G_o-Protein vermittelte Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme und dessen Einfluss auf das monoaminerge Neurotransmittersystem

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

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

vorgelegt von

Diplom-Biologe Jens Baron aus Krefeld

März 2012

Die vorliegende Doktorarbeit wurde im Zeitraum vom 02.01.2007 bis 01.03.2012 an der Charité (Campus Mitte), im Institut für integrative Neuroanatomie, Arbeitsgruppe Funktionelle Zellbiologie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Ahnert-Hilger angefertigt.

Gutachter/in: Frau Prof. Dr. Ahnert-Hilger

Gutachter/in: Herr Prof. Dr. Multhaup

Disputation am 27.06.2012

Danksagung

Ich danke Frau Professor Dr. Gudrun Ahnert-Hilger für die Bereitstellung des Themas und das Ermöglichen dieser Arbeit. Im Zeitraum der gesamten Doktorarbeit erfolgte stets eine intensive Betreuung.

Den beiden Gutachtern danke ich für das Erstellen des Gutachtens über diese Dissertation und für die Durchführung des Disputationsverfahrens.

Ich danke Frau Professor Dr. Heide Hörtnagl für die HPLC-Bestimmungen der Monoamine in Hirnarealen, Herrn Professor Dr. Lutz Birnbaumer für die Bereitstellung der $G_0\alpha$ -*Knockout*-Mausmodelle und Herrn Prof. Dr. Igor Stagljar für die immense Unterstützung bei der Durchführung des Split-Ubiquitin-basierten *Yeast Two-Hybrid*-Ansatzes und für seine intensive Betreuung während meines Aufenthaltes in seinem Labor in Kanada.

Außerdem gilt mein Dank ausdrücklich Marion Möbes, Birgit Metze, Susan Ötztürk und Antje Dräger für ihre ausgiebige technische Unterstützung.

Besonderer Dank gilt auch meinen Kollegen an der Charité, die mit ihrer Diskussionsbereitschaft und ihrem fachlichen Wissen, aber auch ihrem Humor dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit erfolgreich abgeschlossen werden konnte. Diese sind Irene Brunk, Christian Blex, Heiko Fuchs, Sascha Seibert, Johannes Piepgras, Johannes Zander, Karin Richter, Philipp Treppmann, Stephan Maul, Christian Derst, Markus Höltje, Agnieszka Münster-Wandowski, Annett Kaphahn und weiterhin die Mitglieder des Graduierten Kollegs *Learning and Memory*.

Weiterhin danke ich Gudrun Ahnert-Hilger, Tim Flink, Christian Blex, Irene Brunk und Jana Haase für das Korrekturlesen und die Beratung beim Verfassen der Dissertation.

Zum Schluss möchte ich herzlichst meiner Familie und all meinen Freunden für eine wunderbare Zeit und die immense moralische Unterstützung während der Doktorandenzeit danken.

Inhaltsverzeichnis

Inł	nalts	verz	eichnis	I
Ab	bildu	ungs	verzeichnis	V
Та	belle	enve	rzeichnis	VII
Ab	kürz	ung	sverzeichnis	VIII
Zu	sam	mer	ıfassung	2
Ab	stra	ct		4
1	Ein	leitu	ing	6
	1.1	Мо	noaminerges Neurotransmittersystem	6
	1.1	1.1	Catecholaminerges Neurotransmittersystem	6
	1.1	.2	Serotonerges Neurotransmittersystem	9
	1.1	.3	Vesikulärer Monoamintransporter und Monoaminspeicherung	11
	1.2	G _o -	Protein vermittelte Signaltransduktion	13
	1.2	2.1	Familien heterotrimerer G-Proteine und deren Aktivitätszyklus	13
	1.2	2.2	$G_o \alpha$ als Subtyp der G_i -Proteinfamilie	16
	1.2	2.3	Konstitutiv aktive und dominant negative Form des $G_{\text{o}}\alpha$	17
	1.2	2.4	Physiologie des G _o -Proteins	
	Go	α-De	eletionsmutanten	18
	We	eiter	e physiologische G _o -vermittelte Effekte	19
	1.3	Zie	lsetzung der vorliegenden Dissertation	
2	Ма	teria	۱	27
2	2.1	Ch	emikalien	27
	2.2	Ve	brauchsmaterialien	
	2.3	Enz	zyme und Enzympuffer	
	2.4	Bal	kterien- / Hefe-Stämme	31
2	2.5	Kits	5	31
	2.6	Ge	räte und Apparaturen	31
	Po	lyme	erase-Kettenreaktion (PCR)	31
	Ele	ektro	phorese (DNA, Proteine) und Western Blot	31
	Ph	otor	neter	
	Mil	kros	kope	
	Но	mog	genisierung von Gewebe	32
	Ze	ntrif	ugen	32
	So	nstię	ge	33
2	2.7	Sof	tware	34
2	2.8 Puffer und Lösungen			

Lösungen	n für die Agarosegelelektrophorese	. 34
Transform	nationspuffer für Hefezellen	. 35
Lösungen	n für die Proteinbestimmung	. 35
Lösungen	n für die SDS-PAGE	. 36
Lösungen	n für die Coomassie-Färbung	. 37
Lösungen	n für das Western Blot-Verfahren und Proteindetektion	. 37
Lösung fü	ir die subzelluläre Fraktionierung	. 38
Lösungen	n für die Neurotransmitteraufnahme	. 38
Lösungen	n für die Proteinextraktion, GST-Pulldown, Immunpräzipitation	. 39
Weitere L	ösungen	. 39
2.9 Medie	n	. 40
Mikrobiell	e Medien	. 40
2.10 Antika	örper	. 41
Primäre A	Antikörper	. 41
Sekundär	e Antikörper	. 42
2.11 Nukle	einsäuren	. 42
Oligonukl	eotide	. 42
Vektoren		. 44
cDNA		. 47
Methoden	۱	. 48
3.1 DNA-1	Techniken	. 48
3.1.1 Pc	olymerase-Kettenreaktion	. 48
3.1.2 DI	NA-Hybridisierung	. 49
3.1.3 Or	rtsspezifische Mutagenese	. 49
3.1.4 Re	estriktion von DNA mit Endonukleasen	. 51
3.1.5 Aç	garosegelelektrophorese	. 52
3.1.6 Ge	elelution	. 52
3.1.7 Li	gation von DNA-Fragmenten	. 52
3.1.8 He	erstellung und Transformation kompetenter E. coli Bakterien	. 52
3.1.9 Iso	olation von Plasmid-DNA aus E.coli	. 53
3.1.10 A	Amplifikation einer cDNA-Bibliothek	. 53
3.1.11 F	Herstellung kompetenter Hefezellen	. 54
3.1.12 T	Fransformation kompetenter Hefezellen	. 55
3.1.13 E	DTT-Methode als alternatives Protokoll zur Hefezell-(Ko)-transformation	. 56
3.1.14 0	Gap Repair homologe Rekombination als Klonierungsstrategie in Hefe	. 57
3.1.15 ls	solation von Plasmid-DNA aus S. cerevisiae	. 58
3.1.16 k	Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen	. 58
3.1.17 E	DNA-Sequenzierung	. 59
	Lösunger Transform Lösunger Lösunger Lösunger Lösunger Lösunger Lösunger Veitere L 2.9 Medie Mikrobiell 2.10 Antike Primäre A Sekundär 2.11 Nukle Oligonukl Vektoren cDNA Methoden 3.1 DNA- 3.1.1 Pc 3.1.2 D 3.1.3 O 3.1.4 Rc 3.1.5 Ac 3.1.5 Ac 3.1.6 G 3.1.7 Li 3.1.6 G 3.1.7 Li 3.1.10 A	Lösungen für die Agarosegelelektrophorese Transformationspuffer für Hefezellen Lösungen für die SDS-PAGE Lösungen für die SDS-Pationierung Lösungen für die SDS-PAGE Sekundare Attikörper Primäre Antikörper Sekundäre Antikörper 2.11 Antikörper Sekundäre Antikörper Sekundäre Antikörper Sekundäre Antikörper Sekundäre Antikörper Sekundäre Antikörper Sekundäre Antikörper 3.11 Nukleinsäuren Oligonukleotide Vektoren CDNA Methoden 3.11 Polymerase-Kettenreaktion 3.12 DNA-Hybridisierung 3.13 Ortspezifische Mutagenese 3.14 Restriktion von DNA mit Endonukleasen 3.15 Agarosegelelektrophorese 3.16 Gelelution 3.17 Ligation von DNA-Fragmenten 3.18 Herstellung und Transformation kompetenter E. coli Bakterien 3.19 Isolation von Plasmid-DNA aus E. coli. 3.10 Amplifikation einer CDNA-Bibliothek 3.111 Herstellung kompetenter Hefezellen 3.112 Transformation kompetenter Hefezellen 3.113 DTT-Methode als alternatives Protokoll zur Hefezell-(Ko)-transformation 3.14 Gap Repair homologe Rekombination als Klonierungsstrategie in Hefe 3.116 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

	3.2	Pro	otein-Techniken	59
	3.2	2.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	59
	3.2	2.2	SDS-PAGE	59
	3.2	2.3	Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue	60
	3.2	2.4	Western Blot-Analyse und Chemilumineszenzdetektion	60
	3.2	2.5	Überexpression und Isolation von Proteinen aus BL21 E. coli	
			Bakterienzellen	61
	3.2	2.6	Gewinnung von Proteinproben aus Hefezellen	62
	3.2	2.7	Proteinextraktion	62
	3.2	2.8	Massenspektrometrie	63
	3.3	Ex	perimente zur Protein-Protein-Interaktion	64
	3.3	3.1	Das Gal4-basierte Y2H-System	64
	3.3	3.2	Verpaarung von Hefezellen	66
	3.3	3.3	Das Split-Ubiquitin Membran-Y2H-System	66
	3.3	3.4	Immunpräzipitation	69
	3.3	3.5	Glutathion-S-Transferase-Pulldown	70
	3.4	Ve	rsuchstiere	71
	3.5	Ve	rhaltenswissenschaftliche Versuche - Rota Rod-Experiment	72
	3.6	Su	bzelluläre Fraktionierung	72
	3.7	ΗP	LC-Analytik	73
	3.8	Ak	tivitätsnachweis der Monoaminoxidase	74
	3.9	Ne	urotransmitteraufnahmetest - Monoaminaufnahme in synaptische Vesikel	75
	3.10	In	silico-Methoden	76
	3.11	Ve	rsuchsdurchführung und -auswertung	76
4	Erg	gebr	lisse	77
	4.1	An	alyse einer möglichen VMAT2- $G_{o2}\tilde{\alpha}$ Interaktion	77
	4.1	1.1	Klassische Gal4-basierte Y2H-Analyse	77
	4.1	1.2	Analyse über das Split-Ubiquitin-basierte Membran-Y2H-System	79
	4.1	1.3	Immunpräzipitation	87
	4.1	1.4	GST-Pulldown mit zytoplasmatischen Domänen des VMAT2	88
	4.2	Ch	arakterisierung des monoaminergen Systems von $G_{o1} lpha^{-\prime -}$ und $G_{o1/2} lpha^{-\prime -}$	
		Mä	usen auf molekularer Ebene	92
	4.2	2.1	Vesikuläre Aufnahme von radioaktiv markiertem Serotonin	92
	4.2	2.2	Striatales Dopamin	94
	4.2	2.3	Monoaminoxidase-Aktivität in Synaptosomen	95
	4.2	2.4	Western Blot-Analyse Dopamin-synthetisierender Enzyme	97
	4.2	2.5	Western Blot-Analyse monoaminerger Transporter	98

4.2.6	Western Blot-Analyse dopaminerger Rezeptoren und des $G_s \alpha$	
4.3 Cł	narakterisierung zusätzlicher phänotypischer Merkmale von $G_{o1} \alpha^{}$ und	
G	_{51/2} α ^{-/-} Mäusen	101
4.3.1	Western Blot-Analyse der $G_{o1}\alpha$ - und $G_{o2}\alpha$ -Expression	102
4.3.2	Motorisches Verhalten von Wildtyp-, $G_{o1}\alpha^{-/-}$, $G_{o2}\alpha^{-/-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäuser	า 103
4.3.3	Wachstum und Entwicklung der $G_{o1}\alpha^{-/-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäuse	105
4.3.4	Western Blot-Analyse von Schlüsselenzymen bekannter Wachstumssig	J-
	nalwege in Wildtyp-, $G_{o1}\alpha^{-\prime-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-\prime-}$ Mäusen	111
5 Diskus	ssion	114
5.1 VN	/IAT-G _o -Signaltransduktion	114
5.1.1	Hinweise auf eine VMAT2-G_o α -Interaktion	115
5.1.2	Hinweise auf eine VMAT2-G β -Interaktion	115
5.1.3	Einschränkungen des Y2H-Verfahrens zum Nachweis von G-Protein-	
	Interaktionen	116
5.1.4	G-Protein-aktivierende Peptide, die nicht GPCRs entsprechen	117
5.1.5	Sequenzvergleich zytoplasmatischer VMAT2-Domänen mit GPCR-	
	ähnlichen Peptiden	119
5.1.6	Resümee zur VMAT-G $_{o}$ -Interaktion	123
5.2 Pł	hysiologie der VMAT-G $_{o}$ -Signaltransduktion	124
5.3 Au	iswirkungen der $G_o \alpha$ -Deletion auf die Physiologie des monoaminergen	
Sy	/stems	126
5.4 Au	iswirkung der G_0 $lpha$ -Deletion auf weitere phänotypische Merkmale	130
5.5 Sc	hlussfolgerungen	132
Literaturve	erzeichnis	134
Publikatio	nen	143
Preise		143
Selbstständigkeitserklärung148		
Lebenslau	ıf	147
Anhang		149

Abbildungsverzeichnis

Abb.	1:	Syntheseweg der Catecholamine (Bear et al., 2007)	7
Abb.	2:	Schema des dopaminergen Systems im menschlichen Gehirn	8
Abb.	3:	Schema eines Querschnitts durch das Vorderhirn des Menschen	8
Abb.	4:	Schema der motorischen Schleife und den daran beteiligten Hirnarealen	9
Abb.	5:	Serotoninsynthese	.10
Abb.	6:	Schema des serotonergen Systems im menschlichen Gehirn	.10
Abb.	7:	Schema des vesikulären Monoamintransporters (VMAT)	.12
Abb.	8:	Wirkmechanismus heterotrimerer G-Proteine	.15
Abb.	9:	Mögliches Schema des G _o α -Gens (Bertrand et al., 1990)	.17
Abb.	10:	Molekulares Modell eines synaptischen Vesikels nach Takamori et al.,	
		2006	.23
Abb.	11:	Hypothetisches Modell der vesikulären G-Protein Aktivierung über den	
		VMAT	.24
Abb.	12:	DNA-Restriktionsansatz.	.51
Abb.	13:	Gap Repair homologe Rekombination in Hefezellen.	.57
Abb.	14:	Amplifikation des $G_{o2}\alpha$ -DNA-Fragments.	.65
Abb.	15:	PCR-Analyse mehrerer Klonen des Y2H-Screens	.66
Abb.	16:	Prinzip des Split-Ubiquitin Membrane-Yeast Two-Hybrid (MYTH) Assays	.67
Abb.	17:	VMAT2-Varianten für die Generierung von Köderproteinen im MYTH-	
		Assay	.68
Abb.	18:	Anreicherung von vesikulären Proteinen durch subzelluläre	
		Fraktionierung eines Mäusegehirns	.73
Abb.	19:	WB-Analyse der Expression von GAL4-Fusionsproteinen in Hefezellen	.78
Abb.	20:	Mating mit AH109- und Y187-Hefezellen.	.79
Abb.	21:	WB-Analyse der Expression von $N_{\mbox{\tiny UB}}G\mbox{-}Fusionsproteinen in Hefezellen}$.80
Abb.	22:	Test der Expression, Integration und Autoaktivität der VMAT2-	
		Köderproteine in Hefezellen.	.81
Abb.	23:	Interaktion von Köder- und artifiziellen Beutefusionsproteinen in	
		Hefezellen	.82
Abb.	24:	Kontrolle des MYTH-Systems mit Hilfe des artifiziellen Köderproteins	
		EGFR-C _{UB} -TF.	.84
Abb.	25:	Interaktion des VMAT2-FL-Köderproteins mit den $G_{o2}\alpha$ -Beuteproteinen	.85
Abb.	26:	Interaktion des VMAT2-NT-Köderproteins mit den $G_{o2}\alpha$ -Beuteproteinen	.86
Abb.	27:	Interaktion des VMAT2-CT-Köderproteins mit den $G_{o2}\alpha$ -Beuteproteinen	.87
Abb.	28:	Immunpräzipitation mit einem primären Gβ-Antikörper und	

	synaptischen Vesikeln eines Mäusegehirns	88
Abb. 2	9: Analyse der Expression von GST-VMAT2-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	
	Bakterien.	89
Abb. 3	0: Pulldown-Assay mit GST-VMAT2-Fusionsproteinen und Homogenat	
	eines Mäusegehirns.	90
Abb. 3	1: WB-Analyse des Pulldowns über GST-VMAT2-Fusionsproteine mit	
	Mäusegehirnhomogenat	92
Abb. 3	2: Vesikuläre Aufnahme von [³ H]Serotonin	93
Abb. 3	3: HPLC-Analyse der striatalen Dopaminkonzentration	94
Abb. 3	4: MAO-Aktivität in Synaptosomen von Wildtyp- und $G_{o1}\alpha^{-\!/-}$ Mäusen	95
Abb. 3	5: MAO-Aktivität in Synaptosomen von Wildtyp- und $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäusen	96
Abb. 3	6: Quantitative WB-Analyse der TH-Expression im Mäusegehirn	98
Abb. 3	7: Quantitative WB-Analyse der DDC-Expression im Mäusegehirn	98
Abb. 3	8: Quantitative WB-Analyse der Expression von Monoamintransportern	
	in Mäusegehirnfraktionen	99
Abb. 3	9: Quantitative WB-Analyse der Expression von Dopamin-Rezeptoren im	
	Mäusegehirn	101
Abb. 4	0: Quantitative WB-Analyse der Expression des $G_{s}\alpha$ im Mäusegehirn	101
Abb. 4	1: Quantitative WB-Analyse der Expression von $G_o \alpha$ -Isoformen in	
	Synaptosomen	102
Abb. 4	2: Rota Rod-Experiment	104
Abb. 4	3: Geburtenrate von Wildtyp-, $G_{o1}\alpha^{-/-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäusen	106
Abb. 4	4: Durchschnittsalter der $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Mäuse	107
Abb. 4	5: Gewichtsentwicklung der G _{o1} $\alpha^{-/-}$ Mäuse und deren Wildtyp-	
	Wurfgeschwistern	109
Abb. 4	6: Entwicklung des Körpergewichts und des Gehirns von G_0 $lpha^{-\prime-}$ Mäusen	
	und deren Wurfgeschwistern	110
Abb. 4	7: Entwicklung des Körpergewichts und des Gehirns von $G_{o1}\alpha^{-/-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$	
	Mäusen im Vergleich	111
Abb. 4	8: Quantitative WB-Analyse der Expression von Schlüsselenzymen	
	bekannter Wachstumssignalwege in Synaptosomen.	112
Abb. 4	9: Sequenzvergleich des VMAT2-N-Terminus	121
Abb. 5	0: Sequenzvergleich des VMAT2-C-Terminus	122
Abb. 5	1: Sequenzvergleich der 3. zytoplasmatischen Schleife des VMAT2	123

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über verwendete Enzyme	30
Tabelle 2: SDS-PAGE-Trenngele	37
Tabelle 3: Medienzusätze	41
Tabelle 4: Primäre Antikörper.	42
Tabelle 5: Sekundäre Antikörper	42
Tabelle 6: Übersicht zu den verwendeten Vektoren	45
Tabelle 7: Ortsspezifische Mutagenese	51
Tabelle 8: Ergebnis der Massenspektrometrie.	91

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
-/-	homozygote Deletionsmutante
+/-	heterozygote Deletionsmutante
+/+	Wildtyn
3_ A T	3-Amino-1 2 4-triazol
2' LITD	3 prime untranslated region night translationar Abschnitt since Cons
	5 prime unitaristated region, mont-inalistatienter Abschnitt eines Gens
	5-Hydroxytryptamin
5-HIP	5-Hydroxytryptopnan
A	Ampere
A	DNA-Base Adenosin
Abb.	Abbildung
Ade	DNA-Base Adenosin
ADP	Adenosindiphosphat
AGS	activator of G-Protein signalling
Akt	Proteinkinase B
Amn	Amnicillin
	AMD aktivierte Proteinkingse
Amn ^R	Amisillin Desistenzaen
Ашр	
APP	amyloid precursor protein
APS	Ammoniumpersultat
AIP	Adenosintriphosphat
bait	Köder
BCA	Bicinchoninsäure
BON	humane Pankreaskarzinoma-Zelllinie
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
C	Aminosäure Cystein
Ca^{2+}	Calciumion
	zykisches Adenosimmonophosphat
CDNA	complementary DNA
CTU	colony forming units, Kolonie-bildende Einneiten
CHO	chinese hamster ovary, Zellinie aus den Ovarien des chinesischen Hamsters
CIC	Chloridkanal
cpm	counts per minute / Zählungen pro Minute
СТ	C-Terminus
C _{UB}	C-terminale Hälfte des Ubiquitins
CuSO ₄	Kupfersulfat
D₁R	D ₁ -Dopamin-Rezeptor
D ₂ R	D ₂ -Dopamin-Rezeptor
Da	Dalton
DAT	Donamin-Plasmamembrantransporter
	Dopanini-p-nyuloxylase
	double distilled water twoifach destilliontes Wasser
	Dissethedevidevid
DMSO	
DNA	deoxyribonucieic acid, Desoxyribonukieinsaure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Dopa	L-Dihydroxyphenylalanin
∆pH	pH-Gradient
dpm	disintegration per minute / Zerfälle pro Minute
DRG	dorsal root ganglion
DTT	Dithiothreitol
DUBs	deubiquitinierende Enzyme
Λ	elektrischer Gradient
Δν ΛυΗ ⁺	elektrochemischer Protonengradient
ECI	
EUL	

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGTA	Ethylenglykolbis (2-aminoethyl-) tetraacetat
EMBL	european molecular biology laboratory
ER	endoplasmatisches Retikulum
FBS	fötales Kälberserum
FI	full length Gesamtlänge
ESI-Ratten	flinders sensitive line
fw	forward vorwärte
G	DNA Rase Guanocin
0	Aminopäuro Choin
G C Drotoin	Annihosaule Olycin Cuanin Nuklaatid hindandaa Dratain: CTD hindandaa Dratain
G-PIOLEIII	Guanni-Nukieolid-Dindendes-Protein, GTP-Dindendes Protein
GABA	γ -aminoputyric acid, γ -Aminoputtersaure
GAL4	I ranskriptionstaktor von Galaktose-induzierten Genen
GAP	G I Pase-aktivierendes Protein
GAP-43	growth associated protein 43, Wachstumsassoziliertes Protein 43
GDP	Guanosindiphosphat
GDPβS	Guanosine-5'-O-(2- thiodiphosphat)
GEF	guanin nucleotide exchange factor, Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor
GMP-P(NH)P	5'-Guanylylimidodiphosphat
GPCR	g protein coupled receptor, G-Protein gekoppelter Rezeptor
Gpe	Globus pallidus externus
Gpi	Globus pallidus internus
GST-PD	Glutathion-S-Transferase-Pulldown
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	GTP-snaltende Enzyme
GTP _V S	Guanosin-5'-0-(thiotrinhosphat)
h	Stunde
	Homogonat
	N/appar
	Wasser
HUL	Salzsaure
HDAC6/10	Histon Deacetylase 6 und 10
HEPES	N-2-Hydroxyetnyipiperazin-N -2-etnansultonsaure
HG-Puffer	Homogenisierungspuffer
His	Aminosäure Histidin
HPLC	high performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigchromatografie
I	Aminosäure Isoleucin
IGF-II/M6P-R	insulin-like growth factor-II / mannose 6-phosphate receptor
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K / Ktr.	Kontrolle
Kan	Kanamycin
Kan ^R	Kanamycin-Resistenzgen
KCI	Kaliumchlorid
KG	Kaliumglutamat
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
KOH	Kaliumhydroxid
L	Aminosäure Leucin
L3	loop 3, 3. zytoplasmatische Schleife des VMAT
LB	Lysogeny Broth
LDCVs	large dense core vesicles, große elektronendichte Vesikel
Leu	Aminosäure Leucin
LMW	low molecular weight Marker
LP2	lysed pellet 2, lysiertes Sediment 2, Vesikelfraktion
LS2	lysed supernatant 2. lysierter Überstand 2. postvesikulärer Überstand
	long-term depression angzeitdepression
I TP	long-term potentiation 1 angzeithotenzierung
M	Marker
MΔ	Monoamin
mΔCbP	muskariner Acetylcholin-Rezentor
	musicanner Aueryununninezeptur matrix assisted laser deservice / ionization _ time of flight
	mamin-assisted iaser description / ionization – time of hight

MAO	Monoaminooxidase
mcl ms α	monoclonal mouse antibody, monoclonaler Maus-Antikörper
MCS	multiple cloning site
METH	Methamphetamin
Ma ²⁺	Magnesiumion
MaCl	Magnesiumchlorid
mGluR6	metabotroner Glutamat-Rezentor 6
min	Minute
mind	mindectons
	1 Mathyl 4 phonylpyridinium
	1 Mathyl 4 phonyl 1 2 3 6 totrahydronyridin
	n-methyl 4-phenyl-1,2,3,0-tetranydropyndin
	medium aninu nauran mittalara?aa Spina raiahaa Draiatiananauran
	medium spiny neuron, millegroises spine-reiches Projetionsneuron
	Manimalian target of rapamycin Manakrana Magat Tura Likikrid
MYIH	Membrane-Yeast I Wo-Hybrid
N	Aminosaure Asparagin
NaCi	Natriumchiorid
NCBI	national center for biotechnology information
NEI	Noradrenalin-Plasmamembrantransporter
NI	N-Terminus
N _{UB}	N-terminale Hälfte des Ubiquitins
N _{UB} A	N _{UB} mit I13A-Mutation
N _{UB} G	N _{UB} mit I13G-Mutation
N _{UB} I	N _{UB} mit Isoleucin-Rest an Position 13 (wt)
OD	Optische Dichte
ORF	open reading frame, offener Leserahmen
P1	pellet 1, Sediment 1, nukleäres, mitochondriales Sediment
p1-pn	Postnataltag 1-n
P2	pellet 2, Sediment 2, Synaptosomen-Fraktion
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PC12	Pheochromocytoma-Zelllinie der Ratte
pcl rb α	polvclonal rabbit antibody, polyklonaler Kaninchen-Antikörper
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polvethylenglykol
P:	Phosphatanion
PI	Proteaseinhibitor-Cocktail
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
Pines	Pinerazin-N N´-his [2-ethansulfonsäure]
PKA	cAMP-ahhängige Proteinkingse A
PKR	Proteinkinase B
PMSE	Phenylmethylsulfonylfluorid
nrev	Beute
	phosphatase and tensin homolog. Phosphatase
	Prospilatase and tensin nomolog, Friospilatase
FIX	Aminosöura Clutamin
	Anniosaure Giulannin guadrupla dranaut Madium
RGS	regulator of G protein signalling
RNA	
RNase	Ribonukiease
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RI	Raumtemperatur
rv	reverse, ruckwarts
S	Sekunde
S	Aminosaure Serin
S., S. O., S. U.	siehe, siehe oben, siehe unten
S1	supernatant 1; Uberstand 1
S2	supernatant 2, Uberstand 2, postsynaptosomaler Uberstand
screening	Durchmusterung
SD	synthetic dropout, synthetisches Minimalmedium
SDS	Sodium- (Natrium)-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SERT	Serotonin-Plasmamembrantransporter
SLMV	small synaptic-like microvesicle
SNc	Substantia nigra pars compacta
SNr	Substantia nigra pars reticulata
ssDNA	single strand DNA, Einzelstrang-DNA
SSV	small synatic vesicle, kleines synaptisches Vesikel
STN	subthalamischer Nucleus
SYB	Synaptobrevin
SYP	Synaptophysin
Т	DNA-Base Thymidin
TAE	Tris-acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TH	Tyrosinhydroxylase
TMD	Transmembrandomäne
TPH	Tryptophanhydroxylase
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Aminosäure Tryptophan
TS	Tris-Saline
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UE	Untereinheit
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VA	ventral anteriorer Nucleus des Thalamus
VAChT	vesikulärer Acetylcholintransporter
vATPase	vakuoläre H+-ATPase
VF	Verdünnungsfaktor
VGAT	vesikulärer GABA-Transporter
VL	ventrolateraler Nucleus des Thalamus
VMAT	vesikulärer Monoamintransporter
Vmax	Maximalgeschwindigkeit enzymatischer Reaktionen
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
хg	Erdbeschleunigung
x g _{max}	maximale Erdbeschleunigung (Zentrifugation)
X-α-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-galactopyranosid
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
Y2H	Yeast Two-Hybrid
YE	Yeast extract, Hefeextrakt
YNB	Yeast Nitrogen Base
YTH	Yeast Two-Hybrid
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

G_o-Protein vermittelte Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme und dessen Einfluss auf das monoaminerge Neurotransmittersystem

Zusammenfassung

Vorangegangene Studien führten zu einem Modell der präsynaptischen Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme. In diesem Modell wird davon ausgegangen, dass der vesikuläre Monoamintransporter (VMAT) wie ein G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR) funktioniert und das Vesikel-assoziierte heterotrimere G₀₂-Protein aktiviert, welches in einer negativen Rückkopplungsschleife direkt oder indirekt über nachgeschaltete Effektoren die vesikuläre Monoaminaufnahme verringert. Diese Regulation ist damit möglicherweise über die Justierung der Quantengröße auf vesikulärer Ebene an der Feinabstimmung des monoaminergen Neurotransmittersystems beteiligt. Dieser Signalweg wird über die vesikuläre Monoaminkonzentration gesteuert. Wenn eine ausreichende vesikuläre Konzentration erreicht ist, sind verschiedene Monoamine in der Lage die GPCRähnliche Funktion des VMAT über dessen große luminale Schleife zu aktivieren. Zentrale Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine Interaktion zytoplasmatischer VMAT2-Domänen mit der $G_0\alpha$ -Untereinheit und mit $G\beta_1$, für einen GPCR erwartet wird. Diese Ergebnisse liefern damit die Grundvoraussetzung dafür, dass der VMAT eine GPCR-ähnliche Funktion besitzt. Hierfür kamen molekularbiologische Methoden zum Einsatz, wie z. B. das Yeast Two-Hybrid- und das GST-Pulldown-Verfahren.

Am Maus-Modell konnte über die Deletion der $G_0\alpha$ -Splice-Isoform $G_{01}\alpha$ bzw. $G_{02}\alpha$ ein Zusammenhang zur striatalen Dopamin-Homöostase hergestellt werden. Go1a-/- Mäuse zeigen ein gegenüber Wildtyp-Mäusen erhöhtes striatales Dopamin-Niveau, während dieses in $G_{o2}\alpha^{-/-}$ Mäusen vermindert ist. Dabei ist zu beachten, dass in $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Mäusen die $G_{02}\alpha$ -Expression im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist. In der Doppelmutante ($G_{01/2}\alpha^{-1}$) dagegen ist das Dopamin-Niveau ausgeglichen. Dies legt eine Wechselwirkung des $G_{o1}\alpha$ und der $G_{0,2}\alpha$ -Signaltransduktion zur Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme bezüglich der Dopamin-Homöostase nahe. Eine Folge der Störung der Dopamin-Homöostase ist ein verändertes motorisches Verhalten der Tiere. $G_{02}\alpha^{-1}$ Mäuse zeigen allerdings erst unter wiederholter Verabreichung von Psychostimulanzien (Amphetamin, Kokain) Veränderungen bezüglich ihrer motorischen Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Die $G_{o1}\alpha$ -Deletionsmutante ist dagegen bereits ohne Einfluss von Psychostimulanzien stark beeinträchtigt. Diese Störung wird über das zusätzliche Deletieren des $G_{o2}\alpha$ $(G_{01/2}\alpha^{-1})$ im Vergleich zu $G_{01}\alpha^{-1}$ Mäusen gemildert. Letzteres spiegelt sich auch in der Überlebenschance der Tiere wieder. Während $G_{o2}\alpha^{-/-}$ Mäuse eine den Wildtyp-Tieren entsprechende Entwicklung zeigen, sind $G_{o1}\alpha^{-1/2}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-1/2}$ Mäuse stark wachstumsretardiert und weisen eine verkürzte Lebensspanne auf. Auch hier ist dieser Phänotyp der G_{01/2}α-Deletionsmutante gegenüber $G_{\alpha1}\alpha^{-1}$ Mäusen weniger stark ausgeprägt. Wir schließen

daraus, dass $G_{o1}\alpha$ überlebensnotwendig ist, aber eine veränderte $G_{o2}\alpha$ -Expression über eine folgliche Fehlregulation der vesikulären Monoaminaufnahme bezüglich des Überlebens, der striatalen Dopamin-Homöostase und damit der motorischen Aktivität einen großen Einfluss besitzt. Eine Beeinträchtigung der Dopamin-Homöostase resultiert zudem in Krankheiten wie Schizophrenie, Depression und weiteren affektiven Störungen (Übersicht von Beaulieu und Gainetdinov, 2011). Damit sind die $G_o\alpha$ -*Splice*-Isoformen geeignete Kandidaten für eine Analyse im Bezug auf Dopamin-basierte Krankheiten und könnten neue Zielmoleküle für therapeutische, pharmakologische Ansätze darstellen.

Schlüsselbegriffe: monoaminerges Neurotransmittersystem; VMAT; GPCR; heterotrimere G-Proteine; G_{o1}; G_{o2}; vesikuläre Monoaminaufnahme; Dopamin-Homöostase; Striatum; motorische Aktivität

Abstract

Previous studies led to a model which suggests a role for the presynaptic regulation of the vesicular monoamine uptake in fine-tuning the monoaminergic neurotransmitter system by adjusting its quantal size on the vesicular level. In this model it is believed, that the vesicular monoamine transporter (VMAT) functions like a G protein coupled receptor (GPCR) and activates the vesicle associated heterotrimeric G_{o2} protein, which in turn attenuates the vesicular monoamine uptake in a negative feedback loop either directly or indirectly by downstream effectors. This signal pathway is regulated by the vesicular monoamine content. Is the vesicular concentration sufficient, different monoamines are capable of activating the GPCR-like function of the VMAT via its large luminal domain. Here, in this work essential results show a physical interaction of cytoplasmic VMAT2 domains with the G_o protein α -subunit and $G\beta$, obtained by biomolecular methods, such as the yeast two-hybrid and the GST pulldown assay. Thereby, these results provide the basic requirement for the VMAT to own a GPCR-like function, further confirming our model.

In mice, deletion of the $G_0\alpha$ splice isoform $G_{01}\alpha$ and $G_{02}\alpha$, respectively, results in a disturbance of the striatal dopamine homeostasis. $G_{01}\alpha^{-1}$ mice show an increased striatal dopamine level in comparison to wild type mice, whereas it is decreased in $G_{o2}\alpha^{-/-}$ mice. Here it is worth mentioning, that the $G_{o2}\alpha$ expression is increased in $G_{o1}\alpha^{-1}$ mice compared to wild type. In contrast, the double mutant $(G_{01/2}\alpha^{-1})$ shows a balanced dopamine level. From this we conclude, that there might be a cross talk between $G_{01}\alpha$ and the $G_{02}\alpha$ signal transduction, which regulates the vesicular monoamine uptake, regarding dopamine homeostasis. In $G_{0}\alpha$ deletion mutants the disturbed dopamine homeostasis results in altered motor activity. Whereas $G_{\alpha 2} \alpha^{-/-}$ mice only show changes in their motor activity compared to wild type animals after repeated treatment with psychostimulants (amphetamine, cocaine), the $G_{o1}\alpha$ deletion mutant shows strong motor impairments even without drug application. The motor impairment is less pronounced in double knockouts ($G_{o1/2}\alpha^{-/-}$) compared to $G_{o1}\alpha^{--}$ mice. A similar effect is seen when assessing the survival rates of these animals. While $G_{02}\alpha^{-1}$ mice develop similar to wild type animals, $G_{01}\alpha^{-1}$ and $G_{01/2}\alpha^{-1}$ mice are strongly growth retarded and display a shortened life span. This phenotype is less prominent in the $G_{01/2}\alpha$ deletion mutant compared to $G_{01}\alpha^{-1}$ mice. We conclude, that $G_{01}\alpha$ is crucial for survival, but that altered expression of $G_{02}\alpha$ and consequently a misregulated vesicular monoamine uptake have a significant influence on survival, striatal dopamine homeostasis and therefore on regulating motor activity. In addition a disturbed dopamine homeostasis results in diseases like schizophrenia, depression and other affective disorders (reviewed by Beaulieu and Gainetdinov, 2011). Thus for the analysis of dopamine-based disorders $G_{o\alpha}$ splice isoforms are suitable candidates that could be new targets for therapeutical, pharmacological studies.

Key words: monoaminergic neurotransmitter system; VMAT; GPCR; heterotrimeric G protein; G_{o1} ; G_{o2} ; vesicular monoamine uptake; dopamine homeostasis; striatum; motor activity

1 Einleitung

1.1 Monoaminerges Neurotransmittersystem

Das monoaminerge Neurotransmittersystem wird durch präzise Feinabstimmung reguliert (Hnasko et al., 2010). Es ist dem Neurotransmitter entsprechend aus dem catecholaminergen und serotonergen System aufgebaut. Diese Systeme beinhalten Hirnareale, die über distinkte Neurone miteinander verknüpft sind, welche das jeweilige Monoamin synthetisierende und metabolisierende Enzyme, aber auch transportierende Proteine enthalten. Weiterhin sind membranständige Rezeptoren am monoaminergen Neurotransmittersystem direkt beteiligt, an welche die jeweiligen Monoamine spezifisch binden. Im Folgenden wird das catecholaminerge und serotonerge Neurotransmittersystem separat beschrieben.

1.1.1 Catecholaminerges Neurotransmittersystem

Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin werden zu den Catecholaminen zusammengefasst, da sie eine Catechol-Gruppe enthalten. Diese drei Neurotransmitter entstehen im selben Syntheseweg aus der Aminosäure Tyrosin (**Abb. 1**). Tyrosin wird im Zytosol durch die Tyrosinhydroxylase (TH) zu Dopa (L-Dihydroxyphenylalanin) hydroxyliert. Dieser Schritt ist geschwindigkeitsbestimmend in der Catecholaminsynthese (Übersicht von Siegel et al., 1999, Bear et al., 2007). Die Aktivität der TH wird vielfach reguliert, unter anderem durch eine hohe zytosolische Catecholaminkonzentration, die zur sogenannten Endprodukthemmung führt. Eine hohe Catecholaminausschüttung und eine folglich reduzierte intrazelluläre Catecholaminkonzentration resultiert in einem Anstieg der TH-Aktivität (Bear et al., 2007). Bei längerer Stimulation der Neurone findet man zusätzlich eine erhöhte Synthese der für die TH kodierenden mRNA (Siegel et al., 1999), was auf eine vermehrte Translation des Enzyms schließen lässt.

Dopa wird anschließend im Zytosol der catecholaminergen Neurone über die Dopa-Decarboxylase zu Dopamin konvertiert. Ein Teil des Dopamins wird aktiv über den vesikulären Monoamintransporter (VMAT) in die Vesikel transportiert. Der im Zytosol verbleibende Teil des Dopamins wird über die Monoaminoxidase (MAO) metabolisiert.

Zellen des chromaffinen Gewebes des Nebennierenmarks enthalten in ihren Vesikeln das Enzym Dopamin-β-Hydroxylase (DBH), welches aufgenommenes Dopamin zu Noradrenalin (= Norepinephrin) konvertiert. Dies gilt auch für die Neurone des *Locus Coeruleus*, welcher in der *Pons* (Brücke) des Gehirns lokalisiert ist. Diese Neurone projizieren diffus in fast alle Regionen des Gehirns (noradrenerges Neurotransmittersystem). Noradrenalin kontrolliert darüber die Stimmung, Erregbarkeit, Aufmerksamkeit und StressEmpfindlichkeit. In der Peripherie ist Noradrenalin der Haupttransmitter des *Sympathicus* (Ramamoorthy et al., 2011).

Der Großteil der Zellen des Nebennierenmarks enthält zusätzlich das Enzym Phenylethanolamin-N-Methyltransferase, das im Zytosol Noradrenalin methyliert. Dabei entsteht Adrenalin. Das Noradrenalin gelangt zum größten Teil durch Diffusion aus den Vesikeln



ins Zytosol (Siegel et al., 1999, Bear et al., 2007). Anschließend wird das Adrenalin zur Speicherung über den VMAT in die Granula der chromaffinen Zellen transportiert.

Abb. 1: Syntheseweg der Catecholamine (Bear et al., 2007).

Tyrosin wird durch die Tyrosinhydroxylase hydroxyliert. Es entsteht Dopa, welches durch die Dopa-Decarboxylase zu Dopamin konvertiert wird. Die Dopamin-β-Hydroxylase konvertiert Dopamin zu Noradrenalin (= Norepinephrin), während darauf folgend die Phenyl-ethanolamin-N-Methyltransferase Noradrenalin in Adrenalin (= Epinephrin) umwandelt.

Catecholamine und auch Serotonin werden in ihrem zytosolischen Abbauprozess zunächst durch die Monoaminoxidase (MAO) oxidativ deaminiert und damit in ihrer Wirkung als Neurotransmitter inaktiviert. Bei der MAO handelt es sich um ein

Flavoprotein, welches in die äußere Mitochondrienmembran integriert ist. Es gibt zwei Isozyme der MAO mit unterschiedlicher Substratspezifität, MAO-A und MAO-B (Siegel et al., 1999). Nach erfolgter Exozytose werden Dopamin und Noradrenalin über ihren spezifischen Plasmamembrantransporter DAT bzw. NET wieder in die präsynaptischen Terminalien aufgenommen (Übersicht von Ramamoorthy et al., 2011). Damit wird die extrazelluläre Konzentration und folglich die postsynaptische Wirkung des jeweiligen Monoamins kontrolliert (Ramamoorthy et al., 2011).

Rezeptoren des dopaminergen Systems gehören zu einer Familie aus fünf distinkten, aber eng verwandten G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR), D_{1-5} , die in zwei Gruppen eingeteilt werden: die D_1 - und D_2 -Klasse dopaminerger Rezeptoren (Übersicht von Beaulieu und Gainetdinov, 2011). Diese Einteilung erfolgte aufgrund struktureller, pharmakologischer und biochemischer Eigenschaften der Rezeptoren. Dabei gehören der D_1 - und D_5 -Dopamin-Rezeptor zur D_1 -Klasse und der D_2 -, D_3 - und D_4 -Dopamin-Rezeptor zur D_2 -Klasse dopaminerger Rezeptoren.

Die D₁-Klasse dopaminerger Rezeptoren aktiviert heterotrimere G-Proteine der $G_{s/olf}$ -Familie und stimuliert damit die cAMP-Produktion über die aktivierte Adenylylcyclase (1.2.1). Sie kommen postsynaptisch auf Dopamin-rezeptiven Zellen vor, z. B. auf GABAergen, mittelgroßen, *Spine*-reichen Projektionsneuronen (MSNs, *medium spiny neurons*) des *Striatums*. Die Dopamin-Rezeptoren der D₂-Klasse sind an heterotrimere G-Proteine der G_{i/o}-Familie gekoppelt und inhibieren damit die Adenylylcyclase und folglich die cAMP-Produktion. D₂- und D₃-Dopamin-Rezeptoren kommen präsynaptisch auf dopaminergen Neuronen vor (Autorezeptoren) und postsynaptisch auf Dopamin-rezeptiven Neuronen (z. B. MSNs).

Abb. 2: Schema des dopaminergen Systems im menschlichen Gehirn (Bear et al., 2007). Ein Teil dieses Systems wird durch die Neurone der Substantia nigra aufgebaut, welche das Striatum innervieren.

Das dopaminerge System des Gehirns ist hauptsächlich aus zwei eng zusammenhängenden Gruppen von dopaminergen Neuronen aufgebaut. Es handelt sich um die *Substantia nigra* und das



ventral tegmentale Areal, welche im Mittelhirn lokalisiert sind (**Abb. 2**; Bear et al., 2007). Die *Substantia Nigra pars caudata* (SNc) enthält die dopaminergen Neurone, welche das *Striatum* innervieren und dort die glutamaterge Erregung aus dem *Cortex* modulieren (**Abb. 3**, **Abb. 4**; Übersicht von Mink, 1996, Galvan und Wichmann, 2008, Turner und Desmurget, 2010).

Dies geschieht über synaptische Kontakte an den Schäften der dendritischen *Spines* von MSNs, aus denen das *Striatum* zum Großteil besteht (Mink, 1996, Galvan und Wichmann, 2008, Turner und Desmurget, 2010).

Die Modulation erfolgt über Langzeitdepression (LTD, *long-term depression*) bzw. Langzeitpotenzierung (LTP, *long-term potentiation*) der Synapsen striataler Neurone durch zeitliches Zusammentreffen der kortikalen und nigralen Eingänge (Übersicht von Mink, 1996, Galvan und Wichmann, 2008, Turner und Desmurget, 2010).



Abb. 3: Schema eines Querschnitts durch das Vorderhirn des Menschen (Bear et al., 2007).

Grün dargestellt ist das Basalganglion mit der *Substantia nigra*, dem *Subthalamischen nucleus*, Teilen des *Thalamus*, dem *Globus pallidus* und dem *Striatum*, bestehend aus *Nucleus caudatus* und *Putamen*.

Dabei werden die aktivierenden striatalen Verbindungen des direkten (monosynaptichen) Signalwegs der Basalganglien (**Abb. 3**) über D₁-Dopamin-Rezeptoren (D₁R) potenziert und die hemmenden indirekten Verbindungen über D_2 -Dopamin-Rezeptoren (D_2R) inhibiert, woraus eine fördernde Wirkung auf die Initiierung von Bewegung resultiert (**Abb. 4**; Übersicht Mink, 1996, Galvan und Wichmann, 2008, Turner und Desmurget, 2010).

Das dopaminerge System moduliert im ZNS neben der Motoraktivität weitere Funktionen, wie Stimmungszustände, das Belohnungssystem, den Schlaf, die Aufmerksamkeit, das Lernen und das Gedächtnis, oder allgemeiner die Kognition (Carlsson, 1987, Beaulieu und Gainetdinov, 2011, Ramamoorthy et al., 2011).





Neben verschiedenen Arealen des *Cortex*' (M1, PMC, SMA, CMA) und des *Thalamus*' (CM, VA, VL) sind die Strukturen der Basalganglien beteiligt (Putamen, SNc, SNr, GPe, GPi, STN, PPN). Abk.: CM, *centromedian nucleus of thalamus*; CMA, *cingulate motor area*; GPe, *globus pallidus externus*; GPi, *globus pallidus internus*; M1, *primary motor cortex*; Pf, *parafascicular nucleus of the thalamus*; PMC, *premotor cortex*; PPN, *pedunculopontine nucleus*; SMA, *supplementary motor area*; SNc, *substantia nigra pars compacta*; SNr, *substantia nigra pars reticulata*; STN, *subthalamic nucleus*; VA, *ventral anterior nucleus of thalamus*; VL, *ventrolateral nucleus of thalamus*.

1.1.2 Serotonerges Neurotransmittersystem

Serotonin, auch 5-Hydroxytryptamin (5-HT) genannt, wird in zwei Schritten aus der Aminosäure Tryptophan synthetisiert (**Abb. 5**). Nach der Tryptophanaufnahme in die serotonergen Neurone wird es über die Tryptophanhydroxylase (TPH) zu 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) konvertiert, welches wiederum über die 5-HTP-Decarboxylase zu Serotonin decarboxyliert wird (Bear et al., 2007). Die Hydroxylierung des Tryptophans durch die TPH ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Serotoninsynthese (Siegel et al., 1999).

Neben der Synthese aus Tryptophan wird die Serotoninkonzentration im Zytosol auch durch die aktive Wiederaufnahme von freigesetztem Serotonin über dessen Plasmamembrantransporter (SERT) bestimmt (Übersicht von Siegel et al., 1999, Ramamoorthy et al., 2011). Diese Wiederaufnahme beendet die extrazelluläre Serotoninwirkung. Weiterhin wird Serotonin, wie die Catecholamine, über den vesikulären Monoamintransporter (VMAT) in synaptische Vesikel aufgenommen. Serotonin wird im Zytosol ebenfalls von der Monoaminoxidase (MAO) metabolisiert (Siegel et al., 1999). Abb. 5: Serotoninsynthese (Bear et al., 2007). Tryptophan wird im ersten Schritt über die Tryptophanhydroxylase zu 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) konvertiert. Durch Decarboxylierung des 5-HTPs über die 5-HTP-Decarboxylase entsteht Serotonin (5-HT).



Die Rezeptoren des serotonergen Systems sind mit ihren jeweiligen Subtypen in sieben Familien

unterteilt (5-HT₁₋₇). Abgesehen von der 5-HT₃-Familie handelt es sich wie bei den Dopamin-Rezeptoren um GPCRs (Übersicht von Pytliak et al., 2011). 5-HT₁- und 5-HT₅-Rezeptor-Subtypen (5-HT_{1A, B, D, E, F} / 5-HT_{5A, B}) sind an heterotrimere G-Proteine der G_{i/o}-Familie gekoppelt und vermindern über die Inhibition von Adenylylcyclasen den zytosolischen cAMP-Spiegel (1.2.1). Rezeptor-Subtypen der Familie 5-HT_{4, 6, 7} (5-HT_{4A-H} / 5-HT₆ / 5-HT₇) sind an stimulatorische G-Proteine der G_s-Familie gekoppelt und erhöhen den zytosolischen cAMP-Spiegel über die Aktivierung von Adenylylcyclasen. Die Rezeptor-Subtypen 5-HT_{2A-C} sind an heterotrimere G-Proteine der G_{q/11}-Familie gekoppelt und aktivieren darüber die Phospholipase C (PLC). Bei den Rezeptor-Subtypen 5-HT_{3A} und 5-HT_{3B} handelt es sich um Liganden-abhängige Na⁺/K⁺-Kanäle, die sich nach Bindung von Serotonin öffnen und damit zur Depolarisation der Zellmembran führen.





Raphe nuclei liegen medial im Hirnstamm (*Pons* und *Medulla*) aufgereiht und projizieren in vielerlei Regionen des ZNS.

Eine Anhäufung serotonerger Neurone findet man in den *Raphe nuclei*, die im Hirnstamm lokalisiert sind

(**Abb. 6**). Neurone der kaudal in der *Medulla* gelegenen *Raphe nuclei* innervieren das Rückenmark und modulieren dort schmerzbezogene sensorische Signale (Bear et al., 2007). Weiter rostral in der *Pons* und dem Mittelhirn gelegene *Raphe nuclei* innervieren weite Teile des Gehirns in einer ähnlich diffusen Weise, wie es im noradrenergen System bezüglich der Neurone des *Locus Coeruleus* der Fall ist. Diese serotonergen Neurone sind an der Kontrolle des Schlaf-Wach-Rhythmus, des Gemütszustandes und des emotionalen Handelns beteiligt (Bear et al., 2007). Serotonin ist weiterhin an der Modulation von Aggression, Motivation, des Appetits, der Kognition und der sexuellen Aktivität beteiligt (Ramamoorthy et al., 2011).

1.1.3 Vesikulärer Monoamintransporter und Monoaminspeicherung

Bei der Reizweiterleitung an der Synapse werden Neurotransmitter für die Ausschüttung mittels Exozytose aus dem Zytosol in die dafür vorgesehen Organellen, die Vesikel, transportiert. Je nach Zelltyp liegen unterschiedliche Vesikeltypen vor: z. B. die großen elektronendichten Vesikel (LDCVs, *large dense core vesicles*) der chromaffinen Zellen der Nebenniere oder die kleinen synaptischen Vesikel (SSVs, *small synaptic vesicles*) der Axonterminalien im Gehirn. Hierfür sind Transporter notwendig, welche die Neurotransmitter über die vesikuläre Membran ins Lumen der Vesikel transportieren.

Der vesikuläre Monoamintransport wird über die Inhibitoren Reserpin und Tetrabenazin geblockt (Kirshner, 1962, Pletscher, 1977), woraufhin der Aminspeicher aufgelöst wird (Übersicht von Schuldiner, 1994). Reserpin ruft bei Menschen depressionsartige Störungen hervor, was in den 1950er/1960er Jahren zur Amin-Hypothese affektiver Störungen führte (Übersicht von Schildkraut, 1965, Schuldiner, 1994). Mit Hilfe des radioaktiv markierten irreversiblen Inhibitors Reserpin ([³H]Reserpin) konnte ein ca. 70-80kDA großes Glykoprotein aufgereinigt werden (Stern-Bach et al., 1990, Übersicht Schuldiner, 1994). Eine solche Aufreinigung gelang ebenfalls weiteren Forschungsgruppen (Vincent und Near, 1991, Isambert et al., 1992, Übersicht Schuldiner, 1994). Es wurden daraufhin zwei distinkte cDNAs kloniert, die für einen vesikulären Monoamintransporter (VMAT) kodieren (Erickson et al., 1992, Liu et al., 1992). Über eine cDNA-Bibliothek aus Pheochromocytoma Zellen (PC12) der Ratte wurde die für VMAT1 kodierende cDNA kloniert (Liu et al., 1992). Die zugehörige mRNA konnte in der Nebenniere nachgewiesen werden. In der gleichen Studie wurde eine homologe cDNA aus einer Bibliothek des Ratten-Hirnstamms kloniert, die für den VMAT2 kodiert. Die zugehörige mRNA wurde im Gehirn detektiert. Zur gleichen Zeit konnte die VMAT2-cDNA aus einer Leukämie-Zelllinie von basophilen Granulozyten der Ratte kloniert werden (Erickson et al., 1992). Die zugehörige mRNA wurde im Hirnstamm und im Magen von Ratten nachgewiesen. Über weitere Expressionsanalysen stellte sich heraus, dass VMAT2 im Gehirn der Haupttransporter für Monoamine ist, während VMAT1 vor allem in der Peripherie lokalisiert ist.

Bei den Transportern VMAT1 und VMAT2 handelt es sich um Membranglykoproteine, die aus zwölf Transmembrandomänen, einem zytoplasmatischen N- und C-Terminus und einer großen luminalen Schleife zwischen erster und zweiter Transmembrandomäne aufgebaut sind (**Abb. 7**; Erickson et al., 1992, Liu et al., 1992). Bereiche mit geringer Sequenzhomologie zwischen VMAT1 und VMAT2 liegen im N- und C-Terminus und der großen luminalen Schleife der Transporter (Liu et al., 1992).



Abb. 7: Schema des vesikulären Monoamintransporters (VMAT). Der VMAT ist aus 12 Transmembrandomänen, einem zytoplasmatischen N- und C-terminalen Segment und einer großen luminalen Schleife mit Glykosilierungsstellen aufgebaut.

Der Neurotransmittertransport über vesikuläre Transportproteine wird durch einen elektrochemischen Protonengradienten $\Delta \mu H^{\dagger}$ über die Vesikelmembran angetrieben, welcher über die vakuoläre H⁺-ATPase (vATPase) unter ATP-Verbrauch aufgebaut wird (Übersicht von Schuldiner, 1994, Gasnier, 2000, Parsons, 2000, Wimalasena, 2011). Vesikuläre Neurotransmittertransporter werden daher zu einer Familie H⁺-abhängiger Transporter zusammengefasst (Übersicht von Amara und Arriza, 1993, Gasnier, 2000, u. a.). VMAT1 und VMAT2 werden aufgrund von Sequenzhomologien in die major facilitator Superfamilie von Protonen-Anti- und Symportern eingeteilt (Parsons, 2000). Es handelt sich um Antiporter, die ein Neurotransmittermolekül gegen zwei Protonen austauschen (Gasnier, 2000, Parsons, 2000). Dabei besitzen die Monoamine eine einfach positive Ladung (Parsons, 2000). Der über die vATPase generierte elektrochemische Protonengradient $\Delta \mu H^{\dagger}$ besteht aus den beiden Komponenten $\Delta p H$ und ΔJ (Schuldiner, 1994, Parsons, 2000). In situ-Experimente zeigten, dass die Differenz über die Vesikelmembran vom Zytosol ins Vesikellumen für ΔpH und $\Delta ca. -1.4pH$ Einheiten bzw. +39mV beträgt (Übersicht von Parsons, 2000). In vivo-Experimente zeigten, dass der Equilibrium-Aktivitätsgradient, der für die vesikuläre Monoaminaufnahme als Triebkraft dient, zu einem großen Anteil von ΔpH und zu einem geringen Anteil von ΔJ konstituiert wird (zusammengefasst von Parsons, 2000). Demnach hängt die vesikuläre Monoaminaufnahme vorwiegend von ∆pH ab (Johnson, 1988, Hnasko et al., 2010).

Anionen, wie Cl⁻ und Glutamat, haben auf diesen Effekt eine positive Wirkung (Hnasko et al., 2010). Cl⁻ und Glutamat vermindern die ΔJ -Komponente des $\Delta \mu H^+$ an der Vesikelmembran nach deren Aufnahme ins Vesikel. Als Folge wird ΔpH vergrößert, da durch ein geringeres ΔJ der Protonenefflux verringert und die vATPase aktiviert wird, die hierdurch mehr Protonen ins Vesikellumen pumpt. Diese vesikuläre Ansäuerung wiederum verbessert die Aufnahme von Monoaminen ins Vesikellumen (Hnasko et al., 2010).

Der Konzentrationsgradient kann für Monoamine den Equilibrium-Aktivitätsgradienten um ein vielfaches überschreiten, wobei eine vesikuläre Monoaminkonzentration im molaren Bereich gegenüber den submikromolaren Konzentrationen im Zytosol erreicht werden kann (Übersicht von Parsons, 2000 und Wimalasena, 2011). Eine Erklärung hierfür ist die Stabilisation der Monoamine durch intravesikuläre Assoziation, wodurch ihr passiver Transport in Form von Diffusion bzw. Leckströmen reduziert wird (Schuldiner, 1994, Parsons, 2000). Dies gilt besonders für chromaffine Granula der Zellen der Nebenniere. In synaptischen Vesikeln der monoaminergen Neurone des Gehirns dagegen entsteht durch $\Delta \mu H^+$ ein nur zehnfacher Konzentrationsgradient für Monoamine vom Zytosol ins Vesikellumen (Schuldiner, 1994).

Studien zur Transport-Kinetik des VMAT in Ratten zeigen, dass VMAT2 im Vergleich zu VMAT1 eine höhere Affinität für Monoamine aufweist (Peter et al., 1994). Auf den vesikulären Serotonintransport bezogen besitzt der VMAT2 einen K_M-Wert von 0,18 μ M im Vergleich zu 0,3 μ M des VMAT1. Im menschlichen Gewebe dagegen haben VMAT1 und VMAT2 die gleiche Affinität für Serotonin (Erickson et al., 1996). Allerdings besitzt VMAT2 im Vergleich zu VMAT1 eine dreifach höhere Affinität für Catecholamine (Erickson et al., 1996).

VMAT-Deletionsmutanten sind letal und sterben bereits einige Tage nach der Geburt (Fon et al., 1997, Wang et al., 1997, Wimalasena, 2011). Sie zeigen eine drastische Monoaminverarmung.

1.2 G_o-Protein vermittelte Signaltransduktion

1.2.1 Familien heterotrimerer G-Proteine und deren Aktivitätszyklus

Heterotrimere G-Proteine und der durch sie vermittelte Signalweg zur Aktivierung bzw. Inhibierung von Adenylylcyclasen wurde zuerst in Martin Rodbells und Alfred Gilmans Labor entdeckt, die dafür 1994 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin erhielten (Übersichtsartikel von Birnbaumer, 2007a, b). Viele Studien zu dieser Signaltransduktion etablierten drei distinkte molekulare Einheiten: die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), heterotrimere Guanin-Nukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) und zahlreiche Effektoren neben den Adenylylcyclasen. GPCRs gehören zur größten Familie von Zellmembran-Rezeptoren in höheren Organismen und werden durch eine große Vielzahl von Stimuli aktiviert (z. B. Hormone, Neurotransmitter, Geschmackskomponenten, Gerüche und Licht). Eine typische Zelle exprimiert 100 verschiedene GPCRs (Übersicht Hein und Bunemann, 2009). Im Menschen gibt es 865 Gene, die für GPCRs kodieren (Übersicht von Milligan und Kostenis, 2006). GPCRs bestehen aus einem extrazellulären Nterminalen Segment, aus sieben Transmembrandomänen (α -Helices), die über intra- und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind und aus einem zytosolischen C-

terminalen Segment (Übersicht von Hollmann et al., 2005). Aufgrund der sieben helikalen Transmembrandomänen werden GPCRs auch heptahelikale Rezeptoren genannt. Die Ligandenbindungstasche der GPCRs befindet sich auf der extrazellulären Seite, entweder im Kern der arrangierten Transmembrandomänen, an den extrazellulären Schleifen, am N-terminalen Segment oder an einer Kombination aus mehreren extrazellulären Abschnitten. Auf der zytoplasmatischen Seite interagieren GPCRs über die zweite und dritte intrazelluläre Schleife mit den heterotrimeren G-Proteinen. Bei den bereits in Abschnitt 1.1 beschriebenen Dopamin- und Serotonin-Rezeptoren (abgesehen von der 5-HT₃-Familie) handelt es sich um GPCRs.

Heterotrimere G-Proteine setzen sich aus einer α -Untereinheit (UE) und einem Komplex bestehend aus einer β - und γ -UE ($\beta\gamma$ -Komplex) zusammen. Als erstes konnte der G_s α -Subtyp aufgereinigt werden (Übersicht von Milligan und Kostenis, 2006, Birnbaumer, 2007a, b). Diese α -UE besitzt eine stimulierende Wirkung, da sie über die Aktivierung von Adenylylcyclasen den cAMP-Spiegel in Zellen erhöht. Die Aufreinigung des $G_i\alpha$ -Subtyps folgte als nächstes. Sie sind im Gegensatz zu $G_s\alpha$ -UE inhibitorischer Natur bezüglich ihrer Regulation von Adenylylcyclasen und des cAMP-Spiegels. Aufmerksam wurde man auf diese G α -Subtypen aufgrund ihrer Toxin-Sensitivität: G_s α -Subtypen sind Choleratoxinsensitiv, $G_i\alpha$ -Subtypen Pertussistoxin-sensitiv. Als weiteren Pertussistoxin-sensitiven $G\alpha$ -Subtyp, der neben $G_{i\alpha}$ aufgereinigt werden konnte und dessen Wirkung unklar war, wurde $G_0\alpha$ identifiziert (o = other, Neer et al., 1984, Sternweis und Robishaw, 1984). Inzwischen gibt es vier Familien von G α -UE mit mehreren Subtypen: **G**_s α (G_s α , G_{olf} α), **G**_{i/o} α (G_{i1-3} α , $G_{01,2}\alpha$, $G_{11,2}\alpha$, $G_{z}\alpha$, $G_{aust}\alpha$), $G_{a/11}\alpha$ ($G_{a}\alpha$, $G_{11}\alpha$, $G_{14}\alpha$, $G_{15}\alpha$, $G_{16}\alpha$) und $G_{12/13}\alpha$ ($G_{12}\alpha$, $G_{13}\alpha$) (Übersicht von Milligan und Kostenis, 2006). Dazu kommen fünf verschiedene Gβ-Subtypen (G β_{1-5}) und zwölf verschiedene G γ -Subtypen (G γ_{1-12}). Neben der Adenylylcyclase gibt es zahlreiche weitere Effektoren, wie z. B. Phospholipasen, Ionenkanäle und Kinasen. Heterotrimere G-Proteine sind über kovalente Lipid-Modifikationen der α - und γ -UE an die Plasmamembran assoziiert (Übersichtsartikel von Escriba et al., 2007). Heterotrimere G-Proteine interagieren über verschiedene Anteile mit GPCRs, die ebenfalls für die Selektivität der Rezeptor-G-Protein-Interaktion relevant sind (Übersicht von Hollmann et al., 2005). Der C-Terminus der α -UE kann direkt mit dem Rezeptorprotein interagieren. Auch Anteile des benachbarten N-terminalen Abschnitts der α -UE sowie Aminosäure-Reste der β - und γ -UE steuern zur Rezeptor-G-Protein-Interaktion und Selektivität bei.



Abb. 8: Wirkmechanismus heterotrimerer G-Proteine.

A Aktivitätszyklus bestehend aus Aktivierung und Inaktivierung heterotrimerer G-Proteine. **B** Stimuli heptahelikaler GPCRs und durch heterotrimere G-Proteine regulierte Effektorsysteme, z. B. Synthese der *second messenger* cAMP, IP3 und DAG. Abk.: AC, Adenylylcyclase; cAMP, cyclisches Adenosinmonophosphat; DAG, Diacylglycerol; GIRK, *G* protein-coupled inwardly-rectifying K^+ channel; IP3, Inositol-1,4,5-triphosphat; PLC, Phospholipase C; RGS, regulators of *G* protein signalling.

G-Proteine liegen in ihrem inaktiven Zustand als Heterotrimere ($\alpha\beta\gamma$) vor. Dabei hat die α -UE des G-Proteins in ihrer Guaninnukleotid-Bindungsstelle GDP gebunden. Heterotrimere G-Proteine durchlaufen einen Zyklus aus Aktivierung und Inaktivierung (Abb. 8 A; Übersicht von Cabrera-Vera et al., 2003, Milligan und Kostenis, 2006). Durch die Bindung eines agonistischen Liganden am Rezeptor wird dieser aktiviert und vollzieht eine Konformationsänderung. Der aktivierte Rezeptor besitzt eine Guaninnukleotid-Austausch-Funktion und übernimmt damit die Funktion eines GEF (guanin nucleotide exchange factor). Der Rezeptor beschleunigt so die Freisetzung des GDP aus der Bindungsstelle der a-UE des zu diesem Zeitpunkt an den Rezeptor assoziierten heterotrimeren G-Proteins (Abb. 8 A). Dies ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Aktivierungszyklus heterotrimerer G-Proteine. Die nun freie Bindungsstelle der G α -UE wird daraufhin mit GTP besetzt, welches im Zytoplasma der Zelle in höherer Konzentration vorliegt als GDP. Dies führt zur Konformationsänderung der α -UE, woraufhin sie vom $\beta\gamma$ -Komplex und vom Rezeptor dissoziiert. Die aktivierte, GTP-gebundene α -UE und der entlassene βγ-Komplex sind jetzt frei um mit Zielproteinen, so genannten Effektoren, zu interagieren und diese zu aktivieren oder zu inhibieren (Abb. 8 B). Auf diese Weise wird eine Vielzahl nachgeschalteter Signaltransduktionskaskaden angeschaltet oder geblockt, was zu unterschiedlichen physiologischen Effekten führt. Effektorsysteme können second messenger-Systeme sein oder z. B. Ionenkanäle (Abb. 8 B). Die Regulation von Effektorsystemen erfolgt so lange die G α -UE GTP gebunden hat (aktiver Zustand) und der $\beta\gamma$ -Komplex frei vorliegt. Die Gα-UE besitzt in ihrem aktiven Zentrum GTPase-Funktion, über die das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert wird. Dabei wird ein Phosphat-Rest abgegeben. Die Aktivierung der GTPase-Funktion wird durch Hilfsproteine beschleunigt, den sogenannten GAP (GTPase activating proteins), die ebenfalls RGS (*regulators of G protein signalling*) genannt werden. Die α -UE fällt damit in ihre inaktive Konformation zurück und ist nun wieder in der Lage den $\beta\gamma$ -Komplex zu binden. Das G-Protein-Trimer steht jetzt erneut für einen Aktivierungszyklus durch den Ligand-gebundenen Rezeptor bereit (Übersicht von Milligan und Kostenis, 2006). Die Aktivierung heterotrimerer G-Proteine durch den aktivierten Rezeptor erfolgt, solange dieser einen agonistischen Liganden gebunden hat. GTP ist essentiell für die Aktivierung von G-Proteinen, bei der auch Mg²⁺ eine wichtige Rolle spielt (Übersicht von Cabrera-Vera et al., 2003, Birnbaumer, 2007a, b). Im Versuch können G α -UE in ihrem aktivierten Zustand stabilisiert werden, indem man dem Versuchspuffer GTP-Analoga zusetzt, welche sich nicht bzw. kaum hydrolysieren lassen. Solche Analoga sind z. B. GMP-P(NH)P und GTP γ S (Übersicht von GDP β S stabilisiert werden, einem GDP-Analogon mit erhöhter metabolischer Beständigkeit.

1.2.2 $G_o \alpha$ als Subtyp der G_i -Proteinfamilie

Im Jahr 1984 konnte die α -UE des G_o-Proteins von zwei Forschungsgruppen unabhängig aus dem Rindergehirn aufgereinigt werden (Neer et al., 1984, Sternweis und Robishaw, 1984). Bei der aufgereinigten α -UE handelte es sich um ein Pertussistoxin-sensitives, hochaffin GTP-bindendes Protein mit einem Molekulargewicht von 39kDa, das den bereits bekannten G_i α -UE ähnelte. Da es aufgrund seines zum G_i $\tilde{\alpha}$ Protein distinkten Molekulargewichts im SDS-Gel nicht mit dem parallel aus dem Rindergehirn aufgereinigten G_i α (41kDa) migrierte und keine G_s α -Aktivität zeigte, wurde es von Sternweis und Robishaw als das "andere" G α -Protein bezeichnet und erhielt den Namen G_o α (o = *other;* Sternweis und Robishaw, 1984).

Neer und Kollegen konnten über polyklonale Antikörper zeigen, dass $G_0 \alpha 0,5\%$ der gesamten Membranprotein-Masse im Rindergehirn ausmacht.

 $G_0\alpha$ wird in der Ratte in verschiedenen Hirnarealen, z. B. dem *Striatum* und der *Substantia nigra pars reticulata* (SNr) und im Rückenmark exprimiert (Huff et al., 1985, Worley et al., 1986). Die Immunfärbung zeigt eine hohe $G_0\alpha$ -Dichte in der *Substantia nigra*, die einen G_0 -abhängigen nigrostriatalen Signalweg zu reflektieren scheint, da striatale Läsionen die Immunfärbung in der SNr reduzieren (Worley et al., 1986).

Die G_o α -kodierende cDNA konnte in verschiedenen Forschungsgruppen kloniert werden (Itoh et al., 1986, Jones und Reed, 1987, Van Meurs et al., 1987). Im weiteren Forschungsverlauf zeigten verschiedene Arbeitsgruppen, dass zwei Isoformen des G_o α existieren (Scherer et al., 1987, Brabet et al., 1988, Goldsmith et al., 1988, Lang, 1989, Hsu et al., 1990, Strathmann et al., 1990). Die distinkten cDNAs wurden ebenfalls kloniert und G_{o1} α bzw. G_{o2} α (auch G_{oA} α , G_{oB} α) genannt (Hsu et al., 1990, Strathmann et al.,

1990). Die G_o α -Isoformen entstehen durch alternatives *Splicen* aus einem einzelnen RNA-Transkript (**Abb. 9**; Bertrand et al., 1990, Hsu et al., 1990, Strathmann et al., 1990).



Abb. 9: Mögliches Schema des G_oα-Gens (Bertrand et al., 1990).

Weiße Boxen entsprechen den 5'- und 3'-UTRs des ersten und jeweils letzten Exons. Schwarze Boxen entsprechen den kodierenden Regionen der Exons. Unterbrochene Linien (—/ /—) entsprechen den Introns des G₀ α -Gens. Demnach setzt sich G₀₁ α aus den Exonen 1-6 und 7a-9a_{1/2} und G₀₂ α aus den Exonen 1-6 und 7b-9b zusammen. Die Exone 1-6 sind in beiden Isoformen identisch. Die Anordnung der Exone 7a-9a_{1/2} und 7b-9b ist hypothetisch. Die Exone 7b-9b könnten in der DNA-Sequenz auch oberhalb der Exone 7a-9a_{1/2} liegen. Gleiches gilt für die Anordnung der Exone 9a₁ und 9a₂.

Danach unterscheiden sich die $G_{o1}\alpha$ - und $G_{o2}\alpha$ -mRNA in den letzten 88 Nukleotiden des offenen Leserahmens (ORF, *open reading frame*) und in der 3'-UTR (*untranslated region*). Beide mRNAs kodieren ein Protein aus 354 Aminosäuren. Die Sequenz der ersten 248 Aminosäuren ist für $G_{o1}\alpha$ und $G_{o2}\alpha$ identisch. Die restliche C-terminale Sequenz beider α -UE unterscheidet sich in 26 Aminosäuren (Hsu et al., 1990).

Das G_o-Protein liegt, wie die G-Proteine G_i und G_s, ebenfalls als heterotrimeres G-Protein ($\alpha\beta\gamma$) vor (Neer et al., 1984, Sternweis und Robishaw, 1984).

1.2.3 Konstitutiv aktive und dominant negative Form des $G_{o}\alpha$

Gezielte Mutationen der G₀ α -cDNA-Sequenz führen zum Aminosäure-Austausch, welcher die Generierung der konstitutiv aktiven und dominant negativen Form des G₀-Proteins zur Folge hat. Bei der Mutation, die in der dominant negativen Form G₀ α S47C resultiert, wird das Serin (S) der G1-Box an Position 47 in der G₀ α -Primärsequenz durch Cystein (C) ersetzt (Slepak et al., 1993a, b, Übersicht von Barren und Artemyev, 2007). Die in G-Proteinen hochkonservierte G1-Box ist für die Bindung der Phosphat-Reste des Guanin-Nukleotids und Mg²⁺ essentiell. Durch die Mutation des Serin 47 geht die GTP-Bindung durch die G₀ α -UE verloren, welche darauf hin nicht mehr aktiviert werden kann. Sie ist weiterhin in der Lage mit dem $\beta\gamma$ -Komplex zu interagieren. Es konnte gezeigt werden, dass das Serin der G1-Box sowohl durch Cystein (C) als auch Asparagin (N) ersetzt werden kann und erfolgreich zur Generierung von dominant negativen G α -UE führt (Übersicht von Barren und Artemyev, 2007). In dieser Arbeit wurde die dominant negative Variante G₀ α S47N verwendet.

Die zur konstitutiv aktiven Variante führende Mutation liegt in der ebenfalls unter G α -UE hochkonservierten G3-Box. Diese Box wird mit der Bindung des γ -Phospat-Restes von

GTP und der Konformationsänderung von G α -UE aufgrund des GDP-GTP-Austauschs in Verbindung gebracht (Einleitung von Hermouet et al., 1991). Die Mutation des Glutamin-Restes (Q) im Sequenzmotiv der G3-Box führt zur Verminderung der GTPase-Aktivität von G α -UE und daher zur konstitutiv aktiven Variante (Einleitung von Hermouet et al., 1991). In der G $_{0}\alpha$ -UE handelt es sich um den Glutamin-Rest 205, der durch den Austausch mit Leucin (L) zur konstitutiv aktiven Variante G $_{0}\alpha$ Q205L führt (Kroll et al., 1992), welche in dieser Arbeit verwendet wurde.

1.2.4 Physiologie des G_o-Proteins

G_oα-Deletionsmutanten

Es wurden unabhängig von einander zwei verschiedene Linien der $G_o\alpha$ -Deletionsmutante $(G_{o1/2}\alpha^{--})$ generiert (Jiang et al., 1997, Valenzuela et al., 1997).

Valenzuela und Kollegen beobachten, dass die $G_{\alpha 1/2} \alpha^{-/-}$ Mäuse aus ihrer Linie wachstumsretardiert sind, eine verkürzte Lebensspanne aufweisen und den Mendel'schen Regeln der Vererbungslehre folgend im Vergleich und zu Gunsten der Wildtyp-Wurfgeschwister bei der Geburt um 10% vermindert vorliegen (48% $G_{01/2}\alpha^{+/-}$ / 14% $G_{01/2}\alpha^{-/-}$ / 38% Wildtyp). Die Tiere sind dabei allerdings nicht hypoglykämisch. Die $G_{\alpha 1/2} \alpha^{-/-}$ Mäuse leiden weiterhin unter einem Tremor und gelegentlichen Krämpfen (Valenzuela et al., 1997, Mende et al., 1998). Obwohl G_o α der Haupt-Subtyp des Gehirns ist, sieht das Nervensystem der $G_{01/2}\alpha^{--}$ Mäuse dieser Linie intakt aus und es zeigen sich keine offensichtlichen histologischen Anormalitäten. Im Herzen dagegen liegt in den Deletionsmutanten eine defekte Regulation von L-Typ-Ca²⁺-Kanälen durch muskarine Acetylcholin Rezeptoren (mAChR) vor. Trimeres $G_0\alpha$ scheint an den mAChR gekoppelt zu sein und reguliert darüber L-Typ-Ca²⁺-Kanälen (Valenzuela et al., 1997). Weiterhin findet sich im Gehirn und im Herz der $G_{01/2}\alpha^{-1}$ Mäuse eine Verminderung des $\beta\gamma$ -Komplexes. Die reduzierte Menge des $\beta\gamma$ -Komplexes entspricht im Gehirn der Gesamtmenge an verbleibenden Ga-UE (Mende et al., 1998). In der CA3-Region des *Hippocampus* konnte mit Hilfe der $G_{01/2}\alpha^{-/-}$ Mäuse eine $G_0\alpha$ -abhängige Modulation der Regulation von K⁺- und Ca²⁺-Kanälen durch GABA_B- und Adenosin-Rezeptoren nachgewiesen werden (Greif et al., 2000).

Die $G_{o1/2}\alpha^{--}$ Mäuse aus dem Labor von Prof. Birnbaumer sind ebenfalls wachstumsretardiert, haben eine verkürzte Lebensspanne von durchschnittlich sieben Wochen und sind während des Embryonalstadiums und nach der Geburt im Vergleich zu den Wildtyp-Wurfgeschwistern unterrepräsentiert (Jiang et al., 1997, 1998). Die Mäuse dieser Linie sind weiterhin hyperalgetisch und zeigen eine schwere Störung der Kontrolle der Motoraktivität bei gleichzeitiger Hyperaktivität. $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäuse dieser Linie zeigen ebenfalls einen Tremor und außerdem ein auffälliges Dreh-Verhalten, bei welchem sie unablässig
im Kreis rennen (gleiche Richtung). Dabei zeigen Hirnschnitte keine Links-Rechts-Unterschiede. Da sie Objekten ausweichen, wurde ebenfalls angenommen, dass die $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäuse dieser Linie sehen können. Auf dem molekularen Niveau konnte gezeigt werden, dass in einem Viertel der untersuchten Zellen des DRGs (*dorsal root ganglion*) der $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäuse die Inhibition von Ca²⁺-Kanälen durch Opioid-Rezeptor-Agonisten im Vergleich zu Wildtyp-Wurfgeschwistern signifikant vermindert ist. Die Verhinderung der Expression des $G_o\alpha$ hat auch in dieser Linie keinen Anstieg des aktiven, freien $\beta\gamma$ -Komplexes zur Folge.

Die Autoren der Studie schließen daraus, dass das G_o-Protein eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Motoraktivität, dem motorischen Verhalten, in der Schmerzwahrnehmung und der Regulation von Ca²⁺-Kanälen spielt (Jiang et al., 1998). Die Annahme, dass G_o α an der Kontrolle der Motoraktivität beteiligt ist, wird durch eine weitere Studie zur Interaktion mit dem D₂-Dopamin-Rezeptor unterstützt. (Jiang et al., 2001). Hier wurde gezeigt, dass G_o α der Haupt-Subtyp des an den D₂-Dopamin-Rezeptor gekoppelten G-Proteins zu sein scheint.

Unter Verwendung der Deletionsmutanten $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$, $G_{o1}\alpha^{-/-}$ und $G_{o2}\alpha^{-/-}$ konnte außerdem gezeigt werden, dass $G_{o1}\alpha$ als Hauptisoform der Retina mit dem mGluR6 (metabotroper Glutamat-Rezeptor 6) interagiert und durch den Rezeptor aktiviert werden kann (Dhingra et al., 2000, 2002).

Die freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Birnbaumer zur Verfügung gestellten G_{o} -Deletionsmutanten $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$, $G_{o1}\alpha^{-/-}$ und $G_{o2}\alpha^{-/-}$ wurden auch für diese Arbeit verwendet.

Weitere physiologische Go-vermittelte Effekte

Das G_o -Protein ist an der Regulation verschiedener physiologischer Effekte hauptsächlich im Gehirn aber auch im endokrinen System und im Herzen beteiligt. Einige dieser Effekte wurden in Studien mittels Verwendung von $G_o\alpha$ -Deletionsmutanten nachgewiesen, wie bereits im obigen Abschnitt beschrieben. Das $G_o\alpha$ ist weiterhin in die Regulation der PLC, der Proteinkinase C (PKC) und des MAP-Kinase-Signalwegs eingebunden (Moriarty et al., 1990, Xie et al., 1995, van Biesen et al., 1996, Antonelli et al., 2000). Das G_o -Protein wird in Neuronen durch GAP-43 aktiviert, ein intrazelluläres Protein des Wachstumskegels, das mit neuronalem Wachstum in Verbindung gebracht wird (Strittmatter et al., 1990). Die Förderung des Neuritenwachstums durch G_o konnte auch über eine Inhibition der PKC und durch die Modulation der intrazellulären Ca²⁺-Freisetzung gezeigt werden (Xie et al., 1995). Das G_o -Protein scheint weiterhin eine Rolle bei der Verhinderung der Apoptose zu spielen und damit das Überleben von Zellen zu sichern (Tanaka et al., 1999, Yin et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass APP (*amyloid precursor protein*) mit $G_o\alpha$ interagiert und wie ein G_o -gekoppelter Rezeptor funktioniert (Nishimoto et al., 1993). Nishimoto und Kollegen vermuten, dass eine anormale APP- $G_o\alpha$ -Signaltransduktion für den Verlauf der Alzheimer'schen Krankheit verantwortlich sein könnte.

Neben diesen Befunden konnte unter anderem in der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Ahnert-Hilger gezeigt werden, dass das monoaminerge System durch das G_o-Protein moduliert wird. Zunächst wurden die G_{i/o}-Proteine durch frühe Studien in den 1980er Jahren mit der Regulation der Exozytose und damit der Regulation vesikulärer Prozesse in verschiedenen Zelltypen in Zusammenhang gebracht (Übersicht von Ahnert-Hilger und Wiedenmann, 1994, Nürnberg und Ahnert-Hilger, 1996).

Etwas später konnte dann zum ersten Mal gezeigt werden, dass sowohl in der Peripherie als auch im ZNS komplette Sets heterotrimerer G-Proteine ($\alpha\beta\gamma$) mit vesikulären Strukturen (LDCVs und SSVs) assoziiert sind (Ahnert-Hilger et al., 1994, Übersicht Ahnert-Hilger und Wiedenmann, 1994, Nürnberg und Ahnert-Hilger, 1996). Dabei handelte es sich im Bezug auf SSVs um die G-Protein-Subtypen G_{o1}, G_{o2}, G_{i1} und G_{i2}.

Im Jahr 1998 wurde nachgewiesen, dass in PC12 Zellen der Ratte die Catecholaminaufnahme durch die α -UE des G_{o2}-Proteins inhibiert wird (Ahnert-Hilger et al., 1998). Diese Regulation ist spezifisch, da aufgereinigte aktivierte G_{o1}-, G_{i1}- und G_{i2}- α -UE keine Regulation der vesikulären Catecholaminaufnahme aufwiesen. Experimente mit Acridin Orange brachten hervor, dass die Azidifizierung intrazellulärer Organellen in permeabilisierten PC12-Zellen nicht betroffen ist. Dies bestätigten Versuche an G_{o2} $\alpha^{-/-}$ Mäusen. Mit Acridin Orange wurde nachgewiesen, dass die Azidifizierung synaptischer Vesikel dieser Tiere unverändert bleibt und daher nicht von G_{o2} α abzuhängen scheint (Pahner et al., 2003, Winter et al., 2005). Allerdings wurde die Reserpin-Bindung an den VMAT durch G_{o2} α reduziert. Daraus schloss man, dass der beobachtete Effekt eher auf die Regulation des VMAT als der vakuolären ATPase zurückzuführen ist.

Dieser Effekt konnte weiterhin an BON-Zellen, einer serotonergen neuroendokrinen Zelllinie eines pankreatischen Tumors, und an serotonergen Neuronen der *Raphe Nuclei* in Primärkultur bestätigt werden (Höltje et al., 2000). Auch hier zeigte die G₀₁ α -UE keinen Einfluss. Die G₀₂ α -spezifische Inhibition der Monoaminaufnahme wurde an großen elektronendichten und kleinen synaptischen Vesikeln (LDCVs und SSVs) nachgewiesen und betraf die Regulation des VMAT1 und VMAT2. Zusätzlich zeigte die elektronenmikroskopische Analyse des präfrontalen *Cortex* eine Kolokalisation des VMAT2 und G₀₂ α auf SSVs in serotonergen Terminalien (Höltje et al., 2000). Im gleichen Verfahren wurde später beobachtet, dass G₀₂ α , G_{q/11} α , G β_2 und G β_5 an die Membran sekretorischer Granula der chromaffinen Zellen der Nebenniere der Ratte assoziiert sind (Pahner et al., 2002). Auch an aufgereinigten chromaffinen Granula zeigte sich die G₀₂ α -spezifische Hemmung der Monoaminaufnahme.

Studien an Thrombozyten führten zuerst zur Hypothese, dass das Vesikel selbst über assoziierte G-Proteine die Aktivität der vesikulären Transmittertransporter reguliert (Höltje et al., 2003). Thrombozyten nehmen über den Plasmamembrantransporter SERT Serotonin auf und speichern es in elektronendichten Granula über den VMAT2. Auch hier liegt eine GMP-P(NH)P-vermittelte Verminderung der VMAT2-Aktivität vor, obwohl in Thrombozyten kein $G_{02}\alpha$ vorhanden ist. Anhand von Deletionsmutanten ($G_{0}\alpha^{-1}$) konnte gezeigt werden, dass in Thrombozyten die G_aα-UE für die Verminderung der vesikulären Monoaminaufnahme verantwortlich ist. In Thrombozyten aus Mäusen, die keine periphere TPH exprimieren können (TPH1-/-), fehlte dieser Effekt. Die TPH ist für den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Serotoninsynthese verantwortlich (1.1.2). In TPH1^{-/-} Mäusen kann daher in der Peripherie kein Serotonin synthetisiert werden und folglich enthalten die Thrombozyten und damit die VMAT2-tragenden Granula dieser Tiere kaum Serotonin. Die G_αα-abhängige Verminderung des VMAT2-vermittelten Serotonintransports konnte durch Vorbeladung der TPH1^{-/-}-Thrombozyten mit Serotonin, aber interessanterweise auch Noradrenalin, wieder hergestellt werden. Demnach scheint die vesikuläre Neurotransmitterkonzentration wichtig für die G-Protein-abhängige Regulation des VMAT2 zu sein. Die Initiierung dieser Signaltransduktion scheint also im Vesikellumen zu liegen.

Weitere *in vitro*-Studien bestätigten den Einfluss der intravesikulären Neurotransmitterkonzentration auf die Aktivierung der G α -abhängigen Signaltransduktionskaskade, die zur Verminderung der vesikulären Neurotransmitteraufnahme führt. CHO-Zellen (*chinese hamster ovary*) enthalten endogen G₀₂ α , nicht aber den VMAT oder sonstige am monoaminergen System beteiligte Proteine. Wenn VMATs stabil in dieser Zelllinie exprimiert werden, sind sie auf intrazellulären Kompartimenten lokalisiert und zeigen Reserpinsensitive Transportkinetiken für Monoamine (Brunk et al., 2006). Auch hier zeigte sich die G₀₂ α -vermittelte VMAT-Inhibition erst nach Vorbeladen der permeabilisierten Zellen mit verschiedenen Monoaminen im µM- und mM-Bereich. Dabei stach hervor, dass die Adrenalinvorbeladung im Vergleich zu VMAT1 keinen Effekt auf die Regulation der VMAT2-Aktivität zeigte.

Interessanterweise konnte die beschriebene Signaltransduktion ebenfalls durch Vorbeladung mit Agonisten heptahelikaler G-Protein-gekoppelter Rezeptoren initiiert und mit Antagonisten für diese Rezeptoren geblockt werden. Hier wurden 5-HT_{1B}- und α 1-Rezeptor-Agonisten und Antagonisten eingesetzt. Diese Ergebnisse indizieren, dass Vesikel-assoziierte G-Proteine durch die Neurotransmitter im Vesikel bei einer bestimmten Konzentration über luminale GPCR-ähnliche Strukturen aktiviert werden (Brunk et al., 2006).

Durch weitere Experimente in dieser Studie konnte die luminale GPCR-ähnliche Struktur identifiziert werden, die für die Wahrnehmung der intravesikulären Neurotransmitterkon-

zentration verantwortlich ist. Deletiert man die große luminale Schleife des VMAT, zeigt sich bei stabiler Expression in CHO-Zellen, dass der Transporter nach wie vor funktionsfähig ist und eine Reserpin-sensitive Transport-Kinetik aufweist (Brunk et al., 2006). Die Transport-Aktivität dieses trunkierten VMAT konnte durch die Anwesenheit von GMP-P(NH)P nicht vermindert werden.

Diese Ergebnisse führten schließlich zur Hypothese, dass der VMAT (1 und 2) neben seiner Transportaktivität eine GPCR-ähnliche Funktion besitzt, die durch die intravesikuläre Neurotransmitterkonzentration über dessen große luminale Schleife aktiviert wird und über die der VMAT Vesikel-assoziierte G-Proteine (G_o / G_q) aktiviert, deren α -UE die Transportaktivität des VMAT entweder direkt oder indirekt über einen nachgeschalteten Signalweg in Form einer negativen Rückkopplungsschleife vermindert und damit die vesikuläre Monoaminaufnahme dämpft (**Abb. 11**). Das in **Abb. 11** dargestellte Modell der VMAT- $G_{o2}\alpha$ -Signaltransduktion zeigt Vesikelstrukturen, die auf den Ergebnissen der Analyse von Takamori und Kollegen basieren (Takamori et al., 2006). In **Abb. 10** ist das molekulare Modell eines synaptischen Vesikels nach Takamori et al. abgebildet.

Ein möglicher Effektor des nachgeschalteten G-Protein-Signalwegs könnte das CAPS1 (Ca^{2+} dependent activator protein of secretion 1) sein. CAPS1 und CAPS2 regulieren die Exozytose (SSVs und LDCVs) in Neuronen und neuroendokrinen Zellen. Mit Hilfe der Überexpression des CAPS1 und CAPS2 konnte gezeigt werden, dass beide Proteine die vesikuläre Monoaminaufnahme über den VMAT1 und VMAT2 fördern (Brunk et al., 2009). Antikörper, die gegen CAPS1 bzw. CAPS2 gerichtet sind, vermindern jeweils die vesikuläre Monoaminaufnahme. In G₀₂ α -Deletionmutanten ist nur die Expression des CAPS1 im Gehirn verringert und dessen Inhibition durch einen CAPS1-spezifischen Antikörper führt zu keiner weiteren Verminderung der vesikulären Monoaminaufnahme. Ein CAPS2-spezifischer Antikörper vermindert die Monoaminaufnahme in diesen Tieren nach wie vor. Diese Ergebnisse legten nahe, dass CAPS1 ein G₀₂ α -Effektor ist, dessen Negativ-Regulation durch G₀₂ α in der beschriebenen Verminderung der vesikulären Monoaminaufnahme resultiert (Brunk et al., 2009).



Abb. 10: Molekulares Modell eines synaptischen Vesikels nach Takamori et al., 2006.

A B. No Molekulares woden eines Synaptischen Vesikels nach Takanon et al., 2006. **A** Außenansicht. **B** Ansicht des Vesikelquerschnitts. Hervorgehoben ist die vATPase, die für die ATPabhängige Generierung des elektrochemischen Gradienten $\Delta \mu H^+$ verantwortlich ist, der CIC-3, ein vesikulärer CI/H⁺ Antiporter, welcher die Azidifizierung des Vesikels fördert, trimere GTPasen und VGLUT, repräsentativ für vesikuläre Neurotransmittertransporter.



Abb. 11: Hypothetisches Modell der vesikulären G-Protein Aktivierung über den VMAT. Das monoaminerge Vesikel ist schematisch im Querschnitt dargestellt (s. auch Abb. 10). A Grundprinzip der vesikulären Monoaminaufnahme. Über die vATPase wird über die Vesikelmembran unter ATP-Verbrauch der elektrochemische Gradient $\Delta \mu H^{+}$ aufgebaut, welcher aus den Komponenten ΔpH (-1,4) und ΔJ (+39mV) besteht. Die vATPase kann über Bafilomycin geblockt werden. Die Azidifizierung des Vesikels wird voraussichtlich durch den CI/H⁺ Antiport über den CIC-3 potenziert und damit die Vergrößerung des ApH gegenüber einer Verkleinerung des Δ . Der VMAT ist ein Antiporter, der 2H⁺ aus dem Lumen gegen ein Substratmolekül aus dem Zytosol austauscht und kann über Reserpin und Tetrabenazin geblockt werden. Die vesikuläre Monoaminaufnahme ist größtenteils ApH-abhängig. B Aktivierung des heterotrimeren G-Proteins Go. Das Vesikelassoziierte trimere Go-Protein wird vermutlich über eine GPCR-ähnliche Funktion des VMAT aktiviert. Hierbei gehen wir davon aus, dass eine kritische intravesikuläre Monoaminkonzentration diese GPCR-ähnliche Funktion über die große luminale Schleife des VMAT aktiviert (1). Bei einer putativen direkten Interaktion des VMAT und $G_{o2}\alpha$ auf zytoplasmatischer Seite könnte der VMAT als GEF funktionieren (2) und über den Nukleotidaustausch für die Dissoziation des $G_{02\alpha}$ verantwortlich sein (3) **C** Negative Rückkopplungsschleife. Die Verminderung der Transportaktivität des VMAT und damit die Dämpfung der vesikulären Monoaminaufnahme erfolgt nun durch die direkte Regulation der dissoziierten $G_{o2}\alpha$ -UE oder den freien $\beta\gamma$ -Komplex (4) oder indirekt über nachgeschaltete Signaltransduktionskaskaden (5). In letzterem Fall könnte CAPS1 der verantwortliche Effektor der Go-abhängigen Signaltransduktion sein, dessen Hemmung durch $G_{o2}\alpha$ für eine verminderte Monoaminaufnahme verantwortlich ist. Abk.: CAPS1, Ca²⁺ dependent activator protein of secretion 1; GEF, guanin nucleotide ex-change factor; GPCR, G protein coupled receptor; vATPase, vakuoläre ATPase; VMAT, vesikulärer Monoamintransporter.

Zur Analyse möglicher physiologischer Folgen einer Störung der G₀₂α-abhängigen Signaltransduktion zur Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme wurde die Go2a-Deletionsmutante verwendet. Der $G_{\alpha 2} \alpha^{-1}$ Phänotyp ist auf den ersten Blick unauffällig. Erst auf molekularem Niveau werden Unterschiede im Phänotyp von $G_{\alpha 2} \alpha^{-/-}$ Mäusen und ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern deutlich. Die Dopamin-Homöostase ist in $G_{02}\alpha^{-1}$ Mäusen gestört. Folgen dieser Störung zeigen sich allerdings erst nach Verabreichung von Psychostimulanzien, wie Kokain und Amphetamin (Brunk et al., 2008, 2010). Solche Psychostimulanzien erhöhen die nicht-exozytotische Dopaminfreisetzung in bestimmten Gehirnregionen durch die Modulation der VMAT2-Funktion (Übersichtsartikel von Wimalasena, 2011). METH (Methamphetamin) und MDMA (3,4-Methylendioxy-N-methylamphetamin) verringern im Striatum die Dopaminaufnahme in SSVs der Ratte. Kokain dagegen inhibiert den DAT der Plasmamembran und erhöht dadurch subsequent den V_{max}-Wert des VMAT2 bei der Dopaminaufnahme in striatale SSVs der Ratte (Übersicht Wimalasena, 2011). Folglich liegt eine erhöhte extrazelluläre Monoaminkonzentration vor, die für eine verlängerte und potenzierte Signaltransduktion an der Postsynapse verantwortlich ist. Die wiederholte Verabreichung von Kokain führt in $G_{n2}\alpha^{-1}$ Mäusen, bezogen auf deren motorische Aktivität, zu keiner Sensibilisierung ihres Verhaltens. Dies korreliert mit einer reduzierten Dopaminmenge im Striatum der $G_{o2}\alpha$ -Deletionsmutante und einer verringerten Expression der Tyrosinhydroxylase. Weiterhin ist im *Striatum* der $G_{o2}\alpha^{-/-}$ Mäuse der Signalweg des D_1R geschwächt, da die Expression der assoziierten G-Proteine $G_s\alpha$ und $G_{olf}\alpha$ reduziert ist. Nach der Kokainbehandlung dieser Mäuse verändert sich das Verhältnis der Expression des D₁- und D₂R. G₀₂ $\alpha^{-/-}$ Mäuse exprimieren nach wiederholter Gabe von Kokain weniger D₁R und mehr D₂R (Brunk et al., 2008). Dies gilt auch für $G_{02}\alpha^{-/-}$ Mäuse, die mit Amphetamin behandelt wurden (Brunk et al., 2010). Ein großer Unterschied zur Kokainbehandlung ist, dass die wiederholte Amphetamin-Verabreichung in einer zweifachen Erhöhung der Expression der NMDA-Rezeptor-UE NR2B resultiert und damit eine verstärkte Inhibition des indirekten Dopamin-Signalwegs in den Basalganglien zur Folge hat. Daher zeigen Amphetamin-behandelte $G_{02}\alpha^{-1}$ Mäuse trotz verminderter motorischer Aktivität nach wie vor eine Verhaltenssensibilisierung, die in diesen Mäusen nach Kokainbehandlung als Folge des geschwächten D₁R-Signalwegs nicht vorhanden war (Brunk et al., 2010).

Diese Daten legen eine Verknüpfung der $G_0\alpha$ -abhängigen Modulation des VMAT mit der Regulation der Dopamin-Homöostase nahe. Eine Störung dieser Regulation scheint sich auf das Verhalten der Mäuse bei wiederholter Verabreichung von Psychostimulanzien auszuwirken und lässt damit auf einen Zusammenhang mit Suchtverhalten aber auch affektiven Störungen, wie der Schizophrenie und Depression, schließen. Letztere werden unter anderem durch eine Störung der Dopamin-Homöostase hervorgerufen (Übersicht von Beaulieu und Gainetdinov, 2011). Das Verständnis der $G_0\alpha$ -vermittelten Signaltransduktion könnte in zukünftigen Studien zu neuen pharmakologischen Therapieansätzen führen.

1.3 Zielsetzung der vorliegenden Dissertation

Ziel dieser Arbeit ist die GPCR-ähnliche Funktion des VMAT und dessen Signaltransduktion über das Vesikel-assoziierte G_{o2} -Protein weiter zu charakterisieren. Dafür wurden verschiedene Methoden für den Nachweis einer Interaktion des VMAT2 und $G_{o2}\alpha$ herangezogen. Diese Interaktion ist für eine GPCR-ähnliche Signaltransduktion essentiell.

In diesem Zusammenhang sollten weitere im monoaminergen System speziell in der Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme involvierte Schlüsselfaktoren identifiziert werden. Hierfür wurden zytoplasmatische Domänen des VMAT2 in verschiedenen Ansätzen für Interaktionsstudien verwendet.

Um herauszufinden, ob $G_{o1}\alpha$ ebenfalls einen Einfluss auf das monoaminerge System ausübt und ob eine Wechselwirkung mit den $G_{o2}\alpha$ -vermittelten Effekten besteht, wurde die Charakterisierung von *Knockout*-Mausmodellen hinsichtlich dieser Punkte herangezogen. Da das hier beschriebene Modell Auswirkungen auf die dopaminerge Regulation der motorischen Aktivität aufweist, wurden die verschiedenen $G_o\alpha$ -Deletionsmutanten unter anderem diesbezüglich verglichen. Da die $G_{o1}\alpha$ -Deletionsmutante bisher kaum in Publikationen beschrieben wurde, erfolgte in dieser Arbeit außerdem die nicht-molekularbiologische Analyse verschiedener Aspekte des Phänotyps, wie z. B. das Wachstum und die Entwicklung dieser Tiere.

2 Material

2.1 Chemikalien

 40% Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (40,19:1) 	Roth
L-Adeninhemisulfatsalz	Sigma-Aldrich
 Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) 	Sigma-Aldrich
• Agar-Agar	Sigma-Aldrich
• Agarose	Roth
Aluminiumoxid	Sigma-Aldrich
• 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT)	Sigma-Aldrich
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Ampicillin (Amp)	Roth
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich
BCA Protein Assay Reagent A	Thermo Scientific
Bicinchoninsäure (BCA)	Sigma-Aldrich
 Bovines Serum Albumin, Fraktion V (BSA) 	Roth
• 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-galaktopyranosid (X-Gal)	Roth
 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-α-D-galaktopyranosid (X-α-Gal) 	neoLab
Bromphenolblau	Roth
Coomassie Brilliant Blue	Bio-Rad
Desoxynukleotid-Mix	Fermentas
 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure 	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
DNase I	Fermentas
 Enhanced-Chemiluminescence-Reagenzien (ECL) 	GE Healthcare
Entfärbelösung	Bio-Rad
Entwicklerlösung Bonimix	Blach-Röntgen
• Essigsäure	Roth
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Roth
 Ethylendiamintetraacetat (EDTA) 	Roth
 Ethylenglykolbis(2-aminoethyl-)tetraacetat (EGTA) 	Roth
Fixierlösung Bonimix	Blach-Röntgen
• Glukose	Sigma-Aldrich

Material

Glutathion Sepharose 4 fast flow	GE Healthcare
• Glyzerin	Merck
• Glyzin	Sigma-Aldrich
 5'-Guanolylimidodiphosphat (GMP-P(NH)P) 	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	Roth
Heptansulfonsäure	Sigma-Aldrich
L-Histidinmonohydrochlorid	Fluka
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich
 5-Hydroxytryptamin-Hydrochlorid 	Sigma-Aldrich
 5-Hydroxy-[³H]-tryptamintrifluoracetat ([³H]-Serotonin) 	GE Healthcare
 Isopropanol (70%) 	Braun
 Isopropanol (100%) 	Merck
 IsopropyI-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) 	Fermentas
Kaliumchlorid (KCI)	Sigma-Aldrich
Kaliumglutamat	Sigma-Aldrich
 Kaliumhydrogenphosphat (KH₂PO₄) 	Roth
 Kaliumhydroxid (KOH) 	Roth
• Kanamycin (Kan)	Sigma-Aldrich
 Kupfersulfat (CuSO₄) 	Sigma-Aldrich
• L-Leuzin	Sigma-Aldrich
• Lithiumazetat	Sigma-Aldrich
 Low Molecular Weight-Marker (LMW) 	GE Healthcare
• Lysozym	Fluka
Magermilchpulver	Molkerei Heideblume
	(Elsorf)
 Magnesiumchlorid (MgCl₂) 	Sigma-Aldrich
Mass-Ruler-DNA-Marker	Fermentas
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Methanol	Merck
 Di-Natrium-Adenosin-5'-Triphosphat (Na₂-ATP) 	Sigma-Aldrich
Natriumazetat	Sigma-Aldrich
 Natriumbicarbonat (NaHCO₃) 	Sigma-Aldrich
 Natriumcarbonat (Na₂CO₃) 	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
 Natriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) 	Roth

 Natriumhydroxid (NaOH) 	Sigma-Aldrich
 Natriumsulfid (Na₂SO₃) 	Merck
Oktansulfonsäure	Sigma-Aldrich
 Optiphase HighSafe 3 Szintillationsflüssigkeit 	Perkin Elmer
PageRuler - Protein Marker	Fermentas
Perchlorsäure	Sigma-Aldrich
 Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 	Sigma-Aldrich
 Piperazin-N,N´-bis-(2-ethansulfonsäure) (Pipes) 	Sigma-Aldrich
 Polyethylenglykol (PEG 3350) 	Sigma-Aldrich
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Porablot	Macherey & Nagel
 Protease-Inhibitor-Cocktail (PI) 	Sigma-Aldrich
Protein G Sepharose 4 fast flow	GE Healthcare
Reserpin	Sigma-Aldrich
• RNAse A	Fermentas
Saccharose	Roth
Salzsäure	Sigma-Aldrich
Sulfosalicylsäure	Sigma-Aldrich
 Synthetic Dropout (SD)-Pulver (Medienzusatz) 	Clontech
Tetrabenazin	Sigma-Aldrich
 N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) 	Sigma-Aldrich
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich
 Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) 	Merck
• Triton X-100	Roth
• Triton X-100 (10%)	Roche
• Trypsin	Sigma-Aldrich
• Trypton	Roth
• L-Tryptophan	Fluka
• Tween 20	Merck
 Yeast Nitrogen Base (YNB) 	Sigma-Aldrich
 zyklisches Adenosin 3´,5´-monophosphat (cAMP) 	Sigma-Aldrich
 zyklisches Guanosin 3´,5´-monophosphat (cGMP) 	Sigma-Aldrich

2.2 Verbrauchsmaterialien

•

•

Blotting Paper Sheets	Munktell / neoLab
Filme - Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare

Material

 23G-/27G-Kanülen 	Braun / BD Microlance
1x Küvetten	Roth
Nitrozellulosemembran Hybond-C	Amersham Bioscience
Pasteurpipetten	Brand
Petrischalen - 100mm	VWR
 Petrischalen - 150mm 	VWR
Petrischale rechteckig	Thermo Scientific
Pipettenspitzen	Sarstedt
 1,5ml Reaktionsgefäße 	Eppendorf, Sarstedt
 2,0ml Reaktionsgefäße 	Eppendorf, Sarstedt
 15ml Reaktionsgefäße 	Falcon
 50ml Reaktionsgefäße 	Falcon
 Scintillationsröhrchen Mini Poly-Q Vial 	Beckman Coulter
Serologische Pipetten	Falcon
• Spritzen	Braun
 Sterile 10ml-Röhren 	Sarstedt
Sterilfilter	Schleicher & Schuel
 96-Well-Mikrotiterplatten mit / ohne Deckel 	Falcon / Sarstedt
Zentrifugenröhrchen	Beckman Coulter

2.3 Enzyme und Enzympuffer

Enzym	Puffer	Firma
Apa I	10x B (blue)	Fermentas
Bam HI	10x R (red) / 10x Tango	Fermentas
Bcl I	10x G (green) / 10x Tango	Fermentas
Bgl II	10x O (orange) / 10x Tango	Fermentas
Eco RI	10x O (orange) / 10x Tango	Fermentas
Hind III	10x R (red) / 10x Tango	Fermentas
Nhe I	10x B (blue) / 10x Tango	Fermentas
Not I	10x O (orange)	Fermentas
Pstl	10x O (orange)	Fermentas
Pvu I	10x R (red) / 10x Tango	Fermentas
Sacl	10x B (blue) / 10x Tango	Fermentas
Sall	10x O (orange)	Fermentas
Sfil	10x G (green) / 10x Tango	Fermentas
Xba I	10x Tango	Fermentas
Xho I	10x R (red) / 10x Tango	Fermentas
T4-DNA-Ligase	10x T4-DNA-Ligase	Fermentas
Pfu-DNA-Polymerase	10x <i>Pfu</i> mit MgSO₄	Fermentas
High fidelity PCR Enzyme Mix	10X High Fidelity PCR mit MgCl ₂	Fermentas
PfuUltra [®] HF-DNA-Polymerase	10x PfuUltra [®] HF	Stratagene
Dpn I	-	Stratagene

Tabelle 1: Übersicht über verwendete Enzyme.

2.4 Bakterien- / Hefe-Stämme

 E. coli One Shot[®] Top 10F', chemisch kompetent 	Invitrogen
• <i>Ε. coli</i> DH5α	Dr. Derst
• <i>E. coli</i> BL21	Dr. Derst
E. coli XL1-Blue, superkompetent	Stratagene
• <i>E. coli</i> BNN132	Clontech
• S. cerevisiae AH109	Clontech
• S. cerevisiae Y187	Clontech
• S. cerevisiae NMY51	Dualsystems Biotech
• S. cerevisiae AP4	Prof. Dr. Stagljar

2.5 Kits

 Amplex[®] Red Monoamine Oxidase Assay 	Molecular Probes
 QuickChange[®] II Site-Directed Mutagenesis 	Stratagene
 High Yield PCR Clean-up / Gel Extraction 	SLG
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel
Qiaex II Gel Extraction	Qiagen
• Z-Competent E. coli Transformation Kit and Buffer Set	Zymo Research
Qiaprep Spin Miniprep	Qiagen
Quantum Prep Plasmid Miniprep	Bio-Rad
NucleoBond PC100 Midiprep	Macherey-Nagel
Quantum Prep Plasmid Midiprep	Bio-Rad
 Yeastmaker Yeast Transformation System II 	Clontech
 Frozen-EZ Yeast Transformation II 	Zymo Research
 Zymoprep II Yeast Plasmid Minipreparation 	Zymo Research
Yeast Protein	Zymo Research
Matchmaker Gal4 Two-Hybrid System 3	Clontech

2.6 Geräte und Apparaturen

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Biometra UNO II Thermocycler

Elektrophorese (DNA, Proteine) und Western Blot

Falls nicht abweichend angegeben, stammen alle Geräte von Bio-Rad (München).

Agarosegelelektrophorese

- Gel-Formgießer
- Gel-Wanne, UV-transparent
- Mini-Sub Cell GT/ Wide Mini-Sub Cell GT
- 10-/20-/30-Well-Kämme

SDS-PAGE und Western Blot

- Glasplatte, kurz
- Glasplatte mit Abstandhalter (0,75mm / 1,0mm)
- Guss-Rahmen
- Guss-Stand
- Mini Protean II Elektrophorese-Kammer
- Mini Protein Tetra Kammer
- Power/Pac 200/300 Spannungsgerät
- Probe-Ladehilfe
- TransBlot SD Semidry Elektrophorese Transferzelle
- 10-Well-Kämme (0,75mm / 1,0mm)
- Film-Entwicklungskammer Cawomat 2.000 IR, Cawo GMBH
- Filmkassette Hypercassette, Amersham Bioscience

Photometer

- Anthos Labtec HT-2 Mehrzweck-Mikrotiterplattenlesegerät
- Dynatech MR 500 Mikrotiterplattenlesegerät
- GeneQuant II (Pharmacia Biotech)

Mikroskope

• Leica DMIL Kontrastiermikroskop

Homogenisierung von Gewebe

- Heidolph-Rührer RZR 2021
- Wheaton Potter-Elvehjem Gewebe-Handhomogenisator mit PVC-Überzug

Zentrifugen

- Beckman J2-HS Kühlzentrifuge Rotoren: JA-14, JA-20
- Beckmann Optima Max Ultrazentrifuge

Rotoren: TLS 55, TLA 100.4, TLA 100.1

- Beckmann Optima L-90K Ultrazentrifuge Rotoren: Ti 70, SW 40
- Eppendorf Kühlzentrifuge 5417 R, 5417 C

Sonstige

- Computer MacBook Pro, Apple
- Desktop Computer, CeCon
- Digital-Camcorder, Panasonic
- Digital-Spiegelreflexkamera E 500, Olympus
- Drucker f
 ür die Agarose-Geldokumentation Mitsubishi P90 mit zugeh
 örigem Papier Mitsubishi K65HM-CE/KP65HM-CE
- ELISA-Reader HT2, Anthos Labtec instruments GMBH
- Fluoreszenz-Reader Synergy 2, BioTek
- Foto-Scanner CanoScan 8800F, Canon
- Gasprofi 2, Campingaz
- Heizblock Thermomixer Compact, Eppendorf
- Heizplatte, Gerhardt
- Liquid Szintillation Counter LS 6500, Beckman
- Pipet-Aid XP, Drummond
- Pipetten Discovery Comfort, High Tech Lab
- Pipetten LABMATE, High Tech Lab
- Pumpsystem, neoLab
- Rota Rod, Ugo Basile
- Rotator für Reaktionsgefäße: Dynal Sample Mixer, Invitrogen
- Schüttler mit Heizvorrichtung: Unimax 1010 mit Inkubator 1.000, Heidolph; Certomat S, B. Braun Biotech International
- Schüttler ohne Heizvorrichtung: Polymax 1040, Heidolph; MTS 2/4 digital, IKA
- Sterilarbeitsbänke HeraSafe 18 / 2 bzw. Heto-Holten Safe 2010, Heraeus
- Ultraschall-Homogenisator Sonoplus GM70 und UW70, Bandelin
- UV-Leuchte UVA-6-12, neoLab/M & S Laborgeräte GMBH
- Video Dokumentationssystem BioDoc Analyse
- Video Dokumentationssystem mit CCD Video Camera Module, LTF Labortechnik
- Zellkulturbrutschränke bzw. Inkubatoren: BB16CU / BBD 6220 bzw. T 6120, Heraeus

2.7 Software

- Analyse-Software GraphPad Prism 5, GraphPad Software
- Analyse-, Text-, Präsentationssoftware Office 2.000, 2008, Microsoft
- Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop 6.0, CS 4, Adobe
- DNA Sequenzanalyse Software Chromas Lite, Technelysium Pty Ltd
- ELISA-Reader Software, Anthos Labtec instruments GMBH
- Fluoreszenz-Reader Software Gen 5, BioTek
- Gel-Dokumentationssoftware BioCapt, Vilber Lourmat
- Gel-Dokumentationssoftware LabImage 1D 2006, Kapelan Bio-Imaging
- Graphikdesign-Software CorelDraw 10, Corel
- Literaturverzeichnis-Software EndNote 5, Thomson Reuters
- PDF-Erstellungssoftware PDFCreator, pdfforge.org
- Sequenzalignment Software ClustalX2, University College Dublin; Clustal W, EMBL
- Statistik-Software PASW Statistics 18, SPSS Inc.
- Videobearbeitungssoftware MotionDV Studio 5.6E LE for DV, SweetMovieLife 1.0E, Panasonic

2.8 Puffer und Lösungen

Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

Agarosegel mit TAE-Puffer

1-2% (w/v) Agarose1µg/ml Ethidiumbromidin ddH₂O

TAE (Tris-Azetat-EDTA)-Puffer

40 mM Tris 2 mM EDTA in ddH₂O, pH 8,5 (Essigsäure)

6x Probenpuffer

20% (w/v) Ficoll 400 1,0% (w/v) SDS 0,25% (w/v) Bromphenolblau 100mM EDTA in ddH₂O

Transformationspuffer für Hefezellen

PEG/LiAc-Lösung

Diese Lösung wurde vor jeder Transformation frisch aus folgenden sterilen Stammlösungen des verwendeten Kits angesetzt:

8ml 50% (w/v) Polyethylenglykol 3350

1ml 10x Tris-EDTA-Puffer

1ml 1M Lithiumazetat

1,1x TE/LiAc-Lösung

Diese Lösung wurde vor jeder Transformation frisch aus folgenden sterilen Stammlösungen des verwendeten Kits angesetzt:

- 1,1ml 10x Tris-EDTA-Puffer
- 1,1ml 1M Lithiumazetat
- 7,8ml steriles ddH₂O

Puffer für die DTT-Transformation von Hefezellen (pro Reaktion)

Diese Lösung wurde vor jeder Transformation frisch aus folgenden sterilen Stammlösungen angesetzt:

80µl	50% PEG-3350 (w/v)
20µl	Lithiumazetat (1M)
10µl	DTT (1M)
10µl	ssDNA (2mg/ml)
in ddH₂O	

Lösungen für die Proteinbestimmung

Lösung A

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

Lösung B

 $\begin{array}{ll} 4\% \ (w/v) & CuSO_4 \\ \mbox{in } ddH_2O \end{array}$

Lösungen für die SDS-PAGE

4x Laemmli-Probenpuffer

200mM	Tris
400mM	DTT
8,0% (w/v)	SDS
0,4% (w/v)	Bromphenolblau
40% (v/v)	Glyzerin
in ddH₂O	

Elektrophoresepuffer

25mM	Tris
200mM	Glyzin
3,5mM	SDS
in ddH₂O	

Tris I-Puffer (4x)

 $\begin{array}{ll} 500 \text{mM} & \text{Tris} \\ 0,4\% \ (\text{w/v}) & \text{SDS} \\ \text{in } dd\text{H}_2\text{O}, \ \text{pH} \ 6,8 \ (\text{HCI}) \end{array}$

Tris II-Puffer (4x)

 $\begin{array}{ll} 1,5M & Tris \\ 0,4\% \mbox{ (w/v)} & SDS \\ \mbox{in } ddH_2O, \mbox{ pH } 8,8 \mbox{ (HCI)} \end{array}$

Sammelgel

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

Trenngele

% Acrylamid/Bisacrylamid 5% 8% 10% 12% 15%
--

Tris II -Puffer			2,5ml		
Acrylamid/Bisacrylamid (40%;19:1)	1,25ml	2ml	2,5ml	3ml	3,75ml
ddH ₂ O	6,25ml	5,5ml	5ml	4,5ml	3,75ml
TEMED			5µl		
10% APS			50µl		
			oopi		

Tabelle 2: SDS-PAGE-Trenngele.

Lösungen für die Coomassie-Färbung

Fixierlösung

50% (v/v) N	lethanol
-------------	----------

- 10% (v/v) Essigsäure
- $40\%~(v/v) \qquad ddH_2O$

Entfärbelösung

45% (v/v)	Methanol
10% (v/v)	Essigsäure
45% (v/v)	ddH₂O

Lagerungslösung

5% (v/v) Essigsäure in ddH_2O

Lösungen für das Western Blot-Verfahren und Proteindetektion

Proteintransferpuffer

200mM	Glyzin
25mM	Tris
1,3mM	SDS
20% (v/v)	Methanol
in ddH ₂ O	

Ponceau S-Färbelösung

- 0,3% (w/v) Ponceau S
 - 3% (w/v) Trichloressigsäure
 - 3% (w/v) Sulfosalizylsäure
- in ddH_2O

TS-(Tris-Saline) Puffer

20mM Tris

150mM NaCl pH 7,5 (HCl)

TS-Tween-Puffer

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

Magermilchlösung

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

Antikörperlösung

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

Lösung für die subzelluläre Fraktionierung

Homogenisierungspuffer

320mM Saccharose 4mM HEPES in ddH₂O, pH 7,4 (KOH)

Lösungen für die Neurotransmitteraufnahme

KG (Kaliumglutamat)-Puffer (1x)

150mM	Kaliumglutamat
20mM	Pipes
4mM	EGTA
2,8mM	MgCl ₂ (durch Komplexbildung ca. 1mM freies Mg ²⁺)
in ddH₂O, p⊦	I 7,0 (KOH)

KG (Kaliumglutamat)-ATP-Puffer

KG-Puffer 2mM Na₂-ATP in ddH₂O

Natrium-Puffer

10mM Glukose

 5mM
 KCI

 140mM
 NaCI

 5mM
 NaHCO3

 1mM
 MgCl2

 1,2mM
 Na2HPO4

 20mM
 HEPES

 in ddH2O, pH 7,4 (NaOH)

Lösungen für die Proteinextraktion, GST-Pulldown, Immunpräzipitation

HMK Puffer

100mM	KCI
20mM	HEPES
2mM	MgCl ₂
in ddH ₂ O,	pH 7,4 (KOH)

HMK/TX Puffer

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

Extraktionspuffer

140mM	KCI
20mM	HEPES
2mM	EDTA
in ddH₂O, p	oH 7,4 (KOH)

Weitere Lösungen

Homogenisierungslösung für HPLC-Proben

100mMPerchlorsäure (HClO₄)0,4mMNa $_2$ SO $_3$ in ddH $_2$ O

PBS (Phosphate Buffered Saline)

140mM NaCl

 10mM
 KCI

 6,4mM
 Na₂HPO₄

 2mM
 KH₂PO₄

 in ddH₂O, pH 7,4

TE (Tris-EDTA)-Puffer

2.9 Medien

Mikrobielle Medien

Alle hier aufgeführten Medien wurden für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert.

Lysogeny Broth (LB)-Medium

10g/l	Trypton / Pepton
5g/l	Hefeextrakt
10g/l	NaCl
pH 7,4	

2x YT-Medium

10g/l	Yeast-Extrakt
16g/l	Trypton / Pepton
5g/l	NaCl
pH 7,4	

YPD-Medium

10g/l	Yeast-Extrakt
20g/l	Trypton / P epton
20g/l	Dextrose (Glukose)
pH 6,5	

YPDA-Medium

YPD-Medium 30mg/l L-**A**deninhemisulfatsalz

Minimalmedium

6,7g/l YNB (Yeast Nitrogen Base)
20g/l Dextrose (Glukose)
SD-Pulver (s. Tab. Medienzusätze)

pH 5,8

Einfriermedien

LB, YPDA- oder Minimalmedium 25% (v/v) Glyzerin

Medienzusätze

Zusatz	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
SD-Trp-Leu	Pulver	0,64 g/l
SD-Trp-Leu-His-Ade	Pulver	0,60 g/l
Agar-Agar	Pulver	20,00 g/l
L-Tryptophan	4,8 mg/ml	40,00 µg/ml
L-Leuzin	7,2 mg/ml	60,00 µg/ml
L-Histidinmonohydrochlorid	2,4 mg/ml	20,00 µg/ml
L-Adeninhemisulfatsalz	5,0 mg/ml	40,00 µg/ml
Ampicillin	100,0 mg/ml	100,00 µg/ml
Kanamycin	25,0 mg/ml	25,00 µg/ml
X-Gal	20,0 mg/ml	40,00 µg/ml
X-α-Gal	20,0 mg/ml	2,00 mg/ml
3-AT	1,0 M	1,00 mM

Tabelle 3: Medienzusätze.

2.10 Antikörper

Primäre Antikörper

für die Western Blot Analyse:

Antikörper	Katalog-Nr.	Vertrieb	Verdünnung
pcl Kaninchen anti-Akt1/2/3 IgG	sc-8312	Santa Cruz	1:1.000
pcl Kaninchen anti-p-Akt1/2/3 IgG	sc7985-R	Santa Cruz	1:1.000
pcl Kaninchen anti-Aktin IgG	A5060	Sigma-Aldrich	1:3.000
mcl Kaninchen anti-AMPK alpha IgG	2603	Cell Signaling	1:500
mcl Kaninchen anti-Phospho-AMPK alpha IgG	2535	Cell Signaling	ungeeignet
mcl Maus anti-D1 alpha Dopamin Rezeptor IgG	MAB5290	Chemicon	1:2.000
mcl Maus anti-D2 Dopamin Rezeptor IgG	sc-5303	Santa Cruz	1:2.000
pcl Kaninchen anti-DOPA Decarboxylase IgG	ab3905	Abcam	1:1.000
mcl Ratte anti-Dopamin Transporter IgG	MAB369	Chemicon	1:1.000
mcl Maus anti-Gal4 Aktivierungsdomäne IgG	630402	Clontech	1:3.000
mcl Maus anti-Gal4 DNA-Bindungsdomäne IgG	630403	Clontech	1:4.000
mcl Maus anti-G alpha o IgG	sc-13532	Santa Cruz	1:600
mcl Maus anti-G alpha o IgG (101.1)	*	Reinhard Jahn*	1:10.000
mcl Maus anti-G alpha o ₂ IgG(101.4)	*	Reinhard Jahn*	1:6.000
pcl Kaninchen anti-G alpha s IgG	sc-823	Santa Cruz	1:2.000
pcl Kaninchen anti-G beta common IgG (11/11)	*	Reinhard Jahn*	1:3.000
pcl Kaninchen anti-GST IgG	ab9085	Abcam	1:10.000

mcl Maus anti-LexA IgG	P06004	Dualsystems Biotech	1:5.000
pcl Kaninchen anti-PKAc alpha/beta/gamma IgG	ab82545	Abcam	1:1.500
pcl Kaninchen anti-Phospho-PKA C IgG	4781	Cell Signaling	1:1.500
mcl Maus anti-Synaptobrevin IgG	104211	Synaptic Systems	1:10.000
mcl Maus anti-Synaptophysin 1 IgG	101011	Synaptic Systems	1:10.000
pcl Kaninchen anti-Tyrosinhydroxylase IgG	AB152	Chemicon	1:1.000
pcl Kaninchen anti-VMAT2 IgG	138302	Synaptic Systems	1:1.500/2.000
Taballa 4: Brimära Antikärnar * fround	liabonvoigo du	roh ontonrochanda Daraan	horoit gostallt

Tabelle 4: Primäre Antikörper. freundlicherweise durch entsprechende Person bereit gestellt

Sekundäre Antikörper

für die Western Blot Analyse:

Antikörper	Vertrieb	Verdünnung
Pferd anti-Maus IgG (H+L), HR Per-	Vector Laboratories,	2x Primärantikörper,
oxidase-gekoppelt	Burlingame, CA, USA	maximal 1:10.000
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L), HR	Vector Laboratories,	2x Primärantikörper,
Peroxidase-gekoppelt	Burlingame, CA, USA	maximal 1:10.000
Tabelle 5: Sekundäre Antikörner		

Tabelle 5: Sekundäre Antikörper.

2.11 Nukleinsäuren

Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von TIB-MOLBIOL (Berlin) synthetisiert und sind in 5'-3'-Orientierung angegeben.

Primerpaar für die ortsspezifische Mutagenese des NUBG in pPR3-N/-C:

A_F:	cgtcaagactttgaccggtaaaaccGCAacattggaagttgaatcttccg			
A_R:	cggaagattcaacttccaatgtTGCggttttaccggtcaaagtcttgacg			
Primerpaar für die Klon	ierung des $G_{o2}\alpha$ in den Vektor pGADT7:			
Gao2.fl.fw:	CAC <mark>GAATTC</mark> ATGGGATGTACGCTGAGCGCAGAGGAGAGA			
Gao2.fl.rv:	CAC <mark>GAGCTC</mark> TCAGTAGAGTCCACAGCCCCGTAGG			
Primerpaar für die Punktmutation von $G_{o2}\alpha$ zu $G_{o2}\alpha$ S47N in pGADT7:				
Gao2.S47N.fw:	GGGGCTGGAGAATCAGGAAAA <mark>AAC</mark> ACCATTGTGAAGCAGATGAAG			
Gao2.S47N.rv:	CTTCATCTGCTTCACAATGGT <mark>GTT</mark> TTTTCCTGATTCTCCAGCCCC			
Primerpaar für die Sequenzierung des $G_{o2}\alpha$ -Mittelteils in pGADT7:				

Gao2.seq.fw: CCTGGACAGCCTGGATCGGATTGGAGCCGG

	Wat
Gao2.seq.rv:	CGCTGAGTGCGACACAGAAGATGATGGCCG
Primerpaar für die Kl	onierung des ms $G_{o2} \alpha$ in den Vektor pPR3-N:
Go2a.fl.fw.01:	CAC <u>GGCCATTACGGCC<mark>ATG</mark>GGATG</u> TACGCTGAGCGCAGAGG
Go2a.fl.rv.01:	CAC <u>GGCCGAGGCGGCC<mark>TCA</mark>GTAGAGTCCACAGCCCCGTAGG</u>
Primerpaar für die Kl	onierung des ms $G_{o2} lpha$ in den Vektor pPR3-C / -STE:
Go2a.fl.fw.02:	CACGGCCATTACGGCCTTGGATGTACGCTGAGCGCAGAGG
Go2a.fl.rv.02:	CAC <u>GGCCGAGGCGGCC<mark>CC</mark>GTAGAGTCCACAGCCCCGTAGG</u>
Primerpaar für die Kl	onierung des VMAT2-C-Terminus in den Vektor pGBKT7:
VMAT2C-Term.fw:	CACGAATTCTTGCTCCACTCTGCTTTTTTCTTCGAAGTCCACC
VMAT2C-Term.rv:	CACCTGCAGGTCACTCTCAGATTCTTCATCATCACCGACGGGGG
Primerpaar für die Kl	onierung des msVMAT2 in den Vektor pBT3-N:
VMAT2.fl.fw.01:	CAC <u>GGCCATTACGGCC<mark>ATG</mark>GCCCTGAGCGATCTGGTGCTGC</u>
VMAT2.fl.rv.01:	CAC <u>GGCCGAGGCGGCC<mark>TCA</mark>GTCACTCTCAGATTCTTCATCATCACCG</u>
Primerpaar für die Kl	onierung der N-terminalen Hälfte des msVMAT2 in den Vektor pBT3-N:
VMAT2.fl.fw.01: s.	0.
VMAT2.N.rv.01:	CAC <u>GGCCGAGGCGGCC<mark>TCA</mark>GTCCTTCAGCAAGGTCGTAAGAGG</u>
Primerpaar für die Kl	onierung der C-terminalen Hälfte des msVMAT2 in den Vektor pBT3-N:
VMAT2.C.fw.01:	CAC <u>GGCCATTACGGCC</u> CCATCCCGAGTGCAGCCAGAAAGTC
VMAT2.fl.rv.01: s.	ο.
Primerpaar für die Kl	onierung des msVMAT2 in den Vektor pBT3-STE:
VMAT2.fl.fw.02:	CAC <u>GGCCATTACGGCC</u> GCCCTGAGCGATCTGGTGCTGC
VMAT2.fl.rv.02:	CAC <u>GGCCGAGGCGGCC</u> CGTCACTCTCAGATTCTTCATCATCACCG
Primerpaar für die Kl	onierung der N-terminalen Hälfte des msVMAT2 in den Vektor pBT3-STE:
VMAT2.fl.fw.02: s.	ο.
VMAT2.N.rv.02:	CAC <u>GGCCGAGGCGGCC<mark>CC</mark>GTCCTTCAGCAAGGTCGTAAGAGG</u>
Primerpaar für die Kl	onierung der C-terminalen Hälfte des msVMAT2 in den Vektor pBT3-STE:

Primerpaar für die Klonierung der C-terminalen Hälfte des msVMAT2 in den Vektor pBT3-STE: VMAT2.C.fw.01: s. o. VMAT2.fl.rv.02: s. o.

Primerpaar für die Klonierung des VMAT2-C-Terminus in den Vektor pGEX-4T-1:

VMAT2C-Term.fw: s.	ο.
VMA12C1XhoRv:	CAC <u>CTCGAG</u> GTCACTCTCAGATTCTTCATCATCACCGACGGGG
Primerpaar für die Am	olifikation von pACT2-Bibliotheksfragmenten:
pACT25091f:	CTATTCGATGATGAAGATACCCCACCAAACC
pACT24978r:	AGTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACG
Primerpaar für die Klor	nierung des VMAT2-N-Terminus in den Vektor pGBKT7:
VMAT2N-Term.fw:	
AATTC <mark>ATG</mark> GCCCTGAGC	'GATCTGGTGCTGCTGCGATGGCTGCGGGACAGCCGCCACTCGCGCAAG <mark>CTGCA</mark>
VMAT2N-Term.rv:	
GCTTGCGCGAGTGGCGC	CTGTCCCGCAGCCATCGCAGCAGCACCAGATCGCTCAGGGCCATG
Primerpaar für die Klor	nierung der 3. zytopl. Schleife des VMAT2 in den Vektor pGBKT7:
VMAT2loop3fw:	
AATTCCCATCCCGAGT	CAGCCAGAAAGTCAGAAGGGGGACACCTCTTACGACCTTGCTGAAGGACCTGCA
VMAT2loop3rv:	
GGTCCTTCAGCAAGGTC	GTAAGAGGTGTCCCCTTCTGACTTTCTGGCTGCACTCGGGATGGG
Primerpaar für die Klor	nierung des VMAT2-N-Terminus in den Vektor pGEX-4T-1:
VMAT2NTEcoXhoF:	
AATTC <mark>ATG</mark> GCCCTGAGC	CGATCTGGTGCTGCGGATGGCTGCGGGGACAGCCGCCACTCGCGCAAGC
VMAT2NTEcoXhoR:	
TCGAGCTTGCGCGAGT	;GCGGCTGTCCCGCAGCCATCGCAGCAGCACCAGATCGCTCAGGGCCATG

Primerpaar für die Klonierung der 3. zytopl. Schleife des VMAT2 in den Vektor pGEX-4T-1: VMAT2L3EcoXhoF: AATTCCCATCCCGAGTGCAGCCAGAAAGTCAGAAGGGGGACACCTCTTACGACCTTGCTGAAGGACC VMAT2L3EcoXhoR: TCGAGGTCCTTCAGCAAGGTCGTAAGAGGTGTCCCCTTCTGACTTTCTGGCTGCACTCGGGATGGG

Vektoren

Vektor	Bakterien-	Hefe-	Peptid-Fusion	Methode
	Selektion	Selektion		
pcDNA3	Amp ^R	-	-	DNA-Klonierung
pACT2	Amp ^R	LEU2	GAL4-AD	Gal4-Y2H
pGADT7	Amp ^R	LEU2	GAL4-AD	Gal4-Y2H
pGADT7-T	Amp ^R	LEU2	GAL4-AD-T antigen	Gal4-Y2H
pGBKT7	Kan ^R	TRP1	GAL4-DNA-BD	Gal4-Y2H

pGBKT7-lam	Kan ^R	TRP1	GAL4-DNA-BD-Lamin C	Gal4-Y2H
pGBKT7-p53	Kan ^R	TRP1	GAL4-DNA-BD-p53	Gal4-Y2H
pOst1-Nubl	Amp ^R	TRP1	Ost1-Nubl	Ubiquitin-Y2H
pOst1-NubG	Amp ^R	TRP1	Ost1-NubG	Ubiquitin-Y2H
pAMBV	Kan ^R	LEU2	Cub-LexA-VP16	Ubiquitin-Y2H
pBT3-N	Kan ^R	LEU2	Cub-LexA-VP16	Ubiquitin-Y2H
pBT3-STE	Kan ^R	LEU2	Cub-LexA-VP16	Ubiquitin-Y2H
pPR3-N	Amp ^R	TRP1	NubG	Ubiquitin-Y2H
pPR3-C	Amp ^R	TRP1	NubG	Ubiquitin-Y2H
pPR3-STE	Amp ^R	TRP1	NubG	Ubiquitin-Y2H
pGEX-4T-1	Amp ^R	-	GST	GST-Pulldown

Tabelle 6: Übersicht zu den verwendeten Vektoren.

pcDNA3 (Invitrogen): Dieses Plasmid ermöglicht die Expression einer gewünschten cDNA in Säugerzellen. Es beinhaltet den CMV-Promotor. Für die Selektion in Säugerzellen dient das Neomycin-Resistenzgen, für die Selektion in *E.coli* enthält der Vektor außerdem das β-Laktamase-Gen.

pACT2 (Clontech): Dieser *Yeast 2-Hybrid*- (Y2H)-Vektor kodiert für Fusionsproteine bestehend aus der GAL4-Aktivierungsdomäne und den in die *Multiple Cloning Site* (MCS) inserierten Fragmenten. Im Y2H-*Assay* diente dieses Plasmid zur Generierung von Beuteproteinen. Für die Selektion in *E.coli* trägt der Vektor das β -Laktamase-Gen, für die Selektion in *S. cerevisiae* zusätzlich das LEU2-Gen.

pGADT7 (Clontech): Dieses Y2H-Plasmid kodiert ebenfalls für Fusionsproteine mit der GAL4-Aktivierungsdomäne und wurde daher im Y2H-*Assay* auch zur Generierung von Beuteproteinen verwendet. Der Vektor enthält das β -Laktamase-Gen für die Selektion in *E.coli* und das LEU2-Gen für die Selektion in *S. cerevisiae*.

pGADT7-T (Clontech): Dieser Y2H-Vektor kodiert für das Fusionsprotein bestehend aus GAL4-Aktivierungsdomäne und dem großen SV40 T-Antigen. Das SV40 T-Antigen interagiert mit murinem p53 (Iwabuchi et al., 1993, Li und Fields, 1993). Gemeinsam mit pGBKT7-p53 diente dieser Vektor als Positivkontrolle im Gal4-basierten Y2H-*Assay*.

pGBKT7 (Clontech): Dieser Y2H-Vektor ermöglicht die Expression von Fusionsproteinen mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne und wurde zur Generierung von Köderproteinen im Y2H-*Assay* verwendet. Der Vektor enthält das Kanamycin-Resistenzgen für die Selektion in *E.coli* und das TRP1-Gen für die Selektion in *S. cerevisiae*.

pGBKT7-lam (Clontech): Dieses Y2H-Plasmid kodiert für das Fusionsprotein bestehend aus der GAL4-DNA-Bindungsdomäne und humanem Lamin C. Lamin C interagiert kaum mit anderen Proteinen (Bartel et al., 1993, Ye und Worman, 1995). Dieses Plasmid diente daher als Negativkontrolle für den Gal4-basierten Y2H-*Assay*.

pGBKT7-p53 (Clontech): Dieser Y2H-Vektor kodiert das Fusionsprotein bestehend aus der GAL4-DNA-Bindungsdomäne und murinem p53. Murines p53 interagiert mit dem großen SV40 T-Antigen (Iwabuchi et al., 1993, Li und Fields, 1993). In Kombination mit pGADT7-T diente dieses Plasmid als Positivkontrolle im Gal4-basierten Y2H-*Assay*.

pOst1-Nubl (Dualsystems Biotech): Dieses Y2H-Plasmid kodiert für das Fusionsprotein bestehend aus Ost1 und N_{UB}I, dem N-terminalen Abschnitt von Ubiquitin. Ost1 ist ein Hefeprotein, das in die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) der Hefezellen integriert wird (Snider et al., 2010). Es ist unwahrscheinlich, dass Proteine von Interesse im Membran-Y2H- (MYTH)-*Assay* mit Ost1 interagieren. N_{UB}I kann mit C_{UB}, dem Cterminalen Anteil des Ubiquitins, spontan reassoziieren, funktionelles Pseudo-Ubiquitin bilden und damit das Reportergensystem im MYTH-*Assay* aktivieren. Dieses Plasmid diente daher als Positivkontrolle. Es enthält den Promotor ADH1. Weiterhin enthält der Vektor das β -Laktamase-Gen für die Selektion in *E.coli* und das TRP1-Gen für die Selektion in *S. cerevisiae*.

pOst1-NubG (Dualsystems Biotech): Das Grundgerüst entspricht dem pOst1-Nubl-Plasmid (s. o.). Der Unterschied ist, dass $N_{UB}I$ zu $N_{UB}G$ mutiert ist. $N_{UB}G$ kann nicht spontan mit C_{UB} reassoziieren und damit nicht das Y2H-Reportergensystem aktivieren. Daher diente dieses Plasmid als Negativkontrolle im MYTH-*Assay* (Snider et al., 2010).

pAMBV (Dualsystems Biotech): Dieses Plasmid diente zur Generierung von Köderproteinen im MYTH-*Assay*. Das Protein von Interesse wurde C-terminal mit C_{UB} und dem Transkriptionsfaktor LexA-VP16 fusioniert. Der Vektor enthält das Kanamycin-Resistenzgen für die Selektion in *E.coli* und das LEU2-Gen für die Selektion in *S. Cerevisiae*. Dieses Plasmid enthält weiterhin den ADH1-Promotor.

pBT3-N (Dualsystems Biotech): Dieses Plasmid diente ebenfalls zur Generierung von Köderproteinen im MYTH-*Assay*. Dabei wurde das Protein von Interesse N-terminal mit C_{UB}-LexA-VP16 fusioniert. Der Vektor enthält weiterhin das Kanamycin-Resistenzgen für die Selektion in *E.coli* und das LEU2-Gen für die Selektion in *S. Cerevisiae*. Das Plasmid enthält den CYC1-Promotor.

pBT3-STE (Dualsystems Biotech): Das Grundgerüst entspricht dem pBT3-N-Plasmid. Der Unterschied besteht darin, dass das Protein von Interesse C-terminal mit C_{UB}-LexA-VP16 fusioniert wurde. Zusätzlich enthält das Plasmid die STE2 *leader* Sequenz, welche für ein Signal kodiert, das bei der Expression des Fusionsproteins N-terminal lokalisiert ist und sicherstellt, dass das Fusionsprotein in die Hefemembran integriert wird (Iyer et al., 2005).

pPR3-N (Dualsystems Biotech): Dieses Plasmid diente im MYTH-*Assay* dazu Beuteproteine zu generieren. N_{UB}G wurde dabei N-terminal an das Protein von Interesse fusioniert. Der Vektor enthält das β -Laktamase-Gen für die Selektion in *E.coli* und das TRP1-Gen für die Selektion in *S. Cerevisiae*. Das Plasmid enthält weiterhin den CYC1-Promotor.

pPR3-C (Dualsystems Biotech): Das Grundgerüst entspricht dem pPR3-N-Plasmid. Hier wurde im Unterschied dazu $N_{UB}G$ C-terminal an das Protein von Interesse fusioniert.

pPR3-STE (Dualsystems Biotech): Das Grundgerüst entspricht dem pPR3-C-Plasmid. Das Plasmid enthält zusätzlich die STE2 *leader* Sequenz (s. o.).

pGEX-4T-1 (GE Healthcare): Dieser Vektor diente zur Generierung von Glutathion-S-Transferase- (GST-) Fusionsproteinen im GST-*Pulldown-Assay*. Dabei wurde die GST Nterminal an das Protein von Interesse fusioniert. Der Vektor enthält das β -Laktamase-Gen für die Selektion in *E.coli*. Das Plasmid enthält weiterhin den tac-Promotor, welcher unter der Kontrolle des lac-Operators steht und daher die Transkription Isopropyl- β -Dthiogalactopyranosid- (IPTG)-induzierbar macht.

cDNA

cDNA-Bibliothek

Für den Y2H-*Assay* wurde eine *Mouse Brain MATCHMAKER* cDNA-Bibliothek (Clontech, Lot#: 4030478) verwendet, die im *E.coli* Stamm BNN132 vorlag. Als mRNA-Quelle dieser Bibliothek dienten Gehirne 200 männlicher BALB/c Mäuse im Alter von 9-12 Wochen. Die cDNA wurde über die *Xho* I und *Eco*R I Restriktionsschnittstelle des Vektors pACT2 inseriert. Die Anzahl unabhängiger Klone betrug 3,5x10⁶. Die klonierte cDNA lag in einem Größenbereich von 400-4.000 bp vor.

cDNA von α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine

Die cDNA für die G-Protein α -Untereinheiten G₀₁ α und G₀₂ α wurden mittels PCR aus der *Mouse Brain MATCHMAKER* cDNA Bibliothek (Clontech, Lot#: 4030478) amplifiziert und in verschiedene Zielvektoren kloniert.

3 Methoden

3.1 DNA-Techniken

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Über die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden DNA-Sequenzen mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide (Primer) amplifiziert. Die PCR wurde einerseits für analytische Zwecke eingesetzt, andererseits als Vorbereitung für darauf folgende Klonierungsschritte. Neben der *Pfu*-DNA-Polymerase, welche sich durch ihre *proofreading*-Aktivität (3'-5'-Exonukleaseaktivität) auszeichnet, wurde der *High Fidelity PCR Enzyme Mix* verwendet. Dieser Enzym-Mix enthielt neben der *Taq*-DNA-Polymerase eine weitere DNA-Polymerase, die ebenfalls *proofreading*-Aktivität besitzt. Sowohl die DNA-Polymerasen und die dazugehörigen Puffer als auch der Nukleotid- (dNTP)-Mix stammten von der Firma Fermentas.

In einem initialen Denaturierungsschritt der PCR-Reaktion wurde die doppelsträngige DNA-Matrize für 3min bei 95°C denaturiert. Anschließend folgten 30 Zyklen aus Denaturierung (95°C), Anlagerung (58-65°C) und Verlängerung (72°C, Temperaturoptimum der DNA-Polymerasen) des gewünschten DNA-Abschnitts. Zuletzt wurde ein abschließender Elongationsschritt durchgeführt um zu gewährleisten, dass alle Amplifikate vollständig synthetisiert wurden. Danach wurden die PCR-Produkte bei 4°C gekühlt und schließlich zur Lagerung bei -20°C eingefroren. Der vorangegangene Temperaturzyklus stellt einen Standardablauf dar, der entsprechend der Schmelztemperatur des Primerpaares in der Hybridisierungstemperatur modifiziert wurde.

Die über die PCR erhaltenen DNA-Fragmente wurden über die Agarosegelelektrophorese analysiert (3.1.5) bzw. zusätzlich über die Gelelution (3.1.6) für darauf folgende Klonierungsschritte aufgearbeitet.

Es wurde folgender Ansatz zusammengegeben:

Ansatz:	50µl gesamt
H ₂ O (steril)	39,5µl
10x-PCR-Puffer + MgSO₄	5,0µl
10mM-dNTP-Mix	2,0µl (0,4mM)
20µM-fw-Primer	1,0µI (0,4µM)
20µM-rv-Primer	1,0µI (0,4µM)
DNA-Matrize	1,0µl (1µg)
DNA-Polymerase	0,5µl (1,25-2,5 U)

Der Ansatz wurde mit folgendem Programm im ThermoCycler inkubiert.

Temperaturzyklus:

<u>T in °C</u>	Dauer	Zyklen	
95	3min		
95	30s	$\langle \rangle$	
58-65	30s	`)	30x
72	1-2min/kbp		
72	10min		
4	bis zum Einfrieren		

3.1.2 DNA-Hybridisierung

Für besonders kurze DNA-Fragmente, die sich schlecht über die Agarosegelelektrophorese und anschließender Gelelution aufreinigen ließen, wurde alternativ zur PCR eine DNA-Hybridisierung durchgeführt. Hierbei wurde das für Klonierungsschritte zu verwendende DNA-Fragment als Oligonukleotid in Vorwärts- (fw / 5' > 3') bzw. die dazu komplementäre Sequenz in Rückwärtsorientierung (rv / 3' > 5') durch die Firma TIB-MOLBIOL synthetisiert. Der Ansatz wurde im Heizblock für 5min bei 95°C erhitzt um die mögliche Doppelstrangstruktur der komplementären Oligonukleotide zu denaturieren. Es folgte eine Inkubation bei 65°C, um den Ansatz langsam herunterkühlen zu lassen und eine komplementäre Anlagerung der beiden Oligonukleotide zu gewährleisten (Hybridisierung).

Bei der Synthese der Oligonukleotide wurde jeweils an der 5'-Endigung ein Überhang entsprechend der Sequenzen von in Klonierungsschritten zu verwendenden Restriktionsendonukleasen (3.1.4) zugefügt (*sticky ends*). Anschließend folgte die Ligation (3.1.7) mit einem geeigneten Zielvektor.

Es wurde folgender Ansatz zusammengegeben:

Ansatz:	40µl gesamt	
H ₂ O (steril)	38µl	
20µM-fw-Oligonukleotid	1,0µI (0,5µM)	
20µM-rv-Oligonukleotid	1,0µl (0,5µM)	

3.1.3 Ortsspezifische Mutagenese

Für die ortsspezifische Mutagenese wurde das *QuikChange*[®] *II Site-Directed Mutagenesis* Kit von Stratagene verwendet. Hierbei wurde eine Punktmutation in die G₀₂ α -wildtyp cDNA eingefügt, um die dominant negative Variante der G-Protein α -Untereinheit G₀₂ α S47N zu generieren (Slepak et al., 1993a; Übersicht von Barren und Artemyev,

2007). Bei dieser Methode handelte es sich um eine Variation der PCR (3.1.1). Die im Ansatz verwendeten Primer Gao2.S47N.fw und Gao2.S47N.rv enthielten die gewünschte Punktmutation in ihrer Sequenz und wurden zu jeweils 150ng eingesetzt. Es erfolgte eine Amplifikation entlang der DNA-Matrize, welche in Form eines zirkulären DNA-Plasmids vorlag. Dabei wurde das gesamte Plasmid amplifiziert. Das Plasmid bestand in diesem Falle aus dem Vektor pGADT7, welcher die Sequenz der Wildtyp-G-Protein- α -Untereinheit G_{o2} α enthielt, die mittels PCR aus einer Mäuse cDNA-Bibliothek amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen der Enzyme *Eco* RI und *Sac* I in den Vektor kloniert wurde.

Über das gleiche Verfahren wurde im *Membrane-Yeast Two-Hybrid-* (MYTH)-System (3.3.3) die N-terminale Ubiquitin Sequenz $N_{UB}G$ des Vektors pPR3-N und -C zu $N_{UB}A$ mutiert. Hier wurde über eine Punktmutation, lokalisiert in den verwendeten Primern A_F und A_R, die Aminosäure Glycin an Position 13 des N-terminalen Ubiquitin zu Alanin mutiert.

Im Anschluss wurde auf mind. 37°C heruntergekühlt und es folgte die Zugabe von 1µl *Dpn* I. Die Inkubation erfolgte für mind. 1h im Heizblock bei 37°C. *Dpn* I ist eine Restriktionsendonuklease (2.3), welche die methylierte oder hemimethylierte DNA-Erkennungssequenz 5'-GA^{m6}TC-3' spezifisch schneidet. Da die parentale DNA-Matrize, welche keine Punktmutation trug, über eine DNA-Präparation aus *E. coli* aufgearbeitet wurde (3.1.9), ist diese *Dam*-methyliert und kann über *Dpn* I selektiv abgebaut werden. Das neu synthetisierte, punktmutierte, doppelsträngige DNA-Plasmid war hiervon nicht betroffen und konnte in Folgeschritten über die Restriktion mit Endonukleasen (3.1.4) im Agarosegel (3.1.5) analysiert werden. Darauf folgte die Transformation von XL1-Blue superkompetenten *E. coli* Bakterien (3.1.8) unter Verwendung des punktmutierten Plasmids.

Folgender Ansatz wurde für die ortsspezifische Mutagenese zusammengegeben:

Ansatz:	50µl gesamt
H ₂ O (steril)	40,5µl
10x Puffer	5,0µl
dNTP-Mix	1,0µI
20µM-fw-Primer (0,3µg/µl)	0,5µl (0,2µM/150ng)
20µM-rv-Primer (0,3µg/µl)	0,5µl (0,2µM/150ng)
DNA-Matrize	0,5µl (1µg)
PfuUltra [®] HF DNA-Polymerase	2,0µI (5U)

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	30sec
2	20	95°C	30sec
		65°C	1min
		68°C	2min/kb Plasmidlänge
			G _{o2} α-pGADT7: 20min

Der Ansatz wurde mit folgendem Programm im ThermoCycler inkubiert.

Tabelle 7: Ortsspezifische Mutagenese.

3.1.4 Restriktion von DNA mit Endonukleasen

Die DNA-Restriktion mit Endonukleasen wurde zur Analyse von DNA-Konstrukten und zur Vorbereitung von Klonierungsschritten verwendet. Demnach wurde zwischen analytischer und quantitativer Restriktion unterschieden.

In der analytischen Restriktion wurden in einem 10µl Ansatz ca. 1µg DNA (1-5µl) mit 5-10U der entsprechenden Endonukleasen zusammengegeben. Zusätzlich enthielt der Ansatz 1µl des den Enzymen entsprechenden 10-fach Puffers. Der Ansatz wurde mit destilliertem Wasser auf 10µl aufgefüllt. Es folgte die Inkubation für mindestens 1h bei der für die eingesetzten Enzyme optimalen Temperatur.

Für den quantitativen DNA-Restriktionsansatz wurde mindestens ein Volumen von 50µl verwendet, um eine maximale Menge der DNA-Lösung (z. B. PCR-Ansatz) einsetzen zu können. Dabei blieb die Konzentration der Endonukleasen unverändert, während die Pufferkonzentration angepasst wurde. Die Inkubation erfolgte hier für mindestens 2-4h.



Abb. 12: DNA-Restriktionsansatz.

Als Beispiel ist die Analyse der Restriktion von indizierten Plasmid-DNA-Konstrukten einer DNA-Midipräparation (3.1.9) über die Endonuklease Sfi I von Fermentas dargestellt. Die Analyse erfolgte über das Verfahren der Agarosegelelektrophorese (3.1.5). Es handelt sich um Plasmid-Konstrukte, die für das *Split-Ubiquitin Yeast 2-Hybrid*-System (3.3.3) verwendet wurden. Bei den aus dem jeweiligen Vektor herausgeschnittenen *Inserts* handelt es sich um VMAT2-NT (882bp), VMAT2-CT (732bp) und um G_{o2}α (1065bp). VMAT2-NT und -CT sind schematisch in **Abb. 17** dargestellt. Für die Orientierung wurde ebenfalls der DNA-Marker (M) *MassRulerTM DNA-Ladder* von Fermentas auf das Agarosegel aufgetragen, der DNA-Fragmente einer Größe von 100-10.000bp enthält.

Puffer und Endonukleasen wurden von der Firma Fermentas verwendet und die Inkubation fand bei Temperaturen nach Herstellerangaben statt.

Anschließend wurde der Restriktionsansatz mit 6x-DNA-Probenpuffer gemischt und es folgte die Analyse durch die Agarosegelelektrophorese (3.1.5; **Abb. 12**).

3.1.5 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese diente zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe über ein elektrisches Feld. Entsprechend der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 1-2%ige Agarosegele verwendet. Dafür wurde die entsprechende Agarosemenge (w/v) je nach Größe des Gels in 50-200ml TAE-Puffer gelöst. Die Agaroselösung wurde anschließend mit 1µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in den vorbereiteten Rahmen (Biorad) gegossen. Die Elektrophorese fand bei 100V in 1x TAE-Puffer statt. Als Größenstandard wurden 10µl des *MassRulerTM DNA Ladder*-Markers von Fermentas verwendet. Darauf folgte die Dokumentation des DNA-Gels unter UV-Licht (254nm). Alternativ dazu wurde die DNA aus quantitativen Restriktionsansätzen aus dem Gel eluiert.

3.1.6 Gelelution

Aufzureinigende DNA-Fragmente aus quantitativen Restriktions- oder unbehandelten PCR-Ansätzen wurden nach Auftrennung im Agarosegel mit Hilfe eines Skalpells scharf ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte über das *High Yield PCR Clean-up / Gel Extraction* Kit von SLG nach Herstellerangaben. Alternativ wurde das *NucleoSpin Extract II* Kit der Firma Macherey-Nagel und das *QIAEX II Gel Extraction* Kit der Firma Qiagen verwendet. Die DNA wurde in destilliertem Wasser eluiert.

Als Vorbereitung für die Ligation folgte ein analytisches Agarosegel zur Quantifizierung der Menge geschnittener aufgereinigter DNA-Fragmente (Insert und Vektor).

3.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von geschnittenen DNA-Fragmenten (Insert und Vektor) fand mit Hilfe der T4-DNA-Ligase statt. Hierfür wurden der Vektor (ca. 10-100ng) und das Insert im molaren Verhältnis von ca. 1:3 zusammengegeben. Der Ligationsansatz von 10µl enthielt 1µl 10-fach Ligasepuffer und 1µl T4-Ligase (1U/µl). Ligasepuffer und T4-Ligase stammten von Fermentas. Da der Ligasepuffer ATP enthielt, wurde der Ligationsansatz eisgekühlt hergestellt. Die Inkubation erfolgte bei RT für 1-2h oder bei 14°C ÜN.

Es folgte die Transformation kompetenter E. coli Bakterien mit dem Ligationsansatz (5µl).

3.1.8 Herstellung und Transformation kompetenter E. coli Bakterien

Um *E.coli* Zellen für die Aufnahme von Plasmid-DNA kompetent zu machen, wurde das *Z*-*Competent E. coli Transformation Kit* & *Buffer Set* der Firma Zymo Research eingesetzt. Hierfür wurden Bakterienzellen des Stammes DH5 α verwendet. 50µl der Glyzerin-Zellstammlösung wurden zunächst für eine ÜN-Kultur in LB-Medium eingesetzt und bei 240rpm und 30°C inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten nach Herstellerangaben. Alternativ wurden kompetente *E. coli* Bakterien des Stammes Top10F' (Invitrogen) und XL1-Blue (Stratagene) sowie BL21 zur Proteinüberexpression verwendet. BL21 *E. coli* Bakterien wurden freundlicherweise von Dr. Christian Derst, aus der Abteilung Elektronenmikroskopie und molekulare Neuroanatomie, Charité Berlin, zur Verfügung gestellt. Aliquots der Bakterienzellen wurden bei -80°C aufbewahrt.

Für die Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien wurden diese auf Eis aufgetaut. Dabei wurden 50µl Aliquots entsprechend der zu transformierenden DNA-Konstrukt-Anzahl verwendet. Es wurden 100-1.000ng (max. 5µl) Plasmid-DNA zugegeben und für 20-30min auf Eis inkubiert. Daraufhin folgte der Hitzeschock bei 42°C und ein sofortiges Abkühlen der Bakterien auf Eis für jeweils 2min. Zu den transformierten Bakterien wurden anschließend 400µl antibiotikumfreies LB-Medium gegeben und es folgte eine Inkubation für 30-60min bei 37°C, um die Expression des auf dem Plasmid lokalisierten Antibiotikumresistenzgens zu gewährleisten. Daraufhin wurden die Bakterienzellen für 5min bei 4.000rpm in einer Tischzentrifuge sedimentiert, das Zellsediment in einem 100µl-Überstandsrest resuspendiert und auf einer Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Die Bakterien wurden ÜN im Brutschrank bei 37°C kultiviert.

3.1.9 Isolation von Plasmid-DNA aus E.coli

Je DNA-Plasmid wurden 3-10 transformierte *E.coli* Kolonien in jeweils 5ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ÜN bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien in einer Tischzentrifuge bei 6.000 x g sedimentiert und die Plasmid-DNA mit Hilfe des *Qiaprep Spin Miniprep* Kits der Firma Qiagen gemäß Herstellerangaben präpariert. Alternativ wurde das *Quantum Prep Plasmid Miniprep* Kit der Firma Biorad verwendet.

Um Plasmidmengen im größeren Maßstab zu gewinnen, wurden 50-100ml Bakterien-Flüssigkulturen mit Selektionsmedium angesetzt und bei 37°C / 220rpm in sterilen Erlenmeyerkolben ÜN inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde nach Zentrifugation bei 6.000 x g mit Hilfe des *NucleoBond PC100 Midiprep* Kits der Firma Macherey-Nagel gemäß Herstellerangaben aufgearbeitet. Alternativ wurde das *Quantum Prep Plasmid Midiprep* Kit der Firma Bio-Rad verwendet.

3.1.10 Amplifikation einer cDNA-Bibliothek

Um ausreichend Plasmid-DNA für ein Y2H-*Screening* (3.3.1) zu erhalten, musste die *Mouse Brain Matchmaker* cDNA Bibliothek (Clontech), die als Flüssigkultur im *E. coli* Stamm BNN132 vorlag, vervielfältigt werden. Zuerst wurde der Titer der cDNA-Bibliothek bestimmt, um bei der folgenden Amplifikation die nötige Anzahl unabhängiger Klone zu gewährleisten. Dafür wurden 10µl eines Aliquots der cDNA-Bibliothek in 1ml LB Medium resuspendiert und verschiedene Verdünnungen vorbereitet. Von diesen Verdünnungen

wurden 50 bzw. 100µl auf LB-Agarplatten (+ 100µg/ml Amp) verteilt und für 48h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren der Titer bestimmt. Daraufhin wurden 265 150-mm-Agarplatten mit je ca. 40.000cfu (*colony forming unit*) beimpft, um so die Anzahl der unabhängigen Klone der cDNA-Bibliothek (3,5 x 10⁶) mit einem zusätzlichen Sicherheitsfaktor von drei beizubehalten. Feste Nährmedien gewährleisten dabei ein gleichmäßiges Wachstum unterschiedlicher Klone besser als Flüssigkulturen. Die Platten wurden anschließend für 48h bei 30°C inkubiert. Danach wurden je Platte 5ml LB-Medium zugegeben und die Kolonien mit einem Drigalski-Spatel abgelöst und in einer sterilen 1I-Flasche vermischt. Anschließend wurde die Zellsuspension für 4h bei 30°C und 200rpm inkubiert. Zwei Drittel der Zellsuspension wurden mit Glyzerin (Endkonzentration 25%) versetzt und als 50ml Aliquots bei -80°C gelagert. Das verbleibende Drittel wurde für die Plasmidpräparation (s. o.) verwendet. Die Amplifikation der cDNA-Bibliothek wurde von Herrn Dr. Christian Blex, Caprotec Bioanalytics GmbH Berlin, durchgeführt.

3.1.11 Herstellung kompetenter Hefezellen

Um Hefezellen kompetent für die DNA-Aufnahme zu machen, wurde das Yeastmaker Yeast Transformation System II Kit von Clontech verwendet. Hierbei konnten verschiedene Maßstäbe gewählt werden. Für einen Y2H-Screen, in dem eine cDNA-Bibliothek verwendet wurde (3.1.10), wurde der große Maßstab gewählt (Angaben in Klammern). 10ml (150ml) Flüssigmedium wurden mit 1 (3) frisch gewachsenen Hefekolonie(n) inokuliert. Für Hefen des Stamms AH109, Y187 oder NMY51, AP4 wurde 2x YPDA-Medium verwendet. Sollten bereits transformierte Hefezellen für eine sequentielle Transformation erneut kompetent gemacht werden, wurde das dem Plasmid entsprechende Minimalmedium verwendet (s. hierzu 3.1.10, 3.1.12). Die Hefezellsuspension wurde bei 30°C und 300rpm für 1-2 Tage inkubiert, bis eine starke Trübung auftrat, einer OD₆₀₀ von über 1,5 entsprechend. Mit der Hefezellsuspension, entsprechend 5 x 10⁸ (5 x 10⁹) Zellen, wurden 100ml (1.000ml) 2x YPDA-Medium inokuliert, so dass ca. eine OD₆₀₀ von 0,15-0,3 vorlag. Es folgte die Kultivierung für 3-4h bei 30°C und 300rpm, bis max. 2 x 10⁷ Zellen/ml vorlagen, einer OD₆₀₀ von ca. 0,4-1,0 entsprechend. Bei dieser OD befand sich die Hefekultur in der logarithmischen Phase ihrer Wachstumskurve. Anschließend wurden die Hefezellen für 5min bei Raumtemperatur (RT) und 3.000 x g zentrifugiert und zur Reinigung in 60ml (500ml) sterilem ddH₂O resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei gleichen Bedingungen wurden die Zellen in 3ml (10ml) 1,1x TE/LiAc-Lösung resuspendiert. Die Hefezellen, die für eine sequentielle Transformation im großen Maßstab kompetent gemacht wurden, wurden sofort für die anschließende zweite Transformation weiter verwendet. Die Hefezellsuspension des kleinen Maßstabs wurde zu gleichen Teilen auf zwei 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Die Hefezellen wurden danach in einer Tisch-
zentrifuge bei maximaler Umdrehungszahl für 15sek zentrifugiert, in 600µl 1,1x TE/LiAc-Lösung resuspendiert und im Anschluss ebenfalls für die Transformation weiter verwendet. Für Transformationen im kleinen Maßstab wurde alternativ und in ähnlicher Weise das *Frozen-EZ Yeast Transformation II* Kit der Firma Zymo Research gemäß Herstellerangaben eingesetzt. Die Suspension kompetenter Hefezellen konnte wahlweise auch zu 50µl aliquotiert und über eine Styrofoam Box langsam eingefroren werden, um sie bei -80°C für spätere Transformationen zu lagern.

3.1.12 Transformation kompetenter Hefezellen

Für die Transformation kompetenter Hefezellen wurde das Yeastmaker Yeast Transformation System II Kit von Clontech verwendet. Abhängig davon, ob die Hefezellen mit einzelnen DNA-Plasmiden oder einer gesamten cDNA-Bibliothek transformiert werden sollten (s. auch 3.3.1 und 3.3.3), wurden unterschiedliche Mengen der benötigten Reagenzien verwendet. Für die Transformation einzelner DNA-Plasmide wurde der kleine Maßstab gewählt. Für die Transformation einer cDNA-Bibliothek wurde der große Maßstab (Angaben in runden Klammern) oder der "Bibliotheksmaßstab" [Angaben in eckigen Klammern] verwendet. Die kompetenten Hefezellen konnten mit dem Köder- (*bait*) und Beuteplasmid (*prey*) sequentiell transformiert werden oder gleichzeitig über eine Kotransformation.

In einem sterilen, vorgekühlten 15ml Zentrifugenröhrchen wurden 1µg (10µg) [100 µg] Plasmid-DNA mit 5µl (20µl) [200µl] Heringssperma-DNA gemischt und mit 50µl (600µl) [6ml] kompetenten Hefezellen versetzt. Die Heringssperma-DNA wurde zuvor für 5min bei 100°C denaturiert. Anschließend wurden 0,5ml (2,5ml) [25ml] PEG/LiAc-Lösung zugegeben und der Ansatz für 30min (45min) [45min] bei 30°C schüttelnd inkubiert. Danach wurden 20µl (160µl) [1,6ml] Dimethylsulfoxid (DMSO) zugegeben, der Ansatz zwecks Hitzeschock der Hefezellen bei 42°C für 20min inkubiert und daraufhin sofort für 2min auf Eis gekühlt. Während der Inkubation wurde der Ansatz im Abstand von 5min vorsichtig gemischt. Die Hefezellen wurden für 5min bei 3.000 x g sedimentiert und in 1ml (3ml) [30ml] YPD-Plus Herstellermedium resuspendiert. Für die größeren Maßstäbe schloss sich eine 90-minütige Inkubation bei 30°C und 300rpm an. Dieser Schritt wurde für den kleinen Maßstab ausgelassen. Nach erneuter Zentrifugation der Hefezellen bei 3.000 x g für 5min, wurde der Überstand entfernt und das Sediment in 1ml (15ml) [15ml] 0,9% NaCl-Lösung resuspendiert. Abschließend wurden je 100µl (200µl) [200µl] der Transformationsansätze auf 100mm (150mm) [150mm] Agarplatten mit den entsprechenden Selektionsnährmedien ausgestrichen. Parallel wurde eine dekadische Verdünnungsreihe der Transformationsansätze angelegt und zur Bestimmung der Transformationseffizienz ebenfalls auf geeigneten Selektionsnährmedien ausgestrichen. Für Transformationsansätze mit dem Köderplasmid wurde SD-Trp Minimalmedium verwendet, welchem Tryptophan fehlt. Für Ansätze mit dem Beuteplasmid wurde SD-Leu Minimalmedium verwendet, welchem Leucin fehlt. Bei sequentiellen Transformationen oder Kotransformationen von Köder- und Beuteplasmid wurden die Ansätze auf SD-Trp-Leu Minimalmedium kultiviert, welches weder Tryptophan noch Leucin beinhaltet. Die Agarplatten wurden bei 30°C inkubiert, bis ein Koloniewachstum beobachtet werden konnte (3-14 Tage). Die Transformationseffizienz wurde über folgende Formel bestimmt:

Transformationseffizienz = <u>cfu x Vol. Zellsuspension [ml] x Verdünnungsfaktor</u> Vol. plattiert [ml] x DNA-Menge [μg]

cfu = *colony forming unit*

Für die Transformation im kleinen Maßstab wurde alternativ das *Frozen-EZ* Yeast Transformation II Kit der Firma Zymo Research gemäß Herstellerangaben verwendet.

3.1.13 DTT-Methode als alternatives Protokoll zur Hefezell-(Ko)transformation

Das Protokoll erfolgte nach Victoria Wong aus der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Stagljar, *Donnelly Centre for Cellular and Biomolecular Research*, Toronto, Kanada.

Die Hefezellen wurden in einer ÜN-Flüssigkultur in YPDA- oder entsprechendem Minimalmedium (s. hierzu 3.1.12, 3.3.1) bis zur stationären Phase ihrer Wachstumskurve herangezogen.

Durch kurzes Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit wurden die Hefezellen aus 250μ l ÜN-Kultur je Reaktionsansatz in 1,5ml Reaktionsgefäßen sedimentiert und der ÜS verworfen. Nach Zugabe von 100 μ l Transformationspuffer und 2-5 μ l der jeweiligen DNA wurden die sedimentierten Hefezellen durch Vortexen resuspendiert. Es erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 30min. Anschließend wurden die Hefezellen für 15sek bei maximaler Geschwindigkeit sedimentiert und der ÜS verworfen. Die transformierten Hefezellen wurden in 50 μ l sterilem ddH₂O resuspendiert und auf Agarplatten mit entsprechendem Minimalmedium ausgestrichen.

Bei einer hohen Anzahl von Transformationsansätzen wurde eine 96-*Well*-Platte verwendet. Hierfür wurde die gesamte ÜN-Hefekultur für 5min bei 700 x g zentrifugiert und der ÜS verworfen. Die sedimentierten Hefezellen wurden im 3ml Transformationspuffer je 96-*Well*-Platte resuspendiert und zu 30 μ l je *Well* aliquotiert. Es wurden 2-5 μ l der jeweiligen DNA in die entsprechenden *Wells* gegeben. Die 96-*Well*-Platte wurde mit Aluminiumklebefolie versiegelt und die Ansätze in den *Wells* durch Vortexen gemischt. Es erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 30min. Danach wurde die 96-*Well*-Platte bei 700 x g für 1min zentrifugiert. Ohne den ÜS zu entfernen wurden 20 μ l steriles ddH₂O je *Well* zugegeben und die Hefezellen resuspendiert. Danach wurden zweimal jeweils 25 μ l Hefezellsuspension pro *Well* mit einer Multikanalpipette entnommen und auf zwei Agarplatten mit entsprechendem Minimalmedium ausgestrichen.

3.1.14 Gap Repair homologe Rekombination als Klonierungsstrategie in Hefe

Bei dieser Methode (Snider et al., 2010) wurden zunächst für eine PCR-Amplifikation des Gens von Interesse chimäre Primer eingesetzt, welche am 5'-Ende Regionen von 35-40 Basen Länge mit Plasmid-Homologie besitzen (**Abb. 13** A).



Abb. 13: Gap Repair homologe Rekombination in Hefezellen.

Als alternative Klonierungsstrategie in Hefezellen wurde die Methode der *Gap Repair* homologen Rekombination angewandt. Die Abb. zeigt Details dieser Methode am Beispiel des pAMBV-Plasmids. **A** Generierung spezieller PCR-Primer. Der vorwärts-Primer bestand aus ca. 20 Basen der 5'-Sequenz des Gens von Interesse (grün) fusioniert mit ca. 45 Basen Plasmidsequenz (violett), welche die zu verwendende Restriktionsschnittstelle des Vektors (Sfi I) oberhalb flankiert. Der rückwärts-Primer bestand aus ca. 20 Basen der revers-komplementären 3'-Sequenz des Gens von Interesse (blau) fusioniert mit ca. 45 Basen der reverskomplementären Plasmidsequenz (rot), welche die zu verwendende Restriktionsschnittstelle des Vektors (Sfi I) unterhalb flankiert. **B** Prinzip der *Gap Repair* homologen Rekombination. Nach Amplifikation des offenen Leserahmens (ORF) des Gens von Interesse mittels PCR über die speziell generierten Primer (A), wurden Hefezellen mit dem PCR-Produkt und dem über die Sfi I Restriktionsschnittstelle geschnittenen pAMBV-Plasmid kotransformiert. Aufgrund der über die Primer inserierten Plasmid-Homologie des PCR-Produkts konnte dieses über homologe Rekombination (HR) in das Plasmid eingefügt werden.

Die 3'-Enden dieser Primer entsprechen den ersten 20 Basen (Vorwärts-Primer) bzw. den letzten revers-komplementären 20 Basen (Rückwärts-Primer) des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Die Primer-Sequenzen mit Plasmid-Homologie entsprachen den 35-40 Basen, welche die zu verwendende Restriktionsschnittstelle im Plasmid oberhalb (in 5'-Richtung) und unterhalb (in 3'-Richtung) flankieren.

Nach erfolgter PCR und damit Amplifikation des Gens von Interesse mit flankierender Plasmid-Homologie wurden die PCR-Ansätze mit Dpn1 für 4h bei 37°C inkubiert, um die im Ansatz enthaltene methylierte Matrizen-DNA zu degradieren.

Parallel dazu wurde das Plasmid von Interesse mit der für die Klonierung entsprechenden Restriktionsendonuklease für 4h bei 37°C inkubiert. Hierbei wurden ca. 3µg Plasmid in einem 50µl Restriktionsansatz eingesetzt.

Danach wurden Hefezellen mit 200ng des linearisierten Plasmids und 10µl der PCR-DNA nach dem DTT-Protokoll kotransformiert (3.1.13), auf Agarplatten mit entsprechendem Minimalmedium ausgestrichen (s. hierzu 3.1.12, 3.3.1) und für 3 Tage bei 30°C inkubiert. Es erfolgte die homologe Rekombination und das damit einhergehende Einfügen des PCR-Amplifikats in das linearisierte Plasmid (**Abb. 13** B). Zur Kontrolle der Re-Ligation des geschnittenen Vektors wurden die Hefen ausschließlich mit dem Vektor transformiert. Nach erfolgreichem Wachstum der Hefekolonien wurde die Plasmid-DNA isoliert (s. u.), anschließend in *E. coli* transformiert (3.1.8) und abermals isoliert (3.1.9).

Zum Schluss wurde die neu generierte Plasmid-DNA über den Restriktionsverdau (3.1.4), die Analyse im Agarosegel (3.1.5) und die Sequenzierung (3.1.17) auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

3.1.15 Isolation von Plasmid-DNA aus S. cerevisiae

Nach der Kultivierung der Hefezellen auf Agarplatten mit hochstringentem Selektionsmedium (SD-Trp-Leu-His-Ade+3-AT; s. hierzu 3.3.1) wurde die Plasmid-DNA der herangewachsenen Hefekolonien mit Hilfe des *Zymoprep II Yeast Plasmid Minipreparation* Kits der Firma Zymo Research nach Herstellerangaben isoliert. Die Plasmide lagen abschließend in 10µl ddH₂0 gelöst vor. Da Plasmide in Hefekulturen nur in geringer Kopienzahl vorliegen, konnte die so isolierte DNA nicht mit den gängigen Methoden wie der Agarosegelelektrophorese (3.1.5), dem Restriktionsverdau (3.1.4) und schließlich der Sequenzierung (3.1.17) analysiert werden. Daher wurden die aus Hefezellen isolierten DNA-Plasmide anschließend zunächst in *E.coli* Bakterien transformiert und amplifiziert (3.1.8). Dann folgte die weitere Analyse der DNA-Plasmide bzw. ihre Verwendung für weitere Experimente.

3.1.16 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde über die Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Die Konzentrationsberechnung basierte dabei auf folgender Gleichung:

 $c = A_{260} \times 50 \mu g / mI \times VF$

- c : Konzentration der DNA-Lösung [μg/ml]
- A₂₆₀ : Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm
- VF : zu berücksichtigender Verdünnungsfaktor der untersuchten DNA-Lösung

Diese Berechnung erfolgte durch das Photometer GeneQuant II (Pharmacia Biotech).

3.1.17 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden durch die Firma SMB Services in Molecular Biology (Berlin) und GATC Biotech (Konstanz) durchgeführt.

Die Sequenzen neuer DNA-Konstrukte wurden nach den Klonierungsarbeiten mit Hilfe der DNA-Sequenzierung auf ihre Richtigkeit hin überprüft. Amplifikate der *Multiple Cloning Site* (MCS) von Plasmiden der im *Yeast Two-Hybrid-Screen* (3.3.1) identifizierten Klone wurden ebenfalls sequenziert.

3.2 Protein-Techniken

3.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die BCA Methode verwandt (Smith et al., 1985). Die Bestimmung wurde in 96-*Well*-Mikrotiterplatten mit je 20µl Probenvolumen / Vertiefung durchgeführt. Neben den untersuchten Proben wurden bei jeder Bestimmung der Leerwert sowie verschiedene Verdünnungen einer BSA-Standardlösung (25-800µg/ml) in 0,4% Triton X-100-Lösung oder PBS mitgeführt, um die jeweilige Standard-gerade zu ermitteln. Anschließend wurden je Vertiefung 200µl einer Mischung der Lösungen A und B im Verhältnis 50:1 zugegeben und für 30min bei 60°C inkubiert. Die Mikrotiterplatten wurden anschließend für 10min gekühlt und die Extinktion bei 550nm in einem *ELISA-Reader* bestimmt. Anhand der linearen Regression der Standardgeraden wurde die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt.

3.2.2 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen und Peptiden nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970).

Dazu wurden die Proben nach Ermittlung der Proteinkonzentration mit 4x Laemmli-Probenpuffer versetzt und für 5min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gekühlt und auf vorbereitete 0,75-1,00mm dicke Polyacrylamidgele aufgetragen, bestehend aus einem 3,75%igem Sammelgel und einem 8-12%igem Trenngel. Als Größenstandard diente entweder der LMW- (GE Healthcare) oder der *PageRuler Prestained Protein Ladder*-Marker (Fermentas). Die Elektrophorese erfolgte in der *Mini Protean II* Elektrophorese-Kammer (Bio-Rad) mit 1x Elektrophorese-Puffer zunächst bei 80V. Nachdem die Proben das Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 130V erhöht und die Elektrophorese erfolgte, bis die Lauffront der Proben das Gelende erreicht hatte.

3.2.3 Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue

Alle Arbeitsschritte erfolgten bei RT und fanden unter Rotation (200rpm) statt. Zunächst wurden die SDS-Polyacrylamidgele für 30min in Fixierlösung und anschließend 30min in Coomassie-Färbelösung (Bio-Rad) inkubiert. Anschließend wurden die Gele jeweils mit frischer Entfärbelösung gewaschen. Während einer Inkubation von mindestens 2h wurde die Entfärbelösung einmal gewechselt. Die Entfärbung wurde entsprechend der Stärke der Färbung teilweise über Nacht fortgesetzt.

3.2.4 Western Blot-Analyse und Chemilumineszenzdetektion

Mittels WB wurden die elektrophoretisch getrennten Proteine über das Semi-Dry-Verfahren vom SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurde das Trenngel in Transferpuffer gelagert. Gleichzeitig wurden zwei Schichten vorbereitetes Filterpapier (Whatman) in Transferpuffer getränkt und auf der Anodenfläche einer Trans-Blot SD-Kammer (Bio-Rad) luftblasenfrei aufgelegt. Anschließend wurden die Nitrozellulosemembran und das Trenngel in definierter Orientierung aufgelegt und zum Abschluss zwei Lagen Filterpapier darüber geschichtet. Nach Auflage der Kathode erfolgte der Transfer mit einer konstanten Stromstärke von 0,3A / Gel für 45min-1h15min. Abschließend wurde die Nitrozellulosemembran für 2min in Ponceau S-Lösung gefärbt und dann mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen, um die Übertragung der Proteine zu überprüfen. Gegebenenfalls wurde die Nitrozellulosemembran zurechtgeschnitten, um eine Inkubation mit verschiedenen Antikörpern zu ermöglichen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran im Anschluss für 1h in Magermilchlösung inkubiert. Die Behandlung mit dem jeweiligen Erstantikörper erfolgte in Antikörperlösung über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Membran viermal für je 15min mit Magermilchlösung gewaschen und anschließend mit Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Zweitantikörper in Antikörperlösung für 1h bei RT inkubiert. Daraufhin wurde die Membran fünfmal für je 10min mit TS-T-Puffer und abschließend zweimal für je 5min mit TS-Puffer gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte durch die Inkubation der Membran mit ECL-Lösung und anschließender Exposition eines Fotofilms (GE Healthcare) in einer Filmkassette. Die Entwicklung des Fotofilms erfolgte vollautomatisch in der Cura 60 Apparatur der Firma AGFA.

3.2.5 Überexpression und Isolation von Proteinen aus BL21 E. coli Bakterienzellen

Die Protein-Überexpression diente der Vorbereitung des Glutathion-S-Transferase-Pulldown- (GST-PD)-Assays (3.3.5). Zunächst wurden E. coli Bakterien des Stammes BL21 mit den jeweiligen pGEX-4T-1 Plasmiden (Amp^R) transformiert und positive Klone auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum selektioniert. Das pGEX-4T-1-Plasmid enthielt zytoplasmatische Domänen des VMAT2: den N-Terminus, die dritte Schleife und den C-Terminus, die nach erfolgter PCR-Amplifikation über die entsprechenden Primerpaare VMAT2NTEcoXhoF / VMAT2NTEcoXhoR, VMAT2L3EcoXhoF / VMAT2L3EcoXhoR und VMAT2C-Term.fw / VMAT2CTXhoRv in den Vektor kloniert wurden. Zur Kontrolle wurde der Leervektor benutzt. Für die Überexpression der GST-VMAT2-Fusionsproteine wurden zwei Maßstäbe gewählt. Zunächst wurde ein kleiner Maßstab gewählt, um die Expression der Fusionsproteine zu testen. Anschließend erfolgte die Expression der Fusionsproteine für den GST-PD im großen Maßstab. Die Angaben für den großen Maßstab sind im Folgenden in Klammern aufgeführt. 2x YT-Medium (+ 100µg/ml Amp) wurde jeweils mit einer Kolonie der verschiedenen E. coli-Klone inokuliert, die mit den verschiedenen pGEX-4T-1 Plasmidkonstrukten transformiert wurden, um eine ÜN-Flüssigkultur im Maßstab von 10ml (50ml) anzusetzen. Die Kultivierung fand bei 37°C und 200rpm für 12-16h statt. Danach wurde die 10ml (50ml) ÜN-Flüssigkultur verwendet, um eine Flüssigkultur im Maßstab von 100ml (500ml) 2x YT-Medium (+ 100µg/ml Amp) zu beimpfen. Die Inkubation erfolgte erneut bei 37°C und 200rpm für ca. 1h bis die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8 erreicht hatte. Hier wurden der Kultur im kleinen Maßstab für spätere Analysezwecke 300µl entnommen und in 100µl 4x Laemmli-Puffer aufgenommen (Probe P1). Nun erfolgte die Induktion der Überexpression der GST-VMAT2-Fusionsproteine durch Zugabe von 0.5mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) in die E. coli-Flüssigkultur. Die Inkubationszeit betrug 3h und fand abermals bei 37°C und 200rpm statt. Danach wurden der Kultur im kleinen Maßstab erneut 300µl entnommen und in 100µl 4x Laemmli-Puffer aufgenommen (P2). Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 5.000rpm und 4°C für 15min, um die Bakterien zu sedimentieren. Vom ÜS der Kulturen des kleinen Maßstabs wurde, wie zuvor, eine Probe in Laemmli-Puffer aufgenommen (P3). Ansonsten wurde der ÜS verworfen. Das Bakteriensediment wurde in 4ml (20ml) PBS resuspendiert. Das Protokoll konnte hier unterbrochen und die in PBS resuspendierten Bakterien bei -20°C gelagert werden. Andernfalls folgte nun die Bakterienzelllyse. Hierfür wurde den in PBS resuspendierten Bakterienzellen 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 1:1.000 Phosphataseinhibitor-Cocktail (PI), 10mg/ml RNAse A, 1U/ml DNAse 1 und eine Spatelspitze Lysozym zugegeben und 15min auf Eis inkubiert. Es folgte die Sonifikation auf Eis. Hierbei wurden die Bakteriensuspensionen einmal für 1,5min bei

50% *duty cycle* und 70% *Power* über den Sonoplus GM70 der Firma Bandalin mit Ultraschall beschallt. Nach Zugabe von 10% Triton X-100 und einer Inkubation von 5min auf Eis erfolgte die zweite Sonifikation der Suspension, diesmal für 1min. Es schloss sich eine weitere 15minütige Inkubation auf Eis an. Um die Bakterienzelldebris zu sedimentieren, wurde die Suspension im Anschluss an die Sonifikation für 15min bei 30.000 x g und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation liegen nun gelöste GST-Fusionsproteine im ÜS vor, welcher für den GST-PD-*Assay* weiter verwendet wurde (3.3.5). Sind die GST-Fusionsproteine nicht löslich, da sie in die Bakterienmembran integriert, an sie assoziiert oder in Einschlusskörperchen vorliegen, findet man sie im Sediment der Bakterienzelldebris, so dass sie nicht für den GST-PD-*Assay* verwendet werden können. Um dies zu überprüfen, wurden vom ÜS und vom Sediment des Ansatzes im kleinen Maßstab abermals 300 μ l entnommen und in 100 μ l 4x Laemmli-Puffer aufgenommen (P4, P5). Das Sediment wurde ansonsten verworfen. Die nun über den Ansatz im kleinen Maßstab gewonnenen Proben P1-P5 wurden über die SDS-PAGE (3.2.2) und anschließender Coomassie-Färbung (3.2.3) bzw. anschließendem WB-Verfahren (3.2.4) analysiert.

3.2.6 Gewinnung von Proteinproben aus Hefezellen

Für die Aufarbeitung von Hefeproteinen wurde das *Yeast Protein* Kit der Firma Zymo Research eingesetzt. Dazu wurden die Hefezellen einer 500µl frisch gewachsenen Hefekultur bei 5.000 x g in einer Tischzentrifuge sedimentiert und gemäß Herstellerangaben mit Zymolase und Lysepuffer inkubiert. Für die SDS-PAGE wurden die Proben abschließend direkt mit 4x-Laemmli-Probenpuffer versetzt. Die Hefezellen der Kultur wurden zuvor mit Plasmid-DNA für den Y2H-*Assay* (3.3.1, 3.3.3) transformiert und 3 Tage lang auf Agarplatten mit den entsprechenden Selektionsmedien bei 30°C kultiviert (3.1.12). Währenddessen wurden die jeweiligen Fusionsproteine überexprimiert, kodiert durch die entsprechende Plasmid-DNA. Deren Synthese konnte nach der oben beschriebenen Aufarbeitung über die SDS-PAGE (3.2.2) und WB-Analyse (3.2.4) kontrolliert werden.

3.2.7 Proteinextraktion

Das Verfahren der Proteinextraktion wurde sowohl für die Probenvorbereitung für die Immunpräzipitation (IP) (3.3.4) als auch den GST-*Pulldown-Assay* (3.3.5) verwendet.

Zunächst wurde ein Mäusegehirn über die subzelluläre Fraktionierung aufgearbeitet (3.6). Für den GST-PD wurde die Proteinextraktion mit postnukleärem Überstand (S1), für die IP mit synaptischen Vesikeln (LP2) durchgeführt. Hier soll zunächst die Proteinextraktion mit postnukleärem Überstand für den GST-PD beschrieben werden.

Die Proteinkonzentration der S1-Probe wurde über den BCA-*Assay* bestimmt (3.2.1) und auf 5mg/ml eingestellt. Dafür wurde die entsprechende Menge kalter HG-Puffer, 20mM HEPES, 100mM KCI, 2mM MgCl₂, 1mM PMSF und 1:1.000 PI zugegeben. Nun folgte die

Proteinextraktion durch Zugabe von 1% Triton X-100 und Inkubation der Probe für 10-60min auf Eis. Danach folgten zwei Zentrifugationsschritte der subzellulären Fraktionierung entsprechend bei 43.500 x g und 265.000 x g für jeweils 15min (verkürzt), um möglichst alle Membranbestandteile zu sedimentieren. Die extrahierten Proteine lagen gelöst im ÜS vor. Mittels BCA-*Assay* konnte deren Konzentration bestimmt werden. Zur Vorbereitung für den GST-PD-*Assay* wurde das Proteinextrakt durch Zugabe von kaltem HMK/TX-Puffer, 1mM PMSF und 1:1.000 PI auf eine Proteinkonzentration von 2mg/mI eingestellt.

Für die IP wurden die synaptischen Vesikel (LP2) in mind. 200µl zytosolischem ÜS (LS2) resuspendiert um zu gewährleisten, dass mögliche zytosolische Interaktionspartner präsent bleiben. Daraufhin folgte der BCA-*Assay* zur Bestimmung der Proteinkonzentration, welche durch Zugabe von Extraktionspuffer und 1% Triton X-100 auf 1mg/ml eingestellt wurde. Die Extraktion erfolgte für 1h bei 300rpm auf Eis. Anschließend wurde die Suspension durch Zentrifugation mit einer Tischzentrifuge bei 5.000rpm und 4°C für 5min in Extrakt (ÜS) und Non-Extrakt (Sediment) geteilt. Der ÜS mit den darin gelösten, extrahierten Proteinen wurde für die IP weiterverwendet.

Um die Proteinextraktion im SDS-Gel (3.2.2) bzw. WB (3.2.4) zu überprüfen, konnten an entsprechenden Stellen Proben entnommen und in 4x Laemmli-Puffer aufgenommen werden.

3.2.8 Massenspektrometrie

Nach erfolgtem GST-*Pulldown* (3.3.5) wurden die Proben mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie Blau-Färbung (s. o.) analysiert. Coomassie-gefärbte SDS-Gele wurden weiterhin zur massenspektrometrischen Analyse in das Labor von Herrn Prof. Dr. Andreas Pich im Institut für Toxikologie an der Medizinischen Hochschule Hannover geschickt. Die GST-PD Proben mussten hierfür, bevor sie auf das SDS-Gel aufgetragen wurden, speziell vorbereitet werden. Die Proben wurden für 5min bei 95°C gekocht und durch kurzes Zentrifugieren sedimentiert. Je Spur im Gel wurden 20µl Probenvolumen aufgetragen, welche zuvor zur Alkylierung mit 4% Acrylamid (reinst) versetzt und für 20min inkubiert wurden. Für die massenspektrometrische Analyse wurden die Proteine aus dem SDS-Gel herausgelöst und dann über das MALDI-TOF- (*Matrix-assisted Laser Desorption / Ionization – Time of flight*-) Verfahren analysiert. Alternativ wurde das *Orbitrap*-Verfahren eingesetzt.

3.3 Experimente zur Protein-Protein-Interaktion

3.3.1 Das Gal4-basierte Y2H-System

Als Grundlage zur Identifikation von Protein-Interaktionspartnern diente das Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3 - Kit der Firma Clontech. Das zugrunde liegende Prinzip war, dass ein Köderprotein (bait) als Fusionsprotein mit der DNA-Bindungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors (GAL4-DNA-BD) in Hefe exprimiert wurde. Wurden einzelne Fragmente einer cDNA-Bibliothek als Fusionsproteine (Beute bzw. prey) mit der Aktivierungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors (GAL4-AD) in der gleichen Hefezelle exprimiert und kam es zu einer Interaktion zwischen bait- und prey-Protein, wurde dadurch der GAL4-Transkriptionsfaktor rekonstituiert und die Expression verschiedener Reportergene ermöglicht. Die im Y2H-Verfahren verwendeten Hefestämme Y187 und AH109 sind auxotroph bezüglich verschiedener Aminosäuren bzw. Nukleinbasen (Trp/Leu/His/Ade). Das TRP1- bzw. LEU2-Gen, welche über das entsprechende Köder- bzw. Beuteplasmid kodiert werden, vervollständigen den Trp- bzw. Leu-Stoffwechsel der auxotrophen Hefen. So konnten die Hefen auf eine erfolgreiche Transformation hin selektioniert werden. Erst durch die Expression des Reportergensystems (HIS3 / ADE2), welches unter der Kontrolle des Gal4-Promoters steht, wurde das Wachstum auf bestimmten Minimalmedien und somit die Selektion nach Interaktionspartnern möglich. Das Reportergensystem beinhaltet zusätzlich das MEL1-Gen, welches für die α -Galaktosidase kodiert und so eine Blau- / Weißselektion auf X-a-Gal- (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-alpha-D-Galactopyranoside-) enthaltendem Agarmedium möglich macht.

Als Köderproteine wurden zytoplasmatische Anteile des VMAT2 verwendet, die Nterminal an die GAL4-DNA-BD fusioniert vorlagen. Dafür wurde der VMAT2-N-Terminus (-NT), die dritte zytoplasmatische Schleife (-L3), sowie der C-Terminus (-CT) nach erfolgter PCR-Amplifikation über die entsprechenden Primerpaare VMAT2N-Term.fw / VMAT2N-Term.rv, VMAT2loop3fw / VMAT2loop3rv und VMAT2C-Term.fw / VMAT2C-Term.rv in den Vektor pGBKT7 (Clontech) kloniert. Für den Y2H-*Screen* wurde ausschließlich der VMAT2-CT verwendet. Der VMAT2-NT und -L3 fanden im Hefe-Verpaarungsansatz Verwendung (s. u.).

Für die Expression von Beuteproteinen für einen Y2H-*Screen* wurde die *Mouse Brain Matchmaker* cDNA-Bibliothek (Clontech) eingesetzt. Die cDNA-Fragmente der Länge 400-4.000bp aus Mäusegehirnen lagen in den Vektor pACT2 kloniert vor und kodierten für Peptide, die nach erfolgter Expression N-terminal an die GAL4-AD fusioniert wurden.

Für den Hefe-Verpaarungsansatz wurde ein zusätzliches Beuteprotein generiert. Hierfür wurde die dominant negative Variante des $G_{o2}\alpha$ ($G_{o2}\alpha$ S47N) in einer PCR-Reaktion über das Primerpaar Gao2.fl.fw / Gao2.fl.rv amplifiziert (**Abb. 14**) und in den Beute-Vektor

pGADT7 (Clontech) kloniert. Die Punktmutation wurde über die ortsspezifische Mutagenese in die Wildtyp-Sequenz des $G_{o2}\alpha$ inseriert (3.1.3).





Nach Generierung der jeweiligen Köder- und Beuteplasmide bzw. einer Beute-cDNA-Bibliothek, wurde die Plasmid-DNA entweder sequenziell oder als Gemisch in die Hefezellen transformiert (3.1.12). Danach wurden die transformierten Hefezellen zunächst auf das Tragen des jeweiligen Köder- und Beuteplasmid-Gemischs hin selektioniert. Dies geschah auf SD(-Trp-Leu)-Minimalmedium. Für die Selektion einer positiven Interaktion zwischen Köder- und Beuteprotein wurden die transformierten Hefezellen auf SD-Minimalagar (-Trp-Leu-His-Ade) rekultiviert. Für eine Blau- / Weißselektion wurde dem Medium zusätzlich 0,04mg/ml X- α -Gal zugesetzt. Da das Reportergensystem im Y2H-Verfahren oftmals eine schwache Hintergrund-Expression des HIS3-Gens aufweist, wurde dem Medium weiterhin 3-AT (3-Amino-1, 2, 4-Triazol) zugegeben. Die Hintergrund-Expression des HIS3-Gens konnte hier bereits durch 1mM 3-AT unterdrückt werden. 3-AT ist ein kompetitiver Inhibitor der Imidazolglycerol-Phosphat Dehydratase, dem HIS3-Genprodukt (Joung et al., 2000).

Im Falle des Y2H-*Screens* musste anschließend die Plasmid-DNA der auf hochstringentem Minimalagar wachsenden Hefe-Klone zur weiteren Analyse isoliert werden (3.1.15). Die Analyse erfolgte über eine PCR (3.1.1) mit pACT2-spezifischen Primern (pACT25091f / pACT24978r), über welche das in der MCS befindliche DNA-Fragment der cDNA-Bibliothek amplifiziert werden konnte (**Abb. 15**). Die DNA-Sequenz der Amplifikate wurde über die DNA-Sequenzierung bestimmt (3.1.17) und über das Nucleotid-*BLAST*-Verfahren (NCBI / Emble; 3.10) das entsprechende, zugehörige Gen identifiziert.



Abb. 15: PCR-Analyse mehrerer Klonen des Y2H-Screens.

Dargestellt ist die PCR-Analyse der Klone 1-14 aus dem Y2H-Screen mit dem Köderplasmid pGBKT7-VMAT2-CT im Agarosegel. Die Amplifikation erfolgte mit pACT2-spezifischen Primern (pACT25091f / pACT24978r). Um die entsprechenden Klone der cDNA-Bibliothek zu identifizieren, wurde die PCR-DNA sequenziert und das entsprechende, zugehörige Gen über das BLAST-Verfahren identifiziert. Klon 10 und 11 zeigen kein Amplifikat. Hierbei handelt es sich um falsch-positive Aktivierung des Reportergensystems, welches zum Wachstum einer entsprechenden Hefekolonie führte. Die Banden der Amplifikate liegen der cDNA-Bibliothek entsprechend im Bereich von 400-4.000bp. Banden gleicher Höhe entsprechen nicht zwangsläufig einem Fragment derselben Sequenz. Hier liefert ein Restriktionsverdau bzw. die Sequenzierung der DNA-Fragmente genauere Information.

3.3.2 Verpaarung von Hefezellen

Die Verpaarung von Hefezellen des a- und α-Verpaarungstyps diente zur Generierung von diploiden Zellen. AH109-Hefezellen des a-Verpaarungstyps wurden mit entsprechenden *prey*-Plasmiden transformiert, während Y187-Hefezellen des α-Verpaarungstyps mit den jeweiligen *bait*-Plasmiden transformiert wurden. Über die Verpaarung von Zellen der beiden unterschiedlichen Hefe-Genotypen konnten diploide Zellen generiert werden, die für die Untersuchung der Interaktion von Gal4-Fusionsproteinen, je nach Kombination, unterschiedliche Paare an *bait*- und *prey*-Plasmiden enthielten. Für die Verpaarung wurde 1 Kolonie des jeweiligen Verpaarungstyps, welche das zu kombinierende *prey*- bzw. *bait*-Plasmid enthielten, in 500µl YPDA-Medium zusammengegeben und durch Vortexen vermischt. Es erfolgte die Inkubation bei 30°C und 300rpm für 20-24h. Danach wurden jeweils 100µl der Verpaarungsansätze auf Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsmedium (SD-Trp-Leu) ausgestrichen, um diploide Zellen zu selektionieren, die je ein *prey*- und *bait*-Plasmid trugen. Nach der Inkubation bei 30°C für 3-7 Tage wurden die diploiden Hefekolonien auf hochstringentes Selektionsmedium (SD-Trp-Leu-His-Ade+X-α-Gal) umgesetzt, um auf eine Interaktion der Gal4-Fusionsproteine hin zu selektionieren.

3.3.3 Das Split-Ubiquitin Membran-Y2H-System

Das Split-Ubiquitin Y2H-System (Snider et al., 2010) ist eine Fortführung und Weiterentwicklung des klassischen Gal4-basierten Y2H-Systems. Dieser *Assay* wird ebenfalls als Membran-Y2H (MYTH) bezeichnet, da hier Membranproteine oder Membran-assoziierte Proteine, als *bait-* und *prey-*Fusionsproteine in Hefezellen exprimiert werden können.



Abb. 16: Prinzip des Split-Ubiquitin Membrane-Yeast Two-Hybrid (MYTH) Assays.

A Wildtyp-Sequenz des Ubiquitins. Die N-terminale Hälfte ist grün dargestellt und besitzt an Position 13 einen Isoleucin-Rest (rot). Die C-terminale Hälfte ist blau dargestellt. **B** Nach separater Expression der N-terminalen Hälfte des Wildtyp-Ubiquitins ($N_{UB}I$) und der C-terminalen Hälfte (C_{UB}), können beide Peptide spontan reassoziieren und bilden funktionelles Pseudo-Ubiquitin. **C** Wird der Isoleucin-Rest an Position 13 in $N_{UB}I$ zu Glyzin mutiert, kann das so generierte $N_{UB}G$ nicht mehr spontan mit C_{UB} reassoziieren und es bildet sich kein funktionelles Pseudo-Ubiquitin. Dies kann hier nur nach Interaktion von Proteinen erfolgen, an die $N_{UB}G$ bzw. C_{UB} fusioniert wurden. **D** Das Köderprotein (*bait*) wird mit C_{UB} , welches wiederum mit einem Transkriptionsfaktor gekoppelt ist (C_{UB} -TF), fusioniert. Das Beuteprotein (*prey*) liegt als $N_{UB}G$ -Fusionsprotein vor. Liegt nach Integration in die Hefezellmembran (I) eine Interaktion zwischen C_{UB} -TF-Köderfusionsprotein und $N_{UB}G$ -Beutefusionsprotein vor, können $N_{UB}G$ und C_{UB} reassoziieren und es bildet sich funktionelles Pseudo-Ubiquitin (II). Aufgrund der folgenden Spaltung des TFs und C_{UB} durch deubiquitinierende Enzyme (DUBs) wird der TF frei gesetzt und kann in den Hefe-*Nucleus* translozieren, um dort das Reportergensystem zu aktivieren (II, III).

Bait-Proteine wurden über die entsprechenden Vektoren pBT3-N und pAMBV mit dem Cterminalen Abschnitt des Ubiquitins (C_{UB}), sowie dem Transkriptionsfaktor LexA-VP-16 fusioniert. *Prey*-Proteine wurden über die Vektoren pPR3-N, pPR3-N-NubG13A, pPR3-C, pPR3-C-NubG13A und pPR3-STE mit dem N-terminalen Abschnitt des Ubiquitins (N_{UB}) fusioniert. Die Vektoren wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Stagljar, *Donnelly Centre for Cellular and Biomolecular Research*, Toronto, Kanada, zur Verfügung gestellt. Bei der in den *prey*-Vektoren enthaltenen N_{UB} -Sequenz handelt es sich um eine mutierte Variante des N-terminalen Abschnitts des Ubiquitins (N_{UB} G) (**Abb. 16** A-C). In der Peptidsequenz wurde die Aminosäure Isoleucin an der Position 13 durch Mutagenese gegen Glycin ausgetauscht. Die ursprüngliche Variante des N_{UB} (N_{UB} I) hat eine hohe Affinität zu C_{UB} und kann spontan mit diesem reassoziieren, um ein funktionelles Pseudo-Ubiquitinmolekül zu bilden (**Abb. 16** B). Dies geschieht auch, wenn *bait-* und *prey-*Fusionsprotein nicht miteinander interagieren. Daher ist die Mutation an Position 13 essentiell, da N_{UB} G aufgrund geringer Affinität zu C_{UB} nicht spontan mit diesem reassoziieren kann (**Abb. 16** C), sondern nur, wenn eine *bait-* und *prey-*Interaktion stattfindet. Bei erfolgter Interaktion zwischen *bait-* und *prey-*Fusionsprotein bildet sich das Pseudo-Ubiquitinmolekül und deubiquitinierende Enzyme (DUBs) spalten den Transkriptionsfaktor LexA-VP-16 hinter dem C-Terminus des C_{UB} (**Abb. 16** D). Der so entlassene Transkriptionsfaktor transloziert in den *Nucleus* der Hefezellen und aktiviert das Reportergensystem. Das Reportergensystem gleicht dem des klassischen Gal4-basierten Y2H-Systems, abgesehen vom Promotor, da ein unterschiedlicher Transkriptionsfaktor verwendet wird (**Abb. 16** D). Bei den hier verwendeten Hefen handelte es sich um die Stämme AP4 und NMY51.



Abb. 17: VMAT2-Varianten für die Generierung von Köderproteinen im MYTH-*Assay.* Die für die in dieser Abb. dargestellten Varianten der VMAT2 kodierenden cDNAs wurden für die N-terminale Fusion mit C_{UB}-TF in das Plasmid pBT3-N kloniert. **A** Die Expression der VMAT2-cDNA in ihrer gesamten Länge resultiert in VMAT2-*full length* (VMAT2-FL). **B** Expression der N-terminalen Hälfte des VMAT2 einschließlich dritte zytoplasmatischer Schleife über die entsprechend gekürzte cDNA (VMAT2-NT). **C** Expression der C-terminalen Hälfte des VMAT2 einschließlich dritter zytoplasmatischer Schleife über die entsprechend gekürzte cDNA resultiert in VMAT2-CT.

Als Köderprotein wurde VMAT2 in seiner gesamten Länge (-FL), die N-terminale Hälfte des VMAT2 einschließlich dritte zytoplasmatischer Schleife (-NT) und die C-terminale

Hälfte einschließlich zytoplasmatischer Schleife (-CT) verwendet (Abb. 17) und über das entsprechende Plasmid pBT3-N nach erfolgter Expression N-terminal mit C_{UB} fusioniert. Die Klonierung erfolgte über die Sfi I Restriktionsschnittstellen des Vektors und mit den jeweiligen PCR-Fragmenten, die über die Primerpaare VMAT2.fl.fw.01 / VMAT2.fl.rv.01, VMAT2.fl.fw.01 / VMAT2.N.rv.01 und VMAT2.C.fw.01 / VMAT2.fl.rv.01 in einer PCR-Reaktion amplifiziert wurden. Zur Kontrolle wurde der Epidermal Growth Factor Rezeptor (EGFR) als artifizielles Köderprotein eingesetzt, dessen Sequenz in das Plasmid pAMBV kloniert wurde und nach erfolgter Expression C-terminal mit C_{UB} fusioniert vorlag. Das DNA-Konstrukt pAMBV-EGFR wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Igor Stagliar, von der University of Toronto, Kanada, bereitgestellt (Deribe et al., 2009). Ebenfalls von Herrn Prof. Dr. Stagljar bereit gestellt wurden die Plasmide pPR3-N-HDAC6 und -HDAC10, welche für die artifiziellen Beuteproteine HDAC6 und 10 kodierten, die nach erfolgter Expression N-terminal an N_{UB}G fusioniert vorlagen (Deribe et al., 2009). Die Kontrollplasmide pOST1-NubG und -Nubl wurden kommerziell bei der Firma Dualsystems Biotech erworben. Als Beuteproteine wurden verschiedene Varianten des $G_{02}\alpha$ eingesetzt. Die Wildtyp-Variante ($G_{o2}\alpha$ -WT), die dominant negative Variante ($G_{o2}\alpha$ S47N) und die konstitutiv aktive Variante (Go2aQ205L) wurden mittels PCR über die Primer Go2a.fl.fw.01 / Go2a.fl.rv.01 und Go2a.fl.fw.02 / Go2a.fl.rv.02 amplifiziert und anschließend in die Vektoren pPR3-N, pPR3-C und pPR3-STE kloniert. Die Transformation und Selektion der Hefezellen erfolgten auf Minimalmedium, welches dem des Gal4-Y2H-Systems entspricht. Als alternatives Transformationsprotokoll wurde hier die DTT-Methode verwendet (3.1.13).

3.3.4 Immunpräzipitation

Die IP diente zur Überprüfung der im Y2H-Verfahren identifizierten putativen Interaktionspartner des VMAT2. Für die IP wurden über das Verfahren der subzellulären Fraktionierung (3.6) synaptische Vesikel (LP2) aus dem Homogenat eines Mäusegehirns präpariert und in zytosolischem ÜS (LS2) resuspendiert. Es folgte die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration mittels BCA-*Assay* (3.2.1). Zur weiteren Vorbereitung folgte die Extraktion der vesikulären Proteine mit 1% Triton X-100 (3.2.7). 200µl der aus der Extraktion stammenden gelösten Proteine (ÜS) wurden anschließend mit dem primären monoklonalen Antikörper in einer 1:200 Verdünnung versetzt. Als primärer Antikörper diente ein unspezifisch gegen Gβ-Untereinheiten gerichteter Antikörper. Zur Kontrolle wurde ein Antikörper eingesetzt, der gegen Synaptophysin (SYP) gerichtet ist. Es erfolgte die Inkubation bei 4°C und 300rpm ÜN. Zur weiteren Kontrolle diente das Proteinextrakt, das nicht mit primärem Antikörper inkubiert wurde. Die IP erfolgte mit Protein G-Sepharose-*Beads*. Für jeden Ansatz wurden 60µl *Beads* verwendet. Zunächst wurden diese 3x jeweils in 200µl Extraktionspuffer gewaschen und bei 3.000rpm für 3min sedimentiert. Anschließend wurden die Proteinproben mit den gewaschenen *Beads* für 1h bei 4°C und 300rpm inkubiert. Daraufhin wurden die *Beads* bei 5.000rpm und 4°C für 3min sedimentiert. Ein Teil des Überstandes wurde für die spätere Analyse in 4x-Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und bei -20°C gelagert. Die *Beads* wurden mind. 3x in Extraktionspuffer gewaschen und anschließend in 100µl 1x-Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Nach Inkubation der *Beads* bei 95°C für 10min und der damit einhergehenden Denaturierung der Proteine wurden diese erneut sedimentiert (6.000rpm / 5min) und ausschließlich der ÜS bei -20°C gelagert. Es folgte die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (3.2.2) und die Analyse im WB-Verfahren (3.2.4). Hierfür wurden Antikörper verwendet, die gegen SYP, SYB, Gβ(1-4), VMAT2 und G_o(gerichtet sind.

3.3.5 Glutathion-S-Transferase-Pulldown

Der Glutathion-S-Transferase-*Pulldown* (GST-PD) diente ebenfalls zur Identifikation von putativen Interaktionspartnern des VMAT2. Hierfür wurde zunächst über die subzelluläre Fraktionierung (3.6) aus dem Homogenat eines Mäusegehirns je Genotyp der postnukleäre ÜS gewonnen. Dieser wurde dann für die Proteinextraktion vorbereitet (3.2.7). Nach erfolgter Extraktion und Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-*Assay* (3.2.1) wurde die Proteinsuspension mit HMK/TX-Puffer auf eine Konzentration von 2mg/ml eingestellt. Zusätzlich wurden Proteaseinhibitoren zugegeben (PMSF / PI).

Im Vorfeld wurden zytoplasmatische Domänen des VMAT2 in den Vektor pGEX-4T-1 kloniert und über die Expression in BL21 *E. Coli* Zellen an die Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert (3.2.5). Zur Kontrolle wurde GST alleine exprimiert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der gelösten Fusionsproteine und GST aus *E. Coli*. Hierfür wurden 250µl Glutathion-Sepharose-*Beads* je Ansatz zunächst in insg. 40ml kaltem PBS gewaschen und nach Sedimentation in 4ml kaltem PBS aufgenommen. Es folgte die Immobilisierung der GST-VMAT2-Fusionsproteine und des GST an die gewaschenen Glutathion-Sepharose-*Beads* während einer einstündigen Inkubation bei 4°C auf dem Schüttler. Die *Beads* wurden nun 3x mit 20ml kaltem PBS gewaschen. Dabei erfolgte die Sedimentation der Beads bei 5.000rpm und 4°C für 1min. Die *Beads* wurden je Ansatz in 2,5ml kaltem PBS aufgenommen und ihr Proteingehalt über den BCA-*Assay* (3.2.1) bestimmt.

Nun schloss sich der GST-PD an. Hierfür wurde je Ansatz 1ml Proteinextrakt (2mg Protein, s. o.) mit 100µg GST-VMAT2-Fusionsprotein, gekoppelt an Glutathion-Sepharose-*Beads*, für 1h bei 4°C auf dem *Dynal* - Proben-Mixer (Invitrogen) inkubiert. Danach wurden die *Beads* je Ansatz dreimal in 1ml kaltem HMK/TX-Puffer und abschließend einmal in 1ml kaltem HMK-Puffer gewaschen. Die Sedimentation erfolgte hier unter Verwendung einer Tischzentrifuge bei 5.000rpm und 4°C für 30sek, die jeweilige Inkubation erfolgte für 5min bei 4°C. Nach erstmaliger Sedimentation der *Beads* wurde ein Teil des Überstandes in 4x-Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Die *Beads* wurden in 100µl 1x-Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden bis zur Analyse mittels SDS-PAGE (3.2.2) und WB (3.2.4) bei -20°C aufbewahrt.

3.4 Versuchstiere

Aufgrund unter Säugetieren hochkonservierter Signaltransduktionswege, ähnlicher Anatomie und ähnlichem Stoffwechsel eignen sich Mäuse ideal als Modell-Organismus für die Forschung. Mäuse besitzen wie der Mensch ca. 30.000 Gene, von denen 99% im Menschen eine homologe Entsprechung haben (Waterston et al., 2002).

Sowohl der Wildtypstamm 129/SvxC57/BL als auch die Isoform-spezifischen $G_{o2}\alpha$ -, $G_{o1}\alpha$ und $G_{o1/2}\alpha$ -Deletionsmutanten (Jiang et al., 1997, Dhingra et al., 2002) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Lutz Birnbaumer, *National Institute of Environmental Health Sciences*, *Research Triangle Park*, *North Carolina*, zur Verfügung gestellt.

Mittels homologer Rekombination wurde der ORF (*open reading frame*) des Exons 6, welches beiden $G_0\alpha$ -*Splice*-Isoformen gemeinsam ist (**Abb. 9**), durch das Einfügen einer Neomycin-Kassette unterbrochen, wodurch sowohl die $G_{o1}\alpha$ - als auch die $G_{o2}\alpha$ -Expression unterbunden wird. Zur Generierung der $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Mäuse wurde durch homologe Rekombination das Exon 7.1 (**Abb. 9**) durch Einsetzten einer Neomycin-Kassette unterbrochen, während zur Generierung von $G_{o2}\alpha^{-/-}$ Mäusen dar Cystein-Rest 255 im Exon 7.2 (**Abb. 9**) durch ein Stop-Codon ersetzt wurde.

Die Tiere wurden in den Tierställen der Charité (Philippstr., Hessische Str., Berlin-Mitte) gezüchtet. Die $G_{o2}\alpha$ -Deletionsmutante ließ sich untereinander verpaaren. Für Versuche mit heterozygoten und homozygoten *Knockout*-Wurfgeschwistern wurde die Deletionsmutante mit Wildtyp-Mäusen gekreuzt, um deren Nachkommen (heterozygote Tiere) nach dem Erreichen der Geschlechtsreife untereinander zu verpaaren. Auf gleiche Weise wurde bei der Generierung der $G_{o1}\alpha$ - und $G_{o1/2}\alpha$ -Deletionsmutante verfahren, da diese in der Regel die Geschlechtsreife nicht erreichten. Die so generierten Würfe enthielten Wildtyp-, heterozygote und homozygote *Knockout*-Wurfgeschwister. Wurden mehrere Stämme in einem Experiment benötigt, so wurden Tiere gleichen Geschlechts und Alters verwendet. Die Zucht und Dokumentation der Tiere bzw. der Würfe hinsichtlich Geburtenrate, Todeszeitpunkt, Genotyp, Körper- und Gehirngewicht erfolgte durch die chemisch-biologische Technische Assistentin Marion Möbes.

3.5 Verhaltenswissenschaftliche Versuche - Rota Rod-Experiment

Im Rota Rod-Experiment wurden Wildtyp-Mäuse und Deletionsmutanten ($G_{o1}\alpha$, $G_{o2}\alpha$, $G_{o1/2}\alpha$) auf einen rotierenden Stab gesetzt, welcher über einen Zeitraum von 3min von 3rpm auf 50rpm beschleunigte. Die Mäuse liefen auf dem rotierenden Stab oder fielen herunter, falls die Geschwindigkeit das Laufen nicht mehr zuließ. Beim Herunterfallen der Mäuse wurde ein Kippschalter betätigt, welcher die Zeit des Herunterfallens vom Beginn des Laufs an stoppte.

In diesem Experiment wurden zwei Konditionen unterschieden, welche Auskunft über das motorische Verhalten der Mäuse gaben. Zum einen wurde die durchschnittliche Zeit bestimmt, in welcher die Tiere auf dem rotierenden Stab liefen bis sie herunter fielen. Da sich besonders schwache Tiere anstelle des Laufens am rotierenden Stab festkrallten und folglich Eigenrotationen vollführten, wurde als zweite Kondition die durchschnittliche Anzahl der Drehungen der sich festkrallenden Mäuse bestimmt und die durchschnittliche Zeit bis zur ersten Drehung.

Die jeweiligen Tiere wurden vor dem eigentlichen Experiment einer Trainingsphase unterzogen. Das Verhalten der Tiere auf dem rotierenden Stab wurde per Videoaufnahme dokumentiert.

3.6 Subzelluläre Fraktionierung

Zur Präparation von Synaptosomen, synaptischen Vesikeln und weiterer Fraktionen aus Mäusegehirnen wurde die Methode von Huttner und Kollegen bzw. Hell und Jahn in modifizierter Form angewandt (Huttner et al., 1983, Hell und Jahn, 1998).

Zunächst wurden die Mäuse dekapitiert. Nach Öffnung des Schädeldaches wurde das Gehirn entnommen und sofort in 4°C kalten Homogenisierungspuffer (5ml/g Gewebe) überführt, der mit einem Proteaseinhibitorcocktail (PI) versetzt wurde.

Anschließend wurde das Gehirn in einem Wheaton-Homogenisator durch zehnmalige Auf- und Abhübe bei 900rpm homogenisiert (Homogenat). Danach wurde das Homogenat bei einer Beschleunigung von 1.400 x g für 10min und der so gewonnene postnukleäre Überstand (*Supernatant* 1; S1) abermals bei 14.000 x g für 15min zentrifugiert. Das Sediment 1 (P1) des ersten Zentrifugationsschritts enthielt *Nuclei*, Mitochondrien und größere Membranbestandteile der mechanisch lysierten Gehirnzellen. Das Sediment 2 (P2) des zweiten Zentrifugationsschritts enthielt Synaptosomen, welche sich durch das Wiederverschließen der Membran von abgerissenen Axon-Terminalien der Neurone bildeten. Für Versuche mit der Synaptosomenpräparation wurde diese in 1ml Natriumpuffer aufgenommen. Im weiteren Verlauf der subzellulären Fraktionierung jedoch wurden die Synaptosomen über die Zugabe eines zehnfachen Volumens Wasser, das mit PI und 10mM

HEPES (pH 7,4) versetzt war, osmotisch lysiert und durch dreimalige Auf- und Abhübe im Wheaton-Homogenisator bei 2.000rpm homogenisiert. Daraufhin wurde das Lysat bei 29.000 x g in der Ultrazentrifuge für 20min zentrifugiert, um größere Membranfragmente und verbliebene Synaptosomen (LP1) von der im Überstand (LS1) befindlichen Vesikelfraktion zu trennen. Die Vesikel wiederum wurden dann in einem letzten Zentrifugationsschritt bei einer Beschleunigung von 350.000 x g für 30min aus dem Überstand LS1 sedimentiert. Die sedimentierten synaptischen Vesikel (LP2) wurden mit einer 23G- und 27G-Kanüle in geeignetem Puffer resuspendiert und für Versuche verwendet. Von allen Fraktionen wurde mittels BCA-*Assay* (3.2.1) die Gesamt-Proteinmenge bestimmt.



Abb. 18: Anreicherung von vesikulären Proteinen durch subzelluläre Fraktionierung eines Mäusegehirns.

Dieser Western Blot (WB; 3.2.4) zeigt die Anreicherung der vesikulären Proteine VMAT2 und SYP durch subzelluläre Fraktionierung eines Mäusegehirns. Es wurden folgende Fraktionen aufgetragen: Homogenat (H), nukleäres, mitochondriales *Pellet* (P1), Postsynaptosomaler Überstand (S2), Synaptosomen (P2), Lysiertes *Pellet* 1 (LP1), grobe synaptische Vesikel (LP2) und postvesikulärer Überstand (LS2). Die Fraktion der synaptischen Vesikel (LP2) zeigt, wie erwartet, die größte Menge an SYP und VMAT2. SYP liegt ebenfalls in Synaptosomen angereichert vor, welche wiederversiegelten synaptischen Terminalien entsprechen, angereichert mit Vesikeln.

Abb. 18 zeigt die Anreicherung des vesikulären Monoamintransporters 2 (VMAT2) und des Synaptophysins (SYP) über die Fraktionen einer subzellulären Fraktionierung eines Mäusegehirns. Während SYP als Marker synaptischer Vesikel gilt, kommt VMAT2 nur auf synaptischen Vesikeln des monoaminergen Systems vor. Demnach ist das Immunsignal des ECL basierten Detektionsverfahrens im Western Blot (WB; 3.2.4) in der Vesikelfraktion (LP2) für VMAT2 und SYP am stärksten (**Abb. 18**).

3.7 HPLC-Analytik

Zur Präparation verschiedener Gehirnareale wurden die Mäuse dekapitiert und deren Gehirne entnommen. Die Gehirne wurden zunächst auf Trockeneis gefroren und bis zur Präparation der Gehirnregionen bei -80°C in 50ml-Reaktionsgefäßen gelagert. Die Präparation der Gehirnregionen erfolgte auf einer Kühlplatte bei -20°C durch Frau PD Dr. Irene Brunk, Institut für integrative Neuroanatomie, Charité Berlin. Folgende Gehirnregionen wurden präpariert: *Bulbus olfactorius, Frontalcortex, Septum, Striatum, Hypothalamus, Cerebellum, Corpus amygdaloideum, Parietalcortex, Hippocampus* und Hirnstamm. Nach Präparation der jeweiligen Gehirnregion wurde deren Gewicht bestimmt und bis zur Analyse mittels HPLC (*high performance liquid chromatography*) bei -80°C gelagert. Die HPLC-Analyse wurde in Kollaboration von Frau Prof. Dr. Heide Hörtnagl durchgeführt, aus dem Institut für Pharmakologie, Charité Berlin. Hierfür wurden die gefrorenen Proben mit 10-20 Volumen deionisiertem Wasser (ddH₂O) versehen und bei 4°C durch Ultrasonikation homogenisiert. Die Homogenate wurden mit dem gleichen Volumen 0,2N Perchlorsäure versetzt und für 10min bei 25.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden für die HPLC-Analyse zur Bestimmung deren Monoamingehalts mittels elektrochemischer Detektion verwendet. Die Durchführung erfolgte wie zuvor beschrieben (Hörtnagl et al., 1993).

3.8 Aktivitätsnachweis der Monoaminoxidase

Die Aktivität der Monoaminoxidase (MAO) wurde mit Hilfe des *Amplex*[®] *Red Monoamine Oxidase Assay* Kit (A12214) der Firma Molecular Probes nach Herstellerangaben bestimmt. Die Methode basiert auf der Detektion von Wasserstoffperoxid (H₂O₂), welches als Reaktionsprodukt durch die Substratumsetzung der MAO angereichert wurde. Die Detektion von H₂O₂ erfolgte über eine Meerrettichperoxidase-gekoppelte Reaktion, in welcher das *Amplex*[®] *Red* Reagenz (10-Azetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin) verwendet wurde, das ein hochsensitiver und stabiler Sensor für H₂O₂ ist (Molecular Probes, 2004). Als Reaktionsprodukt entstand das stabile Resorufin, welches fluorimetrisch über eine Zeitspanne von 180min detektiert wurde, um eine Enzymkinetik zu erstellen. Die Exzitation des Resorufins erfolgte über Licht, dessen Wellenlänge im Spektrum von 530-560nm lag, während die Emission von Resorufin bei einer Wellenlänge von 590nm (Emissionsmaximum) gemessen wurde. Als Kontrolle diente der Reaktionspuffer alleine (Negativkontrolle), oder mit einer definierten Menge H₂O₂ vermischt (Positivkontrolle).

Um zwischen der MAO-A und MAO-B zu diskriminieren, wurden für die paralogen Enzyme spezifische Substrate und Inhibitoren verwendet. Tyramin ist ein Substrat beider Enzyme, MAO-A und -B, während Benzylamin spezifisch von der MAO-B metabolisiert wird. Clorgylin ist ein MAO-A spezifischer Inhibitor und Pargylin ein spezifischer Inhibitor der MAO-B Aktivität.

Für den MAO-*Assay* wurden Synaptosomen (P2) eines Mäusegehirns je Genotyp verwendet, welche über die subzelluläre Fraktionierung (3.6) aufgearbeitet wurden. Das Synaptosomen-Sediment wurde in 1ml HG-Puffer resuspendiert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Zuvor wurde die Proteinkonzentration mittels BCA-*Assay* (3.2.1) bestimmt. Für jeden Ansatz wurden 100µg Gesamtprotein eingesetzt, gelöst in 100µl 1x Reaktionspuffer (Molecular Probes).

3.9 Neurotransmitteraufnahmetest - Monoaminaufnahme in synaptische Vesikel

Die Monoaminaufnahme in synaptische Vesikel aus Mäusegehirnen erfolgte über den VMAT2. Für die Messung der Monoaminaufnahme über den VMAT2 wurden zunächst synaptische Vesikel über das Verfahren der subzellulären Fraktionierung aus Homogenat von Mäusegehirnen angereichert (3.6). Anschließend wurden die sedimentierten Vesikel (LP2) in KG-ATP-Puffer resuspendiert und zu je 25µl in individuelle Reaktionsgefäße (Beckman) aliquotiert. Die Monoaminaufnahme wurde durch Zugabe von 25µl KG-ATP-Puffer gestartet, welchem 160nM [³H]Serotonin und 2mM Ascorbinsäure zugesetzt wurde. In einem Kontrollansatz wurde durch die zusätzliche Zugabe von 6µM Reserpin, einem irreversiblen Antagonisten des VMAT2, der dessen Transport blockt (Henry et al., 1987, 1998), die unspezifische Aufnahme von [³H]Serotonin bzw. die radioaktive Hintergrundstrahlung ermittelt. In einem weiteren Ansatz wurde das Reserpin durch 100µM GMP-P(NH)P (5'-Guanylylimidodiphosphat) ersetzt, einem kaum-hydrolisierbaren GTP-Analogon, welches daher G-Proteine dauerhaft aktivieren kann (Birnbaumer et al., 1980). Die Inkubation der verschiedenen Ansätze erfolgte parallel für 10min bei 25°C. Die vesikuläre Monoaminaufnahme wurde durch das Lagern der Proben auf Eis und die Zugabe von 400µl eiskaltem KG-Puffer gestoppt. Anschließend wurden die Vesikel der verschiedenen Ansätze in einer Ultrazentrifuge bei 440.000 x g für 10min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Sedimente wurden zur Lyse mit 0,4% Triton X-100 versetzt und für 20min bei 42°C inkubiert. Von den Vesikelsuspensionen wurde ein definierter Teil für die Bestimmung der Radioaktivität im Beckman Coulter LS 6500 vermessen. Der verbleibende Teil wurde für die Proteinbestimmung mittels BCA-Assay verwendet (3.2.1). Die Berechnung der aufgenommenen Monoaminmenge wurde wie folgt berechnet:

MA_{Monoamin}= 1/60 Bq x dpm x 1/(m_{Protein} x 1/1.000 x 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 [³H]-Monoamins [TBq / mmol]

Die im Kontrollansatz durch Zugabe von Reserpin ermittelte Radioaktivität wurde als unspezifische Aufnahme des [³H]Serotonins bzw. als Hintergrund gewertet und von den ermittelten Werten der übrigen Ansätze subtrahiert. In allen Versuchen wurde die Neurotransmitteraufnahme in Dreifachbestimmungen ausgeführt. In der zugehörigen Grafik sind Mittelwerte mit deren Standardabweichung dargestellt bzw. Mediane aus verschiedenen Experimentwiederholungen gegenübergestellt.

3.10 In silico-Methoden

http://www.cellbiol.com/scripts/complement/reverse_complement_sequence.html http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/ http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/ http://www.expasy.ch/ http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html http://arbl.cvmbs.colostate.edu/molkit/translate/index.html http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/

3.11 Versuchsdurchführung und -auswertung

Alle biochemischen Experimente wurden, falls nicht anders angegeben, mindestens dreimal wiederholt. Für einzelne Messwerte wurden dabei jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die in Kapitel 4 angegebenen Daten zeigen entweder die Mittelwerte repräsentativer Einzelexperimente oder die Mediane einer repräsentativen Gruppe von Experimenten. Die Fehlerbalken der errechneten Mittelwerte stellen die ermittelte Standardabweichung dar. Im Falle des Boxplot-Diagramms in **Abb. 44** ist das Minimum, das untere Quartil (25. Percentile), der Median (50. Percentile), das obere Quartil (75. Percentile) und das Maximum dargestellt. Signifikante Unterschiede mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von $p \le 0,05$, $p \le 0,01$ oder $p \le 0,001$ sind mit einem Stern, zwei bzw. drei Sternen markiert. Zur Bestimmung der Signifikanz von Mittelwerten aus normalverteilten Wertegruppen wurde der Student'sche t-Test verwendet. Weiterhin kam der H-Test nach Kruskall-Wallis beim Vergleich mehrerer Wertegruppen und der Mann-Whitney U-Test beim Vergleich von zwei Wertegruppen zum Einsatz.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse einer möglichen VMAT2- $G_{02}\tilde{\alpha}$ Interaktion

Um eine direkte VMAT2- $G_{o2}\alpha$ -Interaktion nachzuweisen, wurde der VMAT2 in seiner Gesamtlänge und zusätzlich dessen zytoplasmatische Domänen alleine als Köderproteine im *Yeast 2-Hybrid*-System (Y2H) eingesetzt. $G_{o2}\alpha$ wurde in diesem System als Beuteprotein verwendet. Weiterhin wurden die zytoplasmatischen Domänen des VMAT2 für den GST-PD mit postnukleärem Überstand von Gehirnhomogenaten aus Mäusen verwendet.

4.1.1 Klassische Gal4-basierte Y2H-Analyse

Das Gal4-basierte Y2H-System funktioniert ausschließlich mit zytoplasmatischen Proteinen, da die Aktivierung der Reportergene davon abhängt, dass Köder- und Beutefusionsprotein in den *Nucleus* der Hefezelle translozieren. Daher wurden für diesen Ansatz ausschließlich zytoplasmatische Domänen des VMAT2 als Köderproteine verwendet: der aus 20 Aminosäuren bestehende N-Terminus (VMAT2-NT), die 20 Aminosäuren lange dritte zytoplasmatische Schleife (VMAT2-L3), sowie der 52 Aminosäuren umfassende C-Terminus (VMAT2-CT). Die entsprechend kodierende DNA-Sequenz wurde in den Ködervektor pGBKT7 kloniert.

Im direkten *Mating*-Ansatz diente die dominant negative Variante G_{o2} α S47N als Beuteprotein. Da davon ausgegangen werden kann, dass VMAT2 über eine GPCR-ähnliche Funktion G_{o2} α aktiviert und heterotrimere G-Proteine in ihrem inaktiven Zustand mit den zugehörigen Rezeptoren (GPCRs) interagieren, wurde die dominant negative Variante des G_{o2} α gewählt. Die entsprechend kodierende DNA-Sequenz wurde in den Beutevektor pGADT7 kloniert.

Zusätzlich wurde der C-Terminus von VMAT2 als Köderprotein für einen Y2H-*Screen* eingesetzt. Hierbei wurde eine Mäusegehirn-cDNA-Bibliothek, kloniert in den Beutevektor pACT2, auf mögliche unbekannte Interaktionspartner des C-Terminus von VMAT2 durchsucht.

Die WB-Analyse zur Überprüfung der Expression von GAL4-Fusionsproteinen in Hefezellen zeigt, dass die Köder- und Kontrollfusionsproteine in AH109-Hefezellen erfolgreich exprimiert werden (**Abb. 19** A, B).

Im nächsten Schritt müssen die einzelnen Plasmide, welche für die entsprechenden Kontroll-, Köder- und Beutefusionsproteine kodieren, in Hinblick auf eine mögliche Autoaktivierung des Gal4-Reportergensystems getestet werden. In AH109-Hefezellen findet keine Autoaktivierung des Gal4-Reportergensystems durch die einzelnen Kontroll-, Köder- und Beutefusionsproteine statt (Daten nicht gezeigt). Im *Mating*-Verfahren entstehen diploide Hefezellen, welche sowohl Köder- als auch Beuteplasmid enthalten und die entsprechenden Fusionsproteine exprimieren. Kombiniert man in diesem Ansatz die Expression der Köderplasmide, die für VMAT2-NT-, -L3- und - CT-Fusionsproteine kodieren, mit der Expression des Beuteplasmids, dass für das dominant negative $G_{o2}\alpha$ -Fusionsprotein ($G_{o2}\alpha$ S47N) kodiert, zeigt sich kein Wachstum der diploiden Hefezellen auf hochstringentem Selektionsmedium (LB -Trp/-Leu/-Ade/-His) (Daten nicht gezeigt). Mit diesem Ansatz kann daher die vermutete direkte Interaktion zytoplasmatischer Domänen des VMAT2 mit $G_{o2}\alpha$ S47N nicht nachgewiesen werden.



Abb. 19: WB-Analyse der Expression von GAL4-Fusionsproteinen in Hefezellen. Hefezellen des Stammes AH109 wurden mit verschiedenen Plasmiden transformiert und die Expression der entsprechenden Fusionsproteine überprüft. Dabei wurden Hefezelllysate in 4x Laemmli-Puffer aufgenommen und über die SDS-PAGE und anschließendem WB-Verfahren analysiert. A Detektion von *bait*-Fusionsproteinen mit Hilfe des Antikörpers α -GAL4-DNA-BD. B Detektion von *prey*-Fusionsproteinen mit Hilfe des Antikörpers α -GAL4-AD. Die Expression der *bait*-Fusionsproteine GAL4-DNA-BD-lamin C (Spur 1), -p53 (Spur 2), -VMAT2-NT (Spur 3), -VMAT2-L3 (Spur 4), -VMAT2-CT (Spur 5) und der GAL4-DNA-BD alleine (Spur 6) war erfolgreich (A). Die Expression der *prey*-Fusionsproteine Gal4-AD-large T antigen (Spur 1) und der GAL4-AD alleine (Spur 2) war ebenfalls erfolgreich (B). Als Kontrolle diente das Lysat untransformierter Hefezellen (Spur 7 A / Spur 3 B).

Im Y2H-*Screen* wurde eine Mäusegehirn-cDNA-Bibliothek nach putativen Interaktionspartnern des VMAT2-CT durchsucht. Entsprechende cDNA-Klone wurden mittels DNA-Präparation aus den Hefezellen isoliert und zur Bestimmung sequenziert. Eine Liste aller Klone, die über den Y2H-*Screen* mit VMAT2-CT gefunden wurden, befindet sich im Anhang (S. 149).

Zwei der im Y2H-*Screen* identifizierten Klone sind besonders interessant, da sie für β -UE heterotrimerer G-Proteine kodieren: G β_1 und G β_{2like1} . **Abb. 20** zeigt, dass diese Klone im *Mating*-Verfahren auf hochstringentem Selektionsmedium in Kombination mit dem Köderplasmid, das für den VMAT2-CT kodiert, Wachstum diploider Hefezellen induzieren (**Abb. 20**, Reihe B, C, Spalte 5). Dies indiziert, dass G β 1 und G β 2like1 mit dem VMAT2-CT interagieren und darüber das Reportergensystem aktivieren. Im Kontrollansatz zeigt sich

allerdings, dass die für G β -UE kodierenden Beuteplasmide auch in Kombination mit dem leeren Köderplasmid Hefezellwachstum induzieren (**Abb. 20**, Reihe B, C, Spalte 1). Dieses Hintergrundwachstum könnte einer Autoaktivierung des Gal4-Reportergensystems durch die G β -Fusionsproteine zugrunde liegen. In einem weiteren Kontrollansatz in Kombination mit Lamin C ist dies allerdings nicht der Fall. Daher ist die Interaktion des VMAT2-CT mit G β -UE naheliegend. Der unabhängige Nachweis in einem anderen System wäre hier allerdings hilfreich.





4.1.2 Analyse über das Split-Ubiquitin-basierte Membran-Y2H-System

Auch dieses Y2H-Verfahren wurde für den Nachweis einer direkten Interaktion zwischen VMAT2 und $G_{o2}\alpha$ herangezogen. Für diesen *Assay* wurden drei verschiedene VMAT2-Varianten als Köderproteine an C_{UB} fusioniert (3.3.3): der VMAT2 in seiner gesamten Länge (VMAT2-FL), die N-terminale Hälfte des VMAT2 einschließlich dritter zytoplasmatischer Schleife (VMAT2-NT) und die C-terminale Hälfte des VMAT2 einschließlich dritter zytoplasmatischer Schleife (VMAT2-CT) (**Abb. 17**).

Als Beuteprotein wurde hier $G_{o2}\alpha$ in seiner Wildtyp- ($G_{o2}\alpha$ -WT), dominant negativen ($G_{o2}\alpha$ S47N) und konstitutiv aktiven Form ($G_{o2}\alpha$ Q205L) verwendet und N- oder C-terminal mit N_{UB}G fusioniert. Im WB der **Abb. 21** ist die erfolgreiche Expression der $G_{o2}\alpha$ -Fusionsproteine über verschiedene Beuteplasmide gezeigt.

Die erfolgreiche Expression der Köderproteine wird mit Hilfe des Kontrollproteins Ost1-N_{UB}I nachgewiesen. Mit dem Kontrollprotein Ost1-N_{UB}G können die Köderproteine weiterhin auf Autoaktivierung des Reportergensystems hin getestet werden.



Abb. 21: WB-Analyse der Expression von N_{UB}G-Fusionsproteinen in Hefezellen. Hefezellen des Stammes NMY51 wurden mit verschiedenen Plasmiden transformiert und die Expression der entsprechenden Fusionsproteine überprüft. Dabei wurden Hefezellysate in 4x Laemmli-Puffer aufgenommen und über die SDS-PAGE und anschließendem WB-Verfahren analysiert. Die Detektion von *prey*-Fusionsproteinen erfolgte mit Hilfe des Antikörpers α -HA-tag. N_{UB}G wurde entsprechend des Plasmids entweder N-terminal (Spur 1-3) oder C-terminal (Spur 4-9) an das G_{o2} α fusioniert. Das G_{o2} α wurde als Wildtyp-(Spur 1, 4, 7), dominant negative (Spur 2, 5, 8) und konstitutiv aktive Variante (Spur 3, 6, 9) kloniert. Die Expression der *prey*-Fusionsproteine G_{o2} α -N_{UB}G war erfolgreich.

Ost1 ist ein Membranprotein des endoplasmatischen Retikulums (ER) der Hefe und sollte für gewöhnlich nicht mit den Köderproteinen interagieren. Fusioniert mit N_{UB}I dient es als Positivkontrolle, da N_{UB}I und C_{UB} spontan ohne Interaktion der fusionierten Proteine reassoziieren und folglich das Reportergensystem aktivieren. Somit wird das Hefewachstum auf hochstringentem *Dropout*-Medium (SD-Trp-Leu-Ade-His, QDO) induziert. Voraussetzung hierfür ist die Expression der Fusionsproteine. Das Wachstum der mit pOst1-Nubl und dem jeweiligen VMAT2-Köderplasmid kotransformierten Hefezellen auf hochstringentem *Dropout*-Medium indiziert also die Expression und Integration der Fusionsproteine in die Membran des ER (**Abb. 22** B, C 1-4). Dies gilt auch für das EGFR- (*epidermal growth factor receptor*) Fusionsprotein, welches in diesem *Assay* für Kontrollzwecke als artifizielles Köderprotein verwendet wurde (**Abb. 22** B, C 1). Letzteres ist bereits in diesem System etabliert (Deribe et al., 2009).

Enthält das Medium X-Gal, färben sich wachsende Hefekolonien blau, da auch die Expression des lacZ-Reportergens aktiviert und folglich die β -Galaktosidase sezerniert wird, welche X-Gal zu einem Indigofarbstoff metabolisiert (**Abb. 22** C 1-4).

Ist Ost1 an N_{UB}G fusioniert, dient es als Negativkontrolle. N_{UB}G kann aufgrund der I13G-Mutation nur mit C_{UB} reassoziieren und folglich das Reportergensystem aktivieren, wenn eine Interaktion der fusionierten Proteine vorliegt. Eine Interaktion zwischen Ost1 und diversen Köderproteinen ist generell unwahrscheinlich. Das EGFR-, VMAT2-FL und VMAT2-NT-Fusionsprotein induzieren demnach wie erwartet in Kombination mit Ost1-N_{UB}G kein Hefewachstum (**Abb. 22** B, C 1-3). Das VMAT2-CT-Fusionsprotein bewirkt hier Wachstum der Hefe (**Abb. 22** B 4), welches sich durch die Zugabe von X-GAL nahezu unterdrücken lässt (**Abb. 22** C 4).



Abb. 22: Test der Expression, Integration und Autoaktivität der VMAT2-Köderproteine in Hefezellen. Die Hefezellen wurden mit den Plasmiden kotransformiert, die für die Köderfusionsproteine EGFR-C_{UB}-TF, TF-C_{UB}-VMAT2-FL, -NT, -CT und die Kontrollfusionsproteine Ost1-N_{UB}G (- Ktr.) und Ost1-N_{UB}I (+ Ktr.) kodieren. **A** Selektion kotransformierter Hefezellen auf SD-Medium, welchem Trp und Leu (Expression durch Köder- bzw. Beuteplasmid) fehlt. **B** Selektion kotransformierter Hefezellen auf SD-Medium, welchem Trp / Leu / Ade / His (QDO) fehlt. Das Hefewachstum indiziert die Aktivierung des Reportergensystems **C** Dem QDO-Medium (B) wird zusätzlich X-Gal zugesetzt, um durch Blau / Weiß-Selektion weiterhin eine Aktivierung des Reportergensystems anzuzeigen. Die Transformation der Hefezellen ist erfolgreich (A). Das Wachstum der mit pOst1-Nubl kotransformierten Hefezellen auf hochstringetem *Dropout*-Medium (- / + X-Gal) in der Positivkontrolle indiziert die Expression der Köderfusionsproteine und deren Integration in die Membran des ER (B, C 1-4). Die Kotransformation der Hefen mit pOst1-NubG führt in der Negativkontrolle auf QDO-Medium zu keinem Wachstum der Zellen (B, C 1-3). Die Koexpression mit dem VMAT2-CT Köderprotein zeigt schwaches Wachstum (B4, C4), das sich nahezu durch die Zugabe von X-Gal unterdrücken lässt (C 1-4).

Zur weiteren Kontrolle des MYTH-Systems und der Spezifität möglicher Interaktionen der Köderproteine wurden artifizielle Beuteproteine eingesetzt, die ebenfalls an N_{UB}G fusioniert sind. Hierfür wurden die Histon Deacetylase 6 und 10 (HDAC6/10) verwendet. Unpublizierte Daten der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Igor Stagljar belegen, dass EGFR spezifisch mit HDAC6 (Positivkontrolle), nicht aber mit HDAC10 (Negativkontrolle) interagiert. In **Abb. 23** A-C 1 zeigt sich, dass das hier im Labor etablierte MYTH-System funktioniert, da EGFR spezifisch mit HDAC6 interagiert und Hefewachstum induziert, nicht aber mir HDAC10 (**Abb. 23** A-C 1). Diese spezifische Interaktion wird weiterhin über die β -Galaktosidase-abhängige Blaufärbung der Hefekolonien bestätigt (**Abb. 23** C 1).

Kombiniert man nun die artifiziellen Beuteproteine mit den VMAT2-Fusionsproteinen, können letztere auf ihre Spezifität putativer Interaktionen hin überprüft werden. Dabei zeigen die Köderproteine VMAT2-FL und -NT leichtes Hintergrundwachstum in der Kombination mit HDAC6 (**Abb. 23** A 2-3), welches schließlich durch den Einsatz von 3-Aminotriazol (3-AT) im SD-Medium unterdrückt werden kann (**Abb. 23** B, C 2-3). 3-AT ist ein kompetitiver Inhibitor des His3 Proteins, welches am Syntheseweg des Histidins beteiligt ist und über die Aktivierung des Reportergensystems in den Hefezellen exprimiert

wird. Das His3 Protein ist für das Wachstum der Hefe auf Minimalmedium ohne Histidin essentiell. Eine leichte nicht spezifisch durch das Y2H-System aktivierte Hintergrundexpression des His3 Gens, die ein Hintergrundwachstum der Hefen zur Folge haben kann, lässt sich wie hier durch 3-AT unterbinden. VMAT2-CT zeigt dagegen stärkeres Hefewachstum in der Kombination mit HDAC6 und HDAC10 (**Abb. 23** A 4), welches sich nicht durch die Zugabe von 3-AT oder X-GAL unterdrücken lässt (**Abb. 23** B, C 4). Die Blaufärbung der Hefekolonien zeigt, dass neben dem His3-Reportergen auch das lacZ-Reportergen exprimiert wird (**Abb. 23** C 4). Da eine unspezifische Interaktion der VMAT2-Fusionsproteine mit HDAC6 bzw. HDAC10 unwahrscheinlich ist, könnte es sich um eine Autoaktivierung des Reportergensystems durch VMAT2-CT handeln. Dies sollte bei der Auswertung im Vergleich zu den folgenden Ansätzen berücksichtigt werden.



Abb. 23: Interaktion von Köder- und artifiziellen Beutefusionsproteinen in Hefezellen. Die Hefezellen wurden mit den Plasmiden kotransformiert, die für die Köderproteine EGFR-CuB-TF, TF-CuB-VMAT2-FL, -NT, -CT und die artifiziellen Beuteproteine NUBG-HDAC6 und -HDAC10 kodieren. HDAC6 ist dabei der spezifische, bereits charakterisierte Interaktionspartner des EGFR (Deribe et al., 2009). HDAC10 interagiert nicht mit EGFR. EGFR wurde als artifizielles Köderprotein eingesetzt. A Selektion kotransformierter Hefezellen auf SD-Medium, welchem Trp / Leu / Ade / His (QDO) fehlt. Das Hefewachstum indiziert die Aktivierung des Reportergensystems und damit die Interaktion der jeweiligen Fusionsproteine. B Dem QDO-Medium (A) wird zusätzlich 3-AT zugesetzt, um das Hintergrundwachstum der Hefe zu unterdrücken, welches durch die leichte, nicht durch das Y2H-System induzierte His3 Hintergrundexpression zustande kommen kann. C Dem QDO-Medium (B) wird zusätzlich X-Gal zugesetzt, um durch Blau / Weiß-Selektion weiterhin eine Aktivierung des Reportergensystems anzuzeigen. Die bereits charakterisierte Interaktion zwischen EGFR und HDAC6, aber nicht HDAC10 dient hier als Kontrolle und kann nachgewiesen werden (A1, B1, C1). Demnach funktioniert das MYTH-System. Das VMAT2-FL- und -NT-Köderprotein bewirken Wachstum der Hefe, wenn sie mit dem artifiziellen HDAC6-Beuteprotein koexprimiert werden (A 2-3). Dieses Hintergrundwachstum kann durch Zugabe von 3-AT unterdrückt werden (B, C 2-3). Das VMAT2-CT-Köderprotein bewirkt in der Kombination mit dem HDAC6 und HDAC10-Beuteprotein Wachstum der Hefe, welches nicht mit 3-AT und X-Gal unterdrückt werden kann (A4, B4, C4).

In einer weiteren Kontrolle wurden nun die verschiedenen $G_{o2}\alpha$ -Fusionsproteine (Beute) in Kombination mit dem artifiziellen EGFR-Fusionsprotein (Köder) auf ihre Spezifität möglicher Interaktionen hin überprüft. Die **Abb. 24** zeigt, dass die $G_{o2}\alpha$ -Beuteproteine, welche N- bzw. C-terminal an N_{UB}G bzw. N_{UB}A fusioniert sind, weitestgehend keine unspezifische Interaktion mit dem EGFR eingehen (**Abb. 24** A-D 1-3). Dies gilt nicht für N_{UB}A-G_{o2} α -WT (**Abb. 24** A 1-3). Bei N_{UB}A handelt es sich um die I13A-Mutante des N_{UB}, welche sich im Hinblick auf seine Fähigkeit spontan mit C_{UB} zu reassoziieren und funktionelles Pseudo-Ubiquitin zu bilden im Vergleich zu N_{UB}G und N_{UB}I intermediär verhält. N_{UB}A besitzt eine stärkere Affinität zu C_{UB} als N_{UB}G, aber eine weniger starke als N_{UB}I (Johnsson und Varshavsky, 1994, Raquet et al., 2001). Das an G_{o2} α fusionierte N_{UB}A wurde über die ortsspezifische Mutagenese generiert um das MYTH-System sensitiver für schwache und transiente Interaktionen zu machen, wie sie für G-Proteine bekannt sind. Nur wenn N_{UB}A N-terminal an G_{o2} α -WT fusioniert ist, nicht aber C-terminal, kann ein Hefewachstum in Kombination mit dem EGFR-Köderprotein induziert werden (**Abb. 24** A). Man kann davon ausgehen, dass es sich hierbei um eine spontane Reassoziation des affineren N_{UB}A und G_{o2} α -WT aktiviert wird. Dies liegt nahe, da in allen anderen Kombinationen der G_{o2} α -Varianten mit EGFR kein Hefewachstum induziert wird (**Abb. 24**).

Durch die Kombination der verschiedenen $G_{o2}\alpha$ -Fusionsproteine mit dem VMAT2-FL-(**Abb. 25**) und VMAT2-NT-Fusionsprotein (**Abb. 26**) wird, abgesehen von der Positiv-Kontrolle mit Ost1-N_{UB}I, kein Hefewachstum induziert (**Abb. 25**, **Abb. 26** D). Das minimale unspezifische Hintergrundwachstum kann durch Zugabe von X-Gal unterdrückt werden. Folglich kann für VMAT2-FL und -NT in diesem *Assay* keine direkte Interaktion mit $G_{o2}\alpha$ nachgewiesen werden.

Die Koexpression des Köderproteins TF-C_{UB}-VMAT2-CT und der G_{o2} α -Fusionsproteine dagegen induziert in allen Kombinationen Hefezellwachstum (**Abb. 27** A-C 2). Dies gilt auch für die Negativkontrolle, in welcher das VMAT2-CT-Fusionsprotein mit Ost1-N_{UB}G koexprimiert wird (**Abb. 27** D 2). In der Negativkontrolle lässt sich dieses Hintergrundwachstum jedoch durch die Zugabe von X-Gal unterdrücken (**Abb. 27** D 3). In allen weiteren Kombinationen zeigt sich auch auf QDO-X-Gal-Medium Hefewachstum (**Abb. 27** A-C 3). Die Kolonien sind durch β -Galaktosidase-metabolisiertes X-Gal blau gefärbt. Dieses Ergebnis legt eine direkte Interaktion des VMAT2-C-Terminus mit den verschiedenen Varianten des G_{o2} α nahe.



Abb. 24: Kontrolle des MYTH-Systems mit Hilfe des artifiziellen Köderproteins EGFR-C_{UB}-TF. Die Koexpression der Beuteproteine mit dem artifiziellen Köderprotein EGFR-C_{UB}-TF zeigt, ob diese in der Lage sind über eine unspezifische Köder-Beute-Interaktion das Reportergensystem zu aktivieren und damit Hefewachstum zu induzieren. A Verschiedene Varianten des $G_{o2\alpha}$ werden als N-terminale Fusionsproteine über das Plasmid pPR3-N in Hefezellen mit dem Köderprotein koexprimiert. B Die gleichen $G_{o2\alpha}$ -Varianten werden als C-terminale Fusionsproteine über das Plasmid pPR3-C mit dem Köderprotein koexprimiert. C Die $G_{o2\alpha}$ -Varianten werden über ein weiteres Plasmid, pPR3-STE, als C-terminale Fusionsproteine mit dem Kö-derprotein koexprimiert. D Als Kontrolle wird Ost1 aus dem ER der Hefe über die Plasmide pOst1-NubG / -Nubl N-terminal an $N_{UB}G$ (- Ktr.) bzw. $N_{UB}I$ (+ Ktr.) fusioniert und mit dem Köderprotein koexprimiert. Das einzige Fusionsprotein, das in Kombination mit dem artifiziellen Köderprotein EGFR-C_{UB}-TF unspezifisch das Reportergensystem aktiviert und damit das Wachstum der Hefe bewirkt, ist $N_{UB}A-G_{o2\alpha}-WT$ (A). Hier wurde das N_{UB} zu $N_{UB}A$ mutiert, welches intermediär zu $N_{UB}G$ und $N_{UB}I$ im Hinblick auf dessen Fähigkeit spontan mit C_{UB} zu reassoziieren angesiedelt ist. Wie bereits gezeigt wurde, passiert EGFR-C_{UB}-TF die Positiv- und Negativkontrolle (D, Abb. 22-1).



Abb. 25: Interaktion des VMAT2-FL-Köderproteins mit den G_{o2}α-Beuteproteinen.

A-D Wie in **Abb. 24**. Die Koexpression des VMAT2-FL-Köderproteins mit den verschiedenen Varianten des $G_{o2}\alpha$ -Fusionsproteins bewirkt kein Wachstum der Hefezellen. An einigen Stellen zeigt sich minimales Hintergrundwachstum, das durch den Zusatz von X-Gal im Medium unterdrückt werden kann. Eine direkte Interaktion zwischen TF-C_{UB}-VMAT2-FL und den G_{o2} α -Beuteproteinen kann hier nicht gezeigt werden.

	Plasmid: pBT3-N				
	Plasmid	Köder: TF-C _{ub} -VMAT2-NT		Beute	
Α		000			N _{ub} A-G _{o2} α-WT
	pPR3-N	• •		4	$N_{ub}G-G_{o2}\alpha$ -WT
			•	-	N _{ub} G-G _{o2} αS47N
		• • •		-	N _{ub} G-G₀₂αQ205L
В	pPR3-C	• • •			G _{o2} α-WT-N _{ub} A
			• •	6	G _{o2} α-WT-N _{ub} G
		• • •	•	6 ²	G₀₂αS47N-N _{ub} G
		• • •			$\mathbf{G}_{\mathbf{o2}} \alpha \mathbf{Q205L} \cdot \mathbf{N}_{\mathbf{ub}} \mathbf{G}$
с	pPR3-STE	0.00			$\mathbf{G}_{\mathbf{o2}} \alpha$ -WT-N _{ub} G
			• •		G₀₂αS47N-N _{ub} G
					G _{o2} αQ205L-N _{ub} G
D				- F - 1	Ost1-N _{ub} G
		• • •	* * *	4 @ * *	Ost1-N _{ub} I
		SD-Trp-Leu	SD-Trp-Leu -Ade-His	SD-Trp-Leu -Ade-His +X-Gal	
		1	2	3	

Abb. 26: Interaktion des VMAT2-NT-Köderproteins mit den $G_{o2\alpha}$ -Beuteproteinen.

A-D Wie in Abb. 24. Die Koexpression des VMAT2-NT-Köderproteins mit den verschiedenen Varianten des Go2α-Beuteproteins bewirkt kein Wachstum der Hefezellen. An einigen Stellen zeigt sich minimales Hintergrundwachstum, das durch den Zusatz von X-Gal im Medium unterdrückt werden kann. Eine direkte Interaktion zwischen TF-C_{UB}-VMAT2-NT und den $G_{o2}\alpha$ -Fusionsproteinen kann hier nicht gezeigt werden.



Abb. 27: Interaktion des VMAT2-CT-Köderproteins mit den $G_{o2\alpha}$ -Beuteproteinen.

A-D Wie in **Abb. 24**. Die Koexpression des VMAT2-CT-Köderproteins mit den verschiedenen Varianten des $G_{o2\alpha}$ -Beuteproteins bewirkt in allen Kombinationen Wachstum der Hefezellen auf QDO-Medium (A-C 2), allerdings auch in der Negativkontrolle (D 2). Das Hefewachstum der Negativkontrolle kann durch die Zugabe von X-Gal unterdrückt werden (D 3). In den verschiedenen Kombinationen zeigt sich ebenfalls schwaches Hefewachstum auf QDO-X-Gal-Medium (A-C 3). Die Kolonien färben sich blau. Dies indiziert eine Interaktion des VMAT2-CT mit $G_{o2\alpha}$.

4.1.3 Immunpräzipitation

Um die über den Y2H-*Assay* nachgewiesene Interaktion von VMAT2 und Gβ-UE zu bestätigen, wurde das Verfahren der Immunpräzipitation (IP) herangezogen. Über die subzelluläre Fraktionierung wurden zunächst synaptische Vesikel (LP2) aus dem Homogenat eines Mäusegehirns präpariert und in zytosolischem Überstand (LS2) resuspendiert. Nach Extraktion der vesikulären Proteine wurden diese mit einem gegen Gβ-UE gerichteten polyklonalen Antikörper inkubiert und über die Protein G-Sepharose präzipitiert. Für Kontrollzwecke wurde ein monoklonaler Synaptophysin (SYP) Antikörper verwendet bzw. ausschließlich Protein G-Sepharose ohne Antikörper. Nach erfolgter IP wurden die Proben über das WB-Verfahren analysiert.

Der in Abb. 28 dargestellte WB zeigt, dass die vesikulären Proteine erfolgreich extrahiert werden konnten (Spur 1, 2). Spur 5-8 dieses WBs zeigen, dass das Verfahren der IP

ebenfalls funktioniert. Mit einem gegen SYP gerichteten, monoklonalen Antikörper lässt sich SYP präzipitieren (Spur 5, 6, Zeile 2) und dessen Interaktionspartner SYB kopräzipitieren (Spur 5, 6, Zeile 5).



Abb. 28: Immunpräzipitation mit einem primären Gβ-Antikörper und synaptischen Vesikeln eines Mäusegehirns.

Mit dem Homogenat eines Mäusegehirns wurden über die subzelluläre Fraktionierung synaptische Vesikel (LP2) präpariert und in der zytosolischen Fraktion (LS2) resuspendiert. Nach Extraktion der vesikulären Proteine wurden diese mit einem polyklonalen G β -Antikörper (pcl rb α -G β_{1-4} / AS398) inkubiert und über Protein G-Sepharose präzipitiert. Zur Kontrolle wurde ein SYP-Antikörper (mcl ms α -SYP) bzw. ausschließlich Protein G-Sepharose (K) verwendet. Nach erfolgter IP schloss sich die WB-Analyse der Proben mit primären Antikörpern an, die gegen VMAT2, SYP, G_{o1/2} α , G β_{1-4} und SYB gerichtet waren. Die ersten beiden Spuren des WBs (WB) zeigen, dass die Extraktion der untersuchten Proteine erfolgreich war. Die Spuren 5 bis 8 des WBs zeigen weiterhin, dass das Verfahren der IP funktioniert hat. Über einen gegen SYP gerichteten Antikörper kann SYP präzipitiert werden (Spur 5, 6, Zeile 2). Das mit SYP interagierende SYB wird kopräzipitiert (Spur 5, 6, Zeile 5). Dies ist im Kontrollansatz nicht der Fall (Spur 7, 8, Zeile 2, 5). Der hier für den Nachweis der VMAT2-G β -Interaktion verwendete polyklonale G β_{1-4} Antikörper eignet sich nicht für eine IP. G β -UE können nur minimal aus dem Proteinextrakt präzipitiert werden (Spur 3, 4, Zeile 4). Das mit G β -UE interagierende G $_{0}\alpha$ kann ebenfalls nur minimal nachgewiesen werden (Spur 3, 4, Zeile 3). Daher lässt sich die im Y2H-Verfahren gefundene VMAT2-G β -Interaktion über das Verfahren der IP nicht bestätigen (Spur 3, 4, Zeile 1).

Dies ist im Kontrollansatz, in welchem ausschließlich Protein G-Sepharose ohne primären Antikörper verwendet wurde, nicht der Fall (Spur 7, 8). Spur 3 und 4 des in **Abb. 28** aufgeführten WBs zeigen, dass der hier verwendete polyklonale $G\beta_{1-4}$ Antikörper nicht für eine IP geeignet ist. $G\beta_{1-4}$ lässt sich nur minimal präzipitieren (Spur 3, 4, Zeile 4). Weiterhin lässt sich die mit G β -UE interagierende α -UE des G $_0$ -Proteins ebenfalls nur minimal kopräzipitieren (Spur 3, 4, Zeile 3). Daher lässt sich die im Y2H-*Assay* ermittelte putative VMAT2-G β -Interaktion hier weder bestätigen noch widerlegen.

4.1.4 GST-Pulldown mit zytoplasmatischen Domänen des VMAT2

Im GST-PD Verfahren wurden die zytoplasmatischen Anteile des VMAT2 C-terminal an die Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert. Dabei wurde der N-Terminus (NT), die dritte zytoplasmatische Schleife (L3) und der C-Terminus (CT) des VMAT2 verwendet.

Die Fusionsproteine wurden in BL21 *E. coli* Bakterien überexprimiert und nach anschließender Aufreinigung an Glutathion-Sepharose-*Beads* immobilisiert. Die so immobilisierten GST-VMAT2-Fusionsproteine wurden mit postnukleärem Überstand aus dem Mäusegehirnhomogenat verschiedener Genotypen inkubiert, um mögliche Interaktionspartner der zytoplasmatischen Domänen von VMAT2 zu präzipitieren.



Abb. 29: Analyse der Expression von GST-VMAT2-Fusionsproteinen in *E. coli* Bakterien.

Zur Analyse der Expression von GST-VMAT2-Fusionsproteinen wurden BL21 *E. coli* Bakterien mit den entsprechenden pGex-4T-1 Plasmiden transformiert. Die Expression wurde im kleinen Maßstab durch Zugabe von IPTG induziert. Mit Hilfe der Plasmide wurden die zytoplasmatischen Domänen N-Terminus (NT), Loop 3 (L3) und C-Terminus (CT) des VMAT2 an GST gekoppelt, oder GST alleine exprimiert. Während der Aufarbeitung der Fusionsproteine wurden die Proben P1-5 entnommen und für die spätere Analyse in 4xLaemmli-Puffer aufgenommen. P1: Nicht-induzierte Bakterienkultur mit einer OD600 von 0,6-0,8. P2: Bakterienkultur 3h nach Induktion durch IPTG. P3: Überstand nach dem Sedimentieren der induzierten Bakterien durch Zentrifugation. P4: Überstand nach dem Sedimentieren der Bakterienzelldebris durch Zentrifugation nach erfolgter Lyse der induzierten Bakterien durch Zugabe von Lysozym und Sonifizieren. P5: Sedimentierte Bakterienzelldebris nach erfolgter Lyse (s. auch P4). **A-D** Coomassie Färbung der 10%igen Proteingele nach erfolgter SDS-PAGE. **E-H** Nachweis der GST-Fusionsproteine nach erfolgreichem WB-Verfahren und Inkubation mit einem polyklonalen GST Antikörper aus dem Kaninchen. Es zeigt sich, dass die Expression der verschiedenen Fusionsproteine nach Induktion durch IPTG um ein vielfaches erhöht wird (A-H, P2). Weiterhin handelt es sich um lösliche Fusionsproteine, welche sich nach Bakterienlyse und Zentrifugation im Überstand befinden (A-H, P4), wenn auch ein Großteil der Fusionsproteine im Bakterienlysat verbleibt (A-H, P5).

Zunächst wurde die Expression der Fusionsproteine in BL21 *E. coli* Bakterien überprüft. Sowohl die Coomassie-Färbung der SDS-Proteingele als auch die WB-Analyse mittels polyklonalem GST-Antikörper zeigen, dass die Expression der Fusionsproteine und GST alleine in BL21 *E. coli* Bakterien erfolgt (**Abb. 29** A-H P2). Weiterhin liegen die Fusionsproteine bzw. GST alleine nach Bakterienzelllyse wie gewünscht löslich im Überstand vor (**Abb. 29** A-H P4), wobei auch ein Großteil im Sediment der Bakterienzelldebris verbleibt (**Abb. 29** B-H P5).

Unter Verwendung der löslichen GST-Fusionsproteine wurde im Anschluss der GST-PD durchgeführt. GST alleine diente hier als Kontrolle für möglicherweise unspezifische Interaktionen.

Zunächst wurden die über den PD gewonnenen Proben nach erfolgter SDS-PAGE im Coomassie-gefärbten Proteingel analysiert (**Abb. 30**). Dabei wurden sowohl die über den PD isolierten Proteine, also putative Interaktionspartner der VMAT2-Domänen, als auch die Überstände (ÜS) der Präzipitation aufgetragen. Die auf Höhe der roten Pfeile befindlichen Banden entsprechen den GST-VMAT2-Fusionsproteinen bzw. dem GST alleine. Bei Banden, die sich unterhalb der Fusionsproteine bzw. GST befinden, handelt es sich häufig um Degradationsprodukte derselbigen.



Abb. 30: *Pulldown-Assay* mit **GST-VMAT2-Fusionsproteinen und Homogenat eines Mäusegehirns.** Nach erfolgreicher Expression in BL21 *E. coli* Bakterien und Lyse dieser wurden die löslichen GST-VMAT2-Fusionsproteine an Glutathion-Sepharose-*Beads* gekoppelt. Diese *Beads* wurden zusammen mit dem Proteinextrakt aus dem postnukleären Überstand eines Mäusegehirnhomogenats inkubiert und anschließend sedimentiert. Nach Sedimentation der *Beads* wurden diese und die jeweiligen Überstände in Laemmli-Puffer aufgenommen und anschließend über die Coomassie-Färbung eines 10%igen Proteingels nach erfolgter SDS-PAGE analysiert. Für den PD wurde GST alleine (Kontrolle) und an die zytoplasmatischen VMAT2-Domänen (N-Terminus, NT; *Loop* 3, L3 und C-Terminus, CT) gekoppelt verwendet. Bei den mit Pfeilspitzen indizierten Banden handelt es sich um Proteine, welche über die Fusionsproteine aus dem Proteinextrakt des Mäusegehirnhomogenats gefällt werden konnten, nicht aber über GST alleine. Diese Proteine stellen damit putative Interaktionspartner der jeweiligen zytoplasmatischen Domäne des VMAT2 dar. Bei den durch rote Pfeile indizierten Banden handelt es sich um die überexprimierten GST-VMAT2-Fusionsproteine bzw. GST alleine. Die durch die GST-VMAT2-Fusionsproteine isolierten Proteine wurden massenspektrometrisch analysiert.

Interessant sind daher Banden, die sich oberhalb der Fusionsproteine bzw. GST durch Coomassie anfärben lassen. Proteinbanden der VMAT2-Fusionsprotein-Präzipitate, auf deren Höhe es keine entsprechende Bande in der GST-Spur gibt, sind mit einer schwarzen Pfeilspitze markiert (**Abb. 30**). Diese Proteinbanden entsprechen putativen Interaktionspartnern des VMAT2, welche sich nicht unspezifisch über GST alleine fällen lassen. Weitere Coomassie-gefärbte Proteingele wurden zur massenspektrometrischen Analyse
in das Labor von Herrn Prof. Dr. Andreas Pich an der medizinischen Hochschule Hannover geschickt. Zunächst wurden hier die über GST-VMAT2 gefällten Proteine einer gesamten Spur des SDS-Polyacrylamidgels herausgearbeitet und massenspektrometrisch analysiert. Dabei konnten für die VMAT2-Fusionsproteine folgende putative Interaktionspartner identifiziert werden:

GST-VMAT2-NT

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3 Vesicle-fusing ATPase Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1

GST-VMAT2-L3	
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3	

GST-VMAT2-CT	
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	
Vesicle-fusing ATPase	
Mitogen-activated protein kinase 1	
Tabelle 8: Ergebnis der Massenspektrometrie.	

Eine vollständige Liste aller gefundenen Proteine befindet sich im Anhang (S. 149). Bei der Analyse der PD-Proben über das WB-Verfahren sollte mit spezifischen Antikörpern gezielt die VMAT2-G_o α -Interaktion nachgewiesen werden. Der GST-PD wurde hier zur Kontrolle ebenfalls mit postnukleärem Überstand des Gehirnhomogenats aus G_{o1/2} $\alpha^{-/-}$ Mäusen durchgeführt. Zum Nachweis des G_o α wurde zunächst der Antikörper 101.1 (Reinhard Jahn) eingesetzt, welcher beide G_o α -Splice-Isoformen (G_{o1} α und G_{o2} α) nachweist. Um die Spezifität der möglichen VMAT2-G_o α -Interaktion zu testen, wurden die Antikörper sc-13532 (Santa Cruz) und 101.4 (Reinhard Jahn) eingesetzt, welche G_{o1} α bzw. G_{o2} α spezifisch detektieren.

Unter Verwendung des Gehirnhomogenats aus Wildtyp-Mäusen lässt sich mit dem Antikörper 101.1 die Fällung des $G_0\alpha$ über die Fusionsproteine GST-VMAT2-NT und -CT nachweisen (**Abb. 31** A). Im Kontrollansatz, in welchem mit GST alleine präzipitiert und demnach unspezifische GST-Interaktionen detektiert wurden, ist keine entsprechende $G_0\alpha$ -Bande markiert. Die Interaktion ist demnach spezifisch an den VMAT2-N- und C-Terminus gekoppelt und nicht GST-abhängig. Auch die zytoplasmatische Schleife (L3) des VMAT2 präzipitiert $G_0\alpha$ nicht. Benutzt man nun zur Kontrolle das Gehirnhomogenat aus $G_{01/2}\alpha^{-/-}$ Mäusen für den PD, lässt sich in keiner Spur $G_0\alpha$ nachweisen (**Abb. 31** A). Damit ist auch die Spezifität der im WB detektierten Banden belegt. Bei dem kopräzipitierten Interaktionspartner des VMAT2-N- und C-Terminus handelt es sich um $G_o \alpha$.

Mit Hilfe der für $G_{o1\alpha}$ bzw. $G_{o2\alpha}$ spezifischen Antikörper zeigt sich, dass wohlmöglich beide *Splice*-Isoformen des $G_{o\alpha}$ mit dem N- bzw. C-Terminus des VMAT2 interagieren (**Abb. 31** B, C).

Zusätzlich wurde ein für G β -Untereinheiten polyklonaler Antikörper eingesetzt, der sowohl im Präzipitat des Gehirnhomogenats von Wildtyp- als auch G_{o1/2} $\alpha^{-/-}$ Mäusen eine Interaktion von G β und VMAT2-NT nachweist (**Abb. 31** D).



Abb. 31: WB-Analyse des Pulldowns über GST-VMAT2-Fusionsproteine mit Mäusegehirnhomogenat.

Nach erfolgtem GST-PD aus Wildtyp- bzw. $G_{01/2}\alpha^{-L}$ Mäusegehirnhomogenat mit zytoplasmatischen Domänen des VMAT2 wurden die Proben in Laemmli-Puffer aufgenommen und über die SDS-PAGE und anschließendem WB-Verfahren analysiert. Es wurden verschiedene Antikörper zur Detektion der G₀α-*Splice*-Isoformen bzw. der G_β-UE eingesetzt. **A** Analyse mit Hilfe des G₀α-Antikörpers 101.1 (Reinhard Jahn), welcher beide *Splice*-Isoformen (G₀₁α + G₀₂α) markiert. **B** Analyse mit dem G₀₁α-spezifischen Antikörper sc-13532 (Santa Cruz), dem G₀₂α-spezifischen Antikörper 101.4 (Reinhard Jahn) und einem G_β Antikörper (G_β common), welcher die G_β-UE 1-4 detektiert. G₀α interagiert mit dem Zytoplasmatischen N- und C-Terminus des VMAT2 (A). Diese Interaktion findet nicht unspezifisch Schleife des VMAT2. Unter Verwendung des Gehirnhomogenats aus G_{01/2}α^{-/-} Mäusen im Westen Blot lässt sich aufgrund der G₀α-Deletion keine Interaktion nachweisen (A). Dies bestätigt eine spezifische G₀α-Detektion. Weiterhin interagieren der VMAT2-NT und -CT sowohl mit G₀₁α als auch G₀₂α (B). Darüber hinaus interagiert der VMAT2-NT mit G_β-UE (B).

4.2 Charakterisierung des monoaminergen Systems von $G_{o1}\alpha^{-/-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäusen auf molekularer Ebene

4.2.1 Vesikuläre Aufnahme von radioaktiv markiertem Serotonin

Für den Aufnahme-Assay mit radioaktiv markiertem Serotonin wurden synaptische Vesikel aus Mäusegehirnhomogenat angereichert. Die Vesikel wurden dann mit Tritiummarkiertem Serotonin ([³H]5-HT) inkubiert und die Aufnahme des Transmitters über den VMAT2 in An- oder Abwesenheit von GMP-P(NH)P bzw. Reserpin im Scintillator gemessen. Die vesikuläre Transmitteraufnahme in Anwesenheit von Reserpin diente als Kontrolle und wurde als Hintergrund gewertet. Die bereits beschriebene $G_{o2}\alpha$ -abhängige Minderung der VMAT2-Aktivität in Anwesenheit von GMP-P(NH)P kann auch hier an Vesikeln des Gehirnhomogenats der jeweiligen Wildtyp-Tiere gezeigt werden (**Abb. 32** A, B - WT).



Abb. 32: Vesikuläre Aufnahme von [³H]Serotonin.

Nach der Vesikelpräparation aus Synaptosomen von Wildtyp-, $G_{01}\alpha^{-t}$ und $G_{01/2}\alpha^{-t}$ Mäusen wurden diese mit radioaktiv markiertem Serotonin ([³H]5-HT) inkubiert und dessen Aufnahme über den VMAT2 im Scintillator gemessen. G-Proteine wurden in diesem *Assay* über das kaum-hydrolysierbare GTP-Analogon GMP-P(NH)P aktiviert. **A-B** [³H]5-HT-Aufnahme an synaptischen Vesikeln (SSVs) von Wildtyp- und $G_{01}\alpha^{-t}$ (A) bzw. $G_{01/2}\alpha^{-t}$ (B) Wurfgeschwistern in An- und Abwesenheit von GMP-P(NH)P bzw. Reserpin. **C-D** GMP-P(NH)P vermittelte Inhibition der [³H]5-HT-Aufnahme an SSVs von Wildtyp- und $G_{01}\alpha^{-t}$ (C) bzw. $G_{01/2}\alpha^{-t}$ (D) Mäusen in Prozent. An SSVs der Wildtyp-Mäuse zeigt sich die bereits mehrfach publizierte GMP-P(NH)P vermittelte $G_{02}\alpha$ abhängige Hemmung der [³H]5-HT-Aufnahme über den VMAT2 (A, B). Diese ist auch an SSVs der $G_{01}\alpha^{-t}$ Mäuse signifikant vermindert (A). Diese Hemmung geht verloren, wenn zusätzlich $G_{02}\alpha$ deletiert wird (B) und ist damit $G_{02}\alpha$ -spezifsch. Die Hemmung der vesikulären [³H]5-HT-Aufnahme durch aktives $G_{02}\alpha$ liegt in Wildtyp-Mäusen bei ca. 11% (C, D) und in $G_{01}\alpha^{-t}$ Tieren bei ca. 9% (C). Die in $G_{01/2}\alpha^{-t}$ Mäusen vorliegende Differenz von ca. 3% ist nicht signifikant (D).

Um nun zu bestätigen, dass dieser Effekt spezifisch von $G_{o2}\alpha$ gesteuert wird, wurden ebenfalls synaptische Vesikel aus Gehirnen der $G_{o1}\alpha$ - und $G_{o1/2}\alpha$ -Deletionsmutante für den Aufnahme-*Assay* verwendet (**Abb. 32**). Es zeigt sich, dass in $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Mäusen ebenfalls eine signifikante GMP-P(NH)P vermittelte VMAT2-Hemmung nachweisbar ist (**Abb. 32** A), welche in $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäusen, in denen eine zusätzliche Deletion des $G_{o2}\alpha$ vorliegt, verloren geht (**Abb. 32** B). Dies bestätigt eine $G_{o2}\alpha$ -spezifische Verminderung der VMAT2-Aktivität.

4.2.2 Striatales Dopamin

Mit Hilfe der HPLC-Analyse wurde die Gesamtmenge des Dopamins im *Striatum* von $G_{o1}\alpha^{-/-}$, $G_{o2}\alpha^{-/-}$, $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäusen und ihren jeweiligen Wildtyp-Wurfgeschwistern ermittelt. Die HPLC-Analyse wurde in Kooperation mit Frau Prof. Dr. Heide Hörtnagl am Institut für Pharmakologie der Charité durchgeführt. Wie bereits für die $G_{o2}\alpha^{-/-}$ Mäuse veröffentlicht, liegt im *Striatum* der Tiere im Vergleich zu den Wildtyp-Wurfgeschwistern sowohl im Jungtieralter (p12) als auch im adulten Stadium eine signifikant Verminderung des Dopaminspiegels vor (**Abb. 33**; Brunk et al., 2008). In $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Mäusen liegt ein entgegengesetzter Effekt vor. Hier ist der striatale Dopaminspiegel gegenüber den Wildtyp-Mäusen signifikant erhöht (**Abb. 33**). In $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäusen liegt kein Unterschied zu den Wildtyp-Wurfgeschwistern vor. Dies zeigt, dass die Deletion jeweils einer der beiden $G_o\alpha$ -*Splice*-Isoformen zu gegensätzlichen Auswirkungen auf die striatale Dopaminkonzentration führt. Diese Effekte gleichen sich bei gleichzeitiger Deletion beider Isoformen aus.

Eine Ursache für den veränderten Dopaminspiegel in den $G_{o2}\alpha^{-/-}$ und $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Mäusen könnte eine zu den Wildtyp-Mäusen veränderte Aktivität oder Expression von degradierenden bzw. synthetisierenden Enzymen sein. Daher wird im nächsten Kapitel zunächst auf die Aktivität der Monoaminoxidase (MAO) eingegangen woraufhin die quantitative Analyse der Expression der Tyrosinhydroxylase (TH) und Dopa-Decarboxylase (DDC) im WB folgt.



Abb. 33: HPLC-Analyse der striatalen Dopaminkonzentration.

Die *Striata* von Mäusen unterschiedlicher Stämme wurden aus deren Gehirnen entnommen und mittels HPLC-Technik auf ihren Dopaminspiegel hin analysiert. Im Vergleich zu Wildtyp-Tieren sind Mäuse des $G_{o2}\alpha^{-/-}$, $G_{o1}\alpha^{-/-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Stamms dargestellt. In $G_{o2}\alpha^{-/-}$ Tieren liegt eine signifikante Verminderung des Dopaminspiegels im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen vor, während gegenläufig dazu in $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Mäusen eine signifikante Erhöhung dieses Spiegels zu finden ist. In $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäusen bleibt der Dopaminspiegel im *Striatum* unverändert im Vergleich zu Wildtyp-Tieren.

4.2.3 Monoaminoxidase-Aktivität in Synaptosomen

Catecholamine werden zytosolisch abgebaut. Dabei werden sie zunächst durch die Monoaminoxidase (MAO) oxidativ deaminiert. Als Folge sind sie in ihrer Wirkung als Neurotransmitter inaktiviert. Hier wurde die Aktivität der beiden MAO-Isozyme mit Hilfe verschiedener Substrate und Inhibitoren fluorimetrisch gemessen. Tyramin ist ein Substrat, welches von beiden Isozymen unspezifisch metabolisiert wird. Benzylamin ist dagegen ein MAO-B spezifisches Substrat. Weiterhin kamen die Inhibitoren Pargylin und Clorgylin zum Einsatz. Clorgylin ist dabei ein MAO-A spezifischer Inhibitor, während die MAO-B spezifisch von Pargylin gehemmt wird.



Abb. 34: MAO-Aktivität in Synaptosomen von Wildtyp- und $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Mäusen.

Gemessen wurde die Immunfluoreszenz-Intensität IF des Endproduktes der enzymatischen Reaktion durch die Monoaminoxidase (MAO) über einen Zeitraum von 180min. Dargestellt sind die Mediane der Substratumsetzung durch die MAO über die Zeit (A-D). **A** Enzymkinetik der MAO-A und -B mit Hilfe des MAO Substrats Tyramin. **B** Durch Zusatz von spezifischen Inhibitoren wurde die Aktivität der MAO-A oder **C** der MAO-B distinkt gemessen. **D** Mit Hilfe des MAO-B spezifischen Substrates Benzylamin wurde ausschließlich deren Enzymkinetik bestimmt. **E** Darstellung der maximalen Substratumsetzung durch die jeweilige MAO. **F** Darstellung der Zeit, bei welcher die Hälfte der maximalen Substratmenge umgesetzt wurde. Im Vergleich von Wildtyp- und G₀₁a^{-/-} Synaptosomen zeigt sich kein signifikanter Unterschied in deren MAO Aktivität (A-F). n = 10

Eine mögliche Ursache für den verminderten Dopaminspiegel in Striata von $G_{o2}\alpha^{--}$ Mäusen (**Abb. 33**) könnte eine gegenüber Wildtyp-Wurfgeschwistern erhöhte MAO-Aktivität in diesen Mäusen sein.



Abb. 35: MAO-Aktivität in Synaptosomen von Wildtyp- und $G_{01/2}\alpha^{-/-}$ Mäusen. A-F Wie in Abb. 34. Im Vergleich von Wildtyp- und $G_{01/2}\alpha^{-/-}$ Synaptosomen zeigt sich kein signifikanter Unterschied in deren MAO-Aktivität (A-F). n =5

Dies ist jedoch nicht der Fall. Die MAO-Aktivität unterscheidet sich nicht zwischen $G_{o2}\alpha^{-/-}$ und Wildtyp-Mäusen (Brunk et al., 2008). In $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Mäusen könnte man analog eine gegenüber Wildtyp-Wurfgeschwistern verminderte MAO-Aktivität erwarten, als Ursache für die erhöhte striatale Dopaminkonzentration (**Abb. 33**). Auch diese Annahme trifft nicht zu (**Abb. 34** A-F). In $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäusen liegt im Vergleich zu den jeweiligen Wildtyp-Wurfgeschwistern ebenfalls kein Unterschied in der MAO-Aktivität vor (**Abb. 35** A-F). Dies entspricht aufgrund des fehlenden Unterschieds im striatalen Dopaminspiegel zwischen $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ und Wildtyp-Mäusen (**Abb. 33**) den Erwartungen. Das veränderte Dopamin-Niveau in $G_{o2}\alpha^{-/-}$ und $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Mäusen könnte also andere Ursachen haben als eine zu Wildtyp-Mäusen variierte MAO-Aktivität. Daher wird im nächsten Kapitel zunächst auf die Expression der TH und DDC eingegangen, welche für die Dopaminsynthese verantwortlich sind.

4.2.4 Western Blot-Analyse Dopamin-synthetisierender Enzyme

Eine weitere Ursache für die verminderte striatale Dopaminmenge in $G_{o2}\alpha^{-/-}$ Mäusen (**Abb. 33**) könnte eine verminderten Aktivität oder Expression der TH sein. Über quantitative WB-Analyse konnte gezeigt werden, dass die TH-Expression in $G_{o2}\alpha^{-/-}$ Mäusen tatsächlich gegenüber Wildtyp-Mäusen signifikant reduziert ist und somit als Ursache für das verminderte striatale Dopamin-Niveau in Frage kommt (Brunk et al., 2008). In $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Mäusen, in welchen ein erhöhter striataler Dopaminspiegel gefunden wurde (**Abb. 33**), zeigt die quantitative Analyse von Gehirnfraktionen im WB, dass gegenüber Wildtyp-Wurfgeschwistern eine tendenzielle aber nicht signifikante Erhöhung der TH-Expression nur im Homogenat vorzufinden ist (**Abb. 36** A).



Abb. 36: Quantitative WB-Analyse der TH-Expression im Mäusegehirn.

Das Gehirnhomogenat und die daraus über die subzelluläre Fraktionierung gewonnenen Fraktionen aus Wildtyp-, $G_{01}\alpha^{-/-}$ und $G_{01/2}\alpha^{-/-}$ Mäusen wurden in 4x Laemmli-Puffer aufgenommen und über die SDS-PAGE und anschließendem WB-Verfahren mit dem entsprechenden Antikörper hinsichtlich der TH Menge analysiert. Die Quantifizierung der Proteinbanden im WB erfolgte über die Software LabImage 1D 2006. Die Signale der entsprechenden Proteine im WB wurden über die interne Kontrolle SYP bzw. Aktin normalisiert. **A** Nachweis der TH in WT- und $G_{01}\alpha^{-/-}$ Gehirnfraktionen und dessen quantitative Auswertung. **B** Nachweis der TH in WTund $G_{01/2}\alpha^{-/-}$ Gehirnfraktionen und dessen quantitative Auswertung. Es besteht kein Unterschied bezüglich der TH-Menge in Gehirnfraktionenen im Vergleich von *Knockout*-Tieren und ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern (A, B).

Die Expression der DDC ist in $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Wurfgeschwistern unverändert (**Abb. 37**). In $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäusen ist die TH-Menge ebenfalls im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unverändert (**Abb. 36** B). Dies überrascht aufgrund des unveränderten Dopaminspiegels im *Striatum* nicht (**Abb. 33**).



Abb. 37: Quantitative WB-Analyse der DDC-Expression im Mäusegehirn. Es wurde wie in **Abb. 36** verfahren. Der quantitative Nachweis der DDC im WB mit WT- und $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Gehirn-fraktionen zeigt, dass kein Unterschied bezüglich der DDC-Menge im Vergleich von WT- und $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Wurfgeschwistern besteht.

4.2.5 Western Blot-Analyse monoaminerger Transporter

Mittels quantitativer WB Analyse konnte bereits gezeigt werden, dass in der synaptischen Vesikelfraktion (LP2) der $G_{o2}\alpha$ -Deletionsmutante der Transporter für Monoamine (VMAT2) im Vergleich zu Widltyp-Tieren signifikant erhöht ist (Brunk et al., 2008). Dies gilt nicht für den plasmamembranständigen Dopamintransporter (DAT), welcher in der synaptosomalen Fraktion (P2) beider Genotypen in ähnlichen Mengen nachgewiesen werden konnte (Brunk et al., 2008). Auch in $G_{o1}\alpha^{-/-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäusen liegt kein Unterschied in der DAT-Expression zu den jeweiligen Wildtyp-Wurfgeschwistern vor (**Abb. 38** A, B). Dies gilt für alle untersuchten Gehirnfraktionen. Die Expression des VMAT2 ist in Gehirnen von $G_{o1}\alpha^{-/-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu den zugehörigen Wildtyp-Wurfgeschwistern nicht signifikant erhöht (**Abb. 38** C, D).



Abb. 38: Quantitative WB-Analyse der Expression von Monoamintransportern in Mäusegehirnfraktionen.

Es wurde wie in **Abb. 36** verfahren. **A** Nachweis des DAT in den verschiedenen Gehirnfraktionen von WT, $G_{o1}\alpha^{-L}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-L}$ Mäusen. **B** Quantitative Auswertung der unter A erhaltenen Signale im WB. **C** Nachweis des VMAT2 in den verschiedenen Gehirnfraktionen von WT, $G_{o1}\alpha^{-L}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-L}$ Mäusen. **D** Quantitative Auswertung der unter C erhaltenen Signale im WB. Es besteht kein Unterschied bezüglich der DAT- und VMAT2-Menge in den jeweiligen Gehirnfraktionen im Vergleich der *Knockout*-Tiere zu ihren WT-Wurfgeschwistern (B, D).

4.2.6 Western Blot-Analyse dopaminerger Rezeptoren und des G_sa

Vorangegangene Studien zeigen, dass die α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins G_{o2} durch die Regulation des dopaminergen Systems Einfluss auf die Motorik nimmt (Brunk et al., 2008, 2010). Die dort beschriebenen Effekte wurden vor allem nach Verabreichung von Psychostimulanzien wie Kokain und Amphetamin deutlich. In G_{o2} $\alpha^{-/-}$ Mäusen ist die Signalübertragung im sogenannten direkten motorischen Signalweg über die D₁R-MSN abgeschwächt, da die Expression der heterotrimeren, stimulierenden G-Proteine G_{olf} α und G_s α , welche den D₁R an die Adenylylcyclase koppeln, gegenüber Wildtyp-Mäusen signifikant verringert ist. Eine ähnliche Tendenz zeigt die Expression des D₁R. Als Folge ist nach Drogenbehandlung eine verminderte Steigerung der motorischen Aktivität

gegenüber den Wildtyp-Mäusen sichtbar. Ein Effekt der wiederholten Verabreichung von Psychostimulanzien ist, dass die Expression des D₁R in G_{o2} $\alpha^{-/-}$ Mäusen weiter verringert wird, so dass ein signifikanter Unterschied zu Wildtyp-Mäusen vorliegt. Als mögliche Kompensation zum abgeschwächten direkten motorischen Signalweg wird nach wiederholter Drogenverabreichung gleichzeitig die Expression der an den D₁R gekoppelten G-Proteine G_{olf} α und G_s α angeglichen und die Expression des D₂R sogar signifikant erhöht. In **Abb. 39** findet sich nun die quantitative WB-Analyse der D₁R- und D₂R-Expression in G_{o1} $\alpha^{-/-}$ und G_{o1/2} $\alpha^{-/-}$ Mäusen verglichen mit ihren jeweiligen Wildtyp-Wurfgeschwistern. Ähnlich der G_{o2} $\alpha^{-/-}$ Mäuse liegt in diesen Tieren unter drogenfreien Bedingungen kein signifikanter Unterschied in der D₁R- und D₂R-Expression vor (**Abb. 39** A-F).



Abb. 39: Quantitative WB-Analyse der Expression von Dopamin-Rezeptoren im Mäusegehirn. Es wurde wie zuvor verfahren. Es besteht kein Unterschied bezüglich der $D_1 \alpha DR$ - und $D_2 DR$ -Menge im Gehirnhomogenat und in Synaptosomen im Vergleich der $G_{o1} \alpha^{-/-}$ und $G_{o1/2} \alpha^{-/-}$ Tiere mit ihren WT-Wurfgeschwistern (C, F).

Weiterhin wurde auch die Expression des an den D₁R gekoppelten G-Proteins $G_{s\alpha}$ untersucht. In der $G_{o1\alpha}$ - und $G_{o1/2\alpha}$ -Deletionsmutante ist die $G_{s\alpha}$ -Expression im Vergleich zu den jeweiligen Wildtyp-Wurfgeschwistern tendenziell aber nicht signifikant erhöht (**Abb. 40** A-C).





4.3 Charakterisierung zusätzlicher phänotypischer Merkmale von $G_{o1}\alpha^{-/-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäusen

 $G_{o2}\alpha^{-/-}$ Mäuse zeigen auf den ersten Blick im Gegensatz zu $G_{o1}\alpha^{-/-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäusen keine auffälligen phänotypischen Veränderungen. Sie entwickeln sich den Wildtyp-Wurfgeschwistern entsprechend und zeigen keine verkürzte Lebensspanne, wie es bei den $G_{o1}\alpha^{-/-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Tieren beobachtet werden konnte. Erst auf molekularer Ebene und nach Behandlung mit Amphetamin und Kokain konnten Differenzen im Phänotyp der $G_{o2}\alpha^{-/-}$ Mäuse im Vergleich zu ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern beschrieben werden (s. o.;

Brunk et al., 2008, 2010). Auf das monoaminerge System bezogen zeigen sich in $G_{o1}\alpha^{-/-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu $G_{o2}\alpha^{-/-}$ Mäusen wenige Veränderungen (s. o.). Dagegen ist der Phänotyp der $G_{o1}\alpha^{-/-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäuse auffällig, da sie wachstumsretardiert sind und eine verkürzte Lebensspanne aufweisen. $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Mäuse fanden jedoch in der Literatur bisher kaum Erwähnung. In den folgenden Abschnitten wird nun auf diese phänotypischen Merkmale der $G_{o1}\alpha^{-/-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäuse näher eingegangen.

4.3.1 Western Blot-Analyse der $G_{o1}\alpha$ - und $G_{o2}\alpha$ -Expression

Mit Hilfe der Deletionsmutanten für $G_{o1}\alpha$, $G_{o2}\alpha$ und $G_{o1/2}\alpha$ sowie von Antikörpern, welche beide *Splice*-Isoformen des $G_{o\alpha}$ oder $G_{o1}\alpha$ bzw. $G_{o2}\alpha$ spezifisch detektieren, wurden die Expressionsraten der beiden *Splice*-Isoformen im Mäusegehirn ermittelt und zwischen den Genotypen verglichen (**Abb. 41**). Der Antikörper 101.1 (Reinhard Jahn) detektiert sowohl $G_{o1}\alpha$ als auch $G_{o2}\alpha$ im WB (**Abb. 41** A). Der Antikörper sc-13532 der Firma Santa Cruz markiert $G_{o1}\alpha$ spezifisch während $G_{o2}\alpha$ durch den Antikörper 101.4 (Reinhard Jahn) spezifisch detektiert wird (**Abb. 41** A). Für die WB-Analyse wurden Synaptosomen von Wildtyp-, $G_{o1}\alpha^{-t}$, $G_{o2}\alpha^{-t}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-t}$ Mäusen verwendet. Das jeweilige $G_{o}\alpha$ -Signal wurde für die quantitative Analyse über den internen Standard Synaptobrevin (SYB) normalisiert. Über die Signale der oben genannten Antikörper konnte nun die Expression der $G_{o}\alpha$ -*Splice*-Varianten ins Verhältnis gesetzt werden (**Abb. 41** B). Dabei wurde das Wildtyp-Signal des 101.1 Antikörpers entsprechend der Gesamtmenge des $G_{o}\alpha$ gleich 100% gesetzt. Im Verhältnis dazu entspricht das Wildtyp-Signal des Antikörpers sc-13532 50-70% $G_{o1}\alpha$, während das Signal des Antikörpers 101.4 30-35% $G_{o2}\alpha$ ausmacht (**Abb. 41** B).



Abb. 41: Quantitative WB-Analyse der Expression von $G_{o}\alpha$ -Isoformen in Synaptosomen.

Es wurde wie zuvor verfahren. **A** Nachweis des $G_{o1\alpha}$ und $G_{o2\alpha}$ in WT, $G_{o1\alpha}^{-/-}$, $G_{o2\alpha}^{-/-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Synaptosomen im WB. **B** Quantitative Auswertung der unter A erhaltenen Signale im WB. Der Antikörper 101.1 (Reinhard Jahn) detektiert beide *Splice*-Isoformen $G_{o1\alpha}$ und $G_{o2\alpha}$ ($G_{o\alpha}$ 1+2 / $G_{o\alpha}$ Gesamtmenge) (A). Die Antikörper sc13532 (Santa Cruz) und 101.4 (Reinhard Jahn) detektieren spezifisch $G_{o1\alpha}$ bzw. $G_{o2\alpha}$. In Wildtyp-Mäusen besteht die Gesamtmenge an $G_{o\alpha}$ (101.1) zu 60-70% aus $G_{o1\alpha}$ (sc13532) und zu 30-40% aus $G_{o2\alpha}$ (101.4) (B). In $G_{o1\alpha}^{-/-}$ Mäusen ist die $G_{o2\alpha}^{-}$ Expression im Vergleich zu Wildtyp-Wurfgeschwistern signifikant erhöht.

Quantifiziert man nun ebenfalls die $G_0\alpha$ -Antikörpersignale der aus den *Knockout*-Tieren stammenden Synaptosomen, zeigt sich, dass in Gehirnen der $G_{01}\alpha^{-/-}$ Mäuse die $G_{02}\alpha$ -Expression signifikant um ca. 10% erhöht ist. Dieses Ergebnis liefert sowohl der Antikörper 101.1 als auch 101.4 (**Abb. 41** B). Im Gegensatz dazu bleibt die $G_{01}\alpha$ -Expression (sc-13532) in der $G_{02}\alpha$ -Deletionsmutante unverändert (**Abb. 41** B). Aus vorangegangenen Studien ist allerdings bekannt, dass die $G_{01}\alpha$ -Expression in $G_{02}\alpha^{-/-}$ Tieren nach Behandlung mit Psychostimulanzien (Kokain und Amphetamin) gegenüber den Wildtyp-Wurfgeschwistern signifikant erhöht ist (Brunk et al., 2010).

4.3.2 Motorisches Verhalten von Wildtyp-, $G_{o1}\alpha^{-/-}$, $G_{o2}\alpha^{-/-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäusen

Zwischen $G_{o}\alpha$ und der motorischen Aktivität von Mäusen konnte bereits ein Zusammenhang hergestellt werden (Jiang et al., 1998, Brunk et al., 2008, 2010). Jiang und Kollegen beobachteten, dass $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäuse im Rota Rod-Experiment auf einem rotierenden Stab ein beachtliches Defizit in koordinierter Bewegung und die Neigung herunterzufallen besaßen.

Um das motorische Verhalten von Wildtyp-, $G_{01}\alpha^{-/-}$, $G_{02}\alpha^{-/-}$ und $G_{01/2}\alpha^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu testen, wurde auch hier das Rota Rod-Experiment durchgeführt. Die Mäuse wurden auf einen rotierenden Stab gesetzt, der innerhalb von drei Minuten von 3rpm auf 50rpm beschleunigt (Abb. 42 A). Es wurden verschiedene Kriterien zur Beurteilung herangezogen. Zunächst wurde die Zeitspanne ermittelt, in welcher die Mäuse befähigt waren, auf dem beschleunigenden Stab zu laufen bis sie herunter fielen (Abb. 42 B). Es konnte beobachtet werden, dass vor allem stark wachstumsretardierte Mäuse, welche kaum fähig waren auf dem Stab zu laufen, diesem entgingen, indem sie sich festkrallten und Eigenrotationen vollführten (Abb. 42 A). Die Eigenrotation der Mäuse wurde ebenfalls, wie deren Herunterfallen, als Kriterium eines gestörten motorischen Verhaltens bewertet. Daher wurde ebenfalls die Zeitspanne bestimmt, in welcher die Mäuse auf dem Stab liefen bis sie die erste Eigenrotation ausübten (Abb. 42 C). Zusätzlich wurde die Anzahl der Eigenrotationen der Mäuse über die Dauer eines Durchgangs (3min) ermittelt (Abb. 42 D). Dabei ist zu beachten, dass die Darbietung auf dem Rot Rod sowohl im Sinne einer verminderten motorischen Aktivität als auch im Sinne einer motorischen Ungeschicklichkeit oder Koordinationsstörung beeinflusst werden kann. Es können verschiedene Ursachen, wie zum Beispiel ein isoliertes motorisches Defizit, aber auch eine generelle Schwäche bei reduziertem Allgemeinzustand, ein ähnliches Bild im Rota Rod-Experiment zeigen.



Abb. 42: Rota Rod-Experiment.

In diesem Experiment wurden WT- und KO-Mäuse für 3min auf einen Stab gesetzt dessen Rotation von 3rpm auf 50rpm beschleunigte. Ihr motorisches Verhalten wurde hinsichtlich der Zeitspanne interpretiert, welche die Mäuse auf dem rotierenden Stab verbrachten bevor sie herunterfielen und bis sie das erste Mal mit dem Stab rotierten. **A** Abb. des Versuchsaufbaus mit Indikation der zwei hier beobachteten Verhalten "Herunterfallen" und "Rotation" der Mäuse. **B** Auswertung der Laufzeit der WT- und KO-Mäuse auf dem rotierenden Stab und **C** der Laufzeit der Mäuse bis zu ihrer ersten eigenen Rotation durch Festkrallen. **D** Darstellung der Anzahl der Rotationen der Mäuse auf dem sich drehenden Stab über die Versuchsdauer von 3min. Während im Vergleich von $G_{o2}\alpha^{-t-}$ zu WT-Mäusen kein Unterschied bezüglich des motorischen Verhaltens erkennbar ist, zeigen $G_{o1}\alpha^{-t-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-t-}$ Mäuse eine signifikante Verringerung dieses verglichen mit WT- und $G_{o2}\alpha^{-t-}$ Mäusen. Dies ist sichtbar durch eine geringere durchschnittliche Laufzeit auf dem rotierenden Stab (B) und bis zur ersten eigenen Rotation durch Festkrallen (C). Weiterhin zeigt sich dies durch eine höhere Anzahl letztgenannter Rotationen während der Versuchsdauer von 3min (D). Gleiches gilt für den direkten Vergleich der $G_{o1}\alpha^{-t-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-t-}$ Mäuse (B, C, D). Tieranzahl: n = 21 WT, 7 $G_{o1}\alpha^{-t-}$, 8 $G_{o1/2}\alpha^{-t-}$, 6 $G_{o2}\alpha^{-t-}$ (jeweils 3-7 Durchgänge pro Tier).

Die Auswertung des Versuchs veranschaulicht deutlich, dass $G_{o2}\alpha^{-/-}$ Mäuse in Bezug auf ihr motorisches Verhalten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen keinen Unterschied in ihrer Darbietung auf dem rotierenden Stab zeigen. Dies gilt für alle untersuchten Kriterien und steht im Einklang mit der beobachteten motorischen Aktivität dieser Tiere bevor sie mit Psychostimulanzien behandelt wurden (Brunk et al., 2008, 2010). In diesen Studien wurde die durch die Mäuse zurückgelegte Strecke als Kriterium der Darbietung motorischer Aktivität ausgewertet und es zeigten sich erst nach Injektion von Kokain oder Amphetamin signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp- und $G_{o2}\alpha^{-/-}$ Mäusen.

 $G_{o1}\alpha^{-/-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäuse hingegen zeigen für alle untersuchten Kriterien hochsignifikante Unterschiede zu Wildtyp- und $G_{o2}\alpha^{-/-}$ Mäusen im Rota Rod-Experiment, interessanterweise aber auch zueinander. $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Mäuse, die wie bereits beschrieben eine erhöhte $G_{o2}\alpha$ -Expession aufweisen (**Abb. 41**), zeigen im Vergleich zu $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäusen, welche weder $G_{o1}\alpha$ noch $G_{o2}\alpha$ besitzen, eine signifikant schlechtere Darbietung im Rota Rod-Experiment. $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Mäuse verbleiben im Durchschnitt 50sek auf dem rotierenden Stab und beginnen im Durchschnitt bereits nach 15sek mit den Eigenrotationen. $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäuse dagegen fallen im Durchschnitt nach ca. 30sek. Wildtyp- und $G_{o2}\alpha^{-/-}$ Mäuse verbleiben im Durchschnitt 150sek auf dem rotierenden Stab und erste Eigenrotationen beginnen nach 65sek.

Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Überschuss an $G_{o2}\alpha$ bei gleichzeitigem Fehlen von $G_{o1}\alpha$ eine starke Beeinträchtigung des motorischen Verhaltens der Mäuse auslöst. Die zusätzliche genetische Deletion des $G_{o2}\alpha$ mildert diese Beeinträchtigung ($G_{o1/2}\alpha^{-/-}$), während diese bei alleinigem Deletieren des $G_{o2}\alpha$ ($G_{o2}\alpha^{-/-}$) sogar aufgehoben wird.

4.3.3 Wachstum und Entwicklung der $G_{o1}\alpha^{-/-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäuse

Vergleicht man die Würfe des jeweiligen *Knockout*-Stammes miteinander, zeigt sich, dass die Gesamtanzahl der Tiere pro Wurf im $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Stamm gegenüber den Mäusen des $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Stammes signifikant erhöht ist (**Abb. 43** A). Dieser Effekt kommt vor allem durch die zum $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Stamm signifikant erhöhte Anzahl der heterozygoten Tiere des $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Stammes zustande (**Abb. 43** A). Die Geburtenrate der $G_{o1}\alpha^{-/-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäuse des jeweiligen Stammes (< 25%) ist im Vergleich und zugunsten der Wildtyp-Wurfgeschwister (> 25%) hochsignifikant verringert (**Abb. 43** B). Die heterozygoten Wurfgeschwister nehmen, wie erwartet, im Wurf einen Anteil von ca. 50% ein (**Abb. 43** B). Dies korreliert mit den von Jiang bzw. Valenzuela und Kollegen publizierten Daten zu den Würfen der von ihnen jeweils gezüchteten $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Stämme (Valenzuela et al., 1997, Jiang et al., 1998). Die durchschnittlich reduzierte Anzahl von *Knockout*-Tieren gegenüber ihren Wildtyp-

Wurfgeschwistern zeigt im Vergleich der beiden Stämme ($G_{o1}\alpha^{-/-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$) keinen signifikanten Unterschied (**Abb. 43** C).



Abb. 43: Geburtenrate von Wildtyp-, $G_{o1}\alpha^{-1}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-1}$ Mäusen.

Die Würfe des $G_{01}\alpha^{-t}$ und $G_{01/2}\alpha^{-t}$ Stammes wurden über mehrere Monate hinsichtlich der Anzahl der Wurfgeschwister analysiert und miteinander verglichen. **A** Durchschnittliche Anzahl der jeweiligen Wurfgeschwister und Gesamtanzahl der Tiere pro Wurf. **B** Durchschnittliche Anzahl der jeweiligen Wurfgeschwister pro Wurf in Prozent. **C** Durchschnittliche Differenz der Anzahl von WT- zu KO-Mäusen im Wurf für den jeweiligen Stamm in Prozent. Im Vergleich der beiden KO-Stämme zeigt sich, dass die durchschnittliche Gesamtanzahl an Tieren pro Wurf im $G_{01/2}\alpha^{-t}$ Stamm gegenüber dem $G_{01}\alpha^{-t}$ Stamm signifikant erhöht ist (A). Dies ist die Folge der signifikant erhöhten Anzahl an heterozygoten Wurfgeschwistern im $G_{01/2}\alpha^{-t}$ Stamm (A). In der prozentualen Darstellung zeigt sich, dass im Durchschnitt die Anzahl der KO-Tiere des jeweiligen Stammes gegenüber den WT-Wurfgeschwistern hochsignifikant verringert ist (B). Dabei liegt eine erhöhte Anzahl an WT-Tieren (>25%) und verringerte Anzahl an KO-Mäusen (<25%) vor. Die Anzahl der heterozygoten Wurfgeschwister liegt im Schnitt ca. bei den erwarteten 50%. Zwischen den Stämmen liegt kein signifikanter Unterschied bezüglich der in (B) festgestellten hochsignifikanten Differenz in der durchschnittlichen Anzahl von WT- zu KO-Tieren vor (C). $G_{01}\alpha$ -Deletionsmutante: n = 119 Würfe; $G_{01/2}\alpha$ -Deletionsmutante: n = 77 Würfe.

Im Gegensatz zu $G_{o2}\alpha^{-/-}$ Tieren sind $G_{o1}\alpha^{-/-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäuse wachstumsretardiert und weisen eine verkürzte Lebensspanne auf. Für den $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Stamm konnte über eine umfangreiche Beobachtung und Auswertung der Würfe das Durchschnittsalter der *Knockout*-Tiere (**Abb. 44**) und die Gewichtsentwicklung der Wurfgeschwister unter unterschiedlichen Bedingungen (**Abb. 45**) festgestellt werden. Dabei wurden die Würfe aufgeteilt und eine Hälfte der Jungtiere dem Muttertier überlassen, die andere Hälfte einer Amme (+ Amme). Eine geringere Tieranzahl im Wurf verringert das kompetitive Verhalten bei der Nahrungsaufnahme am Muttertier bzw. der Amme. Zusätzlich wurde einem Teil der Würfe Feuchtfutter verabreicht (+ Feuchtfutter). Dadurch konnte gewährleistet werden, dass die Wachstumsretardation und die verkürzte Lebensspanne der *Knockout*-Tiere keine Folge des Verhungerns durch Nichterreichen der Nahrung ist. Ein weiterer Teil der Würfe blieb unverändert (-Amme / -Feuchtfutter).

Je nach Auswertungsmethode zeigt sich, dass das Durchschnittsalter der $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Mäuse bei 24 (Median) bzw. ca. 32 Tagen (Mittelwert) liegt (**Abb. 44** A). Darauf haben das Aufteilen des Wurfes und die Gabe von Feuchtfutter keinen Einfluss. Dennoch zeigt sich durch die Darstellung im Boxplot-Diagramm, dass ein großer Prozentsatz der Tiere, die eine geringere Konkurrenz beim Säugen durch das Muttertier oder der Amme erfahren, ein höheres Alter erreichen als Tiere aus Würfen, welche nicht aufgeteilt wurden. Durch den Einsatz einer Amme erreichen 50% der Tiere ein Alter zwischen 20-60 Tagen während 50% der Tiere aus Würfen, die nicht aufgeteilt wurden, nur ein Alter von 20-30 Tagen erreichen (**Abb. 44** A).



Abb. 44: Durchschnittsalter der $G_{o1}\alpha^{-1}$ Mäuse.

 $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Mäuse wurden mit ihren Wurfgeschwistern über eine Altersspanne von 12 bis 120 Tagen beobachtet. Dabei wurde das Durchschnittsalter der Deletionsmutante ermittelt. **A** Durchschnittsalter der $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Mäuse bei Wurfaufteilung (+ Amme), Gabe von Feuchtfutter (+ Feuchtfutter) und unverändertem Wurf (- Amme / - Feuchtfutter). **B** Anzahl der $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Mäuse in Prozent, welche das indizierte Alter erreichen oder überschreiten. Auch hier wurde der Einfluss einer Wurfaufteilung und die Gabe von Feuchtfutter berücksichtigt. Das Durchschnittsalter der $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Mäuse liegt bei 24 (Median) bzw. ca. 32 Tagen (Mittelwert) (A). Es zeigt sich, dass in Altersgruppen oberhalb des Durchschnittsalters die Anzahl der Tiere stark abnimmt (B). Durch den Einsatz einer Amme wird das Überleben der Tiere gesteigert (A, B). Die Gabe von Feuchtfutter hat in der frühen Entwicklung der Tiere einen positiven Effekt auf deren Überleben bzw. Alter (B). Tieranzahl: + Amme / + Feuchtfutter: n = 22; - Amme / - Feuchtfutter: n = 65.

Unterteilt man die Mäuse in Altersgruppen, zeigt sich, dass der Großteil der Tiere innerhalb der ersten 30 Tage verstirbt (**Abb. 44** B). Weiterhin zeigt sich, dass in Altersgruppen oberhalb des Durchschnittsalters die Anzahl der Tiere stark abnimmt. Dieser Effekt kann durch das Aufteilen des Wurfes durch den Einsatz einer Amme deutlich reduziert werden. Die Gabe von Feuchtfutter hat in der frühen Entwicklung der Tiere einen positiven Effekt auf deren Überleben bzw. deren Alter (**Abb. 44** B). Das verfrühte Sterben der Tiere ist keine Folge des Nichterreichens der Nahrung. Trotzdem lassen sich positive Effekte durch die Wurfaufteilung über das Einsetzen einer Amme und die Gabe von Feuchtfutter auf das Überleben und Alter der G₀₁ $\alpha^{-/-}$ Mäuse verzeichnen. Die Wachstumskurve zeigt, dass G₀₁ $\alpha^{-/-}$ Tiere, die das mittlere Alter von 24 Tagen überleben, sich unter allen Bedingungen dem Verlauf der Wachstumskurve der Wildtyp-Wurfgeschwister anpassen (**Abb. 45**). Zuvor, in den ersten 22 Tagen, verzeichnen G₀₁ $\alpha^{-/-}$ Tiere kaum Änderungen in ihrem Körpergewicht. Ab dem 22. Tag (p22) erfolgt dann ein starker Gewichtszuwachs. Dennoch bleibt dabei das Gewicht der *Knockout*-Tiere unter allen Bedingungen dem Wildtyp-Wurfgeschwistern verringert.

Die Wachstumskurve zeigt auch deutlich, dass das Aufteilen des Wurfes mit Hilfe einer Amme zu teilweise signifikanten Unterschieden in der Gewichtszunahme der Tiere führt, verglichen mit Würfen, in welchen die Anzahl der Jungtiere unverändert blieb. Dies gilt sowohl für Wildtyp-Mäuse als auch für $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Tiere. Dabei ist der Effekt bei den *Knockout*-Mäusen wesentlich stärker ausgeprägt. Die Gabe von Feuchtfutter hat keinen Einfluss auf die Gewichtszunahme der Tiere.

In einer weiteren Studie wurde das Körper- wie auch das Gehirngewicht von $G_{o1}\alpha^{-/-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Tieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Jungtierentwicklung mit dem der jeweiligen heterozygoten und Wildtyp-Wurfgeschwister verglichen (**Abb. 46**). Diese Studie zeigt, dass während der Entwicklung vom 4. bis 20. Tag (p4-p20) das Körpergewicht der $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Tiere ähnlich der $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Tiere gegenüber den Wildtyp-Wurfgeschwistern signifikant reduziert ist (**Abb. 46** A). Diese Studie zeigt auch, dass die Entwicklung des Gehirns der *Knockout*-Tiere beider Stämme von der Wachstumsretardation betroffen ist (**Abb. 46** B). Auch hier zeigen sich signifikante Unterschiede im Vergleich zu den jeweiligen Wildtyp-Wurfgeschwistern. Heterozygote Wurfgeschwister beider Stämme sind von der Wachstumsretardation nicht betroffen (**Abb. 46** A + B). Bildet man das Verhältnis vom Gehirn- zum Körpergewicht, zeigt sich im Vergleich von Wildtyp-Mäusen und Deletionsmutante, dass die Zunahme des Körpergewichts stärker retardiert ist als die Zunahme des Gehirngewichts (**Abb. 46** C).



Abb. 45: Gewichtsentwicklung der $G_{o1}\alpha^{-4}$ Mäuse und deren Wildtyp-Wurfgeschwistern.

G₀₁α^{-/-} Mäuse wurden mit ihren Wurfgeschwistern über eine Altersspanne von p12 bis p120 zu unterschiedlichen Konditionen beobachtet. Hier wurde die Gewichtsentwicklung der Tiere im Vergleich dargestellt. Die Tiere wurden entweder mit Feuchtfutter versorgt oder mit Hilfe einer Amme der Tieranzahl nach aufgeteilt. Als Kontrolle hierzu wurden Würfe ebenfalls unverändert beibehalten. **A** Wachstumskurve der Wildtyp- und G_{o1} $\alpha^{-/}$ Mäuse bei unterschiedlichen Bedingungen. B Vergrößerung des unter (A) markierten Ausschnitts. Der Graph zeigt deutlich, dass unabhängig der Bedingungen, denen der jeweilige Wurf ausgesetzt war, KO-Tiere über den Beobachtungszeitraum eine Wachstumsretardation zeigen. Während unter allen drei Bedingungen bei WT-Tieren eine stetige Gewichtszunahme zu beobachten ist, welche ab ca. 40 Tagen in eine Sättigung mündet, bleibt das Gewicht der $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Mäuse bis zu einem Alter von 22 Tagen nahezu auf dem selben Niveau. Ab p22 folgt auch der Gewichtsverlauf der KO-Tiere einer Sättigungskurve. Das Durchschnittsalter der $G_{o1}\alpha^{-t}$ Mäuse beträgt 24 Tage (s. Abb. 44). Ist dieses Alter erreicht bzw. wird es von den KO-Mäusen überlebt, können die Tiere das adulte Alter erreichen, auch wenn sie im Vergleich zu WT-Tieren ein geringeres Gewicht beibehalten. Durch den Einsatz einer Amme wird die Gewichtszunahme der Tiere im Säugealter (p12-p21) signifikant gegenüber Würfen verbessert, welche nicht aufgeteilt wurden (rote Kurve gegenüber blau und grüner Kurve). Dieser Effekt besteht für Wildtyp- als auch für KO-Tiere, ist aber bei den $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Mäusen stärker ausgeprägt. Das Feuchtfutter hat darauf keinen Einfluss, da sich die jeweils grüne und blaue Kurve nicht signifikant unterscheidet. Tieranzahl: + Amme / + Feuchtfutter: n = 19 KO, 24 WT; - Amme / + Feuchtfutter: n = 12 KO, 17 WT; - Amme / - Feuchtfutter: n = 44 KO, 36 WT (im Alter von p12).



Abb. 46: Entwicklung des Körpergewichts und des Gehirns von $G_0 \alpha^{-1}$ Mäusen und deren Wurfgeschwistern.

Während der postnatalen Entwicklung der Mäuse wurde deren Körper- und Gehirngewicht im Alter von 4, 8, 16 und 20 Tagen (p4-20) bestimmt. **A** Verlauf des Körpergewichts während der postnatalen Entwicklung der Mäuse. **B** Verlauf des Gehirngewichts während der postnatalen Entwicklung der Mäuse. **C** Verhältnis vom Gehirn- zum Körpergewicht im angegebenen Entwicklungszeitraum. Es zeigt sich, dass sowohl bei $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ als auch bei $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäusen das Körpergewicht gegenüber den heterozygoten und Wildtyp-Wurfgeschwistern während der postnatalen Entwicklung hochsignifikant reduziert ist (A). Dies gilt nicht für den Vergleich der heterozygoten Mäuse mit den entsprechenden Wildtyp-Tieren. Auch das Gehirn der KO-Tiere ist im Verlauf der postnatalen Entwicklung gegenüber den entsprechenden heterozygoten und Wildtyp-Mäusen signifikant wachstumsretardiert (B). Das Gehirngewicht der heterozygoten Mäuse unterscheidet sich nicht zu den Wildtyp-Tieren. Die Verhältniskurve des Gehirngewichts zum Körpergewicht zeigt, dass die Zunahme des Körpergewichts stärker retardiert ist als die Zunahme des Gehirngewichts (C). Tieranzahl pro Wert: n = 11-123.

Im Vergleich der beiden *Knockout*-Stämme zeigt sich, dass $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäuse stärker von der Retardation des Körpergewichts im Altersabschnitt von 12-20 Tagen betroffen sind als $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Tiere (**Abb. 47** A). Dieser Unterschied ist allerdings unter Berücksichtigung der Standardabweichung sehr gering. Im Vergleich von $G_{o1}\alpha^{-/-}$ mit $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Tieren besteht nahezu kein Unterschied in der Entwicklung des Gehirns (**Abb. 47** B).



Abb. 47: Entwicklung des Körpergewichts und des Gehirns von $G_{o1}\alpha^{-1}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-1}$ Mäusen im Vergleich.

Während der postnatalen Entwicklung der Mäuse wurde deren Körper- und Gehirngewicht im Alter von 4, 8, 16 und 20 Tagen (p4-20) bestimmt. **A** Verlauf des Körpergewichts während der postnatalen Entwicklung der Mäuse. **B** Verlauf des Gehirngewichts während der postnatalen Entwicklung der Mäuse. G_{o1/2} $\alpha^{-/-}$ Mäuse sind stärker von der Wachstumsretardation im Altersabschnitt von 12-20 Tagen betroffen als G_{o1} $\alpha^{-/-}$ Mäuse (A). Dies gilt nicht für die Entwicklung des Gehirns, die annähernd gleich verläuft (B). Tieranzahl pro Wert: n = 11-123.

Diese Daten korrelieren mit den bereits durch Jiang und Kollegen veröffentlichten Daten den $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Stamm betreffend (Jiang et al., 1998). Sie zeigen, dass auch $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäuse gegenüber ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern eine reduzierte Überlebenschance besitzen. Nach dem Absetzen vom Muttertier sind nur 7% der Tiere homozygote *Knockout*-Mäuse. Außerdem sind 3 Wochen alte $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäuse klein. Ihr durchschnittliches Körpergewicht macht nur 45% des Gewichts der Wildtyp-Wurfgeschwister aus (s. auch **Abb. 46** A). Nach 7 Wochen sind bereits 50% der $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Tiere verstorben. Tiere, die überleben, gleichen sich in ihrer Entwicklung den Wildtyp-Wurfgeschwistern an.

 $G_{o2}\alpha^{-/-}$ Tiere sind dagegen nicht von einer Wachstumsretardation oder einer verkürzten Lebensspanne betroffen und erreichen das fortpflanzungsfähige Alter (Daten nicht gezeigt).

4.3.4 Western Blot-Analyse von Schlüsselenzymen bekannter Wachstumssignalwege in Wildtyp-, $G_{o1}\alpha^{-/-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäusen

Da $G_{o1}\alpha^{-t}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-t}$ Mäuse wachstumsretardiert sind, erfolgte hier die quantitative WB-Analyse von Proteinkinasen, welche an Signalkaskaden beteiligt sind, die das Wachstum, das Altern und den Energiemetabolismus des Organismus bestimmen. Das über die spezifischen Antikörper für Akt, P-Akt, AMPK und P-PKA vermittelte Signal wurde über das Signal des internen Standards SYB normalisiert (**Abb. 48**).



Abb. 48: Quantitative WB-Analyse der Expression von Schlüsselenzymen bekannter Wachstumssignalwege in Synaptosomen.

Es wurde wie in **Abb. 36** verfahren. **A** Nachweis der AKT Kinase in WT-, $G_{01}\alpha^{-t}$ und $G_{01/2}\alpha^{-t}$ Synaptosomen. **B** Nachweis der P-AKT Kinase in WT-, $G_{01}\alpha^{-t}$ und $G_{01/2}\alpha^{-t}$ Synaptosomen. **C** Quantitative Auswertung der unter (A) und (B) erhaltenen Signale im WB. **D** Analyse des P-AKT/AKT Verhältnisses für die jeweiligen Mäusestämme. **E** Nachweis der AMPK in WT-, $G_{01}\alpha^{-t}$ und $G_{01/2}\alpha^{-t}$ Synaptosomen. **F** Nachweis der P-PKA in WT- und $G_{01/2}\alpha^{-t}$ Synaptosomen. **F** Nachweis der P-PKA in WT- und $G_{01/2}\alpha^{-t}$ Synaptosomen. **G** Quantitative Auswertung der unter (E) und (F) erhaltenen Signale im WB. Es besteht kein Unterschied bezüglich der AKT-, P-AKT-, AMPK- und P-PKA-Menge in Synaptosomen im Vergleich der KO-Tiere zu ihren WT-Wurfgeschwistern (C, G). Dies gilt auch für das Verhältnis der P-AKT zur AKT (D).

Akt, auch Proteinkinase B (PKB) genannt, ist an Signalwegen beteiligt, welche über die Kinasekaskade PI3K/PTEN/Akt/mTOR und weitere Proteine externe Signale in den Nukleus von Zellen übertragen, um dort die Gen-Expression zu steuern. (Steelman et al., 2011). Diese Signalwege bestimmen die Proliferation und das Apoptose-Verhalten von Zellen mit und werden daher mit Wachstum, maligner Entartung und dem Altern in Verbindung gebracht (Chappell et al., 2011, Steelman et al., 2011). Weiterhin wird der Energie-Stoffwechsel maßgeblich von Akt-Isoformen beeinflusst (Schultze et al., 2011).

Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) wird bei zellulärem Stress, wie z. B. Glukosemangel, aktiviert und blockt daraufhin ATP verbrauchende Signalwege, während sie ATP synthetisierende Signalwege aktiviert, um so das Überleben der Zellen zu sichern (Mantovani und Roy, 2011). Durch die Phosphorylierung zahlreicher Zielproteine, die den Metabolismus steuern, und die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren sorgt die AMPK dafür, dass der zelluläre Energiehaushalt aufrecht gehalten wird (Beauloye et al., 2011). Weiterhin ist die AMPK in der Lage das Zellwachstum zu inhibieren.

Die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) ist eine der ersten Proteinkinasen, die entdeckt und näher charakterisiert wurde (Walsh et al., 1968). Sie vermittelt zahlreiche der für den *second messenger* cAMP beschriebenen Effekte, wie die Regulation des Zellzyklus, der Proliferation, der Differenzierung, der Mikrotubulidynamik, von Ionenströmen, der Exozytose in polarisierten Epithelzellen und weitere Effekte (Überblick von Tasken und Aandahl, 2004). Die PKA und cAMP sind weiterhin an der Regulation der synaptischen Plastizität beteiligt (Waltereit und Weller, 2003).

Die Proteinkinasen Akt / P-Akt, AMPK und P-PKA alternieren allerdings nicht in ihrer Expression in Synaptosomen des Gehirns von $G_{o1}\alpha^{-/-}$ bzw. $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäusen im Vergleich mit deren Wildtyp-Wurfgeschwistern (**Abb. 48**). Daher kann eine Fehlregulierung der Expression dieser Enzyme, zumindest auf der Gehirnebene, nicht als Ursache für die Wachstumsretardierung der $G_o\alpha$ -Deletionsmutanten herangezogen werden.

5 Diskussion

5.1 VMAT-G_o-Signaltransduktion

Unserer Hypothese nach wird das Go-Protein durch den VMAT aktiviert und reguliert rückwirkend dessen Aktivität. Viele Befunde vorangegangener Studien haben zu diesem Modell geführt, in welchem der VMAT über eine GPCR-ähnliche Funktion das Vesikelassoziierte Go-Protein aktiviert, woraufhin die Go2a-Isoform in einer negativen Rückkopplungsschleife direkt oder indirekt über nachgeschaltete Signaltransduktionskaskaden die Transport-Aktivität des VMAT selbst mindert. Der Einsatz von 5-HT_{1B}- und α_1 -Rezeptor Agonisten bzw. Antagonisten führte zur Hypothese, dass eine GPCR-ähnliche Struktur an der G_{o2}-abhängigen Signaltransduktion beteiligt ist, die zur Verminderung der Transportaktivität des VMAT führt (Brunk et al., 2006). Die Aktivierung der GPCR-ähnlichen Struktur scheint durch die intravesikuläre Monoaminkonzentration über die große luminale Schleife des VMAT vermittelt zu werden. Dies zeigten in vitro-Versuche an Thrombozyten aus TPH1^{-/-} Mäusen, welche kaum Serotonin enthielten (Höltje et al., 2003) und Versuche an nicht-monoaminergen CHO-Zellen, die den VMAT in dessen Gesamtlänge und eine um die große luminale Schleife trunkierte Version des VMAT exprimierten (Brunk et al., 2006). Da Vesikel selbst keine GPCRs enthalten und in Anwesenheit der trunkierten Version des VMAT2 die G_{o2}-abhängige Minderung der vesikulären Monoaminaufnahme fehlt, kann daraus geschlossen werden, dass der VMAT selbst eine GPCR-ähnliche Funktion besitzt. Bestätigt sich dieses Modell, wäre es das erste Mal, dass gezeigt werden konnte, dass ein Membrantransporter neben seiner eigentlichen Funktion zusätzlich die eines Rezeptors innehat, in diesem Falle eines GPCRs. Es gibt bereits Beispiele anderer Faktoren, die strukturell nur geringe Homologien zu heptahelikalen GPCRs aufweisen, allerdings dennoch trimere G-Proteine zu aktivieren scheinen (s. u.; Higashijima et al., 1988, Nishimoto et al., 1989, Higashijima et al., 1990, Strittmatter et al., 1991a, b, Oppi et al., 1992, Sudo et al., 1992, Nishimoto et al., 1993). Weiterhin gibt es bereits ein Modell, in welchem Vesikel-assoziierte, monomere G-Proteine die Vesikelphysiologie regulieren. Eine Studie an Thrombozyten zeigte, dass kleine monomere GTPasen über einen Rezeptor-freien Mechanismus an der Regulation vesikulärer Prozesse beteiligt sind. Es konnte gezeigt werden, dass die kleinen GTPasen Rab4 und RhoA durch Serotonin-Transamidierung ("Serotonylierung") über Transglutaminasen in Nukleotid-unabhängiger Weise konstitutiv aktiviert werden und über diesen Mechanismus die Exozytose der α-Granula in Thrombozyten regulieren (Walther et al., 2003).

In Bezug auf den VMAT-G_o-Signalweg geht das Modell allerdings noch weiter, da wir davon ausgehen, dass der VMAT ebenfalls Effektor seiner selbst induzierten Signaltransduktionskaskade ist. Dies zeigte die verminderte vesikuläre Monoaminaufnahme in Anwesenheit von GTP-Analoga bzw. aufgereinigtem $G_{o2}\alpha$, welche in $G_{o2}\alpha$ -Deletionsmutanten oder nach Behandlung mit Pertussistoxin nicht vorhanden war und auch nicht durch andere aufgereinigte $G\alpha$ -UE hervorgerufen wurde (Ahnert-Hilger et al., 1998, Höltje et al., 2000, Pahner et al., 2002, Höltje et al., 2003, Brunk et al., 2008). Die $G_{o2}\alpha$ -abhängige Signaltransduktion scheint allerdings nicht die Azidifizierung, also das Δ pH des Vesikels zu beeinflussen, wie Versuche mit Acridin Orange zeigten (Ahnert-Hilger et al., 1998). Experimente mit [³H]Reserpin zeigten, dass dessen Bindung an den VMAT durch GTP γ S und $G_{o2}\alpha$ direkt verringert werden kann, wodurch der VMAT selbst und dessen Substratbindungsstelle als Ziel der $G_{o2}\alpha$ -Signaltransduktion in den Fokus rückte.

5.1.1 Hinweise auf eine VMAT2- $G_{o}\alpha$ -Interaktion

Im Falle des oben beschriebenen Modells ist eine Interaktion des VMAT mit dem trimeren G-Protein G_0 erforderlich bzw. mit dessen Anteilen, der $G_0\alpha$ -UE oder dem $\beta\gamma$ -Komplex. Um diese Interaktion nachzuweisen, wurden in dieser Arbeit molekularbiologische Methoden eingesetzt, in denen zytoplasmatische Anteile des VMAT2, der VMAT2 in dessen gesamter Länge und $G_{02}\alpha$ in dessen dominant negativer, konstitutiv aktiver und Wildtyp-Variante verwendet wurden. Hier wurde ausschließlich die $G_{o2}\alpha$ -Isoform eingesetzt, da die Verminderung der vesikulären Monoaminaufnahme in neuronalen Zelltypen und in Bezug auf G-Proteine der Gi-Familie Go2a-spezifisch ist. Die Ergebnisse dieser Experimente legen eine VMAT2-G_o-Interaktion nahe. Über das Y2H-Verfahren konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus des VMAT2 mit allen drei Varianten der G₀₂ α -UE und mit der G_{β1}bzw. Gβ_{2like1}-UE interagiert und daher als mögliche Rezeptor- aber auch Effektor-Domäne in Frage kommt. Die VMAT2-CT- $G_0\alpha$ -Interaktion ließ sich dann schließlich über den GST-PD bestätigen. Der GST-PD zeigte zudem, dass auch der N-Terminus des VMAT2 an der Interaktion zu $G_0\alpha$ beteiligt ist. Dies ist aufgrund der dreidimensionalen Struktur des Transporters in der Membran nicht ungewöhnlich, da so beide Domänen (N- und C-Terminus) in einem geringen Abstand zueinander angeordnet sind. Weiterhin ist bekannt, dass GPCRs mit verschiedenen Domänen an trimere G-Proteine koppeln, unter anderem über Anteile der 2. und 3. zytoplasmatischen Schleife (Übersicht von Wess, 1997, LeVine, 1999, Huang und Tesmer, 2011).

5.1.2 Hinweise auf eine VMAT2-Gβ-Interaktion

Über den GST-PD konnte auch eine Interaktion des VMAT2-N-Terminus mit G β -UE nachgewiesen werden. Da ein polyklonaler Antikörper eingesetzt wurde, der G β_{1-4} detektiert, konnte der an der Interaktion beteiligte G β -Subtyp nicht eindeutig bestimmt werden.

Die Gβ-UE konnte neben dem Gehirnhomogenat aus Wildtyp-Mäusen ebenfalls aus dem Homogenat von $G_{01/2}\alpha^{-1}$ Gehirnen kopräzipitiert werden, wie der WB in **Abb. 31** zeigt. Da über den GST-PD Proteinkomplexe über eine Interaktion zu GST-Fusionsproteinen kopräzipitiert werden können, zeigt das letzte Ergebnis, dass die VMAT2-NT-Gβ-Interaktion nicht von der G_oα-UE abhängt. Dieser Befund könnte ein Indiz dafür sein, dass es sich möglicherweise um eine $G_{\beta\gamma}$ -Effektor-Interaktion handelt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass vor allem Gβ-Sequenzabschnitte mit Effektoren interagieren und diese auch unabhängig der G_Y-UE in der Lage sind Effektoren in einer G_BY-ähnlichen Weise zu regulieren (Übersicht von LeVine, 1999). Im Gegensatz dazu kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Interaktion der G_o α -UE an den VMAT2 von G β bzw. dem $\beta\gamma$ -Komplex abhängt. In diesem Falle könnte die VMAT2-NT-G
ß-Interaktion in Wirklichkeit auch einer Interaktion mit der Gy-UE zugrunde liegen, da deren Einfluss auf die Kopplung von trimeren G-Proteinen an entsprechende GPCRs bereits gezeigt wurde (Übersicht von Wess, 1997, LeVine, 1999, Huang und Tesmer, 2011). Im $G\alpha\beta\gamma$ -Komplex scheint der Cterminale Anteil des Gy bei der Interaktion der benachbarten N-terminalen Domäne des $G\alpha$ an GPCRs eine unterstützende Rolle zu spielen. Beide Domänen sind posttranslational mit Lipid-Ankern modifiziert und damit für die Assoziation des heterotrimeren G-Proteins an die Membran verantwortlich. In diesem Falle wäre der Nachweis der Gy-UE im WB im Anschluss an einen GST-PD mit VMAT2-NT- und -CT-Fusionsproteinen erforderlich.

Das Immunsignal des WBs in **Abb. 31** zeigt allerdings, dass sich die G β -UE im Vergleich zum Wildtyp nur in sehr geringen Mengen aus dem Homogenat der G_{01/2} $\alpha^{-/-}$ Gehirne kopräzipitieren lässt. Dies ist wahrscheinlich auf die reduzierte Gesamtmenge des $\beta\gamma$ -Komplexes in G_{01/2} $\alpha^{-/-}$ Mäusen zurückzuführen. Entsprechend der um G₀₁ α und G₀₂ α verminderten Gesamtmenge des G α im Gehirn von G_{01/2} $\alpha^{-/-}$ Mäusen liegt hier weniger $\beta\gamma$ -Komplex vor (Valenzuela et al., 1997, Jiang et al., 1998). Die Gesamtmenge des $\beta\gamma$ -Komplexes ist damit verringert und es liegt keine Erhöhung des freien Komplexes vor. Daher lässt sich insgesamt weniger G β über den VMAT2-N-Terminus kopräzipitieren.

5.1.3 Einschränkungen des Y2H-Verfahrens zum Nachweis von G-Protein-Interaktionen

Der Nachweis der VMAT2- $G_{o2}\alpha$ -Interaktion über das Y2H-Verfahren stellte sich als schwierig heraus. Teilweise ist ein Hintergrundwachstum nicht gänzlich auszuschließen und teilweise resultierte nach Kotransformation einiger Plasmid-Kombinationen kein Hefewachstum auf hochstringentem Medium, obwohl dies erwartet wurde. Im Split-Ubiquitin-Verfahren ist z. B. eine Voraussetzung für das Funktionieren der konstitutiv aktiven und

dominant negativen Variante des $G_{o2}\alpha$, dass diese in den Hefezellen eine entsprechende Konformation einnehmen. Dafür muss am G₀₂αQ205L ein Nukleotidaustausch stattfinden, welcher es in dessen aktivierte Konformation bringt bzw. eine Interaktion des $G_{\alpha 2} \alpha S47N$ mit GDP und einem βγ-Komplex vorliegen. Dies ist nicht gewährleistet. In Hefezellen fehlendes, für Säugerproteine funktionelles G β bzw. G $\beta\gamma$ könnte ein Grund für das Fehlen einer Interaktion sein. Auch weitere an der Interaktion beteiligte und dafür essentielle Faktoren könnten fehlen. Eine weitere Erklärung mag sein, dass für die Interaktion posttranslationale Modifikationen der beteiligten Domänen nötig sind, wie z. B. das Anfügen von Lipid-Ankern, welches in Hefezellen im Anschluss an die ektopische Expression der Säuger-Fusionsproteine nicht erfolgt. Im GST-PD wird aus dem postnukleären Überstand des Mäusegehirnhomogenats präzipitiert in welchem alle nötigen Faktoren und möglichen Proteinkomplexe vorhanden sind. Weiterhin könnte eine Hinderung der Interaktion durch die fusionierten GAL4- bzw. Ubiquitin-Abschnitte erfolgen auf die das fusionierte GST keinen Einfluss hat. In beiden angewandten Y2H-Verfahren wurde ein Plasmid verwendet, über welches die GAL4- bzw. Ubiquitin-Domäne ausschließlich N-terminal an den VMAT2 fusioniert wurden, welche so die Interaktion des VMAT2-N-Terminus gegebenenfalls behindern. Gleiches gilt für eine möglicherweise falsche Faltung der Säugerproteine in Hefezellen. Ein weiterer Grund könnte aber auch die transiente und schwache Interaktion heterotrimerer G-Proteine sein, die nicht ausreicht, um das Reportergensystem der Hefen und damit deren Wachstum zu aktivieren.

5.1.4 G-Protein-aktivierende Peptide, die nicht GPCRs entsprechen

Es konnte gezeigt werden, dass einige Faktoren existieren, die aufgrund ihrer strukturellen Merkmale nicht zu den GPCRs zählen aber dennoch G-Proteine zu aktivieren vermögen. Die Analyse der Eigenschaften und ein Sequenzvergleich dieser Peptide mit den zytoplasmatischen Domänen des VMAT2 (N- und C-Terminus) können Hinweise auf ein möglicherweise konserviertes Motiv liefern, das für die G-Protein-Aktivierung verantwortlich ist. Bereits 1988 wurde nachgewiesen, dass Mastoparan, ein Peptid-Toxin aus dem Wespen-Gift, in einer GPCR-ähnlichen Weise das G₀-Protein aktiviert (Higashijima et al., 1988). Mastoparan ist ein kationisches, amphiphiles Peptid, dessen Struktur, wenn es an eine Lipid-Doppelschicht assoziiert ist, Anteilen der zytoplasmatischen Schleifen von GPCRs ähnelt (Higashijima et al., 1988, 1990). Dabei nimmt Mastoparan eine Helix-Struktur an, die sich parallel zur Membran ausrichtet wobei sich die hydrophobe Seite innerhalb der Lipid-Doppelschicht befindet und die vier positiv geladenen basischen Reste herausschauen. Bei diesen Resten handelt es sich um drei Lysin-Reste und die terminale Aminogruppe. Generell scheinen kationische, amphiphile Peptide eine G-ProteinAktivierung hervorzurufen, wie eine Studie mit verschiedenen Variationen der Mastoparan-Sequenz zeigte (Oppi et al., 1992).

Weitere Studien zeigten, dass auch ein Peptid des IGF-II/M6P- (insulin-like growth factor-II / mannose 6-phosphate)-Rezeptors G-Proteine über eine GPCR-ähnliche Funktion aktiviert (Nishimoto et al., 1989, Okamoto et al., 1990). Dies gilt vor allem für Gi2, aber auch für Go, obwohl dies in einer deutlich abgeschwächten Weise erfolgt. Der IGF-II/man6P-Rezeptor besitzt keine heptahelikale GPCR-typische Struktur sondern lediglich eine einzelne Transmembrandomäne. Das Peptid der Aminosäure-Reste 2410-2423 des menschlichen IGF-II/M6P-Rezeptors ist konserviert und zeigt Ähnlichkeiten zu Mastoparan und zytoplasmatischen Anteilen von GPCRs (Okamoto et al., 1990). Es ist ebenfalls amphiphil und besitzt mehrere kationische, basische Reste. Letztere liegen vereinzelt im Nterminalen Segment des Peptids vor (R_1 und R_2) und bilden im C-terminalen Segment das B-B-X-X-B bzw. B-B-X-B Motiv, wobei B für einen basischen und X für einen variablen Aminosäure-Rest steht. Es konnte gezeigt werden, dass neben dem amphiphilen Charakter des Peptids und dessen daraus resultierender Anlagerung an die Lipid-Doppelschicht, diese basischen Reste essentiell für die G-Protein-Aktivierung sind. In GPCRs konnten ähnliche Motive in den zytoplasmatischen Domänen gefunden werden (Okamoto et al., 1990).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das AP-Protein (APP, amyloid precursor protein) mit G_oa interagiert und wie ein G_o-gekoppelter Rezeptor funktioniert (Nishimoto et al., 1993). Hierfür ist die zytoplasmatische APP-Sequenz Histidin 657 bis Lysin 676 verantwortlich. Diese Sequenz beinhaltet abermals basische Reste im N-terminalen Abschnitt und ein B-B-X-X-B Motiv am C-Terminus. Für diese bereits beschriebenen Peptide gilt, dass die G-Protein-Aktivierung wesentlich effektiver erfolgt, wenn sie an eine Lipid-Doppelschicht assoziiert sind. Für das IGF-II/M6P-R- und APP-Peptid wirken zusätzliche N-terminale Reste, die der jeweiligen Transmembrandomäne entsprechen und damit neben der Amphiphilie des Peptids eine Assoziation an eine Lipid-Doppelschicht gewährleisten, fördernd auf die G-Protein-Aktivierung (Okamoto et al., 1990, Nishimoto et al., 1993). In Neuronen wird das Go-Protein durch die N-terminale Domäne des GAP-43 (growth associated protein 43) in einer GPCR-ähnlichen Weise aktiviert (Strittmatter et al., 1990, Sudo et al., 1992). GAP-43 ist ein intrazelluläres Protein des Wachstumskegels, das dort an die Zellmembran assoziiert ist und mit neuronalem Wachstum in Verbindung gebracht wird. Hier sind die Sequenz der zehn N-terminalen Aminosäure-Reste des GAP-43 und die darin enthaltenen Cystein-Reste an Position 3 und 4 essentiell für die Aktivierung des Go-Proteins. Diese Cystein-Reste werden palmitoyliert um GAP-43 an der Membran zu verankern. In diesem Zustand erfolgt keine Aktivierung des Go-Proteins. Erst nach Depalmitoylierung entfaltet GAP-43 seine GPCR-ähnliche Wirkung. Einen oder zwei solcher Cystein-Reste, die palmitoyliert werden, findet man ebenfalls in der zytoplasmatischen C-terminalen Domäne von GPCRs (Sudo et al., 1992). Diese und flankierende Aminosäure-Reste sind in GPCRs konserviert und zeigen Ähnlichkeit zum GAP-43-Sequenzmotiv. Die zytoplasmatische C-terminale Domäne der GPCRs bildet weiterhin eine amphiphile Helix, die parallel zur Plasmamembran verläuft (Übersicht von Huang und Tesmer, 2011) und zeigt somit ebenfalls Übereinstimmungen mit den Eigenschaften des Mastoparan-, IGFII/man6P-R- und APP-Peptids. Mutationen in dieser Domäne des β_2 adrenergen Rezeptors führen zu einer stark verminderten Aktivierung der Adenylylcyclase (O'Dowd et al., 1989). Vor allem findet man allerdings solche Motive, die amphiphile Helices bilden und für die Interaktion mit heterotrimeren G-Proteinen essentiell sind, in der zweiten zytoplasmatischen Schleife und dem N- und C-terminalen Abschnitt der dritten zytoplasmatischen Schleife von GPCRs (Übersicht von Wess, 1997, LeVine, 1999).

5.1.5 Sequenzvergleich zytoplasmatischer VMAT2-Domänen mit GPCRähnlichen Peptiden

Sequenzvergleiche der oben aufgeführten GPCR-ähnlichen Peptide, welche das Go-Protein aktivieren, mit der Peptidsequenz des zytoplasmatischen N- und C-Terminus von VMAT2 (VMAT2-NT und VMAT2-CT) zeigen starke Übereinstimmungen in den beschriebenen Motiven (Abb. 49, Abb. 50). Zunächst sind diese VMAT2-Sequenzen unter Säugetieren hochkonserviert (Abb. 49, Abb. 50 A). Der Sequenzvergleich des VMAT2-N-Terminus mit dem APP-Peptid 20 (Nishimoto et al., 1993) und den IGF-II/M6P-R-Peptiden 14 und 14G2 (Okamoto et al., 1990) zeigt, dass der VMAT2-NT ein für die Go-Protein-Aktivierung essentielles B-B-X-X-B Motiv enthält (Abb. 49 B-E). Hierbei ist der erste und letzte basische Aminosäure-Rest des Motivs im Vergleich aller aufgeführten Peptide hochkonserviert (Abb. 49 B-E). Dies gilt auch für den im IGF-II/M6P-R-Peptid enthaltenen basischen Aminosäure-Rest R₂, welcher ebenfalls für die G-Protein-Aktivierung essentiell ist. Weiterhin zeigt die Farbkodierung des Sequenzvergleichs, dass zumindest der Nterminale Abschnitt des VMAT2-NT-Peptids alternierend aus unpolaren und polaren Aminosäure-Resten besteht und somit evt. auch eine amphiphile Helix bildet (Abb. 49 A-E). Letzteres gilt auch für den N-terminalen Abschnitt des VMAT2-CT-Peptids (Abb. 50 A-C). Das VMAT2-CT-Peptid zeigt vor allem im Sequenzvergleich zum GAP-43-Peptid 25 (Sudo et al., 1992) ein identisches Motiv zu dessen ersten 10 Aminosäure-Resten, in welchem drei Reste hochkonserviert sind, darunter ein für die Go-Protein-Aktivierung essentieller Cystein-Rest (Abb. 50 B). Ebenfalls befindet sich darunter der zum IGF-II/M6P-R-Peptid 14 homologe R₂-Rest und weiter C-terminal gelegen ein zum B-X-X-B abgewandeltes Motiv (Abb. 50 C).

Vergleicht man die zytoplasmatischen Peptide VMAT2-NT und VMAT2-CT, welche in dieser Arbeit für das GAL4-basierte Y2H-Verfahren und den GST-PD eingesetzt wurden, mit denen des VMAT1, zeigt sich in letzteren zunächst ein ähnliches amphiphiles Sequenzmuster im N-terminalen Abschnitt beider Peptide (**Abb. 49** F, 47 D). Bei dem N- und C-Terminus des VMAT handelt es sich neben der luminalen Schleife zwischen der Transmembrandomäne 1 und 2 um die Abschnitte mit der größten Divergenz zwischen den beiden Subtypen. Trotzdem zeigt der Sequenzvergleich, dass die für die G₀-Protein-Aktivierung essentiellen Aminosäure-Reste und Motive zwischen VMAT1 und 2 in Säugetieren nahezu konserviert sind (**Abb. 49** F, 47 D). Dies gilt zumindest für den R₂-Rest des IGF-II/M6P-R-Peptids und für ein zu B-X-X-B abgewandeltes Motiv in der Peptidsequenz des VMAT1-N-Terminus (**Abb. 49** F).

Im C-Terminus ist vor allem der im GAP-43-Peptid enthaltene Cystein-Rest und das benachbarte Leucin in beiden VMAT-Isoformen hochkonserviert (**Abb. 50** D). Dies stimmt mit den Ergebnissen überein, welche zeigen, dass sowohl VMAT1 als auch VMAT2 die Signaltransduktion des G_{o2} in einer GPCR-ähnlichen Weise steuern (Brunk et al., 2006).

Der GST-PD dieser Arbeit zeigt, dass nur das N- und C-terminale Peptid des VMAT2 an der Interaktion mit G₀ beteiligt ist, nicht aber die dritte zytoplasmatische Schleife (*Loop* 3, VMAT2-L3) (**Abb. 31**). Dies stimmt mit dem Sequenzvergleich des VMAT2-L3 und G₀-Protein-aktivierenden Peptiden überein (**Abb. 51** A-C). Es wird deutlich, dass der VMAT2-L3 fast ausschließlich aus polaren Aminosäure-Resten besteht, somit kein amphiphiles Sequenzmuster zeigt und damit eine Assoziation an die Lipid-Doppelschicht unwahrscheinlich ist. Letzteres wurde für die G-Protein-Aktivierung als ebenso essentiell beschrieben, wie das Vorhandensein basischer Aminosäure-Reste (s. o.). Obwohl einzelne basische Aminosäure-Reste im VMAT2-L3 vorhanden sind liegen sie nicht in einem B-B-X-X-B-ähnlichen Motiv vor. Insgesamt liegen kaum Übereinstimmungen mit dem IGF-II/M6P-R-Peptid 14G2, dem APP-Peptid 20 und dem GAP-43-Peptid 25 vor (**Abb. 51** A-C).

Weiterhin zeigt der GST-PD, dass scheinbar beide $G_o\alpha$ -Isoformen mit dem VMAT2-Nund C-Terminus interagieren. Ähnliches konnte zumindest für das IGF-II/M6P-R-Peptid 14 gezeigt werden, welches G-Proteine in der Hierarchie $G_{i2} > G_{i1} \approx G_{i3} > G_o$ aktiviert (Okamoto et al., 1990). Die Autoren argumentieren mit Strukturen, die unter den Proteinen der G_i -Familie hochhomolog sind. Es ist weiterhin bekannt, dass verschiedene Domänen der GPCRs und G-Proteine für die Spezifität ihrer Interaktion verantwortlich sind und in einer kooperativen Weise für die korrekte G-Protein-Erkennung verantwortlich sind (Übersicht von Wess, 1997). Da im GST-PD die VMAT2-Peptide getrennt untersucht wurden, könnte die Selektivität der VMAT2-G_o-Protein-Interaktion verloren gegangen sein. Möglicherweise sind hierfür weitere zytoplasmatische Aminosäure-Reste oder auch Reste der Transmembrandomänen der nativen VMAT2-Konformation erforderlich, wie es für GPCRs bereits gezeigt werden konnte.

Abb. 49: Sequenzvergleich des VMAT2-N-Terminus. Die Peptidsequenz des VMAT2-N-Terminus (VMAT2-NT) zeigt eine amphiphile Anordnung der Aminosäure-Reste und ist unter Säugetieren hochkonserviert (A). Im Vergleich zu Go-Protein-aktivierenden Peptidsequenzen zeigt sich, dass zwei für die G-Protein-Aktivierung essentielle Aminosäure-Reste hochkonserviert sind (B). Hierbei handelt es sich um den ersten und letzten Aminosäure-Rest des B-B-X-X-B Motivs. das im C-terminalen Abschnitt des VMAT2-NT ebenfalls zu finden ist. Der Vergleich zu den IGF-II/M6P-R-Peptiden 14 und 14G2 zeigt, dass auch der in diesen Peptiden enthaltene basische Aminosäure-Rest R₂ im VMAT2-NT der Säugetiere hochkonserviert ist (C). Dieser Rest ist ebenfalls für die G-Protein-Aktivierung essentiell. Im Vergleich zum APP-Peptid 20 wird deutlich, dass neben der Amphiphilie der Peptide einige Sequenzen vor allem in ihrem B-B-X-X-B Motiv hohe Übereinstimmungen aufweisen (D, E). Der Vergleich des VMAT-NT zeigt, dass die für die G-Protein-Aktivierung essentiellen Aminosäure-Reste unter Säugetieren auch zwischen VMAT1und VMAT2-Peptidsequenzen hochkonserviert sind (F). In VMAT1-NT-Sequenzen ist das B-B-X-X-B Motiv allerdings zu einem B-X-X-B-B bzw. B-X-X-B Motiv abgewandelt. (VMAT, vesikulärer Monoamintransporter: IGF-II/M6P-R, insulin-like growth factor-II / 6-phosphate-receptor, mannose APP. amyloid precursor protein)



Α

в

С

D

rnoVMAT2NT mmuVMAT2NT btaVMAT2NT

F

Ε

mmuVMAT2NT hsaVMAT2NT mamuVMAT2NT btaVMAT2NT mmuVMAT1NT rnoVMAT1NT hsaVMAT1NT mamuVMAT1NT



Abb. 50: Sequenzvergleich des VMAT2-C-Terminus.

Die Peptidsequenz des VMAT2-C-Terminus (VMAT2-CT) ist unter Säugetieren hochkonserviert und zeigt vor allem im N-terminalen Abschnitt eine amphiphile Anordnung der Aminosäure-Reste (A). Im Bezug auf Go-Protein-aktivierende Peptidsequenzen zeigt vor allem der Vergleich zum GAP-43-Peptid 25 und IGF-II/M6P-R-Peptid 14, dass für die G-Protein-Aktivierung essentielle Aminosäure-Reste hochkonserviert sind (B, C). Hierbei handelt es sich um den Cystein-Rest 3 und das benachbarte Leucin 2 des GAP-43-Peptid 25 (B), um den R₂-Rest des IGF-II/M6P-R-Peptid 14 und dessen B-B-X-B Motiv, welches zu B-X-X-B abgewandelt ist (C). Der Vergleich des VMAT-CT zeigt, dass der für die G-Protein-Aktivierung essentielle Cystein-Rest 3 des GAP-43 und angrenzende Aminosäure-Reste unter Säugetieren auch zwischen VMAT1- und VMAT2-Peptidsequenzen hochkonserviert sind (D). (VMAT, vesikulärer Monoamintransporter; IGF-II/M6P-R, *insulin-like growth factor-II / mannose 6-phosphate-receptor*, GAP-43, growth associated protein 43)

Wohlmöglich ist der N-Terminus des VMAT die primäre Interaktionsstelle für das G_o -Protein, da im WB des GST-PDs hier im Vergleich zum Präzipitat des VMAT2-C-Terminus eine stärkere Immunfärbung der $G_o\alpha$ -Bande auftritt (**Abb. 31**). Unterstützt wird diese Ansicht durch den Sequenzvergleich. Die Sequenz des VMAT-NT zeigt größere Übereinstimmungen mit G-Protein-aktivierenden Peptiden und zwischen VMAT1 und 2 untereinander als die VMAT-CT-Sequenz (**Abb. 49** F, 47 D). Dabei könnte der VMAT-CT vor allem

über den hochkonservierten Cystein-Rest in Kooperation eine unterstützende Rolle spielen und evt. die Spezifität für das G-Protein mitbestimmen. Andererseits konnte bisher nur gezeigt werden, dass die rückwirkende Verminderung der vesikulären Monoaminaufnahme spezifisch von $G_{o2}\alpha$ abhängig ist. Theoretisch wäre daher eine Aktivierung beider $G_o\alpha$ -Isoformen denkbar, nach welcher $G_{o1}\alpha$ andere physiologische Effekte reguliert, die bisher nicht identifiziert werden konnten. Letztere Punkte sind allerdings bisher rein spekulativ.



Abb. 51: Sequenzvergleich der 3. zytoplasmatischen Schleife des VMAT2. Die dritte zytoplasmatische Schleife des VMAT2 (VMAT2-L3) zeigt keinen amphiphilen Charakter, da die Peptidsequenz hauptsächlich aus polaren Aminosäure-Resten besteht (A-C). Durch den Veraleich zu Go-Protein-aktivierenden Peptidsequenzen wird deutlich, dass der VMAT2-L3 trotz einiger konservierter Reste keine Übereinstimmung mit den Motiven aufweist, die für die G-Protein-Aktivierung essentiell sind (A-C). Für den Sequenzvergleich wurde das Go-Protein-aktivierende IGF-II/M6P-R-Peptid 14G2, das APP-Peptid 20 und das GAP-43-Peptid 25 verwendet. (VMAT-L3, vesikulärer Monoamintransporter-Loop 3; IGF-II/M6P-R, insulin-like growth factor-II / mannose 6phosphate-receptor, APP, amyloid precursor protein; GAP-43, growth associated protein

5.1.6 Resümee zur VMAT-G_o-Interaktion

Der Sequenzvergleich untermauert damit die Ergebnisse des Y2H-Ansatzes und vor allem des GST-PDs dieser Arbeit und die Hypothese, dass das G_o-Protein durch den VMAT in einer GPCR-ähnlichen Weise aktiviert wird. Eine direkte Aktivierung des heterotrimeren G_o-Proteins durch VMAT oder dessen zytoplasmatische Peptide VMAT-NT und VMAT-CT konnte bisher nicht gezeigt werden. Für diesen Nachweis eignet sich ein Aktivierungs-*Assay* (Northup et al., 1982), in welchem die Bindung von radioaktiv markiertem [³⁵S]GTPγS an aufgereinigte G-Proteine in Abhängigkeit des aktivierten VMAT (z. B. als Vesikelpräparation) oder dessen zytoplasmatische Peptide gemessen wird. Mutationen der im Sequenzvergleich gefundenen VMAT2-Motive bzw. einzelner Aminosäure-Reste würden in diesem Ansatz Auskunft über deren G-Protein-aktivierende Wirkung geben.

Da auch G β -UE mit den zytoplasmatischen Domänen des VMAT2 zu interagieren scheinen und diese Interaktion zumindest für den VMAT2-N-Terminus unabhängig von G_o α ist, könnte es sich hierbei ebenfalls um Effektor-Domänen handeln, welche über den $\beta\gamma$ -Komplex reguliert werden. Da die C-terminale Hälfte des VMAT2 im Split-Ubiquitinbasierten Y2H-Verfahren mit der dominant negativen aber auch konstitutiv aktiven Variante des $G_{o2}\alpha$ zu interagieren scheint, wird die Hypothese weiterhin untermauert, dass der VMAT2 sowohl ein GPCR als auch ein G-Protein-Effektor ist. Unabhängig davon konnte bereits mit aufgereinigten G α -UE gezeigt werden, dass die VMAT-Regulation spezifisch von $G_{o2}\alpha$ abhängt (Höltje et al., 2000). Um den VMAT2 als Effektor des heterotrimeren G_{o2} -Proteins ($\alpha\beta\gamma$) oder dessen Signaltransduktionskaskade zu identifizieren, sind dennoch weitere Experimente nötig, in denen die Transport-Aktivität eines um den N- bzw. C-Terminus verkürzten VMAT2 untersucht wird. Eine G_{o2} -abhängige Verminderung der Transport-Aktivität in Abwesenheit dieser zytoplasmatischen VMAT2-Domänen sollte fehlen, falls es sich tatsächlich um Effektor-Domänen handelt. Dies gilt natürlich auch, wenn sie wie vermutet an der G_o -Protein-Aktivierung beteiligt sind. Zusätzlich wäre der Nachweis der G γ -UE des $\beta\gamma$ -Komplexes z. B. in einem WB im Anschluss an den GST-PD mit GST-VMAT2-NT- und -CT-Fusionsproteinen hilfreich.

5.2 Physiologie der VMAT-G_o-Signaltransduktion

Wir gehen in unserem Modell davon aus, dass die VMAT-Go-Signaltransduktion zur Feinabstimmung des vesikulären Füllungszustands bzw. der Größe des Vesikelquantums dient. Eine physiologische Funktion des VMAT ist die Regulation der stimulierten Freisetzung von Monoaminguanten (Wang et al., 1997). Wang und Kollegen schließen aus ihrer Arbeit an VMAT2^{-/-} Mäusen, dass der VMAT2 entweder die Quantengröße, also die Neurotransmittermenge in einzelnen Vesikeln, oder die Größe des freisetzbaren Vesikel-Reservoirs kontrolliert. In einer weiteren Arbeit über VMAT2^{-/-} Mäuse wird beschrieben, dass die VMAT2-Überexpression in PC12-Zellen zu einer dreifachen Erhöhung der Quantengröße führt (Fon et al., 1997). Weiterhin spricht für diese Hypothese, dass die vesikuläre Monoaminkonzentration der Auslöser der VMAT-G₀-Signaltransduktion zu sein scheint, welche anschließend aufgrund der $G_{o2}\alpha$ -abhängigen Verminderung der VMAT-Aktivität reduziert wird. Ein bereits beschriebener präsynaptischer Mechanismus zur Feinabstimmung der Quantengröße monoaminerger Vesikel ist neben der Aufnahme von Cl⁻ die zusätzliche Aufnahme von Glutamat über einen auf diesen Vesikeln anscheinend kolokalisierten VGLUT2 (Hnasko et al., 2010). Diese Regulation mag auf bestimmte monoaminerge Neurone lokal begrenzt sein, da davon auszugehen ist, dass nicht alle monoaminergen Neurone oder Zelltypen eine solche vesikuläre Transporter-Kolokalisation zeigen. Unabhängig der Begrenzung dieser Regulation unterstreichen diese Befunde wie aufwendig und komplex die vesikuläre Quantengröße reguliert zu werden scheint. Hnasko und Kollegen konnten zeigen, dass das Vesikellumen durch niedrige Glutamatkonzentrationen stärker azidifiziert wird als dies gleiche Cl-Konzentrationen vermögen. Weiterhin scheint Glutamat die Azidifizierung des Vesikels bei Anwesenheit von höheren Cl-

Konzentrationen noch zusätzlich zu vergrößern. Dadurch wird das ApH stabilisiert und das Δ^{j} verringert. Als Folge können mehr Monoamine aufgenommen und zusätzlich im Vesikel stabilisiert werden, da ihr passiver Efflux durch ihre Protonierung vermindert wird. Die Feinabstimmung der vesikulären Quantengröße ist wichtig, da dauerhaft vergrößerte oder verminderte vesikuläre Monoaminkonzentrationen eine veränderte Monoamin-Ausschüttung und ein Ungleichgewicht in der Monoamin-Homöostase zur Folge hätten. Auf eine erhöhte Ausschüttung der Monoamine z. B. würde weiterhin aufgrund der Wiederaufnahme über die plasmamembranständigen Monoamintransporter eine erhöhte zytosolische Monoaminkonzentration folgen. Letztere kann zu erhöhtem oxidativen Stress und Schaden in monoaminergen Neuronen führen und damit für degenerative Erkrankungen, wie der Morbus Parkinson des Menschen, verantwortlich sein (Übersicht Wimalasena, 2011). Morbus Parkinson ist eine Folge der Degeneration dopaminerger Neurone der Substantia nigra pars compacta und ihrer Projektionen in das Striatum (Übersicht von Mink, 1996, Galvan und Wichmann, 2008). Eine Möglichkeit des Schutzes monoaminerger Neurone könnte die pharmakologische Erhöhung der vesikulären Monoaminaufnahme sein (Wimalasena, 2011). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die vesikuläre MPP⁺- (1-Methyl-4-phenylpyridinium)-Aufnahme durch VMAT2 neuroprotektiv wirkt (Übersicht von Wimalasena, 2011). MPP⁺ ist das Produkt des von der MAO katalysierten MPTP- (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin)-Metabolismus. MPTP wird über den DAT der Plasmamembran dopaminerger Neurone aufgenommen. MPP⁺ ist ein schwacher Inhibitor des Komplex 1 der mitochondrialen Elektronentransportkette in der Zellatmung und scheint ebenfalls den oxidativen Stress dopaminerger Neurone zu erhöhen (Übersicht Wimalasena, 2011). MPP⁺ wirkt daher in dopaminergen Neuronen neurodegenerativ, z. B. in der Substantia nigra. MPP⁺ induziert so die Symptome und dient daher in Mäusen als Auslöser des Models der Parkinson'schen Krankheit. Im Verlauf der Morbus Parkinson führt erhöhtes zytosolisches Dopamin in Neuronen zum Zelltod (Übersicht Wimalasena, 2011). Man vermutet, dass dies evt. eine Folge von regulatorischen Polymorphismen des VMAT2 ist, die zur differentiellen quantitativen Expression des VMAT2 führen und daher z. B. genetische Risikofaktoren für die Parkinson'sche Krankheit darstellen könnten (Übersicht Wimalasena, 2011). Dagegen kann eine Verminderung der Dopaminkonzentration im Gehirn von Menschen zu depressiven Stimmungsstörungen führen. Dies zeigte der Einsatz von Reserpin, welcher zur frühen Amin-Hypothese der Depression führte (Schildkraut, 1965, Carlsson, 1987; u. a.). Reserpin inhibiert den VMAT irreversibel und löst folglich eine Monoaminarmut aus. Gleiches konnte an VMAT2^{-/-} Mäusen gezeigt werden (Fon et al., 1997, Wang et al., 1997). FSL-Ratten (Flinders Sensitive Line) dienen als Modell für Depression. Sie zeigen eine reduzierte VMAT2-Expression im Striatum (Übersicht Wimalasena, 2011). Die Monoaminarmut resultiert hierbei allerdings

eher aus dem zytosolischen Metabolismus als Folge der fehlenden vesikulären Speicherung (Fon et al., 1997, Wang et al., 1997). Hier wird deutlich, dass eine veränderte striatale Dopaminkonzentration schwerwiegende Folgen haben kann. Das Expressionsniveau des VMAT aber auch eine Über- bzw. Unterfunktion dieses Transporters könnte hierfür Ursache sein aber auch neuroprotektiv wirken. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Feinabstimmung der vesikulären Quantengröße über die Regulation der VMAT-Aktivität und die generelle Einhaltung der Dopamin-Homöostase.

5.3 Auswirkungen der $G_{o}\alpha$ -Deletion auf die Physiologie des monoaminergen Systems

In der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Ahnert-Hilger diente der Einsatz von Go-Deletionsmutanten der Untersuchung möglicher physiologischer Effekte, die von der Dysregulation der VMAT-Go-Signaltransduktion hervorgerufen werden. So können Rückschlüsse auf die Beteiligung dieser Signaltransduktion an der Physiologie des Organismus auch im Normalzustand gezogen werden. Da diese Signaltransduktion an der Regulation der Füllung monoaminerger Vesikel beteiligt ist, wurden zunächst Aspekte des monoaminergen Systems auf molekularer Ebene untersucht. Dabei bestätigte der Versuch zur Monoaminaufnahme an Vesikelpräparationen aus dem Homogenat von Mäusegehirnen, dass in Neuronen die Verminderung der VMAT-Aktivität G₀₂α-spezifisch reguliert wird. An $G_{\alpha 2} \alpha^{-/-}$ Mäusen konnte bereits gezeigt werden, dass die GMP-P(NH)P-vermittelte Verminderung der vesikulären Monoaminaufnahme im Vergleich zu Wildtyp-Wurfgeschwistern fehlt (Brunk et al., 2006). Dagegen lässt sich an Vesikeln der $G_{o1}\alpha^{-1}$ Mäuse wie an Vesikeln der Wildtyp-Tiere in Anwesenheit von GMP-P(NH)P eine signifikante Verminderung der Monoaminaufnahme durch das nach wie vor vorhandene $G_{o2}\alpha$ nachweisen, welche an Vesikeln der $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäuse durch das zusätzliche Deletieren des $G_{o2}\alpha$ verloren geht (**Abb. 32**).

Weiterhin zeigt sich nach HPLC-Bestimmung der striatalen Dopaminkonzentration, dass im Vergleich zu Wildtyp-Wurfgeschwistern in der $G_{o2}\alpha$ -Deletionsmutante tatsächlich ein veränderter Monoaminspiegel vorliegt. In der $G_{o1}\alpha$ -Deletionsmutante findet man interessanterweise einen konträren Effekt. Im *Striatum* der $G_{o2}\alpha^{-/-}$ Mäuse ist die Dopaminkonzentration signifikant gegenüber Wildtyp-Wurfgeschwistern vermindert, während sie im *Striatum* der $G_{o1}\alpha$ -Deletionsmutante erhöht ist (**Abb. 33**; Brunk et al., 2008). Im Falle der $G_{o2}\alpha$ -Deletionsmutante scheint eine verringerte Expression der TH für den veränderten Dopaminspiegel verantwortlich zu sein (Brunk et al., 2008). Dies liegt nahe, da die TH das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Dopaminsynthese ist. Die Expression der TH scheint sich an die Monoaminkonzentration anpassen zu können bzw. in bestimmten Fäl-
len von dieser reguliert zu werden (Übersicht von Kumer und Vrana, 1996). Ihre Aktivität wird über eine Endprodukthemmung gesteuert (Übersicht von Kumer und Vrana, 1996, Siegel et al., 1999, Bear et al., 2007). Da die Aktivität der MAO in der $G_{o2}\alpha$ -Deletionsmutante unverändert ist und die vesikuläre Monoaminaufnahme in *in vitro*-Versuchen trotz fehlendem $G_{o2}\alpha$ und erhöhter VMAT2-Expression in der Deletionsmutante gegenüber Wildtyp-Tieren leicht vermindert ist (Brunk et al., 2008), könnte eine zeitweise vergrößerte zytosolische Dopaminkonzentration eine Hemmung bzw. eine verminderte Expression der TH bewirken. Für diesen Zusammenhang gibt es allerdings bisher keinen Beweis.

Eine erhöhte Expression und Lokalisation des VMAT2 auf synaptischen Vesikeln im Gehirn der $G_{o2}\alpha$ -Deletionsmutante im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (Brunk et al., 2008) lässt darauf schließen, dass in $G_{o2}\alpha^{-/-}$ Mäusen ein endogener Mechanismus aktiviert zu sein scheint, welcher bei Dopaminmangel, möglicherweise als Folge einer zeitweise erhöhten zytosolischen Dopaminkonzentration, die VMAT2-Expression anpasst. Einige weitere Befunde legen nahe, dass die VMAT2-Expression mit der Dopaminkonzentration zu korrelieren scheint (Übersicht von Wimalasena, 2011).

Bei einer VMAT2-Überexpression würde man eine Erhöhung der Quantengröße erwarten, wie es unpublizierte Daten von Fon und Kollegen zeigten (Fon et al., 1997). Die vesikuläre Monoaminaufnahme sollte durch das Fehlen des funktionellen $G_{o2}\alpha$ und der damit einhergehenden Hemmung der VMAT-Aktivität zusätzlich gefördert werden. Da die Vesikel dieser Tiere, wie bereits erwähnt, in *in vitro*-Aufnahmeversuchen trotzdem im Vergleich zum Wildtyp eine leicht verminderte vesikuläre Monoaminkonzentration zeigen (Brunk et al., 2008), scheint hier ein weiterer Mechanismus der vesikulären Monoaminspeicherung gestört zu sein, wodurch der vesikuläre Monoaminefflux gefördert wird. Diese Hypothese würde zur Argumentation der zeitweise erhöhten zytosolischen Dopaminkonzentration und der folglich verminderten TH-Expression passen, welche schließlich bei gleich bleibender MAO-Aktivität eine verminderte striatale Gesamtmenge des Dopamins zur Folge hat.

Diese Befunde zeigen letztendlich deutlich, dass, wie erwartet, fehlendes $G_{o2}\alpha$ in einer Störung der Dopamin-Homöostase resultiert. $G_{o2}\alpha$ scheint dabei möglicherweise an verschiedenen Stellen die vesikuläre Quantengröße und Monoaminspeicherung zu regulieren und könnte dabei neben der Kontrolle der VMAT-Aktivität auch den vesikulären Monoaminefflux beeinflussen.

Für die $G_{o1}\alpha$ -Deletionsmutante konnte bisher kein Grund für das veränderte Monoamin-Niveau im *Striatum* gefunden werden. Versuche dieser Arbeit zeigen, dass Monoaminsynthetisierende und -degradierende Enzyme, aber auch der VMAT2 im Vergleich zum Wildtyp in ihrer Expression bzw. Aktivität im Gehirn nicht signifikant alternieren. Ein Grund könnte sein, dass die Regulation der Enzyme in diesem Falle lokal begrenzt ist. Der in den Deletionsmutanten veränderte Dopaminspiegel wurde im *Striatum* gefunden. In dieser Arbeit wurde allerdings zunächst das gesamte Gehirn der $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Mäuse analysiert. Eine detaillierte Analyse der striatalen Regulation beschriebener Enzyme in diesen Tieren steht noch aus. In Bezug auf die MAO-Aktivität kommt hinzu, dass sie ein breiteres Substratspektrum aufweist und daher die Gesamt-Aktivität dieses Enzyms evt. nicht alterniert. Es wäre gut möglich, dass eine Quantifizierung der TH- oder MAO-Aktivität ausschließlich in dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra pars compacta*, welche für das striatale Dopamin verantwortlich sind, in $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Mäusen gegenüber Wildtyp-Wurfgeschwistern eine veränderte Aktivität offenbart, die letztendlich zu einem erhöhten striatalen Dopamin-Niveau führt. Zudem zeigt die WB-Analyse des Gehirnhomogenats aus Wildtyp- und $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Wurfgeschwistern, dass die TH-Expression in der Deletionsmutante leicht erhöht zu sein scheint.

Wie im oberen Abschnitt bereits beschrieben kann ein veränderter Dopaminspiegel im Gehirn weitreichende Folgen haben. Es ist bekannt, dass sich ein veränderter Dopaminspiegel ebenfalls auf die Postsynapse auswirkt. Zum Beispiel geht im Verlauf der Morbus Parkinson eine substantielle Degeneration der nigrostriatalen Neurone (mind. 70%) mit einer Dopaminverarmung einher, welche eine Veränderung der Dichte und Sensitivität der Dopamin-Rezeptoren auslöst (Übersicht von Galvan und Wichmann, 2008). Die Expression von D₂-Dopamin-Rezeptoren (D₂R) ist im *Striatum* von Parkinson-Patienten und im Tier-Modell erhöht. Der D₁-Dopamin-Rezeptor (D₁R) scheint weniger exprimiert zu werden, obwohl hier die Beobachtungen verschiedener Forschungsgruppen voneinander abweichen (Übersicht von Galvan und Wichmann, 2008). Die Expression der Dopamin-Rezeptoren ist in $G_{o2}\alpha^{-t}$ Mäusen nach wiederholter Verabreichung von Psychostimulanzien (Kokain, Amphetamin) in gleicher Weise verändert (s. u.; Brunk et al., 2008, 2010).

Unter drogenfreien Bedingungen liegt in striatalen Synaptosomen der $G_{o2}\alpha^{-/-}$ Mäuse nur eine leichte aber nicht signifikante Verminderung der D₁R-Expression vor, während die Expression des D₂R unverändert bleibt (Brunk et al., 2008). Die Expression der Dopamin-Rezeptor-Subtypen der $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Tiere und des an den D₁R gekoppelten $G_{s}\alpha$ ist im Vergleich zu Wildtyp-Tieren im Gehirn nicht verändert (**Abb. 39**, **Abb. 40**). $G_{s}\alpha$ und $G_{olf}\alpha$, letzteres ist ebenfalls an den D₁R gekoppelt, sind dagegen im *Striatum* von $G_{o2}\alpha^{-/-}$ Tieren signifikant vermindert (Brunk et al., 2008). In $G_{o2}\alpha^{-/-}$ Mäusen scheint also der D₁R-Signalweg der motorischen Schleife der Basalganglien bei Dopaminmangel vor allem über eine Verminderung der Expression der an den D₁R-gekoppelten G-Proteine $G_{s}\alpha$ und $G_{olf}\alpha$ geschwächt zu sein. Im Vergleich zum Wildtyp wirkt sich diese Störung, wohlmöglich aufgrund kompensatorischer Mechanismen, erst nach Verabreichung von Psychostimulanzien auf ihr motorisches Verhalten aus.

Eine Monoaminverminderung, wie sie in heterozygoten VMAT2-Deletionsmutanten vorliegt, resultiert zumindest auf dem mRNA-Niveau nicht in einer Veränderung der Expression von Dopamin-Rezeptoren (Wang et al., 1997). Dennoch zeigen diese Tiere eine verstärkte Sensibilisierung der postsynaptischen Dopamin-Rezeptoren (s. u.). Dies zeigten Versuche, in welchen ebenfalls der Einfluss von Psychostimulanzien (Kokain, Amphetamin) auf diese Tiere untersucht wurde. VMAT2^{+/-} Mäuse zeigen ähnlich der G_{o2} α -Deletionsmutante normales Wachstum und erreichen das geschlechtsreife Alter. Daher scheint ein reduziertes Dopamin-Niveau nicht lebensbedrohlich zu sein. Trotzdem zeigen beide Tierstämme, dass eine Reduktion der Dopaminmenge im Gehirn physiologische Folgen hat.

VMAT2^{+/-} Mäuse fehlt nach chronischer Kokain- und Amphetamin-Gabe im Bezug auf ihre motorische Aktivität eine Sensibilisierung des Verhaltens (Wang et al., 1997). Dies ist ein Resultat der erhöhten Sensitivität der Dopamin-Rezeptoren im Striatum. Schon nach der ersten Verabreichung der Droge ist das Maximum der Rezeptor-Antwort auf das durch die Droge erhöhte extrazelluläre Dopamin und damit der motorischen Aktivität erreicht und weitere Injektionen können keine Steigerung dieses Verhaltens auslösen. $G_{o2}\alpha^{--}$ Mäusen fehlt dagegen nur bei wiederholter Kokain-Gabe eine Sensibilisierung des Verhaltens (Brunk et al., 2008). Da deren motorische Aktivität im Vergleich zu Wildtyp-Tieren dabei geringer ausfällt, kann man hier nicht von einer hypersensitiven Dopamin-Rezeptor-Interaktion ausgehen. Vielmehr scheint hier die Abschwächung des direkten D₁R-Signalwegs in den Basalganglien für eine fehlende Sensibilisierung und eine gegenüber Wildtyp-Tieren verminderte motorische Aktivität nach Kokain-Verabreichung verantwortlich zu sein. Eine gegenüber Wildtyp-Tieren verminderte motorische Aktivität findet man auch nach wiederholter Amphetaminbehandlung, obwohl hier eine Sensibilisierung des motorischen Verhaltens bestehen bleibt (Brunk et al., 2010). Dies könnte ein Effekt der möglicherweise verstärkten Abschwächung der GABAergen Inhibition der Motorik über den verstärkten indirekten D₂R-Signalweg der Basalganglien sein. Beide Psychostimulanzien sind trotz striatalem Dopaminmangel in der Lage die motorische Aktivität der $G_{\alpha 2} \alpha^{-/-1}$ Mäuse gegenüber drogenfreien Bedingungen zu erhöhen.

Weitere Studien bestätigen den Zusammenhang des G_o-Proteins mit physiologischen Effekten im Bezug auf einen Drogenmissbrauch oder Krankheiten wie z. B. der Schizophrenie. Hierbei sollte auch beachtet werden, dass ein chronischer Drogenkonsum drogeninduzierte affektive Störungen zur Folge haben kann. Die Modulation des dopaminergen Systems durch chronische Kokainbehandlung von Ratten resultiert in einer signifikanten Verminderung des G_i α - und G_o α -Expressionsniveaus im *ventral-tegmentalen Areal*

(VTA), im *Nucleus accumbens* und dem *Locus coeruleus* (Nestler et al., 1990). Auch in Gehirnen von Patienten, die unter Schizophrenie litten, wurde eine signifikante Verminderung der $G_{i\prime o}\alpha$ -Expression im *Putamen* (*Striatum*) festgestellt (Okada et al., 1990). Im *Hippocampus* der Maus konnte man dagegen nach mehrmaliger niedrig dosierter Gabe von Methamphetamin (METH) einen Anstieg der Expression des α_{2A} -adrendergen Rezeptors und des daran gekoppelten $G_o \alpha$ zeigen (Nishio et al., 2002). Hier wird nicht genau auf die *Splice*-Isoform des $G_o \alpha$ eingegangen. Eine wiederholte Verabreichung von Amphetamin oder Kokain resultiert in $G_{o2}\alpha^{-t}$ Mäusen in einer erhöhten $G_{o1}\alpha$ -Expression (Brunk et al., 2010). Schizophrenie wird weiterhin mit einer erhöhten dopaminergen Transmission in Verbindung gebracht (Okada et al., 1990). Die Dichte des D_2R ist in schizophrenen Patienten erhöht (Owen et al., 1981). Dies stimmt mit Daten zur Physiologie der $G_{o2}\alpha^{-t}$ -Mäuse überein. Eine wiederholte Behandlung mit Psychostimulanzien hat in diesen Tieren ebenfalls eine erhöhte D_2R -Expression im Vergleich zum Wildtyp zur Folge (s. o.; Brunk et al., 2008, 2010).

Diese Befunde zeigen deutlich, dass es einen Zusammenhang des G_o-Proteins mit dem dopaminergen System und der Dopamin-Homöostase gibt. Dies legt auch das Expressionsprofil des G_o α nahe. G_o α wird in der Ratte z. B. im *Striatum* und der *Substantia nigra pars reticulata* (SNr) exprimiert (Huff et al., 1985, Worley et al., 1986). Striatale Läsionen in der SNr reduzieren die Immunfärbung für G_o α (Worley et al., 1986). Worley und Kollegen vermuteten daher schon 1986, dass die hohe G_o α -Dichte in der *Substantia nigra* einen G_o-abhängigen nigrostriatalen Signalweg reflektiert.

Über die Studien aus der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Ahnert-Hilger an Isoformspezifischen Deletionsmutanten konnten erstmals Informationen über physiologische Effekte einer distinkten $G_0\alpha$ -Isoform auf das dopaminerge System gesammelt werden.

In $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Tieren wurde im Vergleich zu deren Wildtyp-Wurfgeschwistern kein Unterschied im striatalen Dopamin-Niveau gefunden und damit wie zu erwarten auch nicht in der Expression bzw. Aktivität monoaminerger Enzyme und Transporter. Während das Fehlen einer $G_o\alpha$ -*Splice*-Isoform in Hinblick auf das striatale Dopamin-Niveau zu Störungen im dopaminergen System führt, scheint die Wegnahme beider Isoformen diese auf der molekularen Ebene wieder auszugleichen. Daher wurde die Charakterisierung weiterer phänotypischer Merkmale der G_o -Deletionsmutanten herangezogen.

5.4 Auswirkung der $G_o \alpha$ -Deletion auf weitere phänotypische Merkmale

Zunächst konnte mit Hilfe der Deletionsmutanten und für die $G_0\alpha$ -*Splice*-Isoformen spezifische Antikörper die Menge der jeweiligen Isoform im Mäusegehirn bestimmt werden. Es zeigt sich, dass im Mäusegehirn im Vergleich zu $G_{o2}\alpha$ mehr $G_{o1}\alpha$ exprimiert wird und dass die Deletion des $G_{o1}\alpha$ in einer Erhöhung der $G_{o2}\alpha$ -Expression resultiert. Dies ist keine Folge der Klonierungsstrategie zur Generierung der Deletionsmutante, da das alternative *Splicen* der $G_{o}\alpha$ -mRNA nach wie vor gewährleistet ist. Die Deletion erfolgt auf Ebene der Translation. Die $G_{o1}\alpha$ -mRNA kann nach dem *Splice*-Vorgang nicht in ein funktionsfähiges Protein übersetzt werden. Auch der microRNA-basierte Regulationsmechanismus der mRNA-Stabilität, welcher die mRNA zur Degradation markiert und sich so auf die Translation der mRNA auswirkt, sollte von der Klonierungsstrategie nicht betroffen sein, da die 3'-UTR (*untranslated region*), welche für diese microRNA-Regulierung benötigt wird, unverändert bleibt. Möglicherweise sind hier expressionsregulatorische Mechanismen durch endogene Signalwege beeinflusst. Dieser Befund legt damit eine regulatorische Wechselwirkung der Expression der $G_{o1}\alpha$ - und $G_{o2}\alpha$ -UE nahe. Evt. wird über das $G_{o1}\alpha$ ein bestimmtes Expressionsniveau des $G_{o2}\alpha$ festgelegt.

Eine Wechselwirkung der $G_{o1}\alpha$ - und $G_{o2}\alpha$ -Expression wird auch durch das Ergebnis des Rota Rod-Experiments untermauert. Dieses Experiment wurde zur Untersuchung des Einflusses einer im *Striatum* veränderten Dopaminkonzentration auf das motorische Verhalten der $G_0 \alpha^{-t}$ Mäuse heran gezogen. Hierfür wurden die G_0 -Deletionsmutanten und Wildtyp-Wurfgeschwister im Vergleich zunächst unter drogenfreien Bedingungen getestet. Es zeigt sich auch hier deutlich, dass ein konträrer Effekt zwischen $G_{o2}\alpha^{-t}$ und $G_{o1}\alpha^{-t}$ Mäusen besteht. Während $G_{o2}\alpha^{-t}$ Tiere im Vergleich zum Wildtyp keinen Unterschied in ihrer motorischen Aktivität aufweisen (**Abb. 42** und Brunk et al., 2008, 2010), zeigen $G_{o1}\alpha^{-t}$ Mäuse eine starke Störung ihrer motorischen Aktivität (**Abb. 42**). An dieser Stelle sollte darauf hingewiesen werden, dass dies ebenfalls ein Effekt des insgesamt reduzierten Allgemeinzustands der Tiere sein könnte, der damit die Auswirkung der veränderten striatalen Dopaminkonzentration überlagert. Interessanterweise zeigt der direkte Vergleich zu $G_{o1/2}\alpha^{-t}$ Mäusen, dass die zusätzliche Deletion des $G_{o2}\alpha$ diesen Phänotyp signifikant mildert (**Abb. 42**).

Dies spiegelt sich ebenfalls im Überleben der Tiere wieder. $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Mäuse erreichen ein Durchschnittsalter von 3-4 Wochen (**Abb. 44**), während $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäuse im Durchschnitt sieben Wochen alt werden (Jiang et al., 1998). $G_{o2}\alpha^{-/-}$ Tiere erreichen dagegen das geschlechtsreife Alter und versterben im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nicht verfrüht. $G_{o1}\alpha^{-/-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäuse zeigen im Vergleich zum Wildtyp bereits bei der Geburt eine reduzierte Tier-Anzahl, die sich zwischen den Deletionsmutanten nicht unterscheidet (**Abb. 43**). Dieser Befund lässt auf ein ähnlich ausgeprägtes pränatales Versterben der $G_{o1}\alpha^{-/-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Embryos schließen. Das Wachstum der $G_{o1}\alpha^{-/-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Tiere ist ebenfalls ähnlich retardiert (**Abb. 46**). Hiervon ist sowohl die Entwicklung des Körpers als auch die

des Gehirns betroffen. Im Gegensatz dazu entwickeln sich $G_{o2}\alpha^{-/-}$ Mäuse im Bezug auf ihr Wachstum normal. Die Wachstumsretardation der $G_{o1}\alpha^{-/-}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäuse konnte nicht über die Expressionsanalyse einiger Schlüsselenzyme bekannter Wachstumssignalwege erklärt werden, da sie im Vergleich zum Wildtyp keinen Unterschied offenbart. Dies verwundert insofern nicht, da eine Wachstumsretardation viele physiologische Ursachen haben kann. Die Wachstumsretardation und verminderte Geburtenrate der $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäuse wurde ebenfalls schon von Jiang, Valenzuela und Kollegen beschrieben (Jiang et al., 1997, Valenzuela et al., 1997, 1998). Hier wurde bereits ein auffälliges motorisches Verhalten dieser Tiere beobachtet, das die Autoren veranlasste auf eine wichtige Rolle des G_o -Proteins bei der Kontrolle der motorischen Aktivität zu schließen (Jiang et al., 1998). Eine weitere Studie dieser Forschungsgruppe legte nahe, dass das G_o -Protein die Hauptisoform des an den D₂R gekoppelten G-Proteins ist und untermauerte damit dessen Regulation der motorischen Aktivität über die Basalganglien (Jiang et al., 2001). Hier wurde allerdings nicht zwischen den *Splice*-Isoformen unterschieden.

5.5 Schlussfolgerungen

 $G_{\alpha 2}\alpha$ scheint an der Regulation der Quantengröße monoaminerger Vesikel maßgeblich beteiligt zu sein. Dies geschieht vor allem über die Regulation der VMAT-Aktivität. Bei dieser Regulation könnte der VMAT als GPCR wirken, der ebenfalls Effektor seiner selbst induzierten Signaltransduktion ist und so über eine negative Rückkopplungsschleife reguliert wird. Allerdings gibt es aufgrund physiologischer Effekte der $G_{o2}\alpha$ -Deletion in Mäusen auch Hinweise darauf, dass die vesikuläre Speicherung der Monoamine und deren vesikulärer Efflux durch $G_{o2}\alpha$ reguliert werden. Die Deletion des $G_{o2}\alpha$ und eine damit einhergehende Störung der monoaminergen Quantenregulation resultiert in einem Ungleichgewicht der Dopamin-Homöostase, welches in ähnlicher, teilweise abgewandelter Weise ebenfalls bei Dopamin-basierten Krankheiten und einer Suchtmittelabhängigkeit beobachtet werden kann. Der direkte Vergleich Isoform-spezifischer G_0 -Deletionsmutanten zeigt, dass hier möglicherweise eine Wechselwirkung der beiden Splice-Isoformen $G_{01}\alpha$ und $G_{o2}\alpha$ vorliegt. Während das Vorhandensein von $G_{o1}\alpha$ essentiell für das Überleben der Mäuse ist, wirkt sich die Deletion des $G_{o2}\alpha$ alleine nicht hierauf aus. Dennoch zeigt der Vergleich von $G_{o1}\alpha^{-1}$ und $G_{o1/2}\alpha^{-1}$ Mäusen, dass eine zusätzliche Deletion des $G_{o2}\alpha$ in einer Milderung der beobachteten Störungen der Physiologie dieser Tiere resultiert. Eine Deletion des $G_{o2}\alpha$ führt zu einem reduzierten striatalen Dopamin-Niveau für das eine biochemische Erklärung gefunden wurde, während eine G₀₁α-Deletion konträr eine Erhöhung des Dopaminspiegels zur Folge hat. Dabei ist hervorzuheben, dass Go1a-1- Tiere eine erhöhte Expression des $G_{o2}\alpha$ zeigen. Dies verdeutlicht den Einfluss der $G_{o2}\alpha$ -UE und deren Regulation des VMAT2 auf die striatale Dopamin-Homöostase. In der Deletionsmutante

beider Splice-Isoformen sind diese Veränderungen auf der molekularen Ebene wiederum ausgeglichen. Dies spiegelt sich in ihrem äußeren Phänotyp wieder. Der Ausgleich des Dopaminspiegels in $G_{o1/2}\alpha^{--}$ Mäusen als mögliche Folge der zusätzlichen Deletion des $G_{o2}\alpha$, könnte für die abgemilderte Störung der motorischen Aktivität im Vergleich zu $G_{o1}\alpha^{-/-1}$ Mäusen, die einen Überschuss an $G_{02}\alpha$ besitzen, verantwortlich sein. Gleiches spiegelt sich in ihrer Überlebenschance wieder. $G_{o1/2}\alpha^{-/-}$ Mäuse zeigen im Vergleich zu $G_{o1}\alpha^{-/-}$ Mäusen eine um ca. 3 Wochen verlängerte Lebensspanne, sterben allerdings aufgrund der Deletion des $G_{01}\alpha$ nach wie vor verfrüht im Vergleich zu Wildtyp- oder $G_{02}\alpha^{-1}$ Mäusen. G₀₁ a scheint demnach auch unabhängig des striatalen Dopamin-Niveaus für eine normale Entwicklung der Mäuse und damit auch deren Überleben essentiell zu sein. Ein zugrunde liegender Mechanismus konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Allerdings konnte im Herzen der G_{01/2}α-Deletionsmutante eine defekte Regulation von L-Typ-Ca²⁺-Kanälen durch muskarine Acetylcholin-Rezeptoren (mAChR) nachgewiesen werden (Valenzuela et al., 1997). Hier wurde nicht zwischen den Splice-Isoformen unterschieden. Da $G_{o1}\alpha$ allerdings die Hauptisoform des Herzens ist und die im Herzen lokal begrenzte Expression der konstitutiv aktiven Variante des $G_{o1}\alpha$ ($G_{o1}\alpha$ Q205L) in einer Steigerung der kontraktilen Funktion des Herzens resultiert (Zhu et al., 2008), liegt eine Dysfunktion des Herzens als Ursache für ein verfrühtes Versterben der $G_{o1}\alpha$ - und $G_{o1/2}\alpha$ -Deletionsmutante nahe. Ein Überschuss an $G_{02}\alpha$ in $G_{01}\alpha^{-1}$ Mäusen verschlimmert deren Phänotyp gegenüber der Doppelmutante. Hierdurch wird deutlich, dass wohlmöglich eine Wechselwirkung der Go1a- und $G_{02}\alpha$ -Expression besteht, durch welche die Dopamin-Homöostase im Gleichgewicht gehalten wird. Aufgrund von Befunden am Mausmodell können damit die G_o α -Splice-Isoformen als geeignete Kandidaten für eine Analyse im Bezug auf Dopamin-basierte Krankheiten angesehen werden, wie Schizophrenie, Depression und Parkinson, aber auch Drogenmissbrauch und Suchtverhalten. Lässt sich ein direkter Zusammenhang zu diesen Störungen herstellen, können die G_oα-Splice-Isoformen als neue Zielmoleküle für therapeutisch-pharmakologische Ansätze betrachtet werden.

Literaturverzeichnis

- Ahnert-Hilger, G., Schäfer, T., Spicher, K., Grund, C., Schultz, G. und Wiedenmann, B. (1994). "Detection of G-protein heterotrimers on large dense core and small synaptic vesicles of neuroendocrine and neuronal cells." Eur J Cell Biol. 65(1): 26-38.
- Ahnert-Hilger, G. und Wiedenmann, B. (1994). "Requirements for exocytosis in permeabilized neuroendocrine cells. Possible involvement of heterotrimeric G proteins associated with secretory vesicles." **Ann N Y Acad Sci. 733**: 298-305.
- Ahnert-Hilger, G., Nürnberg, B., Exner, T., Schäfer, T. und Jahn, R. (1998). "The heterotrimeric G protein Go2 regulates catecholamine uptake by secretory vesicles." **EMBO J. 17**(2): 406-413.
- Amara, S. G. und Arriza, J. L. (1993). "Neurotransmitter transporters: three distinct gene families." **Curr Opin Neurobiol. 3**(3): 337-344.
- Antonelli, V., Bernasconi, F., Wong, Y. H. und Vallar, L. (2000). "Activation of B-Raf and regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway by the G(o) alpha chain." **Mol Biol Cell. 11**(4): 1129-1142.
- Barren, B. und Artemyev, N. O. (2007). "Mechanisms of dominant negative G-protein alpha subunits." **J Neurosci Res. 85**(16): 3505-3514.
- Bartel, P., Chien, C. T., Sternglanz, R. und Fields, S. (1993). "Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system." **Biotechniques. 14**(6): 920-924.
- Bear, M. F., Connors, B. W. und Paradiso, M. A. (2007). **NEUROSCIENCE Exploring the Brain**, Lippincott Williams & Wilkins.
- Beaulieu, J. M. und Gainetdinov, R. R. (2011). "The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors." **Pharmacol Rev. 63**(1): 182-217.
- Beauloye, C., Bertrand, L., Horman, S. und Hue, L. (2011). "AMPK activation, a preventive therapeutic target in the transition from cardiac injury to heart failure." **Cardiovasc Res. 90**(2): 224-233.
- Bertrand, P., Sanford, J., Rudolph, U., Codina, J. und Birnbaumer, L. (1990). "At least three alternatively spliced mRNAs encoding two alpha subunits of the Go GTP-binding protein can be expressed in a single tissue." **J Biol Chem. 265**(30): 18576-18580.
- Birnbaumer, L., Swartz, T. L., Abramowitz, J., Mintz, P. W. und Iyengar, R. (1980). "Transient and steady state kinetics of the interaction of guanyl nucleotides with the adenylyl cyclase system from rat liver plasma membranes. Interpretation in terms of a simple two-state model." **J Biol Chem. 255**(8): 3542-3551.
- Birnbaumer, L. (2007a). "Expansion of signal transduction by G proteins. The second 15 years or so: from 3 to 16 alpha subunits plus betagamma dimers." Biochim Biophys Acta. 1768(4): 772-793.
- Birnbaumer, L. (2007b). "The discovery of signal transduction by G proteins: a personal account and an overview of the initial findings and contributions that led to our present understanding." **Biochim Biophys Acta. 1768**(4): 756-771.
- Brabet, P., Pantaloni, C., Rouot, B., Toutant, M., Garcia-Sainz, A., Bockaert, J. und Homburger, V. (1988). "Multiple species and isoforms of Bordetella pertussis toxin substrates." Biochem Biophys Res Commun. 152(3): 1185-1192.
- Brunk, I., Blex, C., Rachakonda, S., Holtje, M., Winter, S., Pahner, I., Walther, D. J. und Ahnert-Hilger, G. (2006). "The first luminal domain of vesicular monoamine transporters mediates G-protein-dependent regulation of transmitter uptake." J Biol Chem. 281(44): 33373-33385.
- Brunk, I., Blex, C., Sanchis-Segura, C., Sternberg, J., Perreau-Lenz, S., Bilbao, A., Hortnagl, H., Baron, J., Juranek, J., Laube, G., Birnbaumer, L., Spanagel, R. und Ahnert-Hilger, G. (2008). "Deletion of Go2alpha abolishes cocaine-induced behavioral sensitization by disturbing the striatal dopamine system." Faseb J. 22(10): 3736-3746.

- Brunk, I., Blex, C., Speidel, D., Brose, N. und Ahnert-Hilger, G. (2009). "Ca2+-dependent activator proteins of secretion promote vesicular monoamine uptake." J Biol Chem. 284(2): 1050-1056.
- Brunk, I., Sanchis-Segura, C., Blex, C., Perreau-Lenz, S., Bilbao, A., Spanagel, R. und Ahnert-Hilger, G. (2010). "Amphetamine regulates NR2B expression in Go2alpha knockout mice and thereby sustains behavioral sensitization." J Neurochem. 115(1): 234-246.
- Cabrera-Vera, T. M., Vanhauwe, J., Thomas, T. O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni,
 M. R. und Hamm, H. E. (2003). "Insights into G protein structure, function, and regulation." Endocr Rev. 24(6): 765-781.
- Carlsson, A. (1987). "Perspectives on the discovery of central monoaminergic neurotransmission." **Annu Rev Neurosci. 10**: 19-40.
- Chappell, W. H., Steelman, L. S., Long, J. M., Kempf, R. C., Abrams, S. L., Franklin, R. A., Basecke, J., Stivala, F., Donia, M., Fagone, P., Malaponte, G., Mazzarino, M. C., Nicoletti, F., Libra, M., Maksimovic-Ivanic, D., Mijatovic, S., Montalto, G., Cervello, M., Laidler, P., Milella, M., Tafuri, A., Bonati, A., Evangelisti, C., Cocco, L., Martelli, A. M. und McCubrey, J. A. (2011). "Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health." Oncotarget. 2(3): 135-164.
- Deribe, Y. L., Wild, P., Chandrashaker, A., Curak, J., Schmidt, M. H., Kalaidzidis, Y., Milutinovic, N., Kratchmarova, I., Buerkle, L., Fetchko, M. J., Schmidt, P., Kittanakom, S., Brown, K. R., Jurisica, I., Blagoev, B., Zerial, M., Stagljar, I. und Dikic, I. (2009). "Regulation of epidermal growth factor receptor trafficking by lysine deacetylase HDAC6." Sci Signal. 2(102): ra84.
- Dhingra, A., Lyubarsky, A., Jiang, M., Pugh, E. N., Jr., Birnbaumer, L., Sterling, P. und Vardi, N. (2000). "The light response of ON bipolar neurons requires G[alpha]o." J Neurosci. 20(24): 9053-9058.
- Dhingra, A., Jiang, M., Wang, T. L., Lyubarsky, A., Savchenko, A., Bar-Yehuda, T., Sterling, P., Birnbaumer, L. und Vardi, N. (2002). "Light response of retinal ON bipolar cells requires a specific splice variant of Galpha(o)." J Neurosci. 22(12): 4878-4884.
- Erickson, J. D., Eiden, L. E. und Hoffman, B. J. (1992). "Expression cloning of a reserpinesensitive vesicular monoamine transporter." Proc Natl Acad Sci U S A. 89(22): 10993-10997.
- Erickson, J. D., Schafer, M. K., Bonner, T. I., Eiden, L. E. und Weihe, E. (1996). "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. 93(10): 5166-5171.
- Escriba, P. V., Wedegaertner, P. B., Goni, F. M. und Vogler, O. (2007). "Lipid-protein interactions in GPCR-associated signaling." Biochim Biophys Acta. 1768(4): 836-852.
- Fon, E. A., Pothos, E. N., Sun, B. C., Killeen, N., Sulzer, D. und Edwards, R. H. (1997).
 "Vesicular transport regulates monoamine storage and release but is not essential for amphetamine action." Neuron. 19(6): 1271-1283.
- Galvan, A. und Wichmann, T. (2008). "Pathophysiology of parkinsonism." Clin Neurophysiol. 119(7): 1459-1474.
- Gasnier, B. (2000). "The loading of neurotransmitters into synaptic vesicles." **Biochimie. 82**(4): 327-337.
- Goldsmith, P., Backlund, P. S., Jr., Rossiter, K., Carter, A., Milligan, G., Unson, C. G. und Spiegel, A. (1988). "Purification of heterotrimeric GTP-binding proteins from brain: identification of a novel form of Go." **Biochemistry. 27**(18): 7085-7090.
- Greif, G. J., Sodickson, D. L., Bean, B. P., Neer, E. J. und Mende, U. (2000). "Altered regulation of potassium and calcium channels by GABA(B) and adenosine receptors in hippocampal neurons from mice lacking Galpha(o)." J Neurophysiol. 83(2): 1010-1018.

- Hein, P. und Bunemann, M. (2009). "Coupling mode of receptors and G proteins." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 379(5): 435-443.
- Hell, J. W. und Jahn, R. (1998). "Bioenergetic characterization of gamma-aminobutyric acid transporter of synaptic vesicles." **Methods Enzymol. 296**: 116-124.
- Henry, J. P., Gasnier, B., Roisin, M. P., Isambert, M. F. und Scherman, D. (1987).
 "Molecular pharmacology of the monoamine transporter of the chromaffin granule membrane." Ann N Y Acad Sci. 493: 194-206.
- Henry, J. P., Sagne, C., Botton, D., Isambert, M. F. und Gasnier, B. (1998). "Molecular pharmacology of the vesicular monoamine transporter." **Adv Pharmacol. 42**: 236-239.
- Hermouet, S., Merendino, J. J., Jr., Gutkind, J. S. und Spiegel, A. M. (1991). "Activating and inactivating mutations of the alpha subunit of Gi2 protein have opposite effects on proliferation of NIH 3T3 cells." **Proc Natl Acad Sci U S A. 88**(23): 10455-10459.
- Higashijima, T., Uzu, S., Nakajima, T. und Ross, E. M. (1988). "Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins)." J Biol Chem. 263(14): 6491-6494.
- Higashijima, T., Burnier, J. und Ross, E. M. (1990). "Regulation of Gi and Go by mastoparan, related amphiphilic peptides, and hydrophobic amines. Mechanism and structural determinants of activity." **J Biol Chem. 265**(24): 14176-14186.
- Hnasko, T. S., Chuhma, N., Zhang, H., Goh, G. Y., Sulzer, D., Palmiter, R. D., Rayport, S. und Edwards, R. H. (2010). "Vesicular glutamate transport promotes dopamine storage and glutamate corelease in vivo." **Neuron. 65**(5): 643-656.
- Hollmann, M. W., Strumper, D., Herroeder, S. und Durieux, M. E. (2005). "Receptors, G proteins, and their interactions." **Anesthesiology. 103**(5): 1066-1078.
- Höltje, M., von Jagow, B., Pahner, I., Lautenschlager, M., Hortnagl, H., Nurnberg, B., Jahn, R. und Ahnert-Hilger, G. (2000). "The neuronal monoamine transporter VMAT2 is regulated by the trimeric GTPase Go(2)." J Neurosci. 20(6): 2131-2141.
- Höltje, M., Winter, S., Walther, D., Pahner, I., Hortnagl, H., Ottersen, O. P., Bader, M. und Ahnert-Hilger, G. (2003). "The vesicular monoamine content regulates VMAT2 activity through Galphaq in mouse platelets. Evidence for autoregulation of vesicular transmitter uptake." J Biol Chem. 278(18): 15850-15858.
- Hörtnagl, H., Hansen, L., Kindel, G., Schneider, B., el Tamer, A. und Hanin, I. (1993).
 "Sex differences and estrous cycle-variations in the AF64A-induced cholinergic deficit in the rat hippocampus." Brain Res Bull. 31(1-2): 129-134.
- Hsu, W. H., Rudolph, U., Sanford, J., Bertrand, P., Olate, J., Nelson, C., Moss, L. G., Boyd, A. E., Codina, J. und Birnbaumer, L. (1990). "Molecular cloning of a novel splice variant of the alpha subunit of the mammalian Go protein." J Biol Chem. 265(19): 11220-11226.
- Huang, C. C. und Tesmer, J. J. (2011). "Recognition in the face of diversity: interactions of heterotrimeric G proteins and G protein-coupled receptor (GPCR) kinases with activated GPCRs." J Biol Chem. 286(10): 7715-7721.
- Huff, R. M., Axton, J. M. und Neer, E. J. (1985). "Physical and immunological characterization of a guanine nucleotide-binding protein purified from bovine cerebral cortex." **J Biol Chem. 260**(19): 10864-10871.
- Huttner, W. B., Schiebler, W., Greengard, P. und De Camilli, P. (1983). "Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation." **J Cell Biol. 96**(5): 1374-1388.
- Isambert, M. F., Gasnier, B., Botton, D. und Henry, J. P. (1992). "Characterization and purification of the monoamine transporter of bovine chromaffin granules." Biochemistry. 31(7): 1980-1986.
- Itoh, H., Kozasa, T., Nagata, S., Nakamura, S., Katada, T., Ui, M., Iwai, S., Ohtsuka, E., Kawasaki, H., Suzuki, K. und et al. (1986). "Molecular cloning and sequence determination of cDNAs for alpha subunits of the guanine nucleotide-binding

proteins Gs, Gi, and Go from rat brain." **Proc Natl Acad Sci U S A. 83**(11): 3776-3780.

Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P. und Fields, S. (1993). "Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization." Oncogene. 8(6): 1693-1696.

- Iyer, K., Burkle, L., Auerbach, D., Thaminy, S., Dinkel, M., Engels, K. und Stagljar, I. (2005). "Utilizing the split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid system to identify protein-protein interactions of integral membrane proteins." Sci STKE. 2005(275): pl3.
- Jiang, M., Boulay, G., Spicher, K., Peyton, M. J., Brabet, P., Birnbaumer, L. und Rudolph, U. (1997). "Inactivation of the G alpha i2 and G alpha o genes by homologous recombination." **Receptors Channels. 5**(3-4): 187-192.
- Jiang, M., Gold, M. S., Boulay, G., Spicher, K., Peyton, M., Brabet, P., Srinivasan, Y., Rudolph, U., Ellison, G. und Birnbaumer, L. (1998). "Multiple neurological abnormalities in mice deficient in the G protein Go." Proc Natl Acad Sci U S A. 95(6): 3269-3274.
- Jiang, M., Spicher, K., Boulay, G., Wang, Y. und Birnbaumer, L. (2001). "Most central nervous system D2 dopamine receptors are coupled to their effectors by Go." Proc Natl Acad Sci U S A. 98(6): 3577-3582.
- Johnson, R. G., Jr. (1988). "Accumulation of biological amines into chromaffin granules: a model for hormone and neurotransmitter transport." **Physiol Rev. 68**(1): 232-307.
- Johnsson, N. und Varshavsky, A. (1994). "Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo." **Proc Natl Acad Sci U S A. 91**(22): 10340-10344.
- Jones, D. T. und Reed, R. R. (1987). "Molecular cloning of five GTP-binding protein cDNA species from rat olfactory neuroepithelium." **J Biol Chem. 262**(29): 14241-14249.
- Joung, J. K., Ramm, E. I. und Pabo, C. O. (2000). "A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions." Proc Natl Acad Sci U S A. 97(13): 7382-7387.
- Kirshner, N. (1962). "Uptake of catecholamines by a particulate fraction of the adrenal medulla." **Science. 135**(3498): 107-108.
- Kroll, S. D., Chen, J., De Vivo, M., Carty, D. J., Buku, A., Premont, R. T. und Iyengar, R. (1992). "The Q205LGo-alpha subunit expressed in NIH-3T3 cells induces transformation." J Biol Chem. 267(32): 23183-23188.
- Kumer, S. C. und Vrana, K. E. (1996). "Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression." **J Neurochem. 67**(2): 443-462.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." **Nature. 227**(5259): 680-685.
- Lang, J. (1989). "Purification and characterization of subforms of the guanine-nucleotidebinding proteins G alpha i and G alpha o." **Eur J Biochem. 183**(3): 687-692.
- LeVine, H., 3rd (1999). "Structural features of heterotrimeric G-protein-coupled receptors and their modulatory proteins." **Mol Neurobiol. 19**(2): 111-149.
- Li, B. und Fields, S. (1993). "Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system." **Faseb J. 7**(10): 957-963.
- Liu, Y., Peter, D., Roghani, A., Schuldiner, S., Prive, G. G., Eisenberg, D., Brecha, N. und Edwards, R. H. (1992). "A cDNA that suppresses MPP+ toxicity encodes a vesicular amine transporter." **Cell. 70**(4): 539-551.
- Mantovani, J. und Roy, R. (2011). "Re-evaluating the general(ized) roles of AMPK in cellular metabolism." **FEBS Lett. 585**(7): 967-972.
- Mende, U., Zagrovic, B., Cohen, A., Li, Y., Valenzuela, D., Fishman, M. C. und Neer, E. J. (1998). "Effect of deletion of the major brain G-protein alpha subunit (alpha(o)) on coordination of G-protein subunits and on adenylyl cyclase activity." J Neurosci Res. 54(2): 263-272.
- Milligan, G. und Kostenis, E. (2006). "Heterotrimeric G-proteins: a short history." Br J Pharmacol. 147 Suppl 1: S46-55.

- Mink, J. W. (1996). "The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs." **Prog Neurobiol. 50**(4): 381-425.
- Moriarty, T. M., Padrell, E., Carty, D. J., Omri, G., Landau, E. M. und Iyengar, R. (1990). "Go protein as signal transducer in the pertussis toxin-sensitive phosphatidylinositol pathway." **Nature. 343**(6253): 79-82.
- Neer, E. J., Lok, J. M. und Wolf, L. G. (1984). "Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide regulatory unit of brain adenylate cyclase." J Biol Chem. 259(22): 14222-14229.
- Nestler, E. J., Terwilliger, R. Z., Walker, J. R., Sevarino, K. A. und Duman, R. S. (1990). "Chronic cocaine treatment decreases levels of the G protein subunits Gi alpha and Go alpha in discrete regions of rat brain." **J Neurochem. 55**(3): 1079-1082.
- Nishimoto, I., Murayama, Y., Katada, T., Ui, M. und Ogata, E. (1989). "Possible direct linkage of insulin-like growth factor-II receptor with guanine nucleotide-binding proteins." **J Biol Chem. 264**(24): 14029-14038.
- Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Okamoto, T., Murayama, Y. und Ogata, E. (1993). "Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTPbinding protein G(o)." **Nature. 362**(6415): 75-79.
- Nishio, M., Kanda, Y., Mizuno, K. und Watanabe, Y. (2002). "Methamphetamine increases the hippocampal alpha(2A)-adrenergic receptor and Galpha(o) in mice." **Neurosci Lett. 334**(3): 145-148.
- Northup, J. K., Smigel, M. D. und Gilman, A. G. (1982). "The guanine nucleotide activating site of the regulatory component of adenylate cyclase. Identification by ligand binding." J Biol Chem. 257(19): 11416-11423.
- Nürnberg, B. und Ahnert-Hilger, G. (1996). "Potential roles of heterotrimeric G proteins of the endomembrane system." **FEBS Lett. 389**(1): 61-65.
- O'Dowd, B. F., Hnatowich, M., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. und Bouvier, M. (1989). "Palmitoylation of the human beta 2-adrenergic receptor. Mutation of Cys341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor." **J Biol Chem. 264**(13): 7564-7569.
- Okada, F., Crow, T. J. und Roberts, G. W. (1990). "G-proteins (Gi, Go) in the basal ganglia of control and schizophrenic brain." **J Neural Transm Gen Sect. 79**(3): 227-234.
- Okamoto, T., Katada, T., Murayama, Y., Ui, M., Ogata, E. und Nishimoto, I. (1990). "A simple structure encodes G protein-activating function of the IGF-II/mannose 6-phosphate receptor." **Cell. 62**(4): 709-717.
- Oppi, C., Wagner, T., Crisari, A., Camerini, B. und Tocchini Valentini, G. P. (1992). "Attenuation of GTPase activity of recombinant G(o) alpha by peptides representing sequence permutations of mastoparan." **Proc Natl Acad Sci U S A. 89**(17): 8268-8272.
- Owen, F., Cross, A. J., Crow, T. J., Lofthouse, R. und Poulter, M. (1981). "Neurotransmitter receptors in brain in schizophrenia." Acta Psychiatr Scand Suppl. 291: 20-28.
- Pahner, I., Holtje, M., Winter, S., Nurnberg, B., Ottersen, O. P. und Ahnert-Hilger, G. (2002). "Subunit composition and functional properties of G-protein heterotrimers on rat chromaffin granules." **Eur J Cell Biol. 81**(8): 449-456.
- Pahner, I., Holtje, M., Winter, S., Takamori, S., Bellocchio, E. E., Spicher, K., Laake, P., Nurnberg, B., Ottersen, O. P. und Ahnert-Hilger, G. (2003). "Functional G-protein heterotrimers are associated with vesicles of putative glutamatergic terminals: implications for regulation of transmitter uptake." Mol Cell Neurosci. 23(3): 398-413.
- Parsons, S. M. (2000). "Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage." **FASEB J. 14**(15): 2423-2434.
- Peter, D., Jimenez, J., Liu, Y., Kim, J. und Edwards, R. H. (1994). "The chromaffin granule and synaptic vesicle amine transporters differ in substrate recognition and sensitivity to inhibitors." **J Biol Chem. 269**(10): 7231-7237.

- Pletscher, A. (1977). "Effect of neuroleptics and other drugs on monoamine uptake by membranes of adrenal chromaffin granules." **Br J Pharmacol. 59**(3): 419-424.
- Probes, M. (2004). Molecular Probes Amplex ® Red Monoamine Oxidase Assay Kit (A12214).
- Pytliak, M., Vargova, V., Mechirova, V. und Felsoci, M. (2011). "Serotonin receptors from molecular biology to clinical applications." **Physiol Res. 60**(1): 15-25.
- Ramamoorthy, S., Shippenberg, T. S. und Jayanthi, L. D. (2011). "Regulation of monoamine transporters: Role of transporter phosphorylation." **Pharmacol Ther. 129**(2): 220-238.
- Raquet, X., Eckert, J. H., Muller, S. und Johnsson, N. (2001). "Detection of altered protein conformations in living cells." **J Mol Biol. 305**(4): 927-938.
- Scherer, N. M., Toro, M. J., Entman, M. L. und Birnbaumer, L. (1987). "G-protein distribution in canine cardiac sarcoplasmic reticulum and sarcolemma: comparison to rabbit skeletal muscle membranes and to brain and erythrocyte G-proteins." Arch Biochem Biophys. 259(2): 431-440.
- Schildkraut, J. J. (1965). "The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence." **Am J Psychiatry. 122**(5): 509-522.
- Schuldiner, S. (1994). "A molecular glimpse of vesicular monoamine transporters." J Neurochem. 62(6): 2067-2078.
- Schultze, S. M., Jensen, J., Hemmings, B. A., Tschopp, O. und Niessen, M. (2011). "Promiscuous affairs of PKB/AKT isoforms in metabolism." Arch Physiol Biochem. 117(2): 70-77.
- Siegel, G. J., Agranoff, B. W., Albers, R. W., Fisher, S. K. und Uhler, M. D. (1999). **Basic Neurochemistry - Molecular, Cellular and Medical Aspects** Lippincott Williams & Wilkins.
- Slepak, V. Z., Quick, M. W., Aragay, A. M., Davidson, N., Lester, H. A. und Simon, M. I. (1993a). "Random mutagenesis of G protein alpha subunit G(o)alpha. Mutations altering nucleotide binding." J Biol Chem. 268(29): 21889-21894.
- Slepak, V. Z., Wilkie, T. M. und Simon, M. I. (1993b). "Mutational analysis of G protein alpha subunit G(o) alpha expressed in Escherichia coli." J Biol Chem. 268(2): 1414-1423.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. und Klenk, D. C. (1985).
 "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal Biochem. 150(1): 76-85.
- Snider, J., Kittanakom, S., Damjanovic, D., Curak, J., Wong, V. und Stagljar, I. (2010). "Detecting interactions with membrane proteins using a membrane two-hybrid assay in yeast." Nat Protoc. 5(7): 1281-1293.
- Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Kempf, R. C., Long, J., Laidler, P., Mijatovic, S., Maksimovic-Ivanic, D., Stivala, F., Mazzarino, M. C., Donia, M., Fagone, P., Malaponte, G., Nicoletti, F., Libra, M., Milella, M., Tafuri, A., Bonati, A., Basecke, J., Cocco, L., Evangelisti, C., Martelli, A. M., Montalto, G., Cervello, M. und McCubrey, J. A. (2011). "Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapyimplications for cancer and aging." Aging (Albany NY). 3(3): 192-222.
- Stern-Bach, Y., Greenberg-Ofrath, N., Flechner, I. und Schuldiner, S. (1990). "Identification and purification of a functional amine transporter from bovine chromaffin granules." J Biol Chem. 265(7): 3961-3966.
- Sternweis, P. C. und Robishaw, J. D. (1984). "Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain." J Biol Chem. 259(22): 13806-13813.
- Strathmann, M., Wilkie, T. M. und Simon, M. I. (1990). "Alternative splicing produces transcripts encoding two forms of the alpha subunit of GTP-binding protein Go." Proc Natl Acad Sci U S A. 87(17): 6477-6481.
- Strittmatter, S. M., Valenzuela, D., Kennedy, T. E., Neer, E. J. und Fishman, M. C. (1990). "G0 is a major growth cone protein subject to regulation by GAP-43." **Nature. 344**(6269): 836-841.

- Strittmatter, S. M., Valenzuela, D., Sudo, Y., Linder, M. E. und Fishman, M. C. (1991a). "An intracellular guanine nucleotide release protein for G0. GAP-43 stimulates isolated alpha subunits by a novel mechanism." **J Biol Chem. 266**(33): 22465-22471.
- Strittmatter, S. M., Valenzuela, D., Vartanian, T., Sudo, Y., Zuber, M. X. und Fishman, M. C. (1991b). "Growth cone transduction: Go and GAP-43." J Cell Sci Suppl. 15: 27-33.
- Sudo, Y., Valenzuela, D., Beck-Sickinger, A. G., Fishman, M. C. und Strittmatter, S. M. (1992). "Palmitoylation alters protein activity: blockade of G(o) stimulation by GAP-43." EMBO J. 11(6): 2095-2102.
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Gronborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brugger, B., Ringler, P., Muller, S. A., Rammner, B., Grater, F., Hub, J. S., De Groot, B. L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmuller, H., Heuser, J., Wieland, F. und Jahn, R. (2006). "Molecular anatomy of a trafficking organelle." Cell. 127(4): 831-846.
- Tanaka, M., Treloar, H., Kalb, R. G., Greer, C. A. und Strittmatter, S. M. (1999). "G(o) protein-dependent survival of primary accessory olfactory neurons." Proc Natl Acad Sci U S A. 96(24): 14106-14111.
- Tasken, K. und Aandahl, E. M. (2004). "Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A." **Physiol Rev. 84**(1): 137-167.
- Turner, R. S. und Desmurget, M. (2010). "Basal ganglia contributions to motor control: a vigorous tutor." **Curr Opin Neurobiol. 20**(6): 704-716.
- Valenzuela, D., Han, X., Mende, U., Fankhauser, C., Mashimo, H., Huang, P., Pfeffer, J., Neer, E. J. und Fishman, M. C. (1997). "G alpha(o) is necessary for muscarinic regulation of Ca2+ channels in mouse heart." Proc Natl Acad Sci U S A. 94(5): 1727-1732.
- van Biesen, T., Hawes, B. E., Raymond, J. R., Luttrell, L. M., Koch, W. J. und Lefkowitz, R. J. (1996). "G(o)-protein alpha-subunits activate mitogen-activated protein kinase via a novel protein kinase C-dependent mechanism." J Biol Chem. 271(3): 1266-1269.
- Van Meurs, K. P., Angus, C. W., Lavu, S., Kung, H. F., Czarnecki, S. K., Moss, J. und Vaughan, M. (1987). "Deduced amino acid sequence of bovine retinal Go alpha: similarities to other guanine nucleotide-binding proteins." Proc Natl Acad Sci U S A. 84(10): 3107-3111.
- Vincent, M. S. und Near, J. A. (1991). "Purification of a [3H]dihydrotetrabenazine-binding protein from bovine adrenal medulla." **Mol Pharmacol. 40**(6): 889-894.
- Walsh, D. A., Perkins, J. P. und Krebs, E. G. (1968). "An adenosine 3',5'-monophosphatedependant protein kinase from rabbit skeletal muscle." J Biol Chem. 243(13): 3763-3765.
- Waltereit, R. und Weller, M. (2003). "Signaling from cAMP/PKA to MAPK and synaptic plasticity." **Mol Neurobiol. 27**(1): 99-106.
- Walther, D. J., Peter, J. U., Winter, S., Holtje, M., Paulmann, N., Grohmann, M., Vowinckel, J., Alamo-Bethencourt, V., Wilhelm, C. S., Ahnert-Hilger, G. und Bader, M. (2003). "Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release." Cell. 115(7): 851-862.
- Wang, Y. M., Gainetdinov, R. R., Fumagalli, F., Xu, F., Jones, S. R., Bock, C. B., Miller, G. W., Wightman, R. M. und Caron, M. G. (1997). "Knockout of the vesicular monoamine transporter 2 gene results in neonatal death and supersensitivity to cocaine and amphetamine." Neuron. 19(6): 1285-1296.
- Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S. E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., Bork, P., Botcherby, M., Bray, N., Brent, M. R., Brown, D. G., Brown, S. D., Bult, C., Burton, J., Butler, J., Campbell, R. D., Carninci, P., Cawley, S., Chiaromonte, F., Chinwalla, A. T., Church, D. M., Clamp, M., Clee, C., Collins, F. S., Cook, L. L., Copley, R. R., Coulson, A., Couronne, O., Cuff, J., Curwen, V.,

Cutts, T., Daly, M., David, R., Davies, J., Delehaunty, K. D., Deri, J., Dermitzakis, E. T., Dewey, C., Dickens, N. J., Diekhans, M., Dodge, S., Dubchak, I., Dunn, D. M., Eddy, S. R., Elnitski, L., Emes, R. D., Eswara, P., Eyras, E., Felsenfeld, A., Fewell, G. A., Flicek, P., Foley, K., Frankel, W. N., Fulton, L. A., Fulton, R. S., Furey, T. S., Gage, D., Gibbs, R. A., Glusman, G., Gnerre, S., Goldman, N., Goodstadt, L., Grafham, D., Graves, T. A., Green, E. D., Gregory, S., Guigo, R., Guyer, M., Hardison, R. C., Haussler, D., Hayashizaki, Y., Hillier, L. W., Hinrichs, A., Hlavina, W., Holzer, T., Hsu, F., Hua, A., Hubbard, T., Hunt, A., Jackson, I., Jaffe, D. B., Johnson, L. S., Jones, M., Jones, T. A., Joy, A., Kamal, M., Karlsson, E. K., Karolchik, D., Kasprzyk, A., Kawai, J., Keibler, E., Kells, C., Kent, W. J., Kirby, A., Kolbe, D. L., Korf, I., Kucherlapati, R. S., Kulbokas, E. J., Kulp, D., Landers, T., Leger, J. P., Leonard, S., Letunic, I., Levine, R., Li, J., Li, M., Lloyd, C., Lucas, S., Ma, B., Maglott, D. R., Mardis, E. R., Matthews, L., Mauceli, E., Mayer, J. H., McCarthy, M., McCombie, W. R., McLaren, S., McLay, K., McPherson, J. D., Meldrim, J., Meredith, B., Mesirov, J. P., Miller, W., Miner, T. L., Mongin, E., Montgomery, K. T., Morgan, M., Mott, R., Mullikin, J. C., Muzny, D. M., Nash, W. E., Nelson, J. O., Nhan, M. N., Nicol, R., Ning, Z., Nusbaum, C., O'Connor, M. J., Okazaki, Y., Oliver, K., Overton-Larty, E., Pachter, L., Parra, G., Pepin, K. H., Peterson, J., Pevzner, P., Plumb, R., Pohl, C. S., Poliakov, A., Ponce, T. C., Ponting, C. P., Potter, S., Quail, M., Reymond, A., Roe, B. A., Roskin, K. M., Rubin, E. M., Rust, A. G., Santos, R., Sapojnikov, V., Schultz, B., Schultz, J., Schwartz, M. S., Schwartz, S., Scott, C., Seaman, S., Searle, S., Sharpe, T., Sheridan, A., Shownkeen, R., Sims, S., Singer, J. B., Slater, G., Smit, A., Smith, D. R., Spencer, B., Stabenau, A., Stange-Thomann, N., Sugnet, C., Suyama, M., Tesler, G., Thompson, J., Torrents, D., Trevaskis, E., Tromp, J., Ucla, C., Ureta-Vidal, A., Vinson, J. P., Von Niederhausern, A. C., Wade, C. M., Wall, M., Weber, R. J., Weiss, R. B., Wendl, M. C., West, A. P., Wetterstrand, K., Wheeler, R., Whelan, S., Wierzbowski, J., Willey, D., Williams, S., Wilson, R. K., Winter, E., Worley, K. C., Wyman, D., Yang, S., Yang, S. P., Zdobnov, E. M., Zody, M. C. und Lander, E. S. (2002). "Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome." Nature. 420(6915): 520-562.

- Wess, J. (1997). "G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition." **Faseb J. 11**(5): 346-354.
- Wimalasena, K. (2011). "Vesicular monoamine transporters: structure-function, pharmacology, and medicinal chemistry." **Med Res Rev. 31**(4): 483-519.
- Winter, S., Brunk, I., Walther, D. J., Holtje, M., Jiang, M., Peter, J. U., Takamori, S., Jahn, R., Birnbaumer, L. und Ahnert-Hilger, G. (2005). "Galphao2 regulates vesicular glutamate transporter activity by changing its chloride dependence." J Neurosci. 25(18): 4672-4680.
- Worley, P. F., Baraban, J. M., Van Dop, C., Neer, E. J. und Snyder, S. H. (1986). "Go, a guanine nucleotide-binding protein: immunohistochemical localization in rat brain resembles distribution of second messenger systems." Proc Natl Acad Sci U S A. 83(12): 4561-4565.
- Xie, R., Li, L., Goshima, Y. und Strittmatter, S. M. (1995). "An activated mutant of the alpha subunit of G(o) increases neurite outgrowth via protein kinase C." Brain Res Dev Brain Res. 87(1): 77-86.
- Ye, Q. und Worman, H. J. (1995). "Protein-protein interactions between human nuclear lamins expressed in yeast." **Exp Cell Res. 219**(1): 292-298.
- Yin, X., Ouyang, S., Xu, W., Zhang, X., Fok, K. L., Wong, H. Y., Zhang, J., Qiu, X., Miao, S., Chan, H. C. und Wang, L. (2007). "YWK-II protein as a novel G(o)-coupled receptor for Mullerian inhibiting substance in cell survival." J Cell Sci. 120(Pt 9): 1521-1528.
- Zhu, M., Gach, A. A., Liu, G., Xu, X., Lim, C. C., Zhang, J. X., Mao, L., Chuprun, K., Koch, W. J., Liao, R., Koren, G., Blaxall, B. C. und Mende, U. (2008). "Enhanced calcium

cycling and contractile function in transgenic hearts expressing constitutively active G alpha o* protein." **Am J Physiol Heart Circ Physiol. 294**(3): H1335-1347.

Publikationen

Brunk, I., Blex, C., Sanchis-Segura, C., Sternberg, J., Perreau-Lenz, S., Bilbao, A., Hortnagl, H., Baron, J., Juranek, J., Laube, G., Birnbaumer, L., Spanagel, R. und Ahnert-Hilger, G. (2008). "Deletion of Go2alpha abolishes cocaine-induced behavioral sensitization by disturbing the striatal dopamine system." Faseb J. 22(10): 3736-3746.

Preise

Berlin Brain Days:

Best Talk 2010: 1st prize: Jens Baron (Learning and Memory), Go1 protein subunit alpha as an important regulator of the dopaminergic system crucial for survival

Best Poster 2009: 1st prize: Jens Baron, Go1 protein subunit (as an important regulator of the monoaminergic system crucial for survival

http://www.neuroscience-berlin.de/bbd/

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfen erstellt habe. Einige Abbildungen sind Originale aus zitierten Vorlagen. Die Beschriftung ist teilweise in englischer Sprache.

Berlin, den

Jens Baron

Lebenslauf

	Beruflicher Werdegang
2007-2012	Charité, Centrum für Anatomie, Institut für Integrative Neuroanatomie, Forschungsgruppe Ahnert-Hilger, Berlin, Deutschland
	Promotion
10/2009-02/2012	Assoziierte Mitgliedschaft in der Graduiertenschule "Learning and Memory" - Bewerbungsvortrag 2009: "Modulation of the monoaminergic system by the trimeric GTPase $G_{\rm o}$ "
09/2011	Networks - Graduiertenschulsymposium in Tübingen - Vortrag: "Interaction of $G_{o2}\alpha$ and vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2)"
02/2011-05/2011	Auslandsaufenthalt zur Vertiefung der Kenntnisse zum Split-Ubiquitin Yeast Two- Hybrid-Verfahren in der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Stagljar, Donnelly Centre for Cellular and Biomolecular Research, Toronto, Kanada.
11/2010	Berlin Brain Days - Ph.D. Symposium - Vortrag: "The vesicular monoamine transporter VMAT2 activates the $G_{o2}\alpha$ protein"
11/2010	Presenting in English - Workshop
10/2010	PPI Berlin - Current Trends in Network Biology - Workshop
09/2010	Networks - Graduiertenschulsymposium in Berlin - Vortrag: "Yeast Two-Hybrid - a methodological talk"; Poster: "Regulation of VMAT2 by G_o proteins and their influence on the monoaminergic system"
07/2010	7th FENS Forum of European Neuroscience in Amsterdam - Poster: "Go1 protein subunit α as an important regulator of the dopaminergic system crucial for survival"
12/2009	Berlin Brain Days - Ph.D. Symposium - Poster: ",Go1 protein subunit α as an important regulator of the monoaminergic system crucial for survival"
10/2009	Neuroscience 2009 - SfN Symposium in Chicago - Poster: "G _{o1} protein subunit α as an important regulator of the monoaminergic system crucial for survival"
2006-2007	Charité, Centrum für Anatomie, Institut für Zellbiologie und Neurobiologie, Forschungsgruppe Schumacher, Berlin, Deutschland
	Wissenschaftlicher Mitarbeiter
	Charakterisierung von microRNA-regulierten EGFP-Plasmidkonstrukten in pri- mären Neuronenkulturen des Hippocampus (molekulare Zellbiologie).
2004-2005	Bernhard Nocht Institut für Tropenmedizin, Forschungsgruppe Heussler, Hamburg, Deutschland
	Diplomarbeit
	Thema: "Klonierung und Charakterisierung der Cysteinprotease Calpain-7 des Malariaparasiten Plasmodium berghei" (molekulare Zellbiologie).
2001-2003	RCC-Cytotest Cell Research GMBH, Roßdorf, Deutschland
	Wissenschaftlicher Mitarbeiter
	Mikroskopische Analyse und Evaluation von zytogenen Präparationen aus gentoxischen Assays.
	Quantitative Analyse von strukturellen Chromosomenaberrationen.
1998-1999	Hospital "Zum Heiligen Geist", Kempen, Deutschland
	Zivildienst
	Ausbildung und Qualifikation
1999-2005	Technische Universität Darmstadt, Deutschland
	Biologiestudium
2005	Abschluss: Diplom

09/2003-11/2003	Hauptkurs in molekularer Zellbiologie am Max Planck Institut für Hirnforschung, Dr. Engelkamp (Frankfurt am Main)
08/2003	Kurs zur Entwicklungsbiologie mariner Tiere, Prof. Dr. Holstein (Banyuls sur mer, Frankreich)
07/2003-08/2003	Kurs zur Hydra-Entwicklung, molekulare Zellbiologie, Prof. Dr. Technau (TU-Darmstadt)
06/2003	Grundkurs in Zellbiologie, Prof. Dr. Holstein (TU-Darmstadt)
05/2003	Kurs in Tierphysiologie am Max Planck Institut für Hirnforschung, Prof. Dr. Galuske (Frankfurt am Main)
04/2003	Hauptkurs in Tierphysiologie, Prof. Langner (TU-Darmstadt)
10/2002-11/2002	Kurs in physikalischer Biochemie, Prof. Dr. Dencher (TU-Darmstadt)
02/2002-03/2002	Kurs in Proteinbiochemie, Dr. Neiss (TU-Darmstadt)
1989-1998	Michael Ende Gymnasium, Tönisvorst, Deutschland
1998 1997	Abschluss: Abitur Britisch-deutscher Austausch, City of Sunderland, England

Anhang

Liste der über den Y2H-Screen identifizierten Klone unter Einsatz des VMAT2-CT

DNA-Sequenzvergleich (NCBI BLAST; WU-BLAST); alphabetisch geordnet Klon 868 3-monooxgenase/tryptophan 5-monooxgenase activation protein, gamma polypeptide 782 abhydrolase domain containing 12 674 Accn1/A2bp1 trans-spliced mRNA sequence, ataxin 2 binding protein 1 795 acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1 13 aconitase 1; NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 a subcomplex 13; similar to pol protein; novel cell death-regulatory protein GRIM19 (Grim19); genes associated with retinoid-IFN-induced mortality 19 900 acyl-Coenzyme A binding domain containing 3 und weitere, s. Datei adenylate cyclase 5 1010 adrenocortical dysplasia 552 953 adrenocortical dvsplasia 1002 adrenocortical dysplasia, nuclear receptor-binding SET-domain protein 1 aldo-keto reductase family 1, member A4 (aldehyde reductase) 677 ankyrin repeat and SOCS box-containing 13 790 863 ankyrin repeat, family A (RFXANK-like), 2 apoptosis-associated tyrosine kinase (AATYK); insulin receptor substrate p53; brain-specific angio-4 genesis inhibitor 1-associated protein 1122 ARF5, ADP-ribosylation factor 5 Astn2 gene for astrotactin 2 543 ATP citrate lyase 888 ATP citrate lyase 1091 ATP citrate lyase 1115 ATP citrate lyase, s. auch 896 940 896 ATP citrate lyase, s. auch 940 ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1 1024 999 ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, delta 659 ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit 663 ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit 973 1064 ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit 1065 ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit 1013 ATPase inhibitory factor 1 1048 ATPase inhibitory factor 1 176 ATPase inhibitory factor 1 (Atpif1) / protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2 ATPase inhibitory factor 1, protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2 und weitere, 524 s. Datei 540 ATPase inhibitory factor 1, protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2 und weitere, s. Datei 627 ATPase inhibitory factor 1, protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2 und weitere, s. Datei 832 ATPase, Na+/K+ transporting, beta 1 polypeptide (Atp1b1) ATPase, Na+/K+ transporting, beta 2 polypeptide 693 ATPase, Na+/K+ transporting, beta 2 polypeptide, Na+/K+ -ATPase beta 2 subunit 942 639 avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene related B 610 basal cell adhesion molecule, (Lutheran blood group (Auberger b antigen included)) 254 Braf transforming, ferritin heavy chain 1 und weitere, s. Datei, nicht eindeutig 643 brain and kidney proline oxidase 2 (MmPOX2), proline dehydrogenase 742 brain and reproductive organ-expressed protein brain and reproductive organ-expressed protein 1087 416 branched chain ketoacid dehydrogenase kinase 838 bruno-like 4, RNA binding protein (Brunol4) 713 C-terminal binding protein 1 995 C-terminal binding protein 1 calmodulin binding transcription activator 2 647 690 carboxypeptidase E carboxypeptidase E 908 1109 carboxypeptidase E

412 carboxypeptidase E (Cpe)

497 carboxypeptidase E (Cpe) carboxypeptidase E (Cpe) 814 826 carboxypeptidase E (Cpe) 833 carboxypeptidase E (Cpe) 1112 carboxypeptidase E (Cpe) 656 carboxypeptidase E (Cpe) carboxypeptidase E (Cpe) 767 778 carboxypeptidase E (Cpe) 803 carboxypeptidase E (Cpe) carboxypeptidase E (Cpe) 851 carboxypeptidase E (Cpe) 867 carboxypeptidase E (Cpe) 907 carboxypeptidase E (Cpe) 929 957 carboxypeptidase E (Cpe) 1111 carboxypeptidase E (Cpe) 1129 carboxypeptidase E (Cpe) carboxypeptidase E; carboxypeptidase H 7 911 carnitine deficiency-associated gene expressed in ventric... 761 Cd27 binding protein (Hindu God of destruction) 245 chaperonin containing Tcp1, subunit 7 5 cisplatin resistance-associated overexpressed protein (CROP); PUTATIVE ASPARTATE-ARGININE-**RICH mRNA BINDING PROTEIN** 846 CLIP associating protein 2 (Clasp2) 645 collagen triple helix repeat containing 1 988 Contains the Sh2d1a gene for SH2 domain protein 1A, the 3' end of the Odz1 gene for odd Oz/ten-m homolog 1 542 cytochrome b-245, alpha polypeptide 174 cytochrome b5 type B; cytochrome b5 outer mitochondrial membrane precursor 889 disintegrin-like and metalloprotease domain with thrombospondin type I motifs-like 3 (ADAMTSL3) 336 DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6 90 dynactin 5 626 echinoderm microtubule associated protein like 2 675 electron transferring flavoprotein, dehydrogenase 885 elongation factor Tu GTP binding domain containing 2 635 elongation factor Tu GTP binding domain containing 2, U5 small nuclear ribonucleoprotein 668 enolase 1, alpha non-neuron und weitere, s. Datei, nicht eindeutig 1006 ethanolamine kinase 1 648 eukaryotic translation elongation factor 1 eukaryotic translation elongation factor 2 777 861 eukaryotic translation elongation factor 2 849 eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked, CUB and Sushi multiple domains 3 F-box and WD-40 domain protein 5 404 657 family with sequence similarity 96, member B 708 fatty acid amide hydrolase 54 features flanking subject sequence: at 5' side: heterochromatin protein 1, binding protein 3; at 3' side: kinesin family member 17; vascular SH2 domain-containing protein (Sh2d5); Phosphotyrosine interaction (PID or PI) containing protein 989 Features flanking this part of subject sequence: at 5' side: Rho GTPase activating protein 23, at 3' side: Snap-25-interacting protein 646 feminization 1 homolog b 743 filamin B, beta (actin binding protein 278) (FLNB) 698 filamin B, beta (actin binding protein 278) (FLNB) 866 filamin, alpha 931 filamin, alpha 866 filamin, alpha filamin, beta, filamin B, beta 930 853 flotillin 1 649 fumarate hydratase 1 864 fumarate hydratase 1 834 Fyn proto-oncogene, protein-tyrosine kinase fyn 9 GABA-A receptor subunit a 4; 628 gamma-glutamyltransferase 7, gamma-glutamyltransferase-like 3 (GGTL3) 585 glutamate receptor, ionotropic, NMDA1 (zeta 1) 831 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) und weitere, s. Datei, nicht eindeutig, s. auch 827 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) und weitere, s. Datei, nicht eindeutig, s. auch 827 831 997 glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase 943 growth factor receptor bound protein 2 und weitere, s. Datei, nicht eindeutig

932 guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 1 714 guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2 like 1 und weitere, s. Datei, nicht eindeutig 812 HECT domain and ankyrin repeat containing, E3 ubiquitin p. 890 Hepatocellular carcinoma-associated antigen 127 und weitere, s. Datei 2 HESB like domain containing 1 isoform 1; iron-sulfur cluster assembly 2 homolog; epididymal secretory protein 68 HESB like domain containing 1 isoform 1; similar to Iron-sulfur cluster assembly 2 homolog; hesB/yadR/yfhF family containing protein 906 HGF-regulated tyrosine kinase HLA-B-associated transcript 3 (BAT3) 3 749 homer 1d hsp40 mRNA for heat shock protein 40, DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1 684 hypothetical protein 975 976 hypothetical protein hypothetical protein LOC28006 26 990 hypothetical protein LOC28006 hypothetisches Protein 592 595 hypothetisches Protein inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1 954 241 integral membrain protein 2 981 integrin alpha FG-GAP repeat containing 2 941 JTV1 gene 35 junctophilin 4; Features flanking this part of subject sequence: at 5' side: adaptor protein complex AP-1, gamma 2 subunit; at 3' side: junctophilin 4 isoform a 527 kein Sequenzierergebniss 631 kein Sequenzierergebniss 823 kein Sequenzierergebniss kein Sequenzierergebniss 850 852 kein Sequenzierergebniss 871 kein Sequenzierergebniss 883 kein Sequenzierergebniss kein Sequenzierergebniss 912 937 kein Sequenzierergebniss 1066 kein Sequenzierergebniss kein Sequenzierergebniss 1069 1083 kein Sequenzierergebniss 813 kelch domain containing 3 (Klhdc3) 87 kelch domain containing 9; Galactose oxidase, central domain structure containing protein; apolipoprotein A-II (Apoa2); kelch/ankyrin repeat containing cyclin A1 interacting protein (KARCA1) 28 Krt222" /product="keratin 222; Similar to keratin, type I cytoskeletal 15 (Cytokeratin 15) (K15) (CK 15); similar to Homo sapiens BAF57 (BAF57) 748 laminin receptor 1 (ribosomal protein SA), translational controlled 40 kDa polyyeptide p40 low density lipoprotein-related protein 1B; myosin IIIB; follistatin-like 1; protein kinase, DNA activated, 88 catalytic polypeptide; MORC; nicht eindeutig! 608 malate dehydrogenase 1, NAD (soluble) 817 malate dehydrogenase, NAD, soluble 1107 mammary-derived growth inhibitor (MDGI), fatty acid binding protein 3, muscle and heart, u. weitere s. Datei 1029 mannosidase, alpha, class 2C 970 mannosidase, alpha, class 2C, member 1 mannosidase, alpha, class 2C, member 1 (Man2c1) 840 967 matrin 3 und weitere, s. Datei, nicht eindeutig 508 mDj4, DnaJ (Hsp40) homolog ... S. Datei, nicht eindeutig 977 melanoma antigen, family D, 2 681 microtubule-associated protein 6 isoform 1, 2 502 misato homolog 1 1055 mitochondrial genes coding for three transfer RNAs (specific for Phe, Val and Leu), 12S ribosomal RNA. and 16S ribosomal RNA 678 mitogen activated protein kinase kinase kinase 3 und weitere, s. Datei 637 MRE-binding transcription factor, metal response element binding transcription factor 1 1126 MRE-binding transcription factor, metal response element binding transcription factor 1 829 Na+/K+ -ATPase beta 1 subunit 754 NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 6 und weitere, s, Datei 632 nephroblastoma overexpressed netrin receptor Unc5h4 586 893 neurexin II 794 nitrilase family, member 2 1128 Nono, Non-POU-domain-containing, octamer binding protein

- 619 Nrf3, nuclear factor, erythroid derived 2, like 3
- 619 Nrf3, nuclear factor, erythroid derived 2, like 3
- 6 nuclear interacting partner of ALK (NIPA); ubiquitin-conjugating enzyme E2H; synuclein b (SNCB)
- 711 nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3 (Nr1h3) und weitere, s. Datei nucleobindin 1
- 933
- 414 Oz/ten-m homolog 2, similar to Teneurin-2 (Ten-2) (Tenascin-M2) (Ten-m2)
- 938 pam, highwire, rpm 1; MYC binding protein 2
- 1124 papilin, proteoglycan-like sulphated glycoprotein
- 173 pellino 1
- 617 phosphodiesterase 6D, cGMP-specific, rod, delta
- 617 phosphodiesterase 6D, cGMP-specific, rod, delta
- 607 phospholipase D family, member 3, (schwannoma-associated protein (SAM9))
- 808 plasminogen activator, tissue
- 806 potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 1 (Kcnab1)
- 811 proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3 (Psmd3)
- 507 proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 6
- 936 protein kinase C binding protein 1
- 732 protocadherin gamma subfamily C, 3, protocadherin gamma subfamily A, 1, protocadherin gamma subfamily A, 2
- 820 Putative inorganic polyphosphate/ATP-NAD kinase
- 836 R3H domain (binds single-stranded nucleic acids)
- 947 Rap1 GTPase-activating protein, s. auch 337
- 337 Rap1 GTPase-activating protein, s. auch 947
- 886 Rho GTPase activating protein 18, u. weitere s. Datei
- 935 ring finger protein 10
- 641 ring finger protein 187
- 974 ring finger protein 208
- 1025 ring finger protein 208
- 815 ring finger protein, 2 und weitere, s. Datei, nicht eindeutig
- 892 RNA binding motif protein 39
- 1103 RNA binding motif protein 39, RNA-binding region (RNP1, RRM) containing 2
- 1074 RNA binding motif protein 39, transcription coactivator CAPER, u. weitere s. Datei
- 927 RNA polymerase 1-3 isoform 2
- 707 rogdi homolog, leucine zipper domain protein
- 948 ROSA 26 transcription 1
- 810 s. Datei, nicht eindeutig
- 244 s. Datei, nicht eindeutig
- 588 s. Datei, nicht eindeutig
- 597 s. Datei, nicht eindeutig
- s. Datei, nicht eindeutig 717
- 733 s. Datei, nicht eindeutig
- 768 s. Datei, nicht eindeutig
- 787 s. Datei, nicht eindeutig
- 792 s. Datei, nicht eindeutig
- 793 s. Datei, nicht eindeutig
- 800 s. Datei, nicht eindeutig
- 841 s. Datei, nicht eindeutig
- 898 s. Datei, nicht eindeutig
- 1117 sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6B
- 691 serine/arginine repetitive matrix 1und weitere, s. Datei, nicht eindeutig
- 854 serine/threonine kinase 4
- 837 shisa homolog 9
- 175 SNAP25
- 862 Snap25 gene for synaptosomal-associated protein 25
- 642 solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, Graves disease autoantigen), member 16
- 1125 source of immunodominant MHC-associated peptides
- 994 spectrin beta 2 (Spnb2)
- 48 splicing factor, arginine/serine-rich 5; similar to SRp40-1; flanking this part of subject sequence: at 3' side: oogenesin 1; at 5' side: protein tyrosine phosphatase 4a2; at 3' side: aarF domain containing kinase 1; at 5' side: similar to beacon; at 3' side: similar to Oog1 protein isoform 1; INSULIN-INDUCED **GROWTH RESPONSE PROTEIN CL-4**
- 736 stathmin-like 2
- 998 stathmin-like 2
- 1036 stathmin-like 3
- 700 stathmin-like 3, SCG10-related protein
- 774 stathmin-like 3, SCG10-related protein
- 403 stathmin-like 3, SCG10-related protein HiAT3
- 539 stathmin-like 3, SCG10-related protein HiAT3
- 560 stathmin-like 3, SCG10-related protein HiAT3

- 1035 stathmin-like 3, SCG10-related protein HiAT3, Scgn10 like-protein
- 1 stathmin-like 3; SCG10-like-protein (Sclip); SCG10-related protein HiAT3
- 61 succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (Ip)
- 949 suppressor of cytokine signaling 6
- 894 tarp mRNA for tubulointersititial nephritis antigen-related protein
- 93 THAP domain containing 11
- 12 Tnf receptor-associated factor 5; uvm., siehe Datai
- 909 translational controlled 40 kDa polyyeptide p40, ribosomal protein SA
- 640 transmembrane protein 151A
- 897 transmembrane protein 151A
- 496 transmembrane protein 186, hypothetisch
- 624 triosephosphate isomerase und weitere, s. Datei, nicht eindeutig
- 944 TRIP-Br1, SERTA domain containing 1, p34SEI-1
- 706 trophinin und weitere, s. Datei
- 413 tubulin alpha 1A, 3B, 7, 8, (weitere, aber nicht eindeutig)
- 612 tumor necrosis factor (ligand) superfamily
- 764 UBX domain protein 6
- 925 unclassifiable, s. Datei
- 902 WD repeat domain 13
- 962 WD repeat domain 61
- 845 WD repeat domain 74 (Wdr74)
- 934 Wolfram syndrome 1 homolog
- 92 WW domain binding protein 7; potassium channel tetramerisation domain containing 3
- 43 yippee-like 2; flanking this part of subject sequence: at 5' side: yippee-like 2; at 3' side: glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 1; DIGEORGE SYNDROME-RELATED PROTEIN FKSG4 homolog
- zinc finger, MIZ-type containing 1, retinoic acid induced 17, s. auch 629
- 229 zinc finger, MIZ-type containing 1, retinoic acid induced 17, s. auch 763
- zinc finger, MIZ-type containing 2 (Zmiz2)
- 1070 zinc finger, MIZ-type containing 2, retinoic acid induced 17

Massenspektrometrische Analyse von Proteinbanden nach dem

GST-Pulldown mit VMAT2-NT, -L3, -CT

GST-PD mit VMAT2-NT; Mascot-Analyse; Peptide aller Organismen; Gel A und B

- Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2 [K22E HUMAN]
- Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 [K2C1_HUMAN]
- Chaperone protein dnaK OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=dnaK PE=2 SV=1 -[DNAK_ECO24]
- Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 [K1C9_HUMAN]
- Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 [K1C10 HUMAN]
- Elongation factor Tu 1 OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=tuf1 PE=3 SV=1 -[EFTU1_ECO24]
- Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4 [ALBU_BOVIN]
- Tubulin beta-4 chain OS=Xenopus laevis GN=tubb4 PE=2 SV=1 [TBB4_XENLA]
- Glutathione S-transferase class-mu 26 kDa isozyme OS=Schistosoma japonicum PE=1 SV=3 -[GST26_SCHJA]
- Tubulin beta-1 chain OS=Gallus gallus PE=2 SV=1 [TBB1_CHICK]
- Tubulin beta-4 chain OS=Gallus gallus PE=1 SV=1 [TBB4_CHICK]
- Phosphoenolpyruvate synthase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ppsA PE=1 SV=5 [PPSA_ECOLI]
- Tubulin alpha-4A chain OS=Bos taurus GN=TUBA4A PE=1 SV=2 [TBA4A_BOVIN]
- Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4 [K1C14_HUMAN]
- Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KRT16 PE=1 SV=4 [K1C16_HUMAN]
- Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3 [K2C5_HUMAN]
- Biosynthetic arginine decarboxylase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=speA PE=1 SV=2 -[SPEA_ECOLI]
- Keratin, type II cytoskeletal 6B OS=Homo sapiens GN=KRT6B PE=1 SV=5 [K2C6B_HUMAN]
- Outer membrane protein F OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompF PE=1 SV=1 [OMPF_ECOLI]
- Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1 [TRYP_PIG]
- Soluble pyridine nucleotide transhydrogenase OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=sthA PE=3 SV=1 - [STHA_ECO24]
- Galactitol-1-phosphate 5-dehydrogenase OS=Escherichia coli O157:H7 GN=gatD PE=3 SV=1 -[GATD_ECO57]

- ATP synthase subunit beta OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=atpD PE=3 SV=1 - [ATPB_ECO24]
- Vesicle-fusing ATPase OS=Cricetulus griseus GN=NSF PE=1 SV=1 [NSF_CRIGR]
- 60 kDa chaperonin OS=Salmonella agona (strain SL483) GN=groL PE=3 SV=1 [CH60_SALA4]
- Sulfate adenylyltransferase subunit 1 OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=cysN PE=3 SV=1 - [CYSN_ECO24]
- Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase OS=Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae (strain ATCC 700721 / MGH 78578) GN=hemL PE=3 SV=1 - [GSA_KLEP7]
- Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2 [DCD_HUMAN]
- Nucleoid-associated protein ndpA OS=Escherichia fergusonii (strain ATCC 35469 / DSM 13698 / CDC 0568-73) GN=ndpA PE=3 SV=1 [NDPA_ESCF3]
- ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX OS=Desulfotalea psychrophila GN=clpX PE=3 SV=1 - [CLPX_DESPS]
- Glycerol kinase OS=Salmonella typhi GN=glpK PE=3 SV=3 [GLPK_SALTI]
- Actin, cytoplasmic 1 OS=Cercopithecus pygerythrus GN=ACTB PE=1 SV=1 [ACTB_CERPY]
- Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3 OS=Gallus gallus GN=ATP1A3 PE=2 SV=1 -[AT1A3_CHICK]
- Alpha-S2-casein OS=Bos taurus GN=CSN1S2 PE=1 SV=2 [CASA2_BOVIN]
- Rod shape-determining protein mreB OS=Escherichia coli O6 GN=mreB PE=3 SV=1 [MREB_ECOL6]
- Protein recA OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=recA PE=3 SV=1 [RE-CA_ECO24]
- Selenide, water dikinase OS=Escherichia coli O9:H4 (strain HS) GN=selD PE=3 SV=1 [SELD_ECOHS]
- 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 2 OS=Escherichia coli O157:H7 GN=fabF PE=3 SV=2 -[FABF_ECO57]
- Guanosine-3',5'-bis(diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase OS=Escherichia coli O157:H7 GN=spoT PE=3 SV=1 - [SPOT_EC057]
- D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase subunit gatZ OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=gatZ PE=3 SV=1 [GATZ_ECO24]
- Replicative DNA helicase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dnaB PE=1 SV=1 [DNAB_ECOLI]
- Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ptsl PE=1 SV=1 [PT1_ECOLI]
- Beta-lactoglobulin OS=Bos taurus GN=LGB PE=1 SV=3 [LACB_BOVIN]
- Rubber elongation factor protein OS=Hevea brasiliensis PE=1 SV=2 [REF_HEVBR]
- Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1 OS=Mus musculus GN=Slc25a12 PE=1 SV=1 [CMC1_MOUSE]
- Chaperone protein dnaJ OS=Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae (strain ATCC 700721 / MGH 78578) GN=dnaJ PE=3 SV=1 - [DNAJ_KLEP7]
- Elongation factor 1-alpha OS=Dictyostelium discoideum GN=eef1a1 PE=1 SV=2 [EF1A_DICDI]
- L-serine dehydratase 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sdaA PE=1 SV=3 [SDHL_ECOLI]
- Tryptophanase OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=tnaA PE=3 SV=1 -[TNAA_ECO24]
- Kappa-casein OS=Bos taurus GN=CSN3 PE=1 SV=1 [CASK_BOVIN]
- Alpha-galactosidase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=melA PE=1 SV=1 [AGAL_ECOLI]
- Beta-casein OS=Ovis aries GN=CSN2 PE=1 SV=3 [CASB_SHEEP]
- Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2 [K22E_HUMAN]
- Elongation factor Tu 1 OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=tuf1 PE=3 SV=1 -[EFTU1_ECO24]
- Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 [K2C1_HUMAN]
- Chaperone protein dnaK OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=dnaK PE=2 SV=1 -[DNAK_ECO24]
- Tubulin beta chain OS=Sus scrofa PE=1 SV=1 [TBB_PIG]
- Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 [K1C10_HUMAN]
- Tubulin beta-5 chain OS=Bos taurus GN=TUBB5 PE=2 SV=1 [TBB5_BOVIN]
- Tubulin beta-1 chain OS=Gallus gallus PE=2 SV=1 [TBB1_CHICK]
- Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4 [ALBU_BOVIN]
- Tubulin beta-4 chain OS=Xenopus laevis GN=tubb4 PE=2 SV=1 [TBB4_XENLA]
- Tubulin beta-4 chain OS=Gallus gallus PE=1 SV=1 [TBB4_CHICK]
- Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 [K1C9_HUMAN]
- Transcription termination factor rho OS=Escherichia coli O157:H7 GN=rho PE=3 SV=1 [RHO_ECO57]
- Glutathione S-transferase class-mu 26 kDa isozyme OS=Schistosoma japonicum PE=1 SV=3 -[GST26_SCHJA]
- Tubulin alpha chain OS=Xenopus laevis GN=tuba PE=2 SV=2 [TBA_XENLA]
- Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens GN=KRT6A PE=1 SV=3 [K2C6A_HUMAN]
- Keratin, type I cytoskeletal 13 OS=Homo sapiens GN=KRT13 PE=1 SV=4 [K1C13_HUMAN]
- Biosynthetic arginine decarboxylase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=speA PE=1 SV=2 -[SPEA_ECOLI]

- Tubulin alpha-4A chain OS=Bos taurus GN=TUBA4A PE=1 SV=2 [TBA4A_BOVIN]
- Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3 [K2C5_HUMAN]
- Keratin, type II cytoskeletal 4 OS=Homo sapiens GN=KRT4 PE=1 SV=4 [K2C4_HUMAN]
- Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4 [K1C14_HUMAN]
- Aldehyde-alcohol dehydrogenase OS=Escherichia coli O157:H7 GN=adhE PE=3 SV=2 [ADHE_ECO57]
- Beta-lactoglobulin OS=Bos taurus GN=LGB PE=1 SV=3 [LACB_BOVIN]
- Carbamoyl-phosphate synthase large chain OS=Escherichia coli (strain K12) GN=carB PE=1 SV=2 -[CARB_ECOLI]
- UDP-4-amino-4-deoxy-L-arabinose--oxoglutarate aminotransferase OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=arnB PE=3 SV=1 - [ARNB_ECO24]
- Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1 [TRYP_PIG]
- Soluble pyridine nucleotide transhydrogenase OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=sthA PE=3 SV=1 - [STHA_ECO24]
- Actin (Fragment) OS=Lumbricus rubellus PE=2 SV=1 [ACT_LUMRU]
- Rod shape-determining protein mreB OS=Escherichia coli O6 GN=mreB PE=3 SV=1 [MREB_ECOL6]
- Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3 [G3P_RAT]
- Phosphoenolpyruvate synthase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ppsA PE=1 SV=5 [PPSA_ECOLI]
- Ribose-phosphate pyrophosphokinase OS=Salmonella typhi GN=prs PE=3 SV=2 [KPRS_SALTI]
- Annexin A1 OS=Pan troglodytes GN=ANXA1 PE=2 SV=1 [ANXA1_PANTR]
- Alpha-S1-casein OS=Bos taurus GN=CSN1S1 PE=1 SV=2 [CASA1_BOVIN]
- Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Equus caballus GN=HSPA8 PE=2 SV=1 [HSP7C_HORSE]
- Outer membrane protein F OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompF PE=1 SV=1 [OMPF_ECOLI]
- Serpin B4 OS=Homo sapiens GN=SERPINB4 PE=1 SV=2 [SPB4_HUMAN]
- Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha OS=Mus musculus GN=Camk2a PE=1 SV=2 - [KCC2A_MOUSE]
- D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase subunit gatZ OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=gatZ PE=3 SV=1 [GATZ_ECO24]
- Vesicle-fusing ATPase OS=Cricetulus griseus GN=NSF PE=1 SV=1 [NSF_CRIGR]
- Uncharacterized oxidoreductase yeiT OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yeiT PE=4 SV=1 -[YEIT_ECOLI]
- Protein S100-A8 OS=Homo sapiens GN=S100A8 PE=1 SV=1 [S10A8_HUMAN]
- Glycerol kinase OS=Salmonella typhi GN=glpK PE=3 SV=3 [GLPK_SALTI]
- Elongation factor Tu, mitochondrial OS=Bos taurus GN=TUFM PE=1 SV=1 [EFTU_BOVIN]
- 6-phosphofructokinase OS=Enterobacter sp. (strain 638) GN=pfkA PE=3 SV=1 [K6PF_ENT38]
- Cysteine desulfurase OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=iscS PE=3 SV=1 -[ISCS_ECO24]
- Aconitate hydratase 2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=acnB PE=1 SV=3 [ACON2_ECOLI]
- Alpha-S2-casein OS=Bos taurus GN=CSN1S2 PE=1 SV=2 [CASA2_BOVIN]
- Serpin B3 OS=Homo sapiens GN=SERPINB3 PE=1 SV=2 [SPB3_HUMAN]
- Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV=1 [S10A9_HUMAN]
- 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 2 OS=Escherichia coli O157:H7 GN=fabF PE=3 SV=2 -[FABF_ECO57]
- ATP synthase subunit beta OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=atpD PE=3 SV=1 - [ATPB_ECO24]
- Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1 OS=Mus musculus GN=Slc25a12 PE=1 SV=1 [CMC1_MOUSE]
- Elongation factor 1-alpha 2 OS=Mus musculus GN=Eef1a2 PE=1 SV=1 [EF1A2_MOUSE]
- Heat shock protein beta-1 OS=Homo sapiens GN=HSPB1 PE=1 SV=2 [HSPB1_HUMAN]
- Rubber elongation factor protein OS=Hevea brasiliensis PE=1 SV=2 [REF HEVBR]
- Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=hemL PE=3 SV=1 - [GSA_ECO24]
- Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2 [DCD_HUMAN]
- Selenide, water dikinase OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=selD PE=3 SV=1 -[SELD_ECO24]
- Anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit A OS=Escherichia coli O157:H7 GN=glpA PE=3 SV=1 - [GLPA_ECO57]
- Transcriptional activator protein Pur-alpha (Fragments) OS=Rattus norvegicus GN=Pura PE=1 SV=1 -[PURA_RAT]
- Protein recA OS=Proteus vulgaris GN=recA PE=3 SV=1 [RECA_PROVU]
- Protein S100-A7 OS=Homo sapiens GN=S100A7 PE=1 SV=4 [S10A7_HUMAN]
- Chaperone protein dnaJ OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=dnaJ PE=3 SV=1 -[DNAJ_ECO24]
- Cathepsin D OS=Homo sapiens GN=CTSD PE=1 SV=1 [CATD_HUMAN]
- ATP-dependent hsl protease ATP-binding subunit hslU OS=Yersinia enterocolitica serotype O:8 / biotype 1B (strain 8081) GN=hslU PE=3 SV=1 - [HSLU_YERE8]

- Probable ubiquinone biosynthesis protein ubiB OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=ubiB PE=3 SV=1 - [UBIB_ECO24]
- Kappa-casein OS=Bos taurus GN=CSN3 PE=1 SV=1 [CASK_BOVIN]
- Beta-casein OS=Ovis aries GN=CSN2 PE=1 SV=3 [CASB_SHEEP]
- 60 kDa chaperonin (Fragment) OS=Enterobacter asburiae GN=groL PE=3 SV=1 [CH60_ENTAS]

GST-PD mit VMAT2-NT; Mascot-Analyse; Maus-Peptide; Gel A und B

- Tubulin beta-2C chain OS=Mus musculus GN=Tubb2c PE=1 SV=1 [TBB2C_MOUSE]
- Tubulin beta-2A chain OS=Mus musculus GN=Tubb2a PE=1 SV=1 [TBB2A_MOUSE]
- Tubulin beta-3 chain OS=Mus musculus GN=Tubb3 PE=1 SV=1 [TBB3_MOUSE]
- Tubulin alpha-4A chain OS=Mus musculus GN=Tuba4a PE=1 SV=1 [TBA4A_MOUSE]
- Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Mus musculus GN=Krt5 PE=1 SV=1 [K2C5_MOUSE]
- Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Mus musculus GN=Krt1 PE=1 SV=4 [K2C1_MOUSE]
- Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Mus musculus GN=Krt10 PE=1 SV=3 [K1C10_MOUSE]
- Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Mus musculus GN=Krt14 PE=1 SV=2 [K1C14_MOUSE]
- Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Mus musculus GN=Krt2 PE=1 SV=1 [K22E_MOUSE]
- Keratin, type I cytoskeletal 17 OS=Mus musculus GN=Krt17 PE=1 SV=3 [K1C17_MOUSE]
- Vesicle-fusing ATPase OS=Mus musculus GN=Nsf PE=1 SV=2 [NSF_MOUSE]
- Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Mus musculus GN=Krt6a PE=2 SV=3 [K2C6A_MOUSE]
- Keratin, type I cytoskeletal 42 OS=Mus musculus GN=Krt42 PE=1 SV=1 [K1C42_MOUSE]
- Actin, cytoplasmic 1 OS=Mus musculus GN=Actb PE=1 SV=1 [ACTB_MOUSE]
- Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3 OS=Mus musculus GN=Atp1a3 PE=1 SV=1 -[AT1A3_MOUSE]
- Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1 OS=Mus musculus GN=Slc25a12 PE=1 SV=1 [CMC1_MOUSE]
- Elongation factor 1-alpha 1 OS=Mus musculus GN=Eef1a1 PE=1 SV=3 [EF1A1_MOUSE]
- Tubulin beta-2A chain OS=Mus musculus GN=Tubb2a PE=1 SV=1 [TBB2A_MOUSE]
- Tubulin beta-5 chain OS=Mus musculus GN=Tubb5 PE=1 SV=1 [TBB5_MOUSE]
- Tubulin beta-2C chain OS=Mus musculus GN=Tubb2c PE=1 SV=1 [TBB2C_MOUSE]
- Tubulin beta-3 chain OS=Mus musculus GN=Tubb3 PE=1 SV=1 [TBB3_MOUSE]
- Tubulin alpha-1C chain OS=Mus musculus GN=Tuba1c PE=1 SV=1 [TBA1C_MOUSE]
- Tubulin alpha-4A chain OS=Mus musculus GN=Tuba4a PE=1 SV=1 [TBA4A_MOUSE]
- Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Mus musculus GN=Krt5 PE=1 SV=1 [K2C5_MOUSE]
- Actin, cytoplasmic 1 OS=Mus musculus GN=Actb PE=1 SV=1 [ACTB_MOUSE]
- Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Mus musculus GN=Krt1 PE=1 SV=4 [K2C1_MOUSE]
- Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Mus musculus GN=Krt10 PE=1 SV=3 [K1C10_MOUSE]
- Keratin, type I cytoskeletal 13 OS=Mus musculus GN=Krt13 PE=1 SV=2 [K1C13_MOUSE]
- Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Mus musculus GN=Krt14 PE=1 SV=2 [K1C14_MOUSE]
- Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Mus musculus GN=Krt2 PE=1 SV=1 [K22E_MOUSE]
- Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Mus musculus GN=Hspa8 PE=1 SV=1 [HSP7C_MOUSE]
- Keratin, type II cytoskeletal 4 OS=Mus musculus GN=Krt4 PE=1 SV=2 [K2C4_MOUSE]
- Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Mus musculus GN=Gapdh PE=1 SV=2 -[G3P_MOUSE]
- Vesicle-fusing ATPase OS=Mus musculus GN=Nsf PE=1 SV=2 [NSF_MOUSE]
- Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha OS=Mus musculus GN=Camk2a PE=1 SV=2 - [KCC2A_MOUSE]
- Elongation factor Tu, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Tufm PE=1 SV=1 [EFTU_MOUSE]
- Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1 OS=Mus musculus GN=Slc25a12 PE=1 SV=1 [CMC1_MOUSE]
- Elongation factor 1-alpha 2 OS=Mus musculus GN=Eef1a2 PE=1 SV=1 [EF1A2_MOUSE]
- Transcriptional activator protein Pur-alpha OS=Mus musculus GN=Pura PE=1 SV=1 [PURA_MOUSE]
- Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3 OS=Mus musculus GN=Atp1a3 PE=1 SV=1 -[AT1A3_MOUSE]
- Histone H4 OS=Mus musculus GN=Hist1h4a PE=1 SV=2 [H4_MOUSE]

GST-PD mit VMAT2-L3; Mascot-Analyse; Peptide aller Organismen; Gel A und B

- Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 [K2C1 HUMAN]
- Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2 [K22E_HUMAN]
- Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 [K1C10 HUMAN]
- Glutathione S-transferase class-mu 26 kDa isozyme OS=Schistosoma japonicum PE=1 SV=3 -[GST26_SCHJA]
- Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 [K1C9_HUMAN]
- Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3 [K2C5 HUMAN]
- Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4 [ALBU_BOVIN]

- Chaperone protein dnaK OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=dnaK PE=2 SV=1 -[DNAK_ECO24]
- Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens GN=KRT6A PE=1 SV=3 [K2C6A_HUMAN]
- Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4 [K1C14_HUMAN]
- Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KRT16 PE=1 SV=4 [K1C16_HUMAN]
- Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1 [TRYP_PIG]
- D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase subunit gatZ OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=gatZ PE=3 SV=1 [GATZ_ECO24]
- Beta-lactoglobulin OS=Bos taurus GN=LGB PE=1 SV=3 [LACB_BOVIN]
- Alpha-S2-casein OS=Bos taurus GN=CSN1S2 PE=1 SV=2 [CASA2_BOVIN]
- Dihydrodipicolinate reductase OS=Enterobacter sp. (strain 638) GN=dapB PE=3 SV=1 [DAPB_ENT38]
- Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2 [DCD_HUMAN]
- Rubber elongation factor protein OS=Hevea brasiliensis PE=1 SV=2 [REF_HEVBR]
- Glutathione S-transferase Mu 1 OS=Mus musculus GN=Gstm1 PE=1 SV=2 [GSTM1_MOUSE]
- Lysine-sensitive aspartokinase 3 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lysC PE=1 SV=2 [AK3_ECOLI]
- Transthyretin OS=Bos taurus GN=TTR PE=1 SV=1 [TTHY_BOVIN]
- Alpha-S1-casein OS=Bos taurus GN=CSN1S1 PE=1 SV=2 [CASA1_BOVIN]
- Beta-casein OS=Ovis aries GN=CSN2 PE=1 SV=3 [CASB_SHEEP]
- Kappa-casein OS=Bos taurus GN=CSN3 PE=1 SV=1 [CASK_BOVIN]
- Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2 [K22E_HUMAN]
- Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 [K2C1_HUMAN]
- Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 [K1C10_HUMAN]
- Chaperone protein dnaK OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=dnaK PE=2 SV=1 -[DNAK_ECO24]
- Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 [K1C9_HUMAN]
- Glutathione S-transferase class-mu 26 kDa isozyme OS=Schistosoma japonicum PE=1 SV=3 -[GST26_SCHJA]
- Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4 [ALBU_BOVIN]
- Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3 [K2C5_HUMAN]
- Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4 [K1C14_HUMAN]
- Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens GN=KRT6A PE=1 SV=3 [K2C6A_HUMAN]
- Serum albumin (Fragment) OS=Macaca mulatta GN=ALB PE=2 SV=1 [ALBU_MACMU]
- Elongation factor Tu OS=Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae (strain ATCC 700721 / MGH 78578) GN=tufA PE=3 SV=1 - [EFTU_KLEP7]
- Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1 [TRYP_PIG]
- Tubulin beta chain OS=Sus scrofa PE=1 SV=1 [TBB_PIG]
- Bifunctional aspartokinase/homoserine dehydrogenase 2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=metL PE=1 SV=3 - [AK2H_ECOLI]
- Dihydrodipicolinate reductase OS=Enterobacter sp. (strain 638) GN=dapB PE=3 SV=1 [DAPB_ENT38]
- Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2 [DCD_HUMAN]
- Alpha-S2-casein OS=Bos taurus GN=CSN1S2 PE=1 SV=2 [CASA2 BOVIN]
- Elongation factor 1-alpha OS=Dictyostelium discoideum GN=eef1a1 PE=1 SV=2 [EF1A DICDI]
- Glutathione S-transferase Yb-3 OS=Rattus norvegicus GN=Gstm3 PE=1 SV=2 [GSTM4 RAT]
- Transcriptional activator protein Pur-alpha OS=Mus musculus GN=Pura PE=1 SV=1 [PURA MOUSE]
- Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex
- OS=Escherichia coli (strain K12) GN=aceF PE=1 SV=3 [ODP2_ECOLI]
- Aconitate hydratase 2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=acnB PE=1 SV=3 [ACON2_ECOLI]
- Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3 OS=Gallus gallus GN=ATP1A3 PE=2 SV=1 -[AT1A3_CHICK]
- Cysteine desulfurase OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=iscS PE=3 SV=1 -[ISCS_ECO24]
- Actin, cytoplasmic 1 OS=Cercopithecus pygerythrus GN=ACTB PE=1 SV=1 [ACTB_CERPY]
- Lysozyme C OS=Homo sapiens GN=LYZ PE=1 SV=1 [LYSC_HUMAN]
- Lactotransferrin OS=Homo sapiens GN=LTF PE=1 SV=6 [TRFL_HUMAN]
- Alpha-S1-casein OS=Bos taurus GN=CSN1S1 PE=1 SV=2 [CASA1_BOVIN]
- Beta-lactoglobulin OS=Bos taurus GN=LGB PE=1 SV=3 [LACB_BOVIN]
- Kappa-casein OS=Bos taurus GN=CSN3 PE=1 SV=1 [CASK_BOVIN]
- Rubber elongation factor protein OS=Hevea brasiliensis PE=1 SV=2 [REF_HEVBR]
- Beta-casein OS=Ovis aries GN=CSN2 PE=1 SV=3 [CASB_SHEEP]

GST-PD mit VMAT2-L3; Mascot-Analyse; Maus-Peptide; Gel A und B

- Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Mus musculus GN=Krt5 PE=1 SV=1 [K2C5_MOUSE]
- Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Mus musculus GN=Krt10 PE=1 SV=3 [K1C10_MOUSE]
- Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Mus musculus GN=Krt14 PE=1 SV=2 [K1C14_MOUSE]
- Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Mus musculus GN=Krt1 PE=1 SV=4 [K2C1_MOUSE]

- Keratin, type I cytoskeletal 17 OS=Mus musculus GN=Krt17 PE=1 SV=3 [K1C17_MOUSE]
- Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Mus musculus GN=Krt2 PE=1 SV=1 [K22E_MOUSE]
- Keratin, type I cytoskeletal 42 OS=Mus musculus GN=Krt42 PE=1 SV=1 [K1C42_MOUSE]
- Glutathione S-transferase Mu 1 OS=Mus musculus GN=Gstm1 PE=1 SV=2 [GSTM1_MOUSE]
- Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Mus musculus GN=Krt5 PE=1 SV=1 [K2C5_MOUSE]
- Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Mus musculus GN=Krt10 PE=1 SV=3 [K1C10_MOUSE]
- Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Mus musculus GN=Krt1 PE=1 SV=4 [K2C1_MOUSE]
- Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Mus musculus GN=Krt2 PE=1 SV=1 [K22E_MOUSE]
- Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Mus musculus GN=Krt14 PE=1 SV=2 [K1C14_MOUSE]
- Keratin, type I cytoskeletal 17 OS=Mus musculus GN=Krt17 PE=1 SV=3 [K1C17_MOUSE]
- Tubulin beta-5 chain OS=Mus musculus GN=Tubb5 PE=1 SV=1 [TBB5_MOUSE]
- Actin, cytoplasmic 1 OS=Mus musculus GN=Actb PE=1 SV=1 [ACTB_MOUSE]
- Elongation factor 1-alpha 2 OS=Mus musculus GN=Eef1a2 PE=1 SV=1 [EF1A2_MOUSE]
- Transcriptional activator protein Pur-alpha OS=Mus musculus GN=Pura PE=1 SV=1 [PURA_MOUSE]
- Glutathione S-transferase Mu 1 OS=Mus musculus GN=Gstm1 PE=1 SV=2 [GSTM1_MOUSE]
- Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3 OS=Mus musculus GN=Atp1a3 PE=1 SV=1 -[AT1A3_MOUSE]
- Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Mus musculus GN=Gapdh PE=1 SV=2 -[G3P_MOUSE]

GST-PD mit VMAT2-CT; Mascot-Analyse; Peptide aller Organismen; Gel A und B

- Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 [K2C1 HUMAN]
- Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 [K1C9_HUMAN]
- Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2 [K22E HUMAN]
- Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KRT16 PE=1 SV=4 [K1C16_HUMAN]
- Chaperone protein dnaK OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=dnaK PE=2 SV=1 -[DNAK_ECO24]
- Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 [K1C10_HUMAN]
- Keratin, type II cytoskeletal 6B OS=Homo sapiens GN=KRT6B PE=1 SV=5 [K2C6B_HUMAN]
- Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens GN=KRT6A PE=1 SV=3 [K2C6A_HUMAN]
- Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4 [K1C14_HUMAN]
- Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3 [K2C5_HUMAN]
- Glutathione S-transferase class-mu 26 kDa isozyme OS=Schistosoma japonicum PE=1 SV=3 -[GST26_SCHJA]
- Desmoplakin OS=Homo sapiens GN=DSP PE=1 SV=3 [DESP_HUMAN]
- Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4 [ALBU_BOVIN]
- Elongation factor Tu 1 OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=tuf1 PE=3 SV=1 -[EFTU1_ECO24]
- Desmoglein-1 OS=Homo sapiens GN=DSG1 PE=1 SV=2 [DSG1_HUMAN]
- Mitogen-activated protein kinase 1 OS=Mus musculus GN=Mapk1 PE=1 SV=3 [MK01_MOUSE]
- Junction plakoglobin OS=Homo sapiens GN=JUP PE=1 SV=3 [PLAK_HUMAN]
- Phosphoenolpyruvate synthase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ppsA PE=1 SV=5 [PPSA_ECOLI]
- Galactitol-1-phosphate 5-dehydrogenase OS=Escherichia coli O157:H7 GN=gatD PE=3 SV=1 -
- [GATD_ECO57] Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2 - [ALBU_HUMAN]
- Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1 [TRYP PIG]
- Desmocollin-1 OS=Homo sapiens GN=DSC1 PE=1 SV=2 [DSC1 HUMAN]
- Selenide, water dikinase OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=selD PE=3 SV=1 -[SELD_ECO24]
- D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase subunit gatZ OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=gatZ PE=3 SV=1 [GATZ_ECO24]
- Aconitate hydratase 2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=acnB PE=1 SV=3 [ACON2_ECOLI]
- Synaptic vesicular amine transporter OS=Homo sapiens GN=SLC18A2 PE=1 SV=2 [VMAT2_HUMAN]
- Methionine synthase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=metH PE=1 SV=5 [METH_ECOLI]
- Actin (Fragment) OS=Lumbricus rubellus PE=2 SV=1 [ACT_LUMRU]
- Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=hemL PE=3 SV=1 - [GSA_ECO24]
- Alpha-S1-casein OS=Bos taurus GN=CSN1S1 PE=1 SV=2 [CASA1_BOVIN]
- ATP synthase subunit beta OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=atpD PE=3 SV=1 - [ATPB_ECO24]
- Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=3 -[G3P_HUMAN]
- Rod shape-determining protein mreB OS=Escherichia coli O6 GN=mreB PE=3 SV=1 [MREB_ECOL6]
- Plakophilin-1 OS=Homo sapiens GN=PKP1 PE=1 SV=2 [PKP1_HUMAN]
- Tubulin beta chain OS=Trichuris trichiura PE=3 SV=1 [TBB_TRITR]

- Alpha-galactosidase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=melA PE=1 SV=1 [AGAL_ECOLI]
- Dihydrolipoyl dehydrogenase OS=Escherichia coli O157:H7 GN=lpdA PE=3 SV=2 [DLDH_ECO57]
- Cysteine desulfurase OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=iscS PE=3 SV=1 -[ISCS_ECO24]
- Corneodesmosin OS=Homo sapiens GN=CDSN PE=1 SV=3 [CDSN_HUMAN]
- Formate acetyltransferase 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pflB PE=1 SV=2 [PFLB_ECOLI]
- Outer membrane protein F OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompF PE=1 SV=1 [OMPF_ECOLI]
- Ribosomal RNA large subunit methyltransferase N OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=rlmN PE=3 SV=1 - [RLMN_ECO24]
- Alpha-S2-casein OS=Bos taurus GN=CSN1S2 PE=1 SV=2 [CASA2_BOVIN]
- Fumarate hydratase class I, aerobic OS=Escherichia coli O6 GN=fumA PE=3 SV=2 [FUMA_ECOL6]
- DNA repair protein radA OS=Salmonella typhimurium GN=radA PE=3 SV=3 [RADA_SALTY]
- Serpin B12 OS=Homo sapiens GN=SERPINB12 PE=1 SV=1 [SPB12_HUMAN]
- Tubulin alpha chain OS=Xenopus laevis GN=tuba PE=2 SV=2 [TBA_XENLA]
- CTP synthase OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=pyrG PE=3 SV=1 -[PYRG_ECO24]
- Keratin, type I cytoskeletal 13 OS=Oncorhynchus mykiss GN=krt13 PE=2 SV=1 [K1C13_ONCMY]
- Rubber elongation factor protein OS=Hevea brasiliensis PE=1 SV=2 [REF_HEVBR]
- Thioredoxin OS=Homo sapiens GN=TXN PE=1 SV=3 [THIO_HUMAN]
- Beta-casein OS=Ovis aries GN=CSN2 PE=1 SV=3 [CASB_SHEEP]
- Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2 [K22E_HUMAN]
- Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 [K2C1_HUMAN]
- Chaperone protein dnaK OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=dnaK PE=2 SV=1 -[DNAK_ECO24]
- Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 [K1C10_HUMAN]
- Elongation factor Tu 1 OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=tuf1 PE=3 SV=1 -[EFTU1_ECO24]
- Glutathione S-transferase class-mu 26 kDa isozyme OS=Schistosoma japonicum PE=1 SV=3 -[GST26_SCHJA]
- Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4 [ALBU_BOVIN]
- Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 [K1C9_HUMAN]
- Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4 [K1C14_HUMAN]
- Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens GN=KRT6A PE=1 SV=3 [K2C6A_HUMAN]
- Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3 [K2C5_HUMAN]
- Tubulin beta chain OS=Sus scrofa PE=1 SV=1 [TBB_PIG]
- Aconitate hydratase 2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=acnB PE=1 SV=3 [ACON2_ECOLI]
- Galactitol-1-phosphate 5-dehydrogenase OS=Escherichia coli O157:H7 GN=gatD PE=3 SV=1 -[GATD_ECO57]
- Selenide, water dikinase OS=Escherichia coli O9:H4 (strain HS) GN=selD PE=3 SV=1 [SELD_ECOHS]
- D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase subunit gatZ OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=gatZ PE=3 SV=1 [GATZ_ECO24]
- Mitogen-activated protein kinase 1 OS=Mus musculus GN=Mapk1 PE=1 SV=3 [MK01_MOUSE]
- Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1 [TRYP_PIG]
- Tubulin alpha chain OS=Xenopus laevis GN=tuba PE=2 SV=2 [TBA_XENLA]
- Alpha-S1-casein OS=Bos taurus GN=CSN1S1 PE=1 SV=2 [CASA1_BOVIN]
- 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=ispG PE=3 SV=1 - [ISPG_ECO24]
- Anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit C OS=Escherichia coli O157:H7 GN=glpC PE=3 SV=1 - [GLPC_ECO57]
- 60 kDa chaperonin OS=Salmonella agona (strain SL483) GN=groL PE=3 SV=1 [CH60_SALA4]
- Anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit A OS=Escherichia coli O157:H7 GN=glpA PE=3 SV=1 - [GLPA_ECO57]
- Formate acetyltransferase 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pflB PE=1 SV=2 [PFLB_ECOLI]
- Carbamoyl-phosphate synthase large chain OS=Escherichia coli (strain K12) GN=carB PE=1 SV=2 -[CARB_ECOLI]
- Rod shape-determining protein mreB OS=Escherichia coli O6 GN=mreB PE=3 SV=1 [MREB_ECOL6]
- Cysteine desulfurase OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=iscS PE=3 SV=1 -[ISCS_ECO24]
- Actin-3 (Fragment) OS=Echinococcus granulosus GN=ACTIII PE=2 SV=1 [ACT3_ECHGR]
- CTP synthase OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=pyrG PE=3 SV=1 -[PYRG_ECO24]
- 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 2 OS=Escherichia coli O157:H7 GN=fabF PE=3 SV=2 -[FABF_ECO57]
- Alpha-S2-casein OS=Bos taurus GN=CSN1S2 PE=1 SV=2 [CASA2_BOVIN]
- Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=3 -[G3P_HUMAN]

- Rubber elongation factor protein OS=Hevea brasiliensis PE=1 SV=2 [REF_HEVBR]
- Dihydrodipicolinate reductase OS=Enterobacter sp. (strain 638) GN=dapB PE=3 SV=1 [DAPB_ENT38]
- Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2 [DCD_HUMAN]
- Outer membrane protein F OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompF PE=1 SV=1 [OMPF_ECOLI]
- ATP synthase subunit beta OS=Enterobacter sp. (strain 638) GN=atpD PE=3 SV=1 [ATPB_ENT38]
- Elongation factor 1-alpha 2 OS=Mus musculus GN=Eef1a2 PE=1 SV=1 [EF1A2_MOUSE]
- Threonyl-tRNA synthetase OS=Shigella boydii serotype 18 (strain CDC 3083-94 / BS512) GN=thrS PE=3 SV=1 - [SYT_SHIB3]
- Beta-lactoglobulin OS=Bos taurus GN=LGB PE=1 SV=3 [LACB_BOVIN]
- Aldehyde-alcohol dehydrogenase OS=Escherichia coli O157:H7 GN=adhE PE=3 SV=2 [ADHE_ECO57]
- Vesicle-fusing ATPase OS=Cricetulus griseus GN=NSF PE=1 SV=1 [NSF_CRIGR]
- Kappa-casein OS=Bos taurus GN=CSN3 PE=1 SV=1 [CASK_BOVIN]
- Transcription termination factor rho OS=Buchnera aphidicola subsp. Schizaphis graminum GN=rho PE=3 SV=2 - [RHO_BUCAP]
- Lipoyl synthase OS=Enterobacter sp. (strain 638) GN=lipA PE=3 SV=1 [LIPA_ENT38]
- Beta-casein OS=Bos taurus GN=CSN2 PE=1 SV=2 [CASB_BOVIN]

GST-PD mit VMAT2-CT; Mascot-Analyse; Maus-Peptide; Gel A und B

- Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Mus musculus GN=Krt5 PE=1 SV=1 [K2C5 MOUSE]
- Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Mus musculus GN=Krt14 PE=1 SV=2 [K1C14 MOUSE]
- Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Mus musculus GN=Krt6a PE=2 SV=3 [K2C6A MOUSE]
- Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Mus musculus GN=Krt16 PE=1 SV=3 [K1C16_MOUSE]
- Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Mus musculus GN=Krt1 PE=1 SV=4 [K2C1_MOUSE]
- Keratin, type I cytoskeletal 42 OS=Mus musculus GN=Krt42 PE=1 SV=1 [K1C42_MOUSE]
- Mitogen-activated protein kinase 1 OS=Mus musculus GN=Mapk1 PE=1 SV=3 [MK01_MOUSE]
- Keratin, type I cytoskeletal 17 OS=Mus musculus GN=Krt17 PE=1 SV=3 [K1C17_MOUSE]
- Keratin, type II cytoskeletal 75 OS=Mus musculus GN=Krt75 PE=1 SV=1 [K2C75_MOUSE]
- Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Mus musculus GN=Krt10 PE=1 SV=3 [K1C10_MOUSE]
- Junction plakoglobin OS=Mus musculus GN=Jup PE=1 SV=3 [PLAK_MOUSE]
- Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Mus musculus GN=Krt2 PE=1 SV=1 [K22E_MOUSE]
- Actin, cytoplasmic 1 OS=Mus musculus GN=Actb PE=1 SV=1 [ACTB_MOUSE]
- Synaptic vesicular amine transporter OS=Mus musculus GN=Slc18a2 PE=1 SV=1 [VMAT2_MOUSE]
- Tubulin beta-2A chain OS=Mus musculus GN=Tubb2a PE=1 SV=1 [TBB2A_MOUSE]
- Heat shock-related 70 kDa protein 2 OS=Mus musculus GN=Hspa2 PE=1 SV=1 [HSP72_MOUSE]
- Plakophilin-1 OS=Mus musculus GN=Pkp1 PE=1 SV=1 [PKP1_MOUSE]
- Tubulin alpha-1C chain OS=Mus musculus GN=Tuba1c PE=1 SV=1 [TBA1C_MOUSE]
- Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Mus musculus GN=Krt10 PE=1 SV=3 [K1C10_MOUSE]
- Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Mus musculus GN=Krt5 PE=1 SV=1 [K2C5_MOUSE]
- Mitogen-activated protein kinase 1 OS=Mus musculus GN=Mapk1 PE=1 SV=3 [MK01_MOUSE]
- Tubulin beta-3 chain OS=Mus musculus GN=Tubb3 PE=1 SV=1 [TBB3_MOUSE]
- Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Mus musculus GN=Krt14 PE=1 SV=2 [K1C14_MOUSE]
- Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Mus musculus GN=Krt1 PE=1 SV=4 [K2C1_MOUSE]
- Keratin, type I cytoskeletal 17 OS=Mus musculus GN=Krt17 PE=1 SV=3 [K1C17_MOUSE]
- Tubulin alpha-1C chain OS=Mus musculus GN=Tuba1c PE=1 SV=1 [TBA1C_MOUSE]
- Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Mus musculus GN=Krt2 PE=1 SV=1 [K22E_MOUSE]
- Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Mus musculus GN=Hspa8 PE=1 SV=1 [HSP7C_MOUSE]
- Actin, cytoplasmic 1 OS=Mus musculus GN=Actb PE=1 SV=1 [ACTB_MOUSE]
- Elongation factor 1-alpha 2 OS=Mus musculus GN=Eef1a2 PE=1 SV=1 [EF1A2_MOUSE]
- Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Mus musculus GN=Gapdh PE=1 SV=2 -
- [G3P_MOUSE]
- Vesicle-fusing ATPase OS=Mus musculus GN=Nsf PE=1 SV=2 [NSF_MOUSE]