

**Differenzielle Sortierung von  
VGlut1 und 2  
und mögliche funktionelle Aspekte**

**Dissertation**

zur Erlangung des Akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von

**Karin Birgit Richter**

aus Fulda

Berlin, September 2010



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 15. März 2006 bis zum 30. September 2010 am Institut für Integrative Neuroanatomie der Charité – Universitätsklinik in Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. Gudrun Ahnert-Hilger angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Volker Haucke  
Institut für Chemie und Biochemie  
FU Berlin
  
2. Gutachterin: Prof. Dr. Gudrun Ahnert-Hilger  
Institut für Integrative Neuroanatomie  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

Disputation am: 06.01.2011



## **Danksagung**

Besonders danke ich Frau Prof. Dr. Gudrun Ahnert-Hilger für ihre Betreuung und Unterstützung während der gesamten Zeit der Erarbeitung dieser Dissertation. Eine offene Tür und offene Ohren haben mir sehr geholfen und mich stets begleitet.

Herrn Prof. Dr. Haucke danke ich für die unkomplizierte Übernahme der Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit seitens der Biochemie an der FU Berlin.

Ebenso danke ich der gesamten Arbeitsgruppe und ehemaligen Mitarbeitern von Prof. Dr. Ahnert-Hilger. Jeder Kaffee hatte seine Zeit und jede Schokolade wollte gegessen werden. Die vielen Fragen dazwischen fanden ihre Antworten oftmals auf dem Flipchart und brachten manche wichtige Erkenntnis.

Meinen Freunden danke ich innigst für ihren tatkräftigen Beistand. Claudia, Lisa und Kirsten: die schlaflosen Nächte gehören uns.

Zudem grüße ich meine Geschwister Martina und Sebastian – ich hab euch gern.

Meine Dissertation widme ich meinen Eltern Margarete und Hermann Richter. Ohne ihre uneingeschränkte Liebe und Unterstützung - auch in finanzieller Hinsicht - wäre ich nicht in der Position, in der ich jetzt glücklicherweise bin. Sie waren immer für mich da.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, den 30. September 2010

Karin Birgit Richter

## Zusammenfassung

Die Endozytierung synaptischer Vesikel-Proteine von der Plasmamembran zurück in synaptische Vesikel ist ein streng regulierter Prozess. Bisher wurde davon ausgegangen, dass sich der Sortierungsprozess für alle synaptischen Vesikel-Proteine ähnelt. Allerdings existieren Hinweise, die auf eine spezielle Sortierung von vesikulären Glutamattransportern (VGluts) hindeuten. Diese Sortierung ist jedoch weitestgehend unverstanden. Es scheint, dass VGlut1 und 2 nicht nur während der Endozytose an die Plasmamembran sortieren, sondern (tageszeitabhängig) gezielt dorthin transportiert werden. Fraglich ist, ob sie an der Plasmamembran funktionell (z.B. als Natrium-Phosphat-Transporter) ebenfalls relevant sind und ob ein Funktionswechsel eine Rolle in der neuronalen Transmission spielt.

In dieser Arbeit wurde der Sortierungsprozess von VGlut1 und 2 in verschiedenen zellulären und subzellulären Systemen untersucht und die Bedeutung von Interaktionspartnern für die Regulation von VGlut1 und 2 betrachtet. Hierfür wurden unter anderem GST-Bindungsstudien mit Mäusegehirnfraktionen, Neurotransmitteraufnahmeversuche und konfokale Mikroskopie eingesetzt. Die Untersuchung der Translokation von VGlut zwischen Plasma- und synaptischer Vesikelmembran wurde über zwei Wege bearbeitet.

Erstens zeigten GST-Bindungsstudien mit GST-Fusionsprotein, bestehend aus GST und der SH3-Domäne von Endophilin bzw. dem C-Terminus von VGlut1 und 2, dass nur VGlut1 an Endophilin bindet, nicht jedoch VGlut2. VGlut2 hingegen bindet direkt an den Adapterproteinkomplex AP2, was auf individuelle Sortierungsprozesse in den jeweiligen VGlut-Neuronen hinweist. Neueste Studien zeigten eine Kollokalisierung von VGlut1 und 2 in ein und demselben Neuron. Neurone, die sowohl VGlut1 als auch VGlut2 tragen, könnten über die individuelle Sortierung nicht nur unterschiedliche VGlut1 und 2-Vesikelpools generieren. Ebenfalls ist denkbar, dass eine spezifische Sortierung eines der Transporter z.B. an die Plasmamembran möglich ist, während der andere Transporter z.B. auf dem Vesikel „gelagert“ wird.

VGlut1 (und VGlut2) zeigt ein zirkadianes Sortierungsverhalten und lokalisiert in Abhängigkeit der Tageszeit zwischen Plasma- und Vesikelmembran. Um zu prüfen, ob der zirkadianen Oszillation der vesikulären VGlut1-Mengen eine ebenfalls oszillierende Interaktion von VGlut1 mit Endophilin zugrunde liegt, fanden zweitens in dieser Arbeit

Untersuchungen an Mäusen statt, die in einem 12h Licht/12h Dunkel- oder 12h Dunkel/12h Dunkelzyklus gehalten wurden. Mit Hilfe von GST-Fusionsprotein, bestehend aus GST und der SH3-Domäne von Endophilin, konnte in WT-Mäusen eine oszillierende Bindung von VGlut1/Dynamin in Abhängigkeit der Tageszeit an Endophilin festgestellt werden. Die Deletion des Uhrgens Period 2 in Per2<sup>BRDM1</sup>-Mäusen veränderte die Rhythmizität der Mäuse, was sich in einer gleichbleibenden Bindefähigkeit von VGlut1 (bezogen auf Dynamin) an GST-SH3-Endophilin zeigte. Damit wird deutlich, dass VGlut1 anders als andere synaptische Vesikel-Proteine individuell sortiert wird und diese Sortierung nicht nur im Zuge der Endo- bzw. Exozytose eine Rolle spielt.

Als Modell für die VGlut2-Translokation wurde eine VGlut2-exprimierende Phäochromozytomzelllinie der Ratte (PC12) charakterisiert. In diesen Zellen kommt der Transporter vornehmlich an der Plasmamembran vor. Nur VGlut2- und nicht pcDNA3-transfizierte PC12-Zellen zeigen in Gegenwart von Phosphat eine unmittelbare Natriumaufnahme über die Plasmamembran. VGlut2 wirkt in diesen Zellen also eher als Natrium-Phosphat-Co-transporter und weniger als vesikulärer Glutamattransporter, was auf eine funktionelle Relevanz in Abhängigkeit der Sortierung deutet.

Zusammenfassend kann festgestellt werden: 1) Während VGlut1 mit Endophilin interagiert, bindet VGlut2 direkt den Adapterproteinkomplex AP2. 2) Die Bindung von VGlut1 an Endophilin unterliegt einer tageszeitabhängigen Regulierung. 3) VGlut2 besitzt in transfizierten PC12-Zellen die Funktion eines Natrium-Phosphat-Transporters.



## Abstract

The Endocytosis of synaptic vesicle proteins from the plasma membrane back into synaptic vesicles is a highly regulated process. Until now research assumed the trafficking process of synaptic vesicle proteins to be similar. Data exists, however, indicating that the trafficking of vesicular glutamate transporters (VGluts) differs even though it is still poorly understood. It seems that VGlut1 and 2 sort to the plasma membrane not only during exocytosis, but are also transported there in a specific day time dependent manner. Questions remain, such as whether VGlut1 and 2 are functionally relevant at the plasma membrane, e.g. as a sodium phosphate transporter, and whether this change in function is important for synaptic transmission.

In this thesis, the trafficking of VGlut1 and 2 in different cellular and subcellular compartments was investigated as well as the impact of interaction partners for the regulation of VGlut1 and 2 using GST pulldown assays with mouse brain extract, neurotransmitter uptake assays and confocal microscopy. This study approaches the translocation of VGlut to the plasma membrane in two different ways.

Firstly, GST pulldown assays using GST fusion proteins with GST and the SH3 domain of Endophilin or, accordingly, the C-Terminus of VGlut1 and 2, showed an interaction of Endophilin and VGlut1 but not for VGlut2. VGlut2 interacts directly with the adapter protein complex AP2 indicating individual trafficking routes for VGluts. The latest data reveals the coexistence of VGlut1 and 2 in the same neuron. Neurons carrying VGlut1 and 2 might not only generate different vesicle pools; it is further possible that one transporter is sorted to the plasma membrane leaving the other on the synaptic vesicle. VGlut1 (and VGlut2) harbours a circadian trafficking pattern and cycles in a day time dependent manner between plasma and vesicle membrane. Secondly, in order to investigate whether an oscillating binding of VGlut1 to Endophilin forms the basis of the circadian oscillation in the amount of vesicular VGlut1, brain extracts of mice entrained in a 12h light/12h dark-cycle or 12h dark/12h dark-cycle were analysed by GST pulldown assays. The analysis of wild type mice using GST fusion protein containing GST and the SH3 domain of Endophilin, showed an oscillating binding pattern of VGlut1 (in ratio to Dynamin) to Endophilin – depending on the time of the day. The deletion of the period gene *Period 2* in *Per2<sup>BRDM1</sup>* mice resulted in the loss of this oscillating interaction between VGlut1/Dynamin and Endophilin. This effect

emphasizes the individual trafficking process of VGlut1 in comparison to other synaptic vesicle proteins, and its importance not only during endo- but also exocytosis.

In order to study the trafficking of VGlut2, a Rat adrenal pheochromocytoma cell line (PC12) carrying VGlut2 was characterised. In these cells, VGlut2 presumably translocates to the plasma membrane. Only VGlut2- and not pcDNA3 transfected PC12 cells exhibit an immediate sodium uptake across the plasma membrane in the presence of phosphate. VGlut2 functions in these cells as a sodium-phosphate-transporter and not as a vesicular glutamate transporter, indicating a functional relevance subject to the trafficking of the transporter.

In summary, it was shown that: 1) whereas VGlut1 binds to Endophilin, VGlut2 directly interacts with the adaptor complex AP2. 2) The interaction of VGlut1 and Endophilin is regulated in a manner that depends on the time of the day. 3) In transfected PC12 cells, VGlut2 functions more as a sodium-phosphate transporter within the plasma membrane than as a vesicular glutamate transporter.

## Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	5
Selbstständigkeitserklärung .....	6
Zusammenfassung .....	I
Abstract .....	III
Inhaltsverzeichnis .....	V
Abbildungsverzeichnis .....	VIII
Tabellenverzeichnis .....	X
1 Einleitung .....	1
1.1 Signalübertragung an chemischen Synapsen .....	1
1.2 Vesikelzyklus und Vesikelentleerung .....	2
1.3 Sortierung synaptischer Vesikel .....	5
1.4 Auswahl weiterer Proteinkomponenten des Vesikeltransports .....	9
1.4.1 Endophilin .....	9
1.4.2 Dynamin .....	11
1.4.3 Adapterproteine .....	12
1.4.4 AP180/CALM .....	14
1.5 Vesikelproteine für die Neurotransmitter-Beladung synaptischer Vesikel ...	15
1.5.1 Vesikuläre Glutamattransporter .....	15
1.6 <i>Lipid Rafts</i> .....	18
1.7 Neuronale Grundlagen der zirkadianen Rhythmik .....	19
1.8 Regulation von Neurotransmittertransportern in Wildtyp und Per2 <sup>Brdml</sup> -	
Mäusen .....	21
1.9 Zielsetzung der Arbeit .....	21
2 Material .....	23
2.1 Chemikalien .....	23
2.2 Antikörper .....	26
2.2.1 Primäre Antikörper .....	26
2.2.2 Sekundäre Antikörper .....	28
2.3 Radioaktiv markierte Neurotransmitter .....	28
2.4 Nukleinsäuren .....	28
2.5 Puffer und Lösungen .....	30
2.6 Medien .....	33
2.6.1 Mikrobielle Medien .....	33
2.6.2 Zellkulturmedien .....	34
2.7 Geräte und sonstige Hilfsmittel .....	35
2.8 Versuchstiere .....	37
3 Methoden .....	38
3.1 DNA-Techniken .....	38
3.1.1 DNA-Amplifikation über die Polymerase-Ketten-Reaktion .....	38
3.1.2 Herstellung kompetenter Zellen .....	38
3.1.3 Transformation von <i>E. Coli</i> .....	39
3.1.4 Isolation von Plasmid DNA aus <i>E. Coli</i> .....	39
3.1.5 Konzentrationsbestimmung von DNA .....	39
3.1.6 Restriktionsverdau von DNA .....	39
3.1.7 Agarose-Gelelektrophorese .....	40
3.1.8 Gelelution und Aufreinigung von DNA .....	40
3.1.9 Ligation von DNA .....	40
3.1.10 DNA-Sequenzierung .....	40

3.2	Proteintechniken.....	41
3.2.1	Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA-Test).....	41
3.2.2	Proteingelektrophorese (SDS-PAGE).....	41
3.2.3	Proteingelfärbung.....	41
3.2.4	Western-Immunoblotanalyse.....	42
3.3	Subzelluläre Fraktionierung.....	42
3.3.1	Präparation von Synaptosomen.....	43
3.3.2	Aufreinigung von Synaptosomen.....	43
3.3.3	Präparation synaptischer Vesikel.....	44
3.3.4	Präparation von Membranfraktionen von PC12-Zellen.....	44
3.4	Stimulation von Synaptosomen mit Saccharose.....	45
3.5	Hemmung Dynamin- und AP3- abhängiger Signalwege unter der Verwendung von Dynasore und Brefeldin A.....	45
3.6	Extraktion von Membranproteinen.....	45
3.7	Isolation von Detergenz-resistenten Membrandomänen.....	46
3.7.1	Entfernung von Cholesterin aus Zellmembranen mit Methyl- $\beta$ - cyclodextrin.....	47
3.7.2	Bestimmung des Cholesteringehalts in Membranfraktionen.....	47
3.7.3	Aktivitätsbestimmung der Alkalischen Phosphatase.....	48
3.8	Immunpräzipitation.....	48
3.9	Bindungsstudien mit rekombinanten Fusionsproteinen.....	49
3.9.1	Herstellung von Glyzerinkulturen.....	49
3.9.2	Expression von Fusionsproteinen in <i>E. Coli</i> .....	49
3.9.3	Aufbereitung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen.....	49
3.9.4	Proteinaufbereitung für Glutathion-S-Transferase-Bindungsstudien.....	50
3.9.5	Glutathion-S-Transferase-Bindungsstudien (Pulldown Experiment).....	51
3.9.6	Alkylierung der Cystein-tragenden Proteine mit Acrylamid.....	52
3.10	Zellkulturarbeiten.....	52
3.10.1	Kultivierung von PC12-Zellen.....	52
3.10.2	Einfrieren von Zellen.....	53
3.10.3	Aufschluss von Zellen.....	53
3.10.4	Permeabilisierung von Zellen.....	53
3.10.5	Neurotransmitteraufnahme.....	54
3.10.6	Immunzytochemische Methoden.....	55
3.10.7	Färbung mit CoroNa Green.....	55
3.11	Statistische Analyse.....	56
4	Ergebnisse.....	58
4.1	Anreicherung synaptischer Vesikelproteine.....	58
4.2	Charakterisierung der VGlut1-Endophilin-Interaktion.....	59
4.2.1	Nachweis der VGlut1-Endophilin Interaktion durch Immunpräzipitation.....	60
4.2.2	Nachweis der VGlut1-Endophilin Interaktion mit Hilfe von Glutathion- S-Transferase-Bindungsstudien.....	66
4.2.3	Stimulation von exo- und endozytotischen Prozessen mit Sachharose bzw. Dynasore und Brefeldin A.....	69
4.2.4	GST-Bindungsstudien zur Analyse der zirkadianen Sortierung von VGlut1 in Wildtyp- und Per2 <sup>Brdm1</sup> -Mäusen.....	72
4.3	Identifizierung von Bindungspartnern des C-Terminus von VGlut1 und VGlut2.....	80
4.3.1	Verifizierung der putativen Interaktionspartner.....	84

---

4.4	Verteilung vesikulärer Glutamatttransporter in cholesterinreichen Mikrodomänen.....	86
4.4.1	Extraktion synaptischer Proteine nach Cholesterinsenkung.....	87
4.4.2	Proteinumverteilung synaptischer Proteine.....	89
4.5	Charakterisierung VGlut2-transfizierter PC12-Zellen.....	97
4.5.1	Verteilungs- und Funktionsanalyse von VGlut2.....	98
4.5.2	Analyse der zellulären VGlut2-Distribution mittels konfokaler Laser-Mikroskopie.....	106
4.5.3	Natriumsensitive Fluoreszenzmikroskopische Messungen mit CoroNa Green.....	110
5	Diskussion.....	113
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	113
5.2	Bedeutung von Interaktionspartnern für die individuelle Sortierung von VGlut1 und 2.....	114
5.2.1	Möglichkeiten und Grenzen der experimentellen Methodik.....	114
5.2.2	Identifikation von VGlut1 und 2- Interaktionspartnern.....	115
5.3	Bedeutung der Endophilin-VGlut1-Interaktion für das Sortierungsverhalten von VGlut1.....	118
5.3.1	Bindungsverhalten von VGlut1 an GST-SH3-Endophilin nach Stimulation.....	119
5.4	Tageszeitabhängig verändertes Bindungsverhalten von VGlut1 an GST-SH3-Endophilin in Wildtyp- und Per2 <sup>BRMD1</sup> -Mäusen.....	121
5.5	PC12-Zellen als Modell für Translokations- und Funktionsstudien von VGlut2.....	124
5.6	Verteilung vesikulärer Glutamatttransporter in Detergentien-resistenten Membranen.....	127
5.7	Offene Fragen und Ausblick.....	131
6	Literaturverzeichnis.....	132
	Publikationen.....	142
	Anhang.....	143
6.1	VGlut1-cDNA-Sequenz.....	143
6.2	VGlut2-cDNA-Sequenz.....	144
6.3	Vektorkarte pGEX4T1.....	145
	Abkürzungsverzeichnis.....	146
	Lebenslauf.....	149

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Chemische Synapse .....	2
Abb. 2 Synaptisches Vesikel .....	3
Abb. 3 Modell der SNARE-vermittelten Vesikelfusion .....	4
Abb. 4 Synaptischer Vesikel-Zyklus am synaptischen Endknöpfchen .....	5
Abb. 5 Darstellung eines hexameren Clathrin-Triskelions .....	6
Abb. 6 Schematische Darstellung der postulierten Vesikelpools .....	9
Abb. 7 Darstellung des modularen Aufbaus von Endophilin .....	10
Abb. 8 Schema des modularen Aufbaus von Dynamin .....	12
Abb. 9 Schematische Übersicht über den molekularen Aufbau der Adapterproteine 1-4 am Beispiel von AP2 .....	13
Abb. 10 Schematische Übersicht über den molekularen Aufbau von AP180 .....	15
Abb. 11 Angenommene Struktur vesikulärer Glutamattransporter .....	16
Abb. 12 Aktuelles Modell des Glutamattransports durch VGlut .....	17
Abb. 13 Grundschema der subzellulären Fraktionierung von Mäuse- und Rattengehirn .....	43
Abb. 14 Schematischer Ablauf von GST-Bindungsstudien zur Identifizierung potentieller Bindungspartner am Beispiel des C-Terminus von VGlut1 .....	51
Abb. 15 CoroNa Green .....	56
Abb. 16 Aufreinigung synaptischer Proteine .....	59
Abb. 17 Immunpräzipitation zum Nachweis der VGlut1-Endophilin Interaktion .....	61
Abb. 18 Signalspezifität von VGlut1 Antikörpern .....	63
Abb. 19 Kreuzreaktivität von Primär- und Sekundärantikörpern .....	64
Abb. 20 Immunpräzipitation mit rb- $\alpha$ -VGlut1-3LD und rb- $\alpha$ -VGlut1/2-4LD Ak .....	66
Abb. 21 VGlut1 und Dynamin binden an die SH3-Domäne von Endophilin in GST- Bindungsstudien .....	68
Abb. 22 GST-Bindungsstudie mit Synaptosomen nach Behandlung mit Saccharose oder Brefeldin A und Dynasore .....	71
Abb. 23 GST-Bindungsstudie mit synaptosomalen Fraktionen aus Wildtypmäusen, konditioniert im LD-Zyklus .....	74
Abb. 24 GST-Bindungsstudie mit Gesamtgehirnlysat aus Wildtyp- und Per2 <sup>Brdm1</sup> - Mäusen, konditioniert im LD-Zyklus .....	76
Abb. 25 GST-Bindungsstudie mit Gesamtgehirnlysat aus Wildtyp- und Per2 <sup>Brdm1</sup> - Mäusen, konditioniert im DD-Zyklus .....	78
Abb. 26 Zusammenfassung der GST-Bindungsstudie mit Gesamtgehirnlysat von LD- und DD-konditionierten WT- und Per2 <sup>Brdm1</sup> -Mäusen .....	79
Abb. 27 Schematische Darstellung von VGlut1 und 2 sowie Sequenzalignements von cVGlut1- und cVGlut2-pGEX4T1 im Bereich des C-Terminus von msVGlut1 und 2 .....	81
Abb. 28 Expression und Aufreinigung von GST-cVGlut1 und 2 aus <i>E. Coli</i> BL21 .....	83
Abb. 29 GST-Pulldown mit dem C-Terminus von VGlut1 bzw. VGlut2 .....	84
Abb. 30 AP2 bindet an den C-Terminus von VGlut2 .....	85
Abb. 31 Extrahierbarkeit synaptischer Vesikelproteine nach Behandlung mit Methyl- $\beta$ - Cyclodextrin .....	88
Abb. 32 Vergleich von Lubrol- und Triton-solubilisierten Membranfraktionen .....	92
Abb. 33 Membranverteilung synaptischer Proteine nach Cholesterin-Depletion .....	94
Abb. 34 Aktivitätsbestimmung der Alkalische Phosphatase in solubilisierten Membranendomänen .....	96
Abb. 35 Expression von VGlut2 in transfizierten PC12-Zellen .....	98

---

Abb. 36 Konfokale Immunfluoreszenzanalyse von VGlut2-transfizierten und pcDNA3-transfizierten PC12-Zellen: Expression des VGlut2.....	100
Abb. 37 <sup>3</sup> H-Glutamataufnahme von intakten PC12-Zellen in KR-Hepes-Puffer.....	102
Abb. 38 <sup>3</sup> H-Glutamataufnahme von permeabilisierten PC12-Zellen.....	103
Abb. 39 Chloridabhängige <sup>3</sup> H-Glutamataufnahme von permeabilisierten PC12-Zellen .....	104
Abb. 40 Einfluss von VGlut2 auf die VMAT1-abhängige Serotoninaufnahme von permeabilisierten PC12-Zellen.....	105
Abb. 41 <sup>3</sup> H-Glutamataufnahme in Vesikelmembranfraktionen transfizierter PC12- Zellen.....	106
Abb. 42 Lokalisation des VGlut2 im Zytosplasma und vesikulären Strukturen in VGlut2-transfizierten PC12-Zellen.....	108
Abb. 43 Lokalisation des VGlut2 an der Plasmamembran in VGlut2-transfizierten PC12-Zellen.....	109
Abb. 44 Phosphatabhängige Natriumaufnahme von VGlut2-transfizierten PC12-Zellen .....	112
Abb. 45 Aufbau von Lipid Rafts.....	130
Abb. 46 VGlut1-cDNA.....	143
Abb. 47 VGlut2-cDNA.....	144
Abb. 48 Vektorkarte pGEX4T1.....	145

## **Tabellenverzeichnis**

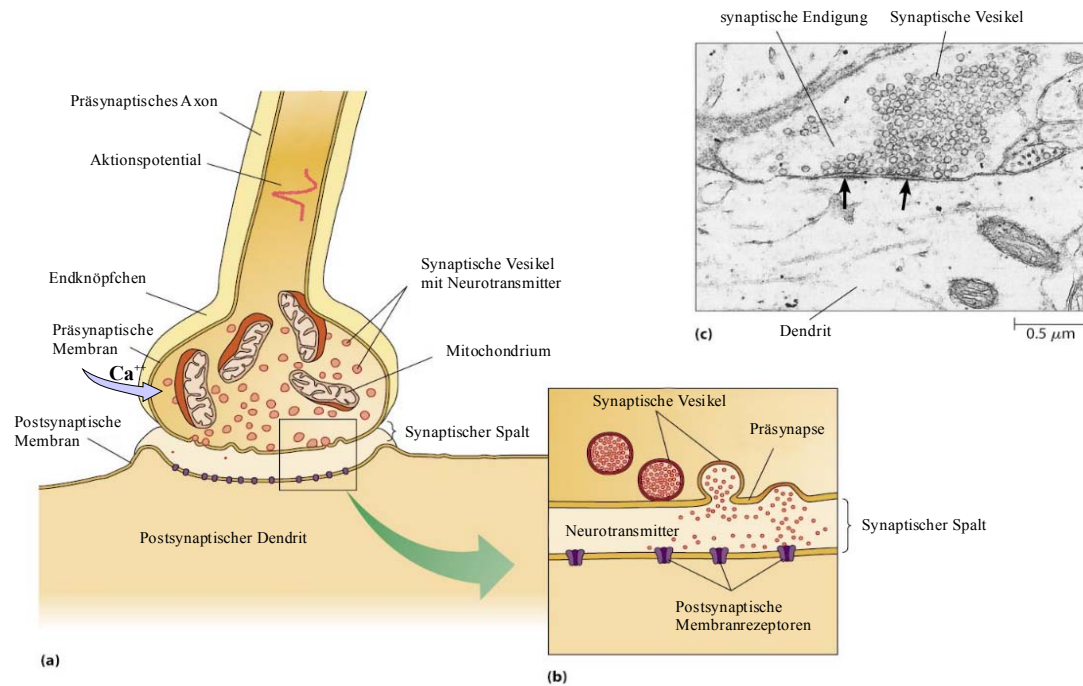
Tab. 1 Eigenschaften verwendeter Vektorkonstrukte bzw. GST-Fusionsproteine .....	29
Tab. 2 Zusammenfassung der Kreuzreaktivität von Antikörpern .....	65
Tab. 3 Zusammenfassung der GST-Bindungsstudien.....	86



# 1 Einleitung

## 1.1 Signalübertragung an chemischen Synapsen

Das menschliche Gehirn besteht aus mindestens  $7 \cdot 10^9$  (Webster, 2001) bis  $10^{11}$  Neuronen (Hyman & Nestler, 1993; Kandel *et al.*, 1995), von denen jedes einzelne wiederum aus einem Zellkörper (Soma), mehreren Dendriten und einem Axon aufgebaut ist. Jedes Neuron kann u.a. mit mehreren tausend anderen Neuronen über individuelle Verbindungen – den sogenannten Synapsen – in Kontakt treten (Hyman & Nestler, 1993; Kandel *et al.*, 1995). Mehrere Typen von Synapsen sind bekannt, die jeweils individuell reguliert werden und nach bisherigem Kenntnisstand in chemische und elektrische Synapsen zu unterscheiden sind. Während letztere über Ionenströme an Proteinkomplexen (*Gap junctions*) kommunizieren, ist das Grundprinzip der chemischen Signalübertragung die Umwandlung eines elektrischen Impulses (Aktionspotential) in ein chemisches Signal an der präsynaptischen Membran von Neuronen. Als Folge davon werden spannungsabhängige Kalziumkanäle geöffnet, wodurch die lokale Kalziumkonzentration von ca. 100 nM im Ruhezustand auf bis zu 100  $\mu$ M in der Nähe des individuellen Kalziumkanals ansteigt (Adler *et al.*, 1991). Der Kalziumeinstrom in das Neuron endet schließlich in der regulierten Sekretion von Neurotransmittern aus synaptischen Vesikeln (SV) in den synaptischen Spalt (Abb. 1). Dieser streng kontrollierte Prozess kann innerhalb von 100 Millisekunden stattfinden (Zucker, 1996) und wird auch regulierte Exozytose genannt. Aufgrund der Sensitivität gegenüber Kalzium handelt es sich um einen Spezialfall der Membranfusion (Bennett *et al.*, 1997), der in ähnlichen Abläufen überall in der Zelle stattfinden kann. Im weiteren Verlauf der Informationsweiterleitung binden freigesetzte Neurotransmitter (NT) an Rezeptoren der postsynaptischen Membran, was informationsweiterleitende Prozesse und gegebenenfalls die Auslösung eines Aktionspotentials im nachfolgenden Neuron nach sich zieht.



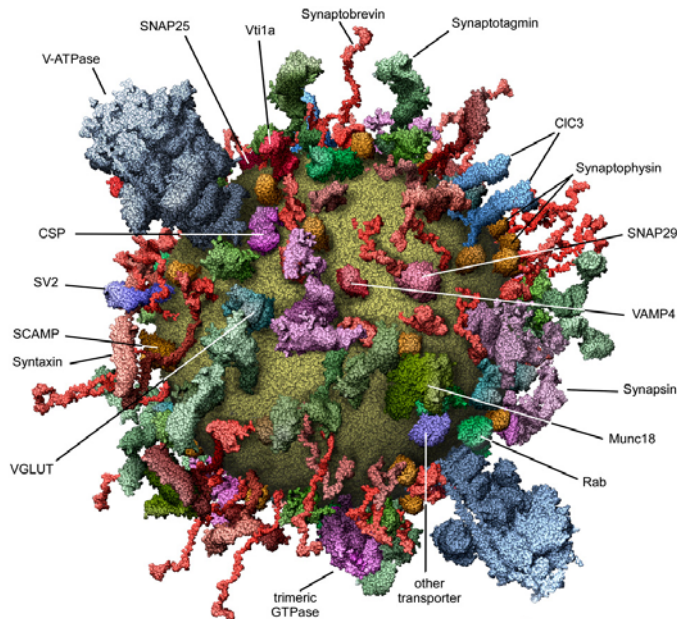
**Abb. 1 Chemische Synapse**

Schematische Darstellungen einer chemischen Synapse (a) und der Exozytose synaptischer Vesikel (b). Elektronenmikroskopische Aufnahme einer chemischen Synapse (c). Die Pfeile markieren den synaptischen Spalt. Copyright © 2009 Pearson Education, Inc.

## 1.2 Vesikelzyklus und Vesikelentleerung

Synaptische Vesikel sind spezialisierte Organellen mit einem Durchmesser von ca. 40-80 nm (Takamori *et al.*, 2006), die sich in der Präsynapse konzentrieren. Ein aktuelles Modell eines synaptischen Vesikels ist in Abb. 2 dargestellt. Die synaptische Antwort auf die aus einem Vesikel freigesetzten Neurotransmitter wird als

Neurotransmitterquantum definiert (Del Castillo & Katz, 1956). Eine große Anzahl von spezifischen SV-Proteinen, manche mit hoher Kopienzahl, ist für wiederholte Zyklen der Exo- und Endozytose notwendig (Schweizer *et al.*, 1995). Eine zentrale Rolle kommt dabei Synaptotagmin und den Proteinen des SNARE-Komplexes (englische Abk. für: soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor) zu (Gundelfinger *et al.*, 2003). Dabei wird angenommen, dass der SNARE-Komplex die Fusion von Vesikel- und Plasmamembran katalysiert. Ein aktuelles Modell der Exozytose von SV ist in Abb. 3 dargestellt (zur Übersicht: (Chen & Scheller, 2001; Fernandez-Chacon & Sudhof, 1999; Jahn & Sudhof, 1999; Sudhof, 2004)).

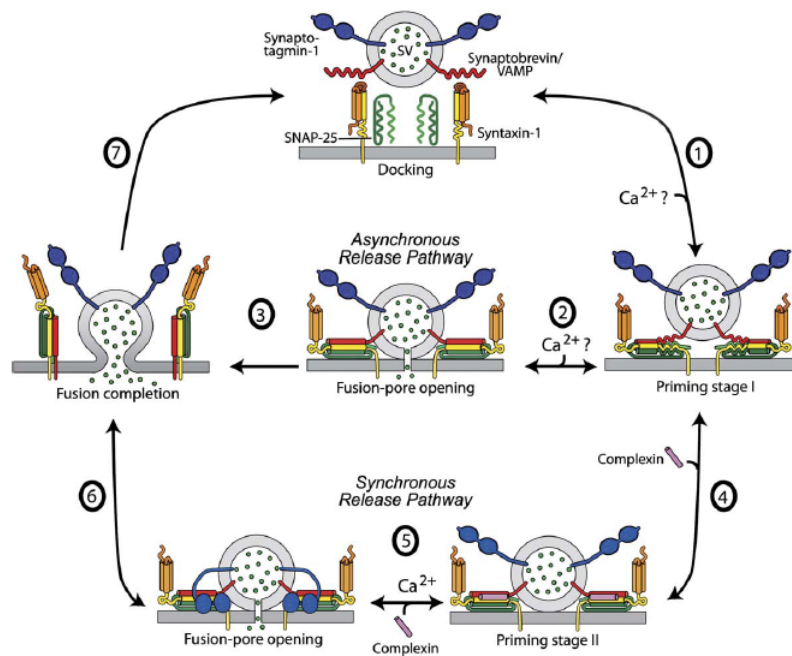


**Abb. 2 Synaptisches Vesikel**

Quantitatives Molekularmodell eines sekretorischen glutamatergen synaptischen Vesikels. Dargestellt sind die häufigsten synaptischen Proteine, die ca. 2/3 der experimentell bestimmten Proteinmasse bilden. Entnommen aus (Takamori *et al.*, 2006).

Zunächst werden die Vesikel unter Beteiligung des Zytoskeletts in die Nähe der „aktiven Zone“ transportiert und an der Plasmamembran verankert (*docking*). Der genaue Ablauf auf molekularer Ebene ist nicht näher aufgeklärt. Anschließend bildet sich der SNARE-Komplex, bestehend aus den SNARE-Proteinen (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptors*). Vesikelmembranständiges Synaptobrevin (VAMP2, *vesicle associated membrane protein 2*), welches eine essentielle Funktion bei der Vesikelfusion einnimmt (Schiavo *et al.*, 1992), sowie plasmamembranständiges Syntaxin 1 und SNAP25 bilden den SNARE-Komplex. Dieser ATP-abhängige Prozess erfordert die Anwesenheit mehrerer regulatorischer Proteine und wird als *priming* bezeichnet. Eine Stabilisierung des entstandenen SNARE-Komplexes wird durch die kalziumabhängige Interaktion mit Complexinen herbeigeführt. Durch diesen Vorgang entstehen akut fusionsfähige Vesikel, deren Anteil als *ready releasable pool* (RRP) definiert wird (Schikorski & Stevens, 1997; Schikorski & Stevens, 2001). Allerdings ist der RRP im Vergleich zum gesamten Vesikel-Repertoire sehr gering. Für die vollständige Verschmelzung von Vesikel- und Plasmamembran wird Kalzium benötigt (Neher & Zucker, 1993). Ein Anstieg der lokalen Kalziumkonzentration wird vermutlich durch das integrale SV-Protein Synaptotagmin detektiert, welches durch die Wechselwirkung mit dem ternären SNARE-Komplex und Phospholipiden der Plasmamembran die Fusion der beiden

Membranen und damit die Freisetzung der Neurotransmitter in den „Synaptischen Spalt“ induziert (Brose *et al.*, 1992; Fernandez-Chacon *et al.*, 2001; Pang *et al.*, 2006). Anschließend werden die Komponenten des SNARE-Komplexes durch die ATPase NSF (*Nethylmaleimidesensitive factor*) unter ATP-Verbrauch in Anwesenheit von NSF-Adapterprotein  $\alpha$ -SNAP dissoziiert und anschließend regeneriert (Jahn, 1999).



**Abb. 3 Modell der SNARE-vermittelten Vesikelfusion**

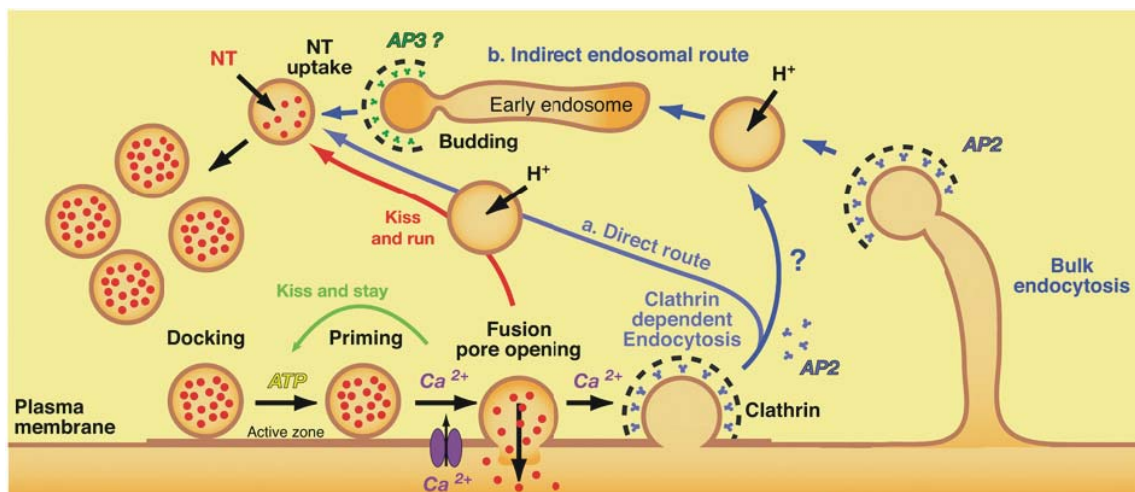
An die Plasmamembran angelagerte Vesikel (*Docking*) (oben) werden durch Bildung des SNARE-Komplexes fest an der Plasmamembran verankert (*Priming*) (1). Für den weiteren Verlauf der Exozytose existieren zwei Modelle, in denen der Kalzium-Sensor Synaptotagmin eine unterschiedliche Rolle spielt. Im *Synchronous Release Pathway* wird der SNARE-Komplex kalziumabhängig von Complexinen stabilisiert und geht in einen metastabilen Zustand über (*Priming II*) (4).  $\text{Ca}^{2+}$ -Moleküle interagieren nach einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit Synaptotagmin, das nachfolgend an den SNARE-Komplex und Phospholipide bindet. Die Dissoziation von Complexinen führt schließlich zur Vesikelfusion mit der Plasmamembran (5-6). Der *Asynchronous Release Pathway* geht von Synaptotagmin-unabhängiger Vesikelfusion aus (2-3). Anschließend dissoziiert der SNARE-Komplex und die Moleküle stehen für einen weiteren Zyklus der Vesikelfusion zur Verfügung (7). Entnommen aus (Tang *et al.*, 2006)

Ein weiteres Vesikelprotein, das in diesem Zusammenhang diskutiert wird, ist das membranintegrierte Glykoprotein Synaptophysin. Die Komplexbildung mit Synaptobrevin (Synaptobrevin-Synaptophysin-Komplex) gilt als eine wichtige Interaktion (Calakos & Scheller, 1994; Edelman *et al.*, 1995; Washbourne *et al.*, 1995) weshalb Synaptophysin als Modulator für die Verfügbarkeit von Synaptobrevin diskutiert wird (Edelman *et al.*, 1995). Mit einem Vorkommen von 6-8% gehört Synaptophysin zu den häufigsten Vesikelproteinen. Trotz dieser Abundanz sind Synaptophysin-Deletionsmutanten lebensfähig und zeigen keine schwereren phänotypischen Auffälligkeiten (Eshkind & Leube, 1995; McMahon *et al.*, 1996). Als

weitere Interaktionspartner wurden u.a. Dynamin 1 und die vesikuläre Protonenpumpe V-ATPase identifiziert (Daly *et al.*, 2000; Daly & Ziff, 2002; Galli *et al.*, 1996; Thomas & Betz, 1990). Als cholesterinbindendes Protein assoziiert Synaptophysin mit cholesterinreichen Mikrodomänen der synaptischen Vesikelmembran und trägt neben einer Separierung von Plasmamembran- und SV-Membranbestandteilen zur Stabilisierung des hohen Krümmungsgrades der Membran synaptischer Vesikel bei (Thiele *et al.*, 2000). Weitreichende Anwendung findet Synaptophysin vor allem in endokrinen Geweben und Tumoren als Markerprotein für Synapsen bzw. SV (Wiedenmann *et al.*, 1986).

### 1.3 Sortierung synaptischer Vesikel

Für die Funktionalität der Synapse ist nach vorangegangener Exozytose eine präzise und effiziente Rezyklierung synaptischer Vesikel durch die Endozytose erforderlich. Dadurch wird sichergestellt, dass die Vesikel für weitere exozytotische Prozesse zur Verfügung stehen (Abb. 4).

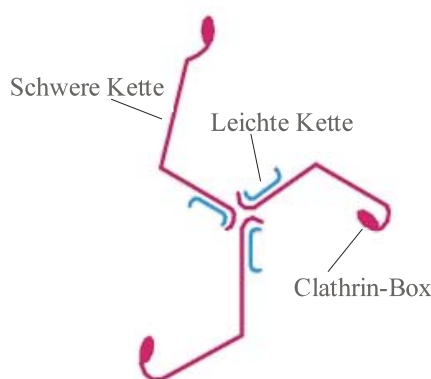


**Abb. 4 Synaptischer Vesikel-Zyklus am synaptischen Endknöpfchen**

Nach einem Zyklus der Vesikelentleerung werden SV über verschiedene Möglichkeiten endozytiert. Falls SV nicht vollständig mit der Plasmamembran verschmelzen, sondern eine transiente Fusionspore bilden, können sie über einen schnellen *Kiss and Run*-Weg (rot) oder einen *Kiss and Stay*-Weg rezykliert werden. Bei vollständiger Fusion mit der Plasmamembran werden SV Clathrin-abhängig mit Hilfe von AP2 endozytiert. Außerdem ist die *Bulk*-Endozytose dargestellt. In beiden Fällen werden SV entweder über den direkten Weg (a) mit NT gefüllt oder aber indirekt (b) über eine endosomale Zwischenstufe, in die möglicherweise AP3 involviert ist. So wurde bereits in PC12-Zellen gezeigt, dass AP3 die Bildung von SV aus Endosomen vermittelt. Entnommen aus (Danglot & Galli, 2007).

Die Entfernung bzw. Rückgewinnung synaptischer Vesikelproteine und -lipide aus der präsynaptischen Membran kann auf verschiedene Weise erfolgen. Gegenwärtig werden zwei Modelle der Exozytose und der darauffolgenden Endozytose diskutiert. Im klassischen Modell erfolgt eine vollständige Fusion des Vesikels mit der

präsynaptischen Membran, wobei die Rückgewinnung der Vesikelmembran über die Clathrin-vermittelte, kompensatorische Endozytose (CME) verläuft. In dem sogenannten *Kiss and Run*-Modell fusioniert das Vesikel vorübergehend mit der Membran, die Integrität des Vesikels bleibt erhalten und die Neurotransmitter werden über eine transiente Fusionspore in den Synaptischen Spalt entlassen, ohne dass eine Vermischung der Vesikelproteine und -lipide mit denen der Plasmamembran erfolgt. Das synaptische Vesikel wird im Bereich der aktiven Zone innerhalb weniger hundert Millisekunden bis zu wenigen Sekunden Clathrin-unabhängig regeneriert oder direkt an der aktiven Zone mit Neurotransmittern befüllt und somit zyklisiert (*Kiss and Stay*) (Rizzoli & Jahn, 2007; Sudhof, 2004). Auf molekularer Ebene sind der *Kiss and Run*- und *Kiss and Stay*-Mechanismen jedoch weitgehend unverstanden (Gundelfinger *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu dauert die CME länger (einige Sekunden bis Minuten). Clathrin, ein Hetero-Hexamer, bildet aus insgesamt 6 Untereinheiten die Form eines Triskelions (Smith & Pearse, 1999) (Abb. 5). An seinem Clathrin-Box-Motiv können verschiedene Proteine binden (Owen & Luzio, 2000), z.B. Adapterproteine. Außerdem kann Clathrin Kalzium binden, was möglicherweise die Bildung der Clathrin-Hülle beschleunigt (Nathke *et al.*, 1990; Ungewickell & Ungewickell, 1991). Die Vesikel-Abschnürung erfolgt, indem eine polyhedrale, kugelartige Clathrinhülle um das entstehende Vesikel gebildet wird.



**Abb. 5 Darstellung eines hexameren Clathrin-Triskelions.**

Das Hexamer wird durch Oligomerisierung von 3 schweren Ketten mit 3 leichten Ketten gebildet. Ein Clathrin-Box-Motiv an den N-terminalen Enden der schweren Ketten dient der Bindung Clathrin-assoziierender Proteine. Entnommen aus (Lodisch *et al.*, 2000).

Die Bildung dieser Clathrin-Hülle setzt die Anwesenheit von Adaptermolekülen (AP-Komplexe wie z.B. AP2 und monomere Adaptoren wie AP180, epsin und HIP1) voraus (Brett *et al.*, 2002; Collins *et al.*, 2002; Robinson, 2004). Diese Adapterkomplexe

werden mittels spezifischer Rezeptoren an die Plasmamembran rekrutiert. Dort vermitteln die Adaptermoleküle sowohl die Bindung an die Vesikelmembran als auch an Clathrin. Lipide, insbesondere Phosphoinositide (Brett *et al.*, 2002; Di Paolo *et al.*, 2004; Ford *et al.*, 2002; Gaidarov & Keen, 1999; Krauss *et al.*, 2003; Rohde *et al.*, 2002) und Kargo-Proteine (De Camilli *et al.*, 2001b; Haucke & De Camilli, 1999) spielen eine wichtige Rolle für die räumlich und zeitlich abgestimmte Bildung der Clathrin-Hülle an der Synapse. Die Interaktion von AP2 mit PIP2 und dem multimeren SV- und Plasmamembranprotein Synaptotagmin führt zur Rekrutierung sowohl von AP2 als auch Clathrin an die Plasmamembran (Gaidarov & Keen, 1999; Grass *et al.*, 2004; Haucke *et al.*, 2000; Jorgensen *et al.*, 1995; Littleton *et al.*, 2001; Rohde *et al.*, 2002). Überdies wird die Hüllbildung anscheinend durch weitere Kargo-Proteine mit endozytotischen Motiven unterstützt, indem sich positiv auswirkende Interaktionen zwischen diesen Motiven, AP2 und Synaptotagmin bilden (Haucke & De Camilli, 1999; Takei & Haucke, 2001).

Für die Abschnürung (*fission*) des Vesikels ist die GTPase Dynamin verantwortlich. Dieses Molekül polymerisiert am „Hals“ des entstehenden Vesikels und schnürt es unter Freisetzung von GDP von der Plasmamembran ab. Für die Beteiligung an der Abschnürung werden andere Proteine, wie z.B. Synaptojanin oder Endophilin, das eine Rolle in der Membraninvagination spielen kann, diskutiert (Ringstad *et al.*, 1999; Sever *et al.*, 1999; Takei *et al.*, 1999).

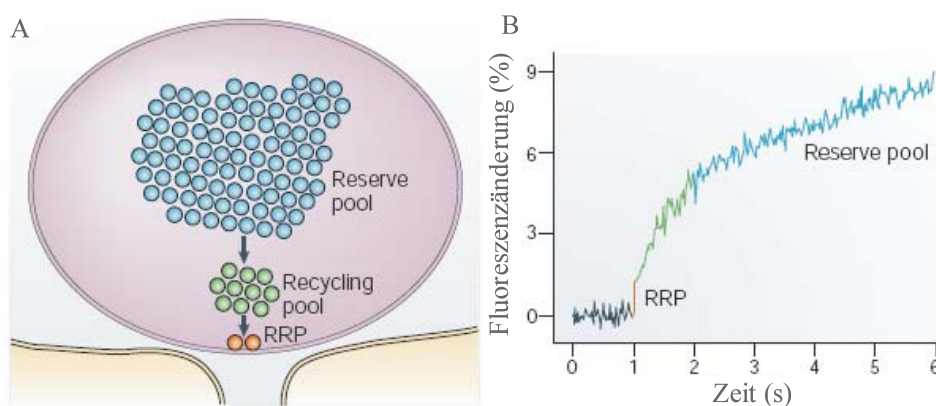
Obwohl der *kiss and run*-Mechanismus als alternativer Endozytose-Route diskutiert wird, gilt nach wie vor die CME als Hauptweg des präsynaptischen Vesikel-Zyklierens (Jung & Haucke, 2007). Die Deletion von Clathrin-Adapterproteinen (Gonzalez-Gaitan & Jackle, 1997; Zhang *et al.*, 1998) oder von essentiellen Kofaktoren in der CME (Di Paolo *et al.*, 2002; Dickman *et al.*, 2005) reduzieren in den verschiedensten Modellorganismen massiv die Fähigkeit von Neuronen, funktionelle SV zu rezyklieren. Gleiches gilt für Proteine, die an der Regulierung des Phosphorylierungszustandes von Phosphoinositiden beteiligt sind (Di Paolo & De Camilli, 2006). Überdies sind SV-Proteine, die exozytiert und anschließend endozytiert werden, nicht identisch (Fernandez-Alfonso *et al.*, 2006; Wienisch & Klingauf, 2006). Dies impliziert, dass SV während eines Vesikel-Zyklus vollständig mit der Plasmamembran fusionieren und weniger im *kiss and run*-Zyklus endozytiert werden.

Ein weiterer Endozytoseweg findet über die sogenannte *Bulk*-Endozytose statt. Hierbei werden in Nervenendigungen große Bereiche der Plasmamembran in einem eingestülpt und endozytiert. Erstmals beschrieben von Takei und anderen (Takei *et al.*, 1996) wurde diese Art der Endozytose als „Notfall“-Kompensationsmechanismus propagiert (Royle & Lagnado, 2003). Neueste Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass die *Bulk*-Endozytose zum Standardrepertoire endozytotischer Mechanismen gehört (Clayton *et al.*, 2007; Leenders *et al.*, 2002; Lenzi *et al.*, 2002). Innerhalb von Sekunden können große Bereiche der präsynaptischen Membran eingestülpt werden (Teng *et al.*, 2007). Es bildet sich eine Vakuolen-ähnliche Struktur, die noch einige Zeit nach Stimulation an der Plasmamembran haften kann (Gad *et al.*, 1998). Von dieser Struktur können sich mehrmals einzelne SV abschnüren (Takei *et al.*, 1996). Besonders nach hoch-frequenter Stimulation, wenn die endozytotische Fracht erhöht ist, scheint dieser Mechanismus eine Rolle zu spielen (Holt *et al.*, 2004; Takei *et al.*, 1996).

Obwohl alle SV einer synaptischen Endigung in elektronenmikroskopischen Aufnahmen ähnlich erscheinen, unterscheidet man aufgrund unterschiedlicher Fusionsbereitschaft und Lokalisation 3 Vesikel-Populationen (Abb. 6). Wie bei Rizzoli und Betz (Rizzoli & Betz, 2005) wird in dieser Arbeit der *Readily Releasable Pool* (RRP) als die Summe synaptischer Vesikel definiert, die bei Stimulation sofort zur Verfügung stehen. Im Elektronenmikroskop können angedockte Vesikel in der Nähe der präsynaptischen Plasmamembran gesehen werden (De Camilli *et al.*, 2001a). Überraschenderweise korrelieren diese Vesikel jedoch nicht mit dem RRP, welcher scheinbar zufällig über die gesamte Anhäufung von Vesikeln in der synaptischen Endigung verteilt ist (Rizzoli & Betz, 2004). Die fusionskompetenten Vesikel des RRP können ihren Inhalt innerhalb von Millisekunden nach Stimulation freisetzen (Mennerick & Matthews, 1996; Neves & Lagnado, 1999). Bartoletti und andere (Bartoletti *et al.*, 2010) zeigten in Ribbonsynapsen aus Zapfen des Salamanders, dass sich etwa 20 Vesikel im RRP befinden, so dass der RRP nach moderater Stimulation schnell aufgebraucht ist. Der *Recycling Pool* wird hier als eine Ansammlung von synaptischen Vesikeln definiert, die im Falle einer moderaten (physiologischen) Stimulation an die Plasmamembran rekrutiert werden und NT ausschütten. Es wird vermutet, dass sich 5-20% aller Vesikel in diesem Pool ansammeln (Harata *et al.*, 2001a; Rizzoli & Betz, 2005). Stimulationen in physiologischen Frequenzen führen dazu, dass dieser Pool fortlaufend rezykliert (de Lange *et al.*, 2003; Harata *et al.*, 2001b;



Kuromi & Kidokoro, 2003; Richards *et al.*, 2003) und mit neu endozytierten Vesikeln wieder aufgefüllt wird. Der *Reserve Pool* wird als ein Bestand synaptischer Vesikel definiert, die nur nach extensiver synaptischer Stimulation NT in den synaptischen Spalt entleeren. Diese Vesikel bilden die Mehrheit (80-90%) der Vesikel in den meisten synaptischen Endigungen und werden äußerst selten oder nie während physiologischer Aktivität rekrutiert (Harata *et al.*, 2001a; Harata *et al.*, 2001b). Dieser Pool bildet eine Art Reserve bei erhöhtem Neurotransmitterbedarf und wird überwiegend dann ausgeschüttet, wenn der *Recycling Pool* geleert ist (Richards *et al.*, 2000; Richards *et al.*, 2003; Sudhof, 2000).



**Abb. 6 Schematische Darstellung der postulierten Vesikelpools**

A) Klassisches Modell, bestehend aus 3 Vesikelpools. Der *Reserve Pool* beinhaltet den größten Teil der Vesikel (80-90%), der *Recycling Pool* ist um einiges kleiner. Der *Readily Releasable Pool* (RRP) besteht nur aus wenigen Vesikeln (~1%), die an der Plasmamembran fusionskompetent anlagern. B) Ausschüttungskinetiken am Beispiel von depolarisierenden Bipolaren Zellen des Goldfisches. Die Zellen wurden in Anwesenheit von Fluoreszenz-Farbstoff FM1-43 stimuliert. Exozytose wird direkt über einen Anstieg in der Fluoreszenz gemessen. Entnommen aus (Rizzoli & Betz, 2005).

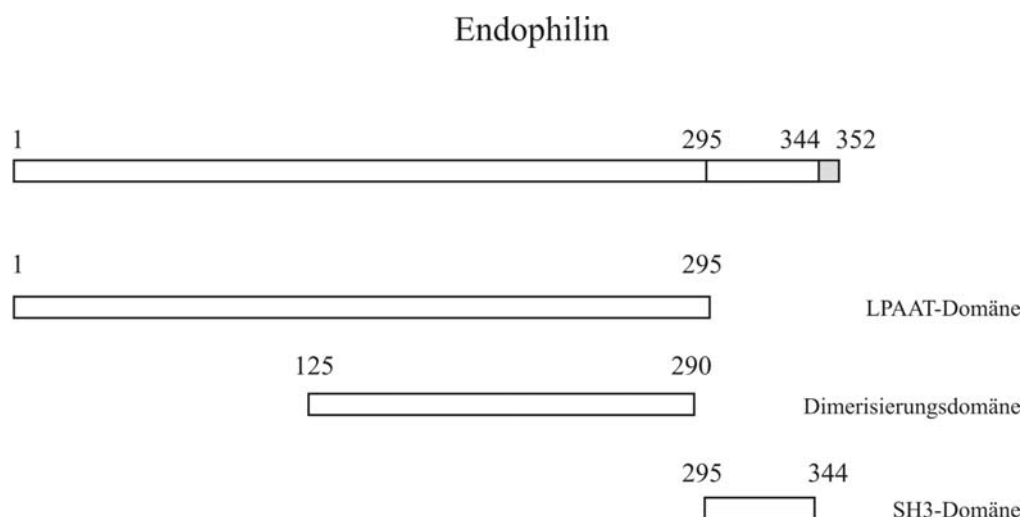
Wahrscheinlich sind an der Aufrechterhaltung der beschriebenen Vesikelpools die oben beschriebenen Rezyklierungsmechanismen beteiligt. Vermutlich trägt der *Kiss and Run*-Mechanismus zu einer Auffüllung des *Recycling Pools* bei, während die CME eher für die Befüllung des *Reserve Pools* mitverantwortlich ist. Vesikel des *Recycling Pools* könnten bei extensiver synaptischer Stimulation auch direkt aus dem *Reserve Pool* aufgefüllt werden (zur Übersicht: (Gundelfinger *et al.*, 2003)).

## 1.4 Auswahl weiterer Proteinkomponenten des Vesikeltransports

### 1.4.1 Endophilin

Endophiline sind während der Endozytose an der Vesikelbildung der Membran beteiligt. Von Endophilinen sind zwei Untergruppen A und B mit gleicher

Domänenstruktur und mehreren Isoformen sowie Splicevarianten bekannt (Modregger *et al.*, 2003; So *et al.*, 2000). Endophiline besitzen eine katalytische, Lipid-bindende Domäne am N-Terminus, eine zentrale Dimerisierungsdomäne und eine C-terminale SH3-Domäne (Giachino *et al.*, 1997; Ringstad *et al.*, 1997) (Abb. 7). An die SH3-Domäne von Endophilin A1 und A3 binden verschiedene endozytotische Proteine, u.a. Synaptojanin 1, Amphiphysine 1 und 2, Dynamin, Synapsin (de Heuvel *et al.*, 1997; Micheva *et al.*, 1997; Ringstad *et al.*, 1997). Während Endophilin B1 Prozesse an intrazellulären Membranen vermittelt und nicht an Synaptojanin 1 oder Synapsin 1 bindet (Modregger *et al.*, 2003), sind Endophilin A1 und A3 essentiell für die Endozytose an der Plasmamembran und stabilisieren u.a. die Hüllenbildung von Clathrin (Guichet *et al.*, 2002). So zieht z.B. die Wechselwirkung mit Synaptojanin eine beschleunigte Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu Phosphatidylinositol nach sich (Gad *et al.*, 2000). Aus der Interaktion mit Dynamin folgt eine beschleunigte Abschnürung der Vesikel von der Plasmamembran (Micheva *et al.*, 1997; Ringstad *et al.*, 1999). Im Jahr 2006 wurde der C-Terminus von VGlut1 als Interaktionspartner der SH3-Domäne von Endophilin identifiziert (De Gois *et al.*, 2006; Vinatier *et al.*, 2006; Voglmaier *et al.*, 2006). Endophilin rekrutiert möglicherweise VGlut1 für die schnell verlaufende, Clathrin/AP2-vermittelte Endozytose im Gegensatz zur langsameren, AP3-vermittelten Vesikelbildung über endosomale Zwischenprodukte (Voglmaier *et al.*, 2006).



**Abb. 7 Darstellung des modularen Aufbaus von Endophilin**

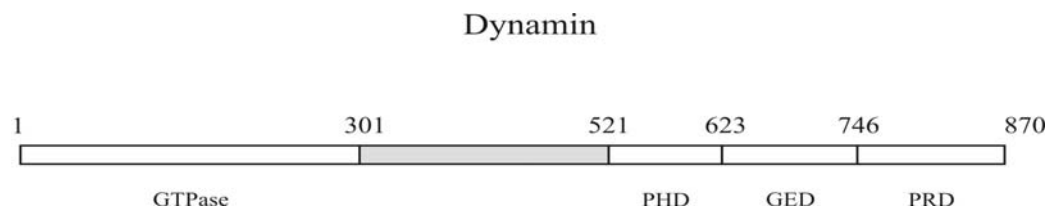
Am N-Terminus befindet sich eine Lipid-Bindedomäne mit (Lysophosphatidylsäure-Acyltransferase- (LPAAT-) Aktivität, zur Modifikation von Membranlipiden. Am zentralen *coiled-coil* Bereich erfolgt die Dimerisierung des Proteins. Der C-Terminus besitzt eine SH3-Domäne, die als Bindedomäne für prolinreiche Sequenzen, z.B. von Dynamin, Synaptojanin oder VGlut1 dient.

## 1.4.2 Dynamin

Dynamin ist eine große GTPase und erfüllt eine wesentliche Funktion bei der Abschnürung Clathrin-umhüllter Vesikel während der Endozytose (zur Übersicht: (Mettlen *et al.*, 2009; Schmid *et al.*, 1998)). Das neuronenspezifische Dynamin 1 gehört zu einer Proteinfamilie mit insgesamt 3 Isoformen, von denen jedes zusätzliche Splicevarianten mit unterschiedlicher Gewebespezifität (Schmid *et al.*, 1998) und intrazellulärer Verteilung (Cao *et al.*, 1998; McNiven *et al.*, 2000) besitzt.

Dynamin besitzt neben einer N-terminalen GTPase-Domäne eine in der C-terminalen Hälfte liegende PH-Domäne (*Pleckstrin-Homology-Domäne*), die Interaktionen mit Membranlipiden vermittelt (Salim *et al.*, 1996). An der PH-Domäne befindet sich eine GED-Domäne (*GTPase-effector-domain-Domäne*), die eine Erhöhung der GTPase Aktivität verursacht, indem sie nach Oligomerisierung des Proteins direkt mit der GTPase-Domäne interagiert (Muhlberg *et al.*, 1997). Am C-Terminus liegt ebenfalls eine prolinreiche Sequenz, die Bindungen an SH3-Domänen, z.B. die des Endophilins, vermittelt (Okamoto *et al.*, 1997) (Abb. 8). Zusammengesetztes Dynamin befähigt Liposomen dazu, Tubuli zu formen und aufzulösen (Sweitzer & Hinshaw, 1998; Takei *et al.*, 1998). Dynamin ist für Abschnürungsprozesse Clathrin-umhüllter Vesikel essentiell (Hinshaw & Schmid, 1995; Marks *et al.*, 2001; Sweitzer & Hinshaw, 1998; Zhang & Hinshaw, 2001). Allerdings ist die Funktion von Dynamin bis heute nicht eindeutig geklärt. Ältere Modelle gehen von Dynamin-Tetrameren aus, die ringförmig um das abzuschnürende Vesikel polymerisieren (Hinshaw & Schmid, 1995; Muhlberg *et al.*, 1997). Nachfolgend bewirkt eine GTP-Hydrolyse eine Konformationsänderung des Dynamins womit der Abstand zwischen den einzelnen Dynaminproteinen vergrößert wird und sich das Vesikel von der Plasmamembran löst. Die Bedeutung der GTPase-Domäne konnte durch die Überexpression eines konstitutiv GTPase-defizienten Dynamins in Säugerzellen gezeigt werden. Als Folge wird die Rezeptor-vermittelte Endozytose inhibiert (Urrutia *et al.*, 1997; Warnock & Schmid, 1996). In anderen Modellen dient Dynamin als molekularer Schalter für andere Proteine, welche als Effektoren die Trennung von Vesikel und Plasmamembran bewirken (Takei *et al.*, 1999). Für dieses Modell spricht, dass Dynamin nicht allein am Vesikelhals lokalisiert ist, sondern dort auch andere Proteine wie z. B. Amphiphysin und Endophilin vorzufinden sind. Amphiphysin, ein zytosolisches Protein, bindet Clathrin, AP2 und Dynamin (De Camilli *et al.*, 2001b) und erleichtert *in vitro* Dynamin-vermittelte Liposomen-Fragmentierung (Takei *et al.*, 1999). Ein neueres Modell vertritt die

Ansicht, dass Dynamin als Mechanoenzym auftritt. Es wird angenommen, dass der Einschnürungsprozess durch die Bildung von Dynaminringen induziert und ebenfalls eine längsgerichtete Zugspannung am Vesikelhals generiert wird. Die finale Vesikelabschnürung wird durch das Zusammenwirken dieser Faktoren katalysiert. Auch hier wird davon ausgegangen, dass an diesem Prozess weitere Faktoren beteiligt sind (Roux *et al.*, 2006).



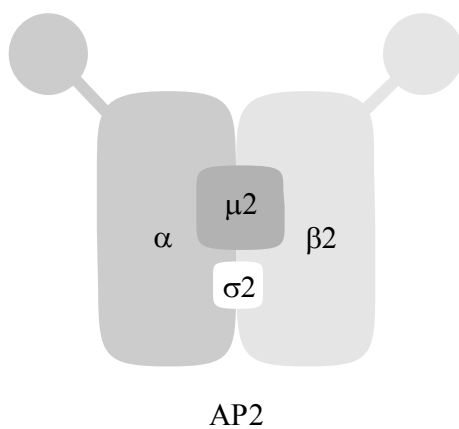
**Abb. 8 Schema des modularen Aufbaus von Dynamin**

Die GTPase, deren Domäne am N-Terminus liegt, führt zu Einschnürungsprozessen während der Vesikelabschnürung und wird durch die eher C-terminal liegende GED (*GTPase effector-domain*)-Domäne beeinflusst. Eine PHD (*Pleckstrin-Homology-domain*)-Domäne dient der Interaktion mit Membranlipiden und die C-terminale, prolinreiche Domäne (PRD) bindet z.B. an die SH3-Domäne von Endophilin.

### 1.4.3 Adapterproteine

Neben Clathrin gehören Clathrin-Adapterproteinkomplexe zu den wichtigsten Komponenten der Endozytose. Da Clathrin nicht direkt mit der Plasmamembran interagieren kann, vermitteln Adapterproteine die Bindung der Clathrinhülle an die Plasmamembran. Je nach Membrantyp und Transportweg werden dafür unterschiedliche Adaptermoleküle benötigt. Bisher wurden in Säugertieren 4 Arten beschrieben: AP1, AP2, AP3 und AP4 (Le Borgne & Hoflack, 1998; Robinson & Bonifacino, 2001). Während AP1 an der Bildung von Clathrin-umhüllten Vesikeln (CCVs) am Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) beteiligt ist, vermittelt AP2 die Bildung von CCVs an der Plasmamembran (Ahle *et al.*, 1988; Robinson & Pearse, 1986). AP3, welches ubiquitär als AP-3A und Neuronen-spezifisch als AP3-3B-Isoform exprimiert wird, lokalisiert sowohl am TGN als auch an Endosomen. Eine mögliche Interaktion mit Clathrin ist umstritten. Einerseits konnten *in vitro* Versuche und kristallografische Studien die Bindung an Clathrin bestätigen (Dell'Angelica *et al.*, 1998; ter Haar *et al.*, 2000), andererseits wurde in Präparationen von CCVs kein AP3 detektiert (Simpson *et al.*, 1996). Außerdem zeigten genetische Studien in der Hefe, dass AP3 an Clathrin-unabhängigen Transportwegen beteiligt ist (Panek *et al.*, 1997; Vowels & Payne, 1998). AP4 lokalisiert am TGN und interagiert offenbar nicht mit Clathrin (Dell'Angelica *et al.*, 1999; Hirst *et al.*, 1999; Simpson *et al.*, 1999).

Alle Adapterproteine liegen als Tetramer vor und bestehen aus jeweils zwei großen Untereinheiten ( $\alpha/\gamma/\delta/\varepsilon$ -Adaptin und  $\beta_{1,2,3,4}$ -Adaptin), einer mittleren Untereinheit ( $\mu_{1,2,3,4}$ -Adaptin) und einer kleineren Untereinheit ( $\sigma_{1,2,3,4}$ -Adaptin) (Hirst & Robinson, 1998; Hirst *et al.*, 1999; Takei & Haucke, 2001). Die analogen Untereinheiten ähneln sich in ihrer Struktur und besitzen möglicherweise ähnliche Funktionen. So wird z.B. die Bindung an Clathrin über die  $\beta$ -Adaptin Untereinheit vermittelt (Ahle & Ungewickell, 1989; Dell'Angelica *et al.*, 1998; Gallusser & Kirchhausen, 1993; Shih *et al.*, 1995). Die  $\gamma$ - bzw.  $\alpha$ -Untereinheit vermitteln die Assoziation mit der TGN- bzw. Plasmamembran (Robinson, 1993) und können ebenfalls an Clathrin binden (Prasad & Keen, 1991) (Abb. 9).



**Abb. 9 Schematische Übersicht über den molekularen Aufbau der Adapterproteine 1-4 am Beispiel von AP2**

Adaptorproteine bestehen aus zwei je 100 kDa schweren Untereinheiten  $\alpha$ - und  $\beta$  (1-4)-Untereinheiten, einer 50 kDa schweren Untereinheit  $\mu$ (1-4) und einer 19 kDa schweren Untereinheit  $\sigma$  (1-4). Die beiden größeren Untereinheiten bilden über flexible Verbindungsbereiche „Ohr-ähnliche“ Strukturen. Abgewandelt nach (Dell'Angelica *et al.*, 1999).

Die unterschiedlichen Adapterproteine hängen mit verschiedenen Sortierungswegen von Proteinen zusammen. AP3 ist in die Sortierung von Proteinen in die Vakuole bzw. in das Lysozym in Hefen (Cowles *et al.*, 1997; Stepp *et al.*, 1997), Fliegen (Kretzschmar *et al.*, 2000; Mullins *et al.*, 1999; Ooi *et al.*, 1997) und Säugern (Le Borgne *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2000) involviert. Es wird neben anderen Proteinen mit der *Bulk*-Endozytose in Verbindung gebracht (Voglmaier *et al.*, 2006). Dieser Sortierungsweg beinhaltet die Fusion einzelner SV mit Endosomen, bevor die SV-Membranproteine AP3-abhängig wieder vom endosomalen Kompartiment abgetrennt werden (Newell-Litwa *et al.*, 2007). Obwohl für die Rezyklierung einiger synaptischer Vesikelproteine, wie z.B. VGlut1 oder VGAT1 dieser langsame, AP3-3B-abhängige Weg über endosomale Zwischenprodukte von Bedeutung ist (Nakatsu *et al.*, 2004; Salazar *et al.*, 2005; Seong *et al.*, 2005; Voglmaier *et al.*, 2006), erfolgt in Neuronen Endozytierung vor allem über

den schnelleren Clathrin/AP2-abhängigen Weg (Haucke & De Camilli, 1999). Während eines endozytotischen Prozesses bindet die  $\alpha$ -Untereinheit an Membranlipide (z.B. Phosphoinositole) und rekrutiert dadurch AP2 an die Plasmamembran. Dort fördert es die Polymerisierung von Clathrin. Die fortschreitende Polymerisierung von Clathrin zu einem polyedrischen Gerüst führt zu einer Einkrümmung der Membran. Diese Struktur bezeichnet man als *coated pit* (Hirst & Robinson, 1998; Kirchhausen *et al.*, 1997; Schmid, 1997). Die Sortierung in Clathrin/AP2-umhüllte Vesikel erfolgt über die Bindung von AP2 an bestimmte endozytotische Signalmotive in zytoplasmatischen Domänen von Membranproteinen. Bisher konnten z.B. Tyrosin-haltige oder Leucin-haltige Motive identifiziert werden (Boll *et al.*, 1996; Dell'Angelica *et al.*, 1999; Ohno *et al.*, 1995; Ohno *et al.*, 1996; Sandoval & Bakke, 1994).

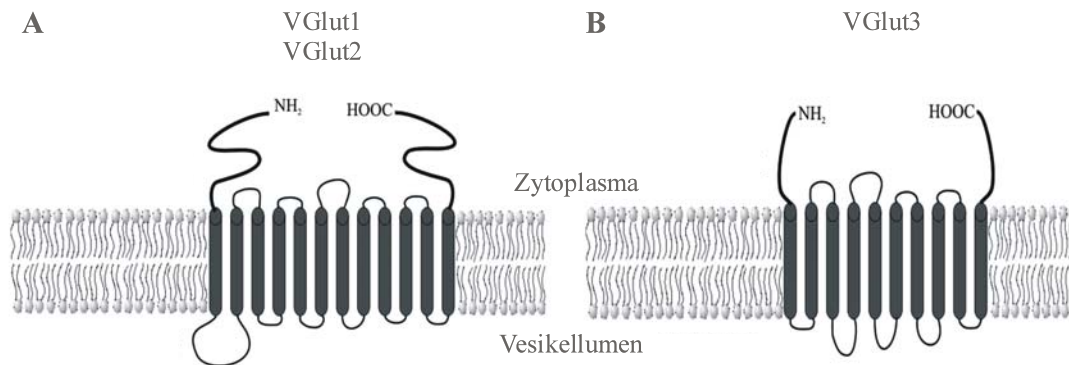
Obwohl AP2 sowohl mit Membranlipiden als auch Proteinkomponenten von Membranen direkt interagieren kann, weisen neuere Untersuchungen auf die Existenz eines spezifischen Bindungsproteins – Synaptotagmin in neuronalen Zellen – hin (Haucke & De Camilli, 1999; Zhang *et al.*, 1994). Neben Clathrin binden u.a. die endozytotischen Proteine AP180, Synaptojanin, Dynamin und Amphiphysin an die  $\alpha$ -Untereinheit von AP2 (Owen *et al.*, 1999; Traub *et al.*, 1999).

#### **1.4.4 AP180/CALM**

Nicht nur AP2 rekrutiert Clathrin an die Plasmamembran, sondern auch AP180, das neben Clathrin auch AP2 und PIP2 binden kann. AP180 ist ein monomeres Mitglied der Adapterproteinfamilie, das zeitweise AP3 genannt wurde (Hao *et al.*, 1999; Kusner & Carlin, 2003). Um Missverständnisse mit dem tetrameren Adaptermolekül AP3 zu vermeiden, wird in dieser Arbeit ausnahmslos die Bezeichnung AP180 verwendet. Bei AP180 handelt es sich um die hirnspezifische Variante des ubiquitär exprimierten verwandten Proteins CALM (*clathrin assembly lymphoid myeloid leukaemia protein*) (Tebar *et al.*, 1999). Beide Proteine fördern den Aufbau der Clathrin-Hülle bei vesikulären Abschnürungsprozessen. Hierfür bindet AP180 an AP2 und Clathrin, wodurch die Assoziation dieser beiden Proteine untereinander verstärkt wird (Ahle & Ungewickell, 1986; Hao *et al.*, 1999). Obwohl ein N-terminales *Clathrin-box*-Motiv in AP180 enthalten ist, erfolgt die Bindung an Clathrin über ein sich wiederholendes DLL-Motiv im C-Terminus (Morgan *et al.*, 2000) (Abb. 10). Die Interaktion von AP180 mit AP2 erfolgt über die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten des AP2-Komplexes (Traub *et al.*, 1999;



(>70% identische Aminosäuren) und zeigen im C-Terminus die größten Differenzen (Liguz-Leczna & Skangiel-Kramka, 2007; Takamori *et al.*, 2002). Während der C-Terminus von VGlut1 z.B. eine prolinreiche Sequenz enthält, ist dies weder für VGlut2 noch VGlut3 der Fall (De Gois *et al.*, 2006; Voglmaier *et al.*, 2006). Neben einer ähnlichen Substratspezifität weisen alle VGluts vergleichbare kinetische und pharmakologische Transportereigenschaften auf (Takamori *et al.*, 2002).



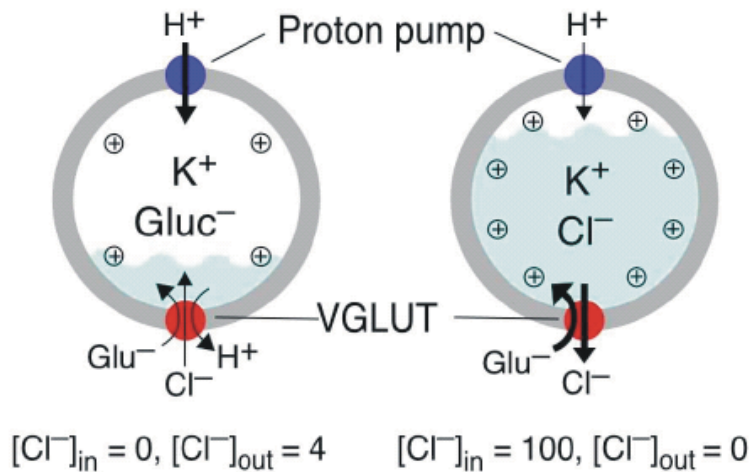
**Abb. 11 Angenommene Struktur vesikulärer Glutamattransporter**

VGlut1 und 2 haben zwölf Transmembrandomänen, VGlut3 besitzt zehn. Beide Termini sind in das Zytosol gerichtet. Entnommen aus (Liguz-Leczna & Skangiel-Kramka, 2007).

Vesikuläre Glutamattransporter benötigen für ein Aktivitätsmaximum geringe zytoplasmatische Chloridkonzentrationen (2-4 mM) (Takamori *et al.*, 2002). Bezüglich ihrer Kinetiken unterschieden sich VGlut1 und VGlut2 kaum (Bellocchio *et al.*, 2000; Takamori *et al.*, 2000); die Affinität für Glutamat ist mit  $K_m$ -Werten in einem Bereich von 1-2 mM gering (Edwards, 2007).

Eine besondere Rolle kommt der ATP-verbrauchenden vakuolären VATPase zu, welche durch den aktiven Transport von Protonen das Vesikellumen azifiziert und gleichzeitig die positive Ladung im Vesikellumen erhöht. Dadurch wird ein elektrochemischer Gradient generiert. Der elektrochemische Gradient besteht aus einer elektrogenen Komponente ( $\Delta\psi$  = Ladungsgradient) und einer chemischen Komponente ( $\Delta\text{pH}$  = Protonengradient). Die resultierende Membranpotentialdifferenz wirkt dabei als Triebkraft für die vesikulären Glutamattransporter. Die Beladung der SV ist somit ATP- und protonenabhängig. Für VGlut1 und VGlut2 spielt anders als z.B. für vesikuläre Monoamintransporter oder den GABA-Transporter die elektrogene Komponente  $\Delta\psi$  eine wichtigere Rolle als die pH-Komponente  $\Delta\text{pH}$  (Maycox *et al.*, 1988, 1990). Für VGlut3 hingegen hängt die Funktionsfähigkeit stärker als für VGlut1 und 2 vom  $\Delta\text{pH}$  ab (Gras *et al.*, 2002). Ein aktuelles Modell zur vesikulären Glutamatbeladung ist in Abb. 12 dargestellt.





**Abb. 12 Aktuelles Modell des Glutamattransports durch VGLut**

Die Glutamataufnahme ist abhängig von der elektrogenen Komponente des elektrochemischen Gradienten. Die Stärke der elektrogenen Komponente ist durch (+) angezeigt. Neben Glutamat wird Chlorid von VGLut1 transportiert. Links: In Abwesenheit von negativer Ladung im Vesikellumen wird der Glutamattransport durch zyttoplasmatisch-vorliegendes Chlorid aktiviert. Der Transport ist überwiegend pH-abhängig, das Vesikel azidifiziert. Rechts: Bei hoher luminaler Chloridkonzentration erleichtert der Chloridausstrom über VGLut1 die  $\Delta\psi$ -vermittelte Glutamataufnahme. Entnommen aus (Schenck *et al.*, 2009).

Unklar ist, unter welchen Bedingungen Glutamat in das SV transportiert wird. Bekannt ist, dass für jedes Glutamatmolekül ein H<sup>+</sup>-Molekül in das Zytoplasma befördert wird. Ob Glutamat im Uniport, Sym- oder Antiport wahlweise mit Chlorid und/oder Protonen transportiert wird und möglicherweise Übergänge zwischen den Modellen existieren, konnte allerdings bisher nicht aufgeklärt werden.

Im adulten ZNS werden VGLut1 und VGLut2 hauptsächlich in glutamatergen Neuronen exprimiert und sind vorrangig komplementär verteilt (Takamori *et al.*, 2002). Im Hippokampus, Cerebellum und Cortex wird vor allem VGLut1mRNA exprimiert, wohingegen im Hirnstamm, Thalamus und Hypothalamus sowie in tiefen Kleinhirnkernen überwiegend mRNA für VGLut2 detektierbar ist (Fremeau *et al.*, 2001). VGLut3 folgt nicht dem Verteilungsmuster der anderen VGLut-Isoformen und befindet sich auch in nicht-glutamatergen Neuronen, wie z.B. auch in serotonergen Neuronen der Raphekerne, in cholinergen Neuronen im Striatum oder in GABAergen Neuronen des Hippokampus (Fremeau *et al.*, 2002; Herzog *et al.*, 2004; Takamori *et al.*, 2002). Gelegentlich finden sich VGLut1 und VGLut2 in frühen Entwicklungsstadien im gleichen Neuron (Herzog *et al.*, 2006).

Während VGLut1-Deletionsmutanten bedingt lebensfähig sind und neben starken neurologischen Beeinträchtigungen eine defekte glutamaterge Signalweiterleitung

aufweisen, sterben Deletionsmutanten von VGlut2 bereits bei der Geburt. Beides spricht für den essentiellen Charakter der glutamatergen Neurotransmission.

Momentan wird angenommen, dass im Durchschnitt ca. 10 Kopien der vesikulären Glutamatransporter auf einem Vesikel zu finden sind (Takamori *et al.*, 2006). Allerdings ist für die Füllung des Vesikels eine Kopie ausreichend (Daniels *et al.*, 2006). Ob dieser Überschuss an Neurotransmittertransportern als eine Art Sicherheitsnetz für die funktionelle Rolle des SV verwendet wird, eine höhere Befüllungsgeschwindigkeit nach sich zieht oder durch Ungenauigkeiten während der Rezyklierung des SV entsteht, ist unbekannt. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass VGlut1 direkt mit dem endozytotischen Apparat interagieren kann. VGlut1 bindet über seine C-terminale prolinreiche Sequenz an die SH3-Domäne des Endophilin 1. Die Bindung an Endophilin erlaubt möglicherweise in Konkurrenz mit der langsameren AP3-vermittelten Endozytose eine Sortierung in die schnellere AP2-vermittelte Endozytose (De Gois *et al.*, 2006; Voglmaier *et al.*, 2006). Möglicherweise ist die Bindung an Endophilin auch für die Generierung verschiedener VGlut-spezifischer Subpopulationen von Bedeutung. Für VGlut2 und VGlut3 konnten bisher keine direkten Interaktionspartner identifiziert werden.

## **1.6 Lipid Rafts**

Endozytotische Wege müssen unabhängig voneinander kontrolliert und reguliert werden. Das macht eine präzise Abstimmung auch mit anderen Membranprozessen notwendig. Synapsen scheinen diese vielfältigen Sortierungsprozesse über unterschiedliche Kompartimente zu bewältigen. Als Teil der Plasma- und Vesikelmembran könnten Lipide hierbei eine regulatorische Rolle über Protein-Lipid-Interaktionen – sogenannte *Lipid Rafts* – einnehmen.

Lange Zeit galt das Fluid-Mosaik-Modell von Singer und Nicholson (1972) als Erklärung für die Organisation der Zellmembran. Dies besagt, dass die Lipiddoppelschicht der Membran eine neutrale zwei-dimensionale Lösungsschicht darstellt, die nur wenig Einfluss auf die Membranfunktionen besitzt. Ende der 90er Jahre entstand schließlich die *Lipid Raft*-Hypothese, die besagt, dass vor allem Signal und Rezeptorproteine in definierten Membranbereichen organisiert werden (Brown & London, 1998; Simons & Van Meer, 1988; Simons & Ikonen, 1997). Es wird

angenommen, dass durch die Rekrutierung von Proteinen in diese Bereiche Interaktionspartner in enge räumliche Beziehungen zueinander gebracht werden und so Signalübertragungen über kürzere Distanzen ablaufen kann (Simons & Toomre, 2000). *Lipid Rafts* weisen einen hohen Cholesterin- und Sphingolipidgehalt auf und enthalten z.B. Glycosylphosphatidylinositol-verankerte Proteine, sogenannte GPI-Anker (Simons & Ikonen, 1997). Sie sind resistent gegenüber ionischen Detergentien und lassen sich unter anderem durch Ultrazentrifugation im Saccharosegradienten isolieren. Bis zum heutigen Tag ist jedoch unklar, ob es sich bei denen durch Ultrazentrifugation erhaltenen Membrandomänen tatsächlich um *Lipid Rafts* handelt, in die Proteine rekrutiert werden. Diese könnten auch nur Membranproteinkomplexe mit geringerer Dichte sein, weil komplexierte Proteine Lipide gebunden haben (Heerklotz, 2002; Staneva *et al.*, 2005). Im Folgenden wird daher der Begriff „Detergentien-resistente Membrandomänen“ (DRM) verwendet.

Komponenten synaptischer Vesikel, die von der Plasmamembran internalisiert werden, könnten in *Lipid Rafts* organisiert sein. Hinweise hierfür lieferte eine Studie von Thiele u.a. an PC12-Zellen. Es zeigte sich, dass eine Verminderung von Cholesterin in der Plasmamembran die Bildung von SLMVs reduzierte, ohne jedoch den Ablauf der Endozytose in Mitleidenschaft zu ziehen (Thiele *et al.*, 2000).

## 1.7 Neuronale Grundlagen der zirkadianen Rhythmik

In den meisten Spezies steuert die tägliche Abfolge von Licht und Dunkel rhythmische Veränderungen im Verhalten und/oder der Physiologie. Der offensichtlichste endogene Rhythmus ist der Schlaf-Wach-Rhythmus. Daneben gibt es viele weitere Funktionen, die in einem 24-stündigen Rhythmus variieren. Vermittelt wird die zirkadiane Rhythmik über Neuronengruppen im Nucleus suprachiasmaticus (SCN) des Hypothalamus, der über Kollateralen der Sehbahn Informationen über die Hell-Dunkel-Verhältnisse erhält (Ibata *et al.*, 1999; Klein, 1991). Der SCN wirkt als endogener Taktgeber und bewirkt über gepulste Freisetzungen von Hormonen und rhythmische Entladungen seiner Neuronen auch die Rhythmizität anderer Hirnstrukturen. Durch zahlreiche Studien konnte die Rolle des SCN in der zirkadianen Rhythmik bestätigt werden. So wurde z.B. 1991 von Schwartz und Gillette (Gillette, 1991; Schwartz, 1991) in (Klein *et al.*, 1991) gezeigt, dass SCN-Neurone *in vivo* und *in vitro* zirkadiane Rhythmen metabolischer und elektrischer Aktivität aufweisen. Außerdem lässt sich durch die elektrische Stimulation des SCN eine Phasenverschiebung im Aktivitätsmuster in gleicher Weise wie durch

Lichtimpulse auslösen (Rusak & Groos, 1982). Schließlich konnte durch die Transplantation eines fetalen SCN in arhythmische adulte Tiere der SCN als Sitz der zirkadianen Rhythmik belegt werden. Adulte Tiere wiesen eine wiederhergestellte Rhythmik auf, die der Periodenlänge des Spendertieres glich (Silver *et al.*, 1990). Man geht davon aus, dass die Neuronen des SCN in einem vorgegebenen Zyklus oszillieren und dabei unter anderem das Trinken, die motorische Aktivität, die Körpertemperatur und die Ausschüttung von Prolaktin, Melatonin, Wachstumsfaktoren und Kortisol regulieren (Meyer-Bernstein & Morin, 1999). Wichtigster exogener Zeitgeber für die Synchronisation auf eine 24-stündige Rhythmik sind Lichtsignale. Ohne äußeren Zeitgeber stellt sich der endogen gesteuerte Zyklus jedoch auf eine Länge von ungefähr 25 Stunden ein. Die photische Information gelangt von der Retina (u.a. über den retino-hypothalamischen Trakt) direkt in den SCN (Harrington & Rusak, 1986; Moore & Lenn, 1972). Läsionsversuche zeigen diesbezüglich Essentialität des retino-hypothalamischen Traktes (Johnson *et al.*, 1988).

Verschiedene Gene sind in die Regulation des SCN involviert. Das molekulare Uhrwerk basiert auf einem System von Rückkopplungsschleifen auf Ebene der Transkription/Translation. Die Transkriptionsfaktoren CLOCK (Gekakis *et al.*, 1998) und BMAL1 (Hogenesch *et al.*, 1998) aktivieren in Form eines Heterodimers zu Beginn der Tagesperiode u.a. die Transkription der Period- (Per) (Albrecht *et al.*, 1997) und Cryptochrom- (Cry) (Okamura *et al.*, 1999) Gene. Im Laufe des Tages bilden die Proteine Per und Cry im Zytoplasma Oligomere, die in den Zellkern zurückwandern und dort CLOCK und BMAL1 und damit ihre eigene Expression inhibieren. Nach Ausbleiben der Neusynthese werden im Laufe der Nacht die Per/Cry-Oligomere abgebaut, so dass am nächsten Morgen der Zyklus erneut beginnen kann. Der Abbau der Per/Cry-Oligomere kann zusätzlich auf Ebene der Translation durch Kinasen reguliert werden.

Es gibt 3 Per-Gene (Per1, 2, 3) (Albrecht *et al.*, 1997; Shearman *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 1997; Tei *et al.*, 1997; Zylka *et al.*, 1998) und zwei Cry-Gene (Cry1, 2) (Miyamoto & Sancar, 1998). Die Deletion einer PAS-Signaldomäne (Domäne, die in Period-, Arnt- und Sim-Proteinen gefunden wurde) des Per2-Proteins in Per2<sup>Brdm1</sup>-Mäusen führt zu einem Defekt in der Licht-induzierten Phasenverschiebung der zirkadianen Uhr (Albrecht *et al.*, 2001). Während Per2<sup>Brdm1</sup>-Mäuse in konstanter Dunkelheit zunehmend arhythmisch reagieren (Zheng *et al.*, 1999), zeigen doppelt transgene Per1 und Per2-

Mäuse unter Dunkel-Dunkel-Bedingungen sofort einen vollständigen Verlust ihrer zirkadianen Rhythmik (Bae *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2001).

## 1.8 Regulation von Neurotransmittertransportern in Wildtyp und $Per2^{Brdm1}$ -Mäusen

Es existieren verschiedene Befunde, die auf eine Verbindung zwischen der Regulation zirkadianer Rhythmik und der Regulation glutamaterger Neurotransmission hindeuten. So zeigt sich neben einer deregulierten Zirkadianität in  $Per2^{Brdm1}$ -Mäusen ein veränderter Glutamatstoffwechsel. Die Expression des Glutamattransporters *Eaat1* ist herabreguliert. Folge davon ist eine vermehrte Glutamataufnahme von Astrozyten und eine erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentration (Spanagel *et al.*, 2005). Eine Studie aus dem Jahr 2004 zeigte, dass in einer Subpopulation von Amakrinzellen der Mausretina neben VGlut3 auch das Period-Gen 1 exprimiert wird (Johnson *et al.*, 2004). VGlut3-Amakrinzellen spielen damit möglicherweise eine wichtige Rolle bei der durch Licht induzierten zirkadianen Rhythmik.

Auf der synaptischen Ebene wurde u.a. gezeigt, dass die Dopaminkonzentration in SV von  $Per2^{Brdm1}$ -Mäusen erhöht ist und der Neurotransmitter GABA die Expression von *Per1*- und *Per2*-mRNA im SCN unterdrückt (Ehlen *et al.*, 2006; Hampp *et al.*, 2008). Im gleichen Jahr wurden tagesabhängige Schwankungen der VGlut1-Menge auf SV nachgewiesen, die in  $Per2^{Brdm1}$ -Mäusen verändert waren (Yelamanchili *et al.*, 2006).

Während Wildtyp-Mäuse eine tageszeitabhängige VGlut-Sortierung an die Plasmamembran aufweisen, ist die Sortierung in  $Per2^{Brdm1}$ -Mäusen dereguliert (Darna *et al.*, 2009).

All diese Studien deuten darauf hin, dass VGlut-tragende Vesikel einer speziellen Sortierung unterliegen. Welcher Art diese Sortierung ist und wie sie reguliert wird, gilt es näher zu betrachten.

## 1.9 Zielsetzung der Arbeit

Bis zum heutigen Zeitpunkt bildet die Regulation synaptischer Übertragungsprozesse eine spannungsreiche Thematik. Der Transport von Neurotransmittern während der Exo- und Endozytose setzt die regulierte Generierung und Regenerierung synaptischer Vesikel mit einem vollständigen Satz von Vesikelproteinen voraus. Die Anzahl der Neurotransmittertransporter wiederum bestimmt die Menge an freigesetzten Transmittern während der Exozytose.

Etliche Fragen bezüglich der Sortierung verschiedenster SV-Proteine sind unbeantwortet. Mit Augenmerk auf die Sortierung von VGlut1 und VGlut2 zwischen Plasmamembran und synaptischer Vesikelmembran stellt sich die Frage, ob sie lediglich im Zuge exozytotischer Prozesse an die Plasmamembran rekrutiert werden oder darüber hinaus auch aktiv über Regulationsmechanismen dorthin sortiert werden. Ihre Rolle als Natrium-Phosphat-Transporter an der Plasmamembran in Oozyten ist bekannt, konnte bisher aber nie in einem anderen System gezeigt werden. Welche Relevanz spielt der Funktionswechsel zwischen einem plasmamembranständigem Natrium-Phosphat-Transporter und einem vesikulärem Glutamattransporter bezüglich neuronaler Transmission?

Neueste Ergebnisse haben die Interaktion von VGlut1 mit dem endozytotischen Apparat gezeigt (De Gois *et al.*, 2006; Voglmaier *et al.*, 2006). Endophilin bindet an eine prolinreiche Sequenz im C-Terminus und sortiert VGlut1 in den schnelleren, AP2-abhängigen Endozytose-Weg (Voglmaier *et al.*, 2006). Ein ähnlicher Sortierungsmechanismus für VGlut2 ist bisher nicht bekannt. Allerdings konnte für beide Transporter eine tagesabhängige Sortierung an die Plasmamembran nachgewiesen werden (Darna *et al.*, 2009; Yelamanchili *et al.*, 2006).

Ziel war es, die Sortierung von VGlut1 und 2 zwischen Vesikel- und Plasmamembran genauer zu untersuchen und Gemeinsamkeiten und /oder Unterschiede in deren Regulation aufzudecken. Desweiteren sollte eine Möglichkeit für die selektive Betrachtung eines Transporters gefunden werden. Hierfür wurden folgende Untersuchungen in dieser Arbeit durchgeführt:

1. Sortierung von VGluts in spezielle Membrandomänen auf der Plasma- und synaptischen Vesikelmembran.
2. Einfluss von Endophilin auf die tagesabhängige Sortierung von VGlut1 in Wildtyp- und *Per2<sup>Brdm1</sup>*-Mäusen, konditioniert im Licht/Dunkel- bzw. Dunkel/Dunkelzyklus.
3. Identifizierung potentieller Interaktionspartner des C-Terminus von VGlut1 und 2.
4. Charakterisierung einer VGlut2-transfizierten PC12-Zelllinie.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

40% Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung	Carl Roth GmbH
Adenosin-5'-Triphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich
Agar-Agar	Sigma-Aldrich
Agarose	Carl Roth GmbH
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Carl Roth GmbH
AmpliTaq DNA Polymerase	Applied Biosystems
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich
Bafilomycin A1, Kat.nr.: 11711-1EA	Sigma-Aldrich
BCA Protein Assay Reagent A	Thermo Scientific
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue Kat.nr. 161-0436	Bio-Rad
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]oktan (DABCO)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Biomol
Enhanced Chemiluminescence-Reagenzien (ECL)	GE Healthcare
Entfärbelösung Kat.nr. 161-0438	Bio-Rad
Entwicklerlösung Bonimix	Blach-Röntgen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH
Ethylenglykolbis(2-aminoethyl-)tetraacetat (EGTA)	Carl Roth GmbH
Essigsäure	Carl Roth GmbH
Ethanol	Herbeta Arzneimittel
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH
Fixierlösung Bonimix	Blach-Röntgen
Gel-Blotting-Papier	VWR International

Geneticin	Invitrogen
Glukose	Merck
Glutathion Sepharose 4 <i>fast flow</i>	GE Healthcare
Glyzerin	Merck
Glyzin	Carl Roth GmbH
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (Hepes)	Biochrom
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich
Kaliumhydroxid	Carl Roth GmbH
Kaliumgluconat	Sigma Aldrich
Kaliumglutamat	Sigma Aldrich
Kanamycin	Sigma Aldrich
Kollagen Typ I	Sigma-Aldrich
Kupfersulfat Pentahydrat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Merck
Low molecular weight marker (LMW)	Fermentas
Kat.nr. SM0671	
Lubrol	Merck
Lysozym	Sigma Aldrich
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	Molkerei Heideblume, Elsdorf
Mass-Ruler-DNA-Marker	Fermentas
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Methanol	Merck
Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD)	Sigma-Aldrich
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich
Mowiol 4-88	Sigma-Aldrich
Natriumacetat	Sigma-Aldrich
Natriumazid	Sigma-Aldrich
Natriumbicarbonat	Sigma Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH
Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH
Natriumhydroxid	Merck



---

Nigericin	Sigma-Aldrich
Nitrocellulose Membran, Hybond C	Amersham, GE Healthcare
<i>p</i> -Nitrophenylphosphat Flüssig-Substrat System (N7653)	Sigma Aldrich
N-methyl-D-glucamine	Sigma Aldrich
Normales Ziegen Serum (NGS)	Roche
Optiphase HighSafe 3, Szintillationsflüssigkeit	Perkin Elmer LAS
Paraformaldehyd	Electron Microscopy, Hatfield, PA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS), steril	Biochrom
Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure) (Pipes)	Sigma-Aldrich
Poly-L-Lysin (PLL)	Biochrom
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Porablot	Machery & Nagel
Protease-Inhibitor-Cocktail (Pi)	Sigma-Aldrich
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail Set V (50x)	Calbiochem
Protein G Sepharose 4 <i>fast flow</i>	GE Healthcare
RNAse A	Carl Roth GmbH
Restriktionsenzyme	Fermentas
Reserpin	Sigma-Aldrich
RNAase A	Carl Roth GmbH
Saccharose	Carl Roth GmbH
Salzsäure	Sigma-Aldrich
Silbernitrat (AgNO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich
Tris(hydromethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH
Triton X-100, Kat.nr.: 11332481001	Roche Diagnostics
Trypan Blau	Sigma-Aldrich
Trypsin	Sigma-Aldrich
Trypton	Carl Roth GmbH
Tween 20	Carl Roth GmbH
Valinomycin	Sigma-Aldrich

## 2.2 Antikörper

### 2.2.1 Primäre Antikörper

Antikörper / Klon	Organismus und Typ	Herkunft + Katalognr.	verwendete Verdünnung
Actin	polyklonal, Kaninchen	Sigma A5060	1: 5 000 (WB)
alpha-Adaptin (Klon A-C1)	monoklonal, Maus	Dianova: MA3-061	1: 2 000 (WB)
AP180	polyklonal, Kaninchen	Synaptic Systems: 155 003	1: 2 000 (WB)
Dynamamin 1	monoklonal, Maus	Santa Cruz: sc-12724	1: 1000 (WB)
Dynamamin 1, 2, 3	polyklonal, Kaninchen	Synaptic Systems: 115 002	1: 5 000 (WB)
Endophilin 1	polyklonal, Kaninchen	Synaptic Systems: 159 002	1: 5 000 (WB)
Endophilin 1-3	monoklonal, Maus	Santa Cruz: sc-48378	1: 5 000 (WB)
Flotillin	monoklonal, Maus	Bio Transduction Laboratories: 610820	1: 500 (WB)
GST	polyklonal, Kaninchen	Abcam: ab9085	1: 10 000 (WB)
Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> -ATPase- $\alpha$ 3	monoklonal, Maus	Thermo Scientific Pierce Antibodies (ABR): MA3-915	1: 2 000 (WB) 1: 300 (IF)
Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> -ATPase- $\beta$	monoklonal, Maus	Millipore: 05382	1: 2 000 (WB) 1: 300 (IF)
NMDA-Rezeptor 1	monoklonal, Maus	Synaptic Systems: 114 011	1: 5 000(WB), 1: 500 (IF)
SNAP25	monoklonal, Maus	Sternberger Monoclonals Baltimore, USA	1: 5 000 – 1: 10 000 (WB)
Synaptogyrin 1	polyklonal, Kaninchen	Synaptic Systems: 103 002	1: 10 000 (WB)
Synaptobrevin 2 (VAMP 2)/69.1	monoklonal, Maus	Synaptic Systems: 104 211	1: 10 000 (WB) 1: 500 (IF)

Synaptophysin 1 (Klon 7.2)	monoklonal, Maus	Synaptic Systems: 101 011	1: 5 000 – 1: 10 000 (WB)
Synaptophysin 1	polyklonal, Kaninchen	Synaptic Systems: 101 002	1: 5 000 – 1: 10 000 (WB)
Synaptojanin 1	monoklonal, Maus	Santa Cruz: sc-32770	1: 500 (WB)
Synaptotagmin 1 (Klon 41.1)	monoklonal, Maus	Synaptic Systems: 105 011	1: 5 000
Syntaxin 1A/B (Klon HPC)	monoklonal, Maus	Sigma-Aldrich: S0664	1: 5 000
THY 1 (H-110)	monoklonal, Maus	Serotec: MCA47G	1: 500
Transferrin Rezeptor	monoklonal, Maus	Invitrogen: 13-6800	1: 500
VGlut1	polyklonal, Meerschweinchen	Synaptic Systems: 135 304	1: 5 000 (WB)
VGlut1/317D5	monoklonal, Maus	Synaptic Systems: 135 311	1: 5 000 (WB)
VGlut1/317G6	monoklonal, Maus	Synaptic Systems: 135 511	1: 1 000 (IF)
VGlut1	polyklonal, Kaninchen	Synaptic Systems: 135 302	1: 5 000 – 10 000 (WB)
VGlut1/2-4LD	polyklonal, Kaninchen	Synaptic Systems: 135 503	50 µg/ml (IP)
VGlut1-3LD	polyklonal, Kaninchen	Synaptic Systems <sup>1</sup>	50 µg/ml (IP)
VGlut2 (N-Terminus)	polyklonal, Kaninchen	Abcam: ab72310	50 µg/ml (IP)
VGlut2	polyklonal, Meerschweinchen	Synaptic Systems: 135 404	1: 5 000 (WB)
VGlut2/321A8	monoklonal, Maus	Synaptic Systems: 135 411	1: 5 000 (WB)
VGlut2/321D6	monoklonal, Maus	Synaptic Systems: 135 611	1: 1 000 (IF)

<sup>1</sup> keine Informationen bekannt; freundlichweise von Synaptic Systems überlassen

VGlut2	polyklonal, Kaninchen	Synaptic Systems: 135 402	1: 5 000 – 10 000 (WB) 1: 1 000 (IF)
VMAT1	polyklonal, Kaninchen	Chemicon: AB 1597P	1: 5 000 (WB) 1: 500 (IF)

### 2.2.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Herkunft + Katalognr.	Verdünnung
für die Western-Immunoblot Analyse		
Pferd anti-Maus IgG (H+L), Peroxidase-gekoppelt	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA	2x Primärantikörper, maximal 1: 10 000
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L), Peroxidase-gekoppelt	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA	2x Primärantikörper, maximal 1: 10 000
Ziege anti-Meerschweinchen IgG (H+L), Peroxidase- gekoppelt	Dianova: 106 035 003	2x Primärantikörper, maximal 1: 10 000
für die Immunzytochemie		
Ziege anti-Kaninchen, Texas-red	Linaris GmbH: Ti-1000	1: 300
Ziege anti-Maus Oregon-green 488	Invitrogen: 0 6380	1: 500

### 2.3 Radioaktiv markierte Neurotransmitter

5-Hydroxy-[<sup>3</sup>H]-tryptamintrifluoracetat ([<sup>3</sup>H]-Serotonin), (GE Healthcare, Kat.nr. TRK1006)

L-[3, 4-<sup>3</sup>H]-Glutaminsäure ([<sup>3</sup>H]-Glutamat), (Moravek Bio- and Radiochemicals, CA, USA, Kat.nr. MT855)

### 2.4 Nukleinsäuren

#### VGlut2-pcDNA3.1-Konstrukt:

PC12-Zellen, stabil transfiziert mit einer vollständig Protein-kodierenden VGlut2-cDNA-Sequenz (Maus), wurden freundlicherweise von Adolfo Zurita (Labor Prof. L. Birnbaumer, National Institute of Environmental Health Sciences, USA) zur Verfügung gestellt. Die VGlut2-cDNA wurde in pcDNA3.1 kloniert. Dieser Vektor ermöglicht die Expression der gewünschten cDNA in Säugerzellen. Für die Selektion in Säugerzellen

dient das Neomycinresistenz-Gen, für die Selektion in *E. Coli* enthält der Vektor außerdem das  $\beta$ -Laktamase-Gen.

#### **cVGlut1 und cVGlut2-GST-Konstrukte:**

Die C-Termina von VGlut1 und VGlut2 wurden aus einer cDNA Bibliothek des Mausgehirns mit spezifischen Primern amplifiziert. Die Maushirn cDNA Bibliothek wurde freundlicherweise von Christina Blex (Labor Ahnert-Hilger) zur Verfügung gestellt. Alle Oligonukleotide wurden von TIB-MolBiol (Berlin) synthetisiert und sind in der 5' -3'-Orientierung angegeben.

Primerpaar für die Sequenzierung des murinen C-Terminus von VGlut1:

**cVGlut1-fwd:** GGGGAATTCTCGGGAGAGAAGCAG

**cVGlut1-rev:** GGGCTCGAGTCAGTAGTCCCGGAC

Primerpaar für die Sequenzierung des murinen C-Terminus von VGlut2:

**cVGlut2-fwd:** GGGGAATTCTCAGGAGAGAAACAACCT

**cVGlut2-rev:** GGGCTCGAGTTATGAATAATCATCTCGGTC

Die VGlut1/VGlut2-cDNA wurde in den pGEX4T1 Vektor kloniert und das resultierende GST-Fusionsprotein zur Expression in *E. Coli* BL21 Zellen transformiert. pGEX4T1 (GE Healthcare): Dieser Vektor ermöglicht die Expression von Proteinen als Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein. Der Vektor enthält das Ampicillinresistenz-Gen für die Selektion in *E. Coli*. Neben dem *tac* Promotor für die Expression des Fusionsproteins enthält der Vektor das *lacIq*-Gen für die kontrollierte Expression nach Induktion mit IPTG.

#### **SH3-Enph-, SH3/GPRL-Enph- und SH3A-ITSN1-GST-Konstrukt:**

GST-Fusionsproteine mit verschiedenen SH3-Domänen (SH3 Domäne des Endophilin 1, mutierte SH3 Domäne des Endophilin 1, SH3 Domäne des humanen Intersectin 1) wurden freundlicherweise von Arndt Pechstein (Labor Prof. V. Haucke, Institut für Chemie und Biochemie, FU Berlin) zur Verfügung gestellt. Die Konstrukte wurden in *E. Coli*-Expressionsstämme transformiert.

**Tab. 1** Eigenschaften verwendeter Vektorkonstrukte bzw. GST-Fusionsproteine

Konstrukt	Protein	NCBI-Akzessions Nr.	cDNA/Organism.	Aminosäuresequenz	Zielvektor	Restrikt. enzym	Express. stamm
enphSH3	SH3 Domäne des Endophilin 1	AAH18385	Maus	283-352	pGEX4T1	EcoRI, XhoI	<i>E. Coli</i> BL21
enphSH3/GPRL	mutierte SH3 Domäne des Endophilin 1	AAH18385	Maus	283-352 G337R, P340L	pGEX4T1	EcoRI, XhoI	<i>E. Coli</i> ER2556

cVGlut1	C-Terminus von VGlut1	NP_892038.1	Maus, Hirn	491-560	pGEX4T1	EcoRI, XhoI	<i>E. Coli</i> BL21
cVGlut2	C-Terminus von VGlut2	Q8BLE7	Maus, Hirn	499-582	pGEX4T1	EcoRI, XhoI	<i>E. Coli</i> BL21
VGlut2	VGlut2	AF324864 (cds)	Maus, Hirn	vollständige Sequenz	pcDNA3.1	<sup>2</sup>	PC12-Zellen

## 2.5 Puffer und Lösungen

### HMK Puffer

20 mM HEPES  
 100 mM KCl  
 2 mM MgCl<sub>2</sub>  
 pH 7,4 (NaOH)

### HMK/TX Puffer

1 % (w/v) Triton X-100  
 in HMK Puffer

### Homogenisierungspuffer

320 mM Saccharose  
 4 mM HEPES  
 pH 7,4 (NaOH)

### MES Buffered saline (MBS)

25 mM MES  
 150 mM NaCl  
 pH 6.5

### Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

140 mM NaCl  
 10 mM KCl  
 6,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 pH 7,4

### Lösungen für die Neurotransmitteraufnahme

#### KGC3 Puffer

150 mM Kaliumgluconat  
 20 mM Pipes  
 4 mM EGTA  
 2,871 mM MgCl<sub>2</sub> (durch Komplexbildung ca. 1 mM freies Mg<sup>2+</sup>)  
 2 mM Na<sub>2</sub>-ATP  
 pH 7,0 (KOH)

#### KG3 Puffer

150 mM Kaliumglutamat

---

<sup>2</sup> unbekannt; freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Labor Prof. L. Birnbaumer

20 mM Pipes  
4 mM EGTA  
2,871 mM MgCl<sub>2</sub> (durch Komplexbildung ca. 1 mM freies Mg<sup>2+</sup>)  
2 mM Na<sub>2</sub>-ATP  
pH 7,0 (KOH)

**Krebs Ringer Hepes buffer (KR-Hepes)**

140 mM NaCl  
5 mM NaHCO<sub>3</sub>  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
1,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
10 mM Glucose  
20.0 mM HEPES  
pH 7.4

**Lösungen für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)****TAE (Tris-Azetat-EDTA) Puffer**

40 mM Tris  
2 mM EDTA  
pH 8,5 (Essigsäure)

**TE (Tris-EDTA) Puffer**

10 mM Tris  
1 mM EDTA  
pH 8,0 (HCl)

**Probenpuffer**

20 % (w/v) Ficoll®400  
100 mM EDTA  
1,0 % (w/v) SDS  
0,25 % (w/v) Bromphenolblau

**Lösungen für die Proteinbestimmung (BCA-Test)****Lösung A**

1 % (w/v) BCA  
17 % (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
0,16 % (w/v) 2,3-Na<sub>2</sub>C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> (Dinatriumtartrat)  
0,4 % (w/v) NaOH  
0,95 % (w/v) NaHCO<sub>3</sub>

**Lösung B**

4 % (w/v) CuSO<sub>4</sub>  
in ddH<sub>2</sub>O

**Lösungen für die Elektrophorese****Laemmli-Puffer (4-fach)**

200 mM Tris  
400 mM DTT

## Material

---

8 % (w/v) SDS  
0,4 % (w/v) Bromphenolblau  
40 % Glycerin

### Elektrophoresepuffer

25 mM Tris  
200 mM Glyzin  
3,5 mM SDS

### Ponceau S-Färbelösung

0,3 % (w/v) Ponceau S  
3 % (w/v) Trichloressigsäure

### Western Blot-Proteintransferpuffer (Semi Dry)

386 mM Glyzin  
47,8 mM Tris  
1,31 mM SDS  
20 % (v/v) Methanol

### Tris I (4-fach)

500 mM Tris  
0,4 % (w/v) SDS  
pH 6,8 (HCl)

### Tris II (4-fach)

1,5 M Tris  
0,4 % SDS  
pH 8,8 (HCl)

<b>Sammelgel [%]</b>	<b>4 %</b>
1,25 ml	Tris I
0,5 ml	40 % Akrylamid
25 µl	10 % APS
2,5 µl	TEMED
3,25 ml	dH <sub>2</sub> O

<b>Trenngel [%]</b>	<b>5 %</b>	<b>8 %</b>	<b>10 %</b>	<b>12 %</b>
Tris II	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Akryl-/Bisakrylamid	1,25 ml	2 ml	2,5 ml	3 ml
dH <sub>2</sub> O	6,25 ml	5,5 ml	5 ml	3 ml
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

### Lösungen für Immunoblots

#### TS (Tris Saline) Puffer

20 mM Tris  
150 mM NaCl  
pH 7,5 (HCl)



**TS/Tween Puffer**

0,1 % (v/v) Tween 20  
in TS Puffer

**Antikörperlösung**

1,5 % (w/v) BSA  
in TS Puffer

**Blocklösung**

5 % (w/v) Magermilchpulver  
0,1 % (v/v) Tween 20  
in TS Puffer

**Lösungen für die Immunfluoreszenz****Blocklösung**

0,1% (v/v) Triton X-100  
5,0 % (v/v) NGS  
2,0 % (w/v) BSA  
in PBS

**Immunfluoreszenz-Antikörperlösung**

2 % (w/v) BSA  
in PBS

**Mowiol**

2,4 g Mowiol 4-88  
6 g Glyzerin  
6 ml ddH<sub>2</sub>O  
12 ml 0,2 M Tris (HCl), pH 8,5  
0,6 g DABCO

**Paraformaldehydlösung**

4 % (w/v) Paraformaldehyd  
0,1 M PBS  
pH 7,4

## 2.6 Medien

### 2.6.1 Mikrobielle Medien

Alle aufgeführten Medien wurden für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Für die Herstellung von Agarplatten wurde Agar-Agar in einer Konzentration von 20 g/l zugegeben.

**Luria Bertani (LB) Medium**

10 g/l Trypton  
5 g/l Hefeextrakt

5 g/l NaCl  
pH 7,0

**2YT Medium**

16 g/l Trypton  
10 g/l Hefeextrakt  
5 g/l NaCl  
pH 7,0

Teilweise wurde den hier aufgeführten Medien nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 55 °C Antibiotika zugegeben.

<b>Antibiotikum</b>	<b>Stammlösung</b>	<b>Konzentration im Medium</b>
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	25 mg/ml	25 µg/ml

**2.6.2 Zellkulturmedien**

Alle für die Zellkultur angegebenen Medienbestandteile wurden von der Firma Biochrom AG (Berlin) bezogen.

**Kollagenlösung**

1 ml Kollagenlösung (1 mg/ml in 0,1 % Eisessig)  
32 ml 30 % Ethanol

**PLL-Lösung**

0,5 ml PLL-Lösung (2 mg/ml in dest. H<sub>2</sub>O)  
50 ml dest. H<sub>2</sub>O

**Einfrierlösung**

28 ml DMEM  
12 ml DMSO  
10 mM HEPES

**Einfriermedium**

60 ml DMEM  
40 ml FCS

**Medium für PC12-Zellen**

170 ml RPMI 1640  
10% Pferdeserum (HS), 30 min, 56 °C hitzeinaktiviert, Charge 0557S  
5% Fetales Kälberserum (FCS), 30 min, 56 °C hitzeinaktiviert, Charge 0037G  
2 mM L-Alanyl-L-Glutamin  
1 ml/100 ml Penicillin (10 000 U/ml)/Streptomycin (10 000 µg/ml)

Medium für transfizierte PC12-Zellen enthielt zusätzlich Geneticin (300 µg/ml).

**CoroNa Green-Lösung**

50 µg CoroNa Green  
40 µl Pluronic F-127  
40 µl DMSO

**Medien für Versuche mit CoroNa Green**

	<b>-Na<sup>+</sup>/ -PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	<b>+Na<sup>+</sup>/ -PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	<b>+Na<sup>+</sup>/ +PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>
20 mM	Tris	Tris	Tris
130 mM	N-methyl-D-glucamin	NaCl (80 mM)	NaCl (80 mM)
3 mM	KCl	KCl	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1 mM	MgCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub>
2 mM	CaCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>
5 mM	Glucose	Glucose	Glucose
pH 7,4 (HCl)			

Alle Medien für die Versuche mit CoroNa Green wurden steril filtriert (0,4 µM) und bei 4°C aufbewahrt.

**2.7 Geräte und sonstige Hilfsmittel****Elektrophorese**

Alle Geräte für die Elektrophorese stammen von Bio-Rad falls nicht anders angezeigt.

Power/Pac 200/300 Spannungsgerät

TransBlot SD SemiDry Elektrophorese Transferzelle

Mini Protean II Elektrophorese-Kammer

Mini-Sub Cell GT/Wide Mini-Sub Cell GT

Entwickler und Fixierer: CAWOMAT 2000IR (CAWO Photochemisches Werk, Schrobenhausen)

**In silico Methoden**

[www.pubmed.de](http://www.pubmed.de)

<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>

**Kits**

Cholesterol/Cholesteryl Ester Quantitation Kit (BioVision, Kat.nr. 603-100)

Quantum Prep™ Plasmid Midiprep Kit (Bio-Rad, Kat.nr. 732-6120)

Quantum Prep™ Plasmid Miniprep Kit (Bio-Rad, Kat.nr. 732-6100)

QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen)

Silver Stain Plus Kit (Bio-Rad, Kat.nr. 161-0449)

**Mikroskopie**

Laser Scanning Mikroskop LSM 5 exciter (Carl Zeiss AG)

### **Photometer**

GeneQuant II (Pharmacia Biotech)

HT-2 Mehrzweck-Mikrotiterplattenlesegerät (Anthos Labtec)

MR 500 Mikrotiterplattenlesegerät (Dynatech)

### **Software**

LabImage 1D 2006 (Kapelan BioImaging GmbH)

LabVIEW 6.1 (National Instruments)

Chromas Lite (Technelysium Pty Ltd, Australia)

ClustalX2 (University College Dublin)

Clustal W (EMBL)

### **Sonstige Geräte**

Bandelin SONOPLUS Ultraschall-Homogenisator, GM70

Beckmann LS 6500, Liquid Szintillation Counter

BioDoc Analyse (Video Dokumentationssystem)

Gradientenmischer-25 ml N857.1 (Carl Roth GmbH)

Silikon-Schlauch Ø0,8 mm (Heidolph)

Scanner:

CanoScan 8800F (Canon)

ScanMaker 4800 (Microtek)

Thermomixer (Eppendorf)

Thermocycler (Uno II, Biometra)

Schüttelapparat Unimax 1010 (Heidolph )

### **Subzelluläre Fraktionierung**

Guillotine (Udo Basile, Biological Research Apparatus, Italien)

Homogenisator Rotor (Heidolph Rührer RZR 2021)

Hand Homogenisator, Spaltmaß 0,1 – 0,15 mm (Wheaton, Potter-Elvehjem)

### **Zellkultur**

Alle Zellkulturschalen und Zellkulturplatten zur Kultivierung von PC12 Zellen wurden von der Firma BD Biosciences bezogen.

Sterilarbeitsbänke Heraeus HeraSafe 18/2 bzw. Heto-Holten Safe 2010

Zellkulturbrutschränke bzw. Inkubatoren: Heraeus BB16CU/BBD 6220 bzw. T6120

Leica DM LB Mikroskop (Leica Microsystems GmbH)

## Zentrifugen

Alle Zentrifugen, Rotoren und Zentrifugationsgefäße stammen von Beckmann Coulter falls nicht anders angezeigt.

J2-HS Kühlzentrifuge

Rotoren: JA-14, JA-20

Optima Max Ultrazentrifuge

Rotoren: TLS 55, TLA 100.4, TLA 120.1, MLS-50

Zentrifugationsgefäße: 13 x 51 mm, 5,1 ml

Optima L-90K Ultrazentrifuge

Rotoren: Type 70 Ti, SW 40 Ti

Zentrifugationsgefäße: 14 x 95 mm, 14 ml

Kühlzentrifuge 5471C (Eppendorf)

Zentrifuge 54702 (Eppendorf)

## 2.8 Versuchstiere

In dieser Studie wurden folgende Tierstämme verwendet:

1. Weibliche Wildtyp (WT) Ratten (Wistar) wurden von der FEM-Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin, dem Bundesinstitut für Risikobewertung, Charles River oder Harlan Winkelmann bezogen.
2. WT-Mäuse (NMRI) wurden von Harlan Winkelmann, Borcheln bezogen.
3. Per2<sup>Brdm1</sup>-Mäuse wurden von Prof. Urs Albrecht (Department of Medicine, Fribourg) freundlicher Weise zur Verfügung gestellt. Die Per2<sup>Brdm1</sup>-Mäuse besitzen ein mutiertes Allel des Period2-Gens und zeigen im Gegensatz zu Wildtypmäusen nach einem spontanen Lichtpuls keine Verschiebung der Dunkelphase (*Resetting*) (Albrecht *et al.*, 2001). Sie reagieren arhythmisch, wenn sie in einem konstantem Dunkel/Dunkelzyklus gehalten werden (Zheng *et al.*, 1999). Für die Analyse von Deletions-mutanten wurden zum Vergleich WT-Mäuse (C57BL/6) von Urs Albrecht bezogen.

Alle Mäuse und alle Ratten wurden in einem 12h Licht/12h Dunkelzyklus (LD-Zyklus) oder 12h Dunkel/12h Dunkelzyklus (DD-Zyklus) gehalten.

### 3 Methoden

#### 3.1 DNA-Techniken

##### 3.1.1 DNA-Amplifikation über die Polymerase-Ketten-Reaktion

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde als Matrize cDNA aus Mausgehirn verwendet. Hierfür wurde die *Pfu*-Polymerase benutzt. Diese zeichnet sich durch eine geringere Fehlerrate aus, verglichen mit der *Taq*-Polymerase. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in 2.4 aufgelistet. In einem PCR-Ansatz von 50 µl wurden folgende Komponenten verwendet und nach folgendem Programm im Thermocycler inkubiert:

Komponente	Volumen [µl]	Konzentration	Programm	
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	0,5	1,25 U/50 µl	95°C	2 min
Matrizen-DNA	1	1,2 µg	<u>29 Zyklen:</u>	
10 x <i>Pfu</i> Puffer mit MgSO <sub>4</sub>	5	1x	95°C	30 sec
dNTP Mix	1	0,2 mM pro Nucleotid	40°C	30 sec
Primer I	2,5	1 µM	72°C	2 min
Primer II	2,5	1 µM	72°C	10 min
H <sub>2</sub> O	37,5	-	4°C	∞

Die Hybridisierungstemperatur wurde 5 bis 7°C unterhalb der mit einem Rechenprogramm (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) bestimmten Schmelztemperatur gewählt. Die Sequenzen der Primer wurden mit Hilfe der oben genannten Webseite so gewählt, dass der GC-Gehalt ca. 40-60% und die Länge 20-30 Basen betrug.

Zur Kontrolle unspezifischer Amplifizierungen diente ein PCR Ansatz ohne DNA-Matrize. Alle Proben wurden bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

##### 3.1.2 Herstellung kompetenter Zellen

Kompetente *E. Coli* TOP10F' Zellen bzw. *E. Coli* BL21-Zellen wurden freundlicherweise von C. Derst zur Verfügung gestellt.

### 3.1.3 Transformation von *E. Coli*

Zur Transformation wurden 50 µl kompetente TOP10F'-Zellen bzw. BL21-Zellen aufgetaut und mit 10-500 ng Plasmid-DNA in einem Volumen von maximal 5 µl versetzt. Der Ansatz wurde durch Antippen des Eppendorfgefäßes vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 30-sekündigen Hitzeschock bei 42°C wurde 250 µl LB Medium zum Ansatz zugegeben und bei 37°C für 1h und 300 rpm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation konzentriert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf Selektionsplatten (LB/Amp) ausgestrichen, um Transformanten über Nacht bei 37°C zu kultivieren.

### 3.1.4 Isolation von Plasmid DNA aus *E. Coli*

Ausgewählte *E. Coli* Kolonien wurden in 2 ml LB/Amp Medium über Nacht bei 37°C und 300 rpm kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien bei 5000 rpm sedimentiert und die Plasmid-DNA mit Hilfe des Quantum Prep™ Plasmid Miniprep Kit (Bio-Rad) gemäß Herstellerangaben isoliert.

Für größere Mengen wurde 50 ml LB/Amp Medium mit einer *E. Coli*-Kolonie angeimpft und über Nacht, wie oben beschrieben, kultiviert. Die Isolierung und Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Quantum Prep™ Plasmid Midiprep Kit (Bio-Rad).

### 3.1.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von Plasmid-DNA nach Isolierung wurde im Photometer über die Absorption bei 260 nm bestimmt. Eine DNA-Konz. von 50 µg/ml entspricht einer optischen Dichte von 1.

### 3.1.6 Restriktionsverdau von DNA

Für analytische Zwecke wurde DNA (ca. 0,5 - 2µg) in 10 µl Gesamtvolumen über eine Stunde mit 1 bis 1,5 U eines oder mehrerer Restriktionsendonucleasen geschnitten. Der Inkubationspuffer und die Inkubationstemperatur wurden nach Empfehlung des Restriktionsenzymherstellers gewählt. Die Fragmente wurden durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (3.1.7) und das Restriktionsmuster mit Hilfe der Videogeldokumentationsanlage dokumentiert. Anschließend wurde die DNA aufgereinigt (3.1.8).

Für präparative Zwecke wurden bis zu 40 µl DNA in 50 µl Gesamtvolumen mit Restriktionsenzymen geschnitten und nach Auftrennung in der Agarosegelelektrophorese aufgereinigt.

### **3.1.7 Agarose-Gelelektrophorese**

Standardmäßig wurden 1%ige Gele verwendet. Die Analyse von DNA-Fragmenten kleiner als 500 bp wurde mit Hilfe 2%iger Agarosegele in TAE-Puffer durchgeführt. Ethidiumbromid wurde in einer Endkonz. von 1 µg/ml zugefügt und das Gel in den Gelträger mit eingesetztem Probenkamm der Elektrophoresekammer gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 1 x Probenpuffer versetzt, auf das Gel aufgetragen und bei 100 V für 1h aufgetrennt. Ethidiumbromid lagert sich in die DNA ein und wird durch UV-Licht angeregt. Die DNA-Ethidiumbromid-Komplexe wurden unter der UV-Lampe sichtbar gemacht und fotografiert. Als Größenstandard dienten 5 µl des *Mass-Ruler-DNA-Ladder*-Markers (Fermentas).

### **3.1.8 Gelelution und Aufreinigung von DNA**

Das gewünschte DNA-Fragment wurde nach der Auftrennung im Agarosegel unter einer UV-Lampe mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAEX II Gel Extraction Kit der Firma Qiagen gemäß Herstellerangaben aufgereinigt.

### **3.1.9 Ligation von DNA**

Die Ligation wurde mit Hilfe der T4-DNA-Ligase durchgeführt. Diese kann sowohl zwei glatte (blunt-) Enden als auch zwei überstehende, komplementäre (sticky-) Enden in doppelsträngiger DNA verbinden. Die Bindung erfolgt durch Knüpfung kovalenter Phosphodiestergruppen unter Verbrauch von ATP zwischen der 3'-Hydroxylgruppe eines Nukleotids und der 5'-Phosphatgruppe eines weiteren Nukleotids.

Lineare Vektor-DNA (100 ng) wurde mit der einzufügenden DNA (insert) in einem molaren Verhältnis von 1:3 in einem Endvolumen von 10 µl in einem Eppendorfreaktionsgefäß vereint. Die Reaktion erfolgte in Ligasepuffer des Herstellers (Fermentas) mit 1 U T4-DNA-Ligase über Nacht bei 14°C.

### **3.1.10 DNA-Sequenzierung**

Alle Sequenzierungen erfolgten durch die Firma SMB Services in Molecular Biology (Berlin). Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Chromas Lite und ClustalX2.



## 3.2 Proteintechniken

### 3.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA-Test)

Die Proteinkonzentration wurde nach einem Protokoll von Smith et al. (Smith *et al.*, 1985) bestimmt. 20 µl Probe wurde in 200 µl BCA-Reagenz (50:1-Mischung von BCA-Lösung A und B) aufgenommen und 20 min bei 60°C in einer Mikrotiterplatte (96 well) inkubiert. Als Referenz wurden BSA-Standards von 0 (Leerwert), 50, 100, 200, 400 und 500 µg aufgetragen. Die Extinktion der abgekühlten Proben erfolgte bei 550 nm in einem Spektrophotometer.

### 3.2.2 Proteingelektrophorese (SDS-PAGE)

Alle Proben wurden in Laemmli-Puffer aufgenommen und für 10 min bei 90°C inkubiert. Das im Laemmli-Puffer enthaltene DTT spaltet Disulfidbrücken, während SDS eine einheitliche Ladungsverteilung an den Proteinen bewirkt. Dadurch erfolgt eine Auftrennung der Proteine in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen nach ihrem Molekulargewicht. Die Elektrophorese wurde in Mini-PROTEAN II-Gelkammern für 15 min bei 75 V und anschließend bei 130 V durchgeführt (ca. 1h 15 min). Als Referenz diente in jedem Gel ein Molekulargewichtsmarker. Anschließend wurden die Gele gefärbt (Silberfärbung oder *Coomassie Brilliant Blue*-Färbung) oder die Proteine auf Nitrocellulose transferiert.

### 3.2.3 Proteingelfärbung

#### Färbung mit Coomassie Brilliant Blue

Alle Arbeitsschritte erfolgten bei RT und fanden unter Rotation (300 rpm) statt. SDS-Polyacrylamidgele wurden 45 min in Entfärbelösung (Bio-Rad) von störenden Salzen befreit und anschließend 45 min in Coomassie-Färbelösung (Bio-Rad) inkubiert. Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern, wurden die Gele zweimal je 45 min in jeweils frischer Entfärbelösung gewaschen. Die eingesetzte Menge entsprach dem zehnfachen Volumen der Färbelösung. Ein längeres Entfärben wurde vermieden, um ein Bleichen der Signalstärke zu verhindern.

#### Silberfärbung

Die Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte mit dem Silver Stain Plus Kit von Bio-Rad. Die Färbung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 3.2.4 Western-Immunoblotanalyse

Proteine wurden aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulosemembranen über ein elektrisches Feld transferiert. Dazu wurde die Nitrocellulosemembran auf das Gel gelegt und mit Filterpapieren zu einem „Sandwich“ zusammengesetzt. Sowohl Nitrocellulosemembran, Filterpapier als auch das Gel wurden zuvor in Semi-Dry-Puffer getränkt. Der Transfer erfolgte bei 20 V für 1h 15 min in einer Semi-Dry-Blot-Kammer. Die Proteinbanden auf der Nitrocellulosemembran wurden durch Inkubation in Ponceau S-Lösung (2 min) sichtbar gemacht. Die Hintergrundfärbung wurde durch mehrfaches Waschen mit destilliertem Wasser entfernt.

Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurde die Membran für mind. 30 min in Magermilchlösung bei RT inkubiert. Proteine wurden mit Primärantikörpern, gerichtet gegen ProteinX ( $\alpha$ -ProteinX), über Nacht bei 4°C markiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch mehrmaliges Waschen der Membran für mind. 5 min mit TS/Tween entfernt. Im Anschluss erfolgte für 1h bei RT die Inkubation mit entsprechendem Sekundärantikörper (gegen Maus (ms), Kaninchen (rb) oder Meerschweinchen (gp) gerichtetes, Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppeltes Ziegen Serum). Alle Inkubationen erfolgten unter Schütteln (300 rpm). Nach gründlichem Waschen (mind. 1h, je 15 min in TS/Tween) wurde die Membran ca. 30 s mit HRP-Substrat (Enhanced Chemiluminescence-Lösung) benetzt. Die daraus resultierenden Signale wurden anschließend in einer Dunkelkammer über Exposition auf einem Film visualisiert.

### Quantifizierung

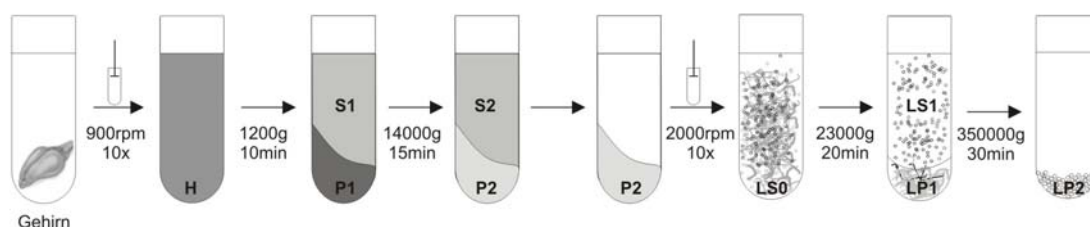
Filme wurden eingescannt und die Bandenvolumina densitometrisch mit Hilfe des Labimage 1D 2000 Programms gemessen und ausgewertet.

### 3.3 Subzelluläre Fraktionierung

Für die subzelluläre Fraktionierung wurden sowohl PC12-Zellen als auch Ratten- bzw. Mausgehirne benutzt. Synaptosomen und synaptische Vesikel wurden nach einem Protokoll von Huttner und anderen präpariert (Huttner *et al.*, 1983). Alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt, um insbesondere proteolytische Enzymaktivitäten zu minimieren. Zusätzlich wurden dem Homogenisierungspuffer kurz vor Gebrauch Protease-Inhibitoren und PMSF zugesetzt. Protease-Inhibitoren sowie PMSF wurden aufgrund ihrer geringen Stabilität in wässriger Lösung alle 60 min erneut zugegeben.

### 3.3.1 Präparation von Synaptosomen

Eine Ratte wurde mit Diethylether betäubt und anschließend dekapiert. Bei der Verwendung von Mäusen wurden diese durch Genickbruch getötet. Die Schädeldecke wurde geöffnet, das Gehirn so schnell wie möglich entnommen und in 10 ml (Ratte) bzw. 5 ml (Maus) Homogenisierungspuffer überführt. Das Gewebe wurde in einem Dounce-Homogenisator homogenisiert (900 rpm, 10x) und die Zellkerne und Zelltrümmer bei 1200 x g für 10 min in einer Ultrazentrifuge sedimentiert (P1). Aus dem Überstand (S1) wurden Synaptosomen durch 15 minütige Zentrifugation bei 14 000 x g angereichert (P2). Die unreine Synaptosomenfraktion im Pellet P2 wurde je nach experimentellem Design im entsprechenden Puffer resuspendiert und weiterverwendet.



**Abb. 13** Grundschema der subzellulären Fraktionierung von Mäuse- und Rattengehirn

Synaptische Vesikel/Synaptosomen aus Maus- bzw. Rattengehirn wurden durch verschiedene Zentrifugationsschritte angereichert. Homogenat [H], Zellkerne und Zelltrümmer [P1], Synaptosomen [P2], Überstand 1 [S1], Überstand 2 [S2], Lyseüberstand 0 [LS0], Lyseüberstand 1 [LS1], Lysepellet 1 [LP1], synaptische Vesikel [LP2].

### 3.3.2 Aufreinigung von Synaptosomen

Synaptosomen aus Rattengehirn wurden präpariert (3.3.1) und in ca. 2 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert. In der Zwischenzeit wurde in Ultra-Clear Zentrifugationsgefäßen (14 x 95 mm) ein diskontinuierlicher Ficoll-Gradient vorbereitet, indem verschiedene Konz. von Ficoll®400, gelöst in Homogenisierungspuffer, überschichtet wurden: auf 4 ml einer 6%igen Ficollsg. folgte 1 ml einer 9%igen Ficollsg. und schließlich 4 ml einer 13%igen Ficollsg.. Auf den Gradienten wurden vorsichtig 2 ml P2 geladen. Die Zentrifugation erfolgte in einem Beckmann SW 40 Ti *swing-out* Rotor in einer Ultrazentrifuge bei 90 040 x g für 35 min bei 4°C. Es wurde darauf geachtet, dass die Ultrazentrifuge langsam beschleunigte und abbremste. An der Grenzschicht zwischen 9% und 13% sammelt sich die aufgereinigte Synaptosomenfraktion, welche abgenommen und in 20 ml Homogenisierungspuffer erneut bei 12 000 x g für 20 min pelletiert wurde. Das Sediment mit den aufgereinigten

Synaptosomen wurde abhängig vom Versuchsaufbau in ca. 500 µl des entsprechenden Puffers aufgenommen.

### **3.3.3 Präparation synaptischer Vesikel**

Synaptosomen wurden präpariert (3.3.1) und in ca. 1 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert. Die Synaptosomen wurden mit destilliertem Wasser in einem Verhältnis von neun Volumenanteilen destilliertes H<sub>2</sub>O zu einem Volumenanteil P2 versetzt, um einen osmotischen Schock herbeizuführen. Durch die Zugabe von HEPES-KOH (Endkonzentration 10 mM) wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Die anschließende Homogenisation im Dounce-Homogenisator (2 000 rpm, 3x) diente der mechanischen Lysierung der Synaptosomen. Das Lysat (LS0) wurde 20 min bei 23 000 x g in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das resultierende Pellet (LP1) setzt sich hauptsächlich aus Fragmenten der Plasmamembran zusammen. Aus dem Überstand (LS1) wurde durch Zentrifugation für 30 min bei 350 000 x g die unreine synaptische Vesikelfraktion gewonnen (LP2). Zur Resuspendierung wurde der Überstand (LS2) verworfen und das Pellet (LP2) in ca. 200 µl Homogenisierungspuffer aufgenommen und zehnmal jeweils durch eine 27 G und eine 23 G Kanüle passagiert.

### **3.3.4 Präparation von Membranfraktionen von PC12-Zellen**

Zur Aufbereitung von Membranfraktionen wurden PC12-Zellen bis zur Semikonfluenz in 60 mm-Kulturschalen angezüchtet. Die Zellen von 3 bis 4 Kulturschalen wurden zweimal mit kaltem Homogenisierungspuffer gewaschen, mit 1 ml Homogenisierungspuffer pro Kulturschale abgelöst und bei 1 000 x g für 5 min sedimentiert. Die folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment einmal in eiskaltem Homogenisierungspuffer gewaschen, bevor es für 10 min bei 1 200 x g sedimentiert wurde. Das resultierende Sediment konnte für weitere Inkubations- bzw. Experimentieransätze verwendet werden.

Zur Herstellung von Membranen wurde das Zellsediment in Homogenisierungspuffer aufgenommen und im Verhältnis 1:9 mit destilliertem Wasser vermischt. Der Ansatz wurde durch die Zugabe von 10 mM HEPES-KOH (pH 7,4) gepuffert und anschließend 9x bei 900 rpm im Dounce-Homogenisator aufgeschlossen. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 25 000 x g wurde der Überstand erneut zentrifugiert (350 000 x g, 30 min) und das Pellet je nach Größe in einem entsprechenden Volumen (~ 200 – 1 000 µl) des für den Versuch benötigten Puffers resuspendiert. Dieses Pellet enthält

unter anderem vesikuläre Membranen und wird aufgrund seiner Aufarbeitung in den folgenden Versuchen als Pseudo-LP2 bezeichnet.

### **3.4 Stimulation von Synaptosomen mit Saccharose**

Durch die Zugabe von Saccharose in Form einer hypertonen Lösung wird Vesikelfusion ausgelöst (Rosenmund & Stevens, 1996). Eine Stimulation mit Saccharose zieht somit exozytotische Prozesse nach sich.

Aufgereinigte Synaptosomen wurden aus Maus- bzw. Rattengehirn präpariert (3.3.2) und mit Saccharose stimuliert. Das synaptosomale Pellet (P2) wurde in KR-Hepes Puffer resuspendiert und mit 0,5 M Saccharose für 5 min bei 37°C stimuliert.

Anschließend wurde der Ansatz sofort auf Eis gestellt und die Hyperosmolarität durch die Zugabe des zehnfachen Volumens an eiskaltem KR-Hepes reduziert. Die Saccharose wurde durch Zentrifugation bei 8 500 x g für 5 min bei 4°C entfernt. Das Sediment wurde in Homogenisierungspuffer aufgenommen und für Glutathion-S-Transferase (GST)-Bindungsstudien weiterverwendet (3.9).

### **3.5 Hemmung Dynamin- und AP3- abhängiger Signalwege unter der Verwendung von Dynasore und Brefeldin A**

Die Substanz Brefeldin A (BFA) aus dem Pilz *Eupenicillium Brefeldianum* stört den vesikulären Proteintransport vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Komplex (Sciaky *et al.*, 1997) und hemmt Dynamin- und AP3-abhängige Signalwege (Salazar *et al.*, 2004; Stoorvogel *et al.*, 1996).

Aufgereinigte Synaptosomen (3.3.2) wurden in KR-Hepes Puffer plus 2,5 mM Ca<sup>2+</sup> resuspendiert und mit 10 µM BFA (AP3 Inhibitor) und 80 µM Dynasore (Dynamin Inhibitor) für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Stimulation wurde gestoppt, indem der Ansatz sofort auf Eis gestellt wurde. Es folgte eine Zentrifugation von 5 min bei 8 500 x g und 4°C. Das Sediment wurde in Homogenisierungspuffer resuspendiert und für GST-Bindungsstudien weiterverwendet.

### **3.6 Extraktion von Membranproteinen**

Die zu untersuchenden Proteine wurden mit Detergentien aus dem Membranverband extrahiert. Als Detergentien dienten Lubrol oder Triton X-100 in einer finalen Konz. von 2 bzw. 1 %. Die Proteinproben wurden mit dem jeweiligen Detergenz im entsprechenden Puffer versetzt und für 1h bei 4°C inkubiert. Je nach Versuchsaufbau

wurden die nicht extrahierbaren Anteile (Non-Extrakt) durch Zentrifugation (5000 rpm, 5 min) vom Extrakt getrennt.

### **3.7 Isolation von Detergenz-resistenten Membrandomänen**

Die Isolation von Detergentien-resistenten (unlöslichen) Membrandomänen (DRMs) erfolgte nach einer Anleitung von Becher und anderen, indem unlösliche Fraktionen niedriger Dichte von löslichen Fraktionen hoher Dichte durch Zentrifugation in einem Saccharosegradienten getrennt wurden (Becher *et al.*, 2001).

DRMs wurden aus Synaptosomen und synaptischen Vesikeln adulter Mäuse oder Ratten gewonnen. Gereinigte Synaptosomen wurden über einen Ficoll-Gradienten hergestellt (3.3.2). Im Fall von ungereinigten synaptischen Vesikeln erfolgte die Aufarbeitung wie unter 3.3.3 beschrieben. Das synaptosomale Pellet (P2) bzw. die synaptischen Vesikel (LP2) wurden in MBS Puffer resuspendiert und die Membranproteine extrahiert (3.6). Im Anschluss wurde die gesamte Probe (Extrakt + Non-Extrakt) mit dem gleichen Volumen einer 80%igen Saccharoselösung vermischt (250-500 µl). Das Gemisch wurde vorsichtig mit einer gebogenen Pasteurpipette auf den Boden eines Saccharose-Dichtegradienten geladen. In Abhängigkeit des Volumens der Zentrifugationsgefäße wurde unterschiedlich für die Herstellung des Gradienten vorgegangen. Für Zentrifugationsgefäße mit einem Volumen von 14 ml, 14 x 95 mm (13 Fraktionen) wurden Fraktionen von 5%, 10%, 15%, 25% und 30% Saccharose in MBS hergestellt. Jede MBS-Saccharose-Fraktionslösung wurde mit 0,1%igem Triton bzw. 0,2%igem Lubrol versetzt und per Hand aufsteigend von 30% bis hin zu 5% vorsichtig im Zentrifugationsgefäß übereinander geschichtet. Der Gradient wurde anschließend über Nacht bei 4°C equilibriert. Für Saccharose-Dichtegradienten in Zentrifugationsgefäßen mit einem Volumen von 5,1 ml, 13 x 51 mm (10 Fraktionen) wurde ein Gradientenmischer (Carl Roth GmbH) verwendet. Hierfür wurde eine 20%ige und eine 30%ige MBS-Saccharoselösung hergestellt und der Gradientenmischer mit je 1,3 ml von beiden Lösungen beladen. Der Gradient wurde bei RT und 10 rpm gegossen und anschließend per Hand mit 500 µl einer 5%igen MBS-Saccharoselösung überschichtet. Alle MBS-Saccharoselösungen wurden, wie bereits beschrieben, mit 0,1%igem Triton bzw. 0,2%igem Lubrol ergänzt. Der mit Probe beladene Saccharose-Dichtegradient wurde über Nacht bei einer Temperatur von 4°C und 140 000 x g in einem Beckmann SW 40 Ausschwingrotor zentrifugiert. Die Beschleunigung und Abbremsung der Ultrazentrifuge erfolgte so langsam wie möglich. Es wurden 1 ml

Fraktionen (größere Dichtegradienten) bzw. 350 µl Fraktionen (kleinere Dichtegradienten) von der Spitze bis zum Boden abgenommen und in Laemmli-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden im Anschluss der Größe nach mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Western-Blot Verfahren mit spezifischen Antikörpern analysiert.

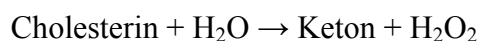
### **3.7.1 Entfernung von Cholesterin aus Zellmembranen mit Methyl- $\beta$ -cyclodextrin**

Für die Entfernung von Cholesterin aus den Zellmembranen wurde Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) verwendet. Cyclodextrine bilden aufgrund ihrer Struktur als zyklische Oligosaccharide hydrophobe Hohlräume, in welchen Cholesterin und andere Steroide eingelagert werden können.

Aufgereinigte Synaptosomen (P2) bzw. ungereinigte synaptische Vesikel (LP2) wurden in MBS Puffer resuspendiert und mit 10 mM M $\beta$ CD für 30 min bei 37°C und unter Schwenken (300 rpm) inkubiert. Anschließend wurde die Probe ein zweites mal mit M $\beta$ CD für 20 min bei 4°C unter Schwenken behandelt. Durch Zentrifugation bei 9000 rpm für 5 min bei 4°C wurde M $\beta$ CD entfernt und das Pellet in 1ml MBS Puffer für die Isolation von Detergentien-resistenten Mikrodomänen resuspendiert.

### **3.7.2 Bestimmung des Cholesteringehalts in Membranfraktionen**

Der Cholesteringehalt von Membranfraktionen wurde mit Hilfe des Cholesterol/Cholesteryl Ester Quantitation Kit der Firma BioVision gemäß Herstellerangaben bestimmt. Das Prinzip dieser Untersuchung basiert auf einer enzymatischen Reaktion der Cholesterinoxidase. In der Probe befindliches Cholesterin wird durch die Cholesterinoxidase zu Cholestenon oxidiert.



Das entstandene Wasserstoffperoxid reagiert in Anwesenheit der Meerrettichperoxidase (HRP) mit 10-Acetyl-3,7-Dihydroxyphenoxazin (Amplex Red Reagenz) und bildet Resorufin. Resorufin ist stark fluoreszierend und kann photometrisch detektiert werden ( $\lambda$  570 nm). Zugabe von Cholesterinesterase ermöglicht es, zusätzlich zum Gehalt an freiem Cholesterin auch das in Cholesterylestern gebundene Cholesterin zu erfassen. Enzymreaktion und Messung wurden in 96 well Platten und mit einem Probenvolumen von 50 µl pro well durchgeführt. Vor der photometrischen Messung wurde der Reaktionsansatz 1h bei 37°C lichtgeschützt inkubiert.

### 3.7.3 Aktivitätsbestimmung der Alkalischen Phosphatase

Die Alkalische Phosphatase ist in DRMs angereichert und wird oft als Markerprotein verwendet (Eckert *et al.*, 2003; Hooper, 1999). Ihre Anwesenheit in Detergentien-resistenten Mikrodomänen wird über einen Aktivitätstest bestimmt.

Als Substrat für die Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase wurde p-Nitrophenylphosphat eingesetzt. Die alkalische Phosphatase katalysiert die Hydrolyse von Phosphateestern. Als Produkt der Enzymreaktion entsteht neben Phosphat auch p-Nitrophenol, dessen Konzentration bei 405 nm photometrisch bestimmt werden kann. Der Test wurde in 96-Mikrotiterplatten durchgeführt. Eine Stammlösung von 0,2 mM p-Nitrophenol diente der Herstellung einer Verdünnungsreihe von 0, 40, 80, 120, 160 und 200  $\mu$ M. Dazu wurden je 0, 20, 40, 60, 80, 100  $\mu$ l Stammlösung in die Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend mit dest. Wasser auf 100  $\mu$ l aufgefüllt.

Der Standard sowie die Proben (je 100  $\mu$ l) wurden 1:1 mit Substratlösung (p-Nitrophenylphosphat Substratsystem) versetzt und die Reaktionsansätze 1h bei RT lichtgeschützt inkubiert. Die Absorption wurde bei 405 nm im ELISA-Lesegerät gemessen. Anhand der Verdünnungsreihe wurde eine Standardkonzentrationskurve berechnet und die Enzymaktivität durch Vergleich mit dem Standard bestimmt.

### 3.8 Immunpräzipitation

Mit Hilfe der Immunpräzipitation (IP) kann ein bestimmtes Protein inklusive seines Interaktionspartners aus einer Vielzahl von Proteinen und Protein-Protein-Komplexen eines Zellysates isoliert werden, und so die Frage geklärt werden, ob zwei (oder mehrere) Proteine miteinander interagieren. Die Methode wird neben GST-Bindungsstudien oft zur Identifizierung neuer Interaktionspartner eines Proteins eingesetzt.

Für die Immunpräzipitation wurde Proteinextrakt (3.6) aus Synaptosomen oder synaptischen Vesikeln der Maus bzw. der Ratte hergestellt. Vom Extrakt wurden 200  $\mu$ l mit 2  $\mu$ l Antikörper versetzt und der Ansatz über Nacht bei 4°C unter ständiger Rotation (300 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurden zu jeder Probe jeweils 60 $\mu$ l aufgereinigte G-Sepharose-Kügelchen gegeben und das Gemisch 1h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose mit gebundenem Antikörper bei 5000 rpm für 5 min sedimentiert und der Überstand (SN) in Laemmli-Puffer gelöst. Das Sepharose Sediment - das sogenannte Immunpräzipitat (IP) - wurde 3x in Extraktionspuffer gewaschen, um danach in Laemmli-Puffer aufgenommen zu werden. Anschließend



erfolgte die Analyse der Proben mittels Proteingelektrophorese (3.2.1) und Western-Immunoblotanalyse (3.2.4).

### **3.9 Bindungsstudien mit rekombinanten Fusionsproteinen**

Glutathion-S-Transferase (GST)-Bindungsstudien, auch GST-Pulldown in der englischen Literatur genannt, dienen dem Nachweis von *in vitro* Protein-Protein-Interaktionen. Im Gegensatz zur Immunpräzipitation wird als Bindungsprotein ein rekombinantes Protein eingesetzt.

Dazu wird ein Fusionsprotein aus GST und Köderprotein hergestellt. Die GST (aus *Schistosoma japonicum*) hat eine hohe Affinität für Glutathion, was eine Kopplung des Fusionsproteins an Glutathion Sepharose Kügelchen ermöglicht. Bindungspartner des Köderproteins können mit Hilfe der gekoppelten Glutathion Sepharose aus einem Homogenat co-aufgereinigt und analysiert werden.

#### **3.9.1 Herstellung von Glycerinkulturen**

Zur Lagerung von transformierten *E. Coli* Zellen über einen längeren Zeitraum wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurde das Zellmaterial aus LB-Flüssigkulturen im Verhältnis 1:1 mit 80%-igem Glycerin versetzt und als 1 ml Aliquots bei -80°C gelagert.

#### **3.9.2 Expression von Fusionsproteinen in *E. Coli***

Mit Plasmid transformierte *E. Coli* BL21-Stämme (Tab. 1) wurden in 50 ml LB/Amp-Medium über Nacht bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Am nächsten Tag wurde mit dieser Kultur im Verhältnis von 1:10 2YT/Amp-Medium angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0,5-0,8$ ) wurde die Expression durch Zugabe von IPTG (0,5 mM) bei 30°C induziert. Nach vierstündiger Expressionszeit wurden die Bakterien sedimentiert (15 min, 5000 rpm) und bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

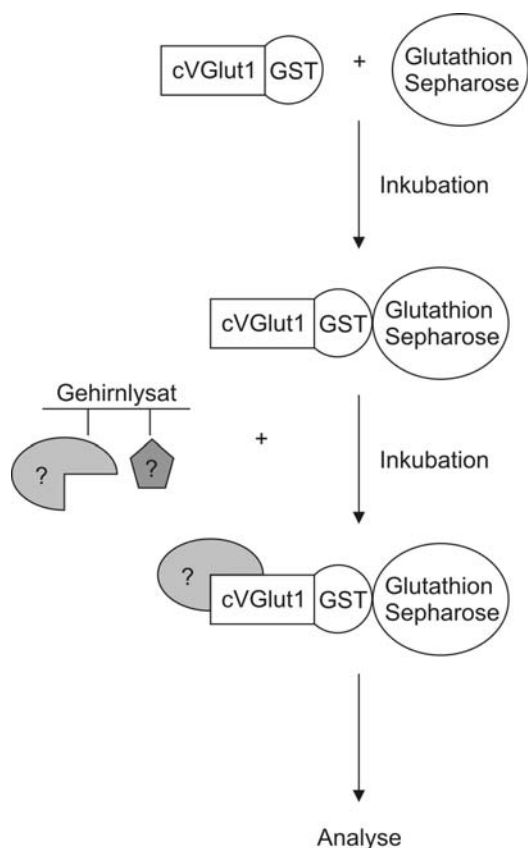
#### **3.9.3 Aufbereitung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen**

Eingefrorene Bakterienpellets einer 500 ml Kultur wurden in 40 ml PBS resuspendiert. Nach Zugabe von RNase und DNase (je 10 µl), PMSF (1 mM), Pi (1:1000, 10 µl) und einer Spatelspitze Lysozym wurde der Ansatz 15 min auf Eis inkubiert und die Bakterien durch aufeinanderfolgende Ultraschallpulse mit einer Arbeitsfrequenz von 50-60 kHz über 90 s (Energienstufe 60%, Puls-Dauerverhältnis 50%) aufgeschlossen.

Nach Zugabe von 1% Triton und ein- bis fünfminütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien erneut durch aufeinanderfolgende Ultraschallpulse mit einer Arbeitsfrequenz von 50-60 kHz über 60 s lysiert (Energienstufe 60%, Puls-Dauerverhältnis 50%). Danach wurde der Ansatz für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend Zelltrümmer und Zellkerne durch Zentrifugation bei maximaler Umdrehung (15 min bei 4°C) sedimentiert. Das bakterielle Lysat enthält das GST-Fusionsprotein und wurde für die Beladung von Glutathion Sepharose-Kügelchen benutzt. Je GST-Fusionsprotein wurden 1 ml Glutathion Sepharose-Kügelchen 3x in PBS (jeweils 40 ml pro Waschgang) gewaschen (5000 rpm, 4°C, 5 min). Das bakterielle Lysat wurde 1h bei 4°C mit den Kügelchen unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Kügelchen wurden erneut 3x gewaschen, um unspezifische Bindungen zu minimieren. Anschließend wurden die Kügelchen in PBS gelöst und die Konzentration des gebundenen Proteins auf den Kügelchen mittels BCA-Test bestimmt.

### **3.9.4 Proteinaufbereitung für Glutathion-S-Transferase-Bindungsstudien**

Für die Aufarbeitung von Protein wurden Mäuse- bzw. Rattengehirne verwendet. Dazu wurden Synaptosomen frisch präpariert (3.3.1) oder aber gefrorenes Material verwendet. Je nach experimenteller Durchführung wurden die Synaptosomen gegebenenfalls mit Saccharose stimuliert (3.4) sowie mit Brefeldin A und Dynosore behandelt (3.5). Bei der Verwendung von Gesamtgehirnlysate für Bindungsstudien wurde frisch präpariertes oder gefrorenes Mausgehirn bis zum S1 aufbereitet (3.3.1). Zur Lyse wurde das Material mit Homogenisierungspuffer auf 5 mg/ml Proteinlösung konzentriert und mit einer finalen Konzentration von 20 mM Hepes (pH 7,4, KOH), 100 mM KCl und 2 mM MgCl<sub>2</sub> versetzt. Neben Pi (1: 1000), PMSF (1 mM) und Phosphatase-Inhibitoren (einfach) wurde zur Probe 1% Triton zugegeben. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis unter Rotation folgte eine 15 minütige Zentrifugation bei 43 500 x g, 4°C. Der Überstand wurde im Anschluss bei 26 5000 x g zentrifugiert. Vom hierbei erhaltenen Überstand wurde im BCA-Test die Proteinkonzentration bestimmt und auf 2 mg/ml mit HMK/TX Puffer konzentriert. Das Mausgehirnlysate wurde für GST-Bindungsstudien verwendet.



**Abb. 14 Schematischer Ablauf von GST-Bindungsstudien zur Identifizierung potentieller Bindungspartner am Beispiel des C-Terminus von VGlut1**

Der C-Terminus von VGlut1 [cVGlut1] wurde als GST-Fusionsprotein [cVGlut1-GST] in Bakterien exprimiert und an Glutathion Sepharose [Glutathion Sepharose] gebunden. Der entstandene Komplex wurde mit Gehirnlisat der Maus inkubiert. Potentielle Bindungspartner an das Fusionsprotein können in einer weiteren Analyse identifiziert werden.

### 3.9.5 Glutathion-S-Transferase-Bindungsstudien (Pulldown Experiment)

Je 1,5 ml einer 2 mg/ml Gehirnlisatlösung der Maus bzw. der Ratte wurden mit PMSF (1mM) und Pi (1: 1 000, 10 µl) versetzt und im Anschluss mit 100 µg an Kügelchen gekoppeltem GST-Fusionsprotein 1h bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Die Unterschiede im benötigten Kügelchen-Volumen aufgrund variierender Konzentrationen des GST-Fusionsproteins wurden durch die entsprechende Zugabe unbelasteter Kügelchen ausgeglichen. Als Kontrolle dienten ein Ansatz unbelasteter Glutathion-Kügelchen sowie die Inkubation von Proteinlysate mit an Kügelchen gekoppeltem GST-Protein. Die Kügelchen wurden sedimentiert (5000 rpm, 5 min, 4°C) und der Überstand in 4 x Laemmli-Puffer aufgenommen. Die Kügelchen wurden im Anschluss 3x in HMK/TX-Puffer und anschließend einmal mit HMK-Puffer für 5 min bei 5000 rpm und 4°C gewaschen. Nach vollständiger Entfernung des Überstands wurden die Kügelchen in 100 µl 1 x Laemmli-Puffer durch vorsichtiges Auftropfen aufgenommen und anschließend 10 min bei 90°C im Thermomixer inkubiert.

### **3.9.6 Alkylierung der Cystein-tragenden Proteine mit Acrylamid**

Reduktion und Alkylierung der in den Proteinen enthaltenen Cysteine ist ein essentieller Schritt des In-Gel-Verdaus, ein Verfahren zur Probenvorbereitung für massenspektrometrische Analysen von Proteinen. Um die Effizienz des In-Gel Verdaus und damit die Sequenzabdeckung in der massenspektrometrischen Analyse zu verbessern, wurden die Proben vor der Beladung auf das SDS-Polyacrylamidgel mit Acrylamid alkyliert. Der frühe Alkylierungsschritt verhindert die Rückfaltung der Proteine bei der elektrophoretischen Trennung und ermöglicht damit eine optimale Zugänglichkeit der Schnittstellen für die Protease während des In-Gel-Verdaus. Eine Reduktion der Cysteine erfolgte durch die Zugabe von Laemmli-Puffer zu den Proben, in welchem bereits DTT als reduzierendes Agens enthalten ist. Die Proben wurden in Laemmli-Puffer 10 min bei 90°C inkubiert und anschließend 20 min bei 4°C mit 10%igem Acrylamid behandelt. Direkt im Anschluss erfolgte die SDS-Gelelektrophorese (3.2.2). Proteolytischer Verdau und massenspektrometrische Analysen wurden von Andreas Pich (Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover) durchgeführt.

## **3.10 Zellkulturarbeiten**

### **3.10.1 Kultivierung von PC12-Zellen**

PC12-Zellen wurden auf Zellkulturschalen bis zur Konfluenz bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach Bedarf wurden die Platten bzw. Schalen mit Kollagen oder PLL beschichtet.

Die Zellkulturschalen wurden mit steriler Kollagenlösung unter der Sterilbank benetzt und die Flüssigkeit über Nacht eingetrocknet. Die beschichteten Schalen wurden bis zur Verwendung im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt.

Im Fall von PLL wurden die benetzten Platten unter der Sterilbank 2h bei RT inkubiert. Restliche PLL-Lösung wurde entfernt und die Platten nach zweimaligem Waschen mit PBS über Nacht unter der Sterilbank getrocknet. Die beschichteten Platten wurden bis zur Verwendung bei 4°C in Aluminiumfolie maximal zwei Wochen aufbewahrt.

Die Zellen wurden mit einer Dichte von 2 - 2,5 x 10<sup>6</sup> Zellen je 100 mm Schale in Kulturmedium ausgesät und bei Konfluenz zum Ausdünnen umgesetzt. Zum Umsetzen wurde das Medium entfernt, die Zellen mit frischem Medium heruntergespült und mit einer Dichte von 2 - 2,5 x 10<sup>6</sup> Zellen je Schale mit 8 ml Kulturmedium verdünnt.

### 3.10.2 Einfrieren von Zellen

Zellen einer konfluent bewachsenen 100 mm Schale wurden in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und zu je 500 µl in Kryoröhrchen gefüllt. Zur Zellsuspension wurden langsam 500 µl Einfrierlösung geträufelt. Die Röhrchen wurden über Nacht in Isopropanol bei -80°C eingefroren und am darauffolgenden Tag zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

### 3.10.3 Aufschluss von Zellen

Für die Western-Immunoblotanalyse wurden die Zellen mechanisch aufgeschlossen. PC12-Zellen wurden auf 60 mm-Kulturschalen semikonfluent angezchtet. Die Zellen von 1-2 Kulturschalen wurden 2x mit kaltem Homogenisierungspuffer gewaschen und mit 1 ml Homogenisierungspuffer pro Kulturschale abgelöst. Die folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden durch 15 aufeinanderfolgende Ultraschallpulse mit einer Arbeitsfrequenz von 50-60 kHz Gleichschall (Energienstufe 60%, Puls-Dauerverhältnis 50%) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer und Kerne wurden in einem Zentrifugationsschritt (3.000 x g, 4°C, 5 min) pelletiert, und die Proteinkonzentration vom Überstand für folgende Western-Immunoblotanalysen auf 1 mg/ml in Laemmli-Puffer konzentriert.

### 3.10.4 Permeabilisierung von Zellen

Eine Permeabilisierung von Zellen ermöglicht eine Neurotransmitteraufnahme an Vesikeln auch ohne Vesikelpräparation.

Das Medium wurde entfernt und die semikonfluent gewachsenen PC12-Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen/100 mm Kulturschale in je 4 ml des entsprechenden Puffers suspendiert und bei 1 000 x g für 3 min bei 4°C sedimentiert. Anschließend wurde das Sediment in ca. 1 ml Puffer resuspendiert. Zur Zellyse wurde dem Puffer das aus *Streptococcus pyogenes* stammende porenformende Toxin Streptolysin O (SLO) (ca. 50-100 HE/ml) zugesetzt. Dieses Toxin besitzt hämolytische Aktivität (HE/ml), welche nach einer Methode von Ahnert-Hilger (Ahnert-Hilger *et al.*, 2000) bestimmt wurde. Zur Reduktion der Disulfidbrücken wurde DTT (1mM) zugegeben. Der Ansatz wurde 10 min auf Eis inkubiert, da bei dieser Temperatur das Toxin an das Cholesterin der Plasmamembran bindet. Eine anschließende Erwärmung der Proben (10 min, 37°C) auf mind. RT induziert

Porenbildung ( $\text{\O}12\text{nm}$ ). Anschließend wurde erneut zentrifugiert ( $16\ 000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) und das Pellet für die Neurotransmitteraufnahme genutzt.

### 3.10.5 Neurotransmitteraufnahme

Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis falls nicht anders gekennzeichnet, um die Funktionstüchtigkeit der Zellen zu erhalten. Der KGC3 Puffer wurde standardmäßig für die Glutamataufnahme bzw. KG3 Puffer für die Serotoninaufnahme verwendet.

Änderungen in den Pufferzusätzen sind, falls nötig, angegeben.

Die vorbereiteten Zellen wurden im entsprechenden Puffer resuspendiert. Dieses Resuspendat wurde für die Neurotransmitteraufnahme mit Puffer versetzt ( $1:1 \rightarrow 25 \mu\text{l} + 25 \mu\text{l}$ ), der zusätzlich den tritiummarkierten und/oder unmarkierten Neurotransmitter und andere Zusätze enthielt:

#### Glutamataufnahme

49,5 $\mu\text{M}$	Kaliumgluconat
+ 0,5 $\mu\text{M}$	$^3\text{H}$ -Glutamat
+/- Inhibitor(en)	
1 $\mu\text{M}$	Trypan Blau ( $\rightarrow$ VGlut)
2 $\mu\text{M}$	Bafilomycin ( $\rightarrow$ VATPase)
5 $\mu\text{M}$	Nigericin (unspez.)
20 $\mu\text{M}$	Valinomycin (unspez.)

#### Serotoninaufnahme

80 nM	$^3\text{H}$ -Serotonin
+ 1 mM	Ascorbinsäure
+/- Inhibitor	
6 $\mu\text{M}$	Reserpin ( $\rightarrow$ VMAT1/2)

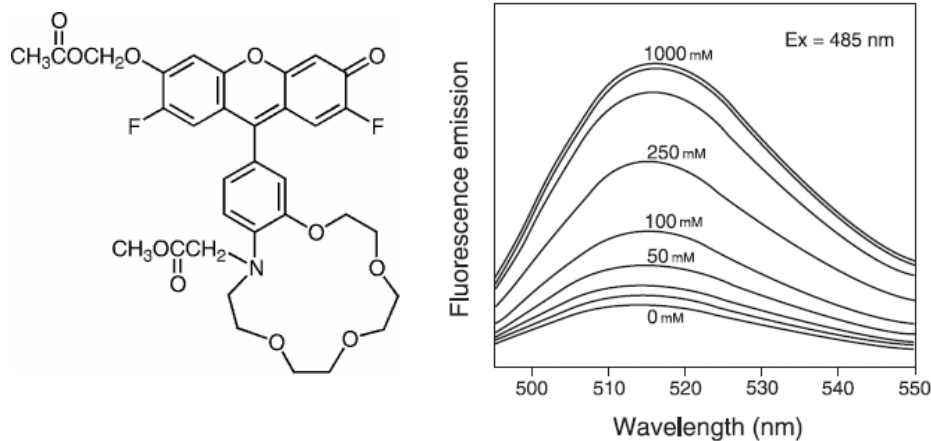
Die Ansätze wurden bei  $37^\circ\text{C}$  und  $1\ 400 \text{ rpm}$  für 10 min stimuliert. Durch Zugabe von eiskaltem Puffer wurde die Neurotransmitteraufnahme gestoppt. Die Proben wurden zentrifugiert ( $43\ 500 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 10 min) und zweimal im jeweiligen Puffer gewaschen (Verhältnis Puffer zu Probe mind. 10:1). Das Pellet wurde zwischen den Waschschritten nicht resuspendiert, um ein Herausfließen des Neurotransmitters aus den Zellen zu verhindern. Im Anschluss wurden die Pellets der Ansätze in  $200 \mu\text{l}$  Triton X-100 für 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  unter starkem Schütteln ( $1\ 400 \text{ rpm}$ ) resuspendiert.  $100 \mu\text{l}$  des Überstandes wurden in 4 ml Szintillatorlösung gegeben und kräftig gemischt. Die radioaktiven Zerfälle pro Minute wurden in DPM ermittelt und die Messwerte über 1 min gemittelt. Für die Neurotransmitter-Aufnahme wurden mind. Vierfachbestimmungen, für die Aufnahme in Anwesenheit des Inhibitors Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Differenz der DPM-Werte aus ungehemmter und gehemmter Aufnahme ergab  $\Delta\text{DPM}$ .

### 3.10.6 Immunzytochemische Methoden

Die Immunfärbung von Zellkulturzellen wurde auf Glasplättchen in 24well Platten durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in einer Dichte von  $0,5 \times 10^6$  Zellen pro PLL-beschichtetes Glasplättchen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen vorsichtig zweimal in PBS gewaschen und mit 4% PFA 20 min bei RT fixiert. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden, wurden die Zellen anschließend 1h bei RT in Blocklösung inkubiert. Die Zellen wurden mit spezifischem Primärantikörper über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  in Blocklösung ohne Triton inkubiert und überschüssiger Antikörper durch mehrmaliges Waschen in PBS entfernt. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper fand für 1-2h in Immunfluoreszenz-Antikörperlösung bei RT lichtgeschützt statt. Anschließend wurden die Zellkerne mit 4', 6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) gefärbt. DAPI ist ein in die DNA interkalierendes Molekül, welches bevorzugt an AT-reiche Regionen der DNA-Helix bindet. Der blau fluoreszierende Farbstoff wird mit Licht der Wellenlänge 355 – 360 nm angeregt und hat sein Fluoreszenzmaximum bei 450 nm. Die Zellen wurden nach einmaligem Waschen in DAPI-Methanol-Lösung ( $1 \mu\text{g DAPI/ ml Methanol}$ ) für 15 min bei Raumtemperatur in DAPI- Methanol-Lösung inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit Methanol wurden die Zellen ein letztes Mal in destilliertem Wasser gewaschen und die Glasplättchen auf Objektträgern in Mowiol-Eindeckungsmedium fixiert.

### 3.10.7 Färbung mit CoroNa Green

CoroNa Green ist ein grün-fluoreszierender  $\text{Na}^+$ -Indikator. Eine Bindung von  $\text{Na}^+$  führt zu einem Anstieg der Intensität der Fluoreszenzemission neben einer geringen Verschiebung der Wellenlänge von 492 nm auf 516 nm. Über die Intensität der Fluoreszenzemission lässt sich auf die  $\text{Na}^+$ -Konzentration in der Zelle schließen. Als natriumbundene Struktur des Indikators CoroNa Green kommt ein Monobenzomonoaza-15-Kronen-5-Ether und als fluoreszierende Komponente ein Fluoreszeinderivat zum Einsatz. Zum Farbstoff liegen bisher nur wenige Untersuchungen vor. Der Hersteller Invitrogen gibt einen  $K_d$ -Wert von 80 mM an.



**Abb. 15 CoroNa Green**

Fluoreszenz Emission Spektrum des CoroNa Green Indikators in Puffer (50 mM MOPS/pH 7,0, 100 mM K<sup>+</sup>) mit unterschiedlichen Konzentrationen von Natrium (©Invitrogen).

PC12-Zellen wurden auf Kollagen beschichtete Glasplättchen in einer Dichte von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/Glasplättchen ausgesät und bis zur Semikonfluenz 12-24h kultiviert. Die Zellen wurden vorsichtig zweimal in Natrium- und Phosphat-freiem ( $-\text{Na}^+ / -\text{PO}_4^{3-}$ ) Medium gewaschen und anschließend 15 min bei 37°C im Brutschrank in  $\text{Na}^+$ -freiem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  CoroNa Green, gelöst in Pluronic F-127 (Dispersionsmittel und Emulgator) und DMSO, in Natrium- und Phosphat-freiem Medium minimal benetzt (ca. 1 ml/60 mm Schale) und 40 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Bis zur Messung wurden die Zellen in der CoroNa Green-Lösung kultiviert, um fehlerhafte Messungen durch Leckströme des CoroNa Green zu vermeiden. Nach einmaligem Waschen in natrium- und phosphatfreiem Medium wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop platziert. Das Medium wurde vollständig mit einer Pipette entfernt und die Zellen sofort mit Medien unterschiedlicher Natrium- und Phosphatkonzentration versetzt. Die Fluoreszenzemission bei 510 nm wurde direkt nach Zugabe des jeweiligen Mediums aufgenommen. Die Fluoreszenzintensität wurde für jedes Glasplättchen an mindestens zwei und maximal 3 verschiedenen Stellen fotografiert. Eine Auswertung erfolgte mit Hilfe der iTEM 5.1 Software der Firma Olympus Soft Imaging Solutions GmbH.

### 3.11 Statistische Analyse

Die Statistische Analyse wurde mit dem zweiseitigen Studentischen T-Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  sind mit einem Stern in den Abbildungen markiert. Die Datenerhebung erfolgte



durch mindestens Fünffachexperimente. Im Fall von geringen Fallzahlen ( $N=3$ ) wurden auf Aussagen einer schließenden Statistik verzichtet und deskriptive Verfahren angewendet.

Für die Vermessung der optischen Dichte in Western-Immunoblotanalysen wurden drei verschiedene Verdünnungen der untersuchten Proben quantifiziert. In den Abbildungen sind die Mediane sowie die zugehörigen Abweichungen durch Minimal- und Maximalwert oder Semiquartilsabstand ( $N>3$ ) dargestellt. Wurden in Western-Immunoblotanalysen mehrere Versuchsbedingungen innerhalb eines Experiments miteinander verglichen, wurde die Summe der Bandenvolumina gebildet und für jedes Bandenvolumen die relative Abweichung von dieser Summe (AvdS) ermittelt. Von mehreren Experimenten wurde der Median der AvdS berechnet und die Divergenz vom Median entweder über den Minimal- und Maximalwert oder den Semiquartilsabstand dargestellt.

Die statistische Vorgehensweise wurde in Absprache mit dem Institut für Biometrie der Charité getroffen.

## 4 Ergebnisse

In der folgenden Arbeit wurde die Sortierung vesikulärer Glutamattransporter zwischen Plasma- und synaptischer Vesikelmembran und deren Regulation untersucht.

Im ersten Teil wurde der Frage nachgegangen, welchen Einfluss Interaktionspartner auf die Regulation bzw. Sortierung vesikulärer Glutamattransporter nehmen und die Sortierung vesikulärer Glutamattransporter in cholesterinreiche Membrandomänen – sogenannte *Lipid Rafts* – synaptosomaler Membranen und synaptischer Vesikel untersucht.

Im zweiten Teil wurde dargestellt, ob eine VGlut2-transfizierte PC12-Zelllinie als Untersuchungsmodell für VGlut2-Sortierungs- und Funktionsstudien geeignet ist. Lokalisationsstudien und Funktionsstudien u.a. zur Neurotransmitteraufnahme dienten hierbei der Klärung dieser Fragestellung.

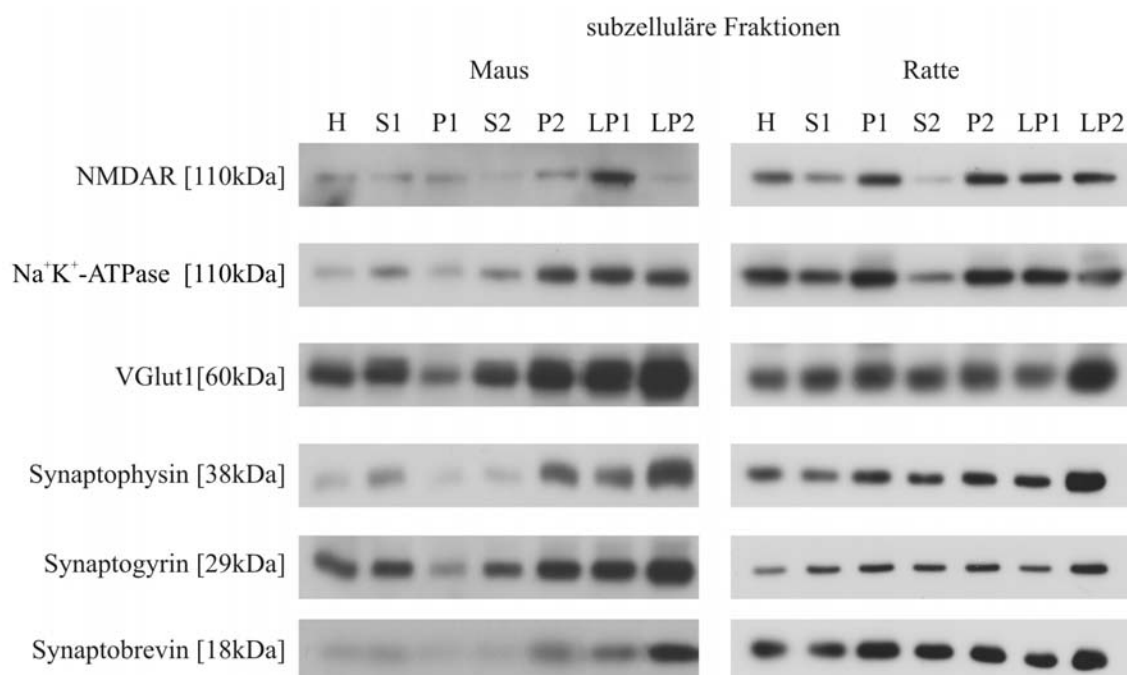
### 4.1 Anreicherung synaptischer Vesikelproteine

Ein Großteil der Versuche wurde an Synaptosomen/synaptischen Terminalien (P2) oder synaptischen Vesikeln (LP2) der Maus bzw. der Ratte durchgeführt. Zur Aufreinigung derselben wurde die subzelluläre Fraktionierung des Gehirns nach Huttner und anderen als grundlegende Methode angewendet (Huttner *et al.*, 1983). Dazu wurde das homogenisierte Gehirn der adulten Tiere durch verschiedene Zentrifugationsschritte fraktioniert (3.3) und die gewonnenen Fraktionen (Homogenat, postnuklearer Überstand S1 und dazugehöriges Pellet P1, mit Synaptosomen angereichertes Pellet P2 und dazugehöriger Überstand S2, nach der Lyse von Synaptosomen erhaltenes Synaptosomenmembranpellet LP1 und das Pellet synaptischer Vesikel LP2) in einer Western-Immunoblotanalyse untersucht.

Es wurden je 5µg Protein aus einer Aufreinigung mit Maus- bzw. Rattengehirn pro Spur aufgetragen und anschließend mit Antikörpern (Ak), gerichtet gegen die vesikulären Proteine VGlut1, Synaptobrevin (Syb), Synaptophysin (Syp) und Synaptogyrin (Syg), detektiert. Zur Kontrolle der Aufreinigung wurde ebenfalls mit Ak gegen Proteine der prä- und postsynaptischen Membran, wie der NMDA-Rezeptor 1 und die Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase detektiert, welche auf synaptischen Vesikeln nicht vorkommen (Lv *et al.*, 2008).

Es war in der Western-Immunoblotanalyse eine Anreicherung der synaptischen Vesikelproteine vom Homogenat zum LP2 zu beobachten (Abb. 16). Als

postsynaptisches Protein wurde der NMDA-Rezeptor nur bis zum LP1 angereichert. Gleiches galt für die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, ein post- und präsynaptisches Plasmamembranprotein. In den synaptischen Vesikel-Fractionen (LP2) war der NMDA-Rezeptor sehr schwach (Maus) bzw. stärker (Ratte) detektierbar. Die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase war im LP2 stärker detektierbar, allerdings nicht weiter angereichert im Vergleich zur LP1-Fraktion. Möglicherweise wurden mit diesem Antikörper Vesikel detektiert, die während der Endozytose aus der Plasmamembran abgeschnürt wurden. Ein weiterer Grund hierfür könnte im Reinheitsgrad der Aufarbeitung gelegen haben. Eine Aufreinigung mit Rattengehirn lieferte entsprechende Ergebnisse.



**Abb. 16 Aufreinigung synaptischer Proteine**

Das Gehirn einer adulten Maus und einer adulten Ratte wurde mit der Methode der subzellulären Fraktionierung aufgereinigt. Die verschiedenen Fraktionen (Homogenat [H], postnuklearer Überstand [S1] mit dazugehörigem Pellet [P1], Überstand [S2] mit dazugehörigem Pellet angereicherter Synaptosomen [P2], nach der Lyse von Synaptosomen erhaltenes Synaptosomenmembranpellet [LP1], angereicherte synaptische Vesikel [LP2]) wurden in Laemmli-Puffer aufgenommen. In Reihung der Präparation wurden von jeder Fraktion 5  $\mu\text{g}$  pro Spur in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Molekulargewichte der untersuchten Proteine sind in eckigen Klammern aufgeführt. Vesikuläre Proteine zeigten eine Anreicherung hin zum LP2, wohingegen postsynaptische Proteine wie der NMDAR und die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase lediglich bis zum LP1 bzw. P2 angereichert wurden.

## 4.2 Charakterisierung der VGlut1-Endophilin-Interaktion

Im Gegensatz zu VGAT und anderen synaptischen Proteinen unterliegen VGluts einer Tageszeit-abhängigen Sortierung zwischen Plasmamembran und synaptischer Vesikelmembran (Darna *et al.*, 2009; Yelamanchili *et al.*, 2006). Unbekannt ist bisher,

welche Regulationsfaktoren für diese Sortierung eine Rolle spielen. Ein möglicher Regulationspartner in diesem Zusammenhang ist Endophilin, welches an VGlut1, nicht aber an VGlut2 bindet (Voglmaier *et al.*, 2006). Es stellt sich die Frage, inwiefern diese Interaktion Einfluss auf Sortierungsprozesse nimmt und wie weit diese Sortierungsprozesse unabhängig von VGlut2 stattfinden.

Interaktionsstudien an Endophilin und VGlut1 erfolgten in einem ersten Ansatz mittels der Methode der Immunpräzipitation (3.8).

#### **4.2.1 Nachweis der VGlut1-Endophilin Interaktion durch Immunpräzipitation**

Die Proteine von frisch präparierten Synaptosomen (P2) der Ratte wurden mit Triton X-100 extrahiert (3.6) und inkubiert mit einem Antikörper, gerichtet gegen Endophilin ( $\alpha$ -Endophilin Ak)<sup>3</sup>. Hierfür wurde ein Antikörper, produziert im Kaninchen (rb- $\alpha$ -Endophilin Ak), sowie ein Antikörper, produziert in der Maus (ms- $\alpha$ -Endophilin Ak), verwendet. Als Kontrolle wurde parallel dazu eine Probe mit ms- $\alpha$ -Syp Ak versetzt. Diese Kontrollbedingung diente dem Nachweis der Bindungsspezifität der  $\alpha$ -Endophilin Ak. Durch Zugabe von G-Sepharose wurde das Protein, gegen das der Antikörper gerichtet ist, samt seiner Interaktionspartner als Antigen-Antikörper-Komplex an die G-Sepharose Kügelchen gebunden. Die Isolation der präzipitierten Proteinkomplexe, das sogenannte Immunpräzipitat, erfolgte durch Zentrifugation. Die isolierten Proteine im Immunpräzipitat (IP) als auch die ungebundenen Proteine im Überstand (SN) wurden durch die Zugabe von Laemmli-Puffer denaturiert.

In den Western-Immunoblotanalysen wurde für die Detektion von VGlut1 die Verwendung von ms- und rb- $\alpha$ -VGlut1 Antikörpern ausgeschlossen, um ein falsch positives Signal für VGlut1, verursacht durch eine Markierung der schweren Polypeptidkette des  $\alpha$ -Endophilin Antikörpers, zu verhindern. Die schwere Polypeptidkette jedes Antikörpers liegt mit 55 kDa in der Höhe von VGlut1 mit einem Molekulargewicht von 60 kDa.

Die Immunpräzipitation mit ms- $\alpha$ -Endophilin Ak führte zu keiner Präzipitation von Endophilin, so dass dieser Antikörper für eine Immunpräzipitation ungeeignet ist (Abb. 17, A). Weitere Analysen wurden nicht durchgeführt. In Abb. 17, B ist die SDS-PAGE/Western-Immunoblotanalyse der Immunpräzipitation mit rb- $\alpha$ -Endophilin Ak

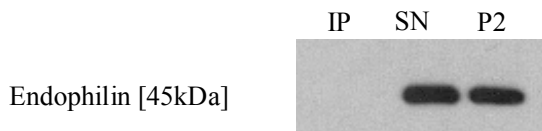
---

<sup>3</sup> beispielhaft für alle Antikörper-Bezeichnungen

und ms- $\alpha$ -Syp, Klon7.2 Ak dargestellt. Neben den Immunpräzipitaten (IP) wurden die Überstände (SN) aufgetragen, in denen nicht präzipitierbare Proteine nachgewiesen werden können. Der Vergleich von IP und SN zeigte, dass beide Antikörper effizient und entsprechend ihrer Antigenspezifität spezifisch Endophilin bzw. Synaptophysin präzipitierten.

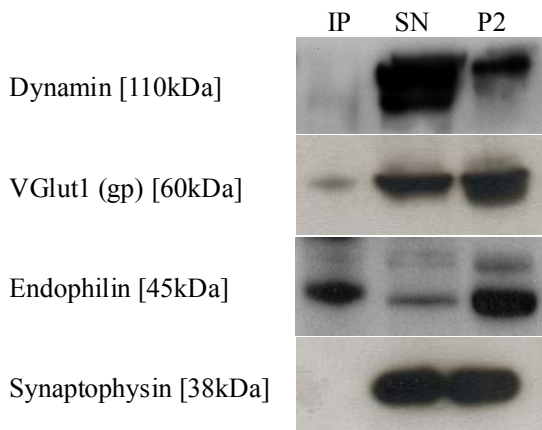
**A**

Immunpräzipitation: ms-a-Endophilin

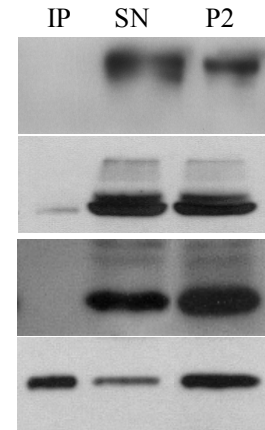


**B**

Immunpräzipitation: rb-a-Endophilin



Immunpräzipitation: ms-a-Syp



**Abb. 17 Immunpräzipitation zum Nachweis der VGlut1-Endophilin Interaktion**

Western-Immunoblotanalyse einer Immunpräzipitation mit rb- $\alpha$ -Endophilin Ak und ms- $\alpha$ -Synaptophysin Ak in frisch präparierten, aufgereinigten Synaptosomen der Ratte. A) Frisch präparierte, aufgereinigte Synaptosomen (P2) der Ratte wurden in 1%igem Triton lysiert. m- $\alpha$ -Endophilin Ak wurde über Nacht mit dem Lysat inkubiert und G-Sepharose zur Bindung des Antigen-Antikörper-Komplexes zugegeben. Gebundene Proteine im Sepharose Sediment (Immunpräzipitat) wurden durch Zentrifugation von nicht gebundenen Proteinen im Überstand getrennt. Nach mehrmaligem Waschen mit Extraktionspuffer wurden 15  $\mu$ l Immunpräzipitat [IP] und 5  $\mu$ l Überstand [SN] auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und im Western-Immunoblot-Verfahren mit verschiedenen Antikörpern analysiert. In [P2] sind ca. 3  $\mu$ g Ausgangsmaterial aufgetragen. In B) wurde wie in A) verfahren, jedoch rb- $\alpha$ -Endophilin Ak bzw. als Kontrolle ms- $\alpha$ -Synaptophysin Ak für die Immunpräzipitation verwendet. Während der m- $\alpha$ -Endophilin Ak für eine Präzipitation ungeeignet war, zeigte die Präzipitation mit rb- $\alpha$ -Endophilin Ak die Bindung von Dynamamin an Endophilin. Ein spezifischer Nachweis einer VGlut1-Endophilin Interaktion war nicht möglich.

Wie aus der Literatur bekannt ist, bindet Endophilin an Dynamamin (Ringstad *et al.*, 1999; Schuske *et al.*, 2003; Verstreken *et al.*, 2003), was im rb- $\alpha$ -Endophilin IP durch eine schwache, jedoch spezifische Dynamaminmarkierung bestätigt werden konnte, da im ms- $\alpha$ -Syp IP keine Markierung vorhanden war. Die Bindung an VGlut1 konnte in der Western-Immunoblotanalyse nicht eindeutig belegt werden. Sowohl im rb- $\alpha$ -Endophilin

IP als auch im ms- $\alpha$ -Syp IP lieferte der im Meerschweinchen (gp) produzierte  $\alpha$ -VGlut1 Ak eine Markierung in einer Höhe des Molekulargewichts von VGlut1, was die Spezifität des verwendeten Detektionsantikörpers in Frage stellte. Daher fand in einem weiteren Ansatz ein ms- $\alpha$ -VGlut1 Ak zur Detektion von VGlut1 Verwendung.

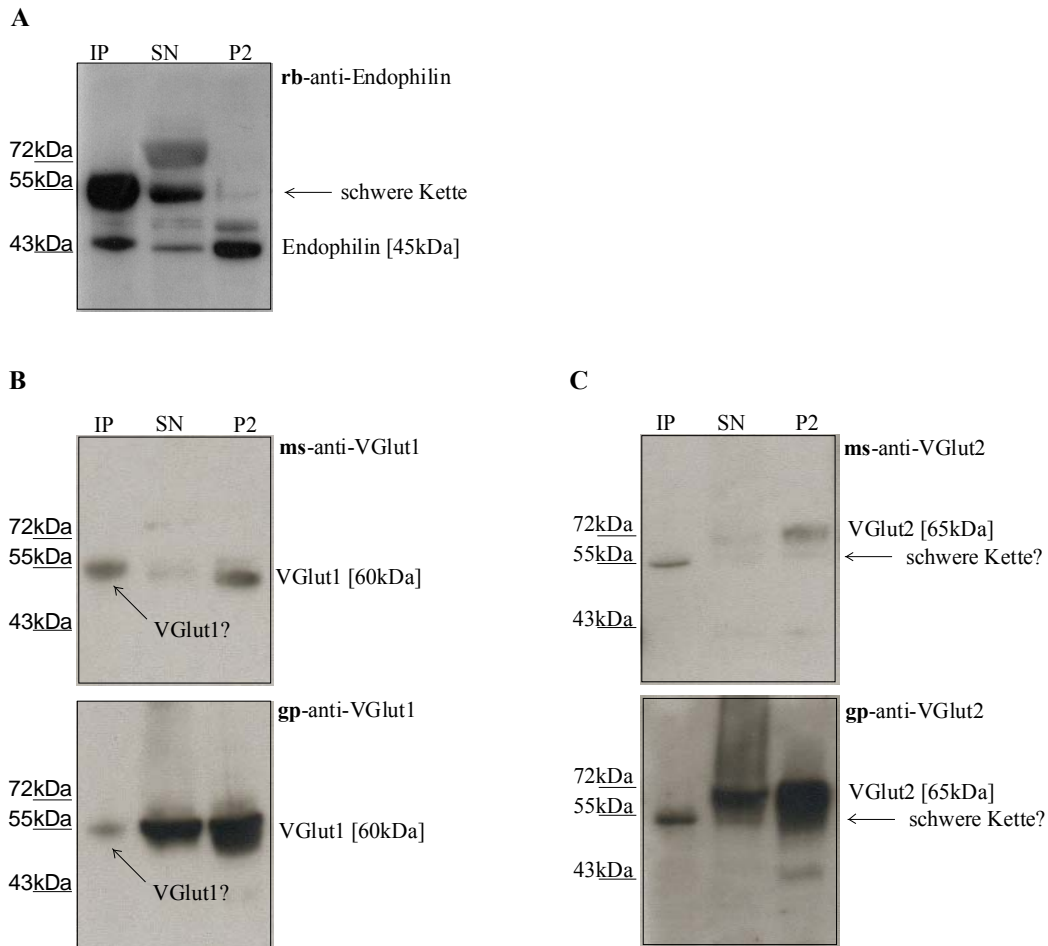
In einer SDS-PAGE wurden IP, SN und Ausgangsmaterial (P2) einer Immunpräzipitation mit rb- $\alpha$ -Endophilin Ak aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine durch Westernblotting wurden die Nitrocellulosemembranen mit ms- und gp- $\alpha$ -VGlut1 Ak, sowie ms- und gp- $\alpha$ -VGlut2 Ak als Negativ-Kontrolle bestückt. Zur Detektion der schweren Kaninchen-Polypeptidkette wurde eine Nitrocellulosemembran über einen Trennbereich von ca. 30 bis 100 kDa mit rb- $\alpha$ -Endophilin Ak, gefolgt von Sekundärantikörper (HRP-gekoppeltes Pferde-IgG, gerichtet gegen Kaninchen) inkubiert.

Die Inkubation mit rb- $\alpha$ -Endophilin Ak zeigte in Abb. 18 eine Markierung von Endophilin (45 kDa) und eine Markierung der schweren Kaninchen-Polypeptidkette in einer Höhe von 55 kDa. Beide  $\alpha$ -VGlut1 Ak und  $\alpha$ -VGlut2 Ak zeigten im IP ebenfalls eine Markierung in einer Höhe von 55 kDa. Ein Vergleich mit dem synaptosomalen Pellet P2 verdeutlichte, dass es sich im Fall von  $\alpha$ -VGlut2 Ak um eine unspezifische Markierung handelte, da VGlut2 im P2 auf einer Höhe zwischen 60 und 72 kDa markiert wurde. Im Gegensatz dazu konnte keine eindeutige Aussage bezüglich der Markierung von VGlut1 bzw. der Spezifität der  $\alpha$ -VGlut1 Ak (gp,m) gemacht werden. Die Markierung von VGlut1 im P2 liegt exakt auf der Höhe der Markierung der schweren Kaninchen-Polypeptidkette (55 kDa). Es war ungewiss, ob im IP VGlut1 oder die schwere Polypeptidkette markiert wurde.

Um die Spezifität des Sekundärantikörpers (HRP-gekoppeltes gegen Maus IgG oder Kaninchen IgG gerichtetes Pferde- bzw. Ziegen Serum von Vector Laboratories) sowie des Primärantikörpers (VGlut1 Ak (m, gp)) näher zu charakterisieren, wurden zwei Ansätze gewählt. Zum einen wurde auf einer SDS-PAGE Kaninchenserum, zum anderen rb- $\alpha$ -Endophilin Ak aufgetrennt. Das optimale Auftragungsvolumen für das Kaninchenserum wurde in einem Vorversuch durch eine Verdünnungsreihe bestimmt (Daten nicht gezeigt). Die aufgetragene Antikörperkonzentration entsprach der verwendeten Antikörperkonzentration in der Immunpräzipitation. In der anschließenden Western-Immunoblot-Analyse wurde mit verschiedenen Primärantikörpern und

entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert oder aber die Inkubation mit Primärantikörpern unterlassen und allein mit Sekundärantikörpern bestückt (Abb. 19).

#### Immunpräzipitation: rb- $\alpha$ -Endophilin



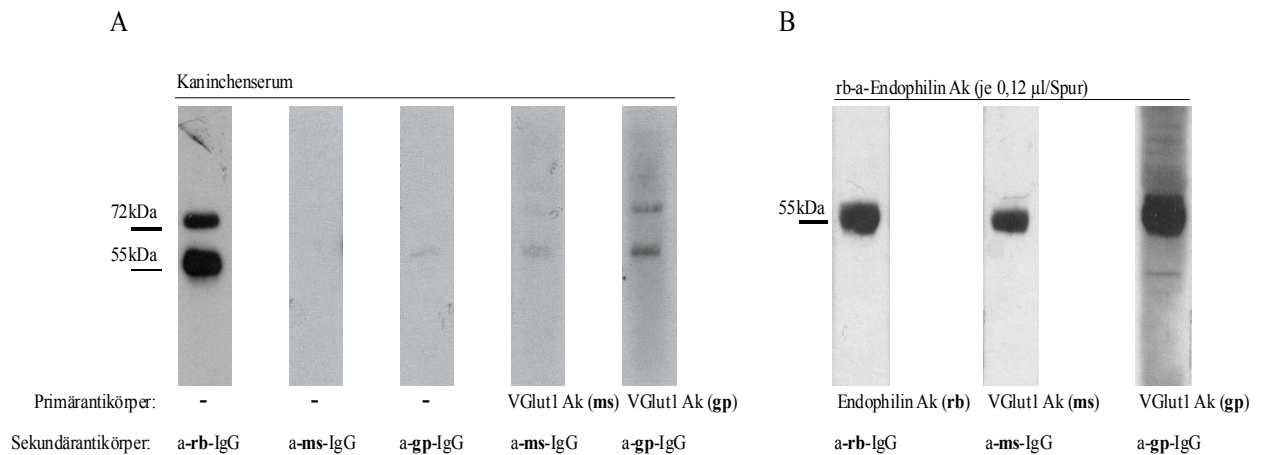
#### Abb. 18 Signalspezifität von VGlut1 Antikörpern

Western-Immunoblotanalyse einer Immunpräzipitation mit rb- $\alpha$ -Endophilin Ak. Frisch präparierte, aufgereinigte Synaptosomen (P2) der Ratte wurden in 1%igem Triton lysiert. rb- $\alpha$ -Endophilin Ak wurde über Nacht mit dem Lysat inkubiert und G-Sepharose zur Bindung des Antigen-Antikörper-Komplexes zugegeben. Gebundene Proteine im Sepharose Sediment (Immunpräzipitat) wurden durch Zentrifugation von nicht gebundenen Proteinen im Überstand getrennt. Nach mehrmaligem Waschen mit Extraktionspuffer wurden 15  $\mu$ l Immunpräzipitat [IP] und 5  $\mu$ l Überstand [SN] auf einem 12%igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Western-Immunoblot-Verfahren mit verschiedenen Antikörpern analysiert (rechter, oberer Bildrand). In [P2] waren ca. 3 $\mu$ g Ausgangsmaterial aufgetragen. Bei allen verwendeten Antikörpern war ein Signal auf der Höhe der schweren Kette der Antikörper (55 – 60 kDa) zu sehen.

Durch Inkubation der Nitrocellulosemembran mit  $\alpha$ -Kaninchen (rb) IgG von Vector Laboratories konnten die im Kaninchenserum schweren Polypeptidketten der Immunglobuline auf einer Höhe von 55 kDa nachgewiesen werden (Abb. 19, A).

Sowohl die Inkubation mit  $\alpha$ -VGlut1 Ak (ms, gp), gefolgt von Sekundärantikörper, als auch die Inkubation allein mit  $\alpha$ -Meerschweinchen (gp) IgG von Dianova zeigte eine

Markierung der schweren Polypeptidketten des Kaninchens, wobei ein Anstieg in der Signalstärke durch Zugabe von Primärantikörper zu verzeichnen war. Lediglich die Inkubation mit Sekundärantikörper  $\alpha$ -Maus (ms) IgG (Vektor Laboratories) ohne vorherige Primärantikörper-Inkubation zeigte keine Kreuzreaktivität mit dem Kaninchenserum.



**Abb. 19 Kreuzreaktivität von Primär- und Sekundärantikörpern**

Je 2  $\mu$ g normales unspezifisches Kaninchenserum (A) und je 100 ng  $\alpha$ -Endophilin Ak, produziert im Kaninchen (B), wurden in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und in einer Western-Immunoblotanalyse mit verschiedenen Primär- gefolgt von Sekundärantikörpern oder mit Sekundärantikörpern ohne vorherige Inkubation mit Primärantikörpern bestückt (unterer Bildrand). Die Molekulargewichte des Proteinmarkers sind in kDa aufgeführt (links).

Der Sekundärantikörper, gerichtet gegen Maus IgG, zeigte keine Kreuzreaktivität mit Kaninchenserum. Alle anderen getesteten Antikörper zeigten eine Kreuzreaktivität im Bereich der schweren Antikörper-Polypeptidkette bei 55 – 60 kDa.

Ebenso zeigten alle getesteten Primärantikörper (gp- $\alpha$ -VGlut1, m- $\alpha$ -VGlut1, rb- $\alpha$ -Endophilin), gefolgt von einer Inkubation mit entsprechendem Sekundärantikörper, eine Markierung der schweren Polypeptidketten des rb- $\alpha$ -Endophilin Ak (Abb. 19, B).

Eine Unterscheidung zwischen einer spezifischen VGlut1-Markierung oder aber einer Markierung der schweren Polypeptidkette des rb- $\alpha$ -Endophilin Ak konnte nicht getroffen werden.

Zusammenfassend ist in Tab. 2 die Kreuzreaktivität der verwendeten Antikörper dargestellt.



**Tab. 2 Zusammenfassung der Kreuzreaktivität von Antikörpern**

Antikörper (Ak)	Spezies	Antigen	Kreuzreaktivität (in der Immunoblotanalyse) mit:		
			rb-Serum	rb- $\alpha$ -E Ak	HC* (rb- $\alpha$ -E Ak)
Endophilin (E)	rb	aa* 256 - 276	+	+	+
	ms	aa 53 - 352	/	/	-
VGlut1	ms	c-Terminus	+	+	+
	gp	c-Terminus	+	+	+
VGlut2	ms	c-Terminus	/	/	+
	gp	c-Terminus	/	/	+
IgG, Peroxidase gekoppelt	Pferd	ms	-	/	/
	Ziege	gp	+	/	/

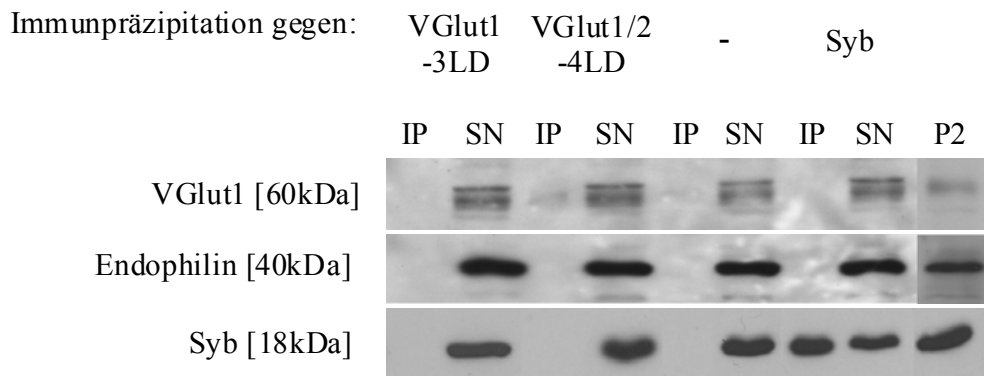
\* aa: Aminosäure, HC: heavy chain (schwere Polypeptidkette) des für die Immunpräzipitation verwendeten Antikörpers

Die Kreuzreaktivität verschiedener Antikörper auf Kaninchenserum, rb- $\alpha$ -Endophilin AK und die schwere Polypeptidkette des rb- $\alpha$ -Endophilin wurde in Western-Immunoblotanalysen untersucht. + : Kreuzreaktivität, - : keine Kreuzreaktivität, / : nicht getestet.

Da die Interaktion zwischen VGlut1 und Endophilin über eine Immunpräzipitation mit rb- $\alpha$ -Endophilin Ak und ms- $\alpha$ -Endophilin Ak nicht nachgewiesen werden konnte, wurde in einer weiteren Immunpräzipitation mit Antikörper, gerichtet gegen VGlut1, präzipitiert (Abb. 20). Hierfür wurden die Proteine von frisch präpariertem P2 der Ratte mit Triton X-100 extrahiert (3.6) und mit  $\alpha$ -VGlut1 Ak inkubiert (3.8). Die Verwendung eines Antikörpers, gerichtet gegen den C-Terminus von VGlut1, wurde ausgeschlossen, da es sich beim C-Terminus um die Bindestelle von Endophilin handelt (De Gois *et al.*, 2006; Voglmaier *et al.*, 2006). Es wurden Antikörper benutzt, die gegen die 4. luminale (rb- $\alpha$ -VGlut1/2-4LD) bzw. 3. luminale (rb- $\alpha$ -VGlut1-3LD) Domäne von VGlut1 gerichtet sind. Beide Antikörper wurden im Kaninchen produziert. Als Kontrolle wurde parallel dazu eine Probe mit m- $\alpha$ -Synaptobrevin Ak versetzt, um die Bindungsspezifität der  $\alpha$ -VGlut1 Ak zu zeigen. Ebenfalls wurde eine Probe ohne Antikörper inkubiert, um die Bindungsspezifität der Antikörper an die Sepharose zu zeigen. Alle Proben wurden mit G-Sepharose versetzt und das Immunpräzipitat (IP) durch Zentrifugation von ungebundenem Protein im Überstand (SN) abgetrennt. Mit Laemmli-Puffer versetzte Proben wurden zusammen mit dem Ausgangsmaterial (P2) in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western-Immunoblot-Verfahren mit ms- $\alpha$ -VGlut1 Ak, rb- $\alpha$ -Endophilin Ak und ms- $\alpha$ -Synaptobrevin Ak analysiert (3.2.2).

Eine Immunpräzipitation von VGlut1 war mit rb- $\alpha$ -VGlut1-3LD VGlut1 Ak nicht möglich, wohingegen im IP des rb- $\alpha$ -VGlut1/2-4LD Aks eine spezifische, wenn auch schwache Markierung des VGlut1 zu sehen war (Abb. 20). Allerdings wurde aus dem

Vergleich von IP und SN ersichtlich, dass die Effizienz der VGlut1-Präzipitation mit diesem Ak sehr gering war.



**Abb. 20 Immunpräzipitation mit rb- $\alpha$ -VGlut1-3LD und rb- $\alpha$ -VGlut1/2-4LD Ak**

Frisch präparierte, aufgereinigte Synaptosomen (P2) der Ratte wurden in 1%igem Triton lysiert. rb- $\alpha$ -VGlut1-3LD Ak [VGlut1-3LD], rb- $\alpha$ -VGlut1/2-4LD Ak [VGlut1/2-4LD] und m- $\alpha$ -Synaptobrevin Ak [Syb] wurden über Nacht mit dem Lysat inkubiert. In einem Kontrollansatz wurde Gehirnlisat ohne Antikörper [-] inkubiert. G-Sepharose wurde zur Bindung des Antigen-Antikörper-Komplexes zu allen Proben zugegeben und gebundene Proteine im Sepharose Sediment (Immunpräzipitat) durch Zentrifugation von nicht gebundenen Proteinen im Überstand getrennt. Nach mehrmaligem Waschen mit Extraktionspuffer wurden 15  $\mu$ l Immunpräzipitat [IP] und 5  $\mu$ l Überstand [SN] auf einem 12%igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. In [P2] sind ca. 3  $\mu$ g Ausgangsmaterial aufgetragen. Im Gegensatz zum  $\alpha$ -Syb Ak war mit den  $\alpha$ -VGlut1 Ak keine ( $\alpha$ -VGlut1-3LD Ak) bzw. nur eine unzureichende ( $\alpha$ -VGlut1/2-4LD Ak) Präzipitation des Zielproteins Synaptobrevin bzw. VGlut1 möglich. Die Interaktion von Endophilin und VGlut1 konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Interaktion von VGlut1 und Endophilin konnte aufgrund der Kreuzreaktivität der verwendeten Antikörper mit der schweren Polypeptidkette des rb- $\alpha$ -Endophilin Aks mit der Methode der Immunpräzipitation nicht nachgewiesen werden, so dass in einem zweiten Ansatz GST-Bindungsstudien zum Studium der VGlut1-Endophilin Interaktion herangezogen wurden.

#### 4.2.2 Nachweis der VGlut1-Endophilin Interaktion mit Hilfe von Glutathion-S-Transferase-Bindungsstudien

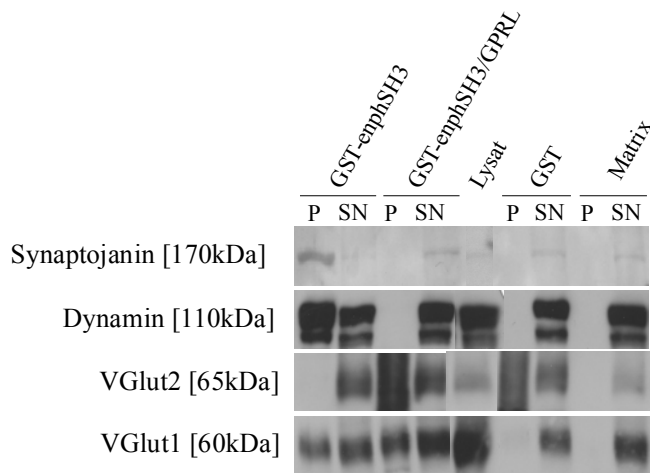
In einem zweiten Ansatz erfolgte der Nachweis der VGlut1-Endophilin Interaktion mit Hilfe von GST-Bindungsstudien. Hierbei wird die Interaktion zwischen einem GST-Fusionsprotein und einem weiteren Protein untersucht.

Fusionsproteine aus GST und der SH3-Domäne des Endophilin (GST-enphSH3) bzw. einer mutierten Variante der SH3-Domäne (GST-enphSH3/GPRL) wurden freundlicherweise von Prof. Volker Haucke, Freie Universität Berlin zur Verfügung gestellt (Tab. 1).

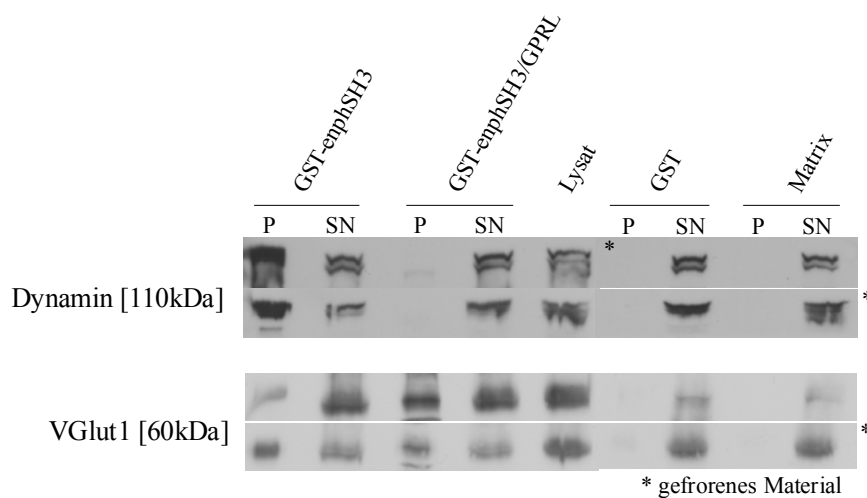
#### 4.2.2.1 Nachweis der VGlut1-Endophilin Interaktion in Lysat aus frisch präpariertem und ehemals gefrorenem Mausgehirn

Gelegentlich macht die begrenzte Verfügbarkeit von frisch präparierten Proben die Verwendung von gefrorenem Material unerlässlich. Um sicherzustellen, dass der Materialzustand keinen Einfluss auf das Ergebnis hat, wurden GST-Bindungsstudien sowohl mit frisch präpariertem als auch gefrorenem Mausgehirn durchgeführt (3.9). Nach Aufreinigung der GST-Fusionsproteine aus *E. Coli* (3.9.2) wurden diese an Glutathion Sepharose gebunden (3.9.3). Das an Glutathion Sepharose-gebundene GST-Fusionsprotein wurde mit Lysat von frisch präpariertem und gefrorenem Mausgehirn inkubiert (3.9.4, 3.9.5). Gebundene Proteine im Sepharose Sediment (P) wurden durch Zentrifugation von den ungebundenen Proteinen im Überstand (SN) getrennt und durch mehrmaliges Waschen der Sepharose aufgereinigt. Die Proben wurden anschließend im Western-Immunoblot-Verfahren analysiert (Abb. 21). Als Positivkontrolle diente die Inkubation mit  $\alpha$ -Dynamin Ak sowie mit  $\alpha$ -Synaptojanin Ak zum Nachweis der Dynamin-Endophilin-Interaktion (Ringstad *et al.*, 1997). Dynamin bindet ebenso wie Synaptojanin neben der SH3-Domäne von SH3GL2 (SH3-domain GRB2-like)/Endophilin u.a. die GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2) -SH3-Domäne (de Heuvel *et al.*, 1997; Gout *et al.*, 1993; Herskovits *et al.*, 1993; McPherson *et al.*, 1994).

A



B



**Abb. 21 VGlut1 und Dynamamin binden an die SH3-Domäne von Endophilin in GST-Bindungsstudien**

50 µg GST bzw. GST-endphSH3 und GST-endphSH3/GPRL wurden an Glutathion-Sephrose gebunden. Während das GST-endphSH3-Fusionsprotein die SH3-Domäne des Endophilin trägt, ist im GST-endphSH3/GPRL-Fusionsprotein durch einen Aminosäureaustausch von Glyzin gegen Arginin an Position 337 sowie von Prolin gegen Leuzin an Position 340 die SH3-Domäne mutiert. Aus dem Homogenisat von frisch präpariertem (A) bzw. vergleichend aus gefrorenem Mausgehirn (B) wurde durch Zentrifugation die Zellkerne und Zelltrümmer entfernt und der Überstand in 1%igem Triton lysiert. Das Lysat wurde für 1h mit den GST-Proteinen [GST-endphSH3, GST-endphSH3/GPRL, GST] inkubiert und gebundene Proteine im Sepharose Sediment durch Zentrifugation von nicht gebundenen Proteinen im Überstand getrennt. Als Kontrolle diente eine Inkubation von Mausgehirnlysat mit Glutathion Sepharose ohne gebundenes GST [-]. Nach mehrmaligem Waschen mit HMK-Puffer wurden Sediment (P) und Überstand (SN) auf einem 8%igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. In [L] sind ca. 10 µg Protein aus Mausgehirnlysat aufgetragen. Die Analyse erfolgte im Western-Immunoblot mit spezifischen Antikörpern.

Synaptojanin, Dynamamin und VGlut1, nicht aber VGlut2 banden an die SH3-Domäne von Endophilin. Ein Aminosäureaustausch an Position 337 und 340 führte zu einem Verlust der Bindung von Synaptojanin und Dynamamin, nicht jedoch von VGlut1 an die SH3 Domäne(A).Eine GST-Bindungsstudie war mit Lysat aus gefrorenen Mäusegehirnen ebenso möglich wie mit dem Lysat frisch präparierter Mäusegehirne (B).

Die Western-Immunoblotanalyse bestätigte die Bindung von Synaptojanin, Dynamamin und VGlut1 an die SH3-Domäne von Endophilin (Abb. 21). Ebenso wurde bestätigt, daß VGlut2 keine Interaktion mit der SH3-Domäne zeigt. Ein Aminosäureaustausch

von Glyzin (G) gegen Arginin (P) an Position 337 sowie von Prolin (R) gegen Leuzin (L) an Position 340 in der SH3-Domäne (GPRL-Mutation) führte zum Verlust der Bindungsfähigkeit von Dynamin und Synaptojanin, wie es in Abb. 21 zu sehen ist. Über jede dieser Mutationen ist bekannt, dass sie zu einer veränderten Bindungskapazität der GRB2-SH3-Domäne führen (Clark *et al.*, 1992; Grabs *et al.*, 1997). Die Bindung von VGlut1 an die SH3-Domäne wurde hingegen durch die Mutation nicht beeinträchtigt. Unspezifische Bindungen an die Matrix konnten ausgeschlossen werden. Einzig der  $\alpha$ -VGlut2-Ak zeigte in der Western-Immunoanalyse eine schwache Markierung im Sediment (P). Unspezifische Bindungen der  $\alpha$ -Dynamin Ak,  $\alpha$ -Synaptojanin Ak und  $\alpha$ -VGlut1 Ak an GST-Protein konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Der Vergleich zwischen gefrorenem und frisch präpariertem Mausgehirn zeigte keinen Unterschied im Bindevverhalten von VGlut1 und Dynamin an die GST-Fusionsproteine.

Ein Nachweis der VGlut1-Endophilin Interaktion war sowohl in frischem als auch gefrorenem Mausgehirn mit Hilfe von GST-Bindungsstudien möglich, wodurch für zukünftige Experimente ebenfalls gefrorenes Gehirn verwendet werden konnte. Ein Aminosäureaustausch an Position 337 und 340 in der SH3-Domäne von Endophilin hatte keinen Einfluss auf die Bindefähigkeit von VGlut1.

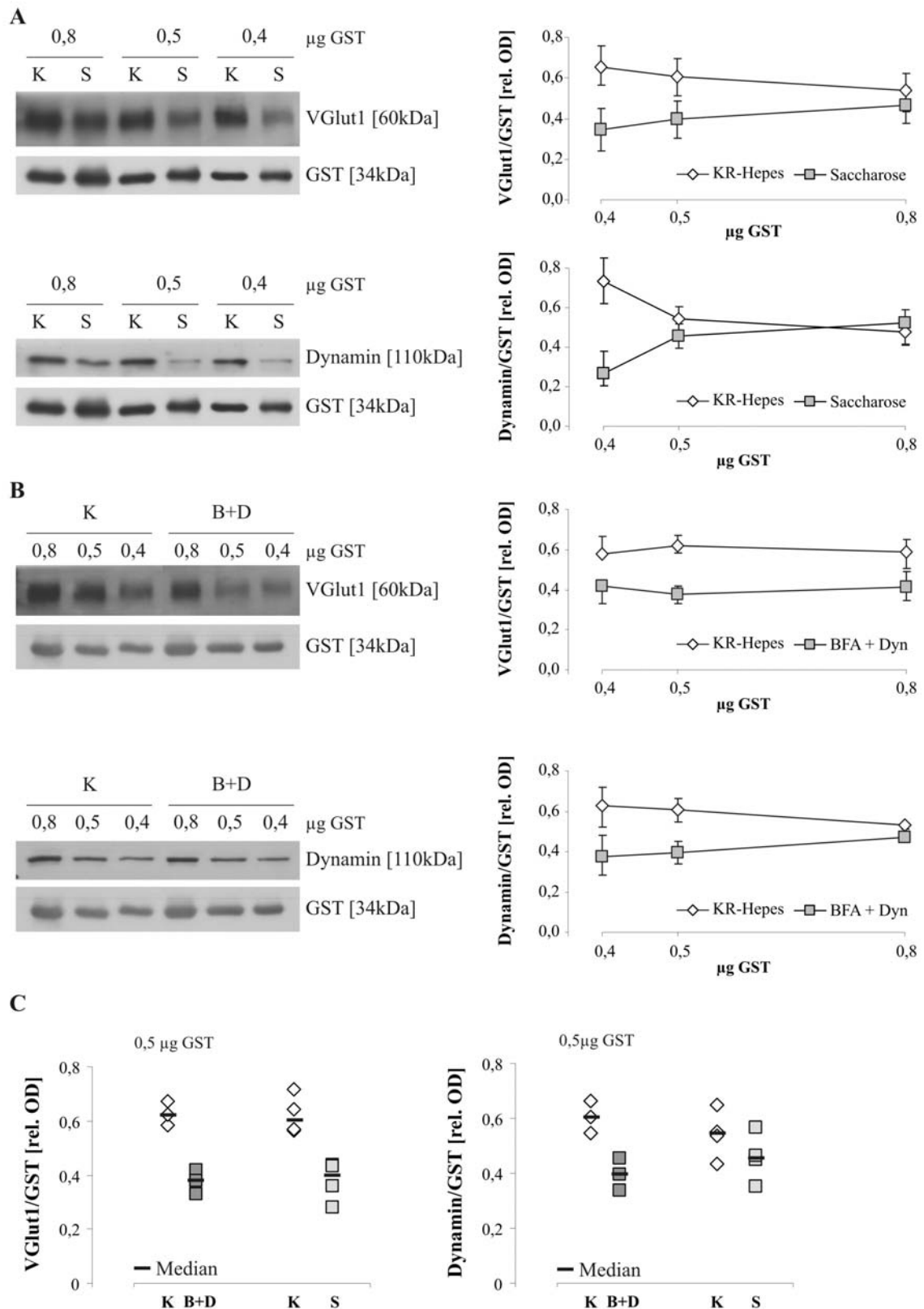
#### **4.2.3 Stimulation von exo- und endozytotischen Prozessen mit Saccharose bzw. Dynasore und Brefeldin A**

Ausgehend von der Tatsache, dass VGlut1 an Endophilin bindet und nach Stimulation exozytotischer Prozesse vermehrt an die Plasmamembran transloziert (Darna *et al.*, 2009), sollte untersucht werden, ob die Stimulation exo- und endozytotischer Prozesse zu Veränderungen in der VGlut1-Endophilin Interaktion führen. Um die Auswirkung exozytotischer Fusionen der Vesikel mit der Plasmamembran auf das Bindungsverhalten von VGlut1 an Endophilin zu untersuchen wurde die Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran durch eine hypertonische Saccharose-Lösung ausgelöst. Endozytotische Prozesse wurden durch die Verwendung von Brefeldin A (BFA) und Dynasore gehemmt. BFA hemmt die AP3-vermittelte Vesikelformierung in Endosomen, indem es ARF (ADP-Ribosylierungsfaktor) inhibiert - ein Regulatorprotein von AP3 (Sata *et al.*, 1999). Dynasore ist ein nicht-kompetitiver Inhibitor von Dynamin, der vermutlich an der GTPase-Domäne Dynamins ansetzt (Thompson & McNiven, 2006). Über eine

Interaktion mit der prolinreichen Sequenz von Dynamin, an die Endophilin bindet, ist nichts bekannt.

Frisch präparierte Synaptosomen (P2) der Maus wurden mit Saccharose stimuliert (3.4) oder mit Dynasore (Dyn) und Brefeldin A (BFA) versetzt (3.5) und anschließend in Triton lysiert (3.9.4). Parallel dazu wurde das GST-enphSH3-Fusionsprotein nach Aufreinigung aus *E. Coli* (3.9.2) an Glutathion Sepharose gebunden (3.9.3) und im Anschluss mit dem Triton-Lysat 1h inkubiert. Gebundene Proteine im Sepharose Sediment (P) wurden durch Zentrifugation von den ungebundenen Proteinen im Überstand getrennt und durch mehrmaliges Waschen der Sepharose aufgereinigt. Nach Aufnahme des Sediments in 100 µl Laemmli-Puffer wurden in einer SDS-Gelelektrophorese anschließend 3 verschiedene Proteinmengen aufgetrennt und im Western-Immunoblot-Verfahren analysiert. Die optischen Dichten wurden mit Hilfe der LabImage Software quantifiziert. Als Ladekontrolle diente GST. Die optischen Dichten von Dynamin und VGlut1 wurden auf das GST-Signal normiert. Für jedes Einzelexperiment wurden die Summen der normierten Einzelwerte berechnet und die relative Abweichung der Einzelwerte von diesen Summen ermittelt. Von diesen Werten wurde der Median gebildet und der Semiquartilabstand berechnet.

Eine Behandlung von Synaptosomen der Maus mit Brefeldin A und Dynasore zog eine signifikante Abnahme der Bindung von VGlut1 an das GST-enphSH3-Fusionsprotein nach sich (Abb. 22, B). Tendenziell ergab sich dieser Effekt ebenfalls für Dynamin, allerdings war in lediglich zwei der drei aufgetragenen Proben eine signifikante Abnahme zu sehen. Eine Behandlung mit Saccharose führte zu einer Abnahme der Bindung sowohl von VGlut1 als auch Dynamin an das GST-enphSH3-Fusionsprotein (Abb. 22, A). Allerdings ist diese Abnahme nicht für alle 3 aufgetragenen Proteinmengen signifikant. Lediglich in zwei (VGlut1) bzw. einer (Dynamin) der 3 verschiedenen aufgetrennten Proteinmengen wurde eine signifikante Abnahme detektiert. Je weniger Protein aufgetrennt wurde, desto besser konnten die Unterschiede zwischen den untersuchten Bedingungen aufgelöst werden.



**Abb. 22 GST-Bindungsstudie mit Synaptosomen nach Behandlung mit Saccharose oder Brefeldin A und Dynasore**

Frisch präparierte Synaptosomen der Maus wurden A) 5 min bei 37°C in Saccharose (S) bzw. KR-Hepes-Puffer (K) oder B) 10 min bei 37°C mit Brefeldin A und Dynasore (B+D) bzw. KR-Hepes-Puffer (K) inkubiert und das Sediment nach Zentrifugation in Homogenisierungspuffer, versetzt mit 1%igem Triton, lysiert. Das Lysat wurde für 1h mit 50 µg GST-endphSH3Fusionsprotein, gebunden an Glutathion-Sepharose, inkubiert und gebundene Proteine im Sepharose Sediment durch Zentrifugation von nicht

gebundenen Proteinen im Überstand getrennt. Nach mehrmaligem Waschen mit HMK-Puffer wurde das Sediment in 100 µl Lamml-Puffer aufgenommen. Von jeder Probe wurden 3 verschiedene Verdünnungen, berechnet an der GST-Konzentration in der Probe, auf einem 10%igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Analyse von mindestens 3 unabhängigen Experimenten erfolgte im Western-Immunoblot mit spezifischen Antikörpern, gerichtet gegen Dynamin, VGlut1 und GST. Die optische Dichte von VGlut1 und Dynamin wurde quantifiziert und auf die optische Dichte des entsprechenden GST-Signals normiert. Für jedes Einzelexperiment wurde die Summe der normierten Einzelwerte berechnet und die Differenzen der Einzelwerte von dieser Summe ermittelt. Von den Differenzen wurde der Median bestimmt, sowie die durchschnittliche Abweichung vom Median (Semiquartilabstand) im Fall von N=4 (Saccharose) berechnet. Für N=3 (Brefeldin A + Dynasore) wurde als Abweichung vom Median Maximal- und Minimalwert dargestellt. C) Protein, gebunden an 0,5µg GST, wurde mittels SDS/PAGE-Western-Immunoblotting analysiert und quantifiziert. Die Ergebnisse wurden in einem Punktdiagramm inklusive Median dargestellt.

Eine Behandlung mit Saccharose führte zur Abnahme der Bindung von VGlut1 an Endophilin (A). Die Hemmung endozytischer Prozesse zog eine Abnahme der Bindung von VGlut1 an Endophilin nach sich (B). Tendenziell waren diese Effekte auch für Dynamin beobachtbar.

Die Hemmung endozytischer Prozesse mittels Brefeldin A und Dynasore hatte eine Abnahme der Bindefähigkeit von VGlut1 an Endophilin zur Folge. Tendenziell war dies auch für Dynamin der Fall. Auch die Auslösung exozytischer Prozesse mittels Saccharose führte zu einer Abnahme der Bindefähigkeit sowohl von VGlut1 als auch von Dynamin an Endophilin.

Eine Blockade der Exozytose (BFA) und eine massive Stimulation (Saccharose) führten zu einer Verminderung der Interaktion von VGlut1 und Endophilin.

#### **4.2.4 GST-Bindungsstudien zur Analyse der zirkadianen Sortierung von VGlut1 in Wildtyp- und Per2<sup>Brdm1</sup>-Mäusen**

Vesikuläre Glutamattransporter unterliegen einer tagesabhängigen Sortierung zwischen Plasma- und Vesikelmembran (Darna *et al.*, 2009). Um zu klären, inwieweit Endophilin in die tagesabhängige Sortierung von VGlut1 an die Plasmamembran involviert ist, wurden GST-Bindungsstudien mit Wildtyp- und Per2<sup>Brdm1</sup>-Mäusen durchgeführt. Die für diese Versuche verwendeten Mäuse wurden in einem LD- bzw. DD-Zyklus gehalten und zu verschiedenen Zeitpunkten („Zeitgeber Time“, ZT) bzw. zu den entsprechenden zirkadianen Zeitpunkten („circadian time“, CT) geopfert (Beginn der Lichtperiode, 6 Uhr morgens (ZT0), Mitte der Lichtperiode, 12 Uhr mittags (ZT6), am Ende der Lichtperiode, 18 Uhr abends (ZT12) und in der Mitte der Dunkelperiode, 24 Uhr nachts (ZT18)). Auf Trockeneis tiefgefrorenes Gesamthirn dieser Mäuse aus dem Jahr 2010 wurde freundlicherweise von Urs Albrecht, Department of Medicine, Fribourg, zur Verfügung gestellt. In fl. Stickstoff tiefgefrorene synaptosomale Präparationen dieser Mäuse wurden freundlicherweise aus einer Präparation aus dem Jahr 2007 von Mahesh

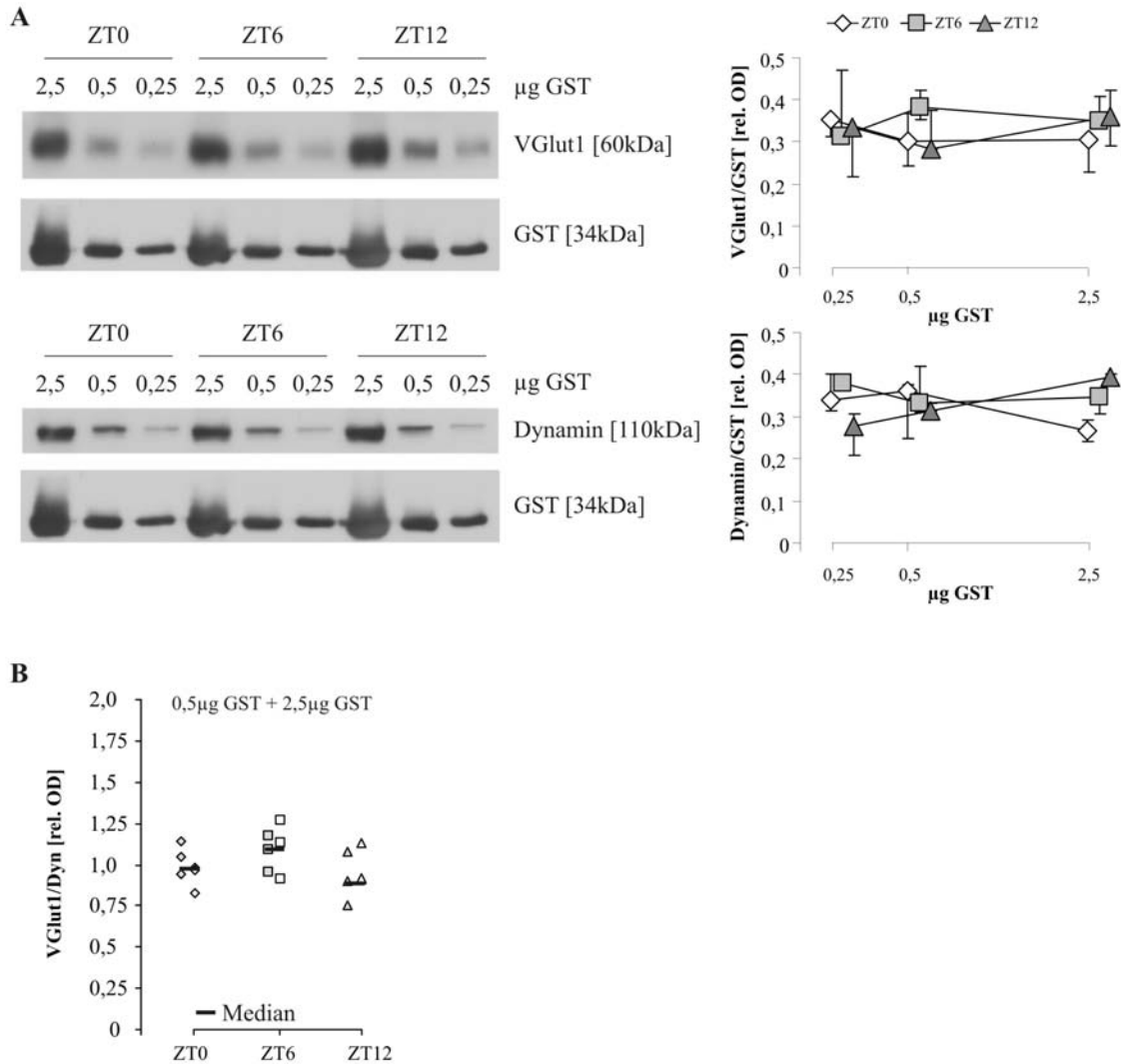


Darna, Labor Ahnert-Hilger, zur Verfügung gestellt. Das Material wurde bis zur Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **4.2.4.1 Analyse synaptosmaler Präparationen aus Wildtypmäusen, konditioniert im LD-Zyklus**

Tiefgefrorene Synaptosomen-Präparationen von Wildtypmäusen, konditioniert im LD-Zyklus (LD-konditioniert), wurden nach dem Auftauen auf Eis in 1% Triton lysiert (3.9.4) und das Lysat mit einem an Sepharose gebundenen GST-enphSH3-Fusionsprotein 1h inkubiert (3.9.5). Gebundene Proteine im Sepharose Sediment (P) wurden durch Zentrifugation von den ungebundenen Proteinen getrennt und durch mehrmaliges Waschen der Sepharose aufgereinigt. Die Proben wurden anschließend in 3 verschiedenen Verdünnungen im Western-Immunoblot-Verfahren analysiert und die optische Dichte quantifiziert. Als Ladekontrolle diente GST. Die optischen Dichten von Dynamin und VGlut1 wurden auf das GST-Signal normiert. Für jedes Einzelexperiment wurden die Summen der normierten Einzelwerte berechnet und die relativten Abweichungen der Einzelwerte von diesen Summen ermittelt und der Median gebildet. Als Abweichung vom Median wurde der Maximal- und Minimalwert dargestellt (Abb. 23).

Abb. 23 zeigt, dass sowohl für VGlut1 als auch für Dynamin keine Veränderungen in der Bindung an Endophilin zu verschiedenen Tageszeiten nachweisbar waren.



**Abb. 23 GST-Bindungsstudie mit synaptosomalen Fraktionen aus Wildtypmäusen, konditioniert im LD-Zyklus**

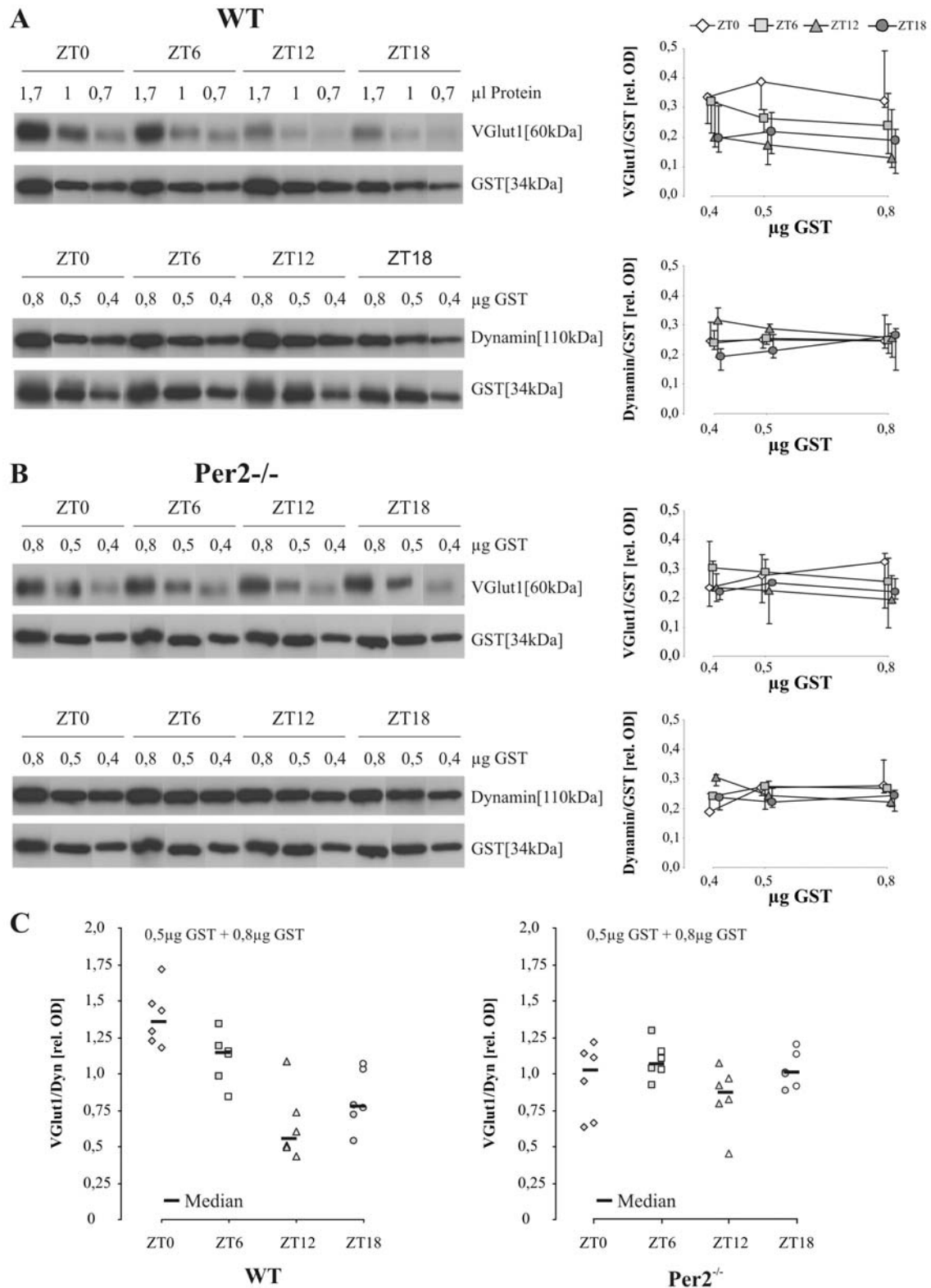
Zu den angegebenen Zeitpunkten (6 Uhr morgens (ZT0), 12 Uhr mittags (ZT6), 6 Uhr abends (ZT12)) wurden Synaptosomen von Wildtypmäusen präpariert und bis zur Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach dem Auftauen auf Eis wurden die synaptosomale Fraktionen in 1% Triton lysiert und das Lysat 1h mit  $50\ \mu\text{g}$  GST-endphSH3-Fusionsprotein, gebunden an Glutathion-Sepharose inkubiert. Gebundene Proteine im Sepharose Sediment wurden durch Zentrifugation von nicht gebundenen Proteinen getrennt. Nach mehrmaligem Waschen mit HMK-Puffer wurde das Sediment in  $100\ \mu\text{l}$  Laemmli-Puffer aufgenommen. 3 verschiedene Verdünnungen, berechnet an der GST-Konzentration in der Probe, wurden auf einem 10%igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. A) Die Analyse von 3 unabhängigen Experimenten erfolgte im Western-Immunoblot mit spezifischen Antikörpern, gerichtet gegen Dynamin, VGlut1 und GST. Die optische Dichte von VGlut1 und Dynamin wurde quantifiziert und auf die optische Dichte des entsprechenden GST-Signals normiert. Für jedes Einzelexperiment wurde die Summe der normierten Einzelwerte berechnet und die Differenzen der Einzelwerte von dieser Summe ermittelt. Von den Differenzen wurde der Median berechnet und als Abweichung vom Median Maximal- und Minimalwert dargestellt. B) Protein, gebunden an  $0,5\ \mu\text{g}$  GST und  $0,8\ \mu\text{g}$  GST, wurde mittels SDS/PAGE-Western-Immunoblotting analysiert und quantifiziert. Die Ergebnisse wurden in einem Punktdiagramm dargestellt. Die Bindung von VGlut1 an Endophilin war zu keinem Zeitpunkt verändert.

#### 4.2.4.2 Analyse von Gesamtgehirn-Präparationen aus Wildtypmäusen und Per2<sup>Brdm1</sup>-Mäusen, konditioniert im LD- oder DD-Zyklus

Gesamtgehirne von Per2<sup>Brdm1</sup>-Mäusen und parallel dazu von Wildtypmäusen wurden im Labor Urs Albrecht, Department of Medicine, Fribourg zu den Zeitpunkten ZT0 – ZT18 präpariert und bis zur Verwendung bei –80°C aufbewahrt. Die Gesamtgehirne wurden auf Eis vorsichtig aufgetaut und nach Homogenisation durch die Verwendung eines Dounce-Homogenisators (900 rpm, zehnmal) zentrifugiert. Im Sediment (P1) befindliche Zellkerne und Zelltrümmer wurden entfernt und der erhaltene Überstand (S1) direkt für GST-Bindungsstudien verwendet. Damit sollte verhindert werden, dass durch vorheriges Ein- und Wiederauftauen bereits freigesetztes Zytosol aus zerstörten Synaptosomen entfernt wurde. Der Überstand wurde wie unter 4.2.4.1 beschrieben behandelt und analysiert.

In den Proben von LD-konditionierten Mäusen zeigten sich keine Veränderungen in der Bindung von Dynamin an Endophilin zu den verschiedenen Zeitpunkten (Abb. 24). Für VGlut1 hingegen war ein Abfall in der Endophilin-Bindung vom Zeitpunkt ZT0 bis zum Zeitpunkt ZT18 in WT-Mäusen zu beobachten. Aufgrund der Begrenztheit des Gewebematerials wurde eine Fallzahl von N=3 gewählt, sodaß sich keine Aussage bezüglich der Signifikanz treffen lässt. Wurde das Verhältnis von VGlut1 und Dynamin gebildet, verdeutlichten sich die tageszeitabhängigen Schwankungen in der Bindung von VGlut1 (im Verhältnis zu Dynamin) an Endophilin in Wildtypmäusen. In Per2<sup>Brdm1</sup>-Mäusen war dieser Effekt nicht zu sehen.

In den Proben von DD-konditionierten WT-Mäusen waren ebenfalls keine Veränderungen in der Bindung von Dynamin an Endophilin zu den verschiedenen Zeitpunkten zu beobachten (Abb. 25). Gleiches galt für die Bindung von VGlut1 an Endophilin. Wurde das Verhältnis von VGlut1 zu Dynamin gebildet, zeigte sich eine oszillierende Bindung von VGlut1 (im Verhältnis zu Dynamin) an Endophilin. Allerdings war das Muster im Vergleich zu LD-konditionierten WT-Mäusen stark verändert. Das Maximum verschob sich auf CT12 und das Minimum auf CT0. In Per2<sup>Brdm1</sup>-Mäusen war dieser Effekt ebenfalls zu sehen, jedoch deutlich schwächer.

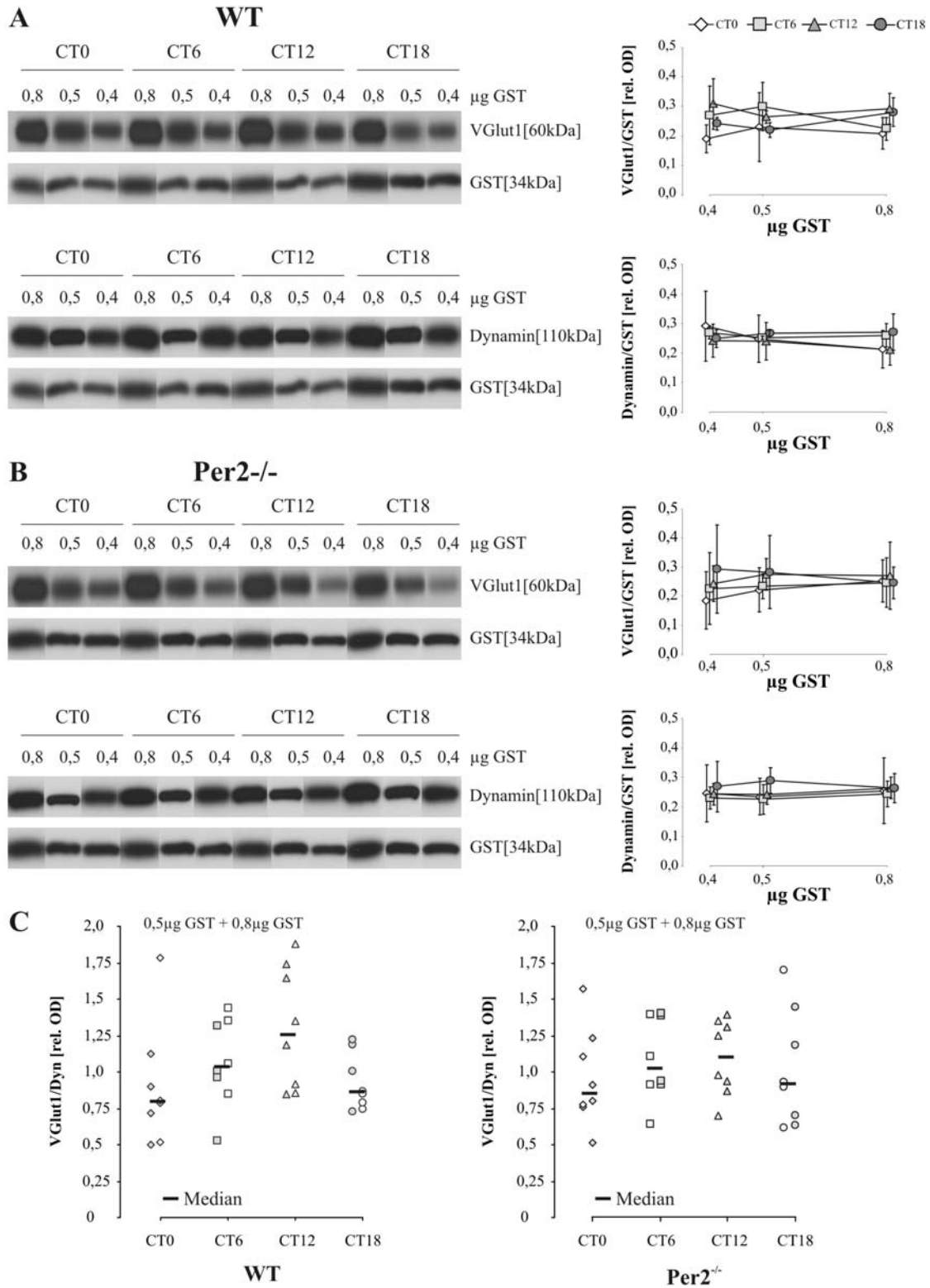


**Abb. 24 GST-Bindungsstudie mit Gesamtgehirnlysate aus Wildtyp- und Per2<sup>Brdm1</sup>-Mäusen, konditioniert im LD-Zyklus**

Zu den angegebenen Zeitpunkten (6 Uhr morgens (ZT0), 12 Uhr mittags (ZT6), 18 Uhr abends (ZT12), 24 Uhr abends (ZT18)) wurde Gesamtgehirn von A) Wildtypmäusen und B) Per2<sup>Brdm1</sup>-Mäusen (n=3) isoliert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen auf Eis wurde das Gehirn homogenisiert, Zellkerne und Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt und der erhaltene Überstand als synaptosomale Fraktion verwendet. Synaptosomale Fraktionen wurden in 1% Triton lysiert und das Lysat 1h mit 50 µg GST-endphSH3-Fusionsprotein, gebunden an Glutathion-Sepharose inkubiert. Gebundene

Proteine im Sepharose Sediment wurden durch Zentrifugation von nicht gebundenen Proteinen getrennt. Nach mehrmaligem Waschen mit HMK-Puffer wurde das Sediment in Laemmli-Puffer aufgenommen. Von jeder Probe wurden 3 verschiedene Verdünnungen, berechnet an der GST-Konzentration in der Probe, auf einem 10%igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Analyse erfolgte im Western-Immunoblot mit spezifischen Antikörpern, gerichtet gegen Dynamin, VGlut1 und GST. Die optische Dichte von VGlut1 und Dynamin wurde quantifiziert und auf die optische Dichte des entsprechenden GST-Signals normiert. Für jedes Einzelexperiment wurde die Summe der normierten Einzelwerte berechnet und die Differenzen der Einzelwerte von dieser Summe ermittelt. Von den Differenzen wurde der Median berechnet und als Abweichung vom Median Maximal- und Minimalwert dargestellt. C) Protein, gebunden an 0,5µg GST (graue Füllung) und 0,8µg GST (weiße Füllung), wurde mittels SDS/PAGE-Western-Immunoblotting analysiert und quantifiziert. Das Verhältnis von VGlut1 zu Dynamin (relative OD) wurde in einem Punktdiagramm dargestellt. Die Bindung von VGlut1 an Endophilin veränderte sich in Abhängigkeit der Tageszeit in WT- nicht jedoch in Per2<sup>Brdm1</sup>-Mäusen.

Es zeigte sich eine veränderte, tageszeitabhängige Bindung von VGlut1 in Lysaten aus Gesamtgehirn, nicht jedoch für synaptosomale Lysate von WT-Mäusen. Ursache hierfür könnte in der unterschiedlichen Aufarbeitung der Proben und der verhältnismäßig langen Lagerung der synaptosomalen Präparationen liegen.



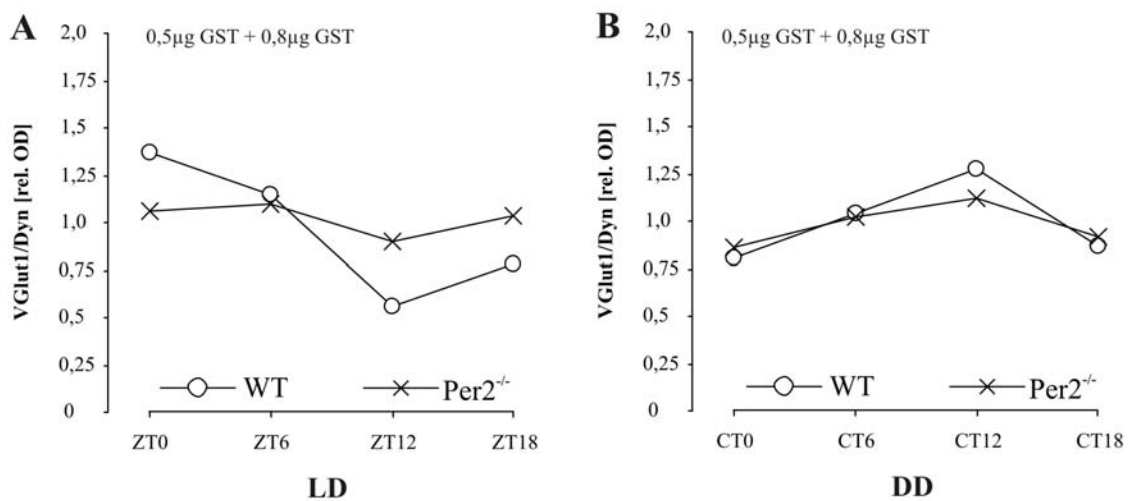
**Abb. 25 GST-Bindungsstudie mit Gesamtgehirnlysate aus Wildtyp- und Per2<sup>Brdm1</sup>-Mäusen, konditioniert im DD-Zyklus**

Zu den angegebenen zirkadianen Zeitpunkten (6 Uhr morgens (CT0), 12 Uhr mittags (CT6), 18 Uhr abends (CT12), 24 Uhr abends (CT18)) wurde Gesamtgehirn von A) Wildtypmäusen und B) Per2<sup>Brdm1</sup>-Mäusen (n=4) isoliert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen auf Eis wurde das Gehirn homogenisiert, Zellkerne und Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt und der erhaltene Überstand als synaptosomale Fraktion verwendet. Synaptosomale Fraktionen wurden in 1% Triton lysiert und das Lysat 1h mit 50 µg GST-endphSH3-Fusionsprotein, gebunden an Glutathion-Sepharose inkubiert. Gebundene Proteine im Sepharose Sediment wurden durch Zentrifugation von nicht

gebundenen Proteinen getrennt. Nach mehrmaligem Waschen mit HMK-Puffer wurde das Sediment in Laemmli-Puffer aufgenommen. Von jeder Probe wurden 3 verschiedene Verdünnungen, berechnet an der GST-Konzentration in der Probe, auf einem 10%igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Analyse erfolgte im Western-Immunoblot mit spezifischen Antikörpern, gerichtet gegen Dynamin, VGlut1 und GST. Die optische Dichte von VGlut1 und Dynamin wurde quantifiziert und auf die optische Dichte des entsprechenden GST-Signals normiert. Für jedes Einzelexperiment wurde die Summe der normierten Einzelwerte berechnet und die Differenzen der Einzelwerte von dieser Summe ermittelt. Von den Differenzen wurde der Median berechnet und der zugehörige Semiquartilsabstand dargestellt. C) Protein, gebunden an 0,5µg GST (graue Füllung) und 0,8µg GST (weiße Füllung), wurde mittels SDS/PAGE-Western-Immunoblotting analysiert und quantifiziert. Das Verhältnis von VGlut1 zu Dynamin (relative OD) wurde in einem Punktdiagramm dargestellt. Eine schwach-veränderte Bindung von VGlut1 an Endophilin in Abhängigkeit der Tageszeit zeigte sich in WT-Mäusen, und ebenfalls- allerdings schwächer- in  $Per2^{Brdm1}$ -Mäusen.

Sowohl LD-konditionierte als auch DD-konditionierte WT-Mäuse zeigten Oszillationen in der Bindung von VGlut1 (bezogen auf Dynamin) an Endophilin. Dieser Effekt war nicht in LD- und nur schwach in DD-konditionierten  $Per2^{Brdm1}$ -Mäusen zu sehen (Abb. 26).

Aufgrund der geringen Fallzahl (N=3 bzw. 4) konnte aus beiden Versuchsansätzen keine allgemeingültige Aussage über eine Beteiligung von Endophilin an der tagesabhängigen Sortierung von VGlut1 getroffen werden.



**Abb. 26 Zusammenfassung der GST-Bindungsstudie mit Gesamtgehirnlysat von LD- und DD-konditionierten WT- und  $Per2^{Brdm1}$ -Mäusen**

Die Ergebnisse aus Abb. 24, C und Abb. 25, C wurden zusammenfassend gegenübergestellt: Protein, gebunden an 0,5µg GST-SH3-Endophilin und 0,8µg GST-SH3-Endophilin, wurde mittels SDS/PAGE-Western-Immunoblotting analysiert und quantifiziert und das Verhältnis VGlut1/Dynamin (relative OD) gebildet. Dargestellt sind die ermittelten Mediane.

In LD-konditionierten Mäusen [LD] ist die Bindung von VGlut1 an Endophilin in Abhängigkeit der Tageszeit in WT- nicht jedoch in  $Per2^{Brdm1}$ -Mäusen verändert. Das gleiche gilt für DD-konditionierte Mäuse [DD], wobei hier der Unterschied zwischen WT- in  $Per2^{Brdm1}$ -Mäusen schwächer ausfällt.

### 4.3 Identifizierung von Bindungspartnern des C-Terminus von VGlut1 und VGlut2

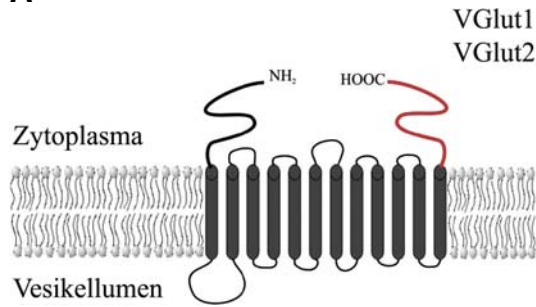
Mit Ausnahme von Endophilin für VGlut1 sind für die vesikulären Glutamatttransporter 1 und 2 keine Interaktionspartner bekannt. In Anbetracht der Tageszeit-abhängigen Sortierung zwischen Plasmamembran und synaptischer Vesikelmembran (Darna *et al.*, 2009) ist von Interesse, inwiefern bisher nicht identifizierte Interaktionspartner eine Rolle in diesem Sortierungsprozess spielen.

Eine anerkannte *in vitro* Methode zur Identifizierung potentieller Bindungspartner von Proteinen sind GST-Bindungsstudien.

Membranproteine, zu denen auch die vesikulären Glutamatttransporter gehören, eignen sich in ihrer vollständigen Form nicht für die Fusion an das GST-Protein, da eine native Expression in bakteriellen Zellen nicht möglich ist. Für die GST-Bindungsstudien haben wir uns für den cytosolischen C-Terminus von VGlut1 und VGlut2 entschieden, um nach cytosolischen Interaktionspartnern zu suchen. Die 3 VGlut-Transporter VGlut1, VGlut2 und VGlut3 weisen in ihrer Aminosäuresequenz untereinander eine sehr hohe Homologie auf (Takamori *et al.*, 2002). Allerdings beherbergt VGlut1 im Gegensatz zu VGlut 2 eine Polyprolin-Sequenz im C-Terminus. Auch dieser Aspekt legte für die GST-Bindungsstudien eine Betonung auf den C-Terminus nahe. Die Bindung des C-Terminus von VGlut1 über eine Polyprolin-Sequenz an die SH3-Domäne des Endophilin 1-3 konnte bereits im Hefe-zwei-Hybrid-System und in GST-Bindungsstudien gezeigt werden (Voglmaier *et al.*, 2006).



A



B

## VGlut1

```

msVGlut1|NM_182993.1      ATGGGGTCTTTGCTTCGGGAGAGAAGCAGCCGTGGGCAGAGCCGGAGGAG
cVGlut1-pGEX4T1          --GGAATTC-----TCGGGAGAGAAGCAGCCGTGGGCAGAGCCGGAGGAG
* * * * *
msVGlut1|NM_182993.1      ATGAGCGAGGAGAAGTGTGGCTTTGTTGGCCACGACCAGCTGGCTGGCAG
cVGlut1-pGEX4T1          ATGAGCGAGGAGAAGTGTGGCTTTGTTGGCCACGACCAGCTGGCTGGCAG
* * * * *
msVGlut1|NM_182993.1      TGACGAAAGTGAAATGGAGGACGAGGCTGAGCCCCAGGGGCGCCCCCG
cVGlut1-pGEX4T1          TGACGAAAGTGAAATGGAGGACGAGGCTGAGCCCCAGGGGCGCCCCCG
* * * * *
msVGlut1|NM_182993.1      CGCCGCCTCCGTCTACGGGGCCACACACAGCACAGTGCAGCCTCCGAGG
cVGlut1-pGEX4T1          CGCCGCCTCCGTCTACGGGGCCACACACAGCACAGTGCAGCCTCCGAGG
* * * * *
msVGlut1|NM_182993.1      CCCC GCCCCCTGTCGGGACTACTGACCACGGGCCTCCCACTGTGGGGC
cVGlut1-pGEX4T1          CCCC GCCCCCTGTCGGGACTACTG-----
* * * * *

```

## VGlut2

```

msVGlut2|AF324864        ATATTTTATGCACTATTTCCTCAGGAGAGAAACAACCTTGGGCAGACCCTGAGGAA
cVGlut2-pGEX4T1          CCGCGTGGATCCCCGGAATTCATCAGGAGAGAAACAACCTTGGGCAGACCCTGAGGAA
* * * * *
msVGlut2|AF324864        ACAAGCGAAGAAAAATGTGGCTTCATTCACGAAGATGAAGTGGATGAAGAAACGGGG
cVGlut2-pGEX4T1          ACAAGCGAAGAAAAATGTGGCTTCATTCACGAAGATGAAGTGGATGAAGAAACGGGG
* * * * *
msVGlut2|AF324864        GACATCACTCAGAATTACATAAATTACGGTACCACCAATCTTACGGTGCTACCTCA
cVGlut2-pGEX4T1          GACATCACTCAGAATTACATAAATTACGGTACCACCAATCTTACGGTGCTACCTCA
* * * * *
msVGlut2|AF324864        CAGGAGAATGGAGGCTGGCCTAACGGCTGGGAGAAAAAGGAAGAATTTGTGCAAGAA
cVGlut2-pGEX4T1          CAGGAGAATGGAGGCTGGCCTAACGGCTGGGAGAAAAAGGAAGAATTTGTGCAAGAA
* * * * *
msVGlut2|AF324864        GGTGCGCAAGACGCGTACACCTATAAGACCGAGATGATTATTCATAA
cVGlut2-pGEX4T1          GGTGCGCAAGACGCGTACACCTATAAGACCGAGATGATTATTCATAA
* * * * *

```

**Abb. 27** Schematische Darstellung von VGlut1 und 2 sowie Sequenzalignements von cVGlut1- und cVGlut2-pGEX4T1 im Bereich des C-Terminus von msVGlut1 und 2

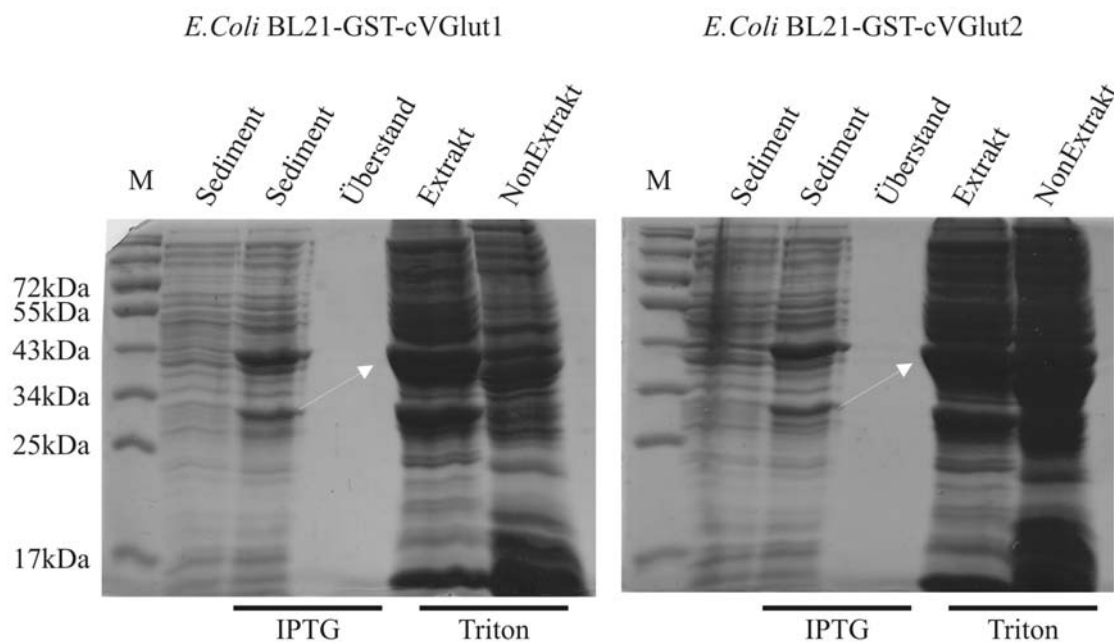
A) Der C-Terminus von VGlut1 und 2, in rot dargestellt, diente als Ausgangspunkt für GST-Bindungsstudien. B) DNA-Sequenzen für den C-Terminus des murinen VGlut1 [msVGlut1] und 2 [msVGlut2] stammen aus der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Graunterlegte Bereiche wurden zur Generierung von Primern benutzt (Tab. 1). Mittels PCR-Reaktionen wurde der C-Terminus von VGlut1 und 2 amplifiziert. Es folgte die Aufreinigung und die Klonierung in den pGEX4T1-Vector. Positive Klone [cVGlut1-pGEX4T1, cVGlut2-pGEX4T1] wurden auf Ampicillin-Agarplatten selektioniert und die aufgereinigte DNA sequenziert. Ein Sequenzalignement der klonierten Sequenz mit der jeweiligen Zielsequenz wurde mit der Software Clustal W erstellt. Die beiden Sequenzen stimmten zu 100% mit der jeweiligen Zielsequenz aus der NCBI-Datenbank überein.

Für die Amplifikation des C-Terminus von VGlut1 und 2 wurde als Matrize cDNA aus einer cDNA-Bank aus Mausgehirn verwendet. Die cDNA-Bank wurde freundlicherweise von Christian Blex, Labor Prof. Ahnert-Hilger zur Verfügung gestellt. Die vollständige Sequenz des murinen VGlut1 und 2 findet sich im Anhang (6.1, 6.2).

Die Suche nach geeigneten Primern (2.4) zur Amplifizierung des C-Terminus erfolgte mit Hilfe der Internetplattformen <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed> und <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>. Die C-Termina wurden in einer PCR-Reaktion amplifiziert (3.1.1) und die aufgereinigten PCR-Produkte in den Glutathion-S-Transferase (GST) exprimierenden pGEX4T1-Vektor kloniert (3.1.9). Die Plasmidkarte des pGEXT4T1 findet sich im Anhang (6.3). cDNA's wurden von Dr. Martin Meixner (SMB, Services in Molecular Biology, Berlin) sequenziert (Abb. 27) und positive Klone in *E. Coli* BL21(DH3)-Zellen transformiert (3.1.3).

In einem ersten Schritt wurden die verschiedenen *E. Coli* BL21(DH3)- Klone auf die Expression des GST bzw. GST-VGlut-Fusionsproteins überprüft. Stellvertretend für alle GST-Fusionsproteine ist in Abb. 28 die Expression und Aufreinigung des GST-cVGlut1-Fusionsproteins abgebildet. Das Allactose-Analogon IPTG induzierte die Expression des Fusionsproteins (ca. 43 kDa). Nach Aufschluss des Bakteriensediments mit 1%igem Triton fand sich das GST-Fusionsprotein zu großen Teilen im Extrakt.

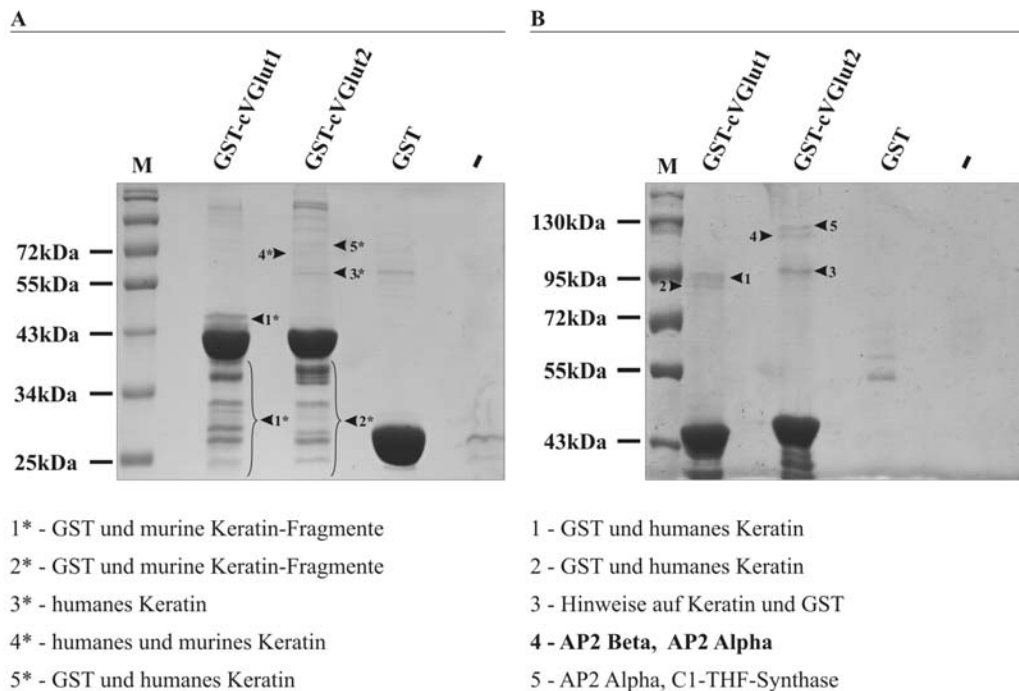
Nach Überprüfung der Expression der verschiedenen GST-VGlut-Fusionsproteine in *E. Coli* BL21 wurden mit dem Extrakt des jeweiligen GST-VGlut-Fusionsproteins und Mausgehirnzellysat GST-Bindungstudien durchgeführt (3.9). Zur Identifizierung potentieller Interaktionspartner des C-Terminus von VGlut1 und/oder 2 wurden die Pulldown-Proben zur Vorbereitung für massenspektrometrische Analysen alkyliert (3.9.6) und in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Hilfe einer Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (3.2.3).



**Abb. 28 Expression und Aufreinigung von GST-cVGlut1 und 2 aus *E. coli* BL21**

*E. coli* BL21-Zellen wurden mit GST-Fusionsprotein- bzw. GST-Protein transformiert und die Expression mit IPTG induziert. In der mit Coomassie Brilliant Blue angefärbten SDS-Gelelektrophorese wurden in Spur [M] der Protein-Längenstandard, in den mit [Sediment] gekennzeichneten Spuren die Bakterienkultur vor bzw. 4h nach der Induktion mit IPTG und in der Spur [Überstand] der zugehörige Überstand nach Sedimentierung der bakteriellen Kultur aufgetrennt. Ein Aufschluß der Bakterien mit 1%igem Triton resultierte in [Extrakt] und [Non-Extrakt], die beide neben Bakterienproteinen das exprimierte GST-cVGlut1-Fusionsprotein in einer erwarteten Höhe von ca. 34 kDa enthielten.

Eine massenspektrometrische Analyse durch Andreas Pich, Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover, identifizierte Alpha- und Beta-adaptin, Untereinheiten des AP2 – Komplexes, in der GST-cVGlut2 Pulldown-Probe (Bande 4, rot markiert, Abb. 29), sowie die cytoplasmatische C-1-Tetrahydrofolat (C1-THF)-Synthase (Bande 5, Abb. 29). Als Verunreinigung wurden humane und murine Keratin- und GST-Fragmente in beiden GST-VGlut-Fusionsproteinen eingestuft. In der GST-cVGlut1 Pulldown-Probe konnten keine weiteren Proteine identifiziert werden.



**Abb. 29 GST-Pulldown mit dem C-Terminus von VGlut1 bzw. VGlut2**

Bindungsstudienexperimente mit GST-Fusionsproteinen [GST-cVGlut1, GST-cVGlut2] wurden mit dem Zelllysate von adultem Mausgehirn durchgeführt. Als Spezifitätskontrolle diente eine Bindungsstudie mit GST-Protein [GST]. In 10% [A] bzw. 8% [B] SDS-PAGE wurden jeweils 20 µl einer Pulldown-Probe aufgetrennt. Um unspezifische Bindungen an die Matrix auszuschließen, wurde als weitere Kontrolle Mausgehirnlysate mit unbeladenen Glutathion Sepharose-Kügelchen inkubiert und aufgetragen [-]. Der Nachweis gebundener Proteine erfolgte über eine Coomassiefärbung. Mit Pfeilen bzw. Zahlen markierte Banden wurden massenspektrometrisch von Andreas Pich, Medizinische Hochschule Hannover untersucht. Fett markiertes Protein wurde als putativer cVGlut2-Interaktionspartner überprüft.

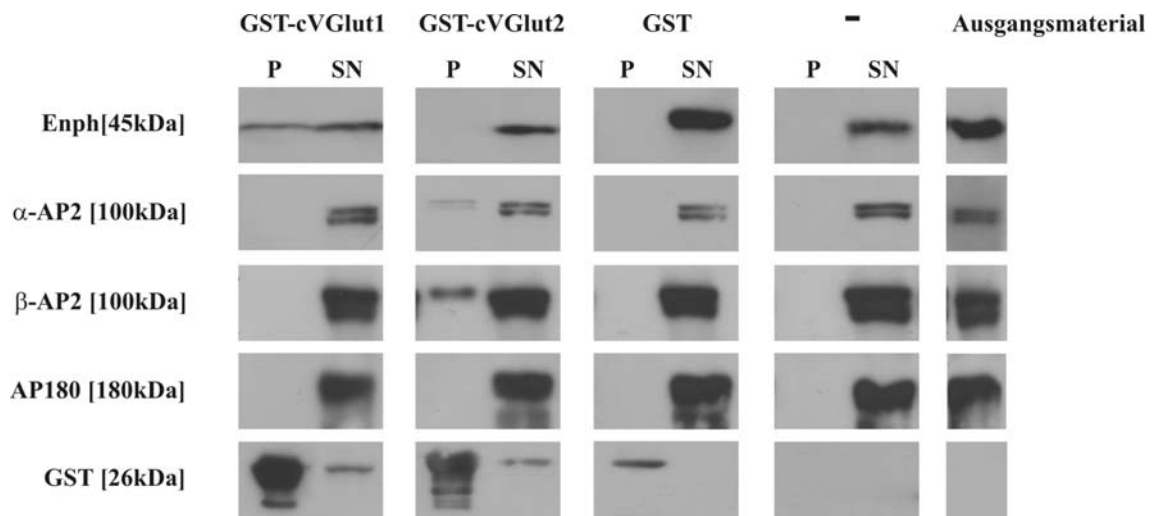
### 4.3.1 Verifizierung der putativen Interaktionspartner

Basierend auf den Ergebnissen der massenspektrometrischen Analyse wurde AP2 als Kandidat für Western-Immunoblotanalysen ausgewählt. Die C1-THF-Synthase wurde nicht einbezogen, da bisher keine Hinweise auf eine Funktion im Prozess der Endo- und Exocytose existieren und daher von einer unspezifischen Bindung an VGlut2 ausgegangen wurde.

Die GST-cVGlut-Pulldownproben wurden in einem Western-Immunoblot mit Antikörpern, gerichtet gegen alpha- bzw. beta-Adaptin und GST, analysiert. Als Positivkontrolle wurde mit einem Antikörper, gerichtet gegen Endophilin, analysiert. Desweiteren wurde mit Antikörpern, gerichtet gegen AP180 - einem AP2-Interaktionspartner, inkubiert.

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse konnten in der Western-Immunoblotanalyse bestätigt werden (Abb. 30). Ebenso konnte in der Western-

Immunoblotanalyse die erwartete Bindung von Endophilin an den C-Terminus von VGlut1 gezeigt werden.



**Abb. 30 AP2 bindet an den C-Terminus von VGlut2**

Jeweils 15µl Eluat [P] und Überstand [SN] der Bindungsstudie mit GST [GST] und Fusionsproteinen [GST-cVGlut1, GST-cVGlut2] wurden in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Als Ausgangsmaterial für die Bindungsstudie diente das Zelllysate von adultem Mausgehirn. Um unspezifische Bindungen zu überprüfen, wurde das Ausgangsmaterial mit der Glutathion Sepharose-Matrix [-] inkubiert und Eluat und Überstand aufgetrennt. Daneben wurde das Ausgangsmaterial aufgetrennt. Die Western-Immunoblotanalyse mit Antikörpern, gerichtet gegen Endophilin [Enph], alpha-Adaptin [ $\alpha$ -AP2], beta-Adaptin [ $\beta$ -AP2], AP180 [AP180] und GST [GST], lieferte neben der erwarteten Endophilinmarkierung im Eluat der GST-cVGlut1-Bindungsstudie eine alpha- und beta-Adaptin-Markierung im Eluat der GST-cVGlut2-Bindungsstudie. Unspezifische Bindungen an GST oder an die Matrix waren nicht zu erkennen.

In den Proben vom Pulldown mit GST-Protein war keine Markierung von AP2 oder Endophilin zu sehen. Gleiches galt für eine Inkubation des Mausgehirnlysats mit Glutathion Sepharose. Unspezifische Bindungen an die unbeladenen Kügelchen oder an GST-Proteine waren somit ausgeschlossen.

Die Western-Immunoblotanalyse bestätigte, dass AP2 an die C-terminale Domäne des VGlut2 bindet. Für AP180 konnte keine Interaktion gezeigt werden.

In Tab. 3 sind zusammenfassend die Interaktionspartner der einzelnen GST-Konstrukte dargestellt.

Tab. 3 Zusammenfassung der GST-Bindungsstudien

GST-Konstrukt	VGlut1	VGlut2	Endophilin	AP2 (alpha/beta adaplin)	Dynamin	Synaptojanin	AP180
Endophilin-SH3	+	-	-	-	+	+	-
Endophilin-SH3/GPRL	+	-	-	-	-	-	-
cVGlut1	-	-	+	-	-	-	-
cVGlut2	-	-	-	+	-	-	-

In GST-Bindungsstudien wurden Interaktionspartner verschiedener GST-Fusionsproteine identifiziert. + : Interaktion, - : keine Interaktion

#### 4.4 Verteilung vesikulärer Glutamattransporter in cholesterinreichen Mikrodomänen

Für die Untersuchung der Sortierung und der Funktionsweise der Transmembranproteine VGlut1 und VGlut2 müssen die Wechselwirkungen mit dem Lipidverband der Membran berücksichtigt werden.

Proteine können in verschiedenen Membrandomänen angeordnet sein, die sich durch ihren unterschiedlichen Gehalt an Lipiden und Cholesterin voneinander abgrenzen.

In Säugetierzellmembranen spielen für die Sortierung von Membranbestandteilen unter anderem Mikrodomänen eine entscheidende Rolle, sowohl für Lipid- als auch für Proteininteraktionen. Zu spezialisierten cholesterinreichen Mikrodomänen zählen die *Lipid Rafts*. Diese Membrandomänen werden seit einiger Zeit mit

Proteinsortierungsprozessen in Verbindung gebracht und als eine Art Plattform für Signaltransduktionskaskaden diskutiert (Simons & Toomre, 2000). Ergebnisse deuten bereits darauf hin, dass Glutamattransporter in *Lipid Rafts* assoziiert sind (Butchbach *et al.*, 2004).

Wie die meisten synaptischen Vesikelproteine befinden sich VGlut1 und VGlut2 sowohl auf synaptischen Vesikeln als auch auf der Plasmamembran, u.a. im Zuge von exo- bzw. endozytotischen Prozessen. Es stellt sich die Frage, inwiefern VGlut1 und VGlut2 in *Lipid Rafts* in Plasmamembrandomänen und in Membrandomänen synaptischer Vesikel verteilt sind.

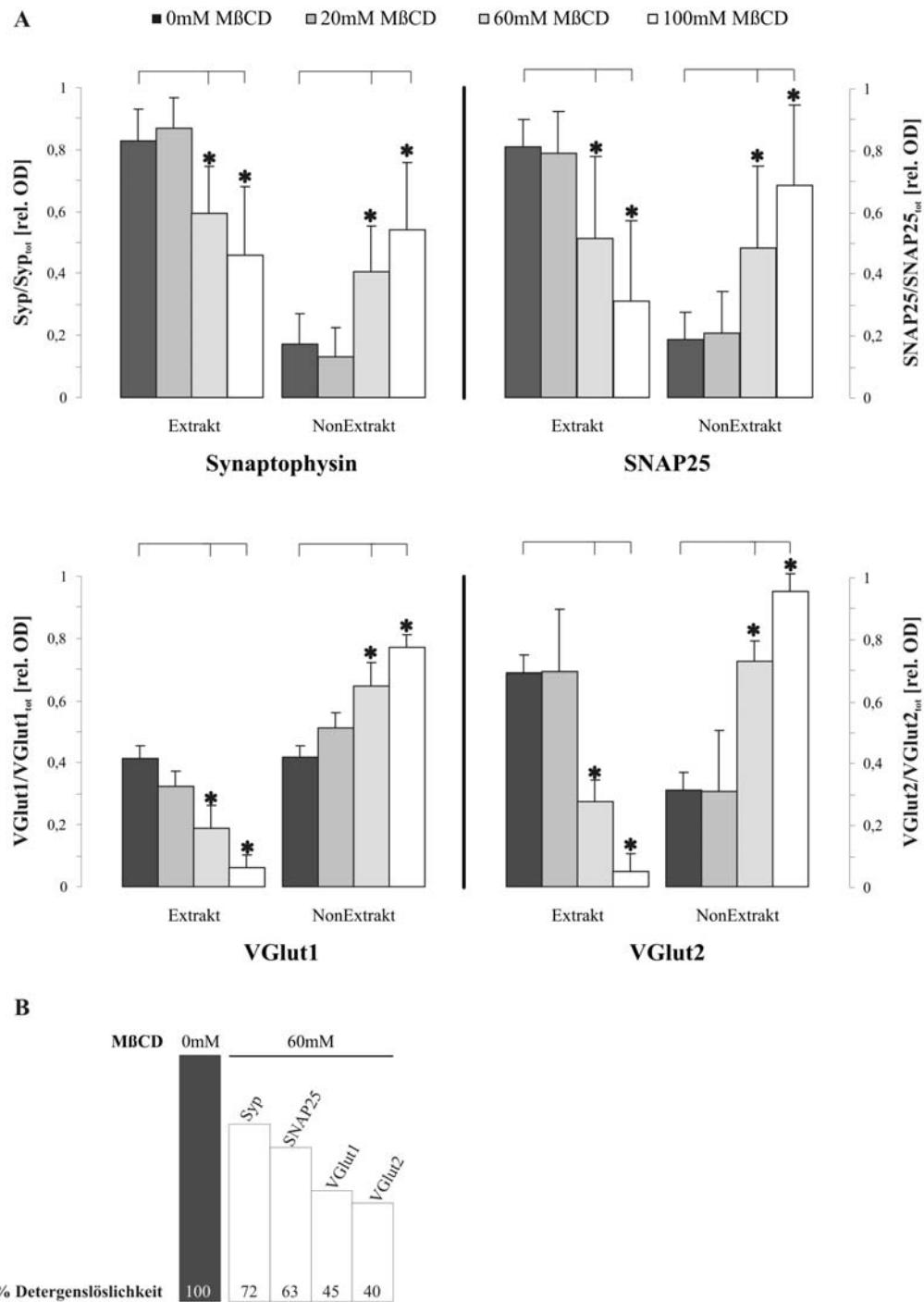
#### 4.4.1 Extraktion synaptischer Proteine nach Cholesterinsenkung

Zur Extraktion von cholesterinreichen Mikrodomänen aus dem Membranverband stehen unterschiedliche Detergentien zur Verfügung. Hierbei zeigte sich, dass Membrane und Proteine eine unterschiedliche Sensitivität bezüglich ihrer Extrahierbarkeit gegenüber Detergentien besitzen.

In einem ersten Ansatz wurde der Anteil von cholesterinreichen Membrandomänen durch Cholesterinsenkung vermindert und der Einfluss auf die Extrahierbarkeit vesikulärer Glutamattransporter, sowie Synaptophysin und SNAP25 vergleichend untersucht. Als Detergenz diente Lubrol. Zum einen ist im Gegensatz zu Triton über die Detergenzlöslichkeit synaptischer Proteine in Lubrol nach Cholesterinsenkung wenig bekannt, da größtenteils Triton als Detergenz z.B. für die Isolation von *Lipid Rafts* in Studien verwendet wird. Zum anderen sollte das Extrahierverhalten in Lubrol näher charakterisiert werden, da für spätere Versuche zur Isolation von *Lipid Rafts* neben Triton ebenfalls Lubrol als Detergenz verwendet werden sollte.

Der Cholesteringehalt von Synaptosomen und synaptischen Vesikeln wurde durch Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) vermindert. Methyl- $\beta$ -cyclodextrin ist ein wasserlösliches, ringförmiges Molekül, das unpolare, hydrophobe Einschulshöhlen bildet (Saenger, 1980). Es besitzt eine hohe Affinität zu Cholesterin und Cholesterinderivaten, weshalb Cyclodextrine zur Depletion von membranständigem Cholesterin benutzt werden (Christian *et al.*, 1997; Pitha *et al.*, 1988). Eine Folge der Cholesterinsenkung mit M $\beta$ CD ist die selektive Freisetzung einiger Transmembran- und GPI-verankerter-Proteine (Ilanguaran & Hoessli, 1998).

Experimente wurden an synaptischen Vesikeln adulter Wistar Ratten durchgeführt. Aufbereitetes LP2 wurde nach Cholesterinsenkung mit unterschiedlichen Konzentrationen von M $\beta$ CD (-, 20, 60, 100 mM) mit 2% Lubrol behandelt (3.6), um die Proteine vollständig zu extrahieren. Die Verteilung der berücksichtigten synaptischen Proteine im Extrakt und Non-Extrakt wurde im Western-Immunoblot-Verfahren analysiert (Abb. 31). Neben Antikörpern, gerichtet gegen VGlut1 und VGlut2, wurden Antikörper, gerichtet gegen SNAP25 und gegen das cholesterinbindende Protein Synaptophysin, verwendet.



**Abb. 31 Extrahierbarkeit synaptischer Vesikelproteine nach Behandlung mit Methyl-β-Cyclodextrin**

Synaptische Vesikel (LP2) adulter Wistar Ratten wurden in MBS Puffer resuspendiert. LP2 wurde zur Cholesterin-Depletion mit unterschiedlichen Konzentrationen MβCD [0, 20, 60, 100 mM] für 30 min bei 37 °C behandelt. Im Anschluss wurden die Proteine in 2% Lubrol 1h bei 4 °C extrahiert. Extrakt und Non-Extrakt wurden durch Zentrifugation (3 000xg, 5 min) voneinander getrennt. In einer SDS-PAGE wurden pro Spur 10 µg Gesamtprotein aus Extrakt und Non-Extrakt aufgetrennt und im anschließenden Western-Immunoblot-Verfahren analysiert. A) Verhältnis von optischer Dichte (OD) des Extrakts bzw. Non-Extrakts zur Summe (OD Extrakt + OD Non-Extrakt). B) Prozentualer Anteil des jeweiligen Proteins im Extrakt nach Behandlung mit 0mM MβCD (schwarz) und 60mM MβCD (weiß).

In synaptischen Vesikeln führte eine Behandlung mit mindestens 60 mM MβCD zu einer signifikanten Verminderung der Detergenzlöslichkeit synaptischer Proteine. VGluts waren von diesem Effekt stärker betroffen als Syp oder SNAP25.



Für Synaptophysin zeigte sich in Lubrol keine Veränderung in der Extrahierbarkeit im Konzentrationsbereich von 20 mM M $\beta$ CD. Allerdings war eine deutliche Abnahme der Detergenzlöslichkeit nach Behandlung mit 60 mM M $\beta$ CD zu erkennen, ein Großteil der Proteinprobe war im Non-Extrakt nachweisbar. Für VGlut1, VGlut2 und SNAP25 führte eine Behandlung mit mindestens 60 mM M $\beta$ CD zu deutlich sinkender Detergenzlöslichkeit in 2%igem Lubrol.

Wie bereits in Triton von Mitter und anderen gezeigt wurde, zog Cholesterinentzug eine Verminderung der Extrahierbarkeit von Synaptophysin in Lubrol nach sich (Mitter *et al.*, 2003). Steigende M $\beta$ CD-Konzentrationen hatten ebenfalls für alle anderen untersuchten synaptischen Proteine einen deutlich verminderten Effekt auf die Detergenzlöslichkeit in Lubrol, wobei die Depletion von Cholesterin am nachhaltigsten die Extrahierbarkeit von VGlut2, gefolgt von VGlut1 beeinflusste. Eine Erhöhung der Extrahierbarkeit, wie dies in Triton für verschiedene andere cholesterinassoziierte Proteine bereits beobachtet wurde (Keller & Simons, 1998; Smart *et al.*, 1994), war nach Cholesterinentzug nicht zu erkennen.

Hinweise auf eine Lokalisation in cholesterinreiche Mikrodomänen ließen sich nicht aufklären und eine genauere Auftrennung von Detergentien-resistenten und Detergentien-löslichen Membrandomänen war notwendig.

In Experimenten zur Isolation von *Lipid Rafts* wurde eine M $\beta$ CD-Konzentration von 10 mM verwendet, da in diesem Konzentrationsbereich in bisherigen Studien keine toxische Wirkung auf Zellen und damit keine unspezifischen Effekte festgestellt wurden (Cherukuri *et al.*, 2004; Ohtani *et al.*, 1989; Peng *et al.*, 2007).

#### **4.4.2 Proteinumverteilung synaptischer Proteine**

Um die Verteilung synaptischer Proteine und insbesondere von VGlut1 und VGlut2 innerhalb der Membran detaillierter und ihre Assoziation mit *Lipid Rafts* zu studieren, wurden sogenannte Detergenz-resistente Membranbereiche (DRMs) der Plasmamembran und synaptischer Vesikel isoliert. Die Isolation von DRMs ist heutzutage eine Methode zur Untersuchung von *Lipid Rafts*, in der Annahme, dass diese Detergentien-resistenten Membranmikrodomänen (DRMs) die molekulare Zusammensetzung der Rafts widerspiegeln (Brown & Rose, 1992; Brown & London, 2000; Pike, 2003). Synaptosomale Fraktionen niedriger Dichte mit Detergentien-löslichen Bestandteilen (DSM) wurden von Fraktionen hoher Dichte mit Detergentien-

unlöslichen Domänen (DRM) getrennt. Dazu wurden über einen Ficollgradienten gereinigte Synaptosomen (P2) adulter Wistar Ratten (3.3.2) mit Triton oder Lubrol behandelt (3.6) und das Lysat auf einen Dichtegradienten aus Saccharoselösungen aufgetragen. Die Auftrennung von DRM und DSM erfolgte über Nacht mittels Ultrazentrifugation (3.7). Nach Auftrennung wurden Fraktionen gleichen Volumens von der Spitze bis zum Boden des Gradientenröhrchens abgenommen. Anhand der Verteilung von DRM-Markern in den verschiedenen Fraktionen lassen sich im Western-Immunoblot-Verfahren DRM von DSM unterscheiden.

In einer weiteren Versuchsbedingung wurde der Cholesteringehalt der Membran vermindert. Hierfür wurde aufbereitetes P2 mit M $\beta$ CD versetzt und anschließend in Lubrol extrahiert (3.7.1). Die weitere Verarbeitung erfolgte wie oben beschrieben.

Um eine vollständige Solubilisierung der Detergentien-resistenten DRM Fraktionen durch zu hohe Detergentien-Konzentrationen zu verhindern und gleichzeitig eine möglichst klare Trennung zwischen DRM und DSM Fraktionen sicherzustellen, wurden im Vorfeld Experimente an Synaptosomen mit unterschiedlichen Detergentien-Konzentrationen durchgeführt.

Die Detergentien-Konzentration wurde im Fall von Lubrol auf 2% optimiert (Abb. 32). Im Fall von Triton war keine Trennung von DRM und DSM möglich. Stellvertretend ist in Abb. 32 die Proteinverteilung in synaptosomalen Membranfraktionen nach Solubilisierung mit 1%igem Triton gezeigt.

Zur Identifizierung cholesterinreicher Domänen wurde in den Fraktionen neben dem Cholesteringehalt die Aktivität des DRM-Markers Alkalische Phosphatase bestimmt (3.7.2, 3.7.3).

Die Proteinverteilung in Triton X-100 solubilisierten Membranfraktionen unterschied sich stark von der Verteilung in Lubrol solubilisierten Membranfraktionen (Abb. 32). In den mit Triton behandelten Proben war die Verteilung der Proteine auf die Fraktionen höherer Dichte (30-40%) beschränkt. Das Aktivitätsmaximum der Alkalischen Phosphatase lag ebenfalls in den Fraktionen höherer Dichte. Der Cholesteringehalt war in den Fraktionen niedrigerer Dichte (5%) und in der Interphase gering (4  $\mu$ g pro Fraktion) und nahm erst in den Fraktionen höherer Dichte zu.

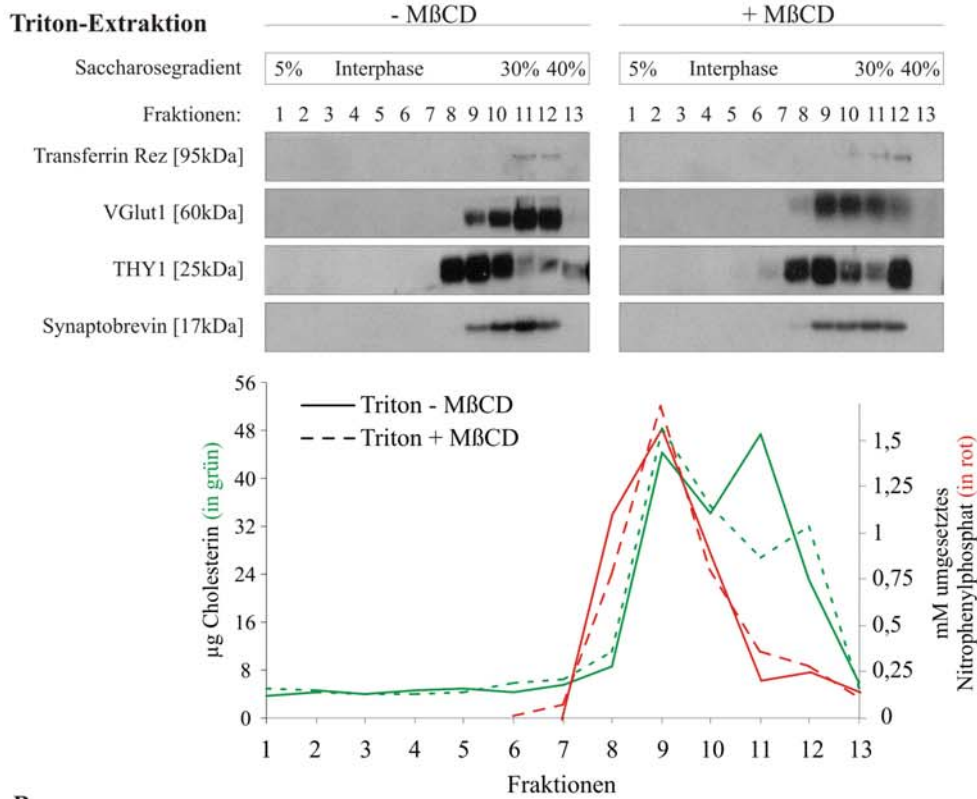
In den mit Lubrol solubilisierten Membranfraktionen zeigte sich ein differenzierteres Bild. Die untersuchten synaptischen Proteine zeigten größtenteils eine breite Verteilung

über den Gradienten und waren in Fraktionen niedriger sowie hoher Dichte detektierbar. Der Transferrin Rezeptor, ein DSM-Marker (Harder *et al.*, 1998), fand sich bei Verwendung von Lubrol allein in den Fraktionen hoher Dichte – den Fraktionen 10-12. Thy1 dagegen, ein DRM-Marker (Brugger *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 2004), der über den gesamten Saccharosegradienten detektiert wurde, war in den Fraktionen 3-5 angereichert. Eine Zerstörung der Detergentien-unlöslichen Membranen durch Depletion des Cholesteringehalts mit Hilfe von M $\beta$ CD (Ilangumaran & Hoessli, 1998; Smart & Anderson, 2002) hatte eine Verschiebung dieses Markers in die löslichen Fraktionen zur Folge. Allerdings war die Zerstörung der Detergentien-unlöslichen Membranen unvollständig, worauf eine verbleibende Detektion des DRM-Markers Thy1 in den Fraktionen niedriger Dichte 3-4 hinwies.

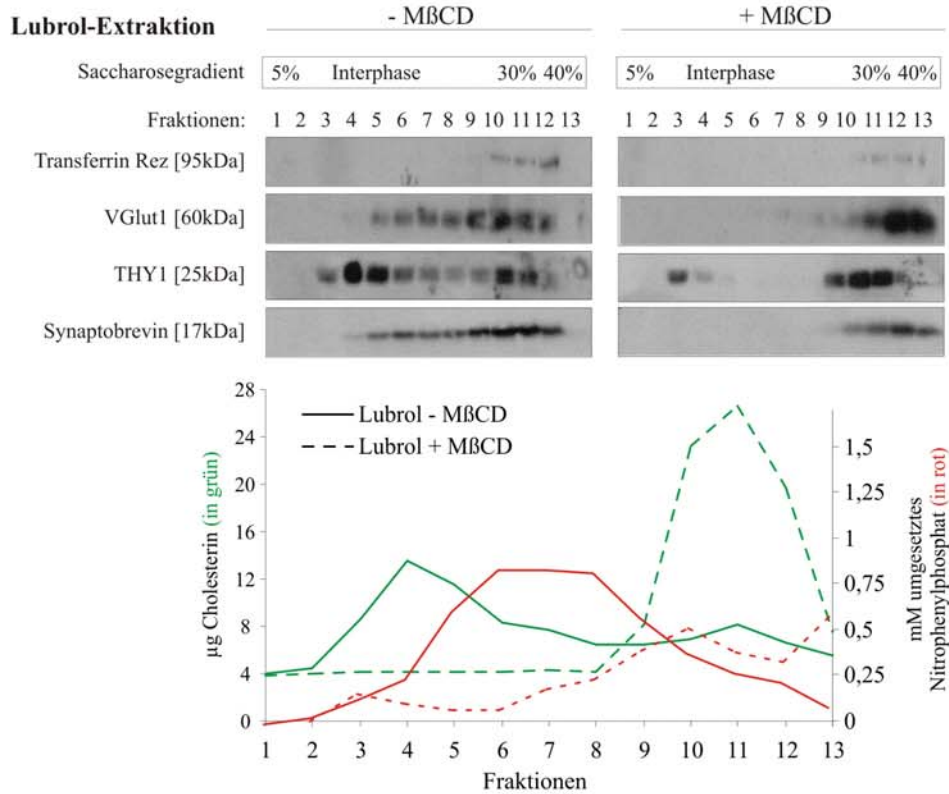
Das Aktivitätsmaximum der Alkalischen Phosphatase, ebenfalls ein Marker für Detergentien-resistente Membrandomänen (Eckert *et al.*, 2003), lag in M $\beta$ CD-unbehandelten Proben in der Lubrol-unlöslichen Fraktion 4. Nach M $\beta$ CD-Behandlung erfolgte ebenfalls eine Verschiebung in die Lubrol-löslichen Fraktionen. In den Lubrol-unlöslichen Fraktionen war im Vergleich dazu eine deutliche Zunahme im Cholesteringehalt auf ca. 14  $\mu$ g zu sehen. Nach M $\beta$ CD-Behandlung verschob sich das Maximum des Cholesteringehalts in die Lubrol-löslichen Fraktionen.

Eine Unterscheidung zwischen cholesterinreichen Detergentien-resistenten Mikrodomänen und Detergentien-löslichen Membranenfraktionen war in Triton-Extrakten nicht möglich, wohingegen eine Extraktion mit Lubrol zur Isolation von Detergentien-resistenten Membrandomänen führte. Für weitere Versuche wurde ausschließlich Lubrol als Extraktions-Detergenz verwendet und somit die Verteilung synaptischer Proteine in „Lubrol-Membranen Rafts“ charakterisiert.

A



B



**Abb. 32 Vergleich von Lubrol- und Triton-solubilisierten Membranfraktionen**

Aufgereinigte Synaptosomen [P2] adulter Wistar Ratten wurden wie unter 3.3.1 beschrieben präpariert und mit 10 mM M $\beta$ CD [+M $\beta$ CD] oder in Homogenisierungspuffer [-M $\beta$ CD] inkubiert (3.7.1). Die Proben wurden mit 1% Triton A bzw. 2% Lubrol B solubilisiert (3.6) und für die Auftrennung von löslichen und unlöslichen Detergentien-Membrandomänen durch Ultrazentrifugation auf einen Saccharosegradienten geladen (3.7). Fraktionen wurden von der Spitze (1) bis zum Boden (13) des

Gradientenröhrchens abgenommen und mittels SDS-PAGE, gefolgt von Western-Immunoblotting analysiert. In jeder Spur wurden je 10 µl/Fraktion aufgetragen. In allen Fraktionen wurde die Aktivität der Alkalischen Phosphatase als µM umgesetztes Nitrophenylphosphat bestimmt (3.7.3) und der Cholesteringehalt in µg ermittelt (3.7.2).

A) In Triton behandelten Proben war im Gegensatz zu Lubrol behandelten Membranfraktionen die Verteilung der Proteine auf Fraktionen höherer Dichte beschränkt. Eine Isolation von cholesterinreichen Mikrodomänen war kaum möglich. B) Anhand spezieller Markerproteine (Alkalische Phosphatase, Thy1) konnten cholesterinreiche Membrandomänen in Lubrol-solubilisierten Membranfraktionen identifiziert werden. Eine Behandlung mit MβCD führte zur Zerstörung dieser Mikrodomänen.

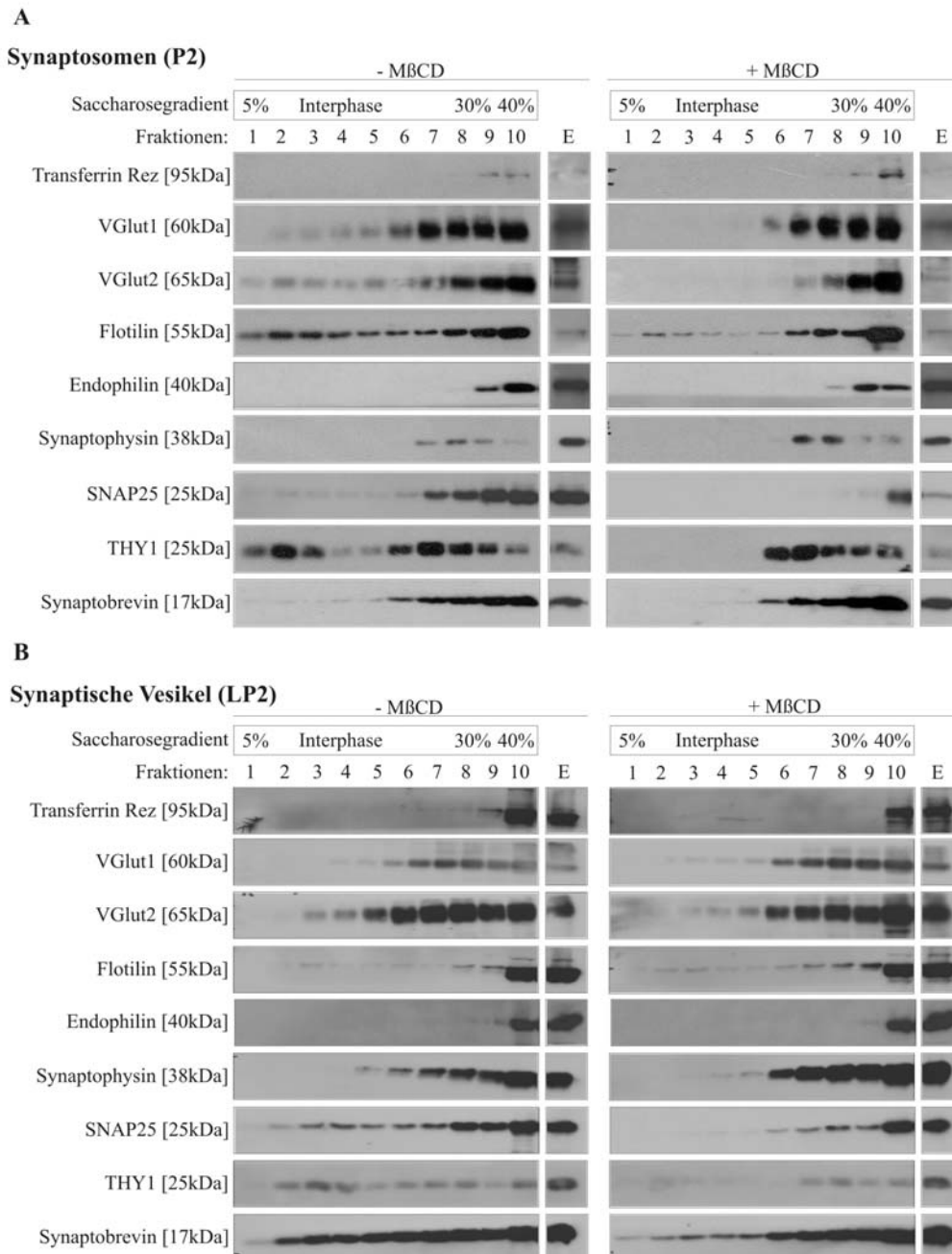
#### 4.4.2.1 Proteinumverteilung in Membrandomänen synaptischer Vesikel

Über *Lipid Rafts* in synaptischen Vesikeln ist bisher nur wenig bekannt. Im Vergleich zu einem Cholesterin/Phospholipid (C/P)-Quotient von ~0,3-0,4:1 (mol/ mol) in der Plasmamembran (Martin, 2000; Shapiro & Barchi, 1981) ist der Cholesterinanteil synaptischer Vesikel mit einem C/P-Quotienten von 0,6-0,8:1 sehr viel höher (Martin, 2000; Takamori *et al.*, 2006; Tong *et al.*, 2009). Welche Folgen hat die Entfernung von Cholesterin auf synaptische Vesikelmembranen und inwiefern unterscheidet sich die Verteilung von VGlut1 und VGlut2 in *Lipid Rafts* der Plasmamembran von jener in synaptischen Vesikeln?

Zur Klärung dieser Fragestellung wurde die methodische Vorgehensweise zur Isolationen von DRMs auf synaptische Vesikelmembranen übertragen. Ficoll-gereinigte Synaptosomen (P2) und synaptische Vesikel (LP2) wurden nach bzw. ohne vorherige Inkubation in 10 mM MβCD in 2% Lubrol solubilisiert und DRMs isoliert (3.7). Neben der SDS-PAGE/Western-Immunoblotanalyse der einzelnen Fraktionen erfolgte eine Aktivitätsbestimmung der Alkalischen Phosphatase (Abb. 34).

Abb. 33 zeigt die Western-Immunoblotanalyse synaptosomaler Membrandomänen im Vergleich zu Membrandomänen synaptischer Vesikel.

Im Fall von synaptosomalen Membranen konnten die Fraktionen 9-10 mittels des DSM-Markers Transferrin Rezeptor als Lubrol-lösliche Fraktionen identifiziert werden. Die DRM-Marker Flotillin (Lang *et al.*, 1998; Suzuki, 2002) und Thy1 fanden sich ebenfalls in Fraktionen niedriger Dichte eins – 3 und in der Interphase. Die hohe Aktivität des DRM-Markers Alkalischen Phosphatase in den Fraktionen 2-4 war ein Indiz für Lubrol-unlösliche DRMs. VGluts fanden sich in Lubrol-unlöslichen Membranfraktionen, ebenso die SNARE-Proteine Syb und SNAP25. Dagegen waren Syp und Endophilin nicht in Lubrol-unlöslichen Membranbereichen vorzufinden.



**Abb. 33 Membranverteilung synaptischer Proteine nach Cholesterin-Depletion**

Western-Immunoblotanalyse der Verteilung von synaptischen Proteinen innerhalb der Membrane von Synaptosomen A) oder synaptischen Vesikeln B) adulter Wistar Ratten.

A) Ficoll-gereinigte Synaptosomen [P2] und B) synaptische Vesikel [LP2] wurden nach bzw. ohne vorherige Inkubation mit 10 mM MβCD in 2% Lubrol solubilisiert. Die Trennung von unlöslichen und löslichen Lubrol-Membranfraktionen erfolgte in einem Saccharosegradienten unterschiedlicher Dichte durch Ultrazentrifugation. Fraktionen gleichen Volumens wurden von der Spitze (1) bis zum Boden (10) des Gradienten abgenommen und in einer SDS-PAGE, gefolgt von Western-Immunoblotting analysiert. Neben 10 µl Fraktion pro Spur wurden 10 µl des Lubrol-Extrakts [E] aufgetragen.

In Synaptosomen konnten anhand spezieller Markerproteine (Flotillin, Thy1) Raft-Domänen identifiziert werden. Eine Behandlung mit MβCD führte zur Zerstörung dieser Domänen. In Membranfraktionen synaptischer Vesikel war dieser Effekt weniger deutlich ausgeprägt.

Eine Verminderung des Cholesteringehalts durch M $\beta$ CD-Behandlung führte zu einer Zerstörung der DRMs. Dieses hatte eine Verschiebung der Raft-lokalisierten Proteine (Fraktionen 1-3) in die Lubrol-löslichen Membranfraktionen (7-10) zur Folge.

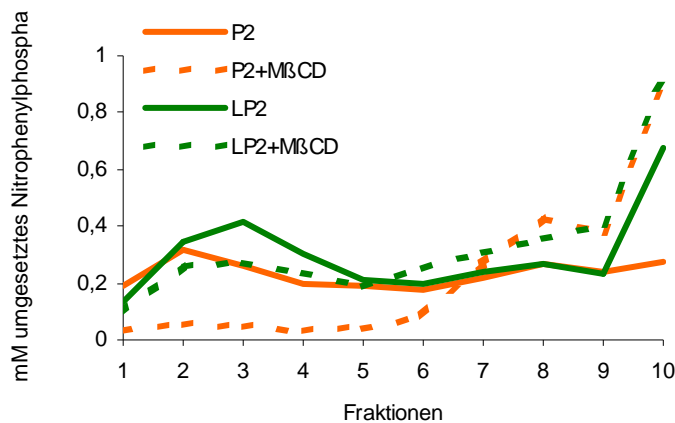
Allerdings waren in den mit M $\beta$ CD behandelten Proben Restspuren in den Fraktionen niedriger Dichte und in der Interphase von Flotillin detektierbar. Eine Cholesterinsenkung führte gleichsam zu einem Aktivitätsabfall der Alkalischen Phosphatase in den Fraktionen niedriger Dichte, einhergehend mit einem Aktivitätsanstieg in den Bodenfraktionen.

Trotz widersprüchlicher Hinweise ihrer Existenz auf synaptischen Vesikeln wurden für die Charakterisierung von Membranfraktionen synaptischer Vesikel die bereits bekannten Proteine Flotillin, Thy-1 und Alkalische Phosphatase als Raft-Marker, sowie der Transferrin Rezeptor als DSM-Marker verwendet. Flotillin wurde in Betracht gezogen, da es auf Endosomen lokalisiert wurde (Dermine *et al.*, 2001; Fivaz *et al.*, 2002) und synaptische Vesikel während ihres Lebenszykluses mit Endosomen (Sudhof, 1995; Sudhof, 2004) fusionieren. Im Fall von Thy-1 gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass dieses Protein auf synaptischen Vesikeln (Jeng *et al.*, 1998) als auch ausschließlich in der Plasmamembran zu finden ist (Acton *et al.*, 1978; Watanabe *et al.*, 1981). Im Fall der Alkalischen Phosphatase konnte eine Assoziation mit synaptischen Vesikeln bereits gezeigt werden (Sugimura & Mizutani, 1979; Zisapel & Haklai, 1980; Zisapel & Levi, 1980). Als gebräuchlicher Endosomenmarker ist der Transferrin Rezeptor sowohl auf synaptosomalen Membranen als auch frühen Endosomen zu finden (Mundigl *et al.*, 1993) und kolokalisiert mit Synaptophysin (Cameron *et al.*, 1991).

Für die synaptischen Vesikelmembranfraktionen ergab sich ein leicht verändertes Bild im Vergleich zu synaptosomalen Membranfraktionen. Der DSM-Marker Transferrin Rezeptor befand sich nur in den Bodenfraktionen 9-10 des Gradienten und die Detektion von Thy-1 und Flotillin im Western-Immunoblot deutete auf Lubrol-unlösliche DRMs in den Fraktionen 2-4 hin. Allerdings war die Markierung für Flotillin sehr schwach und eine Behandlung mit M $\beta$ CD schien keine Auswirkung auf die Verteilung des Proteins zu haben. Die Alkalische Phosphatase zeigte nach Cholesterinsenkung durch M $\beta$ CD einen Aktivitätsabfall in den Fraktionen niedriger Dichte (2-4), jedoch war dieser Effekt nicht so deutlich wie im Fall von synaptosomalen Membranen (Abb. 34).

VGlut1 und 2, sowie SNAP25 und Syb konnten in Lubrol-unlöslichen Fraktionen identifiziert werden. Eine Cholesterinsenkung durch M $\beta$ CD hatte jedoch nur eine leichte Verschiebung dieser Proteine in die DSM-Fraktionen 6-10 zur Folge.

Die Auftrennung von DRM und DSM-Fraktionen in synaptischen Vesikelmembranfraktionen war im Vergleich zu synaptosomalen Membranfraktionen um einiges unschärfer. Eine Cholesterinsenkung führte zu einer schwachen Verschiebung der Proteine in Fraktionen höherer Dichte; möglicherweise bedingt durch den hohen Cholesteringehalt synaptischer Vesikel. Anders als Thy-1 schien Flotillin als Marker für Lubrol-unlösliche Membrandomänen synaptischer Vesikel ungeeignet. VGlut1 und 2 ließen sich auf cholesterinreichen Membrandomänen in Synaptosomen sowie synaptischen Vesikeln finden, allerdings bevorzugt in DRMs von synaptosomalen Membranfraktionen und weniger in DRMs von SV-Membranfraktionen. Mögliche Regulationsmechanismen aufgrund einer Sortierung in diese Membrandomänen müssten genauer betrachtet werden. Eine Sortierung von Endophilin gemeinsam mit dem Interaktionspartner VGlut1 (De Gois *et al.*, 2006; Voglmaier *et al.*, 2006) und VGlut2 in cholesterinreiche Lubrol-unlösliche Membranbereiche war nicht der Fall bzw. konnte mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 34** Aktivitätsbestimmung der Alkalische Phosphatase in solubilierten Membranendomänen

Ficoll-gereinigte Synaptosomen [P2] und synaptische Vesikel [LP2] wurden nach bzw. ohne vorherige Inkubation in 10 mM M $\beta$ CD in 2% Lubrol solubilisiert und Detergentien-unlösliche Membranbestandteile von löslichen Bestandteilen durch Ultrazentrifugation in einem Saccharosegradienten unterschiedlicher Dichte getrennt. Fraktionen wurden von der Spitze (1) bis zum Boden (10) des Gradienten abgenommen und die Aktivität der Alkalischen Phosphatase bestimmt. Die Aktivität ist als mM umgesetzt Nitrophenylphosphat dargestellt.

M $\beta$ CD-Behandlung führt zu einem Aktivitätsverlust in Fraktionen niedriger Dichte (2-4). In Übereinstimmung dazu kommt es zu einem Aktivitätsanstieg in Nähe der Bodenfraktion (7-10). Dieser Effekt ist deutlicher in synaptosomalen Membranfraktionen als in Membranfraktionen synaptischer Vesikel.



VGlut1 und 2 sortierten beide in der Plasmamembran in Lubrol-DRMs - in Regionen, die bekannt sind für ein hohes Maß an Signal- und Regulationsvorgängen. In der synaptischen Vesikelmembran gestaltete sich die Deutung der Ergebnisse schwierig. Die Trennung zwischen DRM und DSM-Fractionen war unscharf, dennoch fanden sich Hinweise für eine Sortierung von VGlut1 und 2 in cholesterinreiche Membranmikrodomänen, die hier ebenfalls als Plattform für Regulationsvorgänge fungieren könnten.

In den vorangegangenen Experimenten lag zum einen das Augenmerk auf der VGlut1-Endophilin-Interaktion, zum anderen wurden beide Transporter betrachtet und die Sortierung in *Lipid Rafts* untersucht. Um den Fokus auf VGlut2 zu legen, wurde in einem weiteren Ansatz eine VGlut2-transfizierte PC12-Zelllinie charakterisiert. Zellmodelle bieten die Chance, die komplexe Dynamik des zellulären Metabolismus zu manipulieren. Da VGlut2 nicht via Endophilin mit dem endozytotischen Apparat interagiert, können selektiv VGlut2-abhängige Sortierungswege betrachtet werden.

#### **4.5 Charakterisierung VGlut2-transfizierter PC12-Zellen**

Um die Regulation des VGlut2 näher zu betrachten, wurde eine stabil mit VGlut2-transfizierte PC12-Zelllinie untersucht. Sie wurde freundlicherweise von Adolfo Zurita, Labor Prof. L. Birnbaumer, National Institute of Environmental Health Sciences, USA zur Verfügung gestellt.

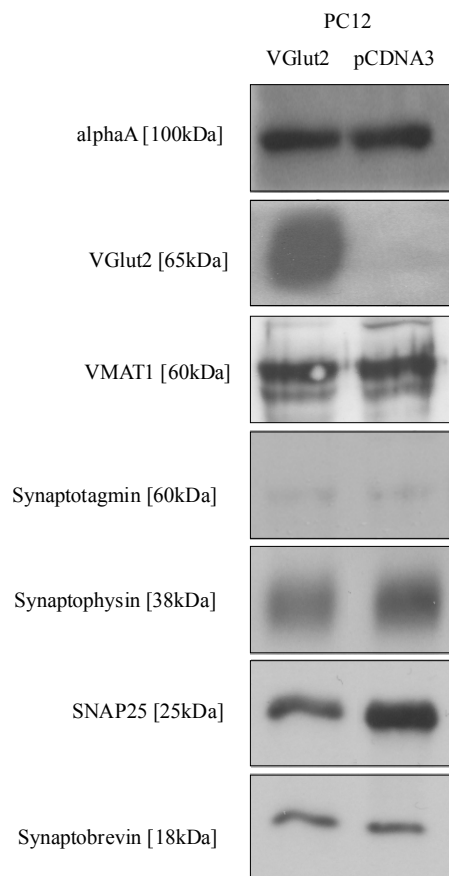
Native PC12-Zellen exprimieren keinen der 3 vesikulären Glutamattransporter, so dass eine Transfektion die selektive Betrachtung des VGlut2 unabhängig von VGlut1 und/oder VGlut3 erlaubt. Ein weiterer Vorteil eines solchen neuroendokrinen Zellkulturmodells ist die leichtere Handhabung im Vergleich zur neuronalen Zellkultur sowie der Verzicht auf die Präparation von synaptischen Vesikeln und die damit verbundene Tötung von Labortieren.

Zur Charakterisierung der transfizierten PC12-Zellen wurde zunächst die Expression und Verteilung von VGlut2 im Western-Immunoblot-Verfahren und im konfokalen Laser-Raster Mikroskop untersucht.

## 4.5.1 Verteilungs- und Funktionsanalyse von VGlut2

### 4.5.1.1 Proteinverteilung nach Western-Immunoblotanalyse

Die Zellysate von PC12-Zellen, die entweder mit VGlut2-pcDNA3 (VGlut2) transfiziert waren oder mit dem Leervektor (pcDNA3), wurden im Western-Immunoblotanalyse auf Unterschiede untersucht. Mit Augenmerk auf Vesikelproteine wurden Ak, gerichtet gegen VGlut2, Synaptophysin, Synaptotagmin, VMAT1, alpha-Adaptin (alphaA), Snap25 und Synaptobrevin, verwendet. Während VGlut2-PC12-Zellen eine Markierung von VGlut2 zeigten, war dies in den pcDNA3-transfizierten PC12-Zellen nicht der Fall. Unterschiede in der Expression anderer Vesikelproteine waren nicht erkennbar (Abb. 35).



**Abb. 35 Expression von VGlut2 in transfizierten PC12-Zellen**

Das Homogenat transfizierter PC12-Zellen wurde durch 15 Ultraschallpulse mit einer Arbeitsfrequenz von 50-60 kHz (Energienstufe 60%, Puls-Dauerverhältnis 50%) mechanisch aufgeschlossen und die Zellkerne und Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt. In einer SDS-PAGE sind 5 µg Zelllysat sowohl von VGlut2-transfizierten PC12-Zellen [VGlut2] als auch PC12-Zellen, die lediglich mit Vektor-DNA transfiziert wurden [pcDNA3], aufgetragen. In einer Western-Immunoblotanalyse wurde mit verschiedenen Antikörpern, gerichtet gegen Vesikelproteine, detektiert. Während die VGlut2-transfizierten PC12-Zellen VGlut2 exprimierten, war in den pcDNA3-transfizierten PC12-Zellen kein VGlut2 vorhanden.

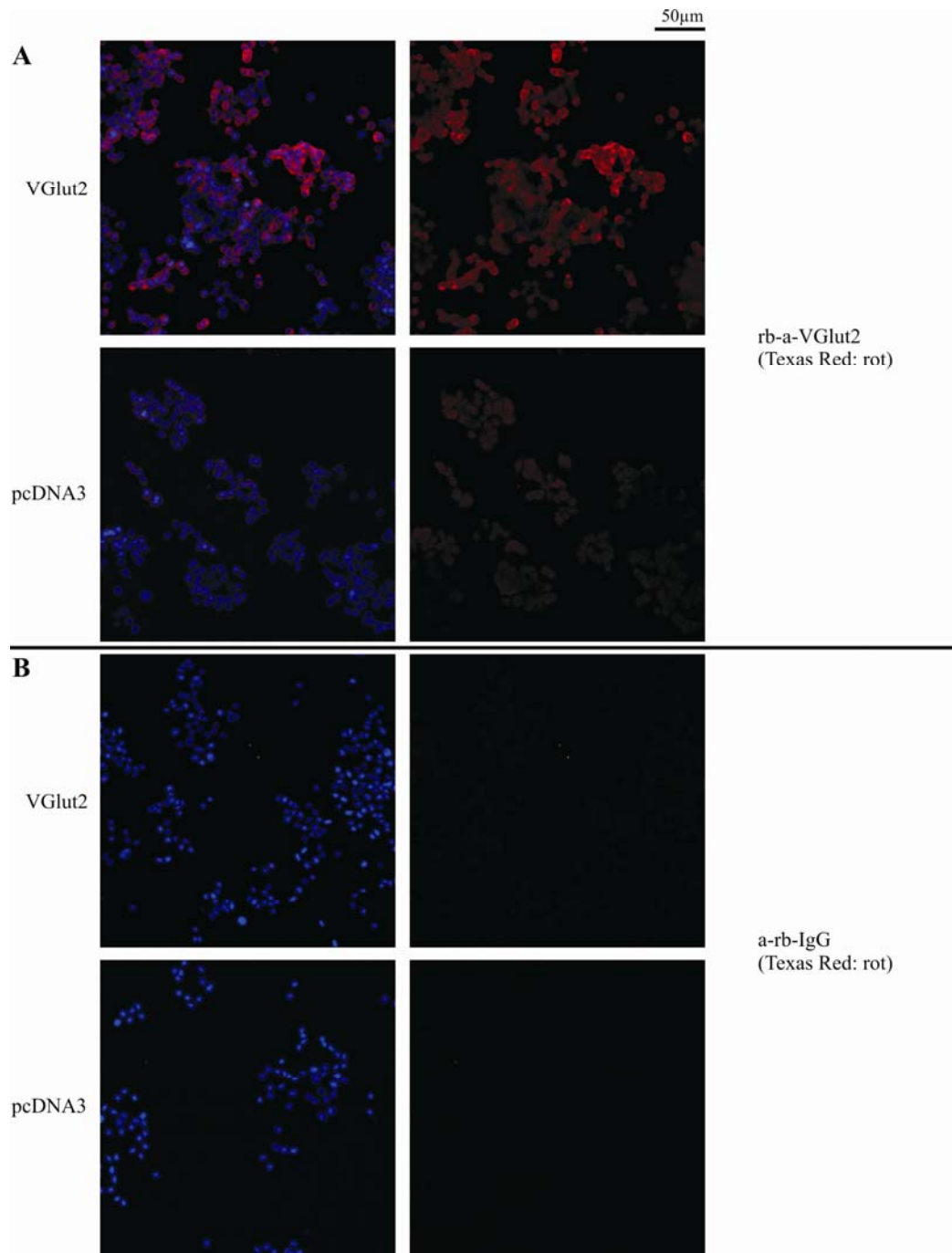
#### **4.5.1.2 Analyse der zellulären Expression von VGlut2 mittels konfokaler Laser-Mikroskopie**

In Ergänzung zu den Western-Immunoblotanalysen wurde die Expression von VGlut2 in konfokalen Immunfluoreszenzstudien beobachtet.

Die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie bietet gegenüber der klassischen Fluoreszenzmikroskopie den Vorteil, dass nur Fluoreszenz aus einer Fokusebene abgebildet wird. Fluoreszenz außerhalb wird ausgeblendet, wodurch eine scharfe Abbildung ausschließlich aus der Fokusebene des Präparates möglich ist.

PFA-fixierte, permeabilisierte PC12-Zellen wurden mit spezifischen Primärantikörpern, gefolgt von Texas Red- oder Oregon Green-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert und nach Kernanfärbung mit DAPI für Immunfluoreszenzanalysen in Mowiol eingebettet (3.10.6). Um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers zu detektieren, wurden PC12-Zellen ohne Primärantikörper und allein mit Sekundärantikörper behandelt. Das dabei entstehende Fluoreszenzsignal wurde als Hintergrundsignal bewertet und zur Beurteilung der parallel dazu angefertigten Färbung inklusive Primärantikörper herangezogen.

Während VGlut2-transfizierte PC12-Zellen ein deutliches Fluoreszenzsignal nach Anfärbung mit rb- $\alpha$ -VGlut2 Ak zeigen, ist das Signal in pcDNA3-transfizierten PC12-Zellen sehr schwach und diffus (Abb. 36). Es ist von einer Hintergrundmarkierung auszugehen. Das VGlut2-Fluoreszenzsignal ist in der Gesamtpopulation der VGlut2-transfizierten PC12-Zellen ungleichmäßig verteilt. Während manche Zellen ein starkes Signal zeigen, ist bei anderen Zellen lediglich ein Signal vergleichbar mit dem Signal in pcDNA3-transfizierten PC12-Zellen vorhanden. Nicht alle VGlut2-transfizierten PC12-Zellen exprimieren demnach VGlut2. Alle weiteren Studien an VGlut2-transfizierten PC12-Zellen wurden im Abgleich mit pcDNA3-transfizierten PC12-Zellen angefertigt. Die Fluoreszenzsignalstärke des VGlut2 wurde anhand des Fluoreszenzsignals in pcDNA3-transfizierten PC12-Zellen bewertet.



**Abb. 36 Konfokale Immunfluoreszenzanalyse von VGlut2-transfizierten und pcDNA3-transfizierten PC12-Zellen: Expression des VGlut2**

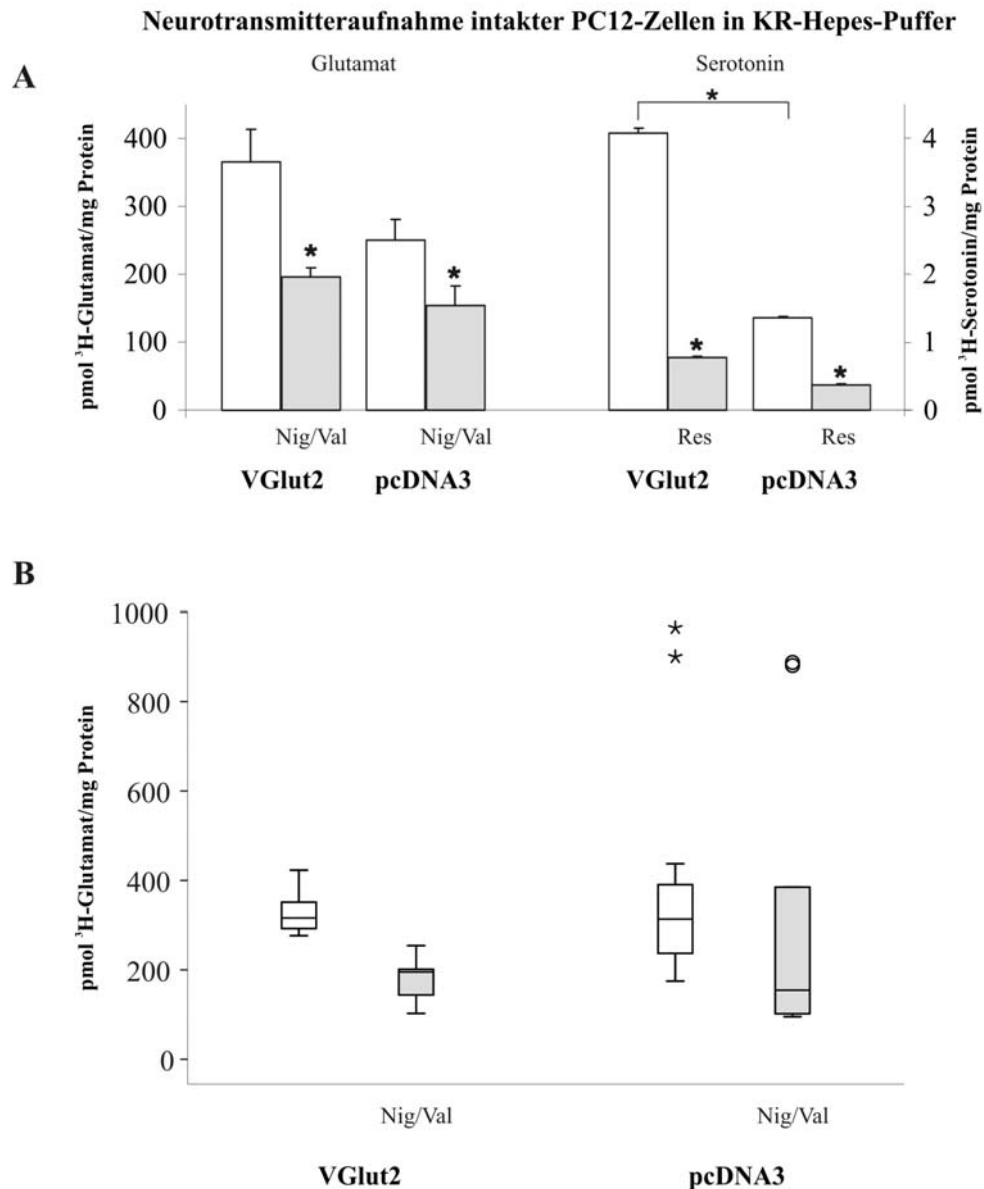
[VGlut2]- bzw. [pcDNA3]- transfizierte PC12-Zellen wurden in PFA fixiert und mit Triton permeabilisiert, bevor sie in A) mit und ohne rb- $\alpha$ -VGlut2 Antikörper, gefolgt von Texas Red-gekoppeltem Sekundärantikörper behandelt wurden. Parallel dazu wurden in B) PC12-Zellen lediglich mit Sekundärantikörper  $\alpha$ -rb-IgG, gekoppelt an Texas Red oder Oregon Green inkubiert. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt und die Zellen in Mowiol eingebettet. Die Auswertung der am konfokalen Mikroskop erhaltenen Fluoreszenzsignale erfolgte mittels dem ZEN 2008 Programm. In der linken Spalte wurden die Fluoreszenzsignale des Kernfarbstoffs DAPI (blau) und des Texas Red (rot)-gekoppelten Sekundärantikörpers überlagert, in der rechten Spalte wurde das Fluoreszenzsignal separat dargestellt. In VGlut2-transfizierten PC12-Zellen war ein deutliches Fluoreszenzsignal detektierbar. Die Stärke des Signals schwankte in der Gesamtpopulation jedoch erheblich von Zelle zu Zelle. In pcDNA3-transfizierten PC12-Zellen war ein sehr schwaches und diffuses Fluoreszenzsignal zu erkennen, das unspezifisch war. Eine Inkubation allein mit Sekundärantikörper zeigte kein Fluoreszenzsignal.

#### 4.5.1.3 Neurotransmitteraufnahme in VGlut2-transfizierten PC12-Zellen

Nach Überprüfung der Expression in transfizierten PC12-Zellen wurde die Funktionalität des VGlut2 in Neurotransmitteraufnahmeversuchen (3.10.5) untersucht. Hierfür wurde die Neurotransmitteraufnahme von  $^3\text{H}$ -Glutamat und  $^3\text{H}$ -Serotonin an intakten VGlut2- bzw. lediglich mit dem Vektor (pcDNA3)-transfizierten PC12-Zellen in KR-Hepes-Puffer gemessen. Die Spezifität der VMAT1-vermittelten Serotoninaufnahme wurde mittels Reserpin, einem spezifischen Inhibitor des VMAT1, überprüft. Um die Aufnahme von Reserpin in die Zellen zu garantieren, wurden die Zellen 1h in Kultivierungsmedium mit Reserpin inkubiert. Im Anschluss wurde die Neurotransmitteraufnahme wie unter 3.10.5 beschrieben durchgeführt. Der Nachweis der Spezifität der Glutamataufnahme über die Plasmamembran durch VGlut2 erfolgte direkt mit Trypan Blau. Ein indirekter Nachweis der vesikulären Glutamataufnahme erfolgte durch eine Hemmung von  $\Delta\mu\text{H}^+$  mittels der plasmamembrangängigen Ionophore Nigericin und Valinomycin. Das  $\text{K}^+/\text{H}^+$ -Ionophor Nigericin transportiert  $\text{H}^+$ -Ionen, was zur Disruption des Protonengradienten  $\Delta\text{pH}$  über der Membran führt. Eine Behandlung mit Valinomycin, einem  $\text{K}^+$ -Ionophor, führt zu einem Abfall von  $\Delta\psi$ , der elektrogenen Komponente des elektrochemischen Gradienten. Beide bedingen einen Zusammenbruch des elektrochemischen Gradienten  $\Delta\mu\text{H}^+$ , welches eine verminderte Aufnahme von Neurotransmitter nach sich zieht (Ahmed & Booth, 1983).

Im KR-Hepes-Puffer zeigten VGlut2- ebenso wie pcDNA3-transfizierte PC12-Zellen eine signifikante verminderte Glutamataufnahme unter dem Einfluß von Nigericin und Valinomycin (Abb. 37, A). Die Glutamataufnahme reduzierte sich in VGlut2-transfizierten PC12-Zellen um ca. 45% (Abb. 37, B), in pcDNA-transfizierten Zellen im Mittel um ca. 36%. Diese Verminderung ist in VGlut2-transfizierten PC12-Zellen tendenziell, allerdings nicht signifikant höher als in pcDNA3-transfizierten PC12-Zellen.

Für beide Zelltypen wurde eine signifikante vesikuläre Serotoninaufnahme beobachtet (Abb. 37, A). Auffällig war die im Vergleich zu pcDMA3-transfizierten PC12-Zellen deutlich erhöhte Serotoninaufnahme VGlut2-transfizierter PC12-Zellen.



**Abb. 37 <sup>3</sup>H-Glutamataufnahme von intakten PC12-Zellen in KR-Hepes-Puffer**

Die <sup>3</sup>H-Glutamat- bzw. <sup>3</sup>H-Serotoninaufnahme von intakten VGlut2- und pcDNA3-transfizierten PC12-Zellen wurde in KR-Hepes-Puffer bestimmt. Die unspezifische Aufnahme des tritiummarkierten Neurotransmitters wurde durch 5  $\mu$ M Nigericin [Nig] und 20  $\mu$ M Valinomycin [Val] bzw. 6  $\mu$ M Reserpin gemessen. Im Fall von Reserpin wurden die Zellen hierfür 1h mit Reserpin in Kultivierungsmedium vorinkubiert und im Anschluss die Transmitteraufnahme nach Standardprotokoll durchgeführt. Je Modell wurden drei Ansätze, bestehend aus vier Messwerten, sowie drei Kontrollansätzen mit spezifischem Inhibitor aufgeführt. A) Die Werte eines Experiments sind angegeben als der Durchschnitt von Dreifachwerten +/- Standardabweichung ( $p \leq 0,05$  nach Student's T-Test). B) Von drei unabhängigen Experimenten wurden die Daten der Glutamataufnahme unter Nigericin und Valinomycin-Einwirkung für beide Zelllinien in Boxblots (Mediane) mit Ausreißern (°) und Extremwerten (\*) dargestellt. Beide Zelllinien zeigten eine Glutamat- und Serotoninaufnahme über die Plasmamembran. Die Reserpinhemmung der Serotoninaufnahme sprach für eine ebenfalls vorhandene vesikuläre Aufnahme. Nigericin und Valinomycin zeigten einen hemmenden Einfluss auf die Glutamataufnahme, wobei diese Hemmung in beiden Zelllinien ähnlich verteilt war und damit auf einen unspezifischen Effekt hindeutet.

Nigericin und Valinomycin hatten einen signifikant hemmenden Einfluss auf die Glutamataufnahme in intakten transfizierten PC12-Zellen. Diese Hemmung war in beiden Zelllinien ähnlich stark und deutet damit auf einen unspezifischen Effekt hin.

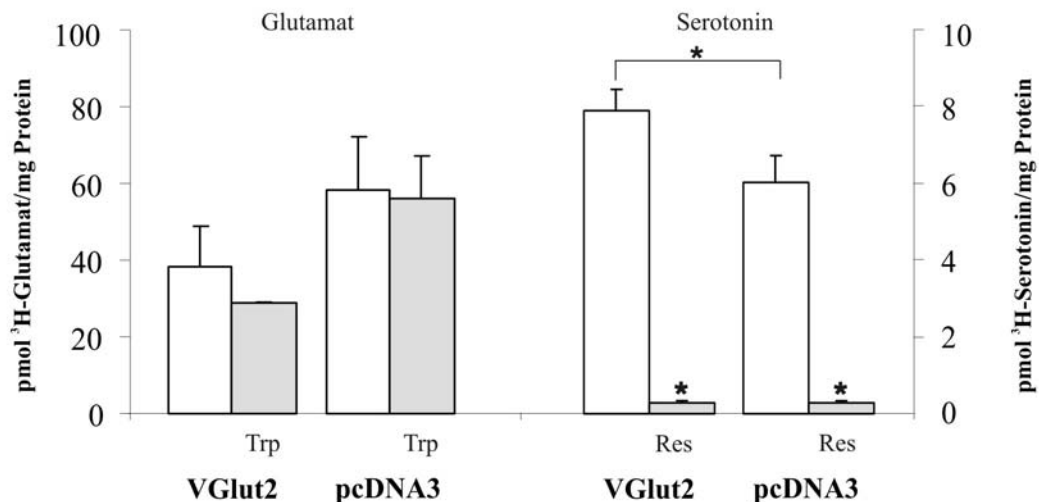
Inwiefern eine direkte Aufnahme auf vesikulärer Ebene möglich war, sollte in einem weiteren Ansatz untersucht werden.

Um die Neurotransmitteraufnahme von VGlut2-transfizierten PC12-Zellen auf vesikulärer Ebene zu betrachten, wurde die Neurotransmitteraufnahme von permeabilisierten transfizierten PC12-Zellen untersucht. Nach einer Permeabilisierung stehen intakte Vesikel für die Neurotransmitteraufnahme zur Verfügung.

Die Permeabilisierung von transfizierten PC12-Zellen wurde mit SLO und DTT durchgeführt (3.10.4) und die  $^3\text{H}$ -Glutamat- bzw.  $^3\text{H}$ -Serotoninaufnahme in KGC3 Puffer gemessen.

In Versuchen mit permeabilisierten PC12-Zellen, die mit VGlut2 oder pcDNA3 transfiziert waren, zeigte sich unter identischen Reaktionsbedingungen eine gleichmäßige [ $^3\text{H}$ ]-Serotoninaufnahmerate von 6 – 8 pmol/mg Protein (Abb. 38). Die Reserpin-sensitive Serotoninaufnahme war in VGlut2- im Vergleich zu pcDNA3-transfizierten PC12-Zellen erhöht. Weder VGlut2-transfizierte noch pcDNA3-transfizierte PC12-Zellen zeigen eine spezifische Glutamataufnahme, was sich nach Abzug der unspezifischen Aufnahme in Gegenwart von Trypan Blau ergibt.

#### Neurotransmitteraufnahme von permeabilisierten PC12-Zellen in KGC3 [4mM Cl]

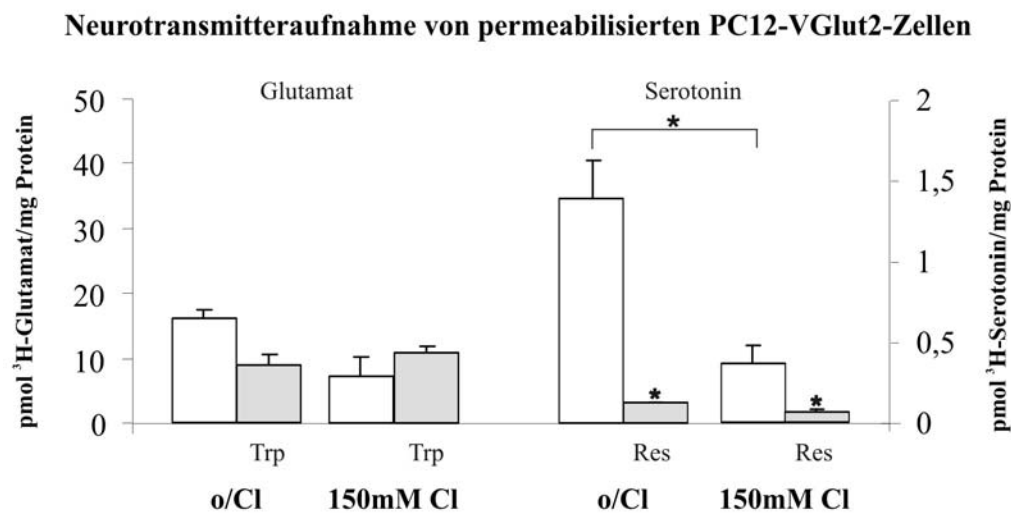


**Abb. 38**  $^3\text{H}$ -Glutamataufnahme von permeabilisierten PC12-Zellen

VGlut2- und pcDNA3-transfizierten PC12-Zellen wurden mit SLO und DTT permeabilisiert und die  $^3\text{H}$ -Glutamat- bzw.  $^3\text{H}$ -Serotoninaufnahme bestimmt. Die unspezifische Aufnahme des tritiummarkierten Neurotransmitters wurde durch 6  $\mu\text{M}$  Reserpin (für Serotonin) bzw. 10  $\mu\text{M}$  Trypan Blau (für Glutamat) gemessen. Je Modell wurden drei Ansätze, bestehend aus drei Messwerten, sowie drei Kontrollansätzen mit spezifischem Inhibitor aufgeführt. Die Werte sind angegeben als der Durchschnitt von Dreifachwerten  $\pm$  Standardabweichung ( $p \leq 0,05$  nach Student's T Test). Während eine Serotoninaufnahme für beide PC12-Zelllinien deutlich erkennbar war, lag keine Glutamataufnahme nach Abzug der Trypan Blau-sensitiven Aufnahme vor.

Da in den Versuchsbedingungen mit Vesikelfractionen keine Glutamataufnahme von transfizierten PC12-Zellen möglich war, wurde die Zusammensetzung des Aufnahmepuffer variiert.

Bereits bekannt ist, dass das Optimum der chloridabhängigen Glutamataufnahme bei ~3-5 mM Chlorid liegt (Bai *et al.*, 2001; Naito & Ueda, 1985). Aus diesem Grund sind dem KGC3-Aufnahmepuffer standardmäßig ca. 4-6 mM Chlorid zugesetzt. Es sollte der Einfluss der Chloridkonzentration auf die Neurotransmitteraufnahme in transfizierten PC12-Zellen untersucht werden. Dafür wurden dem Aufnahmepuffer (KGC3) verschiedene Konzentrationen von Chlorid zugesetzt und die Auswirkungen auf die Glutamat- bzw. Serotoninaufnahme in permeabilisierten VGlut2-transfizierten PC12-Zellen beobachtet (Abb. 39).



**Abb. 39 Chloridabhängige  $^3\text{H}$ -Glutamataufnahme von permeabilisierten PC12-Zellen**

VGlut2-transfizierte PC12-Zellen wurden mit SLO und DTT permeabilisiert und die Abhängigkeit der  $^3\text{H}$ -Glutamat- bzw.  $^3\text{H}$ -Serotoninaufnahme von der Chloridkonzentration im Aufnahmepuffer bestimmt. Die unspezifische Aufnahme des tritiummarkierten Neurotransmitters wurde durch 6  $\mu\text{M}$  Reserpin (für Serotonin) bzw. 10  $\mu\text{M}$  Trypan Blau (für Glutamat) gemessen. Je Modell wurden drei Ansätze, bestehend aus drei Messwerten, sowie drei Kontrollansätzen mit spezifischem Inhibitor aufgeführt. Die Werte sind angegeben als der Durchschnitt von Dreifachwerten +/- Standardabweichung ( $p \leq 0,05$  nach Student's T Test).

Während die Serotoninaufnahme durch steigende Chloridkonzentrationen vermindert wurde, war keine nennenswerte Glutamataufnahme nach Abzug der Trypan Blau-sensitiven Aufnahme unter allen getesteten Versuchsbedingungen zu verzeichnen.

Mit steigender Chloridkonzentration nimmt die Aufnahme von Serotonin ab. Für Glutamat konnte bei einer Konz. von 0 mM Chlorid im Aufnahmepuffer eine signifikante, wenn auch nur sehr geringe Trypan-sensitive Aufnahme verzeichnet werden. Die Variation der Chloridkonzentration im Aufnahmepuffer hatte eine geringe Verbesserung der Glutamataufnahme in transfizierten PC12-Zellen zur Folge.

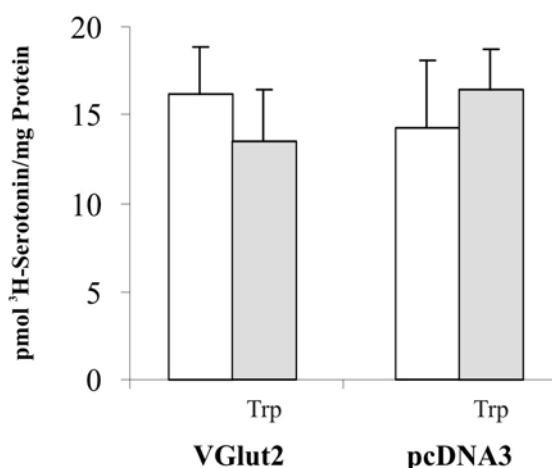


In den bisherigen Experimenten hatte es den Anschein, als sei die Serotoninaufnahme in VGlut2-transfizierten PC12-Zellen im Vergleich zu pcDNA3-transfizierten leicht, wenn auch nur teilweise signifikant, erhöht (Abb. 37, Abb. 38). Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass VGlut2 die Serotoninaufnahme beeinflusst.

Um den Einfluss des VGlut2 auf die Serotoninaufnahme zu untersuchen, wurden VGlut2-transfizierte PC12-Zellen permeabilisiert und die  $^3\text{H}$ -Serotoninaufnahme in Gegenwart von Trypan Blau als spezifischer Inhibitor des VGlut2 beobachtet. Wenn VGlut2 tatsächlich die Serotoninaufnahme fördert, sollte eine Inhibierung des VGlut2 einen negativen Effekt auf die Serotoninaufnahme haben.

In Abb. 40 ist die Serotoninaufnahme reserpinsensitiv dargestellt. Eine spezifische Inhibition des VGlut2 durch Trypan Blau hat keinen signifikanten Effekt auf die Höhe der Serotoninaufnahme.

**Einfluss von VGlut2 auf die Serotoninaufnahme von permeabilisierten PC12-VGlut2 Zellen in KG3 [4mM Cl]**



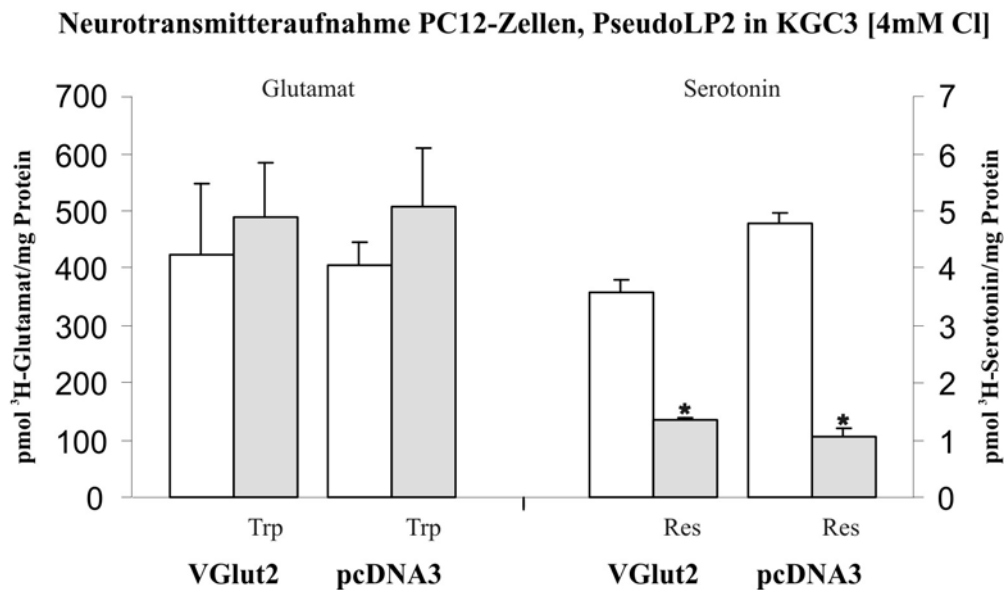
**Abb. 40 Einfluss von VGlut2 auf die VMAT1-abhängige Serotoninaufnahme von permeabilisierten PC12-Zellen**

VGlut2- und pcDNA3-transfizierten PC12-Zellen wurden mit SLO und DTT permeabilisiert und die  $^3\text{H}$ -Serotoninaufnahme in Gegenwart von  $10\ \mu\text{M}$  Trypan Blau zur spezifischen Inhibition des VGlut2 bestimmt. Dargestellt ist die reserpinsensitive Serotoninaufnahme. Je Modell wurden drei Ansätze, bestehend aus drei Messwerten, sowie drei Kontrollansätzen mit spezifischem Inhibitor aufgeführt. Die Werte sind angegeben als der Durchschnitt von Dreifachwerten  $\pm$  Standardabweichung ( $p \leq 0,05$  nach Student's T-Test).

Die Expression des VGlut2 in PC12-Zellen hatte keinen direkten Einfluss auf die Serotoninaufnahme oder ließ sich nicht aufklären.

Da eine Glutamataufnahme in permeabilisierten PC12-Zellen unter den getesteten Versuchsbedingungen nur bedingt möglich war, wurden VGlut2- und pcDNA3-transfizierte PC12-Zellen bis zu einem Äquivalent synaptischer Vesikel (LP2-Äquivalent, PsLP2) aufbereitet (3.3.4). Anschließend wurde die Aufnahme von  $^3\text{H}$ -Glutamat bzw.  $^3\text{H}$ -Serotonin in KGC3 Puffer gemessen. Zur Ermittlung der

unspezifischen Bindung des tritiummarkierten Neurotransmitters wurden die Proben in einem weiteren Ansatz mit spezifischen Inhibitoren des VGlut2 (Trypan Blau) bzw. VMAT1 (Reserpin) versetzt.



**Abb. 41 <sup>3</sup>H-Glutamataufnahme in Vesikelmembranfraktionen transfizierter PC12-Zellen**

Die Aufnahme von Neurotransmittern wurde an einem Äquivalent zu synaptischen Vesikeln (PsLP2) von VGlut2- transfizierten PC12-Zellen [VGlut2] und von PC12-Zellen, die lediglich mit Vektor-DNA transfiziert waren [pcDNA3] durchgeführt. Die unspezifische Aufnahme des tritiummarkierten Neurotransmitters wurde durch 5  $\mu$ M Reserpin (für Serotonin) bzw. 10  $\mu$ M Trypan Blau (für Glutamat) bestimmt. Je Modell wurden drei Ansätze, bestehend aus drei Messwerten, sowie drei Kontrollansätzen mit spezifischem Inhibitor aufgeführt. Die Werte sind angegeben als der Durchschnitt von Dreifachwerten +/- Standardabweichung ( $p \leq 0,05$  nach Student's T-Test).

Während eine Serotoninaufnahme für beide PC12-Zelllinien deutlich zu sehen war, war keine Glutamataufnahme nach Abzug der Trypan Blau-sensitiven Aufnahme zu beobachten.

Während Serotonin in einer Menge von 2,5 – 4 pmol/mg Protein aufgenommen wurde, ist keine Aufnahme von Glutamat im LP2-Äquivalent zu verzeichnen, was sich aus dem Vergleich mit der unspezifischen Glutamataufnahme in Gegenwart von Trypan Blau ergibt (Abb. 41). Die Reserpin-sensitive Serotoninaufnahme in pcDNA3-transfizierten PC12-Zellen war im Vergleich zu VGlut2-transfizierten PC12-Zellen leicht erhöht. Eine Glutamataufnahme war im LP2-Äquivalent von VGlut2- und pcDNA3-transfizierten PC12-Zellen unter den getesteten Versuchsbedingungen nicht möglich.

#### **4.5.2 Analyse der zellulären VGlut2-Distribution mittels konfokaler Laser-Mikroskopie**

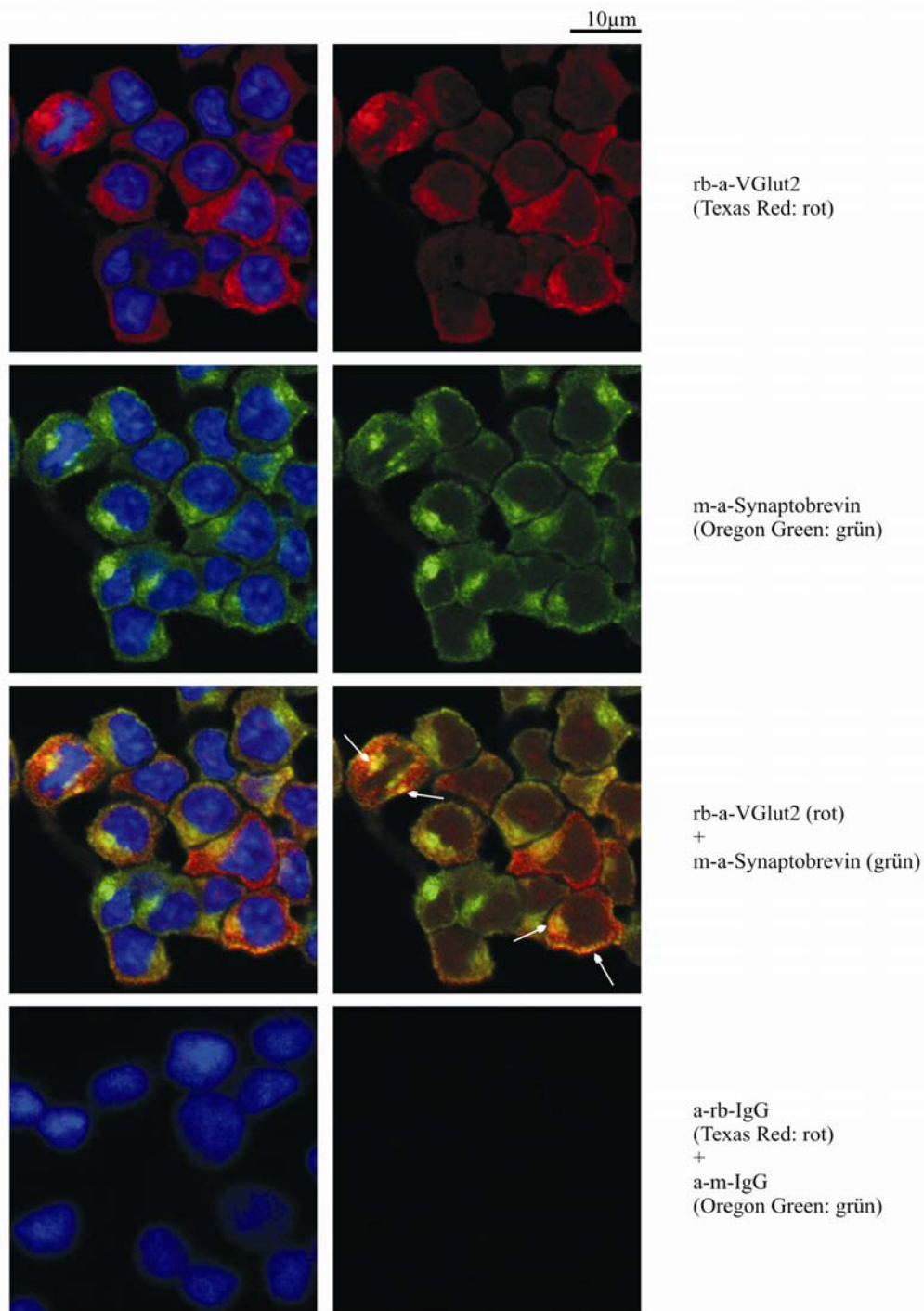
In den bisherigen Experimenten konnte eine Glutamataufnahme lediglich in intakten VGlut2-transfizierten PC12-Zellen beobachtet werden. Eine Glutamataufnahme auf vesikulärer Ebene war nicht möglich. Neben ihrer Funktion als vesikulärer Glutamattransporter besitzen VGlut1 und VGlut2 an der

Plasmamembran die Eigenschaften eines natriumabhängigen Phosphattransporters (Aihara *et al.*, 2000; Bellocchio *et al.*, 1998; Ni *et al.*, 1994). Eine mögliche Lokalisation des VGlut2 in transfizierten PC12-Zellen an der Plasmamembran wurde in einem ersten Ansatz mittels konfokaler Mikroskopiestudien untersucht.

Um die Lokalisation des VGlut2 näher einzugrenzen, wurden PC12-Zellen parallel zu Färbungen mit rb- $\alpha$ -VGlut2 Ak ebenfalls mit m- $\alpha$ -Syb Ak bzw. m- $\alpha$ - Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Ak angefärbt. Dargestellt sind in Abb. 42 repräsentative Vergrößerungen einzelner Zellen.

Synaptobrevin fand sich in PC12-Zellen auf sogenannten *synaptic-like micro vesicles* (SLMV) und *dense core granules* (Chilcote *et al.*, 1995). Eine Doppelfärbung von Synaptobrevin- und VGlut2-Antikörpern zeigte eine Überlagerung des Fluoreszenzsignals an einigen Stellen, jedoch war das Fluoreszenzsignal des VGlut2 nicht exklusiv auf Synaptobrevin-markierte Strukturen beschränkt, sondern verteilte sich im Zytoplasma ebenso auf andere, zytoplasmatische Bereiche. Eine Unterscheidung der Lokalisation an Granula und/oder Mikrovesikeln war nicht möglich. Auffällig war ein angehäuftes Fluoreszenzsignal an der Plasmamembran. Die Doppelmarkierung von VGlut2 mit dem Plasmamembranprotein Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase bestätigte dies (Abb. 43). Eine Kolokalisation von Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase und VGlut2 an der Plasmamembran war eindeutig zu erkennen.

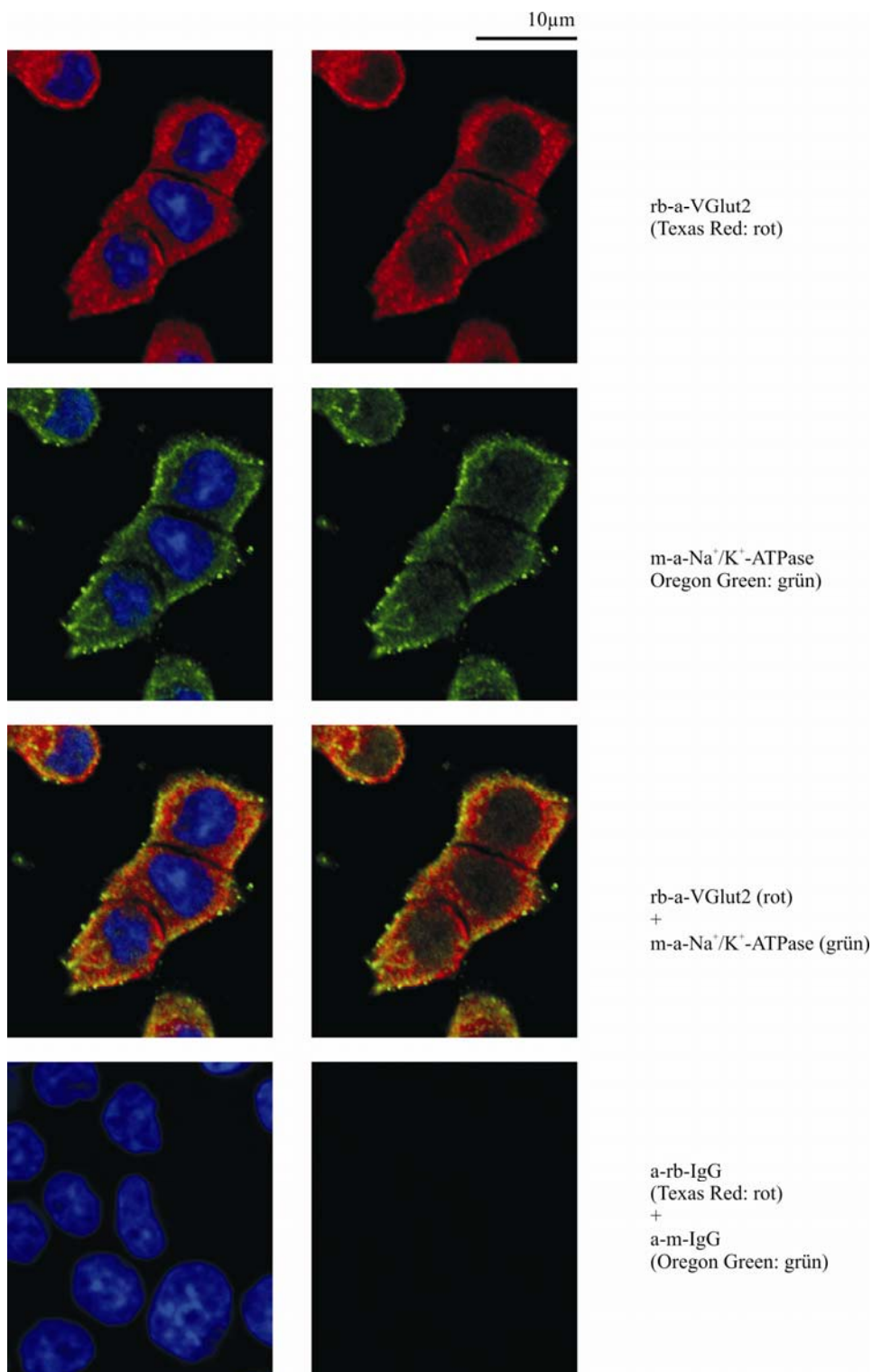
In VGlut2-transfizierten PC12-Zellen schien VGlut2 in geringen Anteilen an endosomale Strukturen und überwiegend an die Plasmamembran sortiert zu werden. Es sollte untersucht werden, ob VGlut2-transfizierte PC12-Zellen für die Analyse des Natrium-Phosphattransports vesikulärer Glutamattransporter geeignet sind.



**Abb. 42 Lokalisation des VGlut2 im Zytosol und vesikulären Strukturen in VGlut2-transfizierten PC12-Zellen**

PFA-fixierte, permeabilisierte PC12-Zellen wurden mit rb- $\alpha$ -VGlut2 Ak und m- $\alpha$ -Syn Ak, gefolgt von Texas Red- und Oregon Green gekoppeltem Sekundärantikörper behandelt. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt und die Zellen in Mowiol eingebettet. Die Auswertung der am konfokalen Mikroskop erhaltenen Fluoreszenzsignale erfolgte mittels der ZEN 2008 Software. In der linken Spalte wurden die Fluoreszenzsignale des Kernfarbstoffs DAPI (blau) und des Texas Red (rot)- bzw. Oregon Green (grün)-gekoppelten Sekundärantikörpers überlagert, in der rechten Spalte wurde das Fluoreszenzsignal separat dargestellt.

VGlut2-transfizierte PC12-Zellen zeigten eine Fluoreszenzüberlagerung - angezeigt durch weiße Pfeile - mit Synaptobrevin-markierten Strukturen wie die *dense core grandula* und *synaptic-like micro vesicles*, allerdings war die Lokalisation nicht exklusiv auf die markierten Bereiche beschränkt.



**Abb. 43 Lokalisation des VGlut2 an der Plasmamembran in VGlut2-transfizierten PC12-Zellen**

PFA-fixierte, permeabilisierte PC12-Zellen wurden mit rb- $\alpha$ -VGlut2 Ak und m- $\alpha$ -Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Ak, gefolgt von Texas Red- und Oregon Green gekoppeltem Sekundärantikörper behandelt. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt und die Zellen in Mowiol eingebettet. Die Auswertung der am konfokalen Mikroskop erhaltenen Fluoreszenzsignale erfolgte mittels der ZEN 2008 Software. In der linken Spalte wurden die Fluoreszenzsignale des Kernfärbstoffs DAPI (blau) und des Texas Red (rot)- bzw. Oregon Green (grün)-gekoppelten Sekundärantikörpers überlagert, in der rechten Spalte wurde das Fluoreszenzsignal separat dargestellt.

VGlut2-transfizierte PC12-Zellen zeigten größtenteils Fluoreszenzsignale an der Plasmamembran, keine Kolokalisation mit dem Plasmamembranprotein Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase.

### 4.5.3 Natriumsensitive Fluoreszenzmikroskopische Messungen mit CoroNa Green

Vorhergehende Ergebnisse zeigten, dass eine Glutamataufnahme durch intakte VGlut2-transfizierten PC12-Zellen nur bedingt möglich war. Allerdings war auch hierbei die Glutamataufnahme sehr gering (im pmol-Bereich) im Vergleich zur Glutamataufnahme synaptischer Vesikel von Ratten oder Mäusen (im nmol-Bereich (Winter *et al.*, 2005)). In der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie von VGlut2-transfizierten PC12-Zellen zeigte sich, dass VGlut2 zu erheblichen Teilen an der Plasmamembran lokalisiert ist. Die Funktion von VGlut1 und VGlut2 an der Plasmamembran als natriumabhängiger Phosphattransporter ist seit langem bekannt, wurde bisher aber nur in Oozyten direkt nachgewiesen. Ausgehend von den bisherigen Ergebnissen wurde eine mögliche Funktion des VGlut2 als natriumabhängiger Phosphattransporter in transfizierten PC12-Zellen untersucht.

Hierfür wurden transfizierte PC12-Zellen mit 10  $\mu$ M CoroNa Green-Lösung in natrium- und phosphatfreiem Medium kultiviert (3.10.7) und das Fluoreszenzsignal bei 516 nm nach Zugabe von Puffern mit unterschiedlichen Natrium- und Phosphatkonzentrationen fotografisch festgehalten.

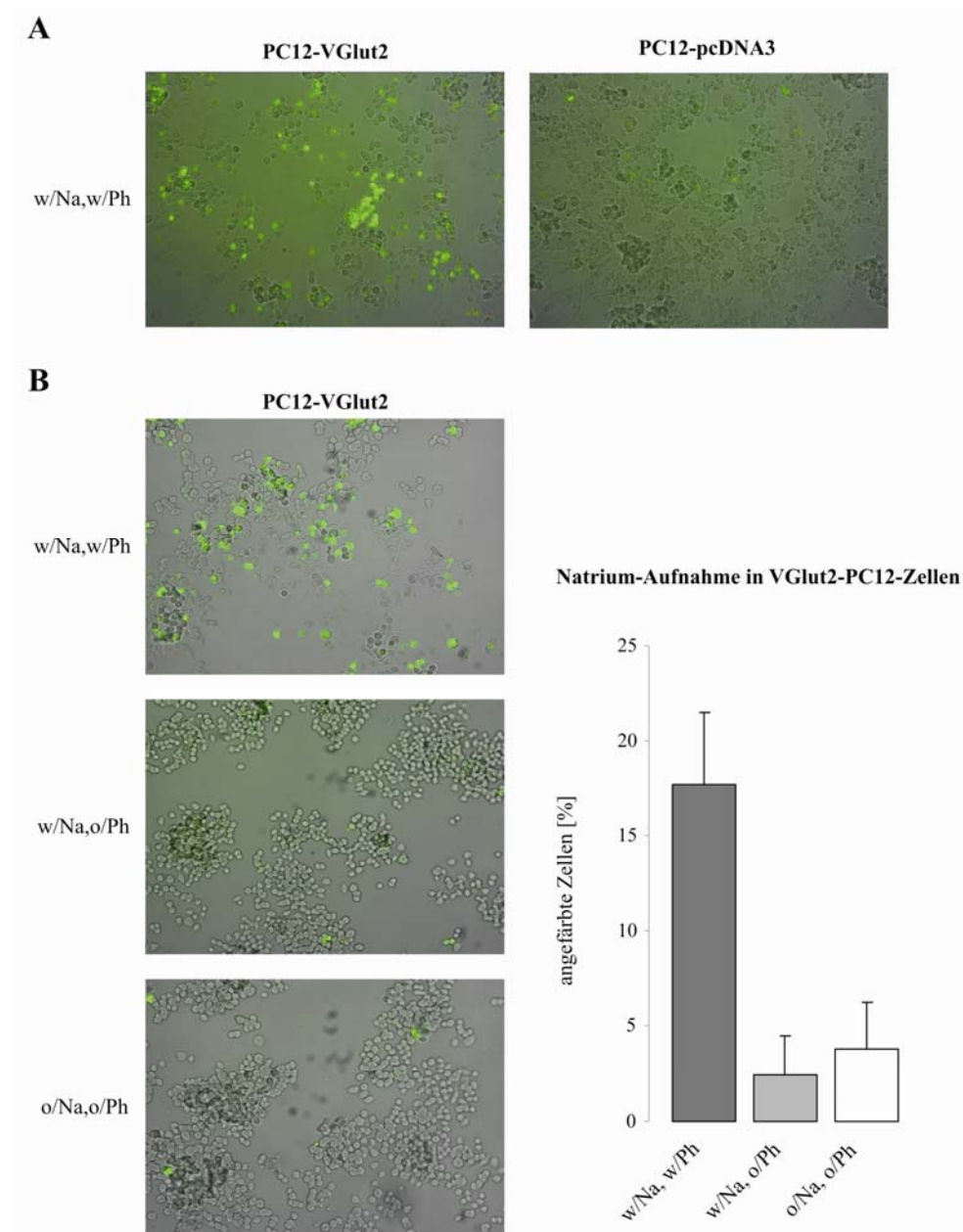
Die Fluoreszenzintensität des Natriumindikators CoroNa Green steigt mit Natriumbindung an und kann deshalb als Signalparameter für Natriummessungen genutzt werden. Eine häufige Fehlerquelle bei Natriummessungen ist, dass Änderungen der intrazellulären Indikatorkonzentration oder der Anregungsintensität einen Anstieg oder Abfall der Fluoreszenzintensität zur Folge haben. Diese Änderungen der Fluoreszenzintensität könnten fälschlicherweise als Änderung der Natriumkonzentration interpretiert werden. In der Literatur finden sich Hinweise auf ein Ausströmen von CoroNa Green aus der Zelle (Meier *et al.*, 2006). Daher wurden die Zellen bis zur direkten Messung in CoroNa Green Puffer kultiviert. Hierdurch sollten mögliche Leckströme des Fluoreszenzindikators aufgrund eines Konzentrationsgefälles vermieden werden. Desweiteren wurden maximal zwei Plättchen pro Versuchsbedingung und maximal 6 Plättchen pro Experiment in einem Zeitfenster von maximal 30 min vermessen. Direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde CoroNa Green Puffer gegen Puffer mit unterschiedlichen Konzentrationen von Natrium und Phosphat ausgetauscht und das Fluoreszenzsignal bei 516 nm sofort fotografisch erfasst. Die Fluoreszenzintensitäten wurden mittels der iTem Software berechnet. Als Indikator für die Natriumaufnahme wurde die Anzahl fluoreszierender PC12-Zellen gewählt. Zur

Unterscheidung zwischen fluoreszierenden und nicht fluoreszierenden Zellen wurde eine Intensitätsschwelle in der Kontrollbedingung (natrium- und phosphatfreies Medium) willkürlich festgelegt und die Zellzahl oberhalb der Schwelle bestimmt. Die Intensitätsschwelle wurde für alle Versuchsbedingungen beibehalten.

In einem ersten Ansatz wurden VGlut2-transfizierte PC12-Zellen in ihrer Natriumaufnahme mit pcDNA3-transfizierten Zellen verglichen. Es zeigte sich für VGlut2-transfizierte PC12-Zellen im Vergleich zu pcDNA3-transfizierten PC12-Zellen eine deutlich erhöhte Natriumaufnahme unter den getesteten Versuchsbedingungen (Abb. 44, A). Um zu klären, ob es sich hierbei um eine phosphatabhängige Natriumaufnahme handelte, wurden VGlut2-transfizierte PC12-Zellen mit 10  $\mu$ M CoroNa Green beladen (3.10.7) und die Fluoreszenzintensität nach Zugabe von Medien mit verschiedenen Natrium- bzw. Phosphatkonzentrationen beobachtet.

Während eine Aufnahme von Natrium in Natrium-Phosphat-Puffer möglich war, führte eine Depletion von Phosphat zu einem Verlust der Natriumaufnahme (Abb. 44, B). Die Aufnahme von Natrium schien unter den gegebenen Versuchsbedingungen somit VGlut2-abhängig.

Die vorangegangenen Ergebnisse zeigten, dass sich VGlut2-transfizierte PC12-Zellen als Modellsystem zur Untersuchung des Natrium-Phosphat-abhängigen Transportmechanismus von VGlut2 eignen.



**Abb. 44 Phosphatabhängige Natriumaufnahme von VGlut2-transfizierten PC12-Zellen**

A) VGlut2-transfizierte und pcDNA3-transfizierte PC12-Zellen wurden in natriumfreiem Medium mit 10  $\mu$ M des natriumsensitiven Fluoreszenzindikators CoroNa Green für 40 min bei 37°C beladen und nach einmaligem Waschen in natriumfreiem Medium unter dem Fluoreszenzmikroskop platziert. Die Zellen wurden mit natriumhaltigem Kultivierungsmedium (RPMI) versetzt und die Fluoreszenzemission bei 510 nm nach 5 s fotografiert. B) VGlut2-transfizierte PC12-Zellen wurden in natrium- und phosphatfreiem Medium mit 10  $\mu$ M CoroNa Green für 40 min bei 37°C beladen und nach einmaligem Waschen in natrium- und phosphatfreiem Medium unter dem Fluoreszenzmikroskop platziert. Die Zellen wurden mit Medium mit (w/Na) und ohne (o/Na) Natrium bzw. mit (w/Ph) und ohne (o/Ph) Phosphat versetzt und die Fluoreszenzemission bei 510 nm an minimal zwei, maximal drei verschiedenen Stellen direkt fotografiert. Von jeder Versuchsbedingung wurden jeweils zwei unabhängige Messungen an zwei unabhängig voneinander passagierten Zellkulturen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der iTem Software. Dargestellt ist die Natriumaufnahme als % angefärbte Zellen oberhalb einer willkürlich festgelegten Intensitätsschwelle.

Im Vergleich zu pcDNA3-transfizierten PC12-Zellen zeigten VGlut2-transfizierte PC12-Zellen eine signifikant höhere Natriumaufnahme. Der Verlust von Phosphat im natriumhaltigen Medium führte zu einer verminderten Natriumaufnahme in VGlut2-transfizierten PC12-Zellen. VGlut2 vermittelt in transfizierten PC12-Zellen eine phosphatabhängige Aufnahme von Natrium.



## 5 Diskussion

### 5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, das individuelle (tageszeitabhängige) Sortierungsverhalten von VGluts zwischen Vesikel- und Plasmamembran zu untersuchen und dabei das Augenmerk auf die Bedeutung von Interaktionspartnern zu richten.

Als potentiell regulatorisch-wirkendes Protein für die Sortierung von VGlut1 wurde Endophilin in Betracht gezogen, ein Protein, das in die Endozytose involviert ist und dessen SH3-Domäne spezifisch an VGlut1, nicht aber an VGlut2 bindet. Um die Interaktion zwischen Endophilin und VGlut1 zu untersuchen, wurden GST-Bindungsstudien und Immunpräzipitationen durchgeführt. Die Immunpräzipitation erwies sich jedoch als ungeeignet.

Mit Hilfe von GST-Bindungsstudien konnte zum einen bestätigt werden, dass VGlut1, Dynamin und Synaptojanin an die SH3-Domäne von Endophilin binden. Zum anderen zeigte sich, dass eine massive Stimulation von Synaptosomen mit Saccharose oder Brefeldin A und Dynasore zu einer Abnahme der Bindefähigkeit von VGlut1 und Dynamin an GST-SH3-Endophilin<sup>4</sup> führte. Es zeigten sich tagesabhängige Schwankungen in der Bindung von VGlut1 an GST-SH3-Endophilin, nicht jedoch für Dynamin.

Zur Identifizierung weiterer Regulations-/Bindungspartner von VGlut1 und 2 wurden GST-Fusionproteine aus dem C-Terminus generiert und für GST-Bindungsstudien mit Zelllysaten aus Mäusegehirn verwendet. Eine massenspektrometrische Analyse identifizierte die alpha und beta Untereinheit von Clathrin-Adapterproteinkomplex 2 (AP2) als potentielle Interaktionspartner des C-Terminus von VGlut2. Die Bindung von alpha- und beta-Adaptin wurde im SDS-PAGE/Western-Immunoblot-Verfahren bestätigt, ebenso die Bindung von Endophilin an den C-Terminus an VGlut1.

Um selektiv die Translokation von VGlut2 untersuchen zu können, wurde eine VGlut2-transfizierte PC12-Zelllinie charakterisiert. Expressionsanalysen zeigten die hauptsächliche Lokalisation von VGlut2 an der Plasmamembran (Fluoreszenzanalyse). Neurotransmitteraufnahmeexperimente und Versuche mit Corona Green, einem grünfluoreszierenden Natriumindikator, offenbarten, dass VGlut2-transfizierte PC12-Zellen nur in Gegenwart von Phosphat Natrium aufnehmen. Eine vesikuläre

---

<sup>4</sup> GST-Fusionsprotein, bestehend aus GST und der SH3-Domäne von Endophilin

Glutamataufnahme war nicht möglich. VGlut2 funktioniert daher in VGlut2-transfizierten PC12-Zellen eher als ein Natrium-Phosphat-Transporter und weniger als vesikulärer Glutamattransporter.

Um das Sortierungsverhalten von VGluts innerhalb der Membran näher aufzuklären, wurde als mögliche Plattform für Proteininteraktionen die Lokalisation von VGlut1 und 2 in DRMs untersucht. Mit steigenden Konzentrationen von M $\beta$ CD nahm die Detergenzlöslichkeit in Lubrol in folgender Reihenfolge ab: Syp, SNAP25, VGlut1, VGlut2. VGlut1 und 2 wurden in Lubrol-DRMs der synaptosomalen Plasmamembran und der synaptischen Vesikelmembran nachgewiesen, wobei eine Anreicherung von VGlut1 und 2 in DRMs der synaptosomalen Plasmamembran zu beobachten war.

## **5.2 Bedeutung von Interaktionspartnern für die individuelle Sortierung von VGlut1 und 2**

### **5.2.1 Möglichkeiten und Grenzen der experimentellen Methodik**

Um die Rolle von Interaktionspartnern in der individuellen Sortierung von VGlut1 und 2 zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Immunpräzipitationen und GST-Bindungsstudien eingesetzt. Die Immunpräzipitation eignet sich im Allgemeinen gut für *in vitro* Interaktionsstudien. Wegen Kreuzreaktivität der verwendeten Antikörper war diese Methode allerdings in der vorliegenden Arbeit nicht durchführbar. Spezies-übergreifende Kreuzreaktivitäten gegenüber Antigenen sind bereits mehrfach beschrieben worden (Boenisch, 2001; Cowin & Garrod, 1983).

Daher wurden hier GST-Bindungsstudien angewendet. In der Literatur werden zahlreiche Beispiele für erfolgreiche Bindungsstudien mit GST-Fusionsproteinen angeführt. Erstmals wurden GST-Bindungsstudien 1988 beschrieben (Smith & Johnson, 1988).

Die Strategie der GST-Bindungsstudien wurde in dieser Arbeit angewendet, um u.a. die kürzlich beschriebene Problematik der Spezies-übergreifenden Kreuzreaktivität von Antikörpern zu vermeiden. Der Vorteil im Vergleich zur Immunpräzipitation liegt darin, dass der Ligand (anstelle des Zielproteins) kovalent an GST gebunden ist und nicht über Ak selektiv isoliert werden muss. Im späteren Eluat sind nach verschiedenen Aufreinigungsschritten keine Antikörper vorhanden, sondern nur das GST-Fusionsprotein und die daran assoziierten Proteine.

Eine Schwierigkeit besteht in der Aufreinigung von Fusionsproteinen aus Bakterien, ausgelöst durch die Bildung von Einschlusskörperchen, sogenannten Inclusion Bodies

(IBs). Bei IBs handelt es sich um große, fehlerhaft gefaltete Proteinaggregate, die vor allem dann auftreten, wenn die Expression Plasmid-kodierter Gene in hohen Raten stattfindet (Hober & Uhlén, 2000; Marston, 1986). Ein weiterer Nachteil liegt in einer möglicherweise fehlerhaften posttranslationalen Modifikation des Liganden, der für die Assoziation des Bindungspartners nötig ist (Baneyx, 1999). Für die Verwendung von Fusionsproteinen, bestehend aus Proteindomänen und nicht dem Gesamtprotein, spricht die gezielte Eingrenzung von Bindungspartnern. Andererseits ist die Gefahr von *in vitro* Artefakten bei der Verwendung von Liganden, bestehend aus Proteindomänen und nicht Gesamtprotein, höher. Es kann nicht garantiert werden, dass die Zugangsmöglichkeit an die Proteindomäne im GST-Fusionsprotein so gegeben ist wie für das Protein *in vivo* (Anggono et al., 2006).

Mit Hilfe von GST-Fusionsproteinen wurde einerseits die VGlut1-Endophilin-Interaktion mit Fokus auf der tageszeitabhängigen Sortierung von VGlut1 betrachtet, andererseits sollten Bindungspartner des C-Terminus von VGlut1 und 2 identifiziert werden. Da es sich bei den VGluts um Transmembranproteine handelt (Liguz-Leczna & Skangiel-Kramka, 2007) und die Expression von Membranproteinen als GST-Fusionsproteinen aufgrund der geringen Löslichkeit und veränderten Konformation nicht sinnvoll ist, wurde GST-Fusionsprotein, bestehend aus den C-Termini von VGlut1 und 2, und nicht aus Gesamtprotein, hergestellt. Außerdem weisen VGlut1 und 2 lediglich im N- und C-Terminus größere Sequenzunterschiede auf (Liguz-Leczna & Skangiel-Kramka, 2007; Takamori *et al.*, 2002) und für den C-Terminus von VGlut1 wurde bereits Endophilin als Interaktionspartner beschrieben (Voglmaier *et al.*, 2006). Der Fokus wurde auf den C-Terminus gelegt, da sich dort neben einer prolinreichen Sequenz in VGlut1 ebenfalls Dileucin-ähnliche Motive sowohl für VGlut1 als auch VGlut2 befinden. Diese Motive werden unter anderem als potentielle Bindestellen für Regulationsproteine der Endozytose (z.B. AP2) vermutet (Bonifacino & Traub, 2003; Jung & Haucke, 2007; Kim & Ryan, 2009; Santos *et al.*, 2009; Voglmaier *et al.*, 2006), was eine GST-Bindungsstudie zur Identifizierung von Interaktionspartnern interessant machte.

### 5.2.2 Identifikation von VGlut1 und 2- Interaktionspartnern

In der GST-Bindungsstudie mit dem C-Terminus von VGlut1 und 2 wurden zwei Proteine als potentielle Interaktionspartner von VGlut2 detektiert. Bei der C1-TFH-Synthase handelt es sich um ein ~100 kDa schweres multifunktionelles Enzym, welches in den C1-Metabolismus involviert ist (Diao *et al.*, 2008; Prasanna & Appling, 2009).

Da sich dieses Protein in Mitochondrien befindet (Ghaemmaghami *et al.*, 2003; Huh *et al.*, 2003; Shannon & Rabinowitz, 1986), wurde von einer falsch-positiven Interaktion ausgegangen. Möglicherweise wurde diese durch Nukleinsäuren (z.B. RNA) ausgelöst, die aufgrund ihrer negativen Ladung an die Oberfläche von Proteinen anhaften können (Nguyen & Goodrich, 2006). Neben der C1-TFH-Synthase wurden die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit von AP2 in der massenspektrometrischen Analyse identifiziert, welche in der Western-Immunoblot-Analyse bestätigt werden konnte. Für VGlut1 konnte eine direkte Interaktion von AP2 weder in der GST-Bindungsstudie noch im Western-Immunoblotting gezeigt werden. Die Interaktion von Endophilin und dem C-Terminus von VGlut1 wurde in der MS-Analyse nicht identifiziert, konnte allerdings in der Western-Immunoblot-Analyse bestätigt werden. Dies ist nicht verwunderlich. Nicht alle Protein-Protein Interaktionen sind stabil genug, um in einer Bindungsstudie isoliert zu werden. Störungen können u.a. durch Detergentien, Salze und vorliegende Zellkomplexe entstehen. Außerdem kann es vorkommen, dass Proteinkomplexe isoliert werden, von denen nur einige wenige Proteine direkt mit dem GST-Fusionsprotein interagieren (Moskalenko *et al.*, 2002; Moskalenko *et al.*, 2003; Sugihara *et al.*, 2002). Die Spezifität der gefundenen Interaktion ließe sich in einem *in vivo*-System wie z.B. dem Hefe-Zwei-Hybrid-Verfahren verifizieren.

Bereits in einigen Fällen wurde gezeigt, dass vesikuläre Transporter direkt an Adapterproteine binden: VMAT2 bindet z.B. an Adapterprotein PACS-1. Das Protein PACS-1 begünstigt die Bildung Clathrin-umhüllter Vesikel und damit den Transport von VMAT2 aus unreifen LDCVs zurück ins Golgi (Waites *et al.*, 2001). VACHT wird als potentieller Bindungspartner von AP1 und AP2 vorgeschlagen (Barbosa *et al.*, 2002; Kim & Hersh, 2004). Für VGAT wurden bisher noch keine Sortierungssignale identifiziert. Dennoch wird vermutet, dass AP3 (Nakatsu *et al.*, 2004) und das Protein unc-46 (Schuske *et al.*, 2007) in die VGAT-Sortierung involviert sind.

VGlut1 und 2-haltige Synapsen unterscheiden sich in ihrer Freisetzungswahrscheinlichkeit (Freneau *et al.*, 2001; Liu, 2003; Takamori *et al.*, 2001; Varoqui *et al.*, 2002; Wojcik *et al.*, 2004). VGlut1-exprimierende Synapsen zeigen im Allgemeinen eine eher geringere Freisetzungswahrscheinlichkeit (Hanse & Gustafsson, 2001; Xu-Friedman *et al.*, 2001), während die Expression von VGlut2-Expression vielmehr mit einer hohen Freisetzungswahrscheinlichkeit verbunden wird.

Es ist denkbar, dass VGlut2-haltige Synapsen durch eine direkte Sortierung über AP2 eine schnelle Rezyklierung in SV garantieren und darüber eine höhere Freisetzungswahrscheinlichkeit ermöglicht wird. Für VGlut1 ist vorstellbar, dass die verschiedenen Sortierungsvarianten eine erhöhte Modulationsfähigkeit in der Freisetzungswahrscheinlichkeit erlauben. Welchen Einfluss die individuelle Sortierung von VGlut1 und 2 auf die Freisetzungswahrscheinlichkeit glutamaterger Synapsen besitzt, kann nicht beantwortet werden. Es bleibt zu klären, inwiefern die unterschiedlichen Sortierungen die jeweilige Synapse modulatorisch beeinflussen.

Nach dem Prinzip von Dale wurde in den 30er Jahren davon ausgegangen, dass ein Neuron nur jeweils einen klassischen Neurotransmittertyp beherbergt (Dale, 1952; Dale, 1934). Allerdings ist dieses Prinzip in den letzten Jahren vielfach überarbeitet worden. Während die Kolokalisation von VGlut1 und 2 auf vesikulärer Ebene bereits im juvenilen Gehirn der Maus gezeigt wurde (Herzog *et al.*, 2006), weisen neueste Studien sogar auf eine Kolokalisation im adulten Gehirn der Ratte hin (Zander *et al.*, 2010). Möglich ist, dass die individuelle Sortierung von VGlut1 und 2 in einer Synapse eine spezifische Lokalisation eines der beiden Transporter, z.B. an die Plasmamembran, erlaubt, während einige SV als eine Art Lagerstätte für den anderen Transporter dienen könnten. Transporterproteine könnten gezielt und bedarfsabhängig an die Plasmamembran sortiert werden, was nachhaltig die postsynaptische Antwort moduliert. Möglicherweise wird die Effizienz der NT-Freisetzung über den Transport unterschiedlicher Mengen von NT-Transportermolekülen an die Plasmamembran reguliert. Für Plasmamembran-Transmittertransporter wurden bereits ähnliche Effekte beschrieben. Der Plasmamembran-GABA-Transporter GAT1 wird nach Kalzium-induzierter Exozytose rasch internalisiert und auf einer Subpopulation von SV, die weder Syp noch VGAT tragen, gespeichert (Deken *et al.*, 2003). Die Autoren gehen davon aus, dass in GABAergen Neuronen möglicherweise ein Bruchteil von SV nicht an der NT-Ausschüttung teilnimmt und diese SV eher in der Neuverteilung von Membranproteinen, die an der NT-Aufnahme beteiligt sind, eine Rolle spielen. Außerdem ist denkbar, dass eine sortierungsabhängige Funktionalität existiert. Zander und andere konnten z.B. zeigen, dass die Lokalisation von VGlut2 auf VGAT-tragenden Vesikeln eine erhöhte GABA-Aufnahme zur Folge hat (Zander *et al.*, 2010). Die VGlut2-Aktivität auf SV unterstützt damit die GABA-Aufnahme.

### **5.3 Bedeutung der Endophilin-VGlut1-Interaktion für das Sortierungsverhalten von VGlut1**

In früheren Studien konnte eine zirkadiane Rhythmik in der Sortierung von VGlut1 (und weniger VGlut2) zwischen Vesikel- und Plasmamembran nachgewiesen werden, welche nicht auf Ebene der Transkription stattfindet (Darna *et al.*, 2009; Yelamanchili *et al.*, 2006). Ein spezifischer Interaktionspartner von VGlut1 ist Endophilin. Die C-terminal gelegenen prolinreichen Domänen (PRD) von Dynamin und VGlut1 interagieren mit der SH3-Domäne von Endophilin, wenn auch an unterschiedlichen Sequenzabschnitten (Ringstad *et al.*, 1997; Voglmaier *et al.*, 2006). Beide Interaktionen sind mit Prozessen der SV-Endozytose verbunden (Gad *et al.*, 2000; Slepnev *et al.*, 1998; Voglmaier *et al.*, 2006). So geht man z.B. davon aus, dass Endophilin und andere synaptische Proteine in unterschiedliche Formen der SV-Endozytose involviert sind, z.B. in schnellere und langsamere Endozytierungsverläufe (Jockusch *et al.*, 2005; Verstreken *et al.*, 2003). Für Endophilin konnte gezeigt werden, dass es VGlut1 in die schnelle, AP2-vermittelte Endozytose rekrutiert (Voglmaier *et al.*, 2006). Um zu prüfen, ob der zirkadianen Oszillation der vesikulären VGlut1-Mengen (Yelamanchili *et al.*, 2006) eine ebenfalls oszillierende Interaktion von VGlut1 mit Endophilin zugrunde liegt, wurden GST-Bindungsstudien mit GST-SH3-Endophilin-Fusionsprotein durchgeführt. Es wurde bereits beobachtet, dass VGlut1 stärker an GST-SH3-Endophilin-Fusionsprotein als an GST-Endophilin-Fusionsprotein bindet (Voglmaier *et al.*, 2006). Möglicherweise wird die Zugänglichkeit an die SH3-Bindestelle durch andere Proteine oder Proteinbestandteile reguliert, ähnlich wie bei Endophilin 2 (Chen *et al.*, 2003).

Für die GST-Bindungsstudien wurde Zellysate von Mausgehirnfraktionen verwendet. In diesem Zellysate steht durchgängig quantitativ die gleiche Menge an Protein zur Verfügung. Schwankungen in dem Grad der Bindung eines Interaktionspartners an das GST-Fusionsprotein lassen sich erklären, wenn der Interaktionspartner in einem aktiven (bindefähigen) und inaktiven (nicht-bindefähigen) Zustand vorliegt. Diese Zustandsänderungen können durch eine Modifikation (z.B. Phosphorylierung) ausgelöst werden, die im Anschluss zu einer Konformationsänderung führt. Ebenso ist der umgekehrte Fall möglich, indem eine Konformationsänderung zu einer Modifikation des Proteins führt. Die Folge ist ein Verlust der Bindefähigkeit an das GST-Fusionsprotein.

In mehreren *in vitro* Experimenten wurde die phosphorylierungsabhängige Bindung von Dynamin an Endophilin bestätigt, wobei eine Phosphorylierung an Ser-774 und Ser-778 als regulatorisches Element für die Bindung an Endophilin propagiert wird (Beart & O'Shea, 2007; Larsen *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 1993). Allerdings ist dieses Modell umstritten. Eine neuere Studie geht eher von *in vitro* Artefakten aus und sieht eine Phosphorylierung nicht als regulatorisches Element in der Bindung an Endophilin (Anggono *et al.*, 2006). VGlut1 beherbergt ebenfalls Serin-, Threonin- und Tyrosin-Motive im C-Terminus. Eine Phosphorylierung konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden.

### **5.3.1 Bindungsverhalten von VGlut1 an GST-SH3-Endophilin nach Stimulation**

Stimulationsabhängige Experimente wurden durchgeführt, um einen Einblick in die Dynamiken der VGlut1-Endophilin-Interaktion zu erhalten. Nach einer Stimulation werden gezielte Endozytose-Prozesse ausgelöst, welche in Folge Modifikationen von Proteinen und damit veränderte Bindungen an Interaktionspartner auslösen können. Exozytische Prozesse wurden in dieser Arbeit durch die Behandlung der Synaptosomen mit 0,5 M Saccharose für 5 min induziert, da Endophilin besonders wichtig für die endozytische Antwort auf langanhaltende Stimulation zu sein scheint (Dickman *et al.*, 2005; Verstreken *et al.*, 2002).

Endozytische Abläufe wurden mit BFA und Dynasore blockiert. Dynasore ist ein nicht-kompetitiver, spezifischer Inhibitor der GTPase-Aktivität von Dynamin *in vitro*, ohne jedoch die Fähigkeit zur Oligomerisierung zu beeinträchtigen (Kirchhausen *et al.*, 2008; Thompson & McNiven, 2006). Dynasore interagiert nicht mit der SH3-Domäne von Endophilin (Macia *et al.*, 2006). Indem Dynasore die Bildung Clathrin-umhüllter Vesikel verhindert, wird die Endozytose vollständig blockiert ohne Einfluss auf die Exozytose zu nehmen (Macia *et al.*, 2006). BFA inhibiert indirekt die AP3-vermittelte Endozytose über endosomale Zwischenprodukte, indem es an ARF1 bindet, ein Regulatorprotein von AP3 (Ooi *et al.*, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass BFA die Rekrutierung von VGlut1-GST ohne funktionale PRD-Sequenz während langanhaltender Stimulation von der langsameren AP3-vermittelten Endozytose in die schnellere AP2-vermittelte Endozytose erleichtert, was normalerweise über die Bindung an Endophilin vermittelt wird (Voglmaier *et al.*, 2006).

Es zeigte sich eine verminderte Bindung von Dynamin und VGlut1 an Endophilin nach massiver Stimulation (der Exozytose) sowie Blockade der Endozytose mit BFA und Dynasore. Wurde das Verhältnis aus gebundenem VGlut1 und gebundenem Dynamin gebildet (VGlut1/Dyn), zeigten sich keine Unterschiede. Die Bindung von VGlut1 und Dynamin an Endophilin wird gleichermaßen vermindert nach massiver Stimulation und unter Blockade der Endozytose.

Zunächst scheint eine verminderte Bindung von Dynamin und VGlut1 an Endophilin unter massiver Stimulation verwunderlich. Eine Studie aus dem Jahr 2002 zeigte jedoch, dass die Zeitkonstante der Endozytose mit der Stärke der Stimulation ansteigt, so dass eine Erhöhung der Exozytose-Rate eine Abnahme der Endozytose-Rate induziert (Sun *et al.*, 2002). Die Akkumulation von SV an der Plasmamembran verlangsamt endozytotische Prozesse im Allgemeinen, was eine verminderte Bindung von VGlut1 und Dynamin an Endophilin nach sich zieht.

Im Widerspruch zu den hier gewonnenen Daten in Bezug auf VGlut1 steht eine Studie mit pHluorin VGlut1, einer pH-sensitiven-VGlut1-Variante (Voglmaier *et al.*, 2006). Diese Studie zeigte eine erhöhte Rezyklierung zurück in das Vesikel im Rahmen von hoch-frequenter, langanhaltender (5 min) Stimulation von Wildtyp-VGlut1 im Vergleich zu VGlut1, in dem die Endophilin-Bindedomäne mutiert war. Die Autoren erklären diesen Effekt mit einer effizienteren VGlut1-Rekrutierung von der Plasmamembran durch Endophilin. Eine verstärkte Bindung von VGlut1 an GST-SH3-Endophilin konnte jedoch nicht gezeigt werden. Möglicherweise lässt sich diese Diskrepanz mit der Verwendung unterschiedlicher Systeme erklären. Während hier mit endogenem Protein gearbeitet wurde, verwendeten Voglmaier und andere transfizierte Hippocampus-Neurone, in denen pHluorin VGlut1 überexprimiert wurde.

Unter Blockade der Endozytose wird wie erwartet weniger Dynamin an Endophilin gebunden. Unklar ist, wie sich diese Befunde auf der funktionellen Ebene für VGlut1 einordnen lassen. Da BFA die AP3-abhängige Endozytose hemmt, hätte man eine verstärkte Bindung von VGlut1 unter diesen Umständen an Endophilin und damit Rekrutierung in die AP2-vermittelte Endozytose erwarten können, wie dies von Voglmaier und anderen postuliert wird (Voglmaier *et al.*, 2006). In Verbindung mit Dynasore scheint dies nicht der Fall zu sein. Die Inhibierung von Dynamin und damit der AP2-vermittelten Endozytose durch Dynasore führt möglicherweise zu einer Verschiebung des Gleichgewichts von aktivem (Endophilin-bindendem) VGlut1 hin zu



inaktivem VGlut1. Eine spezifische Hemmung der AP3-vermittelten Endozytose mit BFA sollte die oben genannten Befunde näher beleuchten. Nichtsdestotrotz konnten Veränderungen in der Bindung von VGlut1 und/oder Dynamin an Endophilin mit Hilfe von GST-Bindungsstudien detektiert werden.

#### **5.4 Tageszeitabhängig verändertes Bindungsverhalten von VGlut1 an GST-SH3-Endophilin in Wildtyp- und Per2<sup>BRMD1</sup>-Mäusen**

Wir haben angenommen, dass sich mögliche zirkadiane Veränderungen in der Bindung von VGlut1 an Endophilin in GST-Bindungsstudien widerspiegeln lassen. Bereits in den vorherigen GST-Bindungsstudien ließ sich eine stimulationsabhängig verminderte Bindung von VGlut1 und Dynamin an Endophilin nachweisen.

Es wurden GST-Bindungsstudien mit dem Zelllysate von Wildtypmäusen und Per2<sup>BRMD1</sup>-Mäusen, die in einem LD- oder DD-Zyklus gehalten wurden, durchgeführt. Zum einen wurden Synaptosomen präpariert, zum anderen wurde Gesamtgehirn verwendet.

Im postnukleären Überstand von LD-konditionierten Wildtyp-Mäusen zeigte sich ein oszillierendes Bindungsmuster von VGlut1 an Endophilin in Abhängigkeit der Tageszeit. Im Gegensatz dazu blieb die Bindung von Dynamin an Endophilin während des gesamten Zeitraumes weitgehend unverändert. Verhältnismäßig mehr VGlut1 als Dynamin wurde zum Beginn der Lichtphase (ZT0) gebunden. Am wenigsten VGlut1 wurde am Ende der Lichtphase (ZT12) von Endophilin gebunden.

Es muss berücksichtigt werden, dass durch die Bildung des Verhältnisses von gebundenem VGlut1/Dynamin eine Summierung der Einzeleffekte erfolgt. Andererseits kann damit die oszillierende Bindung von VGlut1 an Endophilin verdeutlicht werden. Erst durch den Bezug VGlut1/Dynamin zeigten sich in DD-konditionierten WT-Mäusen ebenfalls Schwankungen in der Bindung von VGlut1 an Endophilin. In diesen Mäusen war das Oszillationsmuster allerdings deutlich verschoben. In der oszillierenden Sortierung von VGlut1 zwischen Plasma- und Vesikelmembran bestehen ebenso Unterschiede im Oszillationsmuster zwischen LD- und DD-konditionierten WT-Mäusen (Yelamanchili *et al.*, 2006). Sowohl in LD- als auch in DD-konditionierten Per2<sup>BRMD1</sup>-Mäusen konnten die für WT-Tiere beschriebenen Oszillationen nicht beobachtet werden.

Die oszillierende Bindung von VGlut1 an Endophilin wird möglicherweise durch Signale des SCN ausgelöst. Neurone des SCN enthalten Hormone und Neuropeptide,

die in einer zirkadianen Rhythmik synthetisiert und freigesetzt werden, wie z.B. TGF $\alpha$  (transformierender Wachstumsfaktor  $\alpha$ ), CLC (Kardiotrophin-ähnliches Zytokin), Vasopressin und Prokineticin 2 (Cheng *et al.*, 2002; Laposky *et al.*, 2008). Die Expression von Prokineticin 2 ist lichtabhängig und verändert sich nach Modifikationen des LD-Zyklus (Cheng *et al.*, 2005). Veränderungen in der Expression von Prokineticin 2 oder seines Rezeptors könnten die Veränderungen im Oszillationsmuster in DD-konditionierten Mäusen vermitteln.

In synaptosomalen Membranen aus Wildtyp-Mäusen waren die oben beschriebenen Effekte nicht zu sehen. Die Beobachtung, dass ein tageszeitabhängig-verändertes Bindungsverhalten von VGlut1 an GST-SH3-Endophilin nur in Lysaten aus Gesamtgehirn, nicht jedoch in angereicherten Synaptosomen zu sehen ist, scheint zunächst widersprüchlich. Im Gegensatz zu angereicherten synaptosomalen Membranen befinden sich in Gesamtgehirnpräparationen zusätzlich somatisches Zytosol, Plasmamembran und Organellen. Denkbar ist, dass tagesabhängige Veränderungen in der VGlut1-Endophilin-Interaktion in den gefrorenen synaptosomalen Fraktionen durch das methodische Vorgehen unterbunden wurden. Während Gesamtgehirn direkt nach der Entnahme schockgefroren wird, ist der Zeitaufwand für die Aufarbeitung von P2 bedeutend höher. Instabile Modifikationen könnten unter Umständen aufgrund des höheren Zeitaufwandes verloren gehen und damit nicht mehr detektierbar sein.

Unter Umständen erlaubt die tageszeitabhängig-veränderte Bindung von VGlut1 an Endophilin eine Sortierung in die schnellere, mutmaßlich AP2-vermittelte Endozytose. Diese Sortierung könnte in Abhängigkeit der physiologischen Aktivitäts- bzw. Ruhephase stattfinden. Mäuse sind vorzugsweise nachtaktiv. Zu Beginn der Lichtphase, der einsetzenden Ruhephase, bindet am meisten VGlut1 an Endophilin und wird damit in die anscheinend AP2-vermittelte Endozytose sortiert. Im Laufe der physiologischen Ruhephase nimmt die Bindung von VGlut1 an Endophilin ab. Möglicherweise wird in diesem Zeitraum VGlut1 vermehrt AP3-vermittelt endozytiert. In Abwesenheit der VGlut1-Endophilin-Interaktion wurde gezeigt, dass ein Teil von VGlut1 über den langsameren AP3-Weg endozytiert wird (Voglmaier *et al.*, 2006).

Die Sortierung über verschiedene Endozytose-Wege erlaubt möglicherweise die spezifische Generierung verschiedener VGlut1-Vesikelpools. Die AP3-vermittelte Endozytose über endosomale Zwischenprodukte wird nur nach massiver Stimulation aktiviert und entspricht vermutlich der *Bulk*-Endozytose (Voglmaier *et al.*, 2006;

Voglmaier & Edwards, 2007). In der gleichen Studie konnte gezeigt werden, dass genetische und pharmakologische Blockade des AP3-Wegs die Größe des *Recycling Pools* erhöhen (Voglmaier *et al.*, 2006).

Desweiteren wurde an der neuromuskulären Endplatte nachgewiesen, dass der *RRP* besonders innerhalb der schnellen (AP2-vermittelten) Rezyklierung aufgefüllt wird, während der *Reserve Pool* im Zuge der *Bulk*-Endozytose ausgeglichen wird (Cheung *et al.*; Richards *et al.*, 2003; Rizzoli & Betz, 2004). Diese Unterschiede im Mechanismus zwischen schneller, AP2-vermittelter SV-Rezyklierung und langsamerer *Bulk*-Endozytose (eher AP3-vermittelt) deuten auf eine unabhängige Regulation im Rahmen synaptischer Plastizität hin (Ashton & Ushkaryov, 2005; Evans & Cousin, 2007; Richards *et al.*, 2004).

Die Sortierung von VGlut1 in unterschiedliche Vesikelpools in Abhängigkeit der Tageszeit könnte somit die Möglichkeit bieten, tageszeitabhängig die Größe der verschiedenen Vesikelpools zu regulieren. Dies könnte die physiologischen Eigenschaften der Synapse beeinflussen, möglicherweise auf Ebene der synaptischen Plastizität. Es ist denkbar, dass im Gesamtgehirn verschiedene Neuronengruppen existieren, die für sich verschiedene Aufgaben in Abhängigkeit der Tageszeit erfüllen. Bereits im SCN befinden sich phänotypisch unterscheidbare Subpopulationen von Neuronen, die spezifische Bereiche der Peripherie innervieren (Kalsbeek *et al.*, 2006). Über den SCN werden im Hippocampus neuronale Eigenschaften wie Erregbarkeit und die Bildung von neuronalen Verbindungen tageszeitabhängig moduliert. Zum Beispiel findet Hippocampus-vermitteltes Lernen in Mäusen und anderen Lebewesen teilweise in Abhängigkeit zur zirkadianen Phase statt (Biebach *et al.*, 1991; Carr & Wilkie, 1997; Chaudhury & Colwell, 2002; Monk *et al.*, 1984; Monk *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 1989; Reeb, 1996; Valentinuzzi *et al.*, 2004; Wakamatsu *et al.*, 2001). Auch GnRH-Neurone werden zirkadian reguliert, indem sie z.B. tageszeitabhängig Hormone freisetzen (Hickok & Tischkau; Legan & Karsch, 1975; Mahoney *et al.*, 2004). Desweiteren zeigt die Genexpression und Aktionspotentialfrequenz einer Subpopulation von Neuronen im Bulbus olfactorius eine zirkadiane Rhythmik (Granados-Fuentes *et al.*, 2004).

Bei jedem Wechsel (Licht/Dunkel, Dunkel/Licht) könnten diese unterschiedlichen Neuronengruppen je nach Aufgabe unterschiedliche VGlut1-Vesikelpools bilden. Möglicherweise sind zu bestimmten Zeiten bestimmte Neurone aktiver als andere. Neurone, die verantwortlich sind für die Aktivitätsphase (ZT12), könnten vermehrt Endophilin-bindefähiges VGlut1 bilden.

Die verschiedenen Sortierungssignale und -mechanismen steuern die Regulierung der Endozytose und beeinflussen die Komposition synaptischer Vesikel. Im Gegenzug werden physiologische Eigenschaften der Synapse determiniert, was sich auf die Informationsweitergabe und die Synaptische Plastizität auswirkt (Bonanomi et al., 2006; Valtorta et al., 2001; Voglmaier & Edwards, 2007).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass unter physiologischen Konditionen, wie z.B. in der Licht/Dunkelphase, VGlut1 zu bestimmten Tageszeiten weniger über Endophilin – und damit AP2-vermittelt – sortiert wird, und evt. vermehrt über AP3.

## **5.5 PC12-Zellen als Modell für Translokations- und Funktionsstudien von VGlut2**

Zelllinien bieten im Gegensatz zu Untersuchungen im Gewebe eine erleichterte Verfügbarkeit und den Vorteil der gezielteren Manipulation der Versuchsbedingungen. Ein „reduziertes“ System, wie es Zelllinien darstellen, bietet außerdem die Möglichkeit, einzelne Prozesse fokussiert zu betrachten. In unserem Fall ermöglichte die Exprimierung von VGlut2, nicht jedoch von VGlut1 und 3, eine selektive Betrachtung der Translokation einer der 3 VGlut-Isoformen.

PC12-Zellen sind neuroendokrine Zellen. Auch wenn ihre Funktionen und evt. Vorläuferzellen unterschiedlich sind, nutzen neuroendokrine Zellen und Neurone teilweise die gleichen Proteine für exozytotische Prozesse (Scalettar, 2006). Allerdings gibt es neben den Gemeinsamkeiten auch Unterschiede. So erfolgt die Ausschüttung von Transmittern in Neuronen über SV (20 – 50 nm), wohingegen neuroendokrinen Zellen sekretorische Granula mit einem Durchmesser von etwa 100 nm besitzen (Morgan & Burgoyne, 1997). Granula werden im Gegensatz zu SV immer durch Abschnürung vom trans-Goli-Netzwerk neu gebildet (Burgoyne & Morgan, 2003). Eine Besonderheit ist, dass PC12-Zellen von den vesikulären NT-Transportern lediglich VMAT1 exprimieren (Liu *et al.*, 1994; Peter *et al.*, 1995).

Trotz der Vorteile, die eine isolierte Betrachtung von Vorgängen in einer einzelnen Zelllinie bietet, ist zu beachten, dass die Komplexität eines physiologischen Verbands nicht wiedergegeben wird. Problematisch ist weiterhin, dass sie oft eine unphysiologische Proteinexpression zeigen.

So zeigten z.B. die Ergebnisse der Western-Immunoblot-Analyse wie erwartet eine starke Expression von VGlut2 in VGlut2-transfizierten Zellen, nicht jedoch Zellen, die lediglich mit dem Leervektor transfiziert sind (pcDNA3-transfiziert). Allerdings wiesen die Signale der Immunfluoreszenz auf eine VGlut2-PC12-Mischpopulation hin, bestehend aus VGlut2-exprimierenden und Nicht-VGlut2-exprimierenden PC12-Zellen im Verhältnis von 1:3. Weitere Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen identifizierten schließlich einen Großteil des exprimierten VGlut2 an der Plasmamembran und nicht, wie erwartet, an vesikulären Strukturen. Zwar konnte auch hier VGlut2 in der Immunfluoreszenz gezeigt werden, jedoch in wesentlich geringerem Maß als an der Plasmamembran.

Da VMAT1 endogen in PC12-Zellen exprimiert wird, diente die bereits für die PC12-Zelllinie nachgewiesene vesikuläre Monoaminaufnahme (Ahnert-Hilger *et al.*, 1998) in dieser Arbeit zur Überprüfung der Funktionalität der NT-Aufnahme. Reserpin hemmte in fast allen Versuchsbedingungen vollständig die ATP-abhängige Serotoninaufnahme. Eine Glutamataufnahme war lediglich in intakten Zellen möglich. Eine vesikuläre Glutamataufnahme von VGlut2-transfizierten PC12-Zellen war hingegen nicht eindeutig nachweisbar. In intakten PC12-Zellen hatte es zunächst den Anschein, dass eine Hemmung der Glutamataufnahme mit Nigericin und Valinomycin in den VGlut2-transfizierten PC12-Zellen einen stärkeren Effekt hatte als in pcDNA3-transfizierten PC12-Zellen. Wie der Boxplot jedoch verdeutlicht, liegen die Mediane der Glutamataufnahme und der gehemmten Glutamataufnahme für beide Zelllinien im gleichen Bereich. Auffällig ist die breitere Streuung der Daten in pcDNA3-transfizierten Zellen. Permeabilisierte PC12-Zellen zeigten keine Glutamataufnahme. In anderen Studien mit Vesikel-reichen Membranen von VGlut2-transfizierten PC12-Zellen ließ sich eine Glutamataufnahme nachweisen – allerdings unter anderen experimentellen Bedingungen (Bai *et al.*, 2001; Bellocchio *et al.*, 2000; Fremeau *et al.*, 2001).

Ogleich eine Glutamat-Aufnahme in VGlut2-transfizierten PC12-Zellen nicht möglich war, zeigte sich eine phosphatabhängige Natrium-Aufnahme in intakten VGlut2-transfizierten PC12-Zellen. Mit Hilfe des Natrium-Indikators CoroNa Green konnte eine Natriumaufnahme in VGlut2-transfizierten PC12-Zellen nachgewiesen werden. In Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration im Medium wurde Natrium von VGlut2-transfizierten PC12-Zellen aufgenommen. In unserem Versuchsaufbau konnte in

pcDNA3-transfizierten PC12-Zellen nur eine minimale Natriumaufnahme verzeichnet werden. Die passive Natriumaufnahme von PC12-Zellen ist vergleichsweise langsam (Rudy *et al.*, 1987; Siman & Klein, 1982), so dass die geringe Zeitspanne zwischen Natriumzugabe und Messung eine Detektion von Natrium in pcDNA3-transfizierten PC12-Zellen verhinderte. Die Zellen wurden sofort nach Natriumzugabe vermessen, da ein beträchtlicher Anteil des Farbstoffes CoroNa Green aus der Zelle diffundiert (Meier *et al.*, 2006).

Die Natriumaufnahme von ~ 20% der Zellen in Kultur entsprach den Daten in der Immunfluoreszenz, die eine VGlut2-Expression lediglich in 1/3 der Gesamtpopulation zeigten.

Experimente mit CoroNa Green allein liefern allerdings noch keine ausreichenden Ergebnisse. Für weitere Untersuchungen muss eine direkte Phosphataufnahme, möglicherweise durch Versuche mit radioaktivmarkiertem Phosphat, gezeigt werden. Aufnahmeversuche mit radioaktiv-markiertem Phosphat könnten direkte Messungen zu den Stöchiometrien bezüglich Natrium und Phosphat ermöglichen.

Die vorgestellten Ergebnisse der VGlut2-transfizierten PC12-Zelllinie dokumentieren die vornehmliche Sortierung von VGlut2 an die Plasmamembran und die dortige Eigenschaft als Natrium-Phosphat-Transporter in diesen Zellen. Allerdings zeigten VGlut1 bzw. VGlut2 in allen VGlut2- bzw. VGlut1-transfizierten PC12-Zellen bisher Eigenschaften eines vesikulären Glutamattransporters (Bai *et al.*, 2001; Bellocchio *et al.*, 2000; Freneau *et al.*, 2001). Die Funktion als Natrium-Phosphat-Transporter an der Plasmamembran wurde bisher lediglich in Oozyten und in zellfreien Systemen beschrieben (Aihara *et al.*, 2000; Edwards, 2007; Ni *et al.*, 1994). Bisher ist unklar, in welcher Weise VGluts an der Plasmamembran physiologisch relevant sind. Außerdem ist nicht verstanden, für welche Form des Transports welche Ionenzusammensetzung vorliegen muss. Dennoch konnte in Studien mit Mäusen und Ratten gezeigt werden, dass sich große Mengen der VGluts an der Plasmamembran befinden (Darna *et al.*, 2009). Denkbar ist eine sortierungsabhängige Aktivierung. Bereits für andere Transmittertransporter konnte dies beobachtet werden. Der Aktivitätszustand und die Sortierung des Serotonintransporters SERT kann bei einer Lokalisation in die Plasmamembran über verschiedene assoziierte Proteine reguliert werden. Während der Rezyklierung über endosomale Kompartimente jedoch befindet SERT sich ausschließlich in einem inaktiven Zustand (Steiner *et al.*, 2008). Auch der

plasmamembranständige Cholintransporter CHT wird abhängig von seiner Lokalisation reguliert. Der Hauptanteil von CHT befindet sich auf SV und bis heute ist unklar, ob CHTs auf SV funktionell sind oder aktiv an einem Transport von ACh und /oder Protonen aus dem Vesikel gehindert werden (Iwamoto *et al.*, 2006). Es ist denkbar, dass plasmamembran-ständige Transmittertransporter mit SV-Transmittertransportern funktionell verwandt sind. Die Funktion vesikulärer Glutamattransporter könnte in Abhängigkeit ihrer Lokalisation aktiv reguliert werden.

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften stellen die in dieser Arbeit untersuchten VGlut2-transfizierten PC12-Zellen ein geeignetes Modell für Untersuchungen zum Natrium-Phosphattransport durch VGlut2 dar.

## **5.6 Verteilung vesikulärer Glutamattransporter in Detergentien-resistenten Membranen**

Die Lipidstruktur der Membran hat einen entscheidenden Einfluss auf Membranprozesse und Proteininteraktionen. So wird eine Separation oder Konzentration spezifischer Membranproteine und Lipide in Membranmikrodomänen diskutiert. Zu den spezialisierten cholesterinreichen Membranmikrodomänen gehören *Lipid Rafts*. Es gibt Hinweise, dass *Lipid Rafts* auch in der SV-Membran zu finden sind (Green *et al.*, 1999; Huttner & Schmidt, 2000). Da Cholesterin das wichtigste Membranlipid zur Aufrechterhaltung der Fluidität ist (Bretscher & Munro, 1993), kann durch den Entzug von Cholesterin aus der Membran die Organisation und Struktur der Membran und Membranmikrodomänen stark beeinflusst werden.

Um das Extraktionsverhalten von SV-Proteinen zu untersuchen, wurde der Cholesteringehalt SV-Membranen mittels M $\beta$ CD vermindert. M $\beta$ CD besitzt eine hohe Affinität gegenüber Cholesterin und eignet sich daher gut für die Modulation des membranären Cholesteringehalts (Arispe & Doh, 2002; Bodovitz & Klein, 1996; Frears *et al.*, 1999; Green *et al.*, 1999; Kojro *et al.*, 2001). Eine Behandlung mit M $\beta$ CD führte für alle untersuchten Proteine zu einer Verminderung der Extrahierbarkeit in Lubrol, wobei dieser Effekt am stärksten für VGlut1 und 2 zu beobachten war. Eine Abnahme der Extrahierbarkeit wurde für Synaptophysin, ein cholesterinbindendes Protein, bereits in Triton gezeigt (Mitter *et al.*, 2003). Damit verhält sich Synaptophysin entgegengesetzt zu vielen anderen cholesterinassoziierten Proteinen, wie Caveolin

(Smart *et al.*, 1994), Hämogglutinin (Keller & Simons, 1998) und GPI-verankerte Proteine (Ilangumaran & Hoessli, 1998), deren Extrahierbarkeit in Triton nach Cholesterinverminderung ansteigt. Durch den Entzug von Cholesterin könnte eine Auflösung der Lipidmikrodomänen der Vesikelmembran bewirkt werden. Die neue Anordnung hätte eine verstärkte Zusammenlagerung der Proteine zu Aggregaten zur Folge. Diese Aggregate werden stärker in der Membran verankert und können durch Lubrol nicht mehr aus der Membran solubilisiert werden. Möglich sind ebenfalls durch hohe Konzentrationen ausgelöste unspezifische Effekte. Insbesondere bei der Verwendung von hohen Konzentrationen wird dadurch die Membranintegrität empfindlich beeinflusst.

Die Sortierung in *Lipid Rafts* wurde in der vorliegenden Arbeit über die Isolierung von Detergentien-resistenten Membrandomänen (DRMs) untersucht. Eine Cholesterinverminderung wurde zur Solubilisierung cholesterinreicher Mikrodomänen verwendet, was in Folge zu einer Auflösung der Rafts führt (Ilangumaran & Hoessli, 1998; Keller & Simons, 1998). Das am häufigsten verwendete Detergenz zur Isolation von DRMs ist Triton (Chamberlain, 2004), allerdings sind auch andere Detergentien beschrieben worden (Chamberlain, 2004; Kim *et al.*, 2008; Pike, 2004). Da Rafts nur im Vergleich zu Nicht-Rafts gegenüber Detergentien unlöslich sind, ist eine Konzentrationsanalyse des verwendeten Detergenz unerlässlich, denn bei einer hohen Detergentien-zu-Lipid-Ratio werden auch Rafts effektiv solubilisiert (Chamberlain & Gould, 2002).

Obwohl eine Isolation von Triton-resistenten DRMs nicht möglich war, können dennoch Proteine, die in Triton unlöslich sind, mit anderen Nanomembrandomänen interagieren (Huttner & Schmidt, 2000; Roper *et al.*, 2000). In dieser Arbeit wurde neben Triton Lubrol verwendet. Lubrol-resistente Membranen wurden erstmals in Hundenierenzellen (MDCK-Zellen, Madin Darby Canine Kidney) identifiziert (Roper *et al.*, 2000).

Eine Isolation von Lubrol-Rafts in Synaptosomen und SV zeigte die Verteilung von VGluts und den meisten anderen SV-Proteinen wie Syb, SNAP25 in Rafts. Syp hingegen konnte in Lubrol-Rafts von Synaptosomen nicht identifiziert werden. Das gleiche gilt für SV-Rafts. Eine Lokalisation in Triton-Rafts wurde von Synaptotagmin und Synaptobrevin beobachtet, nicht hingegen von Synaptophysin (Li *et al.*, 2006). Die



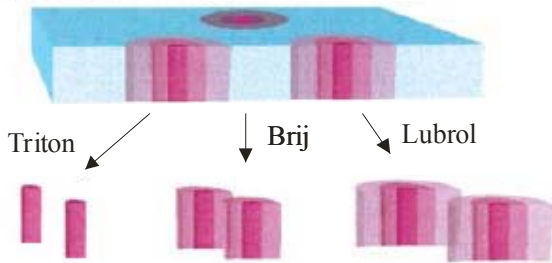
Anwesenheit von SNARE-Proteinen (Syb, Synaptotagmin, SNAP25) in cholesterinreiche Membrandomänen wurde bereits in einigen Studien vermutet (Lang *et al.*, 2001; Lang, 2007) und konnte in Lubrol-Rafts sowohl aus der Plasmamembran als auch aus synaptischen Vesikeln bestätigt werden. Während VGluts eindeutig in Lubrol-Rafts aus Synaptosomen lokalisiert sind, kann ihre Verteilung in SV-Rafts nicht eindeutig bestimmt werden. Durch das hohe Cholesterin-Protein-Verhältnis (0,6-0,8:1) (Takamori *et al.*, 2006) ist die M $\beta$ CD-Konzentration mit 10 mM möglicherweise zu gering, um das Cholesterin aus der SV-Membran vollständig zu desorbieren. Andererseits hat sich in der Literatur in Studien mit Triton die Verwendung von 10 mM M $\beta$ CD bewährt (Calzolari *et al.*, 2006; Jia *et al.*, 2006; Lv *et al.*, 2008). Außerdem sind unspezifische Effekte bedingt durch höhere Konzentrationen von M $\beta$ CD möglich (Cherukuri *et al.*, 2004) und wurden in Versuchen mit Zellen bereits beschrieben (Ohtani *et al.*, 1989; Peng *et al.*, 2007). Schließlich sollte sichergestellt werden, dass M $\beta$ CD per se keine pharmakologischen Effekte auf die Membranpräparationen besitzt, sondern nur durch den Entzug von Cholesterin agiert.

Zu bedenken bleibt, dass sich die hier isolierten Bereiche über ihre Unlöslichkeit in Lubrol definieren lassen, aber möglicherweise in stringenteren Detergentien wie Brij 96 oder Triton X-100 löslich sind. Es existieren verschiedene Modelle für die Verteilung von Proteinen in Subdomänen, über die sich erklären lässt, warum sich einige Proteine in Lubrol-DRMs befinden, jedoch vollständig mit Triton X-100 solubilisiert werden (Abb. 45). In einigen Modellen wird davon ausgegangen, dass sich die Protein- und Lipidkomposition in DRMs im Allgemeinen ähnelt (Ilangumaran & Hoessli, 1998) und die unterschiedlichen Detergentien verschiedene Domänen isolieren, deren Lipid- und Proteinkomposition sich stark voneinander unterscheidet. Ein anderes Modell betrachtet hingegen die verschiedenen Subdomänen als unabhängig voneinander vorkommende Einheiten in der Membran (Roper *et al.*, 2000).

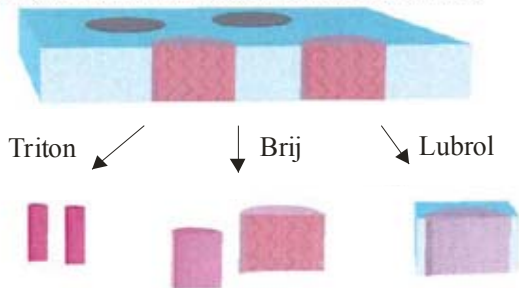
Es stellt sich die Frage, ob eine Extraktion mit Detergentien ein akkurates Bild der Komposition von Rafts in intakten Membranen liefert. Um ein differenzierteres Bild der Verteilung von Rafts in der Membran zu erhalten, sollte die Verteilung nach so geringer Einflussnahme wie möglich untersucht werden, z.B. mit konfokalen Mikroskopiestudien (Vidal & McIntosh, 2005).

Obwohl die Identifizierung von den untersuchten Proteinen in DRMs keinen Hinweis für die Lokalisation in *Lipid Rafts* darstellt, deutet die Lokalisation von Proteinen in DRMs auf eine Nachbarschaft innerhalb einer Zelle hin.

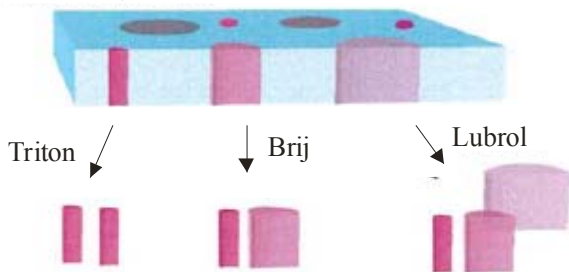
**I** Rafts aus konzentrisch-angeordneten Lipidringen



**II** Homogene Rafts, selektive Extraktion von Lipiden



**III** Heterogene Rafts



**Abb. 45 Aufbau von Lipid Rafts**

Modell I: Rafts, bestehend aus konzentrischen Lipidringen. Die stark geordnete Kernstruktur ist besonders reich an Cholesterin- und Glykosphingolipiden, während die äußeren Lipidschichten zunehmend weniger geordnet vorliegen und schließlich in die ungeordnete Struktur der Plasmamembran übergehen. Die verschiedenen Detergentien solubilisieren verschiedene Lipidschichten mit unterschiedlichem Gehalt an Proteinen und Lipiden. Modell II: Homogene Rafts. Homogene Rafts aus geordneten Domänen sind von einer relativ ungeordneten Plasmamembranschicht umgeben. Aufgrund ihrer Fähigkeit, Lipide und/oder Proteine selektiv zu isolieren, solubilisieren die einzelnen Detergentien DRMs, deren Protein- und Lipidkomposition variiert. Modell III: Heterogene Rafts. Es existieren Rafts, die sich in ihrer Lipid- und Proteinzusammensetzung voneinander unterscheiden und unterschiedlich sensitiv auf die verschiedenen Detergentien reagieren. Abgewandelt nach (Pike, 2004).

## 5.7 Offene Fragen und Ausblick

Die bisherigen Modelle bezüglich der Rezyklierung von SV-Proteinen schließen die direkte Einstülpung der Membran oder die Biogenese aus endosomalen Zwischenprodukten ein. Die meisten Modelle gehen davon aus, dass SV-Proteine gleichzeitig endozytiert werden. Biochemische und optische Ansätze der letzten 5 Jahre zeigen jedoch Unterschiede im Verhalten von individuellen SV-Proteinen. Diese Unterschiede reflektieren möglicherweise verschiedene Interaktionen mit dem endozytotischen Apparat. *Mocha* Mäuse, die kein funktionelles AP3 besitzen, weisen eine fehlerhafte Endozytierung einzelner Proteine auf, jedoch keinen allgemeinen Defekt in der SV-Biogenese (Kantheti *et al.*, 1998; Scheuber *et al.*, 2006). Die Vermutung liegt nahe, dass die Sortierung von VGluts einem individuellen Mechanismus sowohl auf Ebene der VGluts als auch in Bezug auf andere SV-Proteine unterliegt. Diese Arbeit unterstreicht diesen Ansatz; gleichzeitig aber bleiben Fragen:

1. Ist eine Modifizierung von VGlut1 (z.B. in Form einer Phosphorylierung) der Grund für eine verminderte Bindung an GST-SH3-Endophilin? Unklar bleibt, um welche Art der Modifikation es sich handeln könnte und inwiefern möglicherweise Artefakte bedingt durch die angewendete Methode eine Rolle spielen.
2. Wird die Bindung von VGlut1 an Endophilin tageszeitabhängig reguliert? Die Daten der GST-Bindungsstudien mit Lysaten aus Mausgesamtgehirn deuten darauf hin. Allerdings sollte die Fallzahl erhöht werden, um die Ergebnisse auf Ebene der schließenden Statistik zu sichern.
3. Die Interaktion von AP2 und VGlut2 konnte *in vitro* mit Hilfe der GST-Bindungsstudie gezeigt werden. Der Nachweis der Interaktion *in vivo*, z.B. mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Verfahrens, könnte die Interaktion verifizieren.
4. Der direkte Nachweis der Phosphataufnahme von VGlut2-transfizierten PC12-Zellen mit radioaktiv-markiertem Phosphat ist notwendig, um die Funktion des VGlut2 in transfizierten PC12-Zellen als Natrium-Phosphattransporter zu bestätigen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adler, E. M., Augustine, G. J., Duffy, S. N. & Charlton, M. P. (1991).** Alien intracellular calcium chelators attenuate neurotransmitter release at the squid giant synapse. *J Neurosci* **11**, 1496-1507.
- Ahmed, S. & Booth, I. R. (1983).** The use of valinomycin, nigericin and trichlorocarbanilide in control of the protonmotive force in *Escherichia coli* cells. *Biochem J* **212**, 105-112.
- Ahnert-Hilger, G., Nurnberg, B., Exner, T., Schafer, T. & Jahn, R. (1998).** The heterotrimeric G protein Go2 regulates catecholamine uptake by secretory vesicles. *EMBO J* **17**, 406-413.
- Ahnert-Hilger, G., Pahnert, I. & Höltje, M. (2000).** *Pore-Forming Toxins as Cell-Biological and Pharmacological Tools*: Handb Exp Pharm.
- Aihara, Y., Mashima, H., Onda, H. & other authors (2000).** Molecular cloning of a novel brain-type Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem* **74**, 2622-2625.
- Albrecht, U., Sun, Z. S., Eichele, G. & Lee, C. C. (1997).** A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell* **91**, 1055-1064.
- Albrecht, U., Zheng, B., Larkin, D., Sun, Z. S. & Lee, C. C. (2001).** *MPer1* and *mper2* are essential for normal resetting of the circadian clock. *J Biol Rhythms* **16**, 100-104.
- Arispe, N. & Doh, M. (2002).** Plasma membrane cholesterol controls the cytotoxicity of Alzheimer's disease A $\beta$ P (1-40) and (1-42) peptides. *FASEB J* **16**, 1526-1536.
- Bai, L., Xu, H., Collins, J. F. & Ghishan, F. K. (2001).** Molecular and functional analysis of a novel neuronal vesicular glutamate transporter. *J Biol Chem* **276**, 36764-36769.
- Baneyx, F. (1999).** Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **10**, 411-421.
- Bartoletti, T. M., Babai, N. & Thoreson, W. B. (2010).** Vesicle pool size at the salamander cone ribbon synapse. *J Neurophysiol* **103**, 419-423.
- Becher, A., White, J. H. & McIlhinney, R. A. (2001).** The gamma-aminobutyric acid receptor B, but not the metabotropic glutamate receptor type-1, associates with lipid rafts in the rat cerebellum. *J Neurochem* **79**, 787-795.
- Bellocchio, E. E., Reimer, R. J., Freneau, R. T., Jr. & Edwards, R. H. (2000).** Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science* **289**, 957-960.

- Bodovitz, S. & Klein, W. L. (1996).** Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* **271**, 4436-4440.
- Bonifacino, J. S. & Traub, L. M. (2003).** Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* **72**, 395-447.
- Bretscher, M. & Munro, S. (1993).** Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science* **261**, 1280-1281.
- Burger, P. M., Mehl, E., Cameron, P. L., Maycox, P. R., Baumert, M., Lottspeich, F., De Camilli, P. & Jahn, R. (1989).** Synaptic vesicles immunisolated from rat cerebral cortex contain high levels of glutamate. *Neuron* **3**, 715-720.
- Burgoyne, R. D. & Morgan, A. (2003).** Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev* **83**, 581-632.
- Calzolari, A., Raggi, C., Deaglio, S. & other authors (2006).** TfR2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway. *J Cell Sci* **119**, 4486-4498.
- Cameron, P. L., Sudhof, T. C., Jahn, R. & De Camilli, P. (1991).** Colocalization of synaptophysin with transferrin receptors: implications for synaptic vesicle biogenesis. *J Cell Biol* **115**, 151-164.
- Chamberlain, L. H. & Gould, G. W. (2002).** The vesicle- and target-SNARE proteins that mediate Glut4 vesicle fusion are localized in detergent-insoluble lipid rafts present on distinct intracellular membranes. *J Biol Chem* **277**, 49750-49754.
- Chamberlain, L. H. (2004).** Detergents as tools for the purification and classification of lipid rafts. *FEBS Lett* **559**, 1-5.
- Cheng, M. Y., Bullock, C. M., Li, C., Lee, A. G., Bermak, J. C., Belluzzi, J., Weaver, D. R., Leslie, F. M. & Zhou, Q. Y. (2002).** Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* **417**, 405-410.
- Cheng, M. Y., Bittman, E. L., Hattar, S. & Zhou, Q. Y. (2005).** Regulation of prokineticin 2 expression by light and the circadian clock. *BMC Neurosci* **6**, 17.
- Cherukuri, A., Tzeng, S. J., Gidwani, A., Sohn, H. W., Tolar, P., Snyder, M. D. & Pierce, S. K. (2004).** Isolation of lipid rafts from B lymphocytes. *Methods Mol Biol* **271**, 213-224.
- Dale, H. (1952).** Transmission of effects from nerve-endings. (*Lecture*) University Oxford Press.
- Dale, S. H. (1934).** Pharmacology and nerve endings. *Br Med J* **3859**, 1161-1163.
- Danglot, L. & Galli, T. (2007).** What is the function of neuronal AP-3? *Biol Cell* **99**, 349-361.

- Daniels, R. W., Collins, C. A., Chen, K., Gelfand, M. V., Featherstone, D. E. & DiAntonio, A. (2006).** A single vesicular glutamate transporter is sufficient to fill a synaptic vesicle. *Neuron* **49**, 11-16.
- Darna, M., Schmutz, I., Richter, K., Yelamanchili, S. V., Pendyala, G., Holtje, M., Albrecht, U. & Ahnert-Hilger, G. (2009).** Time of day-dependent sorting of the vesicular glutamate transporter to the plasma membrane. *J Biol Chem* **284**, 4300-4307.
- De Camilli, P., Haucke, V., Takei, K. & Mugnaini, E. (2001a).** The structure of synapses. *Synapses (Cowan WM, Südhof TC, Stevens CF, eds)*, 89-133.
- De Camilli, P., Slepnev, V., Shupliakov, O. & Brodin, L. (2001b).** Synaptic vesicle endocytosis. *Synapses* **1**, 217-274.
- Del Castillo, J. & Katz, B. (1956).** Biophysical aspects of neuro-muscular transmission. *Prog Biophys Biophys Chem* **6**, 121-170.
- Dell'Angelica, E. C., Mullins, C. & Bonifacino, J. S. (1999).** AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *J Biol Chem* **274**, 7278-7285.
- Di Paolo, G. & De Camilli, P. (2006).** Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651-657.
- Eckert, G. P., Igbavboa, U., Muller, W. E. & Wood, W. G. (2003).** Lipid rafts of purified mouse brain synaptosomes prepared with or without detergent reveal different lipid and protein domains. *Brain Res* **962**, 144-150.
- Edelmann, L., Hanson, P. I., Chapman, E. R. & Jahn, R. (1995).** Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *Embo J* **14**, 224-231.
- Edwards, R. H. (2007).** The neurotransmitter cycle and quantal size. *Neuron* **55**, 835-858.
- Frears, E. R., Stephens, D. J., Walters, C. E., Davies, H. & Austen, B. M. (1999).** The role of cholesterol in the biosynthesis of beta-amyloid. *Neuroreport* **10**, 1699-1705.
- Freneau, R. T., Jr., Troyer, M. D., Pahner, I. & other authors (2001).** The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron* **31**, 247-260.
- Gillette, M. (1991).** SCN electrophysiology in vitro: rhythmic activity and endogenous clock properties. *Suprachiasmatic Nucleus, the Mind's Clock*, 125-143.
- Green, J. M., Zhelesnyak, A., Chung, J., Lindberg, F. P., Sarfati, M., Frazier, W. A. & Brown, E. J. (1999).** Role of cholesterol in formation and function of a signaling complex involving alpha<sub>v</sub>beta<sub>3</sub>, integrin-associated protein (CD47), and heterotrimeric G proteins. *J Cell Biol* **146**, 673-682.
- Gundelfinger, E. D., Kessels, M. M. & Qualmann, B. (2003).** Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 127-139.

- Hanse, E. & Gustafsson, B. (2001).** Vesicle release probability and pre-primed pool at glutamatergic synapses in area CA1 of the rat neonatal hippocampus. *J Physiol* **531**, 481-493.
- Herzog, E., Takamori, S., Jahn, R., Brose, N. & Wojcik, S. M. (2006).** Synaptic and vesicular co-localization of the glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in the mouse hippocampus. *J Neurochem* **99**, 1011-1018.
- Hober, S. & Uhlén, M. (2000).** Enhanced recovery and folding of recombinant proteins using fusion protein strategies. In *Protein engineering in Industrial Biotechnology*, pp. 23-39. Edited by L. Alberghina. Amsterdam: Harwood Academic Publishers
- Huttner, W. B., Schiebler, W., Greengard, P. & De Camilli, P. (1983).** Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. *J Cell Biol* **96**, 1374-1388.
- Huttner, W. B. & Schmidt, A. (2000).** Lipids, lipid modification and lipid-protein interaction in membrane budding and fission--insights from the roles of endophilin A1 and synaptophysin in synaptic vesicle endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 543-551.
- Hyman, S. & Nestler, E. (1993).** *The molecular foundations of psychiatry*: Amer Psychiatric Pub Inc.
- Ilangumaran, S. & Hoessli, D. C. (1998).** Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem J* **335 ( Pt 2)**, 433-440.
- Iwamoto, H., Blakely, R. D. & De Felice, L. J. (2006).** Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, and pH dependence of the human choline transporter (hCHT) in *Xenopus* oocytes: the proton inactivation hypothesis of hCHT in synaptic vesicles. *J Neurosci* **26**, 9851-9859.
- Jahn, R. (1999).** Recycling of synaptic vesicle membrane within nerve terminals. *Brain Res Bull* **50**, 313-314.
- Jeng, C. J., McCarroll, S. A., Martin, T. F., Floor, E., Adams, J., Krantz, D., Butz, S., Edwards, R. & Schweitzer, E. S. (1998).** Thy-1 is a component common to multiple populations of synaptic vesicles. *J Cell Biol* **140**, 685-698.
- Jia, J. Y., Lamer, S., Schumann, M., Schmidt, M. R., Krause, E. & Haucke, V. (2006).** Quantitative proteomics analysis of detergent-resistant membranes from chemical synapses: evidence for cholesterol as spatial organizer of synaptic vesicle cycling. *Mol Cell Proteomics* **5**, 2060-2071.
- Johnson, R. F., Moore, R. Y. & Morin, L. P. (1988).** Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract. *Brain Res* **460**, 297-313.
- Jung, N. & Haucke, V. (2007).** Clathrin-mediated endocytosis at synapses. *Traffic* **8**, 1129-1136.

**Kalsbeek, A., Palm, I. F., La Fleur, S. E., Scheer, F. A., Perreau-Lenz, S., Ruiter, M., Kreier, F., Cailotto, C. & Buijs, R. M. (2006).** SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *J Biol Rhythms* **21**, 458-469.

**Kandel, E. R., Schwartz, J. H. & Jessell, T. M. (1995).** *Essentials of neural science and behavior*: McGraw-Hill/Appleton & Lange.

**Kantheti, P., Qiao, X., Diaz, M. E. & other authors (1998).** Mutation in AP-3 delta in the mocha mouse links endosomal transport to storage deficiency in platelets, melanosomes, and synaptic vesicles. *Neuron* **21**, 111-122.

**Keller, P. & Simons, K. (1998).** Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin. *J Cell Biol* **140**, 1357-1367.

**Kim, K. B., Lee, J. S. & Ko, Y. G. (2008).** The isolation of detergent-resistant lipid rafts for two-dimensional electrophoresis. *Methods Mol Biol* **424**, 413-422.

**Kim, S. H. & Ryan, T. A. (2009).** A distributed set of interactions controls mu2 functionality in the role of AP-2 as a sorting adaptor in synaptic vesicle endocytosis. *J Biol Chem* **284**, 32803-32812.

**Klein, D., Moore, R. & Reppert, S. (1991).** *Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock*: Oxford University Press, USA.

**Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., Marz, W. & Fahrenholz, F. (2001).** Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha - secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5815-5820.

**Lang, T., Bruns, D., Wenzel, D., Riedel, D., Holroyd, P., Thiele, C. & Jahn, R. (2001).** SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J* **20**, 2202-2213.

**Lang, T. (2007).** SNARE proteins and 'membrane rafts'. *J Physiol* **585**, 693-698.

**Laposky, A. D., Bass, J., Kohsaka, A. & Turek, F. W. (2008).** Sleep and circadian rhythms: key components in the regulation of energy metabolism. *FEBS Lett* **582**, 142-151.

**Li, H., Jihua, L., Qinghua, Z. & Senfang, S. (2006).** Lipid Rafts Identified on Synaptic Vesicles from Rat Brain. *Tsinghua Science and Technology* **11**, 452-458.

**Liguz-Leczmar, M. & Skangiel-Kramska, J. (2007).** Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): the three musketeers of glutamatergic system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **67**, 207-218.

**Liu, Y., Schweitzer, E. S., Nirenberg, M. J., Pickel, V. M., Evans, C. J. & Edwards, R. H. (1994).** Preferential localization of a vesicular monoamine transporter to dense core vesicles in PC12 cells. *J Cell Biol* **127**, 1419-1433.



- Lodisch, H., Berk, A., Zipursky, L. S., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. (2000).** *Molecular Cell Biology* 4edn. New York: Freeman, H. W. .
- Lv, J. H., He, L. & Sui, S. F. (2008).** Lipid rafts association of synaptotagmin I on synaptic vesicles. *Biochemistry (Mosc)* **73**, 283-288.
- Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C. & Kirchhausen, T. (2006).** Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell* **10**, 839-850.
- Marston, F. A. (1986).** The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem J* **240**, 1-12.
- Meier, S. D., Kovalchuk, Y. & Rose, C. R. (2006).** Properties of the new fluorescent Na<sup>+</sup> indicator CoroNa Green: comparison with SBFI and confocal Na<sup>+</sup> imaging. *J Neurosci Methods* **155**, 251-259.
- Meyer-Bernstein, E. L. & Morin, L. P. (1999).** Electrical stimulation of the median or dorsal raphe nuclei reduces light-induced FOS protein in the suprachiasmatic nucleus and causes circadian activity rhythm phase shifts. *Neuroscience* **92**, 267-279.
- Mitter, D., Reisinger, C., Hinz, B., Hollmann, S., Yelamanchili, S. V., Treiber-Held, S., Ohm, T. G., Herrmann, A. & Ahnert-Hilger, G. (2003).** The synaptophysin/synaptobrevin interaction critically depends on the cholesterol content. *J Neurochem* **84**, 35-42.
- Miyamoto, Y. & Sancar, A. (1998).** Vitamin B2-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6097-6102.
- Morgan, A. & Burgoyne, R. D. (1997).** Common mechanisms for regulated exocytosis in the chromaffin cell and the synapse. *Semin Cell Dev Biol* **8**, 141-149.
- Muhlberg, A. B., Warnock, D. E. & Schmid, S. L. (1997).** Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase. *Embo J* **16**, 6676-6683.
- Neher, E. & Zucker, R. S. (1993).** Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron* **10**, 21-30.
- Newell-Litwa, K., Seong, E., Burmeister, M. & Faundez, V. (2007).** Neuronal and non-neuronal functions of the AP-3 sorting machinery. *J Cell Sci* **120**, 531-541.
- Nguyen, T. N. & Goodrich, J. A. (2006).** Protein-protein interaction assays: eliminating false positive interactions. *Nat Methods* **3**, 135-139.
- Ni, B., Rosteck, P. R., Jr., Nadi, N. S. & Paul, S. M. (1994).** Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific Na<sup>(+)</sup>-dependent inorganic phosphate cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5607-5611.
- Ohtani, Y., Irie, T., Uekama, K., Fukunaga, K. & Pitha, J. (1989).** Differential-Effects of Alpha-Cyclodextrins, Beta-Cyclodextrins and Gamma-Cyclodextrins on Human-Erythrocytes. *European Journal of Biochemistry* **186**, 17-22.

- Owen, D. J. & Luzio, J. P. (2000).** Structural insights into clathrin-mediated endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 467-474.
- Peng, W., Martaresche, C., Escande-Beillard, N., Cedile, O., Reynier-Vigouroux, A. & Boucraut, J. (2007).** Influence of lipid rafts on CD1d presentation by dendritic cells. *Mol Membr Biol* **24**, 475-484.
- Peter, D., Liu, Y., Sternini, C., de Giorgio, R., Brecha, N. & Edwards, R. H. (1995).** Differential expression of two vesicular monoamine transporters. *J Neurosci* **15**, 6179-6188.
- Pike, L. J. (2004).** Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J* **378**, 281-292.
- Prasad, K. & Keen, J. H. (1991).** Interaction of assembly protein AP-2 and its isolated subunits with clathrin. *Biochemistry* **30**, 5590-5597.
- Rizzoli, S. O. & Betz, W. J. (2005).** Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci* **6**, 57-69.
- Robinson, M. S. (1993).** Assembly and targeting of adaptin chimeras in transfected cells. *J Cell Biol* **123**, 67-77.
- Roper, K., Corbeil, D. & Huttner, W. B. (2000).** Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane. *Nat Cell Biol* **2**, 582-592.
- Rosenmund, C. & Stevens, C. F. (1996).** Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron* **16**, 1197-1207.
- Roux, A., Uyhazi, K., Frost, A. & De Camilli, P. (2006).** GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature* **441**, 528-531.
- Royle, S. J. & Lagnado, L. (2003).** Endocytosis at the synaptic terminal. *J Physiol* **553**, 345-355.
- Rudy, B., Kirschenbaum, B., Rukenstein, A. & Greene, L. A. (1987).** Nerve growth factor increases the number of functional Na channels and induces TTX-resistant Na channels in PC12 pheochromocytoma cells. *J Neurosci* **7**, 1613-1625.
- Rusak, B. & Groos, G. (1982).** Suprachiasmatic stimulation phase shifts rodent circadian rhythms. *Science* **215**, 1407-1409.
- Saenger, W. (1980).** Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. *Angewandte Chemie International Edition in English* **19**, 344-362.
- Santos, M. S., Li, H. & Voglmaier, S. M. (2009).** Synaptic vesicle protein trafficking at the glutamate synapse. *Neuroscience* **158**, 189-203.
- Scalettar, B. A. (2006).** How neurosecretory vesicles release their cargo. *Neuroscientist* **12**, 164-176.

- Scheuber, A., Rudge, R., Danglot, L., Raposo, G., Binz, T., Poncer, J. C. & Galli, T. (2006).** Loss of AP-3 function affects spontaneous and evoked release at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16562-16567.
- Schmid, S. L., McNiven, M. A. & De Camilli, P. (1998).** Dynamin and its partners: a progress report. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 504-512.
- Schwartz, W. (1991).** SCN metabolic activity in vivo. *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock*, 144-156.
- Schweizer, F. E., Betz, H. & Augustine, G. J. (1995).** From vesicle docking to endocytosis: intermediate reactions of exocytosis. *Neuron* **14**, 689-696.
- Silver, R., Lehman, M. N., Gibson, M., Gladstone, W. R. & Bittman, E. L. (1990).** Dispersed cell suspensions of fetal SCN restore circadian rhythmicity in SCN-lesioned adult hamsters. *Brain Res* **525**, 45-58.
- Siman, R. G. & Klein, W. L. (1982).** Rapid recovery of nicotinic receptor-mediated sodium-22 influx following withdrawal from acute or chronic cholinergic stimulation. *Cell Mol Neurobiol* **2**, 255-261.
- Simons, K. & Ikonen, E. (1997).** Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572.
- Simons, K. & Toomre, D. (2000).** Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31-39.
- Simpson, F., Bright, N. A., West, M. A., Newman, L. S., Darnell, R. B. & Robinson, M. S. (1996).** A novel adaptor-related protein complex. *J Cell Biol* **133**, 749-760.
- Slepnev, V. I. & De Camilli, P. (2000).** Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat Rev Neurosci* **1**, 161-172.
- Smart, E. J., Ying, Y. S., Conrad, P. A. & Anderson, R. G. (1994).** Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *J Cell Biol* **127**, 1185-1197.
- Smith, C. J. & Pearse, B. M. (1999).** Clathrin: anatomy of a coat protein. *Trends Cell Biol* **9**, 335-338.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T. & other authors (1985).** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85.
- Steiner, J. A., Carneiro, A. M. & Blakely, R. D. (2008).** Going with the flow: trafficking-dependent and -independent regulation of serotonin transport. *Traffic* **9**, 1393-1402.
- Sun, J. Y., Wu, X. S. & Wu, L. G. (2002).** Single and multiple vesicle fusion induce different rates of endocytosis at a central synapse. *Nature* **417**, 555-559.

- Takamori, S., Rhee, J. S., Rosenmund, C. & Jahn, R. (2000).** Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* **407**, 189-194.
- Takamori, S., Malherbe, P., Broger, C. & Jahn, R. (2002).** Molecular cloning and functional characterization of human vesicular glutamate transporter 3. *EMBO Rep* **3**, 798-803.
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K. & other authors (2006).** Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **127**, 831-846.
- Takei, K., Slepnev, V. I., Haucke, V. & De Camilli, P. (1999).** Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol* **1**, 33-39.
- Thompson, H. M. & McNiven, M. A. (2006).** Discovery of a new 'dynasore'. *Nat Chem Biol* **2**, 355-356.
- Vidal, A. & McIntosh, T. J. (2005).** Transbilayer peptide sorting between raft and nonraft bilayers: comparisons of detergent extraction and confocal microscopy. *Biophys J* **89**, 1102-1108.
- Voglmaier, S. M., Kam, K., Yang, H., Fortin, D. L., Hua, Z., Nicoll, R. A. & Edwards, R. H. (2006).** Distinct endocytic pathways control the rate and extent of synaptic vesicle protein recycling. *Neuron* **51**, 71-84.
- Waites, C. L., Mehta, A., Tan, P. K., Thomas, G., Edwards, R. H. & Krantz, D. E. (2001).** An acidic motif retains vesicular monoamine transporter 2 on large dense core vesicles. *J Cell Biol* **152**, 1159-1168.
- Webster, R. A. (2001).** *Neurotransmitters, drugs, and brain function*: John Wiley & Sons.
- Wiedenmann, B., Franke, W. W., Kuhn, C., Moll, R. & Gould, V. E. (1986).** Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 3500-3504.
- Xu-Friedman, M. A., Harris, K. M. & Regehr, W. G. (2001).** Three-dimensional comparison of ultrastructural characteristics at depressing and facilitating synapses onto cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* **21**, 6666-6672.
- Zander, J. F., Munster-Wandowski, A., Brunk, I., Pahner, I., Gomez-Lira, G., Heinemann, U., Gutierrez, R., Laube, G. & Ahnert-Hilger, G. (2010).** Synaptic and vesicular coexistence of VGLUT and VGAT in selected excitatory and inhibitory synapses. *J Neurosci* **30**, 7634-7645.
- Zheng, B., Larkin, D. W., Albrecht, U., Sun, Z. S., Sage, M., Eichele, G., Lee, C. C. & Bradley, A. (1999).** The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature* **400**, 169-173.

**Zucker, R. S. (1996).** Exocytosis: a molecular and physiological perspective. *Neuron* **17**, 1049-1055.

## Publikationen

**Darna, M., Schmutz, I., Richter, K., Yelamanchili, S. V., Pendyala, G., Holtje, M., Albrecht, U. & Ahnert-Hilger, G. (2009).** Time of day-dependent sorting of the vesicular glutamate transporter to the plasma membrane. *J Biol Chem* **284**, 4300-4307.

## Anhang

### 6.1 VGlut1-cDNA-Sequenz

```

1  tggggatatt cagggagggg atactgaggt aagcaagcaa gtagaactga gcttctaggg
61  agcagcgcct gtagctaaag tggtagggca ggccttagca acatagaagg gtggagctcc
121 actgagctct gattggtaga tttgggcaga gggcggggca tcttgttgtc gattggctaa
181 ggagctaagt ctatgggtgc tgattggtag agggtagagt ctggggggca tctagtttga
241 tgtgtatttt gaccacaga aagcccagtt caactgggat ccagagactg tccgcctcat
301 acatggctcc ttttctggg gctacattgt cactcagatt cctggaggat ttatctgcca
361 aaaattcgca gccaacaggg tctttggctt tgccattgtg gctacctcca ccctaaacat
421 gttgatccct tcagcagccc gcgttacta tggctgtgtc atcttcgtga ggatccttca
481 gggattggtg gagggggtca catacctgct tgccatggc atctggagca aatgggcccc
541 tcccttagaa cggagtcggc tggcaacgac agccttttgc ggttcctatg ctggggcggt
601 ggttgccatg cccttggtg gggtccttgt gcagatttca ggatggagtt ctgtcttcta
661 tgtctatggc agcttcggga tcttttggtg cctgttctgg ttgcttgtct cctatgagtc
721 accggcactg caccacagca tctctgagga ggagcgcaaa tacattgagg atgccatcgg
781 ggagagcgcc aagctcatga accctgttac gaagttaac acaccctgga ggcgttctt
841 tacgtccatg cccgtctatg ccatcatcgt tgcgaacttt tgccgcagct ggaccttcta
901 cctgctcctc atctctcagc ccgcctactt tgaagaagtg ttcggctttg agatcagcaa
961 ggtggggctg gtgtcggcgc tgcctcacct tgtcatgacc atcatcgtac ccattggagg
1021 ccagatcgct gactttttgc gcagtcgtca cataatgtcc actaccaacg tgcgaaagct
1081 catgaactgc gggggtttcg ggatggaagc cacgctgctg ctgggtggtc gatactcgca
1141 ctccaagggc gtggccatct ccttctgtgt cctggctgtg ggcttcagtg gctttgccat
1201 ctctgggttt aacgtgaacc acttggacat cgcccctcgc tatgccagca tcttgatggg
1261 catttccaat ggcgtgggca cactgtctgg gatggtgtgc cccatcatcg tgggtgcaat
1321 gaccaagcac aagacgcggg aggagtggca gtacgtgttc ctcatagcct cctgggtgca
1381 ctacggcggg gtcacttctc atgggtctt tgcttcggga gagaagcagc cgtgggcaga
1441 gccggaggag atgagcagag agaagtgtgg ctttgttggc cacgaccagc tggctggcag
1501 tgacgaaagt gaaatggagg acgaggtgga gccccaggg gcgccccccg cgccgcctcc
1561 gtcctacggg gccacacaca gcacagtga gcctccgagg cccccgccc ctgtccggga
1621 ctacttgacca cgggcctccc actgtggggc agtttcagg acttccactc catacacctc
1681 tagcctgagc ggcagtgtcg aggaaccca ctctcccct gcctcaggct taagatgcaa
1741 gtcctccctt gttcccagtg ctgtccgacc agcctcttt cctctcaac tgcctcctgc
1801 ggggggtgaa gctgcacact agcagtttca aggataccca gactcccctg aaagtcttc
1861 tccgcttgtt tctgcctgtg tgggtcaaaa tctcccctt gagggttta tttggagggg
1921 cagttcaacc tcttctctc ttgtggtttt gaggtttac ccttcccc aagaccccag
1981 ggattctcag gctaccccga gattatcag gtggtcccct actcagaaga cttcatggtc
2041 gtcctctatt agtttcaagg ctgcctaac caattctaca ttttccaag ctggtttaac
2101 ctaaccacca atgccgccgt tcccaggact gattctcacc agcgtttctg agggaaaatg
2161 gcggtttcaa gtccccccac ccccctttc ttccctgct cctcaccag cacactttgc
2221 cgggccttga ccttagctta gtacaatcat tgtccaggga aatggccaaa atggctctgc
2281 tcaccccgtg ctcttttct gactcagttt tcaggtctca gtagtggctg cccaaagcta
2341 ttaattcagc ggctcagggc cacctcttcc tccccgtgt ggtttcagga tccccctgc
2401 ccccccccc ccaaactctt gcactttatt ctctgggtg gttccaggcc gccctcgggt
2461 tctcagtggc catttgttgt gtgtccctca ggggctaaat gattccaaat ctgggtgct
2521 tcccctcata gacacccctc tctcaacgta gaaatctggg tgggggtgag gtgtgtgaga
2581 gaagttacag aatcccagga aaggagcgg ggctgggagg agagggtgt tcctggggca
2641 gggctgtgtc ttggtgtctg tctctgtgac gtaaatcctg cctgcccc cccactccc
2701 aataaacgct ctggtgtacg gaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa
2761 aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa

```

**Abb. 46 VGlut1-cDNA**

Der codierende Bereich der Sequenz ist in der NCBI-Datenbank unter der Nummer NM\_182993.1 eingetragen. Startcodon und Stopcodon sind fett markiert und unterstrichen.

## 6.2 VGlut2-cDNA-Sequenz

```

1  ggcacgaggc tcagtcttaa ttccactctg ccaactctgcc gcagagcaca attacgcgcy
61  cgcgatggga ggagaccatg ttaaggcagg aagctaacag cagccgctca cctgaggcct
121 aggaagctcc caagggttct gagagctatg agctctgatc agcaaagtca ccattttaga
181 cagtaggggt cttttgcttt tttccttaca caagggttcg atgacgtttc tgggtcaatct
241 gattaaaaga cagcggattt gattgcgata agacttcaaa accgggaatt tacgttgttt
301 ttcggtgagg tgacttccag aacagggact catcagcacc cgcccaaata ccacggcact
361 gcgcgcgccc tcggccaccg gatcctcccc ttccaatgag actttgtgac tgtgtgtacc
421 aattctccta ttaggaaacc cgtgggctgc atgcagctat tctgtgtgac tctctttctc
481 gccctccctc ccctctccaa ctcacagcct tgctggaaag ctcacctctg ctgagaagaa
541 aaagctctac cttaaccaac taagactatg cgcagaatcc gtctttcata gccacaacaa
601 tttaaatctg gtaaggctgg acaccagtct ttacaagaaat gggagtcggta aaacaaagga
661 ttttggcccc ggggaaagag gggataaaga attttgctgg aaaatccctc ggacagatct
721 acaggtgctt ggagaagaag caggacaacc gagagaccat cgagctgaca gaggcggta
781 agcccctgga ggtgcctgag aagaaggctc cgctatgcga ctgcacgtgc ttcggcctgc
841 cgcgccgcta catcatagcc atcatgagcg gcctcggctt ctgcataatc ttcggcatcc
901 gctgtaacct gggcgtggcc atcgtggaca tgggtcaacaa cagcactatc caccgcggag
961 gcaaagttat caaggagaaa gccaaattta actgggacc cagagaccgtg gggatgatcc
1021 acggatcgtt cttctggggc tataatcatca cccagattcc aggaggatat atcgcacgcg
1081 ggctggctgc taaccgggtc tttggggctg cgatactgct cacctctacc ctcaatagc
1141 tgatccccatc tgcagccaga gtgcattatg gatgtgtcat ctttgttagg atattgcaag
1201 gacttgtgga ggggtgtcacc taccagcctt gtcattggat atggagcaag tgggcccctc
1261 ccttgagag gagtaggttg gctacaacct cttttgtgg ttctatgct ggagcagtca
1321 ttgcaatgcc cttagctggt atccttgtgc agtacactgg atggctcgtca gtattttatg
1381 tgtatggaag ctttggcatg gtctggtaca tgttctggct tctgggtgtc tatgagagcc
1441 ctgcaaagca tctaccatt acagatgaag aacgtaggta catagaggag agcattggag
1501 agagcgcaaa tctgctaggt gcaatggaaa aatttaagac cccatggagg aagttttca
1561 catccatgcc cgtctacgcy ataattgttg ccaacttctg caggagctgg actttttatt
1621 tactgctcat cagtcagcca gttatatttg aggaggtttt tggatttgaa atcagcaagg
1681 ttggcatggt gtctgcagtc cctcaccttg tcatgacaat cattgtgcct atcggggggc
1741 aaattgcaga tttcctaagg agcaagcaaa ttctctcaac aactacagtg agaaagatca
1801 tgaattgtgg gggttttggc atggaagcca cgctgcttct ggttgttggc tactctcata
1861 ctagaggggt ggccatctcc ttcttggtgc ttgcagttag attcagtgga tttgctatct
1921 ctggtttcaa tgttaatcac ttggatattg ctccaagata tgccagtatc ttaatgggca
1981 tttcaaatgg cgttggcacy ctgtcgggga tggtttgccc tatcattggt ggtgcaatga
2041 caaagaataa gtcccgtgaa gaatggcagt atgtcttctc cattgctgca ctcgctcact
2101 atgggtggagt catattttat gcaactattg cctcaggaga gaaacaacct tgggcagacc
2161 ctgaggaaac aagcgaagaa aaatgtggct tcattcacga agatgaaact gatgaagaaa
2221 cgggggacat cactcagaat tacataaatt acgggtaccac caaatcttac ggtgctacct
2281 cacaggagaa tggaggctgg cctaacggct gggagaaaaa ggaagaattt gtgcaagaag
2341 gtgcgcaaga cgcgtacacc tataaggacc gagatgatta ttcataacga tgctagtgtc
2401 tggattcatt tgtagtgttt gtgaatcaat taattgtgat tgcacaaaaa taattttaaa
2461 aatgtggtgt gaacatgtaa acatatcaac caagcaagtc ttgctgttca aaaaaaaaaa
2521 aaaaaaaaaa

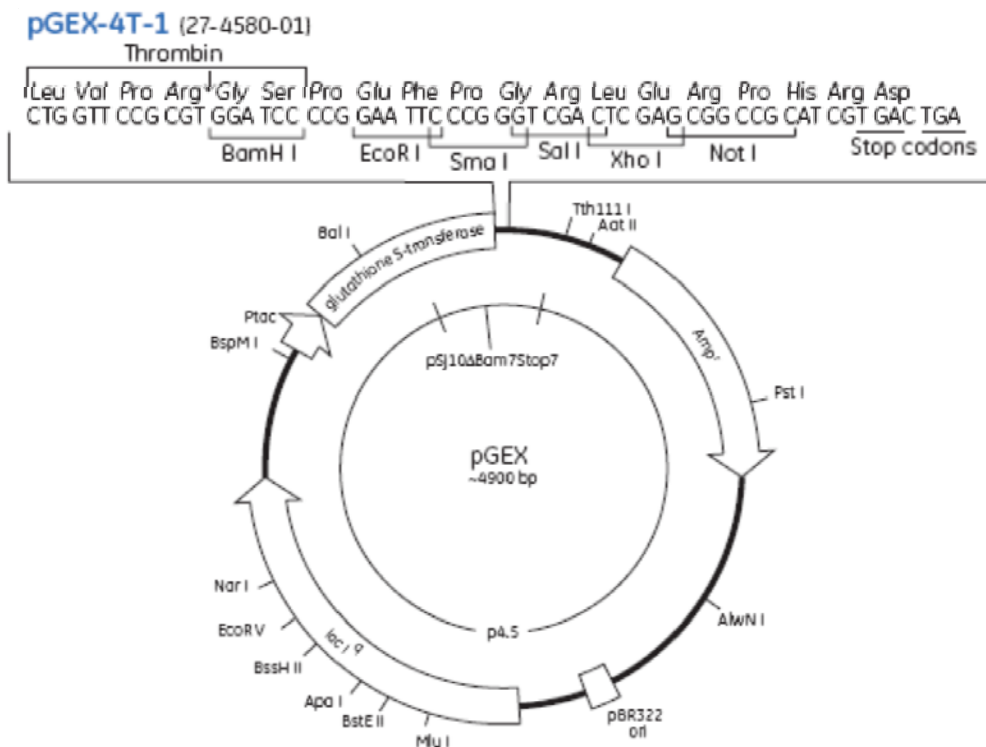
```

### Abb. 47 VGlut2-cDNA

Der codierende Bereich der Sequenz ist in der NCBI-Datenbank unter der Nummer AF324864.1 eingetragen. Startcodon und Stopcodon sind fett markiert und unterstrichen.



### 6.3 Vektorkarte pGEX4T1



**Abb. 48** Vektorkarte pGEX4T1

Die cDNA des C-Terminus von VGlut1 bzw. VGlut2 ist zwischen der *EcoRI* und *XhoI*-Restriktionschnittstelle des pGEX4T1-Vektors (GE Healthcare) eingefügt. Quelle: Amersham Bioscience, *GST Gene Fusion System Handbook*

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
ATPase	ATP-spaltende Enzyme
c	Konzentration
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumionen
cDNA	Komplementär-DNA
ca.	circa
cpm	counts per minute / Zählungen pro Minute
$\Delta\mu\text{H}^+$	elektrochemischer Gradient
Da	Dalton
DD-Zyklus	12h Dunkel/12h Dunkelzyklus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleodisditriphosphat
$\Delta\text{pH}$	pH-Gradient
dpm	decay per minute / Zerfälle pro Minute
DTT	Dithiothreitol
$\Delta\Psi$	elektrischer Gradient
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GFP	green fluorescent protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
dd	doppelt destilliert
5HT	5-Hydroxy-tryptamintrifluoracetat
IF	Immunfluoreszenz
K <sup>+</sup>	Kaliumion
LB	Luria Bertani
LD-Zyklus	12h Licht/12h Dunkelzyklus

---

LDCV	<i>large dense-core</i> Vesikel
LMW	Low molecular weight-marker / Molekulargewichtsmarker
Lsg.	Lösung
min	Minute
Na <sup>+</sup>	Natriumion
Nr.	Nummer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PC12	Phäochromozytomzelllinie der Ratte
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pi	Protease Inhibitor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute / Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLO	Streptolysin O
SSV	<i>Small synaptic</i> Vesikel
TAE	Tris-azetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VACHT	vesikulärer Azetylcholintransporter
VATPase	vakuoläre H <sup>+</sup> -ATPase
F	Verdünnungsfaktor
VGAT	vesikulärer GABA-Transporter
VMAT	vesikulärer Monoamintransporter
VGLUT1	vesikulärer Glutamatttransporter 1

VGLUT2	vesikulärer Glutamattransporter 2
VGLUT3	vesikulärer Glutamattransporter 3
V <sub>max</sub>	Maximalgeschwindigkeit enzymatischer Reaktionen
w/w	Gewicht pro Gewicht
w/v	Gewicht pro Volumen
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
x g	Erdbeschleunigung
x g <sub>max</sub>	maximale Erdbeschleunigung (Zentrifugation)
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.