

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der synaptischen Übertragung

Das menschliche Nervensystem besteht aus mehr als 10^{10} Neuronen. Das Neuron ist die strukturelle und funktionelle Einheit des Nervensystems. Ein typisches motorisches Neuron hat einen Zellkörper (Soma), von welchem zwei Arten von Fortsätzen entspringen: Das Axon und die Dendriten. Über die große Oberfläche der Dendriten nimmt das Neuron Signale von anderen Nerven auf. Das Axon, das am Axonhügel des Somas entspringt und sich in seinem Verlauf oft in Kollateralen aufteilt, überträgt das Nervensignal auf andere Nerven-, Muskel- und Drüsenzellen. Axon und Kollaterale enden mit Endknöpfen an der Synapse und nehmen so Verbindung zum Soma, zu den Dendriten oder zum Axon des nächsten Neurons auf. An einem einzelnen Motoneuron finden sich tausende solcher Kontaktstellen, die bis zu 40% der Neuronoberfläche bedecken können.

Die Synapse ist die Kontaktstelle des Axons einer Nervenzelle mit einem anderen Neuron, aber auch mit Muskel- oder Drüsenzellen. An der Synapse findet die chemische Reizübertragung statt. Dabei werden durch das Aktionspotential, welches die Präsynapse erreicht, spannungsabhängige Calciumkanäle geöffnet. Der Calciumeinstrom in das Zytoplasma führt zu einer Verschmelzung der sekretorischen Vesikel mit der präsynaptischen Membran und so zu einer regulierten Freisetzung (quantale Freisetzung) von Botenstoffen, den Neurotransmittern, in den synaptischen Spalt. Die in den synaptischen Spalt abgegebenen Neurotransmitter binden an postsynaptische Ionenkanalrezeptoren (ionotrop) oder G-Protein gekoppelte (metabotrop) Rezeptoren und bewirken so die Umwandlung des chemischen in ein elektrisches Signal.

Neurotransmitter können in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden: Die erste Gruppe umfasst einfache Aminosäuren wie das erregend (exzitatorisch) wirkende Glutamat und die beiden hemmend (inhibitorisch) wirkenden Neurotransmitter GABA und Glyzin. Vertreter dieser Gruppe sind für eine rasche Erregungsbildung zuständig und kommen im mikromolaren Bereich im Gehirn vor. Sie sind die am weitesten verbreiteten Neurotransmitter. Zur zweiten Gruppe gehören Acetylcholin, Katecholamine (Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin) sowie Serotonin. Diese wirken mit Ausnahme des Acetylcholins langsam. Diese als Latenz bezeichnete synaptische Verzögerung kommt durch die relativ langsame Freisetzung und Diffusion des Überträgerstoffes zustande. Zur dritten Gruppe zählen die Neuropeptide, wie zum Beispiel Metenkephalin, Substanz P und Vasopressin. Sie wirken vor allem neuromodulatorisch und sind im Gehirn in nano- bis picomolaren Mengen zu finden (Nicholls, 1994).

Je nach Art des Neurotransmitters kann dieser zu einer Depolarisierung oder zu einer Hyperpolarisierung der Membran führen. Erregende Transmitter erhöhen die

Ionenleitfähigkeit für Natrium-, Chlorid- und Kaliumionen. Wegen des hohen Gradienten für Natriumionen überwiegt der Na^+ -Einstrom.

Hemmende Neurotransmitter erhöhen nicht die Ionenleitfähigkeit für Natriumionen, sondern nur die für Chlorid- und Kaliumionen. Die Membran wird dadurch hyperpolarisiert und die Erregbarkeit der Zelle herabgesetzt.

Die Variabilität in der quantalen Freisetzung hängt sowohl von der Wahrscheinlichkeit exozytotischer Ereignisse als auch von der Sensitivität und Anzahl postsynaptischer Rezeptoren ab. Darüber hinaus bestimmt die Konzentration des Neurotransmitters, die nicht immer zur Sättigung aller Rezeptoren führt, im synaptischen Spalt die postsynaptische Antwort (Liu et al., 1999). Des Weiteren kann sich auch die Neurotransmittermenge pro Vesikel unterscheiden. Jedoch ist die Chance der unterschiedlich gefüllten Vesikel mit der Plasmamembran zu verschmelzen gleich (Van der Kloot, 1991; Travis et al., 2000). Die Unterschiede in der Neurotransmittermenge pro Vesikel lassen sich durch das set-point oder das steady-state-Modell erklären (Williams, 1997). Das erste Modell geht davon aus, dass Vesikel nur eine definierte Menge Neurotransmitter aufnehmen können. Das Steady-State-Modell besagt, dass bei erhöhtem Neurotransmitterangebot größere Mengen Transmitter aufgenommen werden können. Hierbei kommt es infolge eines postulierten Leckmechanismus zu einem vermehrten Efflux von Neurotransmittern, gleichzeitig aber auch zu einer intravesikulären Gleichgewichtseinstellung der Transmittermenge auf einem höheren Niveau als dem ursprünglichen.

Mit Ausnahme von Acetylcholin, welches durch einen schnellen enzymatischen Abbau inaktiviert wird und als Acetat und Cholin aus dem synaptischen Spalt entfernt wird, werden alle anderen Neurotransmitter mit Hilfe von Plasmamembrantransportern rasch wieder aufgenommen und anschließend über vesikuläre Neurotransmittertransporter in die Vesikel transportiert. Somit tragen diese auch indirekt zur quantalen Variabilität bei.

Die Plasmamembrantransporter lassen sich in zwei Unterfamilien einteilen: Die Hauptvertreter der einen Unterfamilie bilden fünf Glutamattransporter-Subtypen mit verschiedenen Substratspezifitäten (Danbolt, 2001), die in der Genfamilie der exzitatorischen Aminosäure (Glutamat, Aspartat)-Transporter (EAAT) zusammengefasst werden. Sie transportieren Protonen und Neurotransmitter im Austausch gegen Kalium. In der anderen Unterfamilie sind die Transporter für die meisten klassischen Neurotransmitter zusammengefasst. Zu nennen sind der Serotonintransporter (SERT), der Dopamintransporter (DAT), der Noradrenalintransporter (NET), die GABA-Transporter 1-4 (GAT1-GAT4) sowie die Glyzintransporter 1 und 2 (GLYT1 und GLYT2). Bei diesen Transportern kommt es zu einem Cotransport des Neurotransmitters mit Natrium und Chlorid in die Zelle. Dies ermöglicht einen Transport gegen den Konzentrationsgradienten. Während Plasmamembrantransporter für die Monoamine im ZNS neuron-spezifisch sind,

kommen die verschiedenen Transportertypen für Glutamat und GABA sowohl in neuronalen Zellen als auch in Gliazellen vor (Liu et al., 1999).

1.2 Sekretorische Vesikel und ihre Neurotransmittertransporter

Synaptische Vesikel spielen eine zentrale Rolle in der neuronalen und zellulären Kommunikation. Sie lassen sich in zwei Klassen einteilen: Zum einen die „dense core“ und „large dense core“ Vesikel (LDCV), welche große elektronendichte Vesikel mit einem Durchmesser von 70-300 nm darstellen und vor allem Neuropeptide und Hormone speichern und zum anderen die kleinen synaptischen Vesikel (small synaptic vesicles; SSV), welche in neuroendokrinen Zellen als small synaptic-like microvesicles (SLMV) bezeichnet werden mit einem Durchmesser von 40 nm und niedermolekulare Neurotransmitter speichern.

Durch verschiedene Neurotransmittertransporter werden unabhängig vom Vesikeltyp die Neurotransmitter in den Vesikeln gespeichert. Als spezifische Transporter sind hier für Monoamine der VMAT (vesikulärer Monoamintransporter), für Acetylcholin der VACHT (vesikulärer Acetylcholintransporter) für Glutamat die VGLUTs (vesikulärer Glutamatttransporter) und für GABA und Glyzin der VGAT (vesikulärer GABA Transporter) zu nennen.

1.2.1 Der vesikuläre Monoamintransporter

Für den Transport von Monoaminen in sekretorische Vesikel sind zwei strukturell ähnliche aber pharmakologisch gut zu unterscheidende vesikuläre Monoamintransporter verantwortlich (VMAT1, VMAT2). VMAT1 wurde erstmals aus PC 12 Zellen (Liu et al., 1992) und VMAT2 aus dem Rattengehirn (Liu et al., 1992; Liu et al., 1994; Erickson et al., 1996) kloniert. Beide Transporter besitzen zwölf putative Transmembrandomänen und drei (VMAT1) bzw. vier (VMAT2) Glykosylierungsstellen. Des Weiteren findet sich zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne eine luminal Schleife, welche an der Regulation der Aktivität des Transporters beteiligt sein könnte. VMAT2 ist der dominante Transporter im Gehirn, tritt aber auch in einer Vielzahl peripherer Zellen, wie zum Beispiel in sympathischen Neuronen, enterochromaffinen Zellen (Peter et al., 1995; Erickson et al., 1996) und Thrombozyten (Lesch et al., 1993; Höltje et al., 2003) auf. VMAT1 tritt hingegen -zumindest in adulten Individuen- nur in der Peripherie auf. Eine Ausnahme bildet hier die Epiphyse, die ausschließlich VMAT1 enthält (Hayashi et al., 1999). Während der Entwicklung des ZNS der Ratte werden vorübergehend beide Transportertypen koexprimiert, wie für das limbische System, die Basalganglien und einige hypothalamische Kerne beschrieben wurde (Hansson et al., 1998). Beide Transporter transportieren Serotonin, Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin in Konzentrationen mit einem mikromolaren K_m -Wert für VMAT1 und

submikromolaren K_m -Wert für VMAT2 in Ratten (Peter et al., 1994) und Menschen (Erickson et al., 1996). Durch die Aktivität der VMAT wird eine 10^4 - 10^6 fach höhere Konzentration an Monoaminen in den Vesikeln erreicht. In den LDCV und SSV einer Synapse des Blutegels konnten Serotoninkonzentrationen von 270 mM (Bruns et al., 2000) und in chromaffinen Zellen von über 1 M (Johnson, Jr., 1988; Schuldiner et al., 1995) gemessen werden. Des Weiteren transportiert VMAT2 im Gegensatz zu VMAT1 auch Histamin und ist je nach Spezies zehnfach (Ratte) (Peter et al., 1994) bis hundertmal (Mensch) (Erickson et al., 1996) sensitiver gegenüber dem inhibitorisch wirkenden Tetrabenazin. VMAT2 hingegen hat eine allgemein höhere Affinität zu Monoaminen, eine Eigenschaft, welche im Gehirn für die schnelle Wiederaufnahme der cytosolisch toxischen Neurotransmittern wichtig ist. Im Gegensatz dazu steht die langsame Füllung sekretorischer Granula durch VMAT1 im Nebennierenmark (Peter et al., 1994).

Die hohe Aktivität des VMAT2 hat auch eine protektive Wirkung auf den Stoffwechsel der Zelle. Während homozygote VMAT2-Deletionsmutanten direkt nach der Geburt verstarben, zeigten heterozygote Tiere eine erhöhte Sensitivität gegenüber Amphetamin, Kokain und MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin) eine Substanz welche Parkinson in Nagetieren auslöst (Takahashi et al., 1997; Wang et al., 1997; Fon et al., 1997). Gerade die herabgesetzte Resistenz in Bezug auf MPTP hebt die protektive Wirkung der VMAT-Aktivität gegen oxidativen Stress der Zelle durch die Aufnahme dieser Substanzen hervor (Takahashi et al., 1997).

1.2.2 Der vesikuläre Glutamattransporter

Drei vesikuläre Glutamattransporter, VGLUT1 (Bellocchio et al., 2000; Takamori et al., 2000a), VGLUT2 (Bai et al., 2001; Fremeau, Jr. et al., 2001; Hayashi et al., 2001; Takamori et al., 2001) und VGLUT3 (Fremeau, Jr. et al., 2002; Gras et al., 2002; Takamori et al., 2002) wurden kloniert. Die Transporter sind mit sechs (VGLUT1) bis acht (VGLUT2/3) Transmembrandomänen in der Membran verankert (Ni et al., 1994; Takamori et al., 2002).

Die Michaelis-Menten-Konstante liegt für die Transporter VGLUT1 und VGLUT2 bei 1-2 mM (Bellocchio et al., 2000; Gras et al., 2002) für den VGLUT3 bei 0,6 mM (Gras et al., 2002). Alle drei Transporter sind spezifisch für ihr Substrat Glutamat, während andere Aminosäuren wie Aspartat nicht transportiert werden (Takamori et al., 2000a; Takamori et al., 2001; Gras et al., 2002). Obwohl die Plasmamembrantransporter für Glutamat bis zu zwei Zehnerpotenzen stärker affin sind als die vesikulären Glutamattransporter wird durch die hohe zytoplasmatische Konzentration an Glutamat (ca. 100 mM) sichergestellt, dass die sekretorischen Vesikel ausreichend mit Glutamat gefüllt werden können (Danbolt, 2001). Die höhere Affinität der Plasmamembrantransporter ist durch die zytotoxische Wirkung von extrazellulärem Glutamat durch Auslösung einer exzitatorischen Kaskade zu erklären.

Die Affinität der VGLUT ist im Gegensatz zu VMAT und VACHT überwiegend durch $\Delta\Psi$ reguliert. Ein großer elektrischer Gradient erhöht die Affinität der VGLUT für Glutamat.

VGLUT1 ist der dominante Transporter im Cortex, Hippocampus und Cerebellum (Fremeau, Jr. et al., 2001; Fujiyama et al., 2001; Kaneko & Fujiyama, 2002). VGLUT2 kommt in thalamischen und hypothalamischen Regionen (Hisano et al., 2000; Sakata-Haga et al., 2001; Fujiyama et al., 2001; Fremeau, Jr. et al., 2002; Kaneko & Fujiyama, 2002), sowie in der Epiphyse und den α -Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas vor (Hayashi et al., 2001). Die Koexpression von VGLUT3 mit VMAT, VACHT und VGAT in serotonergen, cholinergen (Fremeau, Jr. et al., 2002; Gras et al., 2002) sowie GABAergen (Fremeau, Jr. et al., 2002) Axonendigungen spricht für die Rolle von Glutamat als Kotransmitter.

1.2.3 Der vesikuläre Acetylcholintransporter

Der vesikuläre Acetylcholin-Transporter VACHT wurde erstmals in *Caenorhabditis elegans* als UNC-17 kloniert (Alfonso et al., 1993) gefolgt durch seine Identifikation in *Torpedo* (Varoqui et al., 1994) und in der Ratte (Erickson et al., 1994). VACHT ist mit zwölf Transmembrandomänen in der Membran verankert und hat eine enge genetische Verwandtschaft zu den vesikulären Monoamintransportern und zur Acetyltransferase (Usdin et al., 1995). Er besitzt im Vergleich zu VMAT tausendfach höhere K_m -Werte im millimolaren Bereich für sein Substrat (Varoqui & Erickson, 1996). Die Transportereigenschaften sowie die Abhängigkeit von elektrochemischen Gradienten entsprechen denen der VMAT (Schuldiner et al., 1995; Reimer et al., 1998). VACHT kommt ausschließlich auf kleinen synaptischen Vesikeln peripherer sowie zentraler cholinergischer Axonendigungen vor (Weihe et al., 1996). In tegmentalen Neuronen konnten hohe Konzentrationen an VACHT zusammen mit tubulovesikulären Strukturen der Dendriten gefunden werden, welches eine zusätzliche dendritische Abgabe von Acetylcholin vermuten lässt (Garzon & Pickel, 2000).

1.2.4 Der vesikuläre GABA- oder inhibitorische-Aminosäuren-Transporter

Der vesikuläre GABA-Transporter (VGAT) -auch als vesikulärer inhibitorische-Aminosäuren Transporter bezeichnet (VIAAT)- wurde parallel in *Caenorhabditis elegans* (McIntire et al., 1997) und in der Maus (Sagne et al., 1997) kloniert. Gefunden wurde er sowohl in GABAergen als auch in glyzinerger Axonendigungen (Chaudhry et al., 1998; Dumoulin et al., 1999). Takamori et al. konnten durch eine Immunoisolation aus dem Rattengehirn zeigen, dass GABAerge synaptische Vesikel eine eigene Subpopulation bilden (Takamori et al., 2000b). Er ist mit zehn Transmembrandomänen in der Membran verankert und transportiert γ -Aminobuttersäure (GABA) und Glyzin in die SSV inhibitorischer Neurone. Seine Affinität für GABA kann mit der Affinität der VGLUT zu Glutamat verglichen werden.

Sie liegt im millimolaren Bereich. Seine Affinität zu Glyzin hingegen liegt sogar im submillimolaren Bereich (McIntire et al., 1997; Sagne et al., 1997; Bedet et al., 2000).

1.3 Regulation der Aktivität vesikulärer Transporter

1.3.1 Der elektrochemische Gradient

Johnson et al. konnten am Beispiel der VMAT in chromaffinen Zellen zeigen, dass die Aktivität der vesikulären Transporter vom elektrochemischen Gradienten ($\Delta\mu_{H^+}$) über die Membran abhängt (Johnson, Jr., 1988). Dieser Gradient wird zum einen gebildet aus dem Protonengradient (ΔH^+), welcher durch die vakuoläre H^+ -ATPase aufgebaut wird und zum anderen durch die elektrische Ladungsdifferenz über der Membran ($\Delta\Psi$). Durch die Aktivität der V-ATPase wird ein intravesikulärer pH-Wert von 5,6 erreicht. In Folge dessen ist die luminal Seite der Membran positiv geladen. Der elektrochemische Gradient stellt die treibende Kraft für den Transport von Neurotransmittermolekülen in das Vesikel dar. Dieses in den chromaffinen Zellen erstmals beschriebene Prinzip gilt auch für den Transport von Neurotransmittern in SSVs. Dies wurde für die Aufnahme von GABA, Glutamat und Dopamin bekannt, bevor die Transporter selbst charakterisiert wurden (Hell et al., 1988; Hell et al., 1990; Maycox et al., 1990). Die verschiedenen oben beschriebenen Transporter unterscheiden sich in ihrer Abhängigkeit von ΔpH und $\Delta\Psi$. So hängt die Aktivität des VMAT und des VAcHT hauptsächlich von dem Protonengradient über die Vesikelmembran ab und weniger von der elektrischen Ladungsdifferenz, wohingegen die vesikulären Glutamatttransporter (VGLUT) mehr von $\Delta\Psi$ abhängen und der VGAT durch beide Anteile des elektrochemischen Gradienten reguliert wird (Johnson, Jr., 1988; Hell et al., 1990; Maycox et al., 1990; Schuldiner et al., 1995; Reimer et al., 1998). Zusätzlich zu dem Einfluss von Protonen auf den elektrochemischen Gradienten spielen Chloridionen eine große Rolle. Durch die Aufnahme von Chlorid in das Vesikellumen durch einen vesikulären Chloridkanal wird der Protonengradient erhöht, während die elektrische Ladungsdifferenz erniedrigt wird. Im Gegensatz dazu führt eine Verminderung der vesikulären Chloridkonzentration zu einer Verminderung von ΔH^+ und zu einer Erhöhung von $\Delta\Psi$. Dies lässt sich durch die verminderte Anreicherung von Protonen im Vesikellumen erklären, da durch das fehlende Chlorid die positive Ladung in den Vesikeln nicht ausgeglichen werden kann (Maycox et al., 1990; Reimer et al., 2001). Weiterhin unterscheiden sich die vesikulären Transporter in ihren Transporteigenschaften im Hinblick auf den Austausch von Neurotransmittern gegen Protonen. So transportieren die VMAT und VAcHT ein Transmittermolekül gegen zwei Protonen, wohin gegen VGLUTs und VGAT nur ein Proton gegen ein Transmittermolekül austauschen (Schuldiner et al., 1995; Reimer et al., 2001). In Bezug auf den Transport von Glutamat ist zu sagen, dass es durch das negativ geladene Glutamat zu einem erhöhten

Transport von Protonen in das Vesikellumen durch die V-ATPase kommt. Dies resultiert in einer Azidifizierung des Vesikellumens. Um diese Ladungsdifferenz auszugleichen ist es denkbar, dass im Gegenzug zum Transport von Glutamat in das Lumen zwei Chloridion zusammen mit einem Proton auf die zytosolische Seite transportiert wird (Maycox et al., 1990; Wolosker et al., 1996). Des Weiteren erhöht eine große Ladungsdifferenz die Affinität des Transporters für sein Substrat Glutamat und ein hoher Protonengradient erleichtert die Anreicherung von Glutamat im Vesikellumen (Wolosker et al., 1996).

1.3.2 Heterotrimere G-Proteine

Die Wirkungsweise heterotrimerer G-Proteine in der Signalweiterleitung zwischen Plasmamembranrezeptor und second-messenger-Systemen ist vielfältig untersucht. Seit einiger Zeit ist bekannt, dass heterotrimere G-Proteine auch auf intrazellulären Membranen, wie zum Beispiel dem Golgi-Apparat, dem endoplasmatischen Retikulum, den Endosomen und den sekretorischen Vesikeln vorkommen (Montmayeur & Borrelli, 1994; Helms, 1995; Nurnberg & Ahnert-Hilger, 1996). G-Proteine (Guaninnucleotid-bindende Proteine) bilden eine Superfamilie innerhalb der GTPase-Enzyme (Bourne et al., 1990).

Heterotrimere G-Proteine bestehen aus einer α -, β - und γ - Untereinheit und werden anhand ihrer G_{α} -Untereinheit in vier Familien ($G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i} / G_{\alpha o}$, $G_{\alpha q} / G_{\alpha 11}$, $G_{\alpha 12} / G_{\alpha 13}$) eingeteilt. Je nach Zugehörigkeit zu einer Familie aktivieren oder hemmen die G_{α} -Untereinheiten verschiedene Effektoren. Einen Überblick gibt die folgende Tabelle:

Familie	Untereinheit	Vorkommen	Effektoren
$G_{\alpha s}$	$G_{\alpha s}$	ubiquitär	Adenylatzyklasen \uparrow
	$G_{\alpha sXL}$	Neuroendokrin	Adenylatzyklasen \uparrow
	$G_{\alpha olf}$	Olfaktorisches Epithel, Gehirn	Adenylatzyklasen \uparrow
$G_{\alpha i} / G_{\alpha o}$	$G_{\alpha i1}$	ubiquitär	Adenylatzyklasen (Typ I, III, V, VI, VIII, IX) \downarrow (direkt), viele andere Effektoren über die zugehörige $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit
	$G_{\alpha i2}$	ubiquitär	
	$G_{\alpha i3}$	ubiquitär	
	$G_{\alpha o}$	Neuronal, neuroendokrin	Spannungabhängige Ca^{2+} -Kanäle \downarrow , GIRK \uparrow
	$G_{\alpha z}$	Neuronal, Thrombozyten	Adenylatzyklase (z.B. V, VI) \downarrow ; Rap1GAP
	$G_{\alpha gust}$	Tastzellen, Bürstenzellen	PDE
	$G_{\alpha t-r}$	Stäbchen der Retina, Tastzellen	PDE6 \uparrow
$G_{\alpha q} / G_{\alpha 11}$	$G_{\alpha q}$	ubiquitär	PLC- β 1-4 \uparrow
	$G_{\alpha 11}$	nahezu ubiquitär	
	$G_{\alpha 14}$	Niere, Lunge, Milz	
	$G_{\alpha 15/16}$	blutbildende Zellen	
$G_{\alpha 12} / G_{\alpha 13}$	$G_{\alpha 12}$	ubiquitär	PDZ-RhoGEF, Cadherin, BtK, Gap1m
	$G_{\alpha 13}$	ubiquitär	

(Aktivierung: \uparrow , Inhibition: \downarrow)

(Wettschureck & Offermanns, 2005)

Die verschiedenen $\beta\gamma$ -Untereinheiten interagieren mit etwa dreißig verschiedenen Effektoren. Zu nennen sind hier unter anderem die Phospholipase A2, Phosphoinosit-3-Kinasen und G-Protein-Rezeptorkinasen (Muller & Lohse, 1995). Sie haben darüber hinaus einen direkten hemmenden Effekt auf die Neurotransmitterfreisetzung sowie die an der Exozytose beteiligten SNARE-Proteine (Dell et al., 2002).

Bis heute sind 23 α -, 5 β -, und 11 γ -Untereinheiten beschrieben worden. Dies ergibt mehr als tausend mögliche Kombinationen, welche in einem spezifischen G-Protein und G-Protein-Effektor-Interaktion enden. Die Aktivierung eines G-Proteins erfolgt über ligandenaktivierte heptahelikale Rezeptoren (sog. G-Protein coupled Receptors). Die G_{β} -Untereinheit ist hierbei entscheidend für die Interaktion mit dem Rezeptor. In Folge einer G-Proteinaktivierung tauscht die α -Untereinheit des G-Proteins ein GDP gegen ein GTP aus und dissoziiert von der $\beta\gamma$ -Untereinheit ab. Beide, sowohl die G_{α} -Untereinheit als auch die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit können mit verschiedenen intrazellulären Signalwegen interferieren. Die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit ist in dieser Regulation eine Ausnahme, da sie auch in Abwesenheit der γ -Untereinheit mit G-Protein Effektoren interagieren kann (Sondek & Siderovski, 2001). Die intrinsische GTPase-Aktivität der G_{α} -Untereinheit spaltet anschließend das GTP zu GDP und Phosphat. Dies führt zu einer Inaktivierung und zu einer Reassoziierung mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit (s. Abb.1).

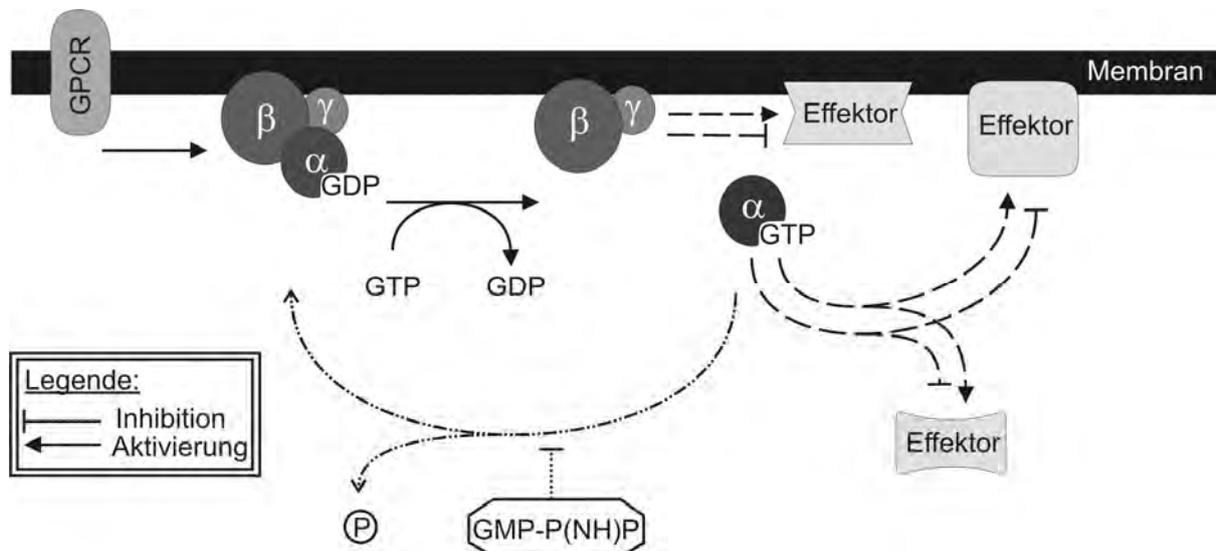


Abbildung 1
Schema der G-Proteinaktivierung

Die Aktivierung eines G-Proteins erfolgt über ligandenaktivierte heptahelikale Rezeptoren (GPCR). In Folge dessen tauscht die G_{α} -Untereinheit das gebundene GDP gegen GTP aus und dissoziiert ab. Sowohl der Komplex aus der $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit als auch die G_{α} -Untereinheit können verschiedene Effektoren bzw. inhibieren. Die intrinsische GTPase-Aktivität der G_{α} -Untereinheit spaltet anschließend das GTP zu GDP und Phosphat. Dies führt zu einer Inaktivierung und zu einer Reassoziierung mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit. Das schwer hydrolysierbare GTP-Analogon GMP-P(NH)P kann an die GTP-Bindungsstelle der G_{α} -Untereinheit binden und verhindert so eine erneute Inaktivierung des G-Proteins.

Die Lokalisation von G-Protein-Untereinheiten in intrazellulären Membranen wurde erstmals für $G_{\alpha i}$ -Untereinheiten in den Axonendigungen der Basalganglien beschrieben (Aronin & DiFiglia, 1992). Eine vesikel subtypische Lokalisation von verschiedenen $G_{\alpha i}$ - und $G_{\alpha o}$ -Untereinheiten konnte an gereinigten sekretorischen Vesikeln des Rattengehirns sowie der Rindernebenniere gezeigt werden. Untergruppen von SSV unterscheiden sich sowohl in ihren Neurotransmittertransportern als auch in ihrer G-Proteinverteilung (Ahnert-Hilger et al., 1994; Pahner et al., 2002).

Bisher konnten nur die $G_{\alpha o}$ und $G_{\alpha q}$ Untereinheiten mit Defekten des zentralen Nervensystems in Verbindung gebracht werden. Bemerkenswert ist, dass in diesem Zusammenhang nur wenig über die voran- und nachgeschalteten Signalwege der $G_{\alpha o}$ -Untereinheiten bekannt ist, obwohl diese ein Prozent der gesamten Proteinmenge des Gehirns darstellen (Dolphin, 1998). $G_{\alpha o}$ kommt in zwei Splicevarianten $G_{\alpha o1}$ und $G_{\alpha o2}$ vor. Von $G_{\alpha o1}$ existiert darüber hinaus eine posttranslationale Modifikation, welche als $G_{\alpha o3}$ bezeichnet wird (Exner et al., 1999). Die physiologische Relevanz von $G_{\alpha o}$ wird am ausgeprägten Genotyp von $G_{\alpha o}$ -defizienten Mäusen deutlich. Sie zeigen neben neurologischen Symptomen (Tremor, Krampfanfälle, Hyperalgesie, auffällige Bewegungsmuster) auch eine hohe postnatale Sterblichkeit (Jiang et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass die $G_{\alpha o}$ -Untereinheiten mit dem Dopamin D2-Rezeptoren (Jiang et al., 2001), den D_{2L} -Rezeptoren in Neuroblastomazellen (Watts et al., 1998) und den RGS-Proteinen (Traver et al., 2000), welche die GTPase-Aktivität der G_{α} -Untereinheiten erhöhen, interagieren. Des Weiteren werden auch von den verschiedenen $G_{\alpha o}$ -Untereinheiten spezifische Effektorsysteme angesprochen (Kleuss et al., 1991; Man-Son-Hing et al., 1992). So hemmt $G_{\alpha o1}$ die Lichtantwort der bipolaren ON-Zellen der Retina über den metabotropen Glutamatrezeptor 6 (Dhingra et al., 2002). $G_{\alpha o2}$ hingegen inhibiert die Aktivität von VMAT1 und VMAT2 in permeabilisierten Zellen und zellfreien Systemen (Ahnert-Hilger et al., 1998; Höltje et al., 2000). Die Regulation des VMAT durch $G_{\alpha o2}$ im ZNS konnte an $G_{\alpha o2}$ -defizienten Mäusen genauer untersucht werden. Sie zeigen keine zentralnervösen Störungen.

Die Vertreter der $G_{\alpha q}$ -Familie $G_{\alpha q}$ und $G_{\alpha 11}$ sind in die Pertussistoxin-insensitive Regulation der Phospholipase-C- β -Isoform involviert (Exton, 1996). Sie sind genetisch verwandt und werden fast immer koexprimiert. Beide G-Proteine der $G_{\alpha q}$ Familie werden im Gehirn von metabotropen Glutamatrezeptoren aktiviert (Wettschureck & Offermanns, 2005).

Auch die physiologische Bedeutung von $G_{\alpha q}$ konnte an $G_{\alpha q}$ -Deletionsmutanten gezeigt werden. Diese Mäuse werden lebensfähig geboren, entwickeln aber dann Koordinationsstörungen wie zum Beispiel Ataxien. Dies ist die Folge einer Störung in der Regression der Kletterfasern der $G_{\alpha q}^{-/-}$ -Mäuse in der dritten postnatalen Woche, wodurch die Purkinje-Zellen multipel innerviert bleiben (Offermanns et al., 1997a). Des Weiteren fehlt in

diesen Tieren die Langzeitdepression der Kletterfasern-Purkinjezellen-Synapse (Daniel et al., 1998). Während in den meisten Säugetierzellen $G_{\alpha q}$ mit dem strukturell und funktionell ähnlichen $G_{\alpha 11}$ koexprimiert ist, enthalten Thrombozyten nur $G_{\alpha q}$. Somit kommt es bei den Deletionsmutanten durch Störung in der G-Protein vermittelten Plättchenaggregation zu Gerinnungsstörungen (Offermanns et al., 1997b). Durch die Regulation der Serotoninaufnahme durch $G_{\alpha q}$ können Thrombozyten als Modellsystem serotonerger Nerven herangezogen werden.

1.3.2.1 Regulation des VMAT2 durch $G_{\alpha o 2}$ und $G_{\alpha q}$ in verschiedenen Geweben

Der erste Hinweis, dass die Aktivität der vesikulären Monoamintransporter durch G-Proteine, speziell durch die $G_{\alpha o 2}$ -Untereinheit reguliert wird, lieferten Versuche an VMAT1 exprimierenden PC12 Zellen (Ahnert-Hilger et al., 1998). Dies konnte durch Versuche sowohl an der Pankreaskarzinoidzelllinie (humane BON Zellen), welche neuroendokrine Eigenschaften besitzt (Höltje et al., 2000), als auch an isolierten chromaffinen Granula des Nebennierenmarks (Pahner et al., 2002) bestätigt werden. Beide Systeme exprimieren auch in einem kleinen Umfang VMAT2. Diese Isoform ist der vorherrschende Transporter im Gehirn (Erickson et al., 1996). Die VMAT2 Aktivität konnte durch das schwer-hydrolyserbare GTP-Analogon GMP-P(NH)P und durch aktivierte $G_{\alpha o 2}$ -Untereinheiten in permeabilisierten Raphe-Neuronen (Höltje et al., 2000) inhibiert werden. Diese Versuche machten deutlich, dass beide Isoformen der vesikulären Monoamintransporter durch die $G_{\alpha o 2}$ -Untereinheit reguliert werden -unabhängig von dem Typ der sekretorischen Vesikel.

Neben der Expression im Gehirn ist auch in den Thrombozyten VMAT2 zu finden. Thrombozyten sind neben dem ZNS die größte Speicherstätte für Serotonin. Sie können allerdings nicht selbst Serotonin aus Tryptophan synthetisieren, sondern nehmen es während der Passage durch die Kapillaren des Darmes auf, wo es durch die enterochromaffinen Zellen freigesetzt wird. Es wird dann durch den Plasmamembrantransporter SERT aufgenommen und durch VMAT2 in den dense bodies gespeichert (Wurzinger, 1990; Morgenstern, 1995; Höltje et al., 2003). Thrombozyten exprimieren kein $G_{\alpha o 2}$ jedoch spielt die G_{α} -Untereinheit $G_{\alpha q}$ in Thrombozyten eine große Rolle in der Regulation von Signaltransduktionswegen. GMP-P(NH)P konnte auch hier, unabhängig von der Spezies, die VMAT2 Aktivität inhibieren (Höltje et al., 2003). Durch die Deletion der $G_{\alpha q}$ -Untereinheit in Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Regulation der VMAT2-Aktivität in Thrombozyten durch $G_{\alpha q}$ reguliert wird.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass VMAT2 im ZNS ausschließlich von $G_{\alpha o 2}$ und in Thrombozyten ausschließlich von $G_{\alpha q}$ reguliert wird (Höltje et al., 2003). Weitgehend unbekannt ist, welche Effektoren zwischen der Aktivierung des G-Proteins und der Regulation des Transporters auf Vesikeln liegen.

1.4 Fragestellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

Welche Auswirkung hat die Deletion der $G_{\alpha 2}$ -Untereinheit des G-Proteins auf die Monoaminaufnahme?

Welche Rolle spielen sekundäre Botenstoffe in der Regulation des VMAT2?

In Vesikeln der Thrombozyten wird der VMAT2 durch $G_{\alpha q}$ und in Vesikeln des ZNS durch $G_{\alpha 2}$ reguliert. Inwiefern unterscheiden sich die nachgeschalteten Signaltransduktionswege? Gibt es Gemeinsamkeiten?