
Aus dem
CC 2 – Charité Centrum für Grundlagenmedizin
Institut für Integrative Neuroanatomie, Charité Campus Mitte
Institutsleiter: Prof. Dr. Rüdiger W. Veh

Habilitationsschrift

**Regulation der Monoamin- und Glutamatspeicherung in
sekretorischen Vesikeln durch die Go2 α -Untereinheit
heterotrimerer G-Proteine**

Zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Anatomie und Zellbiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Irene Brunk

geboren am 20.12.1973 in Berlin

Eingereicht: Februar 2011

Dekanin: Prof. Dr. med. A. Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Markus Missler, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Kerstin Kriegelstein, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	7
1.1 Variabilität der vesikulären Neurotransmittermenge und Einfluss auf die synaptische Übertragung	7
1.1.1 <i>Quantale Transmitterfreisetzung und synaptische Übertragung</i>	7
1.1.2 <i>Variabilität des vesikulären Füllungszustandes</i>	7
1.2 Vesikuläre Neurotransmittertransporter	8
1.2.1 <i>Vesikuläre Monoamintransporter</i>	9
1.2.2 <i>Vesikuläre Glutamattransporter</i>	11
1.3 Heterotrimere G-Proteine	13
1.3.1 <i>Allgemeine Eigenschaften heterotrimerer G-Proteine</i>	13
1.3.2 <i>Goα-Isoformen und ihre Funktionen</i>	15
1.4 Vesikuläre G α -Untereinheiten als Regulatoren der Neurotransmitterspeicherung in synaptischen Vesikeln	16
1.5 Forschungsschwerpunkte	18
2. Zusammenfassung der eigenen Arbeiten	19
2.1 Go2 α reguliert die Aktivität vesikulärer Glutamattransporter durch Änderung ihrer Chloridabhängigkeit	20
2.2 Die erste luminal Domäne vesikulärer Monoamintransporter vermittelt die G-Protein abhängige Regulation der Transmitteraufnahme	31

2.3	Die Deletion von Go2 α verhindert die Entwicklung einer Kokain-induzierten motorischen Sensitivierung durch Beeinträchtigung des striatalen dopaminergen Systems	47
2.4	<i>Ca²⁺-dependent Activator Proteins of Secretion</i> fördern die vesikuläre Monoaminaufnahme	61
2.5	Amphetamin beeinflusst die Expression von NR2B in Go2 α Knockout-Mäusen und fördert dadurch die Entwicklung einer motorischen Sensitivierung	70
3.	Diskussion	86
3.1	Mechanismen der G-Protein vermittelten Regulation der vesikulären Neurotransmitterspeicherung	86
3.1.1	<i>Interaktionspartner von VMAT2 und VGLUT1</i>	86
3.1.2	<i>Vorgeschaltete Signale der G-Protein vermittelten Regulation der vesikulären Neurotransmitterspeicherung</i>	88
3.1.3	<i>Nachgeschaltete Signale der G-Protein vermittelten Regulation der vesikulären Neurotransmitterspeicherung</i>	89
3.2	Bedeutung der Regulation für den Neurotransmittergehalt von Neuronen und die synaptische Übertragung	93
3.2.1	<i>Bedeutung der Regulation der VMAT</i>	93
3.2.2	<i>Bedeutung der Regulation der VGLUT</i>	94
3.3	Physiologische und pathophysiologische <i>in vivo</i> Auswirkungen der Deletion von Go2 α	95
3.3.1	<i>Veränderte motorische Wirkung von Psychostimulanzien nach Deletion von Go2α</i>	95
3.3.2	<i>Auswirkung der Deletion von Go2α auf das Zusammenspiel der glutamatergen und dopaminergen Signaltransduktion striataler Projektionsneurone</i>	96
4.	Zusammenfassung	98

5. Literaturverzeichnis	100
Tierversuchsgenehmigungen	112
Danksagung	113
Erklärung	114

Abkürzungsverzeichnis

der wichtigsten verwendeten Abkürzungen

5HT	5-Hydroxytryptamin = Serotonin
ADP	Adenosindiphosphat
AGS	<i>Activators of G-Protein Signalling</i>
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BNPI	<i>brain specific Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter</i> = VGLUT1
BON-Zellen	humane Karzinoid-Zelllinie
CAPS	<i>Calcium-dependent activator protein of secretion</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovarian</i>
CHO-Zellen	Zelllinie aus Fibroblasten von Ovarien des chinesischen Hamsters
CIC	<i>Chloride Channel</i>
CPP	<i>conditioned place preference</i> = konditionierte Platzpräferenz
D1-Rezeptor	Dopamin 1 Rezeptor
D2-Rezeptor	Dopamin 2 Rezeptor
DAT	Plasmamembrantransporter für Dopamin
$\Delta\mu\text{H}^+$	elektrochemischer Gradient
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNPI	<i>differentiation-associated Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter</i> =VGLUT2
ΔpH	Protonen-/pH Gradient
$\Delta\Psi$	elektrischer Gradient
E	Embryonaltag
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GAP43	<i>growth associated protein 43</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i> = G-Protein gekoppelter Rezeptor
GMP-P(NH)P	5'-Guanylylimidodiphosphat
Glu	Glutamat
GRIN	<i>G-protein regulated inducer of neurite outgrowth</i>
GTP	Guanosintriphosphat
GTP γ S	Guanosin-5'-O-(thiotriphosphat)

IC ₅₀	<i>half maximal inhibitory concentration</i> = halbmaximale inhibitorische Konzentration
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
K _i	Gleichgewichtsdissoziationskonstante eines Inhibitors
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
MAO	Monoaminoxidase
mEPSC	miniature excitatory synaptic current
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
MPP ⁺	1-Methyl-4-phenylpyridinium
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NR2B	NMDA-Rezeptor 2B
P	Postnataltag
PBP	Phosphatidylethanolamin bindendes Protein
PC12-Zellen	Phäochromozytomzelllinie der Ratte
PCP2	<i>Purkinje cell protein 2</i>
PM	Plasmamembran
PMT	Plasmamembrantransporter
pNR2B	phosphorylierter NMDA-Rezeptor 2B
NT	Neurotransmitter
RGS	<i>Regulators of G-Protein Signalling</i>
SERT	Plasmamembrantransporter für Serotonin
SLO	Streptolysin O
TH	Tyrosinhydroxylase
TpH	Tryptophanhydroxylase
<i>unc</i>	<i>uncoordinated family member</i>
VACHT	vesikulärer Azetylcholintransporter
VEAT	vesikulärer Transporter für exzitatorische Aminosäuren
VGAT	vesikulärer GABA-Transporter
VGLUT	vesikulärer Glutamattransporter
VIAAT	vesikulärer Transporter für inhibitorische Aminosäuren
VMAT	vesikulärer Monoamintransporter
V _{MAX}	Maximalgeschwindigkeit enzymatischer Reaktionen
VNT	vesikuläre Neurotransmittertransporter
VNUT	vesikulärer Nukleotidtransporter

1. Einleitung

1.1 Variabilität der vesikulären Neurotransmittermenge und Einfluss auf die synaptische Übertragung

1.1.1 *Quantale Transmitterfreisetzung und synaptische Übertragung*

Die Signalübertragung zwischen Neuronen erfolgt über die Freisetzung von Neurotransmittern an spezialisierten Strukturen, den Synapsen. Die durch die Freisetzung eines Vesikels hervorgerufene elektrophysiologisch beobachtbare postsynaptische Antwort wird als kleinste Einheit oder „Quantum“ der synaptischen Übertragung definiert (Katz et al., 1971) und mEPSC (miniature excitatory synaptic current) genannt. Diese quantale Transmitterfreisetzung ist sowohl im Rahmen spontaner als auch regulierter synaptischer Transmission beobachtbar. Dabei ist die postsynaptische Antwort nach der Freisetzung eines Vesikels variabel, die Größe des Vesikelquantums jedoch unabhängig von der Freisetzungswahrscheinlichkeit (Biro et al., 2005). Diese Variabilität kann durch prä- und postsynaptische Parameter hervorgerufen werden und so im Rahmen synaptischer Plastizität die Effektivität der Signalübertragung modulieren. Zu den postsynaptischen Parametern gehören die Sensitivität und die Anzahl postsynaptischer Rezeptoren (Franks et al. 2002, Faber et al., 1992). Zu den präsynaptischen Parametern gehört der Füllungsstatus der synaptischen Vesikel (Edwards et al., 2007), deren Inhalt während der Signalübertragung freigesetzt wird. Eine Voraussetzung für die Beeinflussung der postsynaptischen Antwort durch den vesikulären Füllungsstatus ist, dass die postsynaptischen Rezeptoren unter physiologischen Bedingungen nicht mit Neurotransmittern gesättigt sind (Forti et al., 1997; Liu et al., 1999). So führt die Exozytose eines stärker befüllten Vesikels bei ansonsten gleich bleibenden Bedingungen zu einer höheren Amplitude des ausgelösten mEPSC.

1.1.2 *Variabilität des vesikulären Füllungsstatus*

Unterschiede im vesikulären Füllungsstatus beeinflussen die Effektivität der synaptischen Übertragung (Edwards et al., 2007). Die Neurotransmittermenge pro Vesikel lässt sich auf verschiedene Arten beeinflussen. Dazu gehören die Neurotransmitterkonzentration im Zytosol, die Transportrate des Neurotransmitters durch vesikuläre Neurotransmittertransporter in die synaptischen Vesikel und der unspezifische Verlust intravesikulären Transmitters über die Vesikelmembran. Dabei hängt die Neurotransmitterkonzentration im Zytosol von der Aktivität und Expression auf- und abbauender Enzyme, sowie der Plasmamembran- und vesikulären

Transporter des entsprechenden Neurotransmitters ab. Für das dopaminerge System konnte dieser Einfluss unter anderem anhand von Deletionsmutanten des Dopamintransporters der Plasmamembran DAT, durch Aktivierung der Tyrosinhydroxylase und durch Applikation des Dopaminvorläufers L-DOPA belegt werden: In allen genannten Ansätzen wurde die pro Vesikel freigesetzte Transmittermenge beeinflusst (Chang et al., 2002; Jones et al., 1998; Pothos et al., 1998a; Pothos et al., 1998b). Die Auswirkung der Expressionsrate der vesikulären Transporter wurde einerseits für die vesikulären Monoamin- und Acetylcholintransporter mehrfach belegt (Fon et al., 1997; Pothos et al., 2000; Prado et al., 2006; Song et al., 1997; Travis et al., 2000). Eine vermehrte Expression von VGLUT 1 führt zu einer Erhöhung der VGLUT-Menge auf synaptischen Vesikeln und des Glutamatgehalts synaptischer Vesikel (Wojcik et al., 2005, Daniels et al., 2004 ; Wilson et al., 2005). Im Falle der vesikulären Glutamattransporter scheinen zirkadiane Sortierungsprozesse bei insgesamt gleicher Expressionsrate die Anzahl von Transportern pro Vesikel zu regulieren und könnten dadurch die vesikuläre Füllung beeinflussen (Yelamanchili et al., 2006; Darna et al., 2009). Neben den zuvor genannten Mechanismen kann aber auch die Aktivität der vesikulären Neurotransmittertransporter den vesikulären Füllungszustand und damit die synaptische Übertragung beeinflussen.

1.2 Vesikuläre Neurotransmittertransporter

Vesikuläre Neurotransmittertransporter transportieren Neurotransmitter vom Zytosol in sekretorische Vesikel (Ahnert-Hilger et al., 2003; Brunk et al., 2006). Man unterscheidet mehrere Klassen vesikulärer Neurotransmittertransporter:

- Die vesikulären Glutamattransporter (VGLUT) transportieren Glutamat.
- Der vesikuläre Transporter für exzitatorische Aminosäuren (VEAT) transportiert Glutamat und Aspartat (Miyaji et al., 2010).
- Die vesikulären Monamintransporter (VMAT) transportieren Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin, Serotonin und Histamin.
- Der vesikuläre Acetylcholintransporter (VACHT) transportiert Acetylcholin.
- Der vesikuläre Transporter für inhibitorische Aminosäuren (VIAAT/VGAT) transportiert GABA und Glycin.
- Der vesikuläre Transporter für Nukleotide (VNUT) transportiert ATP (Iwatsuki et al., 2009).

Die treibende Kraft des vesikulären Neurotransmittertransports ist ein elektrochemischer Gradient über der Vesikelmembran ($\Delta\mu_{H^+}$) (Abb. 1). Er setzt sich zusammen aus einem Protonengradienten (ΔpH) und einem elektrischen Gradienten ($\Delta\Psi$). Beide werden durch die

Aktivität der vakuolären H⁺-ATPase, die Protonen aus dem Zytosol ins Vesikellumen transportiert, aufgebaut. Dadurch kommt es zu einer intravesikulären Ansammlung positiver Ladungen. Neurotransmittermoleküle werden im Antiport gegen Protonen in das Vesikellumen transportiert (Johnson, 1988).

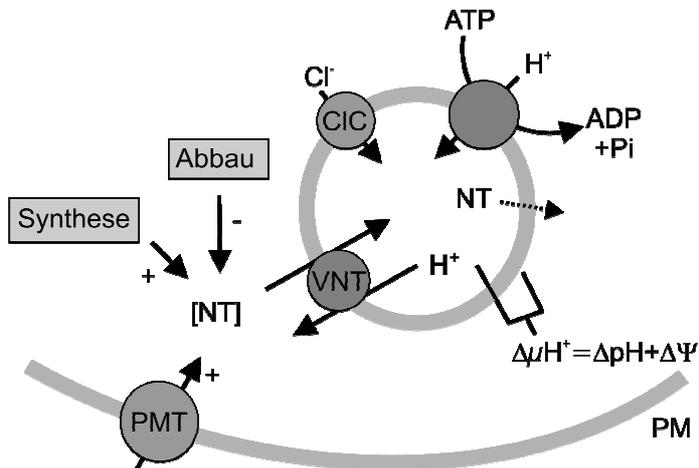


Abb. 1: Einflussgrößen der vesikulären Neurotransmittermenge

Alle Faktoren, die die treibende Kraft $\Delta\mu H^+$ des vesikulären Neurotransmittertransports verändern, beeinflussen die vesikuläre Speicherung von Neurotransmittern. Dazu gehören die vakuoläre H⁺-ATPase und vesikuläre Chloridkanäle. Unspezifische Verluste durch die Vesikelmembran verringern den vesikulären Neurotransmittergehalt. Die zytosolische Neurotransmitterkonzentration [NT] beeinflusst die Menge an Neurotransmitter, die ins Vesikel transportiert wird, und hängt wiederum von Expression und Aktivität auf- und abbauender Enzyme sowie der Plasmamembrantransporter der entsprechenden Neurotransmitter ab.

+: Erhöhung; -: Erniedrigung; ClC: Chloridkanal; NT: Neurotransmitter; PM: Plasmamembran; PMT: Plasmamembrantransporter; VNT: vesikulärer Neurotransmittertransporter

Die Aktivität verschiedener vesikulärer Neurotransmittertransporter hängt in unterschiedlichem Ausmaß von $\Delta p H$ und $\Delta \Psi$ ab. Zusätzlich können intravesikuläre Chloridionen und andere Anionen (z.B. Glutamat) den elektrochemischen Gradienten beeinflussen. Aufnahme von Chlorid in die Vesikel reduziert den elektrischen Anteil $\Delta \Psi$ des elektrochemischen Gradienten. Dadurch kann die Protonenpumpe einen größeren pH-Gradienten aufbauen. Die intravesikuläre Chloridkonzentration kann durch vesikuläre Chloridkanäle beeinflusst werden (Jentsch et al., 2005). Dabei gibt es Hinweise darauf, dass die vesikulär lokalisierten ClC3-Kanäle tatsächlich als Cl⁻/H⁺ Austausch funktionieren (Matsuda et al., 2008).

1.2.1 Vesikuläre Monoamintransporter

Es gibt zwei Isoformen vesikulärer Monoamintransporter, VMAT1 und VMAT2, die aus PC12-Zellen und aus dem Rattengehirn isoliert wurden (Erickson et al., 1992; Liu et al., 1992; Liu et al., 1994). Für beide Isoformen wird eine Struktur mit 12-Transmembrandomänen postuliert. N-

und C-Terminus sind zytoplasmatisch lokalisiert. Sowohl VMAT1 als auch VMAT2 besitzen eine große intravesikuläre Schleife zwischen den Transmembrandomänen 1 und 2, die in das Vesikellumen ragt (Henry et al., 1994a; Henry et al., 1994b).

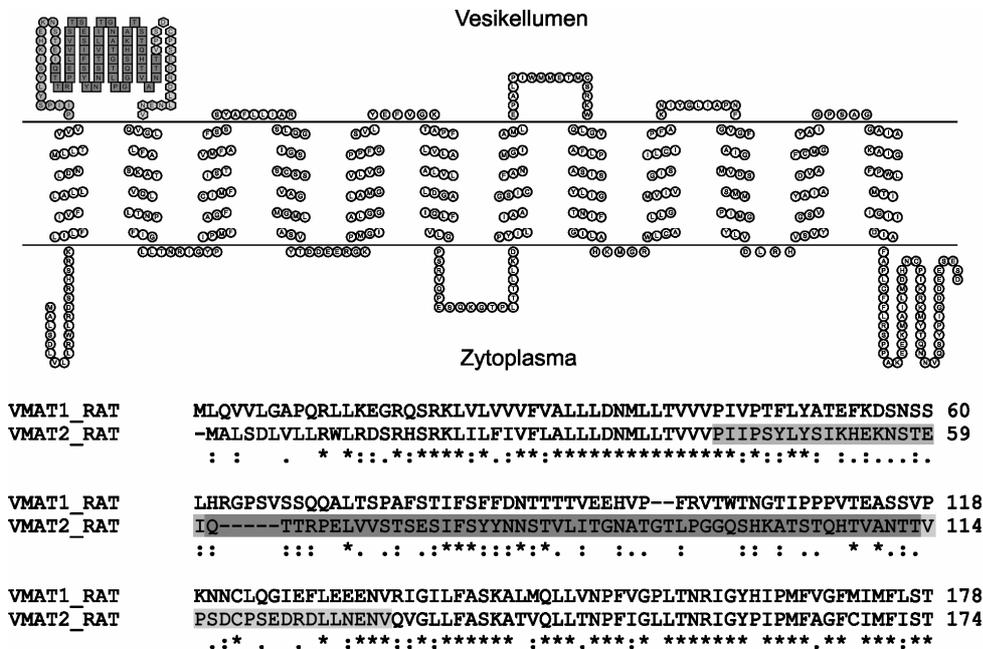


Abb. 2: Darstellung von VMAT2 (Schema, Ratte) und Sequenzalignment von VMAT1 und VMAT2 im Bereich der ersten intravesikulären Schleife

VMAT1 und VMAT2 unterscheiden sich besonders im Bereich der ersten intravesikulären Schleife (grau markierte Abschnitte). Der am stärksten variable Bereich ist dunkelgrau markiert. Zur schematischen Darstellung von VMAT2 wurde die Transmembranprotein-Display-Software TOPO2 angewendet (<http://www.sacs.ucsf.edu/TOPO2/>). Das Sequenzalignment wurde mit Hilfe der Software Clustal W erstellt (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>); (Chenna et al., 2003).

Beim Sequenzvergleich zwischen VMAT1 und VMAT2 fällt bei insgesamt 78-prozentiger Homologie auf Aminosäureebene die größte Divergenz im Bereich dieser luminalen Schleife auf (Schuldiner et al., 1995). VMAT1 und VMAT2 unterscheiden sich sowohl bezüglich ihrer Expression in verschiedenen Geweben als auch in ihren pharmakologischen Eigenschaften. VMAT2 wird vor allem in Neuronen, sowie in enterochromaffinen Zellen und Thrombozyten exprimiert (Erickson et al., 1996; Höltje et al., 2003; Lesch et al., 1993; Peter et al., 1995). VMAT1 wird im adulten Gehirn nur in der Epiphyse exprimiert, diese Isoform kommt überwiegend peripher in neuroendokrinen Zellen vor (Hayashi et al., 1999). Pränatal werden beide Isoformen in manchen Gehirnregionen der Ratte koexprimiert (Hansson et al., 1998; Schutz et al., 1998).

VMAT transportieren Monoamine im Austausch gegen zwei Protonen aus dem Zytosol in sekretorische Vesikel (Johnson et al., 1981; Knoth et al., 1981). Ihre Transportaktivität hängt mehr von ΔpH als von $\Delta \Psi$ ab. Messungen an Blutegelsynapsen ließen die Schätzung der

vesikulären Serotoninkonzentrationen auf 270 mM zu (Bruns et al., 2000). Für chromaffine Granula geht man von einer noch höheren Konzentration bis in den molaren Bereich aus (Edwards, 2007). Die intravesikuläre Monoaminkonzentration liegt damit um den Faktor 10^4 - 10^6 höher als die zytosolische Konzentration.

Beide VMAT-Isoformen transportieren Serotonin, Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin mit K_m -Werten im mikromolaren (VMAT1) und submikromolaren (VMAT2) Bereich, sowohl in der Ratte als auch im Menschen (Erickson et al., 1996; Peter et al., 1994). VMAT2 transportiert zusätzlich auch Histamin, dessen Affinität für VMAT1 30-100-fach niedriger als für VMAT2 ist. Beide Isoformen werden effektiv durch Reserpin inhibiert (Darchen et al., 1989; Erickson et al., 1996; Scherman and Henry, 1984). Der Hemmstoff Tetrabenazin hemmt VMAT2 wirksamer als VMAT1, wobei das Ausmaß des Unterschiedes speziesabhängig ist: Der K_i -Wert für humanen VMAT1 ist 200fach höher als für menschlichen VMAT2 (Erickson et al., 1996); die IC_{50} für VMAT1 aus der Ratte ist zehnmal höher als die für VMAT2 aus der Ratte (Peter et al., 1994).

Neben ihrer Funktion für die Neurotransmitterspeicherung können die VMAT Zellen vor zytosolisch toxischen Substanzen schützen. Strukturell sind sie bakteriellen Transportern, die für die Vermittlung von Antibiotikaresistenzen verantwortlich sind, ähnlich (Schuldiner et al., 1995). Zytosolische Monoamine bzw. deren Oxidationsprodukte wirken toxisch, sodass die hohe Substrataffinität der VMAT physiologisch sinnvoll ist (Chaudhry et al., 2008). Besonders deutlich konnte diese Funktion anhand von VMAT2-Deletionsmutanten (Maus) belegt werden. Homozygote VMAT2-Deletionsmutanten sterben unmittelbar nach der Geburt (Fon et al., 1997). Heterozygote Tiere sind sensitiver gegenüber dem Toxin MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin), das für die experimentelle Auslösung eines Parkinson-Syndroms in Nagetieren eingesetzt wird (Gainetdinov et al., 1998; Takahashi et al., 1997; Tolwani et al., 1999). MPTP wird nach Oxidation zu MPP^+ (1-Methyl-4-Phenyl-pyridinium) durch VMAT in die Vesikel transportiert. Dadurch wird seine toxische Wirkung reduziert.

1.2.2 Vesikuläre Glutamattransporter

Es gibt drei Isoformen vesikulärer Glutamattransporter, VGLUT1 (Bellocchio et al., 2000; Takamori et al., 2000), VGLUT2 (Bai et al., 2001; Fremeau et al., 2001; Takamori et al., 2001) und VGLUT3 (Fremeau et al., 2002; Gras et al., 2002; Schafer et al., 2002; Takamori et al., 2002). VGLUT1 und VGLUT2 wurden zunächst als Natrium-abhängige Phosphattransporter an der Plasmamembran, *brain specific Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter* (BNPI) und *differentiation-associated Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter* (DNPI), beschrieben (Aihara et al., 2000; Hisano et al., 2000; Ni et al., 1994). Für VGLUT1 und VGLUT2 wird eine Struktur mit 12 Transmembrandomänen, für VGLUT3 mit 10 Transmembrandomänen

angenommen, der C-Terminus und der N-Terminus sind zytoplasmatisch lokalisiert (Liguz-Leczna and Skangiel-Kramska, 2007).

Die regionale Verteilung von VGLUT1 und von VGLUT2 im Gehirn unterscheidet sich. Im Neocortex, Hippocampus und Cerebellum wird überwiegend VGLUT1 exprimiert, im Diencephalon und Hirnstamm überwiegend VGLUT2 (Fremeau et al., 2001; Hisano et al., 2000; Kaneko and Fujiyama, 2002; Sakata-Haga et al., 2001). Innerhalb des Kleinhirns findet man VGLUT1 in den Parallelfasern, VGLUT2 in den Kletterfasern (Fremeau et al., 2001). Peripher werden VGLUT1 und VGLUT2 außerdem von endokrinen Zellen exprimiert (Hayashi et al., 2003; Hayashi et al., 2001). VGLUT3 ist in cholinergen, serotonergen und GABAergen Terminalien lokalisiert, was für eine Rolle des Glutamats als Kotransmitter in diesen Neuronen spricht (Fremeau et al., 2002; Gras et al., 2002).

Alle drei VGLUT Isoformen transportieren spezifisch Glutamat, das ebenfalls exzitatorisch wirksame Aspartat wird nicht transportiert (Gras et al., 2002; Takamori et al., 2000). Die K_m -Werte für Glutamat liegen bei etwa 1mM (1-2 mM für VGLUT1 und 2; 0,6-1,6 mM für VGLUT3) (Bellocchio et al., 2000; Fremeau et al., 2002; Gras et al., 2002) und damit etwa ein bis zwei Zehnerpotenzen unter denen der Plasmamembrantransporter ($K_m \sim 20\mu\text{M}$). Durch die hohe zytosolische Glutamatkonzentration (geschätzt etwa 10mM (Danbolt, 2001)) können die synaptischen Vesikel trotzdem ausreichend mit Glutamat beladen werden, resultierend in einer intravesikulären Glutamatkonzentration von etwa 100mM. Intrazelluläres Glutamat ist im Gegensatz zu den Monoaminen und ihren Oxidationsprodukten nicht zytotoxisch. Es gibt Hinweise darauf, dass VGLUT1 außer Glutamat auch Cl^- -Ionen in synaptische Vesikel transportieren kann. Die dafür optimalen extravesikulären Cl^- -Konzentrationen liegen zwischen 1mM und 10mM (Naito and Ueda, 1985; Reimer et al., 2001; Schenck et al., 2009). Alle drei VGLUT Isoformen können durch verschiedene Inhibitoren spezifisch gehemmt werden, dazu gehören zum Beispiel die Farbstoffe Trypanblau, Evans-Blau und Bengal-Rot (Ogita et al., 2001; Patel et al., 2007; Roseth et al., 1995; Thompson et al., 2005).

Die Aktivität der VGLUT hängt mehr von der elektrischen Komponente $\Delta\psi$ als vom Protonengradienten (ΔpH) des elektrochemischen Gradienten über der Vesikelmembran ab (Maycox et al., 1988; Maycox et al., 1990). Für die vesikuläre Speicherung von Glutamat ist jedoch insbesondere ΔpH von Bedeutung (Wolosker et al., 1996). Der vesikuläre Glutamatttransport wird außerdem von der extravesikulären Chloridionenkonzentration beeinflusst (Bai et al., 2001; Fremeau et al., 2002; Fremeau et al., 2001; Naito and Ueda, 1985; Varoqui et al., 2002). Dabei ist die Transportaktivität in Abwesenheit extravesikulären Chlorids niedrig, erreicht bei 2-4mM ein Optimum und nimmt ab 10 mM Chlorid allmählich wieder ab. Eine Theorie geht davon aus, dass das Transportoptimum durch Bindung von Chlorid an eine

regulatorische Bindungsstelle an den VGLUTs selbst hervorgerufen wird (Hartinger and Jahn, 1993; Juge et al., 2010; Juge et al., 2006). Alternativ wurde der intravesikuläre pH-Wert verantwortlich gemacht (Tabb et al., 1992). Sowohl $\Delta\Psi$ als auch ΔpH werden durch intravesikuläres Chlorid bzw. vesikuläre Chloridkanäle oder -transporter beeinflusst. Wodurch die Chloridleitfähigkeit synaptischer Vesikel hauptsächlich bestimmt wird, ist nicht vollständig geklärt (Xie et al., 1989). Im Falle von VGLUT1-exprimierenden Systemen könnten dafür sowohl der Chloridkanal CIC3 als auch VGLUT1 in Frage kommen (Stobrawa et al., 2001). Andere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass VGLUT1 $\Delta\Psi$ abhängig Glutamat im Austausch gegen Chloridionen in synaptische Vesikel transportieren kann (Schenck et al., 2009, Abb. 3). In Gegenwart extravesikulären Chlorids soll VGLUT1 Glutamat und Chlorid im Kotransport in synaptische Vesikel transportieren können, dabei hängt der Transport z.T. vom ΔpH ab, das durch intravesikuläres Chlorid entscheidend beeinflusst wird.

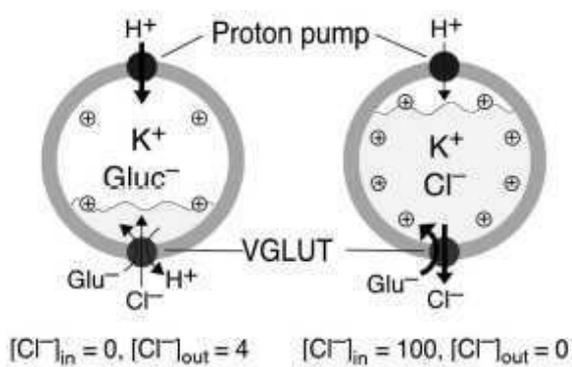


Abb. 3: Transporteigenschaften des VGLUT1: Treibende Kraft des Transports ist der elektrochemische Gradient über der Vesikelmembran, insbesondere dessen elektrische Komponente $\Delta\Psi$. Dadurch ist das Innere des Vesikels positiv geladen und gegenüber dem Zytosol azidifiziert. Zusätzlich zur Glutamatttransportfunktion soll VGLUT1 Chloridionen transportieren können. Diese Transporteigenschaft ist jedoch noch umstritten. Das Schema verdeutlicht die verschiedenen Transporteigenschaften in Abhängigkeit von der extra- und intravesikulären Chloridkonzentration. Abbildung entnommen aus Schenck et al., 2009.

Nach diesen Erkenntnissen regulieren extravesikuläre Chloridkonzentrationen im niedrig-millimolaren Bereich die vesikuläre Glutamataufnahme nicht durch regulatorische Bindung von Chlorid an VGLUT1 selbst. Die Transporteigenschaften und Mechanismen der Chloridabhängigkeit sind also immer noch Gegenstand kontroverser Diskussionen und damit nicht vollständig verstanden.

1.3 Heterotrimere G-Proteine

1.3.1 Allgemeine Eigenschaften heterotrimerer G-Proteine

Heterotrimere Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) gehören zur Familie der GTP-hydrolysierenden Enzyme und bestehen aus je einer α -, β - und γ -Untereinheit (Birnbaumer, 2007; Bourne et al., 1990). Sie dienen der Signalübermittlung von heptahelikalen Rezeptoren

der Plasmamembran, die durch extrazelluläre Stimuli aktiviert wurden, an intrazelluläre Effektorsysteme. Es gibt 23 Isoformen der α - und 12 Isoformen der γ -Untereinheiten. Von den fünf Genen der β -Untereinheiten sind mehrere Splice-Varianten der β_3 und zwei Splice-Varianten der β_5 -Untereinheit bekannt (McIntire, 2009). Durch die Kombination verschiedener Isoformen der Untereinheiten können mehr als 1000 unterschiedliche Heterotrimerer entstehen, die an verschiedenen Signalkaskaden beteiligt sein können. Dabei werden die Kombinationsmöglichkeiten einerseits durch die Expressionsmuster der Untereinheiten in verschiedenen Geweben eingeschränkt, andererseits können sich die Isoformen nicht zu jedem theoretisch möglichen Heterotrimer zusammenfinden. Heterotrimerer G-Proteine werden anhand ihrer α -Untereinheiten in vier Familien eingeteilt, Gs, Gi/o, Gq/11 und G12/13. Im inaktiven Grundzustand liegt ein Heterotrimer vor, bestehend aus dem Komplex von β - und γ -Untereinheit sowie einer GDP-bindenden α -Untereinheit. Im Aktivierungszyklus heterotrimerer G-Proteine (Abb. 4) stellt $G\alpha$ -GTP die aktive Form der α -Untereinheit dar, die Effektoren beeinflussen kann. Effektorsysteme können jedoch auch durch $\beta\gamma$ -Komplexe beeinflusst werden (Smrcka, 2008).

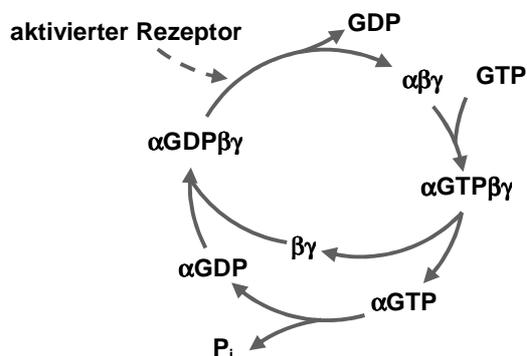


Abb. 4: Aktivierungszyklus heterotrimerer G-Proteine: Bindet der $\alpha\text{GDP}\beta\gamma$ Komplex an einen aktivierten Rezeptor, kommt es zum Austausch von GDP gegen GTP in der α -Untereinheit. Diese dissoziiert daraufhin vom $\beta\gamma$ -Komplex. Sowohl α -Untereinheit als auch $\beta\gamma$ -Komplex können die Aktivität von Effektoren beeinflussen. Nach Spaltung von GTP durch die intrinsische GTPase Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit kommt es zu einer Reassoziierung mit dem $\beta\gamma$ -Komplex und der Signalzyklus kann erneut beginnen.

Durch die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit wird $G\alpha\text{GTP}$ zu $G\alpha\text{GDP}$ und Phosphat umgesetzt. Inaktives $G\alpha\text{GDP}$ reassoziiert mit $\beta\gamma$ zum Heterotrimer. Experimentell können schwer hydrolysierbare GTP-Analoga wie GMP-P(NH)P oder $\text{GTP}\gamma\text{S}$ $G\alpha$ -Untereinheiten in aktiviertem Zustand fixieren. *In vivo* kann die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit durch sogenannte RGS-Proteine (Regulators of G-Protein signalling) oder Effektoren verstärkt werden (Arshavsky and Bownds, 1992; Berstein et al., 1992; Hollinger and Hepler, 2002; Kozasa et al., 1998; Neubig, 2002; Ross and Wilkie, 2000).

Heterotrimerer G-Proteine lassen sich nicht nur durch heptahelikale Plasmamembranrezeptoren aktivieren, sondern auch durch andere Proteine ohne Beteiligung eines Rezeptors: Ein Beispiel

dafür sind die so genannten AGS-Proteine (Activators of G-Protein Signalling) (Cismowski, 2006). Außerdem wurde dieses Phänomen für GAP-43 (growth associated protein 43) (Strittmatter et al., 1991), Presenilin (Smine et al., 1998), Phosphatidylethanolamin bindendes Protein PBP (Kroslak et al., 2001), Ric8A (Synembryn, (Tall et al., 2003)) und Cystein String Protein (Natochin et al., 2005) beschrieben.

1.3.2. *Go α -Isoformen und ihre Funktionen*

Go α gehört zur Gi/o-Familie heterotrimerer G-Proteine und macht zusammen mit Gi α bis zu 1,5% des Proteingehalts von Membranpräparationen aus dem Rinderhirn aus (Neer et al., 1984; Sternweis and Robishaw, 1984). Es gibt drei Go α -Isoformen. Go1 α und Go2 α sind Splice-Varianten, Go3 α geht aus Go1 α durch posttranslationale Deamidierung hervor (Exner et al., 1999; Hsu et al., 1990; Murtagh et al., 1994; Strathmann et al., 1990). Go1 α scheint in drei verschiedenen Varianten zu existieren, die gewebe- und entwicklungsabhängig exprimiert werden (Yoo et al., 2002). Die Aminosäuresequenzen von Go1 α und Go2 α unterscheiden sich vor allem C-terminal, wo G α -Untereinheiten im Zustand des Heterotrimers mit Rezeptoren spezifisch interagieren (Grishina and Berlot, 2000). In vielen Studien über Go α wird nicht erwähnt, welche Go α -Isoform untersucht wurde, meistens ist dann Go1 α gemeint.

Go α -Untereinheiten werden in Neuronen, neuroendokrinen Zellen und im Herzen exprimiert (Jiang and Bajpayee, 2009). Untersuchungen an Go α -Deletionsmutanten zeigten, dass Dopamin-D2-Rezeptoren mit Go α verknüpft sind (Jiang et al., 2001). In der Neuroblastom-Zelllinie NS20Y kann Go α über D2L-Rezeptoren aktiviert werden und die Aktivität der Adenylylzyklase beeinflussen (Watts et al., 1998). Die beiden Splice-Varianten von Go α koppeln an unterschiedliche Rezeptoren (Chen and Clarke, 1996; Dhingra et al., 2002; Kleuss et al., 1991).

Nach Überexpression von konstitutiv aktivem Go α konnten in verschiedenen Systemen Einflüsse auf Phospholipasen, Ionenkanäle und Signalkaskaden, die an Wachstum und Differenzierung beteiligt sind, nachgewiesen werden (Kroll et al., 1992; Moriarty et al., 1990; Ram and Iyengar, 2001; van Biesen et al., 1996; VanDongen et al., 1988). Dabei blieben die direkt mit Go α interagierenden Effektoren unklar. Außer neuronalen Ca²⁺-Kanälen sind nur wenige direkte Effektoren von Go α -Untereinheiten bekannt (Kinoshita et al., 2001). Interaktionsstudien identifizierten verschiedene Interaktionspartner für Go α oder Go1 α , dazu gehören RGS14 (Traver et al., 2000), RGS17, Rap1Gap (Jordan et al., 1999) Purkinje cell

protein 2 (Pcp2, (Luo and Denker, 1999) und G-protein regulated inducer of neurite outgrowth 1&2 (GRIN1&2; (Jordan et al., 1999; Nakata and Kozasa, 2005; Zhao et al., 1999)).

Isoformspezifische funktionelle Untersuchungen ergaben, dass Go2 α die Adenylylzyklase inhibieren und spannungsabhängige Kalziumströme reduzieren kann (Kobayashi et al., 1990; Man-Son-Hing et al., 1992). Aktivierung von Go2 α führt außerdem zu einer Verminderung der vesikulären Monoaminaufnahme über VMAT1 und VMAT2 in neuroendokrinen Zelllinien und Neuronen (Ahnert-Hilger et al., 1998; Höltje et al., 2000). Auf die Rolle von vesikulären G α -Untereinheiten für die Regulation der vesikulären Neurotransmitterspeicherung wird im folgenden Abschnitt (1.4) ausführlicher eingegangen.

Die Bedeutung von Go α im Nervensystem wird durch die Auswirkungen der Deletion beider Go α -Splice-Varianten in Mäusen verdeutlicht. Go α -Deletionsmutanten sterben etwa vier bis sechs Wochen nach der Geburt und zeigen neurologische Symptome, wie Krampfanfälle, Tremor, auffällige Bewegungsmuster und Hyperalgesie (Jiang et al., 1998). Morphologisch ist ihr Gehirn jedoch unverändert gegenüber Wildtyp-Mäusen (Valenzuela et al., 1997). Die Lebensdauer von Go1 α -Deletionsmutanten ist ebenfalls deutlich verkürzt, während Go2 α -Deletionsmutanten zunächst phänotypisch unauffällig erschienen.

1.4 Vesikuläre G α -Untereinheiten als Regulatoren der Speicherung von Neurotransmittern in synaptischen Vesikeln

Außer ihrer Lokalisation an der Plasmamembran kommen heterotrimere G-Proteine auf intrazellulären Organellen vor (Leyte et al., 1992; Nürnberg and Ahnert-Hilger, 1996; Pahner et al., 2003). So konnten Go2 α , Gq α und G β -Untereinheiten (vor allem G β ₂) in Kolokalisation mit VMAT1 und VMAT2 auf chromaffinen Granula im Nebennierenmark der Ratte gefunden werden (Pahner et al., 2002). Sowohl auf synaptischen Vesikeln serotonerger als auch glutamaterger und GABAerger Nervenendigungen konnten G-Protein Untereinheiten nachgewiesen werden (Höltje et al., 2000; Pahner et al., 2003). Massenspektroskopisch ließen sich Go α , Gq α , Gz α , G13 α und Gi2 α und G β ₁₋₄ auf aufgereinigten synaptischen Vesikeln nachweisen (Takamori et al., 2006), und Go α , Gi2 α und G β -Untereinheiten auf Clathrin-ummantelten Vesikeln aus dem Rattengehirn (Blondeau et al., 2004). Da G β -Untereinheiten immer gebunden an G γ Untereinheiten vorkommen (Dingus et al., 2005), belegen diese Daten das Vorkommen vollständiger Heterotrimere auf sekretorischen Vesikeln.

Funktionell sind diese vesikulären Heterotrimere für die Regulation der vesikulären Neurotransmitterspeicherung von Bedeutung. Aktives Go2 α oder G-Protein Aktivierung durch

schwer hydrolysierbare GTP-Analoga inhibiert die Monoaminspeicherung in den neuroendokrinen Zelllinien PC12 und BON, die VMAT1 (PC12) bzw. VMAT1 und VMAT2 (BON) exprimieren (Ahnert-Hilger et al., 1998; Höltje et al., 2000). Diese Beobachtung konnte an aufgereinigten chromaffinen Granula des Nebennierenmarks der Ratte bestätigt werden (Pahner et al., 2002). Auch die VMAT2-Aktivität in Neuronen wird durch $G_{\alpha 2}$ reguliert, wie an serotonergen Neuronen aus Raphe-Primärkulturen und synaptischen Vesikeln gezeigt wurde (Höltje et al., 2000). Die Serotoninspeicherung in sekretorischen Vesikeln von Thrombozyten wird ebenfalls durch G-Proteine beeinflusst. Dabei wird die VMAT2-Aktivität durch $G_{\alpha q}$ inhibiert, wie Untersuchungen an $G_{\alpha q}$ -Deletionsmutanten zeigten (Höltje et al., 2003). Die Hemmung der Glutamataufnahme durch synaptische Vesikel nach Applikation des schwer hydrolysierbaren GTP-Analogons GMP-P(NH)P deutet darauf hin, dass die Aktivität der VGLUTs auch durch heterotrimere G-Proteine beeinflusst wird, wobei die verantwortlichen Untereinheiten zunächst nicht identifiziert werden konnten (Pahner et al., 2003). Sowohl bei der VMAT2-Regulation in Thrombozyten und Neuronen als auch bei der VMAT1- und VMAT2-Regulation in neuroendokrinen Zellen sind die direkten Effektoren der G_{α} -Untereinheiten nicht bekannt.

Untersuchungen an Thrombozyten von Tryptophanhydroxylase1 (Tph1)-Deletionsmutanten (Walther and Bader, 2003) ergaben erste Hinweise darauf, dass die G-Protein vermittelte Regulation der Monoaminspeicherung vom Füllungszustand der sekretorischen Vesikel abhängt. Die sekretorischen Vesikel der Thrombozyten von Tph1 $-/-$ Mäusen enthalten fast kein Serotonin. Dort fehlt die G-Protein vermittelte Regulation der VMAT2-Aktivität, kann aber durch Vorbeladung der sekretorischen Vesikel mit Monoaminen rekonstituiert werden (Höltje et al., 2003). Das deutet darauf hin, dass die Signalkaskade, die in der G-Protein vermittelten Hemmung der Monoaminspeicherung resultiert, im Lumen sekretorischer Vesikel beginnt. Welche Struktur dabei den vesikulären Monoamingehalt misst und die Rolle des G-Protein aktivierenden Rezeptors übernimmt, war jedoch unklar.

1.3 Forschungsschwerpunkte

Im Rahmen der vorgelegten Arbeiten wurden folgende Fragenstellungen untersucht:

- Welche G-Protein Untereinheit ist für die Regulation der vesikulären Glutamataufnahme verantwortlich?
- Ist die Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme in Neuronen auch vom vesikulären Füllungszustand abhängig?
- Falls die vorherige Frage positiv beantwortet werden kann: Welche Struktur übernimmt die Rolle des Rezeptors in der G-Protein vermittelten Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme?
- Gibt es Hinweise auf G-Protein Effektoren innerhalb dieser Signalkaskade?
- Welche physiologische Bedeutung hat die G-Protein vermittelte Regulation der Neurotransmitterspeicherung?

2. Zusammenfassung der eigenen Arbeiten

Die in den folgenden Abschnitten vorgestellten Arbeiten befassen sich mit unterschiedlichen Aspekten der G-Protein vermittelten Regulation der vesikulären Monoamin- und Glutamatspeicherung.

Aus vorherigen Untersuchungen war bereits bekannt, dass G-Protein Aktivierung durch GMP-P(NH)P zu einer Verminderung der vesikulären Glutamataufnahme führt. Daher wurde zunächst überprüft, welche $G\alpha$ -Untereinheit für diese Regulation verantwortlich ist, und wie sich die G-Protein Aktivierung auf die Chloridabhängigkeit der vesikulären Glutamataufnahme auswirkt (Beitrag 2.1).

Anschließend wurden Mechanismen der G-Protein vermittelten Hemmung der Monoaminspeicherung in VMAT1- und in VMAT2-exprimierenden Systemen untersucht. Dabei sollten insbesondere die der G-Protein Aktivierung vorgeschalteten Signale identifiziert werden (Beitrag 2.2).

Mithilfe des Vergleichs von $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten mit Wildtyp-Mäusen und durch die Behandlung beider Genotypen mit Kokain konnte die physiologische Bedeutung der $Go2\alpha$ -induzierten Regulation für das Gleichgewicht des dopaminergen Systems, insbesondere in Hinblick auf motorische Funktionen, deutlich gemacht werden (Beitrag 2.3).

Die Untersuchung der Effekte von Isoformen der *Ca²⁺-dependent Activator Proteins of Secretion* CAPS1 und CAPS2 auf die vesikuläre Monoaminspeicherung ergab Hinweise auf $Go2\alpha$ nachgeschaltete Signalwege in der G-Protein vermittelten Regulation (Beitrag 2.4).

Der Einfluss von $Go2\alpha$ auf das Zusammenspiel glutamaterger und dopaminergere Signalwege und seine Bedeutung im Rahmen der differentiellen Wirkung unterschiedlicher Psychostimulanzien auf die motorische Aktivität wurde anhand von $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten erforscht. Dadurch konnte die komplexe Rolle von $Go2\alpha$ in der monoaminergen und glutamatergen Neurotransmission sowie ihre *in vivo* Auswirkung auf (patho)physiologische Zustände dargelegt werden (Beitrag 2.5).

2.1 Go2 α reguliert die Aktivität vesikulärer Glutamatransporter durch Änderung ihrer Chloridabhängigkeit

In Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe war bereits gezeigt worden, dass die Aktivität vesikulärer Neurotransmittertransporter durch Vesikel-assoziierte heterotrimere G-Proteine reguliert wird: Go2 α wurde auf sekretorischen Vesikeln gefunden und inhibierte die Aktivität von VMAT1 und VMAT2 (Ahnert-Hilger et al., 1998; Höltje et al., 2000; Pahner et al., 2002). Außerdem waren Go α -Isoformen auch auf glutamatergen Vesikeln nachweisbar, und G-Protein Aktivierung durch das nicht-hydrolysierbare GTP-Analogon GMP-P(NH)P verminderte die vesikuläre Glutamataufnahme (Pahner et al., 2003).

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst überprüft, welche G α -Untereinheit für die G-Protein vermittelte Regulation der vesikulären Glutamatspeicherung verantwortlich ist. Dazu wurde die vesikuläre Glutamataufnahme an Präparationen synaptischer Vesikel von Wildtypmäusen und verschiedenen G α -Deletionsmutanten untersucht: In Wildtypmäusen bewirkte der G-Protein Aktivator GMP-P(NH)P in Gegenwart von 5mM Chlorid eine Verminderung der V_{max} und des K_m -Werts der vesikulären Glutamataufnahme. G-Protein Aktivierung führte in Gegenwart von 5mM Chlorid ebenfalls zu einer Hemmung der Glutamataufnahme in synaptische Vesikelpräparationen von Go1 α -/-, Gq α -/- und G11 α -/- Mäusen, während kein Effekt auf die vesikuläre Glutamataufnahme in synaptische Vesikel von Go2 α -/- Mäusen zu beobachten war. Dieses Ergebnis deutete auf eine (alleinige) Beteiligung von Go2 α an der Regulation der vesikulären Glutamataufnahme hin. Die Rolle von Go2 α für die vesikuläre Glutamataufnahme wurde dadurch bestätigt, dass Präinkubation von synaptischen Vesikeln von Wildtypmäusen mit Antikörpern gegen Go2 α die Inhibition der vesikulären Glutamataufnahme durch GMP-P(NH)P induzierte G-Protein Aktivierung verhinderte. Allerdings konnte keine Aussage darüber gemacht werden, ob Go2 α alle drei VGLUT Isoformen reguliert, da in den Neurotransmitteraufnahme-Assays nicht zwischen den Isoformen unterschieden werden kann. Allerdings wird im Kleinhirn bis zum postnatalen Tag (P) 10 nur VGLUT2 exprimiert (Boulland et al., 2004; Miyazaki et al., 2003). In Vesikelpräparationen aus dem Kleinhirn von neun Tage alten Mäusen war die G-Protein vermittelte Inhibition der vesikulären Glutamataufnahme wie in adulten Tieren nachweisbar. Also wird zumindest VGLUT2 durch Go2 α reguliert.

Um Änderungen in der vesikulären Proteinausstattung als Ursache für die fehlende G-Protein Regulierung der vesikulären Glutamataufnahme in Go2 α -/- Mäusen auszuschließen, wurde die Expression von VGLUT1, VGLUT2 und VGLUT3, sowie der vesikulär vorkommenden

Chloridkanäle CIC3 und CIC7 mittels Western-Blot Analysen von Gehirnfractionen aus Wildtypmäusen, sowie aus Go1 α - und Go2 α -Deletionsmutanten untersucht. Dabei ergab sich kein Unterschied zwischen den Genotypen.

Als nächstes wurde geklärt, ob die Hemmung der vesikulären Glutamataufnahme nach G-Protein Aktivierung möglicherweise auf eine Beeinflussung der Aktivität der vakuolären H⁺-ATPase zurückzuführen ist. Sie ist durch den Transport von Protonen ins Vesikellumen für den Aufbau des elektrochemischen Gradienten über die Vesikelmembran verantwortlich, der die treibende Kraft des vesikulären Neurotransmittertransports darstellt. Dazu wurde die Azidifizierung synaptischer Vesikel von Wildtyp- und Go2 α -/- Mäusen nach Glutamat- und Chloridapplikation gemessen. Da sich kein Unterschied zwischen den Genotypen ergab, war eine Beeinflussung der H⁺-ATPase durch Go2 α unwahrscheinlich.

Die vesikuläre Glutamataufnahme hängt von der (zytosolischen) Chloridkonzentration ab mit einem Transportoptimum zwischen 4-6 mM. Dafür ist einmal der Einfluss von Chlorid auf den elektrischen Gradienten und den Protonengradienten über die Vesikelmembran verantwortlich (Tabb et al., 1992; Wolosker et al., 1996), zusätzlich stimuliert Chlorid im niedrig millimolaren Bereich die Transportaktivität (Naito and Ueda, 1985), möglicherweise über eine direkte oder indirekte Interaktion mit den Transportern (Hartinger and Jahn, 1993; Juge et al., 2010). Um Hinweise auf den Mechanismus der Go2 α -vermittelten Regulation der VGLUT-Aktivität zu erhalten, wurde die Chloridabhängigkeit des Transports in Wildtypmäusen und Go2 α -/- Mäusen in An- und Abwesenheit von GMP-P(NH)P untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass das Transportoptimum in synaptischen Vesikeln von Wildtypmäusen unter G-Protein Aktivierung zu niedrigeren Chloridkonzentrationen (1mM) verschoben ist. In synaptischen Vesikeln von Go2 α -/- Mäusen hingegen fehlt ein Chlorid-abhängiges Transportoptimum völlig, während Vesikelpräparationen aus Go1 α -/- Gq α -/- und G11 α -/- Mäusen eine den Wildtypmäusen entsprechende Chloridabhängigkeit zeigten. Go2 α scheint also die Chloridabhängigkeit des vesikulären Glutamattransports zu modulieren, wodurch das Transportoptimum an die zytosolische Chloridkonzentration, die die neuronale Exzitabilität beeinflusst (Zhu et al., 2005), angepasst werden könnte.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass Go2 α nicht nur die vesikuläre Monoaminaufnahme sondern auch die vesikuläre Glutamataufnahme reguliert, wobei es zu einer Verschiebung des chloridabhängigen Transportoptimums zu niedrigeren Chloridkonzentrationen kommt. Diese Regulation könnte der Anpassung der vesikulären Glutamataufnahme an unterschiedliche metabolische und Aktivitätszustände von Neuronen dienen.

Zusammenstellung wesentlicher Publikationen

Beitrag 2.1

Winter, S. *, **Brunk, I. ***, Walther, D.J., Höltje, M., Jiang, M., Peter, J.-U., Takamori, S., Jahn, R., Birnbaumer, L., and Ahnert-Hilger, G. (2005).

G α 2 Regulates Vesicular Glutamate Transporter Activity by Changing Its Chloride Dependence.

J. Neurosci. 25, 4672-4680

* beide Autoren haben gleichermaßen zu der Arbeit beigetragen

2.2 Die erste luminale Domäne vesikulärer Monoamintransporter vermittelt die G-Protein abhängige Regulation der Transmitteraufnahme

In dieser Arbeit wurden Mechanismen der G-Protein vermittelten Hemmung der Neurotransmitteraufnahme in VMAT1- und in VMAT2-exprimierenden Systemen untersucht. Dabei sollten insbesondere die der G-Protein Aktivierung vorgeschalteten Signale identifiziert werden.

Vorangegangene Untersuchungen hatten darauf hingewiesen, dass der vesikuläre Füllungsstatus das der G-Protein Aktivierung vorgeschaltete Signal in der $G\alpha$ -vermittelten Hemmung der vesikulären Monoaminaufnahme sein könnte: Die $Gq\alpha$ -vermittelte Inhibition der VMAT2-Aktivität in Thrombozyten ließ sich nämlich nur in Thrombozyten von Wildtypmäusen, nicht jedoch in Thrombozyten von Tryptophanhydroxylase 1 (Tph1)-Deletionsmutanten nachweisen (Höltje et al., 2003), deren sekretorische Vesikel fast kein Serotonin enthalten (Walther et Bader, 2003; Walther et al., 2003).

In der hier zusammengefassten Arbeit wurde mithilfe von VMAT1- und VMAT2-transfizierten CHO-Zellen überprüft, ob der vesikuläre Monoamingehalt das der $G\alpha$ -vermittelten Hemmung vorgeschaltete Signal ist, unabhängig davon, welche VMAT-Isoform reguliert wird und in welchem Gewebe die Regulation stattfindet. Zunächst wurde nachgewiesen, dass CHO-Zellen $Go2\alpha$ exprimieren und $Go2\alpha$ in CHO-Zellen mit VMAT1 bzw. VMAT2 nach Transfektion auf intrazellulären Membranen kolokalisiert ist. Die Sortierung von VMAT auf endosomale Kompartimente nach Transfektion in CHO-Zellen war auch in der Vergangenheit beschrieben worden (Liu and Edwards, 1997). Die transfizierten Transporter waren funktionell aktiv und ihre Transporteigenschaften entsprachen denen bei natürlicher Expression in anderen Geweben. Zur Messung der Transporteigenschaften wurde die Plasmamembran der CHO-Zellen durch Streptolysin O (SLO) permeabilisiert, so dass die vesikuläre Monoaminaufnahme untersucht werden konnte.

G-Protein Aktivierung durch GMP-P(NH)P beeinflusste die vesikuläre Monoaminaufnahme in transfizierte CHO-Zellen nicht. Intrazelluläre Kompartimente von CHO-Zellen enthalten keine Monoamine. Nach Vorbeladung von permeabilisierten VMAT-transfizierten CHO-Zellen mit verschiedenen Monoaminen (Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin, Serotonin oder Histamin) konnte die G-Protein vermittelte Hemmung der VMAT-Aktivität induziert werden, wobei jedoch Unterschiede zwischen den beiden VMAT-Isoformen feststellbar waren. Alle der genannten Monoamine konnten die G-Protein vermittelte Hemmung der Transportaktivität in CHOVMAT1-Zellen induzieren, wobei Serotonin und Adrenalin am effektivsten waren. Bei Vorbeladung von

VMAT2-exprimierenden CHO-Zellen konnte Noradrenalin am effektivsten die G-Protein vermittelte Hemmung induzieren, während Vorbeladung mit Histamin erst bei höheren Konzentrationen eine entsprechende Wirkung zeigte. Erstaunlicherweise führte Vorbeladung mit Adrenalin nicht zu einer Induktion der VMAT2-Hemmung durch G-Protein Aktivierung, obwohl auch Adrenalin durch VMAT2-transportiert wird (Peter et al., 1994). Adrenalin kann sogar die G-Protein vermittelte Hemmung der VMAT2-Aktivität in Thrombozyten und synaptischen Vesikeln der Ratte, sowie in Noradrenalin-vorbeladenen CHOVMAT2-Zellen aufheben. Insgesamt deuteten diese Ergebnisse auf eine luminalen Rezeptorstruktur hin, die die intravesikuläre Monoaminkonzentration messen kann und im Fall der VMAT2-transfizierten CHO-Zellen durch Adrenalin antagonistisch angesteuert werden kann.

Im Folgenden wurde die hypothetische rezeptive Struktur weiter charakterisiert. Dabei stellte sich heraus, dass 5HT_{1B}-Rezeptor Agonisten in serotoninfreien Thrombozyten von TpH1^{-/-}-Mäusen die G-Protein vermittelte Hemmung induzieren können, während 5HT_{1B}-Rezeptor Antagonisten die G-Protein vermittelte Hemmung in monoaminhaltigen VMAT2-exprimierenden Systemen, wie z.B. Wildtyp-Thrombozyten oder synaptischen Vesikeln, aufheben können. Eine 5HT_{1B}-Rezeptor ähnliche Struktur scheint also in die G-Protein vermittelte Hemmung in VMAT2 exprimierenden Systemen involviert zu sein unabhängig davon, ob die G-Protein vermittelte Hemmung über Go₂ α (synaptische Vesikel) oder Gq α (Thrombozyten) abläuft. Analog konnte in VMAT1 exprimierenden Systemen (CHOVMAT1-Zellen und PC12-Zellen) eine α ₁-Rezeptor-ähnliche Struktur identifiziert werden.

Da sich die pharmakologische Induzierbarkeit zwischen VMAT1- und VMAT2-exprimierenden System unterschied, auch wenn diese abgesehen von der transfizierten Transporterisoform identisch waren (CHOVMAT1- und CHOVMAT2-Zellen), lag die Vermutung nahe, dass intravesikuläre Domänen der VMAT selbst als vorgeschaltete Sensoren dienen.

Um die rezeptive Struktur innerhalb der VMAT-Proteine zu identifizieren, wurden nach einem Sequenzvergleich der intravesikulären Domänen mutierte VMAT-Isoformen hergestellt: VMAT1 und VMAT2 haben beide eine große intravesikuläre Schleife zwischen den Transmembrandomänen 1 und 2, die sich besonders in ihrem mittleren Bereich zwischen den beiden Isoformen unterscheidet (Erickson et al., 1992; Liu et al., 1992; Schuldiner et al., 1995). CHO-Zellen wurden mit mutierter DNS einer der beiden VMAT-Isoformen transfiziert, in der entweder die gesamte intrazelluläre Schleife oder nur deren zentraler Teil deletiert war (VMAT2 Δ P42-V130, VMAT2 Δ Q61-T113, VMAT1 Δ H62-V117). Nachdem die unveränderte Transportaktivität der mutierten VMAT und die im Vergleich zu den Wildtyp-Transportern unveränderte Expression in CHO Zellen überprüft worden war, wurde die Induzierbarkeit der G-Protein vermittelten Hemmung der Transportaktivität überprüft. Weder Vorbeladung mit

Noradrenalin nach Vorbehandlung mit dem 5HT1B-Agonisten Anpirtoline konnte die G-Protein vermittelte Hemmung der VMAT2-Aktivität in VMAT2-transfizierten CHO-Zellen induzieren. Die durch Adrenalin und den α 1-Agonisten Cirazoline induzierte G-Protein vermittelte Hemmung der VMAT1-Aktivität war in mit Wildtyp-VMAT1 transfizierten CHO-Zellen signifikant höher als in CHO-Zellen, die mit mutierter VMAT1-DNS transfiziert waren.

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass der intravesikuläre Monoamingehalt das vorgeschaltete Signal der G-Protein vermittelten Hemmung der vesikulären Monoaminspeicherung darstellt. Dabei wird der Monoamingehalt über eine rezeptive Struktur innerhalb der ersten intravesikulären Schleife der VMAT-Isoformen gemessen. Dieses Signal führt auf noch unbekanntem Weg zur G-Protein Aktivierung.

Zusammenstellung wesentlicher Publikationen

Beitrag 2.2

Brunk, I., Blex, C., Rachakonda, S., Höltje, M., Winter, S., Pahner, I., Walther, D. J., Ahnert-Hilger, G. (2006).

The First Luminal Domain of Vesicular Monoamine Transporters Mediates G-protein-dependent Regulation of Transmitter Uptake.

J Biol Chem 281, 33373-33385

2.3 Die Deletion von $Go2\alpha$ verhindert die Entwicklung einer Kokain-induzierten motorischen Sensitivierung durch Beeinträchtigung des striatalen dopaminergen Systems

Die in den vorigen Abschnitten vorgestellten Arbeiten belegen die Rolle von $Go2\alpha$ in der Regulation der vesikulären Monoamin- und Glutamataufnahme. Über die Bedeutung dieser Regulation *in vivo* unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen konnte allerdings nur spekuliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter anderem durch Behandlung von $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten mit Kokain die Rolle der $Go2\alpha$ -induzierten Regulation für das Gleichgewicht des dopaminergen Systems, insbesondere in Hinblick auf motorische Funktionen, deutlich gemacht.

Wiederholte Behandlung mit Kokain führt in Wildtypmäusen zu einer motorischen Sensitivierung. In $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten blieb die Entwicklung einer motorischen Sensitivierung aus, obwohl sich die motorische Ausgangsaktivität vor Behandlung in beiden Genotypen nicht signifikant unterschied. Auch die konditionierte Platzpräferenz als Parameter für die Suchtentwicklung (Tzschentke, 2007) unterschied sich in Wildtyp- und $Go2\alpha$ -/- Mäusen nicht. Im Folgenden wurden die diesem motorischen Phänotyp zugrunde liegenden molekularen Veränderungen untersucht.

Zunächst wurde sichergestellt, dass sich die Wirkung von Kokain auf den Dopaminplasmamembrantransporter (DAT) und VMAT2 in den beiden Genotypen nicht unterscheidet. Auswirkungen auf die motorische Aktivität legen Änderungen in der striatalen Signalübermittlung an D1- und D2-Rezeptoren und deren koppelnden G-Proteinen (Golf, Gs an D1-Rezeptoren, Go an D2-Rezeptoren) nahe (Corvol et al., 2007; Jiang et al., 2001; Zhuang et al., 2000). Die Untersuchung der Expression von D1- und D2-Rezeptoren, sowie $Gs\alpha$ und $Golf\alpha$ im Striatum ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

Protein	unbehandelte Tiere	Kokain-behandelte Tiere
D1-Rezeptor	wt = ko	wt > ko
D2-Rezeptor	wt = ko	wt < ko
$Gs\alpha$	wt > ko	wt = ko
$Golf\alpha$	wt > ko	wt = ko

Tab. 1: Expression von Dopaminrezeptoren und $G\alpha$ -Untereinheiten im Striatum von unbehandelten und Kokain-behandelten Wildtyp und $Go2\alpha$ -/- Mäusen

=: Expression in beiden Genotypen gleich; >: Expression höher im zuerst aufgeführten Genotyp; <: Expression niedriger im zuerst aufgeführten Genotyp

Insgesamt sprachen die Ergebnisse für Verschiebungen in der D1- und D2-Rezeptor vermittelten Signalübermittlung im Striatum zuungunsten der über D1-Rezeptoren angesprochenen, die Motorik fördernden Basalganglienschleifen, was als Erklärung für die motorischen Defizite nach Kokain-Behandlung interpretiert wurde.

HPLC-Untersuchungen ergaben, dass die striatale Dopaminkonzentration in $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten niedriger als in Wildtypmäusen war, möglicherweise durch eine ebenfalls nachgewiesene reduzierte Expression der Tyrosinhydroxylase (TH), die auch nach Kokainbehandlung nachweisbar war. Die Aktivitäten der Monoaminoxidasen (MAO) A und B unterschieden sich nicht zwischen den Genotypen. Gleichzeitig war die Expression von VMAT2 im Striatum von unbehandelten und Kokain-behandelten $Go2\alpha^{-/-}$ Mäusen höher als in Wildtypmäusen, möglicherweise um kompensatorisch trotz verringerter Dopaminkonzentrationen eine ausreichende vesikuläre Füllung sicherzustellen.

Wegen der bekannten Rolle von $Go2\alpha$ in der vesikulären Monoaminspeicherung konnte vermutet werden, dass das Fehlen von $Go2\alpha$ zu einer Dysregulation der striatalen vesikulären Dopaminspeicherung führt. Das könnte konsekutiv die beobachteten Veränderungen im Dopaminspiegel, der Expression der an Transport und Bildung von Dopamin sowie der dopaminergen Signaltransduktion beteiligten Proteine anstoßen, die in dem veränderten motorischen Phänotyp resultieren.

Tatsächlich konnte der hemmende Effekt von aktivem $Go2\alpha$ auf die VMAT2-vermittelte Monoaminspeicherung in Neuronen dadurch bestätigt werden, dass G-Protein Aktivierung in $Go2\alpha$ -Deletionmutanten im Gegensatz zu Wildtypmäusen nicht zu einer Hemmung der Serotoninaufnahme führte. Erstaunlicherweise war aber die vesikuläre Monoaminaufnahme in synaptische Vesikel von $Go2\alpha^{-/-}$ Mäusen niedriger als in Vesikel von Wildtypmäusen. Wegen der hemmenden Wirkung der G-Protein Aktivierung wäre bei Fehlen von $Go2\alpha$ zunächst eher eine Zunahme der Monoaminaufnahme zu erwarten gewesen. Eine Verminderung der Monoaminaufnahme aufgrund einer veränderten pH-Abhängigkeit des vesikulären Transports oder einer veränderten Expression der vakuolären H^+ -ATPase wurde ausgeschlossen.

Zusammenfassend können die Ergebnisse dieser Arbeit folgendermaßen interpretiert werden: Fehlen von $Go2\alpha$ in Deletionsmutanten führt zu einer Verminderung der vesikulären Monoaminspeicherung in synaptischen Vesikeln. Zur Vermeidung erhöhter zytosolischer Dopaminkonzentrationen kommt es zu einer Verminderung der Expression der TH und einer erhöhten VMAT2-Expression. Die durch die verminderte TH-Expression resultierenden niedrigeren Dopaminspiegel im Striatum sind zusammen mit den Veränderungen in der

Dopaminrezeptor-vermittelten Signaltransduktion für den motorischen Phänotyp der Go2 α -Deletionsmutanten verantwortlich.

Das scheinbare Paradoxon, dass sich die Wirkungen von G-Protein Aktivierung und Deletion von Go2 α auf die vesikuläre Monoaminaufnahme gleichen, lässt sich durch zwei hypothetische Modelle erklären: Vesikuläres Go2 α könnte bei Aktivierung vom Vesikel dissoziieren, was dem Zustand ohne Go2 α bei den Deletionsmutanten gleichkäme. Alternativ könnte der Verlust von Go2 α einen Einfluss auf den für die Monoaminspeicherung bedeutenden Portonengradienten über der Vesikelmembran haben und dadurch die vesikuläre Monoaminspeicherung beeinträchtigen.

Zusammenstellung wesentlicher Publikationen

Beitrag 2.3

Brunk, I.*, Blex*, C., Sanchis-Segura, C., Sternberg, J., Perreau-Lenz, S., Bilbao, A., Hörtnagl, H., Baron, J., Juranek, J., Laube, G., Birnbaumer, L., Spanagel, R., and Ahnert-Hilger, G (2008).

Deletion of $Go2\alpha$ abolishes cocaine-induced behavioral sensitization by disturbing the striatal dopamine system.

FASEB J. 22, 3736-3746

* beide Autoren haben gleichermaßen zu der Arbeit beigetragen

2.4 *Ca²⁺-dependent Activator Proteins of Secretion* fördern die vesikuläre Monoaminaufnahme

Ca²⁺-dependent Activator Proteins of Secretion (CAPS) regulieren das Priming sekretorischer Vesikel in Neuronen und neuroendokrinen Zellen (Jockusch et al., 2007; Speidel et al., 2005). Eine Rolle der Isoformen CAPS1 und CAPS2 in der vesikulären Monoaminspeicherung wurde vermutet, die Art des Einflusses war jedoch Gegenstand kontroverser Diskussionen (Fujita et al., 2007; Speidel et al., 2005). In dieser Arbeit wurden daher die Effekte von CAPS1 und CAPS2 auf die vesikuläre Monoaminspeicherung untersucht. Zusätzlich ergaben sich Hinweise auf eine Beteiligung von CAPS1 an Go2 α -nachgeschalteten Signalwegen in der G-Protein vermittelten Regulation der vesikulären Monoaminspeicherung.

Die Serotoninaufnahme in Präparationen synaptischer Vesikel aus CAPS1-defizienten Mäusen war geringer als die Aufnahme in Präparationen aus Wildtypmäusen. Da CAPS1-Deletionsmutanten kurz nach der Geburt versterben, wurden Präparationen embryonaler Gehirne (E18) verwendet. Da weder die Expression von VMAT2 noch der vakuolaren H⁺-ATPase in Gehirnen der CAPS1^{-/-} Embryonen verändert war, weist die verminderte Serotoninaufnahme auf einen fördernden Einfluss von CAPS auf die vesikuläre Monoaminspeicherung hin. Als nächstes wurde die Wirkung von CAPS1 und CAPS2 auf die vesikuläre Monoaminspeicherung in Gehirnen adulter Mäuse untersucht. Dazu wurden synaptische Vesikelpräparationen vor Messung der Serotoninaufnahme mit CAPS1- oder CAPS2-spezifischen Antikörpern bzw. den entsprechenden Präimmunsereen inkubiert. Sowohl die CAPS1- als auch die CAPS2-spezifischen Antikörper führten im Gegensatz zu den Präimmunsereen zu einer Verminderung der vesikulären Monoaminaufnahme. CAPS1-Antikörper hatten jedoch keine Auswirkung auf die Serotoninaufnahme durch synaptische Vesikel aus CAPS1^{-/-} Embryonen. Beide CAPS Isoformen schienen also die vesikuläre Monoaminaufnahme gleichermaßen zu beeinflussen.

Da in *Caenorhabditis elegans* Go Proteine und das CAPS Ortholog *unc31* funktionell verknüpft sind (Charlie et al., 2006) und, wie zuvor dargelegt, CAPS Isoformen und Go2 α die vesikuläre Monoaminspeicherung beeinflussen, wurde die Expression von CAPS1 und CAPS2 in Gehirnen von Go2 α -Deletionsmutanten untersucht. Die Menge an CAPS1 war im Hirnhomogenat und der synaptosomalen Fraktion von Go2 α ^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen vermindert. Es gab keinen Unterschied in der CAPS2 Expression zwischen den Genotypen. Präinkubation von synaptischen Vesikeln aus Go2 α ^{-/-} Mäusen mit CAPS2 Antikörper führte, wie in Wildtypmäusen, zu einer Verminderung der Serotoninaufnahme. CAPS1-Antikörper hatte jedoch, wahrscheinlich

aufgrund der geringeren Expression von CAPS1 in den Go2 α -Deletionsmutanten, keinen Effekt auf die Serotoninaufnahme. In Hinblick auf die bereits bekannte verminderte Serotoninaufnahme durch synaptische Vesikel von Go2 α -Deletionsmutanten (Beitrag 2.3) kann vermutet werden, dass sie möglicherweise durch die reduzierte Expression von CAPS1 in Go2 α -/- bewirkt wird. Nach Transfektion von VMAT1- und VMAT2-exprimierenden CHO-Zellen mit CAPS1- und CAPS2-cDNS wurde die Serotoninaufnahme nach Permeabilisation gemessen. Dadurch sollte geklärt werden, ob Überexpression von CAPS1 oder CAPS2 einen der CAPS-Defizienz entgegengesetzten Effekt hat und die vesikuläre Monoaminspeicherung fördert. Transfektion mit CAPS1 und CAPS2 führten zu einer Zunahme der V_{max} der Serotoninaufnahme in VMAT1- und VMAT2-exprimierenden Zellen, während die K_m Werte weitgehend unbeeinflusst blieben. Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass sowohl CAPS1 als auch CAPS2 die vesikuläre Monoaminspeicherung in VMAT1- und VMAT2-exprimierenden Systemen fördern. Darüberhinaus ließ sich ein Zusammenhang zwischen der CAPS1-Isoform und Go-Proteinen in Go2 α -Deletionsmutanten bestätigen. Daher wäre eine Rolle von CAPS1 in der G-Protein vermittelten Regulation der Monoaminspeicherung denkbar.

Zusammenstellung wesentlicher Publikationen

Beitrag 2.4

Brunk, I., Blex, C., Speidel, D., Brose, N., and Ahnert-Hilger, G. (2009).

Ca²⁺-dependent Activator Proteins of Secretion Promote Vesicular Monoamine Uptake.

J Biol Chem 284, 1050-1056

2.5 Amphetamin beeinflusst die Expression von NR2B in Go2 α Knockout-Mäusen und fördert dadurch die Entwicklung einer motorischen Sensitivierung

Wie im Beitrag 2.3 dargelegt, äußert sich das dopaminerge Defizit im Striatum von Go2 α -/- Mäusen durch das Fehlen einer motorischen Sensitivierung nach Kokainbehandlung, was auf Veränderungen in der Signaltransduktion über D1- und D2-Rezeptoren zurückgeführt wurde. Striatale Projektionsneurone exprimieren Dopamin- und Glutamatrezeptoren. Die Interaktion dopaminergischer und glutamaterger Signalübermittlung spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der motorischen Aktivität und für die Wirkung von Psychostimulanzien (Kauer and Malenka, 2007; Mameli et al., 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Go2 α auf das Zusammenspiel glutamaterger und dopaminergischer Signalwege und seine Bedeutung im Rahmen der differenziellen Wirkung der Psychostimulanzien Kokain und Amphetamin auf die motorische Aktivität von Go2 α -Deletionsmutanten erforscht.

Obwohl mehrfache Behandlung mit Amphetamin ähnliche Veränderungen in der Expression von D1- und D2-Rezeptoren wie Kokainbehandlung (Beitrag 2.3) verursachte, entwickelten Go2 α -/- Mäuse nach Amphetaminbehandlung im Gegensatz zu den Befunden nach Kokainbehandlung eine motorische Sensitivierung. Die Wirkung von Amphetamin auf die Dopamintransporter der Plasmamembran und VMAT2 unterschied sich nicht zwischen den Genotypen, wie Neurotransmitteraufnahme- und -freisetzungsexperimente an Synaptosomen zeigten.

Da die meisten D2-Rezeptoren an Go α -Untereinheiten binden (Jiang et al., 2001) und die Expression von D2-Rezeptoren nach Behandlung mit Kokain oder Amphetamin im Striatum von Go2 α -Deletionsmutanten im Vergleich zu Wildtypmäusen erhöht war, stellte sich die Frage, ob diese Rezeptoren funktionell aktiv sind. Durch Verdrängungsstudien mit dem D2-Rezeptorantagonisten Spiperone in Anwesenheit ansteigender Dopaminkonzentrationen ohne oder unter G-Protein Aktivierung durch GTP γ S konnte bestätigt werden, dass die striatalen D2-Rezeptoren in den Go2 α -/- Mäusen unverändert funktionell sind. Insgesamt war auch die Veränderung in der Expression von Go α -Untereinheiten (Gs α , Golf α , Go1 α) nach Kokain- und Amphetaminbehandlung ähnlich, so dass die unterschiedliche motorische Reaktion auf die beiden Psychostimulanzien anders begründet sein musste.

Die Aktivität striataler Projektionsneurone wird durch Wechselwirkungen zwischen dopaminergischer und glutamaterger Signaltransduktion beeinflusst. Eine direkte Interaktion zwischen D2-Rezeptoren und der nicht-phosphorylierten NMDA-Rezeptor Untereinheit NR2B und die Modulation dieser Interaktion nach Kokainbehandlung sind beschrieben (Liu et al., 2006). Ko-

Immunpräzipitationen zeigten, dass die Interaktion zwischen nicht-phosphoryliertem NR2B und D2-Rezeptor in Wildtypmäusen und Go2 α -Deletionsmutanten gleichermaßen vorhanden ist. Auch die Aktivität D1-Rezeptor exprimierender Neuronen im Striatum wird durch ein Zusammenspiel der glutamatergen und dopaminergen Signaltransduktion moduliert. Hier spielen Homer-Proteine, insbesondere Homer1a eine Schlüsselrolle (Zhang et al., 2007). Die Analysen der Expression von NR2B und phosphoryliertem NR2B sowie von Homer-Proteinen in Striata von Go2 α -Deletionsmutanten und Wildtypmäusen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Protein	Unbehandelte Tiere	Kokain-behandelte Tiere	Amphetamin-behandelte Tiere
NR2B	wt = ko	wt = ko	wt \leq ko
pNR2B*	wt = ko	wt = ko	wt = ko
Homer**	wt < ko	wt = ko	wt = ko
Homer1a	wt \leq ko	wt \leq ko	wt = ko

* pSer 1203NR2B; ** alle Homer Isoformen

Tab. 2: Expression von Homer-Proteinen und phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem NR2B im Striatum von unbehandelten und Psychostimulanzien-behandelten Wildtyp und Go2 α -/- Mäusen

=: Expression in beiden Genotypen gleich; >: Expression höher im zuerst aufgeführten Genotyp; <: Expression niedriger im zuerst aufgeführten Genotyp. Fett hervorgehoben sind die Proteine, deren Expression nach Kokain- und Amphetaminbehandlung unterschiedlich ist.

Die im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Expression von Homer1a, die nur nach Kokainbehandlung zu beobachten ist, vermindert die Aktivität D1-Rezeptor exprimierender striataler Projektionsneurone (Brakeman et al., 1997), deren Aktivität die Motorik fördert. Dieser die motorische Aktivität hemmende Effekt kann für die fehlende motorische Sensitivierung nach Kokainbehandlung verantwortlich sein.

Die im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Expression von gesamt-NR2B nach Amphetaminbehandlung kann Ausdruck einer erhöhten NR2B/pNR2B Ratio sein. Nur phosphoryliertes NR2B führt zur Verstärkung der Aktivität von D2-Rezeptor exprimierenden striatalen Projektionsneuronen, deren Aktivität die motorische Aktivität vermindert. Die erhöhte NR2B/pNR2B Ratio nach Amphetaminbehandlung kann also als Motorik-fördernd interpretiert werden und erlaubt dadurch die Entwicklung einer motorischen Sensitivierung nach Amphetaminbehandlung.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Amphetaminbehandlung in Go2 α -/- Mäusen zwar eine ähnliche Veränderung der Expression von D1- und D2-Rezeptoren wie Kokainbehandlung zur Folge hat. Jedoch zeigten nur Amphetamin-behandelte Go2 α -/- Mäuse Veränderungen in der Expression von Proteinen, die an der glutamatergen Signalverarbeitung in striatalen Projektionsneuronen beteiligt sind. Als Kompensationsmechanismen für die

veränderten D1- und D2-Rezeptor vermittelten Signale erlauben diese Veränderungen die Entwicklung einer motorischen Sensitivierung in Go2 α -Deletionsmutanten nach Amphetaminbehandlung. Insgesamt konnte so die komplexe Rolle von Go2 α in der monoaminergen und glutamatergen Neurotransmission sowie ihre *in vivo* Auswirkung auf (patho)physiologische Zustände genauer beleuchtet werden.

Zusammenstellung wesentlicher Publikationen

Beitrag 2.5

Brunk, I., Sanchis-Segura, C., Blex, C., Perreau-Lenz, S., Bilbao, A., Spanagel, R., Ahnert-Hilger, G. (2010).

Amphetamine regulates NR2B expression in Go2a knockout mice and thereby sustains behavioral sensitization.

J Neurochem 115, 234-246

3. Diskussion

Die hier vorgestellten Untersuchungen wurden mit dem Ziel durchgeführt, die G-Protein vermittelte Regulation der Neurotransmitterspeicherung näher zu untersuchen. Dabei sollten einerseits vor- und nachgeschaltete Signalwege der G-Protein vermittelten Regulation der VMAT-Isoformen charakterisiert werden. Andererseits sollten die für die Regulation der VGLUT-Aktivität verantwortlichen G-Protein Untereinheiten identifiziert werden. Die Auswirkung der G-Protein vermittelten Regulation auf die synaptische Übertragung und ihre physiologische und pathophysiologische Bedeutung stellen einen weiteren Schwerpunkt der vorliegenden Arbeiten dar. Vor diesem Hintergrund sollen die im vorigen Abschnitt beschriebenen Ergebnisse anhand folgender Aspekte diskutiert werden:

- Mechanismen der G-Protein vermittelten Regulation der vesikulären Neurotransmitterspeicherung: Es werden nachgewiesene und mögliche vor- und nachgeschaltete Signalwege der G-Protein vermittelten Regulation der Monoamin- und Glutamatspeicherung beleuchtet. Auf bekannte Interaktionspartner von VGLUT1 und VMAT2 wird eingegangen.
- Bedeutung der Regulation für den Neurotransmittergehalt von Neuronen und die synaptische Übertragung: Die Auswirkungen der Regulation auf den Neurotransmittergehalt von synaptischen Vesikeln und Neuronen und auf die synaptische Übertragung werden erläutert.
- Physiologische und pathophysiologische *in vivo* Auswirkungen: Anhand der differenziellen Wirkung der Psychostimulanzien Kokain und Amphetamin auf die motorische Aktivität von Go2 α -Deletionsmutanten wird die physiologische Bedeutung der G-Protein vermittelten Regulation der Monoaminspeicherung verdeutlicht.

3.1 Mechanismen der G-Protein vermittelten Regulation der vesikulären Neurotransmitterspeicherung

3.1.1 Interaktionspartner von VMAT2 und VGLUT1

Das Ziel, die an der G-Protein vermittelten Regulation der vesikulären Neurotransmitterspeicherung beteiligten Signaltransduktionselemente zu identifizieren, macht

neben möglichen Interaktionspartnern von Go2 α (s. Abschnitte 1.3.2 und 3.1.3) Bindungspartner vesikulärer Transporter interessant.

Protein-Protein Interaktionen von Transportern können einerseits die Aktivität von Transportprozessen beeinflussen (Jackson et al., 2001; Wersinger et al., 2003), andererseits die Sortierung der Transporterproteine innerhalb von Zellen (Torres et al., 2001). Dabei kann auch die Sortierung durch gezielte Konzentration der Transporterproteine an den funktionell relevanten Orten in der Zelle die Transportaktivität beeinflussen. Zytoplasmatische Anteile des vesikulären Acetylcholintransporters VACHT, von VMAT2 und VGLUT1 (s.u. Interaktion Endophilin A1 und VGLUT1) enthalten Sortierungssignale (Fei et al., 2008). Da die G-Protein vermittelte Regulation der Neurotransmitterspeicherung auch bei der Untersuchung vesikulärer Fraktionen nachweisbar ist, erscheint ein Einfluss auf die Sortierung der Transporter weniger wahrscheinlich, mag aber zusätzlich eine Rolle spielen.

Zytosolische Domänen von VMAT2 interagieren mit Vesikel-assoziiierter DOPA-Decarboxylase und Tyrosinhydroxylase, die beide an der Dopaminsynthese beteiligt sind (Cartier et al., 2010). Dadurch ist die Synthese von Dopamin örtlich und funktionell eng mit dem vesikulären Transport verknüpft. Eine Bedeutung für die Einhaltung einer niedrigen zytosolischen Dopaminkonzentration und die Regulation des vesikulären Füllungszustandes sowie der Beladungseffizienz dopaminerger Vesikel liegt nahe. Dabei sind weitere beteiligte (regulative) Faktoren unbekannt, so auch ein Zusammenhang mit der G-Protein vermittelten Regulation der Monoaminspeicherung. α -Synuclein, dem eine Schlüsselrolle in der Entstehung des idiopathischen Parkinson-Syndroms zugeschrieben wird, bindet an Tyrosinhydroxylase und inhibiert die Aktivität von VMAT2 und Tyrosinhydroxylase (Guo et al., 2008; Perez et al., 2002). Eine Interaktion von Go2 α mit Tyrosinhydroxylase, DOPA-Decarboxylase oder α -Synuclein war in einem Yeast-Two Hybrid Screen nicht nachweisbar (Blex, Rachakonda, Hülsenbeck, Just, Ahnert-Hilger, Brunk, Manuskript in Vorbereitung).

Der zytoplasmatisch orientierte C-Terminus von VGLUT1 interagiert mit Endophilin A1 und A3, die an der Bildung und am Trafficking glutamaterger synaptischer Vesikel beteiligt sind (DeGois et al., 2006; Vinatier et al., 2006). Endophilin A1 reguliert die Freisetzungswahrscheinlichkeit glutamaterger synaptischer Vesikel, die selektive Bindung an VGLUT1 führt zu unterschiedlichen Freisetzungswahrscheinlichkeiten VGLUT2- und VGLUT1-tragender Vesikel (Weston et al., 2011). Einfluss von Endophilinen auf die Aktivität vesikulärer Glutamattransporter oder ein Zusammenhang mit deren G-Protein vermittelter Regulation sind nicht bekannt. Eine Interaktion von Go2 α mit Endophilinen war in einem Yeast-Two Hybrid Screen nicht nachweisbar (Blex, Rachakonda, Hülsenbeck, Just, Ahnert-Hilger, Brunk, Manuskript in Vorbereitung).

3.1.2 *Vorgeschaltete Signale der G-Protein vermittelten Regulation der Neurotransmitterspeicherung*

- **Vorgeschaltete Signale der G-Protein vermittelten Regulation der VMAT**

Die G-Protein vermittelte Regulation der vesikulären Monoaminspeicherung findet nur in gefüllten Vesikeln statt (Beitrag 2.2). Die erste intravesikuläre Schleife von VMAT1 oder VMAT2 dient als rezeptive Struktur für den intravesikulären Füllungszustand (Abb. 5), dabei unterscheiden sich ihre pharmakologischen Eigenschaften: Im VMAT1 hat diese Schleife $\alpha 1$ -Rezeptor ähnliche, im VMAT2 5HT1B-rezeptorähnliche Eigenschaften (Beitrag 2.2). Die Lokalisation der VMAT-Isoformen, sei es auf dense-core Vesikeln oder auf synaptischen Vesikeln oder auf endosomalen Kompartimenten in CHO-Zellen, spielt für die Regulation keine Rolle (Ahnert-Hilger et al., 1998; Höltje et al., 2000; Pahner et al., 2002; Pahner et al., 2003).

Die Ergebnisse des Beitrags 2.2 deuten darauf hin, dass VMAT2 selbst die Funktion eines G-Protein aktivierenden Rezeptors in der $Go2\alpha$ -vermittelten Regulation der vesikulären Monoaminspeicherung einnimmt. Im Fall der VMAT-Regulation durch heterotrimere G-Proteine scheint die G-Protein Aktivierung also nicht von einem heptahelikalen Rezeptor, wie bei der klassischen G-Protein Aktivierung, abhängig zu sein. Tatsächlich konnten heptahelikale Rezeptoren bisher nicht auf synaptischen Vesikeln nachgewiesen werden (Takamori et al., 2006). Für $Go\alpha$ -Untereinheiten wurden zusätzlich zum klassischen Aktivierungsweg durch heptahelikale plasmamembranständige Rezeptoren andere Aktivierungsmechanismen, wie zum Beispiel durch GAP43 und das Alzheimer amyloid precursor-Protein, bereits beschrieben (Nishimoto et al., 1993; Strittmatter et al., 1991). Auf intrazellulären Membranen wurde bislang nur für den sogenannten KDEL-Rezeptor auf Golgi-Membranen die Funktion eines G-Protein gekoppelten Rezeptors vermutet (Capitani and Sallese, 2009).

Wenn die VMAT-Isoformen die Funktion eines G-Protein gekoppelten Rezeptors ausführen können, sollte eine Interaktion von VMAT1 und VMAT2 mit $Go2\alpha$ nachweisbar sein. Koimmunpräzipitationen ergaben bislang keinen Hinweis auf eine Interaktion zwischen VMAT2 und $Go2\alpha$. Diese Fragestellung soll daher mit Hilfe eines Yeast-Two Hybrid Assays beantwortet werden. Insgesamt kann die Induktion der G-Protein vermittelten Regulation der vesikulären Monoaminspeicherung durch den vesikulären Monoamingehalt als Feedbackschleife zur Feinregulation des vesikulären Füllungszustands aufgefasst werden (Abb. 5).

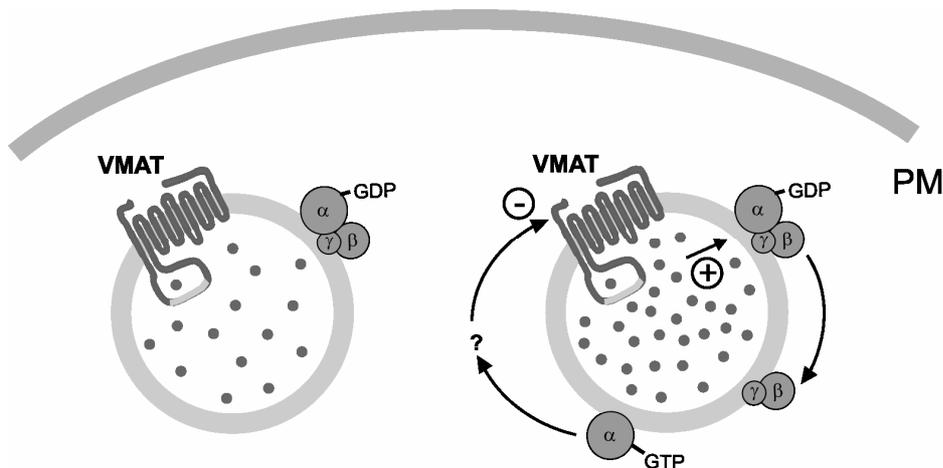


Abb. 5: G-Protein vermittelte Regulation von VMAT in Abhängigkeit vom vesikulären Füllungszustand

Bei wenig gefülltem Vesikel bleibt das vesikuläre G-Protein ein inaktives Heterotrimer. Die vesikuläre Monoaminkonzentration wird von der ersten luminalen Schleife des VMAT erfasst. Bei stärkerer Füllung wird das G-Protein aktiviert und dissoziiert in $G\alpha$ -GTP und den $\beta\gamma$ -Komplex. $G\alpha$ -GTP reguliert die VMAT-Aktivität über noch unbekannte Zwischenschritte. PM: Plasmamembran

- Vorgeschaltete Signale der G-Protein vermittelten Regulation der VGLUT

Das vorgeschaltete Signal der Regulation der VGLUT-Aktivität durch $Go2\alpha$ ist noch unbekannt. Die Tatsache, dass G-Protein Aktivierung das chloridabhängige Transportoptimum verschiebt (Beitrag 2.1), sodass je nach zytosolischer Chloridkonzentration G-Protein Aktivierung entweder zu einer Transportaktivierung oder einer Transporthemmung führt, spricht gegen die vesikuläre Glutamatkonzentration als vorgeschaltetes Signal. Da Chlorid über Chloridkanäle oder -transporter in das Vesikel gelangt und so ΔpH und $\Delta \Psi$ beeinflusst, wären der intravesikuläre pH-Wert oder die intravesikuläre Ladungsbilanz als vorgeschaltete Signale denkbar. Es wurden bereits G-Protein gekoppelte Rezeptoren beschrieben, die in Abhängigkeit vom pH-Wert aktiviert werden (Ludwig et al., 2003). Experimentell wurde diese Theorie bislang jedoch noch nicht verfolgt. $Go2\alpha$ könnte jedoch auch durch zytosolische Faktoren aktiviert werden, sodass die Regulation der vesikulären Glutamat-speicherung mit anderen intrazellulären Signalwegen verknüpft würde und so die Effektivität der synaptischen Übertragung beeinflusst werden könnte.

3.1.3 Nachgeschaltete Signale der G-Protein vermittelten Regulation der Neurotransmitterspeicherung

- Nachgeschaltete Signale der G-Protein vermittelten Regulation der VMAT

Die der G-Protein Aktivierung nachgeschalteten Signalwege in der G-Protein vermittelten Regulation vesikulärer Monoamin- und Glutamattransporter sind noch nicht vollständig

aufgeklärt. Die Beiträge 2.4 und 2.1 lieferten jedoch Hinweise auf Go2 α -Effektoren in der G-Protein vermittelten Regulation der Monoamin- und Glutamatspeicherung.

Bezüglich der vesikulären Monoaminspeicherung sind insbesondere die CAPS-Proteine interessant. Die CAPS Isoformen CAPS1 und CAPS2 fördern die vesikuläre Monoaminspeicherung (Jockusch et al., 2007; Speidel et al., 2005; Beitrag 2.4). Da in synaptischen Vesikeln von CAPS-Deletionsmutanten weder die Menge von VMAT2 noch der vesikulären H⁺-ATPase verändert ist, scheint die verminderte Monominaufnahme direkt durch den Verlust des CAPS1 Proteins und nicht durch indirekte, sekundäre Effekte bedingt zu sein. Möglicherweise können CAPS-Proteine über eine Erhöhung des elektrochemischen Gradienten $\Delta\mu\text{H}^+$ über der Vesikelmembran die Monoaminspeicherung synaptischer Vesikel fördern: Eine Erhöhung der pH-Komponente (ΔpH) erleichtert die Speicherung von Monoaminen im Vesikel und verhindert so den unspezifischen Verlust über die Vesikelmembran (Brunk et al., 2006; Edwards, 2007). Andererseits ist die vesikuläre Glutamataufnahme in CAPS 1 und 2 Deletionsmutanten nicht beeinträchtigt, was für eine spezifische Rolle in der Monoaminspeicherung und gegen eine Störung des elektrochemischen Gradienten spricht (Jockusch et al., 2007).

Da neben den CAPS-Proteinen auch Go2 α die vesikuläre Monoaminaufnahme reguliert, stellt sich die Frage, ob diese beiden Proteine Teile desselben oder unterschiedlicher Signalwege sind. Hinweise auf ein Zusammenwirken von Go und CAPS ergaben Untersuchungen an *C. elegans*: der Funktionsverlust des Go-Proteins konnte (teilweise) die phänotypischen Auswirkungen eines Defizits des CAPS-Homologs *unc31* aufheben (Charlie et al., 2006). Außerdem ist die Expression von CAPS1 in Gehirnen von Go2 α -Deletionsmutanten im Vergleich zu Wildtypmäusen erniedrigt (Beitrag 2.4). Im Zusammenhang mit der beschriebenen fördernden Wirkung der CAPS-Proteine auf die vesikuläre Monoaminaufnahme wäre es denkbar, dass die verminderte CAPS1 Expression die Ursache für die geringere vesikuläre Monoaminspeicherung und die erniedrigten striatalen Dopaminkonzentrationen in Go2 α -Deletionsmutanten darstellt (Beitrag 2.3). Dagegen spricht, dass insbesondere CAPS2, dessen Expression im Gehirn von Go2 α -Deletionsmutanten unverändert ist, in dopaminergen Neuronen der Area tegmentalis ventralis (VTA) und der Substantia nigra pars compacta konzentriert ist (Sadakata et al., 2006). Allerdings wurde die Expression von CAPS1 und CAPS2 in den Gehirnen der Go2 α -Deletionsmutanten an Fraktionen des Gesamtgehirns untersucht, dabei können Expressionsveränderungen in einzelnen Arealen, wie zum Beispiel dem Striatum, das viele dopaminerge Afferenzen aus der Substantia nigra pars compacta erhält, nicht nachweisbar sein. Insgesamt ist der funktionelle Zusammenhang zwischen Go2 α und CAPS-Proteinen nicht vollständig aufgeklärt. Trotzdem ist es denkbar, dass CAPS1 einen Effektor von Go2 α in der G-

Protein-vermittelten Regulation der vesikulären Monoaminspeicherung darstellt. Immunpräzipitationen ergaben keinen Hinweis auf eine Interaktion zwischen Go2 α und CAPS1. Zusätzlich soll in Zukunft die Interaktion zwischen Go2 α und CAPS-Proteinen durch einen Yeast-Two Hybrid Assay untersucht werden.

Neben dem Einfluss der CAPS-Proteine auf die vesikuläre Monoaminspeicherung konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass die vesikuläre Monoaminaufnahme in PC12-Zellen von der cytosolischen cAMP-Konzentration abhängt (Nakanishi et al., 1995). Möglicherweise sind an der Go2 α -abhängigen Regulation der VMATs cAMP-abhängige Signalwege beteiligt. Sowohl cAMP als auch cGMP können, ähnlich wie die Aktivierung von Go2 α , die Monoaminaufnahme in synaptische Vesikel und sekretorische Vesikel der neuroendokrinen Zelllinien BON und PC12 hemmen (Sternberg/Maul/Brunk/Ahnert-Hilger - unveröffentlichte Daten).

Um mögliche Effektoren von Go2 α zu identifizieren, wurde zusätzlich ein Yeast-Two Hybrid Screen einer cDNS-Bibliothek des Mäusegehirns mit konstitutiv aktivem Go2 α als Köderprotein durchgeführt. Es konnten mehrere Proteine identifiziert werden, von denen jedoch keines in Zusammenhang mit der vesikulären Monoaminaufnahme gebracht werden konnte (Blex, Rachakonda, Hülsenbeck, Just, Ahnert-Hilger, Brunk, Manuskript in Vorbereitung).

- Nachgeschaltete Signale der G-Protein vermittelten Regulation der VGLUT

Die G-Protein vermittelte Regulation der vesikulären Glutamataufnahme besteht in der Verschiebung des Transportoptimums zu niedrigeren zytosolischen Chloridkonzentrationen: Es liegt bei 5mM ohne G-Protein Aktivierung, bei 1mM unter G-Protein Aktivierung (Beitrag 2.1). Die Interpretation dieses Befundes in einem übergeordneten Kontext unter Berücksichtigung zusätzlicher Faktoren, wie zum Beispiel vesikulärer Chloridkanäle oder -transporter, ist insbesondere deswegen schwierig, da die Transporteigenschaften der VGLUTs und die Ursache für die Chloridabhängigkeit des Transports immer noch Gegenstand kontroverser Diskussionen ist (Juge et al., 2010; Schenck et al., 2009). Die Existenz einer Chloridbindungsstelle am VGLUT ließe sich mit den im Beitrag 2.1 vorgestellten Ergebnissen im Rahmen folgender Hypothese in Einklang bringen (Abb. 6): Bindung von Chlorid an VGLUT führt zu einem optimalen Transport von Glutamat in das Vesikellumen. Die Chloridbindungsstelle an den VGLUTs kann jedoch durch einen hypothetischen Faktor X belegt werden, sodass eine Chloridbindung nicht mehr stattfinden kann. Dadurch ist die vesikuläre Glutamataufnahme eingeschränkt. Faktor X kann nicht nur an VGLUT sondern auch an Go2 α binden, Bindung an Go2 α und VGLUT schließen einander aus.

Die Affinität von Go2 α zu Faktor X hängt vom Aktivierungsstatus von Go2 α ab. Die Affinität ist im aktiven Zustand höher als im inaktiven, sodass bei aktiviertem Go2 α geringe (1mM) Chloridkonzentrationen für eine ausreichende Belegung der Bindungsstellen am VGLUT ausreichen. Ist Go2 α inaktiv, ist die Affinität zu Faktor X niedriger, es kann vermehrt die Chloridbindungsstelle der VGLUT belegen. Erst bei höheren Chloridkonzentrationen (5mM) kann Chlorid mit Faktor X effektiv um die Bindungsstelle konkurrieren. Fehlt Go2 α , kann es nicht mit der Bindung von Faktor X an die VGLUT konkurrieren, sodass die Chloridbindungsstelle maximal belegt ist. Dadurch fehlt die Chloridabhängigkeit des Transports komplett. Dieses hypothetische Modell erklärt die Förderung des vesikulären Glutamattransports bei 1mM (aktives Go2 α) bzw. 5mM Chlorid (inaktives Go2 α) gegenüber 0mM zytosolischem Chlorid.

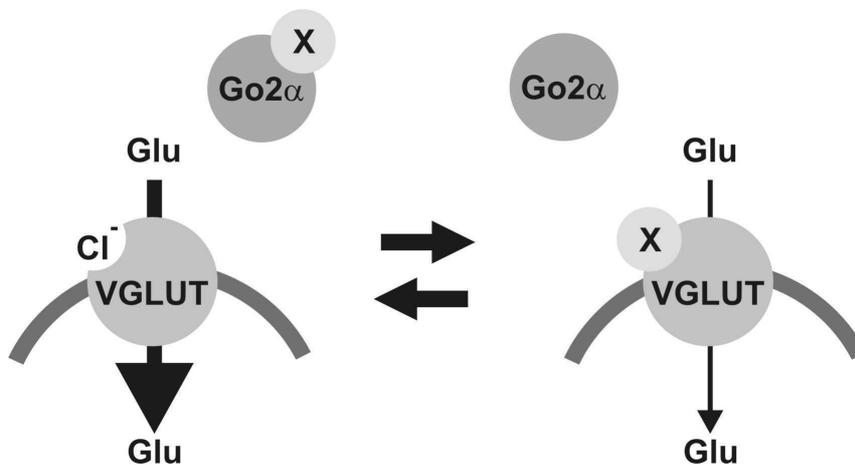


Abb. 6: Regulation der Chloridabhängigkeit des vesikulären Glutamattransports durch Go2 α .

Möglicherweise existiert eine Chloridbindungsstelle an den VGLUT, die auch konkurrierend durch einen Faktor X belegt werden kann. Bindung von Chlorid an VGLUT optimiert den vesikulären Glutamattransport. Faktor X kann auch mit Go2 α in Abhängigkeit von dessen Aktivierungszustand interagieren. Näheres s. Text.

Die Abnahme der Transportaktivität bei Chloridkonzentrationen jenseits von 5mM ist dadurch begründet, dass Chlorid über vesikuläre Chloridkanäle/-transporter in das Vesikellumen gelangt und so die Ladungsdifferenz $\Delta\Psi$ vermindert, von der die VGLUT-Aktivität hauptsächlich abhängt. Dabei sind die verschiedenen teilweise umstrittenen Transporteigenschaften, wie ein Chloridtransport durch VGLUT (Juge et al., 2010; Schenck et al., 2009), und die verschiedenen diskutierten Transportmodi (Symport oder Antiport von Protonen, (Brunk et al., 2006)) nicht berücksichtigt. Experimentell wurde die Existenz eines Faktors X, der mit der Chloridbindungsstelle des VGLUT interagiert, nicht belegt.

3.2 Bedeutung der Regulation für den Neurotransmittergehalt von Neuronen und die synaptische Übertragung

3.2.1 Bedeutung der Regulation der VMAT

Die Effektivität der synaptischen Übertragung kann durch verschiedene Mechanismen beeinflusst werden: Dazu gehören die Sensitivität und Anzahl postsynaptischer Rezeptoren sowie die Konzentration des Neurotransmitters im synaptischen Spalt, die nicht immer zur Sättigung aller postsynaptischen Rezeptoren führt (Liu et al., 1999). Die Konzentration von Neurotransmittern im synaptischen Spalt hängt von der Wahrscheinlichkeit exozytotischer Ereignisse, dem vesikulären Füllungsstatus und der Beseitigung des ausgeschütteten Neurotransmitters aus dem synaptischen Spalt ab. Parameter, die den vesikulären Füllungsstatus beeinflussen, wurden bereits im Abschnitt 1.1 (Variabilität der vesikulären Neurotransmittermenge und Einfluss auf die synaptische Übertragung) beschrieben. Wie bereits in Abschnitt 3.1.1 angedeutet, kann die Regulation der VMAT durch heterotrimere G-Proteine als negativer Feedback-Loop zur Feinregulation des vesikulären Füllungsstatus aufgefasst werden, da diese Regulation nur in gefüllten sekretorischen Vesikeln nachweisbar ist (Beitrag 2.2). Dadurch wird die vesikuläre Füllung mit Monoaminen begrenzt. Bedenkt man die Bedeutung der monoaminergen Neurotransmission für die Entstehung verschiedener Erkrankungen, wie zum Beispiel M. Parkinson durch Untergang dopaminergener Neurone in der Substantia nigra pars compacta, oder die überschießende dopaminerge Transmission als eine der vermuteten molekularen Grundlagen für die so genannte Positiv-Symptomatik im Rahmen schizophrener Psychosen oder verminderte Monoaminkonzentrationen im synaptischen Spalt als Ursache für die Entstehung depressiver Störungen, erscheint die genaue Regulation der vesikulären Füllung monoaminerges Vesikel physiologisch wichtig.

Aufgrund der Hemmung der vesikulären Monoaminspeicherung nach Aktivierung von $Go2\alpha$ würde man im Gehirn von $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten höhere Monoaminspiegel als in Wildtypmäusen erwarten. Veränderungen ließen sich nur im Striatum nachweisen: dort war die Dopaminkonzentration im Vergleich zu Wildtypmäusen jedoch erniedrigt, die Konzentration der anderen Monoamine waren unverändert. Dies geht einher mit einer verminderten Dopaminaufnahme durch synaptische Vesikel, sowie einer verminderten Expression von Tyrosinhydroxylase, dem Leitenzym dopaminerges Neurone. Erstaunlicherweise ist die Expression von VMAT2 in den Gehirnen der $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten erhöht, was der verminderten vesikulären Dopaminaufnahme zunächst zu widersprechen scheint. Diese Befunde lassen sich durch folgende Hypothese in Einklang bringen: Möglicherweise sind die Vesikelmembranen von $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten durchlässiger für Dopamin oder Monoamine,

dafür könnte zum Beispiel die verminderte Expression von CAPS1 in Go2 α -Deletionsmutanten (Beitrag 2.4) verantwortlich sein. Eine erhöhte Durchlässigkeit der Vesikelmembran würde zu einer Erhöhung der zytoplasmatischen Dopaminkonzentration führen. Zytosolische Monoamine bilden toxische Oxidationsprodukte und schädigen dadurch Zellen. Als Kompensationsmechanismus kommt es zu einer verminderten Expression der Tyrosinhydroxylase. Um trotzdem eine ausreichende Dopaminspeicherung zu gewährleisten, wird VMAT2 vermehrt exprimiert (Beitrag 2.3). Diese Veränderungen im dopaminergen System sind unter physiologischen Bedingungen so ausbalanciert, dass die Go2 α -Deletionsmutanten phänotypisch unauffällig wirken. Deutliche Veränderungen zeigen sich erst unter pathophysiologischen Bedingungen (s. 3.3).

3.2.2 Bedeutung der Regulation der VGLUT

Auch bezüglich der G-Protein vermittelten Regulation der VGLUT ist ein Einfluss auf den Neurotransmittergehalt von Neuronen und die synaptische Übertragung denkbar. Es wurden jedoch bislang keine Messungen des Glutamatgehalts im Gehirn von Go2 α -Deletionsmutanten vorgenommen. Da Go2 α das Chlorid-abhängige Transportoptimum des vesikulären Glutamattransports reguliert, liegt eine Modulation der synaptischen Übertragung im Zusammenhang mit Veränderungen der zytosolischen Chloridkonzentration nahe. Unter physiologischen Bedingungen schwankt die zytosolische Chloridkonzentration zwischen 8 und 20 mM in Abhängigkeit von der neuronalen Aktivität. Höhere Chloridkonzentrationen begünstigen dabei die Entwicklung einer neuronalen Hyperexzitabilität (Zhu et al., 2005). Gleichzeitig ist bei höheren Chloridkonzentrationen die VGLUT-Aktivität nicht im Bereich des Optimums. Dadurch sind die glutamatergen Vesikel möglicherweise weniger gefüllt als bei optimaler VGLUT-Aktivität, was einer drohenden Hyperexzitabilität entgegenwirken könnte. Go2 α könnte auch durch die Verschiebung der chloridabhängigen Aktivierung zu niedrigeren Chloridkonzentrationen die optimale Transportaktivität bei erniedrigten neuronalen Chloridkonzentrationen ermöglichen. Es existieren auch pathophysiologische Zustände, die die Chloridabhängigkeit des vesikulären Glutamattransports beeinflussen: Durch Ansammlung von α -Ketonsäuren im Rahmen der Ahornsirup-Krankheit wird die Chloridabhängigkeit zu höheren Chloridkonzentrationen verschoben (Reis et al., 2000). Ähnliche Effekte werden durch die Ansammlung von Ketonkörpern im Rahmen einer katabolen Stoffwechsellage im Hungerzustand hervorgerufen, die in einer verminderten Glutamatfreisetzung an hippocampalen Synapsen, möglicherweise durch Konkurrenz mit der Chloridbindung an VGLUTs, resultieren (Juge et al., 2010). Die Regulation durch Go2 α könnte also einerseits einer negativen

Auswirkung der Ansammlung von z.B. α -Ketonsäuren auf die glutamaterge Neurotransmission entgegenwirken, andererseits auch erwünschten Effekten z.B. im Rahmen einer ketogenen Diät entgegenwirken.

3.3 Physiologische und pathophysiologische *in vivo* Auswirkungen der Deletion von $Go2\alpha$

3.3.1 Veränderte motorische Wirkung von Psychostimulanzien nach Deletion von $Go2\alpha$

$Go2\alpha$ beeinflusst das dopaminerge System durch Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme (Beitrag 2.3 und 2.5). Unter physiologischen Bedingungen erscheinen $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten bezüglich ihres Verhaltens zunächst phänotypisch unauffällig. Genaue Untersuchung ihrer Gehirne ergeben jedoch Veränderungen im dopaminergen System (Beitrag 2.3). Behandlung von $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten mit den Psychostimulanzien Kokain und Amphetamin wirkt sich unterschiedlich auf Wildtyp-Mäuse und $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten aus: Mehrfache Applikation von Kokain führt nur in Wildtyp, nicht jedoch in $Go2\alpha$ -/- Mäusen zur Entwicklung einer motorischen Sensitivierung (Beitrag 2.3). Repetitive Behandlung mit Amphetamin führt jedoch in beiden Genotypen gleichermaßen zu einer Entwicklung einer motorischen Sensitivierung, dabei ist allerdings die motorische Aktivität in den Deletionsmutanten vermindert im Vergleich zu den Wildtypmäusen (Beitrag 2.5). Die Induktion einer motorischen Sensitivierung durch psychoaktive Substanzen stellt ein Dopamin-abhängiges Verhaltensphänomen dar und wird als Parameter für die Entwicklung von motorischen Verhaltensweisen, die mit der Beschaffung psychoaktiver Substanzen verbunden sind, verwendet (Sanchis-Segura and Spanagel, 2006). Die konditionierte Platzpräferenz (CPP) als Maß für die Entwicklung einer Sucht unterschied sich nicht zwischen Wildtyp- und $Go2\alpha$ -/- Mäusen. Grund hierfür könnte sein, dass die Entwicklung einer konditionierten Platzpräferenz nicht allein vom dopaminergen System abhängig ist: Deletionsmutanten des Plasmamembrantransporters für Dopamin (DAT) entwickeln eine konditionierte Platzpräferenz nach Behandlung mit Kokain, erst die zusätzliche Deletion des Serotonintransporters SERT verhindert die Entwicklung einer konditionierten Platzpräferenz (Sora et al., 2001).

Die motorische Aktivität wird durch neuronale Schaltkreise reguliert, deren zentralen Bestandteil die Basalganglien darstellen. Dopamin fördert die motorische Aktivität durch Aktivierung des sogenannten direkten Wegs über D1-Rezeptoren striataler Projektionsneurone und durch Inhibierung des indirekten Wegs über D2-Rezeptoren striataler Projektionsneurone. D1-Rezeptoren koppeln an $G_{\alpha s}$ und $G_{\alpha i}$, eine verminderte Expression dieser Untereinheiten im

Striatum beeinflusst die motorischen Effekte von Psychostimulanzien, wobei die Bedeutung $G\alpha$ größer zu sein scheint (Corvol et al., 2007; Hummel and Unterwald, 2002; Zhuang et al., 2000). D2-Rezeptoren im ZNS koppeln an $G\alpha$ -Untereinheiten, dabei ist nicht bekannt, welche der Splice-Varianten $Go1\alpha$ und/oder $Go2\alpha$ beteiligt ist (Jiang et al., 2001).

Sowohl Behandlung mit Kokain als auch Behandlung mit Amphetamin verschieben das Mengenverhältnis striataler D1- und D2-Rezeptoren in $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten zugunsten der D2-Rezeptoren. Dabei sind die D2-Rezeptoren in $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten funktionell aktiv, was für eine Kopplung an $Go1\alpha$ spricht (Beitrag 2.5). Die Expression von $Go1\alpha$ und $Gs\alpha$ ist nach Kokain- und Amphetaminbehandlung in $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten im Vergleich zu den Wildtypen erhöht, die Expression von $G\alpha$ für beide Genotypen unverändert. Da die beschriebenen Veränderungen in den $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten sowohl nach Kokain- als auch nach Amphetaminbehandlung auftreten, sind sie nicht für die unterschiedlichen Effekte von Kokain und Amphetamin in den Deletionsmutanten verantwortlich.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die unter Normalbedingungen kompensierten Veränderungen im dopaminergen System von $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten durch Applikation von Psychostimulanzien verstärkt und damit phänotypisch relevant wären.

3.3.2 Auswirkung der Deletion von $Go2\alpha$ auf das Zusammenspiel der glutamatergen und dopaminergen Signaltransduktion striataler Projektionsneurone

Das Zusammenspiel der dopaminergen und glutamatergen Signaltransduktion ist für die Regulation der motorischen Aktivität und bei der Entwicklung einer motorischen Sensitivierung von Bedeutung (Kauer and Malenka, 2007; Mameli et al., 2009; Vanderschuren and Kalivas, 2000). Dieses Zusammenspiel ist in $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten verändert und bewirkt dadurch die unterschiedlichen Effekte der Psychostimulanzien Kokain und Amphetamin. Die Veränderungen in der Expression von Elementen der glutamatergen Signaltransduktion in D1-Rezeptor exprimierenden striatalen Projektionsneuronen des direkten Wegs und D2-Rezeptor exprimierenden striatalen Projektionsneuronen des indirekten Wegs sind in Abbildung 7 zusammengefasst.

Die Psychostimulanzien Kokain und Amphetamin führen zu einer Freisetzung von Dopamin und einer Erhöhung der extrazellulären Glutamatkonzentration im Striatum (Del Arco et al., 1999). Freigesetztes Glutamat stimuliert nicht nur NMDA-Rezeptoren sondern auch Gruppe I metabotrope Glutamatrezeptoren striataler Projektionsneurone des direkten Weges. Dadurch wird die Signalübermittlung dieser Neurone verstärkt. Homer-Proteine sind daran durch Cross-Link von metabotropen Glutamatrezeptoren mit intrazellulären Effektoren beteiligt (Tu et al.,

Diese Interaktionen modulieren die Signalübertragung über die beteiligten Rezeptoren. Interaktion von NR2B mit D2-Rezeptoren verhindert die Phosphorylierung der NR2B-Untereinheit durch CamKinasell an Serin 1303 und hemmt dadurch NMDA-Rezeptor vermittelte Ströme striataler Projektionsneurone (Liu et al., 2006). Nur nach wiederholter Amphetamin- nicht nach Kokainbehandlung ist die Gesamtmenge von NR2B in $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten im Vergleich zu Wildtypmäusen erhöht, während die Menge an phosphoryliertem NR2B gleich bleibt (Beitrag 2.5). Das könnte zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten einer Interaktion von NR2B mit D2-Rezeptor führen, sodass die Aktivität der striatalen Projektionsneurone des indirekten Wegs gehemmt wird. Da dadurch die motorische Aktivität begünstigt wird, können $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten trotz ihres dopaminergen Defizits eine motorische Sensitivierung nach Amphetaminapplikation entwickeln.

Insgesamt zeigen die Befunde nach Behandlung der $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten mit den Psychostimulanzien Kokain und Amphetamin, dass die Effekte von $Go2\alpha$ -/- in der (Fein)Regulation der Neurotransmitterspeicherung vor allem Auswirkungen pathophysiologischer Bedingungen beeinflussen können, und untermauern die physiologische Relevanz der Regulation der Neurotransmitterspeicherung durch heterotrimere G-Proteine.

4. Zusammenfassung

In den hier vorgestellten Studien wurde die Regulation der vesikulären Monoamin- und Glutamatspeicherung durch die $Go2\alpha$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine untersucht. Dabei wurden einerseits die der Regulation vorgeschalteten Signale, andererseits die beeinflussten Transportparameter und mögliche Effektoren näher beleuchtet. Zusätzlich konnten für das monoaminerge System der Einfluss auf den Neurotransmittergehalt von Neuronen sowie phänotypische Auswirkungen der Deletion von $Go2\alpha$ unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen gezeigt werden.

Aktivierung von $Go2\alpha$ verschiebt das chloridabhängige Transportoptimum des vesikulären Glutamattransports zu niedrigeren Chloridkonzentrationen. Dadurch kann die optimale Transportaktivität auch bei erniedrigten neuronalen Chloridkonzentrationen ermöglicht werden oder einer drohenden Hyperexzitabilität bei erhöhten zytosolischen Chloridkonzentrationen entgegengewirkt werden. Die der G-Protein vermittelten Regulation vorgeschalteten und direkt nachgeschalteten Signaltransduktionselemente bleiben jedoch unbekannt.

Aktives $Go2\alpha$ inhibiert die vesikuläre Monoaminspeicherung über VMAT1 und VMAT2 in Neuronen und neuroendokrinen Zellen. Dabei ist der vesikuläre Füllungsstatus das der G-

Protein Aktivierung vorgeschaltete Signal. Der mittlere Teil der ersten intravesikulären Schleife von VMAT1 und VMAT2 konnte als Sensor des vesikulären Füllungszustands identifiziert werden und stellt im Fall von VMAT1 pharmakologisch eine α 1-Rezeptor ähnliche Struktur, im Fall von VMAT2 eine 5HT1B-Rezeptor ähnliche Struktur dar. Möglicherweise übernehmen VMAT die Rolle eines G-Protein koppelnden Rezeptors in der G-Protein vermittelten Regulation der Monoaminspeicherung. Die Regulation kann als negative Feedback-Schleife zur Feinregulation des vesikulären Füllungszustands verstanden werden.

Die zytosolischen Proteine CAPS1 und CAPS2 fördern die vesikuläre Monoaminspeicherung über VMAT1 und VMAT2, wie durch Überexpression in VMAT1- und VMAT2-transfizierten CHO-Zellen und an CAPS1 Deletionsmutanten gezeigt werden konnte. Die verminderte Expression von CAPS1 in Gehirnen von $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten und die in der Literatur beschriebene Aufhebung der phänotypischen Auswirkung eines Defizits des CAPS Homologs *unc31* durch Funktionsverlust des Go-Proteins in *C. elegans* könnten auf CAPS1 als möglichen Effektor von $Go2\alpha$ in der Regulation der vesikulären Monoaminspeicherung hindeuten.

Die physiologische Bedeutung der G-Protein vermittelten Regulation der vesikulären Neurotransmitterspeicherung wurde durch die Behandlung von $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten mit den Psychostimulanzien Kokain und Amphetamin deutlich. In $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten, die wiederholt mit Kokain behandelt wurden, fehlt die in Wildtyptieren vorhandene motorische Sensitivierung, was zunächst auf verminderte striatale Dopaminspiegel und veränderte Expression von Dopaminrezeptoren in Deletionsmutanten zurückgeführt wurde. Nach Amphetaminbehandlung konnte jedoch auch in $Go2\alpha$ -/- Mäusen eine motorische Sensitivierung beobachtet werden, auch wenn die motorische Aktivität der $Go2\alpha$ -/- Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen vermindert war. Verantwortlich für die unterschiedliche Wirkung von Amphetamin und Kokain auf $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten waren Veränderungen der Expression von Proteinen (Homer1a und NR2B) in $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten, die für das Zusammenspiel der glutamatergen und dopaminergen Signaltransduktion in striatalen Projektionsneuronen verantwortlich sind.

Insgesamt konnten neue Einblicke in die Mechanismen der G-Protein vermittelten Regulation der vesikulären Neurotransmitterspeicherung gewonnen werden und am Beispiel der Speicherung der Monoamine ihre physiologische Relevanz belegt werden.

5. Literaturverzeichnis

- Ahnert-Hilger, G., Höltje, M., Pahner, I., Winter, S., and Brunk, I. (2003). Regulation of vesicular neurotransmitter transporters. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 150, 140-160.
- Ahnert-Hilger, G., Nurnberg, B., Exner, T., Schafer, T., and Jahn, R. (1998). The heterotrimeric G protein Go2 regulates catecholamine uptake by secretory vesicles. *Embo J* 17, 406-413.
- Aihara, Y., Mashima, H., Onda, H., Hisano, S., Kasuya, H., Hori, T., Yamada, S., Tomura, H., Yamada, Y., Inoue, I., *et al.* (2000). Molecular cloning of a novel brain-type Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem* 74, 2622-2625.
- Arshavsky, V., and Bownds, M. D. (1992). Regulation of deactivation of photoreceptor G protein by its target enzyme and cGMP. *Nature* 357, 416-417.
- Bai, L., Xu, H., Collins, J. F., and Ghishan, F. K. (2001). Molecular and functional analysis of a novel neuronal vesicular glutamate transporter. *J Biol Chem* 276, 36764-36769.
- Bellocchio, E. E., Reimer, R. J., Freneau, R. T., Jr., and Edwards, R. H. (2000). Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science* 289, 957-960.
- Berstein, G., Blank, J. L., Jhon, D. Y., Exton, J. H., Rhee, S. G., and Ross, E. M. (1992). Phospholipase C-beta 1 is a GTPase-activating protein for Gq/11, its physiologic regulator. *Cell* 70, 411-418.
- Birnbaumer, L. (2007). Expansion of signal transduction by G proteins. The second 15 years or so: from 3 to 16 alpha subunits plus betagamma dimers. *Biochim Biophys Acta* 1768, 772-793.
- Biró, Á. A., Holderith, N. B., Nusser, Z. (2005) Quantal Size Is Independent of the Release Probability at Hippocampal Excitatory Synapses. *J Neurosci* 25, 223-232.
- Blondeau, F., Ritter, B., Allaire, P. D., Wasiak, S., Girard, M., Hussain, N. K., Angers, A., Legendre-Guillemain, V., Roy, L., Boismenu, D., *et al.* (2004). Tandem MS analysis of brain clathrin-coated vesicles reveals their critical involvement in synaptic vesicle recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3833-3838.
- Boulland, J. L., Qureshi, T., Seal, R. P., Rafiki, A., Gundersen, V., Bergersen, L. H., Freneau, R. T., Jr., Edwards, R. H., Storm-Mathisen, J., and Chaudhry, F. A. (2004). Expression of the vesicular glutamate transporters during development indicates the widespread corelease of multiple neurotransmitters. *J Comp Neurol* 480, 264-280.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., and McCormick, F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348, 125-132.
- Brakeman, P. R., Lanahan, A. A., O'Brien, R., Roche, K., Barnes, C. A., Huganir, R. L., and Worley, P. F. (1997). Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386, 284-288.
- Brunk, I., Höltje, M., von Jagow, B., Winter, S., Sternberg, J., Blex, C., Pahner, I., and Ahnert-Hilger, G. (2006). Regulation of vesicular monoamine and glutamate transporters by vesicle-associated trimeric G proteins: new jobs for long-known signal transduction molecules. *Handb Exp Pharmacol*, 305-325.
- Bruns, D., Riedel, D., Klingauf, J., and Jahn, R. (2000). Quantal release of serotonin. *Neuron* 28, 205-220.
- Capitani, M., and Sallese, M. (2009). The KDEL receptor: new functions for an old protein. *FEBS Lett* 583, 3863-3871.

-
- Cartier, E. A., Parra, L. A., Baust, T. B., Quiroz, M., Salazar, G., Faundez, V., Egan, L., Torres, G. E. (2010) A Biochemical and Functional Protein Complex Involving Dopamine Synthesis and Transport into Synaptic Vesicles. *J Biol Chem* 285, 1957-1966.
- Chang, J. W., Lee, W. Y., Milstien, S., and Kang, U. J. (2002). A site-specific mutation of tyrosine hydroxylase reduces feedback inhibition by dopamine in genetically modified cells grafted in parkinsonian rats. *J Neurochem* 83, 141-149.
- Charlie, N. K., Schade, M. A., Thomure, A. M., and Miller, K. G. (2006). Presynaptic UNC-31 (CAPS) is required to activate the G alpha(s) pathway of the *Caenorhabditis elegans* synaptic signaling network. *Genetics* 172, 943-961.
- Chaudhry, F. A., Edwards, R. H., and Fonnum, F. (2008). Vesicular neurotransmitter transporters as targets for endogenous and exogenous toxic substances. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48, 277-301.
- Chen, C., and Clarke, I. J. (1996). G(o)-2 protein mediates the reduction in Ca²⁺ currents by somatostatin in cultured ovine somatotrophs. *J Physiol* 491 (Pt 1), 21-29.
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T. J., Higgins, D. G., and Thompson, J. D. (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31, 3497-3500.
- Cismowski, M. J. (2006). Non-receptor activators of heterotrimeric G-protein signaling (AGS proteins). *Semin Cell Dev Biol* 17, 334-344.
- Corvol, J. C., Valjent, E., Pascoli, V., Robin, A., Stipanovich, A., Luedtke, R. R., Belluscio, L., Girault, J. A., and Herve, D. (2007). Quantitative changes in Galphao1f protein levels, but not D1 receptor, alter specifically acute responses to psychostimulants. *Neuropsychopharmacology* 32, 1109-1121.
- Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65, 1-105.
- Daniels, R. W., Collins, C. A., Chen, K., Gelfand, M. V., Featherstone, D. E., and DiAntonio, A. (2006). A single vesicular glutamate transporter is sufficient to fill a synaptic vesicle. *Neuron* 49, 11-16.
- Darchen, F., Scherman, D., and Henry, J. P. (1989). Reserpine binding to chromaffin granules suggests the existence of two conformations of the monoamine transporter. *Biochemistry* 28, 1692-1697.
- Darna, M., Schmutz, I., Richter, K., Yelamanchili, S. V., Pendyala, G., Hölting, M., Albrecht, U., Ahnert-Hilger, G. (2009) Time of day-dependent sorting of the vesicular glutamate transporter to the plasma membrane. *J Biol Chem* 284, 4300-4307.
- DeGois, S., Jeanclos, E., Morris, M., Grewal, S., Varoqui, H., Erickson, J. D. (2006) Identification of endophilins 1 and 3 as selective binding partners for VGLUT1 and their co-localization in neocortical glutamatergic synapses: implications for vesicular glutamate transporter trafficking and excitatory vesicle formation. *Cell Mol Neurobiol* 26, 679-93.
- Del Arco, A., Gonzalez-Mora, J. L., Armas, V. R., and Mora, F. (1999). Amphetamine increases the extracellular concentration of glutamate in striatum of the awake rat: involvement of high affinity transporter mechanisms. *Neuropharmacology* 38, 943-954.
- Dhingra, A., Jiang, M., Wang, T. L., Lyubarsky, A., Savchenko, A., Bar-Yehuda, T., Sterling, P., Birnbaumer, L., and Vardi, N. (2002). Light response of retinal ON bipolar cells requires a specific splice variant of Galphao. *J Neurosci* 22, 4878-4884.

-
- Dingus, J., Wells, C. A., Campbell, L., Cleator, J. H., Robinson, K., and Hildebrandt, J. D. (2005). G Protein betagamma dimer formation: Gbeta and Ggamma differentially determine efficiency of in vitro dimer formation. *Biochemistry* *44*, 11882-11890.
- Edwards, R. H. (2007). The neurotransmitter cycle and quantal size. *Neuron* *55*, 835-858.
- Erickson, J. D., Eiden, L. E., and Hoffman, B. J. (1992). Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 10993-10997.
- Erickson, J. D., Schafer, M. K., Bonner, T. I., Eiden, L. E., and Weihe, E. (1996). Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 5166-5171.
- Exner, T., Jensen, O. N., Mann, M., Kleuss, C., and Nurnberg, B. (1999). Posttranslational modification of Galphao1 generates Galphao3, an abundant G protein in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 1327-1332.
- Faber, D. S., Young, W. S., Legendre, P., Korn, H. (1992). Intrinsic quantal variability due to stochastic properties of receptor-transmitter interactions. *Science* *258*, 1494-8.
- Fei, H., Grygoruk, A., Brooks, E.S., Chen, A., Krantz, D. E. (2008) Trafficking of vesicular neurotransmitter transporters. *Traffic* *9*, 1425-1436.
- Fon, E. A., Pothos, E. N., Sun, B. C., Killeen, N., Sulzer, D., and Edwards, R. H. (1997). Vesicular transport regulates monoamine storage and release but is not essential for amphetamine action. *Neuron* *19*, 1271-1283.
- Forti, L., Bossi, M., Bergamaschi, A., Villa, A., and Malgaroli, A. (1997). Loose-patch recordings of single quanta at individual hippocampal synapses. *Nature* *388*, 874-878.
- Franks, K. M., Bartol, T. M. Jr., Sejnowski, T. J. (2002). A Monte Carlo model reveals independent signaling at central glutamatergic synapses. *Biophys J* *83*, 2333-48.
- Fremeau, R. T., Jr., Burman, J., Qureshi, T., Tran, C. H., Proctor, J., Johnson, J., Zhang, H., Sulzer, D., Copenhagen, D. R., Storm-Mathisen, J., *et al.* (2002). The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 14488-14493.
- Fremeau, R. T., Jr., Troyer, M. D., Pahner, I., Nygaard, G. O., Tran, C. H., Reimer, R. J., Bellocchio, E. E., Fortin, D., Storm-Mathisen, J., and Edwards, R. H. (2001). The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron* *31*, 247-260.
- Fujita, Y., Xu, A., Xie, L., Arunachalam, L., Chou, T. C., Jiang, T., Chiew, S. K., Kourtesis, J., Wang, L., Gaisano, H. Y., and Sugita, S. (2007). Ca²⁺-dependent activator protein for secretion 1 is critical for constitutive and regulated exocytosis but not for loading of transmitters into dense core vesicles. *J Biol Chem* *282*, 21392-21403.
- Gainetdinov, R. R., Fumagalli, F., Wang, Y. M., Jones, S. R., Levey, A. I., Miller, G. W., and Caron, M. G. (1998). Increased MPTP neurotoxicity in vesicular monoamine transporter 2 heterozygote knockout mice. *J Neurochem* *70*, 1973-1978.
- Gras, C., Herzog, E., Bellenchi, G. C., Bernard, V., Ravassard, P., Pohl, M., Gasnier, B., Giros, B., and El Mestikawy, S. (2002). A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci* *22*, 5442-5451.
- Grishina, G., and Berlot, C. H. (2000). A surface-exposed region of G(salpha) in which substitutions decrease receptor-mediated activation and increase receptor affinity. *Mol Pharmacol* *57*, 1081-1092.

Guo, J. T., Chen, A. Q., Kong, Q., Zhu, H., Ma, C. M., and Qin, C. (2008) Inhibition of vesicular monoamine transporter-2 activity in alpha-synuclein stably transfected SH-SY5Y cells. *Cell Mol Neurobiol* 28, 35-47.

Hansson, S. R., Hoffman, B. J., and Mezey, E. (1998). Ontogeny of vesicular monoamine transporter mRNAs VMAT1 and VMAT2. I. The developing rat central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 110, 135-158.

Hartinger, J., and Jahn, R. (1993). An anion binding site that regulates the glutamate transporter of synaptic vesicles. *J Biol Chem* 268, 23122-23127.

Hayashi, M., Haga, M., Yatsushiro, S., Yamamoto, A., and Moriyama, Y. (1999). Vesicular monoamine transporter 1 is responsible for storage of 5-hydroxytryptamine in rat pinealocytes. *J Neurochem* 73, 2538-2545.

Hayashi, M., Morimoto, R., Yamamoto, A., and Moriyama, Y. (2003). Expression and localization of vesicular glutamate transporters in pancreatic islets, upper gastrointestinal tract, and testis. *J Histochem Cytochem* 51, 1375-1390.

Hayashi, M., Otsuka, M., Morimoto, R., Hirota, S., Yatsushiro, S., Takeda, J., Yamamoto, A., and Moriyama, Y. (2001). Differentiation-associated Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter (DNPI) is a vesicular glutamate transporter in endocrine glutamatergic systems. *J Biol Chem* 276, 43400-43406.

Henry, J. P., Botton, D., Sagne, C., Isambert, M. F., Desnos, C., Blanchard, V., Raisman-Vozari, R., Krejci, E., Massoulie, J., and Gasnier, B. (1994a). Biochemistry and molecular biology of the vesicular monoamine transporter from chromaffin granules. *J Exp Biol* 196, 251-262.

Henry, J. P., Gasnier, B., Desnos, C., Scherman, D., Krejci, E., and Massoulie, J. (1994b). The catecholamine transporter of adrenal medulla chromaffin granules. *Ann N Y Acad Sci* 733, 185-192.

Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., Casado, V., Scott, R., Terasmaa, A., Hansson, A., Watson, S., Olah, M. E., Mallol, J., *et al.* (2002). Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *J Biol Chem* 277, 18091-18097.

Hisano, S., Hoshi, K., Ikeda, Y., Maruyama, D., Kanemoto, M., Ichijo, H., Kojima, I., Takeda, J., and Nogami, H. (2000). Regional expression of a gene encoding a neuron-specific Na⁽⁺⁾-dependent inorganic phosphate cotransporter (DNPI) in the rat forebrain. *Brain Res Mol Brain Res* 83, 34-43.

Hollinger, S., and Hepler, J. R. (2002). Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol Rev* 54, 527-559.

Höltje, M., von Jagow, B., Pahner, I., Lautenschlager, M., Hortnagl, H., Nurnberg, B., Jahn, R., and Ahnert-Hilger, G. (2000). The neuronal monoamine transporter VMAT2 is regulated by the trimeric GTPase Go(2). *J Neurosci* 20, 2131-2141.

Höltje, M., Winter, S., Walther, D., Pahner, I., Hortnagl, H., Ottersen, O. P., Bader, M., and Ahnert-Hilger, G. (2003). The vesicular monoamine content regulates VMAT2 activity through Galphaq in mouse platelets. Evidence for autoregulation of vesicular transmitter uptake. *J Biol Chem* 278, 15850-15858.

Hsu, W. H., Rudolph, U., Sanford, J., Bertrand, P., Olate, J., Nelson, C., Moss, L. G., Boyd, A. E., Codina, J., and Birnbaumer, L. (1990). Molecular cloning of a novel splice variant of the alpha subunit of the mammalian Go protein. *J Biol Chem* 265, 11220-11226.

Hummel, M., and Unterwald, E. M. (2002). D1 dopamine receptor: a putative neurochemical and behavioral link to cocaine action. *J Cell Physiol* 191, 17-27.

-
- Iwatsuki, K., Ichikawa, R., Hiasa, M., Moriyama, Y., Torii, K., and Uneyama, H. (2009). Identification of the vesicular nucleotide transporter (VNUT) in taste cells. *Biochem Biophys Res Commun* 388, 1-5.
- Jackson, M., Song, W., Liu, M. Y., Jin, L., Dykes-Hoberg, M., Lin, C. I., Bowers, W. J., Federoff, H. J., Sternweis, P. C., and Rothstein, J. D. (2001). Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAT4 by two interacting proteins. *Nature* 410, 89-93.
- Jentsch, T. J., Neagoe, I., and Scheel, O. (2005). CLC chloride channels and transporters. *Curr Opin Neurobiol* 15, 319-325.
- Jiang, M., and Bajpayee, N. S. (2009). Molecular mechanisms of go signaling. *Neurosignals* 17, 23-41.
- Jiang, M., Gold, M. S., Boulay, G., Spicher, K., Peyton, M., Brabet, P., Srinivasan, Y., Rudolph, U., Ellison, G., and Birnbaumer, L. (1998). Multiple neurological abnormalities in mice deficient in the G protein Go. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3269-3274.
- Jiang, M., Spicher, K., Boulay, G., Wang, Y., and Birnbaumer, L. (2001). Most central nervous system D2 dopamine receptors are coupled to their effectors by Go. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3577-3582.
- Jockusch, W. J., Speidel, D., Sigler, A., Sorensen, J. B., Varoqueaux, F., Rhee, J. S., and Brose, N. (2007). CAPS-1 and CAPS-2 are essential synaptic vesicle priming proteins. *Cell* 131, 796-808.
- Johnson, R. G., Carty, S. E., and Scarpa, A. (1981). Proton: substrate stoichiometries during active transport of biogenic amines in chromaffin ghosts. *J Biol Chem* 256, 5773-5780.
- Johnson, R. G., Jr. (1988). Accumulation of biological amines into chromaffin granules: a model for hormone and neurotransmitter transport. *Physiol Rev* 68, 232-307.
- Jones, S. R., Gainetdinov, R. R., Jaber, M., Giros, B., Wightman, R. M., and Caron, M. G. (1998). Profound neuronal plasticity in response to inactivation of the dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4029-4034.
- Jordan, J. D., Carey, K. D., Stork, P. J., and Iyengar, R. (1999). Modulation of rap activity by direct interaction of Galpha(o) with Rap1 GTPase-activating protein. *J Biol Chem* 274, 21507-21510.
- Juge, N., Gray, J. A., Omote, H., Miyaji, T., Inoue, T., Hara, C., Uneyama, H., Edwards, R. H., Nicoll, R. A., and Moriyama, Y. (2010). Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron* 68, 99-112.
- Juge, N., Yoshida, Y., Yatsushiro, S., Omote, H., and Moriyama, Y. (2006). Vesicular glutamate transporter contains two independent transport machineries. *J Biol Chem* 281, 39499-39506.
- Kaneko, T., and Fujiyama, F. (2002). Complementary distribution of vesicular glutamate transporters in the central nervous system. *Neurosci Res* 42, 243-250.
- Katz, B. (1971). Quantal mechanism of neural transmitter release. *Science* 173, 123-126.
- Kauer, J. A., and Malenka, R. C. (2007). Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci* 8, 844-858.
- Kinoshita, M., Nukada, T., Asano, T., Mori, Y., Akaike, A., Satoh, M., and Kaneko, S. (2001). Binding of G alpha(o) N terminus is responsible for the voltage-resistant inhibition of alpha(1A) (P/Q-type, Ca(v)2.1) Ca(2+) channels. *J Biol Chem* 276, 28731-28738.

-
- Kleuss, C., Hescheler, J., Ewel, C., Rosenthal, W., Schultz, G., and Wittig, B. (1991). Assignment of G-protein subtypes to specific receptors inducing inhibition of calcium currents. *Nature* 353, 43-48.
- Knoth, J., Zallakian, M., and Njus, D. (1981). Stoichiometry of H⁺-linked dopamine transport in chromaffin granule ghosts. *Biochemistry* 20, 6625-6629.
- Kobayashi, I., Shibasaki, H., Takahashi, K., Tohyama, K., Kurachi, Y., Ito, H., Ui, M., and Katada, T. (1990). Purification and characterization of five different alpha subunits of guanine-nucleotide-binding proteins in bovine brain membranes. Their physiological properties concerning the activities of adenylate cyclase and atrial muscarinic K⁺ channels. *Eur J Biochem* 191, 499-506.
- Kozasa, T., Jiang, X., Hart, M. J., Sternweis, P. M., Singer, W. D., Gilman, A. G., Bollag, G., and Sternweis, P. C. (1998). p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for G_{α12} and G_{α13}. *Science* 280, 2109-2111.
- Kroll, S. D., Chen, J., De Vivo, M., Carty, D. J., Buku, A., Premont, R. T., and Iyengar, R. (1992). The Q205L G_α subunit expressed in NIH-3T3 cells induces transformation. *J Biol Chem* 267, 23183-23188.
- Kroslak, T., Koch, T., Kahl, E., and Holtt, V. (2001). Human phosphatidylethanolamine-binding protein facilitates heterotrimeric G protein-dependent signaling. *J Biol Chem* 276, 39772-39778.
- Lesch, K. P., Gross, J., Wolozin, B. L., Murphy, D. L., and Riederer, P. (1993). Extensive sequence divergence between the human and rat brain vesicular monoamine transporter: possible molecular basis for species differences in the susceptibility to MPP⁺. *J Neural Transm Gen Sect* 93, 75-82.
- Leyte, A., Barr, F. A., Kehlenbach, R. H., and Huttner, W. B. (1992). Multiple trimeric G-proteins on the trans-Golgi network exert stimulatory and inhibitory effects on secretory vesicle formation. *Embo J* 11, 4795-4804.
- Liguz-Leczna, M., and Skangiel-Kramska, J. (2007). Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): the three musketeers of glutamatergic system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 67, 207-218.
- Liu, G., Choi, S., and Tsien, R. W. (1999). Variability of neurotransmitter concentration and nonsaturation of postsynaptic AMPA receptors at synapses in hippocampal cultures and slices. *Neuron* 22, 395-409.
- Liu, X. Y., Chu, X. P., Mao, L. M., Wang, M., Lan, H. X., Li, M. H., Zhang, G. C., Parelkar, N. K., Fibuch, E. E., Haines, M., *et al.* (2006). Modulation of D2R-NR2B interactions in response to cocaine. *Neuron* 52, 897-909.
- Liu, Y., and Edwards, R. H. (1997). Differential localization of vesicular acetylcholine and monoamine transporters in PC12 cells but not CHO cells. *J Cell Biol* 139, 907-916.
- Liu, Y., Peter, D., Roghani, A., Schuldiner, S., Prive, G. G., Eisenberg, D., Brecha, N., and Edwards, R. H. (1992). A cDNA that suppresses MPP⁺ toxicity encodes a vesicular amine transporter. *Cell* 70, 539-551.
- Liu, Y., Schweitzer, E. S., Nirenberg, M. J., Pickel, V. M., Evans, C. J., and Edwards, R. H. (1994). Preferential localization of a vesicular monoamine transporter to dense core vesicles in PC12 cells. *J Cell Biol* 127, 1419-1433.
- Ludwig, M. G., Vanek, M., Guerini, D., Gasser, J. A., Jones, C. E., Junker, U., Hofstetter, H., Wolf, R. M., and Seuwen, K. (2003). Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature* 425, 93-98.

-
- Luo, Y., and Denker, B. M. (1999). Interaction of heterotrimeric G protein Galphao with Purkinje cell protein-2. Evidence for a novel nucleotide exchange factor. *J Biol Chem* 274, 10685-10688.
- Mameli, M., Halbout, B., Creton, C., Engblom, D., Parkitna, J. R., Spanagel, R., and Luscher, C. (2009). Cocaine-evoked synaptic plasticity: persistence in the VTA triggers adaptations in the NAc. *Nat Neurosci* 12, 1036-1041.
- Man-Son-Hing, H. J., Codina, J., Abramowitz, J., and Haydon, P. G. (1992). Microinjection of the alpha-subunit of the G protein Go2, but not Go1, reduces a voltage-sensitive calcium current. *Cell Signal* 4, 429-441.
- Matsuda, J. J., Filali, M. S., Volk, K. A., Collins, M. M., Moreland, J. G., and Lamb, F. S. (2008). Overexpression of CLC-3 in HEK293T cells yields novel currents that are pH dependent. *Am J Physiol Cell Physiol* 294, C251-262.
- Maycox, P. R., Deckwerth, T., Hell, J. W., and Jahn, R. (1988). Glutamate uptake by brain synaptic vesicles. Energy dependence of transport and functional reconstitution in proteoliposomes. *J Biol Chem* 263, 15423-15428.
- Maycox, P. R., Hell, J. W., and Jahn, R. (1990). Amino acid neurotransmission: spotlight on synaptic vesicles. *Trends Neurosci* 13, 83-87.
- McIntire, W. E. (2009). Structural determinants involved in the formation and activation of G protein betagamma dimers. *Neurosignals* 17, 82-99.
- Miyaji, T., Omote, H., and Moriyama Y. (2010). A Vesicular Transporter That Mediates Aspartate and Glutamate Neurotransmission. *Biol Pharm Bull* 33 1783-1785
- Miyazaki, T., Fukaya, M., Shimizu, H., and Watanabe, M. (2003). Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre-Purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum. *Eur J Neurosci* 17, 2563-2572.
- Moriarty, T. M., Padrell, E., Carty, D. J., Omri, G., Landau, E. M., and Iyengar, R. (1990). Go protein as signal transducer in the pertussis toxin-sensitive phosphatidylinositol pathway. *Nature* 343, 79-82.
- Murtagh, J. J., Jr., Moss, J., and Vaughan, M. (1994). Alternative splicing of the guanine nucleotide-binding regulatory protein Go alpha generates four distinct mRNAs. *Nucleic Acids Res* 22, 842-849.
- Naito, S., and Ueda, T. (1985). Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J Neurochem* 44, 99-109.
- Nakanishi, N., Onozawa, S., Matsumoto, R., Hasegawa, H., and Yamada, S. (1995). Cyclic AMP-dependent modulation of vesicular monoamine transport in pheochromocytoma cells. *J Neurochem* 64, 600-607.
- Nakata, H., and Kozasa, T. (2005). Functional characterization of Galphao signaling through G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1. *Mol Pharmacol* 67, 695-702.
- Natochin, M., Campbell, T. N., Barren, B., Miller, L. C., Hameed, S., Artemyev, N. O., and Braun, J. E. (2005). Characterization of the G alpha(s) regulator cysteine string protein. *J Biol Chem* 280, 30236-30241.
- Neer, E. J., Lok, J. M., and Wolf, L. G. (1984). Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide regulatory unit of brain adenylate cyclase. *J Biol Chem* 259, 14222-14229.
- Neubig, R. R. (2002). Regulators of G protein signaling (RGS proteins): novel central nervous system drug targets. *J Pept Res* 60, 312-316.

-
- Ni, B., Rosteck, P. R., Jr., Nadi, N. S., and Paul, S. M. (1994). Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 5607-5611.
- Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Okamoto, T., Murayama, Y., and Ogata, E. (1993). Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature* *362*, 75-79.
- Nurnberg, B., and Ahnert-Hilger, G. (1996). Potential roles of heterotrimeric G proteins of the endomembrane system. *FEBS Lett* *389*, 61-65.
- Ogita, K., Hirata, K., Bole, D. G., Yoshida, S., Tamura, Y., Leckenby, A. M., and Ueda, T. (2001). Inhibition of vesicular glutamate storage and exocytotic release by Rose Bengal. *J Neurochem* *77*, 34-42.
- Pahner, I., Holtje, M., Winter, S., Nurnberg, B., Ottersen, O. P., and Ahnert-Hilger, G. (2002). Subunit composition and functional properties of G-protein heterotrimers on rat chromaffin granules. *Eur J Cell Biol* *81*, 449-456.
- Pahner, I., Holtje, M., Winter, S., Takamori, S., Bellocchio, E. E., Spicher, K., Laake, P., Nurnberg, B., Ottersen, O. P., and Ahnert-Hilger, G. (2003). Functional G-protein heterotrimers are associated with vesicles of putative glutamatergic terminals: implications for regulation of transmitter uptake. *Mol Cell Neurosci* *23*, 398-413.
- Patel, S. A., Nagy, J. O., Bolstad, E. D., Gerdes, J. M., and Thompson, C. M. (2007). Tetrapeptide inhibitors of the glutamate vesicular transporter (VGLUT). *Bioorg Med Chem Lett* *17*, 5125-5128.
- Perez, R. G., Waymire, J. C., Lin, E., Liu, J. J., Guo, F., Zigmond, M. J. (2002) A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci* *22*, 3090-3099.
- Peter, D., Jimenez, J., Liu, Y., Kim, J., and Edwards, R. H. (1994). The chromaffin granule and synaptic vesicle amine transporters differ in substrate recognition and sensitivity to inhibitors. *J Biol Chem* *269*, 7231-7237.
- Peter, D., Liu, Y., Sternini, C., de Giorgio, R., Brecha, N., and Edwards, R. H. (1995). Differential expression of two vesicular monoamine transporters. *J Neurosci* *15*, 6179-6188.
- Pothos, E. N., Davila, V., and Sulzer, D. (1998a). Presynaptic recording of quanta from midbrain dopamine neurons and modulation of the quantal size. *J Neurosci* *18*, 4106-4118.
- Pothos, E. N., Larsen, K. E., Krantz, D. E., Liu, Y., Haycock, J. W., Setlik, W., Gershon, M. D., Edwards, R. H., and Sulzer, D. (2000). Synaptic vesicle transporter expression regulates vesicle phenotype and quantal size. *J Neurosci* *20*, 7297-7306.
- Pothos, E. N., Przedborski, S., Davila, V., Schmitz, Y., and Sulzer, D. (1998b). D2-Like dopamine autoreceptor activation reduces quantal size in PC12 cells. *J Neurosci* *18*, 5575-5585.
- Prado, V. F., Martins-Silva, C., de Castro, B. M., Lima, R. F., Barros, D. M., Amaral, E., Ramsey, A. J., Sotnikova, T. D., Ramirez, M. R., Kim, H. G., *et al.* (2006). Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. *Neuron* *51*, 601-612.
- Ram, P. T., and Iyengar, R. (2001). G protein coupled receptor signaling through the Src and Stat3 pathway: role in proliferation and transformation. *Oncogene* *20*, 1601-1606.
- Reimer, R. J., Freneau, R. T., Jr., Bellocchio, E. E., and Edwards, R. H. (2001). The essence of excitation. *Curr Opin Cell Biol* *13*, 417-421.

Reis, M., Farage, M., and Wolosker, H. (2000). Chloride-dependent inhibition of vesicular glutamate uptake by alpha-keto acids accumulated in maple syrup urine disease. *Biochim Biophys Acta* 1475, 114-118.

Roseth, S., Fykse, E. M., and Fonnum, F. (1995). Uptake of L-glutamate into rat brain synaptic vesicles: effect of inhibitors that bind specifically to the glutamate transporter. *J Neurochem* 65, 96-103.

Ross, E. M., and Wilkie, T. M. (2000). GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu Rev Biochem* 69, 795-827.

Sadakata, T., Itakura, M., Kozaki, S., Sekine, Y., Takahashi, M., and Furuichi, T. (2006). Differential distributions of the Ca²⁺-dependent activator protein for secretion family proteins (CAPS2 and CAPS1) in the mouse brain. *J Comp Neurol* 495, 735-753.

Sakata-Haga, H., Kanemoto, M., Maruyama, D., Hoshi, K., Mogi, K., Narita, M., Okado, N., Ikeda, Y., Nogami, H., Fukui, Y., *et al.* (2001). Differential localization and colocalization of two neuron-types of sodium-dependent inorganic phosphate cotransporters in rat forebrain. *Brain Res* 902, 143-155.

Sanchis-Segura, C., and Spanagel, R. (2006). Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol* 11, 2-38.

Schafer, M. K., Varoqui, H., Defamie, N., Weihe, E., and Erickson, J. D. (2002). Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J Biol Chem* 277, 50734-50748.

Schenck, S., Wojcik, S. M., Brose, N., and Takamori, S. (2009). A chloride conductance in VGLUT1 underlies maximal glutamate loading into synaptic vesicles. *Nat Neurosci* 12, 156-162.

Scherman, D., and Henry, J. P. (1984). Reserpine binding to bovine chromaffin granule membranes. Characterization and comparison with dihydrotetrabenazine binding. *Mol Pharmacol* 25, 113-122.

Schuldiner, S., Shirvan, A., and Linial, M. (1995). Vesicular neurotransmitter transporters: from bacteria to humans. *Physiol Rev* 75, 369-392.

Schutz, B., Schafer, M. K., Eiden, L. E., and Weihe, E. (1998). Vesicular amine transporter expression and isoform selection in developing brain, peripheral nervous system and gut. *Brain Res Dev Brain Res* 106, 181-204.

Smine, A., Xu, X., Nishiyama, K., Katada, T., Gambetti, P., Yadav, S. P., Wu, X., Shi, Y. C., Yasuhara, S., Homburger, V., and Okamoto, T. (1998). Regulation of brain G-protein α by Alzheimer's disease gene presenilin-1. *J Biol Chem* 273, 16281-16288.

Smrcka, A. V. (2008). G protein $\beta\gamma$ subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling. *Cell Mol Life Sci* 65, 2191-2214.

Song, H., Ming, G., Fon, E., Bellocchio, E., Edwards, R. H., and Poo, M. (1997). Expression of a putative vesicular acetylcholine transporter facilitates quantal transmitter packaging. *Neuron* 18, 815-826.

Sora, I., Hall, F. S., Andrews, A. M., Itokawa, M., Li, X. F., Wei, H. B., Wichems, C., Lesch, K. P., Murphy, D. L., and Uhl, G. R. (2001). Molecular mechanisms of cocaine reward: combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5300-5305.

Speidel, D., Bruederle, C. E., Enk, C., Voets, T., Varoquaux, F., Reim, K., Becherer, U., Fornai, F., Ruggieri, S., Holighaus, Y., *et al.* (2005). CAPS1 regulates catecholamine loading of large dense-core vesicles. *Neuron* 46, 75-88.

-
- Sternweis, P. C., and Robishaw, J. D. (1984). Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain. *J Biol Chem* 259, 13806-13813.
- Stobrawa, S. M., Breiderhoff, T., Takamori, S., Engel, D., Schweizer, M., Zdebik, A. A., Bosl, M. R., Ruether, K., Jahn, H., Draguhn, A., *et al.* (2001). Disruption of ClC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron* 29, 185-196.
- Strathmann, M., Wilkie, T. M., and Simon, M. I. (1990). Alternative splicing produces transcripts encoding two forms of the alpha subunit of GTP-binding protein Go. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6477-6481.
- Strittmatter, S. M., Valenzuela, D., Sudo, Y., Linder, M. E., and Fishman, M. C. (1991). An intracellular guanine nucleotide release protein for G₀. GAP-43 stimulates isolated alpha subunits by a novel mechanism. *J Biol Chem* 266, 22465-22471.
- Tabb, J. S., Kish, P. E., Van Dyke, R., and Ueda, T. (1992). Glutamate transport into synaptic vesicles. Roles of membrane potential, pH gradient, and intravesicular pH. *J Biol Chem* 267, 15412-15418.
- Takahashi, N., Miner, L. L., Sora, I., Ujike, H., Revay, R. S., Kostic, V., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S., and Uhl, G. R. (1997). VMAT2 knockout mice: heterozygotes display reduced amphetamine-conditioned reward, enhanced amphetamine locomotion, and enhanced MPTP toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9938-9943.
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Gronborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brugger, B., Ringler, P., *et al.* (2006). Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127, 831-846.
- Takamori, S., Malherbe, P., Broger, C., and Jahn, R. (2002). Molecular cloning and functional characterization of human vesicular glutamate transporter 3. *EMBO Rep* 3, 798-803.
- Takamori, S., Rhee, J. S., Rosenmund, C., and Jahn, R. (2000). Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* 407, 189-194.
- Takamori, S., Rhee, J. S., Rosenmund, C., and Jahn, R. (2001). Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGLUT2). *J Neurosci* 21, RC182.
- Tall, G. G., Krumin, A. M., and Gilman, A. G. (2003). Mammalian Ric-8A (synembryn) is a heterotrimeric G α protein guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem* 278, 8356-8362.
- Thompson, C. M., Davis, E., Carrigan, C. N., Cox, H. D., Bridges, R. J., and Gerdes, J. M. (2005). Inhibitor of the glutamate vesicular transporter (VGLUT). *Curr Med Chem* 12, 2041-2056.
- Tolwani, R. J., Jakowec, M. W., Petzinger, G. M., Green, S., and Waggie, K. (1999). Experimental models of Parkinson's disease: insights from many models. *Lab Anim Sci* 49, 363-371.
- Torres, G. E., Yao, W. D., Mohn, A. R., Quan, H., Kim, K. M., Levey, A. I., Staudinger, J., and Caron, M. G. (2001). Functional interaction between monoamine plasma membrane transporters and the synaptic PDZ domain-containing protein PICK1. *Neuron* 30, 121-134.
- Traver, S., Bidot, C., Spassky, N., Baltauss, T., De Tand, M. F., Thomas, J. L., Zalc, B., Janoueix-Lerosey, I., and Gunzburg, J. D. (2000). RGS14 is a novel Rap effector that preferentially regulates the GTPase activity of G α h. *Biochem J* 350 Pt 1, 19-29.
- Travis, E. R., Wang, Y. M., Michael, D. J., Caron, M. G., and Wightman, R. M. (2000). Differential quantal release of histamine and 5-hydroxytryptamine from mast cells of vesicular monoamine transporter 2 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 162-167.

-
- Tu, J. C., Xiao, B., Yuan, J. P., Lanahan, A. A., Leoffert, K., Li, M., Linden, D. J., and Worley, P. F. (1998). Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors. *Neuron* 21, 717-726.
- Tzschentke, T. M. (2007). Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol* 12, 227-462.
- Valenzuela, D., Han, X., Mende, U., Fankhauser, C., Mashimo, H., Huang, P., Pfeffer, J., Neer, E. J., and Fishman, M. C. (1997). G alpha(o) is necessary for muscarinic regulation of Ca2+ channels in mouse heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1727-1732.
- van Biesen, T., Hawes, B. E., Raymond, J. R., Luttrell, L. M., Koch, W. J., and Lefkowitz, R. J. (1996). G(o)-protein alpha-subunits activate mitogen-activated protein kinase via a novel protein kinase C-dependent mechanism. *J Biol Chem* 271, 1266-1269.
- Vanderschuren, L. J., and Kalivas, P. W. (2000). Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl)* 151, 99-120.
- VanDongen, A. M., Codina, J., Olate, J., Mattera, R., Joho, R., Birnbaumer, L., and Brown, A. M. (1988). Newly identified brain potassium channels gated by the guanine nucleotide binding protein Go. *Science* 242, 1433-1437.
- Varoqui, H., Schafer, M. K., Zhu, H., Weihe, E., and Erickson, J. D. (2002). Identification of the differentiation-associated Na+/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J Neurosci* 22, 142-155.
- Vinatier, J., Herzog, E., Plamont, M. A., Wojcik, S. M., Schmidt, A., Brose, N., Daviet, L., El Mestikawy, S., Giros, B. (2006) Interaction between the vesicular glutamate transporter type 1 and endophilin A1, a protein essential for endocytosis. *J Neurochem* 97, 1111-25.
- Walther, D. J., and Bader, M. (2003). A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol* 66, 1673-1680.
- Walther, D. J., Peter, J. U., Winter, S., Höltje, M., Paulmann, N., Grohmann, M., Vowinckel, J., Alamo-Bethencourt, V., Wilhelm, C. S., Ahnert-Hilger, G., and Bader, M. (2003). Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. *Cell* 115, 851-862.
- Watts, V. J., Wiens, B. L., Cumbay, M. G., Vu, M. N., Neve, R. L., and Neve, K. A. (1998). Selective activation of Galphao by D2L dopamine receptors in NS20Y neuroblastoma cells. *J Neurosci* 18, 8692-8699.
- Wersinger, C., Sidhu, A. (2003). Attenuation of dopamine transporter activity by alpha-synuclein. *Neurosci Lett* 340, 189-192.
- Wilson, N. R., Kang, J., Hueske, E. V., Leung, T., Varoqui, H., Murnick, J. G., Erickson, J. D., and Liu, G. (2005). Presynaptic regulation of quantal size by VGLUT1. *J Neurosci* 25, 6221-6234.
- Wojcik, S. M., Rhee, J. S., Herzog, E., Sigler, A., Jahn, R., Takamori, S., Brose, N., and Rosenmund, C. (2004). An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 7158-7163.
- Wolosker, H., de Souza, D. O., and de Meis, L. (1996). Regulation of glutamate transport into synaptic vesicles by chloride and proton gradient. *J Biol Chem* 271, 11726-11731.
- Xiao, B., Tu, J. C., Petralia, R. S., Yuan, J. P., Doan, A., Breder, C. D., Ruggiero, A., Lanahan, A. A., Wenthold, R. J., and Worley, P. F. (1998). Homer regulates the association of group 1

metabotropic glutamate receptors with multivalent complexes of homer-related, synaptic proteins. *Neuron* 21, 707-716.

Xie, X. S., Crider, B. P., and Stone, D. K. (1989). Isolation and reconstitution of the chloride transporter of clathrin-coated vesicles. *J Biol Chem* 264, 18870-18873.

Yelamanchili, S. V., Pendyala, G., Brunk, I., Darna, M., Albrecht, U., Ahnert-Hilger, G. (2006) Differential sorting of the vesicular glutamate transporter 1 into a defined vesicular pool is regulated by light signaling involving the clock gene *Period2*. *J Biol Chem* 281, 15671-15679.

Yoo, J. H., Yang, Y. S., Choi, I., Shangguan, Y., Song, I., Neubig, R. R., and Wiley, J. W. (2002). Expression of novel splice variants of the G protein subunit, Go alpha, is tissue-specific and age-dependent in the rat. *Gene* 296, 249-255.

Zhang, G. C., Mao, L. M., Liu, X. Y., Parelkar, N. K., Arora, A., Yang, L., Hains, M., Fibuch, E. E., and Wang, J. Q. (2007). In vivo regulation of Homer1a expression in the striatum by cocaine. *Mol Pharmacol* 71, 1148-1158.

Zhang, J., Yang, Y., Li, H., Cao, J., Xu, L. (2005). Amplitude/frequency of spontaneous mEPSC correlates to the degree of long-term depression in the CA1 region of the hippocampal slice. *Brain Res* 1050, 110-117.

Zhao-Shea, R., Cohen, B. N., Just, H., McClure-Begley, T., Whiteaker, P., Grady, S. R., Salminen, O., Gardner, P. D., Lester, H. A., and Tapper, A. R. Dopamine D2-receptor activation elicits akinesia, rigidity, catalepsy, and tremor in mice expressing hypersensitive {alpha}4 nicotinic receptors via a cholinergic-dependent mechanism. *Faseb J* 24, 49-57.

Zhao, C. M., Chen, D., Lintunen, M., Panula, P., and Hakanson, R. (1999). Effects of reserpine on ECL-cell ultrastructure and histamine compartmentalization in the rat stomach. *Cell Tissue Res* 295, 131-140.

Zhu, L., Lovinger, D., and Delpire, E. (2005). Cortical neurons lacking KCC2 expression show impaired regulation of intracellular chloride. *J Neurophysiol* 93, 1557-1568.

Zhuang, X., Belluscio, L., and Hen, R. (2000). G(olf)alpha mediates dopamine D1 receptor signaling. *J Neurosci* 20, RC91.

Tierversuchsgenehmigungen

Der Leiterin des Projekts, Frau Prof. Dr. G. Ahnert-Hilger, liegt eine Genehmigung zur Tötung von Tieren zwecks Organentnahme vor. Für in Kooperation durchgeführte Tierversuche oder Tötung von Tieren lag eine Genehmigung des jeweiligen Kooperationspartners vor.

Danksagung

In erster Linie danke ich Frau Prof. Dr. Gudrun Ahnert-Hilger. In ihrer Arbeitsgruppe wurde der größte Anteil der vorgestellten Studien durchgeführt. Das Gelingen der Projekte wurde maßgeblich durch ihre Unterstützung beeinflusst. Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Rüdiger W. Veh, Leiter des Instituts für Integrative Neuroanatomie. Durch sein Engagement wurde meine Weiterbildung im Fach Anatomie entscheidend gefördert. Besonders hervorzuheben ist auch die Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. Manfred Gross, Prodekan für Studium und Lehre der Charité. Diese Unterstützung ermöglichte mir eine umfangreiche Kompetenzerweiterung im Gebiet der Lehre, Curriculumsentwicklung und Lehrforschung durch die Teilnahme am vom Europäischen Sozialfond geförderten Personalweiterbildungsprojekt „Hochschuldidaktik Medizin“ der Charité und am Studiengang „Master of Medical Education - Deutschland“.

Den Mitarbeitern des Centrums für Anatomie danke ich für ihre Kollegialität, Hilfsbereitschaft und ein angenehmes Arbeitsklima. Unter den wissenschaftlichen Mitarbeitern möchte ich Christian Derst, Gisela Große, Thomas Jöns, Markus Höltje, Agnieszka Münster-Wandowski, Ingrid Mitschke, Torsten Weiß und Johannes-Friedrich Zander erwähnen. Einige (ehemalige) Doktoranden haben durch Ihre Arbeit zum Erfolg der Projekte beigetragen (Jens Baron, Christian Blex, Stephan Maul, Sandra Sternberg und Jan Sternberg), weitere (ehemalige) Doktoranden haben in Diskussionen an der Arbeit an den Projekten teilgehabt und das Arbeitsklima positiv beeinflusst, darunter Terence Afube, Mahesh Darna, Johannes Piepgrass, Clemens Reisinger, Karin Richter, Sascha Seibert, Philipp Treppmann und Sowmya Yelamanchili. Mein ganz besonderer Dank geht an die technischen Mitarbeiterinnen Antje Dräger, Annemarie Löchner, Birgit Metze, Marion Möbes, Suzan Öztürk, Elisabeth Schindler und Ursel Tofoté. Ohne ihre experimentelle Expertise hätten die Projekte nicht realisiert werden können. Genauso dankbar bin ich Annett Kaphahn, Sekretariat Prof. Dr. R. W. Veh, die mir stets hilfsbereit in allen administrativen Fragen zur Seite stand.

Ausdrücklich danke ich auch allen Kooperationspartnern, darunter Urs Albrecht, Lutz Birnbaumer, Nils Brose, Heide Hörtnagl, Carles Sanchis-Segura, Rainer Spanagel und Diego Walther sowie allen namentlich nicht genannten. Bedanken möchte ich mich zusätzlich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die die vorgestellten Projekte jahrelang finanziell gefördert hat.

Abschließend danke ich auch meiner Familie, Manfred Hueber, Sara Hueber und Sophie Hueber: Ihr seid hier zwar an letzter Stelle genannt, aber trotzdem das Wichtigste und Beste in meinem Leben.

Erklärung

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

Hiermit erkläre ich, dass

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

.....

Datum

.....

Unterschrift