

Funktionelle Analyse von Isoformen der CAPS-Proteinfamilie

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Carsten Enk
aus Berlin

Göttingen 2001

D 7

Referent:

Herr Prof. Dr. F.-W. Schürmann

Korreferent:

Herr Prof. Dr. K. v. Figura

Tag der mündlichen Prüfung:

2. Mai 2001

1	EINLEITUNG	1
1.1	Neuronale Kommunikation beginnt mit der Transmitterfreisetzung	1
1.2	Molekulare Mechanismen der Transmitterfreisetzung	5
1.3	Identifizierung und Charakterisierung der CAPS-Proteine	8
2	ZIELSETZUNG	10
3	MATERIAL UND METHODEN	11
3.1	Material	11
3.1.1	Geräte	11
3.1.2	Chemikalien	12
3.1.3	Verbrauchsmaterialien	15
3.1.4	Materialien für die Zellkultur	16
3.1.5	Medien und Lösungen	17
3.1.6	Bakterienstämme	17
3.1.7	Vektoren	18
3.1.8	DNA-Kits	18
3.1.9	Primäre Antikörper	18
3.1.10	Sekundäre Antikörper	19
3.1.11	Zelllinien	19
3.1.12	Tiere	20
3.1.13	CAPS-cDNA-Klone	20
3.1.14	Genbibliotheken	20
3.1.15	Gensonden und Klone	20
3.1.16	Synthetische Oligonukleotide	21
3.2	Methoden	22
3.2.1	DNA-Sequenzierung	22
3.2.2	DNA-Datenbanksuche	22
3.2.3	Herstellung elektrokompenter Bakterien	22
3.2.4	Elektrotransformation von Plasmid-DNA in Bakterien	23
3.2.5	DNA-Plasmidpräparationen	23
3.2.5.1	DNA-Minipräparationen	23
3.2.5.2	DNA-Midipräparationen	24
3.2.5.3	Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation	24

3.2.5.4	Isolierung genomischer DNA aus Mäuseschwänzen-----	24
3.2.6	DNA-Konzentrationsbestimmung -----	25
3.2.7	Restriktionsanalyse von DNA -----	25
3.2.8	Dephosphorylierung der 5'-Enden von Nukleinsäuren -----	26
3.2.9	Ligation von DNA-Fragmenten -----	26
3.2.10	Polymerase-Kettenreaktion-----	26
3.2.11	Agarosegelelektrophorese-----	27
3.2.12	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen -----	28
3.2.13	Southern-Blot-Analyse-----	28
3.2.13.1	DNA-Transfer auf Nylonmembranen -----	29
3.2.13.2	Radioaktive Markierung der DNA-Sonden -----	29
3.2.13.3	Hybridisierung und Detektion spezifischer DNA-Fragmente-----	30
3.2.14	mRNA-Expressionsanalyse -----	30
3.2.15	Expression von GST-Fusionsproteinen -----	31
3.2.16	Herstellung synaptosomaler Fraktion (P2)-----	32
3.2.17	Subzelluläre Fraktionierung -----	32
3.2.18	Proteinkonzentrationsbestimmung-----	33
3.2.19	SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteinen -----	34
3.2.20	Immunoblotanalyse-----	36
3.2.20.1	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen-----	36
3.2.20.2	Immundetektion spezifischer Proteine mittels <i>Enhanced Chemoluminescence</i> (ECL)-----	36
3.2.21	Herstellung und Reinigung von Antiseren-----	37
3.2.21.1	Immunisierung von Kaninchen-----	37
3.2.21.2	Affinitätsreinigung von Antiseren mittels PVDF-Membran -----	38
3.2.21.3	Präabsorption von affinitätsgereinigtem Antiserum -----	39
3.2.22	Isolierung eines Genfragments aus einer genomischen Maus-DNA-Bibliothek-----	40
3.2.23	Erzeugung rekombinanter embryonaler Mausstammzellen zur Etablierung von deletionsmutanten Mäusen -----	42
3.2.23.1	Kultivierung von MEF-Zellen -----	42
3.2.23.2	Kultivierung von ES-Zellen-----	43
3.2.23.3	Vorbereitung des Rekombinationsvektors für die Transfektion -----	44
3.2.23.4	Transfektion der ES-Zellen mittels Elektroporation -----	44
3.2.23.5	Selektion rekombinanter ES-Zellen-----	44
3.2.23.6	Isolierung und Expansion resistenter ES-Zellklone-----	45
3.2.23.7	Lagerung von ES-Zellen-----	45
3.2.23.8	Analyse von ES-Zellen nach homologer Rekombination-----	46
3.2.23.9	Blastozysteninjektion und Zucht rekombinanter Mäuse -----	46
3.2.24	Quantitative Immunoblotanalyse -----	47

3.2.24.1	Immundetektion spezifischer Proteine mittels [¹²⁵ I]-konjugierter Sekundärantikörper -----	47
3.2.24.2	Quantifizierung von Proteinbanden -----	47
3.2.25	<i>In situ</i> -Hybridisierung-----	48
3.2.25.1	Bereitstellung von Gehirn- und Nebennierenschnitten-----	48
3.2.25.2	Auswahl von Oligonukleotiden -----	48
3.2.25.3	Terminale Markierung von Oligonukleotiden -----	49
3.2.25.4	<i>In situ</i> -Hybridisierung von Gehirn- und Nebennierenschnitten-----	49
3.2.25.5	Entwicklung von <i>in situ</i> -Präparaten -----	50
3.2.26	Morphologische Methoden-----	51
3.2.26.1	Lichtmikroskopische Untersuchungen an Gehirn und Nebenniere mittels Nissl-Färbung -----	51
3.2.26.2	Immunhistologische Untersuchungen an Gehirn mittels Immunfluoreszenzfärbung -----	51
3.2.26.3	Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Gehirn mittels silberintensivierter 3,3'-Diaminbenzidin-Färbung -----	53
3.2.26.4	Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Rückenmark von Deletionsmutanten -----	55
3.2.27	Analyse des Serums von neugeborenen Deletionsmutanten -----	56

4 ERGEBNISSE ----- 57

4.1	Charakterisierung der CAPS-Proteine-----	57
4.1.1	Strukturvergleich der CAPS-Proteine -----	57
4.1.2	Verteilung der CAPS-mRNAs im Gewebe -----	60
4.1.3	Verteilung der CAPS-mRNAs im Gehirn -----	61
4.1.4	Erzeugung isoformspezifischer Antikörper gegen CAPS-Proteine -----	62
4.1.5	Verteilung des CAPS1-Proteins im Gewebe -----	63
4.1.6	Expression des CAPS1-Proteins im Gehirn während der Ontogenese-----	64
4.1.7	Verteilung des CAPS1-Proteins in Gehirnregionen-----	65
4.1.8	Verteilung des CAPS1-Proteins in subzellulären Fraktionen-----	66
4.1.9	Immunhistochemische Lokalisation des CAPS1-Proteins im Gehirn-----	67
4.1.10	Elektronenmikroskopische Lokalisation des CAPS1-Proteins im Cerebellum -----	70
4.2	Erzeugung und Analyse CAPS1-deletionsmutanter Mäuse -----	72
4.2.1	Konstruktion des Rekombinationsvektors zur CAPS1-Deletion in Mäusen -----	72
4.2.2	Erzeugung von CAPS1-deletionsmutanten Mäusen -----	74
4.2.2.1	Genetischer Nachweis der CAPS1-Deletion -----	76
4.2.2.2	Biochemischer Nachweis der CAPS1-Deletion -----	77
4.2.3	Analyse von CAPS1-deletionsmutanten Mäusen -----	78
4.2.3.1	Allgemeine phänotypische Charakterisierung-----	78

4.2.3.2	Lichtmikroskopische Analyse des Gehirns-----	78
4.2.3.3	Lichtmikroskopische Analyse der Nebenniere -----	79
4.2.3.4	Biochemische Analyse -----	80
4.2.3.4.1	Biochemische Analyse des Gehirns-----	81
4.2.3.4.2	Biochemische Analyse der Nebennieren -----	82
4.2.3.5	Ultrastrukturelle Analyse des Rückenmarks -----	83
4.2.3.6	Elektrophysiologische Analyse von chromaffinen Zellen -----	84
4.2.3.6.1	Elektrophysiologische Analyse von chromaffinen Zellen adulter Mäuse-----	86
4.2.3.6.2	Elektrophysiologische Analyse von chromaffinen Zellen neugeborener Mäuse -----	88
4.2.3.7	Entwicklungsabhängige Verteilung der CAPS-mRNAs in Nebennieren -----	92
4.2.3.8	Elektrophysiologische Analyse von hippocampalen Neuronenkulturen-----	93
4.2.3.9	Analyse des Serums-----	95
5	DISKUSSION -----	97
5.1	Die CAPS-Proteinfamilie -----	98
5.2	Präsynaptische Lokalisation und Funktion von CAPS1 -----	99
5.3	Die Rolle von CAPS1 in chromaffinen Zellen der Nebenniere -----	101
5.4	Funktion der CAPS-Proteine: Exozytose von LDCVs oder synaptischen Vesikeln -----	102
5.5	Letalität der CAPS1-Deletionsmutanten -----	104
5.6	Fazit und Ausblick -----	106
6	ZUSAMMENFASSUNG-----	107
7	LITERATURVERZEICHNIS-----	109

Abkürzungen und Anglizismen

Viele wissenschaftliche Begriffe entstammen dem englischen Wortschatz und können nur schwer ins Deutsche übersetzt werden. Diese Anglizismen und Abkürzungen werden nachfolgend erläutert.

5' oder 3'	Bezeichnung des Endes eines DNA-Strangs, welcher die 5'- bzw. 3'-Hydroxylgruppe der Ribose des DNA-Rückgrats enthält
A	Adenin
α	anti-, Antikörper, welcher gegen ein Protein gerichtet ist
AMBA	Acrylamid-N,N'-Methylenbisacrylamid
<i>antisense-</i>	synthetisches DNA-Fragment, welches
Oligonukleotid	komplementär zu einer mRNA-Sequenz ist
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CAPS	<i>calcium-dependent activator protein for secretion</i>
CA-Regionen	CA1- bis CA3-Regionen (Cornu ammonis) des Hippocampus
cDNA	<i>copy</i> oder komplementäre DNA
C1-Domäne	phorbolster-/ diacylglycerinbindende Domäne, welche ursprünglich in Proteinkinase C charakterisiert wurde
C2-Domäne	kalziumbindende Domäne, welche ursprünglich in Proteinkinase C charakterisiert wurde
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cpm	<i>counts per minute</i> , Zählungen pro Minute
C-terminal	am Carboxy-Terminus eines Proteins gelegen
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins
C	Cytosin
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
dNTP	äquimolare Desoxynukleosidtriphosphatmischung
DTT	Dithiotreitol
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i> , verstärkte Chemolumineszenz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	<i>expressed sequence tag</i> , kurze exprimierte DNA-Sequenzen
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
F1-Generation	1. Nachkommengeneration (Filialgeneration)
F2-Generation	2. Nachkommengeneration (Filialgeneration)
G	Guanin
x g	Erdbeschleunigung (9,80665 m/s ²)
GAD	<i>glutamic acid decarboxylase</i>
GDI	<i>GDP dissociation inhibitor</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
G	Guanin
<i>hairpin</i>	durch Hybridisierung entstehende Haarnadelschleifen der DNA/RNA
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethylsulfonsäure
Immunoblot	über ein elektrisches Feld erzielter Protein-Transfer vom Gel auf Membranen
<i>insert</i>	in einen Vektor klonierte DNA-Sequenz
IPTG	Isopropylthiogalactopyranosid
kb	Kilobasen(paare)
K _D	Dissoziationskonstante
kD	Kilodalton, Einheit für Molekularmasse
LIF	Leucemia Inhibiting Factor
M _r	relative Molekularmasse

mRNA	<i>messenger</i> RNA, Boten-RNA
NMDA-R1	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor 1
Northern Blot	über Kapillarwirkung erzielter RNA-Transfer vom Gel auf Membranen
NSF	<i>N-ethylmaleimide-sensitive factor</i>
N-terminal	am Amino-Terminus eines Proteins gelegen
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins
OD	optische Dichte
Oligonukleotid	synthetisch hergestellte einzelsträngige DNA, die z.B. als Startermoleküle für PCR-Reaktionen verwendet werden
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenyl-Methylsulfonyl-Fluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RSA	Rinderserumalbumin
RT	Raumtemperatur
S20	Sedimentationskoeffizient 20
<i>screening</i>	Identifikation einer cDNA- oder genomischen DNA-Sequenz in einer DNA-Bibliothek
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNAP25	<i>synaptosome-associated protein of 25 kD</i>
α -SNAP	<i>soluble NSF-attachment protein</i>
SNARE	SNAP-Rezeptor
Southern-Blot	über Kapillarwirkung erzielter DNA-Transfer vom Gel auf Membranen
T	Thymin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TWEEN 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat

U	<i>unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
ÜN	über Nacht
<i>unc</i>	Mutante in <i>Caenorhabditis elegans</i> , deren Phänotyp durch unkoordinierte Bewegungen gekennzeichnet ist
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -Galactosid

1 Einleitung

1.1 Neuronale Kommunikation beginnt mit der Transmitterfreisetzung

Da Zellen durch diverse Membranen in unterschiedliche Kompartimente aufgeteilt sind, existieren eine Vielzahl spezifischer, intrazellulärer Transportprozesse. Dabei schnüren sich vom Ursprungskompartiment Vesikel ab, die zum jeweiligen Zielkompartiment transportiert werden und mit diesem fusionieren. Es ist offensichtlich, daß diese Vorgänge spezifisch reguliert werden müssen, um die Integrität einer Zelle zu gewährleisten.

Im Falle der Fusion eines Transportvesikels mit der Plasmamembran werden Botenstoffe in den Extrazellulärraum freigesetzt, die dann von anderen Zellen registriert werden können. Diese sogenannte Exozytose gewährleistet die Kommunikation in vielzelligen Organismen. Die Endozytose ist der entgegengesetzte Vorgang, bei dem Stoffe aus dem Extrazellulärraum aufgenommen werden, indem sich Vesikel von der Plasmamembran abschnüren.

Von besonderer Bedeutung sind durch Exo- und Endozytose vermittelte Kommunikationsvorgänge im zentralen Nervensystem, also in Gehirn und Rückenmark. Das Gehirn ist ein präzises Netzwerk aus mehr als 10^{12} Nervenzellen. Diese Nervenzellen sind zu komplexen Netzwerken verbunden, welche uns die Wahrnehmung unserer Umwelt ermöglichen und unsere Handlungen steuern. Angesichts dieser außerordentlichen Bedeutung neuronaler Netzwerke für praktisch alle Lebensäußerungen liegt ein Schwerpunkt moderner neurobiologischer Forschung in der Analyse von molekularen Mechanismen, welche die Entstehung von Nervenzellnetzwerken steuern und die Signalübertragung zwischen Neuronen vermitteln.

Als Synapse bezeichnet man den Ort der Kontaktaufnahme und Signalübertragung zwischen zwei kommunizierenden Nervenzellen. Der bei weitem häufigste Synapsentyp ist die chemische Synapse, welche als zentrale Schalteinheit der Informationsverarbeitung im Nervensystem betrachtet werden kann und aus drei

Elementen besteht, dem präsynaptischen Endkopf, dem synaptischen Spalt und der postsynaptischen Membran (Kandel et al., 1996). Im menschlichen Gehirn werden die etwa 10^{12} Neuronen durch insgesamt 10^{15} Synapsen miteinander verbunden.

An Synapsen kann eine Membranpotentialveränderung in ein chemisches Signal umgewandelt werden. Dabei löst ein am präsynaptischen Endkopf ankommendes Aktionspotential über die Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle einen Kalziumeinstrom in die Synapse aus. Der resultierende Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration führt ultimativ zur exozytosevermittelten Freisetzung eines Botenstoffes, des Neurotransmitters. Der Transmitter diffundiert dann durch den synaptischen Spalt, um anschließend an spezifische Rezeptoren der postsynaptischen Zelle zu binden und deren physiologischen Zustand je nach Transmitter- und Rezeptorentyp auf vielfältige Weise zu beeinflussen.

Endokrine, neuronale und exokrine Zellen besitzen diese Art von Sekretionsweg, durch welchen Hormone, Neurotransmitter und Enzyme kontrolliert freigesetzt werden können. Dieser kontrollierte Exozytosevorgang benötigt neben Kalziumionen auch ATP und zelleigene Schlüssel-moleküle, welche die Freisetzung vermitteln und regulieren.

Chromaffine Zellen aus der Medulla der Nebenniere werden in neurowissenschaftlichen Studien als ein Modell für verschiedene neuronale Vorgänge verwendet. Sie sind ontogenetische Abkömmlinge der Neuralleiste und exprimieren wie ihre Tumorderivate, die PC12-Zellen, eine große Anzahl von sonst nur in Neuronen exprimierten Proteinen (Morgan und Burgoyne, 1997). Ein enormer Vorteil insbesondere auch der PC12-Zellen liegt darin, daß sie in Kultur gehalten werden können und so biochemischen Manipulationen zugänglich sind. Obwohl die Exozytose in Chromaffinzellen und PC12-Zellen hauptsächlich über *large-dense core*-Vesikel (LDCV) erfolgt, während Neuronen ihre Neurotransmitter aus kleinen synaptischen Vesikeln freisetzen, die sich in einigen wesentlichen Aspekten von LDCVs unterscheiden (Tab. 1), sind viele Erkenntnisse aus Exozytosestudien an LDCVs neuroendokriner Zellen auch auf die kalziumvermittelte Exozytose synaptischer Vesikel übertragbar (Morgan und Burgoyne, 1997). In der Tat besitzen die meisten Nervenzellen sowohl synaptische Vesikel als auch *large-dense core*-Vesikel, die sie auf ähnliche Weise freisetzen.

Parameter	Synaptische Vesikel	<i>large-dense-core-Vesikel</i>
Biogenese	Endosomen	Trans-Golgi-Netzwerk
Vesikeldurchmesser	50 nm	200 nm
Übertragungsgeschwindigkeit	200 μ s	Millisekunden
Fusionsort	aktive Zone	Plasmamembran
Neurotransmitter	schnelle Neurotransmitter	modulatorische Peptide/Catecholamine
beeinflusste Zellen	nur postsynaptischer Kontakt	auch benachbarte Zellen
Dauer des Effekts	kurz	länger
Stimulation	niedrige Frequenz	hohe Frequenz
Membranwiederverwendung	lokal	unklar

Tab. 1: Charakteristika sekretorischer Vesikel in Neuronen

Lebenszyklus der *large-dense-core-Vesikel* in Neuronen

Unreife *large-dense-core-Vesikel* (LDCV) knospen vom Trans-Golgi-Netzwerk ab, wo sie auch mit ihrem Inhalt, Neuropeptiden oder modulatorischen biogenen Aminen, gefüllt werden. Sie reifen während des Transports zur Zelloberfläche oder zum synaptischen Terminal, wo sie anders als synaptische Vesikel nicht mit der Plasmamembran der aktiven Zone in Kontakt treten. Ihre Exozytose wird wie bei synaptischen Vesikeln durch ein Aktionspotential und den folgenden Kalziumeinstrom über spannungsabhängige Kalziumkanäle ausgelöst. Unklar ist, wie LDCVs mit der präsynaptischen Plasmamembran in Kontakt treten. Die Mobilität von chromaffinen Granula zumindest ist nach Membrankontakt dramatisch reduziert, was auf einen proteinvermittelten Andockvorgang schließen läßt (Steyer et al., 1997; Oheim et al., 1998). LDCVs enthalten Proteine/Peptide, welche ausschließlich über das Trans-Golgi-Netzwerk aufgenommen werden können. Deshalb erscheint es als wahrscheinlich, daß die Exozytose das Ende von *large-dense-core-Vesikeln* darstellt und diese nicht lokal wiederverwendet werden. Es gibt jedoch Hinweise, daß ihre Membran- und Proteinkomponenten zum Trans-Golgi-Netzwerk zurücktransportiert werden (Patzak und Winkler, 1986) und somit nicht ausschließlich einer kontinuierlichen *de novo*-Synthese unterliegen.

Lebenszyklus der synaptischen Vesikel in Neuronen

Die Biogenese von synaptischen Vesikeln findet zumindest teilweise durch Knospung von frühen Endosomen lokal im synaptischen Endkopf eines Neurons statt (Südhof, 1995; Fernández-Chacón und Südhof, 1999). Über transmitterspezifische Vesikeltransporter werden zunächst Neurotransmitter wie Acetylcholin (Roghani, et al., 1994), Glutamat (Bellocchio et al., 1998, 2000; Takamori et al., 2000) und GABA (McIntire et al., 1997; Jonas et al., 1998) aktiv in das Lumen der Vesikel transportiert. Die anschließende gerichtete Translokation der Vesikel an die aktive Zone der präsynaptischen Plasmamembran erfolgt entweder durch Diffusion oder aktiv entlang des Zytoskeletts. Möglicherweise sind Isoformen der Rab-Proteine an diesem Schritt beteiligt (Pfeffer, 1999).

Die aktive Zone stellt einen spezialisierten Membranabschnitt dar, auf welchen der synaptische Sekretionsprozeß beschränkt ist (Brose et al., 2000; Garner et al., 2000). Dort kommt es zur Akkumulation von synaptischen Vesikeln, wobei einige Vesikel in direktem Kontakt mit der präsynaptischen Membran stehen (Bartlett et al., 1984a und b; Landis et al., 1988; Hirokawa et al., 1989). Lediglich ein kleiner Anteil dieser membrannahen Vesikel ist fusionkompetent, d.h. nur dieser als "akut freisetzbar" oder *readily releasable* definierte Vesikelpool kann auf ein entsprechendes Kalziumsignal mit Fusion reagieren. In Experimenten an deletionsmutanten Mäusen konnte der entscheidende Einfluß von Munc13-1 für die Reifung glutamaterger synaptischer Vesikel an der aktiven Zone belegt werden (Augustin et al., 1999; Brose et al., 2000).

Der Kalziumeinstrom induziert die Verschmelzung der fusionskompetenten Vesikel mit der Plasmamembran (Heuser et al., 1979) und führt innerhalb von 0.3 ms zur Neurotransmitterfreisetzung in den synaptischen Spalt (Mulkey und Zucker, 1991; Südhof, 1995). Nach der Fusion erfolgt die Rückgewinnung der synaptischen Vesikelmembran und ihrer Proteinkomponenten über klathrinabhängige Endozytose, wobei der Klathrinmantel nach der Endozytose wieder entfernt wird (Cremona und De Camilli, 1997). Die leeren Vesikel gelangen entweder in den Reserve-Pool oder in das frühe Endosom (Fischer von Mollard et al., 1994; Südhof, 1995; Murthy und Stevens, 1998) und stehen dann für einen erneuten Exozytosezyklus bereit.

1.2 Molekulare Mechanismen der Transmitterfreisetzung

Large-dense-core-Vesikel kommen im Perikaryon, im Axon sowie in den Axonendigungen praktisch aller Neurone des peripheren und zentralen Nervensystems vor (Harvey, 1975). Neben den beschriebenen physiologischen Unterschieden zwischen den Lebenszyklen von LDCVs und synaptischen Vesikeln eines Neurons (Tab. 1), gibt es weitgehende Gemeinsamkeiten hinsichtlich des molekularen Mechanismus ihrer kalziumvermittelten Exozytose. Außerdem hat sich herausgestellt, daß die Exozytose offensichtlich von denselben Proteintypen vermittelt wird, die auch in anderen subzellulären Kompartimenten oder Zelltypen an Fusions- und Knospungsprozessen beteiligt sind (Südhof, 1995). Es konnte gezeigt werden, daß jeweils homologe Proteine an analogen Teilschritten des Membrantransports zwischen verschiedenen Zellkompartimenten beteiligt sind (Hay und Scheller, 1997). Tatsächlich scheint der Mechanismus der Neurotransmittersekretion ein Spezialfall dieses allgemeinen Transportmechanismus zu sein, wobei zusätzlich und spezifisch ein Kalziumsensorapparat zur kontrollierten Freisetzung benötigt wird (Bennet, 1997). So konnten die membranassoziierten SNARE-Proteine Synaptobrevin, Syntaxin und SNAP25 als essentielle, identische exozytosevermittelnde Proteine sowohl der synaptischen Vesikel (Niemann et al., 1993; Söllner et al., 1993a; Martin, 1994 und Rothman, 1994) als auch der *large-dense-core-Vesikel* (Morgan und Burgoyne, 1995; Martin, 1997) identifiziert werden. SNARE bezeichnet hier SNAP-Rezeptoren, da zwei weitere lösliche Proteine, α -SNAP und NSF, an diese binden. Die SNARE-Proteine enthalten entweder ein oder zwei SNARE-Motive, eine aus ca. 60 Aminosäuren bestehende konservierte α -helikale Domäne (Weimbs et al., 1998). Syntaxin und SNAP25 werden, da sie sich auf der Plasmamembran (= *target*) befinden, auch als t-SNARE benannt, während Synaptobrevin, weil es sich auf den synaptischen Vesikeln (= *vesicle*) befindet, als v-SNARE bezeichnet wird (Söllner et al., 1993a und b).

In dem allgemein akzeptierten Exozytose-Modell, welches die Teilschritte des *docking* bis zur Fusion von Vesikeln auf molekularer Ebene beschreibt, ist die Ausbildung des sogenannten *core complex* Kernpunkt der Exozytosekaskade (Söllner et al., 1993a und b).

Der *core complex* ist ein thermostabiler, heterotrimerer Komplex bestehend aus den Plasmamembranproteinen Syntaxin und SNAP25 und dem Vesikelprotein Synaptobrevin mit einer 1:1:1-Stöchiometrie (Hayashi et al., 1994). Er wird aus vier SNARE-Motiven gebildet, wobei zwei davon von SNAP25 gestellt werden (Terrian und White, 1997; Weimbs et al., 1997; Weimbs et al., 1998; Sutton et al., 1998). Die Komplexbildung der vier α -Helices wird wahrscheinlich durch die initiale Bindung von Syntaxin an SNAP25 eingeleitet und mit der anschließenden Bindung von Synaptobrevin abgeschlossen. Das Zentrum, *0-layer*, wird über ionische Wechselwirkungen von drei Glutaminresten (Q) und einem Argininrest (R) gebildet, und bildet die Grundlage für die Klassifikation der SNARE-Proteine in Q-SNARE oder R-SNARE (Jahn und Südhof, 1999). Die Spaltung dieser Moleküle durch chlostridielle Neurotoxine führt zu einer vollständigen Blockade der Vesikelexozytose, was die essentielle Bedeutung der Komponenten des *core complex* für die Transmitterfreisetzung dokumentiert (Blasi et al., 1993a und b; Hayashi et al., 1994). Die Assoziation des *core complex* erfolgt unter paralleler Ausrichtung der beteiligten Proteine (Sutton et al., 1998), wobei die Bildung der stabilen *coiled-coil*-Struktur der vier α -Helices die Energie liefern könnte, um die abstoßenden Kräfte bei der Zusammenführung der fusionierenden Membranen zu überwinden (Brünger et al., 2000). In der Tat scheinen die SNARE-Proteine die minimale Fusionsmaschinerie zu bilden, da sie, integriert in unterschiedlichen Liposomen, diese fusionieren können (Weber et al., 1998; Nickel et al., 1999).

NSF bindet über α -SNAP an den *core complex* (Söllner et al., 1993a; Whiteheart et al., 1994). Beide Proteine agieren gemeinsam vor dem *docking* (Morgan und Burgoyne, 1995; Mayer et al., 1996; Morgan, 1996) bzw. nach der Vesikelfusion. NSF übernimmt somit nicht wie zunächst vermutet die Aufgabe, die Fusion voranzutreiben, sondern trennt nach der Exozytose unter ATP-Verbrauch den geformten *core complex*. Auf diese Weise findet eine Regeneration der freien Komponenten des *core complex* statt, welche sich dann in einem neuen Vesikelzyklus wieder zusammenlagern können (Mayer et al., 1996; Hanson et al., 1997; Otto et al., 1997).

Auslöser der Transmitterfreisetzung ist letztlich die Depolarisation der Membran und der Einstrom der Kalziumionen. Das Vesikelprotein Synaptotagmin verfügt über mehrere Kalziumbindungsstellen und wird deshalb als möglicher Kalziumsensor

angesehen (Brose et al., 1992; Shao et al., 1996; Bennet, 1997; Shao et al., 1997). Diese Interpretation wird durch die Analyse entsprechender deletionsmutanter Mäuse gestützt. In Synaptotagmin1-deletionsmutanten Mäusen bzw. in Mäusen, die eine mutante Synaptotagmin1-Variante mit erniedrigter Kalziumaffinität exprimieren, ist die schnelle kalziumabhängige Exozytose blockiert bzw. gestört, während die spontane kalziumunabhängige Transmitterfreisetzung weiterhin möglich ist (Geppert et al., 1994, Fernández-Chacón et al., 2001). Eine Interaktion von Synaptotagmin mit dem *core complex* könnte durch die Bindung an Syntaxin vermittelt werden (Bennet et al., 1992; Li et al., 1995; Chapman et al., 1995).

Trotz der beschriebenen molekularen Gemeinsamkeiten bei der Freisetzung eines Transmitters kommen den *large-dense-core*-Vesikeln jedoch andere Aufgaben im Organismus zu als den synaptischen Vesikeln. Diese Tatsache wird auch durch den unterschiedlichen Inhalt der LDCVs reflektiert. Nach dem gegenwärtigen Verständnis enthalten synaptische Vesikel die klassischen Neurotransmitter wie Acetylcholin, Glutamat und GABA (DeCamilli und Jahn, 1990). Die modulatorischen Transmitter wie die biogenen Amine Serotonin, Dopamin und Noradrenalin sowie Peptidhormone und andere Neuropeptide werden von LDCVs freigesetzt (Winkler und Fischer-Colbrie, 1990).

Interessanterweise scheint es spezifische regulatorische Proteine zu geben, welche selektiv für LDCVs bzw. für synaptische Vesikel exozytosevermittelnd wirken. In Experimenten an deletionsmutanten Mäusen konnte gezeigt werden, daß Munc13-1 lediglich für die Reifung glutamaterger synaptischer Vesikel, nicht jedoch GABAerger Vesikel oder chromaffiner Granula essentiell ist (Augustin et al., 1999; Brose et al., 2000; U. Ashery und N. Brose, unpublizierte Daten). Auf der anderen Seite konnte für *large-dense-core*-Vesikel nachgewiesen werden, daß hier CAPS spezifisch die Exozytose initiiert (Berwin et al., 1998; Tandon et al., 1998).

1.3 Identifizierung und Charakterisierung der CAPS-Proteine

Biochemische Studien an permeabilisierten neuroendokrinen Zellen führten zu der Entdeckung eines neuen kalziumbindenden Proteins, welches als CAPS (*calcium-dependent activator protein for secretion*) bezeichnet wird und für die Rekonstitution der kalziumabhängigen Sekretion aus permeabilisierten PC12-Zellen essentiell ist (Walent et al., 1992). CAPS ist ortholog zu Unc-31, einem Genprodukt des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* (Ann et al., 1997). In *C. elegans* beeinflusst Unc-31 multiple Funktionen des Nervensystems. Mutationen im unc-31-Gen verursachen Lethargie, konstitutives Pumpen, Produktion von Dauerlarvenstadien und einen Eilegedefekt (Avery et al., 1993). Unc-31-Mutanten sind resistent gegen Acetylcholinesterase-Inhibitoren (Miller et al., 1996). Diese phänotypische Veränderung wird auch in einer Reihe von Mutanten beobachtet, in denen Gene von Proteinen mit präsynaptischer Funktion mutiert sind (Hosono et al., 1987; Hosono und Kamiya, 1991), und weist auf eine mögliche Funktion von Unc-31 bei der Transmitterfreisetzung hin.

CAPS ist ein Protein, welches in neuralen und neuroendokrinen Geweben wie dem Gehirn, der Schilddrüse, dem Pankreas und der Nebenniere vorkommt. Es besteht aus 1289 Aminosäuren (145 kDa; Ann et al., 1997) und enthält eine Pleckstrin-homologe Domäne, welche Phosphatidyl-4,5-Bisphosphat bindet (Loyet et al., 1998). Dieses Inositolphospholipid, welches während des ATP-abhängigen *priming* in PC12-Zellen synthetisiert wird, scheint die Fusion von LDCVs, eventuell durch Bindung an CAPS, zu regulieren. Durch Bindung an membranständige Inositolphospholipide entsteht ein membranassoziierter CAPS-Pool, der sich wahrscheinlich auch funktionell von einem größeren löslichen Pool unterscheidet.

Die Funktion des CAPS-Proteins ist unklar. Langsame biochemische Assays in PC12-Zellen legen nahe, daß CAPS nach dem Andocken der Vesikel und dem ATP-abhängigen *priming* agiert (Walent et al., 1992; Hay und Martin, 1992; Ann et al., 1997). Diese Funktion scheint neueren Erkenntnissen zufolge spezifisch für Vesikel vom LDCV-Typ zu sein. Tatsächlich zeigen elektronenmikroskopische Studien von Berwin et al. (1998), daß membranassoziertes CAPS in Synptosomen

hauptsächlich an LDCVs lokalisiert ist. Parallele biochemische Untersuchungen unter Verwendung von gegen CAPS gerichteten Antikörpern in permeabilisierten Synaptosomen lieferten erste Hinweise dafür, daß CAPS lediglich die Sekretion von *large-dense-core*-Vesikeln, nicht jedoch die von synaptischen Vesikeln beeinflusst (Tandon et al., 1998). Elektrophysiologische Untersuchungen u.a. an mit anti-CAPS-Antikörpern injizierten Chromaffinzellen scheinen diese für LDCVs spezifische Rolle von CAPS zu bestätigen (Elhamdani et al., 1999). Einschränkend ist bei all diesen Experimenten einzuwenden, daß Antikörperinjektionsexperimente generell artefaktträchtig sind und in den konkret erwähnten Fällen wahrscheinlich ist, daß die inhibitorischen Effekte der verwendeten, oft schlecht charakterisierten Antikörper zumindest teilweise auf nichtspezifischen Effekten beruhen.

Neben der Pleckstrin-homologen Domäne verfügt CAPS über eine Domäne mit Homologie zu Munc13-1 (MHD1). Diese Ähnlichkeit könnte auf eine funktionelle Verwandtschaft zwischen dem *priming*-Faktor Munc13-1 und CAPS hinweisen (Koch et al., 2000) und war Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit.

2 Zielsetzung

Obwohl eine Reihe von Befunden auf eine essentielle Rolle für CAPS bei der Sekretion aus *large-dense-core*-Vesikeln hinweisen, ist die Funktion dieses Proteins und sein molekularer Wirkmechanismus nach wie vor unbekannt. Insbesondere hinsichtlich der bisher publizierten Studien zur funktionellen Rolle von CAPS ergeben sich in neuester Zeit Zweifel.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die funktionelle Bedeutung von CAPS bei der Exozytose zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollten zunächst möglichst alle in Mammaliern exprimierten CAPS-Isoformen identifiziert und einer vergleichenden Analyse ihrer Expression und subzellulären Verteilung unterzogen werden. In detaillierten licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen sollte dann die subzelluläre Verteilung der CAPS-Isoformen untersucht werden, um so Aufschluß über deren funktionelle Bedeutung zu erhalten. Im Anschluß daran sollten als essentielles Werkzeug für weitere funktionelle Studien CAPS-deletionsmutante Mäuse hergestellt werden. Als Kernprojekt bei der Aufklärung der funktionellen Bedeutung von CAPS-Proteinen für die Exozytose von *large-dense-core*-Vesikeln sollte die Analyse der deletionsmutanten Mäuse mit biochemischen, morphologischen und physiologischen Methoden durchgeführt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Blotkammer	Hofer Scientific Instruments, San Francisco, USA
DNA-Sequencer 373 Stretch	Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt
Elektronenmikroskop	Zeiss GmbH, Jena
Elektrophoresesysteme für Agarose-Gele	Life Technologies Gibco-BRL GmbH, Eggenstein-Leopoldshagen
Elektrophoresesysteme für SDS-Gele	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektroporationsgeräte	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Entwicklungsmaschine	Agfa-Gevaert GmbH, Martsel, Belgien
Durchlichtscanner Duoscan T 1200 (Programm Agfa Foto Look 3.00.07)	Agfa-Gevaert GmbH, Martsel, Belgien
Flüssigkulturschüttler Innova 4000	New Brunswick Science GmbH, Nürtingen
Geltrockner	Biometra GmbH, Göttingen
Glas-Teflon-Homogenisator	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Heizblöcke	Techne, Abingdon, England
Immunfluoreszenzmikroskop	Zeiss GmbH, Jena
Inkubatoren	Heraeus GmbH, Hanau
Kryostat Jung CM 3000	Leica, Bensheim
Kryotom	Leica, Bensheim
Mikrotiterplatten	Greiner GmbH, Frickenhausen

Oligosynthesizer 394 (DNA/RNA Synthesizer)	Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt
PCR-Maschine	Biometra GmbH, Göttingen
pH-Meter	Schütt GmbH, Göttingen
Phosphoimager (Fujix BAS 5000)	Raytest Isotopenmeßgeräte, Straubenhardt
Photometer	Beckman Instruments GmbH, München
Spannungsquelle	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Spektralphotometer	Beckman Instruments GmbH, München
Sterilbank	Heraeus GmbH, Hanau
Szintillationszählgerät	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Ultraschall-Homogenisator Labsonic U	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
UV-Crosslinker	Biometra GmbH, Göttingen
Vibratom VT 1000 S	Leica, Bensheim
Videoanlage für Gele	Intas GmbH, Göttingen
Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Wasserbäder	Schütt GmbH, Göttingen
Zentrifugen	Beckman Instruments GmbH, München Eppendorf, Hamburg Heraeus GmbH, Hanau

3.1.2 Chemikalien

Alle Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von der Firma Merck (Darmstadt) in p.a.-Qualität bezogen.

ABC Kit	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
[³² P]dCTP	Amersham-Buchler GmbH & Co, Braunschweig

[³⁵ S]dATP	NEN, Boston, USA
Agarose	Life-Technologies Gibco-BRL GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen
Alkalische Phosphatase	Boehringer Mannheim GmbH
Acrylamid-N,N'-	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Methylenbisacrylamid	
Aminosäuren	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Ammoniumperoxidisulfat	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Aprotinin	Boehringer Mannheim GmbH
Bacto-Hefe-Extrakt	DIFCO Laboratories GmbH, Augsburg
Bacto-Trypton	DIFCO Laboratories GmbH, Augsburg
Bacto-Agar	DIFCO Laboratories GmbH, Augsburg
Coomassie Blue R250	BioMol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
DEPC	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
3,3'-Diaminobenzidin	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
DNA-Längenstandard (BstE II)	New England Biolabs, Schwalbach
DNA-Längenstandard (1KB-Leiter)	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
dNTPs	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Durcupan- Reagenzien	Fluca Chemie AG, Neu-Ulm
ECL-Reagenzien	Amersham-Buchler GmbH & Co., Braunschweig
Einbettmedium für Gefrierschnitte	Leica Instruments GmbH, Nussloch
Einzelloch-Kupfer-Grid	Plano, Wetzlar
Entellan	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Entwicklungs- und Fixierlösung	Kodak Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Ficoll 400	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Formamid	Fluca Chemie AG, Neu-Ulm
Formvar	Plano, Wetzlar
Freund'sches Adjuvans	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Gelatine	DIFCO Laboratories GmbH, Augsburg

Glutaraldehyd	Polysciences Inc., Warrington, USA
Glutathion	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Glycin	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
HEPES	BioMol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
IPTG	BioMol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Kresylviolett	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Lachsspermien-DNA	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Leupeptin	Boehringer Mannheim GmbH
Lysozym	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Molekulargewichtstandards für SDS-PAGE	Bio-Rad Laboratories GmbH, München sowie Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Osmiumtetroxid	Polysciences Europe GmbH, Eppelheim
Paraformaldehyd	Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, Heidelberg
PEG 8000	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Pepstatin A	Boehringer Mannheim GmbH
Pfu-Polymerase	Stratagene GmbH, Heidelberg
PMSF	Boehringer Mannheim GmbH
Polyadenylsäure	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Ponçeau S	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Proteinase K	Boehringer Mannheim GmbH
Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Restriktionsenzyme sowie T4-Polynukleotid-Ligase	Boehringer Mannheim GmbH oder New England Biolabs, Schwalbach
RNase A	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
SDS	Boehringer Mannheim GmbH

Silver Grain-Emulsion	Kodak Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Taq-Polymerase	ABI, Weiterstadt oder Qiagen GmbH, Hilden
TdT Puffer	Boehringer Mannheim GmbH
TEMED	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
terminale Transferase	Boehringer Mannheim GmbH
T4 DNA-Ligase	Boehringer Mannheim GmbH
2,2,2-Tribromethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Tris	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Triton X-100	Boehringer Mannheim GmbH
Trockenmilchpulver	Nestlé Deutschland AG, Frankfurt/Main
Tween 20	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Uracil	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
X-Gal	BIOMOL Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Ziegenserum	Life-Technologies Gibco-BRL GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Bio-Spin-Chromatographiesäulen P30	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Centricon 30-Säulen	Amicon GmbH, Witten
ECL-Röntgenfilme	Amersham-Buchler GmbH & Co., Braunschweig
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Glutathion-Agarose-Kügelchen	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Hybond-N ⁺ -Nylonmembran	Amersham-Buchler GmbH & Co., Braunschweig

Lab-Tek Chambered Coverglass System	Nunc GmbH, Wiesbaden
Nitrozellulose-Filter (Ø 137 mm) Typ HA (Porengröße 0.45 µm)	Millipore GmbH, Eschborn
Northern Blot-Membran	Clontech GmbH, Heidelberg
Plastikwaren	Greiner, Falcon und Brandt
Nitrozellulosemembran (Protan) (Porengröße 0.2 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
PVDF-Membran (Immobilon) (Porengröße 0.45 µm)	Millipore GmbH, Eschborn
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme (BioMAX)	Kodak Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Szintillationszählröhrchen	Canberra-Packard GmbH, Frankfurt
Szintillationslösung	OptiPhase SuperMix, Fisons Chemicals, Loughborough Leics., England
Whatman-Zellulosefilter (Ø 150 mm)	Biometra GmbH, Göttingen
Whatman-Filterpapier 3MM	Biometra GmbH, Göttingen

3.1.4 Materialien für die Zellkultur

DMEM-Pulvermedium mit 4500 mg/L D-Glucose und L-Glutamin	Life-Technologies Gibco-BRL GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen
DMEM/25mM HEPES	Life-Technologies Gibco-BRL GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen
D-PBS	Life-Technologies Gibco-BRL GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen
ESGRO-LIF	Life-Technologies Gibco-BRL GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen
fötales Rinderserum	HyClone, Erembodegen-Aalst, Belgien
Gancyclovir	zur Verfügung gestellt von Prof. von Figura, Göttingen

L-Glutamin (100x)	Life-Technologies Gibco-BRL GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen
MEM nichtessentielle Aminosäuren (100x)	Life-Technologies Gibco-BRL GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen
2-Mercaptoethanol, Zellkultur-getestet	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Mineralöl	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Mitomycin C	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Neomycin (G418-Sulfat)	Life-Technologies Gibco-BRL GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen
N-Laurylsarcosin	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin (500x)	Boehringer Mannheim GmbH
Trypsin/EDTA	Life-Technologies Gibco-BRL GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen

3.1.5 Medien und Lösungen

<u>200x Ampicillin- Stammlösung:</u>	20 mg/ml	Ampicillin
<u>LB-Medium:</u>	10 g/l	NaCl
	10 g/l	Bacto-Trypton
	5 g/l	Bacto-Hefeextrakt
	1mM	NaOH zugeben und autoklavieren
<u>LB-Platten:</u>	15 g/l	Bacto-Agar in LB-Medium lösen; Bei Selektionsplatten (z.B. LB _{Amp}) die entsprechenden Selektionschemikalien (100 µg/ml Ampicillin) zugeben.
<u>TE-Puffer:</u>	10 mM	Tris/HCl, pH 7.4
	1 mM	EDTA

3.1.6 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> HB101	Invitrogen, NV Leek, Niederlande
<i>Escherichia coli</i> SURE	Stratagene GmbH, Heidelberg
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF (P2)	Stratagene GmbH, Heidelberg

3.1.7 Vektoren

pBluescript II SK +/-	Stratagene GmbH, Heidelberg
pcDNA3	Invitrogen, NV Leek, Niederlande
pCR2.1-TOPO	Invitrogen, NV Leek, Niederlande
pGEX-KG	Guan & Dixon, 1991
pEGFP-N1	Clontech GmbH, Heidelberg
pSFV1	Life-Technologies Gibco-BRL GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen
pTKNeo3	Rosahl et al., 1993

3.1.8 DNA-Kits

Plasmid Mini-, Midi- und Maxi-Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QiaEx II Gel Extraction-Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification-Kit	Qiagen GmbH, Hilden

3.1.9 Primäre Antikörper

CAPS1	AS 4111	C. Enk, Göttingen
CAPS2	AS 36	C. Enk, Göttingen
GAD	1 522 825	Boehringer Mannheim GmbH
GDI	Cl 81.1	Chou und Jahn, 2000
msec7		Neeb et al., 1999
Munc13-1	3H5	Dr. N. Brose, Göttingen
Munc13-2	SA3452	Dr. I. Augustin, Göttingen
Munc13-3	SA3450	Dr. I. Augustin, Göttingen
Munc18-1	I371	Ulrich und Südhof, 1994
Neurologin1	4F9	Dr. N. Brose, Göttingen
NMDA-R1	Cl 54.1	Brose et al., 1993
Secretogranin2	Sg2	Prof. H. Gerdes, Heidelberg
Synaptobrevin2	Cl 69.1	Edelmann et al., 1995

Synaptophysin1	Cl 7.2	Prof. R. Jahn, Göttingen
Synaptotagmin1	V216	Perin et al., 1990
Syntaxin1 A/B	I379	Barnstable et al., 1985

3.1.10 Sekundäre Antikörper

Kaninchen-Anti-Maus- Brückenantikörper	Jackson Immuno Research Lab., West Grove, USA
Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper, biotinyliert	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper, [¹²⁵ I]-konjugiert	Amersham-Buchler GmbH & Co., Braunschweig
Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper, ALEXA 568 (rot)	MoBiTec GmbH, Göttingen
Ziege-Anti-Maus-Antikörper, ALEXA 488 (grün)	MoBiTec GmbH, Göttingen
Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper, HRP-konjugiert	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ziege-Anti-Maus-Antikörper, HRP-konjugiert	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

3.1.11 Zelllinien

E14-Zellen	Embryonale Stammzellen aus Maus, die männlichen Embryonen von SV/29-Mäusen entstammen. Zur Verfügung gestellt von Prof. K. Rajewski, Köln.
MEF-Zellen	murine embryonale Fibroblasten; Genome Systems, Inc., St. Louis, USA

3.1.12 Tiere

Die Tiere (*C57Black/6*-Mäuse, *Wistar*-Ratten und *Chinchilla*-Kaninchen) wurden aus den institutseigenen Tierställen bezogen. Die Tiere wurden bei einer Temperatur von 22°C und einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Es wurde pelletierte Zuchtdiät (Herilan, Eggersmann, Rinteln) und Wasser ad libitum zur Verfügung gestellt.

3.1.13 CAPS-cDNA-Klone

Die in dieser Studie verwendete CAPS-cDNA ist eine Rattensequenz, die in der GenBank[™] / EBI-Datenbank aufgeführt ist (U16802).

3.1.14 Genbibliotheken

Die verwendete Rat brain Quick Clone cDNA wurde von Clontech, Heidelberg, bezogen.

Die verwendete Lambda FIX II library wurde von Stratagene, Heidelberg, bezogen.

3.1.15 Gensonden und Klone

Die Sonde, welche für das *screening* der genomischen Maus-Bibliothek verwendet wurde, umfaßt die Sequenz 963–1518 bp der CAPS1-cDNA (Oligonukleotide: 1051/1052).

3.1.16 Synthetische Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von Frau I. Thanhäuser und Herrn F. Benseler mit dem abteilungseigenen Oligosynthesizer erzeugt und sind nachfolgend aufgeführt.

<i>Oligo-Nr.</i>	<i>5' Sequenz 3'</i>	<i>Lokalisation bzw. Fragmentgröße</i>
1051	CAG GCA GCC CAG ATC AGA CGA GAG	962-985 bp in CAPS1-cDNA
1052	CTG TTT GGG GTG GGA TGG AGG ATA	1495-1518 bp in CAPS1-cDNA
1179	TTT TGG ACA ATT TTA TCT ACT CA	genomische DNA
1180	ATA CCA TTG TGC TGC TTT GTT T	PCR-Fragment: 2.8 kb
1183	CTC TTT CTG TGG GAA TTT TGC ACA	genomische DNA
1184	AAT CTG CAC TCC TTG GCT TGC TCT	PCR-Fragment: 220 bp
1306	CGC CTC GAG CGA CTT GGA CAG CTG GTT CTC GCT	1208-1239 bp in CAPS1-cDNA
1308	CGC GAA TTC GCA GCC TAC CTG AGA TTG ATG GC	707-735 bp in CAPS1-cDNA
1305	CGC CTC GAG CTA GTC GTC TTC TTC ATC TTC CTC GTC	3899-3940 bp in CAPS1-cDNA
1307	CGC GAA TTC AGG ATC TGT TCG CCC CAC TCG TTG TT	2928-2962 bp in CAPS1-cDNA
1502	TGC GGT GGG CTC TAT GGC TTC T	genomische DNA
1503	CTC GAG TGG CCT GAT CTT TGT CA	1502+1504 PCR-Fragment: 465 bp
1504	TAT GAG GAG TTT ATG TGC GTG GAT	1503+1504 PCR-Fragment: 380 bp
1770	GCT TGG TGC TTT GCT TTT TAG	724-744 bp in CAPS2-cDNA
1786	CTA CAG CAA AAT GAG GAG CAT	9-30 bp in CAPS2-cDNA
1818	CGC ATG GGT TGT GGA GAA GTC GCC TTG AGT GCC CCA GGT TGG TTT	1371-1417 bp in CAPS1-cDNA
1820	TCC CGC TCA AAG CCC CTG TGG ATA GAT TGT GCA ATG GAG GAC TCC	3024 - 2978 bp in CAPS1-cDNA
1819	GCA GAC TCC ATC AGG TCA ACG TAG CGG ACA ACC AAG GGC ACA AAG	246 - 292 bp in CAPS2-cDNA.
1821	AGC CTC CAG AAC AGA TCC TCG GAA GTT GTT GAG CCA TTG GTG GAC	459 - 505 bp in CAPS2-cDNA
2146	CGC CGA ATT CTA CAG CAA AAT GAG GAG CAT	1-30 bp in CAPS2-cDNA
2147	CGC CTC GAG ATT GGT GGA CTC ATA TAA AGA	450-479 bp in CAPS2-cDNA
2148	CGC CGA ATT CAG CAG GAG ACA TGG CAG CCT	312-341 bp in CAPS2-cDNA
2149	CGC CTC GAG TCC TCC ATC CAG GGC ACA CAG	747-776 bp in CAPS2-cDNA

3.2 Methoden

3.2.1 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte mittels *cycle sequencing* unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Didesoxy-Terminatoren und eines DNA-Sequencers 373 Stretch (modifiziert nach Sanger et al., 1977).

3.2.2 DNA-Datenbanksuche

Die DNA- und Protein-Sequenzanalyse wurde mit Hilfe des Computer-Programms Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) oder über Internetzugang am National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mit Hilfe des Computer-Programms Blast Search durchgeführt.

3.2.3 Herstellung elektrokompenter Bakterien

Mit einem Einzelklon eines Bakterienstammes wurden 100 ml LB-Medium angeimpft und ÜN bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Die Zellen wurden anschließend 1:100 in einem Liter LB-Medium verdünnt und bei 37°C im Schüttelinkubator bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.5-0.7 weiterkultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (15 Minuten, 4000x g, 4°C) geerntet und vorsichtig in einem Liter eiskalten 10 % Glycerins (10 % Glycerin in sterilem ddH₂O) resuspendiert. Diese Waschschrte wurden mit 500 und 250 ml 10 % Glycerin wiederholt. Nach dem letzten Waschschrte wurden die Zellen in 4 ml 10 % Glycerin resuspendiert und als Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80°C.

3.2.4 Elektrotransformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Zur Transformation wurde 1 µl Plasmid-DNA (1/20 Volumenanteil eines Ligationsansatzes oder 1/100-Verdünnung einer Plasmidpräparation) mit 40 µl der entsprechenden elektrokompenten Bakterien (auf Eis aufgetaut) gemischt, 5 min auf Eis inkubiert, in eine Elektroporationsküvette mit 0.1 cm Elektrodenabstand überführt und mit 1.8 kV im Bio-Rad E. coli-Pulser elektrotransformiert. Zur Regeneration der Zellen wurde der Elektroporationsansatz sofort in 1 ml 37°C warmen LB-Mediums aufgenommen und für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden kurz abzentrifugiert, in ca. 50 µl LB-Medium resuspendiert und auf einer entsprechenden LB-Selektionsplatte (z.B. LB_{Amp}) ausplattiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte dann bei 37°C ÜN.

3.2.5 DNA-Plasmidpräparationen

3.2.5.1 DNA-Minipräparationen (Holmes und Quigley, 1981)

<u>STET</u> :	100 mM	NaCl
	10 mM	Tris/HCl, pH 8.0
	1 mM	EDTA
	5 %	Triton X-100

Zur raschen restriktionsanalytischen Charakterisierung eines Klones, z.B. nach einer Ligationsreaktion, wurde das Protokoll von Holmes angewendet. Es wurde ein *E. coli*-Klon in 2 ml LB_{Amp} inokuliert und ÜN bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. 1.5 ml der Kultur wurden bei 10.000x g für 30 s bei RT zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 300 µl STET resuspendiert. Nach Zugabe von 25 µl einer frisch angesetzten LysozymbLösung (10 mg/ml) wurde die Suspension für 1 min aufgeköcht und dann bei 15.000x g für 10 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und die verbleibende Lösung mit 1/3 Vol. 7.5 M Ammoniumazetat und 2.5 Vol. Ethanol versetzt. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 15.000x g für 20 min bei RT präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde zur Entsalzung mit 70 % Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 50 µl TE-Puffer resuspendiert. Von dieser Präparation wurde 1/10 Vol. im Restriktionsverdau analysiert.

3.2.5.2 DNA-Midipräparationen

Um größere Mengen Plasmid-DNA (150–500 µg) zu isolieren, wurden DNA-Midipräparationen mittels Plasmid Midi- oder Maxi-Kits der Firma Qiagen GmbH, Hilden, nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.5.3 Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation

Die Phenolextraktion dient der Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen. Phenol ist ein guter Wasserstoffbrückenbildner und kann hydrophobe Wechselwirkungen mit Aminosäureseitenketten ausbilden. Dadurch dissoziiert das Phenol die Protein-Nukleinsäurekomplexe in die freien Komponenten unter Denaturierung und Anreicherung von Proteinen in der Phenolphase. Die Extraktion mit Chloroform dient dem Entfernen des Phenols aus der wässrigen Phase, welche die aufgereinigte Nukleinsäure enthält. Eine anschließende Ethanol-Präzipitation und weitere Waschschriffe entfernen Salze.

Es wurde 1 Vol. einer puffergesättigten Phenol/Chloroform-Mischung (1:1) zur Probe gegeben und der Ansatz gemischt. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 15.000x g wurde die wässrige Phase abgenommen. Dann wurde 1 Vol. Chloroform zur Probe zugegeben und gemischt. Nach einer erneuten Zentrifugation von 5 min bei 15.000x g wurde die wässrige Phase abgenommen. Anschließend wurde 1/10 Vol. 3 M Na-Azetat, pH 5.2 und 2.5 Vol. Ethanol zugegeben und gemischt. Die DNA-Präzipitation erfolgte für mindestens eine Stunde bei -20°C. Nach einer Zentrifugation von 20 min bei 15.000x g wurde der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer gelöst.

3.2.5.4 Isolierung genomischer DNA aus Mäuseschwänzen

<u>SNET</u> :	20 mM	Tris/HCl, pH 8.0
	5 mM	EDTA
	1 %	SDS
	400 mM	NaCl

Die Schwanzbiopsie der Maus (ca. 3 mm) wurde in 500 µl SNET, dem 20 µl einer Proteinase K-Lösung (10 mg/ml) zugesetzt wurde, ÜN bei 56°C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert. Dem Ansatz wurde das gleiche Volumen einer puffergesättigten

Phenol/Chloroform-Mischung (1:1) zugegeben. Nach sorgfältigem Mischen wurde der Ansatz zur Phasentrennung bei 15.000x g für 10 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumen von 2-Propanol versetzt und gemischt. Die genomische DNA wurde dann durch Zentrifugation bei 15.000x g für 20 min bei RT präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde in 200 µl TE-Puffer aufgenommen. In dem PCR-Ansatz zur Genotypisierung wurde 1 µl dieser DNA in einem Reaktionsvolumen von 25 µl eingesetzt.

3.2.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

Aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften absorbieren DNA-Moleküle in Lösung UV-Licht. Diese Absorption kann im Spektralphotometer gemessen werden. Je höher die Konzentration der DNA, desto größer ist die optische Dichte der Lösung bei $\lambda = 260$ nm. Es gilt folgende Relation zwischen gemessener Absorption und Konzentration der Nukleinsäuren:

$$\text{dsDNA: } 1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ mg/ml}$$

$$\text{ssDNA: } 1 \text{ OD}_{260} = 36 \text{ mg/ml.}$$

Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei 280 nm. Entsprechend liefert das Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ein Maß für die Verunreinigung einer DNA-Lösung mit Proteinen. Es sollte für proteinfreie DNA-Lösungen 1.7-1.9 betragen.

3.2.7 Restriktionsanalyse von DNA

Restriktionsendonukleasen erkennen und spalten kurze definierte Nukleotidsequenzen der DNA. Mittels Restriktionsenzymen wurden Plasmid-DNA auf *inserts* analysiert, *inserts* aus Plasmiden isoliert bzw. Plasmide spezifisch gespalten. Neben dem Restriktionsenzym und der zu spaltenden DNA enthält der Restriktionsansatz den vom Hersteller mitgelieferten Puffer, um optimale Reaktionsbedingungen zu gewährleisten. Zur Spaltung von Plasmid-DNA wurde der Restriktionsansatz 1.5-2 h bei der enzymespezifischen Temperatur inkubiert, die Restriktion genomischer DNA erfolgte ÜN. Anschließend wurde die DNA je nach Bedarf weiter modifiziert, elektrophoretisch analysiert bzw. aufgereinigt.

3.2.8 Dephosphorylierung der 5'-Enden von Nukleinsäuren

Die alkalische Dephosphorylierung bewirkt die Abspaltung der freien 5'-Phosphatgruppen von Nukleotiden, wodurch die Bildung einer neuen Phosphodiester-Bindung durch Ligase verhindert wird. Durch die Dephosphorylierung eines linearisierten Vektors mit alkalischer Phosphatase wird eine Auto-Religation des Vektors bei der Ligation mit DNA-Fragmenten vermieden. Das Dephosphorylierungsprotokoll entsprach den Herstellerangaben (Boehringer Mannheim GmbH).

3.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten ist eine Methode zur Erzeugung von rekombinanten DNA-Molekülen *in vitro*. Die Polynukleotid-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert die kovalente Verknüpfung von Phosphodiester-Bindungen zwischen freien 5'-Phosphat- mit 3'-Hydroxyl-Enden doppelsträngiger DNA. Bei doppelsträngiger DNA muß nur einer der beiden Stränge kovalent verbunden werden, um eine hohe Transformationseffizienz zu erreichen.

<u>Ligationsansatz:</u>	20-100 ng	Vektor-DNA
	ca. 60–300 ng	<i>insert</i> -DNA
	2 µl	10x Ligase-Puffer
	1 µl	T4 DNA-Ligase
	ad 20 µl	mit ddH ₂ O
		die Inkubation erfolgte bei 16°C ÜN

3.2.10 Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al., 1988)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion können Abschnitte einer DNA oder RNA durch Einsatz einzelsträngiger, komplementärer DNA-Fragmente (Oligonukleotide) spezifisch amplifiziert werden. Die Reaktion besteht aus drei aufeinanderfolgenden Schritten. Zu Beginn wird die doppelsträngige Matrizen-DNA hitzedenaturiert. Als Folge liegen die beiden DNA-Stränge getrennt vor. Somit können im zweiten Schritt Oligonukleotide an die komplementären Sequenzen hybridisieren (*annealing*).

Von diesen ausgehend erfolgt im dritten Schritt die enzymatische Synthese entlang eines Matrizenstranges (*template*). Als Produkt entsteht ein spezifischer DNA-Abschnitt, der in den anschließenden Reaktionsschritten wiederum als Matrize dient.

Für Klonierungen wurde die Pfu-Polymerase verwendet, da diese wegen ihrer 3'-5'-Exonukleaseaktivität eine sehr geringe Fehlerrate aufweist. Bei der DNA-Synthese zur Genotypisierung von Mäusen wurde die Taq-Polymerase verwendet.

PCR mit Pfu-Polymerase	PCR zur Genotypisierung
1-5 µl Matrizen-DNA	1 µl Matrizen-DNA
je 1 µl 5'- und 3'-Oligonukleotide (5 pmol/µl)	je 0.2 µl 5'- und 3'-Oligonukleotide (5 pmol/µl)
1 µl dNTP-Mix (2,5 mM je dNTP)	1 µl dNTP-Mix (2,5 mM je dNTP)
5 µl 10x Polymerase-Puffer	2.5 µl 10x Polymerase-Puffer
1 µl Pfu-Polymerase	0.2 µl Taq-Polymerase
ad 50 µl ddH ₂ O	ad 25 µl ddH ₂ O

Die PCR-Produkte für Klonierungsreaktionen wurden nach Herstellerangaben (Qiagen, Hilden) mittels QIAquick PCR Purification-Kit gereinigt. Ein Aliquot von 1/10 Vol. wurde anschließend im Agarosegel kontrolliert.

3.2.11 Agarosegelelektrophorese

<u>10x TBE:</u>	490 mM	Tris
	490 mM	Borsäure
	20 mM	EDTA
<u>50x TAE:</u>	2 M	Tris
	17.5 %	konzentrierte Essigsäure
	50 mM	EDTA
<u>6x Probenpuffer:</u>	0.25 %	Bromphenolblau
	40 %	Saccharose

Die Agarosegelelektrophorese erlaubt die Analyse von Größe, Menge und Qualität von DNA und RNA. Durch den Auftrag eines DNA-Längenstandards mit DNA-Fragmenten definierter Länge läßt sich die Größe der im Gel aufgetrennten DNA-Banden ermitteln. Die DNA-Banden werden durch Zugabe des interkalierenden und

fluoreszierenden Farbstoffes Ethidiumbromid bei 312 nm visualisiert und können fotografiert werden.

In der Regel wurden 0.7-1.3 %ige Gele verwendet. Die Agarose wurde im entsprechenden 1x Laufpuffer (TBE bzw. TAE) durch Kochen vollständig gelöst, nach Abkühlung auf ca. 50°C mit Ethidiumbromid (0,5 mg/ml) versetzt und in den Gelträger der Elektrophoresekammer gegossen. Vor dem Probenauftrag wurden die DNA-Proben mit 1/6 Vol. Probenpuffer versetzt und in die Taschen des erhärteten Agarosegels pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei konstanter Spannung (80-120 V) in der Gelapparatur. Für die Auftrennung von Plasmid-DNA wurde TBE-Puffer, für genomische DNA TAE-Puffer verwendet.

3.2.12 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung der DNA aus dem Agarosegel wurde die entsprechende Bande nach Herstellerangaben (Qiagen, Hilden) mittels QiaEx II Gel Extraction-Kit gereinigt. Das Prinzip basiert auf der Auflösung der Gelmatrix und der anschließenden Bindung der doppelsträngigen DNA an eine Silicatmatrix, von der sie später quantitativ abgelöst werden kann.

3.2.13 Southern-Blot-Analyse (Southern, 1975)

Nachdem im Agarosegel die enzymatisch gespaltenen DNA-Fragmente elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt worden waren, wurden mittels dieser Methode zur radioaktiv markierten DNA-Sonde komplementäre transferierte Fragmente auf Nylonmembranen identifiziert.

3.2.13.1 DNA-Transfer auf Nylonmembranen

<u>Denaturierungspuffer:</u>	1.5 M	NaCl
	0.5 M	NaOH
<u>Neutralisierungspuffer:</u>	1.5 M	NaCl
	1 M	Tris/HCl, pH 7.4
	1 mM	EDTA
<u>20x SSC:</u>	3 M	NaCl
	0.3 M	Na ₃ -Zitrat

Mit Hilfe des Southern-Transfers wurden DNA-Fragmente in Agarose-Gelen auf Nylonmembranen übertragen. Nach der Agarosegelelektrophorese in TAE-Puffer wurde das Gel für 20 min in Denaturierungspuffer inkubiert, um DNA-Einzelstränge zu erhalten. Diese sind für die radioaktiv markierte Sonde auf der Nylonmembran zugänglich. Das Gel wurde anschließend auf zwei Lagen Whatman-Filterpapier gelegt, deren Enden in Denaturierungspuffer eintauchten, sowie mit Plastikfolie umgrenzt, um einen Flüssigkeitsdurchfluß ausschließlich durch das Gel zu gewährleisten. Auf das Gel wurden luftblasenfrei eine Hybond-N⁺-Nylonmembran, drei Lagen Whatman-Filterpapier (beides vorher in Denaturierungslösung getränkt) sowie mehrere Lagen trockenes Papier gelegt. Der Aufbau wurde mit einem Gewicht von ca. 400 g beschwert. Während einer Transferzeit von mindestens 6 Stunden wurde der Denaturierungspuffer mittels der Kapillarkräfte von den trockenen Papierschichten durch das Gel und die Membran gezogen, wobei die einzelsträngig vorliegende DNA mitdiffundierte und an der Nylonmembran haften blieb. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in Neutralisierungspuffer inkubiert und anschließend mit 2x SSC gespült. Nach Abtropfen wurde die DNA durch UV-Licht (1.0 J/cm²) an die Membran kovalent gebunden.

3.2.13.2 Radioaktive Markierung der DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung der DNA-Fragmente wurde mittels Prime-It II-Random Primer Labeling-Kit nach Herstellerangaben (Stratagene GmbH, Heidelberg) mit 50 µCi [³²P]dCTP durchgeführt. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mittels Bio-Spin-Chromatographiesäulen nach Herstellerangaben (Bio-Rad GmbH, München) von der markierten Sonde getrennt.

3.2.13.3 Hybridisierung und Detektion spezifischer DNA-Fragmente

<u>100x Denhardts-Lösung:</u>	2 %	Rinder-Serum-Albumin
	2 %	Ficoll 400
	2 %	Polyvinylpyrrolidon
<u>Prähybridisierungslösung:</u>	50 %	Formamid
	5x	Denhardts-Lösung
	1.5 %	SDS
	5x	SSC
	100 µg/ml	denaturierte Lachsspermien-DNA
<u>Hybridisierungslösung:</u>		Prähybridisierungslösung mit radioaktiv markierter DNA-Sonde
<u>Waschlösung I:</u>	2x	SSC
	0.1 %	SDS
<u>Waschlösung II:</u>	0.1x	SSC
	0.1 %	SDS

Die Nylonmembran wurde für 2 Stunden bei 42°C in Prähybridisierungslösung unter Schütteln inkubiert und anschließend mit der kurz zuvor denaturierten (10 Minuten, 95°C), radioaktiv markierten DNA-Sonde in Hybridisierungslösung bei gleicher Temperatur 1x geschwenkt. Die Membran wurde durch zweimalige Inkubation mit Waschlösung I und durch eine einmalige Inkubation mit Waschlösung II für jeweils 20 Minuten bei 60°C im Schüttelwasserbad gewaschen. Die luftgetrockneten Membranen wurden in Folie eingeschlagen, auf einen Röntgenfilm in einer Autoradiographiekassette mit Verstärkerfolie gelegt und bei -70°C exponiert.

3.2.14 mRNA-Expressionsanalyse

Für die Analyse der mRNA-Expression wurden kommerziell erworbene Northern Blot-Membranen verwendet. Die radioaktive Markierung, anschließende Hybridisierung und Exposition erfolgte wie in 3.2.13.2 und 3.2.13.3 beschrieben.

3.2.15 Expression von GST-Fusionsproteinen (Guan und Dixon, 1991)

Zur Herstellung rekombinanter GST-Fusionsproteine wurde das entsprechende cDNA-Fragment in den Expressionsvektor pGEX-KG subkloniert. Dieser Vektor ermöglicht die Expression von GST-Fusionsproteinen unter IPTG-Induktion in verschiedenen Bakterienstämmen.

Von einem Einzelklon wurde eine 100 ml Kultur in LB_{Amp} ÜN angelegt. Mit dieser ÜN-Kultur wurde am nächsten Tag ein Liter LB_{Amp} angeimpft und für eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterienkultur wurde auf Raumtemperatur heruntergekühlt (30 min bei RT unter Schütteln) und die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG induziert. Die Bakterien wurden für weitere 4-6 h bei RT unter Schütteln kultiviert und danach durch Zentrifugation (20 min, 4.500x g) sedimentiert. Das Bakteriensediment wurde in 10 ml PBS resuspendiert, zentrifugiert (20 min, 4500x g) und erneut in 10 ml PBS resuspendiert bzw. bei -20°C eingefroren. Der Zellaufschluß erfolgte durch Zugabe von 0.1 mg/ml Lysozym, 0.1 mM PMSF und anschließender Ultraschall-Behandlung mit dem Makrotip eines Ultraschall-Homogenisators bei mittlerer Stärke dreimal für 30 Sekunden. Die Solubilisierung der Proteine erfolgte durch Zugabe von 1 % Triton X-100 und Schütteln auf Eis für 15 Minuten. Anschließend wurde das Bakterienlysat abzentrifugiert (27.500x g, 20 Minuten, 4°C). Der daraus resultierende Überstand wurde ÜN mit 200-500 µl in PBS aufgeschwemmten Glutathion-Agarose-Kügelchen auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Glutathion- Kügelchen fünfmal mit dem Puffer (PBS, 0.1 % Triton X-100, 0.2 mM PMSF) gewaschen (Überstand abnehmen, Waschpuffer zugeben und Matrix bei 1000x g für eine Minute sedimentieren). Nach dem letzten Waschschrift wurden die Glutathion-Kügelchen in 1 Vol. PBS aufgenommen. Zur Überprüfung der Proteinexpression und zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das so aufgereinigte GST-Fusionsprotein durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (3.2.19) analysiert. Die an die Glutathion-Matrix gebundenen Proteine können für mehrere Tage auf Eis bei 4°C aufbewahrt oder mit reduziertem Glutathion eluiert werden. Hierzu wurden die Glutathion-Kügelchen zweimal mit dem Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8.0, 0.1 % Triton X-100,

0.2 mM PMSF) gewaschen und die matrixgebundenen Proteine anschließend zweimal mit 5 ml eines Puffers mit 100 mM Tris/HCl pH 8.0, 0.1 % Triton X-100, 0.2 mM PMSF, 9 mg/ml reduziertes Glutathion bei RT für 45 Minuten auf einem Drehrad eluiert. Die eluierten Proteine im Überstand wurden mittels Centricon 30-Säulen nach Herstellerangaben (Amicon, Witten) durch Zentrifugation auf ca. 1 ml konzentriert. Die Proteine wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.16 Herstellung synaptosomaler Fraktion (P2)

Alle Schritte nach der Gehirnentnahme erfolgten auf Eis, die Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4°C. 20 Cortices aus Rattenhirn werden zu 160 ml eiskalter 320 mM Saccharose-Lösung gegeben, mit einem Glas-Teflon-Homogenisator durch 10maliges Auf- und Abziehen bei 900 UpM homogenisiert und 10 Minuten bei 900x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und erneut für eine Stunde bei 40.000x g zentrifugiert. Das Sediment wird in 50 ml 320 mM Saccharose-Lösung aufgenommen und durch kurze Homogenisation (zweimaliges Auf- und Abziehen bei 900 UpM) resuspendiert. Die so gewonnene grob gereinigte Synaptosomen-Suspension wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert. Von einem kleinem Aliquot wurde eine Proteinkonzentrationsbestimmung (3.2.18) durchgeführt.

3.2.17 Subzelluläre Fraktionierung (Jones und Matus, 1974; Huttner et al., 1983)

Folgende Fraktionen wurden aus Rattenhirn isoliert: H, Homogenat; P1, nukleäres Sediment; P2, ungereinigtes synaptosomales Sediment; P3, leichtes Membransediment; S3, zytosolische Fraktion; LP1, lysierte synaptosomale Membranen; LP2, ungereinigte synaptische Vesikelfraktion; LS2, zytosolische synaptosomale Fraktion; SPM, synaptische Plasmamembranen.

Alle Schritte wurden bei 4°C ausgeführt. 20 Cortices aus Rattenhirn wurden in 150 ml eines Puffers mit 320 mM Saccharose, 0.1 mM PMSF, 2 mg/ml Pepstatin A mit einem Glas-Teflon-Homogenisator homogenisiert und bei 800x g für 10 Minuten

zentrifugiert. Das Sediment (P1) wurde aufbewahrt. Der Überstand wurde bei 9.200x g für 15 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde durch Resuspension und erneute Zentrifugation bei 9.200x g in Homogenisationspuffer gewaschen und aufbewahrt (P2). Der Überstand der ersten Zentrifugation wurde bei 165.000x g für eine Stunde zentrifugiert, das daraus resultierende Sediment (P3) und der Überstand (S3) wurden aufbewahrt. Das grob gereinigte synaptosomale Sediment (P2) wurde in 15 ml 320 mM Saccharose resuspendiert und durch Zugabe des neunfachen Volumens ddH₂O, PMSF (0.1 mM Endkonzentration), Pepstatin A (2 mg/ml Endkonz.), HEPES/KOH, pH 7.4 (10 mM Endkonzentration) osmotisch lysiert. Diese Suspension wurde für 10 Minuten gerührt und anschließend bei 25.000x g für 20 Minuten zentrifugiert (Sediment LP1). Der Überstand wurde erneut zentrifugiert (165.000x g für 2 Stunden), der daraus resultierende Überstand (LS2) und das Sediment (LP2) wurden aufbewahrt. Das Sediment (LP1) nach Lyse und Zentrifugation wurde in 10 ml 320 mM Saccharose, 1 mM HEPES/KOH, pH 7.4 resuspendiert und auf einen kontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten (0.5–1.5 M), der 0.1 mM PMSF, 2 mg/ml Pepstatin A und 1 mM HEPES/KOH, pH 7.4 enthielt, geladen. Nach Zentrifugation (65.000x g, 150 Minuten) wurde die trübe Fraktion unterhalb der Myelin-Bande (entspricht etwa 0.8–1.3 M Saccharose) gesammelt, mit zwei Volumina ddH₂O verdünnt und bei 37.000x g für 20 Minuten zentrifugiert. Das resultierende Sediment (SPM) wurde in 320 mM Saccharose, 1 mM HEPES/KOH, pH 7.4, resuspendiert.

3.2.18 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde mit einem auf der Bradford-Methode (Bradford, 1976) basierenden Protein-Nachweis nach Herstellerangaben (Protein Assay; Bio-Rad Laboratories GmbH, München) vorgenommen.

3.2.19 SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteinen (Laemmli, 1970)

<u>10x Laufpuffer:</u>	3 g/l	Tris
	14.4 g/l	Glycin
	2 g/l	SDS
<u>Sammelgel-Puffer:</u>	0.5 M	Tris/HCl, pH 6.8
	0,4 %	SDS
<u>Trenngel-Puffer:</u>	1.5 M	Tris/HCl, pH 8.8
	0.4 %	SDS
<u>AMBA:</u>	30 %	Acrylamid:N,N'-Methylen-bis-Acrylamid Lösung 37.5:1
<u>10 % APS:</u>	10 %	Ammoniumperoxodisulfat
<u>3 x Laemmlipuffer:</u>	10 %	SDS
	140 mM	Tris/HCl, pH 6.8
	3 mM	EDTA
	30 %	Saccharose
	0.2 %	Bromphenolblau
<u>Gelfärbelösung:</u>	0.15 %	Coomassie Brillant Blue R250
	10 %	konz. Essigsäure
	25 %	Isopropanol
<u>Gelentfärbelösung:</u>	30 %	Methanol
	10 %	konz. Essigsäure

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) erlaubt die Auftrennung komplexer Proteingemische nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Das für die Denaturierung verwendete SDS ist in der Lage, Polypeptidketten unter Aufhebung ihrer Sekundärstruktur aufzufalten. Konformative Effekte werden dadurch weitgehend aufgehoben. Gleichzeitig erhalten die Proteine eine negative Ladung (ca. ein SDS-Molekül/drei Peptidreste), die nicht mehr von ihrer Aminosäurezusammensetzung, sondern von ihrem Molekulargewicht abhängt. Durch die Verwendung von Dithiothreitol werden vorhandene Disulfidbrücken reduziert. Eine optimale Proteinauftrennung erreicht man durch eine diskontinuierliche SDS-PAGE, bei der das Gel in Trenn- und Sammelgel unterteilt wird. Die Proben, die vorab in Laemmli-Puffer gelöst wurden, passieren zunächst ein Sammelgel mit größeren Poren, geringerem Salzgehalt und niedrigerem pH-Wert als das anschließende Trenngel. Im Sammelgel haben die Glycin-Ionen des Laufpuffers eine höhere Mobilität als die mit SDS komplexierten Proteine und bauen einen

Spannungsgradienten im Vorfeld der Proteine auf, was zu einem Sammeleffekt führt. Im Trenngel wandern die Glycinionen hinter den Proteinen, wobei eine Trennung nach dem Molekulargewicht erfolgt.

Lösungen	Sammelgel 3.75 %	Trenngel 7.5 %	Trenngel 12 %
ddH₂O	1.25 ml	2.5 ml	1.75 ml
AMBA	0.25 ml	1.25 ml	2.0 ml
Tris/ HCl	0.5 ml, pH 6.8	1.25 ml, pH 8.8	1.25 ml, pH 8.8
TEMED	5 µl	7 µl	7 µl
APS	12 µl	15 µl	15 µl

Zusammensetzung verschiedener Gele

Nach dem Reinigen und Zusammensetzen der Glasplatten wurden die Komponenten des Trenngels gemischt und bis ca. 4 cm unterhalb des oberen Glasplattenrandes in diese Kammer gegossen. Um eine glatte Grenzfläche zwischen Trenn- und Sammelgel zu erhalten, wurde das Trenngel sofort nach dem Gießen mit wassergesättigtem n-Butanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Butanol dekantiert, das Gel mit H₂O gewaschen, das Sammelgel nach Absaugen letzter Flüssigkeitsreste auf das Trenngel gegossen und sofort ein entsprechender Gelkamm vorsichtig zwischen die Glasplatten geschoben. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Gelkamm entfernt. Die entstandenen Probenaschen wurden mit H₂O ausgespült. Das Gel wurde dann in die Gelelektrophoresekammer eingesetzt und diese mit 1x Laufpuffer aufgefüllt. Die zuvor für 5 Minuten in 1x Laemmli-puffer (gebrauchsfertig durch Zugabe von 50 mM Dithiothreitol) gekochten Proben wurden auf das Gel aufgetragen. Die Proteingemische wurden bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA elektrophoretisch aufgetrennt. Das Molekulargewicht der erhaltenen Proteinbanden wurde durch den parallelen Auftrag eines Molekulargewichtsmarkers ermittelt. Zum Färben der Proteinbanden wurde das Gel für 30 Minuten unter leichtem Schütteln in Gelfärbelösung inkubiert und danach für ca. 2 Stunden mit Gelentfärbelösung entfärbt. Sofern nötig wurde das Gel zur weiteren Aufbewahrung nach zehnmütiger Inkubation in 1 % Glycerin auf Whatman-Papier getrocknet.

3.2.20 Immunoblotanalyse

Mit Hilfe der Immunoblotanalyse läßt sich ein spezifisches Protein aus einem Proteingemisch mit sehr hoher Sensitivität nachweisen. Hierfür wird das aufgetrennte Proteingemisch nach SDS-PAGE (3.2.19) mittels eines elektrischen Feldes auf eine Membran transferiert(3.2.20.1). Dieses wurde einer Immundetektion (3.2.20.2) mit einem gegen das gesuchte Protein gerichteten Antikörper unterzogen.

3.2.20.1 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (Towbin et al., 1979)

<u>Transferpuffer:</u>	3 g/l	Tris
	14.4 g/l	Glycin
	200 ml/l	Methanol
<u>Ponçeau S-Lösung:</u>	1 g/l	Ponçeau S
	5 %	Eisessig

Beim hier eingesetzten Naßblotverfahren wurden das Polyacrylamidgel (3.2.19) und die Protan-Nitrozellulosemembran in eine mit Transferpuffer gefüllte Blotkammer zwischen zwei vertikalen Elektroden eingespannt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei 250 mA für 2 h oder bei 40 mA ÜN. Zur Überprüfung der Transfereffizienz wurde die Membran nach dem Proteintransfer kurz mit Ponçeau S-Lösung (0.1 % w/v) gefärbt und mit ddH₂O entfärbt, um transferierte Proteinbanden zu visualisieren.

3.2.20.2 Immundetektion spezifischer Proteine mittels *Enhanced Chemoluminescence (ECL)*

<u>10x TBS-Puffer:</u>	0.2 M	Tris/HCl, pH 7.4
	1.4 M	NaCl
<u>Puffer A:</u>	5 %	Ziegenserum
	5 %	Trockenmilchpulver
	1x	TBS, pH 7.4
	0.1 %	Tween 20
<u>Puffer B:</u>	1x	TBS, pH 7.4
	0.1 %	Tween 20
<u>Puffer C:</u>	1x	TBS, pH 7.4

Zur Immundetektion eines Proteines wird ein primärer Antikörper eingesetzt, der spezifisch an ein Epitop des gesuchten Proteins bindet. Die spezifische Bindung eines weiteren Antikörpers an den ersten erlaubt über die Kopplung von Meerrettich-Peroxidase in einer Chemolumineszenz-Reaktion die Detektion der gesuchten Proteinbande. Die wesentlichen Komponenten der ECL-Reagenzien sind Luminol und H₂O₂. Die Peroxidase reduziert Wasserstoffperoxid, wodurch der entstehende Sauerstoff Luminol unter Abspaltung von Stickstoff oxidiert. Dabei emittiert Luminol am Ort der Antikörperbindung Blaulicht. Die Chemolumineszenz wird durch geeignete *enhancer* verstärkt und kann durch Exposition auf einem speziellen Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

Zum Blockieren von unspezifischen Antikörper-Bindungsstellen wurde die Membran für 30 Minuten unter leichtem Schütteln in Puffer A inkubiert. Nach Zugabe des primären Antikörpers und einstündiger Inkubation, wurde die Membran fünfmal für fünf Minuten mit Puffer A gewaschen. Die Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper erfolgte ebenfalls in Puffer A für eine Stunde. Die Membran wurde anschließend viermal mit Puffer A, einmal mit Puffer B und zuletzt einmal mit Puffer C für jeweils fünf Minuten gewaschen. Die Membran wurde dann auf eine Glasplatte gelegt und mit einem entsprechenden Volumen ECL-Reagens (ca. 1-2 ml) für eine Minute inkubiert. Durch Schräghalten der Glasplatte wurde das überschüssige ECL-Reagens entfernt. Danach wurde eine trockene Transparenzfolie auf die Membran aufgelegt. Die Exposition der Chemolumineszenz auf einem Röntgenfilm erfolgte je nach Intensität der Banden und der Antikörpersensitivität für 5 Sekunden bis 30 Minuten in einer Dunkelkammer.

3.2.21 Herstellung und Reinigung von Antiseren

3.2.21.1 Immunisierung von Kaninchen

Zur Herstellung von rekombinanten CAPS1-Fusionsproteinen wurden CAPS1-cDNA-Fragmente aus Ratte (Sequenzen: 714–1231 bp und 2936–3931 bp) per PCR (3.2.10) amplifiziert (mit den Oligonukleotidpaaren: 1306/1308 und 1305/1307), in den Expressionsvektor pGEX-KG subkloniert und exprimiert (3.2.15). Diese Sequenzen repräsentieren kodierende Bereiche der CAPS1-cDNA, welche das in den

entsprechenden Deletionsmutanten eliminierte Exon 5' bzw. 3' flankieren. Außerdem wurde zur Herstellung von rekombinantem CAPS2-Fusionsprotein ein CAPS2-cDNA-Fragment aus Maus (Sequenz: 312–776 bp) per PCR amplifiziert (mit dem Oligonukleotidpaar: 2148/2149), in den Expressionsvektor pGEX-KG subkloniert und exprimiert (3.2.15).

Jeweils zwei *Chinchilla*-Kaninchen wurden mit einem CAPS-GST-Fusionsprotein immunisiert. Vor der Immunisierung wurde den Tieren 5 ml Präimmenserum entnommen, welches in späteren Experimenten als Negativkontrolle verwendet werden konnte. Für die Erstimmunisierung wurden 250 µg eines Proteinfragments mit dem gleichen Volumen an komplettem Freund'schen Adjuvans gemischt und zu einer Emulsion homogenisiert, welche dem Kaninchen subcutan injiziert wurde. Jede weitere Immunisierung wurde mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans durchgeführt. Dem Kaninchen wurde eine Zweitimmunisierung im Abstand von 2 Wochen und eine Drittimmunisierung im Abstand von 3 Wochen subcutan injiziert. 8 Tage nach der Drittimmunisierung wurden 15 ml Vollblut abgenommen und das Serum durch Koagulation bei RT und Zentrifugation bei 1000x g für 10 Minuten und 4°C gewonnen.

Die Antiseren wurden mittels Immunoblotanalyse (3.2.20) auf ihre Sensivität und Spezifität getestet und im folgenden als Antiserum α CAPS1 (AS 4111) bzw. α CAPS2 (AS 36) bezeichnet.

3.2.21.2 Affinitätsreinigung von Antiseren mittels PVDF-Membran

Für die Affinitätsreinigung des α CAPS-Antiserums wurden 250 µg des zur Immunisierung verwendeten CAPS-GST-Fusionsproteins (3.2.21.1) mittels einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (3.2.19), anschließend auf eine PVDF-Membran im Naßblotverfahren transferiert (3.2.20.1) und mit Ponceau S (0.1 % w/v) angefärbt. Die zum Fusionsprotein korrespondierende Bande wurde ausgeschnitten und in etwa 1 cm lange Blotstreifen geteilt. Diese Stücke wurden als Matrix für die Antikörperaufreinigung verwendet. Mit PBS wurde das Ponceau S anschließend von den Blotstreifen heruntergewaschen, bevor die Blotstreifen mit 6 ml des Antiserums (1:5 in PBS verdünnt) bei RT für 2 h auf dem Drehrad inkubiert wurden. Der Überstand wurde aufbewahrt. Die Blotstreifen wurden viermal mit PBS für 5 min

gewaschen, bevor der Antikörper mit 2 ml 50 mM Glycin/HCl, pH 2.5 bei RT für 10 min eluiert wurde. Zur Neutralisation wurde das resultierende Eluat mit 0.2 ml 1 M Tris, pH 8.0 versetzt. Die Blotstreifen wurden in 4 weiteren Zyklen mit dem α CAPS-Antiserum inkubiert und die Eluate am Ende vereinigt. Mit Hilfe einer Centricon 30-Säule wurde das Eluat nach Herstellerangaben (Amicon, Witten) auf 1–2 ml aufkonzentriert und zur Stabilisierung der Antikörper mit RSA in einer Endkonzentration von 1 mg/ml versetzt.

Das affinitätsgereinigte Antiserum wurde mittels Immunoblotanalyse (3.2.20) ebenfalls auf seine Sensivität und Spezifität getestet und anschließend für immunhistochemische und elektronenmikroskopische Experimente verwendet.

3.2.21.3 Präabsorption von affinitätsgereinigtem Antiserum

Das präabsorbierte affinitätsgereinigte Antiserum α CAPS1 wurde als Negativkontrolle in der Immunhistologie verwendet.

Zu seiner Erzeugung wurden 100 μ l des affinitätsgereinigten Antiserums α CAPS1 mit 125 μ l (2 mg/ml) des zur Immunisierung verwendeten rekombinanten CAPS1-GST-Fusionsproteins (3.2.21.1) und 275 μ l PBS/5 % Ziegen Serum bei 4°C für 2 h auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 300 μ l einer Glutathion-Kügelchen-Suspension versetzt und bei 4°C für weitere 2 h auf dem Drehrad inkubiert. Der Überstand wurde nach einer Zentrifugation von 2800x g für 5 min abgenommen. Das nun etwa 1:6 verdünnte präabsorbierte, affinitätsgereinigte Antiserum wurde mittels Immunoblotanalyse (3.2.20) auf seine Sensivität und Spezifität getestet.

3.2.22 Isolierung eines Genfragments aus einer genomischen Maus-DNA-Bibliothek

<u>Denaturierungspuffer:</u>	1.5 M	NaCl
	0.5 M	NaOH
<u>SM-Puffer</u>	100 mM	NaCl
<u>(Salt-Magnesium):</u>	80 mM	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	50 mM	Tris/HCl, pH 7.5
<u>20x SSC</u>	3 M	NaCl
<u>(Salt-Sodium Citrate):</u>	0.3 M	Na ₃ -Zitrat, pH 7.4 mit 10 M NaOH
<u>20x SSPE</u>	3 M	NaCl
<u>(Salt-Sodium Phosphate- EDTA):</u>	155 mM	NaH ₂ PO ₄
	20 mM	EDTA pH 7.4 mit 10 M NaOH
<u>Top-Agarose:</u>	0.8%	Agarose in LB-Medium
<u>Neutralisierungspuffer:</u>	1.5 M	NaCl
	1 M	Tris/HCl, pH 7.4
	1 mM	EDTA

Mit dieser Methode wurden aus einer λ -Phagenbibliothek λ -Phagen isoliert, die ein *insert* komplementär zu einer CAPS1-cDNA-Sonde enthielten.

Zunächst wurden Wirtszellen (XL1-Blue MRF (P2)) in Kultur angereichert. Dazu wurden die Bakterien in 50 ml LB-Medium, dem 0.2 % Maltose und 10 mM MgSO₄ zugefügt wurden, bei 37°C ÜN kultiviert. Die Zellen wurden bei 2500x g für 10 min abzentrifugiert, anschließend in SM-Puffer aufgenommen und auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt.

Zur Bestimmung des λ -Phagentiters der genomischen λ -Phagenbibliothek wurde zunächst eine Verdünnungsreihe der λ -Phagen in SM-Puffer angesetzt. Aliquots der verdünnten Proben wurden zur Infektion von 400 μ l XL1 Blue MRA (P2) verwendet, bei 37°C für 20 min inkubiert, in 8 ml Top-Agar auf LB-Platten ausgebracht und bei 37°C ÜN inkubiert. Anhand der Titerbestimmung wurde eine λ -Phagenmenge zur Infektion von XL1 Blue MRA (P2) genutzt, die etwa 50.000 Plaques/Platte (\varnothing 15 cm) bildete.

Zwanzig solcher Platten mit insgesamt 10^6 Plaques wurden hergestellt. Zur Herstellung von Filterreplika wurden Hybon-N⁺-Nylonmembranen auf die Platten gelegt und jeweils die Orientierung der Membranen mit einer sterilen Kanüle markiert. Um später eine sichere Identifizierung positiver λ -Phagen-Klone zu gewährleisten, wurde ein doppelter Satz an Filterreplika hergestellt. Die Nylonmembranen mit der darauf haftenden λ -Phagen-DNA wurde auf Whatman-Papier gelegt, welches mit Denaturierungspuffer getränkt war. Nach 5 min wurden die Membranen im Neutralisierungspuffer für 10 min inkubiert. Dann wurden sie in einem Puffer mit 0.2 M Tris/HCl, pH 7.5, 2x SSC für 10 min inkubiert und anschließend die λ -Phagen-DNA mittels UV-Crosslinking (1 J/cm^2) fixiert. Zur Identifizierung von λ -Phagen mit dem CAPS-Gen als genomisches *insert*, wurde eine radioaktive cDNA-Sonde mit [³²P]dCTP wie beschrieben (3.2.13.2) hergestellt. Die cDNA-Sonde, welche für das *screening* der genomischen Maus-Bibliothek verwendet wurde, umfaßte die Sequenz 963–1518 bp der CAPS1-cDNA (PCR-Produkt des Oligonukleotidpaares: 1051/1052). Diese Sonde wurde für die Hybridisierung und Analyse der Filterreplika wie beschrieben (3.2.13.3) verwendet.

Zur Isolierung von Einzelplaques wurden die Filme auf der markierten Agar-Platte orientiert. Mit dem weiten Ende einer Pasteurpipette wurden positive λ -Phagenklone isoliert, in 1 ml SM-Puffer, 20 μ l Chloroform aufgenommen und für 4-12 h eluiert.

Anschließend wurde eine λ -Phagentiterbestimmung des Eluats durchgeführt, um eine Infektionsrate zu ermitteln, welche die Identifikation von Einzelplaques im *secondary screening* ermöglichen würde. Von der gewählten Infektionsrate wurden mit positiven λ -Phagenklonen wieder Platten hergestellt, die wie unter 3.2.13.2 und 3.2.13.3 beschrieben mittels der cDNA-Sonde auf hybridisierende λ -Phagen-DNA analysiert wurden. Diesmal wurden mit dem engen Ende einer Pasteurpipette individuelle, positive λ -Phagen-Plaques isoliert und in 200 μ l SM -Puffer, 20 μ l Chloroform bei 4°C ÜN eluiert.

Zur λ -Phagenamplifikation wurden die positiven λ -Phagen-Eluate mit 150 μ l Bakterien bei 37°C für 20 min inkubiert, auf eine LB-Platte ausplattiert und bis zu konfluenter Lyse bei 37°C inkubiert. Die angereicherten λ -Phagen wurden mit 4 ml SM-Puffer bei Raumtemperatur über Nacht eluiert. Zur Präparation von λ -Phagen-DNA (Makrolysate) mit dem gewünschten *insert*, wurden Bakterien mit 20, 50 und

100 µl λ-Phagenlysat infiziert. Die infizierten Bakterien wurden in 50 ml LB-Medium bei 37°C ÜN angereichert. Zum Inkubationsansatz wurden dann 750 µl Chloroform gegeben und der Ansatz wurde bei 37°C für 30 min inkubiert. Zelldebris und nicht lysierte Bakterien wurden durch Zentrifugation (bei 2500x g, für 10 min) entfernt und der Überstand wurde mit 2-5 ml 1 M Tris/HCl, pH 7.4, 0.5 ml MgSO₄ sowie 1.6 ml DNase (1mg/ml) versetzt. Nach Inkubation bei RT für 30 min wurden 10 ml 5 M NaCl und 11 g PEG 6000 zugegeben und es wurde für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Die λ-Phagen wurden durch Zentrifugation bei 12000x g für 10 min und 4°C gewonnen und in 600 µl TM-Puffer resuspendiert. Der Ansatz wurde zweimal mit 600 µl Chloroform extrahiert, um kontaminierendes PEG zu entfernen. Nach Zugabe von 30 µl 500 mM EDTA und 60 µl 5 M NaCl wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion (3.2.5.3) durchgeführt, um λ-Phagenproteine zu entfernen. Anschließend wurde die λ-Phagen-DNA nach Zugabe von 1.75 ml Ethanol für 15 min auf Trockeneis präzipitiert, bei 15000x g für 5 min pelletiert, mit 300 µl 80% Ethanol gewaschen und in 50 µl ddH₂O gelöst.

Zur Analyse der isolierten genomischen λ-Klone auf ein CAPS1-*insert* wurden von 100 ng der λ-Phagen-DNA ein Restriktionsverdau wie unter 3.2.7 beschrieben durchgeführt. Die DNA-Fragmente wurden dann elektrophoretisch aufgetrennt (3.2.11) und wie unter 3.2.13 beschrieben mit der CAPS1-cDNA-Sonde auf Anwesenheit eines genomischen CAPS1-*inserts* überprüft.

3.2.23 Erzeugung rekombinanter embryonaler Mausstammzellen zur Etablierung von deletionsmutanten Mäusen (Willnow und Herz, 1994)

3.2.23.1 Kultivierung von MEF-Zellen

<u>DMEM-Medium:</u>	10 g/l 2.2 g/l	DMEM-Pulver Natriumbicarbonat und sterilfiltrieren
<u>MEF-Zellmedium:</u> (DMEM-Medium mit den Zusätzen)	10 % 1x 0.91 % 1x 1260 U/ml	fötales Kälberserum MEM Non Essential Amino Acids 2-Mercaptoethanol Penicillin/Streptomycin ESGRO-LIF

Bei der Kultivierung von ES-Zellen ist es von Bedeutung, daß die Stammzellen ihre Omnipotenz behalten und in keiner Weise differenzieren. Aus diesem Grund wurden die Stammzellen in Gegenwart von MEF-Zellen kultiviert, welche zu optimalen Kulturbedingungen beitragen.

Bei der Kultivierung der MEF-Zellen zur späteren Verwendung als ES-Zellsubstrat, wurden die Kulturgefäße mit 0.1 % Gelatine in D-PBS beschichtet. Dazu wurde die Gelatine-Lösung für 1 Stunde bei RT in den Gefäßen stehengelassen und dann abgesaugt. Zur Inkulturnahme der MEF-Zellen wurde ein Aliquot von 1 ml eingefrorener Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad schnell aufgetaut und in 10 ml MEF-Zellmedium auf eine Zellkulturflasche (75 cm²) ausgesät. Konfluent gewachsene MEF-Zellen wurden 1:3 passagiert. Hierzu wurde das MEF-Zellmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit 10 ml D-PBS gewaschen. Zum Ablösen wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung behandelt (5 min, 37°C). Anschließend wurden die Zellen in 10 ml MEF-Zellmedium aufgenommen, abzentrifugiert (5 min bei 500x g), in 3 ml MEF-Zellmedium resuspendiert und auf die dreifache Ausgangsfläche verteilt. Nachdem die MEF-Zellen eine 70 %ige Konfluenz erreicht hatten, wurden weitere Zellteilungen durch Inkubation mit Mitomycin C blockiert. Hierfür wurde Mitomycin C in einer Konzentration von 10 µg/ml zum MEF-Zellmedium gegeben. Nach einer zweistündigen Inkubation wurden die Zellen zur Entfernung des Mitosegiftes viermal mit D-PBS gewaschen und in MEF-Zellmedium weiterkultiviert.

3.2.23.2 Kultivierung von ES-Zellen

Die Inkulturnahme der embryonalen Stammzellen erfolgte wie für MEF-Zellen beschrieben (3.2.23.1). Zur Vermehrung der Zellpopulation wurden die Stammzellen in Zellkulturflaschen kultiviert. Während der Selektion auf rekombinante Zellen erfolgte die Kultivierung in 10 cm-Rundschalen. Die gepickten einzelnen Zellklone wurden zunächst in 96-Lochplatten kultiviert, anschließend zur Expansion positiver Einzelklone in 24- und 12-Lochplatten. Während der Kultivierung der ES-Zellen erfolgte ein Mediumwechsel, sobald sich die Mediumfarbe ins Gelbliche veränderte. Ab einer Konfluenz von 80 % wurden die ES-Zellen 1:3 passagiert. Das Passagieren erfolgte wie für MEF-Zellen beschrieben (3.2.23.1), jedoch wurde die

Trypsinbehandlung auf 10 min verlängert. Ferner wurden die ES-Zellen kräftig trituriert, um eine gute Vereinzlung der Zellen zu gewährleisten.

3.2.23.3 Vorbereitung des Rekombinationsvektors für die Transfektion

400 µg des mit dem Restriktionsenzym Not I linearisierten Rekombinationsvektors wurde zweimal mit Phenol/Chloroform (1:1 Gemisch) und zweimal mit Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt (3.2.5.3). Das DNA-Sediment wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und unter der Sterilbank nach dem Trocknen in 1 ml sterilem D-PBS gelöst.

3.2.23.4 Transfektion der ES-Zellen mittels Elektroporation

Für die Elektroporation wurde eine Kulturflasche (25 cm²) mit zu 80 % konfluenten ES-Zellen vorbereitet. Die Zellen wurden zweimal mit D-PBS gewaschen, trypsiniert, gut trituriert, nach dem Abzentrifugieren noch zweimal mit D-PBS gewaschen und schließlich in 0.8 ml D-PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 1 ml DNA vermischt und zu je 0.8 ml auf zwei Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand: 0.4 cm) verteilt. Diese wurden 5 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 500 µF und 23 V. Die transfizierten Zellen wurden auf zwei Rundschalen (Ø 10cm) verteilt weiterkultiviert.

3.2.23.5 Selektion rekombinanter ES-Zellen

<u>Selektionsmedium:</u>	190 mg/ml	aktives Neomycin
in MEF-Zellmedium	(+ 2 mM)	Gancyclovir

Das MEF-Zellmedium wurde am nächsten Morgen gewechselt und am Abend desselben Tages gegen Selektionsmedium ausgetauscht. Die Neomycin-Selektion, welche nur das Anwachsen von rekombinanten ES-Zellen erlaubte, erfolgte über neun Tage. Die negative Selektion erfolgte durch Verabreichung von Gancyclovir, mit dessen Hilfe ES-Zellklone, welche den Rekombinationsvektor zufällig integriert hatten und intakte Thymidinkinase-Promotoren enthielten, getötet wurden. Gancyclovir wurde vom dritten bis fünften Tag der Selektion in der angegebenen Konzentration zugegeben.

3.2.23.6 Isolierung und Expansion resistenter ES-Zellklone

Am 10. Tag nach der Elektroporation erfolgte die Vereinzelung der Stammzellklone. Dazu wurde eine 96-Lochplatte mit jeweils 50 µl Trypsin vorbereitet. Die ES-Zellen wurden einmal mit D-PBS gewaschen und mit 10 ml DMEM/25mM HEPES bedeckt. Unter dem Binokular wurden einzelne ES-Zellklone mittels ausgezogener, steriler Pasteurpipetten aufgenommen und in die Trypsin-Lösung transferiert. Nach jedem ES-Zellklon wurde die Pipette zweimal mit D-PBS gespült. Die ES-Zellklone wurden für 15 min bei 37°C in der Trypsin-Lösung inkubiert. Nach Zugabe von jeweils 100 µl MEF-Zellmedium pro Loch wurden die ES-Zellklone gut trituriert und auf eine mit MEF-Zellen vorbereitete 96-Lochplatte transferiert. Nach etwa drei Tagen waren die ES-Zellklone so weit gewachsen, daß sie passagiert werden konnten. Zunächst wurden die Zellen zweimal mit D-PBS gewaschen, dann 10 min mit 50 µl pro Loch Trypsin-Lösung behandelt, nach Zugabe von 150 µl/Loch MEF-Zellmedium gut trituriert und zu jeweils 100 µl pro Loch auf zwei 96-Lochplatten verteilt. Eine der 96-Lochplatten wurde für die Analyse auf homologe Rekombination verwendet (3.2.23.8). In diesem Fall war es nicht erforderlich, daß die Zellen auf MEF-Zellen kultiviert wurden. Diese Platte wurde folglich nur mit Gelatine beschichtet. Die zweite 96-Lochplatte diente der Erhaltung der ES-Zellklone. Nach der Identifizierung positiv rekombinierter ES-Zellklone wurde auf diese Platte zurückgegriffen, und die betreffenden ES-Zellklone wurden in größeren Kulturschalen expandiert.

3.2.23.7 Lagerung von ES-Zellen

<u>2x Einfriermedium:</u>	20 %	DMSO
	20 %	fötale Kälberserum
	60 %	MEF-Zellmedium

Die ES-Zellklone wurden in den 96-Lochplatten bis zur nahezu 100 %igen Konfluenz kultiviert. Vier Stunden vor dem Einfrieren wurde das MEF-Zellmedium gewechselt. Danach wurden die Zellen zweimal mit D-PBS gewaschen, 10 min bei 37°C mit jeweils 50 µl Trypsin-Lösung inkubiert und nach der Zugabe von 50 µl MEF-Zellmedium trituriert. Anschließend wurden die Zellen für 10 min auf 4°C abgekühlt. Zum Medium wurden jeweils 100 µl eiskaltes 2x Einfriermedium gegeben, vorsichtig durchmischt und mit 70 µl/Loch Mineralöl überschichtet. Die

Zellkulturplatte wurde in einer Styroporbox bei -80°C für zwei Tage gelagert und anschließend in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

3.2.23.8 Analyse von ES-Zellen nach homologer Rekombination

<u>Lysispuffer:</u>	10 mM	Tris/HCl, pH 7.5
	10 mM	EDTA
	10 mM	NaCl
	0.5 %	N-Laurylsarcosin,
	1 mg/ml	Proteinase K
<u>Fällungslösung:</u>	75 mM	NaCl in 100 % Ethanol
<u>Reaktionsmix:</u>	1x	enzymspezifischer Restriktionspuffer
	0.1 mg/ml	Rinderserumalbumin,
	375 U/ml	Restriktionsenzym

Die konfluenten ES-Zellklone wurden zweimal mit D-PBS gewaschen und in jeweils 50 µl Lysispuffer bei 60°C ÜN in einer Feuchtkammer aufgeschlossen. Die lysierten Zellen wurden mit 100 µl kalter Fällungslösung (-20°C) versetzt. Zur Präzipitation der genomischen DNA wurden die Proben 30 min bei RT stehengelassen. Der Überstand wurde dekantiert und die DNA dreimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Zur Analyse der ES-Zellklone auf homologe Rekombination wurde ihre DNA einer Restriktionsanalyse wie unter 3.2.7 beschrieben unterzogen. Die DNA-Fragmente wurden dann elektrophoretisch aufgetrennt (3.2.11) und wie unter 3.2.13 beschrieben mit der CAPS1-cDNA-Sonde analysiert.

3.2.23.9 Blastozysteninjektion und Zucht rekombinanter Mäuse

Die Blastozysteninjektionen sowie die Zucht und Pflege rekombinanter Tiere, wurden von den Mitarbeitern des Tierhauses des MPI für experimentelle Medizin, Göttingen, unter der tierärztlichen Leitung von Herrn Dr. Hermann Riedesel, vorgenommen.

Die Verpaarung chimärer Männchen sowie weitere Rückkreuzungen erfolgten mit *C57Bl6/J*-Mäusen. In allen Experimenten wurden Geschwistertiere verschiedenen Genotyps aus demselben Wurf paarweise verglichen.

3.2.24 Quantitative Immunoblotanalyse

3.2.24.1 Immundetektion spezifischer Proteine mittels [¹²⁵I]-konjugierter Sekundärantikörper

Zur quantitativen Immundetektion eines Proteines wurde die Nitrozellulosemembran wie unter 3.2.20.2 beschrieben mit einem Primärantikörper inkubiert. Handelte es sich bei dem primären Antikörper um einen Mausantikörper, wurde eine einstündige Inkubation mit einem Kaninchen-Anti-Maus-Brückenantikörper durchgeführt. Dieser Antikörper wurde in Puffer A 1:1000 verdünnt. Die Membran wurde wie zuvor gewaschen und dann mit dem [¹²⁵I]-konjugierten Anti-Kaninchenantikörper in Puffer A für 1–2 h inkubiert. Dieser Sekundärantikörper wurde in einer Endkonzentration von 10⁶ cpm/ml eingesetzt. Die Membran wurde dreimal mit Puffer A für jeweils 15 min und dann ÜN mit 1x TBS, 0.1 % TWEEN 20 gewaschen. In Folie eingeschweißt, erfolgte eine Exposition der Membran auf einer Detektionsplatte des Phosphoimagers.

3.2.24.2 Quantifizierung von Proteinbanden

Um radioaktiv detektierte Proteinbanden im Immunoblot zu quantifizieren, wurden die Experimente wie unter 3.2.24.1 beschrieben durchgeführt und die Intensität anschließend mittels des Phosphoimagers ausgewertet. Auf einer Detektionsplatte wurde jeweils Gehirn- oder Nebennierenhomogenate von Geschwistertieren unterschiedlichen Genotyps (+/+, +/-, -/-) hinsichtlich des Expressionsgehalts verschiedener synaptischer Proteine verglichen. Ziel war es, Veränderungen des Proteingehalts dieser Markerproteine in Abhängigkeit des Genotyps zu dokumentieren. Dazu wurde die Intensität der Proteinbanden auf der Detektionsplatte mit Hilfe des Programms MacBas V2.31 auf dem Phosphoimager quantifiziert. Als interner Standard wurde für jede Membran das postsynaptische Protein Neuroligin1 herangezogen. Die im Verhältnis zu diesem Referenzprotein ermittelten Werte wurden in Prozent der Wildtypkontrolle ausgedrückt. Es wurden jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 bis 5 Messungen pro Genotyp berechnet.

Für Fälle, in denen die radioaktive Detektionsmethode für die Proteinquantifizierung nicht sensitiv genug war, wurden alternativ dazu Proteinbanden in der Immunoblot-

Analyse adulter und embryonaler Nebennieren mittels ECL-Methode (3.2.20.2) visualisiert. Ihre Intensität wurde anschließend im Durchlichtscanner mit Hilfe des Programms Agfa Foto Look 3.00.07 ausgewertet. Es wurden jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

3.2.25 *In situ*-Hybridisierung

Zur Lokalisationsanalyse von mRNA im zytologischen Präparat werden markierte komplementäre Nukleinsäuren eingesetzt. Diese identifizieren spezifisch durch *in situ*-Hybridisierung die zelluläre Verteilung des entsprechenden Transkripts.

3.2.25.1 Bereitstellung von Gehirn- und Nebennierenschnitten

Mäuse unterschiedlichen Alters und Genotyps aus unter den 3.2.23.9 beschriebenen Verpaarungen wurden mit Diethlyether betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Die Gehirne und Nebennieren wurden entnommen und in Isopentan auf flüssigem Stickstoff schockgefroren. Es wurden am Kryostat 12 µm dicke sagittale Schnitte erzeugt und auf mit Silane beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Schnitte trockneten bei RT für 1 h bevor sie für 5 min in 4 % Paraformaldehyd (in PBS) fixiert wurden. Nach zweimaligem, fünfminütigen Waschen in PBS wurden die Schnitte mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 70 %, 90 % und 100 % Ethanol) dehydriert und bis zur Hybridisierung in 100 % Ethanol bei 4°C aufbewahrt.

3.2.25.2 Auswahl von Oligonukleotiden

Für jedes zu analysierende Transkript wurden zwei verschiedene isoformspezifische *antisense*-Oligonukleotide mit Hilfe des Programms Oligo 5.0 (NBI, Plymouth, USA) ausgewählt. Der GC-Gehalt dieser *antisense*-Oligonukleotide betrug 50–60 %. Die Spezifität wurde durch vergleichende Datenbankanalysen verifiziert. Außerdem wurde darauf geachtet, daß die Wahrscheinlichkeit der Bildung von *hairpins* bzw. der Dimerisierung gering war.

CAPS 1		CAPS 2	
GenBank™ / EBI-Datenbank (U16802)		im Labor kloniert	
Oligonukleotid 1	Oligonukleotid 2	Oligonukleotid 1	Oligonukleotid 2
1818	1820	1819	1821

3.2.25.3 Terminale Markierung von Oligonukleotiden

<u>TNES-Puffer:</u>	140 mM	Na Cl
	20 mM	Tris/HCl, pH 7.5
	5 mM	EDTA
	0.1 %	SDS
		in DEPC-H ₂ O

Die radioaktive Markierung der Oligonukleotide für die *in situ*-Hybridisierung erfolgte mit Hilfe der terminalen Transferase, welche die Addition von [³⁵S]dATP katalysiert. Es wurde folgende Reaktion durchgeführt:

1x	TdT Puffer
0.6 mM	Kobaltchlorid
0.15 ng/ml	Oligonukleotid
0.02 U/μl	terminale Transferase
6x10 ⁶ cpm	[³⁵ S]dATP
ad 20 μl	DEPC-H ₂ O

Das Reaktionsgemisch wurde bei 37°C für 8 min inkubiert. Durch Zugabe von 30 μl TNES-Puffer wurde die Reaktion gestoppt. Nach der Reinigung des Ansatzes über eine Bio-Spin-Chromatographiesäule wurde 1 μl der Probe entnommen, um im Szintillationsmeßgerät die Einbaurate zu überprüfen. Bei einer Messung von mehr als 100.000 cpm/μl wurde die Sonde für die *in situ*-Hybridisierung verwendet.

3.2.25.4 *In situ*-Hybridisierung von Gehirn- und Nebennierenschnitten

<u>Hybridisierungspuffer:</u>	50 %	Formamid (entionisiert)
	4 %	Dextransulfat
	300 mM	NaCl
	30 mM	Tris/HCl, pH 7.4
	4 mM	EDTA
	1x	Denhardts-Lösung, RNasefrei
	0.5 mg/ml	Polyadenylsäure
	0.5 μg/ml	Lachsspermien-DNA

Die radioaktive Markierung der Oligonukleotide erfolgte wie unter 3.2.25.3 beschrieben. Pro Schnitt wurde das Äquivalent von 400.000 cpm in 110 µl Hybridisierungspuffer, welcher mit 45 mM Dithiotreitol versetzt worden war, eingesetzt. In Kontrollexperimenten erfolgte die Hybridisierung der radioaktiv markierten Oligonukleotide in Anwesenheit eines 1.000fachen Überschusses an unmarkiertem Oligonukleotid. Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C für 16 Stunden in einer Feuchtkammer. Nach der Hybridisierung wurde wie folgt gewaschen:

1x SSC, 0.1 % 2-Mercaptoethanol	RT	2x 20 min
1x SSC, 0.1 % 2-Mercaptoethanol	57°C	45 min
1x SSC	RT	5 min
0.1x SSC	RT	2 min

Vor der Exposition wurden die Schnitte mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Die Exposition der Hirnschnitte auf einem Röntgenfilm (BioMAX) erfolgte über 2 Wochen.

3.2.25.5 Entwicklung von *in situ*-Präparaten

Zur Auflösung des radioaktiven Hybridisierungssignals auf zellulärer Ebene wurden die Nebennierenschnitte der *in situ*-Hybridisierung zunächst dehydriert und dann in Silver Grain-Emulsion getaucht. Die mit Fotoemulsion beschichteten Objektträger wurden nach dreimonatiger Lagerung bei 4°C entwickelt. Dazu wurden die Schnitte für 3.5 min in den Entwickler getaucht, welcher auf eine Temperatur von 15°C abgekühlt wurde, anschließend kurz in Wasser gehalten und dann für zweimal 5 min in Fixierer inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte für 15 min unter fließendem Wasser gewaschen. Zur Betrachtung der Präparate im Hellfeldmikroskop wurden die Schnitte mit Kresylviolett wie unter 3.2.26.1 beschrieben angefärbt und mit einem Deckglas bedeckt. Die Aufnahmen der entwickelten *in situ*-Präparate erfolgte im Dunkelfeld unter dem Mikroskop. Dazu wurde der Film ILFORD FP4 125 (Ilford, England) verwendet.

3.2.26 Morphologische Methoden

3.2.26.1 Lichtmikroskopische Untersuchungen an Gehirn und Nebenniere mittels Nissl-Färbung

Färbelösung: 0.1 % Kresylviolett in 0.2 M Natriumazetatpuffer, pH 4.5

Die Gehirne und Nebennieren neugeborener Mäuse wurden aufgrund der geringen Größe mit 4 % Paraformaldehyd für 2 h bei 4°C immersionsfixiert. Die Gehirne wurden dann in 20 % Saccharose/4 % Paraformaldehyd bei 4°C ÜN gelagert, um Gefrierschäden zu verhindern. Nachfolgend wurden sie in Einbettmedium für Gefrierschnitte auf festem Kohlendioxid eingefroren und bei -80°C gelagert. Am Kryostat wurden 8 µm dicke sagittale Gefrierschnitte angefertigt. Diese wurden zur Entfernung der Lipide zweimal für 5 min in Xylol getaucht. In einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 95 %, 70 %, 50 % Ethanol) wurden die Schnitte dann hydriert und anschließend für 5 min in ddH₂O inkubiert. Die Färbung mit Kresyviolett erfolgte für unterschiedliche lange Zeiten, um verschiedene Farbintensitäten zu erzielen. Anschließend wurden die gefärbten Schnitte kurz in ddH₂O abgespült und der Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe unterworfen. Die Schnitte wurden zweimal für 5 min in Xylol inkubiert und anschließend mit einem Deckglas bedeckt.

3.2.26.2 Immunhistologische Untersuchungen an Gehirn mittels Immunfluoreszenzfärbung

<u>Tribromethanol:</u>	32 mg/ml 8 %	Tribromethanol Ethanol in 0.9 % NaCl-Lösung
<u>Phosphatpuffer:</u>	19 mM 81 mM	NaH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ , pH 7.4
<u>Heparinisierte physiologische Kochsalzlösung:</u>	0.9 % 0.05 %	NaCl Na-Heparin
<u>Fixierlösung:</u>	4 % 2 NaOH- Pellets	p-Formaldehyd in Phosphatpuffer lösen, pH 7.4

<u>10x TBS:</u> (Tris Buffered Saline)	0.5 M 1.5 M	Tris/HCl, pH 7.4 NaCl
<u>Blocklösung:</u>	10 %	Ziegenerum in Phosphatpuffer, pH 7.4
<u>Anti-Gefrierlösung:</u>	50 % 30 % 20 %	0.05 M Phosphatpuffer Ethylenglycol Glycerol
<u>0.1 % NPG:</u>	0.1 % 60 %	N-Propylgallat Glyzerin in PBS

Adulte Mäuse (30 g) wurden durch intraperitoneale Injektion von Tribromethanol-Lösung betäubt. Anschließend wurde das Herz freipräpariert, die Injektionskanüle in die linke Herzkammer gesetzt und ein Entlastungsschnitt am rechten Vorhof gesetzt. Das Tier wurde dann mit etwa 10 ml heparinierter physiologischer Kochsalzlösung intracardial perfundiert. Anschließend wurde mit etwa 50 ml Fixierlösung bei einer Flußrate von 20 ml/min perfundiert. Die Gehirne wurden entnommen und zur Post-Fixierung in der Fixierlösung bei 4°C für eine Stunde inkubiert. Die Gehirne wurden, um Gefrierschäden zu vermeiden, in 20 % Sucrose bei 4°C ÜN inkubiert und auf Trockeneis gefroren. Am Kryotom wurden 30 µm dicke sagittale Gehirnschnitte angefertigt und bis zur weiteren Verwendung in Anti-Gefrierlösung bei -20°C gelagert.

Die Anti-Gefrierlösung wurde vor der weiteren Verwendung der Schnitte mittels Phosphatpuffer dreimal für 10 Minuten abgewaschen. Die Schnitte wurden dann bei RT für 1 h in Blocklösung auf einem Schüttler vorinkubiert. Die primären Antikörper wurden in einer geeigneten Verdünnung mit der Blocklösung verwendet.. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte in Blocklösung bei 4°C ÜN. Anschließend wurden die Schnitte viermal für 10 min in der Blocklösung gewaschen.

Als Sekundärantikörper wurde ein fluoreszenzmarkierter Ziege-Anti-Kaninchen Antikörper in einer geeigneten Verdünnung mit der Blocklösung verwendet. Die Inkubation des Sekundärantikörper erfolgte bei RT für 1 h. Anschließend wurden die Schnitte viermal für 10 min in Phosphatpuffer gewaschen. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und mit 0.1 % NPG unter einem Deckglas bedeckt. Zur Fotodokumentation wurde der Film Elite Chrome 160 T (Kodak Integra Biosciences GmbH, Fernwald) verwendet.

3.2.26.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Gehirn mittels silberintensivierter 3,3'-Diaminbenzidin-Färbung

<u>Osmium:</u>	0.5 %	in Phosphatpuffer, pH 7.4
<u>Glutaraldehyd:</u>	2 %	in Phosphatpuffer, pH 7.4
<u>10 x TBS:</u>	0.5 M	Tris/ HCl, pH 7.4
	1.5 M	NaCl
<u>Blocklösung:</u>	1 %	RSA
	10 %	Ziegenerum in Phosphatpuffer
<u>Lösung A:</u>	3 %	Hexamethylentetramin in ddH ₂ O
<u>Lösung B:</u>	5 %	Silber-3-Nitrat in ddH ₂ O
<u>Lösung C:</u>	2.5 %	di-Natriumtetraborat in ddH ₂ O
<u>Lösung D:</u>	0.05 %	Gold(III)-chlorid-chlorwasserstoffsäure in ddH ₂ O
<u>Lösung E:</u>	2.5 %	Natriumthiosulfat in ddH ₂ O
<u>Lösung F:</u>	2.6 %	Hexamethylentetramin
	0.22 %	Silber-3-Nitrat
	0.22 %	di-Natriumtetraborat
<u>Cacodylatpuffer:</u>	0.1 M	in ddH ₂ O
<u>Durcupan-Gemisch:</u>	48.5 %	A
	48.5 %	B
	1.5 %	C
	1.5 %	D
<u>Bleinitrat-Lösung:</u>	0.6 g/l	Bleinitrat
	0.9 g/l	Natriumziträt
	160 mM	NaOH

Für diese elektronenmikroskopische Analysen wurden adulte *Wistar*-Ratten (300 g) wie für Mäuse unter 3.2.26.2 beschrieben perfundiert.

Am Vibratom wurden 50 µm dicke sagittale Gehirnschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden dann bei RT für 1 h in Blocklösung auf einem Schüttler vorinkubiert. Die primären Antikörper wurden in einer geeigneten Verdünnung mit der Blocklösung verwendet. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte in Blocklösung bei 4°C ÜN. Anschließend wurden die Schnitte viermal für 10 min in der Blocklösung gewaschen.

Als Sekundärantikörper wurde ein biotinmarkierter Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper in einer geeigneten Verdünnung mit der Blocklösung verwendet.

Die Inkubation erfolgte bei RT für 2 h. Anschließend wurden die Schnitte fünfmal für 10 min in 0.1 M Phosphatpuffer gewaschen. 30 min vor Ende des Waschgangs wurde der Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC-Komplex) erzeugt. Dazu wurden laut Herstellerangaben (Vector Laboratories, Burlingame, USA) 1 Tropfen der Lösung A und B in 20 ml Phosphatpuffer gemischt. Die Inkubation der Schnitte in diesem Gemisch erfolgte bei RT für 1 h. Dann wurden die Schnitte zweimal für 10 min in 0.1 M Phosphatpuffer und einmal in 50 mM Tris/HCl, pH 7.6 gewaschen. Anschließend wurde die DAB-Reaktion durchgeführt. Dazu wurde eine DAB-Tablette (10 mg) in 30 ml 50 mM Tris/HCl, pH 7.6 aufgelöst und mit 5 μ l H₂O₂ versetzt. Die Inkubation mit der Substratlösung erfolgte bis zur gewünschten Farbinintensität und wurde dann durch weitere Zugabe von 50 mM Tris/HCl, pH 7.6 gestoppt. Anschließend wurden die Schnitte zweimal in 50 mM Tris/HCl, pH 7.6 bei RT für 5 min und danach zweimal in 0.1 M Cacodylatpuffer bei RT für 5 min gewaschen. Die Schnitte wurden nun in 2.5 % Glutaraldehyd/0.1 M Cacodylatpuffer bei 4°C für 2 h nachfixiert. Anschließend wurden die Schnitte zweimal in 0.1 M Cacodylatpuffer bei RT für 5 min gewaschen und in 0.1 M Cacodylatpuffer bei 4°C ÜN inkubiert. Dann wurden die Schnitte in ddH₂O viermal für 15 min gewaschen. Lösung F wurde auf die Schnitte gegeben und diese bei 60°C für 10 min im Wärmeschrank inkubiert. Die Lösung wurde abgesaugt und die Schnitte dreimal für 3 min mit ddH₂O gewaschen. Dann wurden die Schnitte in Lösung D bei RT für 3 min inkubiert. Die Lösung wurde abgesaugt und die Schnitte erneut dreimal für 3 min mit ddH₂O gewaschen. Dann wurden die Schnitte in Lösung E bei RT für 3 min inkubiert. Die Lösung wurde abgesaugt und die Schnitte erneut dreimal für 3 min mit ddH₂O gewaschen. Die Schnitte wurde nun mit 0.5 % Osmium/0.1 M Cacodylatpuffer bei 4°C für 30 min inkubiert. Die Lösung wurde abgesaugt und die Schnitte erneut dreimal für 10 min mit 0.1 M Cacodylatpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte zur Vorbereitung für die Einbettung in Durcupan mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe für jeweils 10 min (30 %, 50 %) dehydriert. Zur Kontrastierung wurden die Schnitte mit 1 % Uranylazetat in 70 % Ethanol für 30 min inkubiert. Die Schnitte wurden nun weiter dehydriert in 90 % Ethanol für 10 min und abschließend dreimal für 10 min in 100 % Ethanol inkubiert. Die Schnitte wurden im Anschluß daran in Propylenoxid zweimal für 10 min und in einem 1:1 Propylenoxid/Durcupan-Gemisch für 2 h bei 4°C inkubiert. Zum Verdampfen des Propylenoxids wurden die Schnitte in einem offenen Gefäß für 30 min unter den

Abzug gestellt. Zur Polymerisierung des Durcupan-Gemisches wurden die Schnitte mit Durcupangemisch aufgefüllt und bei 60°C für 48 in einen Wärmeschrank gestellt.

Zur Erzeugung ultradünner Schnitte für die Elektronenmikroskopie wurden mit Durcupan gefüllte kleine Plastikhütchen auf die zu untersuchenden Schnitte gesetzt und nochmals bei 60°C für 48 in einem Wärmeschrank inkubiert. Nachdem mit einer Rasierklinge der Block auf eine Größe von 0.5 mm x 1 mm getrimmt worden war, wurden am Ultraschneidegerät mit einem Diamantenmesser 70 nm dicke Schnitte angefertigt und auf mit Formvar beschichtete Einzelloch-Kupfer-Grids aufgezogen. Nach dem vorsichtigen Trocknen der Kupfer-Grids mit einem Filterpapier, wurden sie zur Kontrastierung für 15 min mit der Schnittstelle auf einen Tropfen 2 % Uranylazetat gelegt. Die Kupfer-Grids wurden in ddH₂O dreimal für 15 min gewaschen, getrocknet und zur Verstärkung des Kontrasts für 2 min auf eine Bleinitrat-Lösung gelegt. Nach dieser Behandlung wurden die Schnitte im Elektronenmikroskop betrachtet. Für die fotografische Dokumentation wurde der Film TP 6415 (Kodak Integra Biosciences GmbH, Fernwald) verwendet.

3.2.26.4 Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Rückenmark von Deletionsmutanten

Für elektronenmikroskopische Analysen wurden neugeborene deletionsmutante Mäuse wie unter 3.2.26.2 beschrieben perfundiert.

Das Rückenmark wurden entnommen und zur Post-Fixierung in der Fixierlösung bei 4°C für 1 h inkubiert. Am Vibratom wurden 50 µm dicke sagittale Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden für 20 min bei 4°C in 0.5 % Osmium inkubiert und dann dreimal für 10 min in Phosphatpuffer gewaschen. Die Schnitte wurden im Anschluß daran wie unter 3.2.26.3 beschrieben dehydriert, in Durcupan eingebettet und elektronenmikroskopisch analysiert.

3.2.27 Analyse des Serums von neugeborenen Deletionsmutanten

Die biochemische Analyse verschiedener Parameter des Serums erfolgte an Serumproben von neugeborenen Deletionsmutanten. Dazu wurden die Tiere mittels *sectio caesare* Mäuseweibchen an Tag 19 der Trächtigkeit entnommen und nach Kontrolle der ersten Atembewegung bei 37°C in eine feuchte Inkubationskammer gelegt. Dort wurden sie unter Sichtkontakt für 30 min gehalten und im Abstand von 5–10 min durch leichte taktile Reize auf ihren Zustand überprüft. Anschließend wurde das Vollblut der Jungtiere nach zervikaler Dislokation erhalten und das Serum durch Koagulation für 10 min bei RT und Zentrifugation für 10 min bei 1000x g und 4°C gewonnen. Das gelbliche, klare Serum wurde abgenommen und in einem Eppendorf-Gefäß bei –80°C gelagert.

Die Serumproben wurden von einem externen Labor (Laboratoriumsmedizin Wagner & Partner, Göttingen) flammenphotometrisch auf den Gehalt von Natrium und Kalium analysiert.

Die Elektrolytekonzentration wurde in mmol/l angegeben. Es wurden die Mittelwerte sowie die Standardabweichung berechnet. Die Daten der deletionsmutanten Mäuse wurden in Relation zu denen der Wildtypiere (= 100 %) gesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der CAPS-Proteine

4.1.1 Strukturvergleich der CAPS-Proteine

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war lediglich eine CAPS-Isoform bekannt (CAPS1), für die cDNA-Sequenzen in voller Länge aus Maus, Ratte und Mensch beschrieben waren.

Zur Vorbereitung der Charakterisierung von CAPS1 und der Erzeugung und Analyse von CAPS1-Maus-Deletionsmutanten wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst EST- und Genom-Datenbanken nach möglichen CAPS1-Homologen abgesucht. Bei dieser systematischen Suche wurden ein CAPS1-ähnliches cDNA-Fragment aus Maus (GenBank AF000969), eine EST-Sequenz einer CAPS1-ähnlichen cDNA aus Mensch (GenBank AW062254) sowie die vollständige genomische Sequenz eines humanen CAPS1-ähnlichen Proteins verteilt auf drei PAC-Klonen (GenBank AC004838, AC006009, AC004594; 7q31.1-q31.3) identifiziert. Ein Sequenzvergleich dieser neuen CAPS1-ähnlichen Sequenzen mit den bisher bekannten zeigte, daß die neuen CAPS1-Sequenzen aus Maus und Mensch aufgrund ihrer außerordentlich hohen Homologie zueinander wahrscheinlich Orthologe sind, jedoch eine neue, als CAPS2 benannte CAPS-Isoform darstellen (Abb. 1 und 2).

```

1 MLDPSSESEESDEILEEESGKEVLSGIAASGARLSPSRTINEGSAAGSAGMGGSAGAGAGVAGAGGGGGSSASSGGGAGGLQPS r-CAPS1
1 MLDPSSESEESDEILEEESGKDVLSGIAASGARLSPSRTINEGSAAGSAGMGGSAGAGAGVAGAGGGGGSSASSGGGAGGLQPS m-CAPS1
1 ----- m-CAPS2
1 ----- h-CAPS1
1 MLDPSSESEESDEILEEES-RDVLVAAGSQRAPPAAPTRERGRDAPGRAAGG----- h-CAPS2

81 RAIGGRPSSPSPSVVSEKEKEELERLQ-----KIEEERKK-RQLQYVFMRCIAYPFNAKQPTDM r-CAPS1
81 RAIGGRPSSPSPSVVSEKEKEELERLQPSRAGGRPSSPSPSVVSEKEKEELERLQQLYVFMRCIAYPFNAKQPTDM m-CAPS1
1 ----- m-CAPS2
1 ----- h-CAPS1
52 -GAAARISVSPSPSVVSEKEKEELERLQ-----KIEEERKK-RQLQYVFMRCIAYPFNAKQPTDM h-CAPS1
-----DIEEQERRI-RQLQYVFMRCIAYPFNAKQPTDM h-CAPS2

140 ARRPRKISKQQLQTVKDRFQAFNLGETQIVADEAFMNAVQSYEVFVFLKSDRVARMVQSGGCSANDSREVFKKHIEKRVRS r-CAPS1
140 ARRPRKISKQQLQTVKDRFQAFNLGETQIVADEAFMNAVQSYEVFVFLKSDRVARMVQSGGCSANDSREVFKKHIEKRVRS m-CAPS1
1 ----- m-CAPS2
45 ARRQKISKQQLQTVKDRFQAFNLGETQIVADEAFMNAVQSYEVFVFLKSDRVARMVQSGGCSANDSREVFKKHIEKRVRS h-CAPS1
140 ARRQKISKQQLQTVKDRFQAFNLGETQIVADEAFMNAVQSYEVFVFLKSDRVARMVQSGGCSANDSREVFKKHIEKRVRS h-CAPS2

220 LPEIDGLSKETVLSWMAKFDATYRGEEDPRKQARMASAASELILSKEQLYEMFQNILGKIKKFEHQLLYNACQLDNPD r-CAPS1
241 LPEIDGLSKETVLSWMAKFDATYRGEEDPRKQARMASAASELILSKEQLYEMFQNILGKIKKFEHQLLYNACQLDNPD m-CAPS1
1 ----- m-CAPS2
125 LPEIDGLSKETVLSWMAKFDATYRGEEDPRKQARMASAASELILSKEQLYEMFQNILGKIKKFEHQLLYNACQLDNPD h-CAPS1
125 LPEIDGLSKETVLSWMAKFDATYRGEEDPRKQARMASAASELILSKEQLYEMFQNILGKIKKFEHQLLYNACQLDNPD h-CAPS2

300 EQAAQIRRELDGRQMADQIARERKFPKFKVSKEMENMYIEELKSSVNLNLMANLESMVPVSKGG-EFKLQKLRSHNASIID r-CAPS1
321 EQAAQIRRELDGRQMADQIARERKFPKFKVSKEMENMYIEELKSSVNLNLMANLESMVPVSKGG-EFKLQKLRSHNASIID m-CAPS1
1 ----- m-CAPS2
205 EQAAQIRRELDGRQMADQIARERKFPKFKVSKEMENMYIEELKSSVNLNLMANLESMVPVSKGG-EFKLQKLRSHNASIID h-CAPS1
268 EQAAQIRRELDGRQLADKMAKERKFPKFKVSKEMENMYIEELKSSVNLNLMANLESLPVSKGGPEFKLQKLRSHNASIID h-CAPS2

379 MGESEENQLSKSDVLLSFSLEVIMEVQGLKSLAPNRIYVCTMEVEGGEKLTQDQAEASKPTWGTQGDFFSTHALPAVKV r-CAPS1
379 MGESEENQLSKSDVLLSFSLEVIMEVQGLKSLAPNRIYVCTMEVEGGEKLTQDQAEASKPTWGTQGDFFSTHALPAVKV m-CAPS1
1 ----- m-CAPS2
284 MGESEENQLSKSDVLLSFSLEVIMEVQGLKSLAPNRIYVCTMEVEGGEKLTQDQAEASKPTWGTQGDFFSTHALPAVKV h-CAPS1
348 TIGDIEIEITQLSKSDVLLSFSLEVIMEVQGLKSLAPNRIYVCTMEVEGGEKLTQDQAEASRIPWGTQGDFFSTHALPAVKV h-CAPS2

459 KLFTTESTGVLALDEKELGRVILHPTPNPKQSEWHKMTVSKNCPDQDLKIKLAVRMDKPNQMKHSGYLWITIGKNVVKRWK r-CAPS1
480 KLFTTESTGVLALDEKELGRVILHPTPNPKQSEWHKMTVSKNCPDQDLKIKLAVRMDKPNQMKHSGYLWITIGKNVVKRWK m-CAPS1
1 ----- m-CAPS2
364 KLFTTESTGVLALDEKELGRVILHPTPNPKQSEWHKMTVSKNCPDQDLKIKLAVRMDKPNQMKHSGYLWITIGKNVVKRWK h-CAPS1
427 KLFTTESTGVLALDEKELGRVILHPTPNPKQSEWHKMTVSKNCPDQDLKIKLAVRMDKPNQMKHSGYLWITIGKNVVKRWK h-CAPS2

539 KRFFVLVQVSQYTFAMCSYREKKAEPQELLQDGYTVDYTDPPGLEGGRAFFNAVKEGDTVIFASDDEQDRILVWQAMY r-CAPS1
560 KRFFVLVQVSQYTFAMCSYREKKAEPQELLQDGYTVDYTDPPGLEGGRAFFNAVKEGDTVIFASDDEQDRILVWQAMY m-CAPS1
1 ----- m-CAPS2
444 KRFFVLVQVSQYTFAMCSYREKKAEPQELLQDGYTVDYTDPPGLEGGRAFFNAVKEGDTVIFASDDEQDRILVWQAMY h-CAPS1
507 KRFFVLVQVSQYTFAMCSYREKKAEPQELLQDGYTVDYTDPPGLEGGRAFFNAVKEGDTVIFASDDEQDRILVWQAMY h-CAPS2

619 RATGQSHKVPVPTQVQKLIKPRAECLSMADAPISQFY---ADRAQKHGMDEFISSNPNCFDHASLFEMVQRLTLDHRLND r-CAPS1
640 RATGQSHKVPVPTQVQKLIKPRAECLSMADAPISQFY---ADRAQKHGMDEFISSNPNCFDHASLFEMVQRLTLDHRLND m-CAPS1
1 ----- m-CAPS2
524 RATGQSHKVPVPTQVQKLIKPRAECLSMADAPISQFY---ADRAQKHGMDEFISSNPNCFDHASLFEMVQRLTLDHRLND h-CAPS1
587 RATGQSHKVPVPTQVQKLIKPRAECLSMADAPISQFY---ADRAQKHGMDEFISSNPNCFDHASLFEMVQRLTLDHRLND h-CAPS2

695 SYSCLGWFSPPGQVFLVDEYCARNGVRRGCHRHLCYLRDLLEAENGAMIDPTLLHYSFAFCASHVHGNRPDGIPTVTVEEK r-CAPS1
716 SYSCLGWFSPPGQVFLVDEYCARNGVRRGCHRHLCYLRDLLEAENGAMIDPTLLHYSFAFCASHVHGNRPDGIPTVTVEEK m-CAPS1
1 ----- m-CAPS2
604 SYSCLGWFSPPGQVFLVDEYCARNGVRRGCHRHLCYLRDLLEAENGAMIDPTLLHYSFAFCASHVHGNRPDGIPTVTVEEK h-CAPS1
662 SYSCLGWFSPPGQVFLVDEYCARNGVRRGCHRHLCYLRDLLEAENGAMIDPTLLHYSFAFCASHVHGNRPDGIPTVTVEEK h-CAPS2

776 ERFEIEKERLRLVLENQITHFRYCFPPGRPEGALKATLSLLERVLMDKDIIVTPVPQEEVKTVIRKCLEQAALVNSRILEY r-CAPS1
795 ERFEIEKERLRLVLENQITHFRYCFPPGRPEGALKATLSLLERVLMDKDIIVTPVPQEEVKTVIRKCLEQAALVNSRILEY m-CAPS1
1 ----- m-CAPS2
684 ERFEIEKERLRLVLENQITHFRYCFPPGRPEGALKATLSLLERVLMDKDIIVTPVPQEEVKTVIRKCLEQAALVNSRILEY h-CAPS1
742 ERFEIEKERLRLVLENQITHFRYCFPPGRPEGALKATLSLLERVLMDKDIIVTPVPQEEVKTVIRKCLEQAALVNSRILEY h-CAPS2

855 AKIEEENKQDA-----ENYGRLLITPAKKEEDITRLAELVIEVLQNEEHHAE---AFAWWSOGLMVEHAHE r-CAPS1
876 AKIEEENKQDA-----ENYGRLLITPAKKEEDITRLAELVIEVLQNEEHHAE---AFAWWSOGLMVEHAHE m-CAPS1
1 ----- m-CAPS2
764 AKIEEENKQDA-----ENYGRLLITPAKKEEDITRLAELVIEVLQNEEHHAE---AFAWWSOGLMVEHAHE h-CAPS1
824 AKIEEENKQDA-----ENYGRLLITPAKKEEDITRLAELVIEVLQNEEHHAE---AFAWWSOGLMVEHAHE h-CAPS2

909 TFLSLFAVDMDAALEVQPPDWDSPFLQQLNDFLRTDYNLCNGKFKHKLQDLFAPLVVRYVDLMESSIAQSIHRGFERE r-CAPS1
953 TFLSLFAVDMDAALEVQPPDWDSPFLQQLNDFLRTDYNLCNGKFKHKLQDLFAPLVVRYVDLMESSIAQSIHRGFERE m-CAPS1
30 KFWALFTVDMDAALEVQPPDWDSPFLQQLNDFLRTDYNLCNGKFKHKLQDLFAPLVVRYVDLMESSIAQSIHRGFERE h-CAPS2
827 TFLSLFAVDMDAALEVQPPDWDSPFLQQLNDFLRTDYNLCNGKFKHKLQDLFAPLVVRYVDLMESSIAQSIHRGFERE h-CAPS1
878 KFWALFTVDMDAALEVQPPDWDSPFLQQLNDFLRTDYNLCNGKFKHKLQDLFAPLVVRYVDLMESSIAQSIHRGFERE h-CAPS2

989 SWEFV-----NNGSGTSEDLFWKLDALQTFIRDLHW r-CAPS1
1033 SWEFVKSLSNLPNVLNPNVLPKVPNLPVNIPLGIPQMPFSAAPSMAAIYDADNNGSGTSEDLFWKLDALQTFIRDLHW m-CAPS1
110 TWQPVKNIANSLPNVALP-----KVPSLP-----LNLPQIPSFSTPPWMAASLYESTNGSTTSEDLFWKLDALQTFIRDLHW m-CAPS2
907 SWEFV-----NNGSGTSEDLFWKLDALQTFIRDLHW h-CAPS1
958 TWQPVN-----IGSALTSEDLFWKLDALQTFIRDLHW h-CAPS2

1020 PEEFEGKHLLEQRLKLMASOMIESCVKRRTRIAFEVKKLQKTSRSTDFRVPQSICTMFNVVMDAKAOSTKLCSEMGGQE--- r-CAPS1
1113 PEEFEGKHLLEQRLKLMASOMIESCVKRRTRIAFEVKKLQKTSRSTDFRVPQSICTMFNVVMDAKAOSTKLCSEMGGQE--- m-CAPS1
181 PEQIEFAHHLLEQRLKLMASOMIEAICVKKRRTRIAFEVKKLQKTSRSTDFRVPQSICTMFNVVMDAKAOSTKLCSEMGGQE--- h-CAPS1
938 PEQIEFAHHLLEQRLKLMASOMIEAICVKKRRTRIAFEVKKLQKTSRSTDFRVPQSICTMFNVVMDAKAOSTKLCSEMGGQE--- h-CAPS2

1096 -HQYHYSKIDELIEETVKEMITLLVAKFVTILEGLVAKLSRYDEGTLFSSFLSFTVKAASKYVDVPPKPGMDVADAYVTFVR r-CAPS1
1189 -HQYHYSKIDELIEETVKEMITLLVAKFVTILEGLVAKLSRYDEGTLFSSFLSFTVKAASKYVDVPPKPGMDVADAYVTFVR m-CAPS1
254 ----- m-CAPS2
1014 -HQYHYSKIDELIEETVKEMITLLVAKFVTILEGLVAKLSRYDEGTLFSSFLSFTVKAASKYVDVPPKPGMDVADAYVTFVR h-CAPS1
1069 WQQYHYSKIDELIDNVSVKETIISILVSKFVSVILEGLVAKLSRYDEGTLFSSFLSFTVKAASKYVDVPPKPGMDLADDTIYMEVR h-CAPS2

1175 HSQDVLDRDKVNEEMYIERLFDQWYNSSMNVICTWLTDRMDLQLHIYQLKTLIRMVKKTYYRDFRLQGVLDSTLNSKTYETI r-CAPS1
1268 HSQDVLDRDKVNEEMYIERLFDQWYNSSMNVICTWLTDRMDLQLHIYQLKTLIRMVKKTYYRDFRLQGVLDSTLNSKTYETI m-CAPS1
254 ----- m-CAPS2
1093 HSQDVLDRDKVNEEMYIERLFDQWYNSSMNVICTWLTDRMDLQLHIYQLKTLIRMVKKTYYRDFRLQGVLDSTLNSKTYETI h-CAPS1
1149 QNQDITLREKVNEMYIERLFDQWYNSSMNVICTWLTDRMDLQLHIYQLKTLIRMVKKTYYRDFRLQGVLDSTLNSKTYETI h-CAPS2

1255 RNRLLTVEEATASVSEGGGLQGISMKDSDDEEDED r-CAPS1
1348 RNRLLTVEEATASVSEGGGLQGISMKDSDDEEDED m-CAPS1
254 ----- m-CAPS2
1173 RNRLLTVEEATASVSEGGGLQGISMKDSDDEEDED h-CAPS1
1229 RNRLLTVEEATASVSEGGGLQGISMKDSDDEEDED h-CAPS2

```

Abb. 1: Vergleich der Primärstruktur von CAPS-1 und CAPS-2 aus verschiedenen Spezies.

Die Proteinsequenzen von CAPS1 und CAPS2 aus verschiedenen Spezies wurden mit Hilfe des Programms Lasergene (DNA-Star) verglichen. h, Mensch; m, Maus; r, Ratte. Die GenBank-Codes der verschiedenen Sequenzen sind: NM_013219 (rCAPS1), NM_012061 (mCAPS1), AF000969 (mCAPS2), AB032947 (hCAPS1), AC004838/AC006009/AC004594 (hCAPS2).

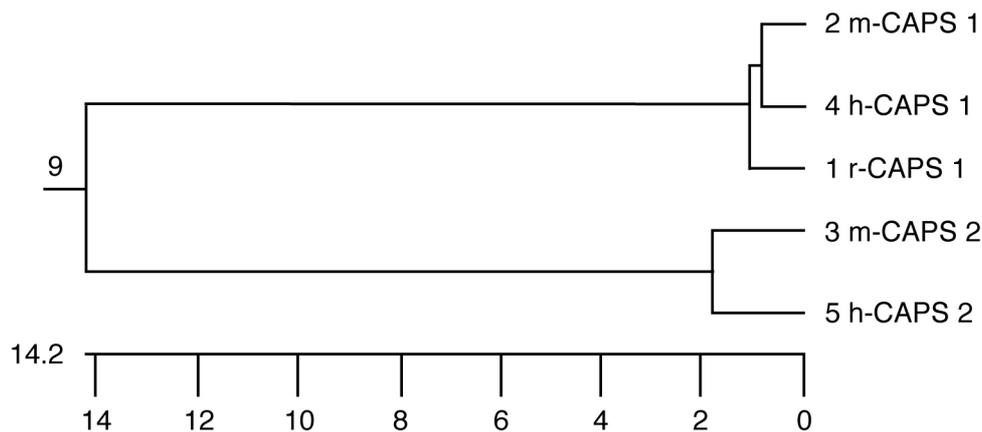


Abb. 2: Quantitative Darstellung des Verwandtschaftsgrades zwischen verschiedenen CAPS-Isoformen.

Die in allen identifizierten CAPS-Sequenzen aus Mammaliern vorhandenen Proteinsequenzen (definiert durch das CAPS2-Fragment aus Maus) wurden mit Hilfe des Programms Lasergene (DNA-Star) verglichen und einander mit Hilfe eines Dendrogramms zugeordnet. Diese Analyse zeigt, daß die bisher bekannten und die in der vorliegenden Arbeit identifizierten CAPS-Sequenzen von zwei Isoformen stammen. h, Mensch; m, Maus; r, Ratte. GenBank-Codes wie in Abb. 1.

Die Familie der CAPS-Proteine besteht demnach aus zwei einander sehr homologen (75 % Ähnlichkeit) Isoformen, CAPS1 (139 kDa) und CAPS2 (144 kDa), die wahrscheinlich ähnliche Funktionen wahrnehmen. Beide CAPS-Isoformen sind charakterisiert durch eine zentrale Pleckstrin-homologe Domäne sowie eine C-terminal gelegene Munc13-Homologie-Domäne (MHD1; Abb. 3).

Um auch im Hinblick auf die geplante Funktionsanalyse von CAPS-Proteinen in entsprechenden Deletionsmutanten eventuelle Unterschiede im Expressionsmuster der beiden CAPS-Isoformen zu identifizieren, wurden die Expressionsmuster von CAPS1 und CAPS2 auf mRNA- und Proteinebene vergleichend analysiert. Da davon ausgegangen werden kann, daß sich die Expressionsmuster der beiden Proteine in Ratte und Maus nicht wesentlich voneinander unterscheiden, wurden je nach den experimentellen Erfordernissen und Möglichkeiten (Spezifität verwendeter Primärantikörper etc.) Maus- oder Rattengewebe für die Analyse verwendet. Insbesondere in biochemischen Experimenten wurde auf Rattengewebe zurückgegriffen, während die morphologischen Studien meist mit Mausgewebe durchgeführt wurden.

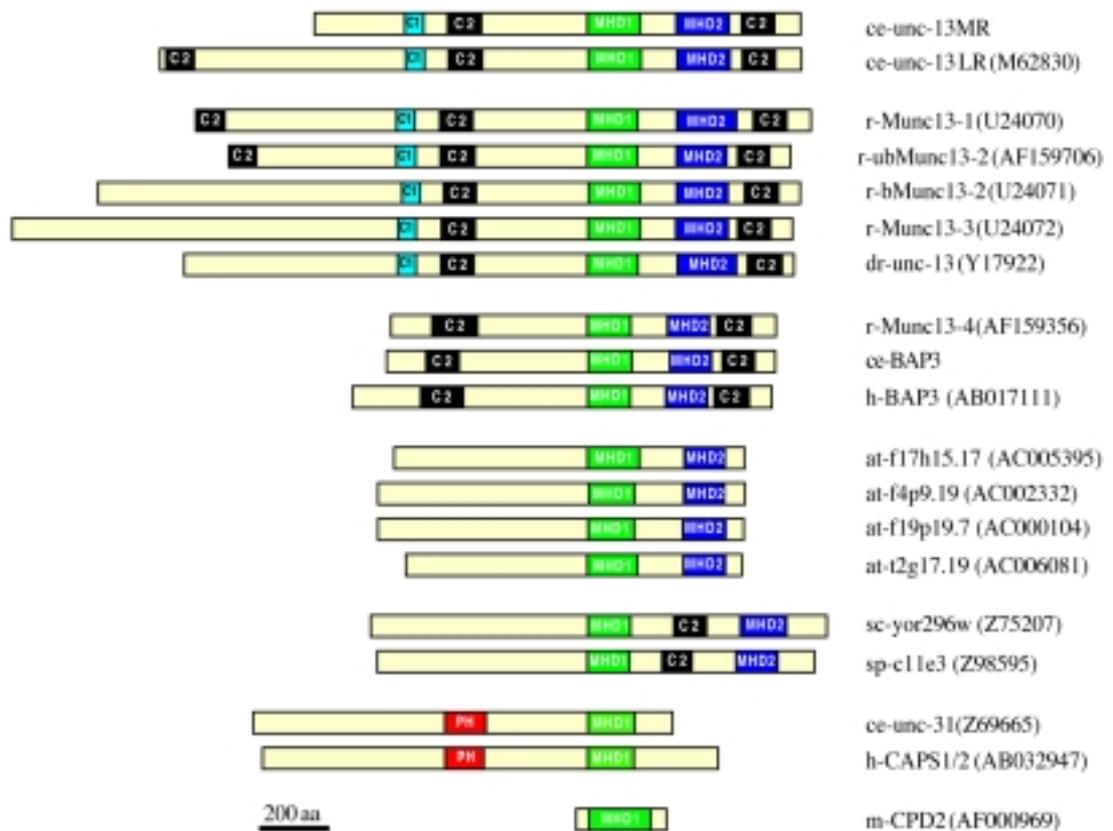


Abb. 3: Domänenstruktur von CAPS1 und CAPS2 im Vergleich zu anderen Proteinen mit Munc13-Homologie-Domäne (MHD1 und MHD2).

MHDs finden sich in einer Reihe verschiedener Proteine, von denen viele an der Regulation von Sekretionsprozessen beteiligt sind. at, *A. thaliana*; C1, C1-Domäne; C2, C2-Domäne; ce, *C. elegans*; dr, *D. melanogaster*; h, Mensch; m, Maus; PH, Pleckstrin-homologe Domäne; r, Ratte; sc, *S. cerevisiae*; sp, *S. pombe*.

4.1.2 Verteilung der CAPS-mRNAs im Gewebe

Um die Gewebeverteilung der beiden CAPS-Isoformen zu vergleichen, wurden zunächst Northern Blot-Analysen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden mittels Restriktionsansatz (*Bss*HIII/*Aat*II; Sequenz: 152-997 bp der CAPS1-cDNA aus Ratte) bzw. PCR (Oligonukleotide: 1770/1786; Sequenz: 10-744 bp des CAPS2-cDNA-Fragments aus Maus) spezifisch gegen CAPS1 bzw. CAPS2 gerichtete cDNA-Sonden isoliert. Die Sonden wurden wie unter 3.2.13.2 beschrieben radioaktiv markiert und zur Hybridisierung von Northern Blot-Membranen verwendet (3.2.14). Für beide CAPS-Isoformen wurden mRNA-Banden von etwa 5.6 kb detektiert. Während CAPS1-mRNA lediglich im Gehirn und zu einem geringen Anteil im Hoden nachzuweisen war, wurden für CAPS2 neben einem besonders starken Signal im Gehirn signifikante Mengen an mRNA auch in Lunge, Leber, Niere und Hoden nachgewiesen (Abb. 4).

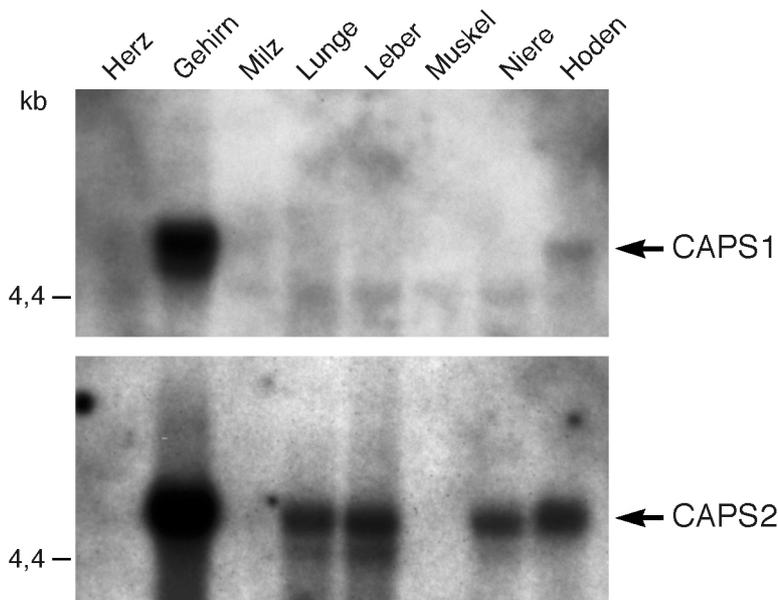


Abb. 4: Verteilung der CAPS-mRNAs im Gewebe

Mit mRNA der induzierten Rattengewebe beladene Northern Blot-Membranen wurden mit spezifisch gegen CAPS1 (oben) bzw. CAPS2 (unten) gerichteten cDNA-Sonden hybridisiert und hochstringent gewaschen. Während CAPS1-mRNA weitestgehend hirnspezifisch exprimiert wird, ist CAPS2-mRNA neben dem Gehirn auch in Lunge, Leber, Niere und Hoden detektierbar.

4.1.3 Verteilung der CAPS-mRNAs im Gehirn

Nachdem sich in Northern Blot-Experimenten (4.1.2) gezeigt hatte, daß die beiden CAPS-Isoformen im Gehirn der Ratte koexprimiert werden, wurde in weiteren Experimenten untersucht, inwieweit die mRNA-Expressionmuster der beiden Isoformen im Gehirn überlappen. In diesen Experimenten wurde auf Mausgewebe zurückgegriffen, um bei der späteren Analyse von deletionsmutanten Mäusen einen eventuellen kompensatorischen Beitrag der nicht deletierten Isoform zum Phänotyp abschätzen zu können.

Zur Analyse der mRNA-Expressionsmuster von CAPS1 und CAPS2 im Maushirn per *in situ*-Hybridisierung wurden zunächst isoformspezifische Oligonukleotide synthetisiert (3.1.16) (CAPS1: 1818/1820; CAPS2: 1819/1821), die in der Folge wie unter 3.2.25.3 beschrieben radioaktiv markiert wurden. Die *in situ*-Hybridisierung von Maushirnschnitten wurden wie unter 3.2.25.4 beschrieben durchgeführt.

CAPS1-mRNA wurde in allen Neuronen des Mausgehirns detektiert während an Gliazellen reiche Regionen (z.B. weiße Substanz in Cerebellum und Großhirnrinde) keine CAPS1-mRNA enthielten (Abb. 5, links). Im Gegensatz hierzu war die CAPS2-mRNA selektiver verteilt und in bestimmten Hirnregionen (z.B. Striatum,

Hypothalamus, Regionen CA3 und CA4 des Hippocampus) nicht detektierbar (Abb. 5, rechts). Kontrollexperimente, die jeweils in Anwesenheit eines Überschusses an nicht markiertem Oligonukleotid durchgeführt wurden, zeigten keine spezifische Markierung (nicht gezeigt). Diese Daten belegen, daß bis auf wenige Ausnahmen Neuronen in allen Hirnbereichen beide CAPS-Isoformen exprimieren.

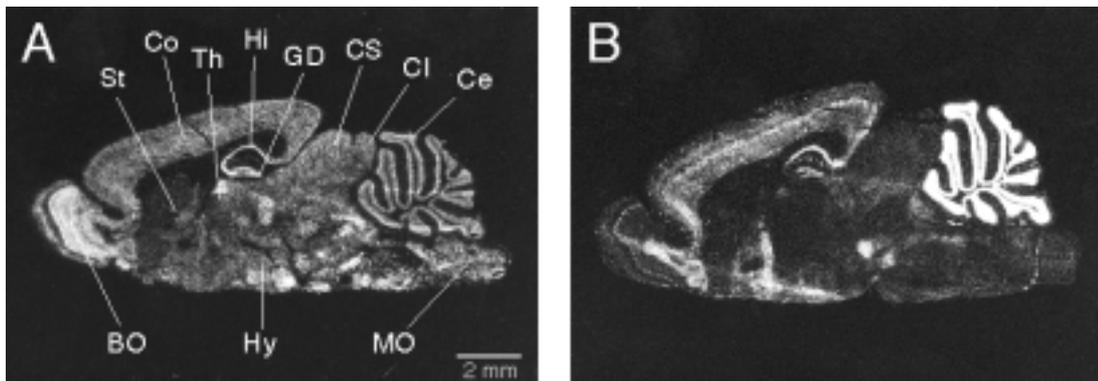


Abb. 5: Verteilung der CAPS-mRNAs im Gehirn

Röntgenfilmbilder der radioaktiven *in situ*-Hybridisierung für CAPS1 und CAPS2 im Maushirn.

Die mRNA-Expression der beiden Isoformen zeigt regionale Unterschiede. (A) CAPS1-mRNA wird nahezu ubiquitär im Gehirn exprimiert. (B) CAPS2-mRNA ist in seiner Verteilung auf einige Hirnregionen beschränkt und insbesondere in Striatum, Hypothalamus, CA3/CA4-Regionen des Hippocampus, sowie in dorsalen Schichten der Großhirnrinde nicht detektierbar.

Ce, Cerebellum; Co, Cortex; GD, Gyrus dentatus; Hi, Hippocampus; Hy, Hypothalamus; Cl, Colliculus inferior; MO, Medulla oblongata; BO, Bulbus olfactorius; Po, Pons; CS, Colliculus superior; St, Striatum; Th, Thalamus

4.1.4 Erzeugung isoformspezifischer Antikörper gegen CAPS-Proteine

Unter Verwendung von CAPS1- und CAPS2-GST-Fusionsproteinen wurden wie unter 3.2.21.1 beschrieben in Kaninchen polyklonale Antiseren gegen den N- und den C-Terminus von CAPS1 aus Ratte und gegen den zentralen Bereich von CAPS2 aus der Maus erzeugt. Zur Grundcharakterisierung der erhaltenen Antikörper wurden die Seren mittels Immunoblots von humanen Fibroblasten analysiert, die entweder CAPS1 oder CAPS2 heterolog überexprimierten. In diesen Experimenten konnte nachgewiesen werden, daß die jeweils gegen eine Isoform erzeugten Antikörper keine Kreuzreaktivität mit der zweiten Isoform aufwiesen (nicht gezeigt). Die Spezifität des gegen CAPS1 gerichteten und in der vorliegenden Studie verwendeten Antikörpers wurde ultimativ mit Hilfe der CAPS1-Deletionsmutanten nachgewiesen (siehe Abb. 16). Das gegen CAPS2 gerichtete Antiserum detektierte zwar zuverlässig in Fibroblasten überexprimiertes rekombinantes CAPS2, ergab aber keine

zuverlässigen Signale in Rattengewebe. Dieser Umstand, der wahrscheinlich mit der Tatsache zusammenhängt, daß die Expressionslevels von CAPS2 sehr niedrig sind, machte eine weitere Charakterisierung von CAPS2 in der vorliegenden Studie nicht möglich.

4.1.5 Verteilung des CAPS1-Proteins im Gewebe

Der isoformspezifische Antikörper ermöglichte eine Überprüfung der Verteilung des CAPS1-Proteins in verschiedenen Geweben. Dazu wurden Gesamthomogenate verschiedener Organe der Ratte (Gehirn, Nebenniere, Pankreas, Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz, Muskel und Hoden) mittels Immunoblot (3.2.20) vergleichend analysiert (Abb. 6). CAPS1 konnte in Hirn, sowie in Nebenniere und Pankreas nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bestätigte den Befund, welcher in der Expressionsanalyse der CAPS1-mRNA im Northern Blot (4.1.2) erhalten wurde.

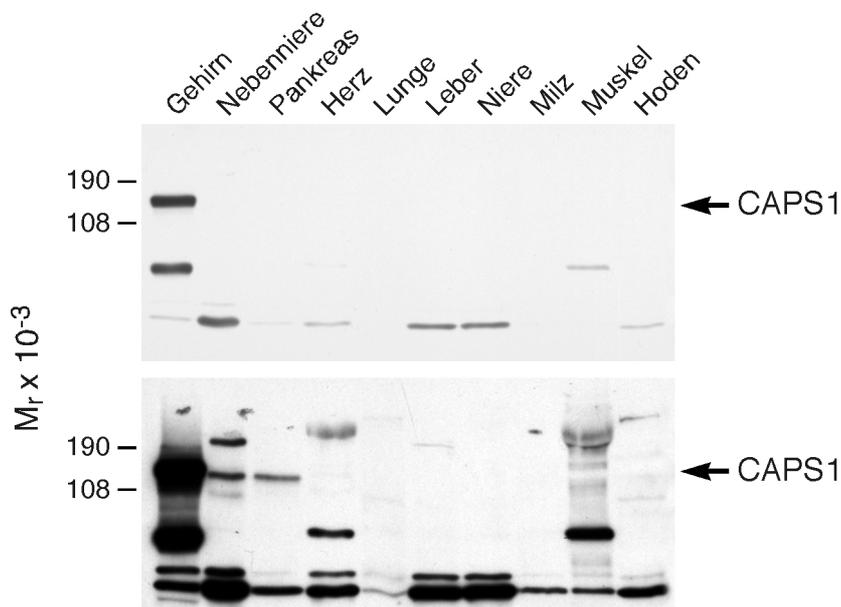


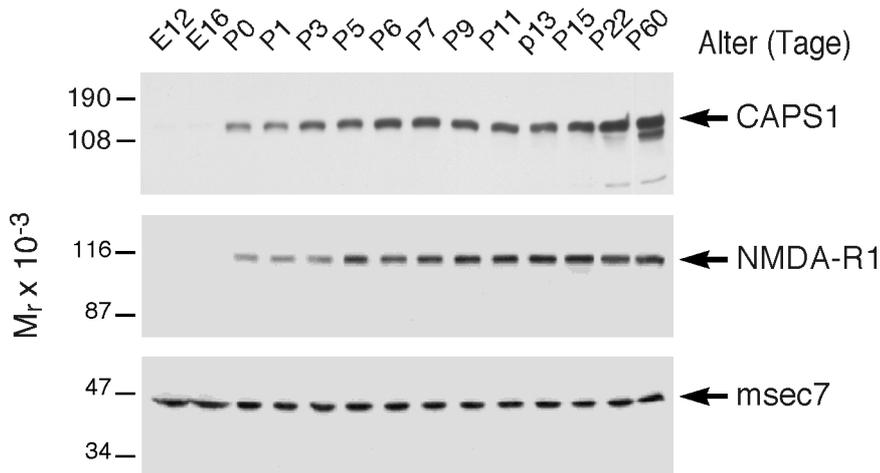
Abb. 6: Verteilung des CAPS1-Proteins im Gewebe

Gesamthomogenate verschiedener Organe der Ratte (20 µg Protein/Spur) wurden mit dem isoformspezifischen Antikörper α CAPS1 mittels Immunoblot analysiert. Immunreaktive Banden wurden mit ECL visualisiert. Eine kurze Exposition des Blots (oben) zeigt, daß CAPS1 besonders stark im Gehirn exprimiert wird. In einer längeren Exposition (unten) kann CAPS1 ebenfalls in Nebenniere und Pankreas nachgewiesen werden. Auf langen Blotexpositionen sichtbare Banden anderen Molekulargewichts repräsentieren unbekannte kreuzreagierende Proteine. Die stark kreuzreagierende Bande in Hirnhomogenat (80 kDa) ist nur in Totalhomogenaten, nicht jedoch in gereinigten Synaptosomen sichtbar (nicht gezeigt).

4.1.6 Expression des CAPS1-Proteins im Gehirn während der Ontogenese

Nach bisherigen Erkenntnissen ist CAPS1 an der Exozytose in neuroendokrinen Geweben beteiligt (Walent et al., 1992). Das entsprechende Nematoden-Ortholog Unc-31 kontrolliert die Neurotransmission im Nervensystem von *C.elegans* (Avery et al., 1993). Diese Befunde lassen auf eine Rolle von CAPS1 bei der Transmitterfreisetzung schließen und legen eine zusätzliche synaptische Funktion von CAPS1 im Gehirn nahe. Die Expressionslevels von Proteinen mit spezifisch synaptischer Funktion korrelieren typischerweise direkt mit der Synapsenzahl (Daly und Ziff, 1997). Die Synaptogenese im Rattenhirn setzt bereits früh in der Embryonalphase ein und erreicht ihren Höhepunkt zwischen den postnatalen Tagen 7 und 14. Um zu untersuchen, ob die zeitliche Veränderung der Expression von CAPS1 mit dem Zeitverlauf der Synaptogenese korreliert, wurden Gehirnhomogenate von Ratten verschiedenen Alters (embryonaler Tag 12 bis postnataler Tag 60) mittels Immunoblot (3.2.20) auf die Expression des CAPS1-Proteins analysiert (Abb. 7).

Abb. 7: Expression des CAPS1-Proteins im Gehirn während der Ontogenese



Gehirnhomogenate von Ratten des angegebenen Alters (20 µg Protein/Spur) wurden mit dem isoformspezifischen Antikörper α CAPS1 sowie mit Antikörpern gegen die NMDA-Rezeptor-Untereinheit NMDA-R1 (Brose et al., 1993) und das Arf-GDP/GTP-Austauschprotein msec7 (Neeb et al., 1999) mittels Immunoblot analysiert. Immunreaktive Banden wurden mit ECL visualisiert. Die Expression von CAPS1 war ab dem Zeitpunkt der Geburt (P0) deutlich nachweisbar. Nach einem kontinuierlichen Anstieg bis zum postnatalen Tag 9 erreicht der Expressionslevel einen Plateauwert. Dieser Zeitverlauf der Proteinexpression gleicht dem von NMDA-R1. Im Gegensatz dazu ist der Expressionslevel des ubiquitären Proteins msec7 nicht entwicklungsabhängig reguliert. E, embryonaler Tag in der Trächtigkeit; P, postnataler Tag

Es zeigte sich (Abb. 7), daß die Expressionslevels von CAPS1 vor der Geburt sehr niedrig sind. Die bereits signifikanten Levels zum Zeitpunkt der Geburt steigen kontinuierlich bis sie etwa zum postnatalen Tag 9 einen Plateauwert erreichen. Die Expression des CAPS1-Proteins verläuft demnach wie die vieler synaptischer Proteine (z.B. NMDA-Rezeptor-Untereinheit NMDA-R1, Abb. 7) parallel zum Synaptogeneseprozeß.

4.1.7 Verteilung des CAPS1-Proteins in Gehirnregionen

Um das Expressionsmuster des CAPS1-Proteins im Gehirn mit dem Expressionsmuster der CAPS1-mRNA zu vergleichen, wurden Gesamthomogenate verschiedener Gehirnregionen (Cerebellum, Septum, Rückenmark, Colliculi, Thalamus, Hypothalamus, Hippocampus, Striatum, Cortex, Bulbus olfactorius und Stammhirn) der Ratte mittels Immunoblot (3.2.20) analysiert. Die Expressionsanalyse innerhalb des Gehirns ergab, daß CAPS1 in vergleichbarer Menge in allen getesteten Hirnregionen exprimiert wird (Abb. 8). Diese Daten bestätigten die Befunde der *in situ*-Hybridisierungsexperimente (4.1.3).

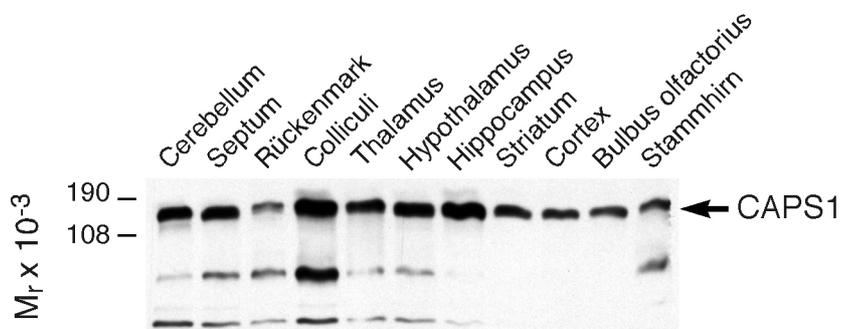


Abb. 8: Verteilung des CAPS1-Proteins in Gehirnregionen

Gesamthomogenate verschiedener Gehirnregionen der Ratte (20 µg Protein/Spur) wurden mit dem isoformspezifischen Antikörper αCAPS1 mittels Immunoblot analysiert. Immunreaktive Banden wurden mit ECL visualisiert. Banden anderen Molekulargewichtes repräsentieren unbekannte kreuzreagierende Proteine. CAPS1 konnte in allen analysierten Gehirnregionen in vergleichbaren Mengen nachgewiesen werden.

4.1.8 Verteilung des CAPS1-Proteins in subzellulären Fraktionen

Obwohl in mehreren Publikationen auf eine spezifische Rolle von CAPS1 bei der kalziumabhängigen Exozytose von *large-dense-core*-Vesikeln hingewiesen wurde (Ann et al., 1997; Berwin et al., 1998; Tandon et al., 1998; Elhamdani et al., 1999), fehlt derzeit eine systematische Analyse der subzellulären Lokalisation des CAPS1-Proteins im Gehirn mit biochemischen und morphologischen Methoden. Da solche Daten unerlässlich sind für die funktionelle Charakterisierung eines Proteins, wurde zunächst mit Hilfe der differentiellen Zentrifugation (3.2.17) die subzelluläre Verteilung von CAPS1 mittels Immunoblot (3.2.20) analysiert. Diese Methode erlaubt im Falle des Gehirns eine für viele andere Gewebe nicht erreichbare Fraktionierung verschiedener subzellulärer Kompartimente. Zur Charakterisierung der Fraktionen wurden neben Antikörpern gegen CAPS1 auch Antikörper gegen spezifische Markerproteine verwendet (Abb. 9). Dabei diente die NMDA-Rezeptor-Untereinheit NMDA-R1 als Marker für synaptische Plasmamembranen (LP₁), und das synaptische Vesikelprotein Synaptophysin1 als Marker für Fraktionen, in denen synaptische Vesikel und andere sekretorische Vesikel angereichert sind (LP₂). Secretogranin2 diente als Marker für *large-dense-core*-Vesikel (in LP₂), während GDI, ein GDP-Dissoziationsinhibitor von Rab-Proteinen, als Marker für lösliche Kompartimente verwendet wurde (S₃, LS₂). Ähnlich wie im Falle des löslichen Proteins GDI, fand sich nach Homogenisation der Hauptanteil von CAPS1 in der löslichen Fraktion S₃. Das in der Synaptosomenfraktion P₂ enthaltene CAPS1 war im synaptosomalen Cytosol angereichert (LS₂). Hier wurde die höchste Anreicherung für CAPS1 nachgewiesen. Lediglich geringe Mengen an CAPS1 waren in der Vesikelfraktion LP₂, in der auch Secretogranin2 und Synaptophysin1 angereichert waren, detektierbar. Diese Daten zeigen, daß CAPS1 im wesentlichen in löslicher Form im synaptischen Zytosol vorliegt, während nur ein kleiner Anteil membranassoziiert zu sein scheint, in der Vesikelfraktion LP₂ anreichert und daher auf sekretorischen Vesikeln wie etwa *large-dense-core*-Vesikeln lokalisiert sein könnte.

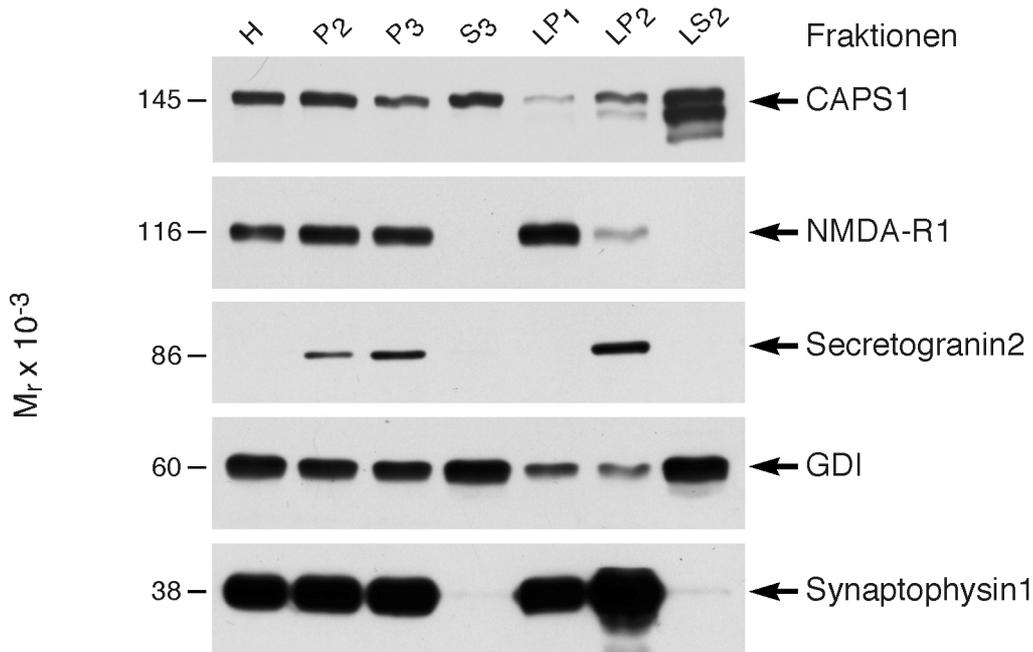


Abb. 9: Subzelluläre Verteilung des CAPS1-Proteins in Gehirnfractionen

Subzelluläre Fractionen (20 µg Protein/Spur) der Gehirnhomogenate von Ratten wurden mit dem isoformspezifischen Antikörper α CAPS1 mittels Immunoblot analysiert. Immunreaktive Banden wurden mit ECL visualisiert. Banden anderen Molekulargewichtes repräsentieren unbekannte kreuzreagierende Proteine. CAPS1 ist in der Fraction des synaptischen Zytosols (LS2) angereichert, nicht jedoch in Fractionen der Synaptosomenmembranen (LP1) oder synaptischen Vesikeln (LP2).

H, Homogenat; P2, Synaptosomenpellet; P3, Pellet leichter Membranen; S3, Zytosol; LP1, lysierte Synaptosomenmembranen; LP2, synaptische Vesikel; LS2, Synaptosomenzytosol

CAPS, *Calcium-dependent Activator Protein for Secretion*; GDI, *GDP dissociation inhibitor*; NMDA-R1, N-methyl-D-Aspartat Rezeptor1

4.1.9 Immunhistochemische Lokalisation des CAPS1-Proteins im Gehirn

Zur detaillierteren Untersuchung der Verteilung des CAPS1-Proteins im Gehirn wurden fixierte Gehirnschnitte der Maus mit Hilfe des affinitätsgereinigten isoformspezifischen Antiserums gegen CAPS1 (3.2.21.2) sowie mit monoklonalen Antikörpern gegen Markerproteine immunhistochemisch untersucht (3.2.26.2). Als Markerproteine dienten Synaptophysin (präsynaptische Kompartimente) und GAD (Glutamatdecarboxylase, GABAerge präsynaptische Kompartimente). Die Detektion des jeweiligen Primärantikörpers erfolgte mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern. Zum Nachweis der Spezifität der CAPS1-Färbung wurden Gehirnschnitte mit dem präabsorbierten affinitätsgereinigten Antiserum gegen CAPS1 getestet, welches keine spezifische immunhistochemische Färbung zeigte (Abb. 10B). Für CAPS1 konnte in diesen Experimenten eine homogene Verteilung im Neuropil des Hippocampus nachgewiesen werden (Abb. 10A).

Die CAPS1-positiven Bereiche entsprechen den Terminationsbereichen der hippocampalen Axonsysteme. Zellkörper von Pyramiden- oder Körnerzellen zeigen keine CAPS1-Signale. Besonders starke Signale konnten in Regionen mit großer präsynaptischer Terminalendichte nachgewiesen werden, z.B. in den präsynaptischen Terminalen des Stratum radiatum. In Doppelfärbungsexperimenten zeigte sich, daß CAPS1 weitgehend mit dem präsynaptischen Markerprotein Synaptophysin kolokalisiert ist (Abb. 10C und D). Diese Befunde weisen zunächst auf eine spezifisch synaptische Lokalisation hin. Da die meisten spezifisch postsynaptisch lokalisierten Proteine in Gewebeschnitten eine starke Färbung von Zellkörpern und Dendriten hervorrufen, dies jedoch im Falle von CAPS1 nicht der Fall ist, kann davon ausgegangen werden, daß CAPS1 präferentiell in präsynaptischen Kompartimenten lokalisiert ist. Dieser Befund unterstützt die unter 4.1.8 beschriebenen biochemischen Daten zur Verteilung von CAPS1.

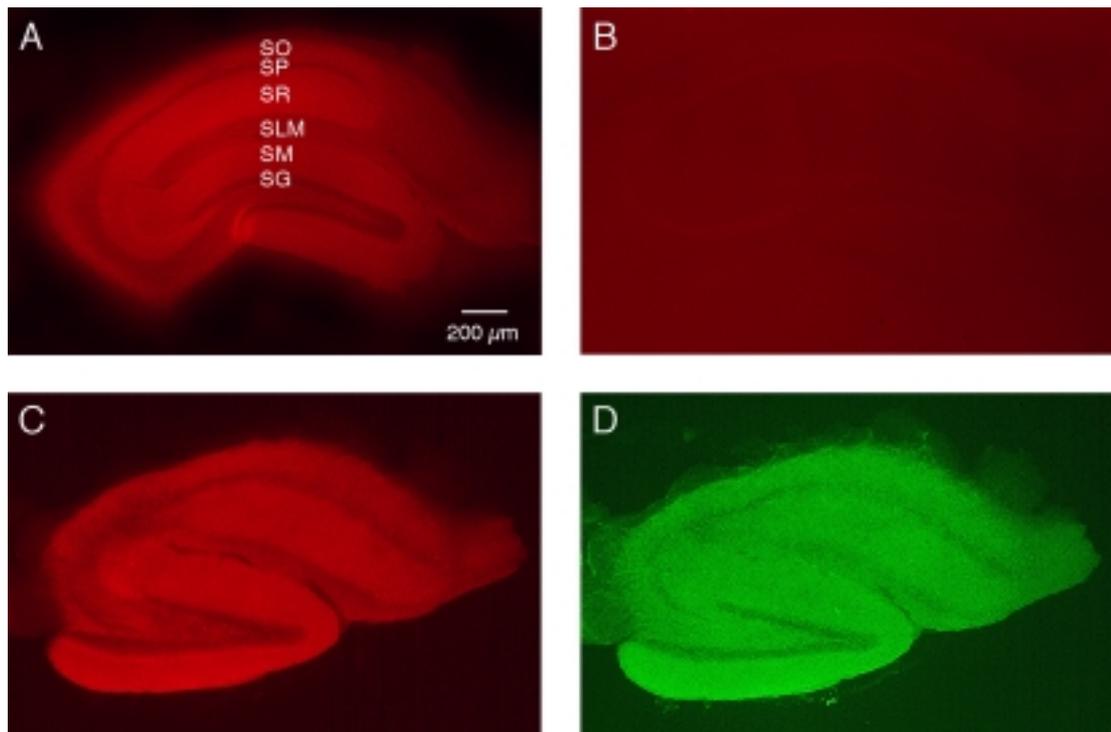


Abb. 10: Lokalisation des CAPS1-Proteins im Hippocampus

Fixierte Gehirnschnitte (30 µm) der Maus wurden mit den indizierten Antikörpern inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper. Als Nachweis für eine spezifische Färbung wurde präabsorbiertes CAPS-Antiserum verwendet. **A:** CAPS1 (rot); **B:** präabsorbiertes Antiserum; **C:** CAPS1 (rot); **D:** Synaptophysin (grün)

(A und C) Die immunhistochemische Färbung von CAPS1 im Hippocampus zeigt eine Verteilung wie sie für synaptische Proteine charakteristisch ist. (D) Es kann eine übereinstimmende Verteilung von CAPS1 und Synaptophysin im Hippocampus gezeigt werden.

SG, Stratum granulosum; SLM, Stratum lacunosum moleculare; SM, Stratum moleculare; SO, Stratum oriens; SP, Stratum pyramidale; SR, Stratum radiatum.

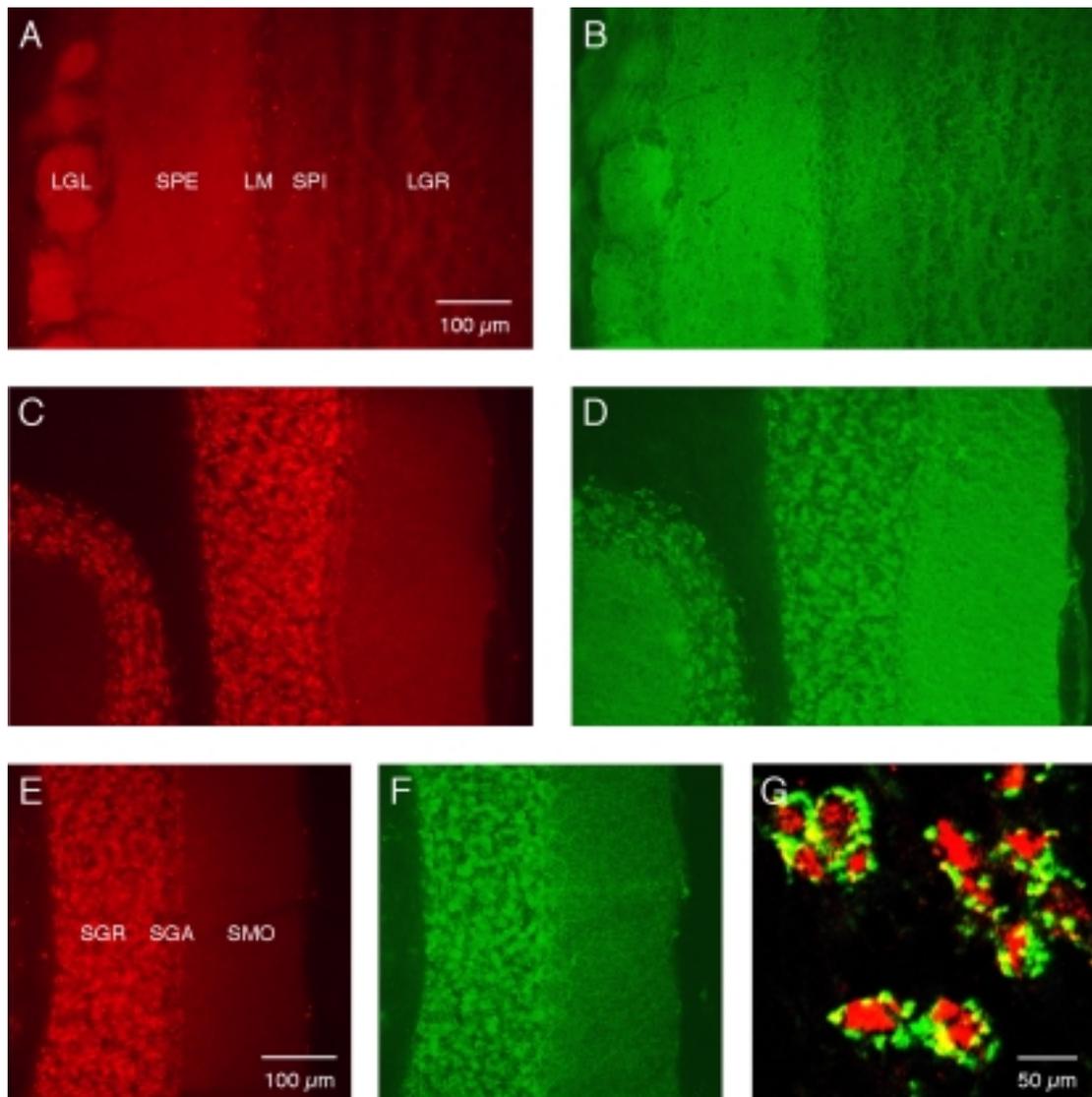


Abb. 11: Lokalisation des CAPS1-Proteins im Bulbus olfactorius und im Cerebellum

Fixierte Gehirnschnitte (30 μm) der Maus wurden mit den indizierten Antikörpern inkubiert. Die Detektion erfolgte mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern. **A:** CAPS1 (rot); **B:** Synaptophysin (grün); **C:** CAPS1 (rot); **D:** Synaptophysin (grün); **E:** CAPS1 (rot); **F:** GAD (grün); **G:** Doppelfärbung CAPS1 (rot) und GAD (grün)

(A und B) Es kann eine übereinstimmende Verteilung von CAPS1 und Synaptophysin im Bulbus olfactorius gezeigt werden. (C und D) Es kann eine übereinstimmende Verteilung von CAPS1 und Synaptophysin im Cerebellum gezeigt werden. (E und F) Es kann keine übereinstimmende Verteilung von CAPS1 und GAD im Cerebellum gezeigt werden.

(G) Konfokaler Ausschnitt aus E bzw. F zeigt die unterschiedliche Verteilung von CAPS1 und GAD im Cerebellum. LGL, Lamina glomerulosa; SPE, Stratum plexiforma externa; LM, Lamina mitralis; SPI, Stratum plexiforma interna; LGR, Lamina granulosa; SGR, Stratum granulosa; SGA, Stratum ganglionare; SMO, Stratum moleculare.

Um die synaptische Lokalisation von CAPS1 näher zu analysieren wurden der Bulbus olfactorius und das Cerebellum der Maus immunhistochemisch näher untersucht (3.2.26.2). Ähnlich wie im Hippocampus war auch hier die Färbung für CAPS1 spezifisch für synaptische Schichten (Lamina glomerulosa und plexiforme Schichten im Bulbus olfactorius, molekulare Schicht des Cerebellum) (Abb. 11A und C). Eine besonders starke CAPS1-Färbung war in der Schicht der Glomeruli sowie in der externen plexiformen Schicht des Bulbus olfactorius nachweisbar. Wie im

Hippocampus (Abb. 10A und C) waren CAPS1 und Synaptophysin auch im Bulbus olfactorius (Abb. 11A und B) und im Cerebellum (Abb. 11C und D) weitgehend kolokalisiert, so daß auch hier von einer präsynaptischen Lokalisation von CAPS1 ausgegangen werden kann.

Neben der Molekularschicht wies die Körnerzellschicht des Cerebellum eine intensive CAPS1-Färbung auf (Abb. 11C und E). Diese CAPS1-positiven Bereiche sparten die Zellkörper der Körnerzellen aus (Abb. 11G) und überlappten mit Synaptophysin-positiven Bereichen (Abb. 11C und D), nicht jedoch mit GAD-positiven Regionen (Abb. 11G). Eine detailliertere konfokale Analyse der CAPS1-Färbung im Cerebellum zeigte, daß die CAPS1-positiven Bereiche in der Körnerzellschicht des Cerebellums Moosfaserterminalen entsprachen (Abb. 11G, rot), die von GAD-positiven Axonendigungen GABAerger Golgizellen umgeben waren (Abb. 11G, grün). CAPS1 ist somit zumindest im Cerebellum spezifisch in exzitatorischen Synapsen und nicht in inhibitorischen GABAergen Synapsen exprimiert.

4.1.10 Elektronenmikroskopische Lokalisation des CAPS1-Proteins im Cerebellum

Um die subzelluläre Lokalisation von CAPS1 bei optimaler Auflösung zu untersuchen, wurden immunoelektronenmikroskopische Untersuchungen am Cerebellum der Ratte durchgeführt. Unter verschiedenen getesteten Methoden erwies sich die der silberintensivierten DAB-Färbung als die zuverlässigste. Immunogoldverfahren führten trotz wiederholter Versuche nicht zum Erfolg. Mit Hilfe der silberintensivierten DAB-Färbung wurden Cerebellumschnitte gefärbt und elektronenmikroskopisch untersucht (3.2.26.3).

Die CAPS1-Färbung in der Körnerzellschicht war weitestgehend auf die wegen ihrer Größe gut identifizierbaren Terminalen von exzitatorischen, glutamatergen Moosfaseraxonen in den Glomeruli cerebellares beschränkt (Abb. 12A), während postsynaptische Strukturen ungefärbt blieben.

In der Molekularschicht waren lediglich die präsynaptischen Kompartimente exzitatorischer Synapsen zwischen Parallelfaseraxonen und Purkinjezellendriten

CAPS1-positiv, während inhibitorische präsynaptische Strukturen keine CAPS1-Färbung aufwiesen (Abb. 12B). Diese Befunde bestätigen die lichtmikroskopischen Daten aus Doppelfärbungen des Cerebellums mit Antikörpern gegen CAPS1 und GAD (Abb. 11G) und liefern einen weiteren Nachweis für eine spezifische Lokalisation von CAPS1 in exzitatorischen, glutamatergen Synapsen.

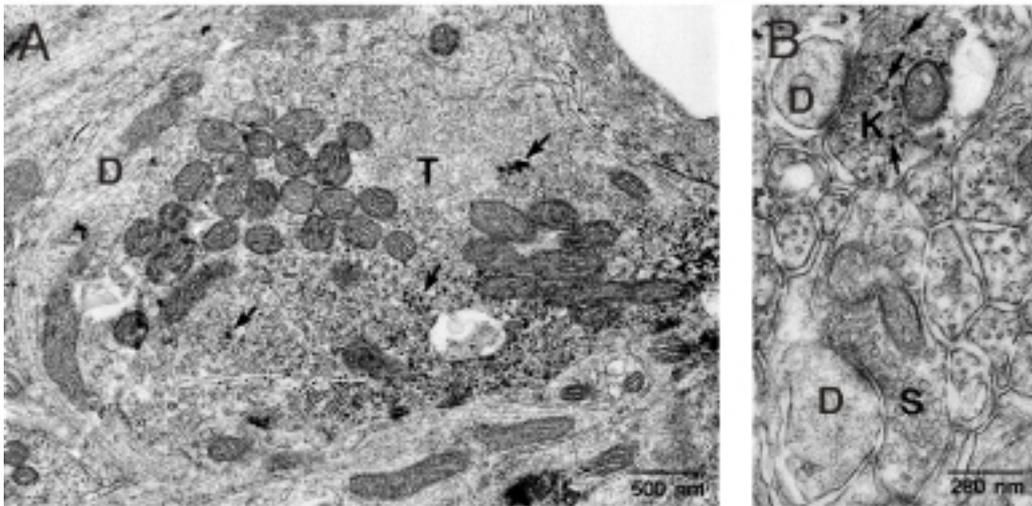


Abb. 12: Lokalisation des CAPS1-Proteins in Synapsen des Cerebellums

CAPS1-Protein wurde mit der unter 3.2.26.3 beschriebenen Methode in Cerebellumschnitten detektiert. Bei dieser silberintensivierten DAB-Methode zeigen sehr elektronendichte granuläre Präzipitate die Anwesenheit von CAPS1-Protein an.

A: Glomerulus cerebellaris in der Körnerzellschicht des Cerebellums einer Ratte. Der Glomerulus wird durch den mit Vesikeln gefüllten, präsynaptischen Endkopf einer Moosfaser gebildet (T) und ist mit Silberpräzipitaten (Pfeile) gefüllt. Der benachbarte Dendrit einer Körnerzelle (D) ist nicht gefärbt.

B: Ausschnitt aus dem Stratum moleculare des Cerebellums einer adulten Ratte. Zwei benachbarte Synapsen sind gezeigt, von denen nur eine (oben, D/K) eine postsynaptische Verdichtung aufweist und daher exzitatorisch (Typ 1) ist, während die andere (unten) keine ausgeprägte postsynaptische Spezialisierung besitzt und inhibitorisch (Typ 2) ist. Lediglich die exzitatorische Synapse, die wahrscheinlich zwischen dem erregenden Parallelfaseraxon einer Körnerzelle (K) und dem Dendriten einer Purkinjezelle gebildet wird, ist CAPS1-positiv (Pfeile). Die benachbarte inhibitorische Synapse, die wahrscheinlich von einem inhibitorischen Sternzellaxon und einem Purkinjezellendriten gebildet wird, enthält kein CAPS1.

4.2 Erzeugung und Analyse CAPS1-deletionsmutanter Mäuse

Der Phänotyp von Unc-31-Mutanten in *C. elegans* ist nicht letal. Unc-31-Mutanten besitzen ein anatomisch normales Nervensystem, sind jedoch lethargisch, pumpen konstitutiv, weisen einen Eilege-Defekt auf und sind nicht in der Lage sich vom Dauerlarvenstadium zu erholen (Avery et al., 1993). Die Tatsache, daß Unc-31-Mutanten insensitiv gegenüber Acetylcholinesteraseinhibitoren sind, läßt auf eine mögliche Funktion von Unc-31 bei der Transmittersekretion schließen. Da es bis vor kurzem jedoch nicht möglich war, elektrophysiologische Messungen in *C. elegans* durchzuführen, ist bis heute unklar, welche Funktion Unc-31 in *C. elegans* hat und wie es zu den beobachteten phänotypischen Veränderungen kommt.

Die einzigen bis heute publizierten Daten zur funktionellen Rolle von Unc-31 sowie CAPS1 stammen aus Experimenten, in denen Sekretionsprozesse *in vitro* gemessen wurden (Ann et al., 1997; Tandon et al., 1998) bzw. in denen fragwürdige Antikörperinjektionen zur Perturbation der CAPS1-Funktion *in vivo* herangezogen wurden (Elhamdani et al., 1999; Rupnik et al., 2000).

Um ein leicht manipulierbares und mit modernen biochemischen, morphologischen und physiologischen Methoden analysierbares Modellsystem zur Untersuchung der CAPS1-Funktion zu schaffen, wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit eine Maus-Deletionsmutante erzeugt, die kein CAPS1 exprimiert. Ziel war dabei, auf dem Wege einer detaillierten Analyse von CAPS1-Deletionsmutanten Aufschluß über die Funktion dieses Proteins *in vivo* zu erhalten.

4.2.1 Konstruktion des Rekombinationsvektors zur CAPS1-Deletion in Mäusen

Die Einführung einer Deletionsmutation in einem definierten Abschnitt im Mausgenom erfolgt über homologe Rekombination. Aus diesem Grund ist es für die Erzeugung eines Rekombinationsvektors notwendig, die genomische DNA-Sequenz des Zielgens zu kennen. Bei der klassischen Strategie zur Deletion eines Proteins repräsentiert der Rekombinationsvektor eine Kombination aus Zielensequenzen und

Selektionsmarkern, die dazu führt, daß nach erfolgter homologer Rekombination des Rekombinationsvektors mit dem Zielgen ein oder mehrere Exone des Zielgens deletiert und so die Erzeugung eines funktionsfähigen Transkriptes (mRNA) und des entsprechenden Proteins verhindert werden.

Zur Isolierung genomischer CAPS1-Sequenzen wurde die Lambda FIX II library mit genomischen *inserts* aus SV129-Mäusen wie unter 3.2.22 beschrieben verwendet. Zur Identifikation genomischer CAPS1-Klone in der genomischen Bibliothek wurde eine 556 bp große cDNA-Sonde mittels PCR (3.2.10) amplifiziert (Oligonukleotide: 1051/1052), welche die Sequenz 963–1518 bp der CAPS1-cDNA aus Ratte repräsentiert. Von den 2×10^6 ausplattierten Plaques der Bibliothek wurden fünf positive Plaques mit dieser CAPS1-Sonde identifiziert. Von allen fünf Plaques wurde eine Einzelplaqueisolierung durchgeführt. Sämtliche DNAs dieser Einzelplaques wurden nach Hybridisierung mit der CAPS1-Sonde mittels Southern-Blot-Analyse (3.2.13) als positiv identifiziert. Die *inserts* dieser λ -Phagen-DNA wurden mittels des Restriktionsenzym Not I isoliert und in den Vektor pBluescript-KS subkloniert (3.2.9). Zwei der erfolgreich subklonierten Klone wurden mittels Southern Blot-Analyse (3.2.13) erneut als CAPS1-positiv identifiziert und restriktionskartiert (Restriktionsenzyme: Not I, BamH I, Bgl II, EcoR I, EcoR V, Nhe I, Sma I, Spe I, Xba I, Xho I). Die Restriktionsfragmente wurden anschließend mittels Southern-Blot analysiert (3.2.13). Restriktionsfragmente, die mit der CAPS1-Sonde hybridisierten und daher Exone enthielten, wurden in pBluescript-KS subkloniert (3.2.9), sequenziert (3.2.1) und hinsichtlich der Exon-Intron-Grenzen kartiert. Für die Konstruktion des Rekombinationsvektors (Abb. 13) wurde auf den genomischen Klon pBS-CAPS 8.2 zurückgegriffen, welcher zwei Exone enthält (homolog zu Sequenzen: 1026-1258 bp und 1259-1380 bp der CAPS1-cDNA aus Ratte). Um das 3'-gelegene Exon (Sequenz: 1259-1380 bp bzw. Aminosäuren 399-439 von CAPS1) zu deletieren, wurde dieses im Rekombinationsvektor durch eine Neomycin-Resistenzgenkassette ersetzt. Dazu wurde mittels PCR (3.2.10) (Oligonukleotide: 1179/1180) ein 3' zum zu deletierenden Exon gelegenes, etwa 2.8 kb großes Fragment aus der genomischen DNA amplifiziert, in pCR2.1-TOPO subkloniert, mit Hilfe der Restriktionsenzyme Not I und Spe I aus dem pCR2.1-TOPO-Subklon ausgeschnitten und in dieselben Schnittstellen von pTKNeo3a ligiert (3.2.9).

Es entstand pTKNeo-CAPS-KOV(*short arm*). Ein etwa 6 kb großes genomisches Fragment wurde mittels der Restriktionsenzyme Sma I und EcoR V aus der genomischen DNA isoliert und in die Hinc II-Schnittstelle von pBluescript KS subkloniert (3.2.9). Das Insert eines pBluescript-Subklones mit der richtigen Orientierung relativ zu den die Hinc II-Schnittstelle flankierenden Cla I- und Xho I-Schnittstellen wurde mit Cla I und Xho I ausgeschnitten und in die Cla I- und Sal I-Schnittstelle von pTKNeo-CAPS-KOV(*short arm*) ligiert (3.2.9), um den kompletten Rekombinationsvektor pCAPS-KOV zu erhalten. Dieser Rekombinationsvektor wurde restriktionsanalytisch und sequenzanalytisch auf seine Richtigkeit überprüft.

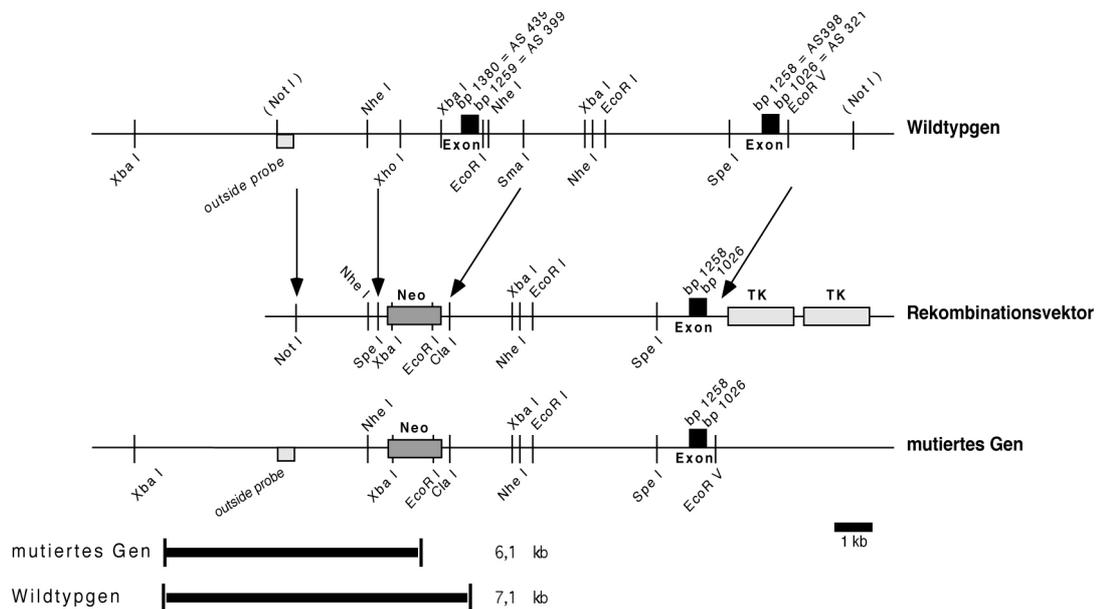


Abb. 13: Strategie zur Deletion des CAPS1-Proteins in Mäusen

Das Diagramm zeigt einen Teil des Wildtyp-CAPS1-Gens (oben), den Rekombinationsvektor für die Deletionsmutation (Mitte) sowie das nach homologer Rekombination deletionsmutierte CAPS1-Gen (unten). Die Positionen kartierter Restriktionsenzym-Schnittstellen und Exone sowie die Sequenz der zur Southern-Blot-Analyse verwendeten cDNA-CAPS1-Sonde (*outside probe*) sind eingezeichnet.

4.2.2 Erzeugung von CAPS1-deletionsmutanten Mäusen

Zur Erzeugung CAPS1-defizienter Mäuse wurden ES-Zellen der Mauslinie *SV129* (E14) mit dem konstruierten Rekombinationsvektor durch Elektroporation transfiziert (3.2.23.4). Über Neomycinresistenzselektion (3.2.23.5) wurden ES-Zellen, in denen ein Rekombinationsereignis stattgefunden hatte, selektiert (positive Selektion). ES-Klone, welche den Rekombinationsvektor zufällig integriert hatten und deshalb die Thymidinkinase-Gene des Rekombinationsvektors enthielten, wurden durch die Selektion mit Gancyclovir (3.2.23.5) eliminiert (negative Selektion). Es wurden 96 der auf diese Weise doppelt selektierten ES-Zellklone

vereinzelt (3.2.23.6) und mittels Southern-Blot (3.2.23.8) analysiert. Zur Identifizierung der genomischen Deletion wurde die genomische DNA der ES-Klone in einem analytischen Restriktionsansatz mit dem Enzym Xba I geschnitten. Der Southern-Blot der geschnittenen DNA wurde mit einer Sonde (*outside probe*) hybridisiert, welche aus dem 3' zum Zielvektor gelegenen genomischen Bereich mit den Oligonukleotiden 1183 und 1184 durch PCR amplifiziert wurde (Abb. 13). Im Fall des deletionsmutanten Allels hybridisiert aufgrund der induzierten Deletion eine im Vergleich zum Wildtypallel um etwa 1 kb kleinere Xba I-Bande mit der CAPS1-cDNA-Sonde (Abb. 13). Von den 96 analysierten ES-Zellklonen konnten vier Klone mit homologer Rekombination identifiziert werden.

Der positive ES-Zellklon D4 wurde expandiert und für die Blastozysteninjektion vorbereitet (3.2.23.9). Die rekombinanten ES-Zellen (Mauslinie *SV129*) wurden in 3.5 Tage alte Blastozysten der Mauslinie *C57Bl/6* injiziert, welche dann in den Uterus pseudoschwangerer Mäuse (Mauslinie *C57Bl/6*) implantiert wurden. Die resultierenden chimären Mäuse enthielten Anteile beider Mauslinien. Entscheidend für den Aufbau einer rekombinanten Mauslinie ist die Beteiligung der mutierten ES-Zellen an der Keimbahnpopulation der Chimäre. Der Anteil der ES-Zellen an der chimären Maus kann anhand der Fellfarbe abgeschätzt werden. Die für diese Arbeiten verwendeten ES-Zellen stammten von männlichen Embryonen einer Mauslinie mit brauner Fellfarbe (*SV129*), während die Blastozystenspendermäuse (*C57Bl/6*) eine schwarze Fellfarbe besitzen. Hochgradig chimäre männliche Mäuse (>75% braun) wurden für die Kreuzung mit weiblichen Mäusen der Mauslinie *C57Bl/6* ausgewählt. Gemäß der Mendel-Regel waren 50 % der dann geborenen F1-Generation mit brauner Fellfarbe heterozygot bezogen auf die CAPS1-Deletion. Verpaarungen der heterozygoten Tiere aus der F1-Generation führten gemäß der Mendel-Regel bei 25 % der Tiere der F2-Generation zu homozygoten CAPS1-Deletionsmutanten.

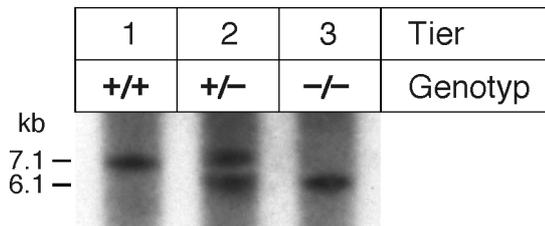


Abb. 14: Southern-Blot-Analyse von CAPS1-mutanten Mäusen

Genomische DNA von Mäusen wurde mit dem Restriktionsenzym Xba I geschnitten und auf Nylonmembranen transferiert. Die Membran wurde anschließend mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert, deren Sequenz aus einem Bereich 3' der für die Zielvektorkonstruktion gewählten genomischen Sequenz stammt (*outside probe* in Abb. 13).

In Abhängigkeit vom CAPS1-Genotyp der Tiere (+/+, Wildtyp; +/-, heterozygote Mutante; -/-, homozygote Mutante) erscheinen nur das Wildtypallel (7.1 kb), nur das Deletionsmutantenallel (6.1 kb) oder beide Allele.

4.2.2.1 Genetischer Nachweis der CAPS1-Deletion

Zur Genotypisierung mutanter Mäuse wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien isoliert (3.2.5.4) und wie für die Untersuchung genomischer ES-Zell-DNA beschrieben (3.2.13) mittels Southern-Blot analysiert (Abb. 14). Nachdem mittels der Southern-Blot-Analyse eine homologe Rekombination eindeutig identifiziert worden war, wurde für die weitere routinemäßige Genotypisierung der Nachkommen dieser heterozygoten Mäuse eine PCR-Strategie angewandt (3.2.10). Für das Wildtypallel wurden hierzu die Oligonukleotide 1503/1504 (380 bp PCR-Fragment) ausgewählt, von denen das Oligonukleotid 1503 homolog zu einem Sequenzabschnitt des durch die homologe Rekombination deletierten Genabschnitts ist, während das Oligonukleotid 1504 im flankierenden Bereich der Neomycin-Resistenzgenkassette hybridisiert. Zur PCR-Detektion des Deletionsmutanten-Allels (465 bp PCR-Produkt) wurde das Oligonukleotid 1504 gemeinsam mit dem Oligonukleotid 1502 verwendet, das im Bereich der Neomycin-Resistenzgenkassette hybridisiert (Abb. 15).

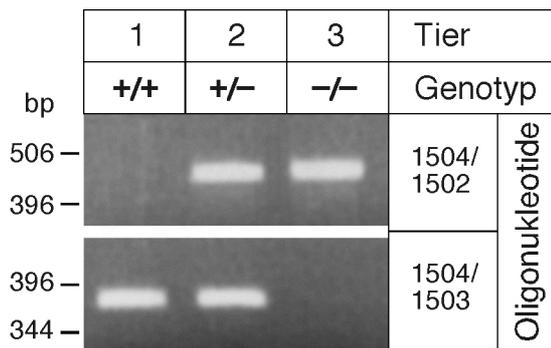


Abb. 15: PCR-Analyse zur Genotypisierung von CAPS1-mutanten Mäusen

Genomische DNA von Mäusen wurde jeweils in einer PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden 1504/1503 auf Anwesenheit des Wildtypallels und mit 1504/1502 auf Anwesenheit des Deletionsmutanten-Allels analysiert. In Abhängigkeit vom CAPS1-Genotyp der Tiere (+/+, Wildtyp; +/-, heterozygote Mutante; -/-, homozygote Mutante) erscheinen nur das Wildtyp-PCR-Produkt (380 bp), nur das Deletionsmutanten-PCR-Produkt (465 bp) oder beide PCR-Produkte.

4.2.2.2 Biochemischer Nachweis der CAPS1-Deletion

Um nachzuweisen, daß die in das CAPS1-Gen eingeführte Mutation tatsächlich auch die CAPS1-Proteinsynthese verhindert, wurden Gehirnhomogenate neugeborener Mäuse, die aus einer Verpaarung zweier heterozygoter Mutanten hervorgegangen waren, mit spezifisch gegen CAPS1 gerichteten Antikörpern mittels Immunoblot (3.2.20) analysiert. Die Analyse mit dem gegen den N-Terminus von CAPS1 (3.2.21) gerichteten Antikörper zeigte, daß homozygote Mutanten kein CAPS1-Protein exprimierten, während heterozygote Tiere eine den Wildtypkontrollen gegenüber um etwa 50 % herabgesetzte CAPS1-Proteinexpression aufwiesen (Abb. 16).

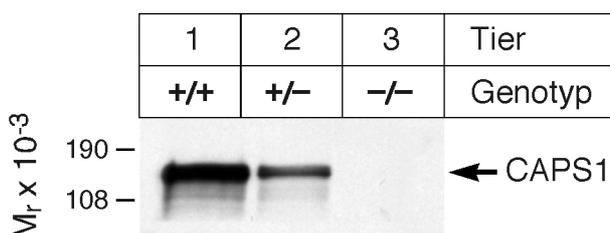


Abb. 16: Immunoblot-Analyse der Gehirne von CAPS1-mutanten Mäusen

Gehirnhomogenate von neugeborenen Mausmutanten (20 µg Protein/Spur) wurden mit dem isoformspezifischen, gegen den N-terminus von CAPS1 gerichteten Antikörper α CAPS1 mittels Immunoblot analysiert. Immunreaktive Banden wurden mit ECL visualisiert. Die in den Wildtyptieren und heterozygoten Tieren vorhandene CAPS1-Bande von 145 kD fehlt im Gehirnhomogenat der Deletionsmutanten.
+/+, Wildtyp; +/-, heterozygote Mutante; -/-, homozygote Mutante.

Neben der vollständigen Elimination von intaktem CAPS1-Protein (145 kDa) in Deletionsmutanten waren auch keine C-terminal trunkierten Formen detektierbar

(nicht gezeigt). Solche trunkierten Formen könnten prinzipiell entstehen, wenn das Neomycin-Resistenzgen aus der mutierten mRNA herausgespleißt wird. In diesem Fall käme es bei der hier verwendeten Deletionsstrategie zu einer Leserahmenverschiebung und einem auf etwa 35 kDa trunkierten CAPS1-Genprodukt. Eine solche CAPS1-Form war in Deletionsmutanten nicht detektierbar (nicht gezeigt).

4.2.3 Analyse von CAPS1-deletionsmutanten Mäusen

4.2.3.1 Allgemeine phänotypische Charakterisierung

Die Wurfgröße nach Verpaarung von zwei heterozygoten CAPS1-Mutanten betrug im Mittel 7 Tiere und lag damit im Normbereich. Dabei entsprach bei Neugeborenen der Anteil der verschiedenen Genotypen am Gesamtwurf der erwarteten Mendel-Verteilung (1:2:1; 41 +/+, 81 +/-, 41 -/- bei 163 analysierten Tieren).

Homozygote CAPS1-deletionsmutante Mäuse zeigten keine pränatalen Entwicklungsstörungen und verhielten sich kurz nach der Geburt oder einer *sectio caesare* phänotypisch normal. Sie reagierten auf taktile Reize mit normalen Reflexen und zeigten normale Atembewegungen. Etwa 30 Minuten nach Geburt oder *sectio caesare* jedoch verlangsamte sich die Atemfrequenz und die Tiere starben. Offensichtlich ist das CAPS1-Protein bereits zum Zeitpunkt der Geburt essentiell für die Lebensfähigkeit. Allerdings gibt die Art des Todes neugeborener CAPS1-Deletionsmutanten keinen Aufschluß darüber, welche Störung den Tod herbeiführt.

4.2.3.2 Lichtmikroskopische Analyse des Gehirns

Für eine vergleichende morphologische Analyse des Gehirns von CAPS1-Deletionsmutanten und Wildtyptieren wurden immersionsfixierte Kryoschnitte von Gehirnen neugeborener Mäuse angefertigt und mit Kresylviolett gefärbt (3.2.26.1). Diese Methode dient der Färbung von Nissl-Granula und Zellkernen von Neuronen und Gliazellen.

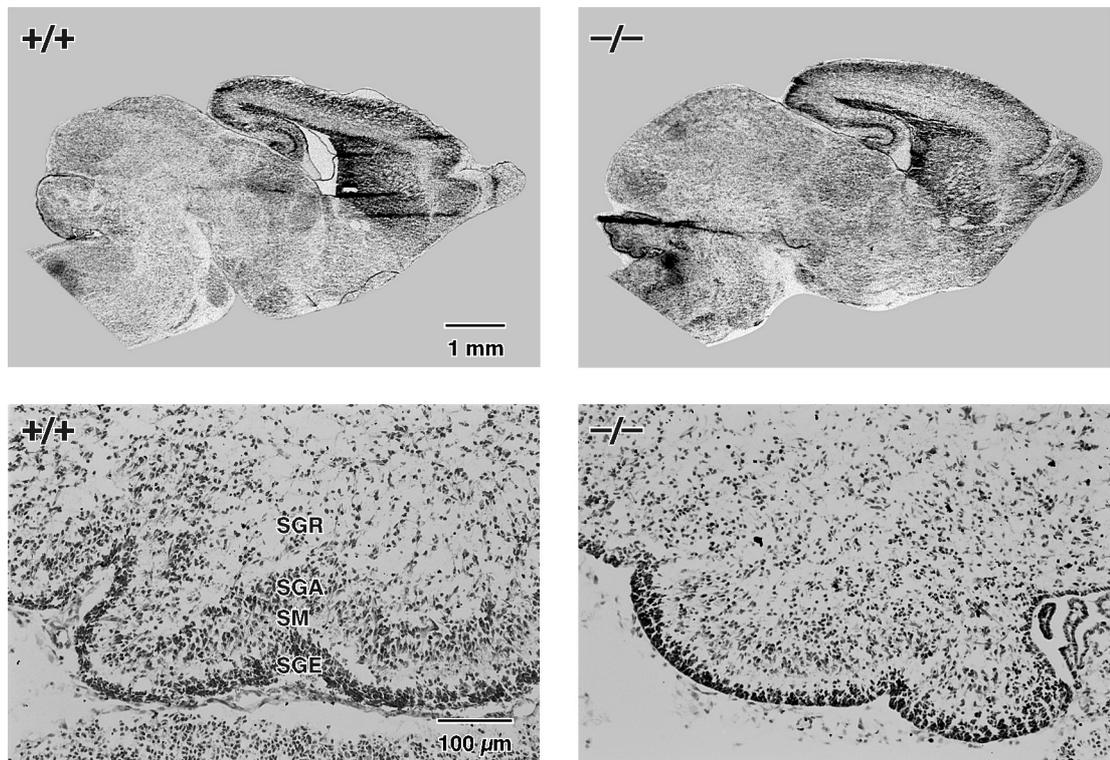


Abb. 17: Zellulärer Aufbau der Gehirne von neugeborenen CAPS1-Deletionsmutanten

Kryoschnitte (8 μ m) des Gehirns von neugeborenen Deletionsmutanten und Wildtypen wurden mit Kresylviolett gefärbt. Die Abbildung zeigt einen Überblick über die Zytoarchitektur des Gehirns eines Wildtypembryos und einer Deletionsmutante (oben) sowie einen Ausschnitt aus dem sich entwickelnden Cerebellum eines Wildtypembryos und einer Deletionsmutante (unten). Es sind keinerlei zytostrukturelle Unterschiede zwischen Wildtyp und Deletionsmutante nachzuweisen.

+/+, Wildtyp; **-/-**, Deletionsmutante; SGR, Stratum granulosum; SGA, Stratum ganglionare; SM, Stratum moleculare; SGE, Stratum germinale externum

Die Gehirne neugeborener CAPS1-deletionsmutanter Mäuse zeigten eine vom Wildtyp nicht unterscheidbare Kompartimentierung, Zelldichte, Zellverteilung, Schichtung und Zytoarchitektur (Abb. 17). Der komplette Verlust des CAPS1-Proteins hat also keine Auswirkungen auf die Entwicklung und Morphogenese des Gehirns.

4.2.3.3 Lichtmikroskopische Analyse der Nebenniere

Neben dem Gehirn sind die Nebennieren der Hauptexpressionsort des CAPS1-Proteins. Um auch in diesem Gewebe einen Effekt der CAPS1-Deletion auf die Organentwicklung und Morphogenese ausschließen zu können, wurden Nebennieren von Deletionsmutanten und Wildtypen morphologisch untersucht. Wie im Falle des Gehirns wurden zu diesem Zweck mit Kresylviolett gefärbte Kryoschnitte

angefertigt (3.2.26.1). Obwohl die embryonale Nebenniere noch nicht die für das adulte Organ typische, detaillierte Gliederung erkennen läßt, waren sowohl in CAPS1-Deletionsmutanten als auch in Wildtypieren Medulla- und Cortexbereiche der Nebenniere zu erkennen (Abb. 18). Insgesamt waren hinsichtlich der Zytoarchitektur der Nebennieren keine Unterschiede zwischen CAPS1-Deletionsmutanten und Wildtypieren erkennbar.

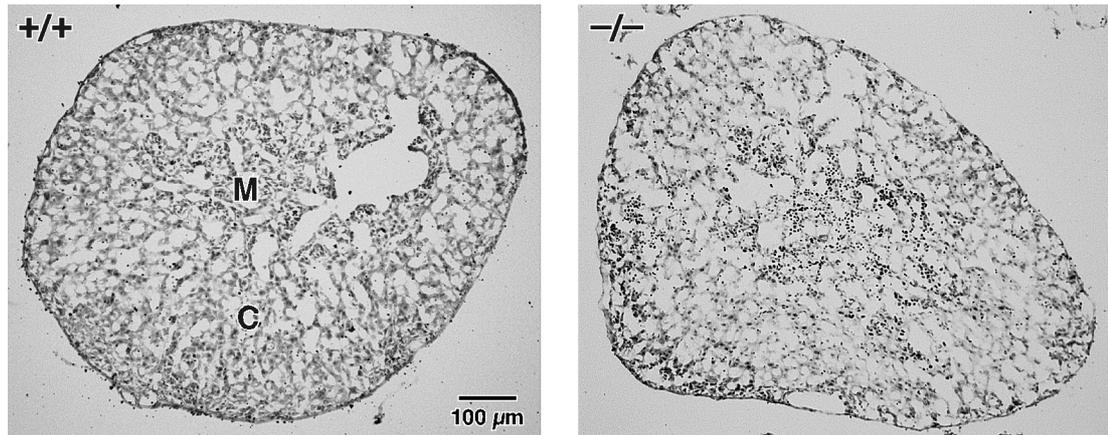


Abb. 18: Zellulärer Aufbau der Nebennieren von neugeborenen CAPS1-Deletionsmutanten

Kryoschnitte (8 µm) der Nebennieren von neugeborenen Deletionsmutanten und Wildtypieren wurden mit Kresylviolett gefärbt. Die Abbildung zeigt die Nebenniere eines Wildtypembryos und einer Deletionsmutante. Es sind keinerlei zytostrukturelle Unterschiede zwischen Wildtyp und Deletionsmutante nachzuweisen. +/+, Wildtyp; -/-, Deletionsmutante; M, Medulla; C, Cortex

4.2.3.4 Biochemische Analyse

Die morphologische Analyse der CAPS1-Deletionsmutanten zeigte, daß der komplette Verlust von CAPS1 keine Konsequenzen für die Anatomie und Zytoarchitektur von Gehirn und Nebenniere hat. Der beobachtete letale Phänotyp der CAPS1-Deletionsmutanten wird daher offensichtlich nicht durch grobe Fehlentwicklungen der üblicherweise CAPS1 exprimierenden Gewebe (insbesondere Gehirn und Nebenniere) verursacht, sondern resultiert wahrscheinlich aus subtileren Fehlfunktionen der Zellen in diesen Geweben. Um ersten Aufschluß über die möglichen zellulären und molekularen Konsequenzen der CAPS1-Deletion zu erhalten, wurden die Expressionslevels ausgewählter Proteine in Gehirn und Nebenniere bestimmt. Ausgangspunkt dieser Experimente war die Annahme, daß der Verlust von CAPS1 in Gehirn und Nebenniere von Mutanten den Membranverkehr in diesen Geweben stören und so die Stabilität und Halbwertszeit von Markerproteinen beeinflussen könnte. Ein ähnliches Vorgehen hat bei der Analyse

einer Reihe von Maus-Deletionsmutanten bereits interessante Informationen über ausgeprägte biochemische und zellbiologische Konsequenzen der Deletionen geliefert (siehe z.B. Rosahl et al., 1995).

4.2.3.4.1 Biochemische Analyse des Gehirns

Um zu überprüfen, ob die CAPS1-Deletion im Gehirn von Mutanten zu starken Veränderungen im Lebenszyklus sekretorischer Vesikel führt, wurden zunächst die Expressionslevels von Markerproteinen für synaptische Vesikel (Synaptotagmin1, Synaptobrevin2) und für LDCVs (Secretogranin2) untersucht. Darüberhinaus wurden die Expressionslevels von Munc13-1 bestimmt da CAPS1 in einem C-terminal gelegenen Sequenzabschnitt homolog zu Munc13-1 ist (MHD; Abb. 3). Dieser Sequenzabschnitt ist essentiell für die Funktion von Munc13-1 als *priming*-Faktor und CAPS1 könnte aufgrund dieser Sequenzhomologie eine ähnliche Funktion im regulierten Sekretionsprozeß wahrnehmen. Zur Analyse der Proteinexpressionslevels wurden Gehirnhomogenate von jeweils drei homozygoten CAPS1-Deletionsmutanten und drei Wildtyp-Geschwistertieren mittels SDS-PAGE (3.2.19) aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert (3.2.20.1) und mit gegen die ausgewählten Markerproteine gerichteter primärer Antikörpern mittels Immunoblot analysiert (3.2.20.2). Die Detektion der Primärantikörper erfolgte im Anschluß mit [¹²⁵I]-konjugierten Sekundärantikörpern (3.2.24.1). Das resultierende radioaktive Signal wurde im Phosphoimager quantifiziert (3.2.24.2), wobei die Signalstärke proportional zur Proteinmenge ist. Obwohl in jeder Spur die entsprechend einer Proteinkonzentrationsbestimmung (3.2.18) gleiche Proteinmenge geladen wurde, erfolgte in jedem Falle ein Abgleich des gemessenen Signals gegen einen internen Standard. Als interner Standard diente Neuroligin1 (117 kD), ein postsynaptisch lokalisiertes Zelladhäsionsmolekül (Song et al., 1999), dessen Expressionslevels zuvor untersucht worden waren und durch die CAPS1-Deletion nicht beeinflusst werden (102 % der Wildtypkontrolle). Die quantitative Analyse der Proteinexpression zeigte, daß in homozygoten Mutanten neben der totalen Elimination von CAPS1 die Expressionslevels von Synaptobrevin2 (160 % des Wildtypwertes), nicht jedoch die der anderen untersuchten Proteine von den Wildtypwerten abwich (Abb. 19).

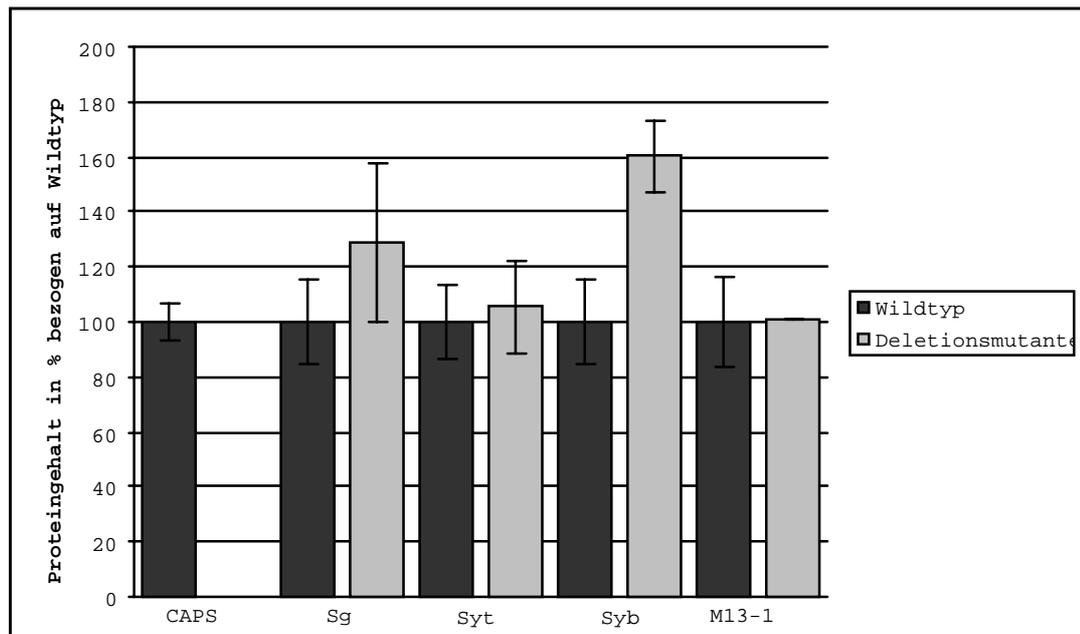


Abb. 19: Quantifizierung von Proteinen im Gehirn neugeborener CAPS1-Deletionsmutanten

Gehirnhomogenate von neugeborenen CAPS1-Deletionsmutanten und Wildtyptieren (20 µg Protein/Spur) wurden mit Antikörpern gegen die induzierten Proteine mittels Immunoblot analysiert. Die Detektion der immunreaktiven Banden erfolgte mit Hilfe von [¹²⁵I]-konjugierten sekundären Antikörpern. Die Intensität der Proteinbanden im Immunoblot wurde im Phosphoimager quantifiziert. Gezeigt sind auf den Wildtypwert normalisierte Mittelwerte von jeweils drei Tieren. Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

Sg, Secretogranin2; Syt, Synaptotagmin1; Syb, Synaptobrevin2; M13-1, Munc13-1

4.2.3.4.2 Biochemische Analyse der Nebennieren

Bei der Analyse des Proteingehalts der Nebennieren von CAPS1-Deletionsmutanten wurde wie unter 4.2.3.4.1 für Gehirne beschrieben vorgegangen. Aufgrund der extrem niedrigen Expressionslevels der untersuchten Markerproteine mußten jedoch für die Bestimmung von Proteinlevels die Nebennieren von jeweils fünf neugeborenen CAPS1-Deletionsmutanten bzw. Kontrolltieren vereinigt werden. Für die Analyse wurden die Nebennieren homogenisiert, über SDS-PAGE (3.2.19) aufgetrennt und wie unter 4.2.3.4.1 beschrieben mit spezifischen Primärantikörpern analysiert. Als Markerproteine dienten Secretogranin2 (für LDCVs), Synaptotagmin1 (für kleine sekretorische Vesikel und LDCVs), sowie Syntaxin als Komponente des Fusionsapparates und Munc18-1 als dessen Regulator. Die Expressionslevels von Munc13-Proteinen liegen in den Nebennieren neugeborener Tiere unterhalb der Detektionsgrenze aller verfügbaren Detektionsmethoden und wurden nicht untersucht. Aufgrund der generell sehr niedrigen Expressionslevels der untersuchten Proteine wurden nicht nur mehrere Nebennieren für die Analyse vereinigt, sondern auch HRP-konjugierte Sekundärantikörper und das ECL-Verfahren zur Detektion immunreaktiver Banden verwendet (3.2.20.2). ECL-Signale wurden anschließend

densitometrisch quantifiziert (Agfa-Photo-Look 3.00.07), wobei nur Signale analysiert wurden, bei denen die Filmschwärzung im linearen Bereich des Films lag. Die quantitative Analyse der Nebennierenproteine ergab, daß die CAPS1-Expression in Nebennieren homozygoter Mutanten komplett eliminiert war (Abb. 20). Der Restwert von 8.5 % resultiert aus Hintergrundfärbung, welche durch die notwendigen langen Expositionszeiten der Filme verursacht wurde. Alle anderen untersuchten Proteine wurden in homozygoten CAPS1-Mutanten in Mengen detektiert, die den Wildtypwerten vergleichbar waren (Abb. 20).

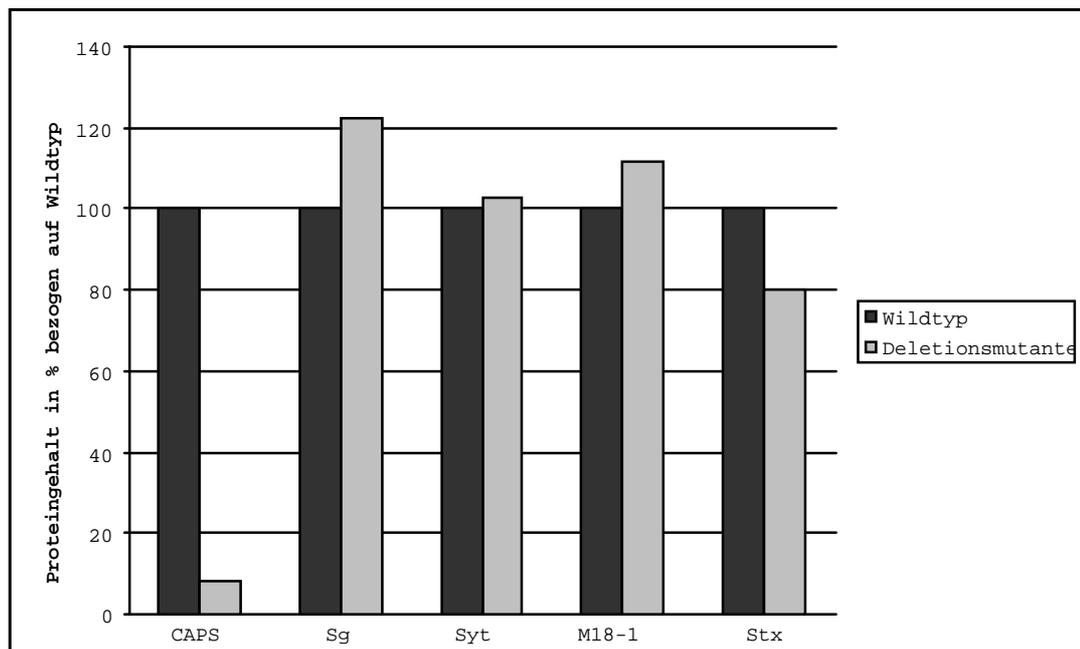


Abb. 20: Quantifizierung von Proteinen in Nebennieren neugeborener CAPS1-Deletionsmutanten

Nebennierenhomogenate von neugeborenen CAPS1-Deletionsmutanten und Wildtyp-Kontrolltieren (15 µg Protein/Spur) wurden mit Antikörpern gegen die indizierten Proteine mittels Immunoblot analysiert. Die Detektion der immunreaktiven Banden erfolgte mit Hilfe von HRP-konjugierten sekundären Antikörpern. Die Intensität der Proteinbanden im Immunoblot wurde densitometrisch quantifiziert.

Sg, Secretogranin2; Syt, Synaptotagmin1; M18-1, Munc18-1; Stx, Syntaxin1

4.2.3.5 Ultrastrukturelle Analyse des Rückenmarks

Die bei weitem stärkste Expression des CAPS1-Proteins ist in präsynaptischen Axonterminalen des zentralen Nervensystems zu beobachten (Abb. 11). Um zu untersuchen, ob der Verlust von CAPS1 zu Fehlbildungen von Synapsen führt, wurde eine ultrastrukturelle Analyse von synaptischen Strukturen im zentralen Nervensystem neugeborener CAPS1-Deletionsmutanten vorgenommen (3.2.26.4). Da die klassischerweise in diesem Zusammenhang untersuchten Hirnregionen wie etwa Cortex oder Hippocampus zum Zeitpunkt der Geburt noch relativ wenig

entwickelt sind und daher nur wenige Synapsen enthalten, wurde für diese Studie das Rückenmark untersucht. Hier werden signifikante Mengen des CAPS1-Proteins exprimiert (Abb. 8) und es existieren bereits bei der Geburt genügend viele Synapsen in hinreichender Dichte, um eine Analyse zu ermöglichen. Es wurden bei der Analyse von Synapsen des Rückenmarks neugeborener CAPS1-Deletionsmutanten keine morphologischen Besonderheiten detektiert. Sowohl inhibitorische/symmetrische (Abb. 21A) als auch exzitatorische/asymmetrische (Abb. 21B) Synapsen waren vorhanden. Dieser Befund korreliert gut mit der Beobachtung, daß neugeborene CAPS1-Deletionsmutanten nach taktiler Stimulation normale Reflexe aufweisen (4.2.3.1).

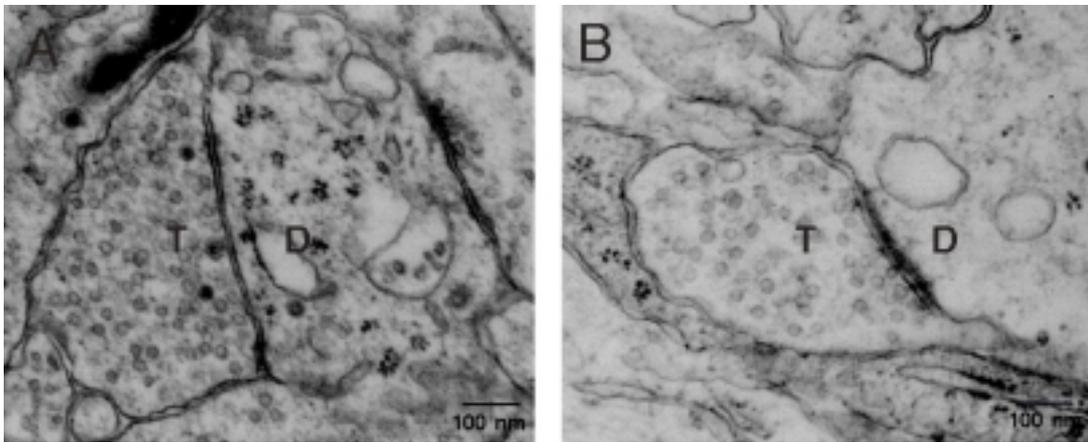


Abb. 21: Ultrastrukturelle Analyse des Rückenmarks von neugeborenen CAPS1-Deletionsmutanten

A: Symmetrische/inhibitorische Synapsen und **B:** asymmetrische/exzitatorische Synapsen aus dem Rückenmark einer neugeborenen CAPS1-Deletionsmutante. In beiden Fällen ist die Präsynapse mit synaptischen Vesikeln gefüllt. Im Falle der exzitatorischen Synapse ist eine postsynaptische Verdichtung, d.h. eine elektronendichte Erweiterung der postsynaptischen Membran sichtbar. T, synaptisches Terminal; D, Dendrit

4.2.3.6 Elektrophysiologische Analyse von chromaffinen Zellen

Die morphologische (4.2.3.2, 4.2.3.3 und 4.2.3.5) und biochemische (4.2.3.4) Charakterisierung der CAPS1-defizienten Mäuse zeigte, daß der Verlust von CAPS1 nicht zu offensichtlichen strukturellen Veränderungen in sekretorisch aktiven Geweben und deren zellulären Komponenten führt. Angesichts dieser Befunde liegt es nahe, daß der letale Phänotyp der CAPS1-Deletionsmutation durch subtilere funktionelle Veränderungen verursacht wird. Da CAPS1 ursprünglich in permeabilisierten neuroendokrinen Zellen als eine Komponente des Sekretionsapparats identifiziert wurde (Walent et al., 1992), ist es wahrscheinlich, daß solche funktionellen Störungen infolge des CAPS1-Verlustes am ehesten in

neuroendokrinen Zellen und Neuronen detektierbar werden. Deshalb wurde in einer systematischen Analyse in Nebennierenschnitten von mutanten Mäusen die Sekretion von Catecholaminen aus chromaffinen Zellen untersucht. Diese Arbeiten wurden von Dr. Thomas Voets (Abteilung Membranbiophysik, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) durchgeführt.

Die Fusion chromaffiner Granula mit der Plasmamembran chromaffiner Zellen führt zu einer Vergrößerung der Zelloberfläche. Dieser Effekt kann aufgrund der sphärischen Form dieser Zellen zuverlässig analysiert werden, indem die Veränderung der Membrankapazität der sekretorisch aktiven Zelle mit Hilfe der *patch-clamp*-Methode gemessen wird. Die Exozytose aus chromaffinen Zellen kann dabei entweder durch kurze Depolarisation oder durch die laservermittelte intrazelluläre Freisetzung von zuvor als photolabile Komplexe infundierten Ca^{2+} -Ionen (Photolyse von komplexierten Ca^{2+} -Ionen) erfolgen. Im Fall der Photolyse von komplexierten Ca^{2+} -Ionen hat die induzierte Sekretion einen typischen Zeitverlauf, dessen Analyse die Unterscheidung verschiedener freisetzbarer Vesikelpools, die Berechnung von Freisetzungskinetiken sowie die Bestimmung von Zeitkonstanten für den Übergang zwischen verschiedenen Vesikelpools ermöglicht (Voets et al., 1999). Einer schnellen und starken, sogenannten *burst*-Phase der Sekretion, die für 0.5-1 s andauert, folgt dabei eine langsamere, schwächere und anhaltende sogenannte *sustained*-Phase (siehe Abb. 22B). Die *burst*-Phase entspricht der Exozytose fusionskompetenter Vesikel aus zwei fusionskompetenten Vesikelpools (RRP und SRP), während die *sustained*-Phase eine Konsequenz der Reifung fusionsinkompetenter Vesikel und deren subsequenter Exozytose ist (Ashery et al., 2000).

4.2.3.6.1 Elektrophysiologische Analyse von chromaffinen Zellen adulter Mäuse

Zunächst wurde die Exozytose aus chromaffinen Zellen in Nebennierenschnitten von adulten Mäusen gemessen. Dabei wurden die Eigenschaften von Wildtyptieren mit denen heterozygoter CAPS1-Deletionsmutanten verglichen (Abb. 22). Unabhängig von der Stimulationsmethode (Depolarisation oder Photolyse von komplexierten Ca^{2+} -Ionen) zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der Sekretionsaktivität in chromaffinen Zellen heterozygoter CAPS1-Deletionsmutanten (Abb. 22). Eine detaillierte Analyse der Sekretionsaktivität nach Photolyse von komplexierten Ca^{2+} -Ionen zeigte, daß beide fusionkompetenten Vesikelpools (RRP und SRP) in den heterozygoten CAPS1-Deletionsmutanten um etwa 30 % reduziert sind, was eine Herabsetzung der Gesamtsekretion um ebenfalls 30 % verursacht (Abb. 22B und C).

Diese ersten elektrophysiologischen Befunde an heterozygoten CAPS1-Deletionsmutanten zeigten demnach, daß in adulten Tieren der Verlust eines CAPS1-Allels bereits zu phänotypischen Veränderungen führt. Um zu zeigen, daß es sich bei diesem Befund um einen echten Gendosiseffekt handelt, wurde in parallelen Experimenten die CAPS1-Expression in Nebennieren heterozygoter Deletionsmutanten quantitativ bestimmt und mit den Werten aus Wildtyp-Kontrolltieren verglichen. Zu diesem Zweck wurden die Nebennieren von jeweils 5 Tieren des entsprechenden Genotyps homogenisiert und mittels SDS-PAGE (3.2.19) und Immunoblot (3.2.20) mit gegen CAPS1 gerichteten polyklonalen Antikörpern untersucht. Immunreaktive Banden wurden mit HRP-konjugierten Sekundärantikörpern und ECL detektiert. Die Quantifikation (3.2.24.2) erfolgte dann durch densitometrische Analyse der ECL-Filme, da die niedrigen CAPS1-Expressionslevels eine Detektion und Quantifikation mit radioaktiven Verfahren nicht zuließen. Die CAPS1-Expressionslevels in Nebennieren heterozygoter Deletionsmutanten waren wie auch die Expressionslevels im Gehirn deutlich reduziert und lagen bei 66 % des Wildtypwertes (Abb. 23). Dieser Befund legt nahe, daß die in heterozygoten CAPS1-Deletionsmutanten elektrophysiologisch bestimmte Erniedrigung der Sekretionsaktivität auf eine parallele Erniedrigung der CAPS1-Expressionslevels zurückzuführen ist.

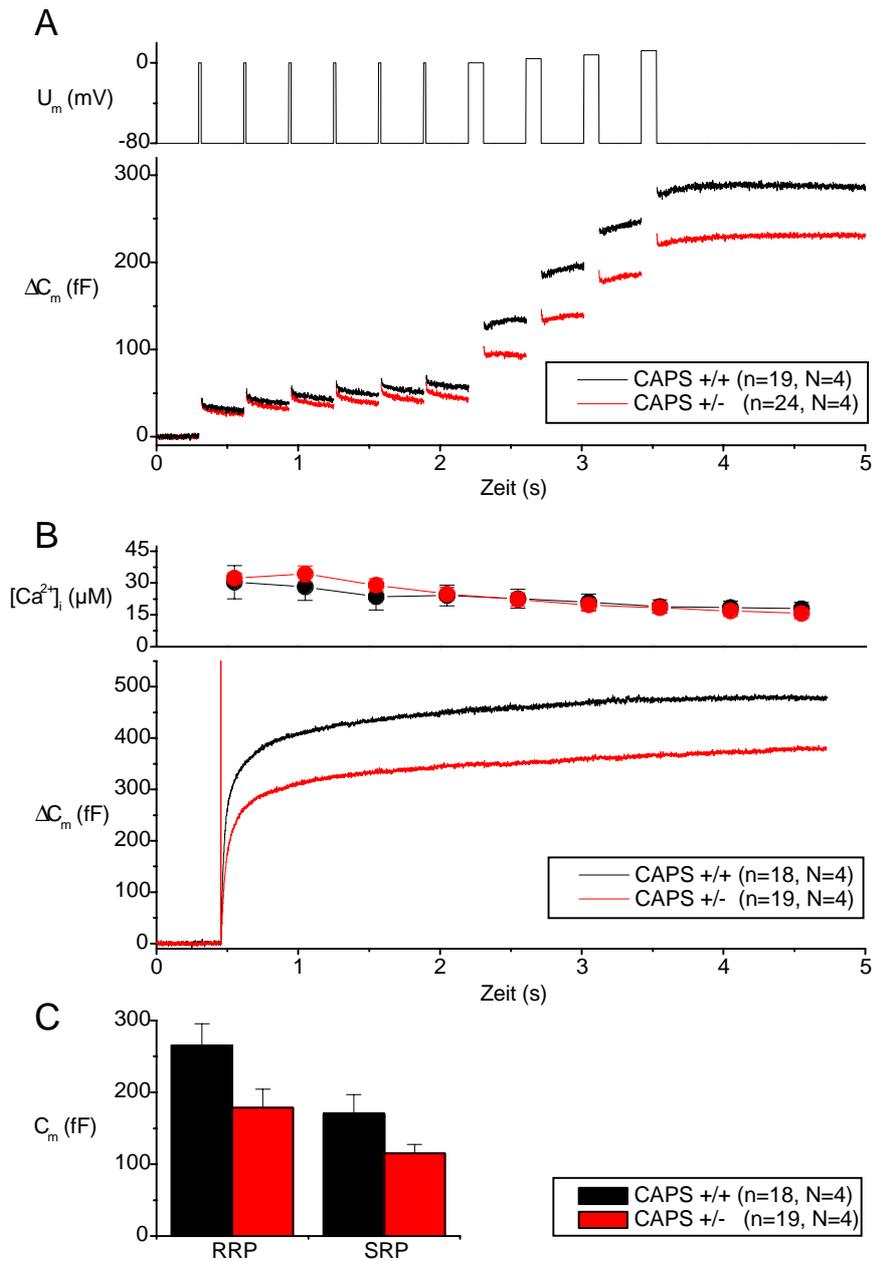


Abb. 22: Elektrophysiologische Charakterisierung von chromaffinen Zellen in Nebennierenschnitten von adulten Mäusen

A: Depolarisationsinduzierte Exozytose aus chromaffinen Zellen. Gezeigt ist die Membrankapazitätsveränderung als Antwort auf das im oberen Abbildungsteil gezeigte Stimulationsprotokoll (sechsmal 10 ms Depolarisation und nach 300 ms viermal 100 ms Depolarisation). Die Kurven repräsentieren Durchschnittswerte von 19 (Wildtyp, schwarz) bzw. 24 Zellen (heterozygote CAPS1-Deletionsmutante, rot). Die evozierte Sekretion aus mutanten Zellen ist gegenüber Wildtyp-Kontrollzellen signifikant erniedrigt ($p < 0.05$). **B:** Exozytose nach Photolyse von komplexiertem Ca^{2+} . Die obere Kurve zeigt den Zeitverlauf der freien Ca^{2+} -Konzentration, die mit Fura2/AM bestimmt wurde. Die auf diese Weise hervorgerufene Sekretion zeigt in beiden getesteten Genotypen den charakteristischen mehrphasigen Verlauf. Gezeigt sind Kurven aus Durchschnittswerten von 18 (Wildtyp, schwarz) und 19 (heterozygote CAPS1-Deletionsmutante, rot) Zellen. Die *burst*-Phase der Sekretion ist in heterozygoten CAPS1-deletionsmutanten Zellen signifikant erniedrigt ($p < 0.05$). **C:** Quantitativer Vergleich der beiden fusionskompetenten Vesikelpools in Wildtyp- und heterozygoten CAPS1-deletionsmutanten Zellen. Beide Pools sind in heterozygoten CAPS1-deletionsmutanten chromaffinen Zellen signifikant erniedrigt ($p < 0.05$). N gibt die Zahl der verwendeten Tiere an.

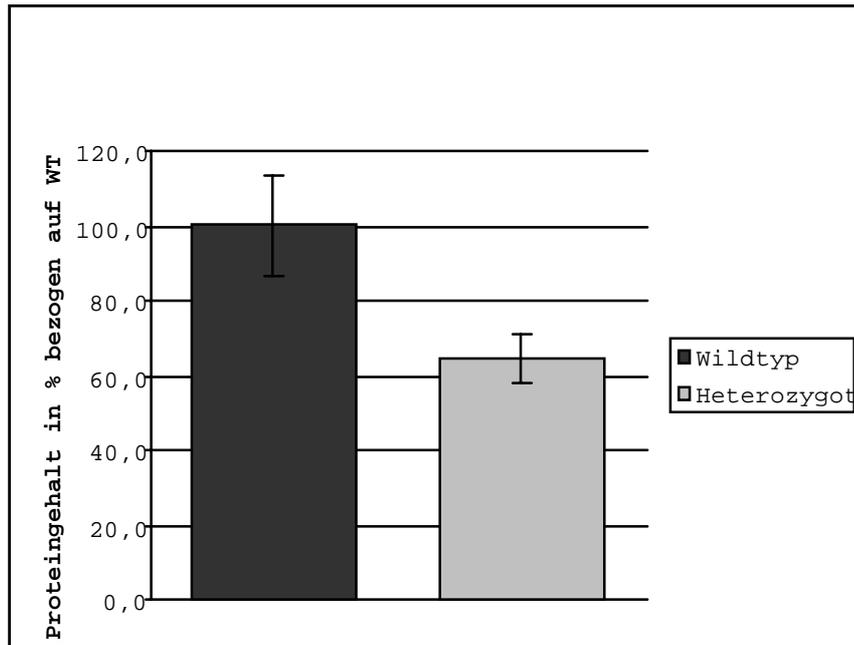


Abb. 23: Quantifizierung des CAPS1-Proteins in Nebennieren adulter Mäuse

Nebennierenhomogenate von je 5 adulten heterozygoten CAPS1-deletionsmutanten und Wildtypieren (15 µg/Spur) wurden mit dem isoformspezifischen Antikörper α -CAPS1 mittels Immunoblot analysiert. Immunreaktive Banden wurden mit ECL visualisiert. Die Intensität der Proteinbanden im ECL-Immunoblot wurde densitometrisch quantifiziert. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler (als % der Wildtyp-Kontrolle) von je 5 unabhängigen Messungen. Die etwa um 30 % erniedrigten CAPS1-Levels in heterozygoten Mutanten sind signifikant verschieden von den Wildtypwerten ($p < 0.05$).

4.2.3.6.2 Elektrophysiologische Analyse von chromaffinen Zellen neugeborener Mäuse

Ausgehend von der Annahme, daß die in adulten heterozygoten CAPS1-Deletionsmutanten detektierten Sekretionsdefizite (Abb. 22) in homozygoten Mutanten noch ausgeprägter sein würden, wurden in einer Reihe von Experimenten die sekretorischen Eigenschaften chromaffiner Zellen aus neugeborenen homozygoten CAPS1-Deletionsmutanten untersucht. Dabei wurde analog zu den in 4.2.3.6.1 beschriebenen Experimenten an adulten Nebennieren vorgegangen. Überraschenderweise ergaben diese Experimente keinen Hinweis auf Sekretionsdefizite in homozygoten CAPS1-deletionsmutanten chromaffinen Zellen. Weder die durch Depolarisation hervorgerufene Exozytose noch die Sekretion nach Photolyse von komplexiertem Ca^{2+} war in homozygot CAPS1-deletionsmutanten Zellen verschieden von Wildtypzellen (Abb. 24). Die Größe der freisetzbaren Vesikelpools RRP und SRP in Nebennieren von neugeborenen Tieren war somit unabhängig vom CAPS1-Genotyp (Abb. 24C).

Die Freisetzung von Catecholaminen aus chromaffinen Zellen kann mit Hilfe von Carbonfaserelektroden amperometrisch gemessen werden (Chow et al., 1992). Dabei gibt der zeitliche Verlauf des amperometrischen Signals Aufschluß über den Verlauf der Fusionsreaktion. Typischerweise besteht ein hochauflösend gemessenes amperometrisches Signal nach der Exozytose eines einzelnen chromaffinen Granulums aus einem kurzen *foot*-Signal, welches die Öffnung der Fusionspore anzeigt, sowie einem starken Hauptsignal, welches durch die schwallartige Freisetzung des Vesikelinhalts hervorgerufen wird. Amplitude und kumulative Ladung des gemessenen Signals sind Meßgrößen für die im Vesikel gespeicherte und freigesetzte Transmittermenge. Veränderungen in diesem Parameter können Probleme in der Transmitterbeladung der Vesikel oder in der Freisetzung anzeigen. Anstiegszeit und Halbwertsbreite des amperometrischen Signals geben einen Anhaltspunkt über den zeitlichen Verlauf der Fusionsreaktion. Veränderungen in diesen Werten können Störungen in der Fusionsreaktion anzeigen.

Elhamdani et al. (1999) zeigten in bovinen chromaffinen Zellen, daß die Infusion von Antikörpern gegen CAPS1 den Zeitverlauf amperometrischer Signale änderte und schlossen auf eine Funktion von CAPS1 bei der Fusionsporenerweiterung. Um zu testen, ob ein ähnlicher Phänotyp in CAPS1-deletionsmutanten Zellen detektierbar ist, wurden amperometrische Signale aus chromaffinen Zellen neugeborener homozygoter CAPS1-Deletionsmutanten analysiert und mit denen aus Wildtyptieren verglichen. Wie in Abb. 25 gezeigt, war keiner der gemessenen Parameter (Amplitude, Ladung, Halbwertsbreite, Anstiegszeit) durch die Deletion von CAPS1 beeinflusst. Ähnliche Befunde wurden in heterozygoten CAPS1-deletionsmutanten chromaffinen Zellen gefunden (nicht gezeigt).

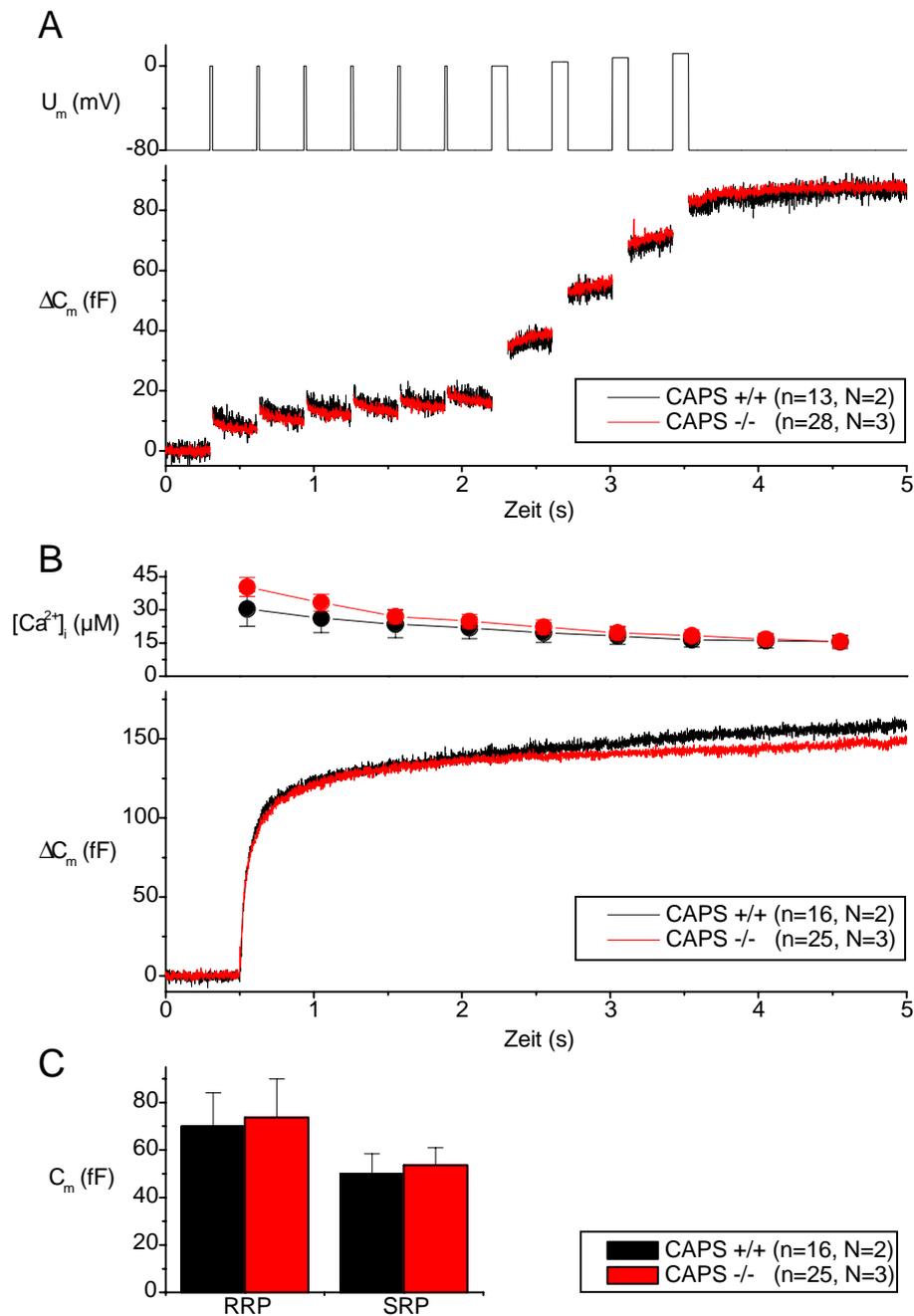


Abb. 24: Elektrophysiologische Charakterisierung von chromaffinen Zellen in Nebennierenschnitten von neugeborenen Mäusen

A: Depolarisationsinduzierte Exozytose aus chromaffinen Zellen. Gezeigt ist die Membrankapazitätsveränderung als Antwort auf das im oberen Abbildungsteil gezeigte Stimulationsprotokoll (sechsmal 10 ms Depolarisation und nach 300 ms viermal 100 ms Depolarisation). Die Kurven repräsentieren Durchschnittswerte von 13 (Wildtyp, schwarz) bzw. 28 Zellen (homozygote CAPS1-Deletionsmutante, rot). Die evozierte Sekretion aus mutanten Zellen ist gegenüber Wildtypzellen unverändert. **B:** Exozytose nach Photolyse von komplexiertem Ca²⁺. Die obere Kurve zeigt den Zeitverlauf der freien Ca²⁺-Konzentration, die mit Fura2/AM bestimmt wurde. Die auf diese Weise hervorgerufene Sekretion zeigt in beiden getesteten Genotypen den charakteristischen mehrphasigen Verlauf. Gezeigt sind Kurven aus Durchschnittswerten von 16 (Wildtyp, schwarz) und 25 (homozygote CAPS1-Deletionsmutante, rot) Zellen. Die verschiedenen Sekretionsphasen in homozygoten CAPS1-deletionsmutanten Zellen sind von Wildtypzellen nicht unterscheidbar. **C:** Quantitativer Vergleich der beiden fusionskompetenten Vesikelpools in Wildtyp- und homozygoten CAPS1-deletionsmutanten Zellen. Es sind keine signifikanten Unterschiede detektierbar. N gibt die Zahl der verwendeten Tiere an.

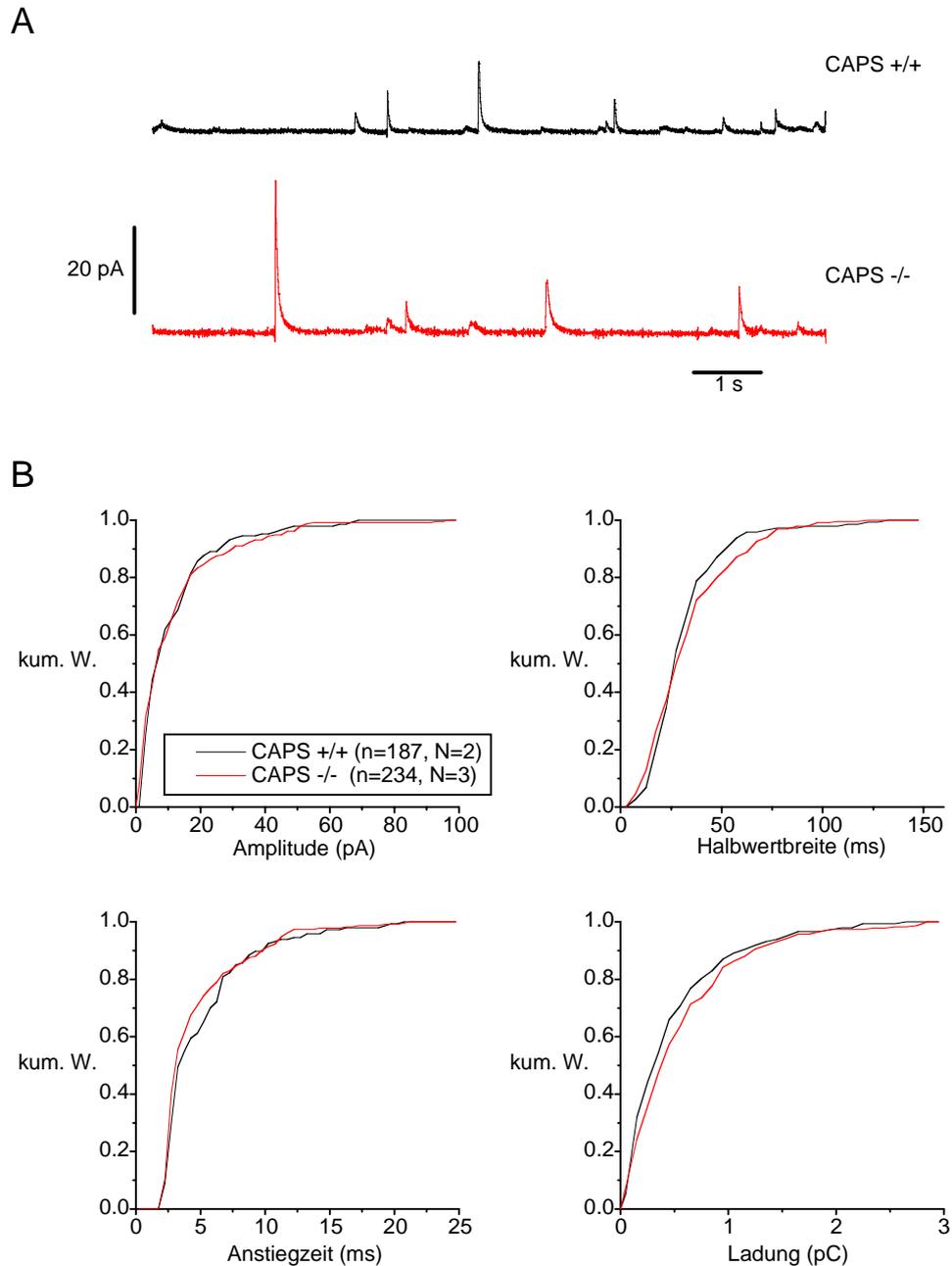


Abb. 25: Amperometrische Charakterisierung von chromaffinen Zellen in Nebennierenschnitten von neugeborenen Mäusen

A: Beispiele von durch Depolarisation induzierten amperometrischen Signalen in chromaffinen Zellen von neugeborenen Wildtypmännern und homozygoten CAPS1-Deletionsmutanten. **B:** Quantitative Analyse evozierter amperometrischer Signale. Gezeigt sind kumulative Wahrscheinlichkeitskurven für die jeweiligen Parameter Amplitude, Halbwertsbreite, Anstiegszeit und Ladung. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Genotypen detektierbar. n gibt die Zahl der Ereignisse an, N gibt die Zahl der analysierten Zellen an.

4.2.3.7 Entwicklungsabhängige Verteilung der CAPS-mRNAs in Nebennieren

Der Befund, daß der Verlust eines CAPS1-Allels in adulten Nebennieren zu einer Störung der Transmittersekretion aus chromaffinen Zellen führt (Abb. 22 und 23), während homozygote CAPS1-Deletionsmutanten phänotypisch normale chromaffine Zellen aufweisen (Abb. 24 und 25), ist am ehesten durch eine komplexe, entwicklungsabhängige Redundanz der beiden CAPS-Isoformen in der Nebenniere erklärbar. CAPS1-Protein wird sowohl in Nebennieren neugeborener Mäuse (Abb. 20) als auch im adulten Organ (Abb. 23) exprimiert. Die bisher erzeugten Antikörper gegen CAPS2 lassen eine zuverlässige Detektion des Proteins in Nebennieren nicht zu. Um die Expression von CAPS1 und CAPS2 in der Nebenniere zu verschiedenen Entwicklungsstadien vergleichen zu können, wurden daher *in situ*-Hybridisierungsexperimente (3.2.25) an Nebennieren neugeborener Tiere und adulter Tiere vorgenommen. Es wurden dabei dieselben Oligonukleotide verwendet, die zur Untersuchung der CAPS-mRNA-Expression im Gehirn herangezogen worden waren (CAPS1: 1818/1820; CAPS2: 1819/1821; Abb. 5).

Eine detaillierte Analyse der hybridisierten Nebennierenschnitte mit der Fotoemulsionsmethode (3.2.25.5) zeigte, daß chromaffine Zellen neugeborener Mäuse sowohl CAPS1 als auch CAPS2 exprimieren, während in adulten chromaffinen Zellen lediglich CAPS1 exprimiert wird (Abb. 26).

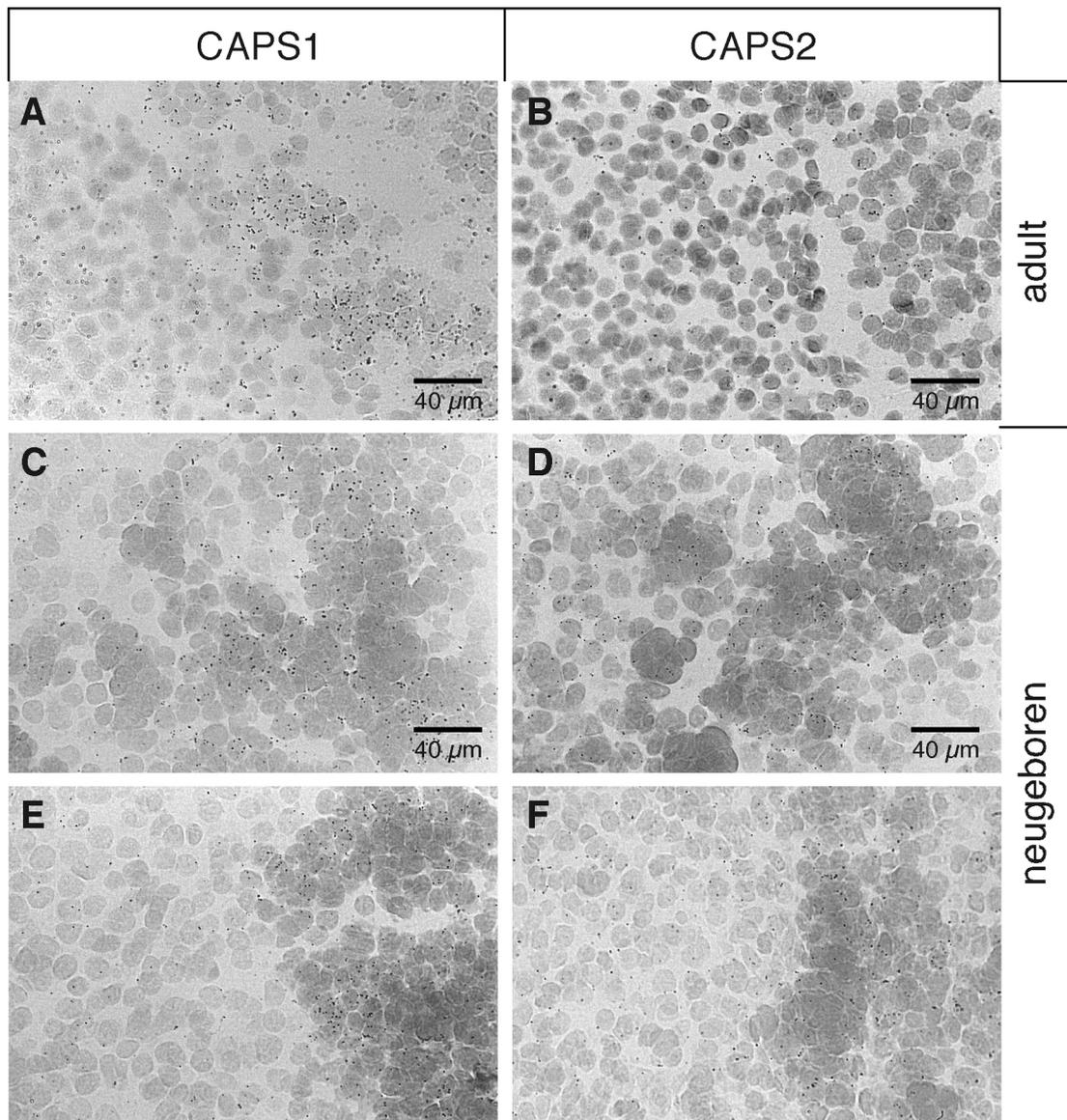


Abb. 26: Entwicklungsabhängige Expression von CAPS1 und CAPS2 in der Nebenniere
 Nebennierenschnitte aus adulten und neugeborenen Mäusen wurden mit spezifischen Oligonukleotiden (CAPS1: 1818/1820; CAPS2: 1821/1819) hybridisiert und mittels Fotoemulsionsmethode (3.2.25.5) entwickelt. Gezeigt sind jeweils Ausschnitte am Übergang zwischen Cortex und Medulla, wobei letztere durch die kompakter gepackten, stärker gefärbten Zellen charakterisiert ist. In der Medulla adulter Nebennieren (A und B) wird nur CAPS1 stark exprimiert. In chromaffinen Zellen von Nebennieren neugeborener Mäuse (C-F) werden CAPS1 und CAPS2 etwa gleich stark exprimiert.

4.2.3.8 Elektrophysiologische Analyse von hippocampalen Neuronenkulturen

Hinsichtlich seiner Verteilung im Gehirn von Maus und Ratte zeigt CAPS1 die klassischen Charakteristika eines präsynaptischen Proteins (Abb. 10-12). Dabei ist CAPS1 auch in vielen Bereichen des synaptischen Neuropils angereichert, in denen LDCVs sehr selten sind. Diese Verteilung von CAPS1 steht in deutlichem Widerspruch zur bisher postulierten Rolle als für LDCVs spezifischer Regulator der Exozytose und legt eine zusätzliche Rolle bei der Freisetzung klassischer

Neurotransmitter aus synaptischen Vesikeln nahe. Um diese Möglichkeit direkt zu prüfen, wurde die Transmitterfreisetzung und die synaptische Transmission in kultivierten CAPS1-defizienten Neuronen gemessen und mit Wildtypwerten verglichen. Besonders im Falle perinatal letaler Phänotypen, bei denen Experimente an den gängigen *slice*-Präparaten nicht möglich sind, stellen kultivierte Hippocampusneuronen ein ideales experimentelles System zur Analyse der Neurotransmission dar. Unter spezifischen Kulturbedingungen formen diese Neuronen Axone und Dendriten und schließlich physiologisch aktive synaptische Kontakte (Bartlett und Banker, 1984a und b).

In der vorliegenden Studie wurden Hippocampusneurone in Zusammenarbeit mit Dr. J. Rettig (Abt. Membranbiophysik, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) in sogenannten *microdot*-Kulturen kultiviert und elektrophysiologisch analysiert. Bei dieser Kultivierungsmethode (Bekkers und Stevens, 1991; Rosenmund et al., 1993 und 1995) werden einzelne Neuronen auf kleinen Inseln von Astrozyten ausgesät. In Abwesenheit einer Partnerzelle bilden solche Neuronen Synapsen mit sich selber aus. Solche sogenannten autaptischen Neurone können mit *patch-clamp*-Techniken analysiert werden, wobei dieselbe Elektrode zur Stimulation per Strominjektion und zur Messung der wenige Millisekunden später erfolgenden postsynaptischen Antwort verwendet werden kann. Eine Analyse 10-14 Tage alter Kulturen aus neugeborenen Wildtyptieren und homozygoten CAPS1-Deletionsmutanten zeigte keine signifikanten Unterschiede. Sowohl die durchschnittlichen evozierten postsynaptischen Stromamplituden als auch die Verteilung der gemessenen Amplituden waren in homozygoten CAPS1-deletionsmutanten Zellen und Wildtypzellen ähnlich (Abb. 27). Trotz der starken Expression von CAPS1 in präsynaptischen Kompartimenten von Hippocampusneuronen (Abb. 10) scheint der totale Verlust von CAPS1 keinen Effekt auf die Neurotransmission in diesen Zellen zu haben.

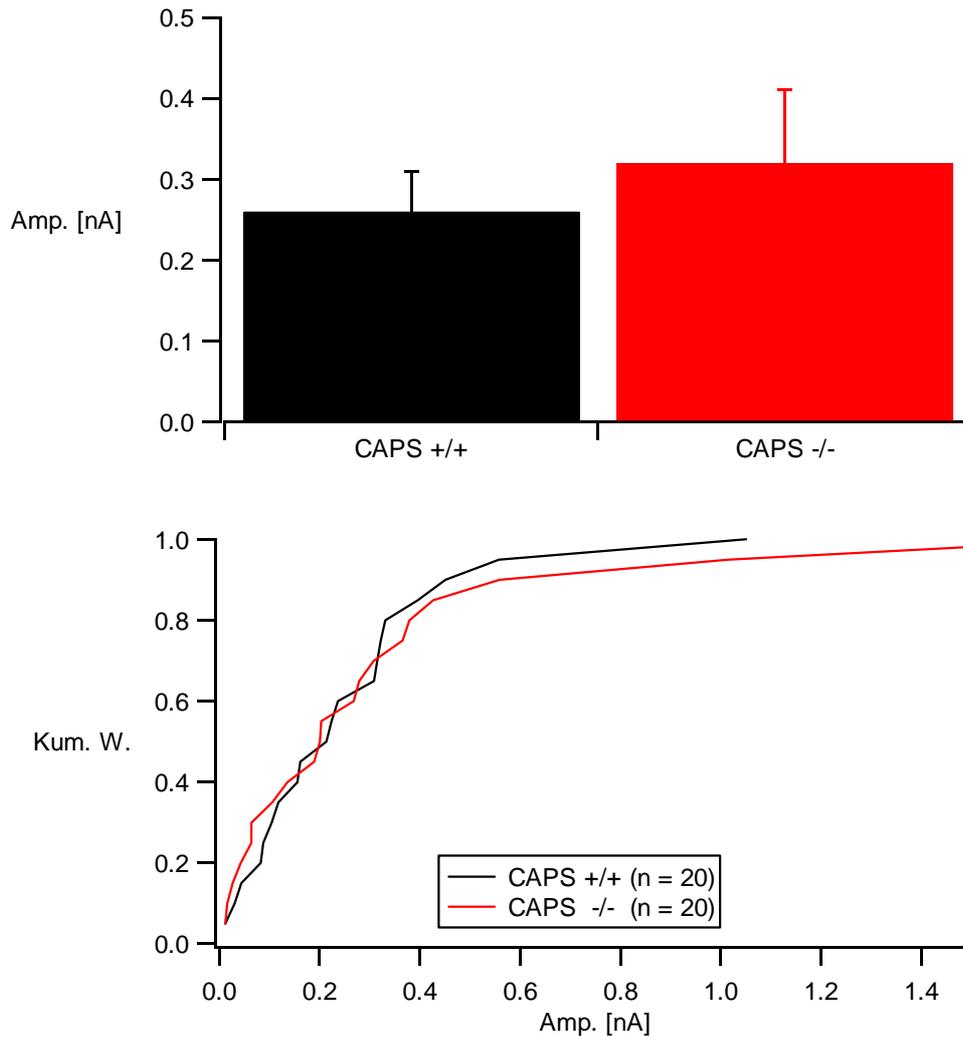


Abb. 27: Elektrophysiologische Charakterisierung von Hippocampusneuronen aus neugeborenen Mäusen

Neonatale Hippocampi von Wildtypen und CAPS1-Deletionsmutanten wurden nach der *microdot*-Technik kultiviert. Für die Messungen wurden einzelne glutamaterge Neuronen (8-14 Tage alt) ausgewählt, die nur mit sich selbst Synapsen gebildet hatten. Postsynaptische Ströme wurden durch ein per Depolarisation induziertes Aktionspotential und folgende Transmitterausschüttung ausgelöst und stellen bei konstanten postsynaptischen Eigenschaften ein Maß für die Transmitterausschüttung dar. Weder die durchschnittlichen evozierten Amplituden (oben) noch deren Verteilung (unten) waren durch die CAPS1-Deletionsmutation beeinflusst. n gibt die Zahl der analysierten Zellen an.

4.2.3.9 Analyse des Serums

Die bisherige phänotypische Charakterisierung der CAPS1-Deletionsmutanten zeigte lediglich eine relativ milde Störung der Transmittersekretion aus chromaffinen Zellen adulter heterozygoter Mutanten (Abb. 22 und 23). Es ist unwahrscheinlich, daß diese Störung für den frühen postnatalen Tod homozygoter Mutanten verantwortlich ist. Dies gilt insbesondere angesichts der Tatsache, daß chromaffine

Zellen von neugeborenen homozygoten CAPS1-Deletionsmutanten phänotypisch normal sind (Abb. 24 und 25).

Wie bereits mehrfach erwähnt, wird derzeit für CAPS1 eine zentrale Rolle bei der Regulation der Exozytose von LDCVs angenommen. In diesem Fall sollte der totale Verlust von CAPS1 neben Störungen in chromaffinen Zellen u.a. auch zu einer dramatischen Fehlregulation in einer Reihe von durch den Hypothalamus und die Hypophyse hormongesteuerten physiologischen Prozessen führen. Hierzu gehört etwa die Kontrolle des Wasser- und Elektrolythaushalts, deren Fehlregulation für den bei homozygoten Mutanten beobachteten schnellen Tod verantwortlich sein könnte. Um dies direkt zu testen, wurden ausgewählte Elektrolyte im Serum neugeborener homozygoter CAPS1-Deletionmutanten quantitativ bestimmt und mit Wildtypwerten verglichen (3.2.27). Es ergaben sich bei diesen Untersuchungen keine Hinweise auf Unterschiede in den Serumkonzentrationen von K^+ - und Na^+ -Ionen (Abb. 28). Eine grobe Fehlregulation der für die Kontrolle des Wasser- und Elektrolythaushaltes verantwortlichen Hormonsysteme in homozygoten CAPS1-Deletionsmutanten ist demnach auszuschließen.

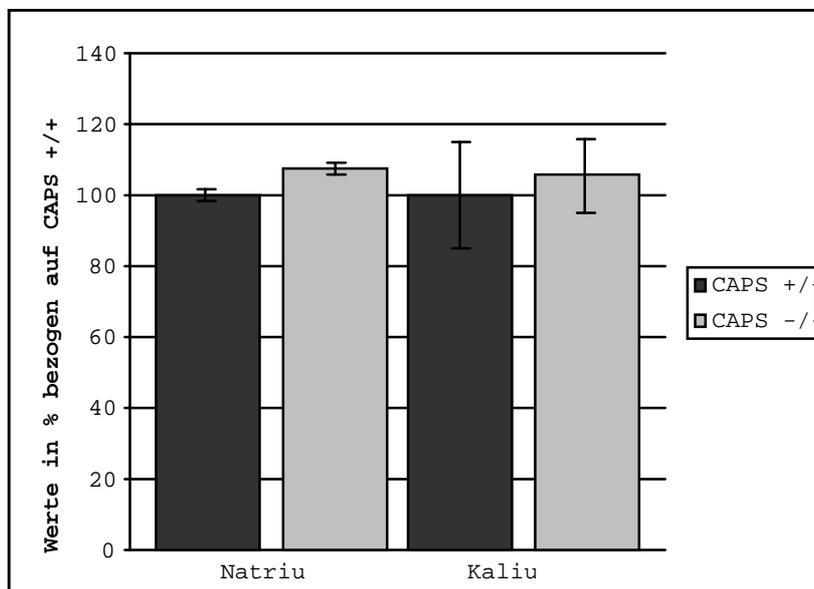


Abb. 28: Analyse der Elektrolykonzentrationen in CAPS1-Deletionsmutanten

Es wurden Serumproben von CAPS1-deletionsmutanten Tieren (n= 5) und Wildtyptieren (n= 8) quantitativ analysiert. Gezeigt sind auf den Wildtypwert normalisierte Mittelwerte. Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Die Konzentrationen der Elektrolyte Kalium und Natrium im Serum von neugeborenen CAPS1-Deletionsmutanten unterscheiden sich nicht von denen der Wildtypiere.

5 Diskussion

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, die Familie der CAPS-Proteine molekular zu definieren und die funktionelle Rolle von Mitgliedern dieser Proteinfamilie bei der Transmitterfreisetzung aus neuroendokrinen Zellen und Neuronen zu analysieren.

Die hier beschriebenen Studien zeigen, daß die CAPS-Proteinfamilie in Maus und Mensch aus zwei Mitgliedern besteht, die sich in ihren Expressionsmustern deutlich unterscheiden (Abb. 1, 2 und 4, 5). Dabei ist die ursprünglich charakterisierte CAPS1-Isoform (Ann et al., 1997) spezifisch für Neuronen und neuroendokrine Zellen (Abb. 4 und 6), während die in der vorliegenden Studie identifizierte und klonierte CAPS2-Isoform auch in einer Reihe nichtneuronaler Gewebe exprimiert wird (Abb. 4). In anschließenden Experimenten, die sich auf die sehr viel stärker exprimierte CAPS1-Isoform konzentrierten, konnte zunächst in Weiterführung publizierter Studien über die Verteilung von CAPS1 in Nebennieren gezeigt werden, daß CAPS1 im Gehirn ein abundantes, in bestimmten Regionen spezifisch in exzitatorischen Präsynapsen lokalisiertes, lösliches Protein ist (Abb. 7-12). Die Analyse eigens erzeugter CAPS1-deletionsmutanter Mäuse ergab einen komplexen Phänotyp. Obwohl CAPS1-deletionsmutante Mäuse kurz nach der Geburt starben, war die Transmittersekretion aus chromaffinen Zellen der Nebenniere bzw. aus Neuronen des Hippocampus nicht verändert (Abb. 24, 25 und 27). Nur in adulten heterozygoten Deletionsmutanten konnte ein Sekretionsdefizit in chromaffinen Zellen detektiert werden, wobei die Charakteristika dieses Defizits auf eine Rolle von CAPS1 beim *priming* sekretorischer Vesikel hinweisen (Abb. 22). Dieser komplexe Phänotyp ist durch die entwicklungsabhängige differentielle Expression von CAPS1 und CAPS2 in der Nebenniere erklärbar (s.u.) und zeigt, daß CAPS-Proteine die Transmitterfreisetzung zumindest in chromaffinen Zellen der adulten Nebenniere während der *priming*-Phase regulieren.

5.1 Die CAPS-Proteinfamilie

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war lediglich eine CAPS-Isoform bekannt (Ann et al., 1997). Erste Hinweise auf weitere Isoformen ergaben sich zunächst aus Analysen von EST-Datenbanken. Dabei zeigte sich anhand der geringen Anzahl neuer, nicht mit CAPS1 identischer ESTs, daß die neue, schließlich einwandfrei nur auf genomischer Ebene identifizierte CAPS2-Isoform sehr viel seltener exprimiert wird als CAPS1. Diese Folgerung wird weiter durch die Tatsache unterstützt, daß es in den hier beschriebenen Experimenten nicht gelungen ist, CAPS2-Protein in verschiedenen Geweben und insbesondere im Gehirn per Immunoblot zu detektieren, obwohl CAPS2-mRNA in *in situ*-Hybridisierungs- und Northern Blot-Experimenten im Gehirn nachgewiesen werden konnte. Die aktuelle NCBI-Datenbank des humanen Genoms enthält über die hier beschriebenen CAPS1- (Chromosom 3) und CAPS2-Isoformen (Chromosom 7) hinaus keine Hinweise über weitere CAPS-Isoformen. Die CAPS-Proteinfamilie besteht demnach in höheren Säugetieren lediglich aus den hier beschriebenen zwei Mitgliedern.

Hinsichtlich der Gewebeverteilung der verschiedenen Isoformen ähnelt die CAPS-Proteinfamilie vielen anderen an der synaptischen Transmitterfreisetzung beteiligten Proteinfamilien, bei denen für Neuronen und neuroendokrine Zellen spezifische Formen (hier CAPS1) eher ubiquitär exprimierten Formen (hier CAPS2) gegenüberstehen (Abb. 4). In Gehirn und Nebenniere jedoch werden die beiden CAPS-Isoformen in partiell überlappenden Mustern exprimiert. Dabei ist CAPS1 in Neuronen aller Hirnbereiche exprimiert, während CAPS2 nur in Körnerzellen des Cerebellums und in Pyramidenzellen der CA1- und CA2-Regionen des Hippocampus und ventralen Schichten des Cortex stark exprimiert wird (Abb. 5). In der Nebenniere ist die redundante Expression von CAPS1 und CAPS2 entwicklungsabhängig so reguliert, daß eine Koexpression in chromaffinen Zellen nur in frühen postnatalen Phasen, nicht jedoch in adultem Gewebe erfolgt (Abb. 26).

Angesichts der starken Homologie zwischen CAPS1 und CAPS2 liegt es nahe, daß die beiden Isoformen nicht nur redundant exprimiert werden, sondern auch funktionell redundant sind. Daß dies tatsächlich der Fall ist, wird anhand der elektrophysiologischen Befunde aus Nebennieren CAPS1-deletionsmutanter Mäuse deutlich (s.u.). Aus phylogenetischer Sicht ist es wahrscheinlich, daß diese Funktion

von CAPS-Proteinen spezifisch für die regulierte Exozytose aus Nervenzellen und neuroendokrinen Zellen ist. CAPS-Proteine werden in niederen sekretorisch aktiven Organismen wie etwa der Hefe nicht exprimiert. In Nematoden hingegen existiert eine *bona fide* CAPS-Isoform (Unc-31 in *C. elegans*), die dort spezifisch in Zellen des Nervensystems exprimiert wird (Avery et al., 1993). Mutationen im *unc-31*-Gen führen zu phänotypischen Veränderungen in *C. elegans* (insbesondere Resistenz gegen Acetylcholinesterase-Inhibitoren; Miller et al., 1996), die auf eine gestörte Neurotransmitterfreisetzung hinweisen.

5.2 Präsynaptische Lokalisation und Funktion von CAPS1

Einer der interessantesten Befunde der vorliegenden Arbeit ist die spezifisch präsynaptische Lokalisation von CAPS1 in Maus- und Rattengehirn (Abb. 10-12). Auf lichtmikroskopischer Ebene sind im synaptischen Neuropil aller untersuchten Hirnbereiche große Mengen an CAPS1 detektierbar, während Zellkörper und Dendriten ungefärbt sind (Abb. 10-11). Diese Verteilung ist typisch für präsynaptisch lokalisierte Proteine (z.B. Augustin et al., 1999).

Interessanterweise zeigte eine detaillierte licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung des Cerebellums, daß CAPS1 dort nur in exzitatorischen präsynaptischen Kompartimenten, nicht jedoch in inhibitorischen Präsynapsen detektierbar ist (Abb. 11 und 12). Eine solche transmitterspezifische Verteilung ist ungewöhnlich für am Sekretionsprozeß beteiligte präsynaptische Proteine und wurde außer für die definitionsgemäß transmitterspezifischen vesikulären Transmittertransporter lediglich für Munc13-1 nachgewiesen (Augustin et al., 1999). Derzeit ist die Bedeutung der transmitterspezifischen Lokalisation von CAPS1 im Cerebellum unklar. Es ist möglich, daß CAPS2 die Rolle von CAPS1 in inhibitorischen Axonterminalen übernimmt. Allerdings zeigen die *in situ*-Hybridisierungen (Abb. 5), daß beide Isoformen in vielen *bona fide* glutamatergen Neuronen (z.B. in Pyramidenzellschichten des Hippocampus) und auch in den GABAergen Purkinjezellen des Cerebellums koexprimiert werden. Dies deutet trotz der differentiellen Verteilung von CAPS1 in bestimmten Synapsentypen des

Cerebellums auf eine weitreichende Redundanz der beiden CAPS-Isoformen hin. Eine solche Folgerung wird durch die Tatsache unterstützt, daß in hippocampalen Neuronen CAPS1-deletionsmutanter Mäuse keine offensichtlichen phänotypischen Veränderungen detektierbar sind (Abb. 27; s.u.).

Angesichts der postulierten LDCV-spezifischen Rolle von CAPS-Proteinen bei der regulierten Exozytose ist die Abundanz von CAPS1 in präsynaptischen Terminalen des Hippocampus, des Cortex und des Cerebellums, also in Bereichen mit sehr geringer Dichte an LDCVs, sehr erstaunlich. Darüberhinaus zeigen die hier erhobenen biochemischen und morphologischen Daten, daß CAPS1 in Präsynapsen weitestgehend löslich und nicht mit LDCVs assoziiert, sondern mehr oder weniger homogen im präsynaptischen Zytosol verteilt ist. Da dies auf eine generellere Funktion von CAPS1 bei der Exozytose von synaptischen Vesikeln hindeutet, wurden in der vorliegenden Arbeit CAPS1-deletionsmutante hippocampale Nervenzellen auf phänotypische Veränderungen untersucht, um eine eventuelle Rolle von CAPS1 bei der Freisetzung klassischer Neurotransmitter nachzuweisen. Diese Experimente zeigten jedoch, daß der Verlust von CAPS1 keinen Effekt auf die Transmitterfreisetzung aus kultivierten hippocampalen Neuronen hat (Abb. 27). Dieser überraschende Befund bedeutet zunächst, daß CAPS1 für die synaptische Transmitterfreisetzung aus kultivierten hippocampalen Neuronen nicht essentiell ist. Allerdings besteht die Möglichkeit einer Redundanz von CAPS1 und CAPS2 in diesen Neuronen, da zumindest Pyramidenzellen der CA1- und CA2-Regionen beide Isoformen exprimieren. Daher wird es zur Beurteilung einer eventuellen Rolle von CAPS-Proteinen bei der synaptischen Transmitterfreisetzung im für perinatal letale Mausmutanten idealen Modellsystem der hippocampalen Primärkultur notwendig sein, in zukünftigen Experimenten Kulturen aus den nicht CAPS2 exprimierenden CA3- und CA4-Regionen des Hippocampus CAPS1-defizienter Mäuse zu analysieren. Darüberhinaus ist angesichts der in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Befunde die Erzeugung von CAPS2-Deletionsmutanten und von CAPS1/CAPS2-Doppelmutanten angezeigt, um die Funktion dieser Proteine abschließend zu klären.

5.3 Die Rolle von CAPS1 in chromaffinen Zellen der Nebenniere

Die aussagekräftigste phänotypische Veränderung in CAPS1-deletionsmutanten Mäusen wurde in chromaffinen Zellen adulter heterozygoter Mutanten detektiert (Abb. 22). Hier wurde infolge eines partiellen CAPS1-Protein-Verlustes von etwa 30 % eine Reduktion der evozierten Sekretion von etwa 30 % gemessen. Diese Reduktion der Sekretion war unabhängig von der Stimulationsmethode und sowohl in Depolarisationsexperimenten als auch nach Photolyse von Ca^{2+} -Komplexen sichtbar. Die Ursache dieser phänotypischen Veränderung liegt in einer Reduktion der akut freisetzbaren Vesikelpools RRP und SRP, was wiederum höchstwahrscheinlich auf eine Erniedrigung der *priming*-Rate zurückzuführen ist.

Interessanterweise scheint CAPS1 also im selben Schritt der Exozytose chromaffiner Granula zu fungieren, wie es für das strukturell verwandte Munc13-1 (Abb. 3) der Fall ist, nämlich im Reifungs- oder *priming*-Schritt, der die Größe der akut freisetzbaren Vesikelpools reguliert (Ashery et al., 2000). Im Gegensatz zu Munc13-1 jedoch, welches in chromaffinen Zellen in kaum detektierbaren Mengen exprimiert wird und bei Überexpression die Sekretion extrem steigert, ist die den *priming*-Prozeß stimulierende Funktion von CAPS1 in chromaffinen Zellen bereits sättigend, so daß CAPS1-Überexpression in diesen Zellen keine weitere Steigerung der Sekretion hervorruft (nicht gezeigt). Angesichts dieser Daten und der Tatsache, daß CAPS1 eine MHD1-Domäne enthält, deren homologe Domäne in Munc13-1 essentiell für die *priming*-Funktion von Munc13-1 zu sein scheint (N. Brose, unpublizierte Daten), ist es sogar möglich, daß CAPS1 eine dem Munc13-1-Protein in Synapsen analoge *priming*-Funktion in chromaffinen Zellen wahrnimmt.

Zu den am wenigsten erwarteten Befunden der vorliegenden Arbeit gehört die Beobachtung, daß zwar chromaffine Zellen adulter heterozygoter CAPS1-deletionsmutanten Nebennieren phänotypisch verändert sind (Abb. 22), in chromaffinen Zellen neugeborener homozygoter Deletionsmutanten jedoch ein dem Wildtypier vergleichbarer Phänotyp gefunden wurde (Abb. 24 und 25). Diese Datenlage ist nur durch eine komplexe Redundanz der beiden CAPS-Isoformen

erklärbar, bei der CAPS2 den Verlust von CAPS1 in chromaffinen Zellen der Nebennieren nur im neugeborenen, nicht jedoch im adulten Tier kompensieren kann. Daß dies tatsächlich der Fall sein könnte, zeigte eine Analyse der CAPS-mRNA-Expression in Nebennieren verschiedenen Alters (Abb. 26), derzufolge die beiden CAPS-Isoformen zum Zeitpunkt der Geburt in chromaffinen Zellen der Nebennieren etwa gleich stark exprimiert werden, während in adulten Nebennieren nur CAPS1 detektierbar ist. Es ist also möglich, daß das CAPS2/CAPS1-Expressionsverhältnis in adulten Nebennieren nicht ausreicht, um selbst den Verlust eines CAPS1-Allels zu kompensieren, während die relativ zu CAPS1 viel höheren CAPS2-Levels zum Zeitpunkt der Geburt eine solche Kompensation erlauben. Neben einem solchen Redundanzphänomen ist es ebenfalls möglich, daß die Expression von CAPS2 nicht nur entwicklungsabhängig gesteuert wird, sondern auch vom jeweiligen CAPS1-Genotyp abhängt. Eine solche kompensatorische Heraufregulation einer Proteinisoform ist zwar untypisch für Deletionen präsynaptisch aktiver Proteine, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da die endogenen CAPS2-Mengen sehr gering sind und die in der vorliegenden Arbeit erzeugten Antikörper gegen CAPS2 dessen Detektion in nativem Gewebe nicht ermöglichten.

5.4 Funktion der CAPS-Proteine: Exozytose von LDCVs oder synaptischen Vesikeln

Die bisher in der Literatur beschriebenen Daten über die Funktion von CAPS1 wurden weitgehend im Sinne einer für LDCVs spezifischen Rolle bei der regulierten Sekretion interpretiert. Diese Interpretation stützt sich auf vier wesentliche Befunde: (1) CAPS1 wurde als essentielle Komponente der Transmitterfreisetzung aus PC12-Zellen identifiziert (Walent et al., 1992; Ann et al., 1997), (2) membranassoziiertes CAPS1 ist teilweise an LDCV-Membranen gebunden (Berwin et al., 1998), (3) gegen CAPS1 gerichtete Antikörper inhibieren die Freisetzung von Neuropeptiden, nicht jedoch von klassischen Neurotransmittern, aus permeabilisierten Synaptosomen (Tandon et al., 1998), und (4) gegen CAPS1 gerichteten Antikörpern inhibieren die

regulierte Sekretion von LDCVs *in vivo* (Elhamdani et al., 1999; Rupnik et al., 2000).

Der Phänotyp der hier beschriebenen CAPS1-deletionsmutanten Mäuse ist zunächst mit einer für LDCVs spezifischen Funktion von CAPS1 kompatibel. Allerdings gehen die hier vorgelegten biochemischen und morphologischen Daten weit über die in der Literatur beschriebenen hinaus. Während Berwin et al. (1998) in wenigen, ausgewählten elektronenmikroskopischen Aufnahmen eine scheinbar LDCV-spezifische Lokalisation von CAPS1 dokumentierten, geht aus den hier dargestellten Ergebnissen klar hervor, daß CAPS1 weitestgehend nicht membranassoziiert, sondern löslich (Abb. 9) und in präsynaptischen Kompartimenten des Gehirns, die extrem wenige LDCVs enthalten, besonders angereichert ist (Abb. 9-12). Obwohl dies auf eine Funktion von CAPS1 bei der Exozytose von synaptischen Vesikeln hinweist, konnte ein entsprechender Nachweis in hippocampalen Primärkulturen nicht erbracht werden (Abb. 27), wobei hierfür wahrscheinlich die redundante Expression von CAPS2 in diesen Zellen verantwortlich ist (Abb. 5). Detailliertere Untersuchungen in alternativen Präparationen oder in CAPS1/CAPS2-Doppelmutanten werden nötig sein, um diese Frage abschließend zu beantworten.

Neben der Lokalisation von CAPS1 besteht ein weiteres Defizit der bisher publizierten Daten in den jeweils verfolgten funktionellen Ansätzen. Eine Präparation funktionell aktiver, permeabilisierter Synaptosomen wie von Tandon et al. (1998) verwendet konnte trotz jahrelanger Versuche bisher von keinem anderen Labor zuverlässig erzeugt werden. Entsprechend skeptisch werden die publizierten Befunde von Tandon et al. (1998) beurteilt. Dies gilt insbesondere auch, weil eine Reproduktion der Daten bis jetzt niemandem gelungen ist. Darüberhinaus ist die Injektion von Antikörpern in Zellen mit dem Ziel der Perturbation physiologischer Prozesse (Elhamdani et al., 1999; Rupnik et al., 2000) ein wenig geeignetes Verfahren zur Analyse von Proteinfunktionen. Das Hauptproblem besteht hierbei darin, daß die Spezifität des injizierten Antikörpers im Zytosol *in vivo* nicht kontrolliert und deshalb ein spezifischer Effekt von einem toxischen nicht unterschieden werden kann. Im Falle der Effekte von gegen CAPS1 gerichteten Antikörpern auf die Sekretion aus chromaffinen Zellen konnten die publizierten Befunde zur Rolle von CAPS1 bei der Fusionsreaktion (Elhamdani et al., 1999) in der vorliegenden Arbeit an CAPS1-Deletionsmutanten nicht verifiziert werden

(Abb. 25). Weiterhin ist es bisher nicht gelungen, die von Elhamdani et al. (1999) publizierten Daten direkt zu reproduzieren (J. Rettig, persönliche Mitteilung).

Vor dem Hintergrund dieser Befunde müssen die von Elhamdani et al. (1999) und Rupnik et al. (2000) veröffentlichten Daten sehr kritisch beurteilt werden. In der Tat ist es wahrscheinlich, daß die beobachteten Effekte in diesen Studien auf toxische Eigenschaften der injizierten Antikörper bzw. Puffer zurückzuführen sind. Die Tatsache, daß die Folgerungen aus diesen Antikörperstudien durch die hier vorgelegte Arbeit Unterstützung erhalten, wäre dann eher zufällig.

Hinsichtlich der Frage, ob CAPS-Proteine wirklich nur die LDCV-Sekretion regulieren, wirft die vorliegende Arbeit also neue Probleme auf. Angesichts der abundanten Expression von CAPS1 in Synapsen ist davon auszugehen, daß die Identifikation eines geeigneten physiologischen Präparates oder die Erzeugung von CAPS1/CAPS2-Doppelmutanten den Nachweis einer synaptischen Funktion von CAPS1 bei der Sekretion klassischer synaptischer Vesikel möglich machen wird.

5.5 Letalität der CAPS1-Deletionsmutanten

Obwohl die phänotypischen Veränderungen an heterozygoten CAPS1-Deletionsmutanten den interessanten Schluß zulassen, daß CAPS1 am *priming* chromaffiner Granula beteiligt ist, können sie die Tatsache nicht erklären, daß homozygote CAPS1-Mutanten kurz nach der Geburt sterben.

An dieser Stelle offenbart sich das insbesondere der Analyse deletionsmutanter Säuger innewohnende Problem der Redundanz von Proteinisoformen. Üblicherweise hat dieses Problem zur Folge, daß in Deletionsmutanten einzelner Isoformen einer Proteinfamilie nur geringfügige oder keine phänotypischen Veränderungen detektierbar werden. Beispiele von Proteinen mit präsynaptischer Funktion, bei denen dieses Redundanzphänomen die Analyse von Deletionsmutanten kompromittierte sind Rab3A, Synaptophysin oder Synapsin (Fernández-Chacón und

Südhof, 1999). Im vorliegenden Fall der CAPS1-Deletionsmutante ist das Redundanzproblem insofern verlagert, als zwar ein letaler Phänotyp vorliegt, das deletierte Protein also essentiell ist, eine phänotypische Veränderung in den sinnvollen und am besten zugänglichen Modellpräparaten aus Redundanzgründen allerdings nicht oder kaum meßbar ist.

Im Licht der hier beschriebenen Experimente bleibt unklar, warum homozygote CAPS1-Deletionsmutanten so kurze Zeit nach der Geburt sterben. Entsprechende Rückschlüsse waren in der Vergangenheit auch bei einer Reihe anderer Mutanten nicht möglich (z.B. Munc13-1; Augustin et al., 1999). Die in chromaffinen Zellen adulter heterozygoter CAPS1-deletionsmutanter Nebennieren beobachtete Reduktion der evozierten Sekretion (Abb. 22) ist sicher nicht der Grund für die Letalität der homozygoten Mutanten. Dies gilt um so mehr, als chromaffine Zellen homozygoter Deletionsmutanten eine normale Sekretion aufweisen (Abb. 24 und 25). Ebenfalls unwahrscheinlich ist, daß eine grobe Fehlregulation der essentielle Prozesse wie etwa Elektrolyt- oder Wasserhomöostase steuernden Hormonsysteme zum Tod von CAPS1-Deletionsmutanten führt (Abb. 28). Auch eine Störung der Funktion des CAPS1 exprimierenden Pankreas kommt eher nicht als Todesursache in Frage, da ein kompletter Verlust etwa der Insulin- oder Glukagonsekretion nicht sofort nach der Geburt zum Tode führt. Der schnelle Tod der Mutanten könnte vielmehr auf eine Fehlregulation eines elementaren zentralnervösen Prozesses wie etwa der Temperaturregulation oder der Atmung hinweisen. Hiermit kompatibel ist die Tatsache, daß CAPS1 in allen Hirnregionen und somit auch in den für diese Prozesse verantwortlichen Hirnstammereichen exprimiert wird (Abb. 5) und dort als präsynaptisch agierendes Protein die Neurotransmission regulieren könnte. Im Gegensatz dazu ist die CAPS2-Expression im Hirnstamm sehr gering (Abb. 5). Zur endgültigen Klärung dieser Frage wird es notwendig sein, etwa die für die Atmungssteuerung notwendigen regulatorischen Hirnbereiche (z.B. Prä-Bötzingerkomplex in der ventrolateralen Medulla oblongata) direkt mit elektrophysiologischen Methoden zu untersuchen, wobei entsprechende Modellpräparate für neugeborene Mäuse derzeit in verschiedenen Labors etabliert werden.

5.6 Fazit und Ausblick

Die vorliegende Studie erlaubt den Schluß, daß CAPS1 das *priming* von LDCVs in chromaffinen Zellen reguliert. Eine weitere hochinteressante Folgerung der hier vorgelegten Arbeit und insbesondere der morphologischen Analyse der CAPS1-Verteilung im Gehirn ist, daß CAPS-Proteine auch an der Freisetzung klassischer Neurotransmitter aus synaptischen Vesikeln beteiligt sein könnten. Die Notwendigkeit einer experimentellen Klärung dieser Vermutung ist die wichtigste Konsequenz der vorliegenden Studie. Hierzu wird es von essentieller Bedeutung sein, über die hier untersuchten, prinzipiell folgerichtig ausgewählten Modellpräparate (chromaffine Zellen, hippocampale Neuronen) hinaus alternative physiologische Präparate zur Analyse von CAPS1-Deletionsmutanten heranzuziehen und CAPS1/CAPS2-Doppelmutanten zu erzeugen.

Die hier beschriebene Analyse von CAPS1 erlaubt lediglich eine phänomenologische Charakterisierung der Funktion dieses Proteins. Eine wesentliche Frage, nämlich die nach dem molekularen Mechanismus der CAPS1-Funktion, bleibt unbeantwortet. Dieses Defizit ist typisch für die meisten der bisher auf dem Wege von Deletionsmutanten untersuchten präsynaptisch aktiven Proteine. In zukünftigen Experimenten müssen daher die hier beschriebenen morphologischen und elektrophysiologischen Befunde durch eine molekulare Analyse der CAPS1-Funktion komplementiert werden. Sinnvolle Ansätze wären hier die Suche nach Interaktionspartnern mit biochemischen und hefe-genetischen Methoden sowie die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von CAPS-Proteinen mit dem Ziel der Identifizierung funktionell relevanter Domänen.

6 Zusammenfassung

CAPS1 ist ein etwa 145 kDa großes Protein, das ursprünglich als putativer Regulator der Transmittersekretion aus PC12-Zellen identifiziert wurde. Es ist ein Ortholog von Unc-31, einem Genprodukt aus *Caenorhabditis elegans*, das im Nematoden multiple Funktionen des Nervensystems beeinflusst. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, alle Isoformen der CAPS-Proteinfamilie in Säugern zu identifizieren und ihre Rolle in zentralnervösen und neuroendokrinen Geweben zu charakterisieren.

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß die Familie der CAPS-Proteine in Säugern aus zwei Mitgliedern besteht, CAPS1 und CAPS2. CAPS1 wird in fast allen Neuronen des zentralen Nervensystems und darüber hinaus nur noch in neuroendokrinen Geweben wie dem Gehirn, dem Pankreas und der Nebenniere exprimiert. Die CAPS2-Expression ist demgegenüber im Gehirn weniger homogen, jedoch auch in einer Reihe nichtneuronaler Gewebe detektierbar. CAPS1, die im zentralen Nervensystem bei weitem abundanteste CAPS-Isoform, ist spezifisch in präsynaptischen Kompartimenten des synaptischen Neuropils lokalisiert und in der Körnerzellschicht des Cerebellums auf exzitatorische Synapsen beschränkt.

Eine funktionelle Analyse von CAPS1-deletionsmutanten Mäusen zeigt, daß CAPS1 ein zum Überleben essentielles Protein ist. CAPS1-defiziente Mäuse sterben kurz nach der Geburt, weisen jedoch weder im Gehirn noch in der Nebenniere morphologische Auffälligkeiten auf. Während dies bedeutet, daß CAPS1 für die Entwicklung und strukturelle Integrität dieser Gewebe keine Bedeutung hat, zeigen elektrophysiologische Untersuchungen an chromaffinen Zellen der Nebenniere, daß der teilweise Verlust von CAPS1 in adulten heterozygoten deletionsmutanten Tieren zu einem deutlichen Sekretionsdefizit führt. Dieses Defizit ist auf eine Herabsetzung der akut freisetzbaren Pools sekretorischer Granula zurückzuführen und zeigt, daß CAPS1, wie das strukturverwandte Munc13-1 am *priming* sekretorischer Vesikel beteiligt ist. Überraschenderweise ist ein solcher Phänotyp in chromaffinen Zellen aus Nebennieren neugeborener homozygoter CAPS1-Deletionsmutanten nicht nachweisbar. Diese Befunde können unter der Annahme einer funktionellen Redundanz von CAPS1 und CAPS2 durch die entwicklungsabhängig differentiell

regulierten Expressionslevels der beiden CAPS-mRNAs erklärt werden. Offensichtlich reicht das niedrige CAPS2/CAPS1-Expressionsverhältnis in adulten Nebennieren nicht aus, um selbst den Verlust eines CAPS1-Allels zu kompensieren, während die relativ zu CAPS1 viel höheren CAPS2-Levels zum Zeitpunkt der Geburt eine solche Kompensation erlauben. Trotz der starken und selektiven Anreicherung von CAPS1 in präsynaptischen Kompartimenten des zentralen Nervensystems wurde in den hier vorgelegten Untersuchungen an CAPS1-defizienten hippocampalen Neuronen kein Hinweis auf eine Funktion dieses Proteins bei der Exozytose synaptischer Vesikel erhalten. Auch hier ist wahrscheinlich, daß die Koexpression der wahrscheinlich funktionell redundanten CAPS2-Isoform in den untersuchten Neuronen phänotypische Konsequenzen der CAPS1-Deletion mildert. Der schnelle Tod der CAPS1-Deletionsmutanten wird höchstwahrscheinlich nicht durch Störungen in Nebenniere oder Pankreas hervorgerufen. Vielmehr ist es aufgrund der Verteilung von CAPS1 und CAPS2 im Gehirn möglich, daß die Fehlregulation eines elementaren zentralnervösen Prozesses wie etwa der Temperaturregulation oder der Atmung für den perinatal letalen Phänotyp der CAPS1-Mutanten verantwortlich ist.

Die vorliegende Studie erlaubt den Schluß, daß CAPS1 das *priming* von LDCVs in chromaffinen Zellen reguliert. Eine weitere hochinteressante Folgerung der morphologischen Analyse der CAPS1-Verteilung im Gehirn ist, daß CAPS-Proteine auch an der Freisetzung klassischer Neurotransmitter aus synaptischen Vesikeln beteiligt sein könnten. Die Notwendigkeit einer experimentellen Klärung dieser Vermutung in zukünftigen Studien ist die wichtigste Konsequenz der vorliegenden Studie. Darüberhinaus erlaubt die hier beschriebene Analyse von CAPS1 lediglich eine phänomenologische Charakterisierung der Funktion dieses Proteins. Eine wesentliche Frage, nämlich die nach dem molekularen Mechanismus der CAPS1-Funktion, bleibt unbeantwortet und muß in weiterführenden Analysen beantwortet werden.

7 Literaturverzeichnis

- Ann K., Kowalchuk J.A., Loyet K.M. und Martin T.F.J. (1997): Novel Ca²⁺-binding protein (CAPS) related to unc-31 required for Ca²⁺-activated exocytosis. *J. Biol. Chem.* 272, 19637-19640
- Ashery U., Varoqueaux F., Voets T., Betz A., Thakur P., Koch H., Neher E., Brose N. und Rettig J. (2000): Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells. *EMBO J.* 19, 3586-3596
- Augustin I., Rosenmund C., Südhof T.C. und Brose N. (1999): Munc 13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature* 400, 457-461
- Avery L., Bargmann C.I., Horvitz H.R. (1993): The *Caenorhabditis elegans* unc-31 gene affects multiple nervous system-controlled functions. *Genetics* 134, 455-464
- Barnstable C.J., Hofstein R., Akagawa K. (1985): A marker of early amacrine cell development in rat retina. *Brain Res.* 352, 286-290
- Bartlett W.P. und Banker G.A. (1984a): An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. I Cells which develop without intercellular contacts. *J. Neurosci.* 4, 1944-1953
- Bartlett W.P. und Banker G.A. (1984b): An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. II Synaptic relationships. *J. Neurosci.* 4, 1954-1965
- Bekkers J.M. und Stevens C.F. (1991): Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7834-7838
- Bellocchio E.E., Hu H., Pohorille A., Chan A., Pickel V.M. und Edwards R.H. (1998): The localization of the brain-specific inorganic phosphate transporter suggests a specific presynaptic role in glutamatergic transmission. *J. Neurosci.* 18, 8648-8659

- Bellocchio E.E., Reimer R.J., Freneau R.T. jr. und Edwards R.H. (2000): Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science* 289, 957-960
- Bennett M.K., Calakos N. und Scheller R.H. (1992): Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* 257, 255-259
- Bennett M.K. (1997): Ca^{2+} and the regulation of neurotransmitter release. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 316-322
- Berwin B., Floor E. und Martin T.F.J. (1998): CAPS (mammalian unc-31) protein localizes to membranes involved in dense-core vesicle exocytosis. *Neuron* 21, 137-145
- Blasi J., Chapman E.R., Link E., Binz T., Yamasaki S., De Camilli P., Südhof T.C., Niemann H. und Jahn R. (1993a): Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature* 365, 160-163
- Blasi J., Chapman E.R., Yamasaki S., Binz T., Niemann H. und Jahn R. (1993b): Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *EMBO J.* 12, 4821-4828
- Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- Brose N., Petrenko A.G., Südhof T.C. und Jahn R. (1992): Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* 256, 1021-1025
- Brose N., Gasic G.P., Vetter D.E., Sullivan J.M. und Heinemann S.F. (1993): Protein chemical characterization and immunocytochemical localization of the NMDA receptor subunit NMDA R1. *J. Biol. Chem.* 268, 22663-22671
- Brose N., Rosenmund C. und Rettig J. (2000): Regulation of transmitter release by unc-13 and its homologues. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 293-302
- Brünger A.T. (2000): Structural insights into the molecular mechanism of Ca^{2+} -dependent exocytosis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 293-302

- Chapman E.R., Hanson P.I. und Jahn R. (1995): Ca^{2+} regulates the interaction between synaptotagmin and syntaxin 1. *J. Biol. Chem.* 270, 23667-23671
- Chou J.H. und Jahn R. (2000): Binding of Rab 3A to synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.* 275, 9433-9440
- Chow R.H., von Rüden L. und Neher E. (1992): Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature* 356, 60-63
- Cremona O. und De Camilli P. (1997): Synaptic vesicles endocytosis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 323-330
- Daly C., Ziff E.B. (1997): Post-transcriptional regulation of synaptic vesicle protein expression and the developmental control of synaptic vesicle formation. *J. Neurosci.* 17, 2365-2375
- De Camilli P. und Jahn R. (1990): Pathways to regulated exocytosis in neurons. *Ann. Rev. Physiol.* 52, 625-645
- Edelmann L., Hanson P.I., Chapman E.R., Jahn R. (1995): Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *EMBO J.* 14, 224-231
- Elhamdani A., Martin T.F.J., Kowalchyk J.A., Artalejo C.A. (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. *J. Neurosci.* 19, 7375-7383
- Fernández-Chacón R. und Südhof T.C. (1999): Genetics of synaptic vesicle function: toward the complete functional anatomy of an organelle. *Ann. Rev. Physiol.* 61, 753-776
- Fernández-Chacón R., Königstorfer A., Gerber S.H., Garcíá J., Matos M.F., Stevens C.F., Brose N., Rizo J., Rosenmund C. und Südhof T.C. (2001): Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* 410, 41-49
- Fischer von Mollard G., Stahl B., Walch-Solimena C., Takei K., Daniels L., Khoklatchev A., De Camilli P., Südhof T.C. und Jahn R. (1994): Localization of Rab5 to synaptic vesicles identifies endosomal intermediate in synaptic vesicle recycling pathway. *Eur. J. Cell Bio.* 65, 319-326

- Garner C.C., Kindler S. und Gundelfinger E.D. (2000): Molecular determinants of presynaptic active zones. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 321-327
- Geppert M., Goda Y., Hammer R.E., Li C., Rosahl T.W. und Südhof T.C. (1994): Synaptotagmin I: a major Ca^{2+} sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* 79, 717-727
- Guan K.L., Dixon J.E. (1991): Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione-S-transferase. *Anal. Biochem.* 192, 262-267
- Hanson P.I., Heuser J.E. und Jahn R. (1997): Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 310-315
- Harvey F.H. (1975): The large dense core vesicle: a normal organelle of the central nervous system myelinated axon. *Acta Neuropath.* 31, 91-96
- Hay J.C. und Martin T.F.J. (1992): Resolution of regulated secretion into sequential MgATP-dependent and calcium-dependent stages mediated by distinct cytosolic proteins. *J. Cell Biol.* 119, 139-151
- Hay J.C. und Scheller R.H. (1997): SNAREs and NSF in targeted membrane fusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 505-512
- Hayashi T., McMahon H., Yamasaki S., Binz T., Hata Y., Südhof T.C. und Niemann H. (1994): Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J.* 13, 5051-5061
- Heuser J.E., Reese T.S., Dennis M.J., Jan Y., Jan L. und Evans L. (1979): Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. *J. Cell. Biol.* 81, 275-300
- Hirokawa N., Sobue K., Kanda K., Harada A., Yorifuji H. (1989): The cytoskeletal architecture of the presynaptic terminal and molecular structure of synapsin 1. *J. Cell Biol.* 108, 111-126
- Holmes D.S., Quigley M. (1981): A rapid boiling method for preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114, 193-197
- Hosono R., Sassa T. und Kuno S. (1987): Mutations affecting acetylcholine levels in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurochem.* 49, 1820-1823

- Hosono R. und Kamiya Y. (1991): Additional genes which result in an elevation of acetylcholine levels by mutation in *Caenorhabditis elegans*. *Neurosci. Letters* 128, 243-244
- Huttner W.B., Schiebler W., Greengard P. und De Camilli P. (1983): Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. *J. Cell. Biol.* 96, 1374-1388
- Jahn R. und Südhof T.C. (1999): Membrane fusion and exocytosis. *Ann. Rev. Biochem.* 68, 863-911
- Jonas P., Bischofberger J. und Sandkühler J. (1998): Corelease of two fast neurotransmitter at a central synapse. *Science* 281, 419-424
- Jones D.H. und Matus A.I. (1974): Isolation of synaptic plasma membrane from brain by combined flotation-sedimentation density gradient centrifugation. *Biochim. Biophys. Acta* 356, 276-287
- Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M. (1996): *Neurowissenschaften*. Spektrum Akademischer Verlag
- Koch H., Hofmann K. und Brose N. (2000): Definition of munc13-homology-domains and characterization of a novel ubiquitously expressed munc13 isoform. *Biochem J.* 349, 247-253
- Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Landis D.M., Hall A.K., Weinstein L.A., Reese TS (1988): The organization of cytoplasm at the presynaptic active zone of a central nervous system synapse. *Neuron* 1, 201 -209
- Li C., Ullrich B., Zhang J.Z., Anderson G., Brose N. und Südhof T.C. (1995): Ca^{2+} -dependent and -independent activities of neural and non-neural synaptotagmins. *Nature* 375, 594-599

- Loyet K.M., Kowalchuk J.A., Chaudhary A., Chen J., Prestwich G.D. und Martin T.F.J., (1998): Specific binding of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate to calcium-dependent activator protein for secretion (CAPS), a potential phosphoinositide effector protein for regulated exocytosis. *J. Biol. Chem* 273, 8337-8343
- Martin T.F.J. (1994): The molecular machinery for fast and slow neurosecretion. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4, 626-632
- Martin T.F.J. (1997): Stages of exocytosis. *Trends Cell Biol.* 7, 271-276
- Mayer A., Wickner W. und Haas A. (1996): Sec18p (NSF)-driven release of Sec17p (alpha-SNAP) can precede docking and fusion of yeast vacuoles. *Cell* 85, 83-94
- McIntire S.L., Reimer R.J., Schuske K., Edwards R.H. und Jørgensen E.M. (1997): Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* 389, 870-876
- Miller K.G., Alfonso A., Nguyen M., Crowell J.A., Johnson C.D. und Rand J.B. (1996): A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 12593-12598
- Morgan A. und Burgoyne R.D. (1995): A role for soluble NSF attachment proteins (SNAPs) in regulated exocytosis in adrenal chromaffin cells. *EMBO J.* 14, 232-239
- Morgan A. (1996): Classical clues to NSF function. *Nature* 382, 680
- Morgan A. und Burgoyne R.D. (1997): Common mechanisms for regulated exocytosis in the chromaffin cell and the synapse. *Cell & Dev. Biol.* 8, 141-149
- Mulkey R.M. und Zucker R.S. (1991): Action potential must admit calcium to evoke transmitter release. *Nature* 350, 153-155
- Murthy V.N. und Stevens C.F. (1998): Synaptic vesicles retain their identity through the endocytic cycle. *Nature* 392, 497-501
- Neeb A., Koch H., Schurmann A. und Brose N. (1999): Direct interaction between the ARF-specific guanine nucleotide exchange factor msec7-1 and presynaptic Munc13-1. *Eur. J. Cell Biol.* 78, 533-538

- Nickel W., Weber T., McNew J.A., Parlat F., Söllner T.H., Rothman J.E. (1999): Content mixing and membrane integrity during membrane fusion driven by pairing of isolated v-SNAREs and t-SNAREs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 12571-12576
- Niemann H., Blasi J. und Jahn R. (1993): Clostridial neurotoxins: new tools for dissecting exocytosis. *Trends Cell Biol.* 4, 179-185
- Oheim M., Loerke D., Stühmer W. und Chow R.H. (1998): The last few milliseconds in the life of a secretory granule. Docking, dynamics and fusion visualized by total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM). *Eur. Biophys. J.* 27, 83-98
- Otto H., Hanson P.I. und Jahn R. (1997): Assembly and disassembly of a ternary complex of synaptobrevin, syntaxin and SNAP-25 in the membrane of synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6197-6201
- Patzak A. und Winkler H. (1986): Exocytotic exposure and recycling of membrane antigens of chromaffin granules: ultrastructural evaluation after immunolabelling. *J. Cell Biol.* 102, 510-515
- Perin M.S., Fried V.A., Mignery G.A., Jahn R. und Südhof T.C. (1990): Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature* 345, 260-263
- Pfeffer S.R. (1999): Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs. *Nat. Cell Biol.* 1, 17-22
- Roghani A., Feldman J., Kohan S.A., Shirdazi A. Gundersen C.B., Brecha N. und Edwards R.H. (1994): Molecular cloning of a putative vesicular transporter for acetylcholine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10620-10624
- Rosahl T.W., Geppert M., Spillane D., Herz J., Hammer R.E., Malenka R.C. und Südhof T.C. (1993): Short-term plasticity is altered in mice lacking synapsin. *Cell* 75, 661-670
- Rosahl T.W., Spillane D., Missler M., Herz J., Selig D.K., Wolff J.R., Hammer R.E., Malenka R.C. und Südhof T.C. (1995): Essential functions of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation. *Nature* 375, 488-493

- Rosenmund C., Clements J.D. und Westbrook G.L. (1993): Non-uniform probability of glutamate release at a hippocampal synapse. *Science* 262, 754-757
- Rosenmund C., Feltz A. und Westbrook G.L. (1995): Synaptic NMDA receptor channels have a low open probability. *J. Neurophysiol.* 15, 2788-2795
- Rothman J.E. (1994): Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372, 55-63
- Rupnik M., Kreft M., Sikdar S.K., Grilc S., Romih R., Zupancic G., Martin T.F.J. und Zorec R. (2000): Rapid regulated dense-core vesicle exocytosis requires the CAPS protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 5627-5632
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. und Erlich H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491
- Sanger F., Nicklen S. und Coulson A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467
- Shao X., Davletov B.A., Sutton R.B., Südhof T.C. und Rizo J. (1996): Bipartite Ca^{2+} -binding motif in C2 domains of synaptotagmin and protein kinase C. *Science* 273, 248-251
- Shao X., Li C., Fernandez I., Zhang X., Südhof T.C. und Rizo J. (1997): Synaptotagmin-syntaxin interaction: the C2 domain as a Ca^{2+} -dependent electrostatic switch. *Neuron* 18, 132-142
- Söllner T., Whiteheart S.W., Brunner M., Erdjument-Bromage H., Geromanos S., Tempst P. und Rothman J.E. (1993a): SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362, 318-324
- Söllner T., Bennett M.K., Whiteheart S.W., Scheller R.H. und Rothman J.E. (1993b): A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation and fusion. *Cell* 75, 409-418
- Song J.Y., Ichtchenko K., Südhof T.C. und Brose N. (1999): Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1100-1105

- Southern E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol. Biol.* 98, 503-517
- Steyer J.A., Horstmann H. und Almers W. (1997): Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Nature* 388, 474-478
- Südhof T.C. (1995): The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375, 645-653
- Sutton R.B., Fasshauer D., Jahn R. und Brünger A.T. (1998): Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at a 2.4 Å resolution. *Nature* 395, 347-353
- Takamori S., Rhee J.S., Rosenmund C. und Jahn R. (2000): Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* 407, 189-194
- Tandon A., Bannykh S., Kowalchuk J.A., Banerjee A., Martin T.F.J. und Balch W.E. (1998): Differential regulation of exocytosis by calcium and CAPS in semi-intact synaptosomes. *Neuron* 21, 147-154
- Terrian D.M. und White M.K. (1997): Phylogenetic analysis of membrane trafficking proteins: a family reunion and secondary structure predictions. *Eur J. Cell Bio.* 73, 198-204
- Towbin H., Staehlin T. und Gordon J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354
- Ullrich B. und Südhof T.C. (1994): Distribution of synaptic proteins in the retina: implications for synaptic vesicle traffic in ribbon synapses. *J. Physiol. Paris* 88, 249-257
- Voets T., Neher E. und Moser T. (1999): Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron* 23, 607-615
- Walent J.H., Porter B.W. und Martin T.F.J. (1992): A novel 145 kd brain cytosolic protein reconstitutes Ca²⁺-regulated secretion in permeable neuroendocrine cells. *Cell* 70, 765-775

- Weber T., Zemelman B.V., McNew J.A., Westermann B., Gmachl M., Parlati F., Söllner T.H. und Rothman J.E. (1998): SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92, 759-772
- Weimbs T., Low S.H., Chapin S.J., Mostov K.E., Bucher P. und Hofmann K. (1997): A conserved domain is present in different families of vesicular fusion proteins: a new superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3046-3051
- Weimbs T., Mostov K.E., Low S.H. und Hofmann K. (1998): A model for structural similarity between different SNARE complexes based on sequence relationships. *Trend Cell Biol.* 8, 260-262
- Whiteheart S.W., Rossmagel K., Buhrow S.A., Brunner M., Jänicke R. und Rothman J.E. (1994): N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein: a trimeric ATPase whose hydrolysis of ATP is required for membrane fusion. *J. Cell Biol.* 126, 945-954
- Willnow T.E. und Herz J. (1994): Homologous recombination for gene replacement in mouse cell lines. *Methods Cell Biol.* 43 Pt A, 305-334
- Winkler H. und Fischer-Colbrie R. (1990): Common membrane proteins of chromaffin granules, endocrine and synaptic vesicles: properties, tissue distribution, membrane topography and regulation of synthesis. *Neurochem. Int.* 17, 245-262