



**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**  
**Medizinische Fakultät Mannheim**  
**Dissertations-Kurzfassung**

**Morphologische und funktionelle in-vitro-Charakterisierung der Aktiven Zone serotonerg differenzierter Neurone**

Autor: Verena Proissl  
Institut / Klinik: Zentralinstitut für Seelische Gesundheit Mannheim (ZI)  
Doktorvater: Prof. Dr. P. Schloss

Die Neurone des serotonergen Systems stellen die Forschung immer wieder vor zahlreiche Probleme. Die Zellzahl ist gering. Die Fortsätze ziehen sich durch das ganze Gehirn und machen die Untersuchung einer kompletten Zelle oder die Kultivierung in Primärkultur unmöglich. Serotonerge Neurone haben aber eine große Relevanz in vielen Körperfunktionen, ebenso in der Pathophysiologie zahlreicher Erkrankungen wie zum Beispiel der Depression. Die Etablierung zellulärer Modelle, an welchen in-vitro-Experimente durchgeführt werden können, ist daher von immer größer werdender Bedeutung. Voraussetzung für solche Modelle ist die genaue Charakterisierung dieser Systeme um die Vergleichbarkeit mit der in-vivo-Situation zu gewährleisten bzw. beurteilen zu können.

In dieser Arbeit wurde ein solches Zellsystem, serotonerg differenzierte Neurone aus murinen embryonalen R1-Stammzellen (R1-5HT-Zellen), näher untersucht hinsichtlich der Ausbildung einer Polarität, also die Bildung von axonalen und somatodendritischen Regionen, sowie der Expressierung von Proteinen der Aktiven Zone (Strukturproteine Bassoon und Piccolo, vesikuläre Proteine Synaptotagmin und Synaptobrevin) in diesen Regionen. Führende Methodik hierbei war die Anfärbung von Struktur- und vesikulären Proteinen der Aktiven Zone sowie der axonalen (TAU) und somatodendritischen (Map2a) Markerproteine mittels Immunfluoreszenz. Auch die Expressierung postsynaptischer Proteine wurde untersucht. Die Färbungen wurden per konfokaler Laserscanningmikroskopie untersucht und repräsentative Aufnahmen angefertigt.

In Übersichtsaufnahmen war hierbei deutlich zu erkennen, dass Cluster-, also Soma-nah das MAP2a-Signal überwiegt, während weiter peripher die TAU-Signale zunehmen. Zoom-Aufnahmen zeigten, dass es in den R1-5HT-Zellen tatsächlich unterschiedliche Regionen gibt, welche sich mittels MAP2a und TAU unterscheiden lassen. Es gibt also Fortsätze, welche nur eine MAP2a- bzw. nur eine TAU-Färbung aufweisen. Somit konnte die Ausbildung einer Polarität nachgewiesen werden. Wann sich diese Polarität jedoch im Differenzierungsprozess entwickelt, ist noch nicht abschließend geklärt. Es gibt Hinweise, dass der Vorgang der Polarisierung über den Differenzierungszeitraum hinaus andauert und nicht gleichzeitig mit der neuronalen Differenzierung abgeschlossen ist.

Weiterhin konnten die genannten Struktur- und vesikulären Proteine der Aktiven Zone sowohl somatodendritisch als auch axonal aufgefunden werden, was für das morphologische Vorhandensein somatodendritischer und axonaler Aktiver Zonen spricht. Auch die Expression postsynaptischer Proteine konnte nachgewiesen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit ging es um die Entwicklung von Methoden zur funktionellen Untersuchung dieser Aktiven Zonen in Live-Cell-Imaging-Experimenten. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Methoden an serotonerg differenzierten 1C11-Zellen untersucht und im Anschluss gegenüber gestellt. Bei diesen Methoden handelt es sich um die Visualisierung von beladenen Vesikeln mit 1. dem „fluoreszierenden, falschen Neurotransmitter“ FFN511 und 2. hoch konzentriertem Serotonin mit Eigenfluoreszenz. Es wurden die Beladung der Vesikel, deren pharmakologische Blockierbarkeit sowie die Exozytose mittels Kaliumchlorid-Puls untersucht.

Folgende Eigenschaften konnten festgestellt werden: Citalopram blockiert die Aufnahme von Serotonin am SERT, wohingegen FFN511 frei durch die Membran in beide Richtungen diffundieren kann. Eine bei der Beladung mit FFN511 entstehende Hintergrundfärbung des Zytoplasmas ist durch Waschschriffe reduzierbar. Die Aufnahme von sowohl FFN511 und Serotonin über VMAT2 in die Vesikel kann von Ro 4-1284 blockiert werden. Bei einem Kaliumchlorid-Puls werden FFN511 und Serotonin exozytiert, wobei sich jedoch nicht alle Vesikel entleeren (Reservepool).

Die gewonnenen Erkenntnisse in dieser Arbeit über die Eigenschaften und Vor- und Nachteile der getesteten Methoden sowie die Rückschlüsse auf deren zellulären Abläufe sollen einen Beitrag leisten die R1-5HT-Zellen in zukünftigen Studien auch funktionell weiter untersuchen zu können.