 2010). Hier konnten die beobachteten Effekte eher durch das SPM erklärt werden (Walter et al., 2013). Zudem konnte das SPM im

Gegensatz zum PPM auch genutzt werden, um die Reaktion auf mehrere aufeinander folgende Stimuli vorherzusagen (Walter et al., 2013). Daher erschien das SPM insgesamt einige Vorteile gegenüber dem PPM zu haben. In der Tat wurden seitdem in Experimenten in anderen Systemen weitere Argumente für eine sequentielle Anordnung der Pools erbracht (Lee et al., 2013). Damals spekulierte ich bereits (in der Diskussion des Manuskriptes), dass die sequenzielle Reaktion auch mit der Population von Freisetzungsstellen zusammenhängen könnte, was aus auch in den Kapiteln 2.2 und 2.5 weiter betrachtet wird.

Der nachfolgende Text entspricht dem originalsprachlichen Abstrakt der Arbeit „*A Sequential Vesicle Pool Model with a Single Release Sensor and a Ca<sup>2+</sup>-Dependent Priming Catalyst Effectively Explains Ca<sup>2+</sup>-Dependent Properties of Neurosecretion*” (Walter et al., 2013), DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003362>:

*“Neurotransmitter release depends on the fusion of secretory vesicles with the plasma membrane and the release of their contents. The final fusion step displays higher-order Ca<sup>2+</sup> dependence, but also upstream steps depend on Ca<sup>2+</sup>. After deletion of the Ca<sup>2+</sup> sensor for fast release – synaptotagmin-1 – slower Ca<sup>2+</sup>-dependent release components persist. These findings have provoked working models involving parallel releasable vesicle pools (Parallel Pool Models, PPM) driven by alternative Ca<sup>2+</sup> sensors for release, but no slow release sensor acting on a parallel vesicle pool has been identified. We here propose a Sequential Pool Model (SPM), assuming a novel Ca<sup>2+</sup>-dependent action: a Ca<sup>2+</sup>-dependent catalyst that accelerates both forward and reverse priming reactions. While both models account for fast fusion from the Readily-Releasable Pool (RRP) under control of synaptotagmin-1, the origins of slow release differ. In the SPM the slow release component is attributed to the Ca<sup>2+</sup>-dependent refilling of the RRP from a Non-Releasable upstream Pool (NRP), whereas the PPM attributes slow release*

*to a separate slowly-releasable vesicle pool. Using numerical integration we compared model predictions to data from mouse chromaffin cells. Like the PPM, the SPM explains biphasic release,  $Ca^{2+}$ -dependence and pool sizes in mouse chromaffin cells. In addition, the SPM accounts for the rapid recovery of the fast component after strong stimulation, where the PPM fails. The SPM also predicts the simultaneous changes in release rate and amplitude seen when mutating the SNARE-complex. Finally, it can account for the loss of fast- and the persistence of slow release in the synaptotagmin-1 knockout by assuming that the RRP is depleted, leading to slow and  $Ca^{2+}$ -dependent fusion from the NRP. We conclude that the elusive 'alternative  $Ca^{2+}$  sensor' for slow release might be the upstream priming catalyst, and that a sequential model effectively explains  $Ca^{2+}$ -dependent properties of secretion without assuming parallel pools or sensors."*

## **2.2 Molekulare Charakterisierung der Freisetzungstellen synaptischer Vesikel**

In der nächsten Studie widmete ich mich der molekularen Charakterisierung der synaptischen Freisetzungstellen an denen Vesikel ihre Transmitter ausschütten. Da die synaptischen Parameter  $p$ ,  $N$  und  $q$  die Stärke der synaptischen Übertragung definieren, herrscht seit jeher großes Interesse daran, diese molekular zu definieren. Die Freisetzungswahrscheinlichkeit hängt (durch die kooperative Abhängigkeit der Kalziumbindung an den vesikulären Sensor) sehr stark vom Kalziumstrom ab (Bollmann et al., 2000; Dodge and Rahamimoff, 1967; Schneggenburger and Neher, 2000).  $p$  wird daher direkt von der Anzahl oder der Leitfähigkeit der spannungsgesteuerten Kalziumkanäle, aber auch von der Breite des Aktionspotentials oder der extrazellulären Kalziumkonzentration beeinflusst. Der Parameter  $q$  hängt beispielsweise von der Menge der Transmitter pro Vesikel und von der Dichte, Leitfähigkeit und Aktivierungsdauer postsynaptischer Rezeptoren ab. Im Gegensatz zu den molekularen Einflussfaktoren für  $p$  und  $q$ , war unser Verständnis über  $N$  stark eingeschränkt. Denn obwohl die Beschreibung der Freisetzungstellen mehr als 50 Jahre zurückliegt, war nicht bekannt, welches Molekül diese definiert.

Daher wurde in der als nächstes vorgestellten Arbeit untersucht, welche der evolutionär konservierten synaptischen Komponenten (die für die Transmission essentiell sind), als Freisetzungstellen fungieren könnten. Hierbei war klar, dass das entsprechende Protein bestimmte Eigenschaften haben müsste, die sich aus den physiologischen Eigenschaften der Freisetzungstellen ergeben. Beispielsweise sollte es über längere Zeit stabil an der Synapse lokalisiert sein, seine Position sollte die der gedockten Vesikel entsprechen und seine Menge mit der Stärke der Synapse zusammenhängen. Dies wurden an der neuromuskulären Endplatte von *Drosophila melanogaster* Larven für drei Proteine untersucht, die für Vesikelexozytose essentiell sind: Syntaxin-1, Unc18 und Unc13 (Aravamudan et al., 1999; Richmond et al., 1999; Schulze et al., 1995; Varoqueaux et al.,

2002; Verhage et al., 2000). Weder Syntaxin-1 noch Unc18 waren über längere Zeit an der Synapse stabil oder zeigten eine definierte Positionierung, die der der gedockten Vesikel entsprach (Reddy-Alla et al., 2017). Hingegen war Unc13 über Stunden stabil, korrelierte in seiner Verteilung mit den Positionen gedockter Vesikel und in seiner Menge mit der Synapsenstärke (Reddy-Alla et al., 2017). Darüber hinaus führte eine Veränderung dieser Proteineigenschaften zu einer Veränderung des statistischen Verhalten der Synapse, die am ehesten durch ein verändertes „N“ erklärt ist (Reddy-Alla et al., 2017). Diese Ergebnisse legen nahe, dass Unc13 als limitierender Faktor die Vesikulären Freisetzungstellen in der Synapse definiert.

Der nachfolgende Text entspricht dem originalsprachlichen Abstrakt der Arbeit „*Stable Positioning of Unc13 Restricts Synaptic Vesicle Fusion to Defined Release Sites to Promote Synchronous Neurotransmission.*“ (Reddy-Alla et al., 2017), DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.08.016>:

*“Neural information processing depends on precisely timed, Ca<sup>2+</sup>-activated synaptic vesicle exocytosis from release sites within active zones (AZs), but molecular details are unknown. Here, we identify that the (M)Unc13-family member Unc13A generates release sites and show the physiological relevance of their restrictive AZ targeting. Super-resolution and intravital imaging of Drosophila neuromuscular junctions revealed that (unlike the other release factors Unc18 and Syntaxin-1A) Unc13A was stably and precisely positioned at AZs. Local Unc13A levels predicted single AZ activity. Different Unc13A portions selectively affected release site number, position, and functionality. An N-terminal fragment stably localized to AZs, displaced endogenous Unc13A, and reduced the number of release sites, while a C-terminal fragment generated excessive sites at atypical locations, resulting in reduced and*



*delayed evoked transmission that displayed excessive facilitation. Thus, release site generation by the Unc13A C terminus and their specific AZ localization via the N terminus ensure efficient transmission and prevent ectopic, temporally imprecise release.”*

### **2.3 Modulation der Transmitterfreisetzung durch Signallipide**

In der nächsten Studie untersuchte ich, inwieweit das Signallipid PI(4,5)P<sub>2</sub> die Ausschüttung chemischer Transmitter beeinflussen. Da PI(4,5)P<sub>2</sub> und DAG metabolisch direkt gekoppelt sind und beiden Lipiden eine wichtige Rolle in der Transmitterfreisetzung zukommt, ist es experimentell schwierig, den jeweiligen Einfluss unabhängig zu untersuchen. Klassische Ansätze zielten darauf ab, Lipid-metabolisierende Enzyme genetisch zu verändern, um deren Funktion direkt zu stören oder mittels Licht, Chemikalien und Spannungsänderungen verändern zu können. Jedoch verändern diese Methoden nicht nur die eine Lipidspezies, die untersucht werden soll, sondern alle im metabolischen Netzwerk, wodurch es Probleme in der Spezifität geben kann. Ein alternativer/komplementärer Ansatz ist die direkte Mutation der Lipid-Bindedomänen im jeweiligen Protein, jedoch ist dies sehr aufwendig und kann ebenfalls zu ungewollten Veränderungen der Proteinfunktion führen. Diese Probleme könnten umgangen werden, wenn es möglich wäre, die einzelnen Lipidspezies unabhängig voneinander auf der Zeitskala der Vesikelfusion zu manipulieren und gleichzeitig die Transmitterfreisetzung zu messen.

Daher etablierte ich in Zusammenarbeit mit meinen Kollaborationspartnern (André Nadler, Max-Planck Institut für molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden und Carsten Schultz, Oregon Health & Science University, Portland) ein Experimentalschema, bei dem wir akut die Menge an PI(4,5)P<sub>2</sub> und DAG veränderten und gleichzeitig Transmitterfreisetzung maßen. Hierzu kombinierten wir UV-Lipiduncaging mit schnellen elektrophysiologischen Messungen der Vesikelfusion in Maus chromaffinen Zellen. Wir konnten zeigen, dass die akute Freisetzung von PI(4,5)P<sub>2</sub> (aber nicht DAG) mittels uncaging zu einer Potenzierung der Transmitterfreisetzung führt. Durch die systematische Analyse von knockout Mauslinien konnten zudem wir zeigen, dass diese Potenzierung sowohl von (M)Unc13 als auch von Synaptotagmin, jedoch nicht von CAPS abhing (Walter et al., 2017). Diese Resultate

sprechen für unterschiedliche Mechanismen: Proteine wie CAPS könnten beispielsweise darin fungieren, PI(4,5)P<sub>2</sub> zu vesikulären Freisetzungstellen zu sequestrieren, damit andere Proteine (wie (M)Unc13, Synaptotagmin), die PI(4,5)P<sub>2</sub> für ihre Funktion stöchiometrisch binden müssen, Vesikel an der Freisetzungsstelle positionieren und deren Fusion auslösen können.

Der nachfolgende Text entspricht dem originalsprachlichen Abstrakt der Arbeit „*Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate optical uncaging potentiates exocytosis*“ (Walter et al., 2017), DOI <https://doi.org/10.7554/eLife.30203>:

*“Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate [PI(4,5)P<sub>2</sub>] is essential for exocytosis. Classical ways of manipulating PI(4,5)P<sub>2</sub> levels are slower than its metabolism, making it difficult to distinguish effects of PI(4,5)P<sub>2</sub> from those of its metabolites. We developed a membrane-permeant, photoactivatable PI(4,5)P<sub>2</sub>, which is loaded into cells in an inactive form and activated by light, allowing sub-second increases in PI(4,5)P<sub>2</sub> levels. By combining this compound with electrophysiological measurements in mouse adrenal chromaffin cells, we show that PI(4,5)P<sub>2</sub> uncaging potentiates exocytosis and identify synaptotagmin-1 (the Ca<sup>2+</sup> sensor for exocytosis) and Munc13-2 (a vesicle priming protein) as the relevant effector proteins. PI(4,5)P<sub>2</sub> activation of exocytosis did not depend on the PI(4,5)P<sub>2</sub>-binding CAPS-proteins, suggesting that PI(4,5)P<sub>2</sub> uncaging may bypass CAPS-function. Finally, PI(4,5)P<sub>2</sub> uncaging triggered the rapid fusion of a subset of readily-releasable vesicles, revealing a rapid role of PI(4,5)P<sub>2</sub> in fusion triggering. Thus, optical uncaging of signaling lipids can uncover their rapid effects on cellular processes and identify lipid effectors.”*

## 2.4 Regulation vesikulärer Freisetzungstellen zur homöostatischen synaptischen

### Potenzierung

Viele Forschungsarbeiten haben sich der Charakterisierung von LZP an den Synapsen der Schaffer-Kollaterale mit den Pyramidalneuronen der CA1 Region des Hippocampus verschrieben, die mit der Etablierung des episodischen Gedächtnisses in Verbindung gebracht wird (Herring and Nicoll, 2016; Kandel et al., 2014; Nicoll, 2017; Takeuchi et al., 2014). Diese Form von LZP hängt maßgeblich von der Veränderung der Neurotransmitter-Rezeptoren ab (deren Motilität, Menge und Aktivierungseigenschaften), und wird daher auch als vornehmlich „postsynaptisch“ beschrieben (Luscher and Malenka, 2012). Ebenfalls bekannt sind jedoch auch präsynaptische Formen von LZP, beispielsweise an den Moosfasern der CA3 Region des Hippocampus (Castillo, 2012; Citri and Malenka, 2008; Monday and Castillo, 2017).

Ziel der nächsten Forschungsarbeit war es, mechanistische Erkenntnisse zur präsynaptischen homöostatischen Potenzierung (PHP) zu gewinnen, die ebenfalls zur längerfristigen Potenzierung der Transmitterausschüttung führen kann, um die Signalübertragung zu stabilisieren. Hierfür untersuchte ich PHP an der neuromuskulären Endplatte von *Drosophila melanogaster* Larven (Frank, 2014). Dieser präsynaptische Plastizitätsmechanismus führt zu einer Erhöhung der Menge an ausgeschüttetem Neurotransmitter durch ein AP um die Signalübertragung aufrechtzuerhalten, wenn Transmitter-Rezeptoren in ihrer Sensitivität geschwächt sind. Dies kann beispielsweise pharmakologisch ausgelöst werden, indem man das Wespengift Philanthotoxin appliziert, das ionotrope Glutamatrezeptoren der Endplatte hemmt (Frank et al., 2006). Dies führt unmittelbar zu einer verringerten Erregung des Muskels, da der quantale Parameter „q“ reduziert ist. Jedoch wird dies an der *Drosophila melanogaster* Neuromuskulären Endplatte innerhalb weniger (<10) Minuten durch eine Erhöhung von „N\*p“ ausgeglichen, was eine

gleichbleibende Signalstärke ( $I = p \cdot N \cdot q$ ) ermöglicht (Frank et al., 2006). Sowohl die Erhöhung von „N“ als auch von „p“ sind hier möglich, allerdings war die hier vorgestellte Arbeit auf die Untersuchung einer Veränderung der Freisetzungstellen („N“) fokussiert, da vorangegangene Studien dies im Kontext von PHP beschrieben hatten (Muller et al., 2012; Weyhermuller et al., 2011). Da wir –wie in Kapitel 2.2 beschrieben- das Protein Unc13 als maßgeblichen Bestandteil der Freisetzungstellen identifiziert hatten (Reddy-Alla et al., 2017), wurde nun untersucht, welche Rolle Unc13 bei PHP spielt. Mithilfe hochauflösender STED Mikroskopie und neuer Algorithmen zur Charakterisierung der synaptischen Ultrastruktur zeigten wir, dass Synapsen während PHP schnell umgestaltet werden können und zwei Phasen der Potenzierung zeitlich unterschieden werden können, die beide von Unc13 abhängen (Bohme et al., 2019): Die schnelle Komponente führt zur Potenzierung innerhalb von Minuten und beruht auf dem verfügbaren präsynaptischen Material. Zeitgleich kommt es jedoch auch zu einer Inkorporation zusätzlichen synaptischen Materials, was nötig ist, um die Potenzierung über einen Zeitraum von Stunden bis Tagen aufrechtzuerhalten (Bohme et al., 2019). Unsere Arbeit identifizierte eine essenzielle Rolle von Unc13 für beide Phasen der PHP. Darüber hinaus zeigten wir, dass eine selektive Manipulation von Unc13 im Fliegenhirn die Gedächtnisbildung stört (Bohme et al., 2019) was darauf hindeutet, dass Unc13 ein zentrales Protein für mehrere Formen der synaptischen Plastizität ist.

Der nachfolgende Text entspricht dem originalsprachlichen Abstrakt der Arbeit „*Rapid active zone remodeling consolidates presynaptic potentiation*“ (Bohme et al., 2019), DOI <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08977-6>:

*“Neuronal communication across synapses relies on neurotransmitter release from presynaptic active zones (AZs) followed by postsynaptic transmitter detection. Synaptic plasticity homeostatically maintains functionality during perturbations and enables*

*memory formation. Postsynaptic plasticity targets neurotransmitter receptors, but presynaptic mechanisms regulating the neurotransmitter release apparatus remain largely enigmatic. By studying Drosophila neuromuscular junctions (NMJs) we show that AZs consist of nano-modular release sites and identify a molecular sequence that adds modules within minutes of inducing homeostatic plasticity. This requires cognate transport machinery and specific AZ-scaffolding proteins. Structural remodeling is not required for immediate potentiation of neurotransmitter release, but necessary to sustain potentiation over longer timescales. Finally, mutations in Unc13 disrupting homeostatic plasticity at the NMJ also impair short-term memory when central neurons are targeted, suggesting that both plasticity mechanisms utilize Unc13. Together, while immediate synaptic potentiation capitalizes on available material, it triggers the coincident incorporation of modular release sites to consolidate synaptic potentiation.”*

## **2.5 Schnelles Vesikel Priming ermöglicht Kurzzeitplastizität trotz heterogener Distanzen zwischen Freisetzungstellen und Kalziumkanälen**

Die Kurzzeitplastizitätseigenschaften einer Synapse sind für die zeitliche Verarbeitung eintreffender Informationen hochrelevant (Zucker and Regehr, 2002). Mechanistisch geht man davon aus, dass synaptische Depression typischerweise dann auftritt, wenn das erste AP einen Großteil des RRP freisetzt (wenn  $pV_r$  groß ist) und zwischen den beiden Stimuli nicht genügend Zeit ist, um den RRP wieder aufzufüllen (Zucker and Regehr, 2002). Auch postsynaptische Mechanismen sind bekannt, wenn z.B. die NT Rezeptoren desensibilisieren, kommt es zu einer Abschwächung der synaptischen Übertragung mit dem zweiten AP (Koike-Tani et al., 2008). Synaptische Fazilitierung wird dahingegen oft beobachtet, wenn das initiale AP nur einen kleinen Teil des RRP freisetzt (wenn  $pV_r$  klein ist), es dann aber mit dem zweiten AP zu einer Steigerung der Übertragungsstärke kommt (Jackman and Regehr, 2017). Dies könnte beispielsweise auf eine starke Erhöhung von  $pV_r$  zum zweiten AP zurückzuführen sein.  $pV_r$  hängt stark von der intrazellulären Kalziumkonzentration ab, weshalb Mechanismen, die aktivitätsbedingt den Kalziumeinstrom erhöhen, zur Fazilitierung beitragen können (Catterall et al., 2013). Auch bei gleichbleibendem Kalziumstrom führt die wiederholte Aktivierung der Synapse durch ein AP zu einer Anreicherung der intrazellulären Kalziumkonzentration, weshalb auch initial davon ausgegangen wurde, dass dies zur Fazilitierung führt (Katz and Miledi, 1968). Allerdings gibt es in der Synapse viele Moleküle, die Kalzium binden und diese agieren als Kalziumpuffer (die reversibel Kalzium binden und wieder freisetzen)(Helmchen et al., 1997). Die Bindung von Kalzium an Synaptotagmin (das die Vesikelfusion auslöst) steht also im Wettbewerb mit den vielen anderen Kalziumbindenden Proteinen/Molekülen. Dies führt dazu, dass der Anstieg der Kalziumkonzentration in Folge eines APs räumlich und zeitlich sehr stark begrenzt ist (Bohme et al., 2018; Eggermann et al., 2012; Meinrenken et al., 2002; Neher and Augustine, 1992). Da die

Affinität Synaptotagmins/des vesikulären Fusionssensors für Kalzium relativ niedrig ist, ist vor allem der transiente ( $<1$  ms) Anstieg der freien Kalziumkonzentration für die NT Ausschüttung verantwortlich (Schneggenburger and Neher, 2000). Danach fällt die Kalziumkonzentration auf einen um einige hundert nanomolar erhöhten Wert herab, bis Kalziumpumpen und Transportprozesse die basale Kalziumkonzentration von etwa 30-90 nM mit einer Zeitkonstante von einigen hundert Millisekunden wieder einstellen (Helmchen et al., 1997). Die temporäre Erhöhung der Kalziumkonzentration nach dem AP passt also zwar zum zeitlichen Profil der Kurzzeitplastizität, allerdings ist die Kalziumkonzentration nach der Transiente zu gering erhöht, um direkt maßgeblich auf den vesikulären Fusionssensor/Synaptotagmin wirken zu können (dessen Affinität im zehnstelligen mikromolaren Bereich liegt (Schneggenburger and Neher, 2000; Sun et al., 2007)). Daher wurde angenommen, dass es spezielle Kalziumsensoren für Kurzzeitplastizität gibt, die höhere Bindungsaffinitäten haben und durch dieses „residuale“ Kalzium aktiviert werden können (Jackman and Regehr, 2017). Eine Möglichkeit hierfür ist das Protein Synaptotagmin-7, das Kalzium mit einer höheren Affinität bindet und genetische Experimente legen nahe, dass es eine Funktion in Kurzzeitfazilitierung hat (Jackman et al., 2016; Sugita et al., 2002) (was allerdings für die neuromuskuläre Endplatte in *Drosophila* nicht bestätigt werden konnte (Guan et al., 2020)).

Wie könnte ein solcher „Fazilitierungssensor“ mechanistisch wirken? Eine Möglichkeit ist, dass dieser  $pV_r$  auf der Millisekunden Zeitskala erhöht. In der Tat konnten mathematische Modelle, in denen Synaptotagmin-7  $pV_r$  reguliert, synaptische Fazilitierung vorhersagen (Jackman and Regehr, 2017). Allerdings wurde in diesen Modellen davon ausgegangen, dass alle vesikulären Freisetzungstellen, das gleiche  $pV_r$  (den gleichen Abstand vom Kalziumkanal) hätten (Jackman and Regehr, 2017). Allerdings ist unklar, ob diese Situation realistisch ist denn es war bisher in den meisten Modellsystemen experimentell sehr schwierig, die Topologie der synaptischen Freisetzungstellen und der beteiligten



Kalziumkanäle quantitativ auf der relevanten Nanometerskala zu untersuchen, was nicht zuletzt auch daran lag, dass keine molekularen Marker für die Freisetzungstellen bekannt waren.

Da wir durch die vorigen Studien Unc13 als zentralen Bestandteil der Freisetzungstellen identifiziert hatten (siehe 2.2, 2.4), konnten wir in der nächsten Studie die Verteilung der Freisetzungstellen und deren Kopplungsdistanzen zu den spannungsgesteuerten Kalziumkanälen an der neuromuskulären Endplatte der *Drosophila melanogaster* Larve quantitativ beschreiben. Dies zeigte eine deutlich heterogene Verteilung der Kopplungsdistanzen, was zu sehr unterschiedlichen  $pV_r$  Werten an unterschiedlichen Freisetzungstellen führt (Kobbersmed et al., 2020). Stochastische Simulationen wurden genutzt, um das Verhalten der Synapse während der Kurzzeitplastizität vorherzusagen. Dies offenbarte Schwierigkeiten vor allem im Kontext der synaptischen Fazilitierung. Es konnte gezeigt werden, dass die heterogenen Kopplungsdistanzen es unmöglich machen, experimentell beobachtete synaptische Fazilitierung allein durch eine Regulation von  $pV_r$  nachzustellen, auch nicht wenn ein Fazilitierungssensor (wie Synaptotagmin-7) zusammen mit Synaptotagmin-1  $pV_r$  reguliert (Kobbersmed et al., 2020). Zudem erzeugte ein solches Modell mit zwei unabhängigen Fusionssensoren zu viel Variabilität in der synaptischen Übertragung (Kobbersmed et al., 2020). Hingegen konnte gezeigt werden, dass eine kalzium-sensitive Regulierung der synaptischen Freisetzungstellen (also eine schnelle Veränderung von „N“) sowohl die experimentell beobachteten Eigenschaften der Kurzzeitplastizität und der Variabilität abbildet (Kobbersmed et al., 2020). Auf Grund unserer Resultate postulieren wir daher ein Modell in dem ein Fazilitierungssensor (wie Synaptotagmin-7) eher „N“ als „p“ reguliert um Kurzzeitplastizität zu modulieren.

Der nachfolgende Text entspricht dem originalsprachlichen Abstrakt der Arbeit „*Rapid regulation of vesicle priming explains synaptic facilitation despite heterogeneous vesicle:Ca<sup>2+</sup> channel distances*“, DOI <https://doi.org/10.7554/eLife.51032>:

*“Chemical synaptic transmission relies on the Ca<sup>2+</sup>-induced fusion of transmitter-laden vesicles whose coupling distance to Ca<sup>2+</sup> channels determines synaptic release probability and short-term plasticity, the facilitation or depression of repetitive responses. Here, using electron- and super-resolution microscopy at the Drosophila neuromuscular junction we quantitatively map vesicle:Ca<sup>2+</sup> channel coupling distances. These are very heterogeneous, resulting in a broad spectrum of vesicular release probabilities within synapses. Stochastic simulations of transmitter release from vesicles placed according to this distribution revealed strong constraints on short-term plasticity; particularly facilitation was difficult to achieve. We show that postulated facilitation mechanisms operating via activity-dependent changes of vesicular release probability (e.g. by a facilitation fusion sensor) generate too little facilitation and too much variance. In contrast, Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanisms rapidly increasing the number of releasable vesicles reliably reproduce short-term plasticity and variance of synaptic responses. We propose activity-dependent inhibition of vesicle un-priming or release site activation as novel facilitation mechanisms.”*

### 3 Diskussion

In den hier dargestellten Arbeiten wurde die vesikuläre Freisetzung von Neurotransmittern physiologisch untersucht. Zunächst wurde in einer theoretischen Arbeit (2.1) etabliert, dass die zwei typischen kinetischen Phasen der schnellen ( $<1$  s) Transmitterfreisetzung aus adrenergen chromaffinen Zellen durch eine sequenzielle Reaktion der Vesikel erklärt werden können (Walter et al., 2013). Dies könnte bedeuten, dass sich die augenscheinlich schneller freigesetzten Vesikel nicht grundsätzlich von den langsameren unterscheiden (wie es in klassischen PPM der Falls ist (Voets, 2000; Voets et al., 1999)), sondern nur im momentanen Stadium, da die langsameren erst durch eine vorgeschaltete Reaktion zur schnellen Fusion reifen. In diesem Fall könnten alle an Freisetzungstellen gedockten Vesikel biochemisch ähnlich sein (z.B. die gleiche Kalziumaffinität haben). Diese mögliche Homogenität der Freisetzungstellen zeigte sich bei „uncaging“ Experimente mit gleichförmiger Erhöhung der Kalziumkonzentration, berücksichtigt aber nicht deren heterogene Kopplungsdistanzen zu spannungsgesteuerten Kalziumkanälen, was in 2.5 und in (Bohme et al., 2016) untersucht wurde. In der Tat wurden auch seither sequenzielle Modelle für die Freisetzung von Neurotransmittern in der Calyx von Held Synapse von Ratten postuliert, wo Vesikel in einer „superpriming“ Reaktion zu besonders hoher Freisetzungswahrscheinlichkeit reifen (Lee et al., 2013; Taschenberger et al., 2016). Interessanterweise scheint (M)Unc13 eine besondere Rolle in der „superpriming“ Reaktion zu spielen (Lee et al., 2013), welches wir als zentralen Bestandteil der vesikulären Freisetzungstellen identifizierten (2.2).

Die Etablierung Unc13s als essenzieller Bestandteil der synaptischen Freisetzungstellen an der *Drosophila melanogaster* neuromuskulären Endplatte (2.2)(Reddy-Alla et al., 2017) war wichtig für die weiteren Studien zur synaptischen Plastizität (2.4, 2.5)(Bohme et al., 2019; Kobbersmed et al., 2020). Dass (M)Unc13 eine zentrale Rolle in der

Transmitterausschüttung zukommt war bereits aus klassischen Experimenten in mehreren Modellsystemen bekannt (Aravamudan et al., 1999; Augustin et al., 1999; Richmond et al., 1999; Varoqueaux et al., 2002). Jüngere Studien belegten zudem die Wichtigkeit der präzisen subsynaptischen Lokalisierung sowie die Anreicherung in diskreten Nanoclustern (Bohme et al., 2016; Bohme et al., 2019; Hu et al., 2013; Sakamoto et al., 2018; Zhou et al., 2013), wie man es von synaptischen Freisetzungstellen erwarten würde. Unsere Experimente zeigten, dass die Positionen der gedockten Vesikel mit der subsynaptischen Verteilung und die Synapsenstärke mit der Menge von Unc13 korreliert (Reddy-Alla et al., 2017). Zudem zeigte sich ein kausaler Zusammenhang, denn die Manipulation synaptischen Unc13s veränderte die Freisetzungstellen (Reddy-Alla et al., 2017). Kurz nach der Publikation unserer Erkenntnisse im Modellsystem *Drosophila melanogaster* wurde die Rolle des homologen Proteins Munc13 für die Bildung synaptischer Freisetzungstellen in hippokampalen Mauseuronen bestätigt (Sakamoto et al., 2018), weshalb man von einer evolutionär konservierten Funktion ausgehen kann.

Mittels einer neuen Methode, dem Lipid-uncaging zeigten wir, dass erhöhte Mengen an PI(4,5)P<sub>2</sub> die Transmitterausschüttung in Maus chromaffinen Zellen potenzieren und identifizierten in genetischen Experimenten mehrere essentielle Proteine hierfür (2.3) (Walter et al., 2017). Unter den bekannten PI(4,5)P<sub>2</sub>-bindenden Proteinen der vesikulären Freisetzungsmaschinerie waren (M)Unc13 (genauer: Munc13-2) und der Kalziumsensor Synaptotagmin-1 für die Potenzierung essentiell. Im Gegensatz dazu konnten wir zeigen, dass das PI(4,5)P<sub>2</sub>-bindende Docking und Priming Protein CAPS (Hammarlund et al., 2008; Loyet et al., 1998) für die Potenzierung entbehrlich war (Walter et al., 2017). Mehr noch: PI(4,5)P<sub>2</sub>-uncaging schien den Effekt, der durch den Verlust von CAPS entstanden war zu kompensieren. Ohne CAPS ist die Neurosekretion aus chromaffinen Zellen reduziert (Liu et al., 2008), was durch PI(4,5)P<sub>2</sub>-uncaging vollständig kompensiert wurde (Walter et al., 2017). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass eine Erhöhung von PI(4,5)P<sub>2</sub> (in diesem Falle

mittels uncaging) an der vesikulären Freisetzungsstelle die Notwendigkeit von CAPS umgeht. Somit lassen sich zwei Hauptmechanismen für PI(4,5)P<sub>2</sub>-bindende Proteine im sekretorischen Pathway postulieren: Zum einen scheint es Proteine zu geben die PI(4,5)P<sub>2</sub> stöchiometrisch für ihre Funktion binden müssen (wie Synaptotagmin und (M)Unc13). Zum anderen gibt es solche (wie CAPS), die PI(4,5)P<sub>2</sub> zu den Freisetzungsstellen rekrutieren, damit dieses Signallipid dort für die zuerst genannten essenziellen Interaktionen (mit Synaptotagmin/(M)Unc13) zur Verfügung steht (Walter et al., 2017).

Unsere Experimente legen nahe, dass eine akute Aktivierung von (M)Unc13 durch PI(4,5)P<sub>2</sub> uncaging die Transmitterfreisetzung potenzieren kann (Walter et al., 2017). Da (M)Unc13 zentraler Bestandteil der vesikulären Freisetzungsstellen ist (2.2) (Reddy-Alla et al., 2017; Sakamoto et al., 2018), könnte dies bedeuten, dass PI(4,5)P<sub>2</sub> sehr schnell die Aktivierung oder Besetzung der Freisetzungsstellen reguliert. Die Studie 2.4 legt ebenfalls nahe, dass (M)Unc13/Transmitter Freisetzungsstellen Targets synaptischer Potenzierung ist/sind (allerdings auf einer längeren Zeitskala). Dort entdeckten wir, dass Unc13 PHP vermittelt (Bohme et al., 2019). Wir identifizieren eine hierarchische Sequenz molekularer Reaktionen, die eine Erhöhung der Neurotransmitterfreisetzung ermöglichen. Mithilfe der hochauflösenden STED Mikroskopie und neuer Algorithmen zur Bildanalyse untersuchten wir die Ultrastruktur von Synapsen und zeigten, dass diese sich während PHP innerhalb von Minuten umgestalten (Bohme et al., 2019; Goel et al., 2019). Letzteres ging mit der Zunahme synaptischen Materials (RBP, BRP, Unc13) im Zentrum der Synapse einher (Bohme et al., 2019). Ähnliche Beobachtungen wurden in diesem Modellsystem auch von anderen Forschergruppen gemacht (Gratz et al., 2019; Weyhermuller et al., 2011). Interessanterweise scheint diese strukturelle Veränderung jedoch nicht für die unmittelbare Potenzierung nötig zu sein, denn genetisch veränderte Fliegen, in denen diese geblockt war, zeigten dennoch robustes PHP auf der Minutenskala (Bohme et al., 2019). Hingegen hatten diese Fliegen ein Problem, langfristige Störungen (ebenfalls genetisch) zu kompensieren, was dafür spricht,

dass PHP nicht über längere Zeit aufrechterhalten werden konnte. Auf beiden Zeitskalen war (M)Unc13 essenziell (Bohme et al., 2019). Dies spricht dafür, dass akute PHP über eine Aktivierung/höhere Besetzung (z.B. durch PI(4,5)P<sub>2</sub>, siehe 2.3) existierender Freisetzungstellen verläuft, langfristig jedoch weitere (M)Unc13 Nanocluster integriert werden müssen, um die Potenzierung aufrechtzuerhalten (Bohme et al., 2019). Da im Zuge der langfristigen Potenzierung zusätzliches Material im Zentrum der Synapsen akkumuliert, lässt sich weiterhin spekulieren, dass diese Synapsen womöglich zudem durch eine akute Aktivierung/höhere Besetzung der Freisetzungstellen zusätzlich potenziert werden können.

Neben einer zentralen Funktion Unc13s während PHP könnte eine schnelle Regulation von (M)Unc13/der synaptischen Freisetzungstellen auf der Millisekunden Zeitskala auch für Kurzzeitplastizität relevant sein, wie unsere Arbeit 2.5 nahelegt. AP-induzierte präsynaptische Kalziumtransienten, die die Vesikelexozytose an Freisetzungstellen steuern, sind kurzlebig und räumlich auf eine Mikro-/Nanodomäne um die Kalziumkanäle beschränkt (Bohme et al., 2018; Neher and Sakaba, 2008; Stanley, 2016). Durch die Anwesenheit vieler kalziumbindender Moleküle besteht an Synapsen eine hohe Pufferkapazität für Kalzium, so dass die Erhöhung der Kalziumkonzentration sehr kurzlebig ist (sub-Millisekunden Zeitskala) und nur in räumlicher Nähe (sub-Mikrometer Skala) zu den spannungsgesteuerten Kalziumkanälen groß genug ausfällt, um ausreichende Konzentrationen zu erreichen, um den vesikulären Kalziumsensor (Synaptotagmin) zu aktivieren (Borst and Sakmann, 1996; Guerrier and Holcman, 2018; Helmchen et al., 1997; Klingauf and Neher, 1997; Meinrenken et al., 2002; Nakamura et al., 2015; Naraghi and Neher, 1997; Neher and Augustine, 1992; Scott and Rusakov, 2006; Stern, 1992). Berücksichtigt man zudem, dass dieser Sensor mit fünffacher Kooperativität Kalzium bindet, ergibt sich ein äußerst steiles räumliches pV<sub>r</sub> Profil (Bohme et al., 2018; Eggermann et al., 2012; Keller et al., 2015; Meinrenken et al., 2002). Daher besteht ein großes Interesse darin, die genauen topologischen Beziehungen zwischen spannungsgesteuerten Kalziumkanälen und vesikulären Freisetzungstellen quantitativ zu

bestimmen. Allerdings ist dies experimentell sehr schwierig, was nicht zuletzt an den begrenzten Methoden liegt, mit denen die relevanten Distanzen auf der Nanometerskala gemessen werden können. Auch war es lange Zeit schwierig, Kalziumkanäle zu markieren, ohne deren Funktion zu beeinträchtigen. Zudem war die molekulare Zusammensetzung der Neurotransmitter Freisetzungstellen ebenfalls lange unbekannt. Ein nützlicher Ansatz war jedoch die computerbasierte Simulation der synaptischen Kalziumtransienten kombiniert mit der mathematische Modellierung der Transmitterfreisetzung um diese Beziehung abzuschätzen (Bollmann et al., 2000; Meinrenken et al., 2002; Schneggenburger and Neher, 2000). Diese Ansätze wurden in den letzten Jahren weiter verfeinert, und ermöglichten eine genauere Abschätzung der topologischen Beziehungen, beispielsweise durch Manipulation der Kalziumpuffer und der quantitativen Beschreibung der Positionen von (jeweils) den Kalziumkanälen und/oder gedockten Vesikeln (Arai and Jonas, 2014; Keller et al., 2015; Nakamura et al., 2015; Pangrsic et al., 2015; Reddy-Alla et al., 2017; Schmidt et al., 2013; Vyleta and Jonas, 2014).

Da wir in 2.2 Unc13 als molekularen Marker der Neurotransmitter Freisetzungstellen identifizieren konnten und die Positionierung der spannungsgesteuerten Kalziumkanäle im Zentrum der Synapsen der Neuromuskulären Endplatte bekannt sind (Bohme et al., 2016; Fouquet et al., 2009; Reddy-Alla et al., 2017), konnte in 2.5 deren Distanzprofil direkt quantitativ beschrieben werden. Eine Analyse mittels hochauflösender STED-Mikroskopie zeigte ähnliche Kopplungsdistanzen zwischen (M)Unc13 und den spannungsgesteuerten Kalziumkanälen wie die elektronenmikroskopische Analyse der Distanzen gedockter Vesikel zum Synapsenzentrum (wo die spannungsgesteuerten Kalziumkanäle anzufinden sind (Fouquet et al., 2009)) (Kobbersmed et al., 2020). Die von uns erhobenen Daten legen nahe, dass anders als in klassischen Simulationsstudien angenommen (Bohme et al., 2016; Meinrenken et al., 2002; Nakamura et al., 2015), die Verteilung der Kopplungsdistanzen sehr heterogen ist (Kobbersmed et al., 2020). Daraus resultiert eine stark heterogene

Freisetzungswahrscheinlichkeit der so verteilten Freisetzungstellen. Mittels stochastischer Simulationen konnten wir zeigen, dass dies direkte Effekte auf die Kurzzeitplastizität der Synapse hat, was hier vor allem die Fazilitierung betraf. Unterschiedliche Modelle der KZF wurden untersucht und mit Experimentaldaten verglichen. Wir konnten zeigen, dass angesichts heterogener Freisetzungswahrscheinlichkeiten KZF Modelle, denen lediglich eine Erhöhung von  $pV_r$  als Fazilitierungsmechanismus zu Grunde liegt, nicht in Einklang mit den experimentellen Beobachtungen gebracht werden konnten. Zweierlei Probleme traten hierbei zu Tage: Zum einen fiel die Fazilitierung in diesen Modellen viel schwächer aus als experimentell beobachtet, zum anderen sagten diese Modelle eine viel höhere Variabilität der synaptischen Signale voraus als im Experiment gemessen wurde. Daher postulierten wir einen alternativen Mechanismus: Eine schnelle, Kalziumvermittelte Aktivierung/Besetzung von Freisetzungstellen. Solch ein Mechanismus zeigte sich in Simulationen als gut geeignet, um die experimentell beobachtete KZF und synaptische Variabilität in Einklang mit der natürlichen Heterogenität der Kopplungsdistanzen zu bringen (Kobbersmed et al., 2020). Da ein ähnlicher KFZ Mechanismus kürzlich für zentrale Säugetiersynapsen gezeigt wurde (Malagon et al., 2020), könnte dies ein über Speziesgrenzen hinweg konservierter Mechanismus sein.

Die hier vorgestellten experimentellen und theoretischen Arbeiten beschreiben den prinzipiellen Aufbau und die physiologischen Eigenschaften der vesikulären Freisetzungstellen für chemische Transmitter, die auch eine wichtige Rolle in der zeitlichen Regulation der Übertragungsstärke spielen. (M)Unc13 wurde als essentielles Protein der Freisetzungstellen identifiziert (2.2). Das in 2.1 vorgestellte SPM postuliert eine wichtige Rolle einer Kalziumabhängigen Reaktion in der Transmitterfreisetzung bevor Synaptotagmin Kalziumabhängig die Vesikelfusion auslöst. Mechanistisch könnte dies mit einer Kalziumvermittelten Besetzung der Freisetzungstellen einhergehen und in 2.1 eine postulierte ich hierfür eine katalytische/kinetische Funktion postulierte. In 2.5 postulierte ich hingegen



eine stabilisierende/thermodynamische Funktion. Beide Mechanismen sind denkbar und schließen sich nicht gegenseitig aus. In der Tat wurden in jüngeren Studien Hinweise auf beide Funktionen im Hinblick auf (M)Unc13 erbracht, denn es wurde gezeigt, dass es die Bildung des neuronalen SNARE Komplex katalysiert und diesen darüber hinaus stabilisiert (He et al., 2017; Ma et al., 2013).

Die Studien in 2.3, 2.4 und 2.5 zeigten, dass (M)Unc13 auf verschiedenen Zeitskalen reguliert werden kann, um die Transmitterausschüttung zu modulieren: Innerhalb von Millisekunden könnte eine Veränderung der Aktivität/Besetzung der Freisetzungstellen zur synaptischen KZF beitragen (2.5). Auf einer ähnlichen Zeitskala erhöht PI(4,5)P<sub>2</sub> innerhalb von Sekunden abhängig von (M)Unc13 die Transmitterfreisetzung aus chromaffinen Zellen (2.3). Hingegen erhöht PHP durch zwei unterscheidbare -aber jeweils Unc13-abhängige- Mechanismen die Transmitterausschüttung innerhalb von Minuten und konsolidiert dies über Stunden und Tage (2.4). Evolutionär sind neben der MUN Domäne, die für die Vesikelfusion essentiell ist (Basu et al., 2005; Stevens et al., 2005) auch regulatorische Domänen hochkonserviert (Bohme et al., 2018; Dittman, 2019). Diese vermitteln Interaktionen mit Proteinen der synaptischen Zytomatrix (RIM, RBP, BRP), Kalzium/Calmodulin und den Signallipiden DAG und PI(4,5)P<sub>2</sub>. Diese Domänen sind sowohl für die grundlegende Transmitterfreisetzung als auch für deren plastische Regulierung essentiell (Basu et al., 2005; Camacho et al., 2017; Deng et al., 2011; Dulubova et al., 2005; Junge et al., 2004; Kawabe et al., 2017; Lipstein et al., 2013; Liu et al., 2016; Michelassi et al., 2017; Sakamoto et al., 2018; Shin et al., 2010; Stevens et al., 2005; Yang et al., 2015). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl die Zeitspannen auf denen (M)Unc13 reguliert wird, als auch die molekularen Signale, die dies auslösen (Kalzium, Signallipide) und deren Ursprung (prä- und postsynaptisch) äußerst divers sind. Dies legt eine ungewöhnliche Konvergenz diverser regulatorischer Routen auf dieses zentrale synaptische Protein nahe, das besonders geeignet scheint, als synaptischer „gatekeeper“ die Transmitterfreisetzung dynamisch zu steuern.

## 4 Zusammenfassung

In den hier vorgestellten Forschungsarbeiten widme ich mich den Freisetzungstellen für chemische Transmitter in zwei Modellsystemen, Maus chromaffinen Zellen und der Neuromuskulären Endplatte von *Drosophila melanogaster* Larven.

In der Studie 2.1 entwickelte ich ein neues quantitatives mathematisches Modell, das detaillierte Einblicke in die Reaktionsgeschwindigkeiten und molekularen Abhängigkeiten der Transmitterfreisetzung lieferte. In diesem Model wurde die Hypothese getestet, ob sequenzielle, Kalziumkatalysierte Reaktionen im Vesikel Priming ursächlich für die beobachtete biphasische Freisetzung des RRP sein können, was der Fall ist. Im Vergleich zu klassischen Modellen mit zwei unabhängigen (parallelen) Fusionsreaktionen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit waren beide Modelle ähnlich gut geeignet, um die Transmitterfreisetzung aus wildtypischen Maus chromaffinen Zellen zu beschreiben. Allerdings konnten durch das neue, sequenzielle Modell, Effekte der Mutation des vesikulären SNARE Proteins Synaptobrevin-2 etwas leichter (durch die Anpassung weniger Parameter) interpretiert werden und die Kalzium-beschleunigte Wiederauffüllung des RRP nach einem Stimulus genauer vorhergesagt werden.

In der Studie 2.2 identifizieren wir die molekulare Identität von synaptischen Freisetzungstellen an der glutamatergen neuromuskulären Endplatte von *Drosophila melanogaster* Larven. Diese Freisetzungstellen limitieren die Neurotransmitterfreisetzung. Obwohl ihre Existenz über 50 Jahre bekannt war, war ihre molekulare Identität unbekannt geblieben. Mit Hilfe von genetischen Experimenten, elektrophysiologischen Messungen, Lebendmikroskopie und hochauflösender Mikroskopie beschreiben wir eine essentielle Rolle des evolutionär konservierten (M)Unc13 Proteins hierfür.

In der Studie 2.3 identifizieren wir eine hierarchische Sequenz molekularer Reaktionen, die eine Erhöhung der Neurotransmitterfreisetzung ermöglichen. An der

*Drosophila melanogaster* neuromuskulären Endplatte zeigen wir, dass PHP von (M)Unc13 abhängt. Mit Hilfe hochauflösender Mikroskopie und neuer Algorithmen zur Untersuchung der Ultrastruktur von Synapsen entdeckten wir, dass Synapsen während PHP schnell umgestaltet werden können und zeitlich zwei Potenzierungsphasen unterschieden werden können: Die schnelle Potenzierung beruht zunächst auf dem verfügbaren präsynaptischen Material. Aber dann erfolgt innerhalb von Minuten die zusätzliche Inkorporation mehrerer Proteine ins Zentrum der Synapsen. Dies ist erforderlich, um die Potenzierung über einen Zeitraum von Stunden bis Tagen aufrechtzuerhalten. Wir zeigen, dass sowohl die akute als auch die langanhaltende Phase der PHP von Unc13 abhängen und dass die selektive Manipulation Unc13s im Fliegenhirn die Gedächtnisbildung stört, was darauf hindeutet, dass dieses Protein in mehreren Formen der Plastizität fungiert, einschließlich derjenigen, die zum Lernen benötigt werden.

In der Studie 2.4 stellen wir das erste schnelle und lichtinduzierte Lipid-Uncaging des Signallipids PI(4,5)P<sub>2</sub> vor. Dies wurde mit schnellen elektrophysiologischen Aufzeichnungen der Neurosekretion kombiniert. Wir zeigten eine rasche Regulation (<1 s) der Transmitterfreisetzung durch PI(4,5)P<sub>2</sub> und identifizierten in genetischen Experimenten Synaptotagmin und (M)Unc13 als essentielle Proteine dafür.

In der Studie 2.5 untersuchten wir quantitativ die Verteilung der Distanzen zwischen synaptischen Freisetzungsstellen und spannungsgesteuerten Kalziumkanälen. Wir konnten zeigen, dass die Verteilung stark heterogen ist und dass dies direkte Effekte auf Kurzzeitplastizität an der Synapse hat. Mittels stochastischer Simulationen wurden unterschiedliche Modelle der KZF untersucht und mit Experimentaldaten verglichen. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die Variabilität synaptischer Antworten und KZF am ehesten durch eine schnelle Regulation der partizipierenden synaptischen Freisetzungsstellen erklärbar sind.

Durch die hier vorgestellten Studien wurden viele Erkenntnisse zum molekularen Aufbau, der Funktion und Regulation synaptischer Freisetzungstellen gewonnen. Anders als zunächst erwartet, zeichnet sich zum jetzigen Zeitpunkt ab, dass Freisetzungstellen hochdynamisch durch Kalzium und Signallipide reguliert werden können. Zukünftige Studien können physiologisch wichtige Erkenntnisse zu den molekularen Mechanismen liefern und wie diese synaptische Transmission auf verschiedenen Zeitskalen für Signalverarbeitung, Homöostase und Gedächtnisbildung modulieren.

## 5 Literaturangaben

Abbott, L.F., and Regehr, W.G. (2004). Synaptic computation. *Nature* 431, 796-803.

Ackermann, F., Waites, C.L., and Garner, C.C. (2015). Presynaptic active zones in invertebrates and vertebrates. *EMBO Rep* 16, 923-938.

Arai, I., and Jonas, P. (2014). Nanodomain coupling explains  $\text{Ca}^{2+}$  independence of transmitter release time course at a fast central synapse. *Elife* 3.

Aravamudan, B., Fergestad, T., Davis, W.S., Rodesch, C.K., and Broadie, K. (1999). *Drosophila* UNC-13 is essential for synaptic transmission. *Nat Neurosci* 2, 965-971.

Atwood, H.L., and Karunanithi, S. (2002). Diversification of synaptic strength: presynaptic elements. *Nat Rev Neurosci* 3, 497-516.

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

Basu, J., Betz, A., Brose, N., and Rosenmund, C. (2007). Munc13-1 C1 domain activation lowers the energy barrier for synaptic vesicle fusion. *J Neurosci* 27, 1200-1210.

Basu, J., Shen, N., Dulubova, I., Lu, J., Guan, R., Guryev, O., Grishin, N.V., Rosenmund, C., and Rizo, J. (2005). A minimal domain responsible for Munc13 activity. *Nat Struct Mol Biol* 12, 1017-1018.

Bohme, M.A., Beis, C., Reddy-Alla, S., Reynolds, E., Mampell, M.M., Grasskamp, A.T., Lutzkendorf, J., Bergeron, D.D., Driller, J.H., Babikir, H., *et al.* (2016). Active zone scaffolds differentially accumulate Unc13 isoforms to tune  $\text{Ca}^{2+}$  channel-vesicle coupling. *Nat Neurosci* 19, 1311-1320.

Bohme, M.A., Grasskamp, A.T., and Walter, A.M. (2018). Regulation of synaptic release-site  $\text{Ca}^{2+}$  channel coupling as a mechanism to control release probability and short-term plasticity. *FEBS Lett*, 3516-3531.

Bohme, M.A., McCarthy, A.W., Grasskamp, A.T., Beuschel, C.B., Goel, P., Jusyte, M., Laber, D., Huang, S., Rey, U., Petzoldt, A.G., *et al.* (2019). Rapid active zone remodeling consolidates presynaptic potentiation. *Nat Commun* 10, 1085.

- Bollmann, J.H., Sakmann, B., and Borst, J.G. (2000). Calcium sensitivity of glutamate release in a calyx-type terminal. *Science* 289, 953-957.
- Borst, J.G., and Sakmann, B. (1996). Calcium influx and transmitter release in a fast CNS synapse. *Nature* 383, 431-434.
- Brose, N., Petrenko, A.G., Sudhof, T.C., and Jahn, R. (1992). Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* 256, 1021-1025.
- Burgalossi, A., Jung, S., Meyer, G., Jockusch, W.J., Jahn, O., Taschenberger, H., O'Connor, V.M., Nishiki, T., Takahashi, M., Brose, N., and Rhee, J.S. (2010). SNARE protein recycling by alphaSNAP and betaSNAP supports synaptic vesicle priming. *Neuron* 68, 473-487.
- Camacho, M., Basu, J., Trimbuch, T., Chang, S., Pulido-Lozano, C., Chang, S.S., Duluvova, I., Abo-Rady, M., Rizo, J., and Rosenmund, C. (2017). Heterodimerization of Munc13 C2A domain with RIM regulates synaptic vesicle docking and priming. *Nat Commun* 8, 15293.
- Castillo, P.E. (2012). Presynaptic LTP and LTD of excitatory and inhibitory synapses. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
- Catterall, W.A., Leal, K., and Nanou, E. (2013). Calcium channels and short-term synaptic plasticity. *J Biol Chem* 288, 10742-10749.
- Chai, Y.J., Sierecki, E., Tomatis, V.M., Gormal, R.S., Giles, N., Morrow, I.C., Xia, D., Gotz, J., Parton, R.G., Collins, B.M., *et al.* (2016). Munc18-1 is a molecular chaperone for alpha-synuclein, controlling its self-replicating aggregation. *J Cell Biol* 214, 705-718.
- Citri, A., and Malenka, R.C. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33, 18-41.
- Clements, J.D., and Silver, R.A. (2000). Unveiling synaptic plasticity: a new graphical and analytical approach. *Trends Neurosci* 23, 105-113.
- Davis, G.W., and Goodman, C.S. (1998). Genetic analysis of synaptic development and plasticity: homeostatic regulation of synaptic efficacy. *Curr Opin Neurobiol* 8, 149-156.
- Davis, G.W., and Muller, M. (2015). Homeostatic control of presynaptic neurotransmitter release. *Annu Rev Physiol* 77, 251-270.

- de Jong, A.P., Meijer, M., Saarloos, I., Cornelisse, L.N., Toonen, R.F., Sorensen, J.B., and Verhage, M. (2016). Phosphorylation of synaptotagmin-1 controls a post-priming step in PKC-dependent presynaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 5095-5100.
- de Wit, H., Walter, A.M., Milosevic, I., Gulyas-Kovacs, A., Riedel, D., Sorensen, J.B., and Verhage, M. (2009). Synaptotagmin-1 docks secretory vesicles to syntaxin-1/SNAP-25 acceptor complexes. *Cell* 138, 935-946.
- Del Castillo, J., and Katz, B. (1954). Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol* 124, 560-573.
- Deng, L., Kaeser, P.S., Xu, W., and Sudhof, T.C. (2011). RIM proteins activate vesicle priming by reversing autoinhibitory homodimerization of Munc13. *Neuron* 69, 317-331.
- Dittman, J.S. (2019). Unc13: a multifunctional synaptic marvel. *Curr Opin Neurobiol* 57, 17-25.
- Dodge, F.A., Jr., and Rahamimoff, R. (1967). Co-operative action a calcium ions in transmitter release at the neuromuscular junction. *J Physiol* 193, 419-432.
- Dulubova, I., Lou, X., Lu, J., Huryeva, I., Alam, A., Schneggenburger, R., Sudhof, T.C., and Rizo, J. (2005). A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity? *EMBO J* 24, 2839-2850.
- Eggermann, E., Bucurenciu, I., Goswami, S.P., and Jonas, P. (2012). Nanodomain coupling between Ca<sup>2+</sup>(+) channels and sensors of exocytosis at fast mammalian synapses. *Nat Rev Neurosci* 13, 7-21.
- Fatt, P., and Katz, B. (1952). Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol* 117, 109-128.
- Fernandez, I., Arac, D., Ubach, J., Gerber, S.H., Shin, O., Gao, Y., Anderson, R.G., Sudhof, T.C., and Rizo, J. (2001). Three-dimensional structure of the synaptotagmin 1 C2B-domain: synaptotagmin 1 as a phospholipid binding machine. *Neuron* 32, 1057-1069.
- Fioravante, D., and Regehr, W.G. (2011). Short-term forms of presynaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 21, 269-274.

- Fouquet, W., Oswald, D., Wichmann, C., Mertel, S., Depner, H., Dyba, M., Hallermann, S., Kittel, R.J., Eimer, S., and Sigrist, S.J. (2009). Maturation of active zone assembly by *Drosophila* Bruchpilot. *J Cell Biol* 186, 129-145.
- Frank, C.A. (2014). Homeostatic plasticity at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Neuropharmacology* 78, 63-74.
- Frank, C.A., Kennedy, M.J., Goold, C.P., Marek, K.W., and Davis, G.W. (2006). Mechanisms underlying the rapid induction and sustained expression of synaptic homeostasis. *Neuron* 52, 663-677.
- Goel, P., Dufour Bergeron, D., Bohme, M.A., Nunnally, L., Lehmann, M., Buser, C., Walter, A.M., Sigrist, S.J., and Dickman, D. (2019). Homeostatic scaling of active zone scaffolds maintains global synaptic strength. *J Cell Biol* 218, 1706-1724.
- Grant, S.G. (2012). Synaptopathies: diseases of the synaptome. *Curr Opin Neurobiol* 22, 522-529.
- Gratz, S.J., Goel, P., Bruckner, J.J., Hernandez, R.X., Khateeb, K., Macleod, G.T., Dickman, D., and O'Connor-Giles, K.M. (2019). Endogenous Tagging Reveals Differential Regulation of Ca<sup>2+</sup> Channels at Single Active Zones during Presynaptic Homeostatic Potentiation and Depression. *J Neurosci* 39, 2416-2429.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y. (1985). A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260, 3440-3450.
- Guan, Z., Quinones-Frias, M.C., Akbergenova, Y., and Littleton, J.T. (2020). *Drosophila* Synaptotagmin 7 negatively regulates synaptic vesicle release and replenishment in a dosage-dependent manner. *Elife* 9.
- Guerrier, C., and Holcman, D. (2018). The First 100 nm Inside the Pre-synaptic Terminal Where Calcium Diffusion Triggers Vesicular Release. *Front Synaptic Neurosci* 10, 23.
- Gundelfinger, E.D., and Fejtova, A. (2012). Molecular organization and plasticity of the cytomatrix at the active zone. *Curr Opin Neurobiol* 22, 423-430.



- Hammarlund, M., Watanabe, S., Schuske, K., and Jorgensen, E.M. (2008). CAPS and syntaxin dock dense core vesicles to the plasma membrane in neurons. *J Cell Biol* 180, 483-491.
- He, E., Wierda, K., van Westen, R., Broeke, J.H., Toonen, R.F., Cornelisse, L.N., and Verhage, M. (2017). Munc13-1 and Munc18-1 together prevent NSF-dependent de-priming of synaptic vesicles. *Nat Commun* 8, 15915.
- Heidelberger, R., Heinemann, C., Neher, E., and Matthews, G. (1994). Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. *Nature* 371, 513-515.
- Heinemann, C., Chow, R.H., Neher, E., and Zucker, R.S. (1994). Kinetics of the secretory response in bovine chromaffin cells following flash photolysis of caged Ca<sup>2+</sup>. *Biophys J* 67, 2546-2557.
- Helmchen, F., Borst, J.G., and Sakmann, B. (1997). Calcium dynamics associated with a single action potential in a CNS presynaptic terminal. *Biophys J* 72, 1458-1471.
- Herring, B.E., and Nicoll, R.A. (2016). Long-Term Potentiation: From CaMKII to AMPA Receptor Trafficking. *Annu Rev Physiol* 78, 351-365.
- Hu, Z., Tong, X.J., and Kaplan, J.M. (2013). UNC-13L, UNC-13S, and Tomosyn form a protein code for fast and slow neurotransmitter release in *Caenorhabditis elegans*. *Elife* 2, e00967.
- Imig, C., Min, S.W., Krinner, S., Arancillo, M., Rosenmund, C., Sudhof, T.C., Rhee, J., Brose, N., and Cooper, B.H. (2014). The morphological and molecular nature of synaptic vesicle priming at presynaptic active zones. *Neuron* 84, 416-431.
- Jackman, S.L., and Regehr, W.G. (2017). The Mechanisms and Functions of Synaptic Facilitation. *Neuron* 94, 447-464.
- Jackman, S.L., Turecek, J., Belinsky, J.E., and Regehr, W.G. (2016). The calcium sensor synaptotagmin 7 is required for synaptic facilitation. *Nature* 529, 88-91.
- Jahn, R., and Fasshauer, D. (2012). Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature* 490, 201-207.

Jahn, R., and Scheller, R.H. (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 631-643.

Junge, H.J., Rhee, J.S., Jahn, O., Varoqueaux, F., Spiess, J., Waxham, M.N., Rosenmund, C., and Brose, N. (2004). Calmodulin and Munc13 form a Ca<sup>2+</sup> sensor/effector complex that controls short-term synaptic plasticity. *Cell* 118, 389-401.

Kaesler, P.S., and Regehr, W.G. (2017). The readily releasable pool of synaptic vesicles. *Curr Opin Neurobiol* 43, 63-70.

Kandel, E.R., Dudai, Y., and Mayford, M.R. (2014). The molecular and systems biology of memory. *Cell* 157, 163-186.

Kandel, E.R., Schwartz, J.H., and Jessel, T.M. (1991). *Principles of neural science* (London u.a.: Prentice-Hall).

Katz, B., and Miledi, R. (1968). The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol* 195, 481-492.

Kawabe, H., Mitkovski, M., Kaesler, P.S., Hirrlinger, J., Opazo, F., Nestvogel, D., Kalla, S., Fejtova, A., Verrier, S.E., Bungers, S.R., *et al.* (2017). ELKS1 localizes the synaptic vesicle priming protein bMunc13-2 to a specific subset of active zones. *J Cell Biol.*

Keller, D., Babai, N., Kochubey, O., Han, Y., Markram, H., Schurmann, F., and Schneggenburger, R. (2015). An Exclusion Zone for Ca<sup>2+</sup> Channels around Docked Vesicles Explains Release Control by Multiple Channels at a CNS Synapse. *PLoS Comput Biol* 11, e1004253.

Klingauf, J., and Neher, E. (1997). Modeling buffered Ca<sup>2+</sup> diffusion near the membrane: implications for secretion in neuroendocrine cells. *Biophys J* 72, 674-690.

Kobbersmed, J.R., Grasskamp, A.T., Jusyte, M., Bohme, M.A., Ditlevsen, S., Sorensen, J.B., and Walter, A.M. (2020). Rapid regulation of vesicle priming explains synaptic facilitation despite heterogeneous vesicle:Ca(2+) channel distances. *Elife* 9.

Koike-Tani, M., Kanda, T., Saitoh, N., Yamashita, T., and Takahashi, T. (2008). Involvement of AMPA receptor desensitization in short-term synaptic depression at the calyx of Held in developing rats. *J Physiol* 586, 2263-2275.

- Lazarevic, V., Pothula, S., Andres-Alonso, M., and Fejtova, A. (2013). Molecular mechanisms driving homeostatic plasticity of neurotransmitter release. *Front Cell Neurosci* 7, 244.
- Lee, J.S., Ho, W.K., Neher, E., and Lee, S.H. (2013). Superpriming of synaptic vesicles after their recruitment to the readily releasable pool. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 15079-15084.
- Lindau, M., and Neher, E. (1988). Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells. *Pflugers Arch* 411, 137-146.
- Lipstein, N., Sakaba, T., Cooper, B.H., Lin, K.H., Strenzke, N., Ashery, U., Rhee, J.S., Taschenberger, H., Neher, E., and Brose, N. (2013). Dynamic control of synaptic vesicle replenishment and short-term plasticity by Ca(2+)-calmodulin-Munc13-1 signaling. *Neuron* 79, 82-96.
- Lipstein, N., Verhoeven-Duif, N.M., Michelassi, F.E., Calloway, N., van Hasselt, P.M., Pienkowska, K., van Haften, G., van Haelst, M.M., van Empelen, R., Cuppen, I., *et al.* (2017). Synaptic UNC13A protein variant causes increased neurotransmission and dyskinetic movement disorder. *The Journal of Clinical Investigation* 127, 1005-1018.
- Liu, X., Seven, A.B., Camacho, M., Esser, V., Xu, J., Trimbuch, T., Quade, B., Su, L., Ma, C., Rosenmund, C., and Rizo, J. (2016). Functional synergy between the Munc13 C-terminal C1 and C2 domains. *Elife* 5.
- Liu, Y., Schirra, C., Stevens, D.R., Matti, U., Speidel, D., Hof, D., Bruns, D., Brose, N., and Rettig, J. (2008). CAPS facilitates filling of the rapidly releasable pool of large dense-core vesicles. *J Neurosci* 28, 5594-5601.
- Loyet, K.M., Kowalchuk, J.A., Chaudhary, A., Chen, J., Prestwich, G.D., and Martin, T.F. (1998). Specific binding of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate to calcium-dependent activator protein for secretion (CAPS), a potential phosphoinositide effector protein for regulated exocytosis. *J Biol Chem* 273, 8337-8343.
- Luscher, C., and Malenka, R.C. (2012). NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
- Ma, C., Su, L., Seven, A.B., Xu, Y., and Rizo, J. (2013). Reconstitution of the vital functions of Munc18 and Munc13 in neurotransmitter release. *Science* 339, 421-425.

- Mackler, J.M., Drummond, J.A., Loewen, C.A., Robinson, I.M., and Reist, N.E. (2002). The C(2)B Ca(2+)-binding motif of synaptotagmin is required for synaptic transmission in vivo. *Nature* 418, 340-344.
- Malagon, G., Miki, T., Tran, V., Gomez, L.C., and Marty, A. (2020). Incomplete vesicular docking limits synaptic strength under high release probability conditions. *Elife* 9.
- McLachlan, E.M. (1978). The statistics of transmitter release at chemical synapses. *Int Rev Physiol* 17, 49-117.
- McLaughlin, S., and Murray, D. (2005). Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature* 438, 605-611.
- Meijer, M., Dorr, B., Lammertse, H.C., Blithikioti, C., van Weering, J.R., Toonen, R.F., Sollner, T.H., and Verhage, M. (2018). Tyrosine phosphorylation of Munc18-1 inhibits synaptic transmission by preventing SNARE assembly. *EMBO J* 37, 300-320.
- Meinrenken, C.J., Borst, J.G., and Sakmann, B. (2002). Calcium secretion coupling at calyx of Held governed by nonuniform channel-vesicle topography. *J Neurosci* 22, 1648-1667.
- Michelassi, F., Liu, H., Hu, Z., and Dittman, J.S. (2017). A C1-C2 Module in Munc13 Inhibits Calcium-Dependent Neurotransmitter Release. *Neuron* 95, 577-590 e575.
- Miller, K.G., Emerson, M.D., and Rand, J.B. (1999). Gqalpha and diacylglycerol kinase negatively regulate the Gqalpha pathway in *C. elegans*. *Neuron* 24, 323-333.
- Monday, H.R., and Castillo, P.E. (2017). Closing the gap: long-term presynaptic plasticity in brain function and disease. *Curr Opin Neurobiol* 45, 106-112.
- Muller, M., Liu, K.S., Sigrist, S.J., and Davis, G.W. (2012). RIM controls homeostatic plasticity through modulation of the readily-releasable vesicle pool. *J Neurosci* 32, 16574-16585.
- Nagy, G., Matti, U., Nehring, R.B., Binz, T., Rettig, J., Neher, E., and Sorensen, J.B. (2002). Protein kinase C-dependent phosphorylation of synaptosome-associated protein of 25 kDa at Ser187 potentiates vesicle recruitment. *J Neurosci* 22, 9278-9286.

- Nakamura, Y., Harada, H., Kamasawa, N., Matsui, K., Rothman, J.S., Shigemoto, R., Silver, R.A., DiGregorio, D.A., and Takahashi, T. (2015). Nanoscale distribution of presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels and its impact on vesicular release during development. *Neuron* 85, 145-158.
- Naraghi, M., and Neher, E. (1997). Linearized buffered Ca<sup>2+</sup> diffusion in microdomains and its implications for calculation of [Ca<sup>2+</sup>] at the mouth of a calcium channel. *J Neurosci* 17, 6961-6973.
- Neher, E., and Augustine, G.J. (1992). Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 450, 273-301.
- Neher, E., and Sakaba, T. (2001). Combining deconvolution and noise analysis for the estimation of transmitter release rates at the calyx of held. *J Neurosci* 21, 444-461.
- Neher, E., and Sakaba, T. (2008). Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron* 59, 861-872.
- Newton, A.C. (2010). Protein kinase C: poised to signal. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, E395-402.
- Nicoll, R.A. (2017). A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron* 93, 281-290.
- Nili, U., de Wit, H., Gulyas-Kovacs, A., Toonen, R.F., Sorensen, J.B., Verhage, M., and Ashery, U. (2006). Munc18-1 phosphorylation by protein kinase C potentiates vesicle pool replenishment in bovine chromaffin cells. *Neuroscience* 143, 487-500.
- Pandey, U.B., and Nichols, C.D. (2011). Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol Rev* 63, 411-436.
- Pangrsic, T., Gabrielaitis, M., Michanski, S., Schwaller, B., Wolf, F., Strenzke, N., and Moser, T. (2015). EF-hand protein Ca<sup>2+</sup> buffers regulate Ca<sup>2+</sup> influx and exocytosis in sensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E1028-1037.
- Pulido, C., and Marty, A. (2018). A two-step docking site model predicting different short-term synaptic plasticity patterns. *The Journal of General Physiology*.
- Reddy-Alla, S., Bohme, M.A., Reynolds, E., Beis, C., Grasskamp, A.T., Mampell, M.M., Maglione, M., Jusyte, M., Rey, U., Babikir, H., *et al.* (2017). Stable Positioning of Unc13

Restricts Synaptic Vesicle Fusion to Defined Release Sites to Promote Synchronous Neurotransmission. *Neuron* 95, 1350-1364 e1312.

Regehr, W.G. (2012). Short-term presynaptic plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a005702.

Rettig, J., and Neher, E. (2002). Emerging roles of presynaptic proteins in  $Ca^{++}$ -triggered exocytosis. *Science* 298, 781-785.

Rhee, J.S., Betz, A., Pyott, S., Reim, K., Varoqueaux, F., Augustin, I., Hesse, D., Sudhof, T.C., Takahashi, M., Rosenmund, C., and Brose, N. (2002). Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs. *Cell* 108, 121-133.

Richmond, J.E., Davis, W.S., and Jorgensen, E.M. (1999). UNC-13 is required for synaptic vesicle fusion in *C. elegans*. *Nat Neurosci* 2, 959-964.

Rizo, J., and Xu, J. (2015). The Synaptic Vesicle Release Machinery. *Annu Rev Biophys* 44, 339-367.

Sakamoto, H., Ariyoshi, T., Kimpara, N., Sugao, K., Taiko, I., Takikawa, K., Asanuma, D., Namiki, S., and Hirose, K. (2018). Synaptic weight set by Munc13-1 supramolecular assemblies. *Nat Neurosci* 21, 41-49.

Scheuss, V., and Neher, E. (2001). Estimating synaptic parameters from mean, variance, and covariance in trains of synaptic responses. *Biophys J* 81, 1970-1989.

Schmidt, H., Brachtendorf, S., Arendt, O., Hallermann, S., Ishiyama, S., Bornschein, G., Gall, D., Schiffmann, S.N., Heckmann, M., and Eilers, J. (2013). Nanodomain coupling at an excitatory cortical synapse. *Curr Biol* 23, 244-249.

Schneggenburger, R., and Neher, E. (2000). Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse. *Nature* 406, 889-893.

Schotten, S., Meijer, M., Walter, A.M., Huson, V., Mamer, L., Kalogreades, L., ter Veer, M., Ruitter, M., Brose, N., Rosenmund, C., *et al.* (2015). Additive effects on the energy barrier for synaptic vesicle fusion cause supralinear effects on the vesicle fusion rate. *Elife* 4, e05531.

- Schulze, K.L., Broadie, K., Perin, M.S., and Bellen, H.J. (1995). Genetic and electrophysiological studies of *Drosophila* syntaxin-1A demonstrate its role in nonneuronal secretion and neurotransmission. *Cell* 80, 311-320.
- Scott, R., and Rusakov, D.A. (2006). Main determinants of presynaptic Ca<sup>2+</sup> dynamics at individual mossy fiber-CA3 pyramidal cell synapses. *J Neurosci* 26, 7071-7081.
- Shin, O.H., Lu, J., Rhee, J.S., Tomchick, D.R., Pang, Z.P., Wojcik, S.M., Camacho-Perez, M., Brose, N., Machius, M., Rizo, J., *et al.* (2010). Munc13 C2B domain is an activity-dependent Ca<sup>2+</sup> regulator of synaptic exocytosis. *Nat Struct Mol Biol* 17, 280-288.
- Sorensen, J.B., Fernandez-Chacon, R., Sudhof, T.C., and Neher, E. (2003). Examining synaptotagmin 1 function in dense core vesicle exocytosis under direct control of Ca<sup>2+</sup>. *J Gen Physiol* 122, 265-276.
- Stamberger, H., Nikanorova, M., Willemsen, M.H., Accorsi, P., Angriman, M., Baier, H., Benkel-Herrenbrueck, I., Benoit, V., Budetta, M., Caliebe, A., *et al.* (2016). STXBP1 encephalopathy: A neurodevelopmental disorder including epilepsy. *Neurology* 86, 954-962.
- Stanley, E.F. (2016). The Nanophysiology of Fast Transmitter Release. *Trends in Neurosciences* 39, 183-197.
- Stern, M.D. (1992). Buffering of calcium in the vicinity of a channel pore. *Cell Calcium* 13, 183-192.
- Stevens, D.R., Wu, Z.X., Matti, U., Junge, H.J., Schirra, C., Becherer, U., Wojcik, S.M., Brose, N., and Rettig, J. (2005). Identification of the minimal protein domain required for priming activity of Munc13-1. *Curr Biol* 15, 2243-2248.
- Sudhof, T.C. (2012). The presynaptic active zone. *Neuron* 75, 11-25.
- Sudhof, T.C. (2013a). A molecular machine for neurotransmitter release: synaptotagmin and beyond. *Nat Med* 19, 1227-1231.
- Sudhof, T.C. (2013b). Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron* 80, 675-690.
- Sudhof, T.C., and Rothman, J.E. (2009). Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* 323, 474-477.

- Sugita, S., Shin, O.H., Han, W., Lao, Y., and Sudhof, T.C. (2002). Synaptotagmins form a hierarchy of exocytotic Ca(2+) sensors with distinct Ca(2+) affinities. *EMBO J* 21, 270-280.
- Suh, B.C., Leal, K., and Hille, B. (2010). Modulation of high-voltage activated Ca(2+) channels by membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Neuron* 67, 224-238.
- Sun, J., Pang, Z.P., Qin, D., Fahim, A.T., Adachi, R., and Sudhof, T.C. (2007). A dual-Ca<sup>2+</sup>-sensor model for neurotransmitter release in a central synapse. *Nature* 450, 676-682.
- Takeuchi, T., Duzkiewicz, A.J., and Morris, R.G. (2014). The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369, 20130288.
- Taschenberger, H., Woehler, A., and Neher, E. (2016). Superpriming of synaptic vesicles as a common basis for intersynapse variability and modulation of synaptic strength. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E4548-4557.
- Turrigiano, G. (2012). Homeostatic synaptic plasticity: local and global mechanisms for stabilizing neuronal function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a005736.
- Varoqueaux, F., Sigler, A., Rhee, J.S., Brose, N., Enk, C., Reim, K., and Rosenmund, C. (2002). Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9037-9042.
- Vere-Jones, D. (1966). Simple stochastic models for the release of quanta of transmitter from a nerve terminal. *The Australian Journal of Statistics* 8, 53-63.
- Verhage, M., Maia, A.S., Plomp, J.J., Brussaard, A.B., Heeroma, J.H., Vermeer, H., Toonen, R.F., Hammer, R.E., van den Berg, T.K., Missler, M., *et al.* (2000). Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* 287, 864-869.
- Verhage, M., and Sorensen, J.B. (2008). Vesicle docking in regulated exocytosis. *Traffic* 9, 1414-1424.
- Verhage, M., and Sorensen, J.B. (2020). SNAREopathies: Diversity in Mechanisms and Symptoms. *Neuron* 107, 22-37.



Voets, T. (2000). Dissection of three Ca<sup>2+</sup>-dependent steps leading to secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron* 28, 537-545.

Voets, T., Moser, T., Lund, P.E., Chow, R.H., Geppert, M., Sudhof, T.C., and Neher, E. (2001). Intracellular calcium dependence of large dense-core vesicle exocytosis in the absence of synaptotagmin I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11680-11685.

Voets, T., Neher, E., and Moser, T. (1999). Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron* 23, 607-615.

Vyleta, N.P., and Jonas, P. (2014). Loose coupling between Ca<sup>2+</sup> channels and release sensors at a plastic hippocampal synapse. *Science* 343, 665-670.

Walter, A.M., Bohme, M.A., and Sigrist, S.J. (2018). Vesicle release site organization at synaptic active zones. *Neurosci Res* 127, 3-13.

Walter, A.M., Groffen, A.J., Sorensen, J.B., and Verhage, M. (2011). Multiple Ca<sup>2+</sup> sensors in secretion: teammates, competitors or autocrats? *Trends Neurosci* 34, 487-497.

Walter, A.M., Muller, R., Tawfik, B., Wierda, K.D., Pinheiro, P.S., Nadler, A., McCarthy, A.W., Ziomkiewicz, I., Kruse, M., Reither, G., *et al.* (2017). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate optical uncaging potentiates exocytosis. *Elife* 6.

Walter, A.M., Pinheiro, P.S., Verhage, M., and Sorensen, J.B. (2013). A sequential vesicle pool model with a single release sensor and a Ca(2+)-dependent priming catalyst effectively explains Ca(2+)-dependent properties of neurosecretion. *PLoS Comput Biol* 9, e1003362.

Walter, A.M., Wiederhold, K., Bruns, D., Fasshauer, D., and Sorensen, J.B. (2010). Synaptobrevin N-terminally bound to syntaxin-SNAP-25 defines the primed vesicle state in regulated exocytosis. *J Cell Biol* 188, 401-413.

Weyhermuller, A., Hallermann, S., Wagner, N., and Eilers, J. (2011). Rapid active zone remodeling during synaptic plasticity. *J Neurosci* 31, 6041-6052.

Wierda, K.D., Toonen, R.F., de Wit, H., Brussaard, A.B., and Verhage, M. (2007). Interdependence of PKC-dependent and PKC-independent pathways for presynaptic plasticity. *Neuron* 54, 275-290.

Wolfel, M., Lou, X., and Schneggenburger, R. (2007). A mechanism intrinsic to the vesicle fusion machinery determines fast and slow transmitter release at a large CNS synapse. *J Neurosci* 27, 3198-3210.

Wolfel, M., and Schneggenburger, R. (2003). Presynaptic capacitance measurements and Ca<sup>2+</sup> uncaging reveal submillisecond exocytosis kinetics and characterize the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of vesicle pool depletion at a fast CNS synapse. *J Neurosci* 23, 7059-7068.

Yang, X., Wang, S., Sheng, Y., Zhang, M., Zou, W., Wu, L., Kang, L., Rizo, J., Zhang, R., Xu, T., and Ma, C. (2015). Syntaxin opening by the MUN domain underlies the function of Munc13 in synaptic-vesicle priming. *Nat Struct Mol Biol* 22, 547-554.

Yoshihara, M., Adolfsen, B., and Littleton, J.T. (2003). Is synaptotagmin the calcium sensor? *Curr Opin Neurobiol* 13, 315-323.

Zhou, K., Stawicki, T.M., Goncharov, A., and Jin, Y. (2013). Position of UNC-13 in the active zone regulates synaptic vesicle release probability and release kinetics. *Elife* 2, e01180.

Zucker, R.S. (1973). Changes in the statistics of transmitter release during facilitation. *J Physiol* 229, 787-810.

Zucker, R.S., and Regehr, W.G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64, 355-405.

## **Danksagung**

Ich danke meinem Team der AG Walter für die harte Arbeit und die aufregende Zeit in der Emmy Noether Nachwuchsgruppe.

Ich danke Jörg Geiger und Henrik Alle für die Möglichkeit, interessante und abwechslungsreiche Lehrtätigkeiten an der Charité Universitätsmedizin Berlin ausführen zu können und für die sehr gute Unterstützung hierbei.

Ich danke Volker Haucke, dem Direktor des Leibniz-Forschungsinstituts für Molekulare Pharmakologie für die Unterstützung meines Forschungsprogramms und unserer Arbeitsgruppe.

Ich danke Stephan Sigrist für die sehr erfolgreiche Zusammenarbeit an synaptischen Proteinen in der Fruchtfliege.

Ich danke André Nadler für den regen Austausch und die erfolgreiche Kollaboration bei der Analyse von Signallipiden.

Ich danke Jakob Sørensen für die Zusammenarbeit an mathematischen Modellen der Transmitterausschüttung.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit im Rahmen des Emmy-Noether Programms und des Transregio 186.

Ich danke meiner Frau für ihre Unterstützung und ihr Verständnis für meinen Wissensdurst. Ihr und meinen Kindern danke ich für den Rückhalt und die große Freude, die sie mir bereiten.

## Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

03.12.2020

Datum

\_\_\_\_\_

Unterschrift