

Aus dem Institut für Integrative Neuroanatomie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Bedeutung von $G\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine
und intrazellulärer Signalwege für die Regulation des
vesikulären Monoamintransporters 1

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stephan Maul

aus Halle (Saale)

Datum der Promotion: 14.02.2014

1	Einleitung	1
1.1	Grundlagen der Signalübertragung im zentralen Nervensystem	1
1.2	Sekretorische Vesikel und Transport und Speicherung von Neurotransmittern	3
1.2.1	Sekretorische Vesikel	3
1.2.2	Transport von Neurotransmittern in sekretorische Vesikel	4
1.3	Monoaminerge Neurotransmitter und vesikuläre Monoamintransporter	5
1.3.1	Monoaminerge Neurotransmitter	5
1.3.2	Vesikuläre Monoamintransporter	7
1.4	Heterotrimere G-Proteine und die sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP	10
1.4.1	Aufbau und Funktionszyklus heterotrimerer G-Proteine	10
1.4.2	Die $G\alpha$ -Untereinheiten $Go1\alpha$ und $Go2\alpha$	12
1.4.3	Die $G\alpha$ -Untereinheit $Gq\alpha$	14
1.4.4	cAMP und cGMP als sekundäre Botenstoffe	14
1.5	G-Protein abhängige Regulation vesikulärer Monoamintransporter	15
1.6	Fragestellungen	18
2	Materialien und Methoden	19
2.1	Chemikalien	19
2.2	Puffer und Lösungen	21
2.3	Medien	24
2.3.1	Zellkulturmedien	24
2.3.2	Mikrobielle Medien	24
2.4	Antikörper	25
2.4.1	Primäre Antikörper	25
2.4.2	Sekundäre Antikörper	25
2.5	Vektoren / DNA	26
2.5.1	Vektoren	26
2.5.2	cDNA von $G\alpha$ -Untereinheiten und ortsspezifische Mutagenese	26
2.6	Geräte und Apparaturen	27
2.7	Methoden	28
2.7.1	DNA-Arbeiten	28
2.7.1.1	Transformation kompetenter E. coli Bakterien	28
2.7.1.2	Isolation von Plasmid-DNA aus transformierten E. coli Bakterien	28
2.7.1.3	Konzentrierung der DNA durch Fällung	28
2.7.1.4	Bestimmung der DNA-Konzentration	29
2.7.1.5	Restriktion von DNA durch Endonukleasen	29
2.7.1.6	Agarose-Gelelektrophorese	29

2.7.2	Zellkulturarbeiten	30
2.7.2.1	PC12-Zellen	30
2.7.2.2	CHO-Zellen	30
2.7.3	Bestimmung der Neurotransmitteraufnahme	31
2.7.3.1	Permeabilisierung von Zellen	31
2.7.3.2	Monoaminaufnahme in permeabilisierte Zellen	31
2.7.3.2.1	Monoaminaufnahme unter Zugabe von GMP-P(NH)P	32
2.7.3.2.2	Monoaminaufnahme unter Zugabe von cAMP bzw. cGMP	33
2.7.3.2.3	Monoaminaufnahme unter ansteigenden Konzentrationen von Serotonin	33
2.7.4	Bestimmung der Neurotransmitteraufnahme nach Transfektion von Zellen	33
2.7.4.1	Transfektion von Zellen	33
2.7.4.2	Bestimmung der Neurotransmitteraufnahme in transfizierte Zellen	34
2.7.4.3	Immunfluoreszenz und Fluoreszenzmikroskopie	34
2.7.5	Homogenisierung von PC12-Zellen und subzelluläre Fraktionierung	35
2.7.6	Protein-Techniken	36
2.7.6.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	36
2.7.6.2	SDS-PAGE	36
2.7.6.3	Western-Blot und Immunfärbung	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Die PC12-Zelllinie als Modellsystem zur Untersuchung der Regulation des vesikulären Monoamintransporters 1	38
3.1.1	Charakterisierung der PC12-Zellen	39
3.1.2	Vesikuläre Monoaminaufnahme und Hemmung durch Aktivierung heterotrimerer G-Proteine	41
3.2	Einfluss sekundärer Botenstoffe auf die vesikuläre Monoaminaufnahme über VMAT1	42
3.2.1	Einfluss von cAMP auf die vesikuläre Serotoninaufnahme in PC12-Zellen	43
3.2.2	Einfluss von cGMP auf die vesikuläre Serotoninaufnahme in PC12-Zellen	44
3.2.3	Einfluss von cAMP und cGMP auf die vesikuläre Serotoninaufnahme im direkten Vergleich	45
3.2.4	Beeinflussung der Transportgeschwindigkeit und der Substrataffinität von VMAT1 in PC12-Zellen durch die sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP	47
3.3	Rolle verschiedener G α -Untereinheiten in der G-Protein vermittelten Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme über VMAT1	50
3.3.1	Effekt von konstitutiv aktivem Go1 α auf die Serotoninaufnahme über VMAT1 in CHO-Zellen	51
3.3.2	Effekt von konstitutiv aktivem Go2 α auf die Serotoninaufnahme über VMAT1 in CHO-Zellen	52
3.3.3	Effekt von konstitutiv aktivem Gq α auf die Serotoninaufnahme über VMAT1 in CHO-Zellen	54

4	Diskussion	56
4.1	Faktoren mit Einfluss auf den vesikulären Monoamintransport	57
4.2	Die Regulation der vesikulären Monoamintransporter durch α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine	60
4.3	Nachgeschaltete Signalwege in der G-Protein vermittelten Regulation vesikulärer Monoamintransporter	63
4.3.1	Einfluss der sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP auf die vesikuläre Monoaminaufnahme	63
4.3.2	Mögliche Interaktionspartner von Go2 α in der Regulation des vesikulären Monotransportes	72
4.4	Effekt der α -Untereinheiten Go1 α , Go2 α und Gq α auf den vesikulären Monoamintransport	73
4.5	Die Regulation der vesikulären Monoamintransporter als Einflussfaktor auf die Signalübertragung	76
4.6	Mögliche physiologische Bedeutung einer Regulation von VMAT	79
4.7	Ausblick	81
5	Zusammenfassung	83
6	Abstract	85
7	Abkürzungsverzeichnis	87
8	Literaturverzeichnis	90
9	Danksagung	98
10	Eidesstattliche Versicherung	99
11	Lebenslauf	100

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Signalübertragung im zentralen Nervensystem

In komplexen Organismen kommen zahlreiche spezialisierte Zellen und Gewebe vor, welche hochspezifisch an ihre jeweiligen Funktionen und Anforderungen angepasst sind. Um ein reibungsloses Funktionieren dieser mannigfaltigen Prozesse zu ermöglichen, ist eine enge Abstimmung der einzelnen Bauelemente des Organismus Voraussetzung. Dies kann einerseits durch direkte Zell-Zell-Interaktion, andererseits durch die Ausschüttung von Botenstoffen und deren Erkennung durch spezifische Rezeptoren der Zielzellen geschehen. Eine besondere Bedeutung bei der Kontrolle der Körperfunktionen kommt hierbei dem zentralen Nervensystem zu. Es ermöglicht einerseits die Wahrnehmung von unterschiedlichen Sinneseindrücken und Reizen und stellt die Grundlage für die verschiedensten Fähigkeiten dar, wie zum Beispiel für die Ausführung von Bewegungen, die Entstehung von Emotionen, Sprachverständnis und -produktion und für Lern- und Gedächtnisprozesse. Andererseits ist das Nervensystem an der Steuerung und Abstimmung einzelner Körperfunktionen beteiligt und fügt diese wichtigen Einzelaspekte zu einem funktionierenden System zusammen.

Die kleinste funktionelle und strukturelle Einheit des Gehirns ist das Neuron. Die Gesamtzahl der Neurone im menschlichen Gehirn wird auf mehr als 100 Milliarden beziffert. Ein Neuron besteht aus einem Zellkörper (Soma), aus Dendriten, welche Informationen von anderen Neuronen empfangen und einem Axon, über welches wiederum Informationen an andere Neurone weitergeleitet werden. Kommt es zur Erregung eines Neurons, wird diese entlang des Axons fortgeleitet. Die Übertragung der Erregung zwischen den einzelnen Neuronen erfolgt über Synapsen. Diese bestehen aus der Präsynapse, dem synaptischen Spalt und der Postsynapse. Im Bereich der Präsynapse werden infolge einer Depolarisation spannungsabhängige Kalziumkanäle geöffnet, woraufhin Kalzium aufgrund des hohen Konzentrationsgradienten in die Zelle einströmt. Dies bewirkt letztendlich die Freisetzung von Neurotransmittern aus der Präsynapse in den synaptischen Spalt. Transmitter werden in speziellen Speicherorganellen (Vesikel) angereichert. Diese fusionieren mit der Zellmembran, wodurch die Botenstoffe in den synaptischen Spalt gelangen. Dieser Vorgang nennt sich Exozytose. Als Quantum wird die Menge an Botenstoffen bezeichnet, welche aus

einem einzelnen Vesikel entleert wird (del Castillo & Katz, 1954; Katz, 1971). Die Botenstoffe diffundieren zur postsynaptischen Membran und binden dort an spezifische Rezeptoren. Es gibt einerseits Ionenkanal-gekoppelte postsynaptische Rezeptoren, welche bei ihrer Aktivierung die Leitfähigkeit für bestimmte Ionen erhöhen (ionotroper Rezeptor). Andererseits gibt es Rezeptoren, die über die Aktivierung von G-Proteinen eine intrazelluläre Signalkaskade anstoßen (metabotroper Rezeptor). Die Wirkung kann bei beiden Rezeptortypen entweder exzitatorisch, d.h., es kommt zur Depolarisation der postsynaptischen Plasmamembran oder inhibitorisch, d.h., es kommt zur Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran, sein. Ob ein erregendes oder ein hemmendes Signal ausgelöst wird, hängt von der Art des Neurotransmitters und vom Rezeptortyp ab. Um eine Depolarisierung auszulösen, wird durch die Wirkung des Transmitters die Leitfähigkeit für Natrium-, Kalium- und Chloridionen erhöht. Durch den hohen elektrochemischen Gradienten überwiegt der Einstrom der Natriumionen. Zur Auslösung einer Hyperpolarisation wird die Leitfähigkeit für Kalium- und Chloridionen erhöht, die Erregbarkeit der Zelle wird dadurch vermindert.

Die synaptische Übertragung wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Hierzu zählen unter anderem die Anzahl der postsynaptischen Rezeptoren, die Größe der Synapse und die Wahrscheinlichkeit von Exozytoseprozessen. Hinzu kommt die Menge an Neurotransmittern im Vesikel, also das Transmitterquantum. Dieses kann durch die intrazelluläre Konzentration an Neurotransmittern, durch den vesikulären Transport ins Vesikelinnere und durch unspezifische Verluste über die Vesikelmembran beeinflusst werden.

Es gibt zahlreiche verschiedene Neurotransmitter im Zentralnervensystem, so zum Beispiel verschiedene Aminosäuren, wie Glutamat oder Glyzin und Aminosäurederivate, wie γ -Aminobuttersäure (GABA) und die Monoamine Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin, Serotonin und Histamin. Des Weiteren kommen im ZNS die Neurotransmitter Acetylcholin, die Purine ATP und Adenosin und verschiedene Neuropeptide, wie Enkephaline, Endorphine oder Substanz P, vor.

Zur Beendigung der Signalübertragung kommt es einerseits durch den Abbau der Botenstoffe durch Enzyme im synaptischen Spalt (z.B. Abbau von Acetylcholin durch die Acetylcholinesterase). Andererseits gibt es in der präsynaptischen Membran und in angrenzenden Gliazellen spezifische Neurotransmittertransporter, welche die Botenstoffe zurück ins Zytoplasma transportieren, wie zum Beispiel die

Plasmamembrantransporter für Dopamin (DAT), Serotonin (SERT), Noradrenalin (NET), GABA (GAT1-GAT4) oder Glyzin (GLYT1/2) (Edwards, 2007).

Neben den zahlreichen Nervenzellen gibt es verschiedene neuroendokrine Zellen im menschlichen Körper, so beispielsweise im Nebennierenmark oder im Gastrointestinaltrakt, welche unter nervaler Kontrolle stehen und bei Erregung ihre Botenstoffe aus sekretorischen Vesikeln in die Blutbahn abgeben.

1.2 Sekretorische Vesikel und Transport und Speicherung von Neurotransmittern

1.2.1 Sekretorische Vesikel

Sekretorische Vesikel dienen als Speicherorganellen für Neurotransmitter. Es lassen sich zwei Klassen unterscheiden: Die kleinen synaptischen Vesikel (small synaptic vesicles; SSV) in Neuronen bzw. die synaptic-like microvesicles (SLMV) in neuroendokrinen Zellen, welche einen Durchmesser von 40nm haben. Sie speichern die niedermolekularen Transmitter, wie die Monoamine, Acetylcholin, GABA und Glyzin. Daneben existieren die elektronendichten, 70-300nm großen dense core und large dense core vesicles (LDCV), welche vor allem die Neuropeptide und Hormone, aber auch Monoamine speichern.

Für die verschiedenen Neurotransmitter existieren spezifische vesikuläre Transporter, die die Botenstoffe aus dem Zytoplasma ins Innere des Vesikels transportieren. Diese Transporter befinden sich in der Vesikelmembran. Die vesikulären Monoamintransporter (VMAT) transportieren Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin, Serotonin und Histamin, der vesikuläre Glutamattransporter (VGLUT) transportiert Glutamat, der vesikuläre Transporter für exzitatorische Aminosäuren (VEAT) transportiert Glutamat und Aspartat (Miyaji et al., 2010), der vesikuläre Transporter für inhibitorische Aminosäuren (VIAAT/VGAT) transportiert GABA und Glyzin, der vesikuläre Acetylcholintransporter (VACHT) befördert Acetylcholin ins Vesikelinnere und der vesikuläre Transporter für Nukleotide (VNUT) transportiert ATP (Iwatsuki et al., 2009).

1.2.2 Transport von Neurotransmittern in sekretorische Vesikel

Eine Voraussetzung für die Weiterleitung von Erregung von einer Nervenzelle zur nächsten bzw. die Ausschüttung von Botenstoffen ins Blut ist die Speicherung und Konzentrierung von Neurotransmittern in den sekretorischen Vesikeln. Die aus dem Extrazellulärraum aufgenommenen bzw. neu synthetisierten Transmitter müssen hierfür in die sekretorischen Vesikel aufgenommen werden. Für die Transmitteraufnahme ins Vesikellumen sind spezifische vesikuläre Transporter (siehe 1.2.1) verantwortlich.

Für die Aufnahme von Neurotransmittern oder Hormonen in sekretorische Vesikel spielt der elektrochemische Gradient ($\Delta\mu\text{H}^+$) über der Vesikelmembran eine entscheidende Rolle (Johnson, 1988). Dieser Gradient wird aus dem Protonengradienten (ΔpH) und dem elektrischen Gradienten ($\Delta\Psi$) gebildet. Der Protonengradient entsteht mit Hilfe einer vakuolären H^+ -ATPase (v-ATPase), welche unter Energieverbrauch Protonen ins Vesikelinnere transportiert und dort den pH-Wert auf etwa 5,6 absenkt. Der elektrische Gradient resultiert aus einer Erhöhung der positiven Ladungen im Vesikel, was eine Potentialdifferenz zum Zytosol bewirkt. Die verschiedenen vesikulären Transporter unterscheiden sich hinsichtlich der Abhängigkeit ihrer Transportaktivität von ΔpH , $\Delta\Psi$ oder beiden. So ist die Aktivität von VMAT und VACHT vor allem von ΔpH und nur geringfügig von $\Delta\Psi$, während VGLUT mehr von $\Delta\Psi$ und VGAT von beiden abhängig ist (Johnson, 1988; Hell et al., 1990; Schuldiner et al., 1995; Reimer et al., 1998). Der Transport der Monoamine und Acetylcholin über vesikuläre Transporter erfolgt als Antiport, wobei ein Aminmolekül gegen Austausch von zwei Protonen ins Vesikelinnere gelangt. Für den Transport von Glutamat und GABA wird jeweils nur ein Proton benötigt. Zusätzlich besitzen die synaptischen Vesikel Chloridkanäle, welche einen Einfluss auf die Ansäuerung des Vesikellumens nehmen können. Diese Chloridkanäle arbeiten vermutlich als Antiporter und transportieren Chloridionen gegen Protonen ins Vesikelinnere (Matsuda, 2008). Kommt es zur Öffnung dieser Chloridkanäle, steigt die vesikuläre Chloridkonzentration an, was wiederum einen erhöhten ΔpH und einen erniedrigten $\Delta\Psi$ zur Folge hat. Dies wird dadurch erklärt, dass die Chloridionen den Anteil des elektrischen Potentials $\Delta\Psi$ vermindern und die Protonenpumpen daher einen höheren Protonengradienten ΔpH aufbauen können (Maycox et al., 1990) (Abbildung 1).

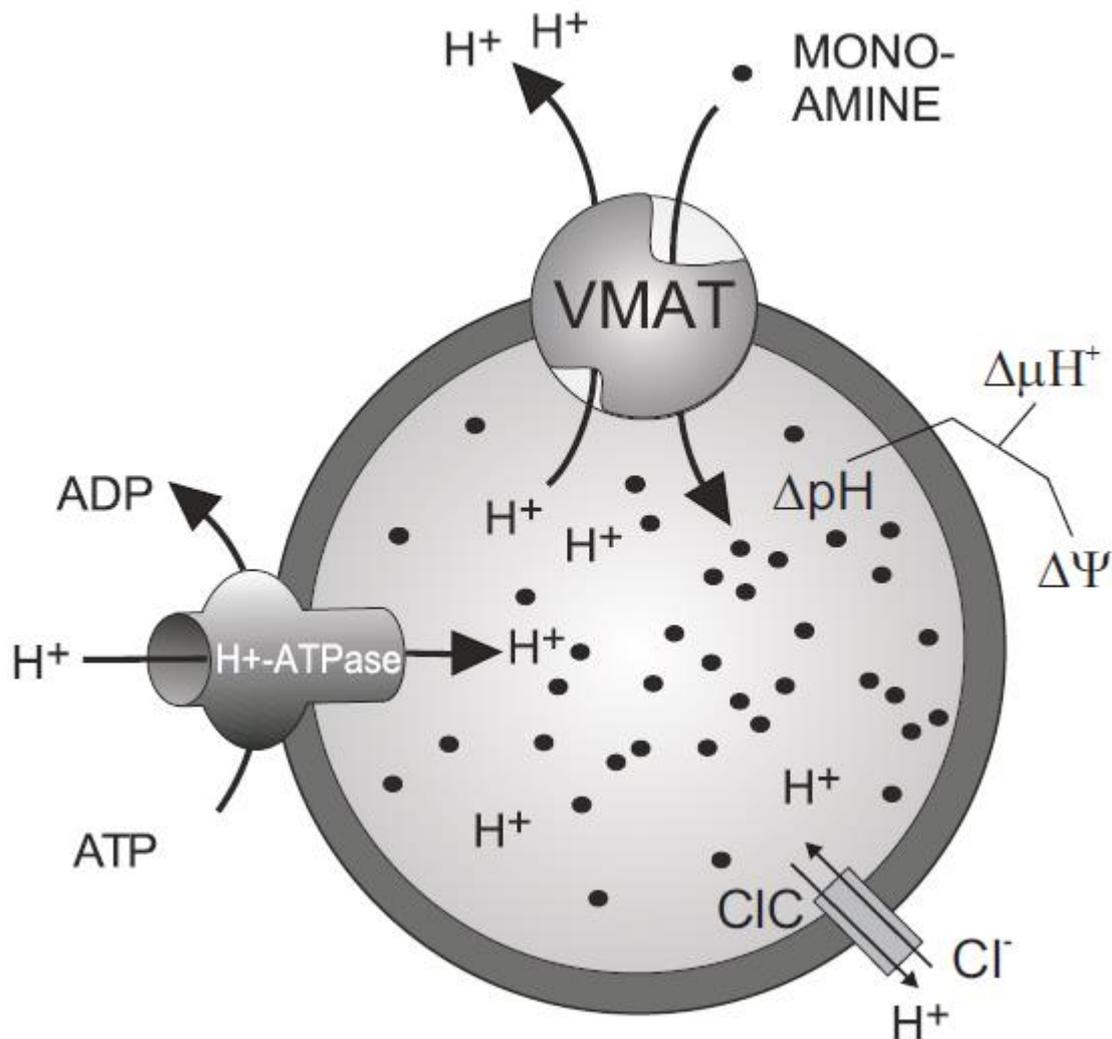


Abbildung 1: Modell der Transporterstoichiometrie des vesikulären Monoamintransportes.

VMAT transportiert ein Monoaminmolekül im Austausch mit zwei Protonen. Der elektrochemische Gradient ($\Delta\mu_{H^+}$) setzt sich aus dem Protonengradienten (ΔpH) und dem chemischen Gradienten ($\Delta\Psi$) zusammen. Dieser wird durch eine vesikuläre ATPase unter Energieverbrauch aufgebaut, deren Aktivität durch den Transport von Chloridionen über einen Chloridkanal (ClC) moduliert werden kann (nach Johnson, 1988; Edwards, 2007).

1.3 Monoaminerge Neurotransmitter und vesikuläre Monoamintransporter

1.3.1 Monoaminerge Neurotransmitter

Monoaminerge Neurotransmitter kommen im gesamten Gehirn und in peripheren Geweben vor. Zur Gruppe dieser Transmitter gehören die Katecholamine Adrenalin,

Noradrenalin und Dopamin sowie Serotonin und Histamin. Gemeinsames Merkmal der Monoamine ist die primäre Aminogruppe, welche über eine Ethylgruppe mit einer Ringstruktur verbunden ist.

Die Biosynthese der Katecholamine geht von der nichtessentiellen Aminosäure L-Tyrosin aus. Durch das Enzym Tyrosinhydroxylase entsteht L-DOPA. Dies ist auch der geschwindigkeitsbestimmende Reaktionsschritt. Dopamin entsteht nach Decarboxylierung von L-DOPA durch die aromatische Aminosäure-Decarboxylase. Aus Dopamin kann nun mit Hilfe der Dopamin-beta-Hydroxylase Noradrenalin gebildet werden. Adrenalin wird vor allem im Nebennierenmark mit Hilfe der Methyltransferase aus Noradrenalin synthetisiert.

Die Wirkungen aller Katecholamine im Zentralnervensystem sind sehr vielfältig: Dopamin spielt eine bedeutende Rolle bei der Beeinflussung der extrapyramidalen Motorik. Dopaminerge Neurone befinden sich in der Pars compacta der Substantia nigra. Bei einem Verlust dieser Neurone kommt es ungeachtet der Pathogenese zur Ausbildung einer parkinsonoiden Symptomatik bestehend aus Hypokinesie, Tremor und Rigor. Zudem wird Dopamin eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Suchterkrankungen zugeschrieben. Noradrenerge Neurone sind vor allem im Locus coeruleus, einer dunkelfarbigem, in der vorderen Rautengrube lokalisierten Zellgruppe, nachweisbar. Neben den peripheren Wirkungen besitzt Noradrenalin eine große Bedeutung für Aufmerksamkeits- und Gedächtnisprozesse und hat einen Einfluss auf die Vigilanz. Außerdem ist Noradrenalin der Botenstoff des zweiten sympathischen Neurons. Adrenalin kommt vor allem in der Peripherie vor und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Herz-Kreislaufsystems, der Atmung und der glatten Muskulatur zahlreicher Organe. Im Zentralnervensystem konnten nur vereinzelt adrenalinproduzierende Zellen gefunden werden, unter anderem in der *Formatio reticularis*. Diesen Neuronen wird eine Bedeutung in der zentralen Regulation des Blutdruckes zugeschrieben.

Serotonin wird aus der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan synthetisiert. Seine Wirkungen entfaltet Serotonin in verschiedenen Organen, zum Beispiel im Magen-Darm-Trakt, im Herz-Kreislaufsystem und es spielt eine Rolle bei der Blutgerinnung. Serotoninerge Neurone kommen in den so genannten Raphe-Kernen des Hirnstammes vor, deren Axone in alle Areale des Gehirns ausstrahlen. Durch Serotonin beeinflusst werden unter anderem die Wahrnehmung, der Schlaf-Wach-Rhythmus, die

Temperaturregulation, die Sensorik, die Schmerzempfindung- und -verarbeitung, der Appetit, das Sexualverhalten und die Hormonsekretion.

Histamin wird mit Hilfe der Histidindecarboxylase in einem pyridoxalphosphat-abhängigen, enzymatischen Schritt aus der Aminosäure L-Histidin synthetisiert. Es wird in größeren Konzentrationen in Mastzellen gebildet, welche in der Haut und in den Schleimhäuten lokalisiert sind. Histamin spielt eine bedeutende Rolle bei der Entstehung einer Immunglobulin E-vermittelten allergischen Reaktion vom Typ 1. Histamin kommt als Neurotransmitter auch im Zentralnervensystem, vor allem im Hypothalamus, vor. Es spielt unter anderem eine Rolle bei der Auslösung von Erbrechen und der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus.

1.3.2 Vesikuläre Monoamintransporter

Der Transport der Monoamine ins Vesikellumen erfolgt über vesikuläre Monoamintransporter (VMAT). Bisher wurden zwei Isoformen isoliert. VMAT1 konnte in PC12-Zellen (Liu et al., 1992) und im Nebennierenmark nachgewiesen werden. VMAT2 wurde aus dem Rattengehirn isoliert (Liu et al., 1992; Erickson et al., 1992; Liu et al., 1994). Außerdem kommt VMAT2 in verschiedenen peripheren Zelltypen, wie sympathischen Neuronen, enterochromaffinen Zellen, dem Nebennierenmark (Peter et al., 1995; Erickson et al., 1996) und in Blutplättchen (Lesch et al., 1993), vor. Mit Ausnahme von Neuronen der Epiphyse (Hayashi et al., 1999) kommt VMAT1 nicht im adulten Gehirn vor. Es konnte aber eine Expression während der Embryonalentwicklung des Rattengehirns nachgewiesen werden (Hansson et al., 1998).

Die vesikulären Monoamintransporter unterscheiden sich nicht nur durch den Ort ihrer Expression, sondern auch hinsichtlich ihrer pharmakokinetischen Eigenschaften. Beide transportieren die Monoamine Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin und Serotonin, wobei die jeweiligen K_M -Werte für VMAT1 im mikro-, die K_M -Werte für VMAT2 im submikromolaren Bereich liegen. Somit ist die Affinität von VMAT2 für dessen Substrate in der Ratte (Peter et al., 1994) und im Menschen (Erickson et al., 1996) höher. Weiterhin unterscheidet sich VMAT2 durch eine 30-100-fach höhere Affinität zu Histamin von VMAT1 (Peter et al., 1994 und Erickson et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, dass Reserpin die Monoaminaufnahme beider vesikulärer Monoamintransporter hemmt (Darchen et al., 1989). Hingegen blockt Tetrabenazin,

welches beispielsweise in der Behandlung von Chorea Huntington zum Einsatz kommt, den VMAT2 zehnfach (Ratte) bis hundertfach (Mensch) effektiver als den VMAT1 (Peter et al., 1994; Erickson et al., 1996). Die hohe Substrataffinität der Transporter und die damit verbundene Möglichkeit zur Speicherung der Monoamine in den Vesikeln sowie ihre Entfernung aus dem Zytosol ist sinnvoll, da zumindest für Dopamin und seine Abbauprodukte eine Neurotoxizität gezeigt werden konnte. So konnte nachgewiesen werden, dass der in der Parkinsontherapie eingesetzte D2/D3-Rezeptoragonist Pramipexol eine erhöhte Aktivität von VMAT2 und damit einen Schutz vor dem Untergang dopaminerger Neurone bewirkt (Truong et al., 2003).

Die Bedeutung des VMAT2 zeigen Versuche an Maus-Deletionsmutanten. Bei einem Verlust beider VMAT2-Allele starben die Mäuse bereits einige Tage nach ihrer Geburt. Bei Heterozygotie von VMAT2 zeigten die Mäuse eine höhere Empfindlichkeit gegenüber dem Neurotoxin MPTP und eine erhöhte Neigung zur Abhängigkeit gegenüber den Sucht auslösenden Substanzen Kokain und Amphetamin (Fon et al., 1997; Takahashi et al., 1997; Wang et al., 1997; Fumagalli et al., 1999). Außerdem traten vermehrt Herzrhythmusstörungen mit einer Verlängerung der PQ-Zeit auf (Itokawa et al., 1999).

Ausgehend von der Aminosäuresequenz besitzen VMAT1 und VMAT2 12 Transmembrandomänen, wobei vermutet wird, dass der C- und der N-Terminus ins Zytosol weisen. Des Weiteren besitzen VMAT1 und VMAT2 zwischen der ersten und der zweiten Transmembrandomäne eine große hydrophile Schleife, welche ins Vesikellumen hineinragt. Diese intraluminale Schleife besitzt drei (VMAT1) bzw. vier (VMAT2) Glykosylierungsstellen (Henry et al., 1994). Auf Aminosäureebene stimmen beide Transporter zu 78% überein, die größten Differenzen liegen im Bereich der intraluminalen Schleife zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne (Schuldiner et al., 1995) (Abbildung 2).

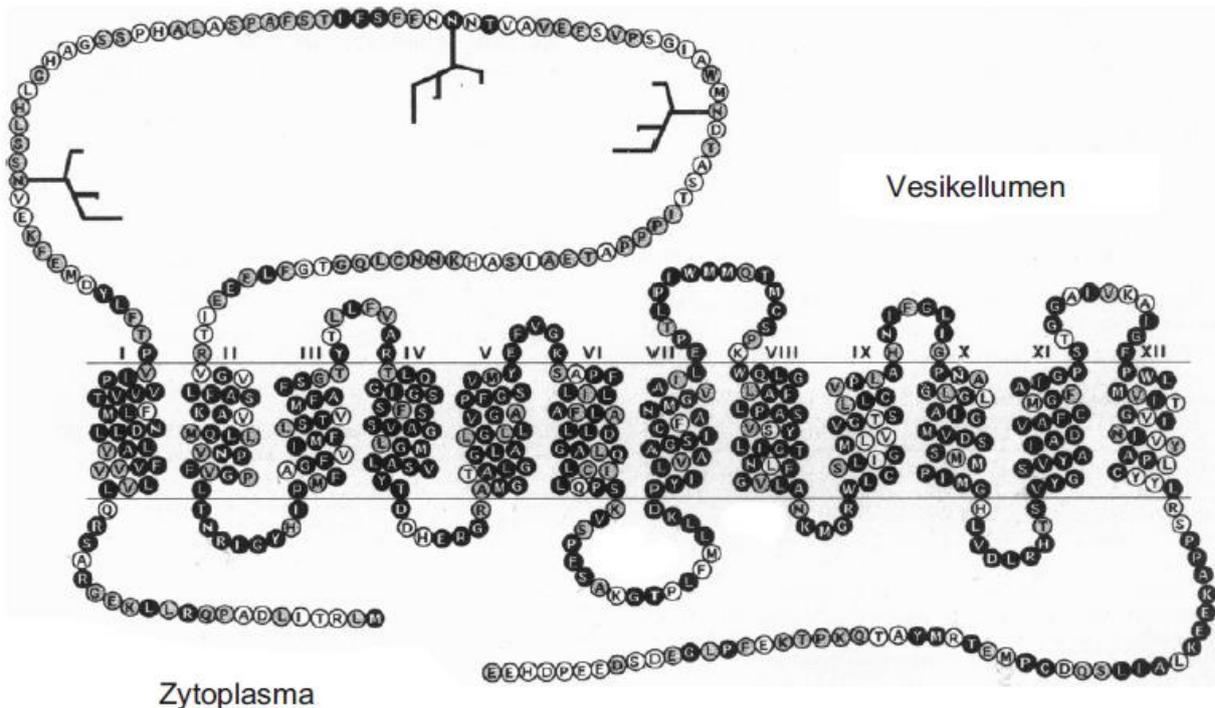


Abbildung 2: Primäre Aminosäuresequenz und erwartete Sekundärstruktur des humanen vesikulären Monoamintransporters 1.

Gezeigt sind die 12 Transmembrandomänen (I-XII). Schwarz hinterlegt sind zwischen Ratte und humanem VMAT1 und zwischen Ratte, humanem und bovinem VMAT2 konservierte Aminosäuren. Die grau schattierten Aminosäuren stimmen im VMAT1 der Ratte und des Menschen überein. Die weiß hinterlegten Aminosäuren finden sich lediglich im humanen VMAT1 (nach Erickson et al., 1996).

Durch die unter 1.2.2 beschriebenen Mechanismen der Transmitteraufnahme und -speicherung kann eine Konzentrierung der Transmitter im Lumen des Vesikels erreicht werden. So beträgt beispielsweise die Konzentration von Serotonin in SSVs und LDCVs nach Schätzungen 270mM (Bruns et al., 2000). Die VMAT besitzen damit die Fähigkeit die Monoamine mit einem Faktor von 10^4 bis 10^5 zu konzentrieren.

Intrazellulär konnte VMAT1 vor allem auf LDCVs, aber auch in geringerem Anteil auf SLMVs nachgewiesen werden (Liu et al., 1994). Ähnliches wurde auch für VMAT2 gezeigt, wo der Transporter auf LDCVs und SSVs nachgewiesen werden konnte (Nierenberg et al., 1995).

1.4 Heterotrimere G-Proteine und die sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP

1.4.1 Aufbau und Funktionszyklus heterotrimerer G-Proteine

Es gibt eine Vielzahl von Proteinen, welche die Fähigkeit besitzen, Guanosintriphosphat (GTP) zu binden und zu hydrolysieren. Diese so genannten G-Proteine lassen sich an verschiedensten Strukturen in der Zelle nachweisen. Man unterscheidet zwischen den heterotrimeren G-Proteinen und den monomeren G-Proteinen. Folgend soll lediglich auf die heterotrimeren G-Proteine eingegangen werden, weil diese eine wichtige Rolle in der Regulation der vesikulären Monoamintransporter spielen.

Am bekanntesten ist ihre Assoziation mit plasmamembranständigen Rezeptoren, wo G-Proteine für die Vermittlung extrazellulärer hormoneller bzw. Neurotransmittersignale ins Zellinnere zuständig sind. Daneben kommen G-Proteine auch im Intrazellulärraum vor (siehe 1.4.2).

Heterotrimere G-Proteine setzen sich aus drei Untereinheiten zusammen, nämlich der α -, β - und γ -Untereinheit. Es sind bisher 27 verschiedene α -, 5 β - und 14 γ -Untereinheiten bekannt, welche die Bildung einer Vielzahl möglicher Heterotrimere zulassen (Albert & Robillard, 2002). Die α -Untereinheiten lassen sich aufgrund ihrer Aminosäuresequenzhomologien in vier Gruppen unterteilen, namentlich Gs, Gi, Gq und G12, welche sich wiederum in weitere Untergruppen untergliedern lassen (Simon et al., 1991).

Die α -Untereinheit besitzt die Bindungsstelle für GTP und die intrinsische GTPase-Aktivität. Am nachhaltigsten untersucht ist die Funktion heterotrimerer G-Proteine, die mit heptahelikalen Rezeptoren der Plasmamembran assoziiert sind. Bei Aktivierung des Rezeptors durch einen Botenstoff kommt es zur Aktivierung des G-Proteins durch Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) gegen GTP. Dadurch kann die α -Untereinheit vom $\beta\gamma$ -Dimer abdissoziieren und die jeweiligen Effektoren beeinflussen, welche beispielsweise Enzyme oder Ionenkanäle sein können (Bourne et al., 1990). Nach Hydrolyse von GTP wird die α -Untereinheit inaktiviert und reassoziiert wieder mit dem $\beta\gamma$ -Dimer (Ali et al., 1994). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass das $\beta\gamma$ -Dimer zahlreiche intrazelluläre Effektoren aktiviert (Clapham et al., 1993). Zudem ist es der Zelle möglich, die intrinsische GTPase-Aktivität durch bestimmte Proteine der so

genannten RGS-Familie (regulators of G-protein signaling) zu beeinflussen und zu regulieren (Ross & Wilkie, 2000) (Abbildung 3). RGS-Proteine können die Aktivität der G-Proteine zudem dadurch verändern, dass sie die Bindung des G-Proteins an seinen Effektor verhindern oder die Affinität der $G\alpha$ -Untereinheit zum $G\beta\gamma$ -Dimer erhöhen.

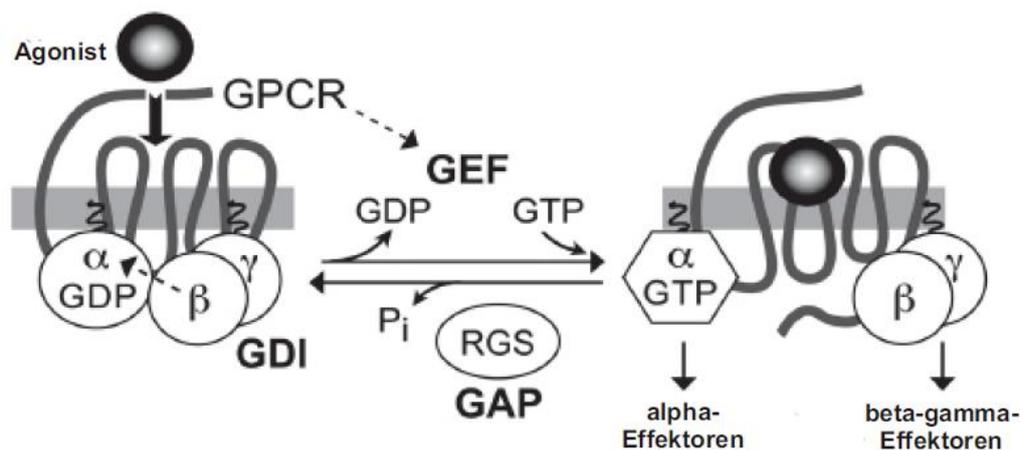


Abbildung 3: Modell der Rezeptor vermittelten Aktivierung heterotrimerer G-Protein assoziierter Signaltransduktion.

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR; G-protein coupled receptor) binden mittels ihrer intrazellulären Schleifen an das heterotrimere G-Protein. Dieses besteht aus $G\alpha$, das Guanosindiphosphat (GDP) gebunden hat, und dem $G\beta\gamma$ -Dimer. Das $G\beta\gamma$ -Dimer unterstützt die Bindung an die Plasmamembran, nimmt an der Ankopplung an den Rezeptor teil und fungiert als Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitor (GDI; guanine nucleotide dissociation inhibitor), der die spontane Aktivierung der $G\alpha$ -Untereinheit verhindert. Bindet ein Agonist an den Rezeptor (GPCR), fungiert dieser als Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF; guanine nucleotide exchange factor) durch Konformationsänderung im G-Protein und führt damit zur Dissoziation von GDP und zur Bindung von GTP an die α -Untereinheit. Die Bindung von GTP an $G\alpha$ bewirkt eine Änderung in drei flexiblen Regionen in der $G\alpha$ -Untereinheit und dies führt zur Dissoziation des $G\beta\gamma$ -Dimers. Anschließend regulieren sowohl $G\alpha$ -GTP als auch $G\beta\gamma$ verschiedene nachgeschaltete Effektoren. Die α -Untereinheit besitzt eine intrinsische GTP-Hydrolyse-Aktivität, wodurch GTP zu GDP hydrolysiert wird und die α -Untereinheit mit dem $\beta\gamma$ -Dimer reassoziert. Dadurch kehrt der Komplex aus GPCR und heterotrimerem G-Protein in den inaktiven Zustand zurück. Die Hydrolyse von GTP wird durch die Familie der RGS-Proteine (regulator of G-protein signaling) gefördert, welche für die $G\alpha$ -Untereinheit als so genannte GAP's (GTPase-accelerating proteins) dienen. (nach Johnston et al., 2008)

Experimentell kommen schwer hydrolysierbare GTP-Analoga wie GMP-P(NH)P und $GTP\gamma S$ zum Einsatz, um die Rolle der G-Proteine genauer zu untersuchen, da sie eine permanente Aktivierung der α -Untereinheit bewirken. Des Weiteren wird durch Aluminiumfluorid eine Aktivierung der α -Untereinheit verursacht (Chabre, 1990). Bestimmte Bakterientoxine lösen Modifikationen an der α -Untereinheit aus, welche

ihrerseits zu einer Änderung des Funktionszustandes führen. So verursacht das Cholera-toxin eine ADP-Ribosylierung der $G_{s\alpha}$ -Untereinheit und verhindert dadurch die GTPase-Aktivität und damit die Hydrolyse von GTP. Hieraus resultiert eine kontinuierliche Aktivierung der G_{α} -Untereinheit. Das Pertussis-toxin führt ebenfalls zu einer ADP-Ribosylierung, allerdings an der Rezeptorbindungsstelle der $G_{i\alpha}$ -Untereinheit, so dass diese vom Rezeptor funktionell entkoppelt wird (Nürnberg & Ahnert-Hilger, 1996).

1.4.2 Die G_{α} -Untereinheiten $Go1\alpha$ und $Go2\alpha$

Eine besondere Bedeutung bei der Regulation der vesikulären Monoamintransporter spielt die $Go2\alpha$ -Untereinheit, eine der beiden Splice-Varianten des $Go\alpha$ -Gens. $Go\alpha$ -Untereinheiten werden der G_i -Subgruppe zugeordnet. Sie sind die in Neuronen am häufigsten vorkommende α -Untereinheit und machen in Assoziation mit den $\beta\gamma$ -Dimeren etwa 1 bis 2% des Gesamtproteins im Gehirn aus (Sternweis & Robishaw, 1984; Jiang et al., 1998; Dhingra et al., 2002). Außerdem konnten sie in endokrinen Zellen (Ohara-Imaizumi et al., 1992) und in Myozyten (Wolf et al., 1998) nachgewiesen werden. $Go2\alpha$ kommt nicht nur mit der Plasmamembran assoziiert, sondern auch im Intrazellulärraum vor. So sind Untereinheiten der G_i/o -Familie mit dem Golgi-Apparat (Ercolani et al., 1990), dem endoplasmatischen Retikulum (Audigier et al., 1988), Endosomen (Ali et al., 1989), dem Zytoskelett (Rasenick et al., 1990) und dem Zellkern (Willard & Crouch, 2000) assoziiert. Des Weiteren wurde $Go2\alpha$ in Kolokalisation mit VMAT1 und VMAT2 auf chromaffinen Granula im Nebennierenmark der Ratte gefunden (Pahner et al., 2002) und wurde massenspektroskopisch neben anderen G-Protein-Untereinheiten auf aufgereinigten synaptischen Vesikeln nachgewiesen (Takamori et al., 2006). Funktionell konnte gezeigt werden, dass durch Aktivierung der $Go2\alpha$ -Untereinheit die vesikuläre Monoaminaufnahme gehemmt wird. Weitere Einflüsse von $Go2\alpha$ auf sekretorische Vesikel werden diskutiert. So soll $Go\alpha$ in Wechselwirkung mit dem Zytoskelett die Exozytose inhibieren (Gasman et al., 1998) und Einfluss auf die Bildung von LDCVs haben (Leyte et al., 1992). Weiterhin ist bekannt, dass die Aktivierung von $Go\alpha$ nicht ausschließlich über heptahelikale Rezeptoren erfolgt, sondern auch über GAP43, einem neuronalen Protein (Strittmatter et al., 1991), und das Alzheimer amyloid precursor-Protein möglich ist. In $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten

konnte gezeigt werden, dass, im Gegensatz zum Wildtyp, eine Kokain induzierte Sensibilisierung und damit eine Zunahme der lokomotorischen Aktivität (= motorische Sensitivierung) nach wiederholter Kokaininjektion ausbleibt. Außerdem zeigten sich eine Verminderung der D1- und eine Erhöhung der D2-Rezeptorzahl (insbesondere nach Kokainbehandlung), eine insgesamt verminderte Konzentration striatalen Dopamins und eine erhöhte Expression von VMAT2. (Brunk et al., 2008a). Ähnliches konnte auch für die Behandlung mit Amphetamin gezeigt werden, wobei hier auch bei den $Go2\alpha$ -Mausdeletionsmutanten bei repetitiver Amphetamingabe eine motorische Sensitivierung auftrat (Brunk et al., 2010).

Über die möglichen Effektoren, die $Go\alpha$ beeinflusst, ist bisher wenig bekannt. Beispielsweise konnte die direkte Interaktion der $Go\alpha$ -Untereinheiten mit spannungsabhängigen Kalziumkanälen und die daraus resultierende Hemmung der Öffnung dieser Kanäle nachgewiesen werden (Kinoshita et al., 2001). Daneben gibt es Hinweise darauf, dass $Go\alpha$ mit dem D_{2L} -Rezeptor (dopamine-like receptor) assoziiert ist (Jiang et al., 2001). Weitere Interaktionspartner von $Go\alpha$ konnten mit Hilfe der Yeast-two-hybrid-Methode und Koimmunopräzipitationen identifiziert werden. Für $Go1\alpha$ zeigten sich dabei unter anderem direkte Interaktionen mit RGS14 (Traver et al., 2000), RGS17, Gz-GTPase-activating protein (Gz-GAP), IP6, Rap1GAP (Jordan et al., 1999), Purkinje cell protein-2 (Luo & Denker; 1999) und G-protein-induced-protein-of-Neurite-outgrowth 1 und 2 (GRIN1&2; Chen et al., 1999). Konstitutiv aktives $Go2\alpha$ interagiert mit Rap1GAP, Girdin und weiteren Proteinen (Baron et al., 2012).

In experimentellen Versuchen mit $Go\alpha$ -Deletionsmutanten, die keine der beiden $Go\alpha$ Splice-Varianten exprimieren, wurde eine deutlich verminderte Lebenszeit der Nachkommen von durchschnittlich sieben Wochen festgestellt. Außerdem fielen eine Hyperalgesie, eine motorische Hyperaktivität und eine Beeinträchtigung der motorischen Kontrolle, Tremor und die Neigung zu Krampfanfällen auf (Jiang et al., 1998). Dies zeigt die enorme Bedeutung von $Go\alpha$ für die Integrität des Zentralnervensystems, ohne dass sich morphologisch Veränderungen des Gehirns im Vergleich zu Wildtypmäusen zeigen ließen (Valenzuela et al., 1997).

1.4.3 Die G α -Untereinheit Gq α

Wie unter 1.4.1 beschrieben, lassen sich die G-Proteine in vier Gruppen unterteilen, darunter befindet sich auch die Familie der Gq-Proteine. Zu den Mitgliedern dieser Gruppe gehören Gq α , G11 α , G14 α und G15/16 α (Simon et al., 1991), welche alle vier Isoformen der Phospholipase C β (PLC- β) aktivieren können. Dieses Enzym bewirkt die Hydrolyse von Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) zu Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). IP₃ bewirkt die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern, DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC). Sowohl Kalzium als auch die PKC sind an zahlreichen intrazellulären Signalwegen beteiligt und bewirken verschiedene zelluläre Ereignisse (Mizuno et al., 2009).

1.4.4 cAMP und cGMP als sekundäre Botenstoffe

Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) sind wichtige Botenstoffe innerhalb der Zelle.

Synthetisiert wird cAMP durch die Adenylylzyklase (AC) aus Adenosintriphosphat (ATP). Dieses Enzym lässt sich in zwei Familien einteilen, die membranassoziierten AC und die löslichen AC. Von den membranassoziierten AC existieren neun Isoformen, alle werden durch Gs α aktiviert. Eine gut verstandene Signalkaskade ist der cAMP-Proteinkinase A-Weg. Die durch cAMP aktivierte Proteinkinase A (PKA) ihrerseits kann zahlreiche Ereignisse in der Zelle auslösen. Abgebaut wird cAMP über Phosphodiesterasen. Experimentell konnte gezeigt werden, dass der vesikuläre Monoamintransport in Phäochromozytomzellen durch cAMP vermindert wird (Nakanishi et al., 1995a). Dieser Effekt konnte durch den Proteinkinase-Inhibitor K252a aufgehoben werden (Nakanishi et al., 1995b).

cGMP entsteht nach G-Protein vermittelter Aktivierung der Guanylylzyklase (GC) aus GTP. Von der GC existieren eine membrangebundene und eine lösliche Form. cGMP kann den Öffnungszustand von Kationenkanälen beeinflussen, was bei der Signaltransduktion in den Sinneszellen des Auges eine große Rolle spielt, und bewirkt eine Aktivierung von cGMP-abhängigen Proteinkinasen. So führen intrazellulär erhöhte Konzentrationen von cGMP unter anderem zur Dilatation glatter Muskelzellen in Gefäßen und im Gastrointestinaltrakt. Außerdem interferiert die cGMP-abhängige

Proteinkinase mit der Generierung von IP_3 über Interaktion mit $Gq\alpha$ bzw. Phospholipase $C\beta$, wodurch die intrazelluläre IP_3 -Konzentration sinkt (Hofmann, 2005). cGMP wird ebenfalls durch Phosphodiesterasen abgebaut.

1.5 G-Protein abhängige Regulation vesikulärer Monoamintransporter

Wie unter 1.4.1 erwähnt, kommen G-Proteine nicht nur rezeptorassoziiert an der Zellmembran, sondern auch im Intrazellulärraum vor. $Go2\alpha$ kommt auf Membranen von chromaffinen Granula vor (Ahnert-Hilger et al., 1994) und Gi - und Go -Proteine sind auf synaptischen Vesikeln vorhanden (Aronin & DiFiglia, 1992; Ahnert-Hilger, 1994; Pahner et al., 2003).

Experimentell konnte eine Verminderung der vesikulären Aufnahme von Monoaminen in permeabilisierte PC12-Zellen, welche ausschließlich VMAT1 exprimieren, durch Zugabe schwer hydrolysierbarer GTP-Analoga (GMP-P(NH)P bzw. $GTP\gamma S$) gezeigt werden. Es stellte sich heraus, dass für die Reduktion der Transmitteraufnahme $Go2\alpha$, aber nicht $Go1\alpha$, $Gi1\alpha$ oder $Gi2\alpha$ verantwortlich ist (Ahnert-Hilger et al., 1998). Ähnliches konnte auch für die Monoaminaufnahme in BON-Zellen nachgewiesen werden, einer Zelllinie, die einer Metastase eines pankreatischen Karzinoidtumors entsprungen ist und welche sowohl VMAT1 und VMAT2 exprimiert. Untermuert wurden diese Ergebnisse durch Monoaminaufnahmeversuche an permeabilisierten Raphe-Neuronen der Ratte und Vesikelpräparationen, welche ebenso eine $Go2\alpha$ vermittelte Verminderung der Serotoninaufnahme durch eine Hemmung des vesikulären Monoamintransporters 2 zeigten (Höltje et al., 2000). Von der gleichen Arbeitsgruppe konnten sowohl VMAT2 als auch $Go2\alpha$ durch elektronenmikroskopische Untersuchungen auf den SSVs serotoninergner Nervenendigungen lokalisiert werden (Höltje et al., 2000). In späteren Experimenten konnte außerdem gezeigt werden, dass die durch GMP-P(NH)P hervorgerufene Hemmung der vesikulären Monoaminaufnahme in $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten ausbleibt (Brunk et al., 2008a).

VMAT2 wurde zudem in Thrombozyten nachgewiesen. Thrombozyten können Serotonin nicht selbst synthetisieren. Sie nehmen das von enterochromaffinen Zellen des Magen-Darm-Traktes synthetisierte Serotonin über den entsprechenden Plasmamembrantransporter (SERT) auf und speichern es mit Hilfe von VMAT2 in vesikulären Strukturen (large dense bodies). Auch in diesem System konnte eine

Hemmung der Serotoninaufnahme durch Zugabe des nicht-hydrolysierbaren GTP-Analogons GMP-P(NH)P gezeigt werden. In aus Tryptophanhydroxylase 1-Deletionsmutanten (Tph 1) gewonnenen Thrombozyten, welche kaum Serotonin enthalten, konnte keine Serotoninaufnahemhemmung durch GMP-P(NH)P gezeigt werden. Hingegen wurde die Aufnahme dann gehemmt, wenn diese Thrombozyten mit Monoaminen vorbeladen wurden. Dies ließ erstmals die Vermutung zu, dass der Füllungszustand der Vesikel zur Hemmung der Transmitteraufnahme beiträgt (Höltje et al., 2003). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass, im Gegensatz zu Neuronen, in Thrombozyten kein $Go2\alpha$ exprimiert wird. Durch Experimente an $Gq\alpha$ -Deletionsmutanten konnte $Gq\alpha$ als das für die Regulation des vesikulären Monoamintransporters 2 in Thrombozyten verantwortliche G-Protein identifiziert werden. Zudem wurden in $Gq\alpha$ -Deletionsmutanten eine verlängerte Blutungszeit und zerebrale Defizite, wie Koordinationsstörungen, nachgewiesen (Höltje et al., 2003).

An VMAT1- bzw. VMAT2-transfizierten CHO-Zellen, welche nicht die Enzymausstattung für die Serotoninsynthese und -speicherung enthalten, aber $Go2\alpha$ exprimieren, konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Serotoninaufnahme durch G-Protein-Aktivierung (mit GMP-P(NH)P) nach Vorbeladung der Zellen mit anderen Monoaminen resultiert. Auffällig war hierbei, dass die Serotoninaufnahemhemmung in mit VMAT1 transfizierten CHO-Zellen nach Vorbeladung mit Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin oder Serotonin signifikant ausfiel. Hingegen konnte in mit VMAT2 transfizierten CHO-Zellen keine Hemmung der Serotoninaufnahme bei Vorbeladung mit Adrenalin gezeigt werden, obwohl VMAT2 Adrenalin transportiert (Brunk et al., 2006). Diese Ergebnisse führten zu dem Schluss, ähnlich den Daten, die an Thrombozyten gewonnen werden konnten, dass der Füllungszustand der Vesikel einen Einfluss auf die VMAT-Aktivität hat und eine Signaltransduktionskaskade unter Mitwirkung von $Go2\alpha$ diese Hemmung vermittelt. Da CHO-Zellen nicht mit den nötigen Enzymen für die Serotoninsynthese und -speicherung ausgestattet sind, wurde vermutet, dass der vesikuläre Monoamintransporter selbst als Sensor für den Füllungszustand der Vesikel fungiert und die Signalkaskade anstößt. Eine viel versprechende Struktur stellt die intraluminale Schleife zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne der VMAT dar. Zwischen den Isotypen bestehen in diesem Abschnitt der Aminosäuresequenz große Differenzen. Nach Deletion der für diese intraluminale Schleife kodierenden DNA-Sequenz und Transfektion von CHO-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass die

G-Protein vermittelte Hemmung der Monoaminaufnahme deutlich reduziert war. Somit stellt die intraluminale Schleife mutmaßlich eine rezeptorähnliche Struktur dar, welche zur Aktivierung einer Signalkaskade und damit von $Go2\alpha$ führt (Brunk et al., 2006). Dabei ist beim VMAT1 eine $\alpha1$ -rezeptorähnliche Struktur an der Bestimmung des intravesikulären Monoaminspiegels verantwortlich.

Bisher ist nicht geklärt, ob das G-Protein direkt mit dem Transporter interagiert oder über weitere Zwischenschritte aktiviert wird. Des Weiteren ist unbekannt, ob $Go2\alpha$ direkt zur Hemmung der VMAT-Aktivität beiträgt oder ob ein nachgeschalteter Signaltransduktionsweg involviert ist. Experimentell konnte jedoch mit Hilfe des Yeast-two-hybrid-Systems mit konstitutiv aktivem $Go2\alpha$ VMAT nicht als direkter Interaktionspartner identifiziert werden (Baron et al., 2013).

1.6 Fragestellungen

VMAT1 und VMAT2 unterscheiden sich hinsichtlich ihres Vorkommens und ihrer Substratspezifität. Über die Regulation von VMAT2 ist insgesamt mehr bekannt als über die Regulation von VMAT1.

Daher sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen untersucht werden:

- 1.) Ein Fragenkomplex betrifft den Einfluss von sekundären Botenstoffen auf die Aktivität von VMAT1:
 - Haben die sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP einen Einfluss auf die vesikuläre Monoaminaufnahme durch den vesikulären Monoamintransporter 1?
 - Wodurch ist ein gegebener Einfluss charakterisiert (Hemmung/Steigerung der VMAT-Aktivität, Veränderung von Transportparametern)?
 - Gibt es Unterschiede in der Wirkung von cAMP und cGMP?

- 2.) Welchen Einfluss haben verschiedene $G\alpha$ -Untereinheiten ($G\alpha_1$, $G\alpha_2$ und $G\alpha_q$) auf die vesikuläre Monoaminaufnahme über VMAT1?

2 Materialien und Methoden

2.1 Chemikalien

40% Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (40%; 19:1)	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma (München)
Ascorbinsäure	Sigma (München)
Bicinchoninsäure (BCA)	Sigma (Schnelldorf)
Bovines Serum Albumin, Fraktion V (BSA)	Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe)
cAMP (cyclisches Adenosin 3', 5'-monophosphat)	Sigma (München)
cGMP (cyclisches Guanosin 3', 5'-monophosphat)	Sigma (München)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma (Schnelldorf)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
Ethylenglykolbis(2-aminoethyl-)tetraacetat (EGTA)	Roth (Karlsruhe)
Geneticin	Invitrogen (Karlsruhe)
Glukose	Sigma (Schnelldorf)
Glyzerin	Merck (Darmstadt)
Glyzin	Sigma (München)
5'-Guanolyimidodiphosphat (GMP-P(NH)P)	Sigma (Schnelldorf)
<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure) (HEPES)	Sigma (Schnelldorf)
5-Hydroxytryptamin-Hydrochlorid	Sigma (Schnelldorf)
5-Hydroxy-[³ H]-tryptamintrifluoracetat ([³ H]-Serotonin)	GE Healthcare (München)
Immu Mount	Thermo Shandon (Pittsburgh)
Kaliumchlorid	Sigma (Schnelldorf)
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka (Buchs)

Kaliumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Kaliumglutamat	Sigma (Schnelldorf)
Kanamycin	Sigma (Schnelldorf)
Kupfersulfat	Sigma (Schnelldorf)
Lipofectamin	Invitrogen (Karlsruhe)
Low Molecular Weight-Marker (LMW)	GE Healthcare (München)
Magermilchpulver	Molkerei Heideblume (Elsdorf)
Magnesiumchlorid	Sigma (Schnelldorf)
Mass-Ruler-DNA-Marker	Fermentas (St. Leonrot)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Natriumazetat	Sigma (Schnelldorf)
Natriumcarbonat	Sigma (Schnelldorf)
Natriumchlorid	Sigma (Schnelldorf)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma (Schnelldorf)
Natriumhydrogencarbonat	Sigma (Schnelldorf)
Natriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Sigma (Schnelldorf)
Di-Natriumtartrat	Sigma (Schnelldorf)
Optiphase HighSafe Szintillationsflüssigkeit	Beckman Coulter (Krefeld)
PageRuler – Protein Marker	Fermentas (St. Leonrot)
Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure) (Pipes)	Sigma (Schnelldorf)
Ponceau S	Sigma (Schnelldorf)
Restriktionsenzyme	Fermentas (St. Leonrot)
Reserpin	Sigma (Schnelldorf)
Salzsäure	Sigma (Schnelldorf)
Saccharose	Roth (Karlsruhe)
Sulfosalizylsäure	Sigma (Schnelldorf)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma (Schnelldorf)
Trichloressigsäure	Sigma (Schnelldorf)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Merck (Darmstadt)
Triton X-100	Roth (Karlsruhe)
Trypsin	Sigma (Schnelldorf)
Trypton	Roth (Karlsruhe)
Tween 20	Merck (Darmstadt)

2.2 Puffer und Lösungen

PBS (Phosphate Buffered Saline)

140 mM	NaCl
10 mM	KCl
6,4 mM	Na ₂ HPO ₄
2 mM	KH ₂ PO ₄
pH 7,4	

Trypsinlösung

0,25 %	Trypsin
1 mM	EDTA
in PBS	

Lösungen für die Proteinbestimmung

Lösung A

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

Lösung B

4 % (w/v)	CuSO ₄
-----------	-------------------

Lösungen für Immunoblots

Antikörperlösung

0,2 % (w/v)	BSA
in PBS	

TS (Tris Saline)-Puffer

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

TS-Tween-Puffer

20 mM	Tris
150 mM	NaCl
0,1 % (v/v)	Tween 20

Magermilchlösung

5 % (w/v) Magermilchpulver
0,05 % (v/v) Tween 20
in TS-Puffer

Antikörperlösung

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

Homogenisierungspuffer

320 mM Sucrose
4 mM Hepes
pH 7,4 (KOH) (vor Zugabe von Sucrose)
+1mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)
+ Proteaseinhibitormix (Sigma) 1:1.000

Lösungen für Elektrophorese

Probenpuffer

200 mM Tris
400 mM DTT
8 % (w/v) SDS
0,4 % (w/v) Bromphenolblau
40 % (v/v) Glyzerin

Elektrophoresepuffer

25 mM Tris
200 mM Glyzin
3,5 mM SDS

Ponceau S-Färbelösung

0,3 % (w/v) Ponceau S
3 % (w/v) Trichloressigsäure
3 % (w/v) Sulfosalizylsäure
in ddH₂O

Proteintransferpuffer

200 mM Glyzin
25 mM Tris
1,3 mM SDS
20 % (v/v) Methanol

Tris I-Puffer (4x)

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

Tris II-Puffer (4x)

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

Sammelgel

0,5 ml	Acrylamid/Bisacrylamid (40%, 19:1)
2,5 µl	TEMED
25 µl	10 % APS
1,25 ml	Tris I-Puffer
3,25 ml	ddH ₂ O

Trenngele

Acrylamid/Bisacrylamid (%)	8 %	10%	12%
Tris II-Puffer	2,5 ml		
Acrylamid/Bisacrylamid (40%; 19:1)	2 ml	2,5 ml	3 ml
ddH ₂ O	5,5 ml	5 ml	4,5 ml
TEMED	5 µl		
10% APS	50 µl		

Lösungen für Neurotransmitteraufnahme

Kaliumglutamat (KG1)- Puffer

150 mM	Kaliumglutamat
20 mM	Pipes
4 mM	EGTA
2,8 mM	MgCl ₂ (durch Komplexbildung ca.1 mM freies Mg ²⁺)
pH 7,0 (KOH)	

Kaliumglutamat-ATP-Puffer

KG-Puffer	
2 mM	Na ₂ -ATP

Lösungen zur Agarosegelelektrophorese

TE-(Tris-EDTA-)Puffer

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

TAE-(Tris-Acetat-EDTA-Puffer)

40 mM	Trisazetat
5 mM	Natriumazetat
1 mM	EDTA
pH 7,4 (Essigsäure)	

Agarosegel

2 % (w/v)	Agarose
In 1x TAE-Puffer	

Lösungen für Immunfluoreszenz

Paraformaldehydlösung

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

Blocklösung

0,1 % (v/v)	Triton X-100
5 % (v/v)	Normal Goat Serum (NGS)
2 % (w/v)	Bovines Serum Albumin (BSA)

2. Antikörper-Lösung

10 ml PBS
+ 2% BSA (200 mg)

2.3 Medien

2.3.1 Zellkulturmedien

Medium für PC12-Zellen

170 ml RPMI 1640
20 ml Pferdeserum (HS)
10 ml Kälberserum (FBS)
2 ml L-Alanylglutamin (200 mM)
2 ml Penicillin (10.000 U) / Streptomycin (10 mg/ml)

Medium für CHO-Zellen

180 ml DMEM/HAM's F12
20 ml Kälberserum (FBS)
2 ml L-Alanylglutamin (200 mM)
2 ml Penicillin (10.000 U) / Streptomycin (10 mg/ml)

Sonstiges

Opti-MEM I Reduced Serum Medium von der Firma Gibco für die Lipofectamin-Transfektionen.

2.3.2 Mikrobielle Medien

Luria Bertani (LB)-Medium

10 g/l Trypton
5 g/l Hefextrakt
5 g/l NaCl
pH 7,0

Das LB-Medium wurde für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

Entsprechend Zusatz von Kanamycin (Endkonzentration 25 µg/ml) zum LB-Medium.

2.4 Antikörper

2.4.1 Primäre Antikörper

Anti-Chromogranin B-Antikörper
Monoklonal, Maus

Santa Cruz Biotechnology
Santa Cruz, USA

Anti-GFP-Antikörper
Polyklonal, Kaninchen

MoBiTec
Göttingen, Deutschland

Anti-Go2 α -Antikörper (Klon 101.4)
Monoklonal, Maus

freundlicherweise von Prof.
Jahn, MPI für
biophysikalische Chemie,
Göttingen, Deutschland, zur
Verfügung gestellt

Anti-Synaptophysin-Antikörper (Klon 7.2)
Monoklonal, Maus

Synaptic Systems
Göttingen, Deutschland

Anti-VMAT1-Antikörper
Polyklonal, Kaninchen

Chemicon International
Schwalbach, Deutschland

Anti-VMAT2-Antikörper
Polyklonal, Kaninchen

Synaptic Systems
Göttingen, Deutschland

Anti-GFP-Antikörper
Polyklonal, Kaninchen

Abcam
Cambridge, USA

2.4.2 Sekundäre Antikörper

Ziege-Anti-Kaninchen IgG
Peroxidase gekoppelt

Vector Laboratories
Burlingham, USA

Ziege-Anti-Maus IgG
Peroxidase gekoppelt

Vector Laboratories
Burlingham, USA

Oregon green-Antikörper
Ziege-Anti-Kaninchen-IgG

MoBiTec
Göttingen, Deutschland

2.5 Vektoren / DNA

2.5.1 Vektoren

pEGFP-C1 (Clontech)

Der Vektor kodiert das Enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP), die Sequenz hierfür wird von der Multiple Cloning Site (MCS) gefolgt. Zudem befindet sich auf dem Vektor das Neomycinresistenzgen, was für die Selektion stabiler Zelllinien von Bedeutung ist. Dem Neomycinresistenzgen ist ein bakterieller Promotor vorgeschaltet, der die Selektion erfolgreich transformierter E. coli mittels Kanamycin ermöglicht.

pEGFP-(del2)-C3

Dieser Vektor ist durch Deletion der Basen 1341 (A) und 1342 (T) des Vektors pEGFP-C1 (Clontech) entstanden. Der Vektor kodiert ebenfalls für das Enhanced Green Fluorescent Protein und die Neomycin- /Kanamycin-Resistenz. Die MCS folgt auf eGFP. Der Vektor wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Christian Derst (Charité – Universitätsmedizin Berlin, Institut für Integrative Neuroanatomie) zur Verfügung gestellt.

2.5.2 cDNA von G α -Untereinheiten und ortsspezifische Mutagenese

Die cDNA für die G α -Untereinheiten Go1 α (Ratte), Go2 α (Hamster) und Gq α (Maus) wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Lutz Birnbaumer, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, North Carolina, USA, zur Verfügung gestellt.

In unserem Labor wurden aus der cDNA der G α -Untereinheiten mit Hilfe ortsspezifischer Mutagenesen die jeweils konstitutiv aktiven Untereinheiten hergestellt. Diese konstitutiv aktiven Mutanten verlieren die Fähigkeit gebundenes GTP zu hydrolysieren. Die jeweiligen Mutanten wurden danach in den pEGFP-C3-Vektor eingebaut (pEGFPGo1 α Q205L, pEGFPGo2 α Q205L, pEGFPGq α Q209L). Diese Vektoren mit den jeweiligen konstitutiv aktiven G α -Untereinheiten wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Christian Blex, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Institut für Integrative Neuroanatomie, zur Verfügung gestellt.

2.6 Geräte und Apparaturen

Elektrophorese

Alle Geräte für die Elektrophorese stammen von der Firma BioRad (München).

Power/Pac 200/300 Spannungsgerät

TransBlot SD Semidry Elektrophorese Transferzelle

Mini Protean II Elektrophorese-Kammer

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

Mikroskope

Leica DMLB Epifluoreszenzmikroskop mit Durchlichteinrichtung

Homogenisierung von Zellen

Ballhomogenisator des European Molecular Biology Laboratory (Heidelberg, Deutschland)

Zentrifugen

Beckman J2-HS Kühlzentrifuge

Rotoren: JA-14, JA-20

Beckmann Optima Max Ultrazentrifuge

Rotoren: TLS 55, TLA 100.4, TLA 100.1

Eppendorf Kühlzentrifuge 5417 R

Transformationen

Nucleobond PC 100

Macherey-Nagel (Düren)

Cawomat 2000 IR Entwicklungsmaschine

Physia GmbH (Neu-Isenburg)

Sonstige

Beckman LS 6500, Liquid Szintillation Counter

BioDoc Analyse (Video Dokumentationssystem)

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

Zellkulturbrutschränke bzw. Inkubatoren: Heraeus BB16CU / BBD 6220 bzw. T 6120

Neubauer Zählkammer

2.7 Methoden

2.7.1 DNA-Arbeiten

2.7.1.1 Transformation kompetenter E. coli Bakterien

Für die Vervielfältigung von Vektoren wurden Escherischia coli Bakterien des Stammes Top10 F' von der Firma Invitrogen verwendet. Zunächst wurden die Bakterien auf Eis langsam aufgetaut und danach 50µl der Bakterien-Lösung mit 1-5µg des jeweiligen DNA-Vektors für etwa 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 2 Minuten bei 42 °C und danach die Abkühlung auf Eis für ebenfalls 2 Minuten. Nach Zugabe von 400µl LB-Medium wurden die transformierten E. coli Bakterien für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien-Suspension wurde daraufhin mit 50-100ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C inkubiert. Dem LB-Medium wurde Kanamycin zugegeben, da auf den genutzten pEGFP-Vektoren das Kanamycin-Resistenzgen enthalten ist und somit nur erfolgreich transformierte Zellen selektiert werden konnten.

2.7.1.2 Isolation von Plasmid-DNA aus transformierten E. coli Bakterien

Die Isolation der Plasmid-DNA aus den transformierten E. coli Bakterien erfolgte mit Hilfe des NucleoBond® - Kits von der Firma Macherey-Nagel. Die über Nacht gewachsene Bakterien-Suspension wurde für 15 Minuten bei 6.000 x g bei 4 °C zentrifugiert und danach mit Hilfe des Kits aufgearbeitet.

2.7.1.3 Konzentrierung der DNA durch Fällung

Im nächsten Schritt erfolgte die Konzentrierung der DNA mittels Fällung. Dazu wurde zum, nach den Arbeitsschritten mit Hilfe des NucleoBond® - Kits erhaltenen wässrigen Eluats, Isopropranolol hinzugegeben. Es schloss sich eine Zentrifugation bei 15.000 x g für 10 Minuten an. Der erhaltene Überstand wurde verworfen und es erfolgten mehrmalige Waschschriffe des DNA-Pellets mit 70%igem Ethanol. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes wurde das DNA-Pellet luftgetrocknet. Zuletzt wurde das Pellet in TE-Puffer (pH 8,0) oder in Aqua bidest. gelöst.

2.7.1.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der Konzentration der DNA-Menge wurde die Absorption der DNA-Lösung bei 260 nm bestimmt und nach folgender Formel berechnet:

$$c = OD_{260} \times 50 \mu\text{g} / \text{ml} \times \text{VF}.$$

c	Konzentration der DNA-Lösung [$\mu\text{g}/\text{ml}$]
OD_{260}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260nm
VF	zu berücksichtigender Verdünnungsfaktor der untersuchten DNA-Lösung

2.7.1.5 Restriktion von DNA durch Endonukleasen

Die Restriktion der erhaltenen DNA erfolgte durch eine zweistündige Inkubation mit geeigneten Restriktionsenzymen (je nach Vektor) in einem für die jeweils eingesetzten Enzyme geeigneten Puffer bei der für die Enzyme optimalen Temperatur.

2.7.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Nach der Restriktion erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dabei kamen 2%ige Agarosegele zum Einsatz. Zur Herstellung wurde TAE-Puffer mit der entsprechenden Menge Agarose vermischt und in einer Mikrowelle aufgekocht bis die Agarose vollständig gelöst war. Die entstandene Lösung wurde mit 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Ethidiumbromid versetzt, in den vorbereiteten Rahmen (Biorad) gegossen und ausgekühlt. Nach Auftragen der entsprechenden DNA-Lösung und des Mass-Ruler-DNA-Ladder-Markers (5 μl) (Fermentas) als Größenstandard wurde die Elektrophorese in TAE-Puffer bei 60-100 Volt durchgeführt. Zum Nachweis der gewünschten Inserts wurden im Anschluss an den Restriktionsverdau die entstandenen DNA-Fragmente unter UV-Licht bei 254nm Wellenlänge sichtbar gemacht, fotografiert und ausgewertet.

2.7.2 Zellkulturarbeiten

2.7.2.1 PC12-Zellen

Die PC12-Zelllinie entstammt Phäochromozytomzellen der Ratte. Sie stellen ein nützliches Modellsystem in der Neurobiologie dar (Greene et al., 1976). Die PC12-Zellen wurden auf 100 mm Kulturschalen ausgesät und mit einem geeigneten Medium bei 37 °C und 10% CO₂ bis zur Konfluenz kultiviert, gegebenenfalls war ein Wechsel des Kulturmediums erforderlich. Zum Ablösen der PC12-Zellen von der Zellkulturschale wurde das Medium entfernt, mit 5ml PBS gespült und danach mit 1ml (1:10) Trypsinlösung behandelt, welche sofort abgesaugt wurde. Nach Inkubation für ca. 2 Minuten im Brutschrank wurden die Zellen mit 1ml PBS von der Platte gespült und für 2 Minuten bei 1.300 x g zentrifugiert. Die sedimentierten PC12-Zellen konnten daraufhin mit Kulturmedium versetzt, in der gewünschten Dichte erneut ausgesät oder mit 1ml PBS versetzt für Neurotransmitteraufnahmetests verwendet werden.

2.7.2.2 CHO-Zellen

Die verwendeten CHO-Zellen sind Fibroblasten aus Ovarien des chinesischen Hamsters. Die in unserem Labor zur Verfügung stehende Zelllinie ist stabil mit dem vesikulären Monoamintransporter 1 (VMAT1) transfiziert. Die Zellen wurden auf 100 mm Kulturschalen ausgesät und bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Zum Ablösen der Zellen wurde das Medium abgesaugt, mit 5ml PBS gespült und danach 1ml (1:10) Trypsinlösung zugegeben, welche direkt abgesaugt wurde. Nach 2 Minuten Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit 1ml PBS von den Platten abgelöst und daraufhin für 2 Minuten bei 1.300 x g zentrifugiert. Die sedimentierten CHO-Zellen konnten daraufhin mit Kulturmedium versetzt in der gewünschten Dichte erneut ausgesät oder mit 1ml PBS versetzt für Neurotransmitteraufnahmetests verwendet werden.

2.7.3 Bestimmung der Neurotransmitteraufnahme

2.7.3.1 Permeabilisierung von Zellen

Nach Ablösen der Zellen von den Zellkulturschalen und Überführung in Eppendorfgefäße wurden die Zellen bei 1.300 x g für 2 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet erneut in 1ml PBS gewaschen und bei 2.000 x g für 2 Minuten zentrifugiert.

Zur Durchführung der Neurotransmitteraufnahmetests war es nötig, die Zellmembran zu permeabilisieren, damit die verwendeten Neurotransmitter ohne den Einfluss der jeweiligen Plasmamembrantransporter ins Zellinnere gelangen konnten. Dies geschah unter Verwendung des von *Streptococcus pyogenes* stammenden Toxins Streptolysin O (SLO). SLO-Monomere binden an Cholesterin der Zellmembran und bilden nicht-kovalentgebundene Heteromere, welche zur Porenbildung in der Zellmembran führen (Weller et al., 1996). Dadurch wird ein passiver Transport von Neurotransmittern in die Zelle ermöglicht.

Zum nach den Wasch- und Zentrifugationsschritten erhaltenen Zellpellet wurde dann die Permeabilisierungslösung, bestehend aus 1,5ml KG1-Puffer, 10µM DTT als Reduktionsmittel vorhandener Disulfidbrücken und ca. 50 HE/ml SLO zugegeben und auf Eis für 10 Minuten inkubiert. Bei diesem Schritt lagert sich das Toxin an das Cholesterin der Zellmembran an. Durch Erwärmung der Zellsuspension auf 37 °C wird dann die Polymerisierung und die Porenbildung (Durchmesser ca. 12nm) induziert. Nach Zentrifugation bei 2.000 x g und 4 °C für 2 Minuten wurde der Überstand verworfen und die Zellen wurden im je nach Versuchsansatz benötigten KG-ATP-Puffervolumen resuspendiert. Die permeabilisierten Zellen konnten nun für die Neurotransmitteraufnahmetests verwendet werden. Alle Versuche wurden, wenn nicht anders angegeben, mit PC12-Zellen durchgeführt.

2.7.3.2 Monoaminaufnahme in permeabilisierte Zellen

Die, wie unter 2.7.3.1 beschrieben, vorbereiteten Zellen, wurden zu je 25µl auf die erforderliche Anzahl an Reaktionsgefäßen verteilt. Zur Durchführung der Monoaminaufnahme wurden jeweils 25µl einer Lösung, bestehend aus KG-ATP-Puffer mit 80nM Tritium-markiertem Serotonin ($[^3\text{H}]$ -Serotonin), 2mM Ascorbinsäure und je

nach Versuchsaufbau weiteren Zusätzen (Aktivatoren, Inhibitoren oder unmarkierten Zusätzen) zugegeben. Nach einer Inkubation des Gemisches für 10 Minuten bei 37 °C wurde die Monoaminaufnahme durch Zugabe von 500µl eisgekühltem KG1-Puffer beendet. Es folgten zwei Zentrifugationsschritte von jeweils 14.000 x g für 2 Minuten mit daran anschließendem Absaugen des Überstandes. Um die unspezifische [³H]-Serotoninaufnahme zu ermitteln, wurde zusätzlich die Monoaminaufnahme unter Zugabe von 6µM Reserpin ermittelt. Reserpin bindet irreversibel an den vesikulären Monoamintransporter (VMAT) und hemmt damit die spezifische Aufnahme der Monoamine in die Vesikel. Die jeweiligen Pellets wurden mit je 200µl 0,4% Triton-X100 in H₂O resuspendiert und für 20 Minuten bei 42 °C inkubiert und dadurch lysiert. Im Folgenden wurden je 100µl entnommen und in Szintillationsgefäßen mit 4ml Szintillationsflüssigkeit vermischt und im Beckman LS 6500, Liquid Szintillation Counter gemessen. Das übrige Lysat wurde für die Proteinbestimmung verwendet. Die Berechnung der in die Zellen aufgenommenen Tritium-markierten Serotoninmenge wurde nach folgender Formel durchgeführt:

$$MA_{\text{Monoamin}} = 1/60 \text{ Bq} \times \text{dpm} \times 1 / (m_{\text{Protein}} \times 1/1000 \times A_S)$$

MA_{Monoamin}	Monoaminaufnahme, bezogen auf die Proteinmenge der Probe [pmol/mg]
m_{Protein}	Proteinmenge der untersuchten Probe [mg]
dpm	Zerfälle pro Minute (1 dpm = 1/60 Bq)
A_S	spezifische Aktivität des tritiierten Monoamins [TBq/mmol]

Die mit Zusatz von Reserpin ermittelte unspezifische Aufnahme der Monoamine wurde von der für jeden Versuchsansatz errechneten Menge aufgenommenen Monoamins subtrahiert. Bei allen Versuchsansätzen erfolgten Dreifachbestimmungen.

2.7.3.2.1 Monoaminaufnahme unter Zugabe von GMP-P(NH)P

5'-Guanolyimidodiphosphat (GMP-P(NH)P) ist ein schwer hydrolysierbares GTP-Analogon. Das unter 2.7.3.2 beschriebene Vorgehen wurde unter Zugabe von 100µM GMP-P(NH)P durchgeführt und mit zusatzfreien Ansätzen verglichen.

2.7.3.2.2 Monoaminaufnahme unter Zugabe von cAMP bzw. cGMP

Die Durchführung des Experimentes erfolgte wie unter 2.7.3.2 beschrieben. Außerdem wurden entweder 1mM cAMP oder cGMP zum Versuchsansatz hinzugefügt. In einem weiteren Versuchsansatz wurde eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen von 50µM, 100µM, 500µM, 1mM und 5mM von cAMP bzw. cGMP verwendet. Verglichen wurden diese Ergebnisse ebenfalls mit Ansätzen ohne Zusatz von cAMP oder cGMP. Um die Effekte auf die Monoaminaufnahme von cAMP und cGMP direkt vergleichen zu können, wurden außerdem Serotoninaufnahmetests mit beiden Zusätzen in den oben genannten Verdünnungen durchgeführt.

2.7.3.2.3 Monoaminaufnahme unter ansteigenden Konzentrationen von Serotonin

Das Vorgehen, wie unter 2.7.3.2 dargestellt, blieb unverändert. Der Versuch wurde unter Zugabe von 500µM cAMP bzw. cGMP durchgeführt und mit Ansätzen ohne Zusatz sekundärer Botenstoffe verglichen. Außerdem wurde die Konzentration von Serotonin erhöht, indem neben den 80nM Tritium-markierten Serotonins nichtmarkiertes Serotonin in ansteigenden Konzentrationen (0,08µM, 1,28µM, 5,12µM, 20,48µM, 81,92µM, 163,84µM) hinzugefügt wurde. Durch diesen Versuchsansatz sollten die kinetischen Parameter von VMAT1 unter Einfluss von cAMP und cGMP ermittelt werden.

2.7.4 Bestimmung der Neurotransmitteraufnahme nach Transfektion von Zellen

2.7.4.1 Transfektion von Zellen

Für die Transfektionsversuche wurden permanent VMAT1-transfizierte CHO-Zellen verwendet. Das Vorgehen richtete sich nach dem Transfektionsprotokoll für Lipofectamin der Firma Invitrogen. Transfiziert wurde dabei mit den konstitutiv aktiven G α -Untereinheiten Go1 α (pEGFPGo1 α Q205L), Go2 α (pEGFPGo2 α Q205L) und Gq α (pEGFPGq α Q209L). Als Kontrolle wurden CHOVMAT1-Zellen mit dem pEGFP-C1-Vektor von Clontech transfiziert. Dabei wurden 4-10µg der gewünschten DNA in 800µl Opti-MEM I Reduced Serum Medium und 100µl der Lipofectamin-Lösung ebenfalls in

Opti-MEM I Reduced Serum Medium gelöst. Nach Vermischung dieser beiden Ansätze und anschließender Inkubation für etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe 4,8ml Opti-MEM I Medium. Die im Vorfeld angezüchteten Zellen wurden vom Medium befreit. In den Zellkulturschalen wurden außerdem Deckgläschen für die fluoreszenz- und durchlichtmikroskopische Auswertung mitgeführt. Im Anschluss wurden 6,4ml Wachstumsmedium ohne Serum und die DNA-Lipofectamin-Lösung hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C im Brutschrank. Am nächsten Tag wurden erneut 6,4ml des für die Zellen entsprechenden Wachstumsmediums mit der doppelten Serumkonzentration hinzugefügt. Danach wurden die Zellen bis zur gewünschten Wachstumsdichte angezüchtet. Gegebenfalls wurde das Wachstumsmedium gewechselt.

2.7.4.2 Bestimmung der Neurotransmitteraufnahme in transfizierte Zellen

Die transfizierten CHO-Zellen wurden von den Zellkulturschalen abgelöst (siehe 2.7.2.2), außerdem wurden die Deckgläschen entfernt. Nach Zentrifugation der Zellen bei 1.300 x g für 2 Minuten schloss sich die unter 2.7.3.1 beschriebene Permeabilisierung mit SLO an. Anschließend wurde ein Neurotransmitteraufnahmetest mit Tritium-markiertem Serotonin (Zielkonzentration 80nM) durchgeführt. Als Referenz wurden die mit dem Leervektor pEGFP-C1 transfizierten Zellen verwendet. Wie auch bei den anderen Versuchen zur Neurotransmitteraufnahme wurde jeder Ansatz in 3-facher Bestimmung durchgeführt und die unspezifische Neurotransmitteraufnahme durch die Verwendung von Reserpin überprüft. Die Berechnung der aufgenommenen Menge an [³H]-Serotonin erfolgte wie unter 2.7.3.2 beschrieben. Es erfolgte außerdem eine Konzentrationsbestimmung der Proteinmenge nach der BCA-Methode (siehe 2.7.6.1).

2.7.4.3 Immunfluoreszenz und Fluoreszenzmikroskopie

Bevor die Zellen von den Zellkulturschalen abgelöst wurden, wurden die Deckgläschen vorsichtig entfernt und in 24-Loch-Titerplatten zweimal mit PBS gewaschen. Das PBS wurde entfernt und die Deckgläschen wurden zur Fixierung für 20 Minuten mit 4%iger Paraformaldehyd-Lösung inkubiert. Danach erfolgten erneut zwei Waschschrte mit PBS. Nach einer 60-minütigen Inkubation in Blocklösung wurde der in Blocklösung

verdünnte Anti-GFP-Antikörper zu den Deckgläschen gegeben. Nach Inkubation über Nacht wurde am nächsten Tag die Antikörperlösung entfernt und danach für 90 Minuten bei Raumtemperatur der Sekundärantikörper (Oregon green-Antikörper), verdünnt in 2. Antikörper-Lösung, hinzugegeben. Zuletzt wurden die Deckgläschen in PBS gewaschen und mit Hilfe von Immu Mount auf Objektträgern fixiert. Um die Transfektionseffizienz zu bestimmen, wurden die Präparate unter dem Leica DMLB Epifluoreszenzmikroskop betrachtet. Die transfizierten Zellen wurden ausgezählt und mit der Gesamtzahl der Zellen in der Durchlichtmikroskopie verglichen. Dazu wurden pro Transfektionsansatz in jeder Kulturschale mindestens zwei Deckgläschen mitgeführt. Zur Auszählung der transfizierten Zellen wurden unter dem Mikroskop mindestens fünf Gesichtsfelder pro Deckglas ausgezählt und gemittelt.

2.7.5 Homogenisierung von PC12-Zellen und subzelluläre Fraktionierung

Die zur Homogenisierung verwendeten PC12-Zellen wurden nach der Anzucht mit Hilfe von 1ml Trypsinlösung von den Zellkulturschalen abgelöst und in PBS-Puffer gewaschen. Nach Zentrifugation bei 1.000 rpm und 4 °C für 5 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1ml Homogenisierungspuffer resuspendiert. Nach Wiederholung der Zentrifugation und erneuter Resuspension in 1ml Homogenisierungspuffer wurden die Zellen mit Hilfe des Ballhomogenisators (European Molecular Biology Laboratory) homogenisiert. Sämtliche folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis ausgeführt. Das erhaltene Homogenat wurde für 15 Minuten bei 2.400 x g zentrifugiert, um unzerstörte Zellen, Zellfragmente und Zellkerne abzutrennen. Das Pellet wurde in 200µl Homogenisierungspuffer mit Proteaseinhibitoren aufgenommen (P1-Fraktion). Der Überstand wurde für 10 Minuten bei 5.100 x g zentrifugiert, um Plasmamembran- und Kernreste sowie Mitochondrien und Zellorganellen ähnlicher Größe zu entfernen. Das erhaltene Pellet wurde in 100µl Homogenisierungspuffer mit Proteaseinhibitoren resuspendiert (P2-Fraktion). Der Überstand wurde erneut zentrifugiert (für 20 Minuten bei 34.000 x g). Das erhaltene Pellet wurde in 100µl Homogenisierungspuffer mit Proteaseinhibitoren gelöst (LDCV-Fraktion; Large Dense Core Vesicles). Um Mikrosomen vom übrigen Zytosol abzutrennen, wurde der Überstand ein letztes Mal bei 347.000 x g für 30 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100µl Homogenisierungspuffer mit Proteaseinhibitoren

aufgenommen (SLMV; Synaptic-like Microvesicles). Von allen Fraktionen wurde die Proteinkonzentration nach der BCA Methode (siehe 2.7.6.1) bestimmt.

2.7.6 Protein-Techniken

2.7.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die BCA-Methode (Smith PK et al., 1985) angewendet. Die Bestimmung erfolgte in 96-Loch-Mikrotiterplatten. Dazu wurden je 20µl jeder Probe in die Vertiefung pipettiert. Zur Bestimmung einer Standardkurve wurden zudem der Leerwert (0,4% Triton-X100) und verschiedene Konzentrationen einer BSA-Standardlösung (50 – 400µg/ml) gemessen, welche ebenfalls in 0,4% Triton-X100 gelöst wurden. Zu jeder Probe wurden 200µl der Lösung A und Lösung B im Mischverhältnis 50:1 hinzupipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde danach für 30 Minuten im Wasserbad bei 60 °C inkubiert. Nach kurzem Abkühlen wurden die jeweiligen Absorptionen bei einer Wellenlänge von 550nm im Elisa-Reader gemessen. Die Errechnung der Proteinkonzentrationen erfolgte über die Standardkurve. Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt, woraus sich ein Mittelwert für jeden Probenansatz ergab.

2.7.6.2 SDS-PAGE

Zum Nachweis von Proteinen in den subzellulären Fraktionen kam das Verfahren der SDS-PAGE (sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) zur Anwendung. Dieses dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Die zu untersuchenden Proben wurden mit 4-fachem Probenpuffer versetzt, für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und danach auf Eis gekühlt. Anschließend wurden, entsprechend der Proteinkonzentration in der jeweiligen Fraktion, die Proben auf die 0,75 mm dicken Gele aufgetragen. Diese wurden zuvor vorbereitet, bestehend aus einem 3,75%igen Sammelgel und einem 8%igen, 10%igen bzw. 12%igen Trenngel. Zudem diente als Referenz der LMW-Standard (low molecular weight) oder die PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas), Gemische von Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht. Die Elektrophorese erfolgte in der Mini Protean II

Elektrophorese-Kammer (BioRad) mit 1-fachem Elektrophoresepuffer. Die angelegte Spannung betrug zunächst 80 V im Sammelgel, danach 150 V im Trenngel.

2.7.6.3 Western-Blot und Immunfärbung

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Sammelgel vom Trenngel entfernt und das Trenngel in Proteintransferpuffer überführt. Mittels Western-Blot erfolgte dann der Transfer der aufgetrennten Proteine vom Trenngel auf Nitrozellulosemembranen im Semi-Dry-Verfahren. Dazu wurde die TransBlot SD-Kammer (Biorad) verwendet. Zunächst wurden zwei Schichten von passend geschnittenem, in Transferpuffer getränktem Filterpapier auf die Anode gelegt. Darauf wurde das Sammelgel platziert. Abgedeckt wurde dies wiederum mit Filterpapier, um darüber die Kathode zu platzieren. Geblottet wurde mit 0,3 A / Gel für 45 Minuten. Im Anschluss erfolgte die Anfärbung der Nitrozellulosemembran mit Ponceau S-Lösung, um die Proteinbanden darzustellen. Nun konnten die Membranen, je nach dem zu untersuchenden Protein, zerschnitten werden, wodurch eine Inkubation mit verschiedenen Antikörpern ermöglicht wurde. Im nächsten Schritt wurden die Nitrozellulosemembranen mit Magermilchlösung über 60 Minuten gewaschen, um unspezifische Antikörperbindungsstellen abzudecken. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper in ausreichender Menge Antikörperlösung und in einer geeigneten Verdünnung bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Membranen vier Mal mit Magermilchlösung für je 15 Minuten gewaschen. Im Folgenden wurden die Blots für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit einem mit Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert und dann mehrfach mit TS-Tween-Puffer gewaschen. Daraufhin konnte die Chemilumineszenz-Reaktion nach der „*enhanced chemiluminescence*“ (ECL)-Methode erfolgen (Xu HJ et al., 1992). Sichtbar gemacht wurde diese Reaktion nach Zugabe des Chemilumineszenz-Reagens mit Hilfe von Fotofilm (GE Healthcare), welcher auf die Blots für bis zu 60 Sekunden in eine Filmkassette gelegt wurde. Die Entwicklung des Fotofilms erfolgte danach in der Cawomat 2000 IR Entwicklungsmaschine vollautomatisch.

3 Ergebnisse

3.1 Die PC12-Zelllinie als Modellsystem zur Untersuchung der Regulation des vesikulären Monoamintransporters 1

Aus vorangegangenen Experimenten ist bekannt, dass die Aktivität von VMAT1 durch vesikelassoziierte heterotrimere G-Proteine reguliert wird. Kommt es zur Aktivierung der α -Untereinheit, wird die VMAT1- und 2-Aktivität gehemmt und der Monoamintransport ins Vesikellumen ist reduziert. In neuroendokrinen Zellen und Neuronen ist für diesen Effekt die $G_{o2\alpha}$ -Untereinheit verantwortlich (Ahnert-Hilger et al., 1998; Höltje et al., 2000), wohingegen in Thrombozyten die $G_{q\alpha}$ -Untereinheit die Transportaktivität vermindert (Höltje et al., 2003). Zudem ist bekannt, dass die Hemmung der Transportaktivität vom Füllungszustand des Vesikels abhängig ist (Höltje et al., 2003; Brunk et al., 2006). Dabei fungiert die intraluminale Schleife zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne von VMAT als Sensor für den Füllungszustand (Brunk et al., 2006). Über die genauen Signaltransduktionsmechanismen, die zur Aktivierung der heterotrimeren G-Proteine und letztendlich zur Hemmung der vesikulären Monoaminaufnahme ins Vesikelinnere führen, gibt es bisher keine genauen Erkenntnisse.

Für die Untersuchung der Regulation des VMAT1 wurden vorwiegend die neuroendokrinen PC12-Zellen verwendet. Sie entstammen einem Phäochromozytom der Ratte und besitzen alle für die Monoaminsynthese und –speicherung nötigen Enzyme (Greene et al., 1976). PC12-Zellen exprimieren nur den vesikulären Monoamintransporter 1.

Um die Signaltransduktionsmechanismen der G-Protein vermittelten Regulation der Monoaminspeicherung näher untersuchen zu können, musste in der verwendeten Zelllinie zunächst die Expression der beteiligten Proteine nachgewiesen werden. Nachfolgend wurde die spezifische Monoaminaufnahme über VMAT1 und deren spezifische Hemmung nach G-Protein Aktivierung näher untersucht.

3.1.1 Charakterisierung der PC12-Zellen

Für eine genauere Charakterisierung der PC12-Zellen wurden die Techniken der subzellulären Fraktionierung, der SDS-PAGE und des Western-Blots mit nachfolgender Immunfärbung angewendet.

Folgende Fraktionen wurden hergestellt und untersucht: In der P1-Fraktion befinden sich nach der Zentrifugation unzerstörte Zellen, größere Zellfragmente und Zellkerne. In der P2-Fraktion sind kleinere Zellfragmente, Mitochondrien, Endosomen und Lysosomen und in der LDCV-Fraktion sind größere Vesikel zu finden. Mikrosomen befinden sich in der SLMV-Fraktion und im Überstand das Zytosol. Bei den untersuchten Proteinen handelte es sich um Chromogranin B, Synaptophysin, Go2 α , VMAT1 und VMAT2.

Als Marker für vesikuläre Strukturen wurden die Fraktionen auf Synaptophysin und Chromogranin B untersucht. Synaptophysin ist ein Marker für neuroendokrine Differenzierung und für synaptische Vesikel (Evans et al., 2005). Es konnte in allen Fraktionen mit Ausnahme der Überstandsfraktion nachgewiesen werden. Chromogranin B ist ein Marker für LDCVs. Ihm werden Aufgaben in der Biogenese von LDCVs und deren Sortierung innerhalb der Zelle zugeschrieben (Borges et al., 2010). Der vorwiegende Nachweis von Chromogranin B konnte in der P1-, P2- und LDCV-Fraktion erfolgen, jedoch kaum in der SLMV- und Überstandsfraktion. Hieran zeigt sich eine suffiziente Differenzierung zwischen LDCV- und SLMV-Fraktion. VMAT1 konnte, außer in der Überstandsfraktion, in allen Fraktionen nachgewiesen werden. Da VMAT1 auf vesikulären Strukturen erwartet wird, erklärt dies den Nachweis in der LDCV- und SLMV-Fraktion. Der Nachweis in der P1- und P2-Fraktion erklärt sich unter anderem durch eine unvollständige Homogenisierung der PC12-Zellen. Dadurch bleiben größere Zellfragmente intakt, welche auch VMAT1 tragen. Dies erklärt auch das Vorkommen von Chromogranin B und Synaptophysin in der P1- und P2-Fraktion. VMAT2 hingegen konnte in keiner Fraktion nachgewiesen werden (nicht dargestellt). Es ist bereits bekannt, dass PC12-Zellen ausschließlich VMAT1 exprimieren (Liu et al., 1992). Go2 α konnte in allen Fraktionen nachgewiesen werden. Von besonderer Bedeutung ist der Nachweis von Go2 α in der LDCV- und SLMV-Fraktion, in der sich die vesikulären Strukturen und damit auch der VMAT1 befinden, welche mit Go2 α assoziiert sind

(Pahner et al., 2002). Da $Go2\alpha$ aber auch auf weiteren Strukturen innerhalb der Zelle vorkommt, erklärt dies das Auftreten in der P1- und P2-Fraktion.

Zusammenfassend konnten die für die Untersuchung der VMAT1-Regulation durch $Go2\alpha$ erforderlichen Proteine in den PC12-Zellen nachgewiesen werden, eine wichtige Voraussetzung für alle weiteren Experimente. Die Ergebnisse der Immunfärbung sind in Abbildung 4 dargestellt.

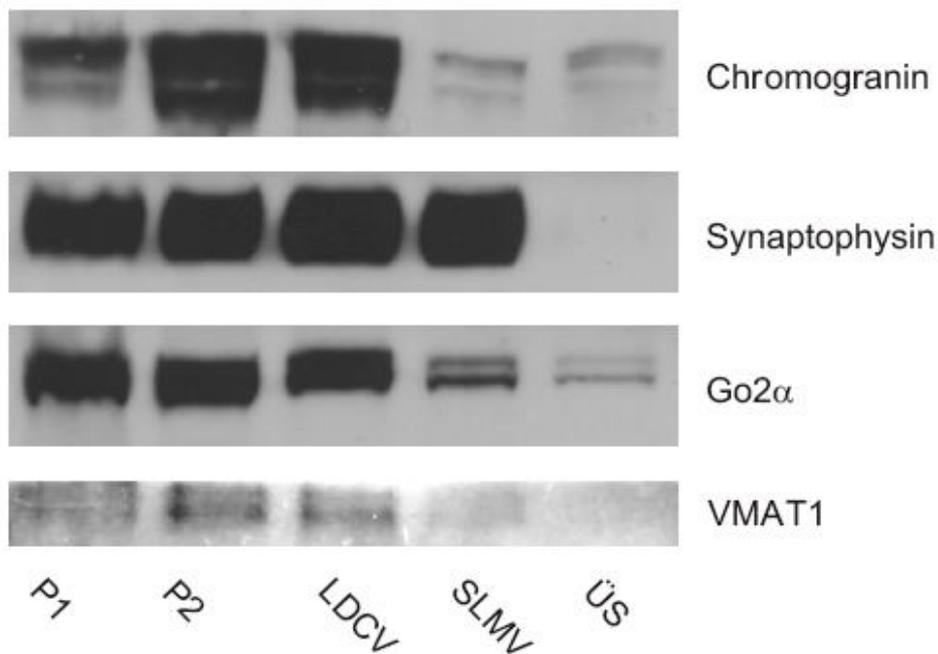


Abbildung 4: Darstellung von Chromogranin B, Synaptophysin, $Go2\alpha$ und VMAT1 nach Homogenisierung und Fraktionierung von PC12-Zellen und anschließender elektrophoretischer Auftrennung, Western-Blot und Immunfärbung

Dargestellt sind die einzelnen Fraktionen P1, P2, LDCV, SLMV und Überstand (ÜS) nach elektrophoretischer Auftrennung, Western Blot und Immunfärbung. Zuvor wurden die PC12-Zellen im Ballhomogenisator homogenisiert und in mehreren Zentrifugationsschritten fraktioniert. Vor der Immunfärbung wurden die Nitrozellulosemembranen nach der zu erwartenden Laufweite der einzelnen Proteine je nach deren Molekulargewicht zugeschnitten. Alle Banden befanden sich im Bereich dieser mit Hilfe von Referenzmarkern bestimmten erwarteten Laufweite. Chromogranin B befand sich bei einer Laufweite von 110kDa und konnte v. a. in der P1-, P2- und LDCV-Fraktion nachgewiesen werden. Synaptophysin konnte bei einer Laufweite von etwa 38kDa nachgewiesen werden. Es kommt in allen Fraktionen außer dem ÜS vor. $Go2\alpha$ findet sich zum Einen in den Vesikel assoziierten Fraktionen (LDCV und SLMV), zum Anderen auch in der P1- und P2-Fraktion, aber nur zu sehr geringen Anteilen im ÜS. Die Laufweite von $Go2\alpha$ lag erwartungsgemäß bei ca. 39kDa. VMAT1 konnte v. a. in der P1- und LDCV-Fraktion, aber auch in der SLMV-Fraktion nachgewiesen werden. Die Laufweite lag bei etwa 55kDa. VMAT2 konnte bei einer erwarteten Laufweite von 55kDa nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

3.1.2 Vesikuläre Monoaminaufnahme und Hemmung durch Aktivierung heterotrimerer G-Proteine

Um die vesikuläre Monoaminaufnahme und -speicherung zu untersuchen, wurden Serotoninaufnahmetests an mit Hilfe von SLO permeabilisierten PC12-Zellen durchgeführt. Durch die Permeabilisierung wird die Diffusion des Serotonins in das Zellinnere ermöglicht und somit die Voraussetzung geschaffen, die vesikuläre Serotoninaufnahme zu bestimmen. Für den Inkubationsansatz wurde ein, an das intrazelluläre Milieu angepasster, Natrium-freier Puffer und ATP (KG3) benutzt. Durch die Zugabe von Reserpin wurde die unspezifische Serotoninanreicherung bestimmt. Reserpin bewirkt eine irreversible Hemmung von VMAT und verhindert somit die Aufnahme von Serotonin ins Vesikellumen. Die unspezifische vesikuläre Aufnahme von Tritium-markiertem Serotonin kann somit durch die Zugabe von Reserpin bestimmt und die spezifische Aufnahme durch die Differenz der Gesamtaufnahme ohne Reserpin errechnet werden. Dabei konnte im Ansatz unter Inkubation mit Reserpin ein Anteil der unspezifischen Anreicherung von Serotonin von 15% (0,488pmol/mg Protein) der Gesamtaufnahme nachgewiesen werden (Abbildung 5A). Bei allen folgenden Serotoninaufnahmetests wurden diese mit Hilfe von Reserpin erhaltenen Werte als unspezifische Serotoninanreicherungen abgezogen.

PC12-Zellen exprimieren, wie unter 3.1.1 gezeigt, als einzigen vesikulären Monoamintransporter VMAT1, welcher sich auf den elektronendichten dense core vesicles befindet. Dass die vesikuläre Serotoninaufnahme unter dem Einfluss heterotrimerer G-Proteine steht, kann unter Verwendung von schwer hydrolysierbaren GTP-Analoga gezeigt werden. Bei Zusatz von GMP-P(NH)P konnte eine Verminderung der [³H]-Serotoninaufnahme in die Vesikel gezeigt werden (Abbildung 5B). In PC12-Zellen beträgt die Hemmung der Serotoninaufnahme 26% von der Gesamtaufnahme. Gleiche Effekte konnten auch in anderen, VMAT2 exprimierenden Modellsystemen, wie in Präparationen synaptischer Vesikel der Maus (Höltje et al., 2000), in Thrombozyten (Höltje et al., 2003) und den VMAT1 und VMAT2 exprimierenden Zellen der BON-Zelllinie (Höltje et al., 2000) gezeigt werden.

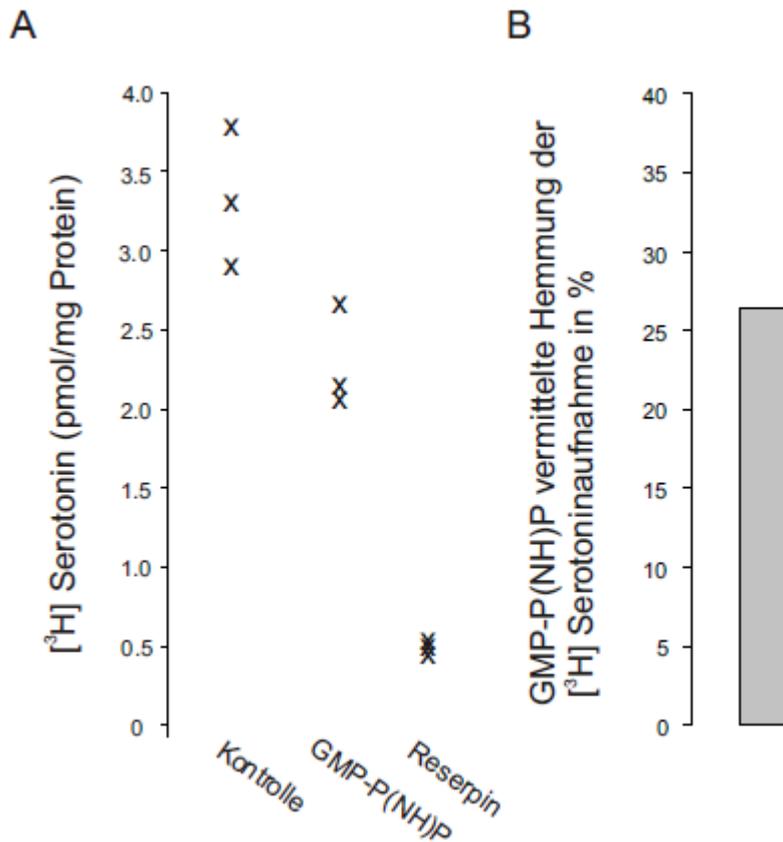


Abbildung 5: Wirkung von GMP-P(NH)-P und Reserpin auf die vesikuläre Serotoninaufnahme.

- A) Permeabilisierte PC12-Zellen wurden mit Tritium-markiertem Serotonin inkubiert. Zusätzlich wurde entweder das GTP-Analogon GMP-P(NH)-P oder Reserpin zugesetzt. Es zeigten sich eine Hemmung der vesikulären Serotoninanreicherung durch die G-Protein Aktivierung durch GMP-P(NH)-P und eine deutliche Hemmung der Serotoninaufnahme in die Vesikel durch Reserpin.
- B) Prozentuale Darstellung der verminderten spezifischen vesikulären Serotoninaufnahme unter dem Einfluss von GMP-P(NH)-P im Vergleich zu den Kontrollen.

Die Grafiken zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus drei separat durchgeführten Experimenten mit gleichem Ergebnis.

3.2 Einfluss sekundärer Botenstoffe auf die vesikuläre Monoaminaufnahme über VMAT1

Eine direkte Interaktion zwischen den vesikulären Monoamintransportern und heterotrimeren G-Proteinen konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Davon ausgehend sind zwischengeschaltete Signaltransduktionsschritte wahrscheinlich, welche zur Hemmung der Transportaktivität von VMAT führen. Zentrale Elemente vieler Signaltransduktionskaskaden sind die sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP. Durch Nakanishi et al. konnte bereits eine Verminderung der vesikulären Monoaminaufnahme in PC12-Zellen durch Inkubation mit cAMP gezeigt werden (Nakanishi et al., 1995a).

Durch Versuche an Thrombozyten war ein Einfluss von sowohl cAMP als auch cGMP auf die vesikuläre Serotoninaufnahme über VMAT2 bekannt (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe).

Das Ziel der nachfolgend beschriebenen Experimente sollte es sein, die Beeinflussung der vesikulären Monoaminaufnahme über VMAT1 in PC12-Zellen durch die sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP zu untersuchen.

3.2.1 Einfluss von cAMP auf die vesikuläre Serotoninaufnahme in PC12-Zellen

Um einen Einfluss des sekundären Botenstoffes cAMP auf die vesikuläre Serotoninaufnahme zu untersuchen, wurden Serotoninaufnahmetests an SLO-permeabilisierten PC12-Zellen in An- und Abwesenheit von cAMP durchgeführt.

Erste Vorversuche mit 500µM cAMP hatten bestätigt, dass, wie bereits in der Vergangenheit nach einer Vorbehandlung von PC12-Zellen mit dibutyryl-cAMP gezeigt wurde (Nakanishi et al., 1995a), die Anwesenheit von cAMP zu einer verminderten vesikulären [H^3]-Serotoninaufnahme führt (nicht gezeigt). Um den Effekt von cAMP bei direkter Anwesenheit während des vesikulären Uptakes genauer zu charakterisieren, wurden im nächsten Schritt neben den Kontrollansätzen ohne cAMP die Auswirkung verschiedener Konzentrationen von cAMP (50µM, 100µM, 500µM, 1mM bzw. 5mM) auf die vesikuläre Serotoninaufnahme getestet. Hierbei zeigte sich eine konzentrationsabhängige Verminderung der Serotoninaufnahme in die Vesikel der permeabilisierten PC12-Zellen (Abbildung 6). Der größte Unterschied im Vergleich zu den Kontrollen betrug 18% bei einer Konzentration von 5mM cAMP. Es fiel auch auf, dass die Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme ab cAMP-Konzentrationen von 500µM praktisch nicht weiter zunahm. So betrug der Unterschied zwischen den erhaltenen Werten bei Inkubation mit 500µM und 5mM cAMP lediglich 3,2%. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass cAMP-abhängige Signalkaskaden in vitro einen Einfluss auf die vesikuläre Serotoninaufnahme und –speicherung haben.

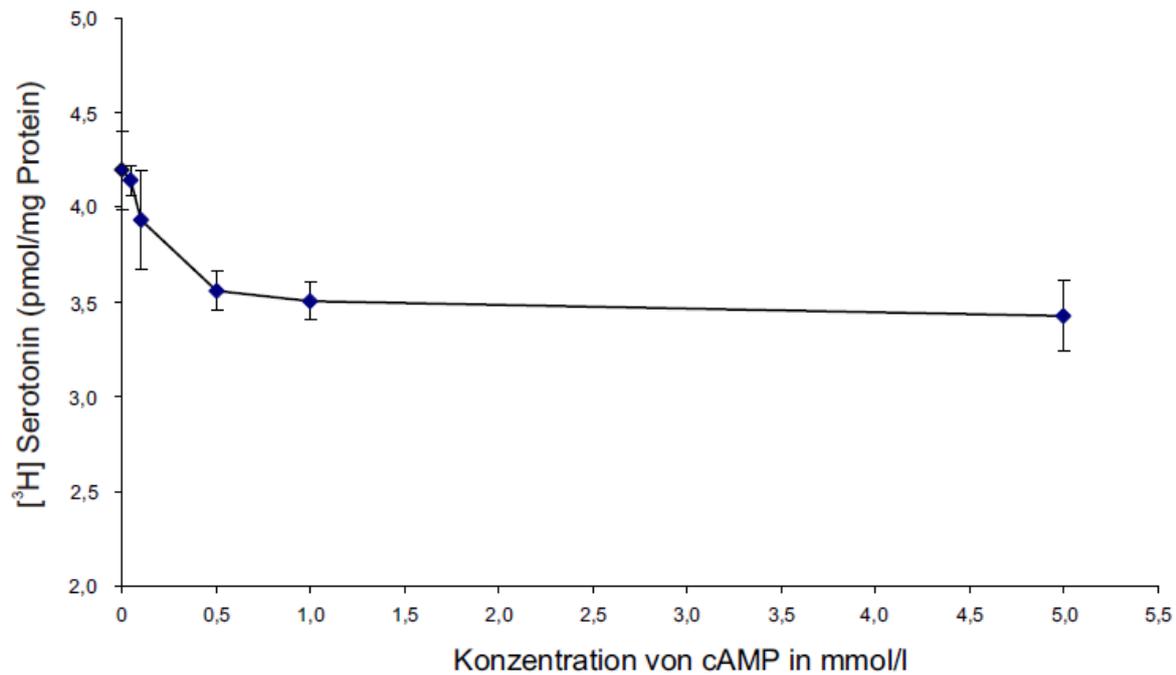


Abbildung 6: Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme unter dem Einfluss ansteigender Konzentrationen von cAMP.

In permeabilisierten PC12-Zellen wurde die vesikuläre Serotoninaufnahme in Anwesenheit ansteigender Konzentrationen von cAMP (50µM, 100µM, 500µM, 1mM und 5mM) bestimmt. Im Vergleich zu den Kontrollen ohne Zusatz von cAMP zeigte sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme durch cAMP.

Die Grafik zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus vier separat durchgeführten Experimenten mit dem gleichen Ergebnis. Bei jedem Experiment wurden jeweils drei individuelle Proben gemittelt und die Standardabweichung bestimmt. Der Student's t-Test ergab eine Signifikanz von $p < 0,03$ für die Proben nach Inkubation von 5mM cAMP.

3.2.2 Einfluss von cGMP auf die vesikuläre Serotoninaufnahme in PC12-Zellen

In ersten Vorversuchen zeigte sich in Anwesenheit von cGMP eine Reduktion der vesikulären Serotoninaufnahme in PC12-Zellen im Vergleich zu nicht mit cGMP inkubierten PC12-Zellen (nicht gezeigt). Daher wurden weitere Serotoninaufnahmetests mit unterschiedlichen Konzentrationen von cGMP (50µM, 100µM, 500µM, 1mM bzw. 5mM) mit den Kontrollansätzen ohne cGMP verglichen. Dabei konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung der [³H]-Serotoninaufnahme in PC12-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 7). Bei einer Konzentration von 5mM cGMP betrug diese Aufnahmeminderung 25% im Vergleich zu den Kontrollen. Auffällig war zudem, dass die Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme bei Konzentrationen über 1mM praktisch kaum mehr zunahm.

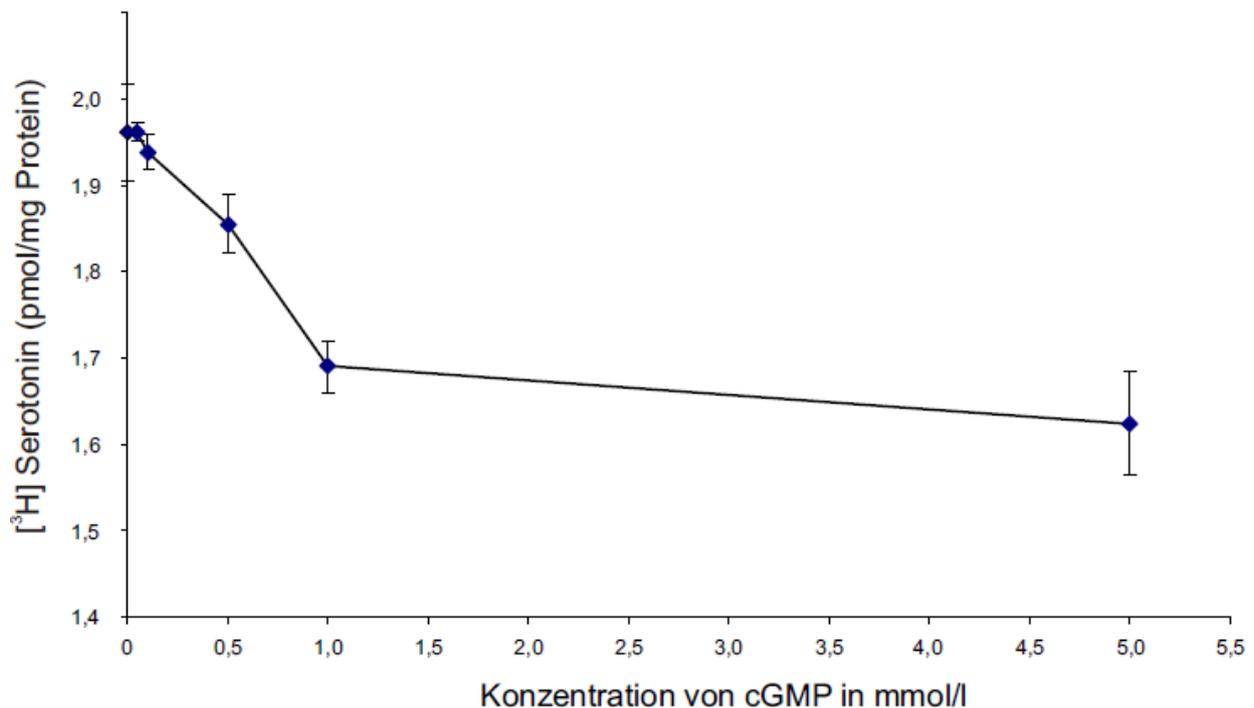


Abbildung 7: Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme unter dem Einfluss ansteigender Konzentrationen von cGMP.

Die vesikuläre Serotoninaufnahme wurde in permeabilisierten PC12-Zellen unter Zugabe von ansteigenden Konzentrationen von cGMP (50 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1mM und 5mM) bestimmt. Dabei zeigte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der vesikulären Serotoninaufnahme durch cGMP im Vergleich zu den Kontrollen.

Die Grafik zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus drei separat durchgeführten Experimenten mit dem gleichen Ergebnis. Dabei wurden bei jedem Experiment jeweils drei individuelle Proben gemittelt und die Standardabweichung bestimmt. Der Student's t-Test ergab eine Signifikanz von $p < 0,02$ für die Proben nach Inkubation mit 1mM und 5mM cGMP.

3.2.3 Einfluss von cAMP und cGMP auf die vesikuläre Serotoninaufnahme im direkten Vergleich

In den Serotoninaufnahmetests unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen von cAMP und cGMP konnte für beide sekundären Botenstoffe eine Hemmung der vesikulären Aufnahme und Speicherung von Tritium-markiertem Serotonin gezeigt werden. Es war trotz scheinbarer Unterschiede in den Vorexperimenten allerdings nicht möglich, Aussagen zu treffen, welcher der beiden sekundären Botenstoffe eine stärkere Hemmung auf die Füllung der Vesikel ausübt. Dazu wurden, analog zu den bisherigen Experimenten, Serotoninaufnahmetests an permeabilisierten PC12-Zellen durchgeführt, wobei diesmal für beide sekundären Botenstoffe zeitgleich und mit derselben Zellpopulation gearbeitet wurde. Es kamen verschiedene Konzentrationen von cAMP bzw. cGMP (100 μ M, 500 μ M, 1mM, 5mM) zum Einsatz. Im Vergleich zu den Kontrollen

ohne Zugabe eines sekundären Botenstoffes zeigte sich sowohl für cAMP als auch für cGMP eine Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme, deren Ausmaß konzentrationsabhängig war (Abbildung 8). Bei einer Konzentration von 5mM zugesetztem sekundären Botenstoff fiel die vesikuläre Monoaminaufnahme bei cAMP um 19,0% und bei cGMP um 20,5% im Vergleich zur Kontrolle ohne Zusatz eines der beiden sekundären Botenstoffe geringer aus. Dies stimmt weitestgehend mit den zuvor erhaltenen Ergebnissen der Einzelexperimente überein. Ein deutlicher Unterschied zwischen dem Einfluss von cAMP und cGMP auf die vesikuläre Serotoninaufnahme konnte nicht nachgewiesen werden. In der Tendenz war die Hemmwirkung auf die Serotoninaufnahme in allen Experimenten von cGMP etwas stärker als die von cAMP.

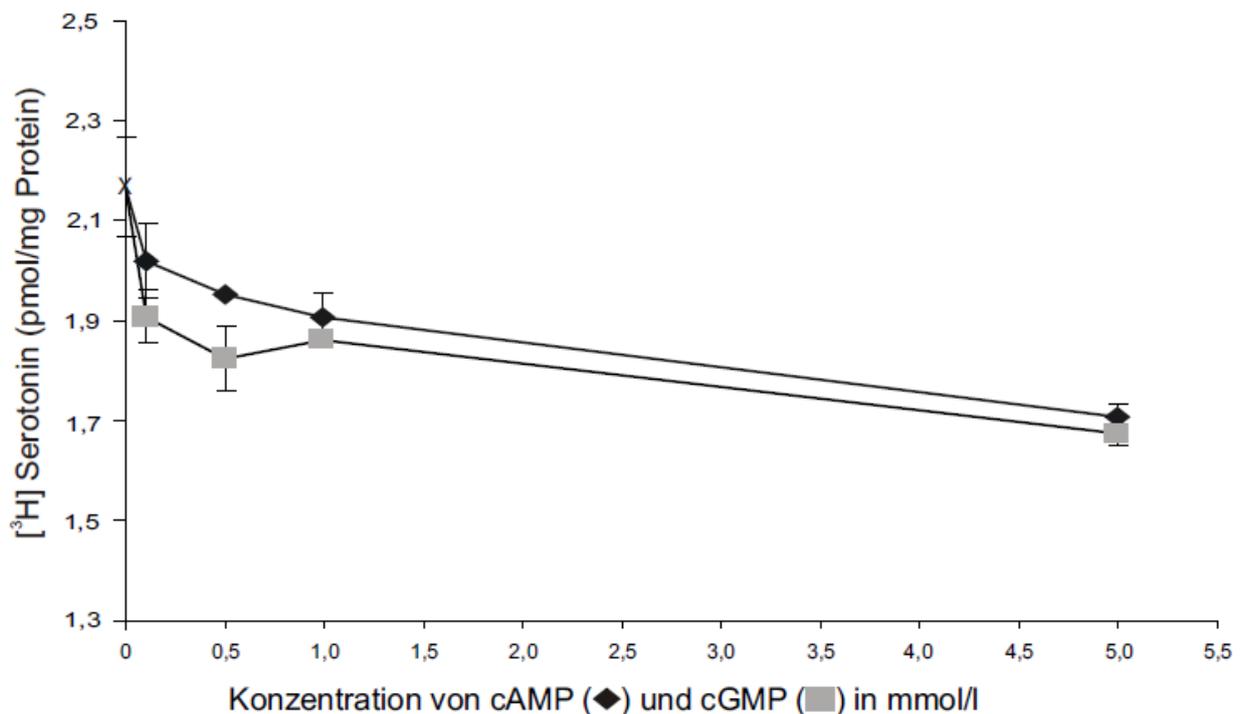


Abbildung 8: Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme unter dem Einfluss ansteigender Konzentrationen von cAMP bzw. cGMP im direkten Vergleich.

An permeabilisierten PC12-Zellen wurde der Einfluss von cAMP und cGMP auf die vesikuläre Serotoninaufnahme im direkten Vergleich durchgeführt. Dabei wurden jeweils ansteigende Konzentrationen von cAMP bzw. cGMP (100µM, 500µM, 1mM und 5mM) zugesetzt. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme sowohl für cAMP als auch für cGMP, wobei die Hemmung unter Einfluss von cGMP etwas stärker war.

Die Grafik zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus vier separat durchgeführten Experimenten mit dem gleichen Ergebnis. In jedem Experiment wurden drei individuelle Proben gemittelt und die Standardabweichung bestimmt. Der Student's t-Test ergab eine Signifikanz von $p < 0,02$ für die Proben nach Inkubation mit 5mM cAMP und cGMP und 500µM cGMP und eine Signifikanz von $p < 0,05$ für die Proben nach Inkubation mit 1mM und 100µM cGMP.

3.2.4 Beeinflussung der Transportgeschwindigkeit und der Substrataffinität von VMAT1 in PC12-Zellen durch die sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP

In weiteren Experimenten wurden die Inhibitionscharakteristika (Einfluss auf Transportgeschwindigkeit und Substrataffinität) von cAMP und cGMP bei der Hemmung von VMAT1 untersucht. Permeabilisierte PC12-Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen von Serotonin (0,08 μ M; 1,28 μ M; 5,12 μ M; 20,48 μ M; 81,92 μ M; 163,84 μ M) für 10 Minuten bei 37° C in An- und Abwesenheit von 500 μ M cAMP oder cGMP inkubiert.

Vergleicht man die Ergebnisse der Kontrollen für jede individuelle Serotoninkonzentration mit denen, bei denen cAMP zugesetzt wurde, fällt auf, dass die vesikuläre Serotoninaufnahme ohne Zusatz von cAMP stets höher als unter Einfluss von cAMP war. Es zeigten sich eine Verminderung des K_M -Wertes (analog zum K_M -Wert bei Enzymkinetiken als Maß für die Substrataffinität des Transporters verwendet) und ein Absinken der maximalen Transportgeschwindigkeit unter Einfluss von cAMP im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 9).

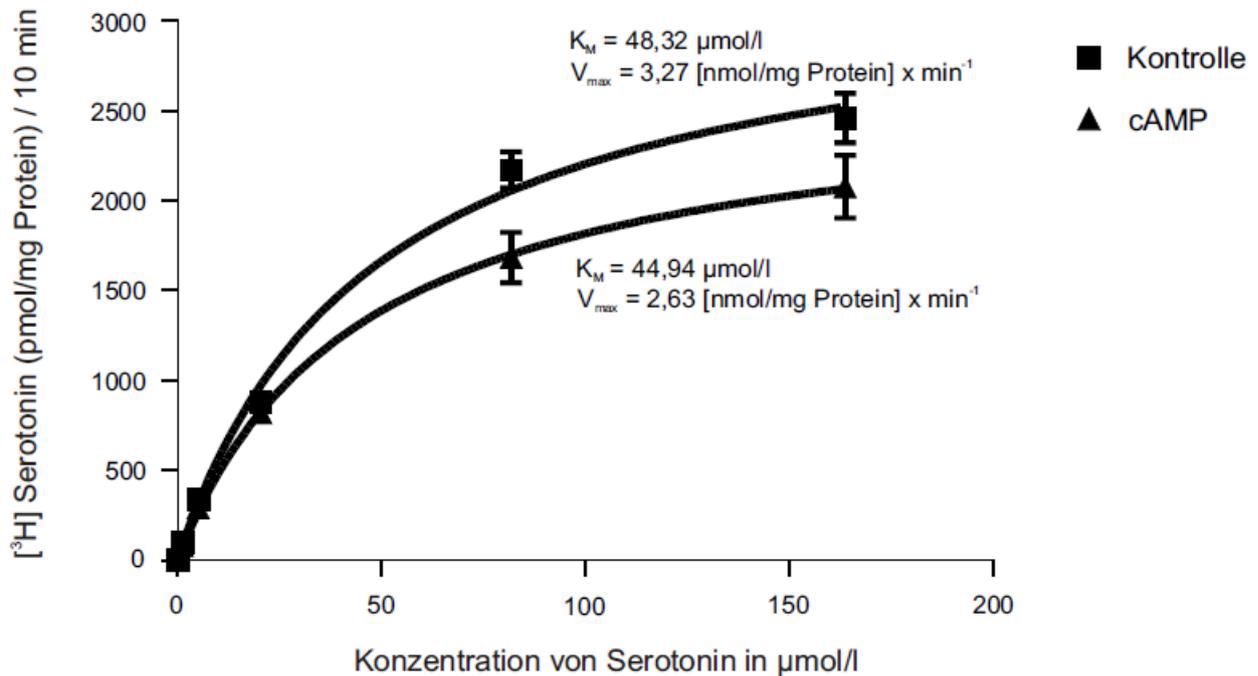


Abbildung 9: Kinetik der Serotoninaufnahme in permeabilisierte PC12-Zellen unter An- und Abwesenheit von 500 mM cAMP.

Permeabilisierte PC12-Zellen wurden mit ansteigenden Serotoninkonzentrationen (bestehend aus [^3H]-markiertem und nicht radioaktiv markiertem Serotonin) inkubiert. Zur Hälfte der Probenansätze wurden für jede Serotoninkonzentration 500mM cAMP zugesetzt. Es zeigte sich eine Verminderung der Maximalgeschwindigkeit unter Einfluss von cAMP. Des Weiteren fiel ein Abfall des K_M -Wertes bei den Proben, denen zusätzlich cAMP zugesetzt wurde, auf.

Die Grafik zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus drei separat durchgeführten Experimenten mit gleichem Ergebnis. In jedem Experiment wurden drei individuelle Proben gemittelt und die Standardabweichung bestimmt. Der Student's t-Test ergab eine Signifikanz von $p < 0,05$ für die Proben mit $0,08\mu\text{M}$, $1,28\mu\text{M}$, $20,48\mu\text{M}$ und $163,84\mu\text{M}$.

Bei den Experimenten mit Zusatz des sekundären Botenstoffes cGMP zeigten sich ebenso verminderte vesikuläre Serotoninaufnahmen bei jeder Serotoninkonzentration im Vergleich zu den Kontrollen ohne Zusatz von cGMP. Dabei wurde ein leichter Anstieg des K_M -Wertes bei den mit cGMP inkubierten Ansätzen deutlich. Außerdem war die maximale Transportgeschwindigkeit niedriger als bei den Kontrollen (Abbildung 10). Insgesamt ähnelten sich die Effekte von cAMP und cGMP, wie auch in den vorangegangenen Experimenten.

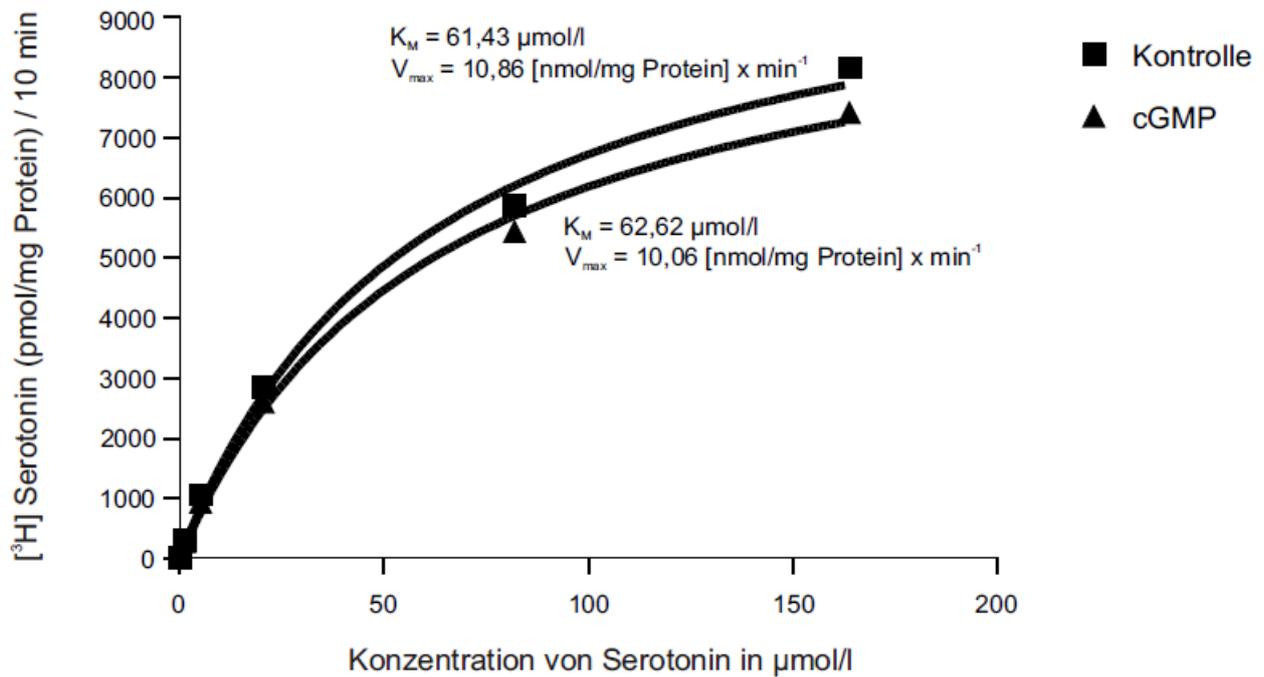


Abbildung 10: Kinetik der Serotoninaufnahme in permeabilisierte PC12-Zellen unter An- und Abwesenheit von 500 mM cGMP.

Unter ansteigenden Konzentrationen von Serotonin (^3H -Serotonin und nichtmarkiertes Serotonin) wurden permeabilisierte PC12-Zellen inkubiert. Zur Hälfte der Probenansätze wurde zudem cGMP in einer Konzentration von 500mM zugegeben. Es zeigten sich eine Verminderung der maximalen Transportgeschwindigkeit und ein geringer Anstieg des K_M -Wertes bei den mit cGMP inkubierten Ansätzen im Vergleich zu den Kontrollen.

Die Grafik zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus drei separat durchgeführten Experimenten mit gleichem Ergebnis. In jedem Experiment wurden drei individuelle Werte gemittelt und die Standardabweichung berechnet. Der Student's t-Test ergab eine Signifikanz von $p < 0,05$ für die Proben mit der Serotoninkonzentration von $0,08\mu\text{M}$, $1,28\mu\text{M}$, $20,48\mu\text{M}$ und $163,84\mu\text{M}$.

Zusammenfassend ließ sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der vesikulären Monoaminaufnahme in PC12-Zellen durch die sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP zeigen, welche sich in einem Absinken der maximalen Transportgeschwindigkeit widerspiegelt. Dabei ergaben sich keine größeren Unterschiede zwischen der Wirkung von cAMP und cGMP.

3.3 Rolle verschiedener G α -Untereinheiten in der G-Protein vermittelten Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme über VMAT1

Der vesikuläre Monoamintransport in synaptische Vesikel über VMAT2 wird durch die Go2 α -Untereinheit reguliert (siehe Abschnitt 1.5). In der neuroendokrinen Zelllinie BON werden sowohl VMAT2 als auch VMAT1 durch Go2 α inhibiert (Höltje et al., 2000). In Thrombozyten dagegen wird VMAT2 durch die Gq α -Untereinheit gehemmt (Höltje et al., 2003). Um eine mögliche differentielle Wirkung von verschiedenen α -Untereinheiten auf die vesikuläre Serotoninaufnahme über VMAT1 zu überprüfen, wurden VMAT1 exprimierende CHO-Zellen mit den mutierten, konstitutiv aktiven α -Untereinheiten Go1 α , Go2 α und Gq α transfiziert. Dazu wurde die cDNA nach ortsspezifischer Mutagenese in den pEGFP-C3-Vektor eingebaut. Parallel dazu wurden CHOVMAT1-Zellen mit dem Leervektor pEGFP-C1 transfiziert. Nach Kultivierung der Zellen im Brutschrank wurden Serotoninaufnahmetests an den permeabilisierten CHO-Zellen durchgeführt. Die Effizienz der Transfektionen wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie ermittelt. Dies war möglich, weil die für die Transfektionen verwendeten Vektoren die DNA-Information für das „grün fluoreszierende Protein“ (GFP) kodierten, welches die CHO-Zellen nach der Transfektion exprimierten. Nach der Bebrütung der Zellen in der Zellkultur wurden die Deckgläschen aus den Kulturschalen entfernt und auf Objektträgern fixiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde danach die Transfektionseffizienz bestimmt, indem das Verhältnis zwischen fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Zellen ermittelt wurde (Abbildung 11 und siehe Abschnitt 2.7.4).

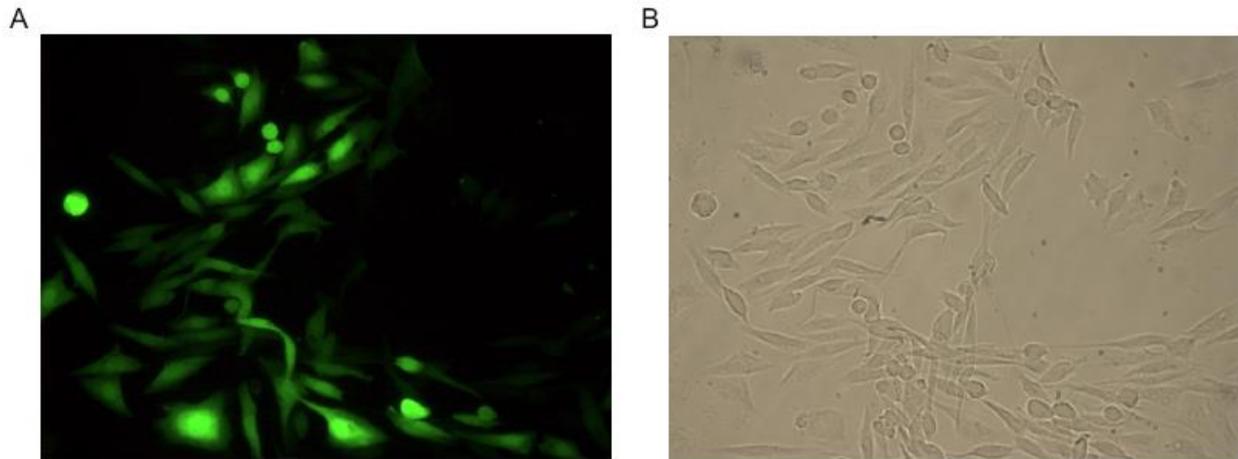


Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopische und durchlichtmikroskopische Darstellung von pEGFP transfizierten CHOVMAT1-Zellen.

Dargestellt sind die fluoreszenzmikroskopische (A) und die durchlichtmikroskopische Ansicht (B) von mit pEGFP transfizierten CHOVMAT1-Zellen. Dabei wurden CHOVMAT1-Zellen mit dem Kontrollvektor pEGFP-C1 transfiziert. Dieser kodiert für das grüne fluoreszierende Protein (GFP). Nach Kultivierung der Zellen für 72 Stunden im Brutschrank wurden die Präparate angefertigt und durch Auszählung der fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Zellen unter dem Epifluoreszenzmikroskop konnte die Transfektionseffizienz bestimmt werden. Analog wurde die Transfektionseffizienz nach Transfektion mit den die Information für die $G\alpha$ -Untereinheiten enthaltenden Vektoren bestimmt.

3.3.1 Effekt von konstitutiv aktivem $Go1\alpha$ auf die Serotoninaufnahme über VMAT1 in CHO-Zellen

Um die Wirkung der aktiven $Go1\alpha$ -Untereinheit auf die vesikuläre Serotoninaufnahme zu bestimmen, wurden CHOVMAT1-Zellen mit der konstitutiv aktiven $Go1\alpha$ -Untereinheit (pEGFPGo1 α Q205L) transfiziert. Nach Kultivierung der transfizierten Zellen für 48 bis 72 Stunden wurden Serotoninaufnahmetests an den permeabilisierten Zellen durchgeführt. Als Kontrolle dienten CHOVMAT1-Zellen, welche mit dem Leervektor pEGFP-C1 transfiziert wurden. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der vesikulären Serotoninaufnahme zwischen den Kontrollen und den mit konstitutiv aktivem $Go1\alpha$ transfizierten Zellen (Abbildung 12). Im Mittel lag die Transfektionseffizienz bei den mit pEGFP-C1 transfizierten CHOVMAT1-Zellen bei etwa 69%. Bei den mit $Go1\alpha$ transfizierten CHOVMAT1-Zellen lag die Transfektionseffizienz bei etwa 62%.

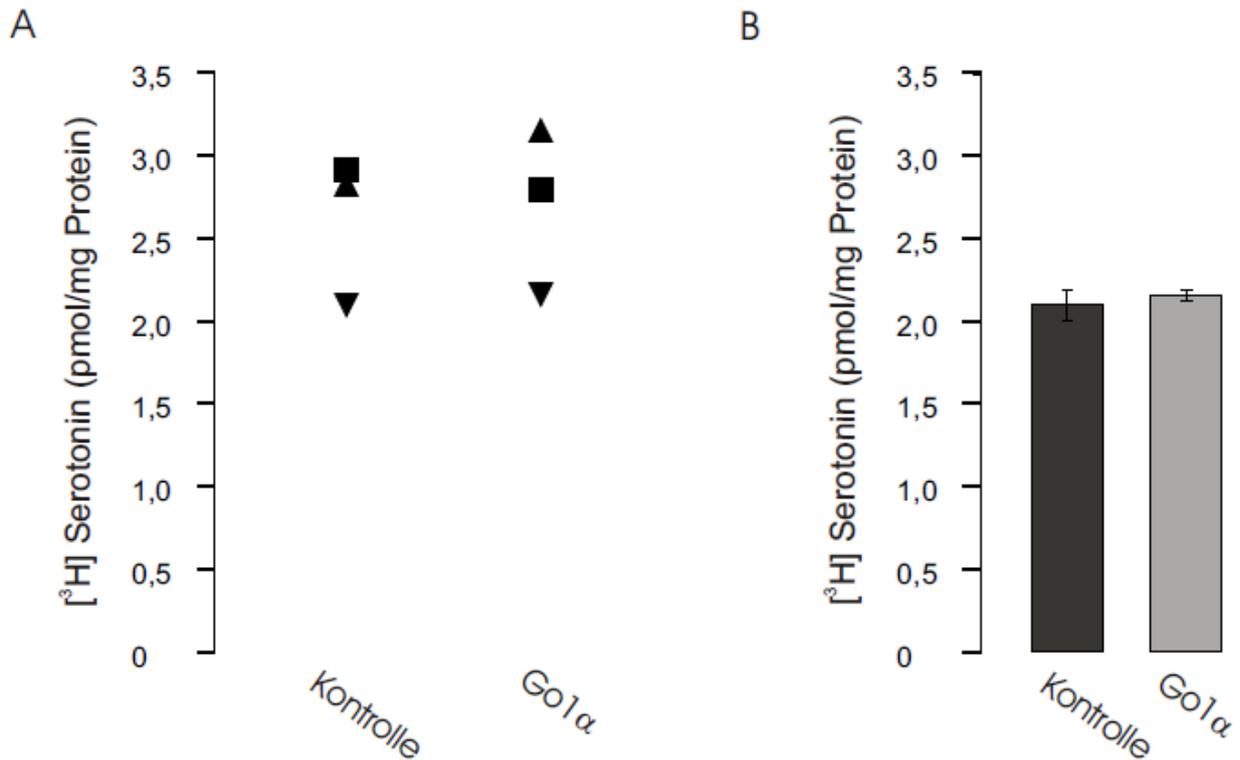


Abbildung 12: Einfluss der konstitutiv aktiven Go1 α -Untereinheit auf die vesikuläre Serotoninaufnahme.

Mit konstitutiv aktivem Go1 α transfizierte und permeabilisierte CHOVMAT1-Zellen wurden mit [³H]-Serotonin inkubiert und die vesikuläre Serotoninaufnahme gemessen. Die Kontrolle erfolgte mit pEGFP-C1 transfizierten CHOVMAT1-Zellen.

12 A) Zeigt das Ergebnis von drei separat und gleichartig durchgeführten Experimenten. In der vesikulären Serotoninaufnahme fielen keine signifikanten Unterschiede zwischen Go1 α und pEGFP-C1 transfizierten Zellen auf.

12 B) Zeigt das Ergebnis eines Einzelerperimentes. Es zeigt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der vesikulären Serotoninaufnahme zwischen Go1 α und pEGFP transfizierten CHOVMAT1-Zellen. Dabei lag die Transfektionseffizienz für die Transfektion mit pEGFP-C1 bei 73% und für Go1 α bei 72%.

12 A) zeigt das Ergebnis dreier separat durchgeführter Experimente. In jedem Experiment wurden vier individuelle Werte gemittelt. Zur Darstellung kommen die gemittelten Werte jedes Einzelerperimentes.

12 B) zeigt ein repräsentatives Ergebnis dreier separat durchgeführter Experimente mit gleichem Ergebnis. Es wurden vier individuelle Werte gemittelt und die Standardabweichung bestimmt. Der Student's t-Test ergab keinen signifikanten Unterschied.

3.3.2 Effekt von konstitutiv aktivem Go2 α auf die Serotoninaufnahme über VMAT1 in CHO-Zellen

Die Wirkung der Go2 α -Untereinheit auf die vesikuläre Serotoninaufnahme wurde analog zu 3.3.1 untersucht. Die mit dem konstitutiv aktiven Go2 α kodierenden Vektor (pEGFP Go2 α Q205L) transfizierten CHOVMAT1-Zellen wurden über 48 bis 72 Stunden kultiviert. Danach wurden die mitgeführten Deckplättchen aus den Zellkulturschalen entfernt und die Zellen nach Permeabilisierung mit Tritium-markiertem Serotonin

inkubiert. Im Vergleich mit den, mit dem Leervektor pEGFP-C1 transfizierten Zellen, zeigte sich eine verminderte vesikuläre Serotoninaufnahme in mit Go2 α Q205L transfizierten CHOVMAT1-Zellen. In diesen war die vesikuläre Serotoninaufnahme im Mittel um 27% geringer als bei den Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden (Abbildung 13). Die Transfektionseffizienz lag im Durchschnitt für die Transfektion mit pEGFP-C1 bei 61% und mit Go2 α bei 56%.

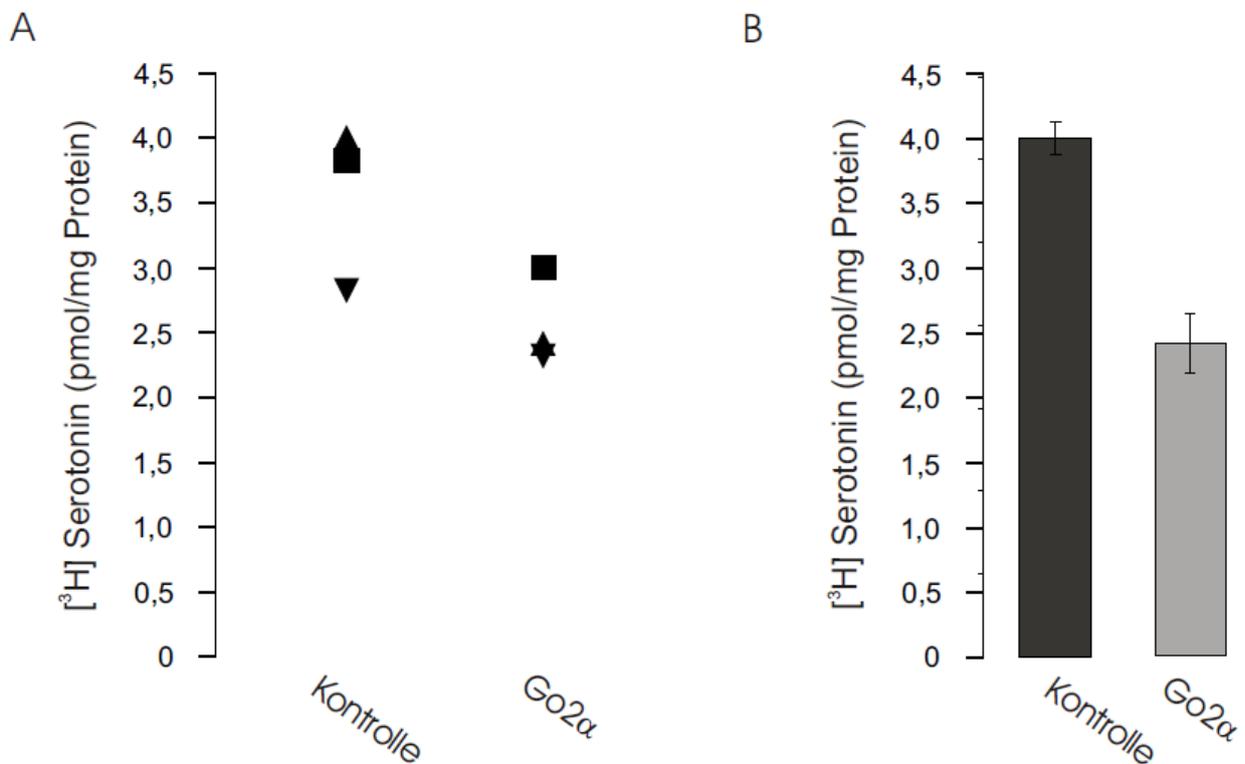


Abbildung 13: Einfluss der konstitutiv aktiven Go2 α -Untereinheit auf die vesikuläre Serotoninaufnahme.

Mit konstitutiv aktivem Go2 α transfizierte und permeabilisierte CHOVMAT1-Zellen wurden mit [³H]-Serotonin inkubiert und die vesikuläre Serotoninaufnahme gemessen. Die Kontrolle erfolgte mit pEGFP-C1 transfizierten CHOVMAT1-Zellen.

13 A) In drei separat und gleichartig durchgeführten Experimenten fällt wiederholt eine signifikante Verminderung der vesikulären Serotoninaufnahme bei mit Go2 α -transfizierten CHOVMAT1-Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit dem Leervektor pEGFP transfiziert wurden, auf.

13 B) Zeigt das Ergebnis eines Einzelerperimentes. Auch hier zeigt sich eine signifikante Verminderung der vesikulären Serotoninaufnahme in den CHOVMAT1-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Leervektor pEGFP-C1). Dabei betrug die Transfektionseffizienz für die Transfektion der CHOVMAT1-Zellen mit pEGFP-C1 62% und mit Go2 α 51%.

13 A) zeigt das Ergebnis dreier separat durchgeführter Experimente. In jedem Experiment wurden vier individuelle Werte gemittelt. Die gemittelten Werte sind in der Abbildung dargestellt. Für die Experimente ergab sich im Student's t-Test eine Signifikanz von $p < 0,05$.

13 B) zeigt ein repräsentatives Ergebnis dreier separat durchgeführter Experimente mit gleichem Ergebnis. Es wurden vier individuelle Werte gemittelt und die Standardabweichung bestimmt. Der Student's t-Test ergab einen signifikanten Unterschied von $p < 0,01$.

3.3.3 Effekt von konstitutiv aktivem Gq α auf die Serotoninaufnahme über VMAT1 in CHO-Zellen

Nach der Transfektion von CHOVMAT1-Zellen mit konstitutiv aktivem Gq α (pEGFPGq α Q209L) und Kultivierung der transfizierten Zellen im Brutschrank für 48 bis 72 Stunden wurde analog zu den Serotoninaufnahmeversuchen mit den Go1 α - bzw. Go2 α -transfizierten Zellen vorgegangen. Als Kontrolle diente der Leervektor pEGFP-C1. Dabei zeigte sich in den Serotoninaufnahmeversuchen eine, im Vergleich zu den Kontrollen, erhöhte vesikuläre Serotoninaufnahme in den mit Gq α transfizierten CHOVMAT1-Zellen. Im Mittel zeigte sich eine Steigerung der vesikulären Serotoninaufnahme um ca. 39% bei den mit Gq α transfizierten CHOVMAT1-Zellen (Abbildung 14). Die Transfektionseffizienz betrug im Mittel für die mit pEGFP-C1 transfizierten CHO-Zellen 68% und für die mit Gq α transfizierten CHO-Zellen 67%.

Zusammenfassend konnte in den unter 3.3 gezeigten Versuchen ein gegenläufiger Effekt der Go2 α - und Gq α -Untereinheiten auf die vesikuläre Serotoninaufnahme in VMAT1-transfizierten CHO-Zellen gezeigt werden. Dabei führt das konstitutiv aktive Go2 α zu der bereits in BON-Zellen beobachteten Hemmung der vesikulären Monoaminaufnahme. Hingegen zeigte sich für die mit konstitutiv aktivem Gq α transfizierten CHO-Zellen eine Zunahme der Serotoninaufnahme. Konstitutiv aktives Go1 α hatte keinen Effekt auf die vesikuläre Serotoninaufnahme.

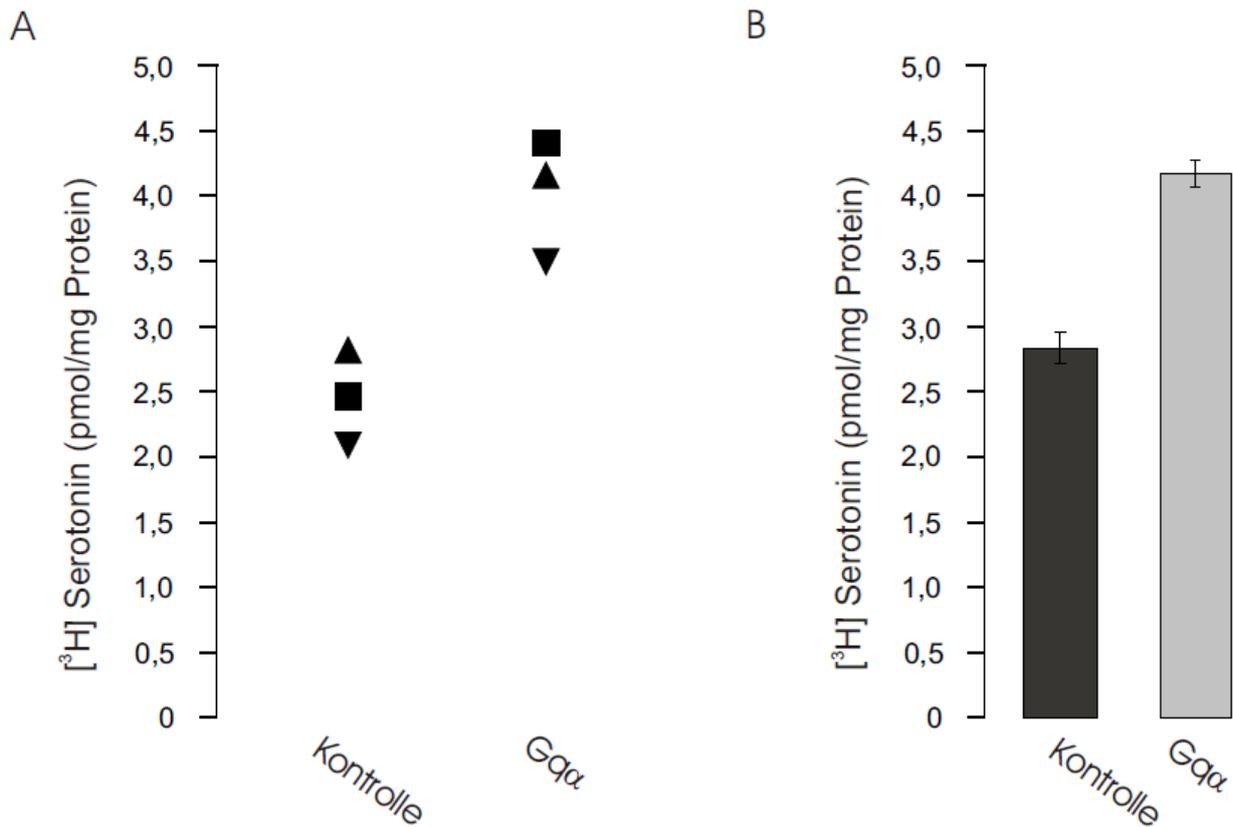


Abbildung 14: Einfluss der konstitutiv aktiven $\text{Gq}\alpha$ -Untereinheit auf die vesikuläre Serotoninaufnahme.

Mit konstitutiv aktivem $\text{Gq}\alpha$ transfizierte und permeabilisierte CHOVMAT1-Zellen wurden mit $[^3\text{H}]$ -Serotonin inkubiert und die vesikuläre Serotoninaufnahme gemessen. Die Kontrolle erfolgte mit pEGFP-C1 transfizierten CHOVMAT1-Zellen.

14 A) Die vesikuläre Serotoninaufnahme in den $\text{Gq}\alpha$ transfizierten CHOVMAT1-Zellen ist in drei separat und gleichzeitig durchgeführten Experimenten signifikant höher als in den mit dem Leervektor pEGFP-C1 transfizierten CHOVMAT1-Zellen.

14 B) Zeigt das Ergebnis eines Einzelexperimentes. Die mit $\text{Gq}\alpha$ transfizierten CHOVMAT1-Zellen zeigen eine signifikant höhere vesikuläre Serotoninaufnahme als die mit pEGFP-C1 transfizierten CHO-Zellen. Die Transfektionsrate lag bei 61% für die Transfektion der CHOVMAT1-Zellen mit pEGFP und bei 64% für die Transfektion mit $\text{Gq}\alpha$.

14 A) zeigt das Ergebnis dreier separat durchgeführter Experimente. In jedem Experiment wurden vier individuelle Werte gemittelt. Die gemittelten Werte sind in der Abbildung dargestellt. Für die Experimente ergab sich im Student's t-Test eine Signifikanz von $p < 0,01$.

14 B) zeigt ein repräsentatives Ergebnis dreier separat durchgeführter Experimente mit gleichem Ergebnis. Es wurden vier individuelle Werte gemittelt und die Standardabweichung bestimmt. Der Student's t-Test ergab einen signifikanten Unterschied von $p < 0,01$.

4 Diskussion

Die synaptische Informationsübertragung wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst. Diese können auf unterschiedlichen Ebenen von Bedeutung sein. Bekannt ist, dass, getriggert durch ein Aktionspotential, synaptische Vesikel unabhängig von ihrem Füllungszustand mit der Plasmamembran fusionieren können. Somit können sowohl mit Neurotransmittern gefüllte als auch leere Vesikel mit gleicher Wahrscheinlichkeit zur Exozytose kommen und ihren Inhalt in den synaptischen Spalt abgeben (van der Kloot, 2000). Eine variable Füllung der Vesikel kann dadurch die postsynaptische Antwort modulieren. Auf postsynaptischer Ebene ist die Signaltransduktion unter anderem von der Anzahl und der Sensitivität der Rezeptoren und Ionenkanäle abhängig. Des Weiteren werden die synaptischen Übertragungsprozesse vom Abbau bzw. der Wiederaufnahme der Neurotransmitter im bzw. aus dem synaptischen Spalt bestimmt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Teil der Signaltransduktionsprozesse, welche an der Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme über VMAT1 beteiligt sind, näher untersucht.

Bekannt ist, dass eine Verminderung der vesikulären Monoaminaufnahme über VMAT durch Aktivierung heterotrimerer G-Proteine vermittelt wird. Dies konnte in Untersuchungen an neuroendokrinen Zellen (Ahnert-Hilger et al., 1998; Höltje et al., 2000), permeabilisierten Thrombozyten (Höltje et al., 2003), transfizierten CHO-Zellen (Brunk et al., 2006) und Präparationen synaptischer Vesikel aus dem Cortex (Höltje et al., 2000) gezeigt werden. Als verantwortliche Untereinheiten wurden in Neuronen und neuroendokrinen Zellen $Go2\alpha$ und in Thrombozyten $Gq\alpha$ identifiziert (Ahnert-Hilger et al., 1998). Zusätzlich ist bekannt, dass die große intraluminale Schleife der VMAT zwischen erster und zweiter Transmembrandomäne als rezeptorähnliche Struktur fungiert und den Füllungszustand des Vesikels misst. Unbekannt ist aber, wie es zur Aktivierung des G-Proteins kommt und welche Effektoren zur Hemmung der VMAT-Aktivität beitragen. Ein Schwerpunkt in dieser Arbeit war die Untersuchung möglicher, der G-Protein Aktivierung nachgeschalteter Signaltransduktionswege, die zur Hemmung der VMAT1-Aktivität und somit zur Verminderung der vesikulären Füllung führen. In diesem Zusammenhang werden die Faktoren, welche den Neurotransmittertransport in die sekretorischen Vesikel beeinflussen, diskutiert und es soll die Rolle der intrazellulären sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP erläutert werden. Ein weiterer

Schwerpunkt war die Untersuchung der Frage, ob verschiedene $G\alpha$ -Untereinheiten in einem System möglicherweise differenzielle Wirkungen auf den vesikulären Monoamintransport über VMAT1 haben. Die physiologische Bedeutung einer solchen Diversität wird beleuchtet.

4.1 Faktoren mit Einfluss auf den vesikulären Monoamintransport

Neben den schon erwähnten Faktoren, die die synaptische Signalübertragung beeinflussen, spielt die vesikuläre Befüllung mit Botenstoffen eine wichtige Rolle. Der vesikuläre Füllungszustand kann durch Modulation des Aufnahme- und Speichervorgangs beeinflusst werden. Hierbei spielt die oben beschriebene durch $G\alpha_2$ vermittelte Signaltransduktion eine wichtige Rolle. Neben der G-Protein vermittelten Regulation kann die Expression der Transporter die vesikuläre Monoaminspeicherung verändern. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Überexpression von VMAT2 in PC12-Zellen die freigesetzte Menge an Monoaminen aus den Vesikeln erhöht war (Pothos et al., 2000). Denkbar sind auch posttranslationale Modifikationen des VMAT, welche die Transportaktivität verändern könnten. Ein weiterer beeinflussender Faktor kommt durch den unspezifischen Verlust von Monoaminen über die Vesikelmembran (Eisenhofer et al., 2004) zustande. Hier könnten insbesondere die Lipidzusammensetzung und der Proteingehalt der Vesikelmembran eine Rolle spielen.

Zusätzlich kommen alle Prozesse in Frage, welche die Monoaminkonzentration in der Zelle verändern, also solche, die die Synthese und den Abbau der Neurotransmitter betreffen. Letztere sind bei den durchgeführten in vitro-Untersuchungen an permeabilisierten Zellen jedoch zu vernachlässigen.

Für den Transport der Monoamine über den vesikulären Monoamintransporter (VMAT) aus dem Zytosol ins Vesikellumen ist der elektrochemische Gradient ($\Delta\mu H^+$) über der Vesikelmembran als Triebkraft essentiell. Dieser setzt sich aus dem Protonengradienten (ΔpH) und dem elektrischen Gradienten ($\Delta\Psi$) zusammen. Der Protonengradient wird über die vakuoläre H^+ -ATPase (v-ATPase) generiert, indem Protonen ins Vesikelinnere transportiert werden. Als Folge des Protonentransportes entsteht zudem ein elektrischer Gradient über der Vesikelmembran, wobei das Vesikellumen gegenüber dem Zytosol positiv geladen ist. Über die Regulation der

v-ATPase in Säugetieren ist bislang nichts bekannt. Durch membranständige vesikuläre Chloridkanäle können jedoch Chloridionen ins Vesikelinnere gelangen. Befinden sich mehr Chloridionen innerhalb des Vesikels, sinkt $\Delta\Psi$ durch den Ladungsausgleich. Dadurch wird die v-ATPase aktiviert und es werden mehr Protonen ins Vesikellumen gepumpt. So hängen $\Delta\Psi$ und ΔpH voneinander ab und werden reguliert. Folglich kommt indirekt auch die intravesikuläre Chloridkonzentration als potentieller Modulator für die Monoaminspeicherung im Vesikel in Frage.

Für VMAT1 und 2 konnte gezeigt werden, dass deren Aktivität vorrangig von ΔpH abhängig ist (Johnson, 1988). In unserer Arbeitsgruppe konnte sowohl in Wildtypmäusen als auch in $\text{Go}\alpha$ -Deletionsmutanten eine Abnahme der VMAT2-Aktivität bei einem pH von 6,5 und 8,5 im Vergleich zu einem neutralen pH-Wert gezeigt werden (Dissertation J. M. Sternberg, 2006). Auch die Hemmung der v-ATPase und der daraus resultierende Zusammenbruch des Protonengradienten führte in beiden Genotypen gleichermaßen zu einer deutlichen Verminderung der VMAT2-Aktivität. Die Azidifizierung synaptischer Vesikelpräparationen von Wildtyp- und $\text{Go}2\alpha^{-/-}$ -Mäusen unterscheidet sich nicht (Winter et al., 2005). Bei einem pH-Wert von 7,0 konnte zudem gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Chlorid-Konzentration keinen Einfluss auf die Hemmung der VMAT2-Aktivität durch eine G-Protein Aktivierung hatte. Somit sind die v-ATPase und der vesikuläre Chloridkanal zwar an der Regulation des elektrochemischen Gradienten und damit indirekt auch der VMAT-Aktivität beteiligt, jedoch nicht in die durch $\text{Go}2\alpha$ vermittelte Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme involviert (Abbildung 15).

Andere Ergebnisse fanden sich beim vesikulären Glutamattransport, dessen Abhängigkeit von der Chlorid-Konzentration gezeigt werden konnte. Interessanterweise fehlte diese Chloridabhängigkeit in $\text{Go}2\alpha^{-/-}$ -Mäusen vollständig (Winter et al., 2005).

Im folgenden Abschnitt soll vor allem die Rolle der G-Proteine auf den vesikulären Monoamintransport betrachtet werden.

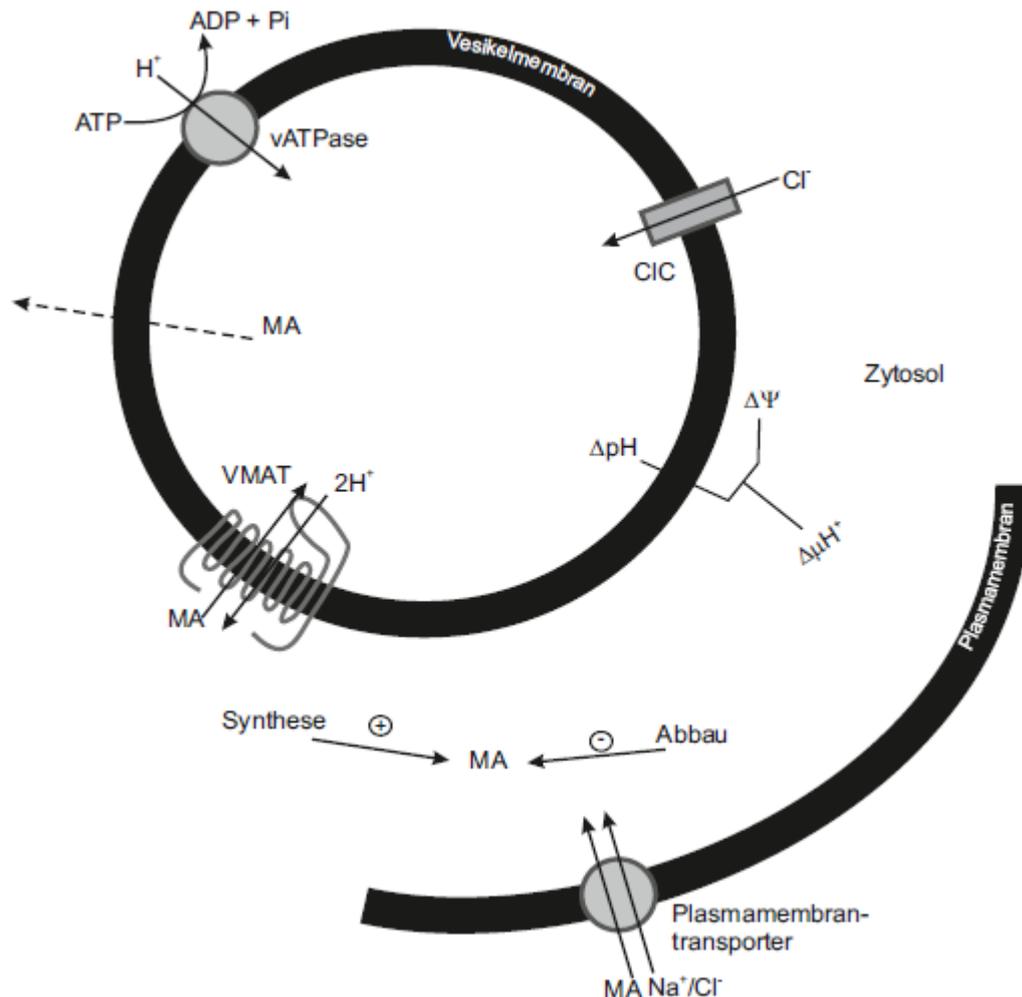


Abbildung 15: Schematische Darstellung von Faktoren, welche die vesikuläre Monoaminaufnahme beeinflussen.

Zu den Faktoren, die die vesikuläre Monoaminspeicherung beeinflussen, gehören einerseits solche, die die zytoplasmatische Monoaminkonzentration verändern und andererseits solche, die die Speicherung der Monoamine (MA) im Vesikel verändern.

Die Monoamine werden durch den vesikulären Monoamintransporter (VMAT) aus dem Zytosol im Austausch gegen zwei Protonen ins Vesikelinnere transportiert. Die Triebkraft für den Monoamintransport ins Vesikelinnere wird durch den elektrochemischen Gradienten ($\Delta\mu H^+$) zwischen Vesikel und Zytosol erzeugt. Dieser setzt sich aus dem Protonengradienten (ΔpH) und dem elektrischen Gradienten ($\Delta\Psi$) zusammen. ΔpH wird mit Hilfe der vesikulären ATPase (v-ATPase) unter Energieverbrauch aufgebaut. Über einen Chlorid-Kanal (ClC) können Chlorid-Ionen im Austausch gegen Protonen (nicht dargestellt) ins Vesikelinnere gelangen, welche eine Verminderung von $\Delta\Psi$ bewirken. Dies hat eine gesteigerte Aktivität der v-ATPase zur Folge. Zudem kann die vesikuläre Monoaminaufnahme durch eine Aktivitätsänderung von VMAT verändert werden. Unspezifische Verluste von Monoaminen erfolgen über die Vesikelmembran aufgrund deren Permeabilität (gestrichelter Pfeil).

Auf zytoplasmatischer Seite ist das Angebot an Monoaminen von Bedeutung. Hier spielen auf- und abbauende Prozesse eine große Rolle. Für die Biosynthese sind vor allem die jeweiligen Schlüsselenzyme maßgeblich (Tyrosinhydroxylase, Histidindecaboxylase, Tryptophanhydroxylase). Am Abbau sind unter anderem die Monoaminoxidasen beteiligt. Des Weiteren sind plasmamembranständige Monoamintransporter, welche ihre jeweiligen Monoamine im Symport mit einem Na^+ - und einem Cl^- -Ion transportieren, für die Wiederaufnahme der Monoamine aus dem extrazellulären Raum verantwortlich.

4.2 Die Regulation der vesikulären Monoamintransporter durch α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine

Die Aktivität der vesikulären Monoamintransporter wird durch heterotrimere G-Proteine reguliert. Dies wurde an neuroendokrinen Zellen (Ahnert-Hilger et al., 1998; Höltje et al., 2000) neuronalen Primärkulturen, Präparationen synaptischer Vesikel aus dem Cortex des Mäusegehirns (Höltje et al., 2000) und an Thrombozyten (Höltje et al., 2003) nachgewiesen. In neuronalen und neuroendokrinen Zellen ist die $G_{o2\alpha}$ -Untereinheit verantwortlich für die Hemmung der vesikulären Monoaminaufnahme. So führt eine Aktivierung von $G_{o2\alpha}$ zu einer Verminderung der vesikulären Serotoninaufnahme in PC12-Zellen und anderen monoaminergen Systemen. Tatsächlich sind vollständige heterotrimere G-Proteine (bestehend aus der $G_{o2\alpha}$ -, G_{β} - und G_{γ} -Untereinheit) auf der Vesikelmembran von LDCVs und SSVs lokalisiert (Ahnert-Hilger et al., 1994; Pahner et al., 2002; Pahner et al., 2003). Als regulierende G_{α} -Untereinheit in Thrombozyten konnte $G_{q\alpha}$ identifiziert werden, welches analog zu den oben genannten Zelltypen nach Aktivierung die Serotoninaufnahme über VMAT2 in die Vesikel hemmt.

Neben der Erkenntnis, dass die VMAT-Aktivität durch heterotrimere G-Proteine beeinflusst wird, stellte sich heraus, dass der vesikuläre Füllungszustand selbst das auslösende Signal für die Regulation sein könnte. In Thrombozyten von Tryptophanhydroxylase-1 (Tph1)-defizienten Mäusen fehlt das Schlüsselenzym der Serotoninsynthese, was zu einem deutlich verminderten Serotoningehalt führt (Walther et al., 2003). Bei Serotoninaufnahmetests an diesen „leeren“ Thrombozyten zeigte sich ein Fehlen der durch die G-Protein Aktivierung verursachten Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme, welche jedoch nach Vorbeladung der thrombozytären Vesikel mit Serotonin wieder nachweisbar war (Höltje et al., 2003).

Ähnliche Effekte konnten an BON-Zellen bzw. primären Raphezellkulturen beobachtet werden, wenn diese dem selektiven Serotoninwiederaufnahmehemmer Fluoxetin ausgesetzt wurden. Dies bewirkte eine Abnahme der intrazellulären Serotoninkonzentration und der Einfluss aktivierter G-Proteine auf die vesikuläre Serotoninaufnahme sank. In einem monoaminfreien System wie den CHO-Zellen zeigte sich bei Serotoninaufnahmetests nach Transfektion mit VMAT1 bzw. VMAT2 eine G-Protein vermittelte Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme ausschließlich dann, wenn die Zellen zuvor mit Serotonin vorbeladen wurden (Brunk et al., 2006). Dies legte den Schluss nahe, dass der Transmittergehalt intraluminal über eine rezeptor-

ähnliche Struktur gemessen wird. Dies kann entweder der VMAT selbst oder ein anderer vesikelmembranständiger Rezeptor sein. Da CHO-Zellen jedoch ursprünglich ein monoaminfreies System darstellen, ist es wahrscheinlich, dass in den CHOVMAT-Zellen der VMAT selbst die rezeptorähnliche Funktion erfüllt.

In weiteren Versuchen wurde mit Hilfe verschiedener Rezeptoragonisten und -antagonisten versucht, eine G-Protein vermittelte Hemmung zu verursachen bzw. zu blockieren. In VMAT2-Modellsystemen stellte sich heraus, dass 5-HT_{1B}-Rezeptoragonisten in der Lage sind, eine G-Protein vermittelte Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme zu induzieren. Durch 5-HT_{1B}-Rezeptorantagonisten wurde ein gegenteiliger Effekt gezeigt. Auf Modellsysteme mit VMAT1 hatten die 5-HT_{1B}-Rezeptoragonisten und -antagonisten keinen Effekt. Es konnte aber eine Wirkung des α 1-Rezeptoragonisten Cirazolin nachgewiesen werden (Brunk et al., 2006). Diese Ergebnisse im Zusammenhang mit der Erkenntnis, dass weder in CHO-Zellen, noch in Thrombozyten 5-HT_{1B}-Rezeptoren nachgewiesen werden konnten (Walther et al., 2003; Pullarkat et al., 1998), sprechen ebenfalls für die Beteiligung der VMAT an den Regulationsprozessen und gegen einen zusätzlich involvierten (heptahelikalen) Rezeptor, der die G-Protein Aktivierung initiiert (Abbildung 16).

Bei einer Sequenzhomologie von 62% der beiden VMAT-Isoformen zeigten sich insbesondere Unterschiede im Bereich der großen intraluminalen Schleife zwischen erster und zweiter Transmembrandomäne. Durch Deletion dieser intraluminalen Schleife konnte gezeigt werden, dass die G-Protein vermittelte Hemmung der vesikulären Neurotransmitteraufnahme sowohl für VMAT1 als auch für VMAT2 vermindert bzw. aufgehoben wird, ohne dass dabei der vesikuläre Serotonintransport oder die Expression der Transporter verändert waren (Brunk et al., 2006).

Zusammenfassend spricht sehr viel dafür, dass die erste intraluminale Schleife der vesikulären Monoamintransporter als rezeptorähnliche Struktur dient, welche den vesikulären Füllungsstatus misst. Im nächsten Schritt muss es in diesem Modell zur Aktivierung des G-Proteins kommen. In Experimenten mittels Yeast-two-hybrid-Verfahren und Glutathion-S-Transferase-Pulldown konnte in unserer Arbeitsgruppe eine Interaktion des C-Terminus von VMAT2 mit Go2 α und G β 1 gezeigt werden (Dissertation J. Baron, 2012). Da es nach Aktivierung von Go2 α zu einer Hemmung der VMAT-Aktivität kommt, VMAT also auch Effektor seiner selbst induzierten Signaltransduktionskaskade ist, kommt der C-Terminus als möglicher Rezeptor- als

auch als Effektor-Domäne in Frage. Jedoch konnte bisher keine direkte Aktivierung des heterotrimeren Go-Proteins durch VMAT gezeigt werden.

Des Weiteren gibt es noch keine Erkenntnisse, welche Effektoren durch die $G\alpha$ -Untereinheit aktiviert werden und über welchen Signaltransduktionsweg eine Aktivierung des G-Proteins zur Hemmung der vesikulären Monoamintransporter führt. cAMP und cGMP als potentielle sekundäre Botenstoffe in dieser Kaskade wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht und werden im Folgenden (siehe Abschnitt 4.3) diskutiert.

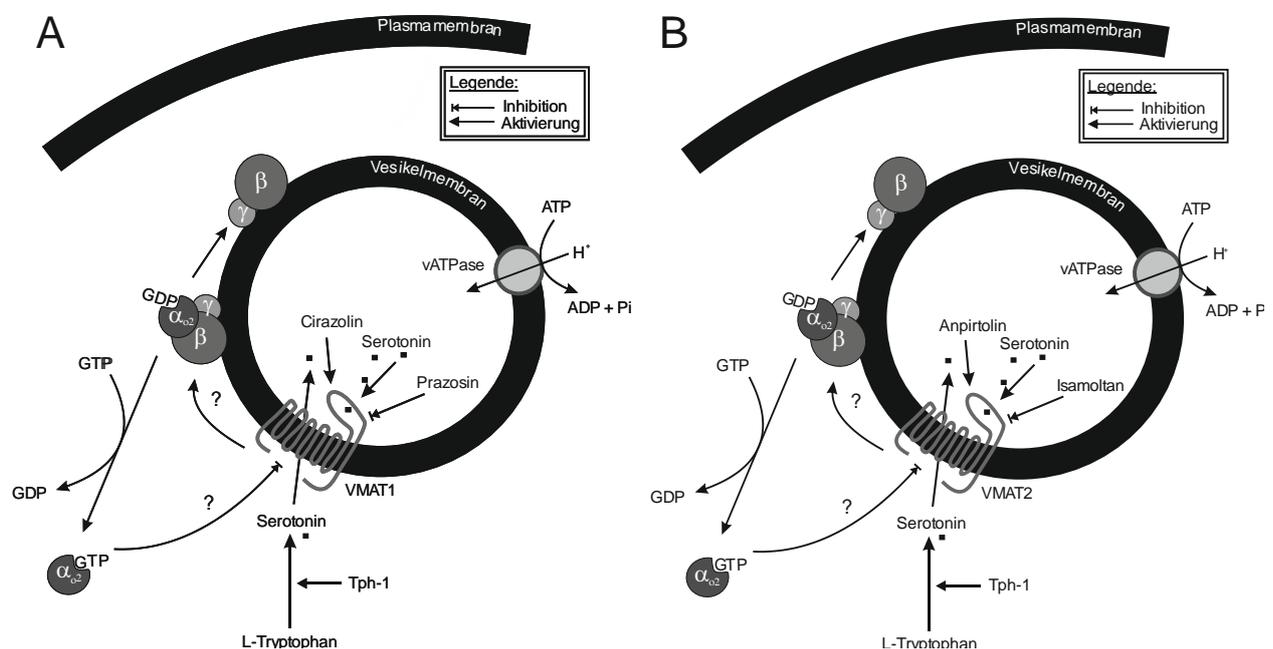


Abbildung 16: Schematische Darstellung zur pharmakologischen Beeinflussung der Aktivität von VMAT1 und VMAT2.

Nach Aktivierung von VMAT kommt es direkt bzw. über einen Zwischenschritt zur Aktivierung des G-Proteins. Hierbei dissoziiert die α -Untereinheit unter Austausch von GDP gegen GTP von der $\beta\gamma$ -Untereinheit. Die aktivierte $G\alpha_2$ -Untereinheit führt wiederum zur Hemmung des Serotonintransportes über VMAT ins Vesikelinnere. Serotonin wird aus L-Tryptophan in mehreren Schritten synthetisiert, wobei die Tryptophanhydroxylase 1 (Tph-1) das geschwindigkeitsbestimmende Enzym darstellt.

A) Für VMAT1 konnte in CHOVMAT1-Zellen gezeigt werden, dass der α -Rezeptoragonist Cirazolin, ebenso wie Serotonin, eine GMP-P(NH)P vermittelte Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme induziert. In PC12-Zellen zeigte sich zudem ein Fehlen dieser Hemmwirkung bei Inkubation mit dem α -Rezeptorantagonisten Prazosin.

B) In VMAT2 transfizierten CHO-Zellen ergab sich eine durch GMP-P(NH)P vermittelte Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme bei Inkubation mit dem 5-HT_{1B} -Rezeptoragonisten Anpirtolin. Diese Hemmung der VMAT2-Aktivität konnte durch den 5-HT_{1B} -Rezeptorantagonisten Isamoltan aufgehoben werden.

Die erste intraluminalen Schleife der vesikulären Monoamintransporter misst vermutlich den vesikulären Füllungszustand und stellt somit eine Rezeptor-ähnliche Struktur dar (nach Brunk et al., 2006).

4.3 Nachgeschaltete Signalwege in der G-Protein vermittelten Regulation vesikulärer Monoamintransporter

Eine Aktivierung der $Go2\alpha$ -Untereinheit führt in neuroendokrinen Zellen und Vesikelpräparationen zur Verminderung der Serotoninaufnahme in die Vesikel über eine Hemmung der Aktivität von VMAT1 und 2. Dies lässt sich in Untersuchungen mit schwer hydrolysierbaren GTP-Analoga, wie GMP-P(NH)P, nachweisen. Der gleiche Effekt konnte in der vorliegenden Arbeit in CHOVMAT1-Zellen, welche mit der $Go2\alpha$ -Untereinheit transfiziert wurden, nachgewiesen werden. Unklar ist über welchen, möglicherweise nachgeschalteten Signalweg, eine Aktivierung der Go-Proteine zu einer Hemmung der Aktivität von VMAT1 und 2 führt. Viel spricht dafür, dass die sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP daran beteiligt sind.

4.3.1 Einfluss der sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP auf die vesikuläre Monoaminaufnahme

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Schwerpunkt auf die Untersuchung des Einflusses der sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP auf die vesikuläre Monoaminaufnahme in PC12-Zellen, die ausschließlich VMAT1 exprimieren, gelegt. Wie bereits erwähnt, konnte für VMAT2 inzwischen eine Interaktion mit der $Go2\alpha$ -Untereinheit gezeigt werden. Jedoch gelang es bisher nicht, eine direkte Aktivierung von $Go2\alpha$ durch VMAT2 nachzuweisen. Außerdem ließ sich feststellen, dass die G-Protein vermittelte Hemmung der vesikulären Monoaminaufnahme in permeabilisierten Zellen oder Synaptosomen stärker ausgeprägt ist als in Vesikelpräparationen. Die Ursache dafür könnte ein vermehrter Verlust an Zytosol bei der Anfertigung der Vesikelpräparationen sein. All das macht einen zwischengeschalteten Signalweg, der zur Hemmung der VMAT-Aktivität führt, wahrscheinlich. Allerdings ist bisher nicht geklärt, welche zwischengeschalteten Signalwege diese Hemmung bewirken. cAMP und cGMP sind bei zahlreichen intrazellulären Signalkaskaden involviert und potentielle Kandidaten für diese Signaltransduktionskaskade. Daher wurden verschiedene Experimente durchgeführt, die die Wirkung von cAMP und cGMP auf die vesikuläre Monoaminaufnahme über VMAT1 untersuchen sollten.

Die Arbeitsgruppe um Nakanishi konnte eine Hemmung der vesikulären Monoaminaufnahme über VMAT1 in permeabilisierten PC12-Zellen nach Inkubation mit

Dibutyryl-cAMP (dBcAMP), einem cAMP-Analogen, zeigen. Eine verminderte vesikuläre Monoaminaufnahme zeigte sich außerdem nach Inkubation von PC12-Zellen mit dem Cholera toxin, einem hexameren Protein, synthetisiert durch das Bakterium *Vibrio cholerae*, welches durch Hemmung der GTPase-Aktivität der $G_s\alpha$ -Untereinheit zu einer permanenten Aktivierung des G-Proteins, somit zu einer übermäßigen Aktivierung der Adenylatzyklase und letztendlich zu einem Überschuss von intrazellulärem cAMP führt (Nakanishi et al., 1995a). cAMP bewirkt zudem eine Aktivierung von Proteinkinasen in der Zelle. Diese cAMP-abhängigen Proteinkinasen können mit zahlreichen Proteinen interagieren und besitzen die Fähigkeit, diese zu phosphorylieren (Scholten et al., 2008). Nakanishi konnte in einer weiteren Versuchsreihe zeigen, dass es über eine direkte Hemmung von Proteinkinasen (u.a. Proteinkinase A, Proteinkinase C) zu einer Erhöhung der vesikulären Monoaminaufnahme kommt, und dass der durch dBcAMP hervorgerufene Effekt aufgehoben werden konnte. Dies führte zu der Vermutung, dass die Hemmung der vesikulären Monoaminaufnahme über eine durch Proteinkinasen vermittelte Proteinphosphorylierung verursacht wird. Führt man neben der Inkubation der PC12-Zellen mit dBcAMP eine Hemmung der Proteinphosphatasen durch, zeigte sich eine stärkere Hemmwirkung der vesikulären Monoaminaufnahme (Nakanishi et al., 1995b).

In unserer Arbeitsgruppe konnte eine Hemmung der vesikulären Monoaminaufnahme über VMAT2 an aus dem Mäusegehirn gewonnenen permeabilisierten Synaptosomen und Vesikelpräparationen unter Inkubation mit cAMP gezeigt werden. Zudem wurde der Effekt unter Inkubation von cGMP untersucht. Unter Inkubation mit cGMP war die vesikuläre Monoaminaufnahme wiederum stärker vermindert als unter Inkubation mit cAMP (Dissertation J.M. Sternberg, 2006; Abbildung 17).

Die bisherigen Untersuchungen mit cAMP und cGMP fanden in aus Mäusegehirn gewonnenen Vesikelpräparationen und Synaptosomen statt. Hier findet sich der vesikuläre Monoamintransporter 2. Die von Nakanishi et al. durchgeführten Experimente fanden an PC12-Zellen statt, welche nur den VMAT1 exprimieren. Diese Untersuchungen wurden nur unter Inkubation mit cAMP durchgeführt.

Zur genaueren Untersuchung der Beeinflussung der vesikulären Monoaminaufnahme durch den VMAT1 in PC12-Zellen durch cAMP und cGMP wurden die in dieser Arbeit vorgelegten Experimente durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde bestätigt, dass PC12-Zellen lediglich VMAT1 und nicht VMAT2 exprimieren.

In permeabilisierten PC12-Zellen zeigte sich eine signifikante Verminderung der vesikulären Serotoninaufnahme nicht nur unter dem Einfluss von cAMP, sondern auch von cGMP. Es zeigte sich außerdem eine konzentrationsabhängige Hemmung, welche bei höheren Konzentrationen von cAMP bzw. cGMP zunahm. Dabei fiel im direkten Vergleich kein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Hemmwirkung zwischen cAMP und cGMP auf (Abbildung 17).

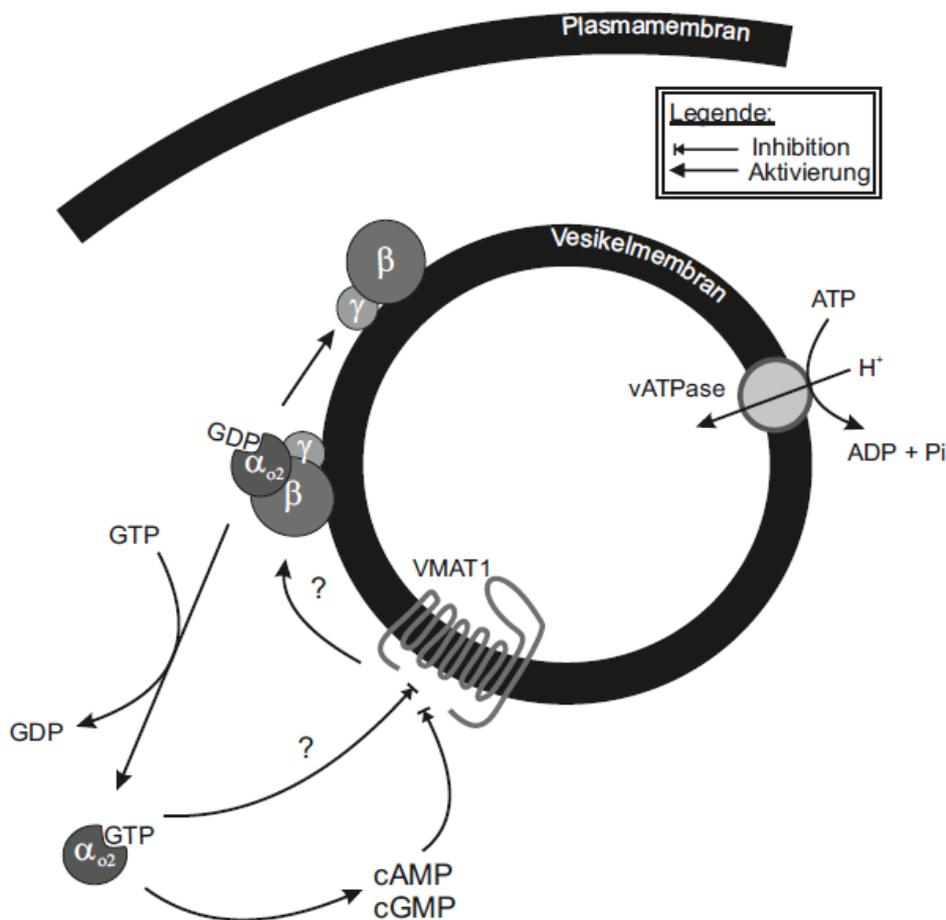


Abbildung 17: Schematische Darstellung einer Hemmung der VMAT1-Aktivität über die sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP.

Die Aktivierung des heterotrimeren G-Proteins wird vermutlich durch VMAT1 selbst ausgelöst. Dabei ist bisher nicht geklärt, ob dies direkt oder über Zwischenschritte passiert. Nach Austausch von GDP gegen GTP in der dazugehörigen Bindungsstelle der $G_{o2}\alpha$ -Untereinheit, dissoziiert diese von der $\beta\gamma$ -Untereinheit. Vorstellbar sind eine Aktivierung der Adenyl- bzw. Guanylylzyklase und die Erhöhung der zytosolischen cAMP- bzw. cGMP-Konzentrationen. Diese könnten über weitere Zwischenschritte die Aktivitätshemmung von VMAT1 vermitteln.

Sowohl für cAMP als auch für cGMP fand sich eine Veränderung der Kinetik von VMAT1. Es zeigte sich eine Abnahme des K_M -Wertes unter der Einwirkung von cAMP. Bei Inkubation mit cGMP kam es zu einer leichten Erhöhung des K_M -Wertes. Außerdem ließ sich eine Abnahme der maximalen Transportgeschwindigkeit (v_{max}) in Anwesenheit beider sekundärer Botenstoffe im Vergleich zu den Kontrollen feststellen.

Unter Berücksichtigung der von Nakanishi et al. erhobenen Ergebnisse hinsichtlich der Aufhebung der Hemmwirkung durch Blockade der Proteinkinase A als Effektor von cAMP, lässt sich die unter Abbildung 18 dargestellte schematische Regulation der VMAT1-Aktivität ableiten.

Jedoch darf nicht unerwähnt bleiben, dass es der Arbeitsgruppe um Kobayashi gelang zu zeigen, dass die $Go2\alpha$ -Untereinheit einen hemmenden Einfluss auf die Adenylatzyklaseaktivität hat. Hierbei wurde die Aktivität der Adenylatzyklase unter dem Einfluss von gereinigtem, durch $GTP\gamma S$ -aktivierten $Gs\alpha$ allein und unter Anwesenheit von $GTP\gamma S$ -gebundenem $Go2\alpha$ gemessen. Eine Hemmung der $Gs\alpha$ -Wirkung auf die AC zeigte sich unter Anwesenheit von $Go2\alpha$ (Kobayashi et al., 1990). Möglicherweise liegt hierbei jedoch ein anderer, Proteinkinase A unabhängiger Prozess zugrunde.

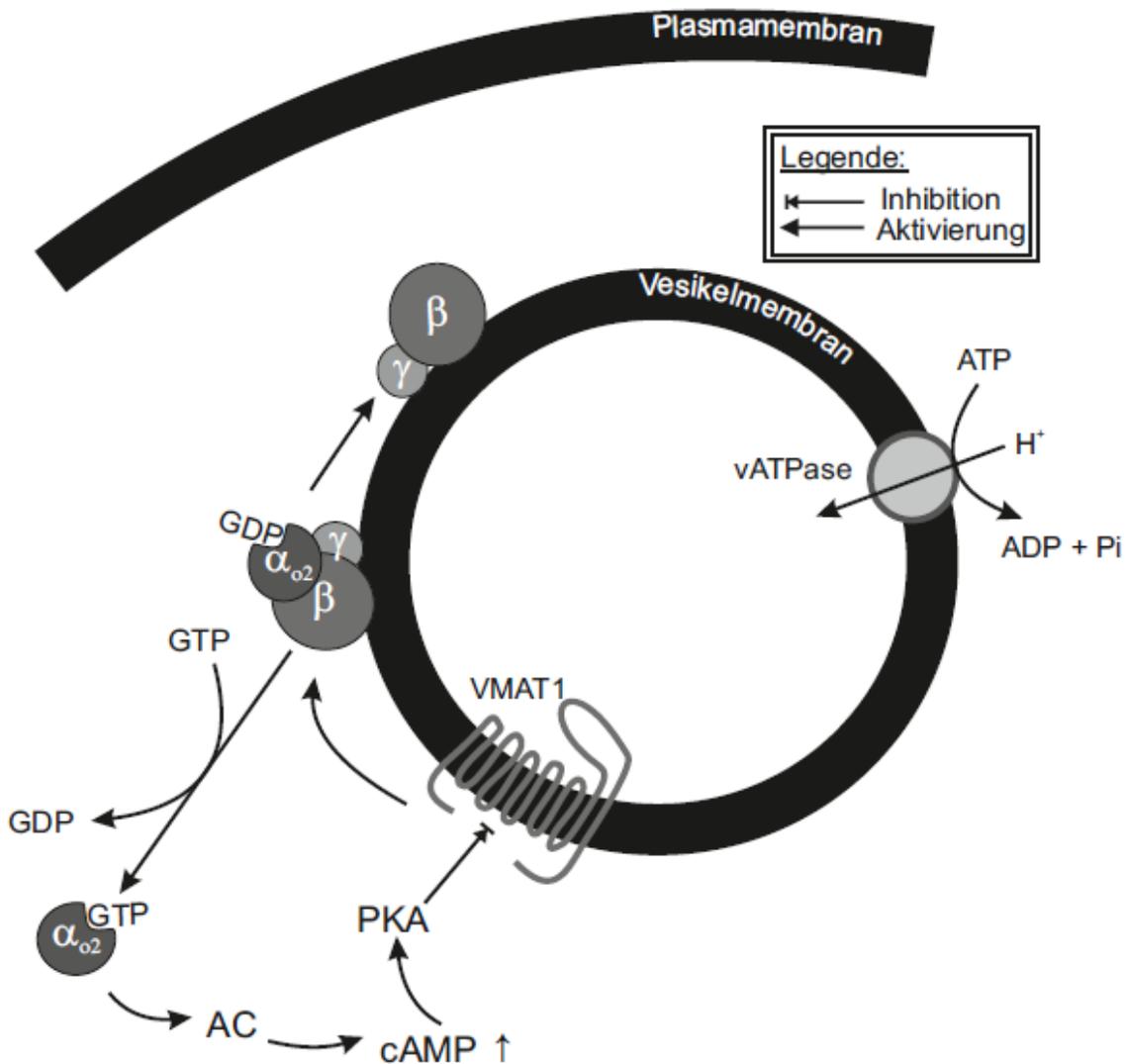


Abbildung 18: Schematische Darstellung der putativen Regulation der VMAT1-Aktivität über cAMP.

Nach Aktivierung der $G_{\alpha 2}$ -Untereinheit aktiviert diese die Adenylatzyklase (AC). Diese bewirkt einen Konzentrationsanstieg von cAMP. cAMP wiederum aktiviert die Proteinkinase A (PKA), welche über Modifikationen an VMAT1 zu einer Hemmung des vesikulären Monoamintransportes führt.

Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung dieses Signalweges stellt die Signaltransduktion über den D2-ähnlichen Rezeptor (D_{2L} -Rezeptor) dar, der mit der G_{α} -Untereinheit assoziiert ist. Kommt es zur Aktivierung von D_{2L} steigt über Aktivierung der Adenylatzyklase der intrazelluläre cAMP-Spiegel an (Watts et al., 1998; Cumbay & Watts, 2001). Von einer anderen Arbeitsgruppe konnte in diesem Zusammenhang die Verminderung des aus einzelnen Vesikeln freigesetzten Dopamins

durch Aktivierung von D2-ähnlichen Autorezeptoren gezeigt werden (Pothos et al., 1998).

Ein weiterer möglicher Signaltransduktionsweg wurde an HEK-293- und den Neuroblastomzellen N1E-115 entdeckt. Dabei kam es nach Aktivierung des β_2 -Adrenozeptors mit Adrenalin bzw. nach Aktivierung der Adenylatzyklase durch Forskolin zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalzium- und Inositol-1,4,5-trisphosphat-(IP₃)-Konzentration. IP₃ ist das Produkt der Phospholipase C und bewirkt unter anderem eine Freisetzung intrazellulärer Kalziumspeicher. Bei einer Hemmung der AC durch 1',5'-Dideoxyadenosin wurde dieser Effekt aufgehoben. Bekannt ist, dass cAMP die Proteinkinase A aktiviert. Die oben beschriebenen Prozesse wurden allerdings nicht durch eine Hemmung der PKA beeinflusst. Dies spricht für einen alternativen cAMP-abhängigen Signalweg. Hierbei wird über einen weiteren Zwischenschritt Rap2B, eine Rap GTPase, aktiviert. Das letztendlich aktivierte Enzym ist die Phospholipase C- ϵ (Schmidt et al., 2001; Abbildung 19).

Ein Einfluss von cAMP auf die Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme konnte bereits mehrfach gezeigt werden. Jedoch bleibt weiterhin unklar, über welche Einzelschritte die Hemmung von VMAT1 vermittelt wird.

PC12-Zellen durch $Go2\alpha$ bewirkt wird, könnte ein ähnlicher Signalweg beteiligt sein (Abbildung 20).

Wie bereits erwähnt, konnte in unserer Arbeitsgruppe eine stärkere, konzentrationsabhängige Hemmwirkung durch cGMP als durch cAMP auf VMAT2 in permeabilisierten Synaptosomen gezeigt werden (Dissertation J. M. Sternberg, 2006), während sich deren Effekt auf die VMAT1-Aktivität nicht unterschied.

In Thrombozyten erfolgt die Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme durch VMAT2 durch die $Gq\alpha$ -Untereinheit. In vorangegangenen Arbeiten konnte, im Gegensatz zu neuroendokrinen Zellen und synaptischen Vesikeln, kein direkter Effekt von cAMP und cGMP auf die vesikuläre Monoaminaufnahme gefunden werden. Allerdings konnten beide sekundären Botenstoffe nach Aktivierung des G-Proteins durch das GTP-Analogon GMP-P(NH)P dessen vermittelten Hemmeffekt aufheben. Diese Erkenntnisse deuten zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass sich die nachgeschalteten Signalwege je nach Gewebe und nach Expression der Transporterisoform unterscheiden.

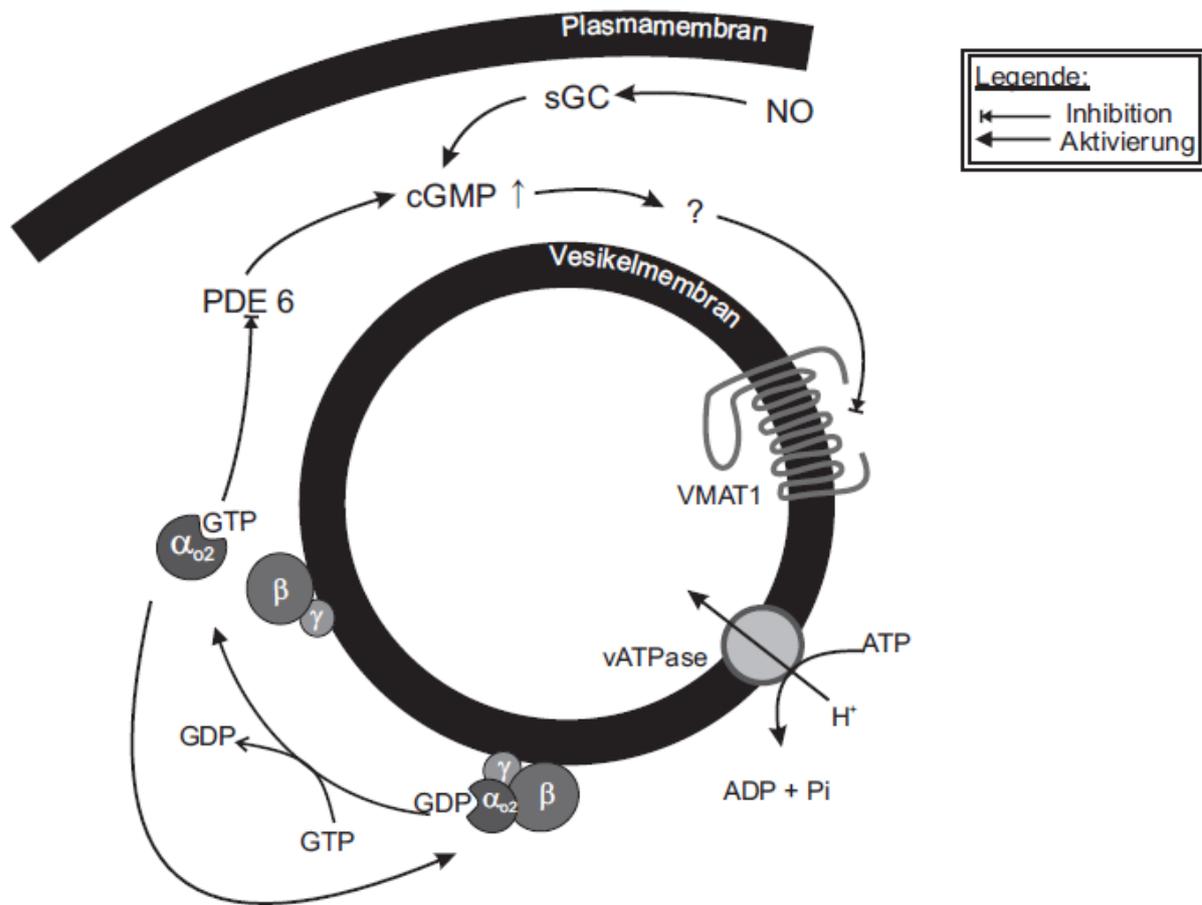


Abbildung 20: Schematische Darstellung eines putativen Signalweges zur Regulation von VMAT1. Durch die Aktivierung von $Go2\alpha$ kann die intrazelluläre cGMP-Konzentration durch die Hemmung der Phosphodiesterase 6 (PDE6) erhöht werden. Gleiches passiert durch die Aktivierung der löslichen Guanylylzyklase (sGC) durch die Aktivierung durch Stickstoffmonoxid (NO). cGMP selbst führt nun über einen bisher unbekanntem Mechanismus zur Hemmung des VMAT1.

Ungeklärt bleibt, welche Einzelelemente zum Signaltransduktionsweg der Regulation der vesikulären Monoamintransporter gehören. Deutlich ist ein Einfluss von cAMP und cGMP auf die Serotoninaufnahme in die Vesikel nachweisbar. Ob es aber in vivo einen direkten Einfluss von cAMP oder cGMP gibt bzw. ob es sich um unabhängige oder synergistische Effekte handelt, konnte nicht abschließend geklärt werden.

4.3.2 Mögliche Interaktionspartner von Go2 α in der Regulation des vesikulären Monotransportes

Eine Möglichkeit, nachgeschaltete Signaltransduktionsschritte der G-Protein vermittelten Regulation der VMAT zu identifizieren, ist die Suche nach Interaktionspartnern der beteiligten G α -Untereinheiten. Spezifische Interaktionspartner von Go2 α sind in unserem Labor mit Hilfe des Yeast-two-hybrid-Systems identifiziert worden (Baron et al., 2013).

Ein Interaktionspartner von Go2 α ist das Protein Rap1Gap (Jordan et al., 1999). Dieses stimuliert die GTPase-Aktivität des kleinen G-Proteins Rap1. Bekannt ist, dass eine Inaktivierung von Rap1Gap die Differenzierung von Zellen fördert. Zudem kann es zur Phosphorylierung von Rap1Gap, unter anderem durch die cAMP-abhängige Kinase, kommen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass es in Go2 α -Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp der Maus zu einer erhöhten Rate von aktiviertem Rap1-GTP ohne signifikante Änderung der Expressionsrate von Rap1 oder Rap1Gap kam. Des Weiteren fanden sich in den Go2 α -Deletionsmutanten längere Axone mit mehr Verzweigungsstellen als bei Wildtypmäusen (Baron et al., 2013). In Thrombozyten konnte außerdem ein mit Rap1Gap verwandtes Protein, Rap1Gap2, identifiziert werden, welches eine 52 %ige Sequenzhomologie aufweist (Schultess et al., 2005). Es aktiviert, wie Rap1Gap, das Protein Rap1. Diese Erkenntnisse und die starke Expression von Rap1Gap im Gehirn machen einen Einfluss auf die Signaltransduktion der vesikulären Monoaminaufnahme über VMAT2 möglich.

Einen weiteren Interaktionspartner von Go2 α stellt das „Gamma interacting vesicle associated protein“ (GIV oder auch Girdin) dar. GIV interagiert mit verschiedenen G α -Untereinheiten, unter anderem auch mit Go α (Le-Niculescu et al., 2005). Die größte Expression fand sich im Gehirn und im Hoden. Es ist unter anderem auf verschiedenen vesikulären Strukturen, vor allem auf COPI-Vesikeln und auf Vesikeln des Golgi-Apparates / Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert. In unserer Arbeitsgruppe konnte die direkte Interaktion von Girdin mit Go2 α gezeigt werden (Baron et al., 2013). Weiterhin bekannt ist, dass Girdin durch die Proteinkinase B phosphoryliert werden kann und dass Girdin mit Actin interagiert. Ihm wird eine Bedeutung bei der Zellmigration zugeschrieben (Enomoto et al., 2005).

Mit beiden Go α -Untereinheiten und der Gq α -Untereinheit interagiert das Protein Synembryn (Ric8). Das im Fadenwurm *C. elegans* isolierte Protein hat vermutlich in

Interaktion mit $Go1\alpha$ und $Gq\alpha$ eine Bedeutung in der Regulation der synaptischen Transmission (Miller et al. 1996; Miller et al. 2000). Dabei sollen Prozesse der synaptischen Transmission und zahlreiche Vorgänge in der Embryogenese beeinflusst werden.

Des Weiteren gibt es eine Reihe von Regulatorproteinen heterotrimerer G-Proteine, die mit $Go\alpha$ interagieren, wie die RGS-Proteine 17, 19 und 20.

Ob die identifizierten, mit $Go2\alpha$ -interagierenden Proteine an der Regulation des VMAT1 beteiligt sein könnten, ist bislang nicht untersucht.

Ein weiteres Signalmolekül, welches an der G-Protein vermittelten Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme in Neuronen und neuroendokrinen Zellen beteiligt sein könnte, ist das „Calcium-dependent activator protein for secretion“ (CAPS). CAPS spielt eine essentielle Rolle für die Generierung von reifen synaptischen Vesikeln (Jockusch et al., 2007). Es gibt zwei Isoformen, CAPS 1 und 2, wobei sich beide in der Präsynapse von Neuronen und in neuroendokrinen Zellen lokalisieren lassen. Auch in Struktur und Funktion ähneln sich beide Isoformen (Speidel et al., 2003). Nach Deletion von CAPS1 konnte eine Verminderung der vesikulären Monoaminaufnahme in embryonalen chromaffinen Zellen der Maus gezeigt werden. Bei adulten Tieren sinkt die Transmittersekretion um 30-35%, wenn ein CAPS-Allel ausgeschaltet wird (Speidel et al., 2005). Hingegen zeigte sich eine Erhöhung der vesikulären Serotoninaufnahme in mit CAPS1 und CAPS2 transfizierten CHOVMAT1- bzw. CHOVMAT2-Zellen (Brunk et al., 2008b). In $Go2\alpha$ -Mausdeletionsmutanten konnte zudem eine verminderte Expression von CAPS1 nachgewiesen werden. Somit scheinen die CAPS-Proteine eine bedeutende Rolle für die vesikuläre Monoaminaufnahme sowohl über VMAT1 als auch über VMAT2 zu spielen. Jedoch ist bislang ungeklärt, ob sie dabei direkt auf den $Go2\alpha$ vermittelten Signalweg oder über einen anderen Weg Einfluss nehmen.

4.4 Effekt der α -Untereinheiten $Go1\alpha$, $Go2\alpha$ und $Gq\alpha$ auf den vesikulären Monoamintransport

In verschiedenen Systemen (den neuroendokrinen Zelllinien BON und PC12, neuronalen Primärkulturen von Raphe-Neuronen, synaptischen Vesikelpräparationen) konnte in vitro eine Hemmung der vesikulären Monoaminaufnahme durch die Aktivierung der $Go2\alpha$ -Untereinheit nachgewiesen werden. In Übereinstimmung damit konnte in Versuchen an stabilen, mit VMAT1 transfizierten CHO-Zellen nach

Transfektion mit konstitutiv aktivem Go2 α ebenso eine Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme belegt werden. Diese konstitutiv aktiven α -Untereinheiten verlieren, induziert durch ortsspezifische Mutation auf DNA-Ebene, ihre Fähigkeit zur Hydrolyse von GTP. Daraus resultiert eine verlängerte Aktivierung der G α -Untereinheit. Der beobachtete Effekt der vesikulären Hemmwirkung von Go2 α konnte somit auch nach Überexpression der konstitutiv aktiven Mutante gezeigt werden und steht im Einklang mit den vorherigen Ergebnissen.

Ausgehend davon, dass Go2 α eine Hemmung der vesikulären Monoaminaufnahme bewirkt, sollte ein Fehlen von Go2 α einen erhöhten Monoamintransport in die Vesikel bewirken. In Go2 α -Mausdeletionsmutanten zeigten sich überraschenderweise erniedrigte Dopaminkonzentrationen in Zellen des Striatums. Zudem konnte eine verminderte vesikuläre Serotoninaufnahme in Synaptosomen von Go2 α -Deletionsmutanten nachgewiesen werden. Möglich scheint, dass durch den verminderten Transport der Monoamine in die Vesikel eine erhöhte zytosolische Konzentration resultiert. Dies hätte besonders für Dopamin eine Konsequenz, da es neurotoxisch wirksam ist. Dieser erhöhte zytosolische Dopaminspiegel könnte eine Transkriptionshemmung der Tyrosinhydroxylase, dem Schlüsselenzym der Dopamin-Biosynthese und eine Expressionssteigerung von VMAT2 in den Go2 α -Mausdeletionsmutanten bewirken (Brunk et al., 2008a). Der Verlust von Go2 α führt also zu einer Verminderung der vesikulären Speicherfähigkeit von Dopamin. Den erhöhten zytosolischen Dopaminkonzentrationen wirkt eine verminderte Synthese durch erniedrigte Expression der Tyrosinhydroxylase entgegen. Die erhöhte VMAT2-Expression bewirkt hingegen, dass genug Dopamin für die neuronale Kommunikation zur Verfügung gestellt werden kann. Diese Kompensationsmechanismen könnten dazu führen, dass die Go2 α -Deletionsmutanten unter physiologischen Bedingungen keine deutlichen phänotypischen Auffälligkeiten zeigen. Weiterhin interessant wären Untersuchungen an neuroendokrinen Zellen von Deletionsmutanten im Hinblick auf die Auswirkung der fehlenden Expression von Go2 α auf den VMAT1 und den vesikulären Transport anderer Monoamine.

In Neurotransmitteraufnahmeversuchen an PC12-Zellen mit Noradrenalin wurden die aufgereinigten α -Untereinheiten Gi1, Gi2, Go1 und Go2 zum Inkubationsgemisch hinzugegeben. Diese Untereinheiten lagen entweder in der nicht aktivierten, GDP-gebundenen oder in der durch GTP γ S bzw. Aluminiumfluorid (AlF $_4^-$) aktivierten Form

vor. Dabei ließ sich lediglich für die aktivierten $Go2\alpha$ -Untereinheiten eine Hemmung der vesikulären Noradrenalinaufnahme nachweisen. Für $Go1\alpha$ konnte in keinem der Versuchsansätze eine Hemmung nachgewiesen werden (Ahnert-Hilger et al., 1998). Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Ergebnis bestätigt werden. Die VMAT1 transfizierten CHO-Zellen wurden zusätzlich mit der konstitutiv aktiven $Go1\alpha$ -Untereinheit transfiziert. Dabei zeigte sich kein Unterschied der vesikulären Serotoninaufnahme im Vergleich zu den Kontrollen. Dies untermauert die bisherigen Ergebnisse und macht eine Regulation von VMAT1 durch $Go1\alpha$ unwahrscheinlich. In Versuchen unserer Arbeitsgruppe, in denen Serotoninaufnahmetests in Vesikelpräparationen von $Go1\alpha$ - und $Go1/2\alpha$ -Deletionsmutanten durchgeführt wurden, zeigte sich in den $Go1\alpha^{-/-}$ -Mäusen eine durch Inkubation mit GMP-P(NH)P vermittelte Hemmung der VMAT2-Aktivität, welche hingegen in den $Go1/2\alpha^{-/-}$ -Mäusen nicht mehr nachweisbar war (Dissertation J. Baron, 2012). Dies spricht abermals für eine selektive Regulation der VMAT2-Aktivität durch $Go2\alpha$. Bei der näheren Untersuchung der Konzentration des Dopamingehalts im Striatum dieser Deletionsmutanten fiel eine Erniedrigung des Dopaminspiegels bei den $Go2\alpha^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen auf. In den $Go1\alpha$ -Deletionsmutanten war hingegen die striatale Dopaminkonzentration erhöht.

Um eine mögliche Rolle von $Go1\alpha$ auf die Aktivität von VMAT1 weiter zu untersuchen, wären Monoaminaufnahmetests in neuroendokrinen Zellen von $Go1\alpha$ -Deletionsmutanten interessant.

In Thrombozyten wird die vesikuläre Serotoninaufnahme durch die $Gq\alpha$ -Untereinheit reguliert. Durch die Aktivierung von $Gq\alpha$ kommt es zu einer Hemmung der vesikulären Monoaminaufnahme. Hingegen konnte $Go2\alpha$ in Blutplättchen nicht nachgewiesen werden (Höltje et al., 2003). Wie unter 4.3.1 beschrieben, konnte an Thrombozyten gezeigt werden, dass cAMP und cGMP keinen Einfluss auf die vesikuläre Serotoninaufnahme haben. Hingegen kann die durch GMP-P(NH)P ausgelöste Hemmwirkung der VMAT2-Aktivität durch die beiden sekundären Botenstoffe aufgehoben werden. Diese Erkenntnis spricht für einen, zumindest partiell, anderen Signalweg als in neuronalen und neuroendokrinen Zellen, in denen cAMP und cGMP eine Hemmung der vesikulären Monoaminaufnahme bewirken.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit VMAT1 transfizierte CHO-Zellen mit konstitutiv aktivem $Gq\alpha$ transfiziert. Dabei zeigte sich, im Gegensatz zu den Untersuchungen an Thrombozyten, eine deutliche Zunahme der vesikulären Serotoninaufnahme durch die

Transfektion mit Gq α . Bei Untersuchungen an der Nebenniere der Ratte konnte gezeigt werden, dass sich Gq α auf chromaffinen Granula befindet (Pahner et al., 2002). Jedoch bleibt zu klären, inwieweit Gq α in diesen Zellen überhaupt einen Einfluss auf die Regulation des vesikulären Monoamintransporters 1 hat. Hierbei wäre des Weiteren zu untersuchen, ob es in vivo ebenso zu einer Zunahme der Aktivität des vesikulären Monoamintransporters 1 wie in den transfizierten CHO-Zellen kommt.

Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse in CHOVMAT1-Zellen und Thrombozyten stellt der Transporter selbst dar. Davon ausgehend, wären Versuche in VMAT2 transfizierten CHO-Zellen interessant. So wird in Thrombozyten nur der VMAT2 exprimiert, in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten CHO-Zellen war hingegen nur der VMAT1 vorhanden. Weiterhin ist es möglich, dass Thrombozyten und endokrine Zellen unterschiedliche Signalwege in der VMAT-Regulation aufweisen könnten, so dass eine Transfektion mit Gq α letztendlich für eine erhöhte vesikuläre Monoaminaufnahme sorgt. Grundsätzlich besteht aber auch die Möglichkeit, dass die Überexpression von Gq α weitere intrazelluläre Signalwege so beeinflusst, dass dies im Endergebnis indirekt zu einer erhöhten Monoaminaufnahme in die Vesikel der CHO-Zellen führt. Zusätzlich ist auch zu bedenken, dass die mit VMAT1 transfizierten Zellen lediglich als reduziertes experimentelles System im Vergleich zu Neuronen bzw. Thrombozyten fungieren können.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten zusammen mit den früheren Erkenntnissen auf eine Diversität der Effekte verschiedener G α -Untereinheiten in Abhängigkeit der Gewebe und der exprimierten Isoform des VMAT hin. Für eine abschließende Aussage zu den unterschiedlichen Effekten und Mechanismen sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

4.5 Die Regulation der vesikulären Monoamintransporter als Einflussfaktor auf die Signalübertragung

In verschiedenen Systemen konnte eine Hemmung der vesikulären Monoaminaufnahme durch Aktivierung von G α -Untereinheiten nachgewiesen werden. Daher soll an dieser Stelle die mögliche Bedeutung dieses Regulationsmechanismus diskutiert werden. Für Nervenzellen spielt dabei vor allem die Regulation des VMAT2 eine Rolle, in endokrinen Zellen auch die Regulation des VMAT1.

Es gibt eine Vielzahl von Faktoren, die auf synaptische Prozesse einwirken. Dabei wurde der Fokus bei der Betrachtung der Variabilität synaptischer Übertragungen lange Zeit auf die postsynaptische Membran gelegt, so zum Beispiel auf die Dichte und die Affinität der postsynaptisch lokalisierten Rezeptoren. An Neuronen und an der neuromuskulären Endplatte konnte gezeigt werden, dass die Füllung eines Vesikels unterschiedlich sein kann und somit auch die Anzahl an Transmittermolekülen, welche nach Exozytose in den synaptischen Spalt freigesetzt werden (Van der Kloot, 1991). Somit besitzt die Zelle einen weiteren Mechanismus, die synaptische Übertragung zu modulieren, indem die Transmitterquanten auf präsynaptischer Ebene variiert werden können. In amperometrischen Untersuchungen konnte zudem gezeigt werden, dass der Serotoningehalt in LDCVs von Retzius-Zellen einer hohen Variabilität unterliegt (Bruns et al., 2000).

Dieser Regulationsmechanismus kann aber nur funktionieren, wenn die Reifung und Bereitstellung der Vesikel unabhängig von deren Füllungszustand ist. So konnte an isolierten Mastzellen von VMAT2-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass die Exozytoseprozesse ablaufen, ohne dass Transmitterquanten freigesetzt werden (Travis et al., 2000). Die VMAT sind also essentiell für die synaptische Übertragung, indem sie die Beladung der Vesikel ermöglichen. Die Ergebnisse dieser und einiger weiterer Arbeiten untermauern die physiologische Bedeutung eines Regulationsmechanismus der vesikulären Monoamintransporter.

Dass eine Variabilität in der synaptischen Übertragung besteht, konnte auch durch Veränderungen im Transmitterangebot gezeigt werden. So konnte dargestellt werden, dass in PC12-Zellen und in einer neuronalen Zelllinie des Mittelhirns der Ratte bei einem erhöhten Angebot der Dopaminvorstufe L-DOPA die quantale Dopaminfreisetzung im Vergleich zu Zellen, die nicht mit L-DOPA inkubiert wurden, erhöht ist (Pothos et al., 1996). Des Weiteren konnte die quantale Freisetzung von Transmittern durch Beeinflussung von VMAT1 gezeigt werden. Dabei ist die Freisetzung nach Inkubation von PC12-Zellen mit 100nM Reserpin signifikant erniedrigt. Bei Inkubation mit L-DOPA zeigte sich neben der bekannten erhöhten Quantenfreisetzung eine Vergrößerung der Vesikeldurchmesser. Dass VMAT für den Füllungszustand und die Vesikelgröße verantwortlich ist, spricht die Feststellung, dass der Effekt von Reserpin durch die zusätzliche Zugabe von L-DOPA aufgehoben werden kann (Colliver et al., 2000). Weiterhin konnte bei einer Überexpression von VMAT2 in

in vitro eine erhöhte Dopaminfreisetzung je Vesikel nachgewiesen werden (Pothos et al., 2000).

Postsynaptische Rezeptoren sind unter physiologischen Bedingungen nicht mit Neurotransmittern gesättigt (Forti et al., 1997), so dass eine Erhöhung der freigesetzten Transmittermenge auch zu einer Veränderung der postsynaptischen Antwort führen kann. Es gibt allerdings eine Reihe von Faktoren, die den Transmittergehalt im synaptischen Spalt beeinflussen. Dazu zählen unter anderem die Morphologie des synaptischen Spaltes selbst, aber auch unterschiedliche Affinitätswerte postsynaptischer Rezeptoren, die Schnelligkeit der Freisetzung der Neurotransmitter durch Exozytose, die Diffusionsgeschwindigkeit durch den synaptischen Spalt und die Geschwindigkeit, mit der die Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt entfernt werden. Hinzu kommt noch ein weiterer Faktor: Glutamat beispielsweise diffundiert über den synaptischen Spalt hinaus und kann an benachbarten Zellen an Rezeptoren binden (Danbolt, 2001). Zusammenfassend scheint die postsynaptische Antwort, neben den anderen beschriebenen Faktoren, auch über die Füllung der Vesikel reguliert werden zu können.

Neben den verschiedenen Einflussfaktoren auf die synaptische Übertragung sind auch das Expressionsmuster und die Transporteigenschaften der beiden Isoformen der vesikulären Monoamintransporter zu berücksichtigen. Bekannt ist, dass VMAT1 in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks und in neuroendokrinen Zellen exprimiert wird. Hierbei kommt der Transporter vorrangig auf dense core vesicles vor. VMAT2 wurde hingegen in monoaminergen Zellen im Gehirn, in Ganglienzellen des sympathischen Nervensystems, in Thrombozyten und in Mastzellen nachgewiesen. Zudem gelang es, VMAT2 in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks nachzuweisen (Peter et al., 1995). Möglicherweise sind es die unterschiedlichen Anforderungen bei einem schnelleren Umsatz der synaptischen Vesikel im Vergleich zu den dense core vesicles, welche eine höhere Substrataffinität des VMAT2 bedingen.

Da es zudem Hinweise für die gleichzeitige Expression von VMAT1 und VMAT2 in chromaffinen Zellen im Nebennierenmark gibt, ist auch eine differentielle Regulation beider Transporter möglich.

4.6 Mögliche physiologische Bedeutung einer Regulation von VMAT

Davon ausgehend, dass sich der vesikuläre Monoamintransport durch die Aktivitätsregulierung von VMAT über die $Go2\alpha$ -Untereinheit beeinflussen lässt, stellt sich die Frage, welche möglichen physiologischen Bedeutungen dieser Vorgang hat. Durch die Aktivierung von $Go2\alpha$ erhöht sich der K_M -Wert von VMAT. Daraus resultiert eine verminderte Aufnahme von Monoaminen in die Vesikel aufgrund der geringeren Substrataffinität. Da die VMAT hochaffin für ihre Substrate sind, kommt es bereits bei niedrigen Monoaminkonzentrationen zur Sättigung des Transportsystems. Eine Verminderung der Affinität kann somit zu einer Erhöhung der Transportkapazität führen. So kommt es im Kapillarnetz des Dünndarms zu sehr hohen Serotoninkonzentrationen. Um eine toxische Wirkung des Serotonins zu vermeiden, ist eine schnelle vesikuläre Aufnahme essentiell. Durch Erhöhung des K_M -Wertes kann die Transportkapazität der VMAT erhöht und damit die Toxizität der Monoaminabbauprodukte verhindert werden.

Die Applikation von MPTP induziert bei Primaten ein irreversibles Parkinson-Syndrom durch die Zerstörung dopaminerger nigrostriataler Zellen (Heikkila et al., 1984). MPTP wird im Organismus durch die Monoaminoxidase B zum aktiven Metaboliten MPP^+ umgebaut. Dieser hemmt die Aktivität der Mitochondrien. In Versuchen an PC12-Zellen, welche nur VMAT1 exprimieren, konnte gezeigt werden, dass diese gegenüber MPP^+ relativ unsensibel sind. Hingegen sind CHO-Zellen deutlich sensibler, sie besitzen keinen vesikulären Monoamintransporter. Nach Transfektion der CHO-Zellen mit der PC12-cDNA-Bibliothek sinkt die Sensitivität der CHO-Zellen gegenüber MPP^+ deutlich. Dies kann durch Zugabe von Reserpin rückgängig gemacht werden. Die Expression von VMAT scheint also für die Resistenz gegenüber MPTP und damit dem neuroprotektiven Effekt verantwortlich zu sein (Liu & Edwards, 1997). Aber auch Dopamin selbst wirkt toxisch auf die dopaminergeren Zellen. Somit ist es auch hier von großer Wichtigkeit, dass die Dopaminkonzentration durch die vesikulären Monoamintransporter im Zytosol niedrig gehalten wird. An heterozygoten VMAT2-Mausdeletionsmutanten zeigte sich außerdem eine erhöhte Neurotoxizität bei erhöhtem Dopamingehalt im Striatum im Vergleich zu Wildtypmäusen. Dieser Effekt wurde durch die Injektion von Methamphetamin erreicht (Fumagalli et al., 1999). In diesem Zusammenhang von Bedeutung ist auch die Erkenntnis, dass die neuronale Degeneration beim Morbus Parkinson oft im Bulbus olfactorius beginnt. Die sich dort

befindlichen Neurone besitzen keinen vesikulären Monoamintransporter (Daniel & Hawkes, 1992).

In der Mukosa des Magenantrums konnte gezeigt werden, dass VMAT1 in gastrin-produzierenden Zellen exprimiert wird. Gastrin ist ein Peptidhormon, welches unter anderem zu einer Steigerung der Magensäureproduktion und zu einer Erhöhung des Tonus des Kardiasphinkters führt und zudem als Wachstumsfaktor fungiert. Aus Progastrin wird über verschiedene Biosyntheseschritte das aus 34 bzw. das aus 17 Aminosäuren bestehende G34 bzw. G17 synthetisiert. Dabei wird G34 etwa fünfmal langsamer abgebaut als G17. Es konnte gezeigt werden, dass es durch Zugabe von L-DOPA zu einer Verschiebung des Verhältnisses von G34 zu G17 kommt, wobei die Konzentration von G34 im Verhältnis zunimmt und die von G17 abnimmt. Dabei wurde, aufgrund des Transportmechanismus von VMAT1, eine intravesikuläre pH-Abhängigkeit postuliert, da die Prohormonkonvertasen ein pH-Optimum im sauren pH-Bereich haben. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der VMAT1 neben seiner Transportfunktion zudem eine Rolle in der Modulation der intravesikalen Prohormonverarbeitung spielt (Hussain et al., 1999).

Eine weitere Wirkung von VMAT1 konnte an glatten Muskelzellen der Aorta der Ratte (smooth muscle aorta cells; SMAC) gezeigt werden. Diese Zellen sind sehr empfindlich gegenüber Hypothermie. Nach Wiedererwärmung auf 37° C kommt es, wie bei vielen anderen Zelltypen, die empfindlich für Hypothermie sind, zu einem Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, zu einer Entleerung der intrazellulären Vesikel, zu einer Zellschwellung und letztendlich zur Apoptose. Nach Transfektion von SMAC mit Tryptophanhydroxylase-1 und VMAT1 (VTSMAC) kam es nach einer 24-stündigen Hypothermie (3° C) mit anschließender Erwärmung (37° C) zu einem signifikanten Anstieg des Überlebens der transfizierten Zellen. Durch Inkubation mit Fluoxetin konnte dieser Effekt aufgehoben werden. Die Transfektion mit VMAT1 und Tryptophanhydroxylase-1 führte zu einer vesikulären Akkumulation von Serotonin, das während der Kältephase exozytiert wurde. Einerseits wirkt Serotonin selbst antioxidativ. Andererseits scheint es durch Serotonin zu einer Induktion der Cystathionin-beta-Synthetase und damit zu einer erhöhten Produktion von Schwefelwasserstoff, welches Zellen vor ROS während der Erwärmungsphase schützt, zu kommen (Talaie et al., 2012). Diese Erkenntnisse zeigen eine weitere Rolle des vesikulären Monoamintransporters und ermöglichen eventuell die Entwicklung neuer Strategien, um beispielsweise das Überleben von Transplantatorganen zu verbessern.

4.7 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Erkenntnisse über die Regulation des vesikulären Monoamintransporters 1 gesammelt und im Zusammenhang mit bereits bekannten wissenschaftlichen Erkenntnissen diskutiert. Bekannt ist, dass VMAT1 und VMAT2 durch G-Proteine reguliert werden (VMAT1 durch $Go2\alpha$ in neuroendokrinen Zellen, VMAT2 durch $Go2\alpha$ in synaptischen Vesikeln und durch $Gq\alpha$ in Thrombozyten). Dabei kommt es sowohl nach Aktivierung von $Go2\alpha$ als auch von $Gq\alpha$ zu einer verminderten Monoaminaufnahme in die Vesikel. Bei den Versuchen mit den CHOVMAT1-Zellen kam es allerdings zu einer Erhöhung der vesikulären Serotoninaufnahme nach Transfektion mit konstitutiv aktivem $Gq\alpha$. Dabei ist zu klären, ob es sich dabei um einen gewebsspezifischen Prozess oder eine andersartige Regulation des VMAT1 im Vergleich zu VMAT2 handelt. So bleibt zu untersuchen, welche Wirkung $Gq\alpha$ in anderen Systemen, in denen der VMAT1 exprimiert wird, hat. Zudem ist bisher wenig untersucht, welche Auswirkung $Gq\alpha$ auf die VMAT2-Aktivität außerhalb von Thrombozyten hat (im Gehirn hat $Gq\alpha$ keine Auswirkung auf die VMAT2-Aktivität). Dies könnte beispielsweise in VMAT2-transfizierten CHO-Zellen näher untersucht werden.

Des Weiteren bleibt zu klären, welche Prozesse zur Aktivierung des jeweiligen G-Proteins führen. So ist bekannt, dass die große intraluminale Schleife zwischen erster und zweiter Transmembrandomäne für die Detektion des vesikulären Füllungszustandes verantwortlich ist. Zudem konnte eine Interaktion zwischen dem C-Terminus von VMAT2 und der $Go2\alpha$ -Untereinheit gezeigt werden. Um eine direkte Aktivierung von $Go2\alpha$ durch VMAT2 nachzuweisen, müssen zukünftig weitere Untersuchungen, wie zum Beispiel Aktivierungs-Assays, durchgeführt werden. Zudem gelang es bisher nicht, eine Interaktion zwischen $Go2\alpha$ und dem VMAT1 zu zeigen.

Es konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass cAMP und cGMP die vesikuläre Monoaminaufnahme in PC12-Zellen hemmen. Dabei stellt sich zunächst die Frage, ob es sich hierbei um zwei voneinander getrennte oder aber synergistische Prozesse handelt. Zudem ist nicht geklärt, über welche Signaltransduktionswege diese Hemmung zustande kommt, also welche Effektoren durch das G-Protein beeinflusst und welche Zielstrukturen durch cAMP und cGMP angesprochen werden. In der Vergangenheit wurde bereits gezeigt, dass durch Hemmung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A die

durch cAMP vermittelte Hemmung der vesikulären Monoaminaufnahme aufgehoben werden kann. Jedoch bleibt offen, welche Zielstrukturen die Proteinkinase A verändert und somit die vesikuläre Monoaminaufnahme reduziert.

5 Zusammenfassung

Die Kommunikation von Zellen in einem Organismus erfolgt unter anderem durch die Ausschüttung von Botenstoffen. Neurone und endokrine Zellen besitzen zu diesem Zweck spezielle Speicherorganellen für diese Botenstoffe, so genannte Vesikel. Durch Exozytoseprozesse können die Transmitter beispielsweise in den synaptischen Spalt oder ins Blut abgegeben werden. Neben zahlreichen Faktoren, die die Konzentration des jeweiligen Botenstoffes beeinflussen, kann auch der Füllungsgrad der Vesikel reguliert werden.

In monoaminergen Systemen werden die Monoamine durch die vesikulären Monoamintransporter 1 und 2 (VMAT1 und 2) ins Vesikelinnere transportiert. Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass die Monoaminspeicherung dieser Vesikel durch die $G\alpha$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine reguliert wird. Kommt es zur Aktivierung der $G\alpha$ -Untereinheit, wird die vesikuläre Monoaminspeicherung in Neuronen und neuroendokrinen Zellen gehemmt. In Thrombozyten konnte dieser Effekt ebenfalls gezeigt werden, allerdings ist dort die $Gq\alpha$ -Untereinheit dafür verantwortlich. Als auslösendes Signal ist dabei der vesikuläre Füllungsgrad anzusehen, wobei vermutlich die große intraluminale Schleife zwischen erster und zweiter Transmembrandomäne der VMAT als Sensor für die Füllung der Vesikel fungiert. Über die Signaltransduktionsprozesse, welche letztendlich zur Hemmung des vesikulären Monoamintransportes und auch zur Aktivierung des heterotrimeren G-Proteins führen, ist bisher wenig bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Regulation des VMAT1 näher untersucht. Dabei wurden Hinweise auf Signaltransduktionsschritte, die der G-Protein Aktivierung nachgeschaltet sind, gefunden: Die sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP, die bekanntermaßen in verschiedenen intrazellulären Signaltransduktionsprozessen eine Rolle spielen, bewirken eine Hemmung des vesikulären Monoamintransportes in PC12-Zellen. Es zeigte sich außerdem eine Verminderung der maximalen Transportgeschwindigkeit des VMAT1. Im Vergleich zu Voruntersuchungen mit den sekundären Botenstoffen cAMP und cGMP an Vesikelpräparationen des Mäusegehirns konnte kein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Hemmung zwischen cAMP und cGMP gefunden werden.

Weiterhin wurde die unterschiedliche Rolle verschiedener $G\alpha$ -Untereinheiten in der G-Protein vermittelten Regulation der VMAT untersucht: In mit VMAT1-transfizierten CHO-Zellen konnte gezeigt werden, dass es zu einer Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme nach Transfektion dieser Zellen mit konstitutiv aktivem $Go2\alpha$ kommt. Eine Transfektion mit konstitutiv aktivem $Go1\alpha$ zeigte keine Beeinflussung der Monoaminaufnahme in die Vesikel. Hingegen kam es nach Transfektion mit konstitutiv aktivem $Gq\alpha$ zu einer verstärkten vesikulären Serotoninaufnahme.

Insgesamt konnten durch die Ergebnisse dieser Arbeit neue Erkenntnisse über die Regulation des VMAT1 gewonnen werden. Daran zeigt sich, dass die Regulation von VMAT1 und VMAT2 trotz gemeinsamer Elemente auch Unterschiede aufweist: Neben der Untermauerung der Bedeutung der $Go2\alpha$ -Untereinheit konnte die differentielle Wirkung verschiedener α -Untereinheiten je nach Gewebe oder exprimierter VMAT-Isoform gezeigt werden. Auch für die Beteiligung intrazellulärer sekundärer Botenstoffe an der VMAT-Regulation ergaben sich Hinweise auf Unterschiede zwischen den Signalwegen für VMAT1 und VMAT2.

6 Abstract

The role of G-protein α -subunits and of intracellular signaling pathways in the regulation of the vesicular monoamine transporter 1

The communication of cells in an organism occurs amongst others by the release of transmitters. For this purpose neurons and endocrine cells possess special storage organelles for these transmitters, so-called vesicles. By exocytosis, the transmitter is released, for example, into the synaptic gap or into the blood. Among many factors that are influencing the concentration of the transmitter, the filling degree of the vesicles can be controlled.

In monoaminergic systems the monoamines are transported into the vesicle by the vesicular monoamine transporters 1 and 2 (VMAT1 and 2). Previous studies showed that the monoamine storage of these vesicles is regulated by the $G\alpha$ subunits of heterotrimeric G-proteins. The activation of $G\alpha_{o2}$ causes inhibition of vesicular monoamine storage in neurons and neuroendocrine cells. In platelets the $G\alpha_{q}$ subunit is responsible for this effect. The vesicular filling state is considered to be the triggering signal of G-protein activation, and is presumably sensed by the large intraluminal loop between the first and second transmembrane domain of the VMAT. Little is known about downstream and upstream signal transduction cascades, which ultimately lead to the inhibition of the vesicular monoamine transport and to the activation of the heterotrimeric G-protein, respectively.

In this work, the regulation of VMAT1 was investigated. The following information of downstream signalling pathways after G-protein activation could be gathered: The second messengers cAMP and cGMP, which are known to play a role in various intracellular signal transduction processes, cause an inhibition of the vesicular monoamine uptake into PC12 cells. A reduction in the maximum transport rate of VMAT1 could be shown. In contrast to previous investigations in vesicle preparations of the mouse brain, no significant difference in the degree of inhibition between cAMP and cGMP could be found.

A second main focus was the investigation of the different role of various $G\alpha$ subunits in the G-protein mediated regulation of VMAT: In VMAT1 transfected CHO cells an

inhibition of the vesicular serotonin uptake could be demonstrated after transfection with constitutively active $Go2\alpha$. A transfection with constitutively active $Go1\alpha$ had no effect on monoamine uptake into the vesicles. In contrast transfection with constitutively active $Gq\alpha$ results in an increased serotonin vesicular monoamine uptake.

Taken together the results of this work yielded new insights into the regulation of VMAT1. Despite of common elements there are differences in the regulation of VMAT1 and VMAT2. In addition to the substantiation of the importance of $Go2\alpha$, the differential effect of various α -subunits depending on the tissue or expressed VMAT isoform could be shown. There was also evidence for differences between the participation of intracellular second messengers in signaling pathways for VMAT1 and VMAT2.

7 Abkürzungsverzeichnis

A

AC	Adenylylzyklase
ADP	Adenosindiphosphat
AlF_4^-	Aluminiumfluorid
ATP	Adenosintriphosphat

B

BCA	Bichinchoninsäure-4,4-dicarboxy-2,2-Bichinolin
BSA	Bovines Serum Albumin

C

cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAPS	Calcium-dependent activator proteins of secretion
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CHO	Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters
ClC	Chloridkanal

D

$\Delta\mu\text{H}^+$	elektrochemischer Gradient
ΔpH	Protonengradient
$\Delta\psi$	elektrischer Gradient
$\text{D}_{2\text{L}}$	D_2 -like dopamine autoreceptor
DAG	Diacylglycerol
DAT	dopamine active transporter
dBcAMP	Dibutyryl-cAMP
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol

E

ECL	enhanced chemiluminescence
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein

G

GABA	γ -Aminobuttersäure
GAP	GTPase-activating protein
GAT	GABA-Transporter
GC	Guanylylzyklase
GDI	guanine nucleotide dissociation inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	guanine nucleotide exchange factor

GFP	green fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein)
GLYT	Glyzin-Transporter
GMP-P(NH)P	5'-Guanylylimidodiphosphat
GPCR	G-protein coupled receptor
GRIN	G-protein-induced-protein-of-Neurite-outgrowth
GTP	Guanosintriphosphat
GTP γ S	Guanosin-5'-O-(thiotriphosphat)
H	
HE	Hämolytische Einheit
I	
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
K	
KG-Puffer	Kaliumglutamat-Puffer
K _M -Wert	Michaelis-Menten-Konstante
L	
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LDCV	large dense core vesicles
LMW	low molecular weight
M	
MCS	Multiple Cloning Site
MPP ⁺	N-methyl-4-phenylpyridinium
MPTP	1-Methyl 4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
N	
NET	norepinephrine transporter (=NAT, Noradrenalin-Transporter)
NO	Stickstoffmonoxid
P	
PBS	Phosphate-buffered Saline
PC12	Phäochromozytomzelllinie der Ratte
PIP ₂	Phosphatidylinositolbisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C

R

RGS regulators of G-protein signaling
 ROS reaktive Sauerstoffspezies

S

SDS-PAGE sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
 SERT Serotonin-Transporter
 SLMV synaptic-like micro vesicles
 SLO Streptolysin O
 SMAC smooth muscle aorta cells
 SSV small synaptic vesicles

T

TAE-Puffer Tris-Acetat-EDTA-Puffer
 TE-Puffer Tris-EDTA-Puffer
 Tph1 Tryptophanhydroxylase-1

U

UV Ultraviolet

V

v/v Volumen pro Volumen
 VACHT vesikulärer Acetylcholintransporter
 v-ATPase vakuoläre ATPase
 VEAT vesikulärer Transporter für exzitatorische Aminosäuren
 VGAT vesikulärer GABA-Transporter
 VGLUT vesikulärer Glutamattransporter
 VIAAT vesikulärer Transporter für inhibitorische Aminosäuren
 VMAT vesikulärer Monoamintransporter
 VNUT vesikulärer Nukleotidtransporter

W

w/v Gewicht pro Volumen

Z

ZNS Zentralnervensystem

8 Literaturverzeichnis

- Ahnert-Hilger G, Schäfer T, Spicher K, et al. Detection of G-protein heterotrimers on large dense core vesicles and small synaptic vesicles of neuroendocrine and neuronal cells. *Eur J Cell Biol* 1994; 65:26-28.
- Ahnert-Hilger G, Nürnberg B, Exner T, et al. The heterotrimeric G-protein Go2 modulates catecholamine uptake into secretory vesicles. *EMBO J* 1998; 17:406-13.
- Albert PR, Robillard L. G-protein specificity: traffic direction required. *Cell Signal* 2002; 14:407-18.
- Ali N, Milligan G, Evans WH. G-proteins of rat liver membranes. Subcellular compartmentation and disposition in the plasma membrane. *Mol Cell Biochem* 1989. 91:75-84.
- Ali N, Agrawal DK. Guanine nucleotide binding regulatory proteins: their characteristics and identification. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1994. 32:187-96.
- Aronin N, DiFiglia M. The subcellular localization of the G-protein $G_{i\alpha}$ in the basal ganglia reveals its potential role in both signal transduction and vesicle trafficking. *J Neurosci* 1992; 12:3435-3444.
- Audigier Y, Nigam SK, Blobel G. Identification of a G-protein in rough endoplasmic reticulum of canine pancreas. *J Biol Chem* 1988; 263:16352-7.
- Baron J. G_o-Protein vermittelte Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme und dessen Einfluss auf das monoaminerge Neurotransmittersystem. Dissertation, Freie Universität Berlin, 2012.
- Baron J, Blex C, Rohrbeck A, et al. The α -subunit of the trimeric GTPase Go2 regulates axonal growth. *J Neurochem* 2013; 124:782-94.
- Blondeau F, Ritter B, Allaire PD, et al. Tandem MS analysis of brain clathrin-coated vesicles reveals their critical involvement in synaptic vesicle recycling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:3822-8.
- Borges R, Díaz-Vera J, Domínguez N, et al. Chromogranins as regulators of exocytosis. *J Neurochem* 2010; 114:335-43.
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 1990; 348:125-32.
- Brunk I, Blex C, Rachakonda S, et al. The first luminal domain of vesicular monoamine transporters mediates G-protein-dependent regulation of transmitter uptake. *J Biol Chem* 2006; 281:33373-85.
- Brunk I, Blex C, Sanchis-Segura C, et al. Deletion of Go2 α abolishes cocaine-induced behavioural sensitization by disturbing the striatal dopamine system. *FASEB J* 2008a; 22:3736-46.
- Brunk I, Blex C, Speidel D, et al. Ca²⁺-dependent activator proteins of secretion promote vesicular monoamine uptake. *J Biol Chem* 2008b; 284:1050-6.

- Brunk I, Sanchis-Segura C, Blex C, et al. Amphetamine regulates NR2B expression in Go2 α knockout mice and thereby sustains behavioural sensitization. *J Neurochem* 2010; 115:234-56.
- Bruns D, Riedel D, Klingauf J, et al. Quantal release of serotonin. *Neuron* 2000; 28:205-20.
- Burré J, Beckhaus T, Schägger H, et al. Analysis of the synaptic vesicle proteome using three gel-based protein separation techniques. *Proteomics* 2006; 6:6250-62.
- Chabre M. Aluminofluoride and beryllofluoride complexes: a new phosphate analogs in enzymology. *Trends Biochem Sci* 1990; 15:6-10.
- Chen LT, Gilman AG, Kozasa T. A candidate target for G-protein action in brain. *J Biol Chem* 1999; 274:26931-38.
- Clapham DE, Neer EJ. New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signaling. *Nature* 1993; 365:403-6.
- Colliver TL, Pyott SJ, Achalabun M, et al. VMAT-mediated changes in quantal size and vesicular volume. *J Neurosci* 2000; 20:5276-82.
- Cumbay MG, Watts VJ. Heterologous sensitization of recombinant adenylate cyclases by activation of D(2) dopamine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297:1201-9.
- Danbolt NC. Glutamate Uptake. *Prog Neurobiol* 2001; 65:1-105.
- Daniel SE, Hawkes CH. Preliminary diagnosis of parkinson's disease by olfactory bulb pathology. *Lancet* 1992; 340:186.
- Darchen F, Scherman D, Henry JP. Reserpine binding to chromaffin granules suggests the existence of two conformations of the monoamine transporter. *Biochemistry* 1989; 28:1697-7.
- Del Castillo J, Katz B. Quantal components of the end-plate Potential. *J Physiol* 1954; 124:560-73.
- Dhingra A, Jiang M, Wang T-L, et al. Light response of retinal ON bipolar cells requires a specific splice variant of G α . *J Neurosci* 2002; 22:4878-84.
- Edwards RH. The neurotransmitter cycle and quantal size. *Neuron* 2007; 55:835-58.
- Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS. Leaky catecholamine stores: undue waste or a stress response coping mechanism? *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1018:224-30.
- Enomoto A, Murakami H, Asai N, et al. Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Dev Cell* 2005; 9:389-402
- Ercolani L, Stow JL, Boyle JF, et al. Membrane localization of the pertussis toxin-sensitive G-protein subunits alpha i-2 and alpha i-3 and expression of a metallothionein-alpha i-2 fusion gene in LLC-PK1 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:4635-39.
- Erickson JD, Eiden LE, Hoffman BJ. Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:10993-7.
- Erickson JD, Schafer MK, Bonner TI, et al. Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:5166-71.

- Evans GJ, Cousin MA. Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling. *Biochem Soc Trans* 2005; 33:1350-3.
- Fon EA, Pothos EN, Sun BC, et al. Vesicular transport regulates monoamine storage and release but is not essential for amphetamine action. *Neuron* 1997; 19:1271-83.
- Forti L, Bossi M, Bergamaschi A, et al. Loose-patch recordings of single quanta at individual hippocampal synapses. *Nature* 1997; 388:874-8.
- Fumagalli F, Gainetdinov RR, Wang YM, et al. Increased methamphetamine neurotoxicity in heterozygous vesicular monoamine transporter 2 knock-out mice. *J Neurosci.* 1999; 19:2424-31.
- Gasman S, Chasserot-Golaz S, Hubert P e al. Identification of a potential effector pathway for the trimeric Go protein associated with secretory granules. *J Biol Chem* 1998; 273:16913-20.
- Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73:2424-8.
- Hansson SR, Hoffmann BJ, Mezey E. Ontogeny of vesicular monoamine transporter mRNAs VMAT1 and VMAT2. The devoping rat central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 1998; 110:135-158.
- Hayashi M, Haga M, Yatsushiro S, et al. Vesicular monoamine Transporter 1 is responsible for storage of 5-Hydroxytryptaminein rat pinealocytes. *J Neurochem* 1999; 73(6):2538-254.
- Heikkila RE, Hess A, Duvoisin RC. Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice. *Science* 1984; 224:1451-3.
- Hell JW, Maycox PR, Jahn R. Energy dependence and functional reconstitution of the γ -aminobutyric acid carrier from synaptic vesicles. *J Biol Chem* 1990; 265:2111-7.
- Henry JP, Botton D, Sagne C, et al. Biochemistry and molecular biology of the vesicular monoamine transporter from chromaffin granules. *J Exp Biol* 1994; 196:251-62.
- Höltje M, von Jagow B, Pahner I, et al. The neuronal monoamine transporter VMAT2 is regulated by the trimeric GTPase Go₂. *J Neurosci* 2000; 20:2131-41.
- Höltje M, Winter S, Walther D, et al. The vesicular monoamine content regulates VMAT2 activity through Gaq in mouse platelets. *J Biol Chem* 2003; 278:15850-58.
- Hofmann F. The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 2005; 280:1-4.
- Hussain I, Bate GW, Henry J, et al. Modulation of gastrin processing by vesicular monoamine transporter type 1 (VMAT1) in rat gastrin cells. *J Physiol* 1999; 517:495-505.
- Itokawa K, Sora I, Schindler CW, et al. Heterozygous VMAT2 knockout mice display prolonged QT intervals: possible contributions to sudden death. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 71:354-7.
- Iwatsuki K, Ichikawa R, Hiasa M, et al. Identification of the vesicular nucleotide transporter (VNUT) in taste cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 388:1-5.
- Jiang M, Gold MS, Boulay G, et al. Multiple neurological abnormalities in mice deficient in the G protein Go. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95:3269-74.

- Jiang M, Spicher K, Boulay G, et al. Most central nervous system D2 dopamine receptors are coupled to their effectors by Go. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98:3577-82.
- Jockusch WJ, Speidel D, Sigler A, et al. CAPS-1 and CAPS-2 are essential synaptic vesicle priming proteins. *Cell* 2007; 131:796-808.
- Johnson RG. Accumulation of biological amines into chromaffin granules: a model for hormone and neurotransmitter transport. *Physiol Rev* 1988; 68:232-307.
- Jordan JD, Carey KD, Stork PJ, et al. Modulation of rap activity by direct interaction of Galpha(o) with Rap1 GTPase-activating protein. *J Biol Chem* 1999; 274:21507-10.
- Katz B. Quantal mechanism of neural transmitter release. *Science* 1971; 173:123-6.
- Kinoshita M, Nukada T, Asano T, et al. Binding of G alpha(o) N terminus is responsible for the voltage-resistant inhibition of alpha(1A) (P/Q-type, Ca(v)2.1) Ca(2+) channels. *J Biol Chem* 2001; 276:28731-8.
- Lesch KP, Gross J, Wolozin BL, et al. Extensive sequence divergence between the human and rat brain vesicular monoamine transporter: possible molecular basis for species differences in the susceptibility to MPP+. *J Neural Transm Gen Sect* 1993; 93:75-82.
- Leyte A, Barr FA, Kehlenbach RH, et al. Multiple trimeric G-proteins on the trans-Golgi network exert stimulatory and inhibitory effects on secretory vesicle formation. *EMBO J.* 1992; 11:4795-804.
- Le-Niculescu H, Niesman I, Fischer T, et al. Identification and characterization of GIV, a novel Galpha i/s-interacting protein found on COPI, endoplasmic reticulum-Golgi transport vesicles. *J Biol Chem* 2005; 280:22012-20.
- Liu Y, Peter D, Roghani A, et al. A cDNA that suppresses MPP+ toxicity encodes a vesicular amine transporter. *Cell* 1992; 70: 539-51.
- Liu Y, Schweitzer ES, Nirenberg MJ, et al. Preferential localization of a vesicular monoamine transporter to dense core vesicles in PC12 cells. *J Cell Biol* 1994; 127:1419-33.
- Liu Y, Edwards RH. The role of vesicular transport proteins in synaptic transmission and neural degeneration. *Annu Rev Neurosci* 1997; 20:125-56.
- Luo Y, Denker BM. Interaction of heterotrimeric G protein Galphao with Purkinje cell protein-2. Evidence for a novel nucleotide exchange factor. *J Biol Chem* 1999; 274:10685-88.
- Matsuda JJ, Filali MS, Volk KA, et al. Overexpression of CLC-3 in HEK293T cells yields novel currents that are pH dependent. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294:C251-62.
- Maycox PR, Hell JW, Jahn R. Amino acid neurotransmission: spotlight on synaptic vesicles. *Trends Neurosci* 1990; 13:83-87.
- Miller KG, Emerson MD, McManus JR, et al. RIC-8 (Synembryn): a novel conserved protein that is required for G(q)alpha signaling in the *C. elegans* nervous system. *Neuron* 2000; 27:289-99.
- Miller KG, Rand JB. A role for RIC-8 (Synembryn) and GOA-1 (G(o)alpha) in regulating a subset of centrosome movements during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 2000; 156:1649-60.

- Miyaji T, Omote H, Moriyama Y. A vesicular transporter that mediates aspartate and glutamate neurotransmission. *Biol Pharm Bull* 2010; 33:1783-5.
- Mizuno N, Itoh H. Functions and regulatory mechanisms of Gq-signaling pathways. *Neurosignals* 2009; 17:42-54.
- Nakanishi N, Onozawa S, Matsumoto R, et al. Cyclic AMP-dependent modulation of vesicular monoamine transport in pheochromocytoma cells. *J Neurochem* 1995a; 64:600-7.
- Nakanishi N, Onozawa S, Matsumoto R, et al. Effects of protein kinase inhibitors and protein phosphatase inhibitors on cyclic AMP-dependent downregulation of vesicular monoamine transport in pheochromocytoma PC12 cells. *FEBS Lett* 1995b; 368:411-4.
- Nirenberg MJ, Liu Y, Peter D, et al. The vesicular monoamine transporter 2 is present in small synaptic vesicles and preferentially localizes to large dense core vesicles in rat solitary tract nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:8773-7.
- Nishimoto I, Okamoto T, Matsuura Y, et al. Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature* 1993; 362:75-79.
- Nürnberg B, Ahnert-Hilger G. Potential roles of heterotrimeric G proteins of the endomembrane system. *FEBS Lett* 1996; 389:61-65.
- Ohara-Imaizumi M, Kameyama K, Kawae N, et al. Regulatory role of the GTP-binding protein, Go, in the mechanism of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J Neurochem* 1992; 58:2275-84.
- Pahner I, Höltje M, Winter S, et al. Subunit composition and functional properties of G-protein heterotrimers in rat chromaffin granules. *Eur J Cell Biol* 2002; 81:449-56.
- Pahner I, Höltje M, Winder A, et al. Functional G-protein heterotrimers are associated with vesicles of putative glutamatergic terminals: implications for regulation of transmitter uptake. *Mol Cell Neurosci* 2003; 23:398-413.
- Peter D, Jimenez J, Liu Y, et al. The chromaffin granule and synaptic vesicle amine transporters differ in substrate recognition and sensitivity to inhibitors. *J Biol Chem* 1994; 269:7231-7.
- Peter D, Liu Y, Sternini C, et al. Differential expression of two vesicular monoamine transporters. *J Neurosci* 1995; 15:6179-88.
- Pothos E, Desmond M, Sulzer D. L-3,4-dihydroxyphenylalanine increases the quantal size of exocytotic dopamine release in vitro. *J Neurochem* 1996; 66:629-36.
- Pothos EN, Przedborski S, Davila V, et al. D2-like dopamine autoreceptor activation reduces quantal size in PC12 cells. *J Neurosci* 1998; 18:5575-85.
- Pothos EN, Larsen KE, Krantz DE, et al. Synaptic vesicle transporter expression regulates vesicle phenotype and quantal size. *J Neurosci* 2000; 20:7297-306.
- Pullarkat SR, Mysels DJ, Tan M, et al. Coupling of serotonin 5-HT1B receptors to activation of mitogen-activated protein kinase (ERK-2) and p70 S6 kinase signaling systems. *J Neurochem* 2003; 71:1059-67.

- Rasnick MM, Wang N, Yan K. Specific associations between tubulin and G proteins: participation of cytoskeletal elements in cellular signal transduction. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1990; 24:381-6.
- Reimer RJ, Fon EA, Edwards RH. Vesicular neurotransmitter transport and the presynaptic regulation of quantal size. *Curr Opin Neurobiol* 1998; 8:405-12.
- Ross EM, Wilkie TM. GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu Rev Biochem* 2000; 69:795-827.
- Schmidt M, Evellin S, Weernink PA, et al. A new phospholipase-C-calcium signaling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase. *Nat Cell Biol* 2001; 3:1020-4.
- Scholten A, Aye TT, Heck AJ. A multi angular mass spectrometric view at cyclic nucleotide dependent protein kinases: in vivo characterization and structure/function relationships. *Mass Spectrom Rev* 2008; 27:331-53.
- Schuldiner S, Shirvan A, Linial M. Vesicular neurotransmitter transporters from bacteria to humans. *Physiological Rev* 1995; 75:369-92.
- Schultess J, Danielewski O, Smolenski AP. Rap1Gap2 is a new GTPase-activating protein of Rap expressed in human platelets. *Blood* 2005; 105:3185-92.
- Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 1991; 252:802-8.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150:76-85.
- Speidel D, Varoqueaux F, Enk C, et al. A family of Ca²⁺-dependent activator protein for secretion: comparative analysis of structure, expression, localization, and function. *J Biol Chem* 2003; 278:52802-9.
- Speidel D, Bruederle CE, Enk C, et al. CAPS1 regulates catecholamine loading of large dense-core vesicles. *Neuron* 2005; 46:75-88.
- Sternberg JM. Regulation des vesikulären Monoamintransporters 2 – Beteiligung heterotrimerer G-Proteine und intrazellulärer Signaltransduktionswege. Dissertation, Freie Universität Berlin, 2006.
- Sternweis PC, Robishaw JD. Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain. *J Biol Chem* 1984; 259:13806-13.
- Strittmatter SM, Valenzuela D, Sudo Y, et al. An intracellular guanine nucleotide release protein for G₀. GAP-43 stimulates isolated alpha subunits by a novel mechanism. *J Biol Chem* 1991; 266:22465-71.
- Su CY, Luo DG, Terakita A, et al. Parietal-eye phototransduction components and their potential evolutionary implications. *Science* 2006; 311:1617-21.
- Takahashi N, Miner LL, Sora I, et al. VMAT2 knockout mice: heterozygotes display reduced amphetamine-conditioned reward, enhanced amphetamine locomotion, and enhanced MPTP toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:9938-43.

- Takamori S, Holt M, Stenius K, et al. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 2006; 127:831-46.
- Talaei F, Schmidt M, Henning RH. Induction of VMAT-1 und TPH-1 expression induces vesicular accumulation of serotonin and protects cells and tissue from cooling/rewarming injury. *PLoS one* 2012; 7:e30400.
- Tang KM, Wang GR, Lu P, et al. Regulator of G-Protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nat Med* 2003; 9:1506-12.
- Toutant M, Aunis D, Bockaert J, et al. Presence of three pertussis toxin substrates and G α immunoreactivity in both plasma and granule membranes of chromaffin cells. *FEBS Lett* 1987; 215:339-44.
- Traver S, Bidot C, Spassky N, et al. RGS14 is a novel Rap effector that preferentially regulates the GTPase activity of G α phao. *Biochem J* 2000; 350:19-29.
- Travis ER, Wang YM, Michael DJ, et al. Differential quantal release of histamine and 5-hydroxytryptamine from mast cells of vesicular monoamine transporter 2 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:162-7.
- Truong JG, Rau KS, Hanson GR, et al. Pramipexole increases vesicular dopamine uptake: implications for treatment of Parkinson's neurodegeneration. *Eur J Pharmacol* 2003; 474:223-6.
- Van der Kloot W. The regulation of quantal size. *Prog Neurobiol* 1991; 36:93-130.
- Van der Kloot W, Colasante C, Cameron R, et al. Recycling and refilling of transmitter quanta at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 2000; 523 Pt 1:247-58.
- Venezuela D, Han X, Mende U, et al. G α (o) is necessary for muscarinic regulation of Ca $^{2+}$ channels in mouse heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:1727-32.
- Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, et al. Synthesis of Serotonin by a second Tryptophan hydroxylase isoform. *Science* 2003; 299:76.
- Wang YM, Gainetdinov RR, Fumagalli F, et al. Knockout of the vesicular monoamine transporter 2 gene results in neonatal death and supersensitivity to cocaine and amphetamine. *Neuron*. 1997; 19:1285-96.
- Watts VJ, Wiens BL, Cumbay MG, et al. Selective activation of G α phao by D2L dopamine receptors in NS20Y neuroblastoma cells. *J Neurosci* 1998; 18:8692-9.
- Weller U, Müller L, Messner M, et al. Expression of active streptolysin O in Escherichia coli as a maltose-binding-protein--streptolysin-O fusion protein. The N-terminal 70 amino acids are not required for hemolytic activity. *Eur J Biochem* 1996; 236:34-9.
- Willard FS, Crouch MF. Nuclear and cytoskeletal translocation and localization of heterotrimeric G-proteins. *Immunol Cell Biol* 2000; 78:387-94.
- Winter S, Brunk I, Walther DJ, et al. G α phoo2 regulates vesicular glutamate transporter activity by changing its chloride dependence. *J Neurosci* 2005; 25:4672-80.
- Wolf WP, Spicher K, Haase H, et al. Immunocytochemical localization of the G-protein subunit, G α c, in rat heart. Implications for a role of G α c in secretion of cardiac hormones. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30:1149-62.

Xu HJ, Umapathysivam K, McNeilage J, et al. An enhanced chemiluminescence detection system combined with a modified immunoblot technique for the detection of low molecular weight IgM in sera from healthy adults and neonates. *J Immunol Methods* 1992; 146:241-7.

9 Danksagung

Frau PD Dr. Irene Brunk danke ich für Ihre kompetente fachliche Anleitung und Ihre wissenschaftliche und persönliche Betreuung sowie die geduldige Unterstützung bei allen Fragen und Problemen, die sich mir immer wieder stellten.

Ich danke Frau Prof. Gudrun Ahnert-Hilger für die Überlassung des Themas und das Ermöglichen dieser Arbeit.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Dr. Christian Blex danke ich für die Bereitstellung der cDNA der konstitutiv aktiven G-Proteine und für seine jederzeit gegebene Hilfe und Unterstützung.

Des Weiteren danke ich meinen Kollegen Birgit, Jens, Johannes, Karin, Mahesh, Marion, Markus, Philipp und Susan für Ihre Mithilfe bei den vielen großen und kleinen Dingen und für das gute Arbeitsklima.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, vor allem meinem Vater für das mehrfache Korrekturlesen, und meinen Freunden für Ihre ausdauernde Unterstützung bedanken.

10 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Stephan Maul, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Bedeutung von G α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine und intrazellulärer Signalwege für die Regulation des vesikulären Monoamintransporters 1“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

28.11.2013

Stephan Maul

11 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.