

Aus dem Institut für Integrative Neuroanatomie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Einfluss von Calcium Activated Protein for Secretion 2
(CAPS2)-Isoformen auf die Funktion der vesikulären
Monoamintransporter 1 und 2**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Elvin Rajabov
aus Baku, Aserbaidshan

Datum der Promotion: 07.12.2018

INHALTSVERZEICHNIS 4

1 ZUSAMMENFASSUNG 5

2 ABSTRACT 7

3 EINLEITUNG 9

3.1	INTEGRATIVE UND KOORDINATIVE FUNKTION DES NERVENSYSTEMS	9
3.2	MONOAMINERGES NEUROTRANSMITTERSYSTEM	11
3.3	MONOAMINSPEICHERUNG ALS GRUNDVORAUSSETZUNG DER MONOAMINERGEN TRANSMISSION	15
3.3.1	REGULIERTE EXOZYTOSE UND SEKRETORISCHE VESIKEL	15
3.3.2	VESIKULÄRE MONOAMINTRANSPORTER	16
3.4	CALCIUM ACTIVATED PROTEIN FOR SECRETION (CAPS) UND SEINE ROLLE BEI DER SYNAPTISCHEN TRANSMISSION	20
3.4.1	DOMÄNENSTRUKTUR VON CAPS	20
3.4.2	VORKOMMEN UND GEWEBEVERTEILUNG VON CAPS	22
3.4.3	CAPS ALS SCHLÜSSELPROTEIN DER DCV- UND SV-EXOZYTOSE	23
3.4.4	CAPS UND VESIKELFÜLLUNG	25
3.4.5	PATHOPHYSIOLOGISCHE ROLLE VON CAPS	26
3.5	WEITERE DETERMINANTEN DER VESIKELFÜLLUNG	27
3.6	FRAGESTELLUNG	29

4 MATERIALIEN UND METHODEN 30

4.1	CHEMIKALIEN	30
4.2	PUFFER UND LÖSUNGEN	32
4.3	MEDIEN	36
4.3.1	ZELLKULTURMEDIEN	36
4.3.2	MIKROBIELLE MEDIEN	36
4.4	ANTIKÖRPER	37
4.4.1	PRIMÄRE ANTIKÖRPER	37
4.4.2	SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER	37
4.5	VEKTOREN / DNA	38
4.5.1	VEKTOREN	38
4.6	GERÄTE UND APPARATUREN	40
4.7	METHODEN	42
4.7.1	DNA-TECHNIKEN	42
4.7.1.1	Transformation kompetenter E. coli Bakterien	42
4.7.1.2	Isolation von Plasmid-DNA aus transformierten E. coli Bakterien	42
4.7.1.3	Konzentrierung der DNA durch Fällung	43
4.7.1.4	Bestimmung der DNA-Konzentration	43
4.7.1.5	Restriktion von DNA durch Endonukleasen	43
4.7.1.6	Agarose-Gelelektrophorese	43
4.7.2	ZELLKULTURARBEITEN	44
4.7.2.1	CHO-Zellen	44
4.7.3	BESTIMMUNG DER NEUROTRANSMITTERAUFNAHME	44
4.7.3.1	Permeabilisierung von Zellen	44
4.7.3.2	Monoaminaufnahme in die permeabilisierte Zellen	45

4.7.4	BESTIMMUNG DER NEUROTRANSMITTERAUFNAHME NACH TRANSFEKTION DER ZELLEN.	46
4.7.4.1	Transfektion	46
4.7.4.2	Bestimmung der Neurotransmitteraufnahme nach Transfektion	47
4.7.4.3	Immunfluoreszenzfärbung und Fluoreszenzmikroskopie	47
4.7.5	HOMOGENISIERUNG VON CHOVMAT1- UND CHOVMAT2-ZELLEN UND SUBZELLULÄRE FRAKTIONIERUNG	48
4.7.6	PROTEIN-TECHNIKEN	48
4.7.6.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	48
4.7.6.2	Proteingelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
4.7.6.3	Western-Blot und Immunfärbung	49
4.7.7	DATENANALYSE	50
5	ERGEBNISSE	51
5.1	CHARAKTERISIERUNG VON CHOVMAT1- UND CHOVMAT2- ZELLEN	51
5.2	EINFLUSS VON CAPS2A UND CAPS2B AUF SEROTONINAUFNAHME IN INTRAZELLULÄRE KOMPARTIMENTE DURCH VMAT1 UND VMAT2	52
6	DISKUSSION	63
6.1	CHO-ZELLSYSTEM ALS MODELL FÜR DIE UNTERSUCHUNG DER FUNKTION VON MONOAMINTRANSPORTER 1 UND 2	64
6.2	DIE BEDEUTUNG VON CAPS FÜR DIE FÜLLUNG DER MONOAMINHALTIGEN VESIKEL	65
6.2.1	DIE BEDEUTUNG VON CAPS FÜR DIE REGULATION VON VMAT	68
6.2.2	MÖGLICHE INTERAKTION VON CAPS MIT WEITEREN DETERMINANTEN DER VESIKELFÜLLUNG	70
6.3	AUSBLICK	71
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	73
8	LITERATURVERZEICHNIS	76
9	DANKSAGUNG	87
10	EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG	88
11	LEBENS LAUF	89

Meinen Eltern in Dankbarkeit

1 Zusammenfassung

Im Nervensystem erfolgt der Informationsaustausch zwischen den Nervenzellen überwiegend über chemische Synapsen. Die wichtigsten Akteure dabei sind Neurotransmitter, zu denen auch die Monoamine gehören. Die Neurotransmitter Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin, Serotonin und Histamin gehören zu jener Klasse. Bevor sie im Rahmen der regulierten Exozytose in den synaptischen Spalt abgegeben werden, werden sie in spezielle Vesikel transportiert und gespeichert. Dieser Transport wird durch die vesikulären Monoamintransporter 1 und 2 (VMAT1 und VMAT2) bewerkstelligt, deren Funktion und somit die Vesikelfüllung durch komplexe Mechanismen reguliert wird.

Calcium activated Protein for Secretion (CAPS) ist ein überwiegend zytosolisches Protein und besitzt zwei Isoformen (CAPS1 und CAPS2). Von CAPS2 existieren 6 Splice-Varianten, die man je nach Molekülgröße in „kurze“ und „lange“ Isoformen einteilen kann. Obwohl CAPS-Proteine in der Literatur hauptsächlich als Primingproteine betrachtet werden, konnte an transfizierten CHO-Zellen eine fördernde Wirkung von CAPS1 und 2 auf die VMAT1- und VMAT2-Funktion gezeigt werden. Es ist ferner bekannt, dass in Abwesenheit von CAPS1 die Füllung von katecholaminhaltigen Vesikeln ausbleibt. Zudem zeigen die elektrophysiologischen Untersuchungen, dass CAPS ein wichtiges Protein für die Generierung und Stabilisierung des sekretionsbereiten Pools von Vesikeln ist. Es wurden auch Unterschiede bei CAPS2-Splice-Varianten hinsichtlich des Behebens der Depletion von verschiedenen Vesikel-Pools und dadurch der Wiederherstellung der Sekretion beobachtet. Über die Wirkung von einzelnen CAPS2-Splice-Varianten auf VMAT-Ebene war aber bisher nichts bekannt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung von zwei langen CAPS2-Splice-Varianten, namentlich CAPS2a und CAPS2b, auf die vesikuläre Monoaminaufnahme durch VMAT1 und VMAT2 untersucht. Wir haben VMAT1 und VMAT2 permanent exprimierende CHO-Zellen mit CAPS2a- und CAPS2b-Vektoren transfiziert und anschließend mit diesen Zellen Monoaminaufnahmetests nach Permeabilisierung der Plasmamembran durchgeführt.

Unsere Ergebnisse zeigen besonders für CAPS2b eine fördernde Wirkung auf die VMAT1- und VMAT2-Funktion. Die hier angewandte Methodik stellt eine gute Ergänzung zu den elektrophysiologischen Verfahren dar, weil sie in der Lage ist, die Funktion von VMAT in An- oder Abwesenheit verschiedener Molekülen direkt zu messen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Frage zum Einfluss von CAPS2a und CAPS2b auf VMAT1 und VMAT2 zwar geklärt. Der Mechanismus einer denkbaren direkten oder indirekten CAPS-VMAT-Interaktion, sowie die dafür verantwortlichen CAPS-Domänen, wurden aber nicht untersucht. Es könnte sein, dass CAPS-Proteine direkt an den VMATs angreifen oder in den Signalweg, über den α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine VMAT regulieren, involviert sind. Es könnte aber auch sein, dass CAPS-Proteine mit anderen Determinanten der Vesikelfüllung interagieren und dadurch den Monoamintransport über VMAT1 und 2 modulieren. Diese Aspekte könnten Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

2 Abstract

The information exchange between neurons occurs mainly via chemical synapses. The most important players are neurotransmitters, including the monoamines. The most common neurotransmitter molecules such as dopamine, noradrenaline, adrenaline, serotonin and histamine belong to this class. Before being released during regulated exocytosis, they are transported into the special vesicles and stored. This transport is accomplished by the vesicular monoamine transporters 1 and 2 (VMAT1 and VMAT2), whose function and thus vesicle filling is regulated by complex mechanisms.

Calcium activated protein for secretion (CAPS) is a predominantly cytosolic protein and has two isoforms (CAPS1 and CAPS2). CAPS2 also has six splice variants, which can be assigned to "short" and "long" isoforms depending on the molecular size. Although CAPS proteins are primarily regarded as priming proteins, transfected CHO cells showed a promoting effect of CAPS1 and 2 on the VMAT1 and VMAT2 functions. It is also known that the filling of catecholamine-containing vesicles is impaired in the absence of CAPS1. Furthermore, the electrophysiological studies show that CAPS is an important protein for generation and stabilization of the secretory pool of vesicles. Differences in CAPS2-splice variants were also observed with regard to fix the depletion of different vesicle pools and thereby restoring secretion. However, nothing is known about the effect of individual CAPS2-splice variants on the VMAT level.

We investigated the effect of two long CAPS2-splice variants, namely CAPS2a and CAPS2b, on the vesicular monoamine uptake by VMAT1 and VMAT2. The VMAT1 and VMAT2 stable-expressing CHO cells were transfected with CAPS2a and CAPS2b vectors. After permeabilisation of the cell membrane we performed monoamine uptake tests with radioactively labeled serotonin ($[^3\text{H}]$ -Serotonin).

Our results show especially for CAPS2b a promoting effect on VMAT1 und VMAT2 function. In addition to electrophysiological techniques our experiments make possible the imaging of VMAT-function in the presence or absence of different molecules.

This work clears the question of the influence of CAPS2a and CAPS2b on VMAT1 and VMAT2. However, the mechanism of a possible direct or indirect CAPS-VMAT interaction, as well as the CAPS domain responsible for it, have not been identified. It may be that CAPS proteins directly interact with VMATs or are involved in the signaling pathway through which α -subunits of heterotrimeric G-proteins regulate VMAT. However, it may also be that CAPS-proteins interfere with other determinants of vesicle filling and

thereby modulate monoamine transport via VMAT1 und 2. These aspects could be the subject of further research.

3 Einleitung

3.1 Integrative und koordinative Funktion des Nervensystems

Die Tatsache, dass der menschliche Organismus aus etwa 10^{14} Zellen besteht und all diese Zellen für die Erfüllung bestimmter Funktionen spezialisiert sind, verdeutlicht die Komplexität dieses Systems. Bei solch einer Komplexität ist die Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen ohne präzise Regulation unvorstellbar. Die Aufgabe unseres Nervensystems besteht eben in der Erfüllung dieser kontrollierenden, integrierenden und koordinierenden Rolle, die die wichtigste Voraussetzung dafür ist, dass der Organismus die inneren und äußeren Reize wahrnimmt und auf sie entsprechend antwortet.

Die oben genannte Funktion des Nervensystems ist nur dann erfüllbar, wenn die Kommunikation zwischen den Nervenzellen (Neuronen) gewährleistet ist. Das Gehirn einer 50- bis 70-jährigen männlichen Person besteht laut experimentellen Daten im Durchschnitt aus ca. 85 bis 86×10^9 Neuronen (Lent et al., 2012; Bear et al., 2016). Die Kommunikation zwischen Neuronen wird zum größten Teil durch spezialisierte Strukturen wie *Synapsen* bewerkstelligt und ist überwiegend chemischer Natur (Squire et al., 2013).

Synapsen lassen sich generell in zwei Gruppen unterteilen:

Elektrische Synapsen, auch *Gap junctions* (*Abbildung 1A*) genannt, werden durch integrale Membranproteine gebildet, die einen zytoplasmatischen Austausch von Ionen und niedermolekularen Metaboliten zwischen zwei kommunizierenden Zellen ermöglichen. Bei Wirbeltieren werden sie durch spezialisierte Proteine, sog. Connexine, gebildet (Nielsen et al., 2012).

Chemische Synapsen (*Abbildung 1B*) sind im Nervengewebe viel zahlreicher und bestehen aus einer prä- und postsynaptischen Membran, die voneinander durch einen synaptischen Spalt getrennt sind. Die Präsynapse wird durch Axonterminalen, die Postsynapse durch Somata, Dendriten oder Axone eines weiteren Neurons gebildet. Der synaptische Spalt ist der Raum zwischen Prä- und Postsynapse und kann 20-50 nm breit sein, also sind die Zellen zehnmal weiter voneinander entfernt als bei Gap junctions (Bear et al., 2016).

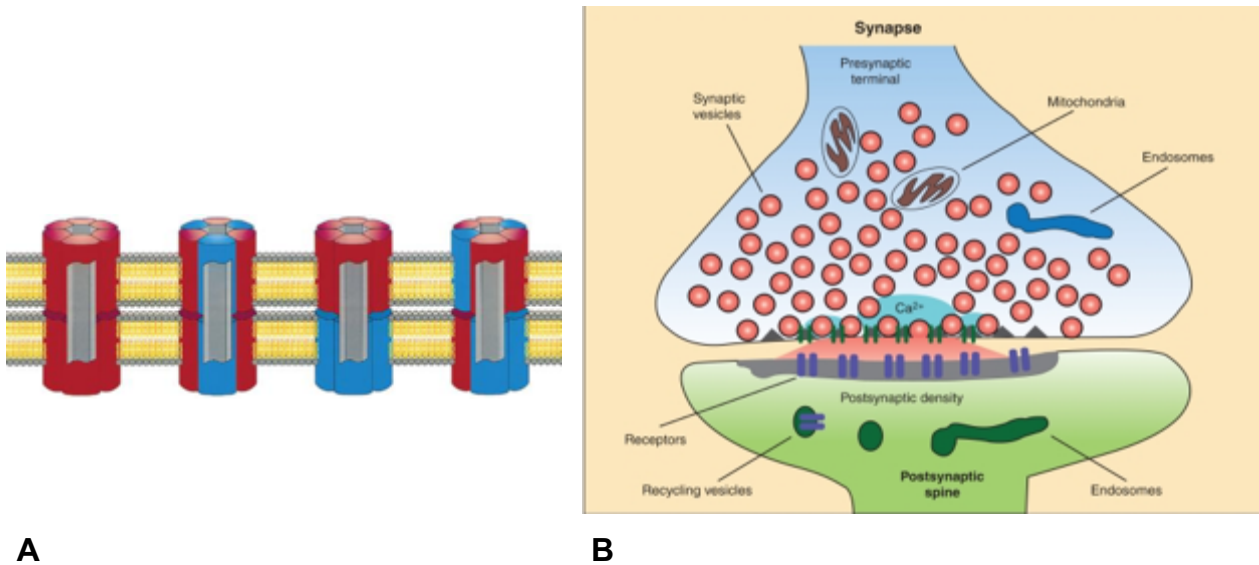


Abbildung 1: 1A: Gap junctions (Kumar et al., 1996; Nielsen et al., 2012). **1B: Chemische Synapse** (Südhof, 2012).

In chemischen Synapsen erfolgt die Kommunikation durch quantale Ausschüttung von *Neurotransmittern* (Botenstoffen) in den synaptischen Spalt (Katz 1971).

Die heute bekannten Neurotransmitter, deren Zahl sich über 100 beläuft, können in zwei große Gruppen eingeteilt werden: *klassische* oder *niedermolekulare* Transmitter und *Neuropeptide* (Purves et al., 2004). Der Begriff „klassisch“ wird genutzt, um Acetylcholin, biogene Amine und Aminosäuretransmitter von den anderen abzugrenzen und hat heute eher einen historischen Charakter (Squire et al., 2013). Die Haupteigenschaften von den meisten klassischen Transmittern sind Speicherung in kleinen Vesikeln, die als SSV (Small synaptic vesicles) bekannt sind, energieabhängige Wiederaufnahme zur Wiederverwertung, Synthese meistens in Axonterminalen. Im Gegensatz dazu werden die Neuropeptide in größeren und dichteren DCVs (Dense core vesicle) gespeichert, nach der Ausschüttung nicht wiederaufgenommen, die Synthese erfolgt im Soma, und sie werden anschließend zu den Axonterminalien transportiert (Gondré-Lewis et al., 2012; Squire et al., 2013).

Im Folgenden wird auf das monoaminerge Transmittersystem näher eingegangen.

3.2 Monoaminerges Neurotransmittersystem

Monoamine sind kleine Moleküle, die aus den Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan, Histidin synthetisiert werden und in weit verteilten Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems vorkommen. Die wichtigsten Transmitter dieser Klasse sind *Dopamin*, *Noradrenalin*, *Adrenalin*, *Serotonin* und *Histamin*.

Die ersten drei werden aufgrund der Katechol-Gruppe in ihrer Struktur als Katecholamine bezeichnet und entstammen der Aminosäure Tyrosin.

Dopamin entsteht durch zytosolische Hydroxylierungs- und Dekarboxylierungsreaktion aus Tyrosin (*Abbildung 2A*). Anschließend wird es durch VMAT (Vesikuläre Monoamintransporter) in die synaptischen Vesikel aufgenommen. Eine wichtige dopaminreiche Struktur des Gehirns ist das Striatum, das seine dopaminergen Projektionen aus der Substantia nigra, Pars compacta, erhält (*Abbildung 3A*). Dopamin ist ein wichtiger Transmitter für die Regulierung der Willkürmotorik, Stimmung, kognitiver Prozesse und des Belohnungssystems. Dopamin wird sowohl durch spezifische Plasmamembrantransporter (DAT) als auch durch Noradrenalintransporter (NET) aus dem synaptischen Spalt wiederaufgenommen (Brady et al., 2012).

Noradrenalin ist im vegetativen Nervensystem ein Transmitter der sympathischen postganglionären Nervenfasern. In noradrenergen Neuronen wird es aus Dopamin durch intravesikuläre Hydroxylierung synthetisiert (*Abbildung 2A*). Im Hirnstamm wird es im Locus coeruleus (Pons) gebildet. Die noradrenergen Fasern des Locus coeruleus projizieren fast in das gesamte Gehirn: Dazu gehören verschiedene Cortexareale, Thalamus, Hypothalamus, Bulbus olfactorius, Cerebellum, Mesencephalon und Rückenmark (*Abbildung 3B*). Der Locus coeruleus ist beteiligt an der Regulation von wichtigen Hirnfunktionen wie Aufmerksamkeit, Schlaf-Wach-Zyklus, Lernen und Gedächtnis sowie der Stimmung. Die Wiederaufnahme erfolgt durch den Noradrenalintransporter (NET), anschließend die Speicherung in synaptischen Vesikeln über VMAT (Purves et al., 2004; Bear et al., 2016).

Adrenalin kommt im Gehirn im Vergleich zu anderen Katecholaminen in geringeren Mengen vor. In adrenergen Neuronen und chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks tritt das Noradrenalin aus Vesikeln aus, wird durch einen zytosolischen Methylierungsschritt in Adrenalin umgewandelt (*Abbildung 2A*) und über VMAT in synaptischen Vesikeln oder DCVs gespeichert. Adrenerge Neurone im Gehirn befinden

sich hauptsächlich im lateralen Tegmentum und der Medulla oblongata. Sie projizieren zum Thalamus und Hypothalamus (*Abbildung 3C*) und über ihre funktionelle Bedeutung ist noch wenig bekannt (Purves et al., 2004).

Serotonin wird durch zytosolische Hydroxylierungs- und Dekarboxylierungsreaktion aus der Aminosäure Tryptophan synthetisiert (*Abbildung 2B*). Anschließend wird es über VMAT in die synaptischen Vesikel aufgenommen. Die serotonergen Neurone befinden sich hauptsächlich in den Raphekernen im Hirnstamm, von denen es neun gibt (Bear et al., 2016). Sie projizieren ins Telencephalon, Diencephalon und Kleinhirn (*Abbildung 3D*). Die serotonerge Transmission spielt eine große Rolle bei der Regulation von Stimmung, Schlaf und Wachheit (Bear et al., 2016; Purves et al., 2004). Nach der Ausschüttung erfolgt die Wiederaufnahme in die Präsynapse durch spezifische Serotonintransporter (SERT).

Histamin wird in einem zytosolischen Dekarboxylierungsschritt aus der Aminosäure Histidin synthetisiert (*Abbildung 2C*) und anschließend über VMAT in synaptische Vesikel transportiert. Histaminerge Neurone befinden sich hauptsächlich im Hypothalamus, projizieren fast in alle Hirnareale und ins Rückenmark (*Abbildung 3E*). Diese Projektionen vermitteln Wachheit und Aufmerksamkeit (Bear et al., 2016; Purves et al., 2004).

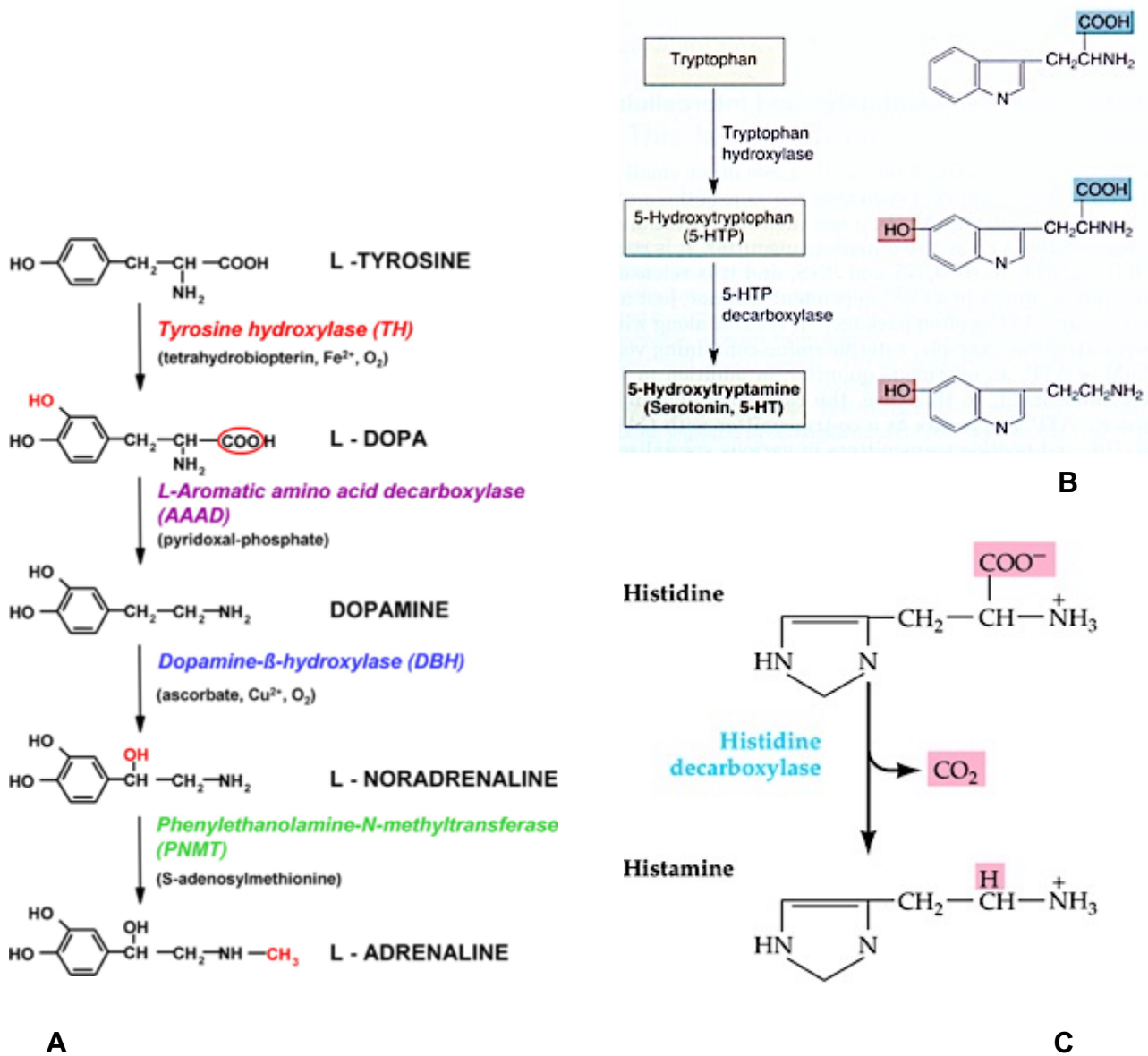


Abbildung 2: Biosynthese von monoaminen Neurotransmittern. 2A: Synthese von Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin (Kvetnansky et al., 2009); 2B: Synthese von Serotonin (Bear et al., 2016); 2C: Synthese von Histamin (Purves et al., 2004).

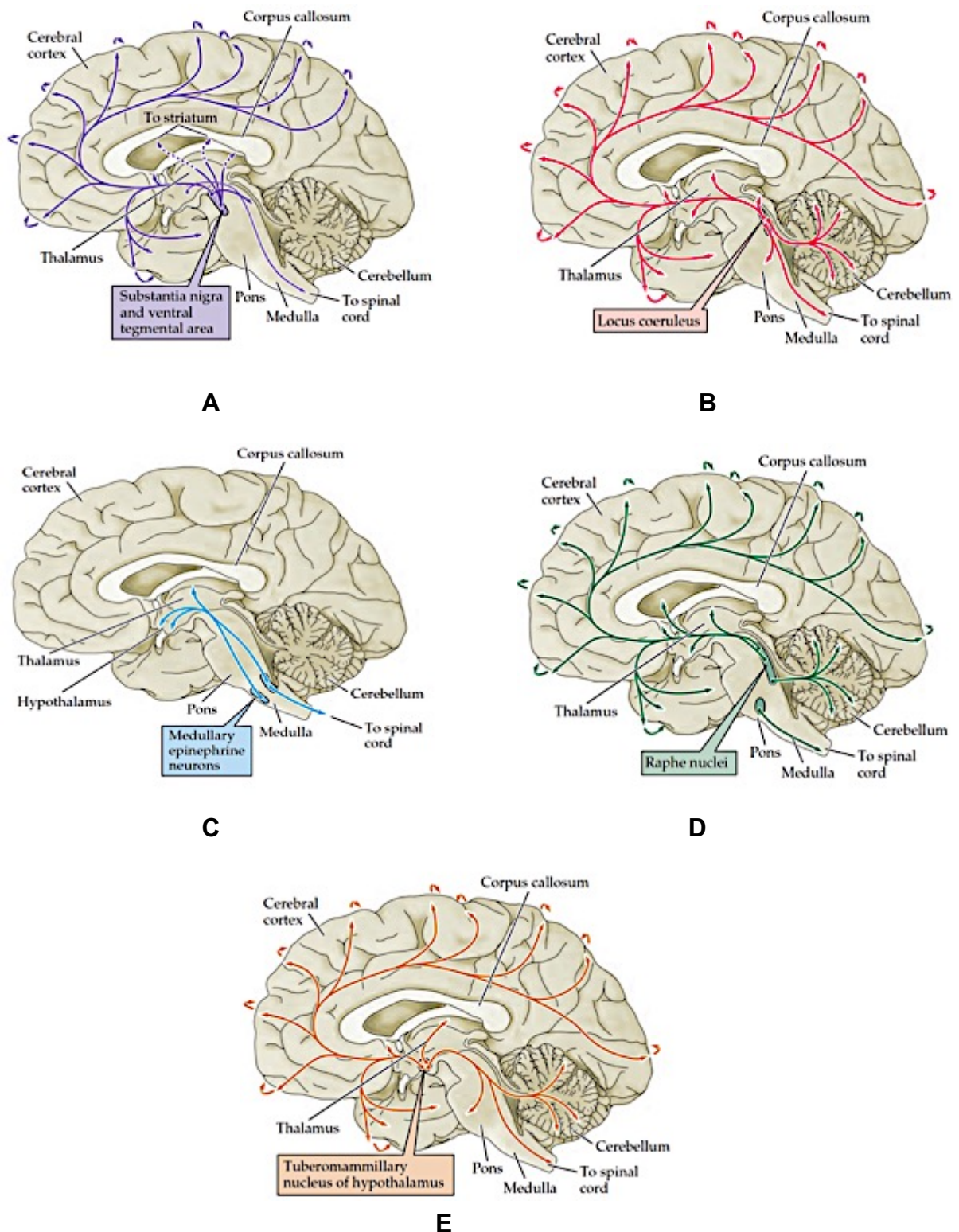


Abbildung 3: Verteilung von Katecholaminen, Serotonin und Histamin im Gehirn (Purves et al., 2004). Erklärungen im Text. 3A: Dopaminerge Neurone und ihre Projektionen; 3B: Noradrenerge Neurone und ihre Projektionen; 3C: Adrenerge Neurone und ihre Projektionen; 3D: Serotonerge Neurone und ihre Projektionen; 3E: Histaminerge Neurone und ihre Projektionen.

3.3 Monoaminspeicherung als Grundvoraussetzung der monoaminergen Transmission

3.3.1 Regulierte Exozytose und sekretorische Vesikel

Wie oben erläutert, erfolgt der Informationsaustausch in chemischen Synapsen mittels Neurotransmitterausschüttung aus Vesikeln, deren Membranen dabei mit der Plasmamembran verschmelzen. Dies wird durch einen lokalen zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg in der aktiven Zone der Axonterminalien getriggert, der durch die Öffnung von spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen bei Ankunft des Aktionspotentials in der Axonterminalie verursacht wird. Es dauert einige hundert Mikrosekunden, bis die Synaptotagmine dieses Ca^{2+} -Signal in eine nanomechanische Aktivierung der Membranfusionsmaschinerie umwandeln. Diese Aktivierung wird durch Ca^{2+} -abhängige Interaktion der C2-Domänen von Synaptotagmin mit Phospholipiden und soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor (SNARE)-Proteinen vermittelt. Die synaptischen Proteine Synaptobrevin, Syntaxin 1 und SNAP-25 gehören zu SNARE-Familie und fungieren als „Motor“ der Membranfusion. Das Hauptereignis der Membranfusion ist die Bildung eines SNARE-Komplexes, was letztendlich zur eigentlichen Fusion und Entstehung der Fusionspore führt. Für die Bildung des SNARE-Komplexes sind auch Sec1/Munc18-like (SM)-Proteine erforderlich, die ihrerseits mit SNARE-Proteinen interagieren. Der genaue Mechanismus dieser Prozesse ist noch nicht endgültig geklärt (Südhof 2012; Jahn et al., 2012; Südhof et al., 2014).

Demnach erfolgt die Neurotransmitterfreisetzung im Rahmen der *regulierten Exozytose*, einem speziellen Sekretionsweg neben der konstitutiven Exozytose, über die Neurone, endo- und exokrine Zellen verfügen (Camilli et al., 1990).

Die Neurotransmitter werden nach der Synthese in die sekretorischen Vesikel transportiert und dort gespeichert. Zwei Typen von Vesikeln nehmen an der regulierten Exozytose teil: SVs und DCVs. Diese Vesikel unterscheiden sich sowohl in ihrer Morphologie, in der Art der gespeicherten Transmitter als auch in der Proteinzusammensetzung ihrer Membranen. SVs sind im ZNS von Säugern über 95% durch SSVs vertreten, deren Größe 50-60nm beträgt (Jahn et al., 1990). Sie sind spezifisch für Neurone, kommen in den aktiven Zonen von Axonendigungen vor und speichern vorwiegend klassische Transmitter.

Im Gegensatz dazu werden in DCVs Neuropeptide gespeichert, ihre Größe beträgt 70-120nm, der Inhalt ist hochkondensiert und hochkonzentriert, die Vesikelfüllung erfolgt nicht in Axonterminalien, sondern in den Somata (Gondré-Lewis et al., 2012). Eine Form von DCVs sind bis zu 300nm große LDCVs (Large dense core vesicles), die auch in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks anzutreffen sind und Katecholamine speichern (Brady et al., 2012). In den Axonen konnten sowohl LDCVs als auch SVs gefunden werden, in den Perikaryen aber ausschließlich LDCVs (Bruns et al., 2000).

3.3.2 Vesikuläre Monoamintransporter

Monoamine werden mit Ausnahme von Noradrenalin im Zytosol synthetisiert, außerdem werden sie nach der synaptischen Transmission in die Präsynapse wiederaufgenommen. Anschließend erfolgt der aktive Transport vom Zytosol ins Vesikellumen. Dazu ist das Vorhandensein zumindest von zwei Proteinen in der Vesikelmembran obligat:

1. *Vakuoläre H⁺-ATPase*, die das Vesikellumen protoniert (ansäuert) und dadurch die Triebkraft für den Transport schafft.
2. Ein *vesikulärer Monoamintransporter*, der die Transmitter im Austausch gegen 2H⁺ Ionen gegen den Konzentrationsgradienten ins Vesikelinnere befördert (Edwards 2007; Gasnier 2000).

VMAT1 und VMAT2 sind Isoformen des vesikulären Monoamintransporters. Beim Menschen wird VMAT1 vorwiegend in neuroendokrinen Zellen einschließlich chromaffinen- und enterochromaffinen Zellen, VMAT2 in monoaminergen Zellen des Gehirns, sympathischen postganglionären Neuronen, Mastzellen, Blutplättchen und histaminergen Zellen des Darms exprimiert (Peter et al., 1995; Wimalasena 2011; Lesch et al., 1993).

Beide Isoformen befinden sich sowohl auf LDCVs als auch auf SSVs (Höltje et al., 2000; Liu et al., 1994; Nirenberg et al., 1995). Die Expression der Isoformen in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks ist spezieabhängig. Die Ratte exprimiert ausschließlich VMAT1, der Rind aber hauptsächlich VMAT2 (Wimalasena 2011; Erickson et al., 1996). Von der Struktur der Aminosäuresequenz sind humane VMAT1 und VMAT2 zu 62% identische, integrale Membranglykoproteine mit einem Molekulargewicht von 65-85 kDa, bestehend aus 12 putativen Transmembrandomänen (*Abbildung 4*) (Henry et al., 1994; Liu et al., 1992; Erickson et al., 1992; Schuldiner et al., 1995). Der C- und der N-Terminus

befinden sich beide im Zytosol. Die Transmembrandomänen sind miteinander über 5 zytoplasmatische und 6 vesikulär-luminale Schleifensequenzen verbunden. Die größte hydrophile Schleife ist zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne lokalisiert, zytoplasmisch und bei VMAT1 an drei, bei VMAT2 an vier Stellen N-glykosyliert (Erickson et al., 1992; Gasnier 2000; Liu et al., 1992; Erickson 1996). Im Bereich dieser intraluminalen Schleife wurden auch die größten Sequenzunterschiede gefunden (Schuldiner et al., 1995). Auf den zytoplasmatischen Schleifen befinden sich auch Phosphorylierungsstellen, die bei den Isoformen Unterschiede aufweisen (Erickson et al., 1992; Henry et al., 1994; Krantz et al., 1997). VMAT2 liegt im Unterschied zu VMAT1 konstitutiv im phosphorylierten Zustand vor (Krantz et al., 1997).

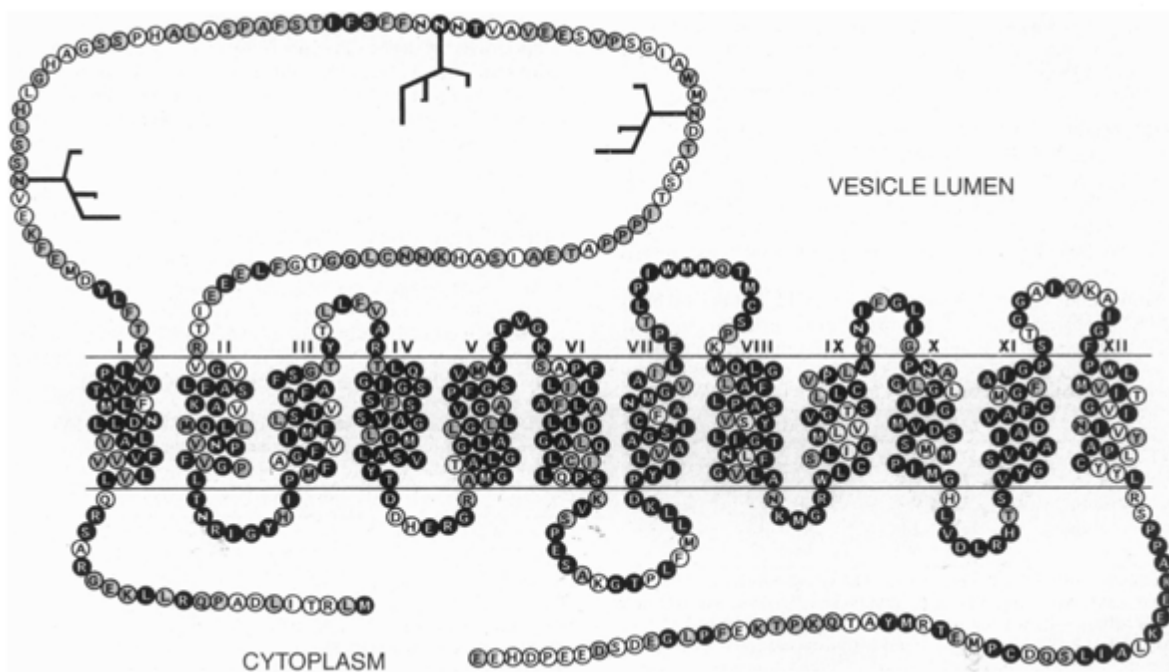


Abbildung 4: Primäre Aminosäuresequenz und erwartete sekundäre Struktur vom humanen VMAT1 (nach Erickson et al., 1996). Erklärungen im Text.

Beide Transporter transportieren Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin und Serotonin, unterscheiden sich aber in ihrer Substrataffinität. Beim Menschen liegen die K_m -Werte von VMAT1 für Serotonin, Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin im mikromolaren Bereich. Für VMAT2 liegen diese Werte im submikromolaren Bereich. Bei VMAT1 liegen die K_m -Werte für Histamin bei $436\mu\text{M}$ (Rind) und $4696\mu\text{M}$ (Mensch). Bei VMAT2 betragen

die K_m -Werte $3\mu\text{M}$ (Rind) und $143\mu\text{M}$ (Mensch) (Peter et al., 1994; Erickson et al., 1996; Varoqui et al., 1997).

Im Allgemeinen zeigt VMAT2 eine höhere Affinität für Monoamine als VMAT1, was für die SSV-Bereitstellung im Rahmen der regulierten Exozytose in Neuronen eine Voraussetzung sein kann, die im Vergleich zu sekretorischen Vesikeln der chromaffinen Zellen während des Recyclings schneller gefüllt werden müssen (Peter et al., 1994; Brunk et al., 2006).

Beide Transporter sind durch Reserpin und Ketanserin inhibierbar. Für VMAT2 liegen die K_i -Werte im nanomolaren Bereich (etwa 10-15nM). Die Affinität von VMAT1 ist dreimal geringer als die von VMAT2. Beim Menschen ist VMAT2 im Gegensatz zu VMAT1 effektiv durch Tetrabenazin inhibierbar ($K_i \approx 50\text{nM}$), was als Hauptkriterium zur pharmakologischen Unterscheidung von beiden Transportern dient (Erickson et al., 1996; Varoqui et al., 1997).

Neben physiologischen Aminen können die Transporter auch Verbindungen wie z. B. das Neurotoxin Methyl-4-Phenylpyridinium (MPP^+) vom Zytosol in die Vesikel transportieren. Dadurch werden die Toxine in den Vesikeln sequestriert und die Zellen vor ihren toxischen Wirkungen geschützt. Diese Funktion entspricht einer Analogie zu bakteriellen Antibiotikaresistenzproteinen wie Toxin Extruding Antiporters (TEXANs) oder p-Glykoprotein neoplastischer Zellen, die bei den genannten Zellen für Medikamentenresistenz verantwortlich sind (Henry et al., 1994; Peter et al., 1994; Schuldiner 1995).

Durch intravesikuläre Sequestrierung wird einerseits die Bereitstellung von Monoaminen für die regulierte Exozytose gewährleistet, andererseits ihre zytosolische Konzentration unterhalb der toxischen Grenzen gehalten (Erickson et al., 1992; Liu et al., 1992; Taylor et al., 2011). Da die Monoamine sowohl im Zytosol metabolisiert werden, als auch spontan oxidieren, entstehen freie Sauerstoffradikale, die intrazelluläre Strukturen angreifen. Es konnte ein Zusammenhang zwischen Funktionsverlust von VMAT2, oxidativem Stress, Neurodegeneration und dem idiopathischen Parkinson Syndrom gezeigt werden (Caudle et al., 2007; Jenner, 2003; Taylor et al., 2009, 2011). Die Krankheit ist durch Untergang der dopaminergen Zellen der Substantia nigra, Pars compacta, sowie von noradrenergen Zellen des Locus coeruleus und serotonergen Zellen der Raphekerne charakterisiert (Taylor et al., 2009; Taylor et al., 2014). Die sympathischen postganglionären Neurone sind dabei mitbetroffen, was das Phänomen

der kardiovaskulären Dysautonomie beim Parkinson Syndrom erklärt (Goldstein, 2003; Samay Jain, 2012).

Die Regulation von VMATs wurde in den letzten Jahren intensiv erforscht. Es konnte ein Zusammenhang zwischen den durch SSVs freigesetzten Transmitterquanten und Vesikelvolumen gezeigt werden (Bruns et al., 2000). Die Aktivität der VMATs kann durch α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine reguliert werden. VMAT1 und VMAT2 werden unabhängig von ihrer Lokalisation durch $Go2\alpha$ gehemmt (Ahnert-Hilger et al., 1998; Höltje et al., 2000; Höltje - Dissertation, 2000). Dabei zeigt VMAT2 eine höhere Sensitivität gegenüber der Regulation durch $Go2\alpha$ als VMAT1 (Höltje et al., 2000). Die Thrombozyten exprimieren die $G\alpha_q$ -Untereinheit und diese hemmt auch die Serotoninaufnahme über VMAT2. Vielmehr konnte dabei ein Zusammenhang zwischen der Vesikelfüllung und VMAT-Aktivität festgestellt werden (Höltje et al., 2003). Es wird zudem vermutet, dass die intraluminale Schleife den vesikulären Transmitterinhalt misst und wie ein G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR) die $Go2\alpha$ -Untereinheit aktiviert, die ihrerseits die Transporteraktivität herunterreguliert (Brunk et al., 2006). Vor kurzem wurde auch gezeigt, dass die sekundären intrazellulären Botenstoffe wie cAMP und cGMP an der Regulation der VMATs beteiligt sind und dabei eine Hemmende Wirkung zeigen (Maul - Dissertation 2014). Der genaue molekulare Mechanismus dieser Regulation bleibt zwar weiterhin unklar, der Befund könnte aber die GPCR-Hypothese zur Funktionsweise der VMATs unterstützen.

Es gibt Hinweise auf die Existenz weiterer Interaktionspartner, die für die Regulation von VMAT-Funktion infrage kommen. Die Proteine CAPS1 und CAPS2, die im folgenden Abschnitt genauer erläutert werden, kommen hierfür infrage. Beide fördern die Monoaminaufnahme sowohl über VMAT1 als auch über VMAT2 (Brunk et al., 2009), wobei der genaue Mechanismus und die Existenz weiterer zwischengeschalteter Signale noch nicht bekannt sind.

3.4 Calcium Activated Protein for Secretion (CAPS) und seine Rolle bei der synaptischen Transmission

3.4.1 Domänenstruktur von CAPS

CAPS1- und CAPS2-Proteine sind bei Nagetieren und Menschen sehr ähnlich aufgebaut. Auf der Ebene der Aminosäurezusammensetzung sind die CAPS-Proteine zu über 95% identisch (Speidel et al., 2003).

Das menschliche CAPS1 besteht aus 1353 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 153 kDa. Das menschliche CAPS2 ist mit 1296 Aminosäuren und 148 kDa Molekulargewicht ein wenig kleiner. CAPS-Isoformen der Säugetiere bilden eine kleine Familie von zwei hoch homologen Proteinen mit identischer Domänenstruktur (Speidel et al., 2003). Die Splice-Varianten von CAPS2 wurden an Mäusen näher untersucht. Es sind die Splice-Varianten CAPS2a, -b, -c, -d, -e, -f bekannt, die in ihrer Domänenstruktur und Gewebeverteilung Unterschiede aufweisen. Diese Splice-Varianten kann man in lange (CAPS2a-c) und kurze (CAPS2d-f) einteilen (Sadakata et al., 2007).

Die längste Isoform ist CAPS2b, bestehend aus 1304 Aminosäuren. CAPS2a exprimiert 40 Aminosäuren weniger und besteht aus 1264 Aminosäuren (Sadakata et al., 2007; Truong et al., 2014).

CAPS-Proteine enthalten N-Terminal Dynactin 1 bindende (DBD)-, C2-, Plekstrin Homology (PH) und Munc-13 Homology (MHD) Domänen (*Abbildung 5*). MHD enthält auch einen mit Syntaxin interagierenden Bereich (SID). Das C-Terminal von CAPS enthält eine Dense Core Vesicle (DCV) bindende Domäne (Betz et al., 1997; Grishanin et al., 2002; Koch et al., 2000; Stevens et al., 2009). Der Bereich zwischen PH- und DCV-Sequenzen wird als MUN-Domäne bezeichnet. Bei CAPS2a fehlen die Exone 22 und 25, bei CAPS2b nur das Exon 25. Diese Exone kodieren für Teile der MHD-Sequenz (Sadakata et al., 2007). Die zuvor genannten Domänenstrukturen sind konserviert und ihnen werden verschiedene Funktionen zugeschrieben: DBD könnte für die Sortierung erforderlich sein (Sadakata et al., 2007; Stevens et al., 2009).

Die C2-Domäne funktioniert offensichtlich als Ca^{2+} -Sensor und interagiert Ca^{2+} -abhängig mit Phospholipidmembranen (Rizo et al., 1998; Stevens et al., 2009).

Die PH-Domäne gehört zu membranbindenden CAPS-Bereichen. Ihre Haupteigenschaften sind Bindung an saure Phospholipide aufgrund der Ladung, stereoselektive Bindung an Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat ($\text{PI}(4,5)\text{P}_2$) und

Bindung an synaptische Plasmamembran, aber nicht an DCV-Membran (Grishanin et al., 2002). Die PH-Domäne ist präsent bei allen langen CAPS2-Isoformen (CAPS2a, CAPS2b und CAPS2c). CAPS2c fehlt ein Teil davon. Von kurzen CAPS2 Varianten enthalten CAPS2d und CAPS2e diesen Bereich. Bei CAPS2f fehlt die PH-Domäne komplett (*Abbildung 6*) (Sadakata et al., 2007).

Die PH-Domäne könnte eine Rolle während der Ca^{2+} -getriggerten regulierten Exozytose bei der CAPS-Interaktion mit der Plasmamembran spielen (Grishanin et al., 2002; Lemmon 2008; Stevens et al., 2009). Die PH-Domäne zeigt durch Bindung an den ADP-Ribosylation Factor 4 und 5 (ARF4/ARF5) auch eine hohe Affinität zur Golgi-Membran und spielt damit eine Rolle bei der Regulation von DCV-Verkehr im *trans*-Golgi Netzwerk (Sadakata et al., 2010).

Es gibt noch eine zweite membranbindende Domäne, im Bereich der distalen C-terminalen Sequenzen, die die Bindung von CAPS an neuroendokrine DCVs vermittelt. Diese Domäne spielt auch eine essenzielle Rolle bei der regulierten Exozytose (Grishanin et al., 2002). Kürzlich wurde zudem festgestellt, dass der C-terminale Bereich von CAPS1 mit der GTP-bindender Domäne von Septin-Proteinen Bindungen eingehen kann und der entstandene Tertiär-Komplex aus Septin, CAPS und Syntaxin vermutlich zum DCV-Verkehr und zur Exozytose beiträgt (Hosono et al., 2016).

MHD enthält eine SID-Sequenz (Syntaxin interacting Domain), die für das Priming von Vesikeln verantwortlich gemacht wird, da sie anscheinend mit Syntaxin interagiert und dieses durch Konformationsänderung in die offene Form überführt. Dadurch gewinnt Syntaxin die Möglichkeit, mit dem SNARE-Komplex zu interagieren (Khodthong et al., 2011; Richmond et al., 2001; Stevens et al., 2009), was für das Priming von synaptischen Vesikeln essenziell ist. Allerdings widersprechen die neuen Daten, gewonnen von Versuchen mit CAPS2 und CAPS1/CAPS2 Double knock-out (DKO)-Zellen, dieser Annahme. Es wurde gezeigt, dass die Funktionsprinzipien von CAPS2 und Munc13s sich eben darin unterscheiden, dass CAPS für das Priming nicht seine MHD-Domäne, sondern die PH-Domäne nutzt (Kabachinski, et al., 2014).

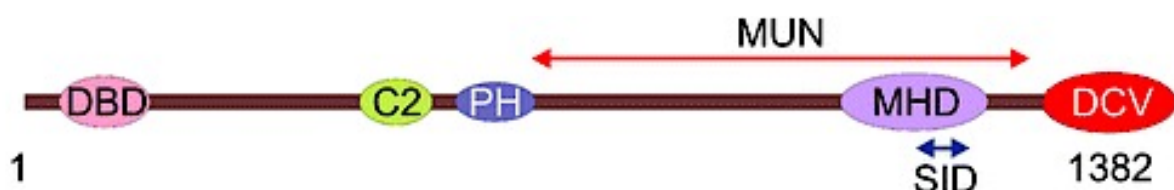


Abbildung 5: Sequenzstruktur von CAPS (nach Stevens & Rettig, 2009). Erklärungen im Text.

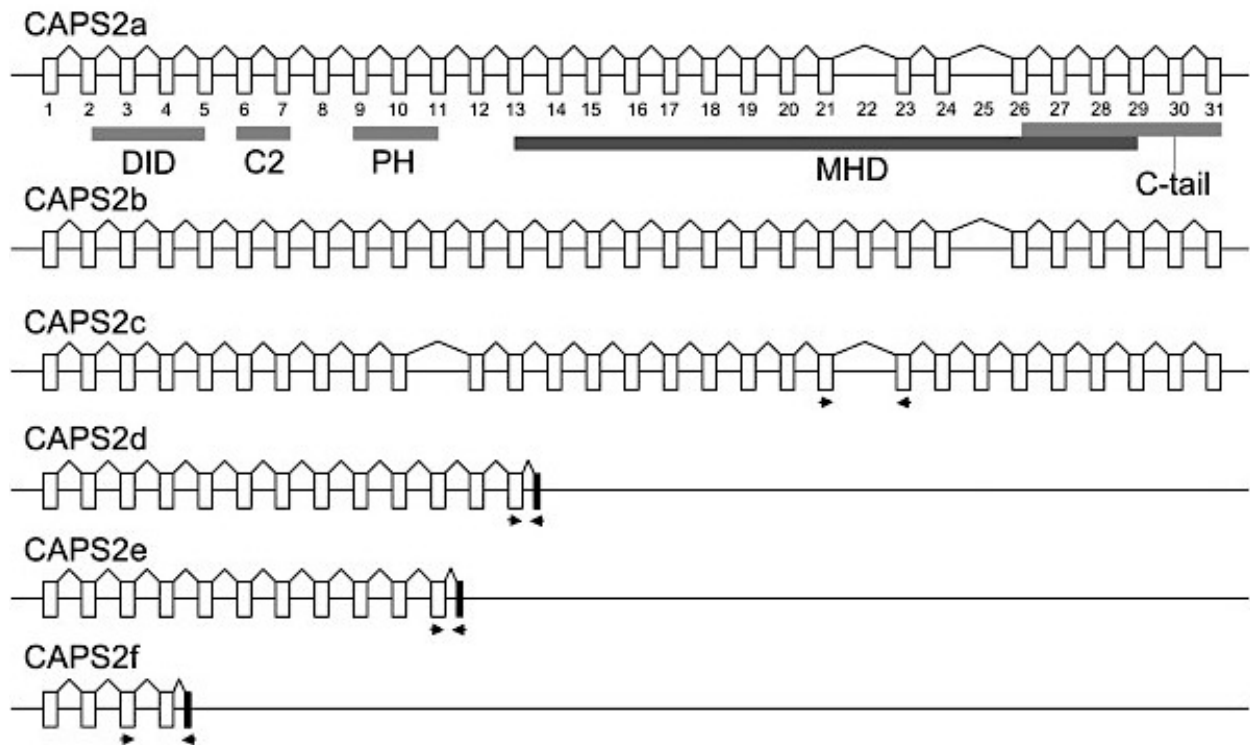


Abbildung 6: Exon- und Intronstruktur von CAPS2 Splice-Varianten (nach Sadakata et al., 2007). Erklärungen im Text.

3.4.2 Vorkommen und Gewebeverteilung von CAPS

CAPS wurde erstmals als ein 145 kDa-großes Protein beschrieben, das bei Experimenten an Phäochromozytom- (PC12) und Hypophysentumorzellen (GH3) der Ratte die Ca^{2+} -abhängige Sekretion wiederherstellte. Bei diesen Zellen war die Sekretion aufgrund der Anwendung einer speziellen Permeabilisierungstechnik, durch die die Zellen zwar ihre normale zytoplasmatische Ultrastruktur behalten, aber alle löslichen Zytosolkomponenten verloren haben, gestört worden. Es wurde seine Schlüsselrolle bei der Transduktion von Ca^{2+} -Signalen in Membranfusionsereignissen vermutet (Walent et al., 1992).

Das CAPS1-Gen wurde auch bei *Caenorhabditis Elegans* (unc-31) und *Drosophila melanogaster* (dCAPS) entdeckt. Das CAPS-Protein des Menschen ist zu 70% identisch mit dem UNC-31-Protein von *C. elegans*, dessen Rolle bei dieser Wurmart hinsichtlich der Exozytose von DCVs untersucht wurde (Speese et al., 2007).

Die immunhistochemischen Verfahren haben in den letzten Jahren Einblicke in die differenzielle Verteilung von CAPS-Proteinen innerhalb neuronaler und nicht-neuronaler

Gewebe geliefert. Es ist bekannt, dass CAPS1 und CAPS2 bei Säugetieren hauptsächlich im Gehirn exprimiert werden.

CAPS1 wird in allen Hirnregionen stark exprimiert. Im Rückenmark wurden im Vergleich dazu geringere Mengen von CAPS1 gefunden (Speidel et al., 2003). Außerdem wird in der Neurohypophyse überwiegend CAPS1 exprimiert (Sadakata et al., 2007a).

Im Gegensatz dazu ist die Expression von CAPS2 innerhalb des Gehirns auf bestimmte Zelltypen und Hirnbereiche, wie z. B. Bulbus olfactorius, Pars intermedia der Hypophyse, die Hippocampusformation, Thalamus, Tegmentum mesencephali, Cerebellum, Medulla oblongata und das Rückenmark beschränkt (Sadakata et al., 2006; Sadakata et al., 2007b). CAPS2b wird ausschließlich im Gehirn exprimiert. CAPS2a sowie die anderen Splice-Varianten werden am stärksten im Cerebellum exprimiert (Sadakata et al., 2004, 2006; Speidel et al., 2003). Die konnte man im Gehirn in hohen Mengen, aber auch in nicht-neuronalen Geweben nachweisen (Sadakata et al., 2007).

In nicht-neuronalen Geweben konnte man CAPS1 hauptsächlich in Pankreasinseln und im Nebennierenmark nachweisen (Sadakata et al., 2007a; Speidel et al., 2003). CAPS1 und CAPS2 sind in Pankreasinseln sowohl an Insulin produzierenden β -Zellen als auch an Glukagon produzierenden α -Zellen nachweisbar (Speidel et al., 2008).

CAPS2 wird auch im Bronchialepithel der Lunge, in parafollikulären Zellen der Schilddrüse, Hauptzellen des Magens, Epithelzellen von Ausführungsgängen der Speicheldrüsen, proximalen Tubuli der Niere, in wenigen Zelltypen von Thymus, Kolon, Milz, in der Leber und im Hoden exprimiert (Sadakata et al., 2007a; Speidel et al., 2003). Auch die zeitlichen Expressionsmuster im Laufe der Entwicklung unterscheiden sich bei den beiden Isoformen. Es wurde festgestellt, dass CAPS2 im Laufe der gesamten embryonalen Entwicklung relativ stabil exprimiert wird und in einem embryonalen Gehirn in etwas höheren Mengen vorkommt als in späteren Entwicklungsstadien. Der zeitliche Verlauf der Expression von CAPS1 aber ist ähnlich denen der synaptischen Marker, d. h. es lässt sich relativ spät in der Embryogenese detektieren (Tag 14), sie nimmt im weiteren Entwicklungsverlauf zu und erreicht ihr Plateau ca. 20 Tage nach der Geburt, wenn sich die meisten Synapsen schon gebildet haben (Speidel et al., 2003).

3.4.3 CAPS als Schlüsselprotein der DCV- und SV-Exozytose

Eine große Anzahl an Arbeiten fokussiert sich auf die Rolle von CAPS bei der Exozytose von DCVs (*Abbildung 7*). CAPS1 wird als ein wichtiges Priming-Protein bezeichnet, das

die Fusionskompetenz von stationären DCVs fördert (Farina et al., 2015) und möglicherweise die Fusionspore dilatiert (Elhamdani et al., 1999).

Wie oben beschrieben, weisen CAPS1 und 2 hoch identische Sequenzstrukturen auf. Das erlaubt den Rückschluss, dass diese Proteine auch funktionell sehr ähnlich sein sollten. Speidel et al. haben gezeigt, dass CAPS1 und 2 eine gleiche Wirkung auf die LDCV-Exozytose von PC12-Zellen haben (Speidel et al., 2003). Die Arbeitsgruppe hat auch gezeigt, dass die subzelluläre Verteilung von CAPS1 und 2 innerhalb des Cortex cerebri sehr ähnlich ist, die Proteine sowohl gelöst im Zytosol als auch im vesikulär membrangebundenen Zustand vorkommen und beide Isoformen präsynaptisch stark angereichert sind (Speidel et al., 2003).

CAPS liegt zwar zum größten Teil im gelösten Zustand vor, aber es kommt auch bis zu 37% membranassoziiert vor, meist an Membranlipide der DCVs gebunden (Berwin et al., 1998; Stevens et al., 2009). Auch das Vorhandensein von zwei membranbindenden Domänen (PH und DCV-bindende C-terminale Sequenz) spricht für die Rolle von CAPS bei den Membranfusionsereignissen im Rahmen der Exozytose. Darüber hinaus bestätigen die neueren Studien, dass CAPS auch ein residentes Protein der DCVs ist und zusammen mit ihnen innerhalb der Zelle transportiert wird (Kabachinski et al., 2015). Eine vollständige Ausschaltung des dCAPS-Gens bei *Drosophila* ist bereits embryonal letal, was darauf hinweist, dass dCAPS ein essenzielles Protein für das Überleben ist. Es wurde festgestellt, dass durch genannte Ausschaltung nicht nur die DCV-Exozytose, sondern auch die glutamaterge Transmission in neuromuskulären Endplatten (NMEs) stark beeinträchtigt wird (Renden et al., 2001). Das spricht für eine Rolle von CAPS auch bei der SSV-Exozytose, obwohl eine Reihe von Studien diese Rolle nur bei der DCV-Exozytose hervorheben und CAPS dabei nur eine DCV-spezifische Funktion zuschreiben.

Sowohl SSVs als auch DCVs werden in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen verschiedenen Fraktionen (Pools) zugeordnet. Die größte Fraktion ist „Depot Pool“ (DP). Dazu gehören alle Vesikel die über 200 nm von der Zellmembran entfernt sind. Diese Vesikel nähern sich der Plasmamembran und letztendlich docken sie an. Danach durchlaufen sie verschiedene „Reifungs“- oder „Priming“- Schritte, um dadurch ihre Sezernierbarkeit zu erreichen. Nach dem Andocken befinden sie sich zuerst im „Unprimed Pool“ (UPP), von wo sie in den „Slowly Releasable Pool“ (SRP) und anschließend in „Readily Releasable Pool“ (RRP) rekrutiert werden. Diese Pools entsprechen den erwähnten Reifungsstadien von Vesikeln (Becherer et al., 2006).

Jockusch et al. konnten durch Ausschaltung von CAPS-Genen bei der Maus zeigen, dass CAPS1 und 2 eine direkte Rolle bei der Generierung und Erhaltung eines funktionstüchtigen „Readily Releasable Pool“ (RRP) spielen (Jockusch et al., 2007). CAPS-Proteine sind auch wichtige Modulatoren der LDCV-vermittelten Insulin-Sekretion und spielen eine Rolle bei der Exozytose von β -Zellen und Stabilisierung ihrer Granula (Speidel et al., 2008).

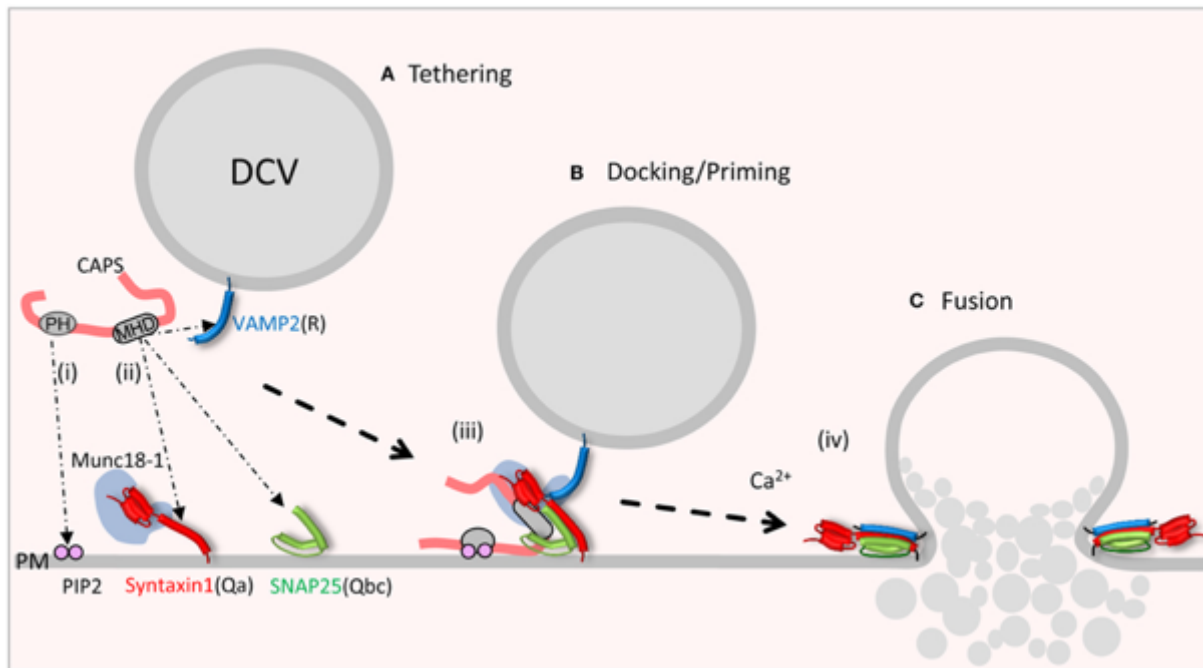


Abbildung 7: Schematische Darstellung der putativen CAPS-Funktion bei der Vesikel-Priming (nach James & Martin, 2013). PH-Domäne bindet an PIP₂ und MHD bindet an SNARE-Proteine.

3.4.4 CAPS und Vesikelfüllung

Die Bedeutung von CAPS für SVs und LDCVs besteht einerseits in seiner Rolle bei Docking und/oder Priming (*Abbildung 7*), andererseits wurde aber auch festgestellt, dass CAPS die Füllung von Vesikeln mit Neurotransmitter beeinflusst (Brunk et al., 2009; Speidel et al., 2005).

Sowohl CAPS1 und CAPS2 fördern die vesikuläre Monoaminaufnahme durch VMAT1 und VMAT2 (Brunk et al., 2009).

Der Mechanismus der CAPS-VMAT Interaktion ist aber noch nicht bekannt. Es ist nicht geklärt, ob CAPS-Proteine direkt mit den vesikulären Monoamintransportern interagieren oder ob eine Reaktionskaskade dazwischenliegt, in die noch weitere unbekannte

Elemente involviert sind. Auf diesen Aspekt der CAPS-Funktion wird im Diskussionsteil dieser Arbeit näher eingegangen. Ebenfalls noch ungeklärt ist, ob und wie die verschiedenen Splice-Varianten von CAPS2 die Monoaminaufnahme durch VMAT1 und 2 beeinflussen, oder ob es Unterschiede in der Wirkung der Splice-Varianten gibt.

3.4.5 Pathophysiologische Rolle von CAPS

CAPS2 ist ein wichtiges Protein für die Sekretion von Neurotrophinen, die eine zentrale Bedeutung für Überleben, Wachstum und Differenzierung von Neuronen haben. Der CAPS2-Einfluss wurde bei der Sekretion von Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) und Neurotrophic factor (NF-3) im Cerebellum und Hippocampus näher untersucht. Es zeigte sich, dass BDNF und NF-3 in DCVs verpackt und im Rahmen der regulierten Exozytose (depolarisationsabhängig) freigesetzt werden (Sadakata et al., 2004, 2014; Shinoda et al., 2011). Bei den CAPS2 KO Mäusen konnten eine Reduktion der BDNF-Sekretion und schwere Störungen in GABAergen Neurotransmission innerhalb des Hippocampus, einschließlich Verringerung der Zahl der GABAergen Neurone und ihrer Synapsen, beobachtet werden (Shinoda et al., 2011). Die hippokampale Neurogenese von erwachsenen und die Reifung der Neurone von neugeborenen CAPS2 KO Tieren wird stark gestört (Yagishita et al., 2017).

Die cerebelläre Entwicklung von Versuchstieren mit verändertem CAPS2, wie im Falle der dex3 Splice-Variante (Exon 3 fehlt) exprimierenden Mäusen, ist auch gestört: es sind Defizite in der dendritischen Arborisation von Purkinje-Zellen, der Fissuren- und Lobusbildung im Vermisbereich sowie bei der Proliferation von Körnerzellenvorläufern zu beobachten (Sadakata et al., 2014). Exogene CAPS2-Überexpression fördert das Überleben von Purkinje-Zellen als Konsequenz der erhöhten Neurotrophin-Freisetzung aus Körnerzellen (Sadakata et al., 2004).

Die oben genannte dex3 Splice-Variante konnte auch im Blut von einigen Autismus-Patienten nachgewiesen werden (Sadakata et al., 2007). Das menschliche CAPS2-Gen befindet sich auf Chromosom 7q31.32, und zwar in dem Bereich (7q31-33), den man mit autistischen Störungen in Zusammenhang bringt (International Molecular Genetic Study of Autism, 2001; Sadakata et al., 2013). Die Sequenzen, die sowohl bei der Maus als auch beim Menschen durch Exon 3 kodiert werden, sind identisch, und die von der Maus gewonnenen Daten zeigen, dass im Normalfall Exon 3 immer mitexprimiert wird

(Sadakata et al., 2007). Da die dex3-Variante von CAPS2 nicht in die Axone hineintransportiert werden kann, wird davon ausgegangen, dass die lokale synaptische BDNF-Ausschüttung beeinträchtigt und diese Tatsache wird wiederum mit der Ausprägung des autistischen Phänotyps in Verbindung gebracht (Sadakata et al., 2007; Sadakata et al., 2013). Es konnte noch festgestellt werden, dass bei schizophrenen Patienten die CAPS2-Expression ansteigt, die dex3 Splice-Variante wurde nicht nachgewiesen (Hattori et al., 2011).

Außerdem wird berichtet, dass CAPS2 KO Mäuse eine veränderte Antwort auf Behandlung mit Kortikosteroiden zeigen. Der schwimmstressinduzierte Anstieg von endogenen Kortikosteroiden war bei den KO Mäusen trotz vorheriger Steroidbehandlung nicht supprimiert. Das könnte für die Beeinträchtigung der negativen Rückkopplung in Abwesenheit von CAPS2 sprechen (Mishima et al., 2015).

3.5 Weitere Determinanten der Vesikelfüllung

Die Speicherung von Neurotransmittern in den synaptischen Vesikeln ist ein grundlegender Prozess der chemischen Transmission. Die erfolgreiche Anreicherung von Neurotransmittern in den Vesikeln hängt von einigen Faktoren ab. Dazu gehören neben dem Vorhandensein des entsprechenden Neurotransmittertransporters auch die Triebkraft für den Transport. Eine unspezifische Leakage der Neurotransmitter aus den Vesikeln hat auch einen Einfluss auf ihren Füllungszustand (Eisenhofer et al., 2004).

Die Triebkraft ist ein Produkt des elektrochemischen H^+ -Gradienten ($\Delta\mu H^+$) über der Vesikelmembran, die durch V-ATPase generiert wird. Bei dem elektrochemischen Gradienten sind zwei Komponenten zu unterscheiden: eine chemische - der Protonengradient (ΔpH), und eine elektrische Komponente - der elektrische Gradient ($\Delta\psi$). Der Transport von Monoaminen in die Vesikel ist an $2H^+$ -Efflux gekoppelt (*Abbildung 8*) und hängt dadurch vom Ansäuerungsgrad des Vesikellumens ab (Chaudhry et al., 2008).

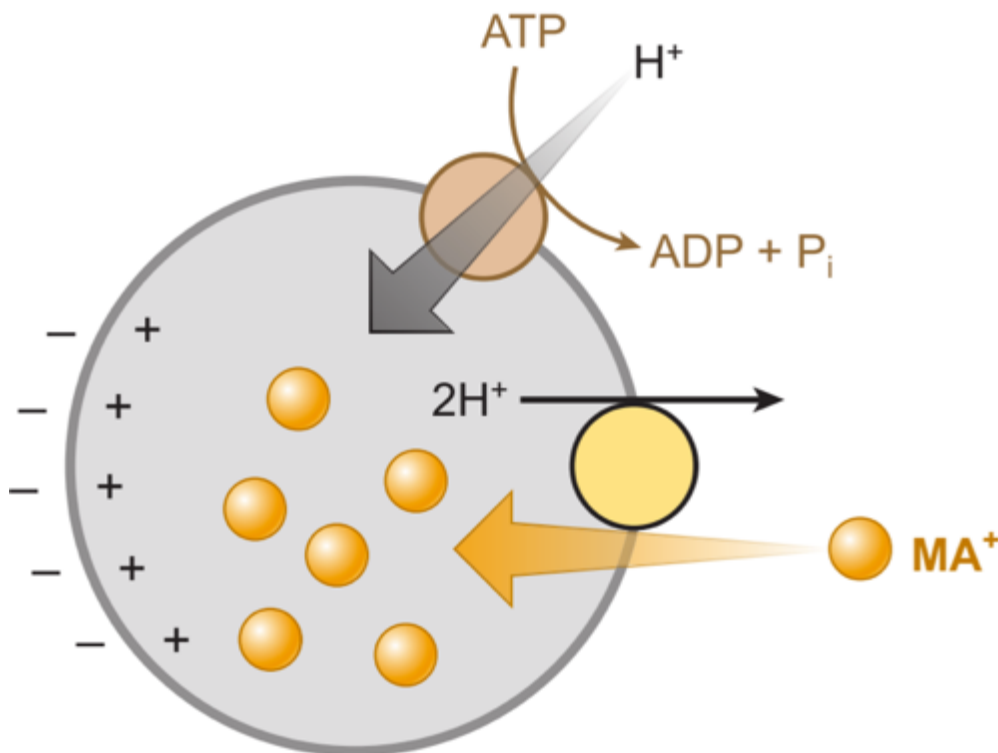


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines monoaminhaltigen Vesikels (nach Chaudhry et al., 2008). Cl^- -Kanäle sind nicht dargestellt.

Die V-ATPasen kommen an den synaptischen Vesikeln von allen klassischen Neurotransmittersystemen vor. Da sich die Ladungen von verschiedenen Neurotransmittermolekülen unterscheiden, nutzen die V-ATPasen überwiegend entweder die eine oder andere Komponente (ΔpH oder $\Delta \psi$) des elektrochemischen Gradienten ($\Delta \mu H^+$). Die Monoamintransmitter sind positiv geladen und werden wie schon erwähnt gegen $2H^+$ ausgetauscht. Folglich ist die ΔpH -Komponente viel entscheidender und der hohe Protonierungsgrad des Vesikellumens fördert den Transport über VMAT. Zusätzlich ist bekannt, dass an der Vesikelmembran auch Chloridkanäle vorhanden sind. Die Stöchiometrie und Rolle dieser sind zwar noch nicht ganz erforscht, es wird aber vermutet, dass für jedes Proton (H^+) $2Cl^-$ ausgetauscht werden. Dieser Ausgleich der elektrischen Komponente ($\Delta \psi$) des elektrochemischen Gradienten führt seinerseits zur sekundären Aktivierung der V-ATPase und dies fördert wiederum den Monoamintransport durch VMAT (Edwards 2007; Chaudhry et al., 2008).

3.6 Fragestellung

Wie oben beschrieben, ist bekannt, dass sich die Splice-Varianten von CAPS2 hinsichtlich ihres Vorkommens und ihrer Funktion unterscheiden. Andererseits ist ebenfalls bekannt, dass sich VMAT1 und VMAT2 neben ihrer Lokalisation auch in ihrer Substrataffinität sowie Regulierbarkeit unterscheiden. Die fördernde Wirkung von menschlichen CAPS-Proteinen auf VMAT1- und VMAT2-Funktion wurde schon experimentell nachgewiesen (Brunk et al., 2009), dabei wurde aber nicht zwischen den Splice-Varianten differenziert.

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung der CAPS2 Splice-Varianten CAPS2a und CAPS2b auf die vesikuläre Monoaminaufnahme durch VMAT1 und VMAT2 untersucht, um so folgende Fragen zu beantworten:

- Beeinflussen CAPS2a und CAPS2b die vesikuläre Monoaminaufnahme über VMAT1 und VMAT2?

Und falls ersteres der Fall ist

- Unterscheiden sich die beiden Splice-Varianten in ihrer Wirkung?
- Gibt es Unterschiede in der Beeinflussung der Monoaminaufnahme bezüglich VMAT1 und VMAT2?

4 Materialien und Methoden

4.1 Chemikalien

40% Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (40%; 19:1)	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma (München)
Ascorbinsäure	Sigma (München)
Bicinchoninsäure (BCA)	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
Bovines Serum Albumin, Fraktion V (BSA)	Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe)
Dithiothreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
Ethylenglykolbis(2-aminoethyl-)tetraacetat (EGTA)	Roth (Karlsruhe)
Geneticin	Invitrogen (Karlsruhe)
Glukose	Roth (Karlsruhe)
Glyzerin	Merck (Darmstadt)
Glyzin	Roth (Karlsruhe)
5'-Guanolyimidodiphosphat (GMP-P(NH)P)	Sigma (Schnelldorf)
<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure) (HEPES)	Sigma (Schnelldorf)
5-Hydroxytryptamin-Hydrochlorid	Sigma (Schnelldorf)
5-Hydroxy-[³ H]-tryptamintrifluoracetat ([³ H]-Serotonin)	GE Healthcare (München)
Immu Mount	Thermo Shandon (Pittsburgh)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)

Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka (Buchs)
Kaliumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Kaliumglutamat	Sigma (Schnelldorf)
Kanamycin	Serva (Heidelberg)
Kupfersulfat	Sigma (Schnelldorf)
Low Molecular Weight-Marker (LMW)	GE Healthcare(München)
Magermilchpulver	Molkerei Heideblume (Elsdorf)
Magnesiumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Mass-Ruler-DNA-Marker	Fermentas (St.Leonrot)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Natriumazetat	Roth (Karlsruhe)
Natriumcarbonat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg)
Natriumhydrogencarbonat	Merck (Darmstadt)
Natriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Di-Natriumtartrat	Merck (Darmstadt)
Optiphase HighSafe Szintillationsflüssigkeit	Beckman Coulter (Krefeld)
Page Ruler (Protein Marker)	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure) (Pipes)	Sigma (Schnelldorf)
Ponceau S	Sigma (Schnelldorf)
Restriktionsenzyme (EcoRI-HF)	Biolabs(Frankfurt am Main)
Reserpin	Sigma (Schnelldorf)
Salzsäure	Merck(Darmstadt)
Saccharose	Roth (Karlsruhe)
Sulfosalizylsäure	Sigma (Schnelldorf)

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe)
Trichloressigsäure	Roth (Karlsruhe)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Roth (Karlsruhe)
Trypsin	Sigma (Schnelldorf)
Trypton	Roth (Karlsruhe)
Tween 20	Roth (Karlsruhe)

4.2 Puffer und Lösungen

PBS (Phosphate Buffered Saline)

140 mM NaCl
 10 mM KCl
 6,4 mM Na₂HPO₄
 2 mM KH₂PO₄
 pH 7,4

Homogenisierungspuffer

320 mM Saccharose
 4 mM HEPES
 pH 7,4 (KOH) (vor Zugabe von Saccharose)
 +1mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)
 + Proteaseinhibitormix (Sigma) 1:1.000

Trypsinlösung

0,25 % Trypsin
 1 mM EDTA
 in PBS

Lösungen für Calcium-Phosphat-Transfektion

Lösung 1

2,5 M CaCl₂

Lösung 2 (2xHBS)

280mM NaCl
10mM KCl
1,5mM Na₂HPO₄
50mM HEPES
pH=7,05

Lösungen für Proteinbestimmung

Lösung A

1 % (w/v) BCA
17 % (w/v) Na₂CO₃
0,16 % (w/v) 2,3-Na₂C₄H₄O₆ (Di-Natriumtartrat)
0,4 % (w/v) NaOH
0,95 % (w/v) NaHCO₃

Lösung B

4 % (w/v) CuSO₄

Lösungen für Immunoblots

TS (Tris Saline)-Puffer

20 mM Tris
140 mM NaCl
pH 7,5 (HCl)

TS-Tween-Puffer

20 mM Tris
150 mM NaCl
0,1 % (v/v) Tween 20

Magermilchlösung

5 % (w/v) Magermilchpulver
0,05 % (v/v) Tween 20
in TS-Puffer

Antikörperlösung

1,5 % (w/v) BSA
in TS-Puffer

Lösungen für Elektrophorese**Laemmli-Puffer (4-fach)**

200 mM	Tris
400 mM	DTT
8 % (w/v)	SDS
0,4 % (w/v)	Bromphenolblau
40 % (v/v)	Glyzerin

Elektrophoresepuffer

25 mM	Tris
200 mM	Glyzin
3,5 mM	SDS

Ponceau S-Färbelösung

0,3 % (w/v)	Ponceau S
3 % (w/v)	Trichloressigsäure
3 % (w/v)	Sulfosalizylsäure
in ddH ₂ O	

Proteintransferpuffer (Semi-Dry)

200 mM	Glyzin
25 mM	Tris
1,3 mM	SDS
20 % (v/v)	Methanol

Tris I-Puffer (4-fach)

500 mM	Tris
0,4 % (w/v)	SDS
pH 6,8 (HCl)	

Tris II-Puffer (4-fach)

1,5 M	Tris
0,4 % (w/v)	SDS
pH 8,8 (HCl)	

Sammelgel (4%)

0,5 ml	Acrylamid/Bisacrylamid (40%, 19:1)
2,5 µl	TEMED
25 µl	10 % APS
1,25 ml	Tris I-Puffer

3,25 ml ddH₂O

Trenngel

Acrylamid/Bisacrylamid (%)	8 %	10%	12%
Tris II-Puffer	2,5 ml		
Acrylamid/Bisacrylamid (40%; 19:1)	2 ml	2,5 ml	3 ml
ddH ₂ O	5,5 ml	5 ml	4,5 ml
TEMED	5 µl		
10% APS	50 µl		

Lösungen für Neurotransmitteraufnahme

Kaliumglutamat (KG1)- Puffer

150 mM Kaliumglutamat
 20 mM Pipes
 4 mM EGTA
 2,8 mM MgCl₂ (durch Komplexbildung ca. 1 mM freies Mg²⁺)
 pH 7,0 (KOH)

Kaliumglutamat-ATP-Puffer

KG-Puffer
 2 mM Na₂-ATP

Lösungen zur Agarosegelelektrophorese

TE-(Tris-EDTA)-Puffer

10 mM Tris (pH 8,0, HCl)
 1 mM EDTA

TAE-(Tris-Acetat-EDTA)-Puffer

40 mM Trisacetat
 5 mM Natriumacetat
 1 mM EDTA
 pH 7,4 (Essigsäure)

Agarosegel

2 % (w/v) Agarose

In 1x TAE-Puffer

Lösungen für Immunfluoreszenz

Paraformaldehydlösung

4 % (w/v) Paraformaldehyd
 0,1 M Phosphatpuffer
 pH 7,4

Blocklösung

0,1 % (v/v) Triton X-100
 5 % (v/v) Normal Goat Serum (NGS)
 2 % (w/v) Bovines Serum Albumin (BSA)

2. Antikörper-Lösung

10 ml PBS
 2% BSA (200 mg)

4.3 Medien

4.3.1 Zellkulturmedien

Medium für CHOVMAT1-Zellen

180 ml DMEM/HAM's F12
 20 ml Kälberserum (FBS)
 2 ml L-Alanylglutamin (200 mM)
 2 ml Penicillin (10.000 U) / Streptomycin (10 mg/ml)

Medium für CHOVMAT2-Zellen enthält dazu noch Geneticin (0,4 mg/ml)

4.3.2 Mikrobielle Medien

Luria Bertani (LB)-Medium

10 g/l Trypton
 5 g/l Hefextrakt
 5 g/l NaCl

pH 7,0

Das LB-Medium wurde für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

Entsprechend Zusatz von Kanamycin (Endkonzentration 25 µg/ml) zum LB-Medium.

LB-Agar

10 g/l Trypton
 5 g/l Hefextrakt
 5 g/l NaCl
 15 g/l Agar
 pH 7,0

4.4 Antikörper

4.4.1 Primäre Antikörper

Anti-GFP-Antikörper Polyklonal, Kaninchen	Synaptic Systems (Göttingen, Deutschland)
Anti-VMAT 1-Antikörper Polyklonal, Kaninchen	Synaptic Systems (Göttingen, Deutschland)
Anti-VMAT 2-Antikörper Polyklonal, Kaninchen	Synaptic Systems (Göttingen, Deutschland)
Anti-CAPS2-Antikörper Polyklonal, Kaninchen	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
Anti-Aktin-Antikörper Polyklonal, Kaninchen	Sigma Aldrich (Missouri, USA)

4.4.2 Sekundäre Antikörper

Oregon green-Antikörper	Thermo Fisher Scientific
Ziege-Anti-Kaninchen-IgG	Massachusetts, USA
Peroxidase Ziege-Anti-Kaninchen	Vector Laboratories; Burlingame, USA

4.5 Vektoren / DNA

4.5.1 Vektoren

Die Vektoren stammen von der Firma QIAGEN und wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Jens Rettig zur Verfügung gestellt. Zur Initiierung der Translation an eukaryotischen Zellen (im Rahmen dieser Arbeit - CHO-Zellen) ist in die Vektoren IRES-Sequenz (Internal ribosomal entry site) eingebaut.

pMax_IRES_eGFP (Leervektor)

Der Vektor besteht aus 4398 Basenpaaren und kodiert das Enhanced Green Fluorescent Protein. Im Vektor befindet sich auch das Kanamycinresistenzgen, was die erfolgreiche Selektion von transformierten E.coli Bakterien im Kanamycin-haltigen Medium ermöglicht.

pMax_mCAPS2a-HA_IRES_eGFP - Konstrukt

Der Vektor besteht aus 8213 Basenpaaren, kodiert ebenfalls für Enhanced Green Fluorescent Protein und Kanamycinresistenz. In diesen Vektor ist auch eine für CAPS2a kodierende Sequenz eingebaut. Das ist der größte Bereich des Vektors und erstreckt sich vom 1000. bis zum 4815. Basenpaar (*Abbildung 9*).

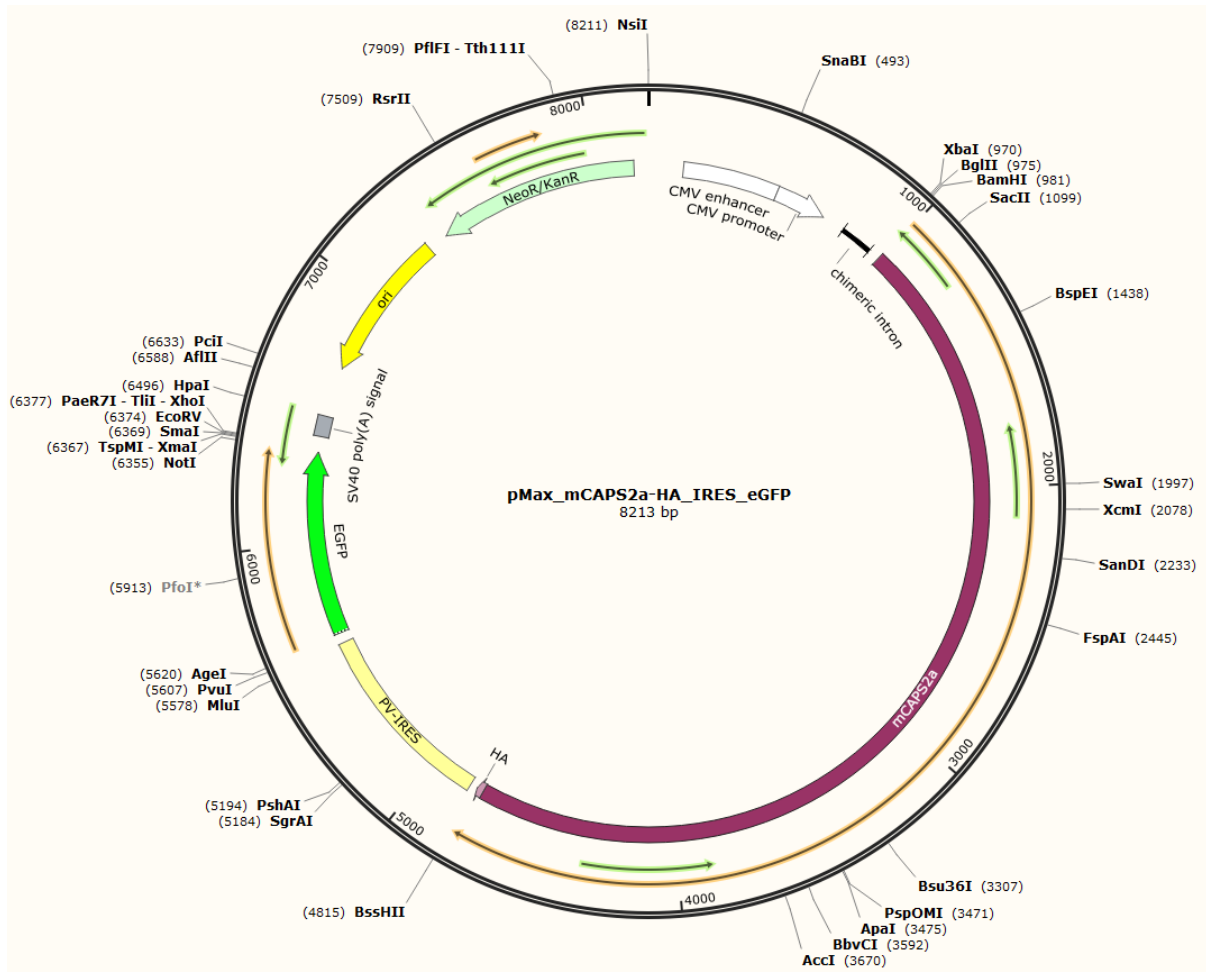


Abbildung 9: pMax_mCAPS2a-HA_Ires_eGFP – Konstrukt

pMax_mCAPS2b-HA_IRES_eGFP-Konstrukt

Der Vektor besteht aus 8333 Basenpaaren, kodiert ebenfalls für Enhanced Green Fluorescent Protein und Kanamycinresistenz. Dazu ist in diesen Vektor auch eine für CAPS2b kodierende Sequenz eingebaut. Das ist der größte Bereich des Vektors und erstreckt sich vom 1000. bis zum 4935. Basenpaar (Abbildung 10).

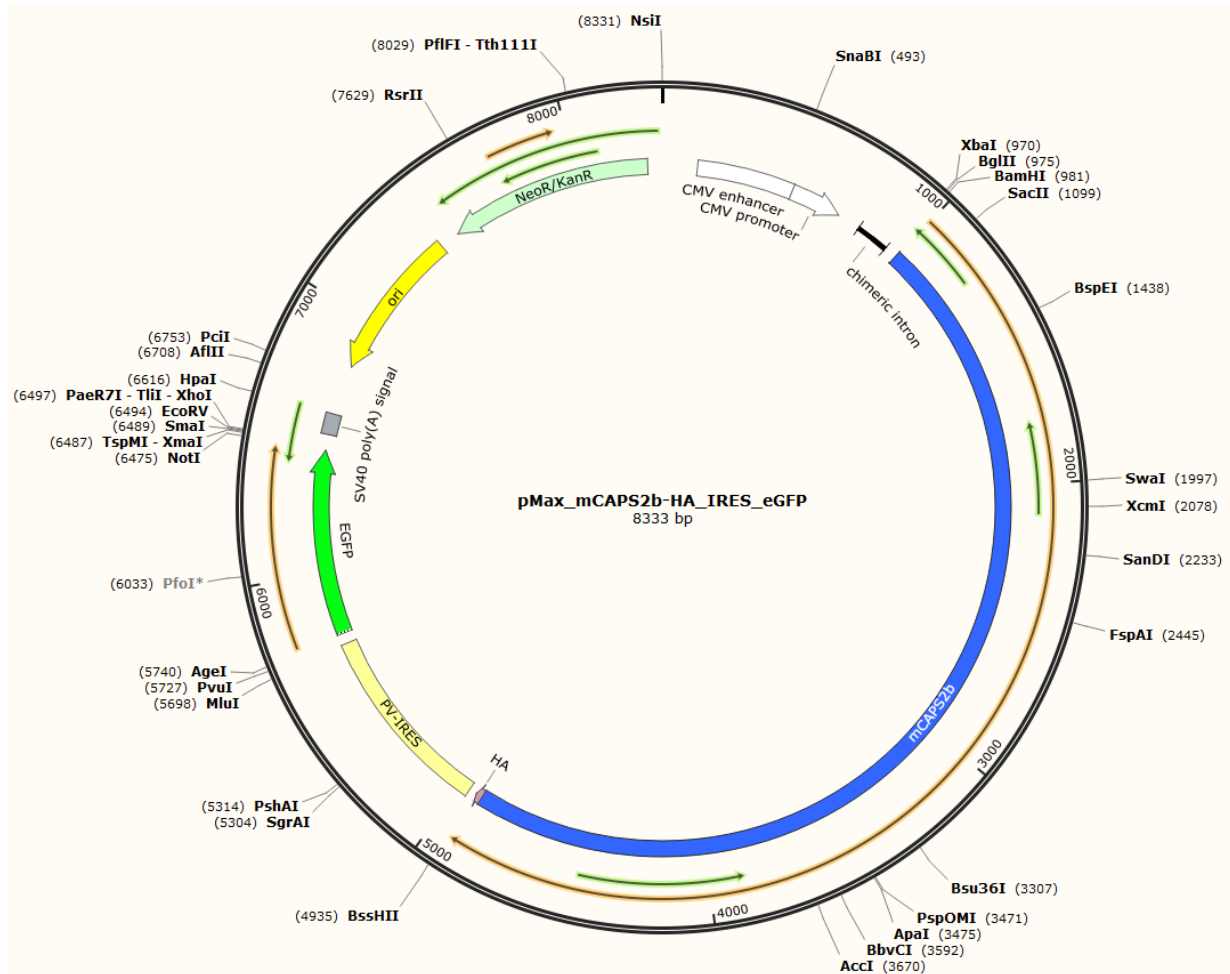


Abbildung 10: pMax_mCAPS2b-HA_Ires_eGFP – Konstrukt.

4.6 Geräte und Apparaturen

Elektrophorese

Alle Geräte für die Elektrophorese stammen von der Firma BioRad (München).

Power/Pac 200/300 Spannungsgerät

TransBlot SD Semidry Elektrophorese Transferzelle

Mini Protean II Elektrophorese-Kammer

Mini-Sub Cell GT/ Wide Mini-Sub Cell GT

Mikroskope

Leica DMLB Epifluoreszenz-Mikroskop mit Durchlichteinrichtung

Homogenisierung von Zellen

Ballhomogenisator des European Molecular Biology Laboratory (Heidelberg, Deutschland)

Zentrifugen

Beckman J2-HS Kühlzentrifuge

Rotoren: JA-14, JA-20

Eppendorf Kühlzentrifuge 5417 R

Labofuge 400 Heraeus Function Line

Cawomat 2000 IR Entwicklungsmaschine

Physia GmbH (Neu-
Isenburg)

Sonstige

Beckman LS 6500, Liquid Szintillation Counter

BioDoc Analyse (Video Dokumentationssystem)

Sterilarbeitsbänke Heraeus HeraSafe 18 / 2 bzw. Heto-Holten Safe 2010

Zellkulturbrutschränke bzw. Inkubatoren: Heraeus BB16CU / BBD 6220 bzw. T 6120

Filme - Fujifilm

Nanophotometer Implen

SPSS – zur statistischen Analyse der Daten

4.7 Methoden

4.7.1 DNA-Techniken

4.7.1.1 Transformation kompetenter E. coli Bakterien

Die Vervielfältigung von Vektoren erfolgte mit Hilfe von Escherichia coli Bakterien des Stammes Top10 F' der Firma Invitrogen. Die Bakterien wurden auf Eis langsam aufgetaut und danach wurde auf 50 µl der Bakterien-Lösung 5 µg Plasmid-DNA zugegeben. Der Ansatz wurde durch Antippen vorsichtig gemischt, für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42 °C. Nach Zugabe von 250 µl LB-Medium, wurden die transformierten E. coli Bakterien für 1 Stunde bei 37 °C und 300 Rpm inkubiert. Die Bakterien-Suspension wurde daraufhin durch Zentrifugation konzentriert, mit 100 µl LB-Medium, das Kanamycin im Verhältnis von 1:1000 enthielt, resuspendiert und auf Selektionsplatten(LB/Kan) ausgestrichen. Dadurch, dass auf den genutzten pEGFP-Vektoren das Kanamycin-Resistenzgen enthalten ist, konnten nur erfolgreich transformierte Zellen selektiert werden. Im Anschluss wurden diese Bakterienkolonien unter Einhaltung der sterilen Bedingungen in 3 ml LB-Medium überführt, das ebenfalls Kanamycin im Verhältnis von 1:1000 enthält, und über Nacht im Thermoschüttler bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde diese 3 ml Suspension in 50 ml LB-Lösung, die ebenfalls im Verhältnis 1:1000 Kanamycin enthält, überführt, um die für den nächsten Schritt erforderliche Zellmenge zu erreichen.

4.7.1.2 Isolation von Plasmid-DNA aus transformierten E. coli Bakterien

Die Isolation der Plasmid-DNA aus den transformierten E. coli Bakterien erfolgte mit Hilfe des Quantum Prep™ Plasmid Midiprep Kit von der Firma Bio-Rad. Am Tag nach der Kultivierung wurden die Bakterien bei 5000 rpm sedimentiert und die Plasmid-DNA gemäß Herstellerangaben des oben genannten Kits isoliert.

4.7.1.3 Konzentrierung der DNA durch Fällung

Als Nächstes erfolgte die Konzentrierung der DNA mittels Fällung. Dazu wurde zum nach den Arbeitsschritten mit Hilfe des Quantum Prep™ Plasmid Midiprep Kits erhaltenen wässrigen Eluat absolutes Ethanol und 3M Natrium-Acetat hinzugegeben. Die Lösung wurde durch sanftes Schwenken gemischt. Nach der Inkubation bei -20°C für mindestens 30 Minuten schloss sich eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 Minuten an. Der erhaltene Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet luftgetrocknet, anschließend im Aqua bidest gelöst (Zielkonzentration 1µg/µl).

4.7.1.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Bestimmung der Konzentration der DNA Lösungen erfolgte fotometrisch bei 260nm Wellenlänge.

4.7.1.5 Restriktion von DNA durch Endonukleasen

Die Restriktion von allen drei Vektoren erfolgte im Rahmen der Vorbereitung zur Restriktionsanalyse. Es wurde eine zweistündige Inkubation mit entsprechenden Restriktionsenzymen in einem für die jeweils eingesetzten Enzyme geeigneten Puffer und optimalen Temperatur durchgeführt. Die Konstrukte wurden dadurch in kleinere DNA-Fragmente geschnitten und im Anschluss mittels Agarose-Gelelektrophorese charakterisiert. Es wurde das Restriktionsenzym EcoRI-HF von der Firma Bio Labs verwendet.

4.7.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Nach der Restriktion wurden die DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Es wurden 1%ige Agarosegele verwendet. Gele wurden wie folgt hergestellt: TAE-Puffer wurde mit der entsprechenden Menge Agarose vermischt und in einer Mikrowelle aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Die entstandene Lösung

wurde mit 1 µl/ml Ethidiumbromid versetzt, in den vorbereiteten Rahmen (Biorad) gegossen und ausgekühlt. Nach Auftragen der entsprechenden DNA-Lösung (20 µl) und des Mass-Ruler-DNA-Ladder-Markers (5 µl) (Fermentas) wurde die Elektrophorese in TAE-Puffer bei 100 Volt für 35 Min durchgeführt. Im Anschluss wurden die Gele unter UV-Licht bei 254 nm Wellenlänge betrachtet, fotografiert und ausgewertet.

4.7.2 Zellkulturarbeiten

4.7.2.1 CHO-Zellen

Es wurde die CHO Zelllinie, generiert aus Fibroblasten aus Ovarien des chinesischen Hamsters, verwendet. Die für diese Arbeit verwendeten CHO-Zellen waren mit VMAT1 und VMAT2 stabil transfiziert. Sie wurden auf 100 mm Kulturschalen ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden für die Versuche abgelöst. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Schale mit 3 ml PBS-Lösung gespült. Danach wurde zur Erleichterung der Ablösung 1 ml (1:10) Trypsinlösung auf die Zellen zugegeben, welche sofort abgesaugt wurde. Nach 2 min Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit 1 ml PBS abgelöst und daraufhin für 5 min bei 1300 x g zentrifugiert. Die sedimentierten CHO-Zellen wurden so mit 1 ml PBS versetzt für Neurotransmitteraufnahmetests verwendet oder, mit Kulturmedium versetzt, in der gewünschten Dichte wieder ausgesät.

4.7.3 Bestimmung der Neurotransmitteraufnahme

4.7.3.1 Permeabilisierung von Zellen

Zur Durchführung der Neurotransmitteraufnahmetests war es nötig, die Neurotransmitter unabhängig von membrangebundenen Transportern in die Zellen zu bringen. Dazu wurde eine Permeabilisierungstechnik mit porenbildenden Toxinen angewendet. Es wurde Streptolysin-O (SLO) von Streptococcus pyogenes verwendet. SLO bindet an Cholesterol in der Plasmamembran (Höltje - Dissertation 2000) und besitzt hämolytische Aktivität (HE/ml) (Ahnert-Hilger et al., 2000). Die durch Oligomere des SLO gebildeten

heterogenen Poren lassen Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 150 kDa passieren, wodurch eine passive Neurotransmitteraufnahme ermöglicht wird (Höltje - Dissertation 2000).

Dazu wurde der PBS-Überstand von sedimentierten Zellen entfernt, die Zellen in 1 ml KG1 Puffer resuspendiert und in Eppendorfgefäße überführt. Danach wurde die Zellsuspension bei 4°C mit 2.000 x g für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zur Vorbereitung der Permeabilisierungslösung erneut im 882 µl KG1 Puffer resuspendiert. Es wurden jeweils 9 µl SLO und DTT (1mM) Lösungen zugegeben. Die Rolle von DTT besteht in der Reduktion der Disulfidbrücken. Im nächsten Schritt wurde dieser Ansatz 10 min auf Eis inkubiert. Dabei bindet SLO an das Cholesterin der Plasmamembran. Anschließend wurden die Proben für 10 min auf 37°C erwärmt. Dadurch wird die Porenbildung induziert. Danach wurden die Proben bei 4°C zentrifugiert (2 min bei 2.000 x g) und das Pellet wurde in KG-ATP-Puffer für die Neurotransmitteraufnahmetests resuspendiert.

4.7.3.2 Monoaminaufnahme in die permeabilisierte Zellen

Die Zellsuspension aus permeabilisierten CHOVMAT1- oder CHOVMAT2-Zellen (je nach Versuchsaufbau) wurde zu je 25 µl in die erforderliche Anzahl an Reaktionsgefäßen verteilt. Es wurde Radiolösung angesetzt, bestehend aus KG 1 Puffer, Ascorbinsäure (2 mM), 0,5 mM ATP und 160 nM 3H-5HT. Eine Probe pro Bedingung wurde mit 12 µM Reserpin versetzt, um die spezifische Monoaminaufnahme zu hemmen und so das Ausmaß der unspezifischen Monoaminaufnahme zu ermitteln. Radiolösung und Zellsuspension wurden im Verhältnis 1:1 miteinander gemischt (jeweils 25 µl + 25 µl pro Probe). Nach einer Inkubation für 10 min bei 37°C wurden 800 µl eiskalten KG1 Puffers zugegeben, um die Aufnahme zu beenden. Es folgten 2 Zentrifugationsschritte bei 4°C und 20.800 x g zuerst für 3 min, dann für 1 min um die Radiolösung möglichst vollständig zu entfernen. Die Pellets wurden anschließend mit 200 µl 0,4 % Triton-X100 in H₂O resuspendiert, 10 min bei Raumtemperatur und 10 Min bei 42°C inkubiert und dadurch lysiert. Im nächsten Schritt wurden 100 µl von jeder Suspension in entsprechende mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit gefüllte Szintillationsgefäße zugegeben und im Beckman LS 6500, Liquid Szintillation Counter gemessen. Der Rest vom Lysat wurde für eine Proteinbestimmung verwendet.

Die radioaktiven Zerfälle pro Minute wurden in DPM ermittelt und die Messwerte über 1 min gemittelt. Für die Neurotransmitteraufnahme wurden ohne Inhibitor Fünffach-Bestimmungen, und pro Bedingung Einzelmessungen mit dem spezifischen Inhibitor (Reserpin) gemacht. Die Subtraktion der DPM-Werte der durch Reserpin gehemmten Aufnahme von denen der Ungehemmten ergab das Δ DPM, das durch die spezifische Serotoninaufnahme verursacht war.

Die Berechnung der Tritium-markierten Serotoninaufnahme erfolgte nach folgender Formel:

$$MA = 1/60 \text{ Bq} \times \text{dpm} \times 1 / (m_{\text{Protein}} \times 1/1000 \times A_s)$$

MA	Monoaminaufnahme, bezogen auf die Proteinmenge der Probe [$\mu\text{mol}/\text{mg}$]
m_{protein}	Proteinmenge der untersuchten Probe [mg]
dpm	Zerfälle pro Minute (1 dpm = 1/60Bq)
A_s	spezifische Aktivität des radioaktiv markierten Monoamins [TBq/mmol]

4.7.4 Bestimmung der Neurotransmitteraufnahme nach Transfektion der Zellen.

4.7.4.1 Transfektion

Für die Transfektionsversuche wurden mit VMAT1 und VMAT2 stabil transfizierte CHO-Zelllinien verwendet. Es wurde die Calciumphosphat-DNA-Kopräzipitationstechnik angewendet.

Bei der Transfektion wurde nach 4.7.1.2 isolierte und nach 4.7.1.3 konzentrierte Plasmid DNA in die Zellen hineingebracht. Dabei wurden pro Vektor drei 100 mm Schalen transfiziert. Pro Schale wurde 25 μl 2,5 M CaCl_2 Lösung mit 15 μl DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) gemischt und die Gesamtlösung mit dd H_2O auf 250 μl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde pro Schale mit 250 μl 2xHBS vermischt und 30 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei bildet die lösliche DNA einen unlöslichen Komplex mit dem Kalziumphosphat und während der Inkubation nehmen diese Präzipitate an Größe zu, die anschließend nach der Zugabe in das Kulturmedium durch die Zellen endozytotisch aufgenommen werden. Nach der Transfektion wurden die Zellkulturschalen zum Erreichen der erwünschten

Wachstumsdichte in den Brutschrank (37°C und 5% CO₂) gestellt, nach 24 Stunden Mediumwechsel durchgeführt. 24 Stunden nach dem Mediumwechsel wurden Neurotransmitteraufnahmeversuche durchgeführt. Wie in 4.5.1 beschrieben, war in die DNA-Konstrukte eine Sequenz für GFP (Green Fluorescent Protein) eingebaut. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde die Eigenfluoreszenz des GFP durch eine Immunfluoreszenz-Färbung verstärkt.

Zur Kontrolle wurden die Zellen auch mit pEGFP – Leervektor transfiziert.

4.7.4.2 Bestimmung der Neurotransmitteraufnahme nach Transfektion

Die transfizierten CHOVMAT1- und CHOVMAT2-Zellen wurden, wie oben bei CHO-Zellen erläutert, von den Zellkulturschalen abgelöst, die Deckgläschen für die Immunfluoreszenzfärbung wurden entfernt. Anschließend wurden die Zellen wie in 4.7.3.1 beschrieben mit SLO permeabilisiert. Danach wurde ein Neurotransmitteraufnahmetest mit Tritium markiertem Serotonin (80nM) durchgeführt. Hier wurden pro Vektor Fünffach-Bestimmungen ohne und eine Einfach-Bestimmung mit Reserpin durchgeführt. Die Berechnung der Menge des aufgenommenen Serotonins erfolgte wie oben in 4.7.3.2 beschrieben. Es folgte außerdem die Bestimmung der Proteinkonzentration nach BCA-Methode (s. 4.7.6.1).

4.7.4.3 Immunfluoreszenzfärbung und Fluoreszenzmikroskopie

Die Kulturschalen wurden immer mit 2 Deckgläschen pro Transfektionsansatz vorbereitet. Vor dem Ablösen der Zellen von den Zellkulturschalen wurden die Deckgläschen entfernt und in 24-Loch-Titerplatten zweimal für 10 Min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen zur Fixierung für 30 Min in 4% Paraformaldehyd-Lösung inkubiert, danach wieder zweimal für 10 Min in PBS gewaschen. Ein Teil der Deckgläschen wurde ohne anschließende Antikörperfärbung eingedeckelt, um die nicht verstärkte Fluoreszenz von GFP zu detektieren.

Ein anderer Teil von Deckgläschen wurde für 1 Stunde in Blocklösung inkubiert und im Anschluss mit Anti-GFP-Antikörper (1:3000) versetzt. Es erfolgte eine Inkubation bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung entfernt und die Deckgläschen

zweimal für 10 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Inkubation für zwei Stunden mit Oregon-Green als Sekundärantikörper durchgeführt. Danach erfolgten zwei Waschschriffe für 10 min mit PBS und ein Waschschriff für 10 min mit dd H₂O. Anschließend wurden die Deckgläschen mit Hilfe von Immumount auf dem Objektträger fixiert. Am nächsten Tag wurden die Präparate mikroskopiert (Leica DMLB Epifluoreszenz Mikroskop) und fotografiert. Über die Bilder wurde ein Raster gelegt, um das Auszählen der Zellen zu erleichtern. Die fluoreszierenden Zellen wurden ausgezählt und zur Gesamtzahl der Zellen ins Verhältnis gesetzt, um die Transfektionseffizienz in Prozent zu ermitteln.

4.7.5 Homogenisierung von CHOVMAT1- und CHOVMAT2-Zellen und subzelluläre Fraktionierung

Für die Homogenisierung wurden die transfizierten CHOVMAT1- und CHOVMAT2-Zellen wie in 4.7.2.1 beschrieben von den Kulturschalen abgelöst und für 5 min bei 1000 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml 4°C kalten Homogenisierungspuffer resuspendiert. Alle nächsten Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Homogenisierung erfolgte mit Hilfe des vorgekühlten Ballhomogenisators (European Molecular Biology Laboratory). Danach wurde das Homogenisat 15 min bei 2400 x g zentrifugiert. Der postnukleäre Überstand wurde vom Pellet, das aus Zellfragmenten besteht, getrennt und für weitere Versuche entnommen. Anschließend wurde die Proteinkonzentration nach der BCA Methode (s. 4.7.6.1) ermittelt.

4.7.6 Protein-Techniken

4.7.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mithilfe der BCA-Methode (Smith PK et al., 1985) ermittelt. Die Bestimmung erfolgte in 96-Loch-Mikrotiterplatten. Dazu wurden je 20 µl jeder Probe in 200 µl BCA-Reagenz (50:1-Mischung von BCA Lösung A und B) pipettiert. Zur Bestimmung einer Standardkurve wurden zudem der Leerwert (0,4% Triton-X100)

und 50, 100, 200, 400, 500 µg/µl- Konzentrationen einer Triton-Protein-Lösung aufgetragen. Die Mikrotiterplatte wurde danach für 20 Minuten bei 60°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Messung von jeweiligen Absorptionen bei einer Wellenlänge von 550nm im Elisa-Reader durchgeführt. Die Errechnung der Proteinkonzentrationen erfolgte über die Standardkurve. Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt und daraus konnte ein Mittelwert für jeden Probenansatz ermittelt werden.

4.7.6.2 Proteingelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proben (postnukleärer Überstand) wurden nach BCA Test im Verhältnis 3:1 mit 4x Laemmli-Puffer versetzt und für 10 min bei 90°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf die Polyacrylamidgele (3,75%iges Sammelgel, 8%iges Trenngel) aufgetragen. Als Referenz wurde Page Ruler (Prestained Protein Ladder) von Thermo Scientific benutzt. Die Gelelektrophorese erfolgte in der Elektrophorese-Kammer von BioRad in Elektrophoresepuffer. Die Spannung im System lag für Sammelgel bei 80 V und für Trenngel bei 150 V.

4.7.6.3 Western-Blot und Immunfärbung

Nach der Elektrophorese wurde das Trenngel auf die mit Transferpuffer (Semidry-Puffer) benetzte Nitrozellulosemembran gelegt. Darunter und darüber kamen jeweils 2 Schichten von in Semidry-Puffer angefeuchteten Filterpapiere. Das Ganze wurde luftfrei in einer Semi-Dry-Blot-Kammer zusammengedrückt. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Nitrozellulosemembranen erfolgte über ein elektrisches Feld (0,3 A pro Gel für 45 Minuten). Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran mit Ponceau-S-Lösung angefärbt, um die Proteinbanden zu visualisieren. Danach erfolgte eine Fotodokumentation und im Anschluss wurde die Membran passend zu gesuchten Proteinbanden geschnitten.

Vor der Inkubation in der Antikörperlösung wurde die geschnittene Nitrozellulosemembran in Magermilchlösung gewaschen. Dadurch konnten die unspezifischen Bindungsstellen für Antikörper gesättigt werden. Anschließend wurden die Membranen bei 4°C über Nacht mit dem jeweiligen ersten Antikörper in geeigneter

Verdünnung inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Antikörperlösung entfernt und die Membranen wieder für 1 Stunde in Magermilchlösung gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit Zweitantikörperlösung (Peroxidasegekoppelte-Ziege-Anti-Kaninchen). Danach wurden die Blots gründlich in zwei Zyklen jeweils 10 Min mit TS-Tween-Puffer, Urea- und NaCl-Lösungen gewaschen. Zuletzt wurden die Blots im Chemilumineszenzverfahren nach der „*enhanced chemiluminescence*“ (ECL-Methode) (Xu HJ et al., 1992) bearbeitet und die Antikörpergelabelten Proteinbanden konnten sichtbar gemacht werden. Dazu wurde ECL-Lösung auf die Blots gegeben und diese wurden dann zusammen mit einem Fotofilm in eine Filmkassette gelegt. Je nach Bildqualität und Ausprägung des Hintergrundrauschens wurden verschiedene Belichtungszeiten gewählt. Die Entwicklung des Fotofilms erfolgte vollautomatisch in der Cawomat 2000 IR Entwicklungsmaschine.

4.7.7 Datenanalyse

Wie in den Kapiteln 4.7.3.2 und 4.7.4.2 erläutert, wurden die Aufnahmewerte für jeden Vektor (Leervektor, CAPS2a, CAPS2b) pro Einzelversuch fünffach ermittelt. Zur Erstellung der Diagramme von Einzelversuchen (Abb. 11, Abb. 14 und Abb. 17) wurden die Mittelwerte der Serotoninaufnahme der Einzelproben pro mg Protein herangezogen. Für die Gegenüberstellung der Versuchsgruppen (Abb. 16 und Abb. 19) wurden die Mittelwerte der Einzelexperimente verwendet. Die statistische Datenanalyse erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS. Die Standardabweichung (SD) wurde bei gesamten Experimenten als reale Streubreite berücksichtigt. Alle angegebenen p-Werte wurden für beide Zelllinien (CHOVMAT1 und CHOVMAT2) mittels Kruskal-Wallis H-Test ermittelt.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung von CHOVMAT1- und CHOVMAT2- Zellen

Voraussetzung zur Beantwortung der Fragestellung war, dass unser Modellsystem alle für den Transport notwendigen Komponenten aufweist und dass diese funktionstüchtig sind. Daher mussten die Transporter VMAT1 und VMAT2 in den entsprechenden Zelllinien nachgewiesen werden und ihre Fähigkeit zur Monoaminaufnahme in deren intrazellulären Kompartimente überprüft werden. Die Expression der Transporter in den CHOVMAT1- und CHOVMAT2-Zellen wurde daher in jedem Experiment überprüft: Nach der Kultivierung wurden die Zellen homogenisiert und subzellulär fraktioniert, die Transporter anschließend im postnukleären Überstand mittels Western-Blot detektiert. Die grundsätzliche Fähigkeit zur Monoaminaufnahme in die intrazellulären Kompartimente wurde in jedem Experiment an nicht-CAPS-transfizierten Zellen mitüberprüft.

Vor Beginn der Transfektionsexperimente wurde das methodische Funktionieren des Neurotransmitteraufnahmeassays an CHOVMAT1-Zellen überprüft (*Abbildung 11*).

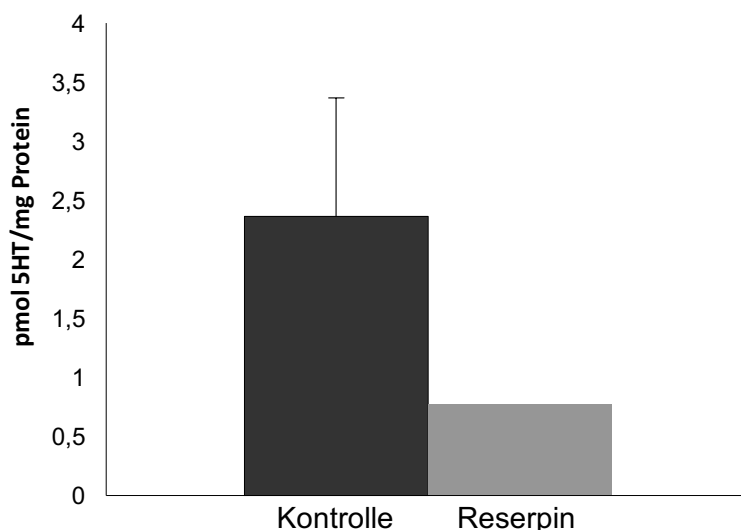


Abbildung 11: Vesikuläre Serotoninaufnahme von CHOVMAT1-Zellen. CHOVMAT1-Zellen wurden nach Kultivierung permeabilisiert und mit [³H]-Serotonin inkubiert. Die unspezifische Serotoninaufnahme wurde in Gegenwart von 6µM Reserpin bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die intrazellulären

Kompartimente von VMAT1-exprimierenden CHO-Zellen Serotonin spezifisch aufnehmen. Die Werte sind angegeben als der Durchschnitt von Vierfachwerten +/- Standardabweichung.

Außerdem wurde vorab die Expression von VMAT1 und VMAT2 in den für die Transfektionsexperimente verwendeten Zelllinien mittels SDS-PAGE/Western-Blot überprüft (*Abbildung 12*).

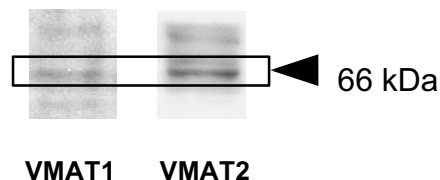


Abbildung 12: Nachweis von VMAT1 und VMAT2 im postnukleären Überstand von CHOVMAT1- und CHOVMAT2-Zellen mittels SDS-PAGE/Western-Blot. VMAT1 und VMAT2 stabil exprimierende CHO-Zellen wurden homogenisiert, zentrifugiert und der postnukleäre Überstand wurde in Lämmli-Puffer aufgenommen. Nach SDS-PAGE/Western Blot wurde eine Immunfärbung mit anti-VMAT1 und anti-VMAT2 durchgeführt. VMAT1 und VMAT2 konnten in erwarteter Laufweite von ca. 66 kDa nachgewiesen werden.

5.2 Einfluss von CAPS2a und CAPS2b auf Serotoninaufnahme in intrazelluläre Kompartimente durch VMAT1 und VMAT2

Aus zurückliegenden Experimenten war bekannt, dass CAPS1 und CAPS2 (Calcium dependent activator protein for secretion) in VMAT1 und VMAT2 exprimierenden CHO-Zellen die Monoaminaufnahme in intrazelluläre Kompartimente fördern (Brunk et al., 2009). In dieser Arbeit haben wir an CHO-Zellen die Wirkung der CAPS2 Splice-Varianten CAPS2a und CAPS2b auf die Funktion von VMAT1 und VMAT2 untersucht.

Als Erstes mussten wir die für entsprechende CAPS-Varianten kodierenden Vektoren (pMax_mCAPS2a-HA_IRES_eGFP und pMax_mCAPS2b-HA_IRES_eGFP) in die Zellen hineinbringen. Dazu wurde durch entsprechende DNA-Vervielfältigungs- und Präparationsschritte die gewünschte Konzentration von 1 µg/µl der jeweiligen Konstrukte erreicht, anschließend CHOVMAT1 und CHOVMAT2-Zellen mittels Calcium Phosphat DNA-Kopräzipitationstechnik transfiziert. Nach 48 Stunden wurden mit diesen Zellen Serotoninaufnahmetests durchgeführt und bei jedem Versuch die Transfektionseffizienz mittels Immunfluoreszenzmikroskopie ermittelt. Die immunfluoreszenzmikroskopisch

ermittelten Transfektionseffizienzen wurden für alle Transfektionen bestimmt, dokumentiert. Die Transfektionseffizienzen der einzelnen Versuche sowie der Mittelwerte in Prozent sind für beide Zellgruppen in der *Tabelle 1* dargestellt. Versuche mit einer Transfektionseffizienz unterhalb von 20% wurden nicht in die Analyse der Serotoninaufnahme nach Transfektion miteinbezogen, da wegen der aus Vergangenheit bekannten relativ geringen Effekte (Brunk et al., 2009) davon auszugehen war, dass kein messbarer Effekt nachweisbar sein würde.

CHOVMAT1-Zellen		
Leervektor	CAPS2a	CAPS2b
55	51	40
52	61	47
52	44	46
35	29	47
39	59	45
44	47	50
54	46	55
42	39	31
67	75	66
32	49	31
42	22	31
46,7	47,5	44,5

CHOVMAT2-Zellen		
Leervektor	CAPS2a	CAPS2b
60	48	73
46	44	55
39	57	39
47	45	47
67	60	41
46	47	54
44	38	40
25	18	25
36	44	39
50	35	25
24	32	29
47	58	32
43	42	35
25	38	35
33	54	44
42	24	32
42,5	43,1	40,7

Tabelle 1: Transfektionseffizienzen von 11 Transfektionen von CHOVMAT1 und 16 Transfektionen von CHOVMAT2-Zellen. Transfizierte Zellen wurden über Immunfluoreszenz sichtbar gemacht und die Relation von fluoreszierenden Zellen zu Gesamtzellzahl wurde bestimmt. Die Tabellen enthalten die Prozentwerte, die Mittelwerte sind gelb markiert.

In den jeweils transfizierten CHOVMAT1 und CHOVMAT2-Zellen wurden CAPS2, GFP, VMAT1, VMAT2 sowie Aktin mittels SDS-PAGE/Western Blot nachgewiesen (*Abbildung 13*).

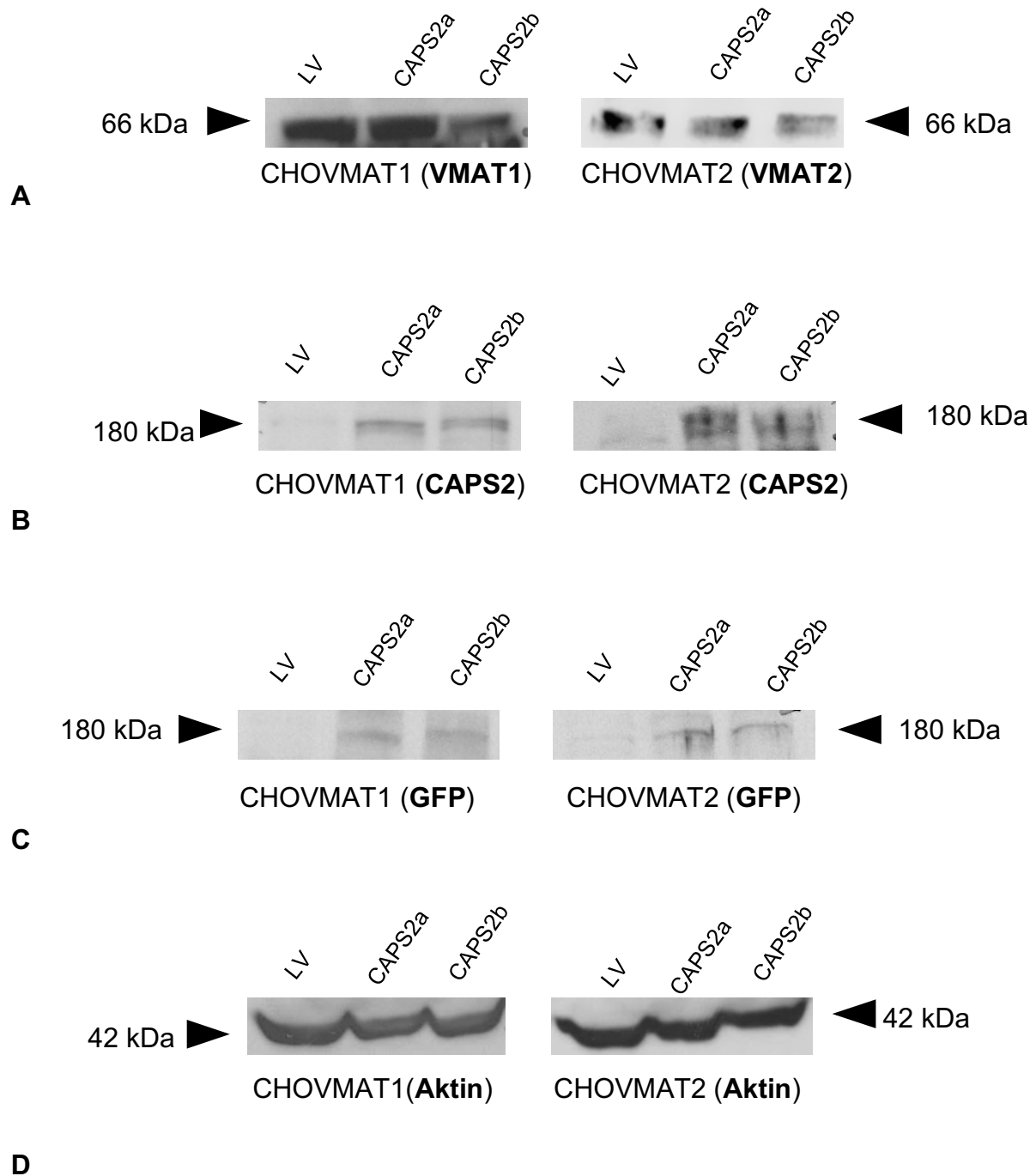


Abbildung 13: Nachweis von VMAT1, VMAT2 sowie CAPS2 und GFP im postnukleären Überstand der transfizierten CHOVMAT1- und CHOVMAT2-Zellen mittels SDS-PAGE/Western-Blot.

CHOVMAT1 und CHOVMAT2-Zellen wurden nach der Transfektion homogenisiert und subzellulär fraktioniert. Nach SDS-PAGE/Western Blot wurde eine Immunfärbung mit den entsprechenden Antikörpern durchgeführt. LV-Leervektor.

10A: Nachweis von VMAT1 und VMAT2. Die entsprechenden Proteine sind wie erwartet bei entsprechenden Zelllinien auf Laufweite von 66 kDa nachweisbar.

10B: Nachweis von CAPS2. Das Protein ist an GFP gekoppelt und daher in Laufweite von 170-190 kDa (Summe Molekulargewichte CAPS2 und GFP) nachweisbar. Bei mit Leervektor transfizierten Zellen konnte erwartungsgemäß kein CAPS2 nachgewiesen werden.

10C: Nachweis von GFP. Das Protein ist an CAPS gekoppelt und daher in Laufweite von 170-190 kDa (Summe Molekulargewichte CAPS2 und GFP) nachweisbar.

10D: Nachweis von Aktin. Das Protein ist wie erwartet auf Laufweite von 42 kDa nachweisbar.

Mit den transfizierten Zellen wurden anschließend Monoaminaufnahmetests durchgeführt. Die Versuche zeigten, dass CAPS2b-transfizierte Zellen im Vergleich zum Leervektor und zu CAPS2a-transfizierten Zellen mehr [³H]-Serotonin aufnehmen (Abbildung 14).

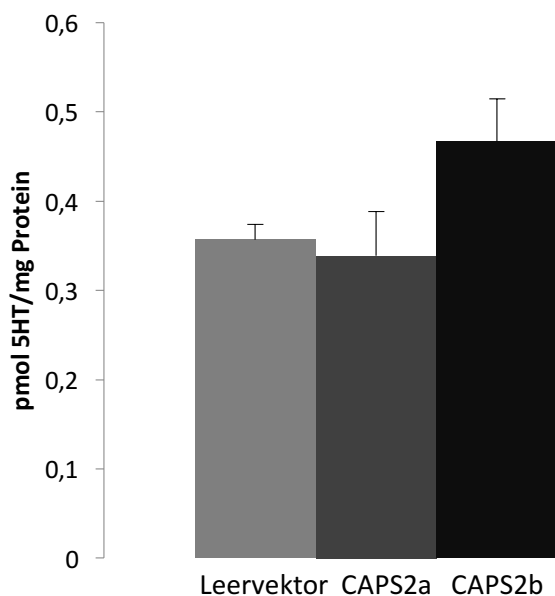


Abbildung 14: Einfluss von CAPS2a und CAPS2b auf die [³H] Serotoninaufnahme in intrazelluläre Kompartimente von CHOVMAT1-Zellen (Einzelversuch).

Die CHOVMAT1-Zellen wurden mit unverändertem sowie CAPS2a- und CAPS2b-haltigem pMax-HA_IRES_eGFP-Vektor transfiziert, nach Kultivierung permeabilisiert und mit [³H]-Serotonin inkubiert. Anschließend wurde die Serotoninaufnahme in intrazelluläre Kompartimente gemessen. Leervektor-transfizierte CHOVMAT1-Zellen dienen als Kontrolle.

Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines einzelnen, exemplarischen Serotoninaufnahmetests, die unspezifische Aufnahme in Gegenwart von Reserpin wurde subtrahiert. CAPS2b-transfizierte CHOVMAT1-Zellen nahmen mehr Serotonin auf als Leervektor-transfizierte Zellen (Kruskall-Wallis H-Test ergab einen p-Wert von 0,009). Die Werte sind angegeben als der Durchschnitt von Fünffachwerten +/- Standardabweichung pro Vektor.

Abbildung 15 zeigt die Immunfluoreszenz- und lichtmikroskopischen Aufnahmen der transfizierten CHOVMAT1-Zellen des in Abbildung 14 dargestellten Versuchs.

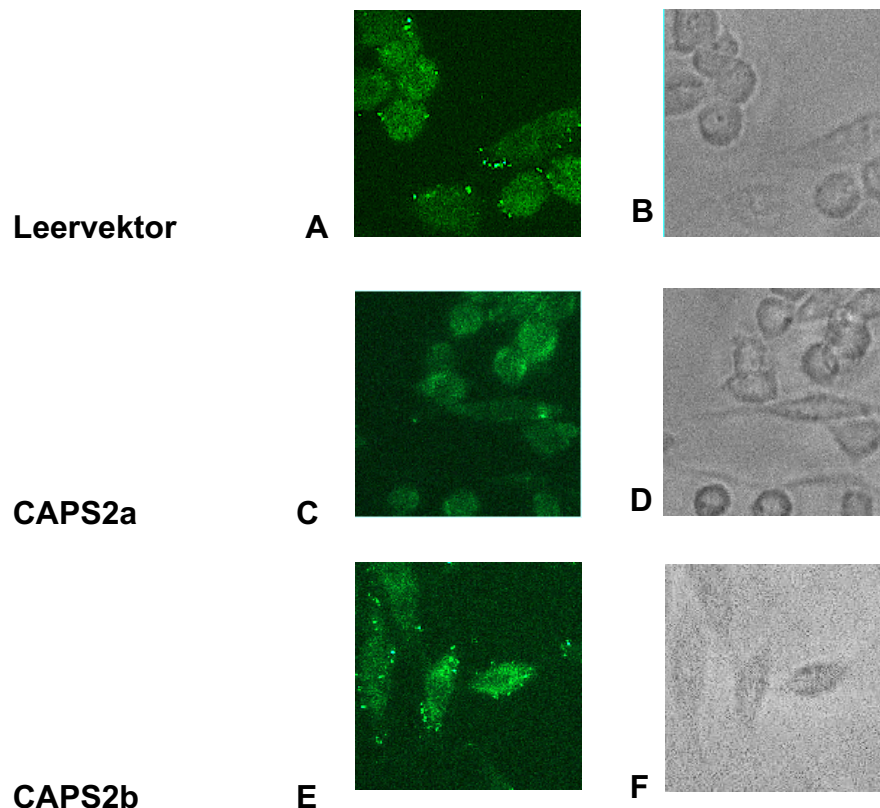
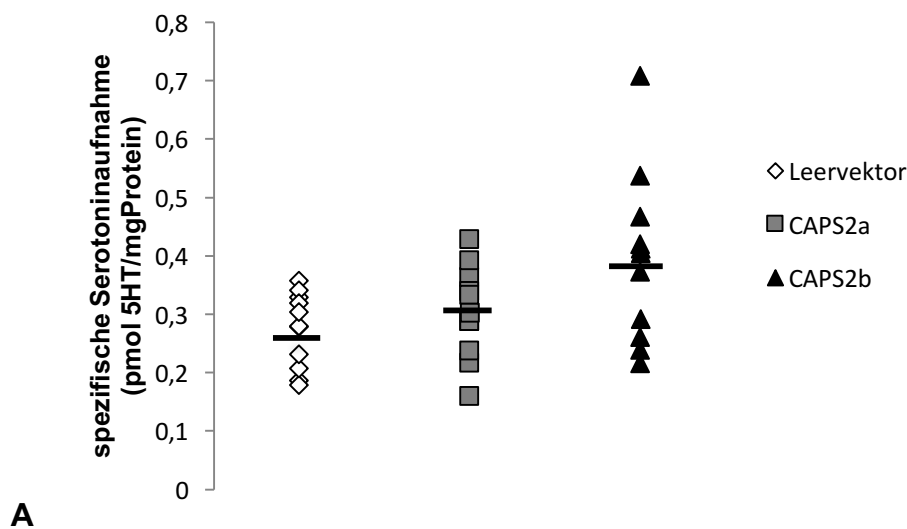


Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopische und durchlichtmikroskopische Darstellung von CAPS2a- und CAPS2b-transfizierten CHOVMAT1-Zellen.

Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische (A, C, E) und durchlichtmikroskopische Ansichten (B, D, F) von CAPS2a- und CAPS2b-transfizierten CHOVMAT1-Zellen. Dabei wurden CHOVMAT1-Zellen mit unverändertem sowie CAPS2a- und CAPS2b-haltigem pMax-HA_IRES_eGFP-Vektor transfiziert. Diese enthalten eine für das grün fluoreszierende Protein (GFP) kodierende Sequenz. Nach Kultivierung der Zellen für 72 Stunden wurden sie gewaschen, fixiert, anschließend mit anti-GFP (1:3000) als Primär- und Oregon Green (1:500) als Sekundäntikörper behandelt, um die Eigenfluoreszenz des GFP zu verstärken. Durch Auszählung der fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Zellen unter dem Epifluoreszenz-Mikroskop und Vergleich zur Gesamtzellzahl unter Durchlichtmikroskop konnte die Transfektionseffizienz bestimmt werden. Die Transfektionseffizienz bei Leervektor-, CAPS2a- und CAPS2b-transfizierten Zellen betrug in diesem Einzelexperiment jeweils 54%, 46% und 55%.

Das in Abbildung 14 dargestellte Einzelexperiment wurde für die CHOVMAT1-Zellen insgesamt elfmal wiederholt. Abbildung 16 zeigt die Zusammenfassung der Einzelexperimente: im Mittel haben die CAPS2a-transfizierten Zellen im Vergleich zu Leervektor-transfizierten Zellen etwa 11 Prozent mehr Serotonin aufgenommen, der Unterschied war aber nicht signifikant. CAPS2b-transfizierte Zellen nahmen aber etwa

44 Prozent mehr Serotonin auf als mit Leervektor transfizierte Zellen. Der statistische Vergleich der absoluten Aufnahmewerte mittels Kruskal-Wallis H-Test ergab jedoch trotzdem keinen Unterschied ($p=0,058$) zwischen den Gruppen (*Abbildung 16A*). Da die Aufnahmefähigkeit der nach Transfektion kultivierten Zellen von Versuch zu Versuch deutlich schwankt, wird die Variabilität der Werte in den einzelnen Untergruppen erhöht. Daher wurden für jeden Versuch die Aufnahmewerte nach Transfektion mit CAPS2a oder CAPS2b auf den Aufnahmewert nach Transfektion mit dem Leervektor normiert, um Kultivierungsbedingte Schwankungen in der Aufnahme aller Zellen zu eliminieren. Der statistische Vergleich der normierten Aufnahmewerte nach Transfektion ergab, dass CAPS2b-transfizierte Zellen signifikant mehr Serotonin aufnahmen ($p=0,005$) als CAPS2a-transfizierte Zellen (*Abbildung 16B*).



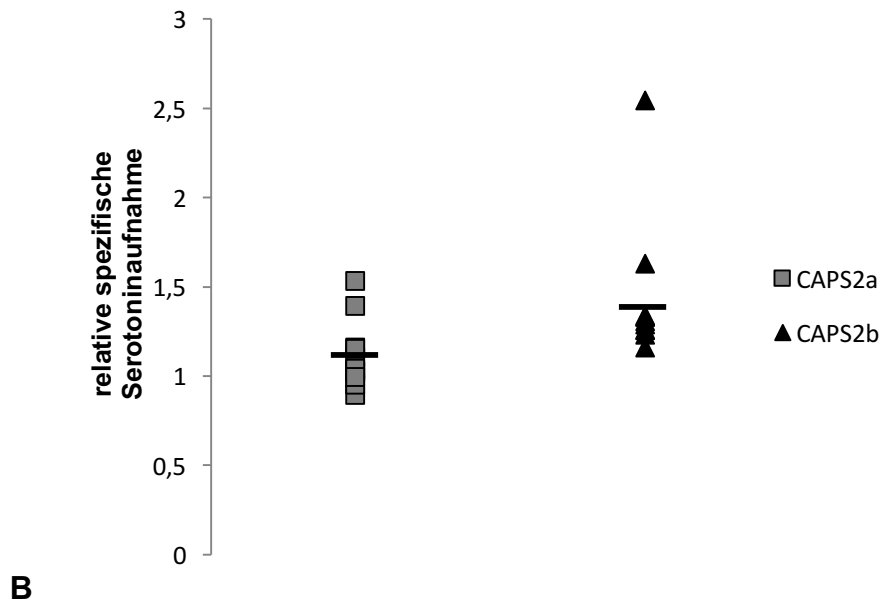


Abbildung 16:

16A: Spezifische Serotoninaufnahme intrazellulärer Kompartimente von CAPS2a- und CAPS2b-transfizierten CHOVMAT1-Zellen.

Dargestellt ist das mittlere (der Balken entspricht dem jeweiligen Mittelwert) Ergebnis von 11 gleichartig durchgeführten Versuchen, in denen die Serotoninaufnahmen in intrazelluläre Kompartimente von Leervektor-, CAPS2a- und CAPS2b-transfizierten Zellen miteinander verglichen werden. CAPS2b-Zellen nahmen mehr auf als Leervektor und CAPS2a-Zellen. Der Kruskal-Wallis H-Test ergab einen p-Wert von 0,058, der Unterschied war also nicht signifikant.

16B: Relative spezifische Serotoninaufnahme von CAPS2a- und CAPS2b-transfizierten CHOVMAT1-Zellen, normiert gegen Leervektor. CAPS2b-transfizierte Zellen nahmen mehr Serotonin auf als CAPS2a-transfizierte Zellen. Kruskal-Wallis H-Test ergab einen p-Wert von 0,005.

Analog zu den Experimenten mit VMAT1-exprimierenden CHO-Zellen wurden CHOVMAT2-Zellen mit CAPS2a und CAPS2b transfiziert und bezüglich der Transfektionseffizienz sowie der Serotoninaufnahme in intrazelluläre Kompartimente analysiert (*Abbildung 17*).

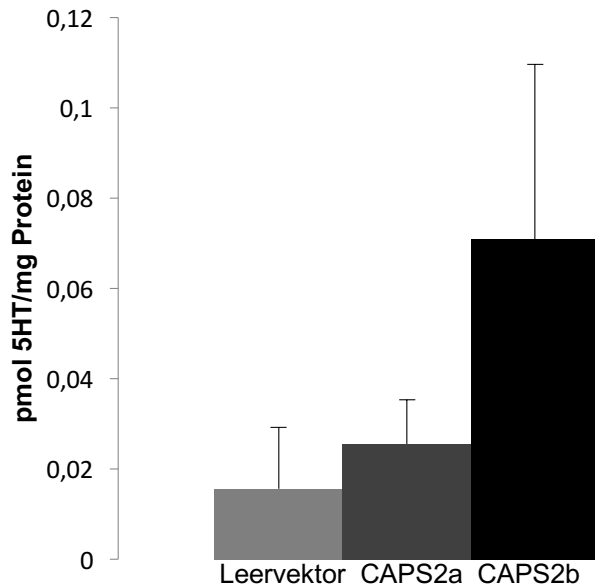


Abbildung 17: Einfluss der CAPS2-Varianten CAPS2a und CAPS2b auf die [³H] Serotoninaufnahme in intrazelluläre Kompartimente von CHOVMAT2-Zellen (Einzelversuch).

Die CHOVMAT2-Zellen wurden mit unverändertem sowie mit CAPS2a- und CAPS2b-haltigem pMax-HA_IRES_eGFP-Vektor transfiziert, nach Kultivierung permeabilisiert und mit [³H]-Serotonin inkubiert. Anschließend wurde die Serotoninaufnahme in intrazelluläre Kompartimente gemessen. Leervektor-transfizierte CHOVMAT2-Zellen dienten als Kontrolle. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines einzelnen Serotoninaufnahmetests. Die höchste Serotoninaufnahme wird bei CAPS2b-transfizierten CHO VMAT2-Zellen beobachtet (Kruskal-Wallis H-Test ergab einen p-Wert von 0,031). Die Werte sind angegeben als der Durchschnitt von Fünffachwerten +/- Standardabweichung pro Vektor.

Abbildung 18 zeigt die Immunfluoreszenz- und lichtmikroskopischen Aufnahmen der transfizierten CHOVMAT2-Zellen des in *Abbildung 17* dargestellten Versuchs.

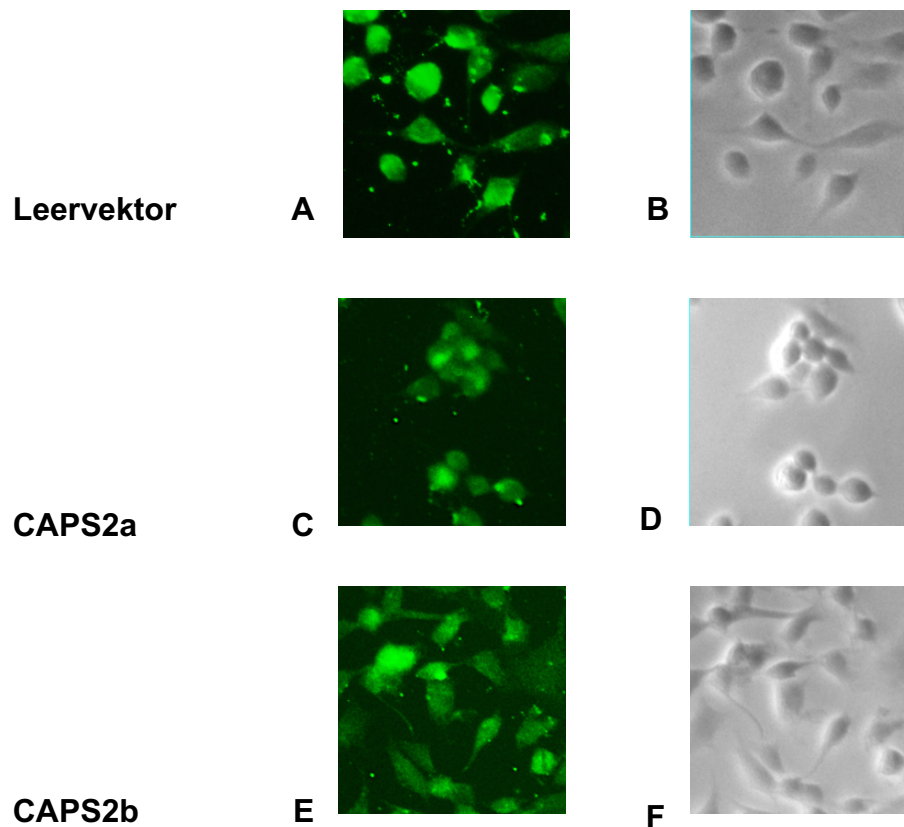


Abbildung 18: Fluoreszenzmikroskopische und durchlichtmikroskopische Darstellung von CAPS2a- und CAPS2b-transfizierten CHOVMAT2-Zellen.

Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische (A, C, E) und durchlichtmikroskopische Ansichten (B, D, F) von mit unveränderten sowie CAPS2a- und CAPS2b-haltigem pMax-HA_IRES_eGFP-Vektor transfizierten CHOVMAT2-Zellen. Nach Kultivierung der Zellen für 72 Stunden wurden sie gewaschen, fixiert, anschließend mit anti-GFP (1:3000) als Primär- und Oregon Green (1:500) als Sekundärantikörper behandelt. Durch Auszählung der fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Zellen unter dem Epifluoreszenz-Mikroskop und Vergleich zur Gesamtzellzahl unter Durchlichtmikroskop konnte die Transfektionseffizienz bestimmt werden. Die Transfektionseffizienz bei Leervektor-, CAPS2a- und CAPS2b-transfizierten Zellen betrug jeweils 50%, 35% und 25% für den hier dargestellten Versuch.

Das in *Abbildung 17* dargestellte Einzelexperiment wurde für die CHOVMAT2-Zellen insgesamt sechzehnmal wiederholt. *Abbildung 19* zeigt die Zusammenfassung der Einzelexperimente. Im Mittel zeigte sich, dass CAPS2a-transfizierte Zellen eine vergleichbar hohe Aufnahme wie Leervektor-transfizierte Zellen haben. CAPS2b-transfizierte Zellen nahmen aber etwa 42 Prozent mehr Serotonin auf als Leervektor-transfizierte Zellen. Der statistische Vergleich mittels Kruskal-Wallis H-Test ergab jedoch keinen Unterschied ($p=0,191$) zwischen den Gruppen (*Abbildung 19A*). Da auch hier die

Aufnahmefähigkeit der kultivierten Zellen von Versuch zu Versuch schwankt, wird wiederum die Variabilität der Werte in den einzelnen Untergruppen erhöht. Daher wurden für jeden Versuch die Aufnahmewerte nach Transfektion mit CAPS2a oder CAPS2b auf den Aufnahmewert nach Transfektion mit dem Leervektor normiert. Der statistische Vergleich der normierten Aufnahmewerte nach Transfektion ergab, dass CAPS2b-transfizierte Zellen signifikant mehr Serotonin aufnahmen ($p=0,013$) als CAPS2a-transfizierte Zellen (Abbildung 19B).

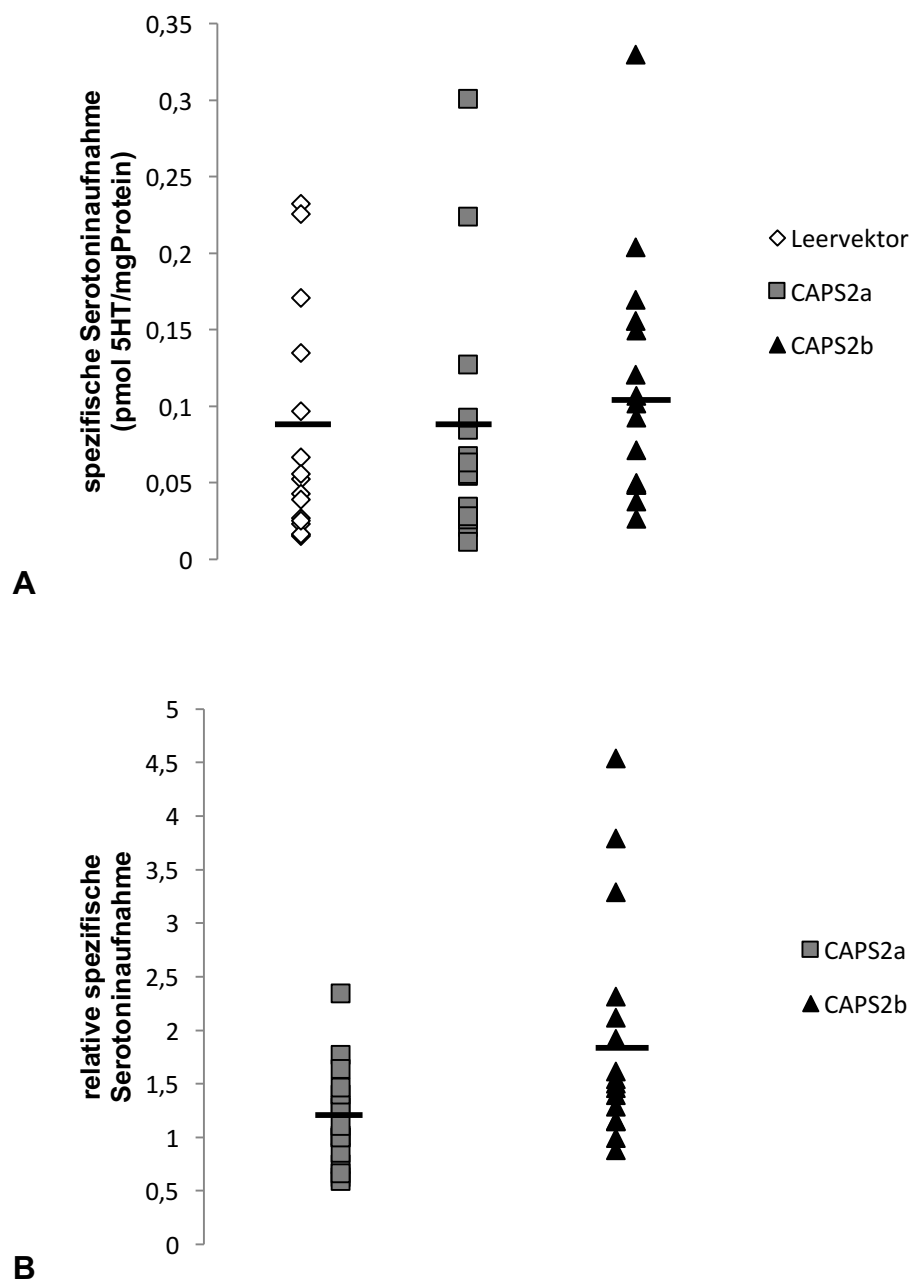


Abbildung 19:**19A: Einfluss von CAPS2a und CAPS2b auf die Monoaminaufnahme in intrazelluläre Kompartimente von CHOVMAT2-Zellen.**

Es sind 16 gleich durchgeführte Versuche dargestellt. Das Diagramm zeigt das mittlere Ergebnis der 16 gleichartig durchgeführten Versuche, mit dem Vergleich der [³H]-Serotoninaufnahmen in intrazelluläre Kompartimente von Leervektor-, CAPS2a- und CAPS2b-transfizierten Zellen. Die Monoaminaufnahme in intrazelluläre Kompartimente von CAPS2b-transfizierten Zellen erscheint höher im Vergleich zu Leervektor- und CAPS2a-transfizierten Zellen. Der Vergleich aller Gruppen mittels des Kruskal-Wallis H-Tests ergab jedoch einen p-Wert von 0,191, somit besteht kein signifikanter Unterschied.

19B: Relative spezifische Serotoninaufnahme in intrazelluläre Kompartimente von CAPS2a- und CAPS2b-transfizierten CHOVMAT2-Zellen, normiert gegen Leervektor. CAPS2b-transfizierte CHOVMAT2-Zellen nahmen signifikant mehr Serotonin als CAPS2a-transfizierte Zellen auf. Kruskal-Wallis H-Test ergab einen p-Wert von 0,013.

Zusammengefasst zeigen unsere Ergebnisse, dass die Monoaminaufnahme in intrazelluläre Kompartimente der transfizierten CHOVMAT1- und CHOVMAT2-Zellen durch CAPS2b im Vergleich zu Leervektor jeweils um 44% und 42% erhöht wird. Bei transfizierten CHOVMAT1- und CHOVMAT2-Zellen erhöht CAPS2a die Monoaminaufnahme jeweils nur um 11% und 3%. Der statistische Vergleich mittels Kruskal-Wallis H-Test zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Durch Schwankungen der Aufnahmefähigkeit der beiden Zelllinien im gesamten Verlauf der Versuche wird die Variabilität der Werte in den einzelnen Untergruppen erhöht. Daher wurden bei beiden Zelllinien für jeden Versuch die Aufnahmewerte nach Transfektion mit CAPS2a oder CAPS2b auf den Aufnahmewert nach Transfektion mit dem Leervektor normiert. Der statistische Vergleich der Aufnahmewerte nach Transfektion zeigte bei CHOVMAT1-Zellen mit 17,4%, bei CHOVMAT2-Zellen mit 65,2% eine signifikante Erhöhung der Serotoninaufnahme von CAPS2b-transfizierten Zellen im Vergleich zu CAPS2a-transfizierten Zellen.

6 Diskussion

Das initial als p145 bezeichnete CAPS konnte nach seiner Sequenzierung als ein Wirbeltier-Homolog von UNC-31 eingeordnet werden (Ann et al., 1997). UNC-31 ist ein Protein von *C. elegans* und ist bei diesem Organismus wichtig für die Neurosekretion. Seine Mutation führt zu verschiedenen Defekten im Nervensystem. Einer von diesen ist eine motorische Störung, die sich durch unkoordinierte Bewegungen äußert, daher auch der Name „UNC - uncoordinated“ (Speese et al., 2007; Stevens et al., 2009). Die Tatsache, dass die homozygoten CAPS1 KO-Mäuse nur für 10 bis 30 Sekunden lebensfähig sind (Speidel et al., 2005), ist der beste Beweis für die Wichtigkeit dieses Proteins im Organismus von Säugetieren. Man konnte außerdem feststellen, dass das Protein mit moderater Affinität ($K_d=270\mu\text{M}$) Ca^{2+} bindet (Stevens et al., 2009). So wurde p145 in CAPS (manchmal CADPS) – „Calcium dependent Activator Protein for Secretion“ umbenannt. Auf diese Rolle von CAPS bei der Sekretion von DCVs und SSVs fokussieren eine Vielzahl an Untersuchungen.

Trotz der intensiven Forschung in den letzten Jahren kann man die Frage zur CAPS-Funktion immer noch nicht endgültig beantworten (Südhof et al., 2005).

Molekulargenetische Studien haben die Rolle von CAPS1 bei der Katecholaminspeicherung beleuchtet (Speidel et al., 2005). Diese Daten wurden später durch Versuche mit transfizierten CHOVMAT1- und CHOVMAT2-Zellen ergänzt (Brunk et al., 2009). Die genannten Arbeiten haben die Erkenntnis geliefert, dass einerseits ohne CAPS1 bis zu 70% der katecholaminhaltigen Vesikel nicht befüllt werden, andererseits wurde festgestellt, dass sowohl CAPS1 als auch CAPS2 die Monoaminaufnahme durch VMAT1 und VMAT2 fördern. Dabei wurden Splice-Varianten nicht berücksichtigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Splice-Varianten von CAPS2 (CAPS2a und CAPS2b) die Monoaminaufnahme bei CHOVMAT1 und CHOVMAT2 Zellen beeinflussen und ob es zwischen der Beeinflussung von VMAT1- und VMAT2-Funktion Unterschiede gibt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Monoaminaufnahme in intrazelluläre Kompartimente von CHOVMAT1- und CHOVMAT2-Zellen durch Überexpression von CAPS2b im Vergleich zu CAPS2a erhöht wird.

Im Folgenden wird zunächst das CHO-Zellsystem als Modell für die Untersuchung der VMAT-Funktion diskutiert, anschließend wird die Rolle von CAPS-Proteinen bei Vesikelfüllung und Regulation der VMAT-Funktion besprochen.

6.1 CHO-Zellsystem als Modell für die Untersuchung der Funktion von Monoamintransporter 1 und 2

Eine wichtige Eigenschaft des CHO-Zellsystems ist die Möglichkeit, durch Transfektion Zellklone herzustellen, die in der Lage sind, verschiedene Gene stabil zu exprimieren. Das CHO-Zellsystem umfasst verschiedene Zelllinien, die vom Ovar des Chinesischen Hamsters stammen (CHO – Chinese Hamster Ovar), immortalisiert sind und erstmalig 1956 von Herrn Theodore Puck isoliert wurden (Fischer et al., 2015). Für diese Arbeit standen CHO-Zelllinien zur Verfügung, die jeweils stabil mit Wildtyp VMAT1 bzw. VMAT2-DNA transfiziert sind. Nach Transfektion werden die Transporter auf die Endosomen der CHO-Zellen sortiert, um die Transport von Monoaminen in diese zu bewerkstelligen (Liu et al., 1994). Die verwendeten CHO-Zellen exprimieren also dauerhaft VMAT1 bzw. VMAT2, entbehren aber jegliche andere Monoaminsynthetisierende oder -abbauende Enzyme oder weitere Monoamintransporter (Brunk et al., 2006). Das ermöglicht eine Untersuchung des Monoamintransports ohne Beeinflussung durch endogene Transporter oder Enzyme.

Um herauszufinden, wie sich die Monoaminaufnahme durch die Splice-Varianten CAPS2a und CAPS2b verändert, haben wir die permanent VMAT1- und VMAT2-exprimierenden CHO-Zellen transient mit CAPS2a und CAPS2b mittels Calcium Phosphat Kopräzipitationstechnik transfiziert. Zu den Vorteilen dieser Transfektionstechnik gehört schnelle Durchführbarkeit mit relativ geringem Aufwand u.a. im Sinne der Kosten, die Möglichkeit, eine große Menge an Säugerzellen zu transfizieren sowie eine gute Verteilung von der Plasmid-DNA in Präzipitaten (Kaestner et al., 2015). Ein enges pH-Optimum (7,05 bis 7,12), eine mögliche Ansäuerung des Mediums im Laufe der Transfektion, dadurch resultierender Zelluntergang und infolgedessen eine mögliche geringe Transfektionseffizienz gehören zu den Nachteilen dieser Methode (Graham et al., 1973; Kaestner et al., 2015). Wir haben uns an empfohlenen Protokollen orientiert und haben in den meisten Fällen sowohl bei CHOVMAT1- als auch bei CHOVMAT2-Zellen eine gute Transfektionseffizienz beobachtet (Tabelle 1).

Die Methode der Serotoninaufnahme in permeabilisierte (transfizierte) Zellen eignet sich optimal zur unmittelbaren Untersuchung der VMAT-Funktion in An- oder Abwesenheit von verschiedenen Molekülen wie CAPS. Das ermöglicht uns im Vergleich zu elektrophysiologischen Verfahren die direkte Messung der Monoaminaufnahme. Bei

diesem experimentellen Modell werden die Monoamine in die intrazellulären (endosomalen) Kompartimente der CHO-Zellen aufgenommen, die analog zu synaptischen Vesikeln betrachtet werden. Allerdings sind die endosomalen Kompartimente von CHO-Zellen nur begrenzt mit SSVs oder LDCVs vergleichbar, wodurch die eingeschränkte Übertragbarkeit dieses Modells auf Neurone oder andere sezernierende Zellen bedingt ist.

Die meisten Arbeiten über CAPS liefern Daten aus Membrankapazitätsmessungen und Amperometrie. Membranfusion lässt sich zwar durch Kapazitätsmessung detektieren, dies allein liefert aber keine Aussagen über den Füllungszustand von Vesikeln oder darüber, ob die Fusion auch tatsächlich zur Transmitterfreisetzung geführt hat. Durch Amperometrie kann die Freisetzung der oxidierbaren Transmitter mittels Kohlefaserelektroden elektrochemisch detektiert werden (Zhou et al., 1996). Dies liefert jedoch auch nur einen indirekten Hinweis auf die Transportfähigkeit der vesikulären Neurotransmitter-Transporter. Aus dieser Sicht liefert das von uns angewendete Verfahren eine direktere Information über den Einfluss von CAPS2-Isoformen auf die VMAT-Funktion und ist dadurch eine gute Ergänzung zu den elektrophysiologischen Techniken.

6.2 Die Bedeutung von CAPS für die Füllung der monoaminhaltigen Vesikel

Wie beschrieben, werden Monoamine nach der Biosynthese über VMAT1 und VMAT2 in die Vesikel transportiert und dort gespeichert. Beobachtungen an embryonalen chromaffinen Zellen von homozygoten CAPS1 KO Mäusen haben gezeigt, dass in Abwesenheit von CAPS1 über 70% der sezernierten Vesikel keine Katecholamine enthalten (Speidel et al., 2005), d.h. im leeren Zustand in die Exozytose geschickt werden. Bei Zellen von heterozygoten CAPS1 KO Tieren, die im Vergleich zu Wildtyp Tieren 50% weniger CAPS1 exprimierten, waren im Alter von 30 Tagen keine leeren Vesikel zu sehen. Das könnte man als ersten Hinweis auf die Rolle von CAPS bei der Füllung von Vesikeln interpretieren. Es konnten bei chromaffinen Zellen der oben genannten homozygoten CAPS1 KO Tieren keine Änderungen in der Fusionskinetik der Vesikel festgestellt werden. Gleichzeitig wurde auch eine massive Erhöhung der Produkte des zytosolischen Katecholamin-Metabolismus beobachtet. All das spricht für

das Ausbleiben des Transports von Katecholaminen in die Vesikel und/oder der Speicherung in Abwesenheit von CAPS1. Der molekulare Mechanismus dieser CAPS-Wirkung bleibt aber unklar. Die Rolle von CAPS2 und seinen Splice-Varianten bei der Vesikelfüllung wurde zwar im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, die Daten lieferten aber einen Hinweis auf die fördernde Wirkung von CAPS-Proteinen auf die Vesikelfüllung und dienten als Anlass für die weiteren Untersuchungen in dieser Richtung.

Im Rahmen einer anderen Arbeit (Liu et al., 2008) wurden beide CAPS Isoformen (chromaffine Zellen von CAPS DKO Tieren) ausgeschaltet. Hier wurde ebenfalls amperometrisch eine relativ starke Reduktion der gemessenen Ströme festgestellt, was wiederum für das Vorhandensein leerer Vesikel sprechen könnte. Dieser Effekt wurde aber lediglich auf die Rolle von CAPS beim Priming von Vesikeln zurückgeführt. Die Ergebnisse könnten aber genauso gut als möglicher Hinweis auf die Rolle von CAPS bei der Monoaminaufnahme und/oder Speicherung gedeutet werden. Außerdem wird in dieser Arbeit CAPS2 nicht isoformspezifisch betrachtet.

Brunk et al. sind der genannten Fragestellung in ihren Versuchsreihen nachgegangen. Sie haben die Serotoninaufnahme der synaptischen Vesikel von Wildtyp, homo- und heterozygoten CAPS1 KO mutanten Mausembryos (E18) verglichen und bei den homozygoten CAPS1 KO Zellen eine verringerte Aufnahme im Vergleich zu Wildtyp und heterozygoten beobachtet (Brunk et al., 2009). Die Expression von VMAT2 und vH⁺-ATPase waren dabei vergleichbar zum Wildtyp. Als weiterer Ansatz wurden die CAPS1- und CAPS2-Proteine der synaptischen Vesikel von adulten Wildtyp Tieren mittels spezifischen Antikörper inaktiviert. Das Ergebnis war die Reduktion der Monoaminaufnahme um 40%. Der *vice versa* Effekt bei Überexpression von CAPS-Proteinen konnte auch nachgewiesen werden. Dazu wurden die VMAT1 und VMAT2 exprimierenden CHO-Zellen mit CAPS1 und CAPS2 enthaltenden Vektoren transfiziert. Als Ergebnis wurde in allen Fällen die Zunahme der Serotoninaufnahme beobachtet.

Zusammengenommen sprechen all diese Daten dafür, dass CAPS-Proteine die vesikuläre Monoaminaufnahme durch VMAT1 und VMAT2 fördern. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Daten deuten darauf hin, dass diese Förderung im Fall von CAPS2 Splice-Varianten-abhängig ist. CAPS2b wird ausschließlich im Gehirn exprimiert. Im Kleinhirn der Maus, wo alle CAPS2 Splice-Varianten am stärksten exprimiert werden, konnte sogar gezeigt werden, dass die CAPS2b-Expression im Laufe der gesamten embryonalen Entwicklung steigt, während die Expression von anderen Splice-Varianten nach Erreichen eines Gipfels wieder abfällt (Sadakata et al., 2007). Ob

dieser Expressionsmuster mit dem beobachteten Effekt auf die Monoaminaufnahme im Zusammenhang steht, lässt sich noch nicht eruieren, da die Daten zu Expressionsmustern von CAPS2b in monoaminergen Zellen noch fehlen.

Die Daten von Membrankapazitäts- und amperometrischen Messungen im Rahmen der Rescue-Versuche könnten auch als Hinweis auf die Splice-Varianten-abhängige Förderung der VMAT-Funktion durch CAPS2 bewertet werden. Es sei nochmal erwähnt, dass die Wiederexpression von CAPS2 an chromaffinen Zellen der CAPS1/CAPS2 DKO Tieren eine Reversibilität der Sekretionsdefizite und der Störung der Katecholaminspeicherung zeigte (Liu et al., 2010).

Eine Arbeit untersucht, ob die CAPS2 Splice-Varianten in chromaffinen Zellen und hippocampalen Neuronen von CAPS1/CAPS2 DKO Tieren bestehende schwere Sekretionsdefizite aufheben können (Truong et al., 2014). In den chromaffinen Zellen der CAPS1/CAPS2 DKO Tiere traten erwartungsgemäß Störungen der Katecholaminspeicherung in LDCVs auf. Auch ließen sich mittels Membrankapazitätsmessungen die Exozytosestörungen der Vesikel detektieren, die durch CAPS2a und CAPS2b behoben werden konnten (Rescue-Effekt). Der Effekt von CAPS2e war genauso, obwohl es in seiner Struktur keine MUN-Domäne besitzt. CAPS2c hat eine unvollständige PH-Domäne und zeigte einen inkompletten Rescue-Effekt. Mittels Rescue-Versuche mit langen und kurzen CAPS2 Splice-Varianten konnte festgestellt werden, dass CAPS seine Priming-Funktion nicht über seine MUN-Domäne, sondern vielmehr über die PH-Domäne erfüllt (Truong et al., 2014). CAPS2b und CAPS2e zeigten auch an hippocampalen Neuronen von CAPS1/CAPS2 DKO Mausembryos (E18) amperometrisch messbaren Rescue-Effekt auf die Katecholaminsekretion. CAPS2c zeigte diesen Effekt nicht.

Die Beeinflussung der Vesikelfüllung wurde hierbei aber nicht in Erwägung gezogen. CAPS2a exprimiert 40 Aminosäuren weniger in seiner MUN-Domäne, da, wie schon erläutert, die Exone 22 und 25 fehlen. Truong et al. haben in ihren Versuchen festgestellt, dass die CAPS2-Isoformen, welche die MUN-Domäne entbehren, das Vesikelpriming genauso bewerkstelligen können. Die Isoformen ohne PH-Domäne können dies aber nicht. Es könnte sein, dass diese beobachteten Effekte vielmehr auf die Rolle von CAPS bei der Regulation der VMAT-Funktion und dadurch die Beeinflussung der Vesikelfüllung zurückzuführen sind. Die amperometrischen Methoden detektieren die Sekretion von Katecholaminen, die vorher in die Vesikel transportiert und in denen gespeichert werden müssen. Im Falle von CAPS2b stimmen diese Daten mit unseren überein. Die

beschriebenen Strukturunterschiede zwischen CAPS2a und CAPS2b könnten im Rahmen unserer Arbeit der kleineren Förderung der VMAT-Funktion durch CAPS2a im Vergleich zu CAPS2b zugrunde liegen. In diesem Fall käme die MUN- oder PH-Domäne für die direkte oder indirekte Interaktion mit VMAT infrage.

6.2.1 Die Bedeutung von CAPS für die Regulation von VMAT

Von den Faktoren, die die Vesikelfüllung beeinflussen, nehmen VMATs eine zentrale Rolle. Wie schon beschrieben, beeinflussen die CAPS-Proteine sowohl die Exozytosevorgänge als auch die Füllung der monoaminhaltigen Vesikel.

Die in dieser Arbeit dargestellten Beobachtungen sprechen dafür, dass CAPS-Proteine auch an der Regulation von VMAT-Funktion beteiligt sein könnten. In der Literatur fehlen jedoch Hinweise auf VMAT-CAPS Interaktion. Die im Rahmen dieser Arbeit mit Splice-Varianten von CAPS2 (CAPS2a und CAPS2b) durchgeführten Versuche deuten auch darauf hin, dass CAPS die VMAT-Funktion direkt oder über Zwischenschritte beeinflussen könnte. Es könnte entweder ein bislang unbekannter Signalweg sein oder es könnte sich um einen Teil des Regulationswegs über $Go2\alpha$ handeln.

Der Effekt von CAPS2b auf die VMAT-Funktion ist genauso fördernd wie der von CAPS1. CAPS-Proteine scheinen somit, wie auch vorher beschrieben, neben dem Priming von Vesikeln noch eine Rolle bei der Regulation von VMAT zu spielen, die Splice-Varianten abhängig ist.

Brunk et al. haben erstmalig den Einfluss von CAPS-Proteinen auf VMAT mittels Monoaminaufnahmetests direkt untersucht und die positive Auswirkung auf die VMAT1 und VMAT2-Funktion beobachtet (Brunk et al., 2009). Diese durch Monoaminaufnahmetests erzeugten Daten stimmen mit denen von Speidel et al. überein, welche durch Amperometrie und TIRFM erhoben wurden (Speidel et al., 2005). Zusätzlich berichtet die Arbeitsgruppe, dass bei $Go2\alpha$ KO Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren signifikant reduzierte Mengen von CAPS1 nachweisbar sind. Hierzu sei nochmals erwähnt, dass als eine Funktion von $Go2\alpha$ bekannt ist, dass es die VMAT-Aktivität hemmt (Ahnert-Hilger et al., 1998; Höltje et al., 2000; Höltje - Dissertation, 2000). Anscheinend besteht ein funktioneller Zusammenhang zwischen VMAT, $Go2\alpha$ und CAPS1, der mechanistisch noch zu klären ist. Es ist aber nicht geklärt, ob CAPS-Proteine direkt mit den vesikulären Monoamintransportern interagieren oder ob Zwischenschritte

notwendig sind. An der Stelle muss auch erwähnt werden, dass Brunk et al. keine direkte Interaktion zwischen CAPS-Proteinen und VMAT sowie Go2 α nachweisen konnten, was auf die Existenz indirekter Signalwege zwischen CAPS und VMAT hinweisen könnte (Brunk et al., 2009). Im Rahmen der Fraktionierungsexperimente aus dem Gehirn von homozygoten Go2 α -Deletionsmutanten und Wildtyp-Tieren konnte für CAPS1 ein Zusammenhang mit Go2 α festgestellt werden, da bei Go2 α KO-Zellen CAPS1-Expression stark reduziert war. Für CAPS2 konnte diese Reduktion im Rahmen der zitierten Versuche nicht nachgewiesen werden (Brunk et al., 2009). Ob die Beteiligung von CAPS2 und seinen Splice-Varianten an VMAT-Go2 α Signalkaskade endgültig ausgeschlossen werden kann, muss noch geklärt werden. Es ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht möglich, eine plausible Hypothese zur Mechanistik eines Signalweges zu entwickeln, in den CAPS, Go2 α und VMATs involviert sind.

Die oben beschriebenen Daten von Truong et al. (Truong et al., 2014), die wiederum mittels Amperometrie und Membrankapazitätsmessungen erhoben wurden, enthalten ebenfalls Hinweise auf die mögliche VMAT-Regulation durch CAPS-Proteine.

Um die Frage zu klären, ob CAPS2a und CAPS2b an einer VMAT-Regulation beteiligt sind, haben wir CHOVMAT1- und CHOVMAT2-Zellen mit diesen transfiziert und im Anschluss Monoaminaufnahmetests durchgeführt. Unsere Ergebnisse sind mit denen der oben genannten Arbeiten vergleichbar und bestätigen die Funktion von CAPS auf VMAT-Ebene. CAPS2b als längste CAPS2-Isoform fördert signifikant sowohl die VMAT1- als auch die VMAT2-Funktion. Dieser Aspekt könnte dem von Truong et al. beobachteten Rescue-Effekt von CAPS2 Splice-Varianten auf die chromaffinen Zellen und hippocampalen Neurone der CAPS1/CAPS2 DKO-Tieren zugrunde liegen. CAPS2a ist um 40 Aminosäuren kürzer als CAPS2b. Beide Isoformen unterscheiden sich in ihrer MUN-Domäne. Diese Differenz könnte die kleinere Förderung der VMAT-Funktion durch CAPS2a, im Vergleich zu CAPS2b, erklären. Unsere Daten erlauben aber keine Aussagen zur Rolle der PH-Domäne bei der Förderung der VMAT-Funktion. Wie schon erwähnt, zeigten die amperometrischen Daten, dass CAPS2f als einzige Isoform ohne PH-Domäne, gar nicht, und CAPS2c als eine Isoform mit inkompletter PH-Domäne nur eingeschränkt in der Lage waren, den Rescue-Effekt herbeizuführen (Truong et al., 2014).

Durch unsere Versuche haben wir die Frage zum Einfluss von CAPS2a und CAPS2b auf VMAT1 und VMAT2 geklärt, ohne den weiteren Signalweg, wie zum Beispiel die

Möglichkeit einer direkten oder indirekten Interaktion von CAPS2-Splice-Varianten mit VMAT1 und VMAT2 zu untersuchen. Es wäre interessant zu klären, wie die CAPS2-Isoformen ohne und mit inkompletter PH-Domäne (CAPS2f und CAPS2c) sowie die CAPS2-Isoformen mit fehlender oder inkompletter MUN-Domäne (CAPS2e und CAPS2d) die VMAT-Funktion beeinflussen. Dadurch könnten eindeutigere Aussagen über mit VMAT direkt oder indirekt interagierenden Domänen gemacht werden.

6.2.2 Mögliche Interaktion von CAPS mit weiteren Determinanten der Vesikelfüllung

CAPS-Proteine könnten mit einer anderen wichtigen Säule der Vesikelfüllung in Zusammenhang stehen, nämlich mit Faktoren, von denen die Triebkraft des Transports selbst abhängt, also nicht nur mit den Transportern selbst. Es wäre denkbar, dass CAPS-Proteine den pH-Gradienten über der Vesikelmembran beeinflussen, und sie auf diese Weise den Monoamintransport in die Vesikel regulieren. Von CAPS ist bekannt, dass es zum größten Teil hydrophil ist und Bereiche besitzt, die für die Coiled-Coil-Interaktion mit anderen Proteinen infrage kommen könnten (Ann et al., 1997). Da ein kleiner Anteil von CAPS membrangebunden vorliegt, könnte dieser für die Interaktion mit vH^+ -ATPase infrage kommen. An hippokampalen Neuronen der Maus konnte bereits der Anstieg des intraluminalen pH-Werts der BDNF-haltigen Vesikel in Abwesenheit von CAPS1 nachgewiesen werden (Eckenstaler et al., 2016). Für diesen Effekt wird die Interaktion mit vH^+ -ATPase oder mit Cl^- -Kanälen (CIC) in Betracht gezogen. Da für den Monoamintransport über VMAT1 und VMAT2 die Ausbildung eines pH-Gradienten essentiell ist, könnte das die oben beschriebenen Defizite bei der Füllung von katecholaminhaltigen Vesikeln in Abwesenheit von CAPS1 (Speidel et al., 2005; Brunk et al., 2009) erklären. Über diesen Weg könnten auch CAPS2 und zumindest seine langen Splice-Varianten wie CAPS2a und CAPS2b die Vesikelfüllung beeinflussen, da CAPS2 in seiner Aminosäurestruktur bis zu 95% mit CAPS1 identisch ist.

Diese Aspekte der CAPS-Funktion könnten Splice-Varianten abhängig sein, wurden aber in dieser Arbeit nicht untersucht, und es ist auch noch nichts darüber bekannt. Die vorliegenden Versuche zeigen aber eindeutig, dass zumindest CAPS2b an der Vesikelfüllung beteiligt ist. Außerdem könnten unsere Ergebnisse als Anlass zur

Durchführung weiterer Versuche dienen, die die direkte oder indirekte Wechselwirkung zwischen CAPS-Proteinen und Triebkraft schaffenden Faktoren beleuchten würden.

6.3 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden über die Beeinflussung der VMAT1- und VMAT2-Funktion durch lange CAPS2 Splice-Varianten (CAPS2a und CAPS2b) neue Erkenntnisse gewonnen.

Unsere Daten sprechen für die Annahme, dass CAPS2 bei der Füllung der monoaminhaltigen sekretorischen Vesikel, also Upstream von Andockungsprozessen, eine Rolle spielt und diese Rolle Splice-Varianten-abhängig ist.

CAPS2b fördert als längste CAPS2-Isoform sowohl die VMAT1- als auch die VMAT2-Funktion. Der Mechanismus, der diesem Effekt zugrunde liegt, bleibt noch ungeklärt.

Die Splice-Varianten von CAPS2 unterscheiden sich in ihrer Domänenstruktur. Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Differenz zwischen CAPS2a und CAPS2b in der Beeinflussung der Speicherfähigkeit von CHO-Zellen sind auch am wahrscheinlichsten auf die strukturellen Unterschiede zwischen diesen beiden Isoformen zurückzuführen. Durch unsere Beobachtungen erhärtet sich die Annahme, dass es eine direkte oder indirekte Wechselwirkung zwischen CAPS-Proteinen und VMATs bestehen könnte. Für diese Wechselwirkung könnten PH- oder MUN-Domäne verantwortlich sein. Um die von uns gewonnenen Erkenntnisse zu erweitern und an den Splice-Varianten-abhängigen CAPS2-Effekten auf die vesikuläre Monoaminaufnahme beteiligte Domänen herauszufinden, wäre es sinnvoll, die CAPS2-Isoformen ohne und mit inkompletter PH-Domäne (CAPS2f und CAPS2c) sowie die CAPS2-Isoformen mit fehlender oder inkompletter MUN-Domäne (CAPS2e und CAPS2d) bezüglich ihrer Fähigkeit, die Monoaminaufnahme in sekretorische Vesikel zu beeinflussen, zu untersuchen. Dadurch könnten genauere Aussagen über für die direkte oder indirekte VMAT-Interaktion verantwortlichen Domänen gemacht werden.

Des Weiteren könnte die Klärung der Mechanistik der CAPS-VMAT-Wechselwirkung von Bedeutung sein. Unsere Daten zeigen lediglich, dass der fördernde CAPS2-Einfluss auf die vesikuläre Monoaminaufnahme Splice-Varianten abhängig ist. Ob diese Wechselwirkung eine direkte oder aus anderen Interaktionspartnern bestehende Signaltransduktion ist, wird im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt. Die Suche nach

Interaktionspartnern von CAPS-Proteinen könnte in dieser Richtung bedeutende Erkenntnisse liefern. Für CAPS1 konnte ein Zusammenhang mit Go2 α festgestellt werden, da bei Go2 α KO-Zellen CAPS1 auch reduziert war. Für CAPS2 und seine Splice-Varianten wurde so eine Beziehung nicht festgestellt. Interessant wäre somit weiterhin, ob CAPS-Proteine mit Go2 α im gleichen Signaltransduktionsweg wirken. Die gleichzeitige Überexpression von CAPS2 Splice-Varianten und Go2 α in einem Zellsystem mit anschließenden Monoaminaufnahmetests könnte zu einer diesbezüglichen Klärung einen Beitrag leisten .

Außerdem könnten die CAPS-Proteine mit den Faktoren interagieren, die die Triebkraft für den Transport schaffen. Eine Interaktion mit der V-ATPase könnte dafür infrage kommen. Ein experimenteller Ansatz, bei dem der intraluminale pH-Wert der monoaminhaltigen Vesikel in Verbindung mit Deletion und Überexpression von CAPS2 Splice-Varianten gemessen wird, könnte in dieser Richtung Erkenntnisse liefern.

7 Abkürzungsverzeichnis

A

ADP	Adenosindiphosphat
AlF_4^-	Aluminiumfluorid
ARF	ADP ribosylation factor
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat

B

BCA	Bichinchoninsäure-4,4-dicarboxy-2,2-Bichinolin
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BSA	Bovines Serum Albumin

C

cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CAPS	Calcium-dependent activator proteins for secretion
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CHO	Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters

D

$\Delta\mu\text{H}^+$	Elektrochemischer Gradient
ΔH^+	Protonengradient
$\Delta\psi$	Elektrischer Gradient
DAG	Diacylglycerol
DAT	Dopamine active transporter
dBcAMP	Dibutyryl-cAMP
DBD	Dynactin binding domain
DCV	Dense core vesicle
DKO	Double knock out
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	Depot pool
DPM	Disintegrations per minute
DTT	Dithiothreitol

E

ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure

F

FBS	Fetal bovine serum
G	
GABA	γ -Aminobuttersäure
GC	Guanylylzyklase
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	green fluorescent protein
GH ₃	Growth Hormone
GPCR	G protein-coupled receptor
GTP	Guanosintriphosphat
H	
HE	Hämolytische Einheit
HBS	Hepes buffered Saline
I	
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IRES	Internal ribosomal entry site
K	
KG-Puffer	Kaliumglutamat-Puffer
K _M -Wert	Michaelis-Menten-Konstante
KO	Knock out
L	
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LDCV	large dense core vesicles
M	
MPP ⁺	N-methyl-4-phenylpyridinium
MHD	Munc-13 Homology Domain
MUNC(Munc)	Mammals uncoordinated
N	
NET	norepinephrine transporter (=NAT, Noradrenalin-Transporter)
NF	Neurotrophic factor
NMJ	Neuromuscular junction
NO	Stickstoffmonoxid
P	
PBS	Phosphate-buffered Saline
PC12	Phäochromozytomzelllinie der Ratte
Pcp2	Purkinje cell protein 2
pEGFP	plasmid enhanced green fluorescent protein

PIP ₂	Phosphatidylinositolbisphosphat
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PH	Plextrin Homology
R	
RRP	Rapid releseable pool
S	
SDS-PAGE	sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SERT	Serotonin-Transporter
SID	Syntaxin interaction Domain
SLO	Streptolysin O
SNARE	soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptor
SRP	Slow releseable pool
SV	synaptic vesicles
SSV	small synaptic vesicles
T	
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TEXANs	Toxin Extruding Antiporters
TEMED	Tetramethylethylendiamin
U	
UV	Ultraviolet
UNC	Uncoordinated
UPP	Unprimed pool
V	
v/v	Volumen pro Volumen
VAcHT	vesikulärer Acetylcholintransporter
vATPase	vakuoläre ATPase
VGAT	vesikulärer GABA-Transporter
VGLUT	vesikulärer Glutamintransporter
VMAT	vesikulärer Monoamintransporter
W	
w/v	Gewicht pro Volumen
Z	
ZNS	Zentralnervensystem

8 Literaturverzeichnis

Ahnert-Hilger G., Pahnert I., Höltje M. (2000) Pore-Forming Toxins as Cell-Biological and Pharmacological Tools. *Handb Exp Pharm.*

Ahnert-Hilger G., Nürnberg B., Exner T., Schäfer T., Jahn R. (1998) The heterotrimeric G protein Go2 regulates catecholamine uptake by secretory vesicles. *The EMBO Journal* 17:406–413.

Ann K., Kowalchuk J. A., Loyet K. M., Martin T. F. J. (1997) Novel Ca^{2+} -binding Protein (CAPS) Related to UNC-31 Required for Ca^{2+} -activated Exocytosis. *Journal of Biological Chemistry* 272:19637–19640.

Bear, Connors P. (2016) *Neuroscience: Exploring the Brain* (fourth edi). Wolters Kluwer.

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

Berwin B., Floor E., Martin T. F. J. (1998) CAPS (Mammalian UNC-31) Protein Localizes to Membranes Involved in Dense-Core Vesicle Exocytosis. *Neuron* 21:137–145.

Betz A., Okamoto M., Benseler F., Brose N. (1997) Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N-terminus of syntaxin. *The Journal of Biological Chemistry* 272:2520–6.

Brady S. T., Siegel G. J., Albers R. W., Price D. L. (2012) *Basic Neurochemistry*. Elsevier (eighth edition).

Brunk I., Höltje M., von Jagow B., Winter S., Sternberg J., Blex C., Pahnert I., Ahnert-Hilger G. (2006) Regulation of Vesicular Monoamine and Glutamate Transporters by Vesicle-Associated Trimeric G Proteins: New Jobs for Long-Known Signal Transduction Molecules. *Handbook of Experimental Pharmacology* 175:305-325

Brunk I., Blex C., Rachakonda S., Höltje M., Winter S., Pahnert I., Walther D.I., Ahnert-

Hilger G. (2006) The First Luminal Domain of Vesicular Monoamine Transporters Mediates G-protein-dependent Regulation of Transmitter Uptake. *Journal of Biological Chemistry* 281:33373–33385.

Brunk I., Blex C., Speidel D., Brose N., Ahnert-Hilger G. (2009) Ca²⁺-dependent activator proteins of secretion promote vesicular monoamine uptake. *Journal of Biological Chemistry* 284:1050–1056.

Bruns D., Riedel D., Klingauf J., Jahn R. (2000) Quantal release of serotonin. *Neuron*, 28:205–220.

Caudle W. M., Richardson J. R., Wang M. Z., Taylor T. N., Guillot T. S., McCormack A. L., Colebrooke R. E., Di Monte D. A., Emson P. C., Miller G. W. (2007) Reduced Vesicular Storage of Dopamine Causes Progressive Nigrostriatal Neurodegeneration. *Journal of Neuroscience* 27:8138–8148.

Chaudhry F. A., Edwards R. H., Fonnum F. (2008) Vesicular Neurotransmitter Transporters as Targets for Endogenous and Exogenous Toxic Substances. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 48:277–301.

De Camilli P., Jahn R. (1990) Pathways to regulated exocytosis in neurons. *Annual Review of Physiology* 52:625-645.

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

Edwards R. H. (2007) The Neurotransmitter Cycle and Quantal Size. *Neuron* 55:835–858.

Eisenhofer G., Kopin J. I., Goldstein D. S. (2004) Catecholamine Metabolism: A Contemporary View with Implications for Physiology and Medicine. *Pharmacological Reviews* 56:331-349.

Elhamdani A., Martin T. F. J., Kowalchuk J. A., Artalejo C. R. (1999) Ca^{2+} -Dependent Activator Protein for Secretion Is Critical for the Fusion of Dense-Core Vesicles with the Membrane in Calf Adrenal Chromaffin Cells. *The Journal of Neuroscience* 19:7375–7383.

Erickson J. D., Eiden L. E., Hoffman B. J. (1992) Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:10993–7.

Farina M., van de Bospoort R., He E., Persoon C. M., van Weering J. R. T., Broeke J. H., Verhage M., Toonen R. F. (2015) CAPS-1 promotes fusion competence of stationary dense-core vesicles in presynaptic terminals of mammalian neurons. *eLife* 4:e05438.

Fischer S., Handrick R., Otte K. (2015) The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives. *Biotechnology Advances* 33:1878–1896.

Gasnier B. (2000) The loading of neurotransmitters into synaptic vesicles. *Biochimie* 82:327–337.

Goldstein D. S. (2003) Dysautonomia in Parkinson's disease: Neurocardiological abnormalities. *Lancet Neurology* 2:669–676.

Gondré-Lewis M. C., Park J. J., Loh Y. P. (2012) Cellular Mechanisms for the Biogenesis and Transport of Synaptic and Dense-Core Vesicles. *International Review of Cell and Molecular Biology* 299:27-115.

Graham et al. (1973) A new Technique for the Assay of Infectivity of Human Adenovirus 5 DNA. *Virology* 52:456–467.

Grishanin R. N., Klenchin V. A., Loyet K. M., Kowalchuk J. A., Ann K., Martin T. F. J. (2002) Membrane association domains in Ca^{2+} -dependent activator protein for secretion mediate plasma membrane and dense-core vesicle binding required for Ca^{2+} -dependent exocytosis. *Journal of Biological Chemistry* 277:22025–22034.

Hattori K., Tanaka H., Wakabayashi C., Yamamoto N., Uchiyama H. (2011) Expression

of Ca²⁺-dependent activator protein for secretion 2 is increased in the brains of schizophrenic patients. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry* 35:1738–1743.

Henry J. P., Botton D., Sagne C., Isambert M. F., Desnos C., Blanchard V., Raisman-Vozari R., Krejci E., Massoulie J., Gasnier B. (1994) Biochemistry and molecular biology of the vesicular monoamine transporter from chromaffin granules. *The Journal of Experimental Biology* 196:251–62.

Höltje M. (2000) Regulation der Aktivität der vesikulären Monoamintransporter VMAT1 und VMAT2 in neuroendokrinen Zellen und Neuronen. *Dissertation*.

Höltje M., von Jagow B., Pahner I., Lautenschlager M., Hörtnagl H., Nürnberg B., Jahn R., Ahnert-Hilger G. (2000) The neuronal monoamine transporter VMAT2 is regulated by the trimeric GTPase Go(2). *The Journal of Neuroscience* 20:2131–2141.

Höltje M., Winter S., Walther D., Pahner I., Hörtnagl H., Ottersen O. P., Bader M., Ahnert-Hilger G. (2003) The Vesicular Monoamine Content Regulates VMAT2 Activity Through G_{αq} in Mouse Platelets: Evidence for autoregulation of vesicular transmitter uptake. *Journal of Biological Chemistry* 278:15850–15858.

Hosono M., Shinoda Y., Hirano T., Ishizaki Y., Furuichi T. (2016) Neuroscience Letters Interaction of Ca²⁺-dependent activator protein for secretion 1 (CAPS1) with septin family proteins in mouse brain. *Neuroscience Letters* 617:232–235.

International Molecular Genetic Study of Autism Consortium. (2001) Further characterization of the autism susceptibility locus AUTS1 on chromosome 7q. *Human Molecular Genetics* 10:973–982.

Jahn R., Fasshauer D. (2012) Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature* 490(7419):201-207.

Jain S., Goldstein D. S. (2012) Cardiovascular dysautonomia in Parkinson Disease: From pathophysiology to pathogenesis. *Neurobiology of Disease* 46(3):572-580.

James D. J., Kowalchuk J., Daily N., Petrie M., Martin T. F. J. (2009) CAPS drives trans-SNARE complex formation and membrane fusion through syntaxin interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:17308–13.

James D. J., Martin T. F. J. (2013) CAPS and Munc13: CATCHRs that SNARE vesicles. *Frontiers in Endocrinology* 187:1–11.

Erickson J. D., Schäfer M. K., Bonner T. I., Eiden L. E., Weihe E. (1996) Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:5166–5171.

Jenner P. (2003) Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Annals of Neurology* 53:26-38

Jockusch W. J., Speidel D., Sigler A., Sörensen J. B., Varoqueaux F., Rhee J. S., Brose N. (2007) CAPS-1 and CAPS-2 Are Essential Synaptic Vesicle Priming Proteins. *Cell* 131:796–808.

Kabachinski G., Kielar-Grevstad D. M., Zhang X., James D. J., Martin T. F. J. (2015) Resident CAPS on dense-core vesicles docks and primes vesicles for fusion. *Molecular Biology of the Cell* 27(4):654-68.

Kabachinski G., Yamaga M., Kielar-Grevstad D. M., Bruinsma S., Martin T. F. J. (2014) CAPS and Munc13 utilize distinct PIP2-linked mechanisms to promote vesicle exocytosis. *Molecular Biology of the Cell* 25(4):508–21.

Kaestner L., Scholz A., Lipp P. (2015) Conceptual and technical aspects of transfection and gene delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 25(6):1171–1176.

Katz B. (1971) Quantal Mechanism of Neural Transmitter Release. *Science*. 173(3992):123-6

Khodthong C., Kabachinski G., James D. J., Martin T. F. J. (2011) Munc13 Homology Domain-1 in CAPS/UNC31 Mediates SNARE Binding Required for Priming Vesicle Exocytosis. *Cell Metabolism* 14(2):254-63.

Koch H., Hofmann K., Brose N. (2000) Definition of Munc13-homology-domains and characterization of a novel ubiquitously expressed Munc13 isoform. *The Biochemical Journal* 349(Pt 1):247–53.

Krantz D. E., Peter D., Liu Y., Edwards R. H. (1997) Phosphorylation of a Vesicular Monoamine Transporter by Casein Kinase II. *Journal of Biological Chemistry* 272(10):6752–6759.

Kumar N. M., Gilula N. B. (1996) Communication Channel. *Cell Press* 84(3):381–388.

Kvetnansky R., Sabban E. L., Palkovits M. (2009) Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiological Reviews* 89(2):535–606.

Lesch K. P., Gross J., Wolozin B. L., Murphy D. L., Riederer P. (1993) Extensive sequence divergence between the human and rat brain vesicular monoamine transporter: possible molecular basis for species differences in the susceptibility to MPP⁺. *Journal of Neural Transmission* 93:75–82.

Lemmon M. A. (2008) Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9(2):99–111.

Lent R., Azevedo F. A. C., Andrade-Moraes C. H., Pinto A. V. O. (2012) How many neurons do you have? Some dogmas of quantitative neuroscience under revision. *European Journal of Neuroscience* 35:1-9.

Liu Y., Peter D., Roghani A., Schuldiner S., Privé G. G., Eisenberg D., Brecha N., Edwards R. H. (1992) A cDNA that suppresses MPP⁺ toxicity encodes a vesicular amine transporter. *Cell* 70(4):539–551.

Liu Y., Schweitzer E. S., Nirenberg M. J., Pickel V. M., Evans C. J., Edwards R. H. (1994)

Preferential Localization of a Vesicular Monoamine Transporter to Dense Core Vesicles in PC12 Cells. *The Journal of Cell Biology* 127(5):1419-1433.

Maul S. (2014) Bedeutung von G α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine und intrazellulärer Signalwege für die Regulation des vesikulären Monoamintransporters 1. *Dissertation*.

Mishima Y., Shinoda Y., Sadakata T., Kojima M., Wakana S., Furuichi T. (2015) Lack of stress responses to long-term effects of corticosterone in CAPS2 knockout mice. *Scientific Reports* 5:8932.

Nielsen M. S., Axelsen L. N., Sorgen P. L., Verma V., Delmar M., Holstein-Rathlou N. H. (2012) Gap Junctions. *Comprehensive Physiology* 2(3):1981–2035.

Nirenberg M. J., Liu Y., Peter D., Edwards R. H., Pickel V. M. (1995) The vesicular monoamine transporter 2 is present in small synaptic vesicles and preferentially localizes to large dense core vesicles in rat solitary tract nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(19):8773–7.

Peter D., Jimenez J., Liu Y., Kim J., Edwards R. H. (1994) The chromaffin granule and synaptic vesicle amine transporters differ in substrate recognition and sensitivity to inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* 269(10):7231–7237.

Peter D., Liu Y., Sternini C., de Giorgio R., Brecha N., Edwards R. H. (1995) Differential expression of two vesicular monoamine transporters. *The Journal of Neuroscience* 15(9):6179–6188.

Purves D., Augustine G. J., Fitzpatrick D., Hall W. C., Lamantia A.-S., McNamara J. O., Willians S. M. (2004) *Neuroscience*. Sinauer Associates (third edition).

Reinhard J., Johannes H., Maycox P. R. (1990) Synaptic vesicles: Key organelles involved in neurotransmission. *The Journal of Physiology* 84:128-133.

Renden R., Berwin B., Davis W., Ann K., Chin C. T., Kreber R., Ganetzky B., Martin T.

F., Brodie K. (2001) *Drosophila* CAPS is an essential gene that regulates dense-core vesicle release and synaptic vesicle fusion. *Neuron* 31(3):421–437.

Richmond J. E., Weimer R. M., Jorgensen E. M. (2001) An open form of syntaxin bypasses the requirement for UNC-13 in vesicle priming. *Nature* 412(6844):338–41.

Rizo J., Südhof T. C. (1998) C2-domains, Structure and Function of a Universal Ca^{2+} -binding Domain. *Journal of Biological Chemistry* 273(26):15879–15882.

Sadakata T., Itakura M., Kozaki S., Sekine Y., Takahashi M., Furuichi T. (2006) Differential Distributions of the Ca^{2+} -Dependent Activator Protein for Secretion Family Proteins (CAPS2 and CAPS1) in the Mouse Brain. *Journal of Comparative Neurology* 495(6):735–753.

Sadakata T., Kakegawa W., Shinoda Y., Hosono M., Katoh-Semba R., Sekine Y., Sato Y., Saruta C., Ishizaki Y., Yuzaki M., Kojima M., Furuichi T. (2014) Axonal localization of Ca^{2+} -dependent activator protein for secretion 2 is critical for subcellular locality of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 release affecting proper development of postnatal mouse cerebellum. *PloS One* 9(6):e99524.

Sadakata T., Mizoguchi A., Sato Y., Katoh-Semba R., Fukuda M., Mikoshiba K., Furuichi T. (2004) The Secretory Granule-Associated Protein CAPS2 Regulates Neurotrophin Release and Cell Survival. 24(1):43–52.

Sadakata T., Shinoda Y., Oka M., Sekine Y., Furuichi T. (2013) Autistic-like behavioral phenotypes in a mouse model with copy number variation of the CAPS2 / CADPS2 gene. *FEBS Letters* 587(1):54–59.

Sadakata T., Shinoda Y., Sekine Y., Saruta C., Itakura M., Takahashi M., Furuichi T. (2010) Interaction of Calcium-dependent Activator Protein for Secretion 1 (CAPS1) with the Class II ADP-ribosylation Factor Small GTPases Is Required for Dense-core Vesicle Trafficking in the trans-Golgi Network. *Journal of Biological Chemistry* 285(49):38710–38719.

Sadakata T., Washida M., Furuichi T. (2007b) Alternative splicing variations in mouse CAPS2: differential expression and functional properties of splicing variants. *BMC Neuroscience* 8:25.

Sadakata T., Washida M., Iwayama Y., Shoji S., Sato Y., Ohkura T., Katoh-Semba R., Nakajima M., Sekine Y., Tanaka M., Nakamura K., Iwata Y., Tsuchiya K. J., Mori N., Detera-Wadleigh S. D., Ichikawa H., Itohara S., Yoshikawa T., Furuichi T. (2007) Autistic-like phenotypes in *Cadps2* -knockout mice and aberrant CADPS2 splicing in autistic patients. *Journal of Clinical Investigation* 117(4):931-43.

Sadakata T., Washida M., Morita N., Furuichi T. (2007a). Tissue distribution of Ca²⁺-dependent activator protein for secretion family members CAPS1 and CAPS2 in mice. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 55(3):301–11.

Schuldiner S., Shirvan A., Linal M., (1995) Vesicular Neurotransmitter Transporters: From Bacteria to Humans. *Physiological Reviews* 75(2):369-92.

Shinoda Y., Sadakata T., Nakao K., Katoh-Semba R., Kinameri E., Furuya A. (2011) Calcium-dependent activator protein for secretion 2 (CAPS2) promotes BDNF secretion and is critical for the development of GABAergic interneuron network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(1):373–378.

Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C. (1985) Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry* 150:76-85.

Speese S., Petrie M., Schuske K., Ailion M., Ann K., Iwasaki K., Jorgensen E. M., Martin T. F. J. (2007) UNC-31 (CAPS) Is Required for Dense-Core Vesicle But Not Synaptic Vesicle Exocytosis in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Neuroscience* 27(23):6150–6162.

Speidel D., Bruederle C. E., Enk C., Voets T., Varoqueaux F., Reim K., Becherer U., Fornai F., Ruggieri S., Holighaus Y., Weihe E., Bruns D., Brose N., Rettig J. (2005) CAPS1 Regulates Catecholamine Loading of Large Dense-Core Vesicles. *Neuron*

46(1):75–88.

Speidel D., Salehi A., Obermueller S., Lundquist I., Brose N., Renström E., Rorsman P. (2008) CAPS1 and CAPS2 Regulate Stability and Recruitment of Insulin Granules in Mouse Pancreatic β Cells. *Cell Metabolism* 7(1):57–67.

Speidel D., Varoqueaux F., Enk C., Nojiri M., Grishanin R. N., Martin T. F. J., Hofmann K., Brose N., Reim K. (2003) A family of Ca^{2+} -dependent activator proteins for secretion: Comparative analysis of structure, expression, localization, and function. *Journal of Biological Chemistry* 278(52):52802–52809.

Squire L. R., Berg D., Bloom F. E., du Lac S., Ghosh A., Spitzer N. C. (2013) *Fundamental Neuroscience* (fourth edition). Elsevier.

Stevens D. R., Rettig J. (2009) The Ca^{2+} -dependent Activator Protein for Secretion CAPS: Do I Dock or do I Prime? *Molecular Neurobiology* 39:62–72.

Südhof T. C. (2012) Calcium Control of Neurotransmitter Release. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4:a011353.

Südhof T. C., (2005) CAPS in Search of a Lost Function. *Neuron* 46(1):2–4.

Südhof T. C., Palade G., Llinas R., Stevens C., Sakmann B., Kandel E., Whittaker V. (2014) The Molecular Machinery of Neurotransmitter Release (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition* 53(47):12696–717.

Taylor T. N., Alter S. P., Wang M., Goldstein D. S., Miller G. W. (2014) Neuropharmacology Reduced vesicular storage of catecholamines causes progressive degeneration in the locus ceruleus. *Neuropharmacology* 76 Pt A:97–105.

Taylor T. N., Caudle W. M., Miller G. W. (2011) VMAT2-Deficient Mice Display Nigral and Extranigral Pathology and Motor and Nonmotor Symptoms of Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease* 2011:124165.

Taylor T. N., Caudle W. M., Shepherd K. R., Norriar A., Jackson C. R., Iuvone P. M., Weinschenker D., Greene J. D., Miller G. W. (2009) Nonmotor symptoms of Parkinson's disease revealed in an animal model with reduced monoamine storage capacity. *Journal of Neuroscience* 29(25):8103–13.

Truong C. Q. N., Nestvogel D., Ratai O., Schirra C., Stevens D. R., Brose N., Rhee J., Rettig J. (2014) Secretory vesicle priming by CAPS is independent of its SNARE-binding MUN domain. *Cell Reports* 9(3):902-9.

Varoqui H., Erickson J. D. (1997) Vesicular Neurotransmitter Transporters Potential Sites for the Regulation of Synaptic Function. *Molecular Neurobiology* 15(2):165-91.

Walent J. H., Porter B. W., Martin T. F. J. (1992) A Novel 145 kd Brain Cytosolic Protein Reconstitutes Ca^{2+} -Regulated Secretion in Permeable Neuroendocrine Cells. *Cell* 70:765–775.

Webster R. A. (2001) Neurotransmitters, drugs and brain function. John Wiley & Sons Ltd.

Wimalasena K. (2011) Vesicular monoamine transporters: structure-function, pharmacology and medicinal chemistry. *Medicinal Research Reviews* 31(4):483–519.

Xu HJ, Umaphysivam K, McNeilage J, Gordon TP, Roberts-Thompson PJ (1992) An enhanced chemiluminescence detection system combined with a modified immunoblot technique for the detection of low molecular weight IgM in sera from healthy adults and neonates. *Journal of Immunological Methods* 146(2):241-7

Yagishita K., Suzuki R., Mizuno S., Katoh-Semba R., Sadakata T., Sano Y., Furuichi T., Shinoda Y. (2017) CAPS2 deficiency affects environmental enrichment-induced adult neurogenesis and differentiation/survival of newborn neurons in the hippocampal dentate gyrus. *Neuroscience Letters* 661(2017):121-125.

Zhou Z., Mislis S. (1996) Amperometric detection of quantal secretion from patch-clamped rat pancreatic β -cells. *Journal of Biological Chemistry* 271(1):270–277.

9 Danksagung

Frau PD. Dr. med. Irene Brunk möchte ich für das Ermöglichen meiner Mitwirkung an diesem Projekt und für ihre exzellente fachliche und persönliche Betreuung sowie für das Korrekturlesen meiner Arbeit besonders danken. Ich bin ihr für ihre Geduld und kompetente Unterstützung bei jeglichen theoretischen und praktischen Fragen, die sich im Laufe meiner Doktoranden-Zeit stellten, sehr dankbar.

Ich danke Frau Prof. Gudrun Ahnert-Hilger und Frau PD Dr. med Irene Brunk für die Überlassung des Themas und Herrn Prof. Dr. Jens Rettig für die Bereitstellung der cDNA für CAPS2a und CAPS2b.

Ich danke Frau Dr. Karin Richter für ihre sehr wertvolle und hoch kompetente Unterstützung bei allen molekular-biologischen Fragestellungen.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe – Birgit, Suzan, Marion, Antje, Markus, Sascha, Johannes Piepgras und Johannes Zander für ihre Unterstützung und Hilfe bei jeglichen großen und kleinen Problemen und Fragen. Ohne sie und ihre Hilfe wäre diese experimentelle Arbeit nicht machbar.

Meinem Kollegen und einem guten Freund Herrn Sebastian Mohr danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit, für seine sprachlichen und stilistischen Verbesserungsvorschläge. Auch danke ich meinen Freunden Scott und Nadine für ihre EDV-technische Unterstützung.

Abschließend möchte ich meinen Eltern danken, deren Liebe und Unterstützung mich in meinem gesamten Lebensweg begleitet hat.

10 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Elvin Rajabov, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Einfluss von Calcium Activated Protein for Secretion 2 (CAPS2)-Isoformen auf die Funktion der vesikulären Monoamintransporter 1 und 2** selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

11 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

