

3. Ergebnisse

3.1 Regulation von VMAT2 im ZNS in Wildtyp-Mäusen und

$G_{\alpha 02}$ -Deletionsmutanten - ein Vergleich

Aus vorangegangenen Experimenten war bekannt, dass die Transporteraktivität von VMAT2 durch vesikuläre G-Proteine reguliert wird. G-Proteine sind molekulare Schalter, welche vielfache Funktionen in Zellen ausüben. $G_{\alpha 02}$ hemmt sowohl VMAT1 als auch VMAT2 (Höltje et al., 2000). Daher sollten weiterführende Erkenntnisse über die Regulation von VMAT2 auf synaptischen Vesikeln durch den Vergleich von Wildtyp- und $G_{\alpha 02}^{-/-}$ - Mäusen gewonnen werden.

In den Fraktionen einer synaptischen Vesikelauflösung reichern sich vesikelassoziierte Proteine an (s. Abb. 5). Es konnte gezeigt werden, dass VMAT2 im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen in den $G_{\alpha 02}^{-/-}$ - und den $G_{\alpha 01+2}^{-/-}$ -Mäusen stärker exprimiert wird.

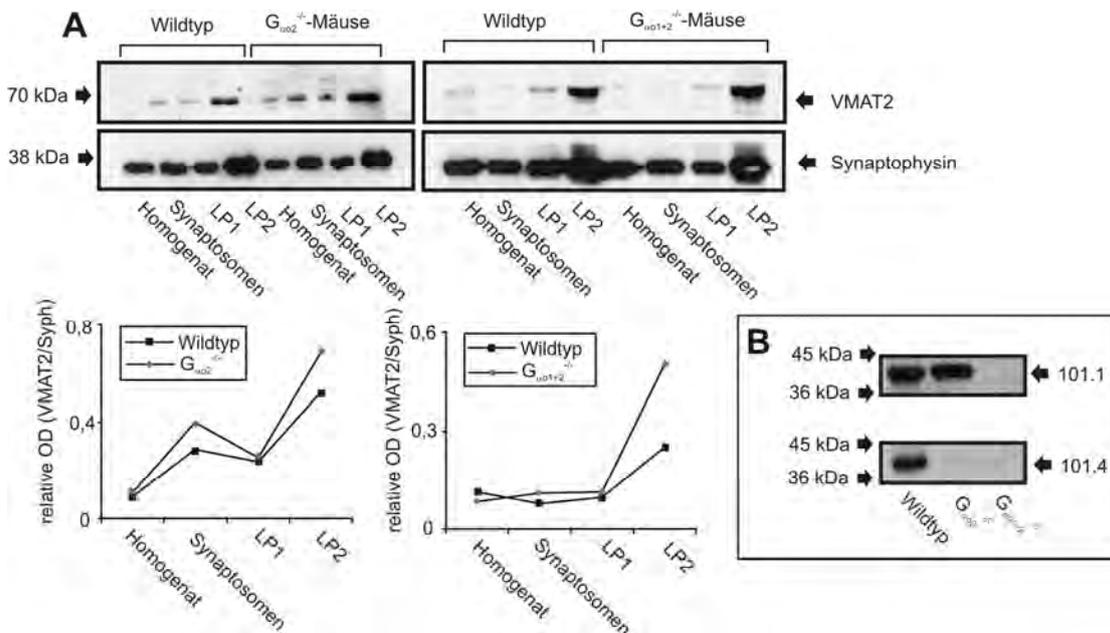


Abbildung 5

Immunoblotanalyse von verschiedenen Fraktionen einer subzellulären Fraktionierung des Gehirns von Wildtyp-, $G_{\alpha 02}^{-/-}$, und $G_{\alpha 01+2}^{-/-}$ - Mäusen

A Verschiedene Fraktionen einer subzellulären Fraktionierung wurden via SDS-Page (10%) und Immunreplikaanalyse dargestellt (10 µg Protein/Spur). Anschließend wurde mit spezifischen Antikörpern gegen Synaptophysin (38 kDa) und VMAT2 (~70 kDa) detektiert.

Die Graphik zeigt das Verhältnis von VMAT2 zu Synaptophysin, ein vesikelassoziiertes Membranprotein, in den jeweiligen Fraktionen.

B Synaptosomen von Wildtyp-, $G_{\alpha 02}^{-/-}$, und $G_{\alpha 01+2}^{-/-}$ - Mäusen wurden mit den $G_{\alpha 0}$ -Antikörpern 101.1 und 101.4 inkubiert. Der für $G_{\alpha 02}$ spezifische Antikörper 101.4 zeigte nur eine Bande in den Wildtyp-Mäusen, wohin gegen der Antikörper 101.1, welcher sowohl $G_{\alpha 01}$ und $G_{\alpha 02}$ detektiert eine Bande in den Wildtyp und $G_{\alpha 02}^{-/-}$ -Mäusen zeigte.

Die Abbildung ist repräsentativ für zwei verschiedene Immunoblotanalysen (n=2). Die Graphik zeigt die gemittelte Darstellung aus beiden Experimenten. In Kooperation mit Dr. Irene Brunk.

3.1.1 G-Protein vermittelte VMAT Regulation

Zu Beginn der Versuche wurde geklärt, ob sich neben den aufgereinigten und angereicherten synaptischen Vesikeln (LP2), welche bereits in anderen Arbeiten verwendet wurden (Höltje et al., 2000), auch die von der Plasmamembran umgebenen Vesikel der Synaptosomen für eine Transmitteraufnahme eignen, da in dieser Fraktion zytosolische Proteine in einer höheren Konzentration vorhanden sind und so Bedingungen vorliegen, welche denen in intakten Neuronen ähneln.

Es konnte gezeigt werden, dass es bei 5.000 hämolysischen Einheiten Streptolysin O zu einer ausreichenden Permeabilisierung der Plasmamembran kommt und so die Aufnahme von [³H]-Serotonin in die Vesikel möglich ist. Eine Hemmung der Transmitteraufnahme durch das schwer hydrolysierbare GTP-Analogon GMP-P(NH)P, welches das G-Protein aktiviert, konnte unter diesen Bedingungen in beiden Versuchen gezeigt werden. Ohne Permeabilisierung der Synaptosomen kam es weder zu einer ausreichenden Aufnahme von Serotonin noch zu einer GMP-P(NH)P vermittelten Hemmung, da GMP-P(NH)P nicht membrangängig ist und so die Vesikel nicht erreicht (s. Abb. 6).

Des Weiteren wurde die Haltbarkeit der gewonnenen Synaptosomen untersucht. Auch am Tag nach der Präparation eigneten sich die Synaptosomen für eine Transmitteraufnahme (s. Abb. 7). Ein direkter Vergleich beider Fraktion erfolgte in einem späteren Experiment (s. Abb. 9).

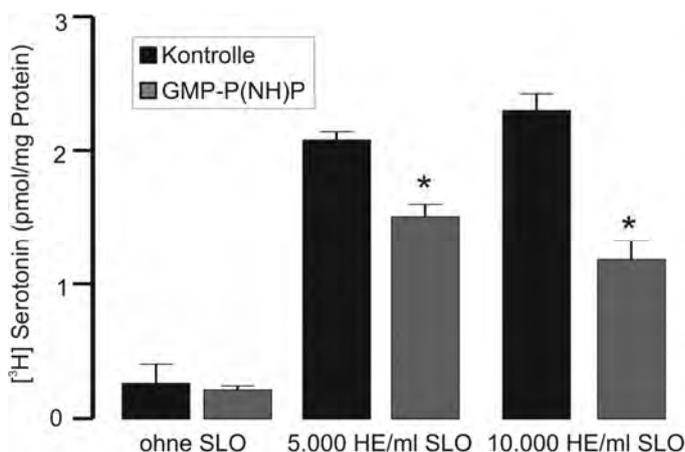


Abbildung 6

Austestung verschiedener Streptolysin O Konzentrationen in Synaptosomen

Es konnte gezeigt werden, dass es bei ca. 5000 HE/ml Streptolysin O zu einer Aufnahme von [³H] Serotonin in die Vesikel in den permeabilisierten Synaptosomen kommt. Des Weiteren konnte auch eine signifikante Hemmung durch 20 μ M GMP-P(NH)P erreicht werden. Die unspezifische Aufnahme wurde mit Reserpin ermittelt und von den dargestellten Werten subtrahiert.

Gezeigt ist hier eine gemittelte Darstellung aus zwei Experimenten mit je drei individuellen Proben je Wert (n=6). Der Student's t-Test ergab eine Signifikanz * p<0,03

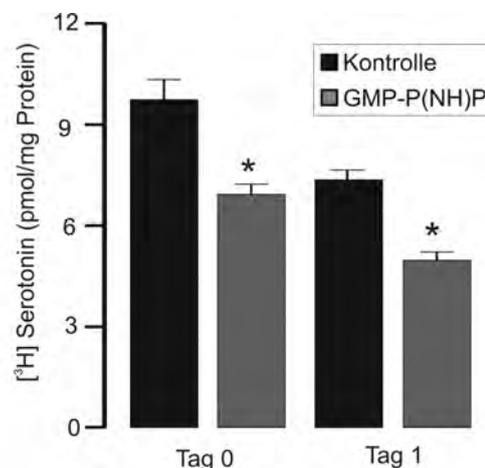


Abbildung 7

Haltbarkeit von Synaptosomen

Es wurden an zwei Tagen Streptolysin-O permeabilisierte Synaptosomen einer Charge mit und ohne 10 μ M GMP-P(NH)P inkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass sich Synaptosomen auch am ersten Tag nach der Präparation für die Transmitteraufnahme eignen.

Gezeigt ist hier eine gemittelte Darstellung aus zwei Experimenten mit je drei individuellen Proben je Wert (n=6). Der Student's t-Test ergab eine Signifikanz * p<0,03

Zunächst sollte geprüft werden, ob die Geschwindigkeit und die Substrataffinität des Monoamintransporters in synaptischen Vesikeln des Gehirns durch die Aktivierung von G-Proteinen beeinflusst werden. Dies wurde mittels einer Michaelis-Menten-Kinetik untersucht (s. Abb. 8). Analog der V_{max} als Maß für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit und K_m als Maß für die Substrataffinität eines Enzyms wurden diese Werte auch für die Aktivität der Transporter bestimmt.

Eine synaptische Vesikelpräparation aus dem Gesamthirn von Wildtyp-Mäusen wurde mit [3 H]-markiertem Serotonin und jeweils ansteigenden Konzentrationen an nicht radioaktiv-markiertem Serotonin (0; 0,04; 0,64; 10; 80 μ M) in Ab- bzw. Anwesenheit von GMP-P(NH)P inkubiert. Die kinetischen Messwerte der VMAT2-Aktivität ohne G-Protein-Aktivierung sind vergleichbar mit den kinetischen Daten für die humane VMAT2-Aktivität (Erickson et al., 1996). Der Wert für die maximale Geschwindigkeit der vesikulären Serotoninaufnahme reduzierte sich nach Zugabe von GMP-P(NH)P von 18,67 auf 15,75 pmol/mg min. Die Lineweaver-Burk-Darstellung (Inset) ließ einen leichten Anstieg des K_m -Wertes von 2,36 μ M auf 2,69 μ M erkennen. In den Vesikeln des Gehirns beeinflusst somit die G-Protein-aktivierung sowohl die maximale Geschwindigkeit als auch die Substrataffinität der Transporter.

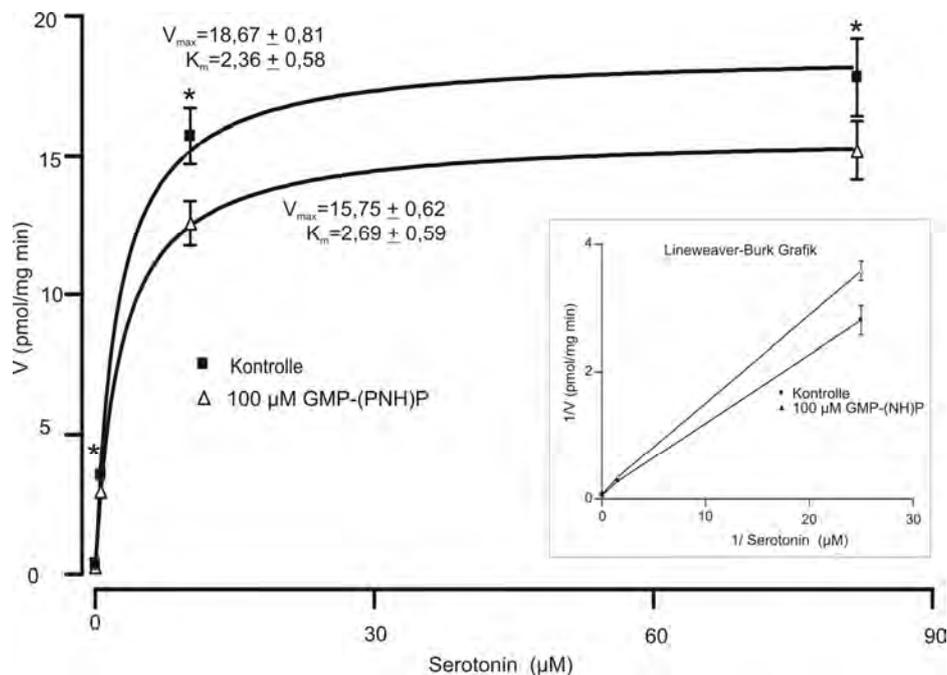


Abbildung 8

Kinetik der Serotoninaufnahme in einer synaptischen Vesikelpräparation von Wildtyp-Mäusen vor und nach G-Protein-Aktivierung durch GMP-P(NH)P

Eine synaptische Vesikelpräparation wurde mit einem Gemisch aus [3 H]-markiertem und nicht radioaktiv markiertem Serotonin in unterschiedlichen Konzentrationen mit und ohne GMP-P(NH)P inkubiert. Dargestellt ist die Reaktionsgeschwindigkeit (V) in Abhängigkeit von der Konzentration an Serotonin. Die Werte für die unspezifische Serotoninaufnahme in Anwesenheit von Reserpin wurden subtrahiert. In Anwesenheit von GMP-P(NH)P sank V_{max} von 18,67 auf 15,75 pmol/mg min. Die Lineweaver-Burk Darstellung (Inset) zeigt entsprechend einen leichten Anstieg des K_m -Wertes.

Gezeigt ist hier eine gemittelte Darstellung aus zwei Experimenten mit je drei individuellen Proben je Wert ($n=6$). Der Student's t-Test ergab eine Signifikanz * $p < 0,03$ für V_{max} .

Danach wurde die Serotoninaufnahme in An- und Abwesenheit von GMP-P(NH)P in Wildtyp und $G_{\alpha_{02}}^{-/-}$ -Mäusen untersucht (s. Abb. 9). In den $G_{\alpha_{02}}^{-/-}$ -Mäusen fehlt die für die Inhibition des VMAT2 verantwortliche $G_{\alpha_{02}}$ -Untereinheit des G-Proteins. Infolge dessen wurde die Monoaminaufnahme nach Gabe des GTP-Analogons GMP-P(NH)P in den $G_{\alpha_{02}}^{-/-}$ -Mäusen nicht vermindert. Des Weiteren wurde ein direkter Vergleich zwischen Synaptosomen und den aufgereinigten und angereicherten synaptischen Vesikeln durchgeführt (s.o.). Hierzu wurden Aliquots der Synaptosomen mit Streptolysin O permeabilisiert und anschließend die [3 H]-Serotoninaufnahme gemessen. Bei der Verwendung von Wildtyp-Synaptosomen konnte schon mit 5 μ M GMP-P(NH)P eine signifikante Hemmung der VMAT2 Aktivität erreicht werden. Ansonsten zeigten sich keine Unterschiede zur Vesikelpräparation.

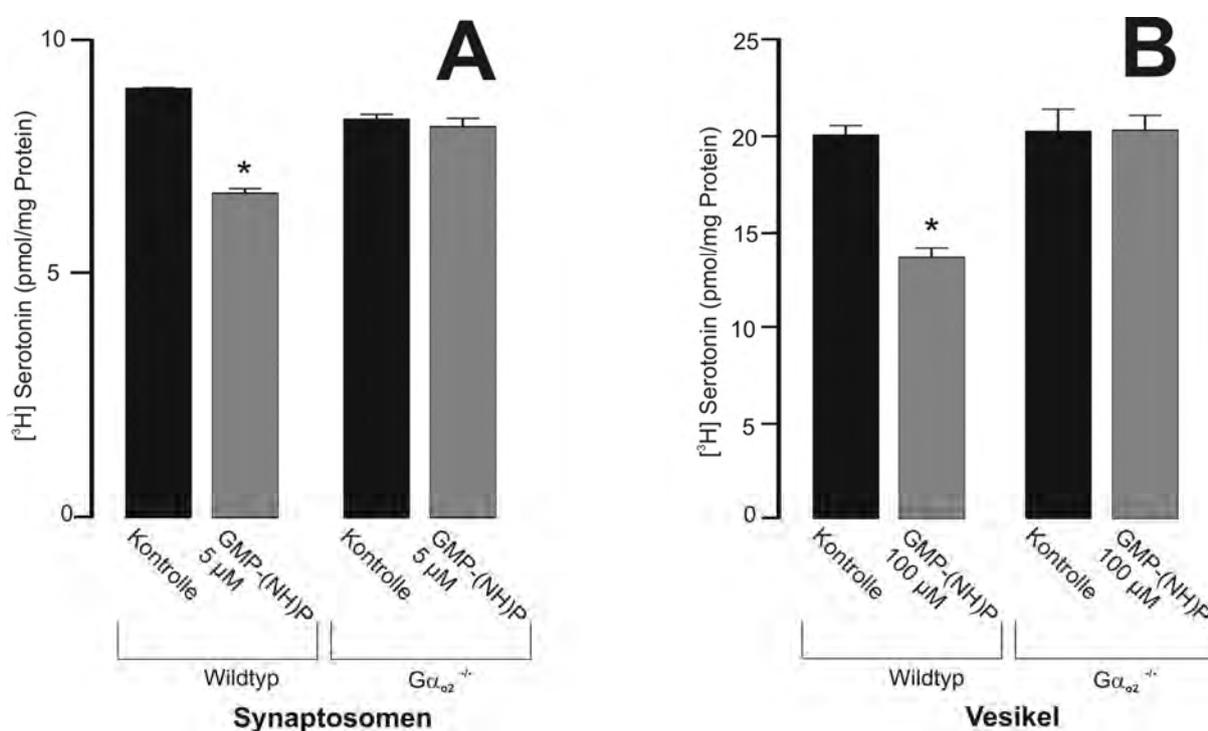


Abbildung 9

Regulation der vesikulären Serotoninaufnahme durch das schwer-hydrolysiertbare GTP-Analogon GMP-P(NH)P in Synaptosomen und Vesikeln von Wildtyp und $G_{\alpha_{02}}^{-/-}$ Mäusen

Eine Präparation von permeabilisierten Synaptosomen bzw. Vesikeln aus dem Gesamthirn wurde mit 40 nM [3 H] Serotonin (Kontrolle) sowie GMP-P(NH)P inkubiert. Dargestellt ist die Serotoninaufnahme in pmol/mg Protein.

A In Synaptosomen von Wildtyp-Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation mit 5 μ M GMP-P(NH)P zu einer signifikanten Hemmung der Serotoninaufnahme führt. Im Gegensatz dazu zeigt sich keine signifikante Hemmung der Serotonin-Aufnahme bei den $G_{\alpha_{02}}^{-/-}$ Mäusen.

B In der synaptischen Vesikelpräparation derselben Tiere konnten die Ergebnisse des Experiments in den Synaptosomen bestätigt werden. Eine signifikante Inhibition der Serotoninaufnahme durch 100 μ M GMP-P(NH)P in den Wildtyp-Mäusen und keine Hemmung der Aufnahme in den $G_{\alpha_{02}}^{-/-}$ Mäusen.

Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert aus zwei verschiedenen Experimenten mit je drei individuellen Proben je Wert (n=6) und der Standardabweichung (SD). Der Student's t-Test ergab eine Signifikanz * $p < 0,02$

Um zu überprüfen, ob sich heterozygote $G_{\alpha_{02}}$ -Mäuse in Bezug auf die G-Protein-Regulierung von den Wildtyp-Mäusen unterscheiden, wurden permeabilisierte Synaptosomen aller drei Genotypen mit und ohne GMP-P(NH)P inkubiert. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Wildtyp Mäusen und den heterozygoten Tieren, während in den $G_{\alpha_{02}}$ -Deletionsmutanten eine Hemmung der Serotoninaufnahme vorhanden war (s. Abb. 10).

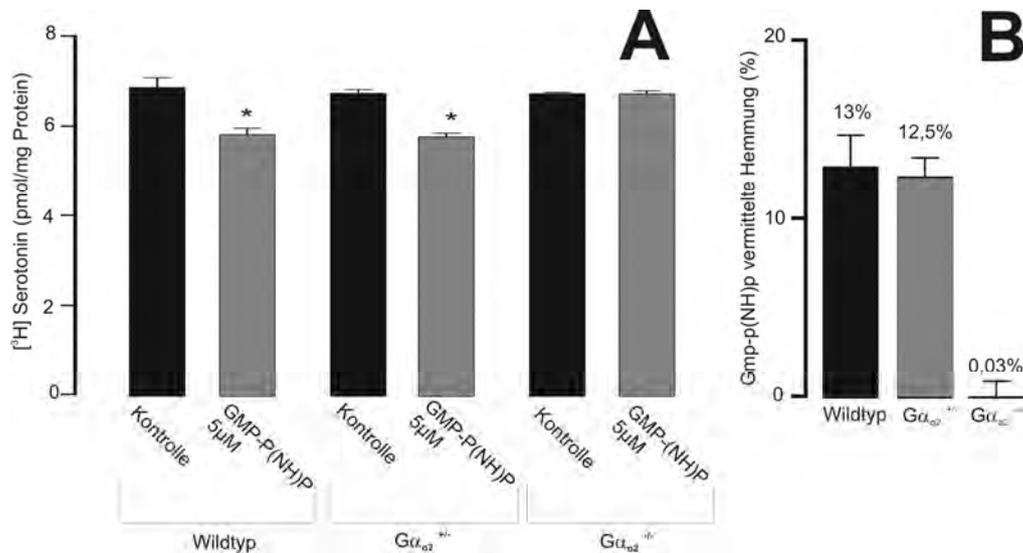


Abbildung 10

Vergleich der Regulation der vesikulären Serotoninaufnahme durch GMP-P(NH)P in Synaptosomen von Wildtyp, $G_{\alpha_{02}}^{+/-}$, $G_{\alpha_{02}}^{-/-}$ Mäusen

SLO-permeabilisierte Synaptosomen wurden in An- und Abwesenheit von GMP-P(NH)P mit 40 nM [³H] Serotonin inkubiert.

A Dargestellt ist die signifikante Hemmung durch GMP-P(NH)P in Wildtyp und $G_{\alpha_{02}}^{+/-}$ - Mäusen, welche nicht in den $G_{\alpha_{02}}^{-/-}$ - Mäusen gezeigt werden konnte.

B Abgebildet ist hier die prozentuale Hemmung der Serotoninaufnahme durch GMP-P(NH)P in den verschiedenen Genotypen. Sie liegt bei den Wildtyp- und $G_{\alpha_{02}}^{+/-}$ - Mäusen bei 13% bzw. 12,5%. Bei den $G_{\alpha_{02}}^{-/-}$ - Mäusen ist keine Hemmung nachweisbar.

Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert aus drei individuellen Proben je Wert (n=3) und der Standardabweichung (SD). Der Student's t-Test ergab eine Signifikanz * p<0,02.

Nach dem die Wirkung einer G-Proteinaktivierung auf die VMAT2-Aktivität in den verschiedenen Genotypen untersucht worden war, sollte gezeigt werden, ob sich die kinetischen Daten des VMAT2 zwischen den Wildtyp und $G_{\alpha_{02}}^{-/-}$ -Mäusen unterscheiden. Vesikelpräparationen von Wildtyp und $G_{\alpha_{02}}^{-/-}$ -Mäusen wurden mit [³H]-markiertem Serotonin und jeweils ansteigenden Konzentrationen an nicht radioaktiv-markiertem Serotonin (0; 0,04; 0,64; 10; 80 µM) inkubiert (s. Abb. 11).

Die maximale Geschwindigkeit des Transporters ist in den $G_{\alpha_{02}}^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen leicht aber nicht signifikant vermindert.

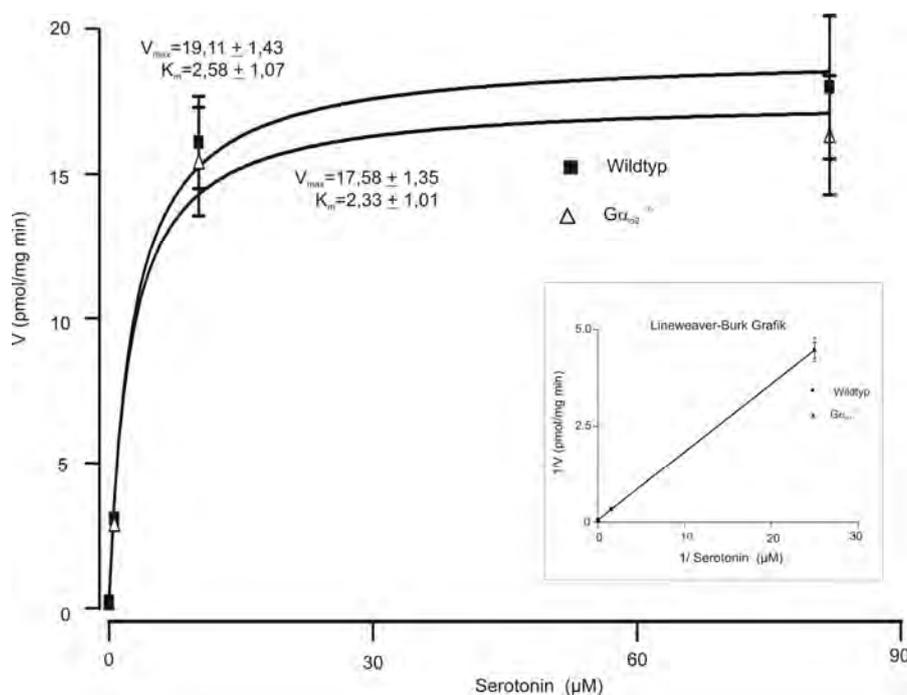


Abbildung 11

Kinetik der Serotoninaufnahme von synaptischen Vesikeln aus Wildtyp- und $G\alpha_{O2}^{-/-}$ - Mäusen

Eine synaptische Vesikelpräparation wurde mit einem Gemisch aus [^3H]-markiertem und nicht radioaktiv markiertem Serotonin in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Dargestellt ist die Reaktionsgeschwindigkeit (V) in Abhängigkeit von der Konzentration an Serotonin. Die Werte für die unspezifische Serotoninaufnahme in Anwesenheit von Reserpin wurden subtrahiert. Es zeigt sich eine geringe aber nicht signifikante Verminderung von V_{\max} in den $G\alpha_{O2}^{-/-}$ - Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen.

Gezeigt ist hier eine gemittelte Darstellung aus vier Experimenten mit je drei individuellen Proben je Wert ($n=12$) und der Standardabweichung (SD).

Dieser Effekt konnte in allen Versuchen zwischen Wildtyp, $G\alpha_{O2}^{+/-}$ -Mäusen und $G\alpha_{O2}$ -Deletionsmutanten beobachtet werden. Es konnte im Durchschnitt, aller in dieser Abreife durchgeführten Versuche, gezeigt werden, dass die Serotoninaufnahme bei den $G\alpha_{O2}$ -Deletionsmutanten im Schnitt 7-8% und bei den heterozygoten Tiere ca. 4% unter der von Wildtyp-Mäusen liegt (s. Abb. 12).

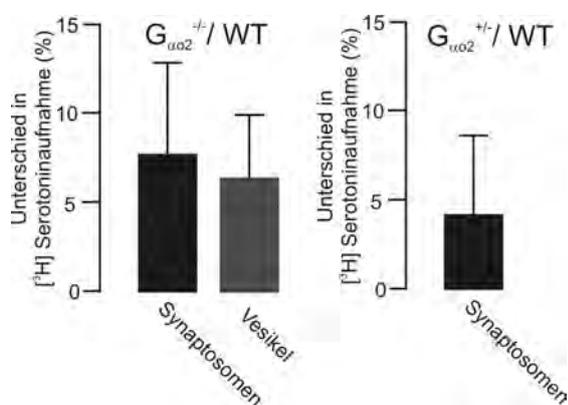


Abbildung 12

Unterschied in der Serotoninaufnahme zwischen Wildtyp-, $G\alpha_{O2}^{+/-}$ - und $G\alpha_{O2}^{-/-}$ - Mäusen

Es konnte gezeigt werden, dass die Serotoninaufnahme bei den $G\alpha_{O2}$ -Deletionsmutanten im Schnitt 7-8% und bei den heterozygoten Tiere ca. 4% unter der von Wildtyp-Mäusen liegt.

Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert aus fünf verschiedenen Experimenten mit je drei individuellen Proben je Wert ($n=15$) für die Synaptosomen der $G\alpha_{O2}^{-/-}$ - Mäuse, zehn verschiedenen Experimenten mit je drei individuellen Proben je Wert ($n=30$) für die Vesikel $G\alpha_{O2}^{-/-}$ -Mäuse und drei verschiedene Experimenten mit je drei individuellen Proben je Wert ($n=9$) für die Synaptosomen der $G\alpha_{O2}^{+/-}$ - Mäuse.

3.1.2 Zeitabhängigkeit der Monoaminaufnahme in Wildtyp- und $G_{\alpha 02}$ Deletionsmutanten

Ein weiterer Grund für die oben dargestellte Verminderung der Monoaminaufnahme in den $G_{\alpha 02}^{-/-}$ -Mäusen könnte eine erhöhte Durchlässigkeit der Vesikelmembran für Monoamine sein. Um dies zu überprüfen, wurde die Serotoninaufnahme in Vesikeln zu verschiedenen Zeitpunkten gestoppt und die [3 H]-Serotoninaufnahme gemessen. Es zeigte sich bei allen Zeitpunkten wiederum eine leichte, aber nicht signifikante Verminderung der Serotoninaufnahme in den $G_{\alpha 02}^{-/-}$ -Mäusen (s. Abb. 13). Es wurden durch diese Versuche keine Hinweise auf eine erhöhte Durchlässigkeit der Membran gefunden. Möglich ist jedoch, dass aufgrund der hohen cytosolischen Toxizität von Serotonin einem erhöhten Efflux aus dem Vesikel direkt gegengesteuert wird.

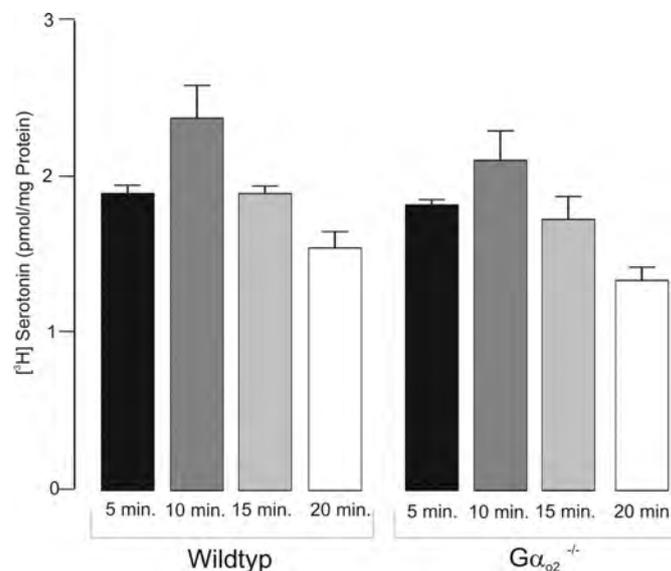


Abbildung 13

Zeitabhängigkeit der Serotoninaufnahme bei Wildtyp- und $G_{\alpha 02}^{-/-}$ - Mäusen.

Die Aufnahme von Serotonin in einer Präparationen von synaptischen Vesikeln wurde zu verschiedenen Zeitpunkten gestoppt und die Aufnahme von [3 H]-markiertem Neurotransmitter an jedem individuellen Zeitpunkt gemessen. Es zeigte sich eine leichte Verminderung der Serotoninaufnahme an allen Zeitpunkten in den $G_{\alpha 02}^{-/-}$ - Mäusen im Vergleich zu den Wildtyptieren.

Gezeigt ist hier eine gemittelte Darstellung aus zwei Experimenten mit je drei individuellen Proben je Wert (n=6) und der Standardabweichung (SD).

3.1.3 Einfluss von ΔpH und $\Delta \Psi$ auf die VMAT-Aktivität in An- und Abwesenheit von $G_{\alpha 02}$

Die Aktivität aller vesikulären Transporter hängt von dem elektrochemischen Gradienten ($\Delta \mu H^+$) über der Vesikelmembran ab. Es setzt sich zusammen aus dem Protonengradienten (ΔpH) sowie der elektrischen Ladungsdifferenz über der Membran ($\Delta \Psi$). Der Protonengradient wird durch die vakuoläre H^+ -ATPase erzeugt. Durch ihre Aktivität wird ein intravesikulärer pH-Wert von 5,6 erreicht. Durch diesen Ladungsunterschied zwischen der äußeren und inneren Seite der Membran ist die vesikuläre Seite positiv geladen.

Die Aktivität von VMAT 1 und 2 hängt hauptsächlich von dem Protonengradienten ΔpH (Johnson, Jr., 1988) ab. VMAT 1 und 2 tauschen zwei Protonen gegen ein Neurotransmittermolekül aus.

Um den Einfluss des elektrochemischen Gradienten auf die Serotoninaufnahme detaillierter zu untersuchen und mögliche Unterschiede zwischen Wildtyp- und $G\alpha_{o2}^{-/-}$ - Mäusen aufzudecken, wurden Experimente unter verschiedenen ΔpH und $\Delta\Psi$ Bedingungen durchgeführt.

3.1.3.1 pH-Wert Abhängigkeit

In einem ersten Ansatz wurde der Einfluss verschiedener pH-Werte im Aufnahmebuffer auf die Serotoninaufnahme untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass bei pH 7 die Serotoninaufnahme optimal ist (s. Abb. 14). Im Gegensatz dazu kommt es bei pH 6,5 und pH 8,5 zu einer starken Verminderung der Neurotransmitteraufnahme. Dies lässt sich durch einen verminderten Protonengradienten erklären bei dem der VMAT2 nicht im Optimum arbeitet. Weiterhin ist erkennbar, dass sich die Abhängigkeit des VMAT2 vom elektrochemischen Gradienten in Wildtyp- und $G\alpha_{o2}^{-/-}$ -Mäusen nicht unterscheidet.

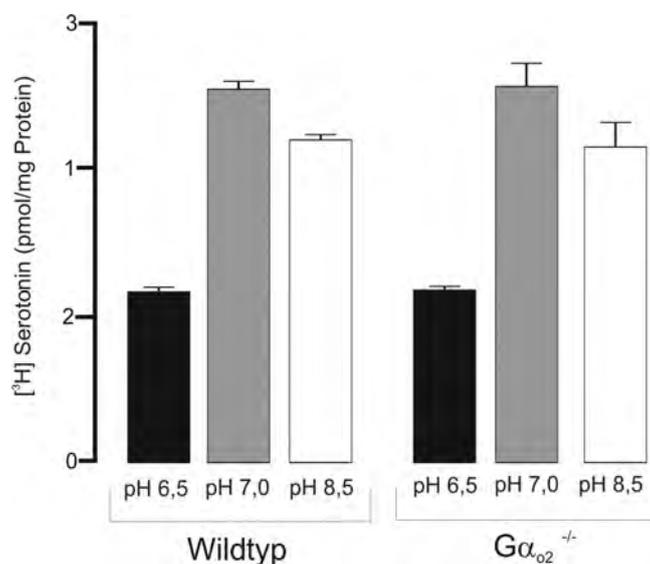


Abbildung 14

pH-Wert Abhängigkeit des VMAT2 in Wildtyp und $G\alpha_{o2}^{-/-}$ - Mäusen.

Synaptische Vesikel von Wildtyp- und $G\alpha_{o2}^{-/-}$ - Mäusen wurden bei pH 6,5; 7,0 und 8,5 mit 40 nM [^3H]-markiertem Serotonin inkubiert und die Transmitteraufnahme in Abhängigkeit zum pH-Wert gemessen. Es zeigte sich, dass der Transporter bei einem pH von 7,0 optimal arbeitet. Dieses Experiment wurde in Abwesenheit von Chlorid durchgeführt.

Gezeigt ist hier eine gemittelte Darstellung aus zwei Experimenten mit je drei individuellen Proben je Wert (n=6) und der Standardabweichung (SD).

3.1.3.2 Hemmung der vakuolären H⁺-ATPase (V-ATPase)

In einem zweiten Schritt wurde durch die Hemmung der vesikulären H⁺-ATPase die Bildung des Protonengradienten verhindert. Bafilomycin, ein sehr potenter Inhibitor der V-ATPase, führte zu einer Verminderung der Serotoninaufnahme in SLO-permeabilisierten Synaptosomen (s. Abb. 15). Nigericin, eine Ionophore welche vor allem Kaliumionen gegen Protonen austauscht, diente in diesem Versuch als Kontrolle. Es verweist allerdings auch auf den starken Einfluss von ΔpH , da im Zuge des Austausches von Kaliumionen gegen Protonen der Protonengradient zusammenbricht. Zwischen den Wildtyp und $G\alpha_{o2}^{-/-}$ -Mäusen waren keine Unterschiede zu sehen.

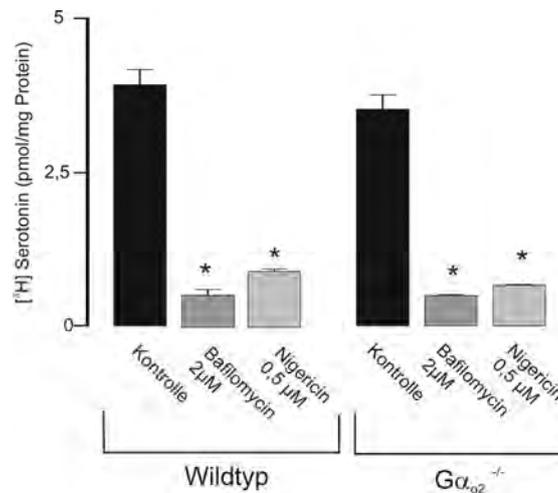


Abbildung 15

Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme durch Inhibitoren der vakuolären H⁺-ATPase,

Serotoninaufnahme in Wildtyp- und $G\alpha_{o2}^{-/-}$ - Mäusen in Gegenwart von Bafilomycin. Es zeigt sich eine deutliche und signifikante Hemmung der Serotoninaufnahme. Es gab keinen Unterschied zwischen Wildtyp- und $G\alpha_{o2}^{-/-}$ - Mäusen nach einer Blockade der V-ATPase.

Gezeigt ist hier eine gemittelte Darstellung aus drei individuellen Proben je Wert (n=3) und der Standardabweichung (SD). Der Student's t-Test ergab eine Signifikanz * $p < 0,02$.

3.1.3.3 Einfluss der Chlorid-Konzentration

Um die Ergebnisse von Johnson (Johnson, Jr., 1988) im Hinblick auf die Aktivität des Transporters bei Änderung der elektrischen Ladungsdifferenz ($\Delta\Psi$) zu bestätigen, wurden synaptische Vesikelpräparationen von Wildtyp- und $G\alpha_{o2}^{-/-}$ - Mäusen bei verschiedenen Chlorid-Konzentrationen mit und ohne GMP-P(NH)P und bei pH 6,5 und pH 7,0 inkubiert (s. Abb. 16). Es zeigte sich bei beiden pH-Werten ein leichter Anstieg der Serotoninaufnahme zwischen 0 mM und 50 mM Chlorid. Bei pH 6,5 kam es bei höheren Chloridkonzentrationen zu einem signifikanten Abfall der Neurotransmitteraufnahme. Dies lässt sich durch einen höheren Einfluss der Ladungsdifferenz ($\Delta\Psi$) bei pH 6,5 erklären, da die V-ATPase durch die erhöhte Konzentration extrazellulärer Protonen keinen hohen Protonengradienten (ΔpH) aufbauen kann. Bei pH 7,0 hat eine Erhöhung der Chloridkonzentration keinen Einfluss, da der Transporter, getragen durch einen hohen

Protonengradienten, im Optimum arbeitet und so eine Veränderung in der Ladungsdifferenz nicht ins Gewicht fällt. Es zeigte sich, dass die durch GMP-P(NH)P vermittelte Hemmung von den Veränderungen des elektrochemischen Gradienten unabhängig ist und 9-15% unter der Serotoninaufnahme der Kontrollwerte liegt.

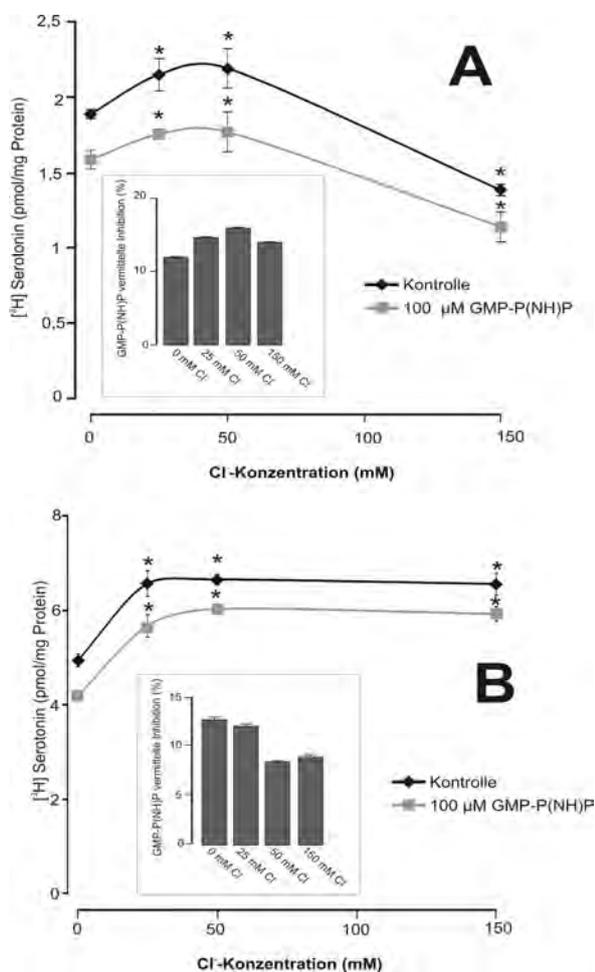


Abbildung 16

Vergleich der Chlorid-Abhängigkeit der VMAT-Transporter unter verschiedenen pH-Werten

Eine synaptische Vesikelpräparation wurde bei verschiedenen pH-Werten sowie bei verschiedenen Cl-Konzentrationen mit 40 nM [³H]-markiertem Serotonin (Kontrolle) und GMP-P(NH)P inkubiert.

A Dargestellt ist hier die Abhängigkeit der Serotoninaufnahme durch VMAT2 von verschiedenen Cl-Konzentrationen bei pH 6,5. Es ist deutlich ein Maximum bei 50 mM Chlorid und ein signifikanter Abfall der Transmitteraufnahme zu höheren Chlorid-Konzentrationen zu sehen.

B Auch bei pH 7,0 konnte ein Maximum der Neurotransmitteraufnahme bei 50 mM Chlorid nachgewiesen werden.

Eine GMP-P(NH)P induzierte Hemmung war unter allen Bedingungen nachweisbar (Inset).

Gezeigt ist hier eine gemittelte Darstellung aus je drei individuellen Proben je Wert (n=3) und der Standardabweichung (SD).

Der Student's t-Test ergab eine Signifikanz * p<0,04.

3.1.4 Metabolisierende und synthetisierende Enzyme des Monoaminstoffwechsels in Wildtyp- und $G\alpha_{O2}^{-/-}$ - Mäusen

An dieser Stelle sollte die Monoaminbildung und der -abbau betrachtet werden, da durch die vorangegangenen Experimente deutlich wurde, dass die Aufnahme von Serotonin in die Vesikel in $G\alpha_{O2}^{-/-}$ - Mäusen leicht erniedrigt war. Dies könnte zu einer erhöhten zytosolischen Konzentration an Monoaminen führen, welches für die Nervenzelle toxisch wäre. Mosharov et al. (Mosharov et al., 2003) konnten zeigen, dass die Konzentration an zytosolischen Monoaminen stark reguliert und stabil gehalten wird.

Es wurden zwei Schlüsselenzyme für die Bildung und den Abbau von Monoaminen ausgewählt. Die Tyrosinhydroxylase und die Monoaminoxidase.

Die Tyrosinhydroxylase setzt Tyrosin zu Dihydroxyphenylalanin, unter Umwandlung von Tetrahydrobiopterin und Sauerstoff zu Dihydrobiopterin, um, welches dann durch die aromatische-Aminosäuren-Decarboxylase zu Dopamin umgewandelt wird.

Die Monoaminoxidasen sind eine Familie mitochondrialer Enzyme, welche Monoamine durch Desaminierung mit Hilfe von Wasser und Sauerstoff zu den entsprechenden Aldehyden, Ammoniak und Wasserstoffperoxid abbauen.

Die MAO-A (Monoaminoxidase A) baut vorwiegend Monoamine (v.a. Desaminierung von Serotonin, Noradrenalin und Nahrungsaminen) in der Körperperipherie ab. Die MAO-B baut vorwiegend Monoamine (v.a. Dopamin) im ZNS ab.

3.1.4.1 Tyrosinhydroxylase

Die Tyrosinhydroxylase wurde in verschiedenen Fraktionen einer synaptischen Vesikelpräparation durch Immunoblotanalyse mit einem polyklonalen Tyrosinhydroxylase-Antikörper dargestellt und ins Verhältnis zur Menge an Synaptophysin gestellt. Es zeigte sich, dass die Tyrosinhydroxylase in der P2 Fraktion $G_{\alpha_{02}}^{-/-}$ -Mäusen signifikant erniedrigt ist. (s. Abb.17)

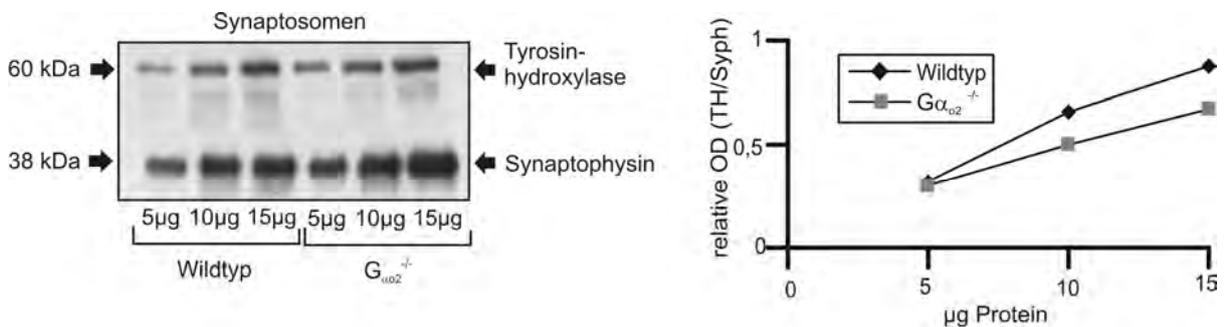


Abbildung 17

Immunoblotanalyse der P2 Fraktion von Wildtyp-, $G_{\alpha_{02}}^{-/-}$ -Mäusen

Synaptosomen wurden via SDS-Page (10%) und Immunreplikaanalyse dargestellt. Anschließend wurde mit spezifischen Antikörpern gegen Synaptophysin (38 kDa) und Tyrosinhydroxylase (~60 kDa) detektiert. Die Graphik zeigt das Verhältnis der Tyrosinhydroxylase zu Synaptophysin in den jeweiligen Laufspuren.

Die Abbildung ist repräsentativ für zwei verschiedene Immunoblotanalysen (n=2). Die Graphik zeigt die gemittelte Darstellung aus beiden Experimenten. In Kooperation mit Dr. Irene Brunk.

Parallele Immunoblotanalysen mit Antikörpern gegen die Tryptophanhydroxylase, welche Tryptophan zu 5-Hydroxytryptophan umwandelt und so an der Synthese von Serotonin beteiligt ist, zeigten bisher keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und $G_{\alpha_{02}}^{-/-}$ - Mäusen (Dr. Irene Brunk, persönliche Mitteilung).

3.1.4.2 Monoaminoxidase

Die Aktivität der Monoaminoxidasen wurde fluorometrisch bestimmt. Es zeigte sich sowohl bei Messung der Aktivität beider Isoformen als auch bei den spezifischen Fluoreszenzmessungen von MAO-A und MAO-B in den $G_{\alpha_{o2}}^{-/-}$ -Mäusen eine leichte, aber nicht signifikante, höhere Aktivität.

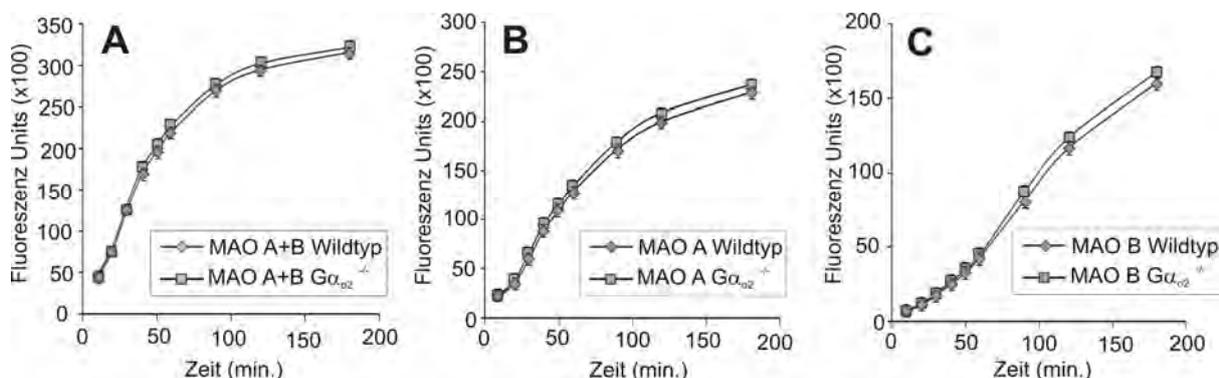


Abbildung 18

Vergleich der Aktivität der Monoaminoxidase A und B in Wildtyp- und $G_{\alpha_{o2}}^{-/-}$ - Mäusen

Es kam das Amplex Red Monoaminoxidase Assay Kit der Firma "Molecular Probes Invitrogen" zur Anwendung. Mit diesem System ist es möglich, eine fluorometrische Messung der Aktivität der Monoaminoxidasen durchzuführen. Als Substrat wurde p-Tyramin (A,B,C), ein Substrat für MAO-A und -B eingesetzt. Als spezifische Inhibitoren diente für MAO-A Clorgylin (B) und für MAO-B Pargylin (C). Aufgetragen wurden Fluoreszenz Units (FU) als Maß der Aktivität der Monoaminoxidasen gegen die Zeit in Minuten.

In allen drei Graphiken ist eine leichte aber nicht signifikante höhere Aktivität der Monoaminoxidase-Isoformen in den $G_{\alpha_{o2}}^{-/-}$ -Mäusen festzustellen.

Gezeigt ist hier eine gemittelte Darstellung aus drei Versuchen mit je vier individuellen Proben je Wert (n=12) und der Standardabweichung (SD).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in den $G_{\alpha_{o2}}$ -Deletionsmutanten die Tyrosinhydroxylase schwächer exprimiert wird, wohin gegen die Monoaminoxidasen eine höhere Aktivität aufweisen.

3.1.5 Nachgeschaltete Signaltransduktionswege

Immunpräzipitationen sowie Versuche mit chemischer Quervernetzung konnten keine direkte Interaktion von G-Proteinen mit dem VMAT2 nachweisen. Dies macht eine Beteiligung weiterer Signalketten wahrscheinlich. Daher wurden die sekundären Botenstoffe cGMP und cAMP sowie ihre Analoga diButyryl-cAMP und diButyryl-cGMP im Hinblick auf ihre Wirkung auf die Neurotransmitteraufnahme näher untersucht. DiButyryl-cAMP und diButyryl-cGMP wurden verwendet, da diese im Gegensatz zu cAMP und cGMP membrangängig sind. In den Synaptosomen werden die Butyryl-Gruppen durch Esterasen abgespalten. Nakanishi et al. (Nakanishi et al., 1995a; Nakanishi et al., 1995b) konnte an permeabilisierten PC12-Zellen zeigen, dass ansteigende cAMP Konzentrationen die vesikuläre Monoaminaufnahme vermindern. Weitere wichtige sekundäre Botenstoffe sind cGMP, Diacylglycerol und IP3.

3.1.5.1 cAMP und cGMP und ihre Rolle in der Regulation des VMAT2-Transporters

Es wurden Versuche mit Synaptosomen und der aufgereinigten Vesikelfraktion (LP2) von Wildtyp- und $G\alpha_{O2}^{-/-}$ Mäusen durchgeführt. In einem ersten Schritt wurden die durch Streptolysin O permeabilisierten Synaptosomen und das LP2 direkt mit cAMP bzw. cGMP inkubiert. Es zeigte sich sowohl in den Synaptosomen als auch im LP2 eine signifikante Hemmung der Serotoninaufnahme durch den sekundären Botenstoff cGMP. Die Hemmung durch cAMP war in beiden Fraktionen schwächer.

Im zweiten Schritt wurde eine Vorinkubation der Synaptosomen mit den Analoga dBcAMP und dBcGMP für 20 min, bei 25 °C durchgeführt. Anschließend wurde im Fall der Synaptosomen mit SLO permeabilisiert bzw. die so vorbehandelten Synaptosomen zu synaptischen Vesikeln (LP2) weiterverarbeitet. Die erwartete Hemmung der Serotoninaufnahme konnte nur in der an synaptischen Vesikeln reichen Fraktion (LP2) gezeigt werden (s. Abb. 19).

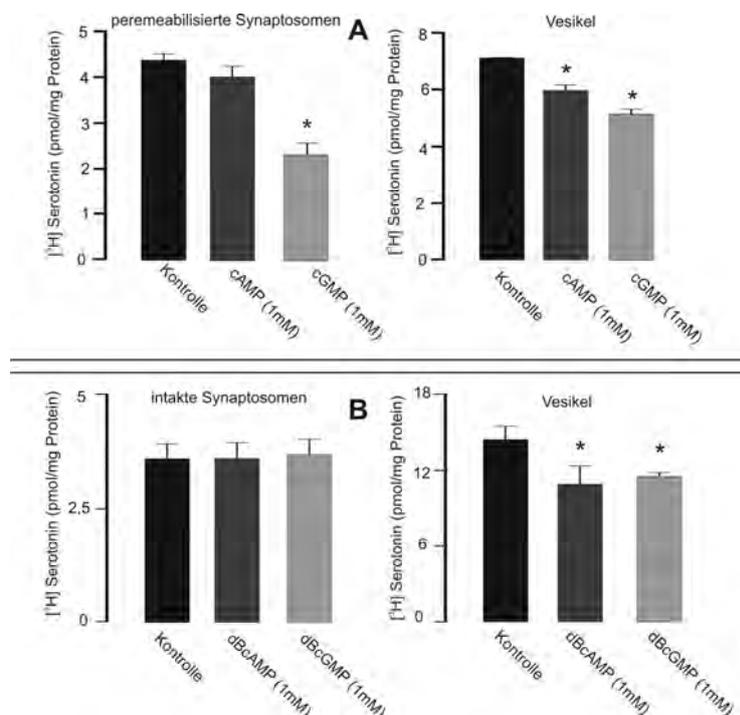


Abbildung 19

Einfluss von cAMP und cGMP auf die Regulation des VMAT2

Eine Präparation von Synaptosomen bzw. Vesikeln aus dem Gesamthirn einer Maus wurden mit 40 nM [³H] Serotonin, sowie den zyklischen Nucleotidmonophosphaten cAMP und cGMP bzw. ihren Analoga inkubiert.

A Es konnte in SLO-permeabilisierte Synaptosomen sowie in der an synaptischen Vesikeln reichen Fraktion eine leichte Inhibition der Transmitteraufnahme nach Inkubation mit cAMP und eine deutliche Verringerung der Aufnahme nach Inkubation mit cGMP gezeigt werden.

B Eine Vorinkubation der Synaptosomen mit dBcAMP bzw. dBcGMP zeigte hingegen keine Effekte in den anschließend durch Streptolysin O permeabilisierten Synaptosomen. Eine folgende Weiterverarbeitung der mit dBcAMP bzw. dBcGMP behandelten Synaptosomen zur an Vesikeln reichen Fraktion und der sich daran anschließenden Transmitter-Aufnahme ergab eine Hemmung der Aufnahme bei beiden mit Butyryl-Gruppen gekoppelten zyklischen Nucleotidmonophosphaten.

Die Graphiken zeigen eine gemittelte Darstellung aus je zwei Versuchen mit je drei individuellen Proben je Wert (n=6) und der Standardabweichung (SD). Der Student's t-Test ergab eine Signifikanz * p<0,03

Die nicht nachweisbare Hemmung in den mit dBcAMP bzw. dBcGMP vorbehandelten intakten Synaptosomen lässt sich zum einen durch eine ungenügende Aufnahme der zyklischen Nukleotidmonophosphat-Analoga während der Vorinkubation und zum anderen durch eine ungenügende Abspaltung der Butyryl-Gruppen durch Esterasen in den Synaptosomen selbst erklären. Diese Faktoren führten dann zu einer zu geringen Konzentration an cAMP bzw. cGMP, welche für die Verminderung der Serotoninaufnahme nötig ist.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass auf vesikulärer Ebene sowohl cGMP- als auch cAMP- abhängige Signaltransduktionswege einen Einfluss auf die Transmitterspeicherung haben.

Im weiteren Verlauf sollte geklärt werden, in wie weit sich die Geschwindigkeit und Substrataffinität des Transporters durch die Gabe eines sekundären Botenstoffs ändert. Synaptosomen von Wildtyp und $G_{\alpha O_2}^{-/-}$ -Mäusen wurden mit 100 μM dBcAMP für 20 min. bei 25 °C vorbehandelt und dann zur aufgereinigten Vesikelfraktion (LP2) weiterverarbeitet. Die Aufnahme erfolgte mit [^3H]-markiertem Serotonin und jeweils ansteigenden Konzentrationen an nicht radioaktiv-markiertem Serotonin (0; 0,04; 0,64; 10; 80 μM). Sowohl bei den Wildtyp als auch bei den $G_{\alpha O_2}^{-/-}$ -Mäusen zeigte sich eine Verminderung der maximalen Geschwindigkeit und ein leichter Anstieg der Michaelis-Menten-Konstante unter der Behandlung mit dBcAMP (s. Abb. 20).

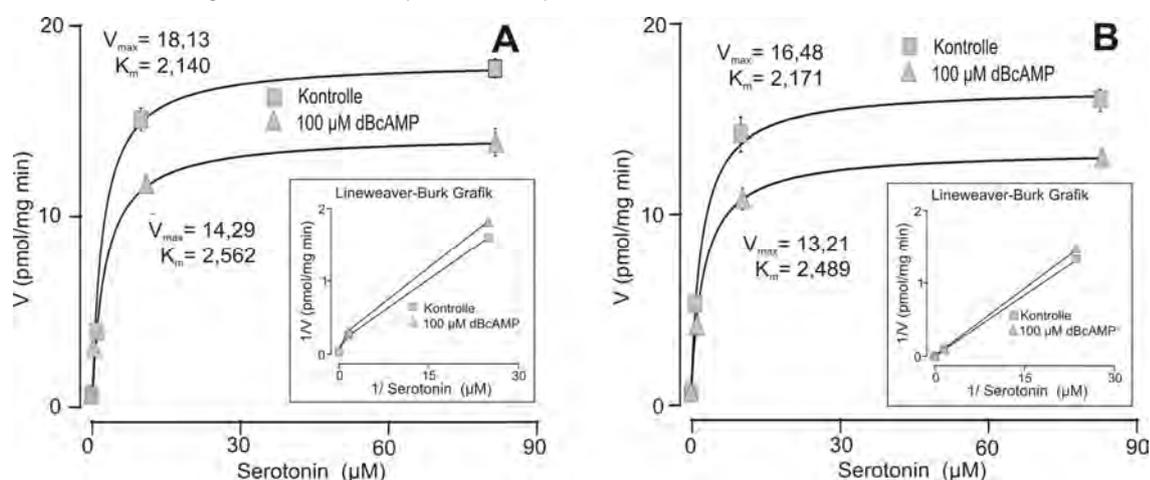


Abbildung 20

Kinetik der Serotoninaufnahme in Gegenwart von dBcAMP in einer synaptischen Vesikelpräparation von Wildtyp- und $G_{\alpha O_2}^{-/-}$ - Mäusen.

Eine synaptische Vesikelpräparation wurde mit einem Gemisch aus [^3H]-markiertem und nicht radioaktiv markiertem Serotonin in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Dargestellt ist die Reaktionsgeschwindigkeit (V) in Abhängigkeit von der Konzentration an Serotonin. Die Werte für die unspezifische Serotoninaufnahme in Anwesenheit von Reserpin wurden subtrahiert.

Sowohl bei den Wildtyp-Mäusen (A) als auch bei den $G_{\alpha O_2}^{-/-}$ - Mäusen (B) zeigt sich eine Verminderung der maximalen Geschwindigkeit (V_{max}). Entsprechend zeigt die Lineweaver-Burk Darstellung (Insert) einen leichten Anstieg des K_m -Wertes.

Die Graphiken zeigen eine gemittelte Darstellung aus je zwei Versuchen mit je drei individuellen Proben je Wert (n=6) und der Standardabweichung (SD). Der Student's t-Test ergab eine Signifikanz * $p < 0,04$

In einem weiteren Versuch konnte gezeigt werden, dass cGMP die Serotoninaufnahme stärker hemmt als cAMP (s.Abb. 21).

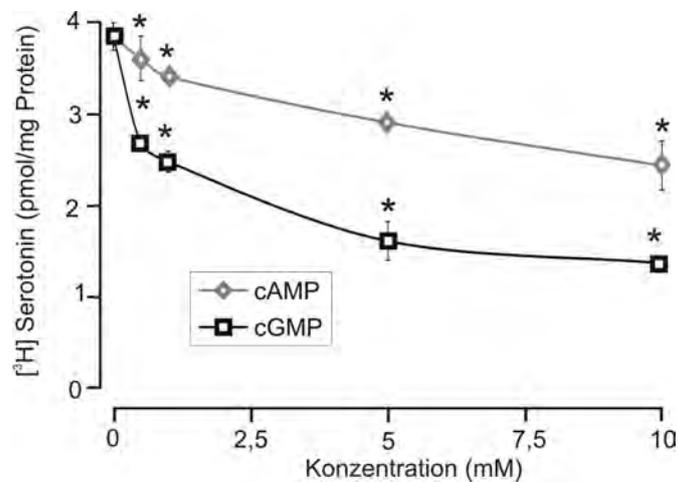


Abbildung 21

Vergleich der Hemmung durch cAMP und cGMP

SLO-permeabilisierte Synaptosomen wurden mit verschiedenen Konzentrationen cAMP bzw. cGMP inkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Neurotransmitteraufnahme stärker durch den sekundären Botenstoff cGMP inhibiert wird als durch cAMP.

Die Graphik zeigt eine gemittelte Darstellung aus je zwei Versuchen mit je drei individuellen Proben je Wert (n=6) und der Standardabweichung (SD). Der Student's t-Test ergab eine Signifikanz * p<0,02

3.1.5.1.1 Synthese von cGMP- die Guanylatzyklase

Nachdem gezeigt wurde, dass eher cGMP an der Regulation des VMAT2-Transporters beteiligt ist, sollte geklärt werden, welchen Einfluss eine Erniedrigung bzw. Erhöhung des physiologisch vorkommenden cGMP-Spiegels auf die VMAT-Regulation hat.

Hierzu wurden Synaptosomen bis zu zwei Stunden mit einem Aktivator bzw. Inhibitor der löslichen Guanylatzyklase (sGC) inkubiert. Danach wurden sie permeabilisiert und die verschiedenen Ansätze mit ansteigenden Konzentrationen an GMP-P(NH)P (0,5, 1, 1,5 µM) inkubiert. Es zeigte sich, dass eine Erhöhung des cGMP-Spiegels durch den sGC-Aktivator BAY 41-2272 zu einer Verstärkung der durch GMP-P(NH)P induzierten Hemmung führte. Eine Erniedrigung des cGMP-Spiegels durch den Inhibitor ODQ führte hingegen zu einer leichten Aufhebung der Hemmung durch GMP-P(NH)P. Sowohl beim Aktivator als auch beim Inhibitor wurde die Gesamtaufnahme an Serotonin jedoch gehemmt.

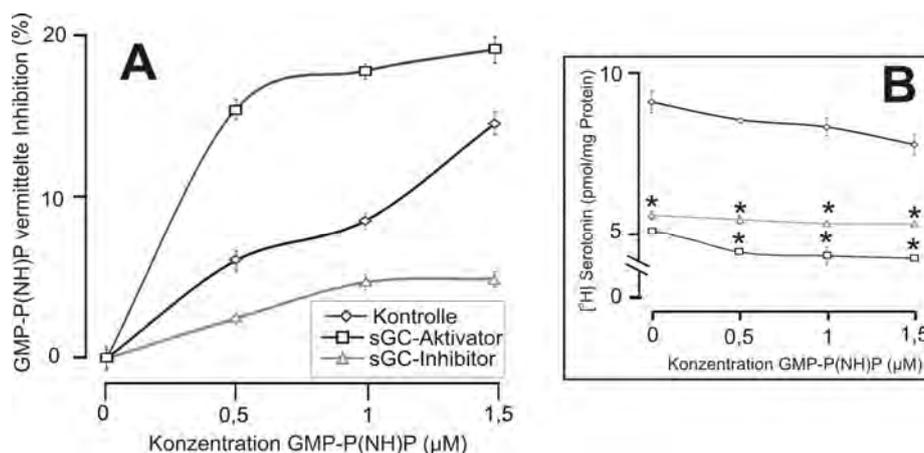


Abbildung 22

Regulation der vesikulären Serotoninaufnahme durch die lösliche Guanylatzyklase (sGC)

Durch Streptolysin O permeabilisierte Synaptosomen wurden mit dem sGC-Aktivator (BAY 41-2272) sowie dem sGC-Inhibitor (ODQ) unter verschiedenen GMP-P(NH)P Konzentrationen inkubiert.

A Der sGC-Aktivator verstärkte die durch GMP-P(NH)P induzierte Hemmung wohin gegen der sGC-Inhibitor zu einer leichten Aufhebung der GMP-P(NH)P induzierten Hemmung führte.

Darstellung findet hier die prozentuale Inhibition der Serotoninaufnahme bezogen auf den jeweiligen Kontrollwert.

B Aufgetragen ist hier die Aufnahme an $[^3\text{H}]$ Serotonin gegen die Konzentration an GMP-P(NH)P.

Die Graphik zeigt eine gemittelte Darstellung aus je zwei Versuchen mit je drei individuellen Proben je Wert ($n=6$) und der Standardabweichung (SD). Der Student's t-Test ergab eine Signifikanz * $p < 0,03$

3.1.5.1.2 Abbau von cGMP- die Phosphodiesterasen

Die Superfamilie der Phosphodiesterasen umfasst elf Familien, welche als PDE1-11 bezeichnet werden. Für die Regulation des cGMP bzw. cAMP-Spiegels im Gehirn kommen folgende Phosphodiesterasen in Frage:

PDE-Familie	Substrat	Besonderheiten
PDE 1	cAMP, cGMP	Ca^{2+} /Calmodulin stimulierbar, geringe Aktivität
PDE 2	cAMP, cGMP	durch cGMP aktivierbar
PDE 4	cAMP	
PDE 7	cAMP	
PDE 9	cAMP, cGMP	Höhere Aktivität für cGMP
PDE 10	cAMP, cGMP	Höhere Aktivität für cGMP

(Palfreyman & Souness, 1996; Soderling et al., 1998; Fisher et al., 1998a; Fisher et al., 1998b; Soderling et al., 1999; Fawcett et al., 2000)

Von besonderem Interesse im Hinblick auf die Regulation des cGMP-Spiegels waren also die PDE 2, 9 und PDE 10. Für die PDE 10 steht kein spezifischer Hemmstoff zur Verfügung. In einem ersten Schritt wurde der Einfluss von IBMX, ein unspezifischer Inhibitor der Phosphodiesterasen, sowie dem spezifischen PDE2-Inhibitor BAY 60-7550 auf die Serotoninaufnahme untersucht. Es kam in beiden Fällen zu einer deutlichen Hemmung der Serotoninaufnahme in die Vesikel und zu einer Verstärkung der durch cGMP ausgelösten Hemmung. Als Negativkontrolle kam Zaprinast, ein spezifischer Inhibitor der PDE 5/6, zur Anwendung. Die PDE 5 kommt hauptsächlich in der glatten Muskulatur und der Niere vor. Die PDE 6 ist eine Phosphodiesterase des Auges (sog. Photorezeptor PDE). Wie zu erwarten hatte Zaprinast keinen Einfluss auf die Regulation der Transmitteraufnahme (s. Abb. 23).

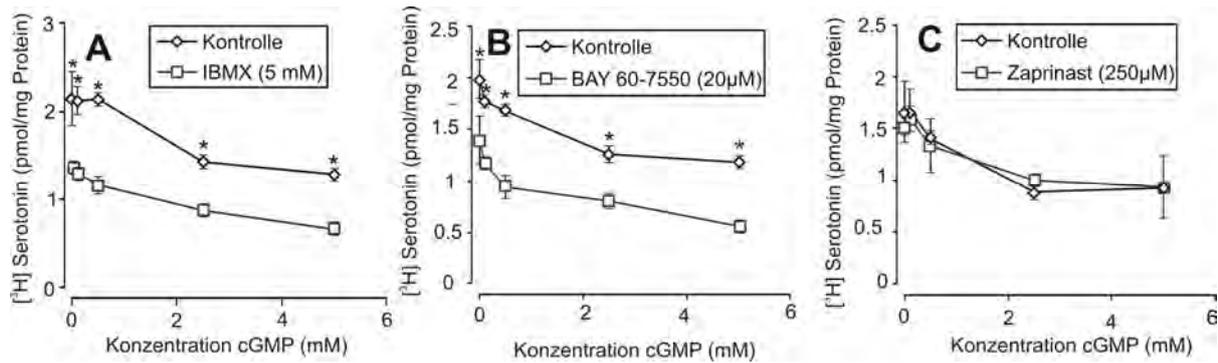


Abbildung 23

Einfluß verschiedener Phosphodiesterase-Inhibitoren

Permeabilisierte Synaptosomen wurden unter verschiedenen Konzentrationen cGMP mit und ohne Phosphodiesterase-Inhibitoren behandelt. Zur Anwendung kamen: IBMX ein unspezifischer PDE- Hemmer, BAY 60-7550 ein spezifischer PDE2-Hemmer und Zaprinast ein Inhibitor der PDE 5 und PDE6.

A Unter Zugabe von 5 mM IBMX ist eine deutliche Hemmung der Serotoninaufnahme zu sehen

B Nach Inkubation mit dem sehr spezifischen PDE2-Inhibitor BAY 60-7550 ist schon bei 20 µM eine signifikante Hemmung zu beobachten

C Nach Zugabe des spezifischen PDE 5 u. 6 –Inhibitors konnte kein Einfluß ermittelt werden.

Die Graphiken zeigen eine gemittelte Darstellung aus je zwei Versuchen mit je drei individuellen Proben je Wert (n=6) und der Standardabweichung (SD). Der Student's t-Test ergab in den Graphiken A, B je Wert eine Signifikanz * p<0,03

In einem weiteren Schritt wurden die PDE2a und die PDE9 mittels einer Immunoblotanalyse in verschiedenen Fraktionen dargestellt. PDE2 kommt gleichmäßig in allen Fraktionen vor. Die Phosphodiesterase 9 ist im LP2 weniger vorhanden als in den anderen Fraktionen (s. Abb. 24). Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den Wildtyp und $G_{\alpha 2}^{-/-}$ -Mäusen.

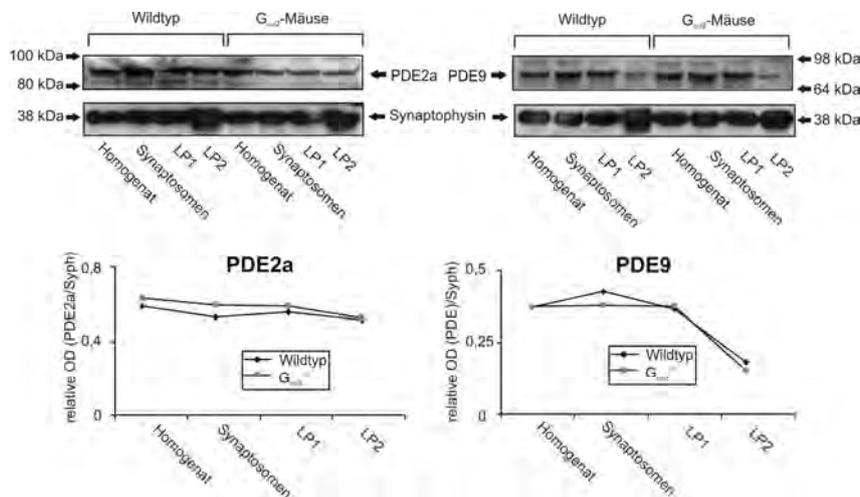


Abbildung 24

Immunoblotanalyse von PDE2a und PDE9 in verschiedenen Fraktionen einer Vesikelpräparationen von Wildtyp- und $G_{\alpha 2}^{-/-}$ Mäusen

Verschiedene Fraktionen einer synaptischen Vesikelpräparation wurden via SDS-Page (10%) und Immunreplikaanalyse dargestellt (10 µg Protein/Spur). Anschließend wurde mit den spezifischen Antikörpern gegen die Phosphodiesterase 2a (~95 kDa) und 9 (~70 kDa) und Synaptophysin (~38 kDa) detektiert.

PDE2a ist konstant in allen Fraktionen vorhanden. PDE9 ist weniger im LP2 vorhanden als in anderen Fraktionen. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Wildtyp- und $G_{\alpha 2}^{-/-}$ - Mäusen.

Die Abbildung ist repräsentativ für zwei verschiedene Immunoblotanalysen (n=2). Die Graphik zeigt die gemittelte Darstellung aus beiden Experimenten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass vor allem die Phosphodiesterase 2 im Gehirn an der Regulation des cGMP Spiegels beteiligt ist. Auch ist eine vorübergehende Assoziation dieser Phosphodiesterase an die Vesikeln wahrscheinlich, da sie, im Gegensatz zur Phosphodiesterase 9, auch in der aufgereinigten vesikelreichen Fraktion zu finden ist. Abschließende Versuche an SLO-permeabilisierte Synaptosomen konnten zeigen, dass sowohl der sGC-Aktivator BAY 41-2272 und der PDE2-Inhibitor BAY 60-7550 durch eine Erhöhung des cGMP-Spiegels zu einer Verminderung der Serotoninaufnahme in die Vesikel führt. Dieser Effekt konnte sowohl in den Wildtyp-Mäusen als auch in den $G_{\alpha_{O_2}}$ -Deletionsmutanten gezeigt werden (s. Abb. 25).

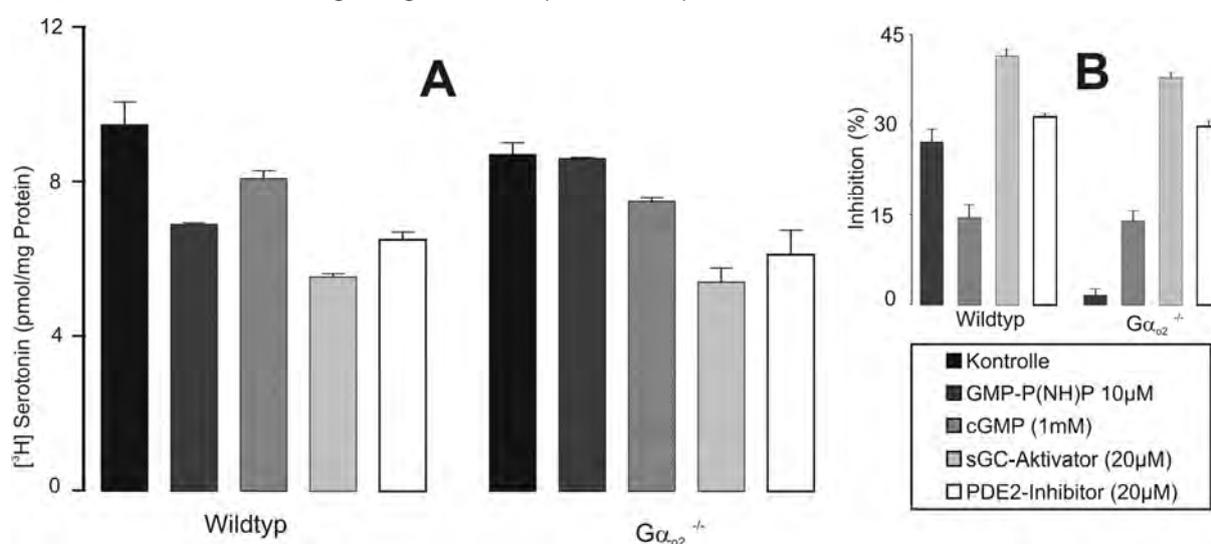


Abbildung 25

Vergleich der Wirkung von cGMP, BAY 41-2272 und BAY 66-7550 auf die vesikuläre Serotoninaufnahme

A Permeabilisierte Synaptosomen von Wildtyp- und $G_{\alpha_{O_2}}^{-/-}$ - Mäusen wurden mit dem sGC-Aktivator (BAY 41-2272) und dem PDE2-Inhibitor (Bay 66-7550) inkubiert und ihre Wirkung auf die vesikuläre Serotoninaufnahme im Hinblick auf Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen untersucht. GMP-P(NH)P wurde in diesem Fall als interne Kontrolle benutzt. Es zeigt sich kein Unterschied zwischen Wildtyp- und $G_{\alpha_{O_2}}^{-/-}$ - Mäusen.

B Gezeigt ist hier die prozentuale Inhibition der verschiedenen Substanzen in Bezug auf den jeweiligen Kontrollwert.

Die Graphiken zeigen eine gemittelte Darstellung aus je zwei Versuchen mit je drei individuellen Proben je Wert (n=6) und der Standardabweichung (SD). Der Student's t-Test ergab eine Signifikanz * p<0,03

3.2 Regulation von VMAT2 durch $G_{\alpha q}$ in humanen Thrombozyten

In Thrombozyten der Maus wird VMAT2 nicht wie in den Vesikeln des Gehirns durch die G-Proteinuntereinheit $G_{\alpha o2}$, sondern durch $G_{\alpha q}$ reguliert. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten unabhängig voneinander zeigen, dass als Speicherstätte für Serotonin in humanen Thrombozyten die „dense bodies“ dienen (Wurzinger, 1990; Morgenstern, 1995; Höltje et al., 2003).

In einer Immunoblotanalyse gereinigter humaner Thrombozyten konnten sowohl die $G_{\alpha q}$ -Untereinheit, sowie der VMAT2 nachgewiesen werden (s. Abb. 26).

Die $G_{\alpha o}$ -Untereinheiten sowie der VMAT1 konnte wie erwartet nicht nachgewiesen werden.

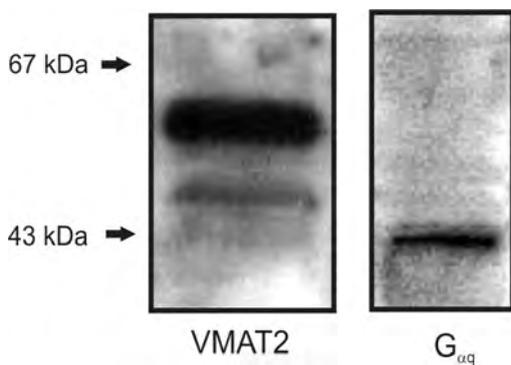


Abbildung 26

Immunoblotanalyse von humanen Thrombozyten

Gewaschene Thrombozyten wurden via SDS-Page (10%) und Immunreplikaanalyse dargestellt (10 µg Protein/Spur). Anschließend wurde mit den spezifischen Antikörpern gegen VMAT2 (~60 kDa) und $G_{\alpha q}$ (~40 kDa) dedektiert.

Die Graphik ist repräsentativ für drei Einzelexperimente.

Die Haltbarkeit der humanen Thrombozyten wurde von der Blutbank mit ca. fünf Tagen bei 22°C angegeben was auch in Bezug auf die vesikuläre Serotoninaufnahme und die Hemmung durch GMP-P(NH)P bestätigt werden konnte (s. Abb. 27).

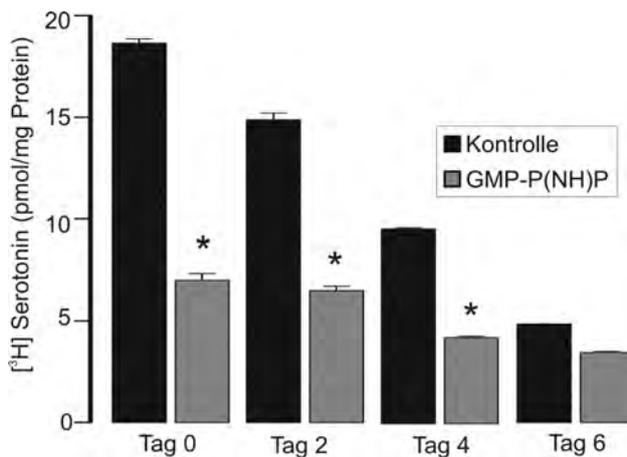


Abbildung 27

Haltbarkeit von humanen Thrombozyten

Es wurden an verschiedenen Tagen Streptolysin-O permeabilisierte Thrombozyten einer Charge mit und ohne 10 µM GMP-P(NH)P inkubiert.

Es konnte gezeigt werden, dass sich Thrombozyten bis zum vierten Tag nach der Präparation für eine Transmitteraufnahme eignen. Die unspezifische Serotoninaufnahme (Reserpin) wurde mit Reserpin ermittelt und von den dargestellten Werten subtrahiert.

Die Graphiken zeigen eine gemittelte Darstellung aus je drei individuellen Proben je Wert (n=3) und der Standardabweichung (SD). Der Student's t-Test ergab eine Signifikanz * p<0,03

Somit wurden für die folgenden Versuche bis zu drei Tage alte Thrombozyten eingesetzt.

3.2.1 G-Protein vermittelte VMAT Regulation

Zunächst sollte untersucht werden, ob auch in humanen Thrombozyten G-Proteinaktivierung zu einer VMAT2-Hemmung führt. Hierzu wurden SLO-permeabilisierte Thrombozyten mit verschiedenen Konzentrationen an GMP-P(NH)P (2, 10, 50, 100 μ M) inkubiert und die Serotoninaufnahme gemessen. Es zeigte sich schon bei 20 μ M GMP-P(NH)P eine fast 100%ige Hemmung der Neurotransmitteraufnahme (s. Abb. 28).

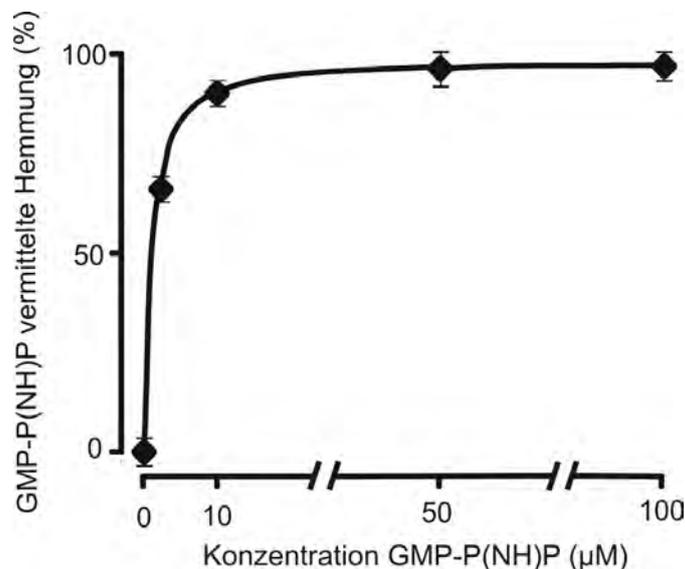


Abbildung 28

Regulation der vesikulären Serotoninaufnahme durch das schwer-hydrolysiertbare GTP-Analogon GMP-P(NH)P in menschlichen Thrombozyten

Durch Streptolysin O permeabilisierte Thrombozyten wurden mit 40 nM [3 H] Serotonin (Kontrolle) sowie GMP-P(NH)P inkubiert. Dargestellt ist die durch GMP-P(NH)P vermittelte Hemmung.

In Thrombozyten führen schon 10 μ M GMP-P(NH)P zu einer maximalen Hemmung der vesikulären Neurotransmitteraufnahme.

Die Graphiken zeigen eine gemittelte Darstellung aus je zwei Versuchen mit je drei individuellen Proben je Wert (n=6) und der Standardabweichung (SD).

3.2.2 Nachgeschaltete Signaltransduktionswege

Analog zu den Untersuchungen an synaptischen Vesikeln (s. Kapitel 3.1.5) sollte auch in den Thrombozyten der Effekt der sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP untersucht werden. Überraschender Weise konnte hier ein anderer Regulationsweg gezeigt werden. Die Inkubation permeabilisierter Thrombozyten mit cAMP bzw. cGMP hatte keinen Einfluss auf die Serotoninaufnahme. Jedoch zeigte sich nach gleichzeitiger Inkubation von GMP-P(NH)P mit cAMP bzw. cGMP eine Aufhebung der GMP-P(NH)P vermittelten Hemmung. (s. Abb. 29). Dieser Effekt war bei der Inkubation mit cGMP stärker ausgeprägt, was auch hier auf einen maßgeblich durch cGMP regulierten Prozess schließen lässt.

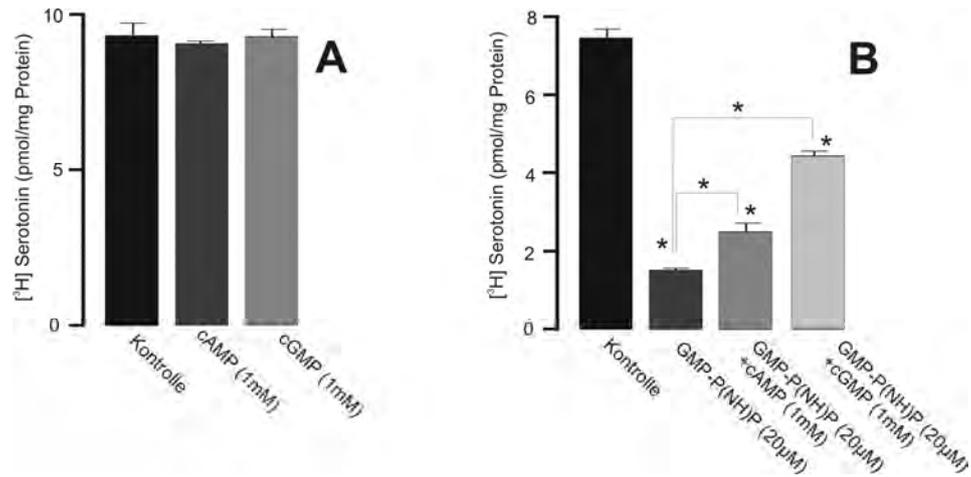


Abbildung 29

Einfluß von cGMP und cAMP auf die vesikuläre Serotoninaufnahme in Thrombozyten

A Eine Inkubation von SLO-permeabilisierten Thrombozyten mit cAMP und cGMP zeigte keine Veränderung in der Aufnahme von Serotonin durch die Vesikel

B In Kombination mit dem schwer-hydrolysierbaren GTP Analogon GMP-P(NH)P zeigte sich jedoch eine Aufhebung der durch GMP-P(NH)P induzierten Hemmung. Dieser Effekt war besonders bei der Kombination mit cGMP deutlich.

Die Graphiken zeigen eine gemittelte Darstellung aus je zwei Versuchen mit je drei individuellen Proben je Wert (n=6) und der Standardabweichung (SD). Der Student's t-Test ergab eine Signifikanz * p<0,02

Dies konnte durch eine Konzentrationsabhängigkeit von cAMP und cGMP bestätigt werden. Hier wurden permeabilisierte Thrombozyten bei einer konstanten GMP-P(NH)P Konzentration von 20 µM mit verschiedenen Konzentrationen an cAMP bzw. cGMP inkubiert und das Ergebnis als Aufhebung der GMP-P(NH)P vermittelten Hemmung dargestellt (s. Abb. 30).

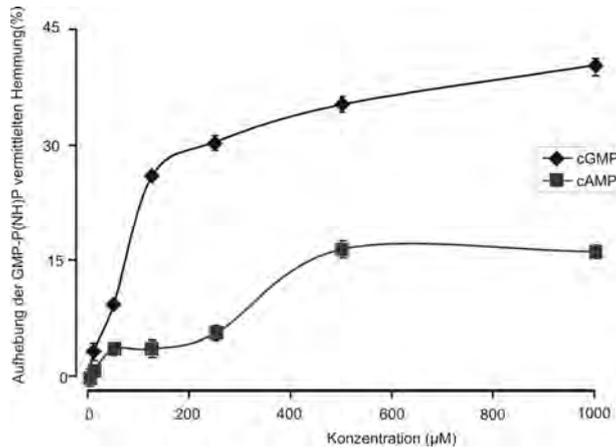


Abbildung 30

Konzentrationsabhängige Aufhebung der GMP-P(NH)P induzierten Hemmung durch cAMP und cGMP

Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Aufhebung der GMP-P(NH)P induzierten Hemmung maßgeblich um einen durch cGMP induzierten Effekt handelt. So liegt die maximale Aufhebung der Hemmung bei 1 mM cGMP bei ~40%. Die eingesetzte GMP-P(NH)P Konzentration liegt bei allen Werten bei 20 µM.

Die Graphiken zeigen eine gemittelte Darstellung aus je zwei Versuchen mit je drei individuellen Proben je Wert (n=6) und der Standardabweichung (SD).

3.3 Die Phospholipase C- die gemeinsame Endstrecke?

Sowohl im ZNS und als auch in den Thrombozyten wird Serotonin durch den VMAT2 in Vesikel transportiert. Des Weiteren wird die Monoaminaufnahme in beiden Systemen durch G-Proteinaktivierung reguliert. Somit sollte es auch neben den herausgestellten Unterschieden in der Regulation der Monoaminaufnahme auch Gemeinsamkeiten geben.

Im ZNS konnten durch Schmidt et al. (Schmidt et al., 2001) einer neuer Signaltransduktionsweg über die Phospholipase C- β sowie cAMP und die Rap GTPase gezeigt werden. Auch spielt die Phospholipase C in der Plättchenaggregation eine große Rolle (Saeed et al., 2004).

In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob die Phospholipase C als gemeinsame Endstrecke in der Regulation der Monoaminaufnahme im ZNS und in den „dense bodies“ in Thrombozyten in Frage kommt.

Zuerst wurden Versuche an permeabilisierten Synaptosomen durchgeführt. Es zeigte sich, dass der PLC-Inhibitor U-73122 in Wildtyp- sowie in $G\alpha_{O2}^{-/-}$ Mäusen zu einer dosisabhängigen Abnahme der Serotoninaufnahme führte. Des Weiteren hatte der PLC-Aktivator m-3m3FBS keinen Effekt auf die Neurotransmitteraufnahme (s. Abb. 31).

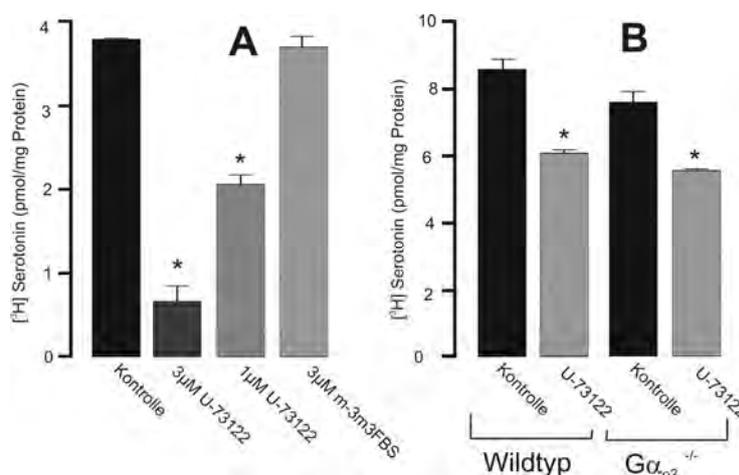


Abbildung 31

Regulation der vesikulären Serotoninaufnahme durch die Phospholipase C

A Permeabilisierte Synaptosomen wurden mit dem PLC-Inhibitor U-73122 und dem PLC-Aktivator m-3m3FBS inkubiert und ihre Wirkung auf die vesikuläre Serotoninaufnahme untersucht.

Es zeigte sich, dass U-73122 zu einer Inhibition der Transmitteraufnahme führte. Wohin gegen der Aktivator keinen Effekt zeigte.

B Eine synaptische Vesikelpräparation aus Wildtyp- und $G\alpha_{O2}^{-/-}$ Mäusen wurde mit U-73122 inkubiert eventuelle Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen zu untersuchen. Es zeigte sich kein Unterschied.

Die Graphiken zeigen eine gemittelte Darstellung aus je zwei Versuchen mit je drei individuellen Proben je Wert (n=6) und der Standardabweichung (SD). Der Student's t-Test ergab eine Signifikanz * $p < 0,02$.

In einem weiteren Schritt wurde eine Dosisabhängigkeit des PLC-Aktivators und -Inhibitors in verschiedenen Konzentrationen (0,3; 1,1; 3,3; 10 μM) durchgeführt (s. Abb. 32).

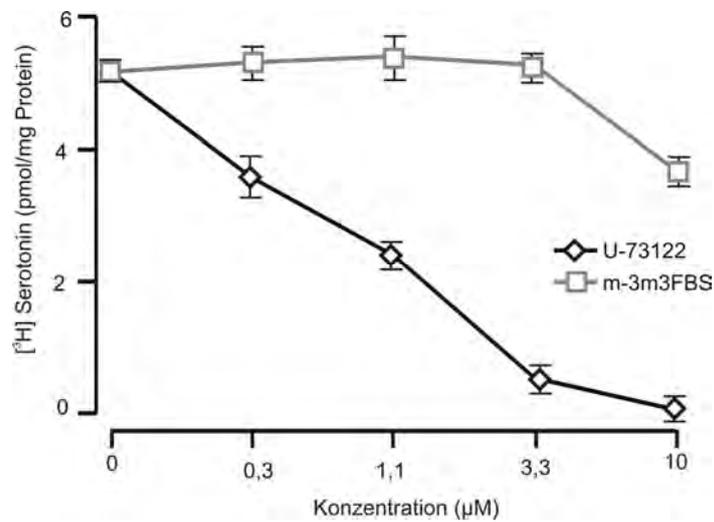


Abbildung 32

Dosisabhängigkeit des PLC –Inhibitors U-73122 und -Aktivators m-3m3FBS in SLO permeabilisierten Synaptosomen

Der PLC Inhibitor U-73122 führte bei 10 μM zu einer fast 100%igen Inhibition der Neurotransmitteraufnahme. Der Aktivator zeigte bis zu einer Konzentration von 3,3 μM keinen Effekt.

Die Graphik zeigt eine gemittelte Darstellung aus je zwei Versuchen mit je drei individuellen Proben je Wert (n=6) und der Standardabweichung (SD).

Durch diesen Versuch konnte bestätigt werden, dass durch den PLC-Inhibitor U-73122 die Serotoninaufnahme dosisabhängig gehemmt werden konnte. Eine vollständige Hemmung war schon mit ca. 3 μM Inhibitor möglich. In hohen Konzentrationen zeigte überraschender Weise auch der PLC-Aktivator, welcher für die Isoformen β_2 , β_3 , γ_1 , γ_2 , δ_1 spezifisch ist (Bae et al., 2003), einen Effekt auf die Serotoninaufnahme.

Warum auch der PLC-Aktivator einen inhibierenden Effekt auf die Serotoninaufnahme hatte konnte nicht geklärt werden. Des Weiteren war es nicht möglich die durch U-73122 ausgelöste Inhibition durch Zugabe des Aktivators wieder aufzuheben. Dies könnte durch folgende Ansätze erklärt werden: Zum einen könnten der Aktivator und der Inhibitor am Enzym verschiedene Angriffstellen haben, welche nur ohne eine zuvor erfolgte Bindung des Gegenspielers zur Verfügung steht. Zum anderen könnte es sich beim Aktivator um einen partiellen Agonisten handeln.

Nachdem der Einfluss des PLC-Inhibitors und des -Aktivators in Synaptosomen gezeigt wurde, wurden auch Versuche an SLO-permeabilisierten Thrombozyten durchgeführt. Es zeigte sich, dass der PLC-Inhibitor U-73122 auch in Thrombozyten zu einer dosisabhängigen Hemmung der Serotoninaufnahme führt (s. Abb. 33).

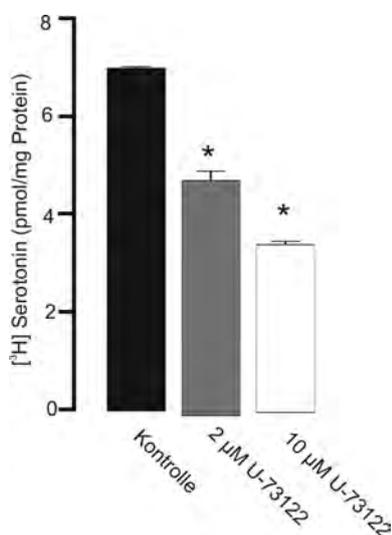


Abbildung 33

Einfluß des PLC-Inhibitors U-73122 in Thrombozyten

Permeabilisierte Thrombozyten wurden mit U-73122 in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Auch hier zeigte sich eine Verminderung der Neurotransmitteraufnahme.

Die Graphik zeigt eine gemittelte Darstellung aus je zwei Versuchen mit je drei individuellen Proben je Wert (n=6) und der Standardabweichung (SD). Der Student's t-Test ergab eine Signifikanz * $p < 0,02$

Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, dass in der Regulation des VMAT2 durch das G-Protein sowohl in den Vesikeln des Gehirns als auch in Thrombozyten die Phospholipase C eine wichtige Rolle spielt.