

4. Diskussion

Veränderungen in der synaptischen Transmitterübertragung hängen sowohl von prä- als auch postsynaptischen Faktoren ab. An der Postsynapse bestimmen die Zahl und die Sensitivität von Rezeptoren und Ionenkanälen die synaptische Übertragung. An der Präsynapse bestimmen sowohl die Verfügbarkeit an Vesikeln und deren Fähigkeit mit der Membran zu verschmelzen als auch die Menge an Neurotransmitter pro Vesikel die Stärke der postsynaptischen Antwort. Gerade die Menge an Neurotransmitter pro Vesikel wurde in der Modulation der synaptischen Plastizität häufig unterschätzt. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Speicherung von Serotonin durch den VMAT2 in Vesikel genauer betrachtet.

Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- (1) Es konnte kein Unterschied in Wildtyp- und $G\alpha_{O_2}^{-/-}$ - Mäusen sowohl in der Aktivität des VMAT2 selbst als auch durch eine Variierung des elektrochemischen Gradienten nachgewiesen werden.
- (2) Die Aktivität und Expression von Monoamin synthetisierenden und metabolisierenden Enzymen, sowie des VMAT2 unterscheiden sich in Wildtyp-Mäusen und $G\alpha_{O_2}$ -Deletionsmutanten.
- (3) Die Aktivität des VMAT2 wird im ZNS und in den Thrombozyten unterschiedlich über die sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP reguliert.

4.1 Regulation des vesikulären Monoamintransporters 2

Heterotrimere G-Proteine sind als vielseitige Schalter in der Signalweiterleitung zwischen einem Plasmamembranrezeptor und dessen intrazellulären Effektoren bekannt. Neben ihrer Lokalisation auf der Plasmamembran wurden sie auch auf intrazellulären Membranen gefunden (Montmayeur & Borrelli, 1994; Helms, 1995; Nurnberg & Ahnert-Hilger, 1996). Untersuchungen mit Modulatoren der G-Proteinaktivität konnten zeigen, dass sie in vielen Schritten der Sekretion und des vesikulären Transports involviert sind (Wettschurek et al., 2005).

Auch der Transmittergehalt sekretorischer Vesikel wird durch G-Proteine reguliert. Dies konnte durch Untersuchungen an neuroendokrinen Zellen (Ahnert-Hilger et al., 1998; Höltje et al., 2000), neuronalen Primärkulturen, Präparationen synaptischer Vesikel aus dem Cortex (Höltje et al., 2000), chromaffinen Granula sowie permeabilisierten Thrombozyten bestätigt werden (Ahnert-Hilger et al., 2003).

Die Monoaminspeicherung in Vesikeln wird über den, in dieser Arbeit untersuchten, vesikulären Monoamintransporter 2 abhängig vom Gewebe von zwei verschiedenen G_{α} -Untereinheiten reguliert. So konnte in neuroendokrinen Zellen und chromaffinen Granula gezeigt werden, dass $G_{\alpha_{O2}}$ die Monoaminspeicherung in VMAT1 und VMAT 2 enthaltenen sekretorischen Vesikeln reguliert (Ahnert-Hilger et al., 1998; Höltje et al., 2000; Pahner et al., 2002). In Thrombozyten hingegen reguliert G_{α_q} die Monoaminaufnahme in die Vesikel (Höltje et al., 2003).

In früheren Arbeiten konnte für den vesikulären Monoamintransporter in chromaffinen Zellen gezeigt werden, dass der vesikuläre Transport vom elektrochemischen Gradienten $\Delta\mu H^+$ über die Membran abhängt (Johnson, Jr., 1988). Eine genauere Charakterisierung im Hinblick auf die Abhängigkeit des VMAT2 von den beiden Komponenten des elektrochemischen Gradienten, dem elektrischen Potential und der elektrischen Ladungsdifferenz wurde vor allem durch Schuldiner et al. (Schuldiner et al., 1995) und Johnson et al. (Johnson, Jr., 1988) vorangetrieben. Aus diesen Arbeiten ist bekannt, dass die vesikulären Monoamintransporter hauptsächlich von dem Protonengradienten ΔpH abhängen. Zwei Faktoren sind in der Modulation des elektrochemischen Gradienten auf Vesikeln beteiligt: Zum einen die vakuoläre H^+ -ATPase und zum anderen Chloridkanäle, welche Protonen bzw. Chloridionen in das Vesikellumen transportieren.

In Abwesenheit von Chlorid ist $\Delta\Psi$ hoch und ΔpH gering. Chloridkonzentrationen im physiologischen Bereich (2-10mM) führen zu einer Erhöhung von ΔpH im Vergleich zu den Werten ohne Chlorid und zu einer leichten Verminderung von $\Delta\Psi$. Hohe Chloridkonzentrationen (>20 mM) führen aufgrund nachgezogener Protonen in das Vesikel zwar zu einem noch höherem ΔpH jedoch auch in Folge einer erhöhten Ladungskompensation zu einer stark verminderten $\Delta\Psi$.

Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnte gezeigt werden, dass sich die Regulation der Monoaminaufnahme über den elektrochemischen Gradienten zwischen den Wildtyp- und $G_{\alpha_{O2}}^{-/-}$ - Mäusen nicht unterscheidet.

Somit scheinen sowohl die vakuoläre H^+ -ATPase als auch der auf den Vesikeln gelegene Chloridkanal nicht in der Regulation der Monoaminaufnahme durch heterotrimere G-Proteine involviert zu sein. Anders verhält es sich bei der vesikulären Glutamataufnahme. So konnten Winter et al. (Winter et al., 2005) zeigen, dass die maximale Aktivität des vesikulären Glutamattransporters, welche bei 5mM Chlorid liegt, durch aktivierte $G_{\alpha_{O2}}$ -Untereinheiten zu niedrigeren Chloridkonzentrationen verschoben wurde und dass es in Vesikeln von $G_{\alpha_{O2}}$ -Deletionsmutanten zu einem totalen Verlust der Chloridabhängigkeit kam. Dieses legt, für die Aufnahme von Glutamat in das Vesikel, die Vermutung nahe, dass $G_{\alpha_{O2}}$ eine Chloridbindungsstelle reguliert.

Anhand durchgeführter Michaelis-Menten-Kinetiken konnte deutlich gemacht werden, dass sich auch die Aktivität des VMAT2 selbst zwischen den Wildtyp-Mäusen und $G_{\alpha O2}$ -Deletionsmutanten nicht unterscheidet. Somit liegt auch keine Modulation des Transporters in den $G_{\alpha O2}$ -Deletionsmutanten vor.

Die in allen Versuchen zwischen Wildtyp- und $G_{\alpha O2}^{-/-}$ - Mäusen beobachtete Verminderung der Serotoninaufnahme muss somit über transient an das Vesikel assoziierte Moleküle, veränderte Effluxmechanismen und / oder synthetisierende und metabolisierende Enzyme beeinflusst werden.

4.2 Regulation der Serotoninkonzentration in Nervenendigungen

Die Aufnahme von zytosolischen Serotonin in die Vesikel ist für die Zelle von großer Bedeutung, da beim Verbleib von Monoaminen im Zytosol 5-S-Cysteinyl-Monoamin-Verbindungen gebildet werden, welche in der Folge zu neuronalen Schäden, oxidativen DNA-Basenmodifikationen und einer erhöhten Expression von Caspase-3, ein Enzym, welches in der Apoptose von Zellen beteiligt ist, führen (Shen et al., 1996; Sulzer & Edwards, 2000; Spencer et al., 2002).

Es wurden im Bezug auf veränderte Effluxmechanismen zwei Vermutungen aufgestellt: Zum einen, dass der Efflux von Serotonin aus den Vesikeln der $G_{\alpha O2}$ -Deletionsmutanten im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen verstärkt sein könnte und zum anderen, dass sich die Regulation der Synthese und des Abbaus von Serotonin in den $G_{\alpha O2}$ -Deletionsmutanten von der in den Wildtyp-Mäusen unterscheidet.

Speidel et al. (Speidel et al., 2005) stellten heraus, dass die Deletion eines Calcium abhängigen Aktivatorproteins für die Sekretion (CAPS) zu einer Veränderung der Membranzusammensetzung führen könnte und so der Efflux von Monoaminen aus dem Vesikel erhöht sein könnte. Erste Ergebnisse aus der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass eine Überexpression von CAPS1 und 2 in transfizierten CHO-Zellen zu einer Erhöhung der Serotoninkonzentration in den Vesikel führt (persönliche Mitteilung Dr. I. Brunk und C. Blex). Ob CAPS auch in der Regulation der Monoaminaufnahme über heterotrimere G-Proteine beteiligt ist konnte noch nicht gezeigt werden.

Floor et al. (Floor et al., 1995) konnten in Bezug auf die Aufnahme und Abgabe des Neurotransmitter Dopamin zwei unabhängige Effluxmechanismen nachweisen: Zum einen den Transporter abhängigen Efflux und zum anderen den Transporter unabhängigen Efflux durch die Vesikelmembran.

Sollte es einen Unterschied in den Effluxmechanismen zwischen Wildtyp- und $G_{\alpha O2}^{-/-}$ - Mäusen geben, so müssten die mit Serotonin beladenen Vesikel der $G_{\alpha O2}$ -Deletionsmutanten ihr aufgenommenes Serotonin über die Zeit schneller wieder an das Zytosol abgeben als die Vesikel der Wildtyp-Mäuse. Dies konnte im Rahmen der in dieser

Arbeit durchgeführten Versuche nicht gezeigt werden. Es ist jedoch möglich, dass einer erhöhten zytosolischen Serotoninkonzentration sofort entgegen gewirkt wird. Dies ist für die Zelle aufgrund der hohen Zytotoxizität von zytosolischem Serotonin von besonderer Bedeutung.

So ergaben Immunoblot-Analysen, dass der vesikuläre Monoamintransporter in den Deletionsmutanten im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen stärker exprimiert wird (Dr. I. Brunk, persönliche Mitteilung). Des Weiteren konnten Mosharov et al. (Mosharov et al., 2003) zeigen, dass die Konzentration an zytosolischen Monoaminen über ihre Synthese bzw. ihren Abbau streng reguliert und so die Menge an Monoaminen in einem engen Niveau gehalten wird. Aus diesem Grund wurden zwei Schlüsselenzyme der Monoaminsynthese und des -abbaus betrachtet - die Tyrosinhydroxylase und die Monoaminoxidasen.

In Bezug auf die Tyrosinhydroxylase konnte in Zusammenarbeit mit Dr. I. Brunk gezeigt werden, dass diese in den Deletionsmutanten schwächer exprimiert wird. Im Unterschied dazu ist die Aktivität der Monoaminoxidasen leicht verstärkt. Aus diesen Daten lässt sich folgendes Modell ableiten: Sollten die Vesikel der $G_{\alpha 02}$ -Deletionsmutanten die aufgenommenen Monoamine schneller wieder an das Zytosol abgeben, so wirken die verminderte Expression der Tyrosinhydroxylase, sowie die erhöhte Aktivität der Monoaminoxidasen und die erhöhte Expression des VMAT2 auf den Vesikeln einer Erhöhung der zytosolischen Monoaminkonzentration entgegen. Andererseits gewährt die vermehrte VMAT2 Expression in den $G_{\alpha 02}$ -Deletionsmutanten eine ausreichende Füllung der Vesikel, bei vermindertem Angebot und erhöhtem Efflux. Dies lässt sich aus dem von Williams beschriebenen steady-state-Modell ableiten (Williams, 1997).

4.3 Unterschiede und Gemeinsamkeiten in der Regulation des VMAT2 in synaptischen Vesikeln und Thrombozyten- Die Rolle der sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP

Die Hemmung der vesikulären Aufnahme von Neurotransmittern durch G-Proteinaktivatoren ist in permeabilisierten Thrombozyten und Synaptosomen stärker als in einer Vesikelpräparation. Während der Präparation kommt es zu einem Verlust vesikelassoziierter zytosolischer Komponenten, welche möglicherweise in der G-Protein vermittelten Regulation der Neurotransmittertransporter involviert sind.

Weit reichend ungeklärt ist, welche nachgeschalteten Signaltransduktionswege zwischen der Aktivierung des G-Proteins und der Regulation der Monoaminspeicherung in Vesikeln beteiligt sind. Da bisher keine direkten Interaktionen des Transporters mit dem jeweiligen G-Protein nachgewiesen werden konnten, ist eine Beteiligung von nachgeschalteten Signalketten wahrscheinlich. Als sekundäre Botenstoffe spielen cAMP und cGMP in der Regulation vieler durch G-Proteine vermittelter Signaltransduktionsketten eine große Rolle.

Durch Versuche mit cAMP und cGMP konnten für synaptische Vesikel und für Vesikel aus Thrombozyten verschiedene Regulationen gezeigt werden:

1.) Sowohl cAMP als auch cGMP verminderten die Serotoninaufnahme in synaptischen Vesikeln. Die Hemmung der Serotoninaufnahme nach Inkubation mit cGMP war jedoch deutlich stärker. cAMP wurde in der Vergangenheit in Beziehung mit der Regulation durch $G_{\alpha o}$ -Untereinheiten in Verbindung gebracht. Ansteigende cAMP-Konzentrationen verminderten die vesikuläre Monoaminaufnahme in PC12-Zellen (Nakanishi et al., 1995a; Nakanishi et al., 1995b). Des Weiteren zeigten Watts und Cunbay (Watts et al., 1998; Cumbay & Watts, 2001) am Beispiel des D_{2L} -Rezeptors, dass $G_{\alpha o}$ über die Adenylatzyklase zu einer Erhöhung von cAMP führt. In der Maus-Neuroblastomzelllinie N1E-115 konnte eine rezeptorvermittelte cAMP-abhängige Stimulation der Phospholipase C- ϵ nachgewiesen werden, die über eine Rap-GTPase (RAB2b) vermittelt wird (Schmidt et al., 2001). Neuste Untersuchungen am Parietalorgan des Gemeinen Seitenfleckleguan (*Uta stansburiana*) konnten auch einen Zusammenhang zwischen der $G_{\alpha o}$ -Untereinheit und cGMP herstellen. So führt $G_{\alpha o}$ über die Inhibition der Phosphodiesterase 6 zu einem Anstieg der cGMP-Konzentration (Su et al., 2006).

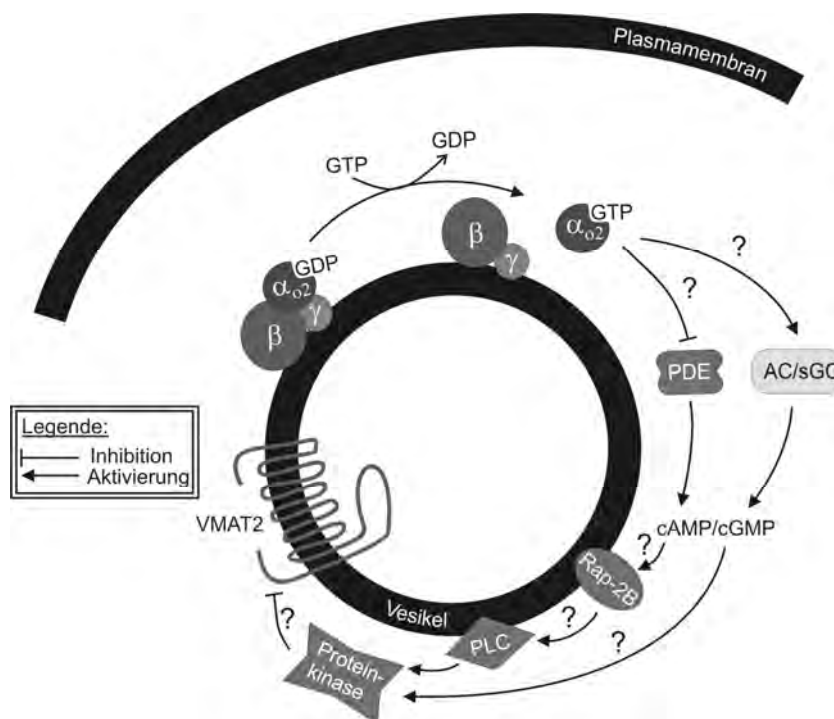


Abbildung 34

Putative Signaltransduktionswege zwischen der $G_{\alpha o2}$ -Untereinheit und des VMAT2 in Vesikeln des ZNS

Die aktivierte G_{α} -Untereinheit könnte Phosphodiesterasen inhibieren und sowohl die Adenylatzyklase als auch die lösliche Guanylatzyklase aktivieren. Dies führt zu einem Anstieg von cAMP bzw. cGMP. Dies wiederum könnte entweder direkt oder über Rap-2B und die Phospholipase C Proteinkinasen aktivieren und so die Aufnahme von Serotonin in das Vesikel hemmen.

Nicht nur die stärkeren Effekte in der Inhibition der Monoaminaufnahme lassen vermuten, dass vorwiegend cGMP in der Regulation der Monoaminaufnahme beteiligt ist. So konnte in ersten Versuchen gezeigt werden, dass eine Inhibition von AKAP (A-Kinase anchoring protein) keinen Effekt auf die Neurotransmitteraufnahme hat. AKAP transportiert ein Haupttarget von cAMP, die Proteinkinase A zu Orten in der Zelle, an denen cAMP gebildet wird. Somit kann eine Phosphorylierung von Substraten auf diese Regionen beschränkt werden. Dies lässt vermuten, dass cAMP nur eine untergeordnete Rolle in der Regulation der Monoaminaufnahme spielt. Des Weiteren ist ein Hauptsubstrat der Phosphodiesterase 2 und 9, welche in der Regulation der Monoaminaufnahme beteiligt sein könnten, cGMP.

cGMP erhöht jedoch auch die Aktivität der Phosphodiesterase 2 für das Substrat cAMP. Dies wiederum hebt die zentrale und synergistische Rolle beider zyklischen Nukleotidphosphate hervor.

Der cGMP-Spiegel kann sowohl durch die lösliche als auch durch die partikuläre Guanylatzyklase erhöht werden. Beide könnten in der Regulation der Monoaminaufnahme beteiligt sein. Bisher konnte nur eine Beteiligung der löslichen Guanylatzyklase nachgewiesen werden. Abschließend kann gesagt werden, dass sowohl eine Inhibition der Phosphodiesterasen als auch eine Aktivierung der Adenylat- bzw. Guanylatzyklasen zu einem Anstieg von cGMP und cAMP führen, der dann über Proteinkinasen auf die Speicherung von Monoaminen Einfluss nehmen kann. Inwieweit es sich bei diesen Mechanismen um zwei unabhängige oder synergistische Effekte handelt, konnte nicht abschließend geklärt werden.

2.) In Vesikeln von Thrombozyten wurde ein ganz anderer Regulationsweg nachgewiesen. So hatten beide zyklischen Nukleotidphosphate allein keinen Einfluss auf die Regulation des Transporters. Jedoch unter dem Einfluss des schwer hydrolysierten GTP-Analogons GMP-P(NH)P konnte eine Aufhebung der durch dieses Analogon hervorgerufenen Hemmung herbeigeführt werden. Auch hier konnte ein größerer Effekt durch cGMP erreicht werden.

Sowohl cAMP als auch cGMP gelten als zentrale und synergistische intrazelluläre Botenstoffe, welche die Effekte von Stickoxid und Prostazyklin (PG-12) in Thrombozyten vermitteln. Des Weiteren konnte für cGMP gezeigt werden, dass in Thrombozyten über die Stickoxid/cGMP-Kaskade der G_{α_q} -Signalweg über eine durch die cGMP-Kinase vermittelte Phosphorylierung und Aktivierung von RGS2 negativ reguliert wird (Tang et al., 2003).

RGS Proteine sind noch nicht lange bekannt. Bis jetzt konnten mehr als dreißig verschiedene RGS-Proteine in Säugetieren nachgewiesen werden, welche in sieben Subfamilien unterteilt worden sind. Diese Unterteilung basiert auf Sequenzhomologien und funktionelle Ähnlichkeiten (De Vries et al., 2000; Ross & Wilkie, 2000; Hollinger & Hepler, 2002). Es sind drei Regulationsmechanismen bekannt mit denen RGS-Proteine die

Signalweiterleitung über heterotrimere G-Proteine beenden können. Als erstes ist hier die GTPase-aktivierende Eigenschaft (GAP-Aktivität) zu nennen, welche über die Bindung an das G_{α} -GTP die Lebensdauer der aktivierten G_{α} -Untereinheit verkürzt (s. Abb. 35).

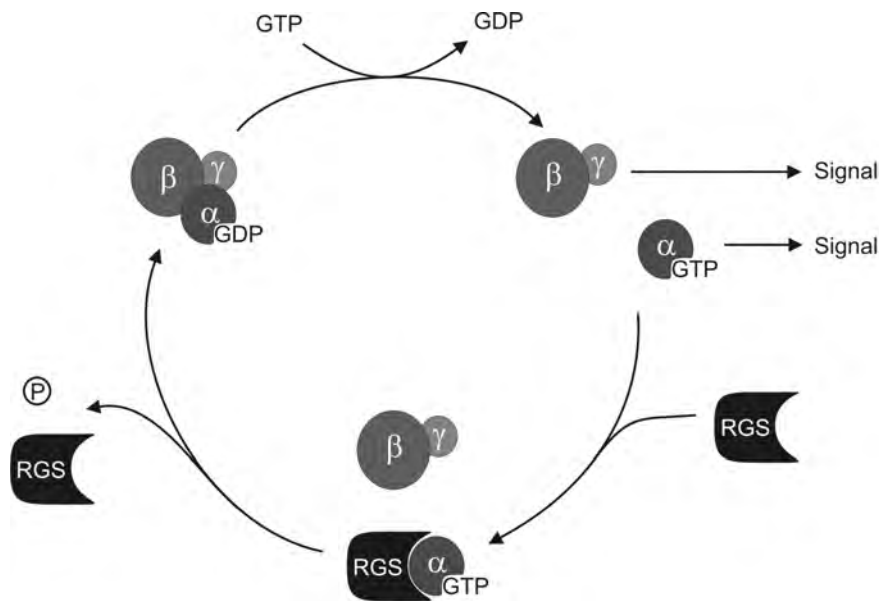


Abbildung 35

Schema der Aktivierung und Deaktivierung des G-Proteins und der Rolle von RGS-Proteinen

Nach erfolgter Aktivierung des G-Proteins durch einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) kommt es zu einer Ablösung der G_{α} -Untereinheit von der $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit des G-Proteins. Sowohl die G_{α} -Untereinheit als auch die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit können mit verschiedenen Effektoren interagieren. RGS-Proteine binden an das G_{α} -GTP und fungieren dort als GTPase aktivierendes Protein (GAP) und erhöhen so die Geschwindigkeit der Hydrolyse des GTP zu GDP. Anschließend reassoziiert die G_{α} -Untereinheit wieder mit der $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit.

Des Weiteren können RGS-Proteine selbst als Effektorantagonisten wirken, in dem sie G-Proteine daran hindern an ihren Effektor zu binden (Hepler et al., 1997) und drittens können sie auch über eine Erhöhung der Affinität der G_{α} -Untereinheit zu der $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit die Anzahl der freien $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten erniedrigen und so deren Signalweiterleitung inhibieren (Druey et al., 1996; Yan et al., 1997).

Obwohl manche RGS-Protein-Subfamilien selektiv an bestimmte G_{α} -Untereinheiten binden und diese regulieren, zu nennen wäre hier das RGS-Protein p115RhoGEF, welches nur an $G_{\alpha12/13}$ bindet, bleibt dies die Ausnahme (Hepler, 2003).

Durch die GAP-Aktivität der RGS-Proteine könnte ermöglicht werden, dass das an die G_{α} -Untereinheit gebundene GMP-P(NH)P schneller gespalten wird und es so zu einer Reassoziierung mit der $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit kommt.

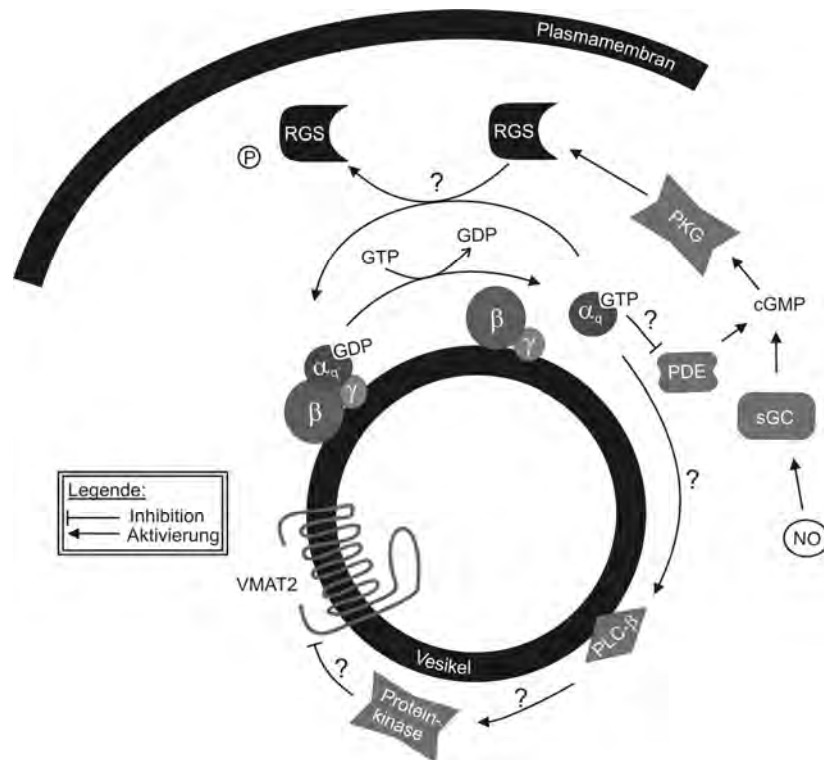


Abbildung 36

Putative Signaltransduktionswege zwischen der $G_{\alpha q}$ -Untereinheit und des VMAT2 in Vesikeln der Thrombozyten

Die aktivierte $G_{\alpha q}$ -Untereinheit könnte zu einer Inhibition der Phosphodiesterasen führen und so den cGMP-Spiegel erhöhen. Des Weiteren ist eine Erhöhung der cGMP-Konzentration durch die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase durch Stickoxid denkbar.

cGMP wiederum aktiviert eine Proteinkinase G, welche durch Phosphorylierung ein RGS-Protein aktiviert, welches zu einer zügigen Umsetzung von GTP zu GDP beiträgt und die Hemmung des Transporters wieder aufhebt. Des Weiteren könnte die aktivierte $G_{\alpha q}$ -Untereinheit die Phospholipase C- β aktivieren, was wiederum durch eine Proteinkinase zur Inhibition des Transporters führt.

Die Unterschiede in der Regulation des VMAT2 zwischen den im ZNS und in den Thrombozyten vorkommenden Vesikeln lassen sich zum einen durch eine andere G-Proteinzusammensetzung -im ZNS reguliert $G_{\alpha o 2}$ und in Thrombozyten $G_{\alpha q}$ den Transporter- und zum anderen durch die Selektivität von RGS Proteinen auf verschiedene Signalwege erklären. Diese Selektivität kann durch drei verschiedene Faktoren bewerkstelligt werden: Erstens durch die zell-typische und intrazelluläre Lokalisation der RGS-Proteine, zweitens durch die zeitliche Expression in der Zelle und drittens über die Einwirkung von Domänen außerhalb der RGS-Domäne, welche auf andere Signalwege einwirken können.

Gerade die ausgeprägte regionale und zelltypische Lokalisation von RGS-mRNA im Gehirn legt die Vermutung nahe, dass RGS Proteine spezifisch mit Neurotransmitter-Signalwegen interagieren können (Gold et al., 1997). Eine bestimmte regionale Lokalisation von RGS-Proteinen konnte auch am Beispiel des RGS9 während der Entwicklung gezeigt werden. So kann RGS9 prae- und postnatal im Gesamthirn nachgewiesen werden (Thomas et al., 1998), ist jedoch in adulten Ratten nur noch in der Retina vorhanden

(Cowan et al., 1998; He et al., 1998). Des Weiteren können RGS4 und GAIP Domänen über eine selektive Interaktion mit verschiedenen G_{α} -Untereinheiten die Inhibition eines präsynaptischen Ca^{2+} -Kanals durch eine, über G_i und G_o , vermittelte Signaltransduktion wieder aufheben (Diverse-Pierluissi et al., 1999).

Diese Faktoren zeigen, dass der Einfluss von RGS-Proteinen auch auf die durch $G_{\alpha o}$ und $G_{\alpha q}$ vermittelten Signaltransduktionswege in der Regulation der Serotoninaufnahme in Vesikel sehr unterschiedlich sein kann.

Trotz aller Unterschiede fanden sich auch Hinweise auf eine gemeinsame „Endstrecke“. Durch Saeed et al. (Saeed et al., 2004) und Wettschurek & Offermanns (Wettschurek & Offermanns, 2005) konnte der Einfluss der Phospholipase C im Rahmen einer durch die $G_{\alpha q}$ -Untereinheit, die Cyclooxygenase und MAP-Kinase vermittelten Signaltransduktionskette in Thrombozyten gezeigt werden. Des Weiteren konnten Schmidt et al. in der Maus-Neuroblastomzelllinie N1E-115 eine rezeptorvermittelte cAMP-abhängige Stimulation der Phospholipase-C ϵ nachweisen (Schmidt et al., 2001). In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der Phospholipase C zu einer Verminderung der Monoaminaufnahme in Vesikeln des Gehirns und in Thrombozyten führt.

4.4 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergeben eine Reihe weiterer Fragen, denen in Zukunft nachgegangen werden muss.

Es ließ sich zeigen, dass die Konzentration an intrazellulären Monoaminen eng durch die Tyrosinhydroxylase und die Monoaminoxidasen reguliert wird. Sind auch andere Enzyme, welche in der Synthese und im Abbau von Monoaminen involviert sind in den Deletionsmutanten hoch- bzw. runterreguliert?

Des Weiteren konnte sowohl in den Vesikeln des ZNS als auch in Thrombozyten gezeigt werden, dass cAMP und cGMP maßgeblich an der Regulation der Serotoninaufnahme beteiligt sind. Handelt es sich hierbei um zwei unabhängige Regulationsprozesse oder sind diese synergistisch?

In Thrombozyten wird vermutet, dass cGMP über die Rekrutierung von RGS-Proteinen auf die Regulation der Monoaminaufnahme Einfluss nimmt. Kann eine ähnliche Regulation auch an Vesikeln des Gehirns gezeigt werden?

Auch konnte nachgewiesen werden, dass zwischen der Aktivierung des G-Proteins und der Regulation des Transporters nachgeschaltete Signale liegen. Doch wie wird das G-Protein selbst aktiviert? Es konnte bisher kein heptahelikaler G-Protein-gekoppelter Rezeptor auf Vesikeln nachgewiesen werden. Übernehmen die Domänen des vesikulären Monoamintransporters diese Funktion selbst? In ersten Versuchen konnte gezeigt werden, dass die luminale Schleife des Transporters zwischen Transmembrandomäne 1 und 2 dies bewerkstelligen kann.

Des Weiteren stellt sich die Frage welche Isoformen der Phospholipase C sowohl in der Regulation des VMAT2 durch $G_{\alpha 2}$ bzw. $G_{\alpha q}$ beteiligt sind. Weit reichend ungeklärt ist, ob und welche Effektoren die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit auf Vesikeln ansprechen kann. Sind diese auch an der Regulation des Transporters beteiligt?