

**Vor- und nachgeschaltete Signalwege der Go2 $\alpha$ -vermittelten  
Regulation der vesikulären Monoaminspeicherung**

Vorgelegt von  
Diplom Ingenieur  
Christian Blex  
aus Berlin

von der Fakultät III Prozesswissenschaften  
der Technischen Universität Berlin  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Ingenieurwissenschaften  
- Dr.-Ing. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. U. Stahl  
Berichter: Prof. Dr. R. Lauster  
Berichterin: Prof. Dr. G. Ahnert-Hilger

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 21. Juli 2008

Berlin 2008  
D83

---

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Abstract</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>Neuronale Kommunikation an Synapsen</b>	<b>3</b>
<b>3.2</b>	<b>Die Variabilität der vesikulären Neurotransmitterspeicherung beeinflusst die synaptische Übertragung</b>	<b>4</b>
<b>3.3</b>	<b>Neurotransmittertransport in synaptische Vesikel</b>	<b>5</b>
<b>3.4</b>	<b>Transport und Speicherung von Monoaminen in synaptischen Vesikeln</b>	<b>7</b>
3.4.1	Monoaminerge Neurotransmitter	7
3.4.2	Speicherung monoaminerges Neurotransmitter	8
<b>3.5</b>	<b>Heterotrimere G-Proteine beeinflussen den Neurotransmittertransport in synaptische Vesikel</b>	<b>11</b>
3.5.1	Eigenschaften heterotrimerer G-Proteine	11
3.5.2	G $\alpha$ - eine in Neuronen und neuroendokrinen Zellen exprimierte Untereinheit heterotrimerer G-Proteine	12
3.5.3	Lokalisation heterotrimerer G-Proteine auf synaptischen Vesikeln - Regulation der vesikulären Neurotransmitterspeicherung	14
<b>3.6</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>16</b>
<b>4</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>17</b>
<b>4.1</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>17</b>
<b>4.2</b>	<b>Geräte und Apparaturen</b>	<b>19</b>
<b>4.3</b>	<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>21</b>
<b>4.4</b>	<b>Medien</b>	<b>24</b>
4.4.1	Mikrobielle Medien	24
4.4.2	Zellkulturmedien	25
<b>4.5</b>	<b>Antikörper</b>	<b>26</b>
4.5.1	primäre Antikörper	26
4.5.2	sekundäre Antikörper	26
<b>4.6</b>	<b>Nukleinsäuren</b>	<b>26</b>
4.6.1	Oligonukleotide	26
4.6.2	Vektoren	28
4.6.3	cDNA	29
<b>4.7</b>	<b>Methoden</b>	<b>29</b>
4.7.1	DNA-Techniken	29
4.7.2	Yeast-Two-Hybrid-Methoden	33

4.7.3	Protein-Techniken	35
4.7.4	Zellkulturarbeiten	38
4.7.5	Neurotransmitteraufnahmetests	39
4.7.6	Versuchstiere	42
4.7.7	HPLC-Analytik	42
4.7.8	Versuchsdurchführung und -auswertung	45
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>46</b>
<b>5.1</b>	<b>Modellsysteme zur Untersuchung der Regulation von VMAT1 und VMAT2 durch heterotrimere G-Proteine</b>	<b>46</b>
<b>5.2</b>	<b>Einfluss der ersten intravesikulären Schleife des VMAT2 auf die G-Protein-vermittelte Regulation der Monoaminspeicherung</b>	<b>48</b>
5.2.1	Die Deletion der ersten intravesikulären Schleife beeinflusst die Expression der VMAT2-Konstrukte in CHO-Zellen nicht	49
5.2.2	Die Deletion der ersten intravesikulären Schleife verändert den Monoamintransport in transfizierten CHO-Zellen nicht	50
5.2.3	Die Deletion der ersten intravesikulären Schleife des VMAT2 führt in CHO-Zellen zu einem Verlust der Regulation durch G-Proteine	51
<b>5.3</b>	<b>Die intravesikuläre Erkennungsstruktur des VMAT1</b>	<b>52</b>
5.3.1	Eine $\alpha$ 1-Rezeptor-ähnliche Struktur reguliert die Monoaminspeicherung durch den VMAT1	52
5.3.2	Auch in VMAT1-transfizierten Zellen ist die erste intravesikuläre Schleife an der G-Protein-vermittelten Regulation beteiligt	53
<b>5.4</b>	<b>Zytoplasmatische Strukturen des VMAT2 die an der Signaltransduktion beteiligt sein könnten</b>	<b>55</b>
5.4.1	Die Substitution der Aminosäuren P273-D292 durch 5 Glyzinreste führt zum Verlust der Transportaktivität des VMAT2	56
5.4.2	Deletionen im C-terminalen Bereich des VMAT2 beeinflussen die G-Protein-vermittelte Regulation des VMAT2 nicht	57
<b>5.5</b>	<b>Nachgeschaltete Signaltransduktionswege der G-Protein-vermittelten Regulation der VMAT</b>	<b>58</b>
5.5.1	Einfluss von DbcAMP auf die G-Proteinregulation der VMAT	58
5.5.2	Die Überexpression von CAPS1 und CAPS2 steigert die Monoaminaufnahme in CHO-VMAT-Zellen	59
<b>5.6</b>	<b>Bedeutung der Regulation des vesikulären Monoamintransports durch heterotrimere G-Proteine</b>	<b>61</b>
5.6.1	Die Inaktivierung von $Go2\alpha$ durch Pertussistoxin führt zu einer Verminderung der Monoaminaufnahme in PC12 Zellen	61
5.6.2	Die Inaktivierung von $Go2\alpha$ durch Pertussis Toxin führt in BON-Zellen zu einem verminderten Monoamingehalt	62
5.6.3	$Go2\alpha$ -Deletionsmutanten haben gegenüber Wildtypieren einen verminderten striatalen Dopaminspiegel	63
5.6.4	Verhaltensveränderungen bestätigen den veränderten Dopaminmetabolismus in $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten	64

---

<b>5.7</b>	<b>Identifizierung von möglichen Zielen der Go2<math>\alpha</math> -vermittelten Signaltransduktion durch das Yeast-two-Hybrid-System</b>	<b>68</b>
5.7.1	Vorgehensweise bei der cDNA-Durchmusterung mittels Yeast-two-Hybrid-System	68
5.7.2	Vorbereitende Arbeiten	72
5.7.3	Sequenzielle Transformation von <i>bait</i> - und <i>prey</i> -Vektoren	73
5.7.4	Charakterisierung der Interaktionspartner	75
5.7.5	Überprüfung der Spezifität der Interaktionspartner	78
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>81</b>
<b>6.1</b>	<b>Faktoren die den vesikulären Neurotransmittertransport beeinflussen</b>	<b>82</b>
<b>6.2</b>	<b>Domänen der VMAT sind an der Regulation der Monoamin-speicherung durch Go2<math>\alpha</math> beteiligt</b>	<b>84</b>
<b>6.3</b>	<b>Nachgeschaltete Signalwege der Regulation des Monoamin-transportes durch Go2<math>\alpha</math></b>	<b>89</b>
6.3.1	Die Adenylylzyklase kann den vesikulären Monoamintransport beeinflussen	89
6.3.2	Die Überexpression von CAPS erhöht die Speicherfähigkeit vesikulärer Strukturen in CHO-Zellen	90
<b>6.4</b>	<b>Physiologische Funktion der Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme durch Go2<math>\alpha</math></b>	<b>91</b>
<b>6.5</b>	<b>Direkte Interaktionspartner von Go2<math>\alpha</math></b>	<b>94</b>
6.5.1	Spezifische Go2 $\alpha$ -Interaktionspartner	95
6.5.2	Interaktionspartner, die mit beiden Go $\alpha$ -Isoformen interagieren	98
6.5.3	Proteine die mit beiden Go $\alpha$ -Isoformen und mit Gq $\alpha$ interagieren	99
6.5.4	Zusammenfassung Yeast-two-Hybrid-Screening	100
<b>6.6</b>	<b>Ausblick</b>	<b>102</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>104</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>106</b>

# 1 Zusammenfassung

Die Grundlage der neuronalen Signalübertragung ist die regulierte Freisetzung vesikulärer Neurotransmitter in den synaptischen Spalt. Die synaptische Signalübertragung unterliegt dabei einer Vielzahl regulatorischer prä- und postsynaptischer Prozesse. Die Beeinflussung des vesikulären Füllungsstatus stellt dabei eine Möglichkeit dar, die synaptische Übertragung präsynaptisch zu modulieren. Vorangegangene Arbeiten konnten zeigen, dass der Füllungsstatus monoaminerger Vesikel durch die  $Go2\alpha$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine reguliert wird. Der vesikuläre Füllungsstatus ist dabei das auslösende Signal der G-Proteinregulation. Die daran beteiligten zellulären Prozesse und Signaltransduktionswege sowie die Bedeutung dieser Regulation *in vivo* sind aber bisher unverstanden.

Ziel dieser Arbeit war es daher, vor- und nachgeschaltete Signalwege zu identifizieren und physiologische Effekte der Inaktivierung von  $Go2\alpha$  zu analysieren.

Monoamine werden durch zwei Isoformen des vesikulären Monoamintransporters (VMAT) in Vesikeln gespeichert. In Neurotransmitteraufnahmeexperimenten mit CHO-Zellen, die mit verschiedenen mutierten Konstrukten des VMAT2 transfiziert, als stark vereinfachtes Modellsystem dienten, konnte gezeigt werden, dass die erste intraluminale Schleife des VMAT2 an der Signaltransduktion aus dem Vesikellumen beteiligt ist. Ähnliche Untersuchungen mit dem VMAT1 legen eine vergleichbare Bedeutung der ersten intraluminale Schleife als intravesikuläre Rezeptorstruktur nahe.

Einen weiteren Schwerpunkt der Arbeit bildete die Identifikation potentieller nachgeschalteter Signalproteine. Dabei stellte sich heraus, dass die Proteine CAPS1 und CAPS2 in der Lage sind, den vesikulären Monoamintransport und die Speicherfähigkeit für Monoamine zu erhöhen. Durch systematisches Durchmustern einer cDNA-Bibliothek mit konstitutiv aktivem  $Go2\alpha$  in einem Yeast-two-Hybrid-System wurden 15 Proteine identifiziert, die als potentielle Zielproteine an der G-Proteinregulation der VMAT beteiligt sind. Darüber hinaus konnten verschiedene, dabei identifizierte  $Go2\alpha$ -bindende Proteine bereits im Zellkern lokalisiert bzw. assoziiert mit dem Zytoskelett nachgewiesen werden und deuten auf eine Funktion von  $Go2\alpha$  an diesen Strukturen hin.

In genetisch veränderten Mäusen, die nicht in der Lage sind,  $Go2\alpha$  zu exprimieren, konnten im Striatum, einer Gehirnregion die besonders an der motorischen Feinregulation beteiligt ist, verminderte Dopaminspiegel festgestellt werden. Diese verminderten Monoaminspiegel korrelieren mit einer verminderten Bewegungsaktivität der  $Go2\alpha$ -defizienten Mäuse nach Stimulation des dopaminergen Systems mittels Amphetamin und Kokain. Zusätzlich bleibt nach mehrfacher Behandlung mit Kokain die in Wildtypen einsetzende substanzvermittelte Sensibilisierung aus, die auf zusätzliche Störungen des dopaminergen Systems hinweist.

## 2 Abstract

The basic principle of neural communication involves regulated exocytosis of neurotransmitter molecules into the synaptic cleft. Neuronal communication at the synapse depends on several regulatory mechanisms which are localized pre- or postsynaptically. Vesicular filling represents one possibility of influencing synaptic transmission presynaptically. Previous experiments showed that activation of  $Go2\alpha$ , a brain and neuroendocrine cell specific subunit of heterotrimeric G-proteins, modulates filling of synaptic vesicles with monoamines. Vesicular filling itself was shown to be the preceding step of the  $Go2\alpha$ -regulation. Further evidence of participating intracellular signalling cascades was missing.

Therefore the aim of the project was to identify possible upstream and downstream signalling molecules as well as to determine the impact of  $Go2\alpha$  inactivation *in vitro* and *in vivo*.

Monoamine storage in vesicles is mediated by the activity of two isoforms of the vesicular monoamine transporter (VMAT). Neurotransmitter uptake experiments using CHO-cells transfected with wildtype and mutant VMAT2-cDNA proved that the first intravesicular loop of VMAT2 is required for  $Go2\alpha$ -activation. Similar experiments using VMAT1-cDNA-constructs also indicated that the first intraluminal loop of the VMAT shows receptor like properties.

The investigation of potential downstream targets revealed the proteins CAPS1 and CAPS2 to enhance vesicular transport and storage capacity for monoamines. Furthermore a yeast two hybrid screening of a mouse brain cDNA-library using GTPase deficient  $Go2\alpha$  as bait identified 15 potential downstream effectors. Besides a possible role in regulating vesicular filling, some of the identified proteins are localized in the nucleus or associated with the cytoskeleton. These observations point to further functions of  $Go2\alpha$  at other subcellular structures.

Analysis of  $Go2\alpha$ -knockout mice revealed reduced dopamine-amounts in the striatum, a brain region involved in movement control. Decreased striatal dopamine levels correlate with reduced locomotor-activity of the knockout mice compared to wildtype animals after challenging the monoaminergic system using amphetamine and cocaine. Additionally knockout mice lack drug-induced sensitization after repeated application of cocaine indicating further disturbances of the dopaminergic system.

## 3 Einleitung

### 3.1 Neuronale Kommunikation an Synapsen

Die Grundlage jeglicher Funktionen eines Organismus bildet die Abstimmung zwischen verschiedenen spezialisierten Zellen und Geweben, um in geeigneter Weise auf Umweltreize zu reagieren. Das kann durch direkte Zell-Zellinteraktion oder indirekt über die Freisetzung von Botenstoffen aus signalauslösenden Zellen einerseits und die Erkennung dieser Botenstoffe durch Zielzellen andererseits erfolgen. Beide Prozesse sind auch an der Informationsverarbeitung im zentralen Nervensystem beteiligt und kontrollieren dadurch eine Vielzahl von Körperfunktionen, wie z.B. die Wahrnehmung und Verarbeitung äußerer Reize, die Ausführung von Bewegungen, aber auch die Entstehung von Emotionen, Lernvorgänge und Gedächtnisleistungen. Die indirekte Signalübertragung zwischen Neuronen, die im menschlichen Gehirn auf mehr als sieben Billionen beziffert werden (Webster, 2001), erfolgt dabei über die Freisetzung von Neurotransmittern an spezialisierte Strukturen zwischen Neuronen - den Synapsen.

Grundprinzip dieser chemischen Signalübertragung ist zunächst ein ankommender elektrischer Impuls, das Aktionspotential, der an der präsynaptischen Membran zur Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle führt. Ausgelöst durch den Einstrom extrazellulärer Kalziumionen in das Zytoplasma, kommt es zur regulierten Freisetzung von Neurotransmittern aus sekretorischen Vesikeln in den synaptischen Spalt. Die dabei von einem einzelnen synaptischen Vesikel abgegebene Menge wird auch als Neurotransmitterquantum bezeichnet. Die Weitergabe der Information erfolgt an der postsynaptischen Membran durch Aktivierung membranständiger Rezeptoren, bei denen es sich um Ionenkanäle (ionotroper Rezeptor) handeln kann, die eine schnelle Signalleitung ermöglichen (1-10 ms). Alternativ können Rezeptoren beteiligt sein, die intrazelluläre Signalwege aktivieren (metabotroper Rezeptor), um so den Ionentransport an der Plasmamembran zu beeinflussen. Letztgenannte Prozesse laufen deutlich langsamer ab (100 ms - min). Durch Aktivierung dieser postsynaptischen Rezeptoren kann dann entweder ein erregendes oder ein inhibitorisches Signal in der postsynaptischen Zelle durch De- oder Hyperpolarisierung der Plasmamembran ausgelöst werden. Eine Depolarisation wird dabei durch eine Erhöhung der Ionenleitfähigkeit für Natrium-, Kalium- und Kalziumionen erreicht. Eine Verminderung der Erregbarkeit einer Zelle durch Hyperpolarisation wird hingegen durch eine erhöhte Ionenleitfähigkeit für Chloridionen bewirkt. Ob ein inhibitorisches oder exzitatorisches Signal ausgelöst wird, hängt von der Art des Neurotransmitters und dem Rezeptortyp ab.

Neurotransmitter können aufgrund ihrer Struktur eingeteilt werden. Die häufigsten Neurotransmitter im ZNS sind die Aminosäuren Glutamat, Glyzin sowie  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA). Daneben sind auch noch Azetylcholin, die Monoamine Dopamin, Noradrenalin,

Adrenalin, Serotonin und Histamin sowie die Purine ATP und Adenosin bekannte Neurotransmitter. Neben diesen klassischen Neurotransmittern gibt es auch Neuropeptide, darunter Enkephaline, Endorphine, Cholezystokinin und die Substanz P, die eher neuromodulatorisch wirken.

Um nach der Aktivierung postsynaptischer Rezeptoren die Signalübertragung zu beenden, müssen die Neurotransmitter wieder aus dem synaptischen Spalt entfernt werden. Acetylcholin wird dazu durch die Acetylcholinesterase gespalten. Das Cholin wird dann über Plasmamembranrezeptoren wieder aufgenommen. Für die anderen klassischen Neurotransmitter existieren ebenfalls Plasmamembranrezeptoren, die die freigesetzten Neurotransmitter wieder in das Zytoplasma transportieren. Dabei zeichnen sich die Plasmamembrantransporter für Serotonin (SERT), Dopamin (DAT), Noradrenalin (NET), GABA (GAT1-GAT4) und Glyzin (GLYT1-GLYT2) dadurch aus, dass sie die Neurotransmitter über einen Natrium- und Chloridkotransport in die Zelle transportieren. Der Glutamattransport aus dem synaptischen Spalt erfolgt durch die exzitatorischen Aminosäuretransporter (EAAT1-EAAT5), die durch Kotransport von Natriumionen und Protonen sowie einen Antiport von Kaliumionen angetrieben werden. Für Neuropeptide sind keine Plasmamembrantransporter bekannt, sie werden durch membrangebundene Peptidasen gespalten.

### **3.2 Die Variabilität der vesikulären Neurotransmitterspeicherung beeinflusst die synaptische Übertragung**

Untersuchungen an der neuromuskulären Endplatte führten zur Definition der kleinsten Einheit der synaptischen Übertragung - des Neurotransmitterquantums - worunter ein einzelnes mit Neurotransmittern gefülltes Vesikel verstanden wird (Katz, 1971). Obwohl davon ausgegangen wurde, dass diese Neurotransmitterquanta invariabel sind, stellte sich heraus, dass nicht nur postsynaptische Parameter einen Einfluss auf die synaptische Übertragung haben können, sondern auch, dass die Menge des vesikulären Neurotransmitters variiert und somit ebenfalls die synaptische Übertragung verändern kann.

Voraussetzung für die Beeinflussung der synaptischen Übertragung durch unterschiedliche vesikuläre Neurotransmittermengen ist, dass die postsynaptischen Rezeptoren einer Synapse unter physiologischen Bedingungen nicht mit Neurotransmittern gesättigt sind. Das konnte neben metabotropen Rezeptoren, die teilweise auch durch Neurotransmitterfreisetzung benachbarter Synapsen aktiviert werden, auch für ionotrope Rezeptoren gezeigt werden (Forti et al., 1997; Liu et al., 1999). Neben der vesikulären Neurotransmittermenge haben auch die Wahrscheinlichkeit von Exozytoseprozessen, die Größe der Synapsen und die Anzahl postsynaptischer Rezeptoren einen Einfluss auf die synaptische Übertragung (Murthy et al., 1997; Nusser et al., 1997).

Parameter, die den vesikulären Neurotransmittergehalt, also das Neurotransmitterquantum, beeinflussen, sind die Neurotransmitterkonzentration im Zytoplasma sowie der Transport und unspezifischer Verlust über die Vesikelmembran.

Auf die intrazelluläre Neurotransmitterkonzentration haben sowohl der Transport über die Plasma- und Vesikelmembran als auch die Biosynthese und der Abbau der Neurotransmitter einen Einfluss. So zeigen Deletionsmutanten des DAT schwerwiegende Veränderungen im Dopaminstoffwechsel. Homozygote Deletionsmutanten zeigen einen fünffach erhöhten extrazellulären Dopaminspiegel und eine um 75 % reduzierte Freisetzung von Dopamin nach elektrischer Stimulation. Insgesamt war der Gesamtdopamingehalt dieser Tiere in der Gehirnregion des Striatums, die ca. 80 % aller dopaminergen Endknöpfe des Mäusegehirns enthält, um 95 % reduziert (Jones et al., 1998). Dies zeigt, dass die vesikuläre Neurotransmitterkonzentration in starkem Maße von der Wiederaufnahme durch Plasmamembranrezeptoren aus dem synaptischen Spalt abhängt.

Auch Veränderungen des Neurotransmitterstoffwechsels, wie z.B. nach Aktivierung des Schlüsselenzyms der Dopaminbiosynthese, der Tyrosinhydroxylase, führen in Zellen zu einer verstärkten Produktion von Dopamin (Chang et al., 2002). Die Beeinflussung der vesikulären Neurotransmittermenge durch die Applikation des Dopaminsynthesevorläufers L-DOPA führte sowohl in PC12-Zellen (Pothos et al., 1998a) als auch in dopaminergen Neuronen (Pothos et al., 1998b) zu einer Erhöhung der freigesetzten Neurotransmitterquanten, die mit Hilfe der amperometrischen Detektion an Karbonfaserelektroden bestimmt werden konnten (Mosharov & Sulzer, 2005). Hingegen führt eine verminderte Aktivität der Tyrosinhydroxylase zu einer Verminderung der freigesetzten Neurotransmitterquanten. Auch die Verringerung der vesikulären Transporterzahl beeinflusst die Speicherung und Freisetzung von Neurotransmittern. So führt, z.B., die Überexpression der vesikulären Transporter für Monoamine und Acetylcholin zu einer Erhöhung der Neurotransmitterquanten (Pothos et al., 2000; Song et al., 1997). Im Gegensatz dazu führt die Reduktion dieser Transporter zu einer verminderten Neurotransmitterfreisetzung (Fon et al., 1997; Travis et al., 2000; Prado et al., 2006).

Wie die vorangegangenen Ausführungen und Beispiele zeigen, ist der vesikuläre Neurotransmittergehalt variabel und wird von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Einer dieser Faktoren ist auch der vesikuläre Neurotransmittertransport, dessen grundlegende Mechanismen im folgenden Abschnitt näher beschrieben werden sollen.

### **3.3 Neurotransmittertransport in synaptische Vesikel**

Nach der synaptischen Signalübertragung werden die Neurotransmitter aus dem Extrazellulärraum ins Zytosol transportiert und anschließend über vesikuläre Neurotransmittertransporter in sekretorischen Vesikeln gespeichert. Die sekretorischen Vesikel lassen sich

in zwei Klassen unterteilen: Kleine synaptische Vesikel in Neuronen (small synaptic vesicles; SSV) und ihre Analoge in neuroendokrinen Zellen (small synaptic-like microvesicles; SLMV) sowie die großen elektronendichten Vesikel (large dense-core vesicles; LDCV). SSV und SLMV speichern niedermolekulare Neurotransmitter, LDCV enthalten zusätzlich verschiedene Neuropeptide als Kotransmitter. Unabhängig vom Vesikeltyp erfolgt die Neurotransmitterspeicherung über die vesikulären Neurotransmittertransporter. Dabei werden Monoamine durch die vesikulären Monoamintransporter (VMAT), Azetylcholin über den vesikulären Azetylcholintransporter (VACHT), Glutamat über vesikuläre Glutamattransporter sowie GABA und Glyzin über den vesikulären inhibitorischen Aminosäuretransporter (VIAAT bzw. VGAT) in das Vesikellumen transportiert. Wie auch der Plasmamembrantransport ist dieser Transport energieabhängig und wird durch einen Antiport von Protonen aus dem Vesikellumen ins Zytoplasma angetrieben. Der dafür notwendige Protonengradient über die Vesikelmembran wird durch die Aktivität der vakuolären ATP-abhängigen Protonenpumpe (vATPase) erzeugt. Neben dem Protonengradient ( $\Delta\text{pH}$ ) ergibt sich durch Anreicherung positiver Ladungen im Vesikellumen zusätzlich auch ein elektrischer Gradient ( $\Delta\Psi$ ). Beide werden als elektrochemischer Gradient zusammengefasst ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) und bilden gemeinsam die Triebkraft für den Neurotransmittertransport entgegen dem Konzentrationsgradienten (Johnson, 1988). Die Aktivität verschiedener vesikulärer Neurotransmittertransporter hängt in unterschiedlichem Maße von  $\Delta\text{pH}$  und  $\Delta\Psi$  ab. Die Aktivität der VMAT und VACHT hängt stärker vom  $\Delta\text{pH}$  ab und die der vesikulären Glutamattransporter stärker von  $\Delta\Psi$  (Johnson, 1988; Maycox et al., 1988; Carlson et al., 1989). Der vesikuläre GABA-Transport hängt von beiden Anteilen gleichermaßen ab.

Neben der Aktivität der vakuolären ATPase wird der elektrochemische Gradient über die Vesikelmembran zusätzlich durch die Anwesenheit von Chloridionen beeinflusst. Isolierte synaptische Vesikel zeigen nach Inkubation mit ATP nur eine geringe Ansäuerung. Fügt man zusätzlich Chloridionen zu, steigt die Ansäuerung stark an. Ursache hierfür ist wahrscheinlich die Tatsache, dass in die Vesikel aufgenommenes Chlorid den elektrischen Anteil des elektrochemischen Potentials  $\Delta\Psi$  reduziert und die Protonenpumpe dadurch einen größeren pH-Gradienten aufbauen kann. Somit können beide Anteile des elektrochemischen Gradienten unabhängig von einander reguliert werden (Johnson, 1988). Intrazelluläre Ionenkanäle, die die vesikuläre Ansäuerung beeinflussen, sind in der Literatur beschrieben (Jentsch et al., 2005).

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen der vesikuläre Transport und die Speicherung von Monoaminen. Die zugrunde liegenden Prozesse werden im nächsten Abschnitt eingehend beschrieben.

## 3.4 Transport und Speicherung von Monoaminen in synaptischen Vesikeln

### 3.4.1 Monoaminerge Neurotransmitter

Zu den monoaminergen Neurotransmittern gehören Histamin und Serotonin sowie die Katecholamine Adrenalin, Dopamin und Noradrenalin. Kennzeichen dieser Neurotransmitter ist eine namensgebende primäre Aminogruppe, die über eine Ethylgruppe mit einer aromatischen Ringstruktur verbunden ist. Die Grundgerüste dieser Neurotransmitter sind die Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Histidin, aus denen sie nach verschiedenen Biosyntheseschritten gebildet werden. Die Zellkörper der monoaminergen Neuronen sind hauptsächlich in den Regionen des Hirnstamms und des Hypothalamus lokalisiert, von wo aus sie weite Bereiche des Gehirns innervieren und dadurch viele Gehirnfunktionen beeinflussen. Im Folgenden soll kurz auf die Lokalisation und Bedeutung der genannten Neurotransmitter eingegangen werden.

Dopamin ist an vielen Gehirnfunktionen beteiligt und entfaltet seine Wirkung über fünf bekannte Dopaminrezeptoren (D1-D5), bei denen es sich um metabotrope Rezeptoren handelt. Ausgehend von ihren Ursprungsgebieten in der Substantia nigra pars compacta und Formatio reticularis innervieren dopaminerge Neurone ein Hauptzielgebiet, das Striatum, wo ca. 80% des gesamten Dopamins des Gehirns lokalisiert sind. Dopamin hat in dieser Region einen starken Einfluss auf die Motorik. So führt ein Dopaminmangel, wie er z.B. bei Morbus Parkinson auftritt, zu einem Bewegungsmangel und zu Muskelsteifheit. Eine weitere wichtige Funktion im Belohnungssystem des Gehirns wird der dopaminergen Innervation des Nucleus accumbens aus der Area tegmentalis ventralis zugeschrieben, in denen belohnende Stimuli zur Dopaminfreisetzung führen. Zusätzliche innervieren dopaminerge Fasern den Cortex, wo sie den Informationsfluss aus anderen Gehirnarealen modulieren und Motivation, Emotionen, Gedächtnis und Aufmerksamkeit beeinflussen. Ebenfalls hemmt Dopamin - ausgehend vom Nucleus infundibularis - die Freisetzung des Hypophysenhormons Prolaktin.

Noradrenalin, das neben seiner Funktion als Neurotransmitter im ZNS und Neuronen des sympathischen Nervensystems auch durch chromaffine Zellen der Nebenniere als Hormon gebildet und freigesetzt wird, entsteht intravesikulär durch die Hydroxylierung von Dopamin durch die Dopamin- $\beta$ -hydroxylase. Durch Noradrenalin werden drei Familien adrenerger Rezeptoren -  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  bzw.  $\beta$ -Rezeptoren - aktiviert. Der prädominante Rezeptor im Nervensystem ist der  $\alpha_{2A/D}$ -Rezeptor, der die neuronale Erregbarkeit reduziert. Hauptlokalisationsorte noradrenerger Neurone ist der Locus coeruleus, von dem, wie auch von anderen noradrenergen Kerngebieten, zahlreiche Gehirnregionen innerviert werden. Aktiviert durch sensorische Stimuli, besitzt das Noradrenalinssystem eine große Bedeutung für Aufmerk-

samkeit und Wachheit, ist aber ist auch für die Ausbildung des Langzeitgedächtnisses wichtig.

Neurone des ZNS, die Adrenalin als Neurotransmitter sezernieren, sind im verlängerten Rückenmark lokalisiert. Projektionen aus diesen Kerngebieten ziehen ins Rückenmark, wo sympathische Neurone beeinflusst, aber auch verschiedene Gehirnregionen innerviert werden. Das Adrenalinsystem ist mit der Kontrolle autonomer Funktionen wie Blutdruck und Atmung verbunden.

Wie die zuvor beschriebenen Katecholamine innervieren serotonerge Neurone viele Gehirnareale und sind daher an der Regulation verschiedener physiologischer Funktionen und Verhaltensweisen, darunter Essen, Schlafen, zirkadiane Rhythmik und Hormonsekretion der Hypophyse beteiligt. Dabei sind die serotonergen Neurone hauptsächlich in den Raphekerne des Mittelhirns und des verlängerten Rückenmarks lokalisiert. Bisher sind sieben Rezeptorfamilien für Serotonin bekannt (5-HT<sub>1-7</sub>), die - mit Ausnahme des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors - metabotrope Rezeptoren sind. Viele dieser Rezeptoren und der Serotoninplasmamembrantransporter (SERT) sind die pharmakologischen Zielstrukturen zur Behandlung von Depressionen, Angstzuständen, Psychosen, Migräne sowie Übelkeit und Erbrechen und unterstreichen die Bedeutung von Serotonin im ZNS.

Neben dem Vorkommen von Histamin in den Mastzellen, ist Histamin auch ein Neurotransmitter. Histaminerge Neurone finden sich hauptsächlich im Hypothalamus, von wo aus sie in die Großhirnrinde, weitere hypothalamische Areale und in den Hirnstamm projizieren. Aber auch andere Gehirnareale zeigen in unterschiedlichem Maß eine histaminerge Innervation. Bisher sind vier verschiedene metabotrope Histaminrezeptoren (H<sub>1</sub>-H<sub>4</sub>) bekannt. Generell scheint Histamin die Erregbarkeit von Neuronen im ZNS zu steigern und die Aktivierung histaminergener Neurone die Wachheit und Erregbarkeit zu steigern. Bestätigt werden diese Beobachtungen durch die, durch Histaminrezeptorantagonisten (Antihistaminika) ausgelöste Müdigkeit. Zusätzlich ist Histamin an der Hypophysenregulation und an der Kontrolle vegetativer Funktionen, wie z.B. der Thermoregulation und dem Glukose- und Lipidstoffwechsel, beteiligt.

### **3.4.2 Speicherung monoaminerger Neurotransmitter**

Der Monoamintransport in Vesikel erfolgt durch zwei strukturell ähnliche vesikuläre Monoamintransporter (VMAT), die aus PC12-Zellen (VMAT1, Liu et al., 1992) und dem Rattengehirn isoliert wurden (VMAT2, Liu et al., 1992; Liu et al., 1994; Erickson et al., 1992). Für beide Transporter wird von einer Topologie aus 12-Transmembrandomänen mit zytoplasmatischer Lokalisation von N- und C-Terminus ausgegangen. Entsprechend dieser Topologie besitzen VMAT1 und VMAT2 eine große intravesikuläre Schleife zwischen den Transmembrandomänen 1 und 2, die in das Vesikellumen ragt. Diese luminale Schleife enthält

drei (VMAT1) bzw. vier (VMAT2) Glykosylierungsstellen (Henry et al., 1994). Der Sequenzvergleich zwischen VMAT1 und VMAT2 ergab eine 78-prozentige Homologie der beiden Transporter auf Aminosäureebene (Schuldiner et al., 1995). Die größte Divergenz existiert dabei in der luminalen Schleife. Beide Transporter unterscheiden sich hinsichtlich ihres Vorkommens und ihrer pharmakologischen Eigenschaften.

VMAT2 wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert, tritt aber auch in einer Vielzahl peripherer Zellen, darunter Neuronen des sympathischen Nervensystems, enterochromaffinen Zellen (Peter et al., 1995; Erickson et al., 1996) und Thrombozyten (Lesch et al., 1993; Höltje et al., 2003) auf. Die VMAT1-Expression ist im Gegensatz dazu überwiegend auf periphere Zellen beschränkt und kommt im Gehirn nur in Neuronen der Epiphyse (Zirbeldrüse) vor (Hayashi et al., 1999). Während der ZNS-Entwicklung in Ratten konnte in einigen Gehirnanlagen vorübergehend eine Koexpression beider VMAT-Isoformen beobachtet werden (Hansson et al., 1998).

Die Neurotransmitter Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin und Serotonin werden von beiden VMAT-Isoformen transportiert. Beide Transporter unterscheiden sich dabei bezüglich ihrer Affinität gegenüber den beschriebenen Substraten. Die  $K_M$ -Werte des VMAT1 liegen im mikromolaren Bereich, die Affinität des VMAT2 ist mit  $K_M$ -Werten im submikromolaren Bereich in Ratten (Peter et al., 1994) und Menschen (Erickson et al., 1996) höher. Ein zusätzliches Unterscheidungsmerkmal beider VMAT ist der Transport von Histamin, der durch VMAT2 mit 30-100-fach höherer Affinität erfolgt. Beide Transporter können durch Inhibitoren blockiert werden. Ein gemeinsamer Inhibitor der VMAT ist Reserpin, der durch Bindung auf zyttoplasmatischer Seite der Transporter die Monoaminaufnahme blockiert (Darchen et al., 1989; Scherman & Henry, 1984). Ein weiterer Inhibitor, Tetrabenazin, ist je nach Spezies zehn- (Ratte) bzw. hundertfach (Mensch) effektiver in der Wirkung auf VMAT2 als VMAT1 (Peter et al., 1994; Erickson et al., 1996).

Der Monoamintransport durch die VMAT erfolgt im Austausch gegen zwei Protonen aus dem vesikulären Lumen (Johnson et al., 1981; Knoth et al., 1981). Da die Monoamine intrazellulär ausschließlich im protonierten Zustand transportiert werden, reduziert sich dadurch die intravesikuläre Ladung nur um eine positive Ladung, wodurch die stärkere Abhängigkeit von  $\Delta pH$  gegenüber  $\Delta \Psi$  erklärt werden kann. Durch den Transport und die Speicherung im Vesikel werden die Monoamine um den Faktor  $10^4$ - $10^6$  gegenüber dem Zytosol angereichert. In den LDCV und SSV einer Synapse des Blutegels konnten Serotoninkonzentrationen von 270 mM gemessen werden (Bruns et al., 2000). In chromaffinen Granula kann von einer noch höheren Konzentration bis in den molaren Bereich ausgegangen werden (Edwards, 2007).

Die hohe Substrataffinität der VMAT und die damit verbundene Speicherung von Monoaminen im Vesikel ist aufgrund der hohen intrazellulären Toxizität der Monoamine und ihrer

Oxidationsprodukte physiologisch sinnvoll (Chaudry et al., 2008). Es bestehen starke strukturelle Ähnlichkeiten zwischen VMAT und bakteriellen Transportern, die für die Vermittlung von Antibiotikaresistenzen verantwortlich sind (Schuldiner et al., 1995). Somit kommt den VMAT zusätzlich zur Neurotransmitterspeicherung eine Entgiftungsfunktion für Zellen zu. Belege für eine Schutzfunktion in Zellen lieferten Mausdeletionsmutanten des VMAT2. Homozygote VMAT2-Deletionsmutanten starben direkt nach der Geburt und heterozygote Tiere zeigten eine stärkere Anfälligkeit gegenüber MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin). Dabei handelt es sich um eine Substanz, die zum Auslösen von Parkinsonsymptomen in Nagetieren genutzt wird. Sie wird nach der Oxidation zu MPP<sup>+</sup> durch den VMAT in die Vesikel transportiert, wodurch ihre toxische Wirkung reduziert wird (Takahashi et al., 1997, Gainetdinov et al., 1998).

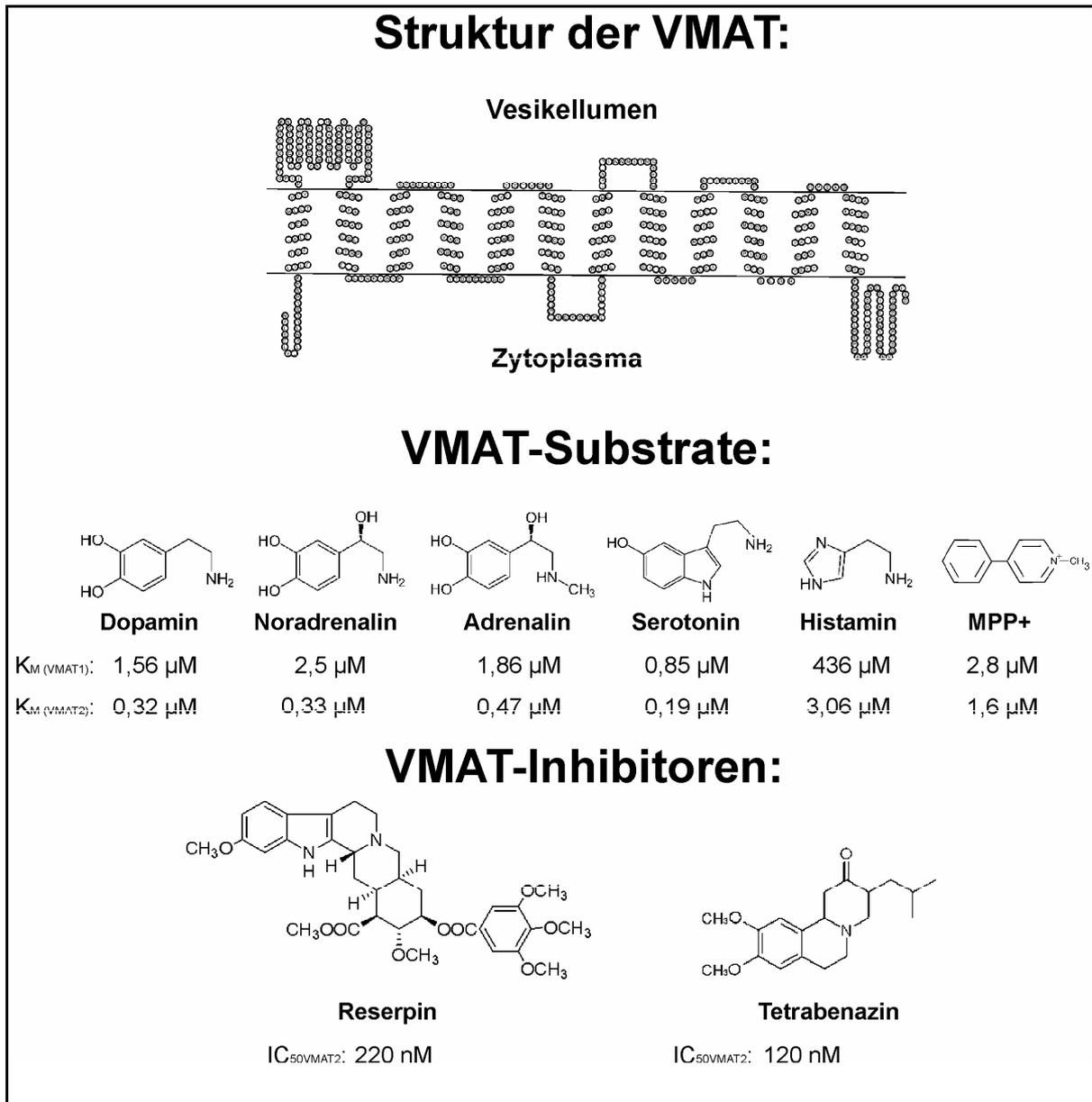


Abbildung 1: Dargestellt sind die vorhergesagte Struktur der VMAT mit Hilfe des Programmes TOPO2 (<http://www.sacs.ucsf.edu/TOPO2/>) sowie die Strukturformeln bekannter Substrate und Inhibitoren mit ihren  $K_M$ - bzw.  $IC_{50}$ -Werten (Peter et al., 1994; Partilla et al., 2006).

### 3.5 Heterotrimere G-Proteine beeinflussen den Neurotransmittertransport in synaptische Vesikel

#### 3.5.1 Eigenschaften heterotrimerer G-Proteine

Heterotrimere Guaninnukleotid-bindende-Proteine bilden eine Unterfamilie der Enzyme, die GTP hydrolysieren können (Bourne et al., 1990). Sie bestehen aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit und sind als molekulare Schalter der Plasmamembran bekannt, die extrazelluläre, heptahelikale Rezeptoren der Plasmamembranen aktivierende Stimuli an intrazelluläre Effektorsysteme weiterleiten. Durch die Kombination aus 23  $\alpha$ -, 5  $\beta$ - und 12  $\gamma$ -Untereinheiten ergeben sich mehr als 1000 mögliche Heterotrimere, wodurch verschiedene vor- und nachgeschaltete Signaltransduktionswege miteinander verknüpft werden können. Eingeschränkt

werden diese Kombinationsmöglichkeiten durch die Expressionsmuster der Untereinheiten in verschiedenen Geweben. Anhand ihrer Untereinheiten können G-Proteine in vier Familien -  $G_{s\alpha}$ ,  $G_{i/o\alpha}$ ,  $G_{q/11\alpha}$  bzw.  $G_{12/13\alpha}$  - eingeteilt werden. Im Grundzustand liegt der Komplex aus  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit und einer GDP-bindenden  $\alpha$ -Untereinheit vor. Bindet dieser Komplex an einen aktivierten heptahelikalen Rezeptor, kommt es zum Austausch von GDP gegen GTP in der  $\alpha$ -Untereinheit. Diese dissoziiert daraufhin vom  $\beta\gamma$ -Komplex. Sowohl  $\alpha$ -Untereinheit als auch  $\beta\gamma$ -Komplex können die Aktivität vieler Effektoren, wie z.B. Enzyme oder Ionenkanäle, beeinflussen. Beendet wird dieses Signal durch die intrinsische GTPase Aktivität der  $G_{\alpha}$ -Untereinheit. Dadurch kommt es zu einer Reassoziierung mit dem  $\beta\gamma$ -Komplex und der Signalzyklus kann erneut beginnen. Die intrinsische GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit kann durch Effektoren (Arshavsky and Bownds, 1992; Berstein et al., 1992; Kozasa et al., 1998) aber auch durch Proteine der RGS-Familie (regulators of G-Protein signalling) verstärkt werden (Ross & Wilkie, 2000; Hollinger & Hepler 2002; Neubig & Sidarovski, 2002). In Experimenten können durch den Einsatz von GTP-Analoga wie z.B.  $GTP\gamma S$  oder  $GMP-P(NH)P$ , die durch die GTPase-Aktivität der  $G_{\alpha}$ -Untereinheit nur schwer hydrolysiert werden können,  $G_{\alpha}$ -Proteine in aktiviertem Zustand fixiert werden.

Neben der „klassischen“ Aktivierung durch heptahelikale Rezeptoren der Plasmamembran weisen Untersuchungen darauf hin, dass auch andere Proteine ohne Beteiligung eines Rezeptors heterotrimerer G-Proteine aktivieren können. Dazu gehören GAP-43 (Strittmatter et al., 1991), Ric8A (Synembryn, Tall et al., 2003), PBP (Phosphatidylethanolamin bindendes Protein, Krosiak et al., 2001), Presenilin (Smine et al., 1998), Cystein String Protein (Natochin et al., 2005) und ein partiell gereinigtes Protein aus der NG108-15 Zelllinie (Sato et al., 1996; Ribas et al., 2002). Funktionelle Durchmusterungen in Hefen identifizierten zusätzlich eine Reihe weiterer Proteine, die als AGS-Proteine (Activators of G-Protein Signalling) bezeichnet werden und sich in ihrem Aktivierungsmechanismus unterscheiden (Cismowski 2006).

### **3.5.2 $G_{o\alpha}$ - eine in Neuronen und neuroendokrinen Zellen exprimierte Untereinheit heterotrimerer G-Proteine**

$G_{o\alpha}$  wurde von zwei unabhängigen Forschergruppen identifiziert (Neer et al. 1984; Sternweis & Robishaw, 1984).  $G_{o\alpha}$  gehört zur  $G_{i/o}$ -Familie. Diese ist dadurch gekennzeichnet, Substrat für die ADP-Ribosylierung durch Pertussistoxin aus *Bordetella pertussis* zu sein, wodurch das  $G_{o\alpha}$  in seiner inaktiven Konformation fixiert wird. Gemeinsam mit  $G_{i\alpha}$  macht  $G_{o\alpha}$  in Membranpräparationen des Gehirns bis zu 1,5 % des Proteingehaltes aus (Sternweis & Robishaw, 1984). Neben seinem Vorkommen in Neuronen wird  $G_{o\alpha}$  in endokrinen Zellen sowie im Herzen exprimiert. Wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, lässt sich  $G_{o\alpha}$  nicht nur durch heptahelikale Rezeptoren aktivieren, sondern auch durch mindestens zwei Prote-

ine, GAP43 und das Alzheimer amyloid precursor-Protein (Strittmatter et al., 1991; Nishimoto et al., 1993). Neben der Inhibierung von neuronalen  $Ca^{2+}$ -Kanälen sind nur wenige direkte Effektoren der  $Go\alpha$ -Untereinheit bekannt (Qin et al., 1997, Kinoshita M et al., 2001). Bindungsstudien an Hirnschnitten von  $Go\alpha$ -Deletionsmutanten belegen, dass Dopamin  $D_2$ -Rezeptoren mit  $Go\alpha$  verknüpft sind (Jiang et al., 2001). In Neuroblastomazellen scheint  $Go\alpha$  aktivierende und hemmende Effekte von  $D_{2L}$ -Rezeptoren auf die Adenylatzyklase zu vermitteln (Watts et al., 1998). Die Überexpression von konstitutiv aktivem  $Go\alpha$  ( $Go\alpha Q205L$ ) führt zu einer Interaktion mit der src-Kinase (Ram & Iyengar, 2001), transformiert NIH-3T3-Fibroblasten (Kroll et al., 1992), aktiviert die MAP-Kinase-Kaskade in CHO-Zellen (van Biesen et al., 1996), die Phospholipase C in *Xenopus* Oozyten (Moriarty et al., 1990) und auch Kalium-Kanäle in Neuronen (van Dongen et al., 1988). Wie diese Effekte ausgelöst werden bzw. welche Effektoren durch  $Go\alpha$  angesprochen werden ist dabei aber unklar. Erschwert wird diese Tatsache dadurch, dass zwei verschiedene Spleißvarianten von  $Go\alpha$  existieren -  $Go1\alpha$  und  $Go2\alpha$  - und in Untersuchungen häufig nur von  $Go\alpha$  die Rede ist, wobei aber  $Go1\alpha$  gemeint ist. Darüber hinaus existiert eine dritte Isoform,  $Go3\alpha$ , die durch posttranslationale Deamidierung des Asparagins an Position 346 zu Asparaginsäure aus  $Go1\alpha$  hervorgeht (Exner et al., 1999).

Go1 $\alpha$	241	TNRMHESLMLFDSICNNKFFITDTSIILFLNKKDLIFGEKIKKSPLTICFPEYTPGSNTYEDA	300
Go2 $\alpha$	241	TNRMHESLKLFLDSICNNKWFITDTSIILFLNKKDLIFEKIKKSPLTICFPEYTPGSAPTEA	300
		*****.*****.******.*****.*****.*****.*.....*	
Go1 $\alpha$	301	AAYIQTFESKNRSPNKEYTCHMTCATDTNNIQVVFDAVTDIIANNLRGCGLY	354
Go2 $\alpha$	301	VAHIQQQYESKNKSAHKEVYSHVTCATDTNNIQVVFDAVTDVIIAKNLRGCGLY	354
		*.*	

**Abbildung 2: Sequenzvergleich der C-Termini beider  $Go\alpha$ -Isoformen der Maus. Orange markiert sind die 25 in den beiden Isoformen unterschiedlichen Aminosäuren.**

Trotz der hohen Homologie beider  $Go\alpha$ -Isoformen, interagieren beide Spleißvarianten mit verschiedenen Rezeptoren und Effektoren.

Um direkte Interaktionspartner der  $Go\alpha$ -Untereinheiten zu identifizieren, wurden zahlreiche Yeast-two-hybrid-Untersuchungen und Koimmunopräzipitationen durchgeführt. Für  $Go\alpha$  bzw.  $Go1\alpha$  konnten die direkten Interaktionen mit RGS14 (Traver et al., 2000), RGS17, Rap1Gap, IP6 (KIAA 0514; Jordan et al., 1999), Purkinje cell protein2 (Pcp2, Luo & Denker, 1999), G-Protein-Induced-Protein-of-Neurite-outgrowth 1&2 (GRIN1&2; Chen et al., 1999; Nakata & Kozasa 2005) nachgewiesen werden. Isoformspezifische Untersuchungen für  $Go\alpha 2$  fehlen bisher komplett, obwohl gezeigt werden konnte, dass beide Spleißvarianten von  $Go\alpha$  mit verschiedenen Rezeptoren (Kleuss et al., 1991; Dhingra et al., 2002) oder Effektoren (Man-Son-Hing et al., 1992) interagieren.

Die Bedeutung von  $Go\alpha$  im Nervensystem wird durch ausgeprägte Defizite von  $Go\alpha$ -defizienten Mäusen deutlich. Sie weisen neben verschiedenen neurologischen Symptomen

wie Tremor, Krampfanfällen, auffälligen Bewegungsmustern und Hyperalgesie eine hohe postnatale Sterblichkeit auf (Jiang et al., 1998). Morphologisch zeigt das Gehirn jedoch keine Veränderungen (Valenzuela et al., 1997).

### **3.5.3 Lokalisation heterotrimerer G-Proteine auf synaptischen Vesikeln - Regulation der vesikulären Neurotransmitterspeicherung**

Neben der Vermittlung der Signale von heptahelikalen Rezeptoren und der damit verbundenen Lokalisation an der Plasmamembran ist bekannt, dass Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine auch intrazellulär vorkommen. Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine der Gi/o-Familie sind mit dem Golgi-Apparat (Ercolani et al., 1990; Stow et al., 1991; Wilson et al., 1994; Montmayeur & Borrelli, 1994; Denker et al., 1996), dem endoplasmatischen Retikulum (Audigier et al., 1988), Endosomen (Ali et al., 1989; Zheng et al., 2004), dem Zytoskelett (Rasenick et al., 1990; Roychowdhury et al., 1999; Chen et al., 2003) und dem Zellkern assoziiert (Willard & Crouch, 2000).

Gleichermaßen lassen sich auf sekretorischen Granula und Vesikeln (Toutant et al., 1987; Aronin & DiFiglia, 1992)  $\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine finden. Dabei hat sich gezeigt, dass verschiedene synaptische Vesikel Unterschiede in ihrer G-Proteinverteilung aufweisen (Ahnert-Hilger et al., 1994). Über die Bedeutung und Funktionsweise sowie vor- und nachgeschaltete Signalwege existieren nur wenige Informationen.

Von Bedeutung sind vesikel-assoziierte heterotrimere G-Proteine bei Neurotransmitteraufnahme und -speicherung in sekretorischen Vesikeln. Erste Hinweise auf die Beteiligung von G-Proteinen an diesen Prozessen zeigten Experimente an PC12-Zellen, einer Zelllinie, die aus einem Phaeochromozytom der Ratte hervorgegangen ist. In permeabilisierten PC-12-Zellen, die ausschließlich VMAT1 exprimieren, konnte der Transport markierter Monoamine in Vesikel durch Zugabe der schwer hydrolysierbaren GTP-Analoga GTP $\gamma$ S bzw. GMP-P(NH)P vermindert werden.

Bei der Charakterisierung des für die Reduktion verantwortlichen G-Proteins stellte sich heraus, dass Go2 $\alpha$  aber nicht Go1 $\alpha$ , Gi1 $\alpha$  und Gi2 $\alpha$  die vesikuläre Serotoninaufnahme in PC12-Zellen vermindert (Ahnert-Hilger et al., 1998). Gleiche Beobachtungen konnten an einer Pankreaskarzinoidzelllinie (BON-Zellen), die sowohl VMAT1 als auch VMAT2 exprimiert, gemacht werden. Beide VMAT-Isoformen werden durch Go2 $\alpha$  reguliert. Exozytoseprozesse spielen bei dieser Regulation keine Rolle. Dies zeigten Experimente mit Tetanustoxin, das die Vesikelfusion mit der Plasmamembran verhindert (Höltje et al., 2000). Auch in Vesikelpräparationen und permeabilisierten Raphe-Neuronen kann die vesikuläre Serotoninaufnahme durch Zugabe von GMP-P(NH)P bzw. rekombinantem Go2 $\alpha$  gehemmt werden (Höltje et al., 2000). Elektronenmikroskopisch werden diese Daten durch die Lokalisation von Go2 $\alpha$  auf VMAT2-haltigen SSV serotonerger Nervenendigungen untermauert

(Höltje et al., 2000). Neuere Untersuchungen des Proteoms Clathrin-ummantelter Vesikel (Blondeau et al., 2004) und synaptischer Vesikel (Burrè et al., 2006, Takamori et al., 2006) bestätigen ebenfalls das Vorkommen von  $Go2\alpha$  bzw.  $Go\alpha$  auf synaptischen Vesikeln.

Neben dem Vorkommen im Gehirn wird VMAT2 auch in Thrombozyten exprimiert. In den Thrombozyten ist VMAT2 gemeinsam mit dem Plasmamembrantransporter SERT an der Speicherung von Serotonin beteiligt. Das Serotonin wird durch enterochromaffine Zellen freigesetzt und bei der Passage durch die Kapillaren des Magen-Darm-Traktes in die Thrombozyten aufgenommen, wo es in den vesikulären Strukturen, sogenannten dense bodies, gespeichert wird. Die Synthese von Serotonin aus Tryptophan ist in Blutplättchen nicht möglich. Auch in Thrombozyten führt die G-Proteinaktivierung durch GMP-P(NH)P zu einer verminderten Neurotransmitterspeicherung. In diesen Organellen wird dieser Prozess durch  $Gq\alpha$  reguliert, wie Versuche an permeabilisierten Thrombozyten aus  $Gq\alpha$ -Deletionsmutanten zeigen (Höltje et al., 2003). Experimente an Thrombozyten aus Tryptophanhydroxylase1(Tph1)-Deletionsmutanten, deren Thrombozyten weniger als 10 % Serotonin gegenüber Wildtypthrombozyten enthalten, ließen erstmals die Schlussfolgerung zu, dass der vesikuläre Füllungsstatus ein vorgeschaltetes Signal der G-Protein vermittelten Regulation der Neurotransmitteraufnahme ist. In den nahezu leeren Thrombozyten aus Tph1-Deletionsmutanten fehlt die  $Gq\alpha$ -vermittelte Verminderung der Serotoninspeicherung, kann aber durch Vorinkubation mit Serotonin wiederhergestellt werden (Höltje et al., 2003). Ähnliche Beobachtungen wurden an mit VMAT transfizierten CHO-Zellen gemacht. Diese Zellen enthalten keine für Serotoninsynthese und -speicherung nötigen Enzyme und Transporter. Nach Transfektion mit VMAT2 bzw. VMAT1 und Permeabilisierung der Zellen - sie enthalten keinen Plasmamembrantransporter - kann der Monoamintransport in intrazelluläre Kompartimente gemessen werden (Brunk et al., 2006). In diesem zellulären Testsystem kann eine G-Protein-vermittelte Hemmung der Monoaminaufnahme erst nach Vorbeladung der intrazellulären Kompartimente mit Monoaminen beobachtet werden (Brunk et al., 2006). Dabei eignen sich für VMAT1 und VMAT2 nicht alle Monoamine gleichermaßen. So führt z.B. die Vorbeladung mit Adrenalin in permeabilisierten VMAT1-transfizierten Zellen in nachfolgenden Neurotransmitteraufnahmetests zur Auslösung einer G-Protein-vermittelten Hemmung. Im Gegensatz dazu fehlt in VMAT2-transfizierten Zellen diese Adrenalinwirkung (Brunk et al., 2006).

Die zuletzt beschriebenen Ergebnisse belegen, dass eine Signaltransduktionskaskade, die im Vesikellumen beginnt, an der G-Proteinaktivierung beteiligt ist. Eine Erkennungsstruktur, die an der Bestimmung der intravesikulären Monoaminkonzentration beteiligt ist, unterscheidet sich in VMAT1- und VMAT2-transfizierten CHO-Zellen. Da diese Zellen nicht die Enzymausstattung für Synthese und Speicherung von Monoaminen haben, scheinen die VMAT Bestandteil der intravesikulären Rezeptorstruktur zu sein.

### 3.6 Fragestellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten deshalb folgende Fragestellungen untersucht werden:

Sind die VMAT Bestandteil einer intravesikulären Rezeptorstruktur? Wenn ja, welche Domänen der Transporter sind an einer Signaltransduktion aus dem Lumen ins Zytoplasma beteiligt?

Welche weiteren Signalmoleküle beeinflussen die Monoaminspeicherung in Vesikeln und welche nachgeschalteten Signaltransduktionsmoleküle interagieren direkt mit aktiviertem  $G\alpha_2$ ?

Welche Bedeutung hat die durch  $G\alpha_2$  -Protein-vermittelte Regulation für den Organismus bzw. welche Folgen hat die Inaktivierung von  $G\alpha_2$ ?

## 4 Materialien und Methoden

### 4.1 Chemikalien

40% Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (40,19:1)	Roth (Karlsruhe)
L-Adeninhemisulfatsalz	Sigma (Schnelldorf)
Adrenalin	Sigma (Schnelldorf)
Agar-Agar	Sigma (Schnelldorf)
Agarose	Roth (Karlsruhe)
Aluminiumoxid	Sigma (Schnelldorf)
3-Aminotriazol (3-AT)	Sigma (Schnelldorf)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma (München)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
AmpliTaq DNA Polymerase	Applied Biosystems (Darmstadt)
Ascorbinsäure	Sigma (München)
Bafilomycin	Sigma (Schnelldorf)
Bicinchoninsäure (BCA)	Sigma (Schnelldorf)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe)
Bovines Serum Albumin, Fraktion V (BSA)	Roth (Karlsruhe)
Dibutyryl-cAMP (DbcAMP)	Sigma (Schnelldorf)
Dibutyryl-cGMP (DbcGMP)	Sigma (Schnelldorf)
Kollagen Typ VII	Sigma (Schnelldorf)
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]oktan (DABCO)	Sigma (Schnelldorf)
3,4-Dihydroxybenzylaminhydrobromid (DHBA)	Sigma (Schnelldorf)
3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure	Sigma (Schnelldorf)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (Schnelldorf)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma (Schnelldorf)
[7,8- <sup>3</sup> H]Dopamin	GE Healthcare (München)
3,4-Dihydroxyphenethylamin-hydrochlorid (Dopamin)	Sigma (Schnelldorf)
Enhanced-Chemiluminescence-Reagenzien (ECL)	GE Healthcare (München)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
Ethylenglykolbis(2-aminoethyl-)tetraacetat (EGTA)	Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Geneticin	Invitrogen (Karlsruhe)
Glukose	Sigma (Schnelldorf)

Glyzerin	Merck (Darmstadt)
Glyzin	Sigma (Schnelldorf)
5'-Guanolyimidodiphosphat (GMP-P(NH)P)	Sigma (Schnelldorf)
Hefeextrakt	Roth (Karlsruhe)
Heptansulfonsäure	Sigma (Schnelldorf)
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma (Schnelldorf)
5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA)	Sigma (Schnelldorf)
5-Hydroxytryptamin-Hydrochlorid	Sigma (Schnelldorf)
5-Hydroxy-[ <sup>3</sup> H]-tryptamintrifluoracetat ([ <sup>3</sup> H]-Serotonin)	GE Healthcare (München)
Kaliumchlorid	Sigma (Schnelldorf)
Kaliumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Kaliumglutamat	Sigma (Schnelldorf)
Kanamycin	Sigma (Schnelldorf)
Kupfersulfat	Sigma (Schnelldorf)
Lipofectamin	Invitrogen (Karlsruhe)
Lithiumazetat	Sigma (Schnelldorf)
Low Molecular Weight-Marker (LMW)	GE Healthcare (München)
Magermilchpulver	Molkerei Heideblume (Elsorf)
Magnesiumchlorid	Sigma (Schnelldorf)
Mass-Ruler-DNA-Marker	Fermentas (St. Leonrot)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Mowiol 4-88	Sigma (Schnelldorf)
Di-Natrium-Adenosin-5'-Triphosphat (Na <sub>2</sub> -ATP)	Sigma (München)
Natriumazetat	Sigma (Schnelldorf)
Natriumbicarbonat	Sigma (Schnelldorf)
Natriumcarbonat	Sigma (Schnelldorf)
Natriumchlorid	Sigma (Schnelldorf)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma (Schnelldorf)
Natriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Sigma (Schnelldorf)
Di-Natriumtartrat	Sigma (Schnelldorf)
Nigericin	Sigma (Schnelldorf)
Noradrenalinbitartrat	Sigma (Schnelldorf)
Oktansulfonsäure	Sigma (Schnelldorf)
Optiphas HighSafe 3 Szintillationsflüssigkeit	Beckman Coulter (Krefeld)
PageRuler - Protein Marker	Fermentas (St. Leonrot)

Perchlorsäure	Sigma (Schnelldorf)
Pertussistoxin (Ptx)	List Biological Laboratories
Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure) (Pipes)	Sigma (Schnelldorf)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma (Schnelldorf)
Polyethylenglykol (PEG 3350)	Sigma (Schnelldorf)
Ponceau S	Sigma (Schnelldorf)
Porablot	Macherey & Nagel (Düren)
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma (Schnelldorf)
Restriktionsenzyme	Fermentas (St. Leonrot)
Reserpin	Sigma (Schnelldorf)
RNAse A	Roth (Karlsruhe)
Synthetic Dropout(SD)-Pulver (Medienzusatz)	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)
Saccharose	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure	Sigma (Schnelldorf)
Sulfosalicylsäure	Sigma (Schnelldorf)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma (Schnelldorf)
Tetrabenazin	Sigma (Schnelldorf)
Trichloressigsäure	Sigma (Schnelldorf)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Merck (Darmstadt)
Triton X-100	Roth (Karlsruhe)
Trypsin	Sigma (Schnelldorf)
Trypton	Roth (Karlsruhe)
Tween 20	Merck (Darmstadt)
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid (X-Gal)	Roth (Karlsruhe)
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-α-D-galaktopyranosid (X-α-Gal)	Neolab (Heidelberg)
Yeast Nitrogen Base (YNB)	Sigma (Schnelldorf)
zyklisches Adenosin 3',5'-monophosphat (cAMP)	Sigma (Schnelldorf)
zyklisches Guanosin 3',5'-monophosphat (cGMP)	Sigma (Schnelldorf)

## 4.2 Geräte und Apparaturen

### Elektrophorese

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

Power/Pac 200/300 Spannungsgerät

TransBlot SD Semidry Elektrophorese Transferzelle

Mini Protean II Elektrophorese-Kammer

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

### **Mikroskope**

Leica DMIL Kontrastiermikroskop

Leica DMLB Epifluoreszenz-Mikroskop mit Durchlichteinrichtung

### **Homogenisierung von Gewebe**

Heidolph Rührer RZR 2021

Wheaton Homogenisator

### **Photometer**

GeneQuant II (Pharmacia Biotech)

Anthos Labtec HT-2 Mehrzweck-Mikrotiterplattenlesegerät

Dynatech MR 500 Mikrotiterplattenlesegerät

### **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

### **HPLC**

Beckman Coulter LC 118 Pumpenmodul

Beckman Coulter LC 508NM Autosampler

Chromsystems Elektrochemischer Detektor CLC 100

Säulenthermostat Jetstream (FlowSpek AG)

### **Sonstige**

Beckman LS 6500, Liquid Szintillation Counter

BioDoc Analyse (Video Dokumentationssystem)

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

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

### 4.3 Puffer und Lösungen

#### Kollagenlösung

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

#### Einfrrierlösung

28 ml	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
12 ml	DMSO
10 mM	HEPES

#### Homogenisierungslösung für HPLC-Proben

100 mM	Perchlorsäure (HClO <sub>4</sub> )
0,4 mM	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>

#### PBS (Phosphate Buffered Saline)

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

#### PEG/LiAc-Lösung

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

8 ml	50 % (w/v) Polyethylenglykol 3350
1 ml	10 x Tris-EDTA-Puffer
1 ml	1 M Lithiumazetat

#### 1,1 x TE/LiAc-Lösung

1,1 ml	10 x Tris-EDTA-Puffer
1,1 ml	1M Lithiumazetat
7,8 ml	steriles ddH <sub>2</sub> O

#### Trypsinlösung

0,25 %	Trypsin
1 mM	EDTA
in PBS	

#### Lösungen für die Proteinbestimmung

##### **Lösung A**

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

##### **Lösung B**

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

**Lösungen für Immunoblots****TS-(Tris-Saline) Puffer**

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

**TS-Tween-Puffer**

20 mM Tris  
150 mM NaCl  
0,1 % (v/v) Tween 20  
pH 7,5 (HCl)

**Antikörperlösung**

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

**Magermilchlösung**

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

**Lösungen für Elektrophorese****Probenpuffer**

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

**Elektrophoresepuffer**

25 mM Tris  
200 mM Glyzin  
3,5 mM SDS

**Ponceau S-Färbelösung**

0,3 % (w/v) Ponceau S  
3 % (w/v) Trichloressigsäure  
3 % (w/v) Sulfosalizylsäure  
in ddH<sub>2</sub>O

**Proteintransferpuffer**

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

**Tris I-Puffer (4x)**

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

**Tris II-Puffer (4x)**

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

**Sammelgel**

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

**Trenngele**

% Acrylamid/Bisacrylamid	5%	8%	10%	12%	15%
Tris II -Puffer	2,5 ml				
Acrylamid/Bisacrylamid (40%;19:1)	1,25 ml	2 ml	2,5 ml	3 ml	3,75 ml
ddH <sub>2</sub> O	6,25 ml	5,5 ml	5 ml	4,5 ml	3,75 ml
TEMED	5 µl				
10% APS	50 µl				

**Lösungen für Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

**TAE (Tris-Azetat-EDTA)-Puffer**

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

**TE (Tris-EDTA)-Puffer**

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

**Probenpuffer**

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

**Lösungen für Vesikelpräparationen und Neurotransmitteraufnahme**

**Homogenisierungspuffer**

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

**KG (Kaliumglutamat)-Puffer (1x)**

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

**KG (Kaliumglutamat)-ATP-Puffer**

KG-Puffer	
2 mM	Na <sub>2</sub> -ATP

**Natrium-Puffer**

10 mM	Glukose
5 mM	KCl
140 mM	NaCl
5 mM	NaHCO <sub>3</sub>
1 mM	MgCl <sub>2</sub>
1,2 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
20 mM	HEPES
pH 7,4 (NaOH)	

**Tyrode HEPES (TH)-Puffer**

134 mM	NaCl
0,34 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
2,9 mM	KCl
12 mM	NaHCO <sub>3</sub>
10 mM	HEPES
5 mM	Glukose
1 mM	MgCl <sub>2</sub>
pH 7,3 (HCl)	

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

0,1 % (v/v)	Triton X-100
5,0 % (v/v)	NGS (normal goat serum)
2,0 % (w/v)	BSA (bovine serum albumine)
in PBS	

**Mowiol**

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

**Paraformaldehydlösung**

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

**4.4 Medien****4.4.1 Mikrobielle Medien**

Alle hier aufgeführten Medien wurden für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Bei Medien, die Glukose enthielten, wurde diese als 20-fache Stammlösung separat sterilisiert und nach dem Autoklavieren zugegeben. Für die Herstellung von festen Medienplatten wurde vor dem Autoklavieren Agar-Agar mit einer Konzentration von 20 g / l zugegeben.

**Luria Bertani (LB)-Medium**

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

**YPD-Medium**

20 g / l	Pepton
10 g / l	Hefeextrakt
20 g / l	Glukose
pH 6,5	

**YPDA-Medium**

wie YPD-Medium, jedoch mit dem Zusatz von 30 mg / l L-Adeninhemisulfatsalz

**Minimalmedium**

6,7 g / l	YNB (Yeast Nitrogen Base)
20 g / l	Glukose
0,6 g / l	SD-Pulver-Zusatz (Menge variierend entsprechend Herstellerangaben)

**Einfrier-Medien**

wie LB, YPDA- oder Minimalmedium, jedoch mit Zusatz von Glycerin, so dass die Endkonzentration 15 % (v/v) betrug

**Medienzusätze**

Die hier aufgeführten Medienzusätze wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf ca. 55°C zugegeben.

<u>Medienzusatz</u>	<u>Stammlösung</u>	<u>Konzentration im Medium</u>
Ampicillin	100 mg / ml	100 µg / ml
Kanamycin	25 mg / ml	25 µg / ml
X-Gal	20 mg / ml	40 µg / ml
X-α-Gal	20 mg / ml	2 mg / ml
3-AT	1 M	1 mM

**4.4.2 Zellkulturmedien**

Alle für die Zellkultur angegebenen Medienbestandteile wurden von der Firma Biochrom AG (Berlin) bezogen. Bei Transfektionen kam zusätzlich das Medium Optimem (Invitrogen, Karlsruhe) zum Einsatz.

**Medium für BON- und CHO-Zellen**

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

**Medium für PC12-Zellen**

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

**Einfriermedium**

60 ml	DMEM
40 ml	Kälberserum (FBS)

## 4.5 Antikörper

### 4.5.1 primäre Antikörper

Anti-Gq $\alpha$ polyklonal, Kaninchen	Calbiochem, La Jolla, Ca ,USA
Anti-Go $\alpha$ (Klon 101.1, 101.4) monoklonal, Maus	freundlicherweise von Prof. Jahn, MPI für biophysikalische Chemie zur Ver- fügung gestellt, Göttingen, Deutschland
Anti-GAL4-DNA-Bindungsdomäne monoklonal, Maus	Clontech Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
Anti-GAL4-Aktivierungsdomäne monoklonal, Maus	Clontech Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
Anti-Synaptophysin (Klon 7.2) monoklonal, Maus	Synaptic Systems Göttingen, Deutschland
Anti-VMAT1 polyklonal, Kaninchen	Chemicon International Schwalbach, Deutschland
Anti-VMAT2 polyklonal, Kaninchen	Synaptic Systems Göttingen, Deutschland

### 4.5.2 sekundäre Antikörper

Ziege-Anti-Kaninchen IgG Peroxidase gekoppelt	Vector Laboratories Burlingham, USA
Ziege-Anti-Maus IgG Peroxidase gekoppelt	Vector Laboratories Burlingham, USA
Ziege-Anti-Kaninchen IgG MFP488 gekoppelt	MoBiTec GmbH, Göttingen, Deutschland
Ziege-Anti-Maus IgG MFP590 gekoppelt	MoBiTec GmbH Göttingen, Deutschland

## 4.6 Nukleinsäuren

### 4.6.1 Oligonukleotide

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

Primerpaar für die ortsspezifische Mutagenese einer EcoR1-Schnittstelle in Gq $\alpha$  (Ratte):

**EcorGQ-fwd:** AGG CAG CCC GAG AGT TTA TTC TGA AGA TGT TC  
**EcorGQ-rev:** GAA CAT CTT CAG AAT AAA CTC TCG GGC TGC CTG

Primerpaar für die ortsspezifische Mutagenese von Q205L in Go2 $\alpha$ :

**Go2Q205L-f:** TTG ACG TTG GGG GCT TAC GTA GTG AAC GTA AGA AGT GG  
**Go2Q205L-R:** ACT TCT TAC GTT CAC TAC GTA AGC CCC CAA CGT CA

Primerpaar für die Klonierung von Go1/2 $\alpha$  (EcoRI/Sall):

**GO1fw:** ACC GAA TTC ATG GGA TGT ACT CTG AGC  
**GO1rev:** AAT GTC GAC TCA GTA CAA GCC ACA GC  
**GO2rev:** AAT GTC GAC TCA GTA CAA GCC ACA GCC CCG CAG A

Primerpaar für die Klonierung von Gq $\alpha$  (EcoRI/XhoI):

**Gqfw:** AGC GAA TTC ATG ACT CTG GAG TCC  
**Gqrev:** AGC CTC GAG TTA GAC CAG ATT GTA CTC C

Primerpaar für die Amplifikation von pACT2-Bibliotheksfragmenten:

**pACT25091f:** CTA TTC GAT GAT GAA GAT ACC CCA CCA AAC C  
**pACT24978:** AGT GAA CTT GCG GGG TTT TTC AGT ATC TAC G

Primer für die Klonierung von mutiertem VMAT2 im Bereich der ersten luminalen Schleife:

**VMAT2-1:** AAG CTT GCC GCC ATG GCC CTG AGC GAT CTG G  
**VMAT2-2:** GAA TTC GCC GCC GCC GCC GCC AAC CAC GAC GGT GAG  
 CAG CAT G  
**VMAT2-3:** GAA TTC GAT TTC CGT AGA GTT TTT CTC ATG C  
**VMAT2-4:** GAA TTC GTC CCT TCG GAC TGT CCC AG  
**VMAT2-5:** GAA TTC CAA GTT GGG CTG CTG TTT GCC  
**VMAT2-6:** ACG CTC GAG TCA GTC ACT TTC AGA TTC TTC

Primer für die Klonierung von mutiertem VMAT1 im Bereich der ersten luminalen Schleife:

**VMAT1-1:** ATC GGA TCC GCC GCC ATG CTC CAG GTT GTT CTG  
**VMAT1-2:** ATC GAA TTC GCC GCC GCC GCC GCC CAC CAC CAC AGT GAG  
 CAG CAT  
**VMAT1-3:** CTC GAA TTC CAG AGA AGA GTT GCT GTC TTT G  
**VMAT1-4:** CAG AAT TCC CAA AAA ACA ACT GCT TGC AAG G  
**VMAT1-5:** CTG AAT TCC GGA TTG GGA TTC TAT TTG C  
**VMAT1-6:** ACA CTC GAG TTA CTC CCC GCT GCT AGG ATC

Primer für die Klonierung von C-terminal mutierter VMAT2-cDNA:

**VMAT2-1:** AAG CTT GCC GCC ATG GCC CTG AGC GAT CTG G  
**VMAT2 $\Delta$ Crev:** GCG CCT CGA GTC AAA GGA AAA AGC AGA GAG GAG C  
**VMAT2 $\Delta$ Cmed:** GCG CCT CGA GTC AGT CAC TTT CAG ATT CTT CAT CAT CAC  
 CGA TGG GAA GGA AAA AGC AGA GAG GAG C

Primer für die Klonierung mutierter VMAT2 mit Deletion der Schleife zwischen TMD VI & VII:

**VMAT2-1:** AAG CTT GCC GCC ATG GCC CTG AGC GAT CTG G  
**VMAT2TM6re:** ATG GGC CGC CGC CGC CGC CCT GGA GCA CAA AGA  
 GCT G  
**VMAT2TM7fw:** CAG GGC GGC GGC GGC GGC GGC CCA TAC ATC CTC ATC  
 GCT G  
**VMAT2-6:** ACG CTC GAG TCA GTC ACT TTC AGA TTC TTC

## 4.6.2 Vektoren

**pACT2** (Clontech): Dieser Vektor kodiert die in die Multiple Cloning Site (MCS) klonierten Fragmente als Fusion mit der GAL4-Aktivierungsdomäne. Für die Selektion in *E.coli* trägt der Vektor das  $\beta$ -Laktamase-Gen, für die Selektion in *S.cerevisiae* zusätzlich das LEU2-Gen.

**pcDNA3.1** (Invitrogen): Dieser Vektor ermöglicht die Expression einer gewünschten cDNA in Säugerzellen. Für die Selektion in Säugerzellen dient das Neomycinresistenz-Gen, für die Selektion in *E.coli* enthält der Vektor außerdem das  $\beta$ -Laktamase-Gen.

**pEGFP-(del2)-C3**: Dieser Vektor wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Christian Derst (Charité, Institut für Integrative Neuroanatomie, Berlin) zur Verfügung gestellt. Dieser modifizierte Vektor ist durch Deletion der Basen 1341 (A) und 1342 (T) des Vektors pEGFP-C1 (Clontech) entstanden. Der Vektor kodiert das *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) gefolgt von der MCS. Für die Generierung stabiler Zelllinien dient das Neomycinresistenz-Gen. Für die Selektion in *E. coli* ist dem Neomycinresistenz-Gen ein bakterieller Promotor vorgeschaltet, der die Selektion mittels Kanamycin ermöglicht.

**pGBKT7** (Clontech): Dieser Vektor ermöglicht die Expression von Proteinen als Fusionsproteine mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne. Der Vektor enthält das Kanamycinresistenz-Gen für die Selektion in *E.coli* und das TRP1-Gen für die Selektion in *S.cerevisiae*.

**pGBKT7lam** (Clontech): Dieser Vektor kodiert ein Fusionsprotein der GAL4-DNA-Bindungsdomäne mit humanem Lamin C. Es ist bekannt, dass Lamin C kaum mit anderen Proteinen interagiert (Bartel et al., 1993; Ye & Worman, 1995). Der Vektor dient während eines Yeast-Two-Hybrid-Screenings als Negativkontrolle.

**pGBKT7p53** (Clontech): Dieser Vektor kodiert ein Fusionsprotein der GAL4-DNA-Bindungsdomäne mit murinem p53. Es ist bekannt, dass murines p53 mit dem großen SV40 T-Antigen interagiert (Li & Fields, 1993; Iwabuchi et al., 1993). In Kombination mit pGADT7T dient dieser Vektor als Positivkontrolle für ein Yeast-Two-Hybrid-Screening.

**pGADT7** (Clontech): Dieser Vektor kodiert Fusionsproteine mit der GAL4-Aktivierungsdomäne. Der Vektor enthält das  $\beta$ -Laktamase-Gen für die Selektion in *E.coli* und das LEU2-Gen für die Selektion in *S.cerevisiae*.

**pGADT7T** (Clontech): Dieser Vektor kodiert für das Fusionsprotein aus GAL4-Aktivierungsdomäne und dem großen SV40 T-Antigen. Es ist bekannt, dass das SV40 T-Antigen mit murinem p53 interagiert. Gemeinsam mit pGBKT7p53 dient dieser Vektor als Positivkontrolle in einem Yeast-Two-Hybrid-Screening.

### 4.6.3 cDNA

#### 4.6.3.1 cDNA-Bibliothek

Für das Yeast-Two-Hybrid-Screening wurde eine Mouse Brain MATCHMAKER cDNA Library (Clontech, Lot#: 4030478), die im *E.coli* Stamm BNN132 vorlag, verwendet. Als mRNA-Quelle dieser Bibliothek dienten 200 Gehirne von 200 männlichen BALB/c Mäusen im Alter von 9-12 Wochen. Die cDNA lag in die *Xho* I und *Eco*R I Restriktionsschnittstellen des Vektors pACT2 kloniert vor. Die Anzahl unabhängiger Klone betrug  $3,5 \times 10^6$ . Die klonierte cDNA lag in einem Größenbereich von 400-4000 bp vor.

#### 4.6.3.2 cDNA von $\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine

Die cDNA für die  $G\alpha$ -Untereinheiten  $Go1\alpha$  (Ratte),  $Go2\alpha$  (Hamster) und  $Gq\alpha$  (Maus) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Lutz Birnbaumer, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, North Carolina, in pAGA2 zur Verfügung gestellt.

## 4.7 Methoden

### 4.7.1 DNA-Techniken

#### 4.7.1.1 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*

Um *E.coli* Zellen kompetent für die DNA-Aufnahme zu machen, wurde der Z-Competent *E. coli* Transformation Kit & Buffer Set der Firma Zymo Research eingesetzt. Dafür wurde zunächst eine Übernacht(ÜN)-Kultur mit 50  $\mu$ l Zellen aus der Glycerinstammlösung des entsprechenden Stammes (DH5 $\alpha$ ) in LB-Medium bei 240 rpm und 30°C angesetzt. Von dieser ÜN-Kultur wurden dann 500  $\mu$ l abgenommen, um 50 ml LB-Medium zu beimpfen. Dann erfolgte eine Weiterkultivierung bei 240 rpm und Raumtemperatur (RT) bis eine OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 erreicht wurde (ca. 3 h). Anschließend wurden die Bakterien entsprechend den Herstellervorschriften gewaschen und in Puffer resuspendiert und als 100  $\mu$ l Aliquots bei -80 °C eingefroren oder direkt für Transformationen eingesetzt.

Für die Transformation wurden 1-5  $\mu$ l DNA (ca. 10 ng) mit 100  $\mu$ l kompetenten Zellen gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden 400  $\mu$ l LB-Medium zugegeben und der gesamte Ansatz für 1 h bei 240 rpm und 37 °C inkubiert. Schließlich wurden 2 x 250  $\mu$ l der transformierten Zellen auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert.

#### 4.7.1.2 Isolation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Ausgewählte *E.coli* Kolonien wurden in 2 ml LB-Medium mit geeignetem Selektionsantibiotikum über Nacht bei 37°C angezogen. Am nächsten Tag wurden die Bakterien in einer Tischzentrifuge bei 6000 x g sedimentiert und die Plasmid-DNA mit Hilfe des Quantum Prep Plasmid Miniprep-Kits der Firma Biorad gemäß Herstellerangaben präpariert.

Um Plasmidmengen im größeren Maßstab zu gewinnen, erfolgte das Animpfen von 50 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum und Kultivierung bei 37°C und 220 rpm in sterilen Erlenmeyerkolben über Nacht. Die Plasmid-DNA wurde nach Zentrifugation bei 6000 x g mit Hilfe des Quantum Prep Plasmid Midiprep Kit der Firma Biorad gemäß Herstellerangaben aufgearbeitet.

Für die Isolation der cDNA-Bibliothek nach der Amplifikation wurde der Qiagen Plasmid Giga Kit verwendet.

#### 4.7.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

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

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

c : Konzentration der DNA-Lösung [ $\mu\text{g} / \text{ml}$ ]

OD<sub>260</sub> : Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm

VF : zu berücksichtigender Verdünnungsfaktor der untersuchten DNA-Lösung

#### 4.7.1.4 Konzentration von DNA durch Fällung

Mittels Ethanolpräzipitation wurde die Plasmid-DNA aus einer wässrigen Lösung gefällt. Dazu wurde die wässrige Phase mit 1/10 Volumen 3 M Natriumazetat pH 4,5 versetzt und anschließend das zwei- bzw. zweieinhalbfache Volumen Isopropanol bzw. eiskalter Ethanol zugegeben. Dieser Ansatz wurde danach bei 20.000 x g und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet einmal mit 70 % Ethanol gewaschen und nach wiederholter Zentrifugation in einem gewünschten Volumen TE-Puffer resuspendiert.

#### 4.7.1.5 Restriktion von DNA mit Endonukleasen

Der Restriktionsansatz wurde in einem Volumen von 15  $\mu\text{l}$  durchgeführt, bestehend aus 1,5  $\mu\text{l}$  eines geeigneten 10-fach Puffers (je nach Enzym), ca. 3  $\mu\text{g}$  DNA sowie 1,5 U Restriktionsenzym /  $\mu\text{g}$  DNA. Die Restriktion erfolgte für zwei Stunden bei dem für das Restriktionsenzym spezifischen Temperaturoptimum. Anschließend wurde der Restriktionsansatz mit

Probenpuffer gemischt und durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Für präparative Zwecke wurden die dreifachen Mengen des beschriebenen Ansatzes verwandt.

#### **4.7.1.6 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dazu wurden je nach untersuchtem Größenbereich der Fragmente unterschiedlich konzentrierte Agarosegele verwandt. Für kleine Fragmente von 0,2 kbp bis 3 kbp wurden 2-prozentige Agarosegele bzw. für Fragmente von 0,5 – 10 kbp 1-prozentige Agarosegele benutzt. Dazu wurde die Agarose mit TAE-Puffer in eine 250 ml Schraubflasche gegeben und in einer Mikrowelle aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Die Agaroselösung wurde dann mit 1 µg / ml Ethidiumbromid versetzt und in den vorbereiteten Rahmen (Biorad) gegossen. Die Elektrophorese wurde bei 60-100 V in 1x TAE-Puffer durchgeführt, wobei als Größenstandard 5 µl Mass-Ruler-DNA-Ladder-Marker (Fermentas) verwendet wurde. Abschließend wurde die DNA unter UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht und fotografiert.

#### **4.7.1.7 Gelelution**

Das gewünschte DNA-Fragment wurde nach der Auftrennung im Agarosegel mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des NucleoSpin Extract II Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt.

#### **4.7.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten**

Die Ligation von DNA-Fragmenten, wurde mit Hilfe der T4-DNA-Ligase durchgeführt, die sowohl in der Lage ist, zwei glatte (blunt-) oder zwei überstehende, komplementäre (sticky-) Enden durch Knüpfung kovalenter Phosphodiesterbindungen zwischen der 3'-Hydroxylgruppe eines Nukleotids und der 5'-Phosphatgruppe eines weiteren Nukleotids in doppelsträngiger DNA miteinander zu verknüpfen. Für die Ligation wurden Vektoren mit DNA-Fragmenten im Verhältnis von 1:3 (Vektor : DNA-Fragment) eingesetzt. Im Ligationsansatz von 10 µl wurden 1 µl 10-fach Ligasepuffer (Fermentas), 1 µl T4-Ligase (1U / µl) sowie ca. 100 ng Vektor-DNA mit entsprechender Menge Fragment-DNA gemischt und 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 10 Minuten bei 75°C hitzeinaktiviert.

#### **4.7.1.9 Polymerasekettenreaktion**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifikation von DNA-Sequenzen unter Einsatz spezifischer Primer verwandt. Die so erhaltenen DNA-Fragmente dienten einerseits analytischen Zwecken, wurden aber auch zur Generierung spezifischer DNA-Fragmente, z.B. für die Klonierung, eingesetzt. Für analytische Zwecke wurde die AmpliTaq-DNA Poly-

merase (Applied Biosystems) verwendet, für präparative Zwecke die Pfu-Polymerase (Fermentas), die sich durch Ihre proofreading-Aktivität (3'-5'-Exonukleaseaktivität) von der Taq-Polymerase unterscheidet. In einem initialen Denaturierungsschritt wurde die doppelsträngige DNA-Matrize für 3 Minuten bei 95°C denaturiert. Anschließend folgten je nach Verwendungszweck mehrere Zyklen (25 - 40) aus Denaturierung (95°C), Anlagerung (58-65°C, je nach Schmelztemperatur des verwendeten Primerpaares) und Verlängerung (72°C, Temperaturoptimum der DNA-Polymerasen) des gewünschten DNA Abschnitts. Danach wurde ein abschließender Elongationsschritt durchgeführt, um zu gewährleisten, dass alle Amplifikationen abgeschlossen waren. Danach wurden die PCR-Produkte bei 4°C gekühlt und schließlich bei -20°C eingefroren. Zur Kontrolle der PCR-Bedingungen, und um Verunreinigungen auszuschließen, wurden immer Positiv- und Negativkontrollen (keine DNA-Matrize) mitgeführt. Der folgende PCR-Ansatz stellt einen Standardablauf dar, der gegebenenfalls an den Parametern Hybridisierungstemperatur bzw. Anzahl der Zyklen modifiziert wurde.

<u>Ansatz</u>		<u>Temperaturzyklus</u>		
		<u>T in °C</u>	<u>Dauer</u>	<u>Zyklen</u>
50	µl Gesamtvolumen			
5,0	µl 10 x PCR Puffer	95	3 min	) 25-40
1,0	µl dNTP Mix (10 µM)	95	30 s	
1,0	µl 5'-Primer (10 µM)	58	30 s	
1,0	µl 3'-Primer (10 µM)	72	1 min / kbp DNA	
0,15	µl Taq Polymerase (5 U / µl)	72	10 min	)
5,0	µl DNA-Matrize (wenn möglich, 3 ng / µl)	4	bis zum Einfrieren	
36,85	µl ddH <sub>2</sub> O			

#### 4.7.1.10 Ortsspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese wurde genutzt, um aus der cDNA, die die G-Protein  $\alpha$ -Untereinheiten  $Go1\alpha$ ,  $Go2\alpha$ ,  $Gq\alpha$  kodiert, jeweils die konstitutiv aktiven Untereinheiten herzustellen. Diese konstitutiv aktiven Mutanten können einmal gebundenes GTP nicht mehr hydrolysieren. Die Wildtyp cDNA wurde freundlicherweise durch Prof. Lutz Birnbaumer, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, North Carolina, zur Verfügung gestellt.

Das Prinzip des verwendeten QuikChange II-Kits (Stratagene) basiert auf der Verlängerung an spezifischer Stelle mutierter, komplementärer Primerpaare, wodurch Punktmutationen in die neusynthetisierte doppelsträngige DNA eingebaut wurden. Die nichtmutierte, doppelsträngige und durch die *Dam*-Methylierung gekennzeichnete Ursprungs-DNA wurde anschließend durch Behandlung mit *DpnI*, einer Restriktionsendonuklease, die nur die methylierte Erkennungssequenz 5'-GA<sup>m6</sup>TC-3' identifiziert, abgebaut. Nach Transformation der mutierten DNA in kompetente *E.coli* Zellen wurden die verbliebenen *nicks* der neusyntheti-

sierten doppelsträngigen DNA durch die bakterieneigene Ligase verknüpft. Dadurch konnte die Plasmid-DNA normal repliziert werden.

#### 4.7.1.11 DNA-Sequenzierung

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Klonierungsarbeiten mit einer folgenden Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft. Sowohl diese Sequenzierungen als auch Sequenzierungen von Vektoren aus identifizierten Klonen des Yeast-Two-Hybrid-Screenings wurden mit Hilfe der ABI BigDye-Terminator-Chemie durch die Firma SMB Services in Molecular Biology (Berlin) analysiert.

#### 4.7.1.12 Amplifizierung der cDNA-Bibliothek

Um ausreichend Plasmid-DNA für ein Screening der cDNA-Bibliothek zu erhalten, musste die vorhandene Mouse Brain Matchmaker cDNA Bibliothek, die als Flüssigkultur im *E. coli* Stamm BNN132 vorlag, vervielfältigt werden. Zuerst musste der Titer der cDNA-Bibliothek bestimmt werden, um bei der folgenden Amplifikation die nötige Anzahl unabhängiger Klone zu gewährleisten. Dazu wurden 10 µl eines Aliquots der cDNA-Bibliothek in 1 ml LB Medium resuspendiert und verschiedene Verdünnungen vorbereitet. Von diesen Verdünnungen wurden 50 bzw. 100 µl auf LB / Amp-Agarplatten verteilt und für 48 h bei 30°C inkubiert und anschließend unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren der Titer bestimmt. Anschließend wurden 265 150-mm-Platten mit je ca. 40000 cfu (*colony forming unit*) beimpft, um so die Anzahl der unabhängigen Klone von  $3,5 \times 10^6$  der cDNA-Bibliothek mit einem zusätzlichen Sicherheitsfaktor von drei beizubehalten. Feste Nährmedien gewährleisten dabei besser ein gleichmäßigeres Wachstum unterschiedlicher Klone, als eine Flüssigkultur. Die Platten wurden anschließend für 48 Stunden bei 30°C inkubiert. Danach wurden je Platte 5 ml LB-Medium zugegeben und die Kolonien mit einem Drigalski-Spatel abgelöst und in einer sterilen 1l-Flasche vermischt. Anschließend wurde die Zellsuspension für 4 Stunden bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Zwei Drittel der Zellsuspension wurden mit Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 25 % versetzt und als 50 ml Aliquots bei -80°C gelagert. Das verbleibende Drittel wurde für die Plasmidpräparation verwandt.

### 4.7.2 Yeast-Two-Hybrid-Methoden

Als Grundlage zur Identifikation von Proteininteraktionspartnern diente der 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 in Hefe exprimiert wird. Wurde eine cDNA-Bibliothek als Fusionsprotein (Beute oder *prey*) mit der Aktivierungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors in der gleichen Hefezelle exprimiert und kam es zu einer Bindung zwischen *bait* und *prey*, wurde

dadurch der GAL4-Transkriptionsfaktor rekonstituiert und die Expression verschiedener Reportergene ermöglicht. Die für das Screening verwendeten Hefestämme Y187 und AH109 sind auxotroph bezüglich verschiedener Aminosäuren bzw. Nukleinbasen. Erst durch die Expression des Reportergens wurde das Wachstum auf bestimmten Minimalmedien und somit die Selektion nach Interaktionspartnern möglich.

#### 4.7.2.1 Herstellung kompetenter Hefezellen

Um Hefezellen kompetent für die DNA-Aufnahme zu machen, wurden 3 ml YPDA-Medium mit einer frisch gewachsenen Hefekolonie inokuliert. Die Hefezellsuspension wurde bei 30°C über Nacht für 8-12 Stunden inkubiert. Danach wurden 50 ml YPDA-Medium mit 5 µl dieser Übernachtskultur beimpft und bei 30°C und 250 rpm inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,15-0,3 erreicht war. Anschließend wurden die Zellen für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 700 x g zentrifugiert, in 100 ml YPDA Medium resuspendiert und bei 30°C und 250 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,5 kultiviert. Dann wurden die Hefezellen bei 700 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und das Pellet dann in 60 ml sterilem ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei gleichen Bedingungen wurden die Zellen in 3 ml 1,1 x TE/LiAc-Lösung resuspendiert und zu gleichen Teilen auf zwei 1,5 ml Eppis verteilt. Die Zellen wurden danach in einer Tischzentrifuge bei maximaler Umdrehungszahl für 15 Sekunden zentrifugiert und in 600 µl 1,1 x TE/LiAc-Lösung resuspendiert.

Für Transformationen in kleinerem Maßstab wurde alternativ der Frozen-EZ Yeast Transformation II-Kit der Firma Zymo Research gemäß Herstellerangaben eingesetzt.

#### 4.7.2.2 Transformation kompetenter Hefezellen

Je nachdem, ob die Hefezellen mit einzelner Vektor-DNA oder einer gesamten cDNA-Bibliothek transformiert werden sollten, wurden unterschiedliche Mengen der benötigten Reagenzien verwendet. Die im Folgenden angegebenen Werte wurden für die Transformation mit der cDNA-Bibliothek verwendet. Die Angaben in Klammern entsprechen den Transformationen mit einzelner Vektor-DNA, bei denen alternativ auch der Frozen-EZ Yeast Transformation II-Kit der Firma Zymo Research gemäß Herstellerangaben verwendet wurde.

In einem sterilen, vorgekühlten 15 ml Zentrifugenröhrchen wurden 10 µg (1 µg) Vektor-DNA mit 20 µl (5 µl) frisch denaturierter Heringssperma-DNA gemischt und mit 600 µl (50 µl) kompetenten Hefezellen versetzt. Anschließend wurden 2,5 ml (0,5 ml) einer PEG/LiAc Lösung zugegeben und der Ansatz für 45 (30) Minuten bei 30°C schüttelnd inkubiert. Danach wurden 160 µl (20µl) DMSO zugegeben und bei 42°C in einem Wasserbad inkubiert. Der Ansatz wurde dabei im Abstand von 5 Minuten vorsichtig gemischt. Für die Transformation mit der cDNA-Bibliothek folgte nach Zentrifugation der Zellen bei 700 x g für 5 Minuten eine

90-minütige Inkubation bei 30°C in YPD-Plus Spezialmedium (Yeastmaker Yeast Transformation System 2). Bei Transformationen im kleinen Maßstab wurde dieser Schritt ausgelassen. Nach erneuter Zentrifugation der Hefezellen bei 700 x g (20.000 x g) für 5 Minuten (15 Sekunden), wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 15 ml (1ml) 0,9% NaCl-Lösung resuspendiert. Je 150 µl (100 µl) des Transformationsansatzes wurden auf 150 mm (100 mm) Selektionsnährmedien ausplattiert. Parallel wurde eine dekadische Verdünnungsreihe des Transformationsansatzes angelegt und zur Bestimmung der Transformationseffizienz ebenfalls auf geeigneten Selektionsnährmedien ausplattiert.

Die Medienplatten wurden dann bei 30°C inkubiert, bis ein Koloniewachstum beobachtet werden konnte (7-14 Tage).

#### **4.7.2.3 Isolation von Plasmid-DNA aus *S.cerevisiae***

Um die Plasmid-DNA aus den gewachsenen Hefekolonien wieder zu isolieren, wurden zunächst Flüssigkulturen (3ml) der verschiedenen Hefekolonien in SD-QDO (quadruple-dropout)-Medium mit 1 mM 3AT angesetzt. Nach Kultivierung über 2 Tage bei 30°C wurde ein Aliquot der Zellen zum Anlegen von Glycerinstammkulturen verwendet. Die restlichen Zellen wurden bei 20.000 x g in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Danach wurden mit Hilfe des Zymoprep II Yeast Plasmid Minipreparation Kit (Zymo Research) die Plasmide isoliert und lagen abschließend in 10 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst vor. Da Plasmide in Hefen nur in geringerer Kopiezahl je Zelle vorliegen, konnte die so isolierte DNA nicht mit den gängigen Methoden untersucht werden. Deshalb musste sie zunächst wieder in den Stamm *E.coli* (DH5α) transformiert und amplifiziert werden, damit eine angemessene Menge für Agarosegelelektrophorese, Restriktionsverdau und schließlich Sequenzierung zur Verfügung stand.

#### **4.7.2.4 Verpaarung von Hefezellen**

Die Verpaarung der unterschiedliche Vektoren tragenden Hefestämme AH109 und Y187 erfolgte im Mikrotiterplattenformat. Dazu wurde je gewünschter Verpaarung 160 µl YPD-Medium in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten gefüllt und 20 µl einer frischen Hefezellsuspension beider Stämme zupipettiert. Die frische Hefezellsuspension wurde durch Lösen einer Hefekolonie in 1 ml YPD-Medium hergestellt. Die Mikrotiterplatten wurden danach bei 30 °C für 16 Stunden auf einem Plattformschüttler bei 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden je 100 µl der verschiedenen Kulturen auf geeigneten Selektionsmedien ausplattiert.

### **4.7.3 Protein-Techniken**

#### **4.7.3.1 Proteinbestimmung**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die BCA Methode (Smith et al., 1985) verwendet. Die Bestimmung wurde in 96-Loch-Mikrotiterplatten mit je 20 µl Probenvolumen /

Vertiefung durchgeführt. Neben den untersuchten Proben wurden bei jeder Bestimmung der Leerwert sowie verschiedene Verdünnungen einer BSA-Standardlösung (50 – 800 µg/ml) in 0,4% Triton X-100-Lösung mitgeführt, um die jeweilige Standardgerade zu ermitteln. Anschließend wurden je Vertiefung 200 µl einer Mischung der Lösungen A und B im Verhältnis 50:1 zugegeben und für 30 Minuten bei 60°C inkubiert. Die Mikrotiterplatten wurden anschließend für 10 Minuten gekühlt und die Extinktion bei 550 nm in einem Mikrotiterplattenlesegerät bestimmt. Anhand der mitgeführten BSA-Konzentration wurde eine Standardgerade ermittelt und durch lineare Regression die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt.

#### **4.7.3.2 SDS-PAGE**

Die SDS-PAGE (sodiumdodecylsulfate 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 Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gekühlt und auf vorbereitete, 0,75 mm dicke Gele, bestehend aus einem 3,75 %igem Sammelgel und einem 8-12%igem Trenngel, aufgetragen. Als Größenstandard diente entweder der LMW-Marker (GE-Healthcare) oder die PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas). Die Elektrophorese erfolgte in der Mini Protean II Elektrophorese-Kammer (BioRad) mit 1-fach Lauffpuffer zunächst bei 80V. Nachdem die Proben das Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 160 V erhöht, bis die Lauffront das Gelende erreicht hatte.

#### **4.7.3.3 Western-Blot und Chemolumineszenzdetektion**

Mittels Western Blot wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus der SDS-PAGE im Semi-Dry-Verfahren auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Dazu wurde das Trenngel vom Sammelgel getrennt und in Transferpuffer gelagert. Gleichzeitig wurden vier Schichten vorbereitetes Filterpapier (Whatman) in Transferpuffer getränkt und auf der Anodenfläche einer TransBlot SD-Kammer (Biorad) luftblasenfrei aufgelegt. Anschließend wurden die Nitrozellulosemembran und das Trenngel in definierter Orientierung aufgelegt und zum Abschluss wieder vier Lagen Filterpapier darüber geschichtet. Nach Auflage der Kathode wurde mit einer konstanten Stromstärke von 0,3 A / Gel für 45 Minuten geblottet. Abschließend wurde die Nitrozellulosemembran für 2 Minuten in Ponceau S-Lösung angefärbt und dann mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen, um die Übertragung der Proteine zu überprüfen. Gegebenenfalls wurde die Nitrozellulosemembran zerschnitten, um eine Inkubation mit verschiedenen Antikörpern zu ermöglichen. Im Anschluss daran wurde die Membran, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, für eine Stunde in Magermilchlösung inkubiert. Die Behandlung mit dem jeweiligen Erstantikörper erfolgte in Antikörperlösung über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde je viermal 15 Minuten mit Magermilchlö-

sung gewaschen und die Membran mit Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Zweitantikörper in Antikörperlösung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde fünfmal 10 Minuten mit TS-T-Puffer und abschließend zweimal 5 Minuten mit TS-Puffer gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Inkubation des Blots mit ECL-Lösung und anschließender Exposition eines Fotofilms (GE Healthcare) in einer Filmkassette. Die Entwicklung des Fotofilms erfolgte vollautomatisch in der Cura 60 (AGFA).

#### **4.7.3.4 Gewinnung von Proteinproben aus Hefezellen**

Für die Aufarbeitung von Hefeproteinen wurde der Yeast Protein Kit der Firma Zymo Research eingesetzt. Dazu wurden 500 µl einer frisch gewachsenen Hefekultur bei 5.000 x g in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und gemäß Herstellerangaben mit Zymolyase und Lysepuffer inkubiert. Für die SDS-PAGE wurden die Proben abschließend direkt mit 4x-Probenpuffer versetzt.

#### **4.7.3.5 Gewinnung von Proteinproben aus Zelllinien**

Zur Gewinnung von Proteinproben aus Zelllinien wurden fünf 100 mm Schalen der gewünschten Zelllinien bis zur Konfluenz kultiviert. Danach wurden die Zellen geerntet (siehe 4.7.4.1) und in 1 ml Homogenisierungspuffer mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und in einem Kugelhomogenisator (EMBL) aufgeschlossen. Das so gewonnene Lysat wurde direkt mit dem SDS-Ladepuffer vermischt. Alternativ wurde das Zellysate bei 1.000 x g zentrifugiert um größere Zellbruchstücke zu entfernen, der verbliebene Überstand für 30 Minuten bei 360.000 x g und 4 °C. Das gewonnene Pellet wurde in Homogenisierungspuffer resuspendiert und mit entsprechender Menge 4x-SDS-Probenpuffer gemischt. Für die SDS-PAGE wurden 5-15 µl aufgetragen.

#### **4.7.3.6 Fluoreszenznachweis von Proteinen**

Zum Anfärben intrazellulärer Proteine mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper bzw. zum Nachweis GFP-markierter Proteine, wurde wie folgt vorgegangen. Die Zellen wurden wie üblich in 100 mm Zellkulturschalen, denen Deckgläschen zugegeben wurden, ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die bewachsenen Deckgläschen herausgenommen und zweimal mit je 2 ml PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung in 4 % Paraformaldehydlösung für 20 Minuten. Nach der Fixierung wurden die Zellen zweimal mit je 2 ml PBS gewaschen.

Zum Nachweis GFP-markierter Proteine wurden die Deckgläschen dann für 5 Sekunden in ddH<sub>2</sub>O gespült und nach gründlicher Entfernung des Wassers auf Objektträger verbracht. Dazu wurden kurz vorher für jedes Deckgläschen 10 µl Mowiol auf den Objektträger pipettiert und die Deckgläschen luftblasenfrei aufgelegt.

Für den Nachweis durch fluoreszenzmarkierte Antikörper wurden die Deckgläschen nach dem Waschen für 60 Minuten in Blocklösung inkubiert und danach mit dem Erstantikörper in Blocklösung entweder für 90 Minuten bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde zweimal für 10 Minuten mit PBS gewaschen und die Deckgläschen für 90 Minuten mit fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurde zweimal mit 2 ml PBS gewaschen, 5 Sekunden in ddH<sub>2</sub>O gespült und die Deckgläschen mit Mowiol auf einem Objektträger befestigt. Bis zur mikroskopischen Analyse wurden die Objektträger bei 4 °C und vor Licht geschützt aufbewahrt.

#### **4.7.4 Zellkulturarbeiten**

##### **4.7.4.1 BON und CHO-Zellen**

BON- und CHO-Zellen wurden auf 100 mm Schalen bzw. in Mikrotiterplatten ausgesät und bis zur Semikonfluenz bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Zum Umsetzen wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 5 ml PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml (1:10) Trypsin-Lösung behandelt. Diese wurde sofort abgesaugt und die Zellen für 2 min in den Brutschrank gestellt. Danach wurden die Zellen mit 1 ml PBS von der Platte gespült und bei 1300 x g für 2 min zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 1 ml Medium aufgenommen und entsprechend der gewünschten Dichte ausgesät.

##### **4.7.4.2 PC12-Zellen**

PC12-Zellen wurden auf 100 mm Schalen, die zuvor mit Kollagen beschichtet wurden ausgesät und bis zur Konfluenz bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Die Kollagenbeschichtung der 100 mm Zellkulturschalen erfolgte über Nacht mit 3 ml einer Kollagenlösung unter der Sterilbank.

Zum Umsetzen wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 5 ml PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml (1:10) Trypsin-Lösung behandelt. Diese wurde sofort abgesaugt und die Zellen für 2 Minuten in den Brutschrank gestellt. Danach wurden die Zellen mit 1 ml PBS von der Platte gespült und bei 1.300 x g für 2 min zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 1 ml Medium aufgenommen und entsprechend der gewünschten Dichte ausgesät.

##### **4.7.4.3 Einfrieren von Zellen**

Zum Einfrieren adhärent wachsender Zellen wurde das Medium entfernt und mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml (1:10) Trypsin-Lösung behandelt. Diese wurde sofort abgesaugt und die Zellen für 2 min in den Brutschrank gestellt. Danach

wurden die Zellen mit 1 ml PBS von der Platte gespült und bei 1.300 x g für 2 min zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde dann in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und zu je 500 µl in Kryoröhrchen gefüllt. Die Zellsuspension wurde dann mit 500 µl einer Einfrierlösung versetzt, die tropfenweise und unter Schwenken des Kryoröhrchens zugegeben wurde. Die Kryoröhrchen wurden über Nacht in Isopropanol bei -80°C gelagert und am darauffolgenden Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

#### **4.7.4.4 Auftauen von Zellen**

Die Zellen wurden schnell im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Danach wurden die Zellen bei 80 x g für 4 Minuten abzentrifugiert und in einer 100 mm Kulturschale ausgesät.

#### **4.7.4.5 Generierung stabil transfizierter CHO-Zelllinien**

CHO-Zellen wurden unter Standardbedingungen in 6-Loch-Mikrotiterplatten bis zur Semikonfluenz kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, einmal mit 2 ml PBS gewaschen und die Zellen mit 400 µl Optimem für 1 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Gleichzeitig wurden 0 µg, 1 µg bzw. 2 µg Vektor-DNA mit 100 µl Optimem versetzt und mit 100 µl einer Lipofectamin/Optimem Lösung (50 µl Lipofectamin / ml Optimem) für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden weitere 200 µl Optimem zugegeben und jeweils der Gesamtansatz von 400 µl zu den Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben.

Die CHO-Zellen wurden dann für 4 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> weiterkultiviert. Danach wurde je Vertiefung 800 µl Standard CHO-Medium zugegeben und unter gleichbleibenden Bedingungen inkubiert.

Nach 48 Stunden wurde das Medium gegen ein Standard-CHO-Medium mit 400 µg / ml Geneticin ausgetauscht und die Zellen ca. 1 Woche mit täglichem Mediumwechsel weiterkultiviert, bis alle nicht-transfizierten Zellen abgestorben waren. Die verbliebenen Zellen wurden dann vereint, auf eine Zellkonzentration von ca. 1-2 Zellen / 100 µl Medium eingestellt und in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte (100 µl / Vertiefung) ausgesät. Wachsende Zellklone wurden bis zur Konfluenz kultiviert und mittels größerer Mikrotiterplatten (48-Loch und 24-Loch Mikrotiterplatten) expandiert, bis ausreichend Zellen für weitere Untersuchungen und zum Einfrieren zur Verfügung standen.

### **4.7.5 Neurotransmitteraufnahmetests**

#### **4.7.5.1 Subzelluläre Fraktionierungen**

Zur Präparation von Synaptosomen und synaptischen Vesikeln wurde die Methode von Hell und Jahn (Hell & Jahn, 1998) in modifizierter Form angewandt. Zunächst wurden die Mäuse

mit Ether betäubt und anschließend dekapitiert. Das Gehirn wurde nach Öffnung des Schädeldaches entnommen und sofort in 4 °C kalten Homogenisierungspuffer (5 ml / g Gewebe), der mit Proteaseinhibitorcocktail versetzt wurde, überführt. Anschließend wurde das Gehirn in einem Wheaton-Homogenisator zehnmal bei 900 rpm homogenisiert (Homogenat) und dann bei  $1.400 \times g_{\max}$  für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der so gewonnene Überstand (Supernatant 1; S1) bei  $14.000 \times g_{\max}$  für 15 Minuten zentrifugiert und das Pellet (P2), das die Synaptosomen enthält, gewonnen. Diese Synaptosomenpräparation wurde für Versuche in 1 ml Natriumpuffer aufgenommen oder durch Zugabe eines zehnfachen Volumens Wasser, das mit Proteaseinhibitoren und 10 mM HEPES (pH 7,4) versetzt war, durch dreimaliges Homogenisieren im Wheaton-Homogenisator bei 2.000 rpm lysiert. Das Lysat wurde danach bei  $29.000 \times g_{\max}$  für 20 Minuten zentrifugiert, um größere Membranfragmente und verbliebene Synaptosomen (LP1) von der im Überstand (LS1) befindlichen Vesikelfraktion zu trennen. Der LS1 wurde dann in einem letzten Zentrifugationsschritt bei  $350.000 \times g_{\max}$  für 30 Minuten zentrifugiert. Das so gewonnene klare Pellet (LP2) enthält synaptische Vesikel. Es wurde mit einer 27G-Kanüle in geeignetem Puffer resuspendiert und für Versuche verwendet.

#### 4.7.5.2 Permeabilisierung von Zellen und Synaptosomen

Die Untersuchung der Neurotransmitteraufnahme an Vesikeln von Zellen und Synaptosomen war auch ohne Vesikelpräparation möglich. Dafür mussten die Zellen bzw. Synaptosomen jedoch mit Hilfe des aus *Streptococcus pyogenes* stammenden porenformenden Toxins Streptolysin O (SLO) permeabilisiert werden. Das ermöglichte die direkte Messung der Neurotransmitteraufnahme ohne Beeinflussung durch die Neurotransmittertransporter der Plasmamembran.

Das Prinzip der Permeabilisierung beruht darauf, dass SLO bei 4 °C in seiner monomeren Form an das Cholesterol der Plasmamembran bindet und durch Erwärmung auf mindestens Raumtemperatur eine Porenbildung (ca.  $\varnothing 12$  nm) induziert wird. Zuvor wurde zur Reduktion von Disulfidbrücken 1 mM Dithiothreitol (DTT) zugegeben. Die Bestimmung der hämolytischen Aktivität des Toxins (HE / ml) erfolgte nach der Methode von Ahnert-Hilger (Ahnert-Hilger et al., 2000).

Die Zellen wurden nach dem Ablösen von den 100 mm Schalen (siehe 4.7.4.1 bzw. 4.7.4.2) in 1 ml PBS gewaschen und dann bei  $1.300 \times g$  für 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einem zehnfachen Volumen KG-Puffer resuspendiert. Danach wurde die Zellsuspension mit  $\sim 50$  HE/ml SLO versetzt und der Ansatz für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei  $1.300 \times g$  für 2 Minuten bei 4°C zentrifugiert und in einem geeigneten Volumen KG-ATP-Puffer resuspendiert. Die mit SLO

versetzten Zellen konnten nun für die Neurotransmitteraufnahme bei 37°C verwendet werden. Dadurch wurde gleichzeitig die Porenbildung induziert.

Mit den in Natrium-Puffer resuspendierten Synaptosomen wurde analog verfahren. Zunächst erfolgte eine Zentrifugation bei 16.000 x g für 2 Minuten. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit zehnfachem Volumen KG-Puffer resuspendiert und ~5000 HE/ml SLO zugesetzt. Danach wurde bei 16.000 x g und 4°C für 2 Minuten zentrifugiert und die Synaptosomen in KG-ATP-Puffer aufgenommen. Die so präparierten Synaptosomen wurden für die Neurotransmitteraufnahmeexperimente genutzt.

#### 4.7.5.3 Monoaminaufnahme in Synaptosomen und Zellen

Die wie unter 4.7.5.2 beschriebenen vorbereiteten Zellen oder Synaptosomen wurden in KG-ATP-Puffer resuspendiert und entweder mit verschiedenen Substanzen (Substrate, Inhibitoren, Aktivatoren) bei 37 °C vorinkubiert und dann zu je 25 µl in Reaktionsgefäße überführt oder direkt zu je 25 µl in verschiedene Reaktionsgefäße pipettiert. Soweit nicht anders angegeben, wurde die Monoaminaufnahme durch Zugabe von je 25 µl KG-ATP-Puffer mit 80 nM [<sup>3</sup>H]-Serotonin bzw 100 nM [<sup>3</sup>H]-Dopamin, 2 µM Ascorbinsäure ohne bzw. mit Zusätzen (wie z.B. Aktivatoren, Inhibitoren oder unmarkiertem Substrat) für 10 Minuten bei 37°C durchgeführt. Die unspezifische Aufnahme bzw. Bindung des [<sup>3</sup>H]-Monoamins wurde in Gegenwart von 6 µM Reserpin ermittelt, das irreversibel an den vesikulären Monoamintransporter (VMAT) bindet und so die spezifische Aufnahme von Serotonin in das Vesikel verhindert. Die Monoaminaufnahme wurde durch Lagern der Proben auf Eis sowie die Zugabe von 500 µl eiskaltem KG-Puffer gestoppt. Anschließend wurden die Proben bei 16.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen und die individuellen Pellets für 20 Minuten mit 0,4% Triton-X100 in H<sub>2</sub>O bei 42°C lysiert. Von dem so erhaltenen Lysat wurde eine definierte Menge abgenommen, mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Beckman Coulter LS 6500 vermessen. Das übrige Lysat jeder Probe wurde für eine Proteinbestimmung verwendet. Die von den Zellen bzw. Synaptosomen aufgenommene Monoaminmenge wurde wie folgt berechnet:

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

$MA_{\text{Monoamin}}$ : Monoaminaufnahme, bezogen auf die Proteinmenge der Probe [pmol / mg]

$m_{\text{Protein}}$  : Proteinmenge der untersuchten Probe [mg]

dpm : Zerfälle pro Minute (1 dpm = 1/60 Bq)

$A_S$  : spezifische Aktivität des tritiierten Monoamins [TBq / mmol]

Die durch Zugabe von Reserpin ermittelte unspezifische Aufnahme wurde von den ermittelten Werten der Neurotransmitteraufnahme subtrahiert. Alle Versuche wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Angaben stellen Mittelwerte und Standardabweichung dar.

#### 4.7.5.4 Monoaminaufnahme in synaptische Vesikel

Für die Messung der Monoaminaufnahme in synaptische Vesikel wurden von den re-suspendierten Pellets (LP2) aus der subzellulären Fraktionierung (siehe 4.7.5.1) je 25 µl in individuelle Reaktionsgefäße (Beckman) überführt. Anschließend wurde die Monoaminaufnahme durch Zugabe eines gleichen Volumens KG-ATP-Puffer mit 80 nM [<sup>3</sup>H] Serotonin bzw. 100 nM [<sup>3</sup>H] Dopamin und 2 µM Ascorbinsäure ohne bzw. mit Zusätzen gestartet. Wie unter Punkt 4.7.5.3 beschrieben, wurde auch hier die unspezifische Aufnahme durch Zugabe von 6 µM Reserpin ermittelt. Die Inkubation erfolgte für 10 Minuten bei 25°C. Pro Bedingung wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Monoaminaufnahme wurde ebenfalls durch Lagern der Proben auf Eis und die Zugabe von 400 µl eiskaltem KG-Puffer gestoppt. Anschließend wurden die Proben bei 540.000 x g<sub>max</sub> für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Die Pellets wurden dann 20 Minuten mit 0,4% TritonX-100 bei 42°C inkubiert. Von dieser Suspension wurde ein definierter Teil im Beckman Coulter LS 6500 vermessen. Der andere Teil wurde für die Proteinbestimmung verwendet. Die Berechnung der aufgenommenen Monoaminmenge erfolgte wie unter 4.7.5.3 beschrieben.

#### 4.7.6 Versuchstiere

Sowohl der Wildtypstamm 129/SvxC57/BL als auch die isoformspezifischen Go2α-Deletionsmutanten (Dhingra et al., 2002) wurden freundlicherweise von Prof. Lutz Birnbaumer, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, North Carolina, zur Verfügung gestellt. Alle Tiere wurden sowohl im MPI für Molekulare Genetik, Berlin-Dahlem als auch in den Tierställen der Charité (Philipppstr.; Hessische Str.) gezüchtet. Die Go2α-Deletionsmutanten ließen sich untereinander verpaaren. Für Versuche mit heterozygoten Tieren wurden die Deletionsmutanten mit Wildtyp-Mäusen gekreuzt und die Nachkommen (heterozygote Tiere) nach dem Erreichen der Geschlechtsreife untereinander verpaart. Die so generierten Würfe enthielten sowohl Wildtyp- und heterozygote Tiere als auch Go2α-Deletionsmutanten. Für alle Versuche wurden vier bis zwölf Wochen alte Mäuse verwendet. Wurden mehrere Stämme in einem Experiment benötigt, so wurden Tiere gleichen Geschlechts und Alters verwendet.

#### 4.7.7 HPLC-Analytik

##### 4.7.7.1 Aufarbeitung von Zellen

Wie unter Punkt 4.7.4.1 beschrieben, wurden die Zellen nach Wachstum bis zur Konfluenz bzw. Inkubation mit Verbindungen, wie Toxinen, Substraten, Inhibitoren oder Aktivatoren, von den Kulturschalen abgelöst, jedoch fünfmal mit 0,5 ml PBS gewaschen. Danach wurden

die Zellen in einem Gesamtvolumen von 800 µl resuspendiert und je 200 µl Aliquots direkt verwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

#### 4.7.7.2 Präparation von Gehirnregionen

Zur Präparation der verschiedenen Gehirnareale wurden die Mäuse getötet und dekapitiert. Die Gehirne wurden entnommen und auf einer mit Trockeneis gekühlten Aluminiumfolie derart gelagert, dass die Hemisphären auf ihrer Dorsalseite liegen. Die Gehirne wurden einige Minuten auf der Folie gelagert, bis sie durchgefroren waren, und dann bis zur Präparation der verschiedenen Gehirnteile bei -80°C in 50 ml Falcon-Tubes aufbewahrt. Für jede Gehirnregion wurde nach der Präparation das Gewicht bestimmt. Die Präparation der Gehirnregionen erfolgte auf einer Kühlplatte bei -20°C durch Frau Dr. Irene Brunk. Folgende Gehirnregionen konnten präpariert werden: Bulbus olfactorius, Frontalcortex, Septum, Striatum, Hypothalamus, Cerebellum, Corpus amygdaloideum, Parietalcortex, Hippocampus und Hirnstamm. Nach der Präparation wurden die Gehirnareale entweder bei -80°C gelagert oder für die Messung mittels HPLC (high performance liquid chromatography) vorbereitet.

#### 4.7.7.3 Probenvorbereitung für die HPLC

Vor der HPLC-Analyse wurden die Zellen mit dem gleichen Volumen kalter Homogenisierungslösung versetzt. Für Gewebe wurde 10 µl / mg Gewebe der eiskalten Homogenisierungslösung verwandt. Nach Zugabe der Homogenisierungslösung wurde die Probe mit einem Ultraschallstab für 30 Sekunden homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat bei 16.000 x g bei 4°C für 20 Minuten zentrifugiert und der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. Für die Bestimmung von Serotonin konnte die vorliegende Probe jetzt direkt für die HPLC-Analyse verwendet oder musste noch verdünnt werden. Das Probenvolumen betrug 20 µl.

Für die Bestimmung von Katecholaminen war es nötig, vor der Injektion noch eine Extraktion an Aluminiumoxid durchzuführen. Dazu wurde die Probe, je nach geplanter Verdünnung, vor der HPLC-Analyse mit 1/10 Volumen internen Standards Dihydroxybenzylamin (DHBA) gemischt (Endkonzentration während der HPLC-Messung 250 nM bzw. 500 nM) und mit 1 ml 1 % Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (in 1M Tris, pH 8,6) versetzt und für 10 Minuten bei 4°C geschüttelt. Danach wurde das Aluminiumoxid bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge sedimentiert und die Pellets zweimal mit 1 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Pellet in einem geeigneten Volumen 0,2 M Perchorsäure resuspendiert und für 10 Minuten bei 4 °C schütteln d inkubiert. Abschließend wurde zentrifugiert und der Überstand in neue Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Der Überstand wurde dann für die HPLC-Messung verwendet oder zuvor in geeignetem Maße verdünnt. Für die Analyse wurden 20 µl appliziert.

#### 4.7.7.4 Bestimmung von Monoaminen sowie deren Abbauprodukten mittels HPLC-EC

Der Monoamingehalt der Proben wurde mittels HPLC und elektrochemischer Detektion bestimmt. Die Messungen wurden unter den folgenden Bedingungen durchgeführt. Als Säule diente eine 125 mm (Ø 4mm) LiChroCART-Kartusche (Merck), die mit dem Material Purospher STAR (RP-18 endcapped; 5 µm) gefüllt war. Die Säulentemperatur während der Messung betrug 37°C, es wurde eine Flussrate von 1 ml / min eingestellt und für 20 Minuten gemessen. Das am Detektor angelegte Potential betrug + 0,65 V.

Für die Bestimmung von Serotonin (5-HT) und 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) wurde eine mobile Phase, bestehend aus 0,1 M Natriumacetat; 0,1 mM EDTA; 0,35 mM Heptansulfonsäure und 5% (v/v) Methanol (pH 4,5) verwendet. Als Standard wurde nach jedem dritten Probenlauf 20 µl eines Gemisches definierter Konzentrationen von 5-HT und 5-HIAA injiziert.

Für die Bestimmung der Katecholamine wurde eine mobile Phase, bestehend aus 0,1 M Natriumphosphat; 0,1 mM EDTA; 0,75 mM Oktansulfonsäure und 5 % (v/v) Methanol (pH 5,0) verwendet. Als Standard wurde nach jedem dritten Probenlauf ein Gemisch von Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin, Dihydroxyphenylelessigsäure sowie DHBA definierter Konzentration injiziert.

Bei der Bestimmung von Serotonin wurde vor jeder Messung eine Kalibriergerade durch Applikation definierter Konzentrationen einer Standardlösung sowie Applikation von Standardlösungen zwischen den Proben erstellt. Durch lineare Regression wurde dann für die jeweiligen Proben die Konzentration an 5-HT bzw. 5-HIAA berechnet.

Bei der Bestimmung der Katecholamine wurde bei allen Proben der interne Standard Dihydroxybenzylamin mitgeführt. Durch Ermittlung des Kalibrierfaktors von DHBA und den analysierten Katecholaminen konnte so die Konzentration in den einzelnen Proben bestimmt werden. Die dabei genutzten Gleichungen lauten wie folgt:

$$KF_{KA} = (m_{KA} \times A_{DHBA}) / (m_{DHBA} \times A_{KA})$$

$$m_{KAProbe} = KF_{KA} \times A_{DHBAProbe}$$

$KF_{KA}$	: Kalibrierfaktor des jeweiligen Katecholamins
$m_{KA}$	: Masse des Katecholamins in der Kalibrierlösung
$A_{KA}$	: Fläche des Katecholamin-Peaks der Kalibrierlösung
$m_{DHBA}$	: Masse von DHBA in der Kalibrierlösung
$A_{DHBA}$	: Fläche des DHBA-Peaks der Kalibrierlösung
$m_{KAProbe}$	: Masse des Katecholamins der untersuchten Probe
$A_{DHBAProbe}$	: Fläche des DHBA-Peaks der Probenlösung

Die ermittelte Masse des jeweiligen Monoamins wurde bei der Vermessung von Gehirnarealen auf die Masse des untersuchten Gewebes, bei Zellen auf die Proteinmenge der jeweiligen Probe bezogen.

#### **4.7.8 Versuchsdurchführung und -auswertung**

Alle biochemischen Experimente wurden, falls nicht anders angegeben, dreimal wiederholt. Für einzelne Meßwerte wurden dabei jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die in Kapitel 5 angegebenen Daten zeigen die Mittelwerte repräsentativer Einzelexperimente. Die Fehlerbalken der ermittelten Messwerte stellen die ermittelte Standardabweichung dar. Die Ausnahme bilden hierbei die HPLC- und Verhaltensexperimente, in denen die Fehlerbalken den mittleren Standardfehler widerspiegeln. Signifikante Unterschiede mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  sind mit einem Stern markiert. Für die Untersuchung ob die gemessenen Unterschiede signifikant sind, wurde in allen biochemischen Untersuchungen der Student'sche t-Test für unabhängige Proben verwendet. Die Verhaltensexperimente wurden mittels ANOVA und falls notwendig, mit Duncan's post-hoc-Test analysiert.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Modellsysteme zur Untersuchung der Regulation von VMAT1 und VMAT2 durch heterotrimere G-Proteine

Der Ausgangspunkt für die durchgeführten Untersuchungen war die Beobachtung, dass die Aktivierung heterotrimerer, vesikelassoziierter G-Proteine in Neurotransmitteraufnahmeexperimenten zu einem verminderten Transport von Monoaminen durch VMAT1 und VMAT2 führt. Es stellte sich heraus, dass in neuroendokrinen Zellen und Neuronen die aktivierte  $G\alpha$ -Untereinheit  $Go2\alpha$  (Ahnert-Hilger et al., 1998; Höltje et al., 2000) und in Thrombozyten aktiviertes  $Gq\alpha$  (Höltje et al., 2003) für die Regulation der Neurotransmitteraufnahme verantwortlich ist. Die G-Protein-vermittelte Regulation der Neurotransmitteraufnahme stellt einen in zahlreichen Modellsystemen beobachtbaren Effekt dar, dessen genaue Signaltransduktionsmechanismen aber noch nicht verstanden sind. Wie Untersuchungen an Thrombozyten von Tryptophanhydroxylase-Deletionsmutanten und in mit VMAT2 transfizierten CHO-Zellen zeigten, ist die G-Proteinregulation von der Füllung der Vesikel mit Neurotransmitter abhängig (Höltje et al., 2003; Brunk et al., 2006). Einen Überblick der Modellsysteme und repräsentative Ergebnisse von Neurotransmitteraufnahmeversuchen in den jeweiligen Systemen, zeigt Abbildung 3.

In allen Modellsystemen konnte in Neurotransmitteraufnahmeversuchen durch Zugabe des schwer hydrolysierbaren GTP-Analogons GMP-P(NH)P eine Verminderung der Neurotransmitteraufnahme beobachtet werden. GMP-P(NH)P fixiert  $G\alpha$ -Untereinheiten in ihrem aktivierten Zustand und bestätigt dadurch die Bedeutung von G-Proteinen bei der Neurotransmitterspeicherung. Die ermittelten Daten sind nach Abzug der unspezifischen Bindung des tritierten Neurotransmitters in der Gegenwart von Reserpin zusätzlich als GMP-P(NH)P vermittelte Hemmung in Prozent dargestellt. Dadurch werden die aufgeführten Abbildungen vereinfacht und ein Vergleich verschiedener Proben erleichtert.

Neben der Untersuchung frisch präparierter Vesikel aus dem Gehirn der Maus wurden auch die neuroendokrinen Zelllinien PC12 und BON verwendet, die die für die Synthese und Speicherung von Monoaminen nötigen Enzyme und Transporter exprimieren. PC12-Zellen entstammen einem Phäochromozytom der Ratte (Greene & Tischler, 1976), BON-Zellen stammen aus einem humanen Karzinoid des Pankreas (Evers et al., 1991). Beide Zelllinien exprimieren den VMAT1, BON-Zellen, die in einer Mischpopulation vorliegen, zusätzlich auch den VMAT2.

Auch Thrombozyten besitzen alle für die Monoaminspeicherung nötigen Transporter, nicht jedoch die für den Monoaminstoffwechsel nötigen Enzyme. Die Neurotransmitterspeicherung in Vesikeln wird in Thrombozyten durch  $Gq\alpha$  reguliert.

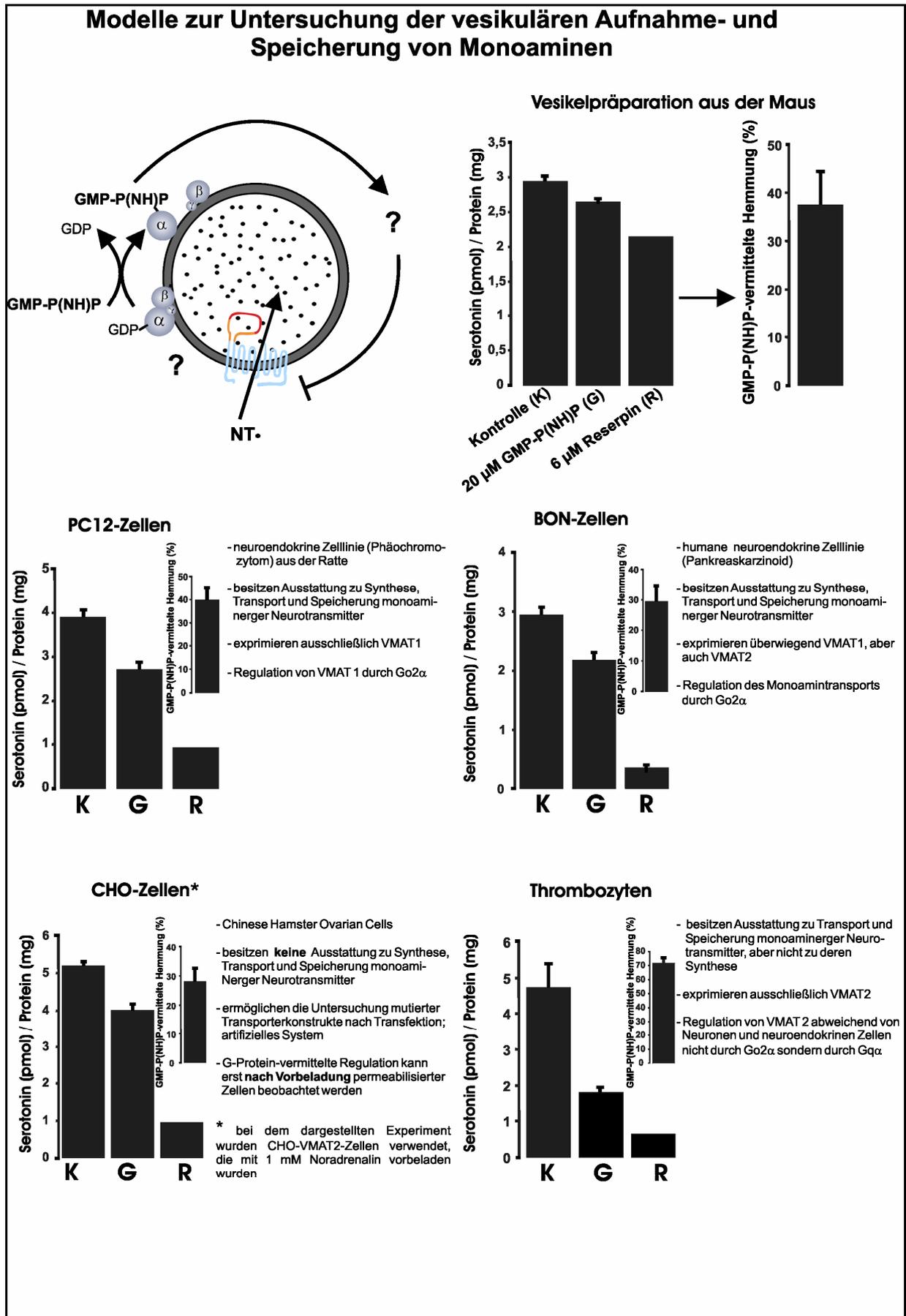


Abbildung 3: Modelle zur Untersuchung der Neurotransmitteraufnahme.

Nach Austausch von GDP gegen das schwer hydrolysierbare GTP-Analogon GMP-P(NH)P werden durch vesikelassoziierte G-Proteine bislang unbekannt Signaltransduktionswege aktiviert, durch die es zu einer verminderten Neurotransmitteraufnahme kommt. *In vitro* kann man diese Effekte durch Neurotransmitteraufnahmeexperimente an synaptischen Vesikelpräparationen der Maus, aber auch an einfacheren Systemen wie neuroendokrinen Zelllinien, transfizierten CHO-Zellen und Thrombozyten untersuchen. Für alle Modellsysteme sind die Ergebnisse von [<sup>3</sup>H]-Serotoninaufnahmeversuchen dargestellt. Je Modell wurden dabei drei Ansätze, bestehend aus je drei Messwerten, eine Kontrolle (ohne Zusätze), eine Probe mit 20 µM GMP-P(NH)P und eine Probe mit 6 µM Reserpin aufgeführt. In allen Modellsystemen kann durch die Zugabe von GMP-P(NH)P eine Reduktion der [<sup>3</sup>H]-Serotoninaufnahme gegenüber der Kontrollbedingung beobachtet werden. Mit der Zugabe von 6 µM Reserpin kann die unspezifische Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Serotonin bestimmt werden. Zieht man diese unspezifische Aufnahme jeweils von den Ergebnissen der Kontrollbedingung und der Aufnahme in Gegenwart von GMP-P(NH)P ab, können diese Ergebnisse auch vereinfacht als GMP-P(NH)P-vermittelte Hemmung dargestellt werden. Dabei setzt man den Wert der [<sup>3</sup>H]-Serotoninaufnahme als 100 % und berechnet die prozentuale Hemmung durch GMP-P(NH)P.

Neben den Diagrammen der repräsentativen Versuchsergebnisse der verschiedenen Modelle werden deren Besonderheiten erläutert.

NT: Neurotransmitter, K: Kontrolle, G: 20 µM GMP-P(NH)P, R: 6 µM Reserpin

Der Einsatz von CHO-Zellen, die auch Go2α exprimieren, ermöglicht durch gezielte Mutagenese und Transfektion die Untersuchung rekombinanter VMAT. Zu berücksichtigen ist dabei, dass eine G-Protein-vermittelte Hemmung der Neurotransmitteraufnahme erst nach Vorbeladung der intrazellulären Kompartimente zu beobachten ist.

## 5.2 Einfluss der ersten intravesikulären Schleife des VMAT2 auf die G-Protein-vermittelte Regulation der Monoamin-speicherung

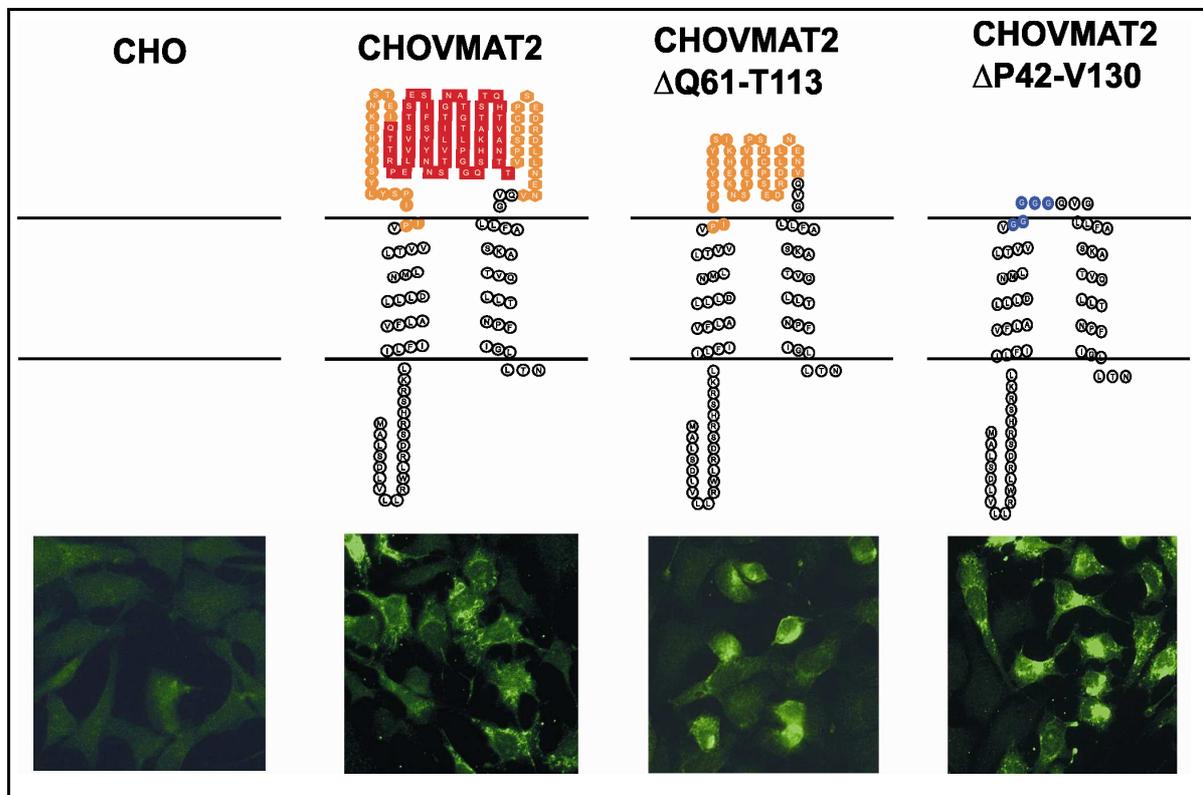
Wie Untersuchungen an Thrombozyten von Tph1-Deletionsmutanten gezeigt haben, ist die Voraussetzung für die G-Protein-vermittelte Hemmung des Monoamintransports der Füllungszustand der Vesikel (Höltje et al. 2003). Es muss also ein vesikulärer Rezeptor existieren, der den intravesikulären Monoaminspiegel detektiert. Es konnte gezeigt werden, dass, im Gegensatz zum VMAT1, die für die VMAT2-Regulation verantwortliche Struktur durch 5HT1B-Agonisten aktiviert und durch 5HT1B-Antagonisten inhibiert werden kann (Brunk et al. 2006). Diese Beobachtungen bestätigten sich auch in CHO-Zellen die mit rVMAT2 transfiziert wurden.

Da CHO-Zellen nicht über die Enzymausstattung verfügen, um Monoamine zu synthetisieren und zu speichern, lässt das die Hypothese zu, dass der VMAT2 selbst an der Messung der intravesikulären Monoaminkonzentration beteiligt ist. Da zwischen VMAT1 und VMAT2 Unterschiede bezüglich der pharmakologischen Charakterisierung der vesikulären Erkennungsstruktur vorliegen, wie die pharmakologische Charakterisierung mit 5HT1B-Agonisten- und Antagonisten gezeigt hat, sollte sich diese rezeptorähnliche Struktur zwischen VMAT1 und VMAT2 unterscheiden.

Ein Proteinsequenzvergleich von VMAT1 und VMAT2 zeigt, dass die am stärksten variablen Regionen im Bereich der ersten großen intravesikulären Schleife zu finden sind. Der Sequenzvergleich dieser Region ist gemeinsam mit einem Modell des VMAT2 in Abbildung 4 dargestellt. Über die Funktion und Bedeutung dieser Schleife für die Transporteraktivität gibt es keine Informationen, sie enthält jedoch fünf potentielle Glykosylierungsstellen.



VMAT2-Konstrukte sowie die Immunfärbung mit Anti-VMAT2-Antikörper ist in Abbildung 5 dargestellt. Dabei zeigte sich, dass die verschiedenen, mutierten VMAT-Konstrukte, wie auch die unveränderten VMAT2, durch den Antikörper erkannt werden und in den stabil transfizierten CHO-Zellen vorliegen.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der ersten luminalen Schleife des rVMAT2 und der mutierten rVMAT2-Konstrukte sowie Nachweis der Proteinexpression in stabil transfizierten CHO-Zellen.

Ausgehend von der cDNA des rVMAT2 wurden VMAT2-Konstrukte hergestellt, denen der zentrale Teil der luminalen Schleife (rot; Aminosäuren Q61-T113) entfernt wurde bzw. bei denen die gesamte luminal Schleife durch fünf Glyzinreste (blau) ersetzt wurde. Mit diesen Konstrukten wurden CHO-Zellen stabil transfiziert. Die Überprüfung der Expression der transfizierten Transportermoleküle erfolgte durch Immunfärbung und ist jeweils darunter dargestellt. Alle diese Arbeiten erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. S. Rachakonda.

### 5.2.2 Die Deletion der ersten intravesikulären Schleife verändert den Monoamintransport in transfizierten CHO-Zellen nicht

Nach Überprüfung der Expression der verschiedenen VMAT2-Konstrukte wurde anschließend deren Funktionalität in Neurotransmitteraufnahmeexperimenten untersucht. In Versuchen mit permeabilisierten CHO-Zellen, die mit Wildtyp- oder mutiertem VMAT2 transfiziert waren, zeigte sich unter identischen Reaktionsbedingungen eine gleichmäßige [<sup>3</sup>H]-Serotoninaufnahmerate von 4-5 pmol / mg Protein (Abbildung 6). Weitere [<sup>3</sup>H]-Serotoninaufnahmeexperimente mit ansteigenden Konzentrationen nichtmarkierten Serotonins wurden zur Ermittlung der K<sub>M</sub>-Werte der verschiedenen Transporterkonstrukte durchgeführt. Die Kinetiken dafür sind in Abbildung 6 aufgeführt. Aus den Kinetiken wurde mittels nichtlinearer Regression durch Einsatz der Software GraphPadPrism der K<sub>M</sub>-Wert berech-

net. Für den VMAT2 und VMAT2 $\Delta$ P42-V130 wurden vergleichbare  $K_M$ -Werte von 13 bzw. 12  $\mu$ M ermittelt. Der  $K_M$ -Wert für VMAT2 $\Delta$ Q61-T113 war mit 6  $\mu$ M leicht erniedrigt.

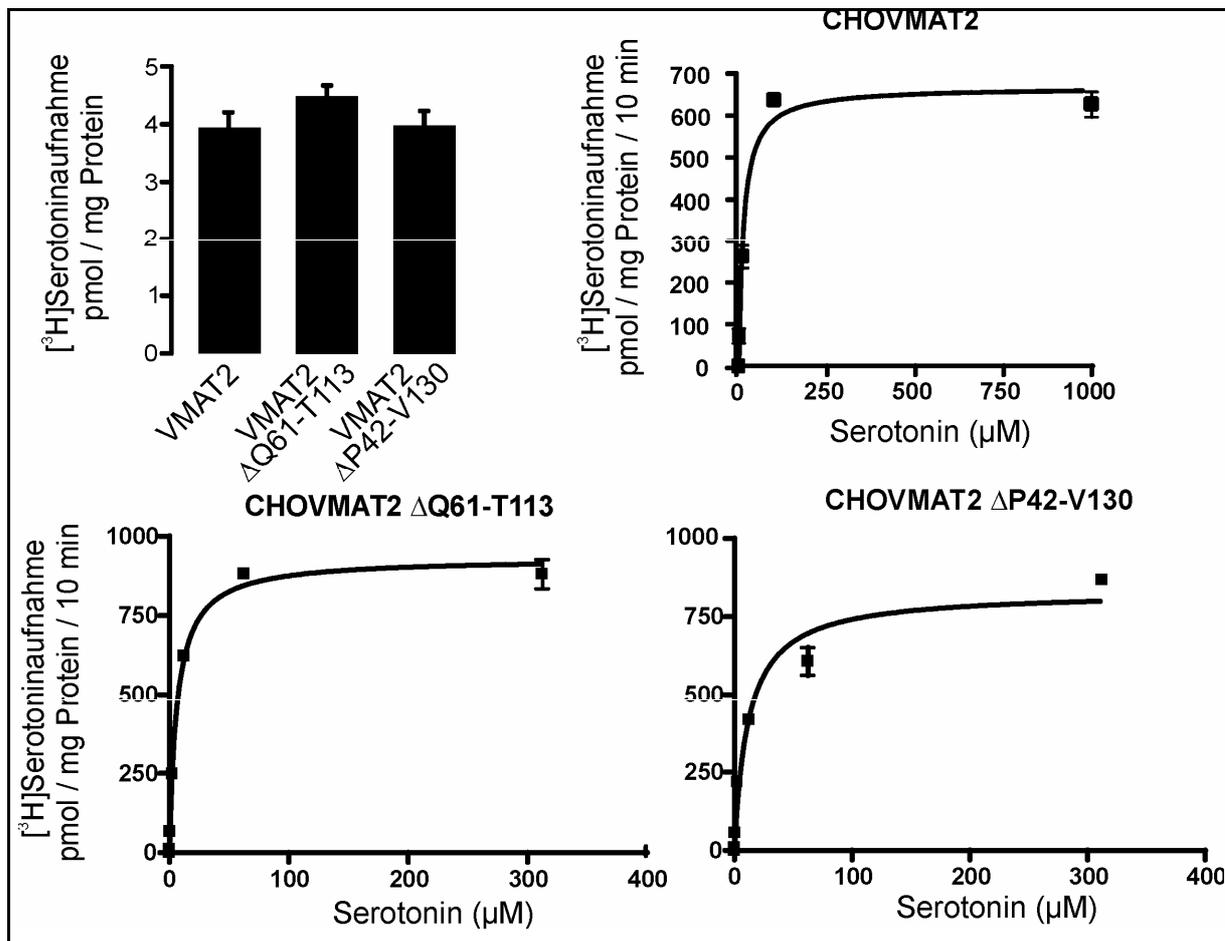


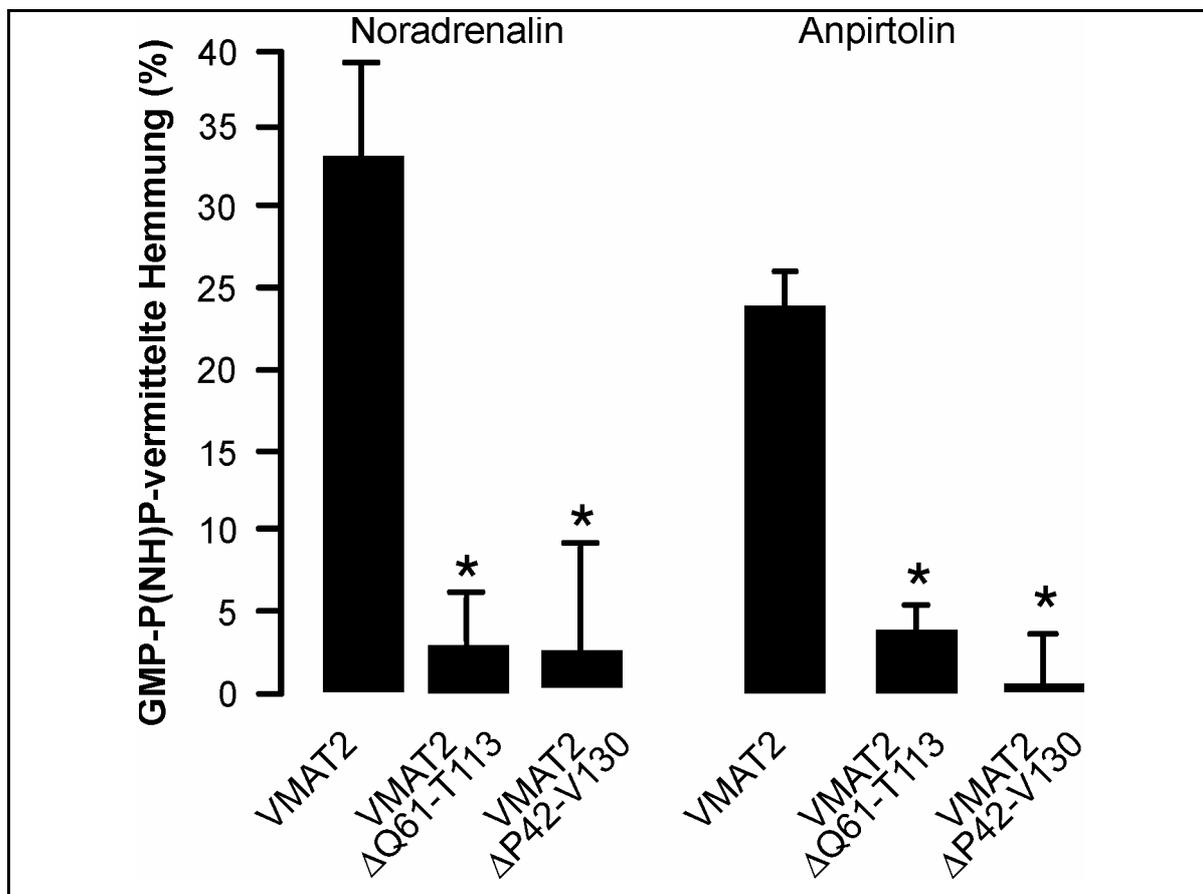
Abbildung 6: Kinetik des Serotonintransports von CHO-Zellen die mit VMAT2-cDNA bzw. mutierten VMAT2-cDNA-Konstrukten transfiziert sind.

Stabil transfizierte CHO-Zellen wurden permeabilisiert und die Serotoninaufnahme für 10 Minuten bei 37°C untersucht. Für die verschiedenen transfizierten Zelllinien war eine gleichmäßige  $[^3\text{H}]$ -Serotoninaufnahme zu beobachten. In Folgeexperimenten wurden bei der  $[^3\text{H}]$ -Serotoninaufnahme steigende Mengen nichtmarkierten Serotonins zugesetzt, um die für die Kinetiken höheren Konzentrationen einzustellen. Die Kinetiken wurden mit der GraphPadPrism Software ausgewertet. Die dabei bestimmten  $K_M$ -Werte lagen im Bereich von 6 - 13  $\mu$ M.

### 5.2.3 Die Deletion der ersten intravesikulären Schleife des VMAT2 führt in CHO-Zellen zu einem Verlust der Regulation durch G-Proteine

Um zu überprüfen, ob sich die Deletion der ersten intravesikulären Schleife auf die G-Protein-vermittelte Regulation des Monoamintransports auswirkt, wurden die verschiedenen transfizierten VMAT-Zelllinien nach Permeabilisierung der Plasmamembran mit 1 mM Noradrenalin vorinkubiert, um die intrazellulären Strukturen mit Monoaminen zu füllen. Alternativ erfolgte die Inkubation mit 500 nM Anpirtolin, einem 5HT1B-Rezeptoragonisten. Für beide Substanzen war bekannt, dass sie in CHO-Zellen die G-Protein-vermittelte Hemmung induzieren. Anschließend wurde die vesikuläre Serotoninaufnahme in An- und Abwesenheit von GMP-P(NH)P bestimmt. Die induzierte Hemmung ist in Abbildung 7 auch bei CHO-Zellen zu beobachten, die mit der Wildtyp VMAT2 cDNA transfiziert waren. Hingegen ist in

Zellen, die mit VMAT2 $\Delta$ Q61-T113 bzw. VMAT2 $\Delta$ P42-V130 transfiziert waren, diese G-Protein-vermittelte Regulation nicht mehr oder nur sehr schwach ausgeprägt.



**Abbildung 7:** GMP-P(NH)P-vermittelte Hemmung der Serotoninaufnahme in permeabilisierten CHO-Zellen, die mit verschiedenen rVMAT2-Konstrukten transfiziert sind.

Stabil transfizierte CHO-Zellen wurden permeabilisiert und für 10 Minuten bei 37°C mit 1 mM Noradrenalin bzw. 500 nM des 5HT1B-Agonisten Anpirtolin inkubiert. Anschließend wurde die Serotoninaufnahme mit und ohne 100  $\mu$ M GMP-P(NH)P durchgeführt. Die Serotoninaufnahme ohne GMP-P(NH)P wurde als 100 % festgelegt, die durch GMP-P(NH)P verursachte prozentuale Hemmung ist dargestellt.

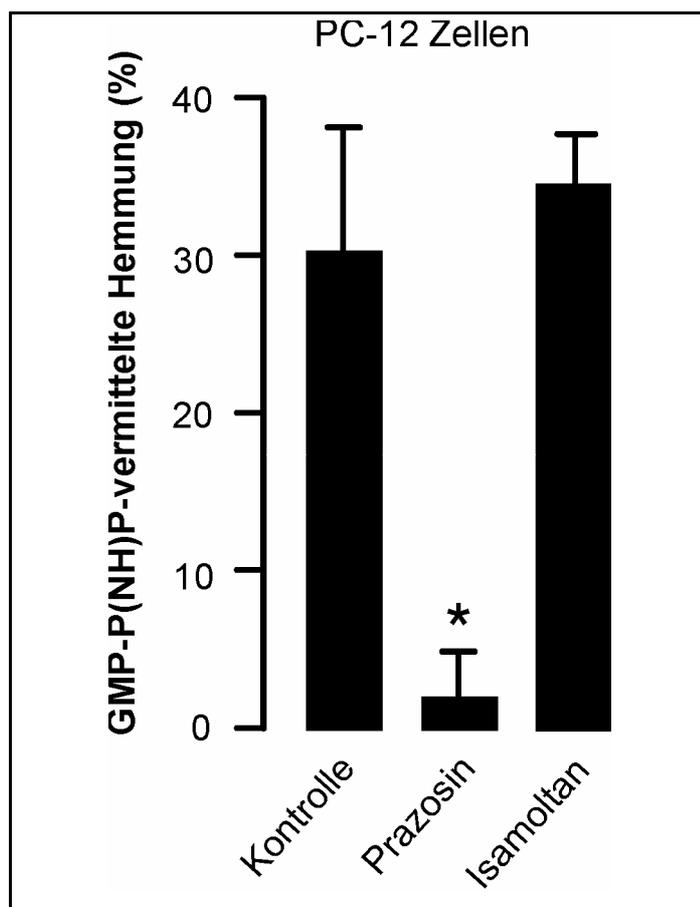
Die durch eine GMP-P(NH)P vermittelte Hemmung nach Vorinkubation mit 1 mM Noradrenalin bzw. 500 nM Anpirtolin ist in mit Wildtyp-VMAT2-DNA transfizierten Zellen deutlich. CHO-Zellen, die mit mutierter VMAT2-cDNA transfiziert sind, zeigen nach der Vorinkubation keine bzw. nur eine geringe GMP-P(NH)P vermittelte Hemmung.

### 5.3 Die intravesikuläre Erkennungsstruktur des VMAT1

#### 5.3.1 Eine $\alpha$ 1-Rezeptor-ähnliche Struktur reguliert die Monoaminspeicherung durch den VMAT1

In Anlehnung an die Beobachtung, dass eine 5HT1B-Rezeptor-ähnliche Struktur für die Bestimmung des intravesikulären Monoamingehalts im VMAT2-System verantwortlich ist, wurden die zur Verfügung stehenden Systeme CHO-VMAT1-Zellen sowie PC12-Zellen, für die Charakterisierung des VMAT1 untersucht. Untersuchungen in CHO-VMAT1-Zellen, die von Frau Dr. Irene Brunk ausgeführt wurden, zeigten, dass im Gegensatz zu CHO-VMAT2-Zellen nicht eine 5-HT1B-ähnliche, sondern eine  $\alpha$ 1-Rezeptor-ähnliche Struktur an der Bestimmung der intravesikulären Monoaminspiegel beteiligt ist (Brunk et al., 2006). Um die

dabei erzielten Beobachtungen in einem weiteren System zu untersuchen, wurden PC12-Zellen, die ausschließlich den VMAT1 exprimieren, untersucht. Nach der Permeabilisierung wurden die PC12-Zellen mit 500 nM des  $\alpha$ 1-Rezeptorantagonisten Prazosin vorinkubiert. Im darauffolgenden [ $^3$ H]-Serotoninaufnahmetest mit und ohne GMP-P(NH)P konnte nach Prazosin-Vorbehandlung im Gegensatz zu unbehandelten Zellen und solchen, die mit dem 5HT1B-Rezeptorantagonisten Isamoltan behandelt wurden, keine G-Protein-vermittelte Hemmung mehr beobachtet werden (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Effekte des  $\alpha$ 1-Rezeptorantagonisten Prazosin und des 5HT1B-Rezeptorantagonisten Isamoltan auf die GMP-P(NH)P-vermittelte Hemmung der [ $^3$ H]-Serotoninaufnahme in permeabilisierten PC-12 Zellen.

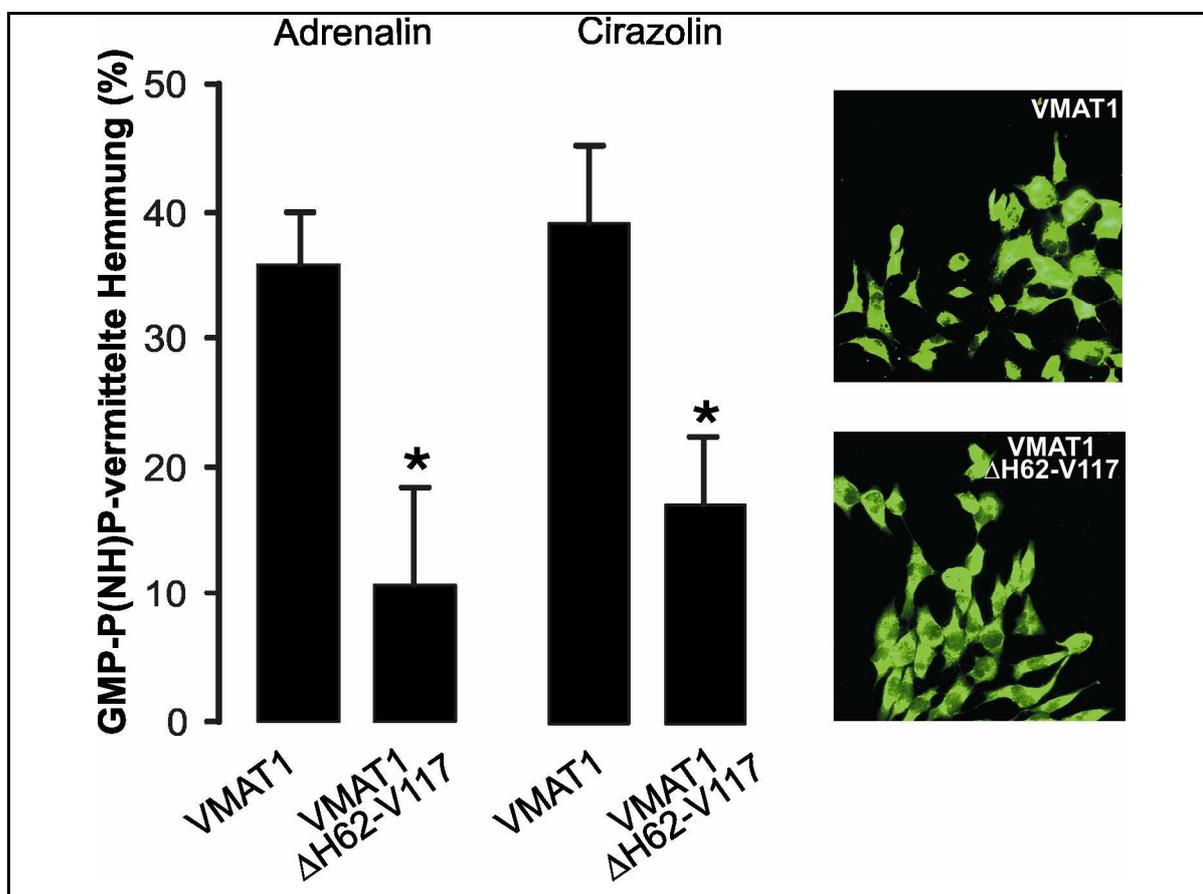
Nach einer Vorinkubation permeabilisierter PC12-Zellen mit 500 nM Prazosin ist im Gegensatz zur Vorinkubation mit 500 nM Isamoltan und zu Kontrollbedingungen keine durch GMP-P(NH)P verursachte Hemmung zu beobachten.

Die Neurotransmitteraufnahme wurde nach zehnmütiger Vorinkubation der permeabilisierten Zellen mit Prazosin bzw. Isamoltan durchgeführt. Die Serotoninaufnahme ohne GMP-P(NH)P wurde als 100% festgelegt, die durch das GTP-Analogon verursachte Hemmung der Neurotransmitteraufnahme in Prozent ist dargestellt.

### 5.3.2 Auch in VMAT1-transfizierten Zellen ist die erste intravesikuläre Schleife an der G-Protein-vermittelten Regulation beteiligt

Um zu überprüfen, ob an der  $\alpha$ 1-Rezeptor-ähnlichen Struktur des VMAT1 auch die erste intravesikuläre Schleife beteiligt ist, wurden wie bei der Untersuchung des VMAT2 (5.2.1), cDNA-Konstrukte des VMAT1 hergestellt, denen Teile der ersten intravesikulären Schleife

fehlen. Für das Konstrukt VMAT1 $\Delta$ H62-V117 wurden CHO-Zellen transfiziert und nach der Selektion und Vereinzelung stabil transfizierte Zelllinien erzeugt. Mittels Immunfluoreszenz konnte die Expression des Konstruktes nachgewiesen werden. Auch in funktionellen Tests der Transporteraktivität konnte eine reserpinsensitive [ $^3$ H]-Serotoninaufnahme beobachtet werden, die allerdings um den Faktor vier kleiner war, als bei vergleichbaren Wildtypkonstrukten. Nach Vorbeladung permeabilisierter Zellen und Vorinkubation mit 1 mM Adrenalin bzw. 500 nM des  $\alpha$ 1-Rezeptoragonisten Cirazolin war in mit VMAT1 transfizierten Zellen eine G-Protein-vermittelte Hemmung zu beobachten. Das war auch bei den VMAT1 $\Delta$ H62-V117-Konstrukten zu erkennen, im Vergleich mit CHO-VMAT1-Zellen allerdings in einem signifikant geringeren Ausmaß (Abbildung 9). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass auch bei VMAT1 die erste intravesikuläre Schleife an der G-Protein-vermittelten Regulation beteiligt ist.



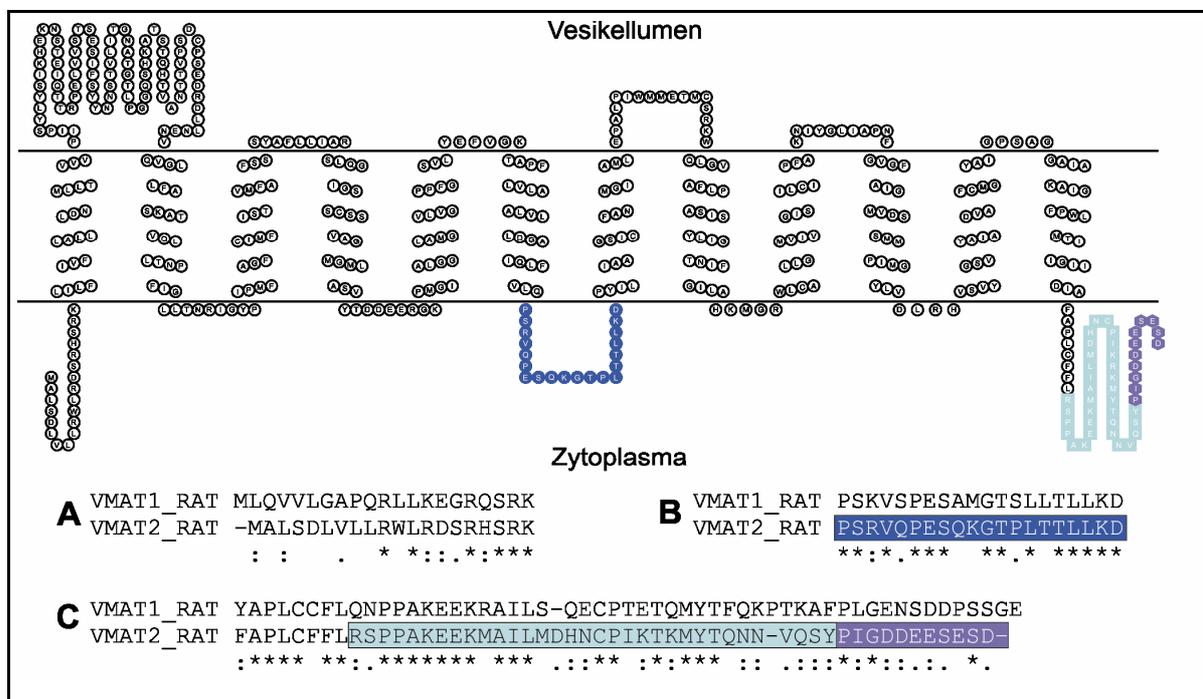
**Abbildung 9:** GMP-P(NH)P-vermittelte Hemmung der Serotoninaufnahme in permeabilisierten CHO-Zellen, die mit verschiedenen rVMAT1-Konstrukten transfiziert sind.

Mit rVMAT1 und mutierter VMAT1-cDNA stabil transfizierte CHO-Zellen wurden permeabilisiert und für 10 Minuten mit 1 mM Adrenalin bzw. 500 nM des  $\alpha$ 1-Agonisten Cirazolin inkubiert. Anschließend wurde die Serotoninaufnahme mit und ohne GMP-P(NH)P gemessen. Die Serotoninaufnahme ohne GMP-P(NH)P wurde als 100 % festgelegt, die durch GMP-P(NH)P vermittelte Hemmung in Prozent ist dargestellt.

Die durch GMP-P(NH)P vermittelte Hemmung in CHO-Zellen mit mutierten VMAT1-Konstrukten ist nach der beschriebenen Vorbehandlung gegenüber Wildtyp rVMAT1-Zellen deutlich reduziert. Die Expression der Transportermoleküle wurde durch Immunfärbung nachgewiesen.

## 5.4 Zytoplasmatische Strukturen des VMAT2 die an der Signaltransduktion beteiligt sein könnten

Wie die vorangegangenen Untersuchungen zeigten, besitzen der VMAT2 und auch der VMAT1 eine rezeptorähnliche Struktur, die in das Vesikellumen ragt und nach Aktivierung durch intravesikuläre Monoamine zu einer Aktivierung der  $Go2\alpha$ -Untereinheit führt. Ob diese Aktivierung direkt durch den VMAT ausgelöst wird oder andere Signalmoleküle dazwischengeschaltet oder zusätzlich daran beteiligt sind, ist unklar. In einem nächsten Schritt sollte deshalb überprüft werden, ob zytoplasmatische Anteile des VMAT2 an dieser Signalweiterleitung beteiligt sind. Da VMAT-regulierende Signale beider VMAT-Isoformen durch die gleiche G-Proteinuntereinheit  $Go2\alpha$  vermittelt werden, sollten homologe Bereiche an der Signalweiterleitung ins Zytosol beteiligt sein. Zytoplasmatische Bereiche die einen hohen Grad an Homologie aufweisen sind der N- und C-terminale Anteil der Transporter und die Region zwischen den Transmembrandomänen VI und VII. In einem ersten Ansatz wurden deshalb mutierte cDNA des VMAT2 hergestellt, bei der die Region zwischen den Transmembrandomänen VI und VII durch fünf Glyzinreste ausgetauscht wurde. Bei zwei weiteren Konstrukten wurde der C-terminale Bereich nach der Transmembrandomäne XII (Aminosäuren R472-D515) entfernt oder der mittlere Teil des C-Terminus, die Aminosäuren R472 – Y504 (hellblau, siehe Abbildung 10), deletiert.



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung des rVMAT2 sowie verschiedener Sequenzvergleiche von rVMAT1 und rVMAT2 im N-terminalen Bereich, zwischen Transmembrandomäne 6 und 7 sowie im C-terminalen Bereich.

Da sowohl VMAT1 und VMAT2 an der Signalübermittlung aus dem Vesikellumen beteiligt sind, galt es herauszufinden, welche zytoplasmatischen Bereiche an der Signalweiterleitung beteiligt sein könnten. Die Neurotransmitterspeicherung wird bei beiden Transportern durch  $Go2\alpha$  reguliert. Daher sollten homologe Bereiche für die Signaltransduktion ins Zytosol eher in Betracht kommen. Die farblich markierten Bereiche kennzeichnen

stärker homologe zytoplasmatische Transporterregionen des VMAT2, die mittels Mutagenese ganz oder teilweise entfernt wurden. Die Region zwischen Transmembrandomäne VI und VII (dunkelblau) wurde gegen 5 Glyzinreste substituiert. Der mittlere Teil des C-Terminus (hellblau) wurde einzeln oder in Kombination mit der unmittelbar C-terminalen Region (lila) deletiert. Für die Darstellung des rVMAT2 wurde das Programm TOPO2 verwendet. Der Sequenzvergleich wurde mit der Software Clustal W erstellt; A: N-Terminus; B: Region zwischen Transmembrandomäne VI und VII; C: C-Terminus.

#### 5.4.1 Die Substitution der Aminosäuren P273-D292 durch 5 Glyzinreste führt zum Verlust der Transportaktivität des VMAT2

Wie unter Punkt 5.4 gezeigt, wurden VMAT2 cDNA-Konstrukte hergestellt, bei denen die Aminosäuren P273-D292 der zytoplasmatischen Region zwischen Transmembrandomäne VI und VII gegen 5 Glyzinreste ausgetauscht wurden. Die Konstrukte wurden in CHO-Zellen transfiziert, und nach Vereinzlung wurden stabil transfizierte CHO-Zelllinien selektiert. Die Expression des mutierten VMAT2 konnte mittels Immunfluoreszenz überprüft werden. Im Gegensatz dazu konnte in keinem der 23 untersuchten CHO-Zellklone in [<sup>3</sup>H]-Serotoninaufnahmeexperimenten eine Neurotransmitteraufnahme und -speicherung nachgewiesen werden (Abbildung 11). Gemeinsam mit den Fluoreszenzdaten deutet das darauf hin, dass die Deletion der Aminosäuren P273-D292 zu einem Verlust der Transportaktivität des VMAT2 führt.

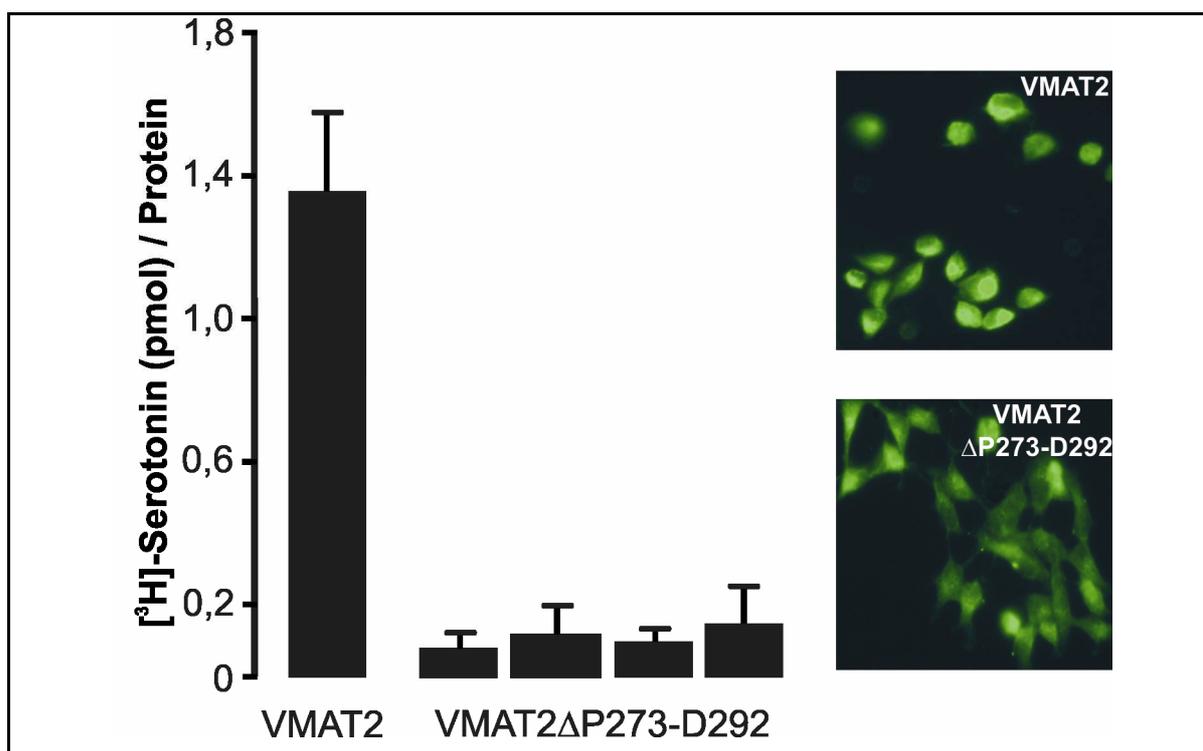


Abbildung 11: Serotoninaufnahme in permeabilisierten CHO-Zellen, die mit rVMAT2 und rVMAT2-Konstrukten transfiziert sind. Bei den veränderten VMAT-Konstrukten wurde der zytoplasmatische Bereich zwischen den Transmembrandomänen 6/7 gegen 5 Glyzinreste substituiert.

Mit rVMAT2 und mutierter VMAT2-cDNA stabil transfizierte CHO-Zellen wurden permeabilisiert und für 10 Minuten die Serotoninaufnahme gemessen. Von den mutierten rVMAT2-Konstrukten sind 4 Klone (von 24) mit der höchsten Neurotransmitteraufnahme abgebildet. Die Expression der Transportermoleküle wurde durch Immunfärbung nachgewiesen.

### 5.4.2 Deletionen im C-terminalen Bereich des VMAT2 beeinflussen die G-Protein-vermittelte Regulation des VMAT2 nicht

Für die Untersuchung C-terminaler Sequenzen wurden mittels PCR und zwei unterschiedlicher Rückwärtsprimer zwei verschiedene cDNAs hergestellt. Mit diesen cDNA-Konstrukten wurden CHO-Zellen stabil transfiziert und durch Immunfluoreszenz und [<sup>3</sup>H]-Neurotransmitteraufnahme tests charakterisiert. Sowohl für CHO-VMAT2 $\Delta$ R472-D515, als auch für CHO-VMAT2 $\Delta$ R472-Y504 konnten Klone identifiziert werden, die in Neurotransmitteraufnahme tests vergleichbare Neurotransmitteraufnahme rates zeigten wie CHO-VMAT2-Zellen. Wurden C-terminal mutierte VMAT exprimierende Zelllinien permeabilisiert und mit Noradrenalin vorbeladen, so zeigten sie in [<sup>3</sup>H]-Serotoninaufnahme tests nach Zugabe von GMP-P(NH)P - wie auch der VMAT2-Wildtyp - eine G-Protein-vermittelte Verminderung der Neurotransmitteraufnahme, die in Abbildung 12 dargestellt ist. Eine Beteiligung des C-Terminus an einer Signaltransduktion aus dem Vesikellumen ist daher unwahrscheinlich.

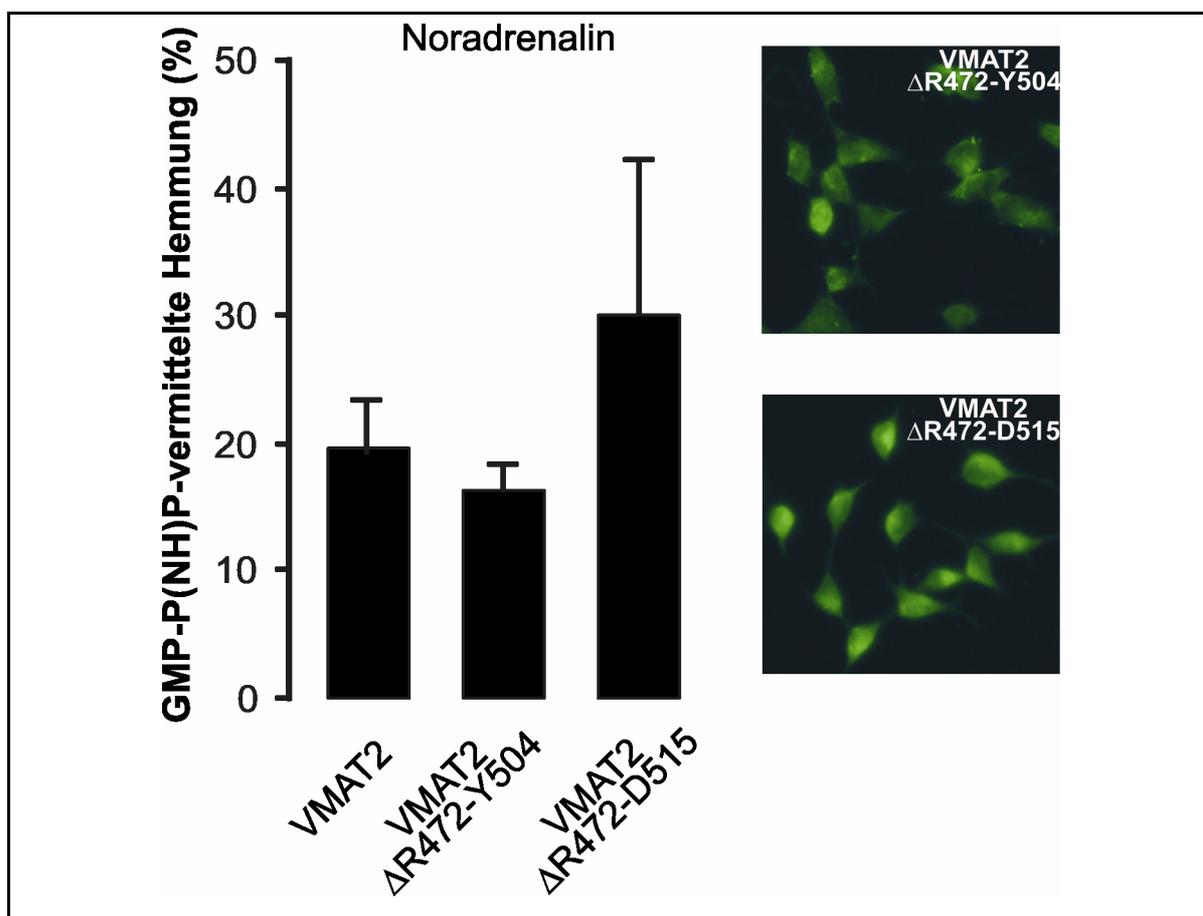


Abbildung 12: GMP-P(NH)P-vermittelte Hemmung der Serotoninaufnahme in permeabilisierten CHO-Zellen, die mit verschiedenen C-terminal veränderten rVMAT2-Konstrukten transfiziert sind.

Mit rVMAT2 und mutierter rVMAT2-cDNA stabil transfizierte CHO-Zellen wurden permeabilisiert und für 10 Minuten mit 1 mM Noradrenalin inkubiert. Anschließend wurde die Serotoninaufnahme mit und ohne GMP-P(NH)P gemessen. Die Serotoninaufnahme ohne GMP-P(NH)P wurde als 100 % festgelegt, die durch GMP-P(NH)P vermittelte Hemmung in Prozent ist dargestellt.

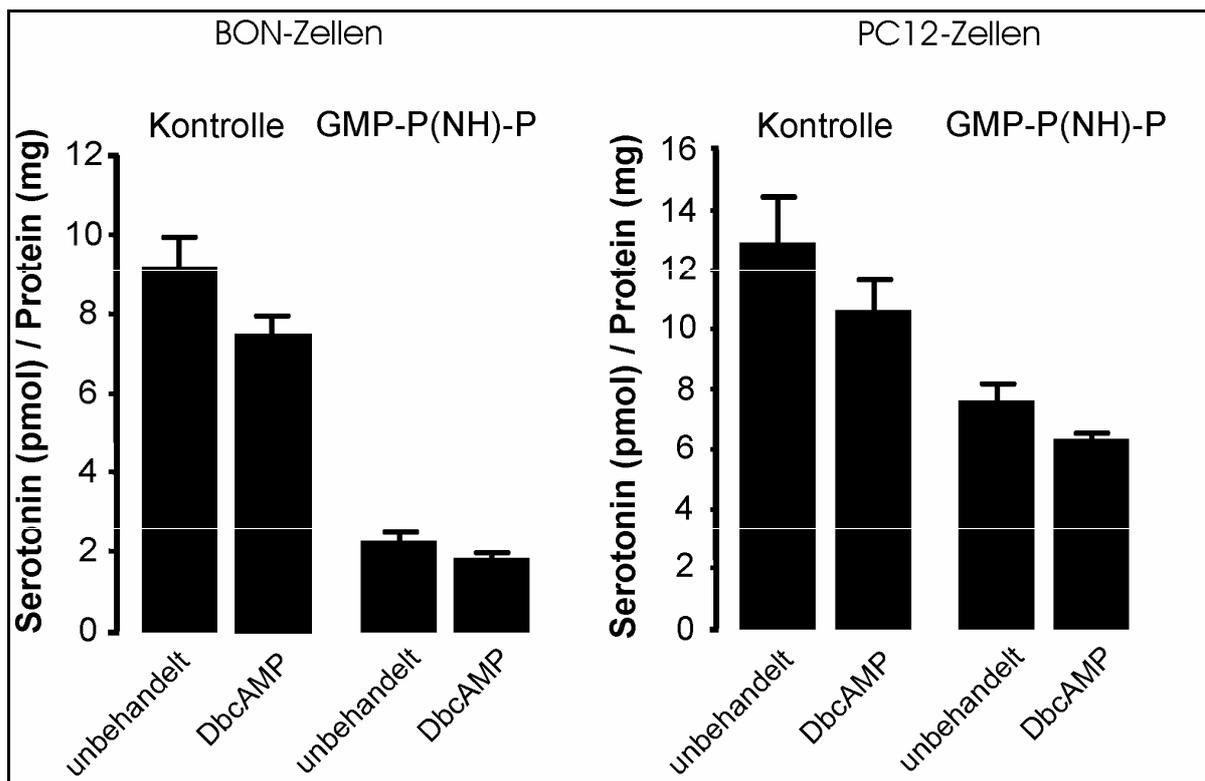
Zwischen C-terminal mutierten und Wildtyp-rVMAT2-Konstrukten konnte kein Unterschied in der durch GMP-P(NH)P vermittelten Hemmung beobachtet werden. Die Expression der Transportermoleküle wurde durch Immunfärbung nachgewiesen.

## **5.5 Nachgeschaltete Signaltransduktionswege der G-Protein-vermittelten Regulation der VMAT**

### **5.5.1 Einfluss von DbcAMP auf die G-Proteinregulation der VMAT**

Durch Untersuchungen an permeabilisierten PC12-Zellen konnten Nakanishi und Kollegen (Nakanishi et al., 1995a, Nakanishi et al., 1995b) zeigen, dass cAMP die vesikuläre Neurotransmitteraufnahme konzentrationsabhängig vermindert. In ersten Versuchen zur Aufklärung der beteiligten nachgeschalteten Signaltransduktionswege sollte deshalb der Einfluss von DbcAMP auf die Serotoninaufnahme sowohl in permeabilisierten BON-Zellen, als auch in permeabilisierten PC12-Zellen, untersucht werden. Gleichzeitig sollte der Einfluss der cAMP-Behandlung auf die G-Protein-vermittelte Regulation der VMAT überprüft werden. Dazu wurden BON bzw. PC12-Zellen für zwei Stunden mit dem membrangängigen cAMP-Analogen DbcAMP (300  $\mu$ M) inkubiert, danach permeabilisiert und ein [ $^3$ H]-Serotoninaufnahmetest durchgeführt.

In beiden neuroendokrinen Zelllinien zeigte sich, dass durch die Vorbehandlung mit DbcAMP die Neurotransmitteraufnahme reduziert wurde. Wie in Abbildung 13 dargestellt ist, konnte die G-Protein-vermittelte Reduktion der Neurotransmitteraufnahme auch nach der DbcAMP-Vorbehandlung beobachtet werden. In neuroendokrinen Zellen scheinen daher cAMP und GMP-P(NH)P die Monoaminaufnahme auf unterschiedliche Weise zu beeinflussen, wodurch ein alleiniger Einfluss des aktivierten G-Proteins auf die Adenylylzyklase ausgeschlossen werden kann.



**Abbildung 13: GMP-P(NH)P- vermittelte Hemmung der Serotoninaufnahme in permeabilisierten BON und PC12-Zellen mit und ohne Vorinkubation mit DbcAMP.**

BON und PC12-Zellen wurden 2 h mit und ohne 300  $\mu$ M DbcAMP in serumfreien Medium inkubiert. Anschließend wurde die Serotoninaufnahme bestimmt.

In BON und PC12-Zellen führte eine Vorinkubation mit DbcAMP zu einer Reduktion der Neurotransmitteraufnahme. Die durch GMP-P(NH)P vermittelte Hemmung bleibt nach DbcAMP-Vorbehandlung bestehen und beträgt wie bei unbehandelten Zellen ca. 75 % (BON-Zellen) und ca. 40 % (PC12-Zellen).

### 5.5.2 Die Überexpression von CAPS1 und CAPS2 steigert die Monoaminaufnahme in CHO-VMAT-Zellen

Ein weiteres Protein, von dem erst kürzlich ein Einfluss auf die Monoaminspeicherung gezeigt werden konnte, ist CAPS1 (calcium-dependent activator protein for secretion). Speidel und Mitarbeiter (Speidel et al., 2005) konnten in CAPS1-Deletionsmutanten zeigen, dass die Granula chromaffiner Zellen weniger gefüllt waren. Das ist auf eine verminderte Speichermöglichkeit zurückzuführen. Daher sollte CAPS1 und eine zweite Isoform CAPS2 in CHO-VMAT1- und CHO-VMAT2-Zellen exprimiert und die Neurotransmitteraufnahme in permeabilisierten Zellen untersucht werden. Dazu wurden CHO-VMAT1 und CHO-VMAT2 Zellen transient mit pcDNA3.1CAPS1IRESEGFP bzw. pcDNA3.1CAPS2IRESEGFP (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Nils Brose, MPI für experimentelle Medizin, Göttingen) transfiziert. Die Expression von CAPS1 und CAPS2 wurde mittels EGFP-Fluoreszenz nachgewiesen. Die Zellen wurden dann mit SLO permeabilisiert und [ $^3$ H]-Serotoninaufnahmetests mit steigenden Konzentrationen nicht-markierten Serotonins unterzogen. Dabei zeigte sich nach transienter Transfektion beider CAPS-Isoformen eine gesteigerte Serotoninaufnahme über einen weiten Konzentrationsbereich - sowohl in CHO-

VMAT1, als auch in CHO-VMAT2-Zellen (Abbildung 14). CAPS-Proteine sind daher ein Faktor, der die Neurotransmitteraufnahme steigern kann.

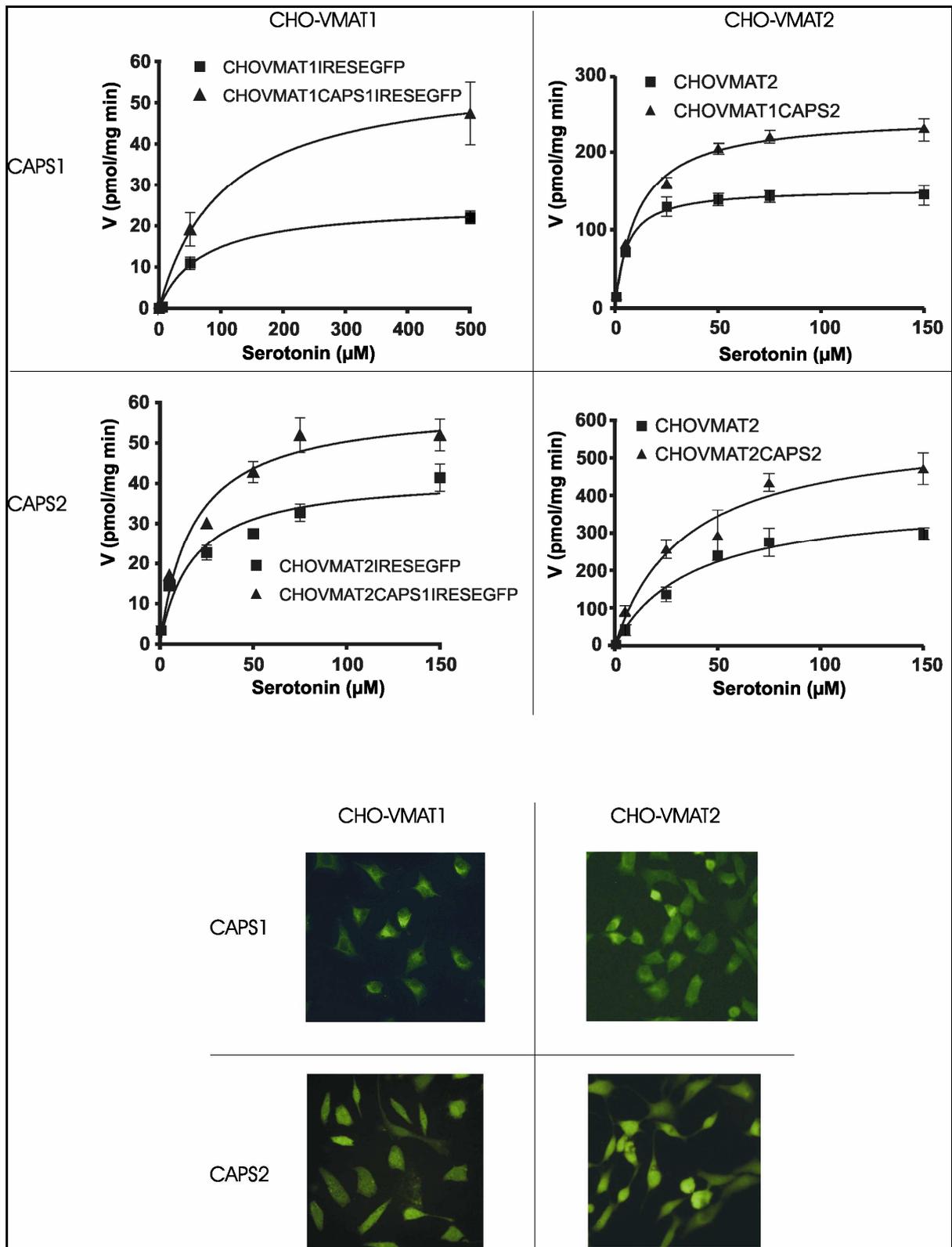


Abbildung 14: Einfluss der transienten Expression von CAPS1 bzw. CAPS2 auf die Neurotransmitteraufnahme in CHO-VMAT1 und CHO-VMAT2-Zellen.

Stabil transfizierte CHO-VMAT-Zellen wurden transient mit CAPS1 bzw. CAPS2 oder zur Kontrolle nur mit EGFP transfiziert. Für die Neurotransmitteraufnahme wurden die Zellen permeabilisiert und die Serotoninaufnahme für 10 Minuten bei 37°C untersucht. [<sup>3</sup>H]-Serotonin wurde mit steigenden Mengen nichtmarkiertem Serotonin gemischt, um die für die Kinetiken höheren Konzentrationen einzustellen. Die Kontrolle der CAPS1- bzw. CAPS2-Expression erfolgte durch Nachweis der EGFP-Färbung.

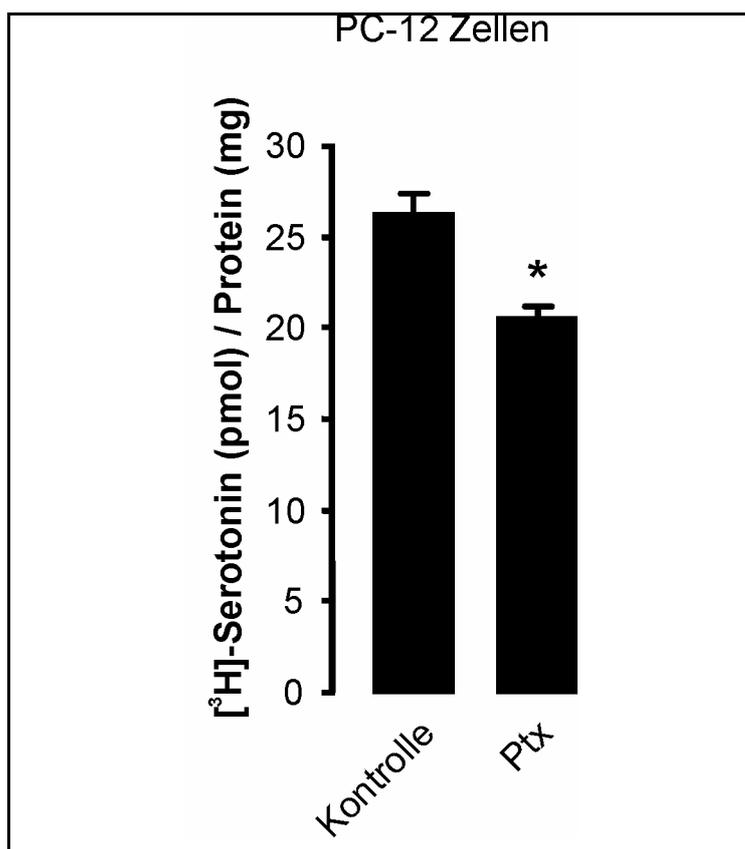
## **5.6 Bedeutung der Regulation des vesikulären Monoamin- transports durch heterotrimere G-Proteine**

### **5.6.1 Die Inaktivierung von Go2 $\alpha$ durch Pertussistoxin führt zu einer Verminderung der Monoaminaufnahme in PC12 Zellen**

Neben der Untersuchung der Signaltransduktionswege, die die Monoaminspeicherung in synaptischen Vesikeln beeinflussen, war ein weiterer zentraler Untersuchungsschwerpunkt, Hinweise für die Relevanz der G-Protein vermittelten Regulation zu finden.

In einem ersten Ansatz sollte daher analysiert werden, inwiefern eine Inaktivierung von Go2 $\alpha$  die Serotoninaufnahme in PC12-Zellen beeinflusst. Die G-Proteinuntereinheit Go2 $\alpha$  sollte durch Behandlung mit Pertussistoxin inaktiviert werden. Bei diesem Toxin handelt es sich um ein Toxin des Bakteriums *Bordetella pertussis*, das durch seine ADP-Ribosyltransferaseaktivität spezifisch die G $\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine der Gi/o Klasse inaktiviert, indem sie in ihrer GDP-gebundenen Form fixiert werden.

Da nach G-Protein-Aktivierung eine Verminderung der Neurotransmitterspeicherung auftritt, wurde erwartet, dass bei der Inaktivierung des G-Proteins eine gesteigerte Neurotransmitteraufnahme beobachtet werden kann. Wie in Abbildung 15 dargestellt, konnte nach 24-stündiger Vorinkubation von PC12-Zellen mit Pertussis-Toxin das Gegenteil - eine verminderte [<sup>3</sup>H]-Serotoninaufnahme - beobachtet werden.



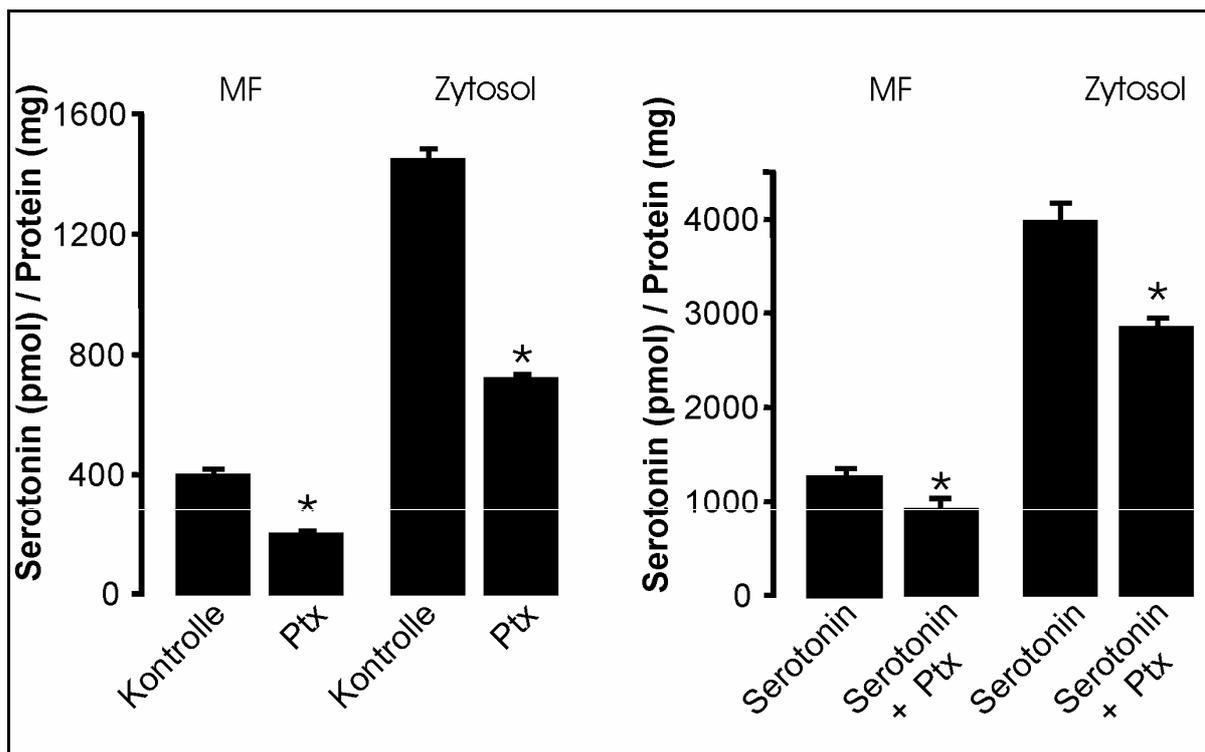
**Abbildung 15:** Serotoninaufnahme in permeabilisierten PC12-Zellen nach Vorinkubation mit Pertussis Toxin (Ptx).

Die Zellen wurden für 24 h in serumfreien Medium mit bzw. ohne 300 nM Ptx inkubiert. Danach wurden die Zellen permeabilisiert und die Serotoninaufnahme gemessen.

Nach einer Inaktivierung der Gi/o- $\alpha$ -Proteine durch Ptx-Behandlung war eine Reduktion der Neurotransmitteraufnahme zu beobachten.

### 5.6.2 Die Inaktivierung von Go2 $\alpha$ durch Pertussis Toxin führt in BON-Zellen zu einem verminderten Monoamingehalt

In einem nächsten Schritt sollte überprüft werden, inwiefern die Serotoninspeicherung in intrazellulären Speicherorganellen durch die Inaktivierung von Go2 $\alpha$  beeinflusst wird. Dazu sollten einerseits unter normalen Bedingungen kultivierte BON-Zellen sowie BON-Zellen, die in Gegenwart erhöhter Serotoninkonzentrationen kultiviert wurden, untersucht werden. Wie unter Punkt 5.6.1 beschrieben, wurden Zellen dazu für 24 Stunden mit bzw. ohne Pertussistoxin kultiviert. Nach der Zellernte wurden die Zellen durch mehrfache Passage durch eine 27G-Kanüle aufgeschlossen und in einem ersten Zentrifugationsschritt der postnukleäre Überstand gewonnen. In einem zweiten hochtourigen Zentrifugationsschritt wurden Membranfraktion (MF) und Zytosol voneinander getrennt. Die gesammelten Fraktionen wurden dann mittels HPLC-EC und Proteinbestimmung analysiert und der Serotoningehalt bestimmt. Dabei zeigte sich nach Ptx-Behandlung sowohl bei BON-Zellen, die unverändert bzw. zusätzlich in Gegenwart von 30  $\mu$ M Serotonin kultiviert wurden, in der Membranfraktion und in der zytosolischen Fraktion ein verminderter Serotoningehalt (siehe Abbildung 16).



**Abbildung 16:** Serotoningehalt in Membranfraktion (MF) und Zytosol von mit und ohne Pertussis Toxin (Ptx) behandelten BON Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit und ohne 30 µM Serotonin.

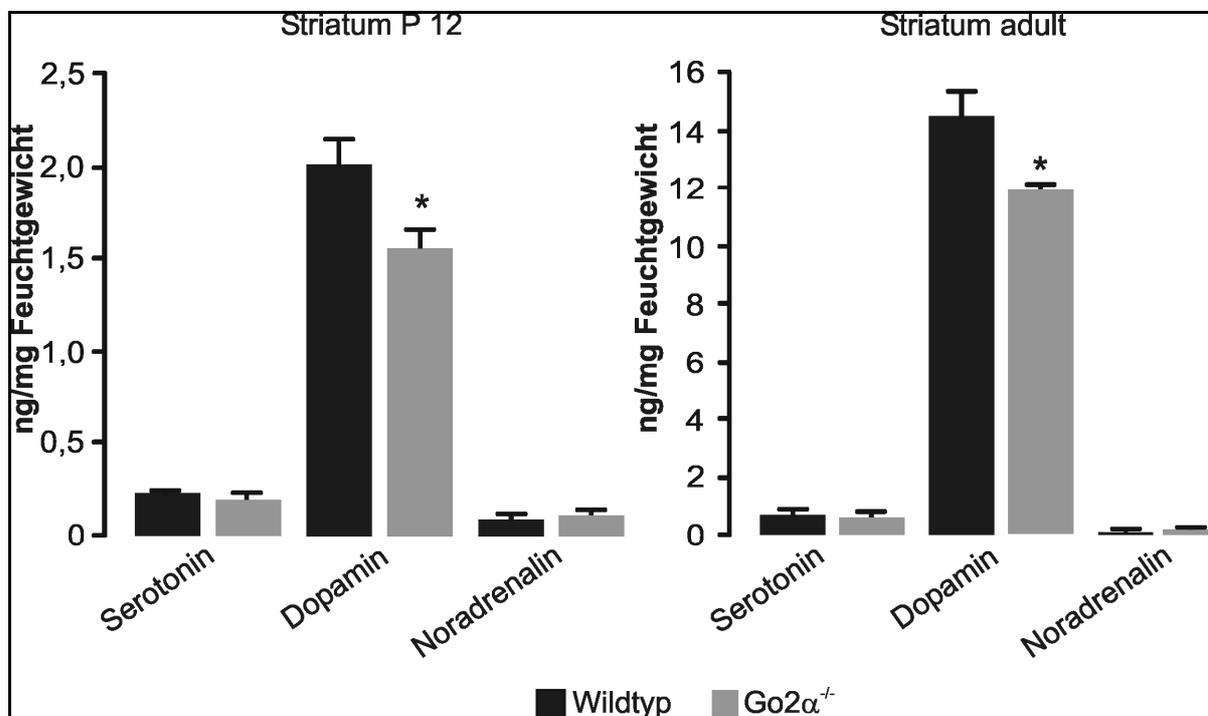
Die Zellen wurden nach der Inkubation von den Zellkulturschalen gelöst und in Homogenisierungspuffer resuspendiert. Anschließend erfolgte der Aufschluss durch 40-faches Resuspendieren mit einer 27G-Nadel. Nach der Zentrifugation bei 3000 x g wurde der postnukleare Überstand bei 350.000 x g sedimentiert (MF). Der verbliebene Überstand (Zytosol) wurde ebenfalls mittels HPLC-EC vermessen.

Nach Behandlung mit 300 nM Ptx ist in allen Fraktionen eine signifikante Reduktion des Serotoningehaltes zu verzeichnen. Auch nach Vorinkubation in der Gegenwart mit 30 µM Serotonin, wodurch der Serotoningehalt insgesamt erhöht ist, ist eine Abnahme des Serotoningehaltes nach Vorinkubation mit Ptx zu beobachten.

### 5.6.3 Go2α-Deletionsmutanten haben gegenüber Wildtypmäuern einen verminderten striatalen Dopaminspiegel

Da in den vorangegangenen Experimenten mit PC12 und BON-Zellen die Beeinflussung des Monoaminspiegels durch Inaktivierung von Go2α gezeigt werden konnte, sollte nachfolgend der Einfluss der Deletion von Go2α auch *in vivo* im Mausmodell untersucht werden. Die Deletionsmutanten (Dhingra et al., 2002) wurden freundlicherweise durch Prof. Lutz Birnbaumer, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, North Carolina, zur Verfügung gestellt. Bei den folgenden Untersuchungen wurden die Gehirnregionen Frontalkortex, Hippocampus, Bulbus olfactorius, Hypothalamus und Cerebellum präpariert und ausgewogen. Der jeweilige Monoamingehalt wurde mittels HPLC-EC bestimmt und auf die untersuchte Menge Feuchtwicht bezogen (pg / mg Feuchtwicht). Die Analysen wurden in Kooperation mit Frau Prof. Dr. Hörtnagl durchgeführt. In Untersuchungen des Gesamthirns von zwei (P2), vier (P4) und acht (P8) Tage alten Wildtypmäusen und Go2α-Deletionsmutanten konnten keine Unterschiede des Gehalts an Serotonin, Dopamin und Noradrenalin und deren Metaboliten beobachtet werden. Bei zwölf Tage alten

Tieren war es erstmals möglich, die Gehirnregionen Hippocampus, Hypothalamus, Frontal-cortex sowie Striatum zu präparieren und getrennt zu untersuchen. Dabei zeigte sich ein verminderter Dopamingehalt des Striatums, der auch in adulten Tieren beobachtet werden konnte (Abbildung 17). In allen anderen Regionen konnte keine signifikante Veränderung des Monoamingehalts beobachtet werden.



**Abbildung 17:** HPLC-EC-Analyse des Striatums von Wildtyp und Go2 $\alpha$ -Deletionsmutanten von P12- und adulten Mäusen.

Das Striatum wurde aus tiefgefrorenem Gehirn auf einer Kühlplatte (-20°C) präpariert und dann mittels HPLC-EC vermessen. Pro Versuchsgruppe wurden die Gehirnareale von sechs Tieren analysiert. Angegeben sind Mittelwert +/- SEM.

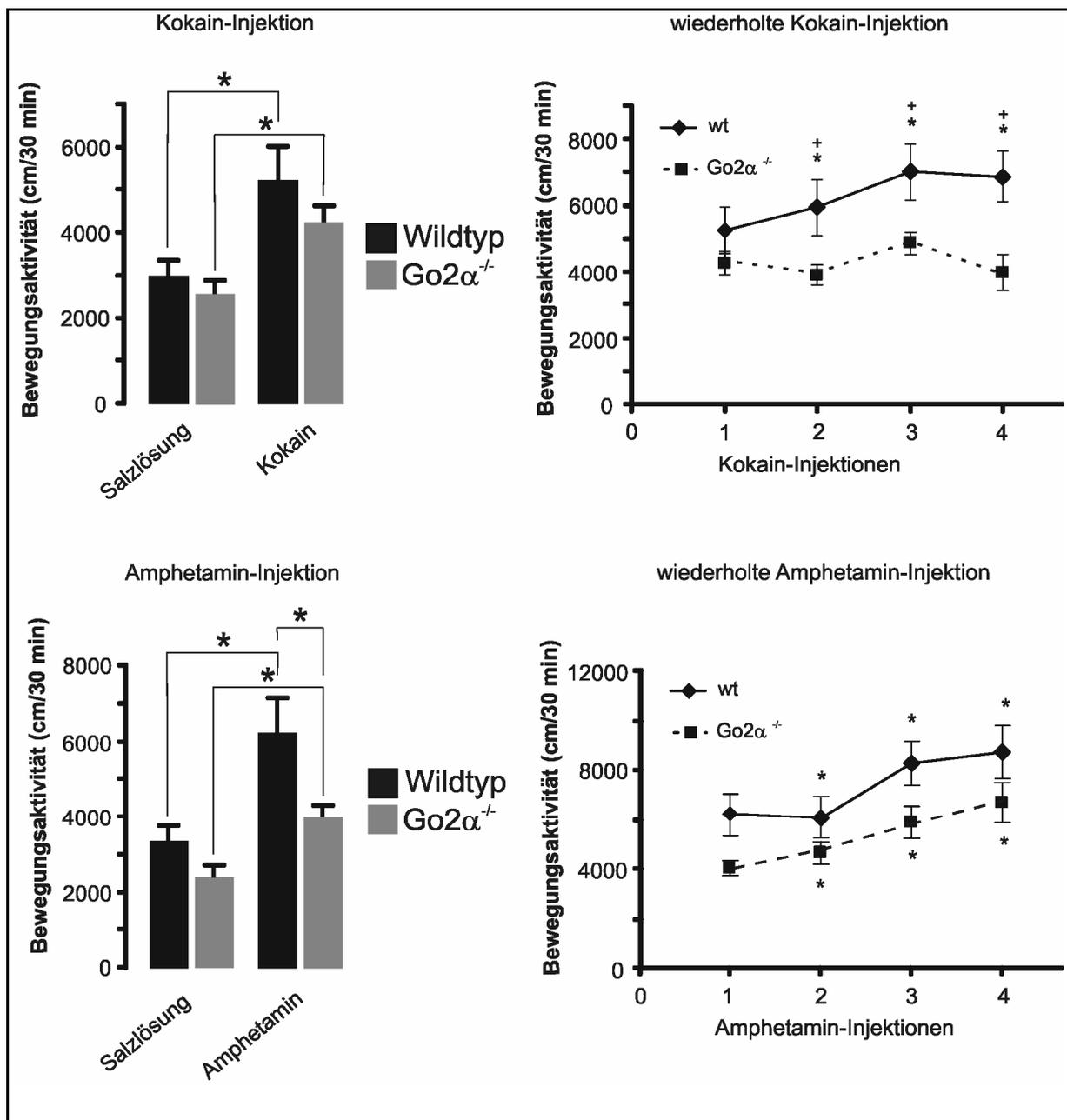
Sowohl P12 als auch adulte Tiere zeigen eine Verminderung des Dopamingehalts im Striatum von Go2 $\alpha$ -Deletionsmutanten gegenüber Wildtypmäusen.

Die Bestimmung der Monoamine erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Professor Dr. Heide Hörtnagl, Institut für Pharmakologie der Charité.

#### 5.6.4 Verhaltensveränderungen bestätigen den veränderten Dopaminmetabolismus in Go2 $\alpha$ -Deletionsmutanten

Da eine Vielzahl von Gehirnfunktionen über Dopamin reguliert wird, (u.a. Bewegung, Kognition sowie Emotionen) und das dopaminerge System leicht durch verschiedene Substanzen beeinflussbar ist, sollte in Versuchen überprüft werden, ob sich der im Striatum veränderte Dopamingehalt auch auf Verhaltensebene widerspiegelt. Das war insbesondere von Interesse, da Go2 $\alpha$ -Deletionsmutanten scheinbar keine offensichtlichen Veränderungen aufweisen (Jiang et al., 1998; Dhingra et al., 2000; 2002). Bei Kooperationspartnern, der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rainer Spanagel am Zentralinstitut für seelische Gesundheit in Mannheim, wurden Wildtyptiere und Go2 $\alpha$ -Deletionsmutanten einer repetitiven Behandlung mit den Psychostimulantien Kokain bzw. Amphetamin unterzogen. Die durch Substanzgabe

induzierte Bewegung wurde nach jeder Applikation zur Ermittlung der substanzinduzierten Sensitivierung gemessen. Nach der vierten Applikation wurden die Mäuse einem Conditioned Place Preference Test (CPP-Test) unterzogen. Dabei zeigten sich im CPP-Test, der ein Maß für die substanzvermittelten Belohnungseffekte und damit den Einsatz von Suchtverhalten ist, keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu traten Unterschiede in der substanzinduzierten Bewegung zwischen Wildtyptieren und Go2 $\alpha$ -Deletionsmutanten bei einzelner und wiederholter Substanzapplikation auf. Bei der Einzelapplikation konnte beobachtet werden, dass die Go2 $\alpha$ -Deletionsmutanten eine geringere Bewegungsaktivität aufweisen. Diese ergibt aber nur nach Gabe von Amphetamin einen signifikanten Unterschied. Bei wiederholter Substanzgabe war bei Wildtyptieren zu beobachten, dass sowohl bei Amphetamin, als auch bei Kokain, eine mit jeder Injektion zunehmende Bewegungsrate - die substanzvermittelte Sensibilisierung - auftritt. Hingegen ist diese substanzvermittelte Sensibilisierung bei den Go2 $\alpha$ -Deletionsmutanten nur nach Amphetamininjektion, allerdings auf einem verminderten Niveau, zu beobachten. Nach wiederholter Injektion von Kokain war keine Sensibilisierung in Go2 $\alpha$ -Deletionsmutanten zu erkennen (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Einfluss der akuten und wiederholten Injektion von Kokain bzw. Amphetamin auf die Bewegungsaktivität von Wildtyp und Go2 $\alpha$ -Deletionsmutanten.**

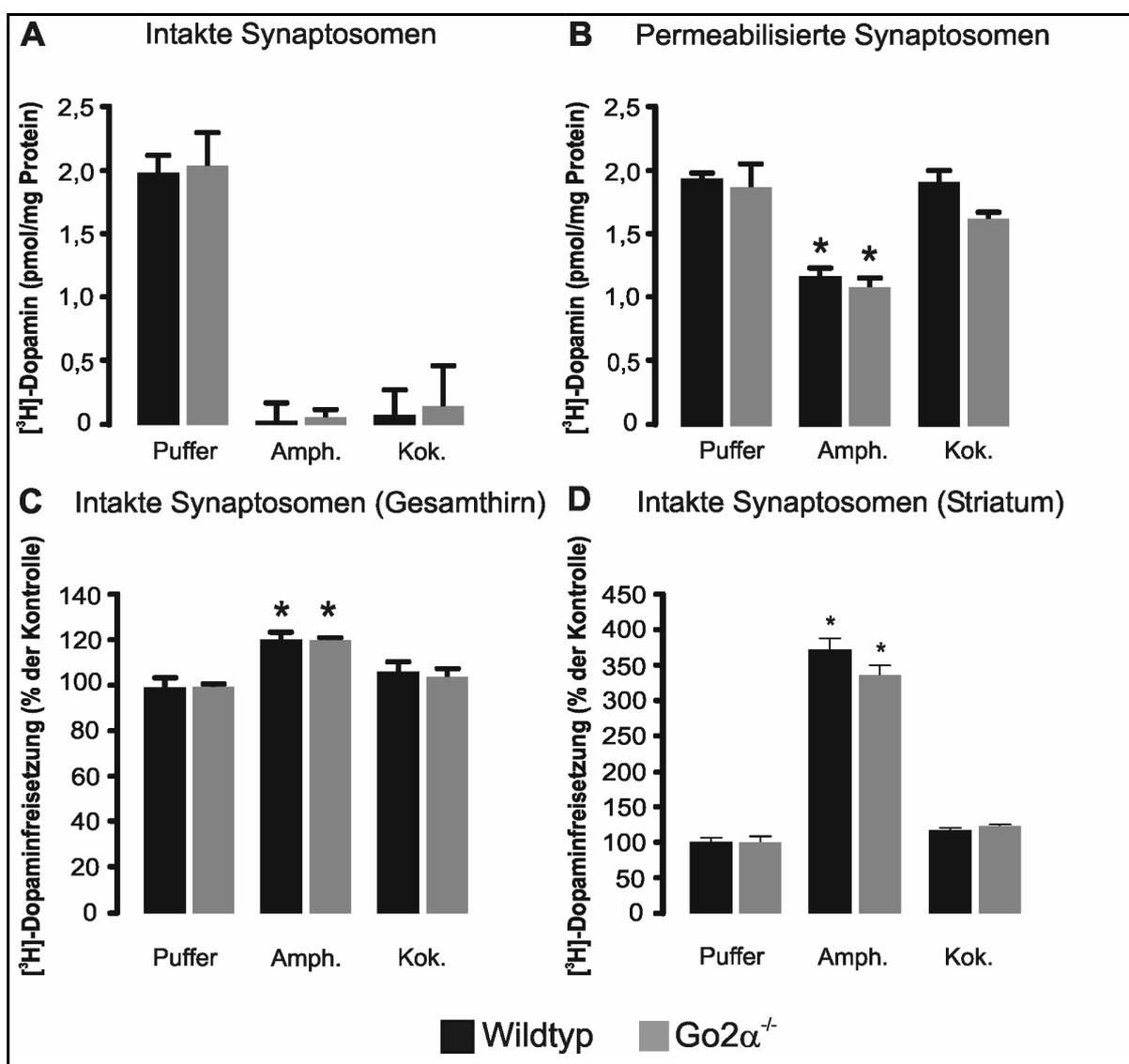
Nach Adaption an die Umgebung erhielten die Mäuse entweder eine Salz-, Kokain- (10 mg/kg; i.p.) oder Amphetamininjektion (2 mg/kg; i.p.). Einzelapplikationen erhöhten die Bewegungsaktivität in Wildtypmäusen und auch in Go2 $\alpha$ -Deletionsmutanten. Dabei ist die Bewegungsaktivität in Go2 $\alpha$ -Deletionsmutanten etwas geringer als in Wildtypmäusen.

Mehrfachinjektionen von Kokain und Amphetamin führen bei Wildtyptieren zu einer Sensibilisierung (Erhöhung der Bewegungsaktivität) nach wiederholter Substanzapplikation. Bei Go2 $\alpha$ -Deletionsmutanten ist das nur nach Injektionen mit Amphetamin zu beobachten, nicht aber nach Injektionen mit Kokain.

Diese Experimente wurden durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Spanagel am Zentralinstitut für seelische Gesundheit in Mannheim durchgeführt.

Um zu untersuchen, ob die beobachteten Verhaltensunterschiede durch unterschiedliche Effekte von Kokain und Amphetamin bei der Neurotransmitteraufnahme und -speicherung in beiden Genotypen beruhen, wurden abschließend Kontrollexperimente an Synaptosomen durchgeführt. Dabei dienten intakte Synaptosomen als System für die zelluläre Aufnahme und Speicherung und permeabilisierte Synaptosomen als System für die vesikuläre Auf-

nahme und Speicherung. An intakten Synaptosomen konnte gezeigt werden, dass sowohl 5  $\mu\text{M}$  Kokain als auch 10  $\mu\text{M}$  Amphetamin die zelluläre Dopaminaufnahme komplett hemmen (Abbildung 19A). In permeabilisierten Synaptosomen ist bei beiden Genotypen in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$  Amphetamin eine signifikant verminderte Aufnahme von Dopamin zu erkennen (19B). Die Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  Kokain führt in den  $\text{Go}2\alpha$ -Deletionsmutanten zu einer leichten Verminderung der Neurotransmitteraufnahme. An intakten, mit  $^3\text{H}$ -Dopamin vorbeladenen Synaptosomen des Gesamthirns und des Striatums konnte verifiziert werden, dass Amphetamin im Gegensatz zu Kokain in der Lage ist, nicht nur die Dopaminaufnahme zu blockieren, sondern zusätzlich auch Dopamin in den Extrazellulärraum freizusetzen. Wie Abbildung 19 C und D zu entnehmen ist, erfolgt die Freisetzung in Wildtyptieren und  $\text{Go}2\alpha$ -Deletionsmutanten gleichermaßen.



**Abbildung 19:** Einfluss von Kokain und Amphetamin auf die Neurotransmitteraufnahme und deren Freisetzung in bzw. aus Synaptosomen von Wildtyptieren und  $\text{Go}2\alpha$ -Deletionsmutanten.

A: Die Neurotransmitteraufnahme in intakte Synaptosomen wurde mit 100 nM  $^3\text{H}$ -Dopamin sowie zusätzlich mit und ohne 5  $\mu\text{M}$  Kokain (Kok.) bzw. 10  $\mu\text{M}$  Amphetamin (Amph.) für 10 Minuten bei 37°C gemessen. Die unspezifische Aufnahme wurde in Gegenwart von 20  $\mu\text{M}$  GBR-12909 gemessen und vom Ergebnis der jeweiligen Mes-

sungen abgezogen. Sowohl Kokain als auch Amphetamin blockieren die [ $^3\text{H}$ ]-Dopaminaufnahme in die Synaptosomen komplett.

**B:** Um den Einfluss auf die vesikuläre Neurotransmitteraufnahme zu untersuchen, wurden Synaptosomen beider Stämme permeabilisiert und die reserpinsensitive [ $^3\text{H}$ ]-Dopaminaufnahme mit und ohne Kokain bzw. Amphetamin (Konzentrationen siehe **A**) bestimmt. Nur Amphetamin ist in der Lage, auch die vesikuläre [ $^3\text{H}$ ]-Dopaminaufnahme zu reduzieren. In Go2 $\alpha$ -Deletionsmutanten ist auch eine leichte Verminderung zu beobachten.

**C+D:** Untersucht wurde auch der Einfluss von Kokain und Amphetamin auf die Freisetzung von [ $^3\text{H}$ ]-Dopamin aus zuvor vorbeladenen Synaptosomen des Gesamthirns bzw. des Striatums. In beiden Fällen ist eine Freisetzung durch Amphetamin zu beobachten, die im Striatum erwartungsgemäß deutlicher ist.

## 5.7 Identifizierung von möglichen Zielen der Go2 $\alpha$ -vermittelten Signaltransduktion durch das Yeast-two-Hybrid-System

Trotz der unter 5.5 identifizierten Faktoren cAMP und CAPS, die die Neurotransmitteraufnahme beeinflussen, bleibt der Zusammenhang mit der durch Go2 $\alpha$ -vermittelten Reduktion der Neurotransmitteraufnahme und -speicherung ungeklärt. Zusätzlich belegen die unter 5.6 durchgeführten Untersuchungen, dass Go2 $\alpha$  offensichtlich für die Regulation des Dopaminmetabolismus von Bedeutung ist, wobei möglicherweise beteiligte Signalkaskaden aber unbekannt sind. Deshalb sollte in einem weiteren Ansatz durch Verwendung des Yeast-two-Hybrid-Systems (Y2H) gezielt nach möglichen Effektoren der Go2 $\alpha$ -Untereinheit gesucht werden. Obwohl die Isoformen von Go $\alpha$  einen großen Anteil am Gehirngesamtprotein ausmachen - gemeinsam mit Gi $\alpha$  mehr als 1,5 % des Membranproteins (Sternweis & Robishaw, 1984) - wurde bisher nur nach Interaktionspartnern der Go1 $\alpha$ -Isoform gesucht. Diese unterscheidet sich aber in der GTPase-Domäne, die für die Interaktion mit Effektoren verantwortlich ist, von Go2 $\alpha$ .

Als Köderprotein (*bait*) für das Y2H-System wurde daher Go2 $\alpha$ Q205L verwendet. Es handelt sich dabei um eine mutierte G $\alpha$ -Untereinheit, die noch in der Lage ist, GTP zu binden, der aber die GTPase Aktivität fehlt. Dadurch bleibt die G-Protein-Untereinheit konstitutiv aktiv (Kroll et al., 1992). Mit diesem *bait* wurde eine cDNA-Bibliothek aus dem Mäusegehirn durchgemustert.

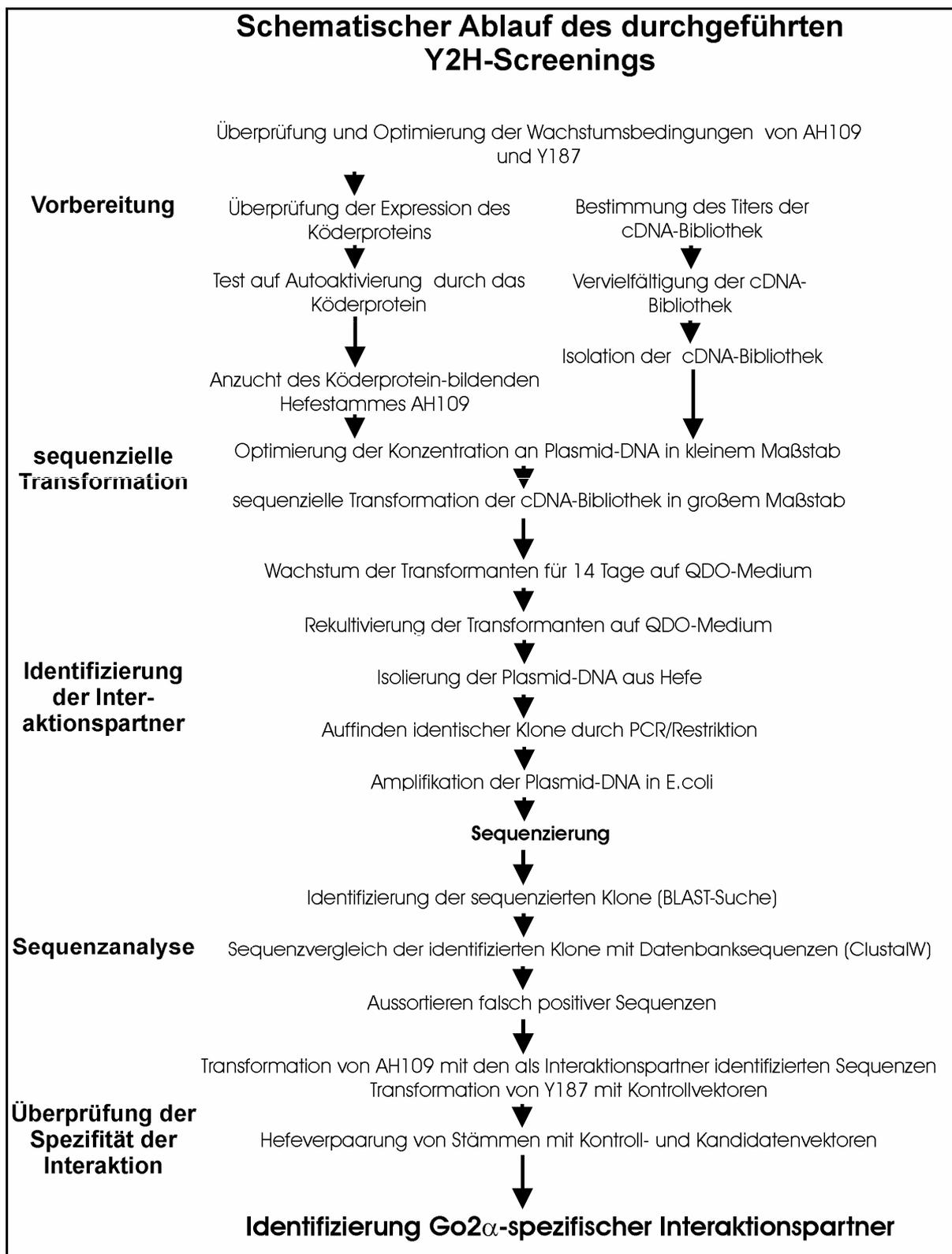
### 5.7.1 Vorgehensweise bei der cDNA-Durchmusterung mittels Yeast-two-Hybrid-System

Im Folgenden wird zunächst kurz die Vorgehensweise bei der Durchmusterung der cDNA-Bibliothek beschrieben. Diese ist in Form eines Fließschemas auch in Abbildung 20 dargestellt. In den folgenden Abschnitten wird dann genauer auf die dabei beobachteten Ergebnisse eingegangen.

Zu Beginn der Untersuchungen wurden, durch das Wachstum auf verschiedenen Minimalmedien, die verwendeten Hefestämme AH109 und Y187 bezüglich ihres Phänotypes charakterisiert. Beide Stämme wuchsen nicht auf Minimalmedien ohne Tryptophan bzw. Leuzin. Das war die Voraussetzung für die Selektion transformierter Hefezellen nach Einbringen der Yeast-two-Hybrid-Vektoren für die Durchmusterung. Für die Selektion von transformierten

Hefezellen mit *prey*-Vektoren (pACT2), in denen die cDNA-Bibliothek vorlag, diente Leuzin als Wachstumsmarker. Für die Selektion von transformierten Hefezellen mit *bait*-Vektoren (pGBKT7), diente die Tryptophanuxotrophie der verwendeten Stämme. Um auszuschließen, dass während der Durchmusterung ein Wachstum auch ohne Reportergenaktivierung erfolgen konnte, durften beide Hefestämme ebenso nicht auf Minimalmedien ohne Adenin bzw. Histidin wachsen. Sowohl Adenin als auch Histidin dienen im Stamm AH109 durch die Reportergenprodukte ADE2 und HIS3 als Nachweis der Proteininteraktion. Beide Hefestämme, AH109 und Y187, zeigten die gewünschten Wachstumseigenschaften. Allerdings wies der Stamm AH109 ein leichtes Hintergrundwachstum auf Medium ohne Histidin auf. Deshalb wurde dem Minimalmedium 1 mM 3-AT zugesetzt, wodurch das Hintergrundwachstum, das vermutlich durch eine leichte konstitutive Expression des His3-Proteins verursacht wird, unterbunden wurde. Bei 3-AT handelt es sich um einen Inhibitor des His3-Proteins. Anschließend wurde der Hefestamm AH109 mit dem Vektor pGBKT7-GO2Q205L transformiert, der das Fusionsprotein der Gal4-DNA-Bindungsdomäne mit dem konstitutiv aktiven G-Protein Go2 $\alpha$ , im Folgenden als Gal4-DNABD-GO2QL bezeichnet, kodiert. Danach wurde die Expression dieses Fusionsproteins überprüft und getestet, ob das Protein Gal4-DNABD-GO2QL allein einen Einfluss auf die Aktivierung der Reporter gene (Wachstumsmarker) hat. Zur selben Zeit wurde der Titer der cDNA-Bibliothek aus dem Gehirn der Maus bestimmt. Die cDNA-Bibliothek lag im Vektor pACT2, mit dem der Stamm *E.coli* BNN1202 transformiert wurde, vor. Die cDNA-Bibliothek wurde durch Wachstum auf LB-Medienplatten amplifiziert. Danach wurde die cDNA mittels Plasmidpräparation isoliert und für die anschließende Transformation verwendet. Der mit dem *bait*-Vektor transformierte Hefestamm AH109 wurde in Selektionsmedium ohne Tryptophan (SD-Trp) angezogen und kompetent für die DNA-Aufnahme gemacht. Dann stand er für die Transformation zur Verfügung. Während einer ersten Transformation in kleinerem Maßstab wurde dann die bei der Transformation benötigte Menge der cDNA-Bibliothek optimiert, um eine möglichst große Anzahl unabhängiger Klone der cDNA-Bibliothek zu untersuchen. Ausgehend von der Transformations-effizienz der Testtransformation wurde dann eine Durchmusterung im großen Maßstab durchgeführt. Nach der Transformation wurden die Hefezellen auf QDO-Medium mit 3-AT und X- $\alpha$ -Gal für 14-Tage inkubiert. Die gewachsenen Hefeklone wurden dann noch dreimal nacheinander auf Selektionsmedium rekultiviert. Einerseits sollte das Wachstum überprüft und andererseits die Anzahl irrelevanter cDNA-Plasmide in den Hefezellen für die nachfolgende Analytik reduziert werden. Anschließend wurde die Plasmid-DNA aus den Hefezellen isoliert. Durch eine PCR mit dem pACT2 spezifischen Primerpaar wurde dann das cDNA-Insert aller Klone amplifiziert und die Größe durch Agarosegelelektrophorese bestimmt. Ähnlich große Fragmente wurden dann in einem weiteren Schritt mit einem häufig schneidenden Restriktionsenzym verdaut und in einem weiteren Elektrophoreseschritt analysiert,

um mögliche Dopplungen bei der Sequenzierung auszuschließen. Abschließend wurden die Klone in dem *E.coli* Stamm DH5 $\alpha$  amplifiziert, um ausreichend Material für die nachfolgende Sequenzierung zu gewinnen. Nach Erhalt der Sequenzen wurden diese mittels BLAST (BasicLogicalAlignmentSearchTool)-Suche des European Bioinformatics Institute (EBI) mit Datenbanken verglichen und in einem nächsten Schritt mit dem Program ClustalW (ebenfalls EBI) Sequenzvergleiche ausgewertet. Bereits nach der Sequenzanalyse erkennbar falsch positive Klone wurden durch Abgleich mit Datenbanken bekannter, falsch positiver Interaktionspartner ausgeschlossen (van Criekinge & Beyaert, 1999). Ebenso ausgeschlossen wurden Klone, die keine Protein-kodierenden Sequenzen enthielten. Auch der einheitliche Leserahmen von Gal4-DNA-AD mit dem jeweiligen Insert wurde geprüft und bei weiteren Untersuchungen berücksichtigt, auch wenn bekannt ist, dass in Hefezellen translationelle Leserahmenverschiebungen auftreten können. Abschließend wurde der Hefestamm AH109 erneut mit den cDNAs der identifizierten Interaktionspartner transformiert, um danach eine Verpaarung mit dem Hefestamm Y187 durchzuführen. Dieser lag neben dem *bait*-Vektor auch mit verschiedenen Kontrollvektoren transformiert vor. So sollte die Interaktion der Klone mit Go2 $\alpha$  sowie die Spezifität für diese G $\alpha$ -Isoform überprüft werden.



**Abbildung 20: Schematischer Ablauf des durchgeführten Yeast-two-hybrid-Screenings.**

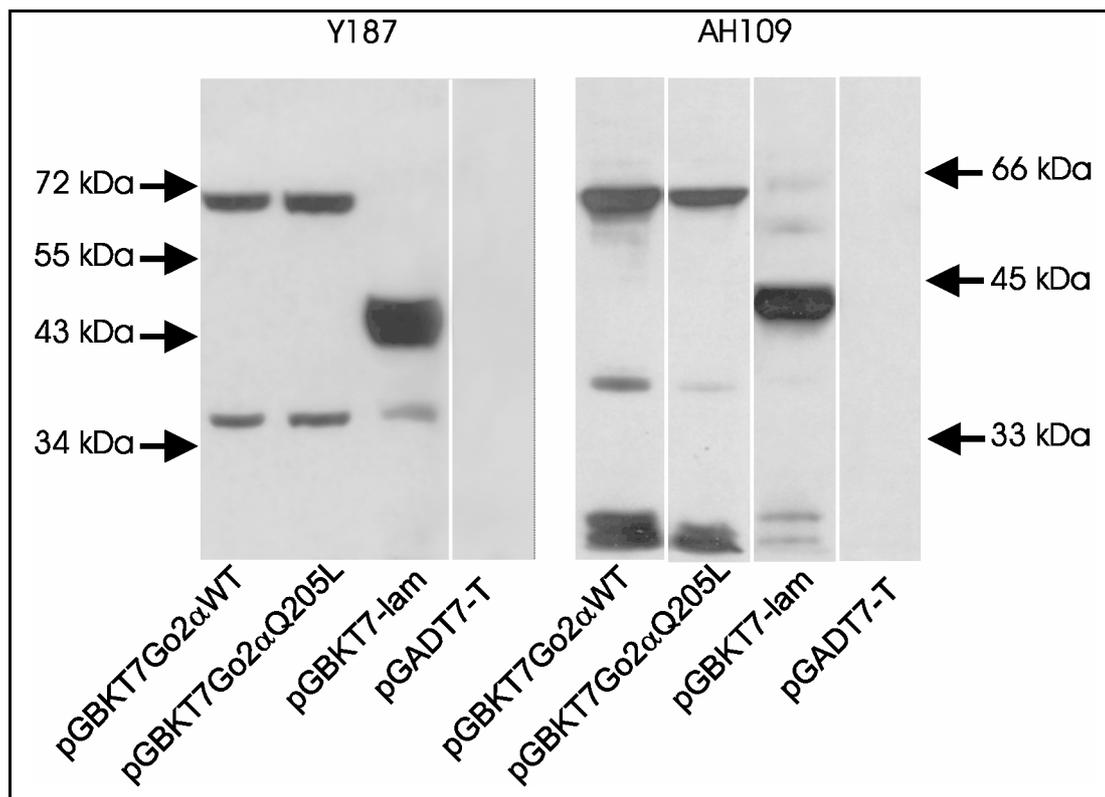
Eine ausführliche Beschreibung erfolgt im Text unter Punkt 5.7.1.

## 5.7.2 Vorbereitende Arbeiten

Zuerst wurde das Wachstum der beiden Hefestämme AH109 und Y187 auf Minimalmedien jeweils ohne Tryptophan oder Leuzin (Vektormarker) bzw. Adenin oder Histidin (Reporter-genmarker) überprüft. Bis auf den Stamm AH109, der auf Histidinmangelmedien ein leichtes Hintergrundwachstum zeigte, wuchs keiner der beiden Stämme auf den Einzelselektions-nährmedien. Um das Hintergrundwachstum zu verhindern, genügte es, dem Medium 1 mM 3-AT zuzusetzen.

Danach wurden beide Stämme mit den Vektoren pGBKT7Go2 $\alpha$ WT, pGBKT7Go2 $\alpha$ Q205L, pGBKT7-lam und pGADT7T transformiert. Nach Wachstum auf den Selektionsmedien SD-Trp bzw. SD-Leu wurden je 3ml-Flüssigkulturen angesetzt und nach 24 Stunden die Zellen abzentrifugiert und das Hefegesamtprotein isoliert. Das Gesamtprotein wurde dann durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Die Proteine wurden dann mit anti-Gal4-DNA-BD-Antikörper (Clontech) inkubiert (siehe Abbildung 21). Dabei zeigte sich, dass in beiden Hefestämmen ein Fusionsprotein von ca. 62 kDa gebildet wird, das der erwarteten Größe aus Go2 $\alpha$  (40 kDa) und der Gal4-DNA-BD (22 kDa) entspricht. Auch für das Kontrollprotein Lamin C kann in beiden Hefestämmen die Expression eines ca. 40 kDa großen Proteins beobachtet werden. Im Gegensatz dazu kann im Proteinextrakt aus Hefezellen, die mit pGADT7T transformiert wurden und keine Gal4-DNA-BD enthalten, keine Proteinexpression nachgewiesen werden.

Für die Vervielfältigung der cDNA-Bibliothek musste zunächst der Titer der vorhandenen *E.coli*-Suspension bestimmt werden. Der Titer der verwendeten cDNA Bibliothek betrug  $4,875 \times 10^7$  cfu / ml. Um die Anzahl unabhängiger Klone der cDNA-Bibliothek von  $3,5 \times 10^6$  bei der Amplifikation aufrechtzuerhalten, wurde sicherheitshalber die dreifache Menge an Klonen der cDNA-Bibliothek ausplattiert. Dazu wurden 215  $\mu$ l der cDNA-Bibliothek à ca. 40000 cfu / 150 mm Medienplatte auf insgesamt 263 Medienplatten verteilt und für 48 h bei 30°C kultiviert. Abschließend wurden die Zellen in LB-Medium resuspendiert und von der Hälfte der geernteten Zellen die Plasmid-DNA isoliert.



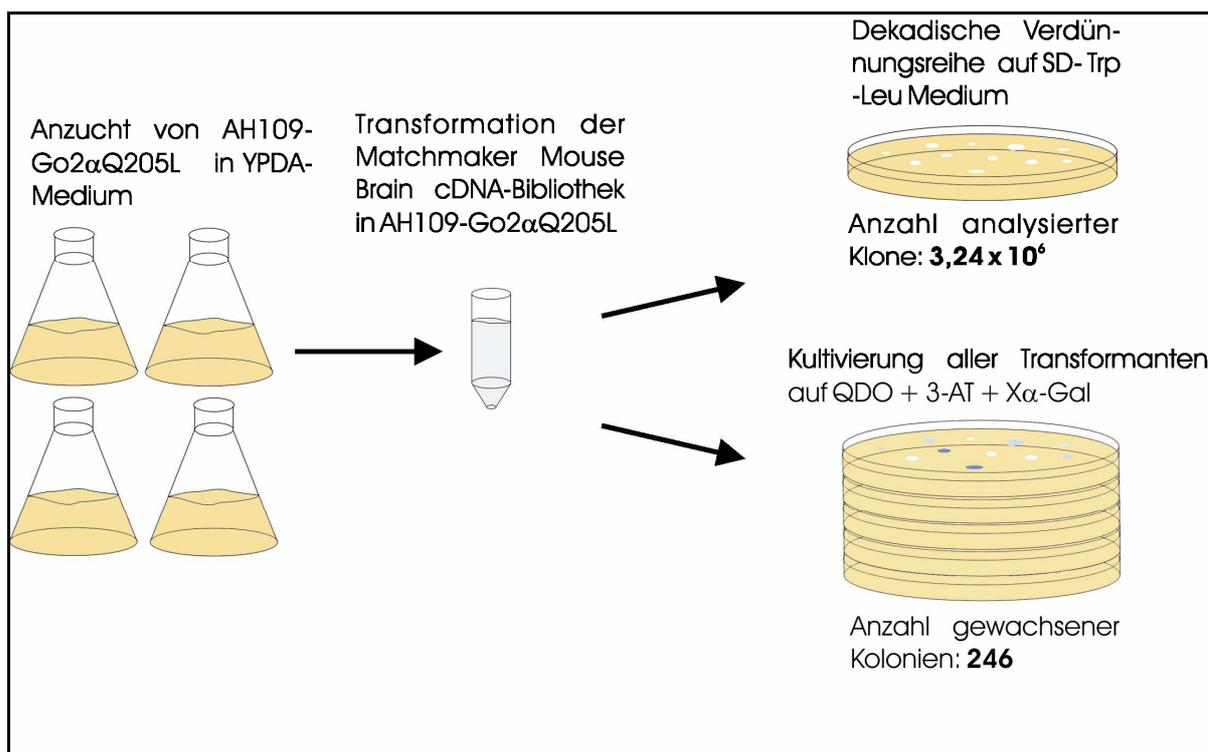
**Abbildung 21:** Western-Blot mit einem Anti-Gal4-DNA-BD Antikörper. Aufgetragen sind verschiedene Hefeproteinaufarbeitungen der Stämme Y187 und AH109, die mit verschiedenen Kontroll- und *bait*-Vektoren transformiert sind.

Die Expression des Fusionsproteins aus Go2 $\alpha$ -Untereinheit und Gal4-DNA-BD mit einer Größe von ca. 63 kDa kann in beiden Hefestämmen nachgewiesen werden. Auch mit dem Kontrollvektor pGBKT7-lam transformierte Zellen zeigen die Expression eines Fusionsproteins von ca. 40 kDa. Als Negativkontrolle konnte in Hefezellen, die mit dem Fusionsprotein aus Gal4-Aktivierungsdomäne und dem SV40T-Antigen transformiert wurden, mit dem Antikörper gegen die Gal4-DNA-BD kein Protein nachgewiesen werden.

### 5.7.3 Sequenzielle Transformation von *bait*- und *prey*-Vektoren

Bei der sequenziellen Transformation wurden die Hefezellen, nach Transformation des Hefestammes AH109 mit dem *bait*-Vektor (siehe 5.7.1), erneut kompetent zur DNA-Aufnahme gemacht und mit der zuvor gewonnenen cDNA der cDNA-Bibliothek transformiert. Um dabei einerseits eine hohe Transformationsrate zu erzielen und gleichzeitig abschätzen zu können, wie groß der Transformationsansatz gewählt werden muss, um eine größtmögliche Anzahl an Klonen der cDNA-Bibliothek zu untersuchen, wurde zunächst eine Testtransformation mit verschiedenen Konzentrationen der cDNA-Bibliothek durchgeführt. Dabei stellte sich nach Bestimmung der Transformationseffizienz auf SD-Leu-Trp-Medium heraus, dass die Konzentration von 10  $\mu\text{g}$  / Transformationsansatz am besten war. Die für Testzwecke generierten Transformanten wurden neben der Bestimmung der Transformationseffizienz unter stringentesten Bedingungen auf QDO-Medium ausplattiert und für 14 Tage bei 30°C inkubiert. Gewachsene Kolonien wurden wie die, der nachfolgend beschriebenen Bibliotheks-Durchmusterung behandelt. Nach der Optimierung der zu verwendenden cDNA-Konzentration wurde eine sequenzielle Transformation (siehe Abbildung 22) im Biblio-

theksmaßstab durchgeführt. Dazu wurden 4 x 50 ml YPDA-Medium mittels einer Vorkultur des *bait*-tragenden Hefestammes AH109 angezogen, kompetent für die DNA-Aufnahme gemacht und bei einer Konzentration von  $10 \mu\text{g} / 600 \mu\text{l}$  kompetenter Zellen mit der cDNA transformiert. Die Transformanten wurden auf 100 150 mm QDO-Medienplatten verteilt und gleichzeitig eine dekadische Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Transformationseffizienz und der Anzahl der durchgemusterten Klone auf SD-Leu-Trp-Medium angelegt. Nach 14-tägiger Inkubation bei  $30^\circ\text{C}$  waren 246 Kolonien gewachsen, wobei insgesamt  $3,24 \times 10^6$  Klone durchgemustert wurden. Gemeinsam mit der Testtransformation, bei der ca.  $5 \times 10^5$  Klone durchgemustert wurden, entsprach die Anzahl der durchgemusterten Klone ungefähr der Anzahl unabhängiger Klone der cDNA-Bibliothek. Der empfohlene Sicherheitsfaktor von drei, um auch seltene Interaktionspartner sicher zu identifizieren und insgesamt  $1,05 \times 10^7$  Klone durchmustern zu können, konnte vermutlich aufgrund ungünstigerer Transformationsbedingungen nicht erreicht werden. Da jedoch unter den stringentesten Bedingungen 246 Klone zu analysieren waren, wurde von zusätzlichen Transformationen abgesehen.



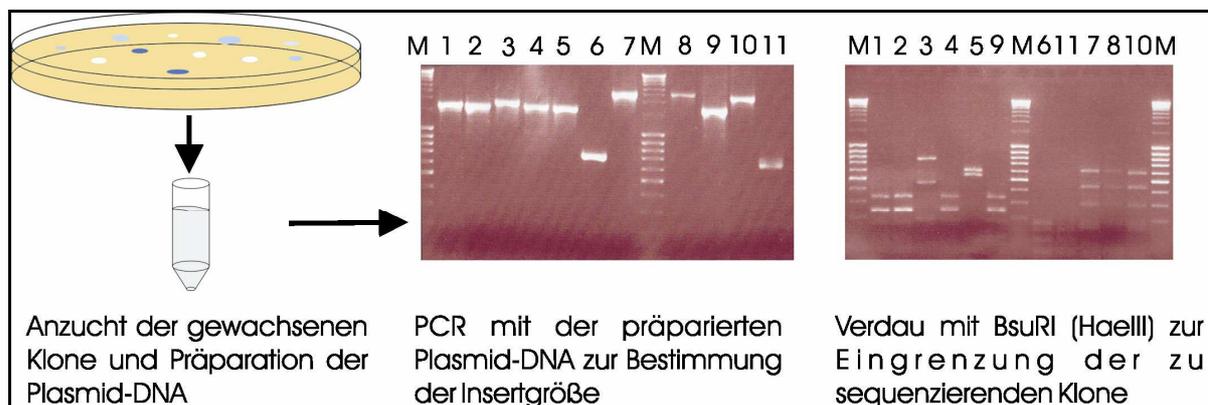
**Abbildung 22: Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der Durchführung der sequenziellen Transformation.**

Zu Beginn wurden 4x 200 ml YPDA-Medium mittels einer Vorkultur des mit dem *bait*-Vektor transformierten Stammes AH109 auf  $5 \times 10^6$  Zellen / ml eingestellt. Nach Erreichen der Zelldichte von  $2 \times 10^7$  Zellen / ml wurden die Hefezellen kompetent zur DNA-Aufnahme gemacht und mit der cDNA-Bibliothek, die im Vektor pACT2 vorlag, transformiert. Danach wurden die Hefezellen auf 100 QDO-Platten ausplattiert. Gleichzeitig wurden je 100  $\mu\text{l}$  einer dekadischen Verdünnungsreihe auf SD-Trp-Leu-Platten verteilt, um die Anzahl der durchgemusterten Klone zu bestimmen.

Nach 14 Tagen konnte das Wachstum von 246 Kolonien beobachtet werden, wobei  $3,24 \times 10^6$  Klone untersucht worden sind.

### 5.7.4 Charakterisierung der Interaktionspartner

Die 246 gewachsenen Klone wurden dann noch dreimal nacheinander auf QDO-Medium reselektiert, um das Wachstum zu überprüfen. Zusätzlich sollten überzählig transformierte Vektor-DNA der cDNA-Bibliothek in den gewachsenen Kolonien reduziert werden, um dadurch die nachfolgende Charakterisierung der Interaktionspartner zu erleichtern. Da unter den 246 gewachsenen Kolonien auch Dopplungen einzelner Klone auftraten und es zu aufwendig gewesen wäre, die cDNA von 246 Klonen zu sequenzieren und auszuwerten, wurde die Anzahl der zu analysierenden Klone wie im Folgenden beschrieben und in Abbildung 23 dargestellt, reduziert. Zunächst wurde die komplette Vektor-DNA der Hefezellen isoliert und das cDNA-Fragment durch pACT2-spezifische Primer amplifiziert. Auf diese Weise konnten Rückschlüsse auf die Größe des enthaltenen cDNA-Fragments gezogen werden. Die cDNA-Fragmentgröße aller 246 Klone wurde ermittelt und es wurden Gruppen von cDNA-Fragmenten ähnlicher Größe gebildet, deren Identität in einem weiteren Restriktionsschritt mit dem häufig schneidenden Restriktionsenzym, BsuRI, untersucht wurde. Abschließend wurde der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  jeweils mit allen einzigartigen Klonen (Größe, Fragmentmuster) transformiert und auf LB-Amp-Platten nach Klonen die den jeweiligen *prey*-Plasmid enthalten, selektiert. Dadurch konnte die gewöhnlich in Hefen vorliegende niedrige Vektorzahl durch Vermehrung in *E.coli* erhöht werden, um nach der Isolation aus *E.coli* ausreichend Material für eine Sequenzierung zur Verfügung zu haben. Abschließend wurden die cDNA-Fragmente von 78 Klonen sequenziert.



**Abbildung 23:** Analyse der cDNA-Inserts der gewachsenen Klone zum Auffinden identischer Klone.

Die gewachsenen Klone wurden für die weitere Analytik in QDO-Medium angezogen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA isoliert. Durch Amplifikation der Insert-DNA mittels Polymerasekettenreaktion wurden die Klone nach Fragmentgrößenbereichen sortiert. Durch anschließende Restriktion der PCR-Fragmente mit BsuRI, einem häufig schneidenden Restriktionsenzym, konnten Klone mit gleichem Insert identifiziert werden. In der gewählten Abbildung zeigen z.B. die Klone 1,2,4 und 5 eine ähnliche Fragmentgröße. Nach dem Verdau mit BsuRI können die identischen Klone 1,2 und 4 identifiziert werden. Klon 5 weist ein anderes Bandenmuster auf.

#### 5.7.4.1 Sequenzanalyse der identifizierten Interaktionspartner

Von den ermittelten Sequenzen wurden Regionen des Vektors und die Linkerregion entfernt und mit dem Programm BLAST des EBI homologe Sequenzen identifiziert. Danach wurde in

Sequenzvergleichen mit dem Programm ClustalW überprüft, in welchen Bereichen die sequenzierten Klone mit den Sequenzen der Datenbank übereinstimmen. Nur wenn es sich dabei um proteinkodierende Bereiche handelte, wurden die Klone als potentielle Interaktionspartner in Erwägung gezogen. Ebenso wurden Klone nicht weiter analysiert, von denen aus Datenbanken bzw. Literatur (van Criekinge & Beyaert, 1999) bekannt war, in Y2H-Durchmusterungen falsch positive Signale zu liefern. Darunter waren während der durchgeführten Durchmusterung PCNA (proliferating cell nuclear antigen), Ribosomales Protein L17, die mitochondrial kodierten Proteine ATPsynthase Protein 6, Ubiquinol Cytochrom C Reduktase und Propionyl-CoA-Carboxylase. Abschließend wurde überprüft, ob der Leserahmen der identifizierten Interaktionspartner in der richtigen Abfolge zur Gal4-DNA-AD vorlag. Leserahmenverschiebungen zwischen beiden Domänen konnten als Hinweis darauf herangezogen werden, dass der Interaktionspartner möglicherweise ein falsch positives Signal liefert. Allerdings ist von Hefen auch bekannt, dass sie translationale Leserahmenverschiebungen zulassen. Daher wurden diese Klone nicht aussortiert. Eine Liste der identifizierten Interaktionspartner zeigt Tabelle 1. Neben der Bezeichnung der identifizierten Interaktionspartner sind dort zusätzlich der Genname, die Uniprot-Zugangsnummer, die Länge der Proteinsequenz, falls möglich die Länge der vom Klon kodierten Sequenz, mit etwaigen zusätzlichen Aminosäuren, angegeben.

Protein	ALIAS	Gen-Name	Uniprot Eintrag	Proteingröße	Sequenzbereich
armadillo repeat containing x-linked 1	ALEX1	Aimcx1	G9CX83	456 AA	V172-A362
EYA4 protein	-	Eya4	Q0VAV8	616 AA	V174-L384
Girdin (KIAA1212)	Girders of actin filament Akt phosphorylation enhancer APE	Grdn Kiaa1212	Q5SNZ0	1873 AA	G1318 - S1873 L 1351
G-protein signalling modulator 1	Hook-related protein 1 HkRPI G alpha-interacting vesicle-associated protein GIV	Gpsm1	Q6IR34	650 AA	G461-S650 I462-S650 G177-S650 A125-S650 G315-K672 L84-K672
G-protein signalling modulator 2	AGS3-like, C. elegans	Gpsm2	Q8VDU0	672 AA	L84-K672
KIAA 1045	Protein PCD-5	Kiaa1045	Q80TL4	400 AA	CTRTVP-E54-S400
Purkinje Cell Protein 2 (L7)	Purkinje cell-specific protein L7	Pcp2 Pcp-2	P12660	120 AA	M1-P120 VSGCCLEDREGTDQTKPITSVPK-A2-P120 DREGTDQTKPITSVPK-A2-P120 D6-P120 T-M1-P120 ALLSPISL-A2-P120 PVRT-M1-P120 GVRGRSGKETQVSRFRIQLQTREY-G3 - P120
Rap1Gap (KIAA0474)	-	Rap1gap Rap1ga1 mKIAA0474	Q6A063	726 AA	A1 - C726 A1 - C726 G3-P647
Regulator of G-protein signaling 14	RGS14	Rgs14	P97492	547 AA	A1 - C726 A10 - C726 G3-P647
Regulator of G-protein signaling 17	RAP1/RAP2-interacting protein RGS17 Regulator of Gz-selective protein signaling 2	Rgs17 Rgsz2	Q9QZB0	210 AA	E77-S210 K3-C206 D-M1-R189
Regulator of G-protein signaling 19	RGS19	Rgs19	Q9CX84	216 AA	DFGARRRD3GTRRSARILCCSEGPQLAPQNLGNPLHSP+M1-V147 DFGARRRD3GTRRSARICCSGPELAPQNLGNPLHSP M1-P162
Regulator of G-protein signaling 20	RGS20 Regulator of G-protein signaling Z1	Rgs20 Rgsz1	Q9QZB1	239 AA	A10-M211 P82-A239 S13-L205 184-AA
similar to apolipoprotein A1 binding protein	from Rattus norvegicus BC028663 protein [Fragment] Protein Ric-8A	BC028663	Q8R2K0	-	184-AA
synembryn	-	Ric8a Ric8	Q3TIR3	530 AA	PAQAFQHPVPGA+M1-Q180 VFPAQAFQHPVPGA+M1-D530 FQHPVPGA+M1-D530
TNF alpha induced protein 8	SCC-S2 GG2-1	Tnfaip8	Q921Z5	198 AA	RAVQLRGTLDRPALHSSRRRRRALPP-M1-F167 Isoform 2 PPGVLRGPREAVQLRGTALDRPALHSSRRRRRALPP-M1-I198 LTSMSVAVP/AVHPDS-M1-G176 Isoform 1
Isoform 2	-	-	-	-	-
c-erba alpha3	Thyroid hormone receptor alpha C-erba-alpha	Thra	P63058	-	-
fatty acid binding protein 3	H-FABP	Fabp3	P11404	-	-
Poly(rC)-binding protein 1	Heart-type fatty acid-binding protein Mammary-derived growth inhibitor MDGI	Fabph1	-	-	-
synaptotagmin XI	Alpha-CP1 hnRNP-E1 SyTXI	Pcbp1 Sy11	P60335 Q9R0N3	-	-

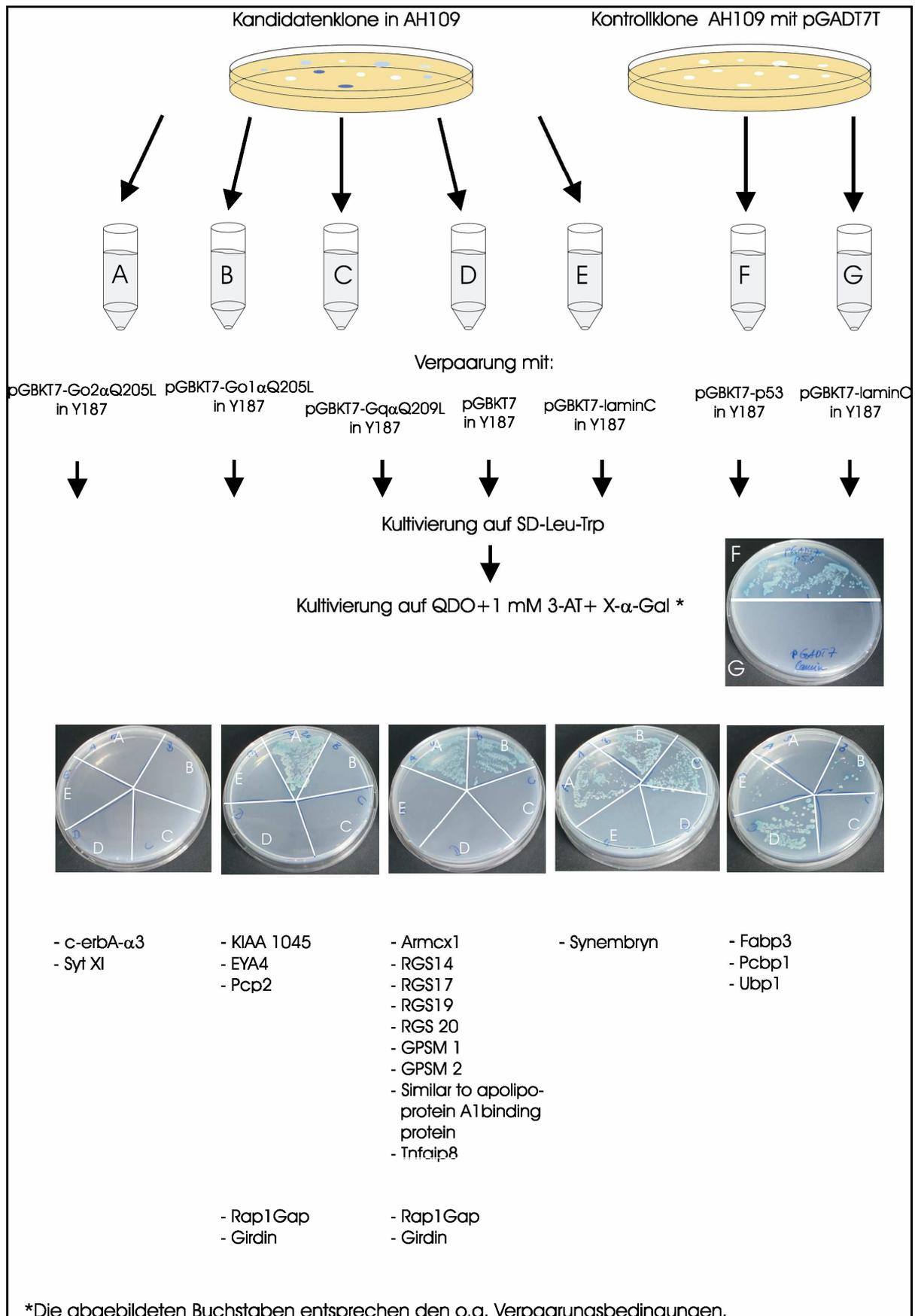
**Tabelle 1: Ergebnis der Sequenzierung der Plasmid-DNA aus den untersuchten Klonen des Yeast-two-hybrid-Screenings.**

Angegeben sind der Name der jeweiligen Proteine sowie etwaige abweichende Bezeichnungen. Für jedes Protein ist die Uniprot-Zugangsnummer sowie die Länge der zugehörigen Proteinsequenz angegeben. Unter Sequenzen ist die tatsächlich kodierte Aminosäuresequenz aller Klone eines Proteins mit exakter Positionsangabe verzeichnet (fettgedruckt). Etwaige zusätzliche Aminosäuren sind angegeben. Nicht fettgedruckte Kandidatenproteine stellten sich in späteren Tests als falsch positiv heraus.

### 5.7.5 Überprüfung der Spezifität der Interaktionspartner

Um einerseits die Interaktion der identifizierten *prey*-Proteine mit dem Fusionsprotein Gal4-DNA-BD-GO2QL zu kontrollieren, und darüber hinaus die Spezifität für Go2 $\alpha$  gegenüber anderen G $\alpha$ -Untereinheiten zu testen, wurden verschiedene Hefeverpaarungen der unterschiedlich transformierten Stämme AH109 und Y187 durchgeführt. Die während der Durchmusterung identifizierten potentiellen Interaktionspartner wurden genutzt, um den Hefestamm AH 109 zu transformieren, wodurch sichergestellt ist, dass wirklich nur der jeweilige *prey*-Vektor in den jeweiligen Transformanten vorliegt. Der Stamm Y187 wurde mit den Vektoren transformiert, die für konstitutiv aktives Go2 $\alpha$  (pGBKT7Go2 $\alpha$ Q205L), konstitutiv aktives Go1 $\alpha$  (pGBKT7Go1 $\alpha$ Q205L), konstitutiv aktives Gq $\alpha$  (pGBKT7Gq $\alpha$ Q209L), humanes Lamin C (pGBKT7laminC) bzw. die unveränderte Gal4-DNA-bindende Domäne (pGBKT7) kodieren. Alle Interaktionspartner in AH109 wurden mit jedem der Kontrollvektoren in Y187 verpaart und die diploiden Zellen auf SD-Leu-Trp angezogen. Anschließend wurden die diploiden Zellen auf QDO-Selektionsmedium überführt. Nach sieben bzw. 14 Tagen wurde das Wachstum überprüft. Zu Kontrollzwecken wurde AH109 mit dem Vektor pGADT7T und Y187 mit den Vektoren pGBKT7-p53 bzw. pGBKT7-laminC transformiert. Bei der Verpaarung dieser Kontrollvektoren war - wie zu erwarten - Wachstum bei diploiden Zellen zu erkennen, die mit Vektoren für die Fusionsproteine von p53 und SV40-T-Antigen ausgestattet waren. Gleichzeitig war kein Wachstum bei der Kombination der Fusionsproteine von Lamin C und p53 zu erkennen.

Für die Fusionsproteine der Interaktionspartner mit den verschiedenen Kontrollproteinen konnten folgende Beobachtungen, die auch in Abbildung 24 dargestellt sind, gemacht werden. Für die Proteine Synaptotagmin XI und c-erb- $\alpha$ 3 konnte mit keinem der eingesetzten Kontrollvektoren, auch nicht mit pGBKT7Go2 $\alpha$ Q205L, Wachstum auf QDO-Medium beobachtet werden, was auf eine falsch positiv angezeigte Interaktion hinweist.



**Abbildung 24:** Kontrollexperimente zur Bestätigung der Interaktion mit konstitutiv aktivem Go2α mittels Hefeverpaarung. Gleichzeitig wurde getestet, ob die im Screening identifizierten Klone auch mit der konstitutiv aktiven Go1α Isoform oder mit konstitutiv aktivem Gqα interagieren.

Der Hefestamm AH109 wurde mit der isolierten Plasmid-DNA aus Kandidatenklonen bzw. Kontroll-DNA (pGADT7-T) transformiert und auf SD-Leu ausplattiert. Die gewachsenen Kolonien wurden mit dem unterschiedlichen Plasmiden tragenden Stamm Y187 verpaart. Die verschiedenen Y187-Klone für die Verpaarung mit Kontroll-DNA enthielten pGBKT7-p53 oder pGBKT7-laminC. Für die Kandidatenklone erfolgte eine Verpaarung mit Y187-Zellen, die entweder mit Plasmiden der Fusionsproteine aus Gal4-DNA-BD mit konstitutiv aktiven G $\alpha$ -Untereinheiten (Go2 $\alpha$ , Go1 $\alpha$ , Gq $\alpha$ ) oder mit den Kontrollvektoren pGBKT7 bzw. pGBKT7-laminC transformiert waren. Die verpaarten Hefezellen (A-G) werden dann auf SD-Leu-Trp kultiviert und danach das Wachstum auf QDO+3AT+X $\alpha$ -Gal getestet.

Wie erwartet, zeigten verpaarte Zellen mit dem p53-Fusionsprotein und dem SV40-T-Antigen-Fusionsprotein Wachstum auf QDO-Medium und eine deutliche Blaufärbung des Nährmediums (F), wohingegen verpaarte Zellen mit SV40-T-Antigen-Fusionsprotein und Lamin-C-Fusionsprotein kein Wachstum zeigten (G).

Für die Plasmide der Kandidatenklone konnten fünf verschiedene Wachstumsschemata beobachtet werden:

1. kein Wachstum bei A, B, C, D oder E; die Klone konnten als falsch positiv aussortiert werden
2. Wachstum nur von A; diese Klone lassen auf eine alleinige Interaktion des Proteins mit der konstitutiv aktiven Isoform Go2 $\alpha$  schließen
3. Wachstum von A und B; diese Klone interagieren offensichtlich mit beiden Go $\alpha$ -Isoformen aber nicht mit Gq $\alpha$
4. Wachstum von A, B und C; diese Klone interagieren sowohl mit beiden Go $\alpha$ -Isoformen und Gq $\alpha$
5. Wachstum auf D oder E; diese Klone zeigen auch Wachstum mit den Kontrollvektoren und sind deshalb ebenfalls als falsch positiv auszusortieren
6. eine Sonderstellung nehmen Rap1Gap und Girdin ein, da bereits nach 7 Tagen starkes Wachstum von A zu erkennen war und erst nach 14 Tagen auch Wachstum von B beobachtet werden konnte; das lässt auf eine stärkere Interaktion mit Go2 $\alpha$  als mit Go1 $\alpha$  schließen

Für die Proteine Fabp3, Pcbp1 und Ubp1 konnte auch Wachstum mit den Kontrollproteinen Lamin C und der Gal4-DNA-bindenden Domäne allein beobachtet werden. Diese Proteine scheinen die Reportergene daher unspezifisch zu aktivieren.

Das Protein Synembryn zeigt Wachstum mit den konstitutiv aktiven Go $\alpha$ - und Gq $\alpha$ -Untereinheiten und ist somit nicht für Go $\alpha$  spezifisch. Der größte Teil der identifizierten Go2 $\alpha$ -Interaktionspartner zeigt ebenfalls Wachstum mit Go1 $\alpha$ , darunter Armcx1, die identifizierten RGS-Proteine, GPSM1 und 2, Tnfaip8 und das Apolipoprotein A1-ähnliche Protein. Die einzigen Proteine, die spezifisch nur mit Go2 $\alpha$  wechselwirken, sind Pcp2, Eya4 und das Protein KIAA1045. Eine Sonderstellung nehmen Rap1Gap sowie Girdin ein, die bereits nach einer Woche starkes Wachstum mit dem Go2 $\alpha$ -Fusionsprotein aufwiesen. Nach zwei Wochen zeigten sich für beide Proteine auch vereinzelte Kolonien nach Verpaarung mit dem Stamm Y187, der mit dem Go1 $\alpha$ -Fusionsprotein transformiert war. Dadurch kann man auf eine stärkere Interaktion mit konstitutiv aktivem Go2 $\alpha$  als mit konstitutiv aktivem Go1 $\alpha$  schließen.

## 6 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Funktion und Bedeutung von Teilen eines Signaltransduktionsprozesses untersucht, der entscheidenden Einfluss auf die Menge an in synaptischen Vesikeln gespeicherten Monoaminen hat. Da die Freisetzung der gespeicherten Monoamine infolge eines Aktionspotentials unabhängig vom Füllungszustand erfolgt, d.h. leere und gefüllte Vesikel mit gleicher Wahrscheinlichkeit mit der Plasmamembran fusionieren können (van der Kloot et al., 2000), kann über eine variable Füllung der Vesikel die postsynaptische Antwort moduliert werden. Das ist insbesondere deshalb möglich, weil durch einzelne Exozytoseprozesse nicht alle postsynaptischen Rezeptoren gesättigt werden. Da die Monoamine zumeist über metabotrope Rezeptoren an vielen verschiedenen Zielzellen wirken und nicht auf die postsynaptische Membran einer Zielzelle beschränkt sind, gewinnt diese Modulation der Transmitterfreisetzung im ZNS zusätzlich an Bedeutung. Das ist insbesondere wichtig, weil Monoamine an vielfältigen Gehirnfunktionen, wie der Steuerung von Bewegungen, Motivation, Emotionen, Gedächtnis sowie Aufmerksamkeit beteiligt sind (siehe 3.4.1). Untersuchungen an neuroendokrinen Zellen (Ahnert-Hilger et al., 1998; Höltje et al., 2000), permeabilisierten Thrombozyten (Höltje et al., 2003) und transfizierten CHO-Zellen (Brunk et al., 2006) belegen, dass die Verminderung des vesikulären Monoamintransports durch heterotrimere G-Proteine ein häufiges Prinzip ist und in allen VMAT exprimierenden Zellen beobachtet werden kann. Neben Gehirnfunktionen werden durch dieses Regulationsprinzip daher auch weitere wichtige Körperfunktionen, wie z.B., die endokrine Hormonfreisetzung aus der Nebenniere, beeinflusst.

Einen Schwerpunkt dieser Arbeit bildete die Untersuchung, welche Strukturen der vesikulären Neurotransmittertransporter für die G-Protein vermittelte Regulation von Bedeutung sind. Hierzu wurden bereits einige Vorarbeiten geleistet. Deren Resultate werden deshalb unter 6.2 gemeinsam mit den Ergebnissen dieser Arbeit dargestellt. Im Anschluss wird die Untersuchung in der Literatur beschriebener Einflussfaktoren der vesikulären Neurotransmitterspeicherung im Hinblick auf die Beteiligung an der Regulation durch  $Go2\alpha$  diskutiert. Danach werden Untersuchungen zu Dopaminspeicherung und -metabolismus in Zellen, in denen die  $Go2\alpha$ -Untereinheit inaktiviert wurde, und in  $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten der Maus analysiert. Den Schlusspunkt bildet die Identifizierung nachgeschalteter Zielproteine von  $Go2\alpha$  mittels Y2H-Screening.  $Go2\alpha$  reguliert die VMAT im ZNS und in neuroendokrinen Zellen und kann darüber hinaus den Dopaminstoffwechsel beeinflussen. Über welche nachgeschalteten Effektoren von  $Go2\alpha$  diese Regulation bzw. Beeinflussung erfolgen könnte, ist bisher nicht bekannt. Prinzipielle durch  $Go2\alpha$  veränderbare Einflussgrößen der vesikulären Monoaminspeicherung werden unter Punkt 6.1 dargestellt.

## 6.1 Faktoren die den vesikulären Neurotransmittertransport beeinflussen

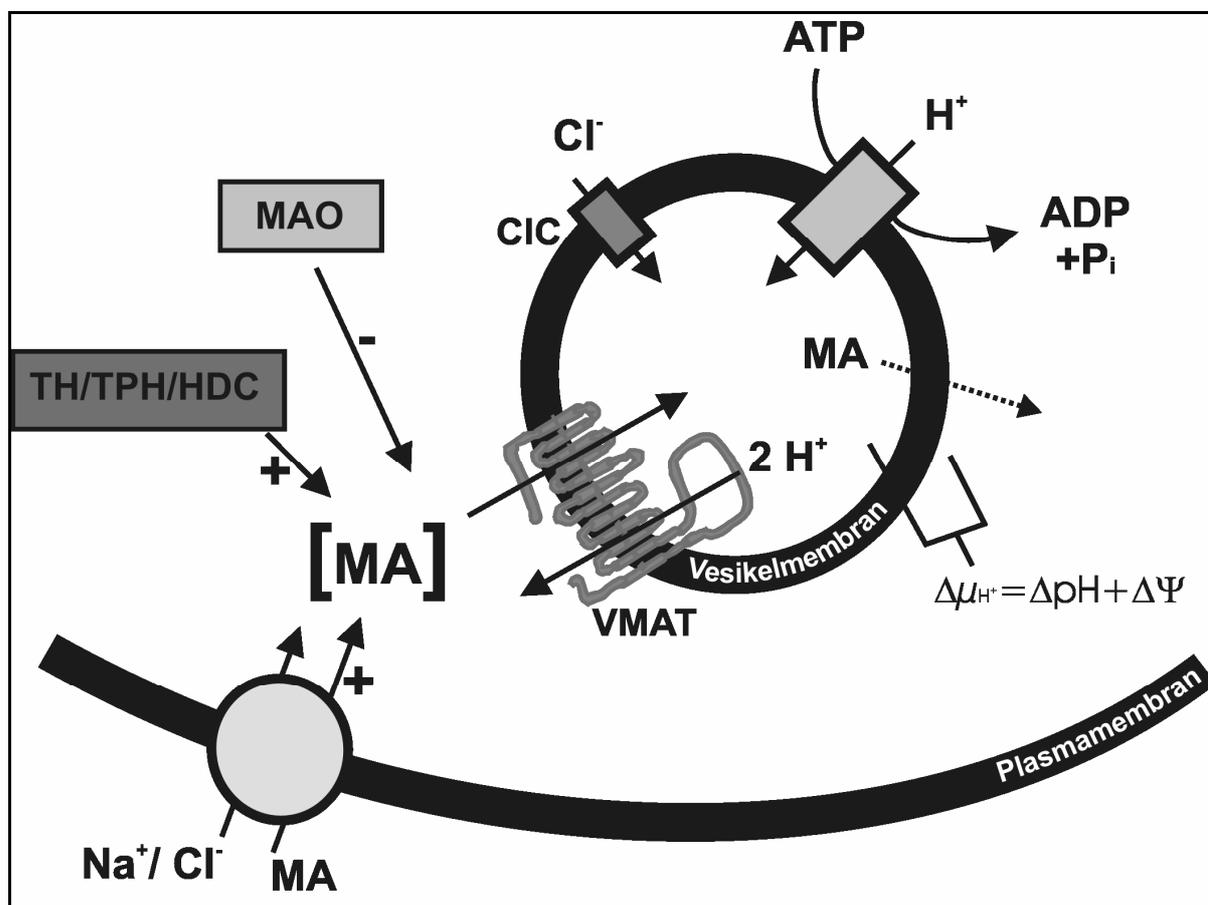
Alle im Folgenden aufgeführten Parameter können die vesikuläre Neurotransmitteraufnahme beeinflussen. Sie kommen daher als Regelgrößen in Frage, die durch  $Go2\alpha$ -vermittelte Signalkaskaden moduliert werden können. Neben den Parametern, die den vesikulären Monoamintransport erhöhen, zählen dazu unter *in vivo*-Bedingungen auch alle Prozesse, die die intrazelluläre Monoaminkonzentration beeinflussen. Bei der *in vitro*-Untersuchung von Transportprozessen in permeabilisierten Zellen und an Vesikeln sind diese die Monoaminkonzentration beeinflussenden Faktoren zu vernachlässigen.

In jedem Fall von Bedeutung ist die Triebkraft für den Neurotransmittertransport in synaptische Vesikel - der Protonengradient über die Vesikelmembran. Dieser wird durch die vakuoläre  $H^+$ -ATPase (v-ATPase) generiert, die strukturell und funktionell mit der mitochondrialen  $F_0/F_1$ -ATPase verwandt ist. Im Gegensatz zur  $F_0/F_1$ -ATPase nutzt die v-ATPase die Hydrolyse von ATP, um Protonen in das Vesikellumen zu pumpen. Der Protonengradient über die Vesikelmembran hat einerseits einen pH-Gradienten ( $\Delta pH$ ) und andererseits einen elektrischen Gradienten ( $\Delta \Psi$ ) zur Folge, die gemeinsam zum elektrochemischen Gradienten  $\Delta \mu H^+$  zusammengefasst werden. Die direkte Regulation der v-ATPase in Säugern ist bisher nicht untersucht. Dafür liegen zahlreiche Informationen vor, dass vor allem Chloridionen zu einer sekundären Aktivierung der vATPase führen können. Durch  $Cl^-$ -Transport in die Vesikel wird  $\Delta \Psi$  vermindert, wodurch die vATPase mehr Protonen in das Vesikellumen pumpen kann. Dadurch ist es gleichzeitig möglich,  $\Delta pH$  und  $\Delta \Psi$  unabhängig voneinander zu regulieren. Die VMAT transportieren Monoamine im Austausch gegen zwei Protonen in das Vesikellumen. Da die Monoamine in protonierter Form transportiert werden, ergibt sich eine stärkere Abhängigkeit von  $\Delta pH$  gegenüber  $\Delta \Psi$ . Neben der Aktivität der v-ATPase kann somit auch die intraluminale Chloridkonzentration die Monoaminspeicherung im Vesikel durch die Modulation von  $\Delta \mu H^+$  beeinflussen.

Neben der Regulation des elektrochemischen Gradienten kann auch die Aktivität der VMAT selbst zu einer veränderten Monoaminspeicherung führen, wie mit der Überexpression der VMAT gezeigt werden konnte (Pothos et al., 2000). Zusätzlich sind dabei auch weitere posttranslationale Modifizierungen der VMAT, die deren Aktivität ändern, denkbar.

Neben den zuvor genannten Faktoren, die ausnahmslos den Transport in die Vesikel modifizieren, kann auch der unspezifische Verlust an Monoaminen aus dem Vesikellumen die Neurotransmitterspeicherung beeinflussen (Eisenhofer et al., 2004). Insbesondere die Lipidzusammensetzung und der Proteingehalt der Vesikelmembran könnten durch Veränderung der Membranpermeabilität dazu beitragen.

Ein bedeutender *in vivo* regulierter Parameter ist die zytoplasmatische Monoaminkonzentration, die durch den Plasmamembrantransport sowie synthetisierende und abbauende Stoffwechselwege beeinflusst wird.



**Abbildung 25:** Schema der Faktoren, die die vesikuläre Monoaminspeicherung maßgeblich beeinflussen und daher Zielstrukturen der Go2α-vermittelten Signaltransduktion sein können.

Zu diesen Faktoren zählen einerseits alle Mechanismen, die die zytoplasmatische Monoaminkonzentration verändern, andererseits alle Mechanismen, die den Transport und die Speicherung von Monoaminen im Vesikel beeinflussen.

Die zytoplasmatische Monoaminkonzentration wird einerseits durch die Wiederaufnahme extrazellulärer Monoamine im Kotransport von Natrium- und Chloridionen über verschiedene Plasmamembrantransporter erhöht. Zusätzlich erhöht die Biosynthese der Monoamine die zytoplasmatische Monoaminkonzentration. Dafür sind in dem Schema stellvertretend die Schlüsselenzyme der verschiedenen Biosynthesewege angegeben (TH: Tyrosinhydroxylase; TPH: Tryptophanhydroxylase; HDC: Histidindecaboxylase). Gleichzeitig kann die zytoplasmatische Monoaminkonzentration durch abbauende Biosynthesewege, die über die Monoaminoxidasen (MAO) verlaufen, vermindert werden.

Zu den Faktoren, die den vesikulären Monoamintransport und die Monoaminspeicherung beeinflussen, zählen zunächst alle Parameter, die die Triebkraft des Neurotransmittertransports - den elektrochemischen Gradienten über die Vesikelmembran ( $\Delta\mu_{H^+}$ ) - verändern. Dazu zählt primär die v-ATPase, durch deren Aktivität der Protonengradient über die Vesikelmembran hergestellt wird. Sekundär kann dieser Protonengradient auch durch Transport von Cl<sup>-</sup> in das Vesikellumen moduliert werden. Durch Verminderung von  $\Delta\Psi$  können dadurch mehr Protonen in das Vesikellumen gepumpt und ein höherer  $\Delta pH$  erreicht werden. Zusätzlich kann auch die direkte Beeinflussung des VMAT die transportierte bzw. gespeicherte Monoaminmenge verändern. Neben den Transportprozessen, die Monoamine in das Vesikellumen überführen, können auch Variationen unspezifischer Verluste über die Vesikelmembran (gepunkteter Pfeil) die vesikuläre Monoaminmenge verändern. Ein denkbarer Parameter hierfür ist die Membranpermeabilität, die durch Faktoren, wie z.B. Lipidzusammensetzung oder Proteingehalt, moduliert werden könnte.

MA: Monoamin; +: Erhöhung; -: Verminderung; ClC: Chloridkanal; VMAT: vesikulärer Monoamintransporter

## 6.2 Domänen der VMAT sind an der Regulation der Monoamin-speicherung durch Go2 $\alpha$ beteiligt

Untersuchungen an permeabilisierten Thrombozyten von Tryptophanhydroxylase-1-Deletionsmutanten der Maus (Walther et al., 2003; Höltje et al., 2003) führten zu der grundlegenden Idee, dass die vesikulären Monoamintransporter selbst an der Signaltransduktion, die den vesikulären Füllungsstatus reguliert, als vorgeschaltete Rezeptorstruktur beteiligt sind. Untersuchungen an mit VMAT1 bzw. VMAT2 transfizierten und permeabilisierten CHO-Zellen stützen dabei die zuvor gemachten Beobachtungen (Brunk et al., 2006). Der Vorteil dieser beiden „vereinfachten“ Modellsysteme ist, dass sie erlauben, die Neurotransmitteraufnahme und deren Regulation an quasi leeren Vesikeln zu untersuchen. Voraussetzung dabei ist die Permeabilisierung der Plasmamembran, wodurch Beeinflussungen der Transportprozesse durch Plasmamembrantransporter ausgeschlossen werden können.

Die Tryptophanhydroxylase-1 (Tph1) ist das Schlüsselenzym der Serotoninsynthese außerhalb des ZNS. Das extraneuronale Serotonin wird zu einem Großteil in den vesikulären Strukturen der Thrombozyten gespeichert. Fehlt die Tph1, sind nur noch 6% der Menge des Serotonins gegenüber Wildtypthrombozyten nachweisbar, wobei andere Monoamine vernachlässigt werden können (Höltje et al., 2003). In Untersuchungen an diesen leeren Thrombozyten stellte sich heraus, dass die durch G-Proteinaktivierung verursachte Verminderung der Neurotransmitterspeicherung in permeabilisierten, leeren Vesikeln fehlt, aber durch Vorbeladung mit Serotonin bzw. Noradrenalin wieder hergestellt werden kann. Dies war der erste Hinweis darauf, dass die Füllung des Vesikels mit Monoaminen das auslösende Signal der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion am Vesikel ist (Höltje et al., 2003). Unbekannt war aber, welcher, ins vesikuläre Lumen ragende Rezeptor, dafür verantwortlich war.

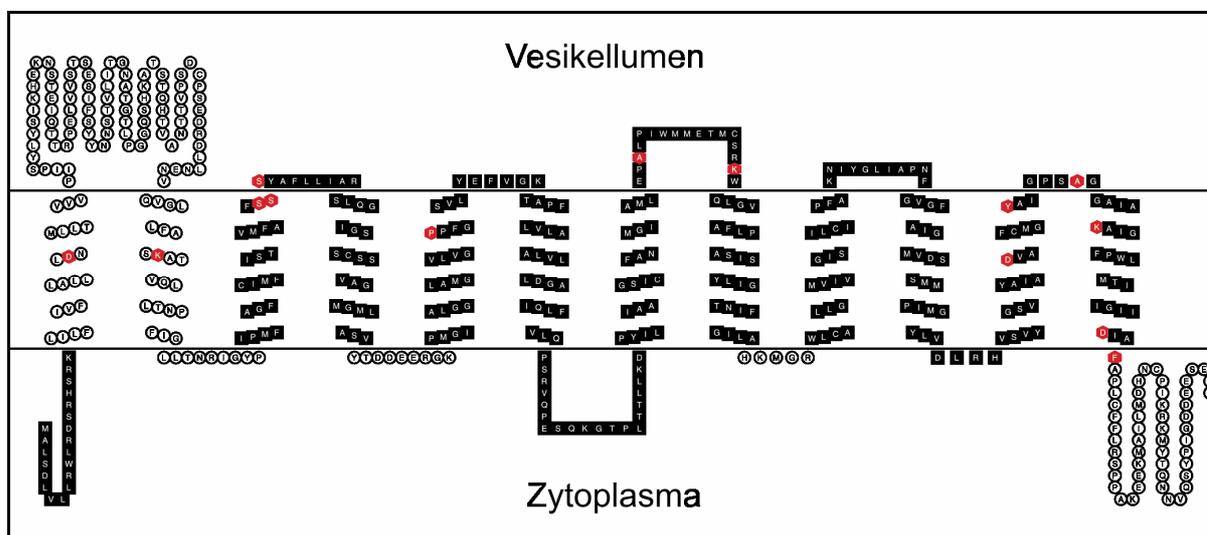
Untersuchungen an permeabilisierten CHO-Zellen die mit VMAT1 bzw. VMAT2 transfiziert wurden, unterstützen die zuvor beschriebenen Beobachtungen. Wie die „leeren“ Thrombozyten der Tph1-Deletionsmutanten stellen CHO-Zellen ein monoaminfreies System dar, zusätzlich fehlen die Transporter der Plasmamembran und die VMAT. Auch in VMAT-CHO-Zellen kann die G-Protein-vermittelte Hemmung der Monoaminspeicherung durch Vorbeladung mit Monoaminen, die allerdings erst nach einer Permeabilisierung der Plasmamembran erfolgen konnte, induziert werden (Brunk et al., 2006). Dafür sind, vermutlich aufgrund der Lokalisation der VMAT auf - gegenüber sekretorischen Vesikeln - größeren intrazellulären Kompartimenten (Liu et al., 1997), höhere Konzentrationen an Monoaminen von 300  $\mu$ M - 1 mM nötig. Da der VMAT ein breites Substratspektrum besitzt, kann die G-Protein-vermittelte Regulation durch Vorbeladung mit jeglichem Monoamin erfolgen. Überraschenderweise bildet Adrenalin hierbei eine Ausnahme. Obwohl Adrenalin ein Substrat für beide VMAT-Isoformen ist, kann es nur in VMAT1-transfizierten CHO-Zellen eine G-Protein-

vermittelte Regulation auslösen. Darüber hinaus hebt Adrenalin in allen VMAT2-Modellsystemen, VMAT2-CHO-Zellen, Thrombozyten der Ratte und in synaptischen Vesikelpräparationen eine durch andere Monoamine ausgelöste G-Protein vermittelte Verminderung des Monoamintransports wieder auf (Brunk et al., 2006). Diese Experimente in CHO-Zellen bestätigen, dass die Füllung vesikulärer Strukturen die Voraussetzung der Regulation des Monoamintransports durch G-Proteine ist. Sie lassen erstmals den Schluss zu, dass die VMAT selbst an dieser Regulation beteiligt sind. Wie bereits mehrfach erwähnt wurde, sind CHO-Zellen ein komplett monoaminfreies System. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass zelleigene monoaminsensitive Rezeptoren an der Auslösung und Weiterleitung beteiligt sind. Geht man von einer Beteiligung der VMAT am Regulationsprinzip aus, lässt sich zusätzlich feststellen, dass die beteiligten Strukturen für die beiden Isoformen verschieden sind, wie die unterschiedliche Wirkung von Adrenalin zeigt.

In nachfolgenden Experimenten wurden die rezeptorartigen Strukturen von VMAT1 und VMAT2 genauer charakterisiert. Durch den Einsatz verschiedener Agonisten und Antagonisten in den verschiedenen Modellsystemen (siehe 5.1) konnte für den VMAT2 gezeigt werden, dass 5HT1B-Rezeptoragonisten und -antagonisten in der Lage sind, die G-Proteinvermittelte Hemmung zu induzieren bzw. zu blockieren (Brunk et al., 2006). Im Gegensatz dazu sind 5HT1B-Agonisten und Antagonisten in VMAT1-Systemen wirkungslos. So kann der 5HT1B-Rezeptoragonist Anpirtolin in CHO-VMAT2-Zellen eine G-Protein-vermittelte Regulation der Neurotransmitteraufnahme induzieren, nicht aber in CHO-VMAT1-Zellen (Brunk et al., 2006). In CHO-VMAT1-Zellen scheint eine  $\alpha$ 1-rezeptorartige Struktur als auslösendes Signal der G-Proteinregulation verantwortlich zu sein, wie in Experimenten mit dem  $\alpha$ 1-Rezeptoragonist Cirazolin gezeigt werden konnte (Brunk et al., 2006). Diese Beobachtungen für den VMAT1 werden durch Teile dieser Arbeit unterstützt. So kann in permeabilisierten PC12-Zellen, die ausschließlich den VMAT1 exprimieren, durch den Einsatz des  $\alpha$ 1-Rezeptorantagonisten Prazosin, nicht aber durch den 5HT1B-Rezeptorantagonisten Isamoltan, die G-Protein vermittelte Hemmung nahezu vollständig aufgehoben werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Beobachtung, dass sich die vesikulären Rezeptorstrukturen für VMAT1 und VMAT2 unterscheiden. Aufgrund der Gültigkeit in allen VMAT1- bzw. VMAT2-Systemen unterstützen diese Ergebnisse ein weiteres Mal, dass die VMAT selbst an der Regulation des vesikulären Füllungszustandes beteiligt sind. Sowohl in Thrombozyten als auch in CHO-Zellen konnten bisher keine 5HT1B-Rezeptoren nachgewiesen werden (Walther et al., 2003; Pullarkat et al., 1998), wodurch die Beteiligung zelleigener, klassischer heptahelikaler Rezeptoren zusätzlich unwahrscheinlich wird.

Unter der Einbeziehung der zuvor beschriebenen Ergebnisse, dass beide VMAT eine rezeptorähnliche Struktur besitzen, die in beiden Isoformen verschieden ist, sollte festgestellt

werden, welche in das Vesikellumen ragenden Regionen der VMAT daran beteiligt sein könnten. In der Literatur sind bereits zahlreiche Beispiele für funktionell relevante Aminosäuren und Bereiche der VMAT beschrieben. Für die Substraterkennung des VMAT2 wichtige Regionen sind die Bereiche der Transmembrandomänen III-IV, V-VIII sowie IX-XII, wobei zusätzlich N-terminale Regionen die Substrataffinität beeinflussen können (Peter et al., 1996). Innerhalb der Transmembrandomänen wurden zahlreiche Aminosäuren mit geladenen Seitenketten charakterisiert, die essentiell für Substratbindung und Transport sind. So verursachen Mutationen der Aminosäuren Lysin (K139) in TMDII, Aspartat (D33, D427, D461) in den Transmembrandomänen I, X und XI eine Verringerung der Substrataffinität bzw. beeinflussen den Monoamintransport (Merickel et al., 1995a; Peter et al., 1996, Merickel et al., 1997). Darüber hinaus ist bekannt, dass die Mutation der Serinreste S180-S182 (Ende TMDIII) zu Alanin den Serotonin und Histamintransport blockiert (Merickel et al., 1995b). Auch der Prolinrest P237 (TMD V; Finn 3rd & Edwards, 1998), Tyrosin an Position 434 (TMD XI; Peter et al., 1996) und Phenylalanin an Position 464 (TMD XII, Finn 3rd & Edwards 1997) beeinflussen entscheidend die Substraterkennung und den Transport des VMAT2. Neben den Aminosäuren der Transmembranregionen konnten auch in den luminalen und zytoplasmatischen Schleifenregionen bedeutende Aminosäuren identifiziert werden, die den Transport oder die Substrataffinität beeinflussen. Dazu gehören die Aminosäuren A315 (Schleife VII/VIII Finn 3rd & Edwards, 1998), K328 (Schleife VII/VIII), A440 und K446 (TMD XI/XII; Finn 3rd & Edwards, 1997).



**Abbildung 26: Bereiche des VMAT2, die für den Monoamintransport von Bedeutung sind.**

Dargestellt ist die Topologie des rVMAT2. Die schwarzgefüllten und viereckigen Aminosäuren gehören zu Bereichen des VMAT2, die einen Einfluss auf den Monoamintransport haben. Für rot markierte Aminosäuren konnte durch ortsspezifische Mutagenese eine entscheidende Bedeutung für Monoamintransport und -erkennung durch den VMAT2 gezeigt werden. Für Literaturangaben und Erläuterungen siehe Text (4.2).

Auf diesen Informationen basierend, erschien es nicht sinnvoll, Regionen der intraluminalen Regionen der Schleifen VII/VIII und XI/XII zu substituieren. Das Hauptaugenmerk richtete sich aus mehreren Gründen auf die große intravesikuläre Schleife zwischen den Trans-

membrandomänen I und II. Einerseits handelt es sich um einen Bereich, in dem sich VMAT1 und VMAT2 - zwischen denen eine Sequenzhomologie zu 62% besteht -, besonders unterscheiden. Dadurch könnte das unterschiedliche pharmakologische Verhalten der beiden Transporter erklärt werden. Andererseits handelt es sich um einen ausgeprägten luminalen Bereich des VMAT2, für den zum Zeitpunkt der Überlegungen noch keine Struktur-Funktionsbeziehungen vorlagen, und dessen Bedeutung unklar war. Neuere Untersuchungen schildern eine Bedeutung dieser Schleife bzw. deren Glykosylierungsstellen bei der Sortierung des VMAT innerhalb verschiedener Membrankompartimente in PC12-Zellen (Yao & Hersh, 2007). Wie die intraluminalen Glykosylierungsstellen die Sortierung, die ja eher über zytoplasmatisch orientierte Motive reguliert wird, wie z.B. das C-terminale Isoleucin-Leucinmotiv des VMAT2 (Tan et al., 1998), beeinflussen, bleibt dabei aber ungeklärt. Allerdings unterstützt diese Hypothese die nachfolgend beschriebenen Beobachtungen einer Signaltransduktion aus dem Vesikellumen. Die Signaltransduktion aus luminalen Strukturen ist bereits beschrieben worden. Ein bekanntes Beispiel für derartige Signaltransduktionsmechanismen ist der KDEL-Rezeptor, der für die Retention luminaler Proteine mit KDEL-Sequenz im endoplasmatischen Retikulum verantwortlich ist (Scheel & Pelham, 1998).

Unsere Untersuchungen an den VMAT2-Mutanten der Schleife zwischen den Transmembrandomänen I/II in CHO-Zellen, VMAT2 $\Delta$ P42-V130 bzw. VMAT2 $\Delta$ Q61-T113 belegen, dass diese Bereiche des VMAT2 für den Neurotransmittertransport von Serotonin nicht benötigt werden. Sie sind ein erster Hinweis darauf, dass diese Bereiche regulatorische Funktionen besitzen. Nachfolgende Experimente an permeabilisierten CHO-Zellen dieser VMAT-Konstrukte zeigen, dass die Schleife zwischen TMDI/II - und somit der VMAT2 selbst - an der Regulation des Monoamintransports in die Vesikel beteiligt ist. Diese Beobachtung stützt die Theorie, dass das Vesikel unter Beteiligung des VMAT2 selbst in der Lage ist, seinen Neurotransmittergehalt über die Aktivierung vesikelassoziierter heterotrimerer G-Proteine zu regulieren. Die gewonnenen Daten belegen nicht nur, dass der VMAT2 neben seiner Transporterfunktion auch rezeptorartige Anteile besitzt, sondern sind auch ein Beispiel dafür, dass Signaltransduktionswege auf der luminalen Seite von Endomembransystemen initiiert werden können.

Die für alle VMAT2-Konstrukte beobachteten  $K_M$ -Werte weichen teilweise um zwei Zehnerpotenzen von den in der Literatur beschriebenen  $K_M$ -Werten ab (Peter et al., 1994). Das wird vermutlich durch unterschiedliche Versuchsbedingungen, insbesondere die Temperatur, hervorgerufen. Im Vergleich zu den CHO-Zellen, die mit dem Wildtyp-VMAT2 transfiziert wurden, zeigen sich dagegen vergleichbare  $K_M$  und  $V_{max}$ -Werte, wodurch eine verlässliche Basis für die ermittelten Daten besteht. Die vergleichbaren  $V_{max}$  von Wildtyp-VMAT2 und VMAT2 $\Delta$ P42-V130 bzw. VMAT2 $\Delta$ Q61-T113, bestätigen nicht nur eine vergleichbare Serotonintransportrate, sondern auch vergleichbare Proteinexpressionsraten in den stabil trans-

fizierten CHO-Zelllinien zusätzlich zur Proteinexpressionskontrolle mittels Immunfluoreszenzfärbung des VMAT2.

Die Experimente mit VMAT1 und VMAT1 $\Delta$ H62-V117 transfizierten CHO-Zellen unterstützen die Beobachtungen, die zuvor für den VMAT2 gemacht wurden. Die Deletion von Bereichen der ersten intraluminalen Domäne führt auch beim VMAT1 zu einer Verminderung der G-Protein-vermittelten Inhibition des Neurotransmittertransports. Im Gegensatz zum VMAT2 führt die Deletion des zentralen Bereiches der ersten intravesikulären Schleife beim VMAT1 nur zu einer partiellen Aufhebung der G-Protein-vermittelten Hemmung. Die Ursache dafür könnte eine nur teilweise Deletion der Rezeptorstruktur sein. Allerdings erwies sich die Transfektion von CHO-Zellen mit dem VMAT1 insgesamt schwieriger als mit dem VMAT2. Die hergestellten VMAT1 $\Delta$ H62-V117-Zellen wiesen gegenüber dem VMAT1-Wildtyp eine stark verminderte Serotoninaufnahme auf. Für VMAT1-Konstrukte mit kompletter Schleifen-deletion war es leider nicht möglich, stabil transfizierte und funktionelle Zellklone herzustellen. Beide Beobachtungen deuten auf eine reduzierte Expression, veränderte Sortierung oder verminderte Transporteigenschaften der modifizierten Transportermoleküle hin. Die Beobachtung einer verminderten G-Proteinhemmung der Serotoninaufnahme nach Deletionen der ersten intraluminalen Schleife beim VMAT1 bedarf daher zusätzlicher Überprüfung. Unter der Voraussetzung, dass der VMAT2, ähnlich G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Plasmamembran, intravesikuläre Signale ins Zytoplasma leitet, sollten sich auch auf der zytoplasmatischen Seite Bereiche befinden, die an der Signaltransduktion beteiligt sind. Die Untersuchungen hierzu erbrachten jedoch nur unbefriedigende Ergebnisse. Deletionen in C-terminalen Bereichen, wie bei den Mutanten VMAT2 $\Delta$ R472-D515, denen der unmittelbare C-Terminus fehlt, als auch VMAT2 $\Delta$ R472-Y504, dem mittlere Anteile des C-Terminus fehlen, führen nicht zu einem Funktionsverlust des VMAT2. Allerdings kann auch in diesen VMAT2-Mutanten, wie auch bei mit Wildtyp-VMAT2 transfizierten CHO-Zellen, nach Vorbeladung mit Monoaminen eine G-Protein-vermittelte Verminderung des Monoamintransports beobachtet werden. Die Beteiligung an einer Signaltransduktion aus dem Vesikellumen, die zur Aktivierung von Go2 $\alpha$  führt, ist daher für den VMAT2 C-Terminus unwahrscheinlich. Ein weiterer Bereich des VMAT2, der in dieser Arbeit untersucht wurde, ist die zytoplasmatische Schleife zwischen den Transmembrandomänen VI und VII. Die Schleife wurde komplett gegen 5 Glyzinreste ausgetauscht. Trotz mehrfacher Versuche, funktionelle, stabil transfizierte Zelllinien zu generieren, zeigten die klonierten Zelllinien zwar eine Expression der mutierten Transportermoleküle, aber keine Transportaktivität. Da bekannt ist, dass die Transmembrandomänen V-VIII bedeutenden Anteil an der Substraterkennung und dem Transport haben (Peter et al., 1996) ist es möglich, dass diese Schleife essentiell für Substraterkennung und Transport ist, oder aber durch den Austausch gegen 5 Glyzinreste die beteiligten Transmembrandomänen VI und VII ungünstig zueinander positioniert sind. Um

die letztere Möglichkeit auszuschließen, könnten Konstrukte mit kleineren Substitutionen hergestellt und erneut getestet werden. Der einzige zytoplasmatische bisher nicht untersuchte Bereich ist die N-terminale Region des VMAT2. Diese Region wurde aufgrund einer Beteiligung an der Substraterkennung (Peter et al., 1996) bisher nicht untersucht. Da sich diese Region in räumlicher Nähe zur ersten intraluminalen Schleife befindet, könnte auch der Austausch kleinerer Bereiche des N-Terminus sinnvoll sein. Die komplette Deletion des N-Terminus scheint aufgrund der Beteiligung an der Substraterkennung weniger sinnvoll. Zusammenfassend belegen die erzielten Ergebnisse, dass die erste intraluminale Schleife des VMAT2, und vermutlich auch des VMAT1, an der intraluminalen Erkennungsstruktur für Monoamine beteiligt und für die Auslösung der G-Protein vermittelten Regulation des Monoamintransports essentiell sind. Allerdings bleibt weiter unklar, wie die Signaltransduktion ins Zytoplasma erfolgt. Deletionen und Substitutionen an zytoplasmatischen Anteilen der VMAT2 lieferten diesbezüglich keine Hinweise. Ob vesikelassoziierte G-Proteine direkt mit dem VMAT interagieren, konnte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls nicht endgültig geklärt werden. Die Überprüfung der direkten Interaktion von  $Go2\alpha$  und VMAT2 durch Koimmunopräzipitation bzw. chemische Quervernetzung ist nicht gelungen. Alternativ wäre auch denkbar, dass die Aktivierung des vesikelassoziierten  $Go2\alpha$  über einen weiteren Zwischenschritt erfolgt. Die Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen unabhängig von heptahelikalen Rezeptoren ist insbesondere für G-Proteine der Gi/o-Familie mehrfach beschrieben (siehe 3.5.1).

## **6.3 Nachgeschaltete Signalwege der Regulation des Monoamintransports durch $Go2\alpha$**

### **6.3.1 Die Adenylylzyklase kann den vesikulären Monoamintransport beeinflussen**

Für  $Go2\alpha$  sind in der Literatur bisher keine Isoform-spezifischen nachgeschalteten Signaltransduktionswege beschrieben. Die verfügbaren Informationen beschränken sich auf  $Go\alpha$ , wobei zu berücksichtigen ist, dass alle  $Go\alpha$ -Isoformen für die beschriebenen Effekte in Frage kommen. Dass sich  $Go1\alpha$  und  $Go2\alpha$  in all ihren Funktionen gleichen, ist durch die Kopplung mit verschiedenen Rezeptoren und Effektoren (siehe 3.5.2) sowie bereits beschriebenen unterschiedlichen Funktionen (Dhingra et al., 2002) auszuschließen.

In einem ersten Ansatz wurde daher überprüft, inwieweit die Aktivierung der Adenylylzyklase als potentielles nachgeschaltetes Signal möglich ist. cAMP, das durch die Adenylylzyklase gebildet wird, wurde bereits von Watts und Cumbay (Watts et al., 1998; Cumbay & Watts, 2001) mit der  $Go\alpha$ -Untereinheit in Verbindung gebracht. Sie konnten zeigen, dass die Aktivierung des  $D_{2L}$ -Rezeptors über  $Go\alpha$  zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels führt. Erhöhungen des cAMP-Spiegels führten in PC12-Zellen zu einer verminderten vesiku-

lären Monoaminaufnahme (Nakanishi et al., 1995 a; b). Durch Experimente in mit DbcAMP vorbehandelten PC12-Zellen konnte eine verminderte Monoaminaufnahme bestätigt werden. Die gleichzeitige Aktivierung von G-Proteinen durch GMP-P(NH)P führt dabei zu einer zusätzlichen Verminderung der Monoaminaufnahme. Unter der Annahme, dass die Adenylylzyklase an der Regulation beteiligt ist, deutet die weitere Verminderung der Monoaminaufnahme durch GMP-P(NH)P auf eine zügige Aktivierung der Adenylylzyklase hin, die zusätzlich zur DbcAMP den lokalen cAMP-Spiegel erhöht. Ebenso ist denkbar, dass es sich um gänzlich verschiedene Signalwege handelt, die unabhängig voneinander die vesikuläre Monoaminaufnahme beeinflussen.

### **6.3.2 Die Überexpression von CAPS erhöht die Speicherfähigkeit vesikulärer Strukturen in CHO-Zellen**

Ein weiteres wichtiges Signalmolekül, das an nachgeschalteten Signalwegen beteiligt sein könnte, ist CAPS (Calcium-dependent activator-protein for secretion). Dafür werden zwei Isoformen beschrieben, die sich in ihrem Expressionsmuster hinsichtlich Zeit und Ort unterscheiden (Speidel et al., 2003). Beide Isoformen ähneln in ihrem Expressionsmuster  $Go2\alpha$  mit einer starken Expression vor allem in Gehirn und neuroendokrinen Zellen. Ein weiteres Argument für eine Beteiligung von CAPS an der Regulation der Monoaminspeicherung lieferten Untersuchungen an embryonalen chromaffinen Zellen von CAPS1-Deletionsmutanten der Maus (Speidel et al., 2005). Dabei konnte beobachtet werden, dass nach Deletion von CAPS1 70 % der fusionierten LDCV keine Monoamine enthielten und eine Beeinflussung der Monoaminaufnahme oder Speicherung wahrscheinlich ist. Die Ergebnisse in mit CAPS1 und CAPS2 transfizierten CHO-VMAT Zelllinien belegen, dass unabhängig von transfizierten CAPS-Isoformen und untersuchten VMAT-Isoformen, die Überexpression von CAPS zu einer verstärkten Monoaminaufnahme führt. Das belegt in Übereinstimmung mit den Untersuchungen an CAPS1-Deletionsmutanten die Bedeutung von CAPS für die Monoaminspeicherung. Fehlt CAPS, führt das zu einer verminderten Monoaminspeicherung. Die Überexpression führt zu einer Erhöhung der Monoaminspeicherung. Allerdings zeigten Untersuchungen in PC12 Zellen, in denen die CAPS1-Expression mittels RNA-Interferenz nachweislich inaktiviert wurde, ebenfalls eine Erhöhung der vesikulären Neurotransmitterspeicherung. Ursache dafür ist vermutlich die Verminderung ablaufender Exozytoseprozesse (Fujita et al., 2007). Experimente an hippokampalen Neuronen belegen eine funktionelle Bedeutung der CAPS-Proteine bei der Ausbildung der Fusionskompetenz auch kleiner synaptischer Vesikel (Jokusch et al., 2007). Dadurch könnten Veränderungen während des Exozytoseprozesses, wie sie durch Fujita und Kollegen beobachtet wurden, erklärt werden. Im Vergleich dazu zeigen die Ergebnisse in CHO-VMAT-Zellen, die bekanntermaßen nicht über vesikuläre Exozytoseprozesse Monoamine freisetzen können, dass nicht nur die Exozytose beeinflusst wird. Die CAPS-Proteine scheinen ähnlich  $Go2\alpha$  den

Monoamintransport oder die Monoaminspeicherung in intrazellulären Strukturen zu beeinflussen.

Die Wirksamkeit von sowohl CAPS1 als auch CAPS2 in CHO-VMAT-Zellen, lässt sich mit der hohen Homologie zwischen beiden Isoformen von 78-79 % erklären, mit der vermutlich auch ähnliche Funktionen assoziiert sind. *In vivo* führen nur die unterschiedlichen räumlichen und zeitlichen Expressionsmuster zu funktionellen Unterschieden der beiden CAPS-Isoformen, die in bestimmten Zelltypen oder zu bestimmten Entwicklungszeitpunkten nötig sind (Speidel et al., 2003).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Beobachtungen dieser Arbeit für die Hypothese sprechen, dass die CAPS-Proteine die vesikuläre Monoaminspeicherung regulieren können. Möglicherweise wirken sie dabei in einem gemeinsamen Signaltransduktionsweg mit  $Go2\alpha$ . Darauf hindeuten könnten Untersuchungen an *C. elegans*, wobei die Inaktivierung von  $Go\alpha$  den Phänotyp einer *unc-31* (CAPS) Mutation unterdrückt (Speidel et al., 2005). Monoaminspeicherung oder -transport könnten dabei direkt, wie unter 6.1 beschrieben, durch Beeinflussung des vesikulären Monoamintransportsystems oder der Membranpermeabilität gegenüber Monoaminen reguliert werden.

#### **6.4 Physiologische Funktion der Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme durch $Go2\alpha$**

Die Hemmung der vesikulären Monoaminspeicherung durch die Aktivierung heterotrimerer G-Proteine kann *in vitro* in vielen verschiedenen Testsystemen beobachtet werden. Sie stellt ein generelles Regulationsprinzip dar. Da die Aktivierung von  $Go2\alpha$  in einer verminderten Neurotransmitteraufnahme resultiert, sollte die Inaktivierung des G-Proteins zu einer gesteigerten vesikulären Monoaminaufnahme führen. Überraschenderweise führt die Inaktivierung von  $Go2\alpha$  durch Pertussistoxin ebenfalls zu einer verminderten Neurotransmitteraufnahme während 10-minütiger Messung in PC12-Zellen. Darüber hinaus führt die Langzeitinkubation von BON-Zellen in Gegenwart von Pertussistoxin nicht nur zu einer Verminderung des vesikulären Dopaminspiegels, sondern auch zu einer Verminderung des zytoplasmatischen Dopamingehaltes. Einschränkend ist hierbei anzumerken, dass die ermittelten Messwerte nicht unbedingt die physiologischen Bedingungen widerspiegeln. So wurden diese Beobachtungen an Zellen gemacht, die teilweise in Gegenwart hoher Serotoninkonzentration kultiviert wurden. Zusätzlich mussten die Zellen für die HPLC-Messungen subzellulär fraktioniert werden, wodurch Verschiebungen zwischen zytoplasmatischen und vesikulären Serotonin-kompartimenten wahrscheinlich sind. Generell belegen die Beobachtungen jedoch, dass der Serotoninspiegel nach  $Go2\alpha$ -Inaktivierung durch Pertussitoxin insgesamt reduziert ist. Man könnte die Beobachtungen an BON- und PC12-Zellen auf die Vermutung zurückführen, dass andere durch G-Proteine der Gi/o-Familie vermittelte Effekte, die ebenfalls durch Per-

tussistoxin beeinflusst werden, diese überraschende Beobachtung hervorrufen. Weiterführende Untersuchungen im Gehirn von  $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten legen jedoch die Annahme nahe, dass die Inaktivierung von  $Go2\alpha$  für die beobachteten Pertussistoxineffekte verantwortlich ist. Auch die genetische Deletion von  $Go2\alpha$  in Mäusen führt zu einem verminderten Dopaminspiegel in der Gehirnregion des Striatums. Da hierzu keine subzellulären Fraktionen für die Untersuchung herangezogen wurde, lässt sich nicht eindeutig sagen, ob nur die vesikuläre, die zytoplasmatische oder die extrazelluläre Dopaminmenge vermindert ist. Am wahrscheinlichsten ist jedoch, dass alle zellulären Kompartimente gleichermaßen betroffen sind. Dafür sprechen einerseits die zuvor genannten Beobachtungen an den BON-Zellen, aber andererseits auch die Tatsache, dass der zytoplasmatische Dopaminspiegel aufgrund der intrazellulär toxischen Wirkung von Dopamin stark reguliert wird (Ben Shachar et al., 2004). Sollte weniger Dopamin vesikulär gespeichert werden können, würde der ansteigende zytoplasmatische Dopaminspiegel zu einer Feedback-Inhibition der Tyrosinhydroxylase, dem Schlüsselenzym der Dopaminbiosynthese, und zum vermehrtem Abbau von Dopamin durch die Monoaminoxidase führen. Dadurch würde sich auch zytoplasmatisch ein niedriger Dopaminspiegel einstellen. Interessanterweise sprechen Quantifizierungen des VMAT2 und der Tyrosinhydroxylase genau für ein derartiges Szenario in den  $Go\alpha2$ -Deletionsmutanten. So ist die Expression des VMAT2 auf Vesikeln von  $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten gegenüber Wildtyptieren signifikant erhöht, wohingegen das Expressionsniveau der Tyrosinhydroxylase gegenüber Wildtyptieren signifikant vermindert ist (Dr. I. Brunk, persönliche Mitteilung). Die Deletion von  $Go2\alpha$  verursacht also entweder einen verminderten Transport in die Vesikel oder verändert deren Speicherfähigkeit so, dass ein erhöhter Efflux, der über den VMAT2 vermittelt, oder unvermittelt über die Vesikelmembran erfolgen kann (Floor et al., 1995). Eine verminderte Expression der Tyrosinhydroxylase und damit verbunden eine verminderte Dopaminsynthese wirken einem erhöhten, zytoplasmatischen Dopaminspiegel entgegen, führen aber insgesamt zu einem erniedrigten zellulären Dopamingehalt. Zusätzlich tragen die erhöhte Expression des VMAT2 auf Vesikeln und der damit verbundene stärkere Dopamintransport in die Vesikel ebenfalls zu einer Stabilisierung der zytoplasmatischen Dopaminkonzentration bei. Gleichzeitig wird dadurch sichergestellt, dass mehr Dopamin in den Vesikeln für die interneuronale Kommunikation zur Verfügung steht. Diese kompensatorischen Mechanismen führen vermutlich dazu, dass  $Go2\alpha$ -Deletionsmutanten keine offensichtlichen phänotypischen Veränderungen zeigen. Diese dynamische Gegenregulation der Zellen erklärt auch, dass nur für Dopamin und nur in der Region des Striatums eine signifikante Verminderung des Monoaminspiegels nachgewiesen werden kann. Im Striatum enden ca. 80 % aller dopaminergen Fasern des Gehirns (Siegel et al., 1998), wodurch in dieser Region eine sehr hohe Dopaminkonzentration von ca. 15 ng / mg Feuchtgewicht gemessen werden kann. Somit sind auch Veränderungen

des Dopaminspiegels in dieser Region am einfachsten zu detektieren. Die Untersuchung jüngerer Tiere bis zu einem Alter von 12 Tagen gestattet keine regionenspezifische Untersuchung des Striatums, weshalb die Unterschiede im Dopaminspiegel auch erst danach detektiert werden können. Bei der Untersuchung der verschiedenen Regionen der P12- und adulten Go2 $\alpha$ -Deletionsmutanten ist in vielen Regionen und auch für verschiedene Monoamine eine tendenzielle aber nicht signifikante Verminderung gegenüber den Wildtyptieren zu beobachten. Naheliegend ist, dass auch andere Monoamine in ihrer Konzentration leicht vermindert sind, sich aber aufgrund der diffusen Projektion in viele verschiedene Gehirnareale mit der gewählten Methode keine Unterschiede nachweisen lassen. Interessant wären diesbezüglich Untersuchungen zu Unterschieden im Monoamingehalt des Blutes und neuroendokriner Zellen von Wildtypmäusen und Go2 $\alpha$ -Deletionsmutanten, da hier ebenfalls hohe Monoaminkonzentrationen vorliegen.

Die Auswirkungen des verminderten Dopaminspiegels im Striatum spiegeln sich zusätzlich in der verminderten Bewegungsaktivität der Go2 $\alpha$ -Deletionsmutanten wieder, die durch Gabe der Bewegungsaktivität-stimulierenden Substanzen Kokain und Amphetamin beibehalten bzw. verstärkt wird. Beide Substanzen wirken auf die Dopamintransporter der Plasmamembran. Kokain blockiert sie, wodurch die Wiederaufnahme von Dopamin ausbleibt, und eine erhöhte extrazelluläre Konzentration die Folge ist. Amphetamin führt neben der Blockade der Plasmamembrantransporter zu einer zusätzlichen Freisetzung intrazellulären Dopamins in den Extrazellularraum, wodurch die extrazelluläre Konzentration im Striatum ebenfalls erhöht wird. Die Wirkung beider Substanzen wurde an permeabilisierten und intakten Synaptosomen verifiziert, wobei aber *in vitro* keine Unterschiede in der Substanzwirkung zwischen Wildtypmäusen und Go2 $\alpha$ -Deletionsmutanten beobachtet werden konnten. Die Dopaminwirkung im Striatum wird hauptsächlich durch D1 und D2 Rezeptoren vermittelt, die über die Aktivierung verschiedener neuronaler Verschaltungen (Steigerung des sogenannten direkten, Hemmung des sogenannten indirekten Weges) zu gesteigerter motorischer Aktivität (flüssiger Bewegungsablauf) führen, wodurch die erhöhte Bewegungsaktivität nach Kokain- bzw. Amphetamingabe erklärt werden kann. Da auch in den Go2 $\alpha$ -Deletionsmutanten nach Kokain- bzw. Amphetaminapplikation eine Erhöhung der Bewegungsaktivität zu beobachten ist - jedoch gegenüber Wildtyptieren in geringerem Maße - liegt hiermit ein direktes Korrelat für die verminderten Dopaminspiegel im Striatum vor. Auch wenn die dabei beobachteten Unterschiede nur nach Amphetamingabe signifikant sind. Darüber hinaus fehlt in Go2 $\alpha$ -Deletionsmutanten die Kokain-induzierte Sensibilisierung. Dabei handelt es sich um einen dopaminvermittelten Effekt, der in verschiedenen Spezies beobachtet werden kann, und häufig als Test für einsetzendes Suchtverhalten genutzt wird (Sanchis-Segura & Spanagel, 2006). Die wiederholte Applikation gleicher Dosen Kokain führt dabei zu einer gesteigerten Bewegungsaktivität, die sich mit fortschreitender Applikati-

on noch verstärkt. Die Untersuchung des Suchtverhaltens im Conditioned Place Preference Test ergab keine Unterschiede zwischen Go2 $\alpha$ -Deletionsmutanten und Wildtyptieren. Daher deutet die fehlende Sensibilisierung nach der Kokainbehandlung in den Go2 $\alpha$ -Deletionsmutanten auf zusätzliche Veränderungen in der vor- bzw. nachgeschalteten, durch Dopamin vermittelten, Signaltransduktion hin. Im Gegensatz dazu ist es überraschend, dass nach wiederholter Amphetaminapplikation eine Sensibilisierung zu beobachten ist. Im Vergleich zu Wildtyptieren erfolgt die Sensitivierung auf niedrigerem Niveau. Das wird vermutlich ebenfalls durch den verminderten Monoaminspiegel verursacht.

Zusammenfassend führt die Deletion von Go2 $\alpha$  zu einem reduzierten Dopaminspiegel im Striatum. In Verhaltensexperimenten, in denen nach Applikation von Kokain und Amphetamin die Bewegungsaktivität gemessen wird, spiegelt sich der verminderte Dopaminspiegel wieder. Gleichzeitig scheinen weitere Störungen des dopaminergen Systems vorzuliegen. Der verminderte Dopaminspiegel ist höchstwahrscheinlich auf den reduzierten vesikulären Dopamintransport in die Vesikel oder eine Abnahme von deren Speicherfähigkeit zurückzuführen. Die genauen molekularen Ursachen bleiben dabei aber unverstanden. Die durchgeführten Untersuchungen belegen, dass die Regulation des vesikulären Monoamintransports durch Go2 $\alpha$  von entscheidender Bedeutung für die optimale Speicherung von Dopamin ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass leichte Veränderungen in der Dopaminspeicherung auf vesikulärer Ebene, trotz einer Gegenregulation der Zellen, zu systemischen Veränderungen führen können.

## 6.5 Direkte Interaktionspartner von Go2 $\alpha$

Wie die zuvor beobachteten Effekte des verminderten Dopaminspiegels im Striatum durch Go2 $\alpha$  hervorgerufen werden, ist unbekannt. In der Literatur sind für Go2 $\alpha$  keine Interaktionspartner beschrieben. Untersuchungen zu Go $\alpha$  fokussieren dabei bisher auf Go1 $\alpha$ . Zudem lieferten die Untersuchungen zu den zuvor beschriebenen Signalmolekülen cAMP und CAPS (siehe 6.3) keine Informationen, ob deren Wirkung auf den vesikulären Monoamintransport mit der von Go2 $\alpha$ -vermittelten Regulation verbunden ist.

In einem weiteren Schritt sollten daher direkte Interaktionspartner von Go2 $\alpha$  identifiziert werden, um nachfolgende Schritte möglicherweise beteiligter Signalkaskaden aufzudecken. Das ist einerseits für das Verständnis der Regulation des vesikulären Monoamintransports von Bedeutung und andererseits auch für das Verständnis der Rolle von Go2 $\alpha$  in ZNS und neuroendokrinen Zellen, über die bis heute noch keine Informationen vorliegen. Insbesondere unter Berücksichtigung der verminderten Dopaminspiegel in Go2 $\alpha$ -Deletionsmutanten könnten direkte Interaktionspartner Hinweise darauf liefern, über welche Signalwege sowohl die vesikuläre als auch die zytoplasmatische Monoaminkonzentration reguliert werden.

Für das Auffinden direkter Interaktionspartner wurde das Yeast-two-hybrid System genutzt. Dabei wurde eine cDNA-Bibliothek aus dem Gehirn der Maus mit der konstitutiv aktiven Go2 $\alpha$ Q205L-Untereinheit durchgemustert. Dadurch sollten Interaktionspartner identifiziert werden, die als Effektoren nach Go2 $\alpha$ -Aktivierung in Frage kommen. Bei der Durchmusterung der Bibliothek wurden ca.  $3,5 \times 10^6$  Klone untersucht. Dieser Wert entspricht der Anzahl unabhängiger Klone der cDNA-Bibliothek. Dadurch konnte ein Großteil der Klone der Bibliothek analysiert werden. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass seltene Transkripte während des durchgeführten Screenings nicht identifiziert wurden. Von den durchgemusterten Klonen zeigten 246 unter den stringentesten Wachstumsbedingungen eine Koloniebildung. Durch Plasmidisolierung, PCR und Restriktionsverdau konnten identische Klone identifiziert, und die Anzahl der zu sequenzierenden Klone auf 78 verringert werden. Von den 78 Klonen kodierten 56 Proteine, wobei von einigen Proteinen verschiedene Klone aufgetreten sind. Nach Abzug der offensichtlich falsch positiven Klone verblieben insgesamt 20 mögliche Interaktionspartner. Von diesen 20 Klonen konnten in Verpaarungsexperimenten 15 Interaktionspartner bestätigt werden. Die anderen fünf Klone wurden aufgrund unspezifischer Interaktion mit den Kontrollproteinen, bzw. aufgrund fehlender Interaktion mit Go2 $\alpha$ Q205L in Kontrollexperimenten, ausgeschlossen. Die zuletzt genannten falsch positiven Klone sind erklärbar, da die Hefekolonien während der Durchmusterung mehrere AD-Bibliotheksvektoren tragen können. Ein großer Anteil der identifizierten Klone zeigt in Spezifitätsuntersuchungen Interaktionen mit beiden Go $\alpha$ -Isoformen.

### 6.5.1 Spezifische Go2 $\alpha$ -Interaktionspartner

Ein spezifischer Go2 $\alpha$ -Interaktionspartner ist Eya4. Eya4 ist Bestandteil einer Familie transkriptioneller Aktivatoren (Eya 1-4), die sich zusätzlich durch eine Proteinphosphataseaktivität auszeichnen. Neben einer Lokalisation im Zellkern, die im Drosophilaprotein durch mehrere Kernlokalisationssequenzen verankert ist, ist daher eine Funktion auch außerhalb des Zellkerns denkbar. Dazu geben Untersuchungen Anlass, die in *C. elegans* eine Interaktion von Eya-Proteinen mit Membranproteinen belegen (Li et al., 2004). Darüber hinaus interagieren Eya1(Maus) mit den heterotrimeren G-Proteinuntereinheiten Gz $\alpha$ , Gi2 $\alpha$  und Eya2 (Mensch) mit Gi1-3 $\alpha$  (Ozaki et al., 2002; Embry et al., 2004; Fan et al., 2000), die in überwiegenderem Maße zytoplasmatisch lokalisiert sind. Während der embryonalen Entwicklung zeigt Eya4 eine breites Expressionsmuster. In adulten Tieren zeigen lediglich die Skelettmuskeln ein starkes Vorkommen an Eya4-m-RNA (Borsani et al., 1999). Die Beobachtung einer Interaktion von Go2 $\alpha$  mit Eya4 während des Yeast-two-hybrid-Screenings lassen jedoch auch den Schluss zu, dass im adulten Gehirn eine funktionelle Interaktion auftritt, da die cDNA-Bibliothek aus dem adulten Gehirn stammt. Das ist von besonderem Interesse, da Mutationen von Eya4 zu Taubheit (DFNA10 nonsyndromic hearing loss) füh-

ren können (Wayne et al., 2001; Pfister et al., 2002). Verbunden mit dem niedrigen m-RNA-Vorkommen von Eya 4 im Gehirn, ist eine Bedeutung für die vesikuläre Monoaminspeicherung aber eher unwahrscheinlich.

Das Protein Pcp2 (Purkinje cell protein 2), das in Purkinjezellen des Kleinhirns und in bipolaren Neuronen der Retina exprimiert wird, interagiert auch mit Go2 $\alpha$ . Die Interaktion von Pcp2 mit Go1 $\alpha$  wurde mittels Yeast-two-hybrid- und GST-Pulldowntests nachgewiesen. Pcp2 fungiert dabei als Nukleotidaustauschfaktor und stimuliert den Austausch von GDP gegen GTP (Luo & Denker, 1999). Die Identifikation als spezifischer Bindungspartner von konstitutiv aktivem Go2 $\alpha$  steht den Ergebnissen von Luo und Denker entgegen. Möglicherweise besitzt Pcp2 neben der Bedeutung als Nukleotidaustauschfaktor weitere Funktionen bei der Regulation von G-Proteinen, die unabhängig von der GTPase-Aktivität sind, wie z.B. die Lokalisation an bestimmten intrazellulären Signalkomplexen. Aufgrund des spezifischen Expressionsmusters scheidet Pcp2 jedoch als nachgeschaltetes Signal der G-Proteinregulation der Monoaminaufnahme aus.

Ein drittes, spezifisch nur mit Go2 $\alpha$  interagierendes Protein ist KIAA1045. Dabei handelt es sich um ein Protein mit 427 Aminosäuren, für das zwei Isoformen beschrieben sind. Das Protein konnte neben der m-RNA auch auf Proteinebene in Synaptosomen aus dem Mäusegehirn nachgewiesen werden, wobei eine Phosphorylierung an S348 als posttranslationale Modifikation gezeigt werden konnte (Munton et al., 2007). Die auf der HUGE-Proteindatenbank hinterlegten Expressiondaten zeigen ein starkes Vorkommen von KIAA1045-mRNA im Gehirn, wobei in allen untersuchten Gehirnarealen eine mittlere bis hohe Expressionsrate beobachtet werden konnte (<http://www.kazusa.or.jp/huge/index.html>). Einziges strukturelles Merkmal, das einen Hinweis auf die Funktion des identifizierten Proteins geben kann, ist eine Zinkfingerregion des PHD Typs (plant homeodomain) im Bereich der Aminosäuren 129-190. Proteine mit PHD-Finger sind höchstwahrscheinlich im Kern lokalisiert und vermutlich an Transkriptionskontrolle und Chromatinregulation beteiligt (Bienz, 2006). Berücksichtigt man, dass auch G-Proteine, insbesondere der Gi/o-Familie, nukleär lokalisiert sein können, ist mit dem übereinstimmenden Expressionsmuster von Go2 $\alpha$  und KIAA1045 eine höchst interessante Interaktion identifiziert worden. Es bedarf deshalb weiterer Untersuchungen zur Funktion und Bedeutung von KIAA 1045. Aufgrund des Expressionsmusters könnte KIAA 1045 an der Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme beteiligt sein. Aufgrund der wahrscheinlichen Lokalisation und transkriptionsregulierenden Funktion im Zellkern sind die vermittelten Effekte der Interaktion beider Proteine vermutlich eher länger anhaltend und für die beobachteten Effekte an synaptischen Vesikeln, die innerhalb weniger Minuten beobachtet werden können, nicht verantwortlich. Interessant für zukünftige Fragestellungen ist, ob KIAA 1045 an der transkriptionellen Kontrolle wichtiger Enzyme des Monoaminmetabolismus beteiligt ist.

Eine Sonderstellung unter den spezifischen Go2 $\alpha$ -Interaktionspartnern nehmen die Proteine Rap1Gap und Girdin ein. Sie zeigen in den Spezifitätsuntersuchungen sowohl mit konstitutiv aktivem Go1 $\alpha$  als auch mit konstitutiv aktivem Go2 $\alpha$  eine Interaktion. Allerdings deutet die Beobachtung eines schnelleren und wesentlich stärkeren Koloniewachstums nach einer Woche bzw. zwei Wochen bei beiden Proteinen auf eine stärkere Interaktion mit konstitutiv aktivem Go2 $\alpha$  hin. Rap1Gap, ein Protein, das die GTPase-Aktivität des kleinen G-Proteins Rap1 stimuliert, zeigt eine gewebespezifische Expression in Gehirn, Schilddrüse und anderen Geweben. (Polakis et al., 1991; Rubinfeld et al., 1991). Rap1Gap existiert in zwei Isoformen (Rap1GapI; Rap1GapII), die sich durch 31 N-terminale Aminosäuren unterscheiden. Diese kommen nur in Rap1GapII vor. Rap1GapII ist zu unterscheiden von Rap1Gap2, das als weitere verwandte Isoform in Thrombozyten gefunden wurde, allerdings nur 50 %-Sequenzhomologie aufweist (Schultess et al., 2005). Die Inaktivierung von Rap1Gap führt zu erhöhter Zelldifferenzierung, vermutlich über Rap1. Rap1Gap wird deshalb als mögliches Tumorsuppressorprotein angesehen. Rap1Gap kann durch mehrere Kinasen, darunter die cAMP-abhängige Kinase, phosphoryliert werden. Die Interaktion von Rap1Gap mit mehreren G $\alpha$ -Untereinheiten ist mehrfach beschrieben (Meng et al., 1999; Jordan et al., 1999). Besonders auffällig bei den von Meng sowie Jordan und Kollegen durchgeführten Untersuchungen ist, dass Rap1Gap offensichtlich weniger mit konstitutiv aktivem Go1 $\alpha$  als mit Wildtyp Go1 $\alpha$  interagiert. Diese Ergebnisse stimmen mit den in dieser Arbeit durchgeführten Spezifitätsuntersuchungen überein. Die Interaktion von Rap1Gap mit konstitutiv aktivem Go1 $\alpha$  ist erst nach längerer Inkubationszeit der Hefezellen und auch nur in geringem Umfang (wenige Kolonien) zu beobachten. Interessanterweise zeigt konstitutiv aktives Go2 $\alpha$  ein genau gegensätzliches Verhalten bei Interaktionsstudien mit Rap1Gap - eine nach kurzer Zeit beobachtbare starke Interaktion (viele Kolonien). Obwohl sich Go1 $\alpha$  und Go2 $\alpha$  nur in wenigen Aminosäuren ihrer GTPase-Domäne unterscheiden, zeigen sie bezüglich der Interaktion mit Rap1Gap entgegengesetztes Verhalten. Da die Beteiligung von Go $\alpha$  und Rap1Gap an Differenzierungsprozessen neuronaler Zellen (Neuritenwachstum; He et al., 2006) beobachtet wird, sind die vorliegenden Ergebnisse besonders interessant. Bezüglich der Regulation des Monoamintransports stellt Rap1Gap ein sehr interessantes Zielmolekül dar. Neben der spezifischen Interaktion mit konstitutiv aktivem Go2 $\alpha$  sind die starke Expression im Gehirn, die Beeinflussbarkeit durch cAMP-abhängige Kinasen und das Vorkommen einer Thrombozytenisoform im Zusammenhang mit der Regulation des Monoamintransports von Bedeutung.

Girdin oder auch GIV (Gamma interacting vesicle associated protein; Anai et al., 2005; Enomoto et al., 2005; Simpson et al., 2005, Le-Niculescu et al., 2005) ist ein weiteres nachgeschaltetes Signal, das an der Regulation des vesikulären Monoamintransports beteiligt sein könnte. Girdin wurde sowohl auf DNA als auch auf Proteinebene überwiegend in Gehirn und

Hoden, aber auch in Herz, Fettgewebe, Lunge und Milz nachgewiesen. Darüber hinaus wird Girdin auch in hohem Maße in PC12-Zellen exprimiert. Für die Interaktion von Girdin mit Gi3 $\alpha$  ist eine Region zwischen den Aminosäuren 1399-1481 verantwortlich, die auch in den beiden, während des Yeast-two-hybrid-Screenings identifizierten, Klonen enthalten ist. Girdin kommt auf allen Vesikeln im Zytoplasma vor, ist aber auf COPI-Vesikeln in der cis-Golgi-Region vermehrt lokalisiert und scheint aufgrund seiner Struktur Membrankompartimente mit den Mikrotubuli zu verbinden. Durch die Lokalisation auf Vesikeln ist Girdin möglicherweise an der vesikulären Neurotransmitterspeicherung beteiligt. Über welche Mechanismen es dabei wirken könnte, ist bisher aber unklar.

### 6.5.2 Interaktionspartner, die mit beiden Go $\alpha$ -Isoformen interagieren

Zu den Proteinen, die während des Yeast-two-hybrid-Screenings mit beiden Go $\alpha$ -Isoformen interagieren, gehört das auf dem X-Chromosom kodierte Protein ALEX1 (Armadillo repeat containing X-linked 1). Strukturell ist dieses Protein durch eine vorhergesagte Transmembrandomäne und zwei Wiederholungen des armadillo-Aminosäuremotives, das aus 42 Aminosäuren besteht, gekennzeichnet. Homologien bestehen zu humanem Importin  $\alpha$  und zum vakuolären Protein 8 in Hefe (Vac8p). ALEX1 wird, neben anderen Geweben, zu einem hohen Maße im Gehirn exprimiert (Kurochkin et al., 2001). Aufgrund seiner vermutlichen Membranlokalisation und Homologie zu Proteinen, die auf intrazellulären Strukturen lokalisiert sind, und des starken m-RNA-Vorkommens im Gehirn kann ALEX1 relevant für die Regulation von Neurotransmittermetabolismus und -speicherung sein.

Das Protein AGS3 wurde durch funktionelle Tests in Hefen identifiziert, in denen es in Abwesenheit eines benötigten G-Protein gekoppelten Rezeptors heterotrimere G-Proteine aktivieren konnte (Takesono et al., 1999). Wie der Mechanismus der G-Proteinaktivierung erfolgt, ist dabei aber unklar (De Vries et al., 2000). Der C-terminale Anteil des Proteins enthält vier G-Protein-regulatorische Motive (GPR-Motiv; bzw: GoLoco-Motiv) die auch in zahlreichen anderen Proteinen, darunter die zuvor beschriebenen Pcp2 und Rap1Gap, vorkommen. AGS3 zeigt in Gehirn und Leberhomogenat die höchste Immunreaktivität und kann subzellulär sowohl in Zytosol als auch in der partikulären Fraktion nachgewiesen werden (De Vries et al., 2000). Auch PC12-Zellen exprimieren AGS3. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass AGS3 in einem Yeast-two-Hybrid-Screening mit allen Gi $\alpha$ -Isoformen und Go1 $\alpha$  aber nicht mit Gq $\alpha$ , Gz $\alpha$ , Gs $\alpha$ , oder G12 $\alpha$  interagiert. Diese Beobachtungen stimmen mit den nachgewiesenen Interaktionen von AGS3 mit konstitutiv aktivem Go1 $\alpha$  und Go2 $\alpha$ , aber nicht Gq $\alpha$ , überein. Die kürzesten identifizierten AGS3-Klone enthielten minimal die letzten drei der insgesamt vier C-terminalen GPR-Motive. Anscheinend ist für die Bindung an AGS3 der Aktivierungsstatus des G-Proteins nicht von Bedeutung. Die Beeinflus-

sung der vesikulären Monoaminaufnahme aufgrund der zuvor zusammengefassten Eigenschaften durch AGS3 ist denkbar.

Neben AGS3 wurden weitere Regulatorproteine heterotrimerer G-Proteine als Interaktionspartner beider  $G_{\alpha}$ -Proteine identifiziert. Darunter waren die RGS-Proteine 17 (RGSz2), 19 (GAIP) und 20 (RGSz1), die zur RZ/A-Familie gehören und RGS14, das zur R12-Familie der RGS-Proteine gehört. Für die RZ/A-Familie der RGS-Proteine ist bekannt, dass sie spezifisch nur mit den  $G_{\alpha}$ -Untereinheiten der *i/o*-Familie und  $G_{z\alpha}$  interagieren. Eine Selektivität gegenüber  $G_{i/o\alpha}$  wird auch für RGS14 beschrieben. Für alle identifizierten RGS-Proteine ist die Expression im Gehirn bekannt. RGS17 wird darüber hinaus auch in neuroendokrinen Zellen exprimiert. Eine Besonderheit von RGS17 ist, dass es subzellulär auch im Zellkern lokalisiert ist. Eine in der Literatur beschriebene Interaktion von RGS17 mit  $G_{q\alpha}$  konnte für konstitutiv aktives  $G_{q\alpha}$  in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (Mao et al., 2004). Auch die für RGS19 beschriebene GAP-Aktivität bezüglich  $G_{q\alpha}$  *in vitro* konnte während des Yeast-two-Hybrid-Screenings nicht durch eine Interaktion bestätigt werden. RGS14 enthält neben der RGS-Domäne zwei Rap-bindende Domänen sowie ein GoLoco-Motiv, wie es auch für AGS3, Rap1Gap und Pcp2 beschrieben wurde. RGS14 ist im Affengehirn hauptsächlich mit der Membranfraktion assoziiert. Mikroskopische Untersuchungen zeigen zusätzlich, dass RGS14 in überwiegendem Maße zytoplasmatisch und dabei eher postsynaptisch lokalisiert ist. Geringe Mengen RGS14 können auch im Zellkern nachgewiesen werden. In der Region der Substantia nigra konnte RGS14 nur in Tyrosinhydroxylase-negativen Neuronen nachgewiesen werden. Prinzipiell könnten alle beschriebenen RGS-Proteinvarianten an der Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme und des Monoaminmetabolismus beteiligt sein. Lediglich die Beteiligung von RGS14 ist aufgrund der subzellulären und zellulären Lokalisation fraglich.

Für das dem Apolipoprotein AI-bindenden Protein ähnliche Transkript, das während des Screenings identifiziert wurde, liegt noch kein Nachweis auf Proteinebene vor. Für das verwandte Protein APOA1BP wurden die Expression im Gehirn und ein gleichzeitig hoher Liquorspiegel nachgewiesen. Über Interaktionen mit G-Proteinen oder andere Isoformen stehen derzeit keine Informationen zur Verfügung. Da das Protein jedoch sezerniert wird, ist eine Beteiligung an intrazellulären Signaltransduktionswegen eher unwahrscheinlich.

Ein weiteres Protein, für das noch keine Interaktionen mit G-Proteinen beschrieben ist, ist das TNF- $\alpha$ -induzierte Protein 8 (TNFAIP8; SCC-S2; GG2-1). Dabei handelt es sich um ein antiapoptotisches Protein, dessen Transkript eine ubiquitäre Gewebeverteilung aufweist.

### 6.5.3 Proteine die mit beiden $G_{\alpha}$ -Isoformen und mit $G_{q\alpha}$ interagieren

Das Protein Synembryn (Ric8) wurde erstmals in *C. elegans* identifiziert, wo Mutationen des Synembryngens vermutlich durch Interaktionen mit  $G_{\alpha}$  bzw.  $G_{q\alpha}$  sowohl die synaptische

Übertragung, als auch die Spindelpolbewegungen während der Embryogenese beeinflusst (Miller et al., 1996; Miller et al., 2000; Miller & Rand, 2000). Durch Yeast-two-Hybrid-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Synembryn mit vielen verschiedenen G $\alpha$ -Untereinheiten interagiert, darunter Go $\alpha$ , Gi $\alpha$  und Gq $\alpha$ . Für Go $\alpha$  und Gq $\alpha$  wird auch eine Interaktion mit den konstitutiv aktiven G $\alpha$ -Untereinheiten und Synembryn beschrieben (Tall et al., 2003). Aufgrund seiner Bedeutung bei der synaptischen Übertragung in *C. elegans* ist die Beteiligung an der Regulation des vesikulären Monoamintransports denkbar.

#### 6.5.4 Zusammenfassung Yeast-two-Hybrid-Screening

Wie in den vorhergehenden Ausführungen gezeigt wurde, konnten durch das Yeast-two-hybrid-Screening verschiedene Interaktionspartner identifiziert werden, die an der Regulation des vesikulären Monoamintransports durch Go2 $\alpha$  beteiligt sein könnten. Insbesondere Rap1Gap, Girdin, AGS3, die identifizierten RGS-Proteine sowie Synembryn sind aufgrund ihrer Beteiligung an der Regulation von Go $\alpha$ , der Assoziation mit synaptischen Vesikeln bzw. der Beeinflussung der synaptischen Übertragung die wahrscheinlichsten nachgeschalteten Signaltransduktionsmoleküle. Andere Proteine, wie Eya4, Pcp2, sowie das APOAIBP-ähnliche Protein, scheiden wegen ihres geringen und begrenzten Expressionsmusters im Gehirn sowie der Sezernierung und des extrazellulären Vorkommens aus, bzw. ist eine Regulation der vesikulären Neurotransmitterspeicherung eher unwahrscheinlich. Um die Liste der potentiell bedeutenden Proteine weiter einzugrenzen, sollten, wenn der Proteinnachweis durch verfügbare Antikörper möglich ist, in allen verwendeten Testsystemen, darunter synaptische Vesikel und alle Zelllinien, das Vorkommen und die subzelluläre Lokalisation der Proteine überprüft werden. Wenn es die Antikörper zulassen, sollte ebenfalls die *in-vitro*-Interaktion mit konstitutiv aktivem Go2 $\alpha$  durch Immunpräzipitationsexperimente bestätigt werden. Alternativ ist weiterhin denkbar, dass keines der identifizierten Proteine in dem von uns untersuchten Signaltransduktionsweg eine Rolle spielt. Denkbar wäre, dass multimere Proteinkomplexe, die durch das Y2H-Screening nicht hätten identifiziert werden können, Go2 $\alpha$  am Vesikel regulieren. Dafür spricht, dass keines der identifizierten Proteine in Untersuchungen des Vesikelproteoms nachgewiesen werden konnte. Allerdings kann man dem entgegen, dass auch der VMAT2 in diesen Untersuchungen nicht identifiziert werden konnte. Als Bestandteil der Vesikel monoaminerger Neuronen ist die Konzentration des VMAT2 für massenspektrometrische Nachweismethoden - im Vergleich zu häufigeren vesikulären Membranproteinen - vermutlich zu gering. Hilfreich hierbei wäre die Immunisolierung von Go2 $\alpha$ -Proteinkomplexen und anschließende massenspektrometrische Analyse der isolierten Proteine, um in einem komplementären Ansatz mit Vesikeln assoziierte und mit Go2 $\alpha$ -interagierende Proteine zu identifizieren. Dadurch könnten während des Yeast-two-Hybrid-Screenings identifizierte Proteine bestätigt werden und gleichzeitig multimere Interaktions-

partner von Go2 $\alpha$  identifiziert werden. Darüber hinaus könnten potentielle Interaktionspartner in verschiedenen Testsystemen der vesikulären Monoaminaufnahme überexprimiert bzw. ausgeschaltet werden, um gegebenenfalls eine Beeinflussung des Monoamintransports zu beobachten und dadurch Rückschlüsse auf eine Beteiligung am Go2 $\alpha$ -Signalweg zu ziehen.

Neben der Identifikation potentieller Go2 $\alpha$ -Interaktionspartner bestätigen die Ergebnisse des durchgeführten Yeast-two-Hybrid-Screenings, dass die Unterschiede von 25 Aminosäuren zwischen Go1 $\alpha$  und Go2 $\alpha$  deutliche Unterschiede in ihrer Spezifität zu nachgeschalteten Signaltransduktionsproteinen verursachen. Dafür sprechen Beobachtungen, dass während des durchgeführten Screenings spezifisch nur mit konstitutiv aktivem Go2 $\alpha$  interagierende Proteine Eya4, Pcp2 und KIAA1045 gefunden werden konnten. Bezüglich der Spezifität wäre es interessant zu untersuchen, ob die jeweiligen Go $\alpha$ -Isoformen auch in ihrer Wildtypkonformation die spezifischen Interaktionsmuster aufweisen. So existieren in der Literatur für Pcp2 deutliche Hinweise auf eine Interaktion mit Wildtyp-Go1 $\alpha$  in Yeast-two-hybrid-Experimenten. Während des in dieser Arbeit durchgeführten Screenings mit konstitutiv aktivem Go1 $\alpha$ , konnte hingegen keine Interaktion nachgewiesen werden. Ebenso scheint die Interaktion von Girdin und Rap1Gap gleichermaßen schwächer mit konstitutiv aktivem Go1 $\alpha$  zu erfolgen, wohingegen in der Literatur eine stärkere Interaktion mit Wildtyp-Go1 $\alpha$  beschrieben ist.

Beide Go $\alpha$ -Isoformen scheinen zusätzlich in Abhängigkeit von ihrem Aktivierungszustand antagonistisch zu wirken. Zukünftig ist daher eine differenziertere Betrachtungsweise bei Prozessen nötig, die durch Go $\alpha$  vermittelt werden.

Unabhängig von dieser scheinbar antagonistischen Wirkungsweise beider Go $\alpha$ -Isoformen wurden neben zahlreichen bekannten Go $\alpha$ -Interaktionspartnern durch das Yeast-two-hybrid-Screening neuartige Go $\alpha$ -Interaktionspartner identifiziert, darunter Eya4, das bisher uncharakterisierte Protein KIAA1045, ALEX1, TNFAIP8 und das dem Apolipoprotein AI bindenden Protein ähnliche Protein. Insbesondere für diese Proteine ist es wichtig, die Interaktion mit Go $\alpha$  durch weitere Methoden zu überprüfen und nachzuweisen, dass die Interaktion intrazellulär auch möglich ist. Besonders auffällig ist, dass zahlreiche der identifizierten Proteine auch im Zellkern vorkommen können bzw., dass eine Assoziation mit dem Zytoskelett vorliegt. Die nukleäre Lokalisation ist für die Interaktionspartner Eya4 als transkriptionellen Aktivator und KIAA1045 mit seiner Zinkfingerdomäne wahrscheinlich und konnte auch für RGS14 und RGS17 beobachtet werden. Die Beeinflussung nukleärer Prozesse durch Go2 $\alpha$  scheint daher wahrscheinlich. Wie bereits unter 3.5.3 beschrieben, ist für zahlreiche Go $\alpha$ -Untereinheiten auch eine Lokalisation im Zellkern beobachtet worden.

Proteine, die Go2 $\alpha$  mit einer Funktion im Zytoskelett in Verbindung bringen, sind Girdin und Synembryn. Girdin, das über eine N-terminale Mikrotubuli-bindende Domäne verfügt und zusätzlich membranassoziiert vorliegen kann, verbindet vesikuläre Kompartimente - auf denen Go2 $\alpha$  nachgewiesen werden kann - mit den Mikrotubuli des Zytoskeletts. Ebenso scheint Synembryn an der Spindelausbildung durch Generierung von Zugkräften astraler Mikrotubuli beteiligt zu sein. Dadurch verbindet es ebenfalls Go2 $\alpha$  mit einer Zellkernlokalisation und den Mikrotubuli.

## 6.6 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten viele Aspekte der Regulation des vesikulären Monoamintransports durch heterotrimere G-Proteine und der daran beteiligten Signaltransduktionswege untersucht werden.

So konnte gezeigt werden, dass der VMAT2 über seine erste intraluminale Schleife an der Signaltransduktion, die die vesikuläre Füllung beeinflusst, beteiligt ist. Offen geblieben ist jedoch, wie dabei die Signaltransduktion ins Zytoplasma erfolgt. Eine aussichtsreiche, bisher nicht untersuchte Struktur des VMAT2 ist dabei der N-Terminus. Gegebenenfalls sollte zusätzlich eine erneute Untersuchung der zytoplasmatischen Schleife zwischen den TMD VI/ VII, bei der anstelle der kompletten Schleife nur kleinere Ausschnitte entfernt werden, stattfinden.

Durch die Identifizierung vieler potentieller Go2 $\alpha$ -Interaktionspartner während des Yeast-two-Hybrid-Screenings ergeben sich zwingend Untersuchungen, die die Interaktion auf zusätzlichem Wege, z.B. über Koimmunpräzipitation, nachweisen können. In einem komplementären Ansatz wäre die Aufreinigung von Go2 $\alpha$ -Proteinkomplexen verschiedener Zellen und Gewebe über eine Immunaффinitätschromatographie mit anschließender Proteinidentifizierung sinnvoll. Dadurch könnten neben der Bestätigung der in dieser Arbeit identifizierten Proteine auch multimere Interaktionspartner identifiziert und ein besseres Verständnis beteiligter Signalkomplexe erreicht werden. Zusätzlich dazu sollte die Analyse der zellulären und subzellulären Lokalisation der identifizierten Proteine in monoaminsynthetisierenden Zellen und Gehirnregionen im Mittelpunkt stehen, um mögliche physiologische Interaktionen während der Neurotransmitterspeicherung nachzuweisen. In einem nächsten Schritt könnte dann durch gezielte Deletion identifizierter physiologischer Interaktionspartner die Beeinflussung der Neurotransmitterspeicherung untersucht werden.

Die festgestellten verminderten Monoaminspiegel im Striatum und damit assoziierte motorische Defizite von Go2 $\alpha$ -Deletionsmutanten belegen erstmals die Bedeutung für das monoaminerge System. Für die Bestätigung der verminderten Monoaminspeicherung in den Vesikeln wären Untersuchungen zur Bestimmung der freigesetzten Monoamine mittels Amperometrie sinnvoll. Dadurch könnte zusätzlich überprüft werden, ob auch andere monoamin-

erge Zellen, so z.B. neuroendokrine Zellen des Nebennierenmarks, ebenfalls verminderte Monoaminspiegel aufweisen. Darüber hinaus wären zusätzliche Verhaltensexperimente, die weitere mit vermindertem Monoaminspiegel assoziierte Krankheiten, wie z.B. Parkinson oder Depressionen, untersuchen, sinnvoll.

Sollte Go2 $\alpha$  die Vesikelpermeabilität beeinflussen, wäre auch die Untersuchung weiterer Neurotransmittersysteme auf Veränderungen in den Go2 $\alpha$ -Deletionsmutanten sinnvoll.

## 7 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
3-AT	3-Aminotriazol
A	Adenosin / Ampere
ADP	Adenosindiphosphat
AGS	Activator of G-Protein signalling
ATP	Adenosintriphosphat
<i>bait</i>	Köder
BCA	Bicinchoninsäure
BON	humane Pankreaskarzinoidzelllinie
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytidin
c	Konzentration
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumionen
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAPS	calcium-dependent activator protein for secretion
cDNA	Komplementär-DNA
cfu	Kolonie bildende Einheiten (colony forming units)
CHO	Zelllinie aus den Ovarien des chinesischen Hamsters
CIC	Chloridkanal
cpm	counts per minute / Zählungen pro Minute
CPP-Test	conditioned place preference test
$\Delta\mu\text{H}^+$	elektrochemischer Gradient
Da	Dalton
DAT	Dopaminplasmamembrantransporter
DbcAMP	Dibutyryl-cAMP
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
$\Delta\text{pH}$	pH-Gradient
dpm	disintegration per minute / Zerfälle pro Minute
DTT	Dithiothreitol
$\Delta\Psi$	elektischer Gradient
EAAT	exzitatorischer Aminosäuretransporter
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EGTA	Ethylenglykolbis(2-aminoethyl)-tetraacetat
FBS	fötales Kälberserum
G	Guanosin
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanylnukleotidaustauschfaktor
GFP	green fluorescent protein
GMP-P(NH)P	5'-Guanylylimidodiphosphat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
G-Protein	G-Protein
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	GTP-spaltende Enzyme
GTP $\gamma$ S	Guanosin-5'-O-(thiotriphosphat)
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HDC	Histidindekarboxylase
HPLC-EC	Hochleistungsflüssigchromatografie mit elektrochemischer Detektion
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
K <sub>M</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
LB	Luria Bertani Medium
LDCV	Large Dense Core Vesicles
L-DOPA	Dihydroxyphenylalanin
MA	Monoamin

MAO	Monoaminoxidase
MF	Membranfraktion
min	Minute
MPP+	1-Methyl-4-phenylpyridinium
MPTP	1-Methyl 4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
NET	Noradrenalinplasmamembrantransporter
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PC12	Phäochromozytomzelllinie der Ratte
Pcp	Purkinje cell protein
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
Pi	Phosphatanion
Pipes	Piperazin-N,N'-bis [2-ethansulfonsäure]
<i>prey</i>	Beute
Ptx	Pertussistoxin
QDO	Quadruple-Dropout-Medium
Rap1Gap	Rap1-GTPase aktivierendes Protein
RGS	Regulator of G-Protein signalling
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
screening	Durchmusterung
SD	Synthetisches Dropoutmedium
SDS	Natriumdodezylsulfat
SEM	mittlerer Standardfehler
SERT	Serotoninplasmamembrantransporter
SLMV	Small synaptic-like microvesicles
SLO	Streptolysin O
SSV	Small synaptic vesicles
T	Thymidin
TAE	Tris-acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TH	Tyrode HEPES
TMD	Transmembrandomäne
TPH	Tryptophanhydroxylase
Tph1	Tryptophanhydroxylase 1
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VACHT	vesikulärer Azetylcholintransporter
vATPase	vakuoläre ATPase
VF	Verdünnungsfaktor
VGAT	vesikulärer GABA-Transporter
VIAAT	vesikulärer inhibitorischer Aminosäuretransporter
VMAT	vesikulärer Monoamintransporter
Vmax	Maximalgeschwindigkeit enzymatischer Reaktionen
w/w	Gewicht pro Gewicht
w/v	Gewicht pro Volumen
Wt	Wildtyp-Mäuse
x g	Erdbeschleunigung
X g <sub>max</sub>	maximale Erdbeschleunigung (Zentrifugation)
X- $\alpha$ -Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
Y2H	Yeast two hybrid
YE	Hefeextrakt
YNB	Yeast Nitrogen Base
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 8 Literaturverzeichnis

Ahnert-Hilger G, Schäfer T, Spicher K, Grund C, Schultz G, 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* 65:26-38

Ahnert-Hilger G, Nürnberg B, Exner T, Schäfer T, Jahn R (1998) The heterotrimeric G protein Go2 regulates catecholamine uptake by secretory vesicles. *EMBO J* 17:406-413

Ahnert-Hilger G, Pahner I, Höltje M (2000) Pore-Forming Toxins as Cell-Biological and Pharmacological Tools. *Handb Exp Pharm* 145:557-573

Ali N, Milligan G, Evans WH (1989) G-proteins of rat liver membranes. Subcellular compartmentation and disposition in the plasma membrane. *Mol Cell Biochem* 91:75-84

Anai M, Shojima N, Katagiri H, Ogihara T, Sakoda H, Onishi Y, Ono H, Fujishiro M, Fukushima Y, Horike N, Viana A, Kikuchi M, Noguchi N, Takahashi S, Takata K, Oka Y, Uchijima Y, Kurihara H, Asano T (2005) A novel protein kinase B (PKB)/AKT-binding protein enhances PKB kinase activity and regulates DNA synthesis. *J Biol Chem* 280:18525-18535

Aronin N, DiFiglia M (1992) The subcellular localization of the G-protein Gi alpha in the basal ganglia reveals its potential role in both signal transduction and vesicle trafficking. *J Neurosci* 12:3435-3444

Arshavsky VY & Bownds MD (1992) Regulation of deactivation of photoreceptor G protein by its target enzyme and cGMP. *Nature* 357:416-417

Audigier Y, Nigam SK, Blobel G (1988) Identification of a G protein in rough endoplasmic reticulum of canine pancreas. *J Biol Chem* 263:16352-16357

Bartel P, Chien CT, Sternglanz R, Fields S (1993) Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* 14:920-924

Ben-Shachar D, Zuk R, Gazawi H, Ljubuncic P (2004) Dopamine toxicity involves mitochondrial complex I inhibition: implications to dopamine-related neuropsychiatric disorders. *Biochem Pharmacol* 67:1965-1974

Berstein G, Blank JL, Jhon DY, Exton JH, Rhee SG, Ross EM (1992) Phospholipase C-beta 1 is a GTPase-activating protein for Gq/11, its physiologic regulator. *Cell* 70:411-418

Bienz M (2006) The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends Biochem Sci* 31:35-40

Blondeau F, Ritter B, Allaire PD, Wasiak S, Girard M, Hussain NK, Angers A, Legendre-Guillemin V, Roy L, Boismenu D, Kearney RE, Bell AW, Bergeron JJ, McPherson PS (2004) Tandem MS analysis of brain clathrin-coated vesicles reveals their critical involvement in synaptic vesicle recycling. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:3833-3838

Borsani G, DeGrandi A, Ballabio A, Bulfone A, Bernard L, Banfi S, Gattuso C, Mariani M, Dixon M, Donnai D, Metcalfe K, Winter R, Robertson M, Axton R, Brown A, van Heyningen V, Hanson I (1999) EYA4, a novel vertebrate gene related to *Drosophila* eyes absent. *Hum Mol Genet* 8:11-23

Bourne HR, Sanders DA, McCormick F (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348:125-132

Brunk I, Blex C, Rachakonda S, Höltje M, Winter S, Pahner I, Walther DJ, Ahnert-Hilger G (2006) The first luminal domain of vesicular monoamine transporters mediates G-protein-dependent regulation of transmitter uptake. *J Biol Chem* 281:33373-33385

Bruns D, Riedel D, Klingauf J, Jahn R (2000) Quantal release of serotonin. *Neuron* 28:205-220

- Burré J, Beckhaus T, Schägger H, Corvey C, Hofmann S, Karas M, Zimmermann H, Volkandt W (2006) Analysis of the synaptic vesicle proteome using three gel-based protein separation techniques. *Proteomics* 6:6250-6262
- Carlson MD, Kish PE, Ueda T (1989) Characterization of the solubilized and reconstituted ATP-dependent vesicular glutamate uptake system. *J Biol Chem* 264:7369-7376.
- Chang JW, Lee WY, Milstien S, Kang UJ (2002) A sitespecific mutation of tyrosine hydroxylase reduces feedback inhibition by dopamine in genetically modified cells grafted in parkinsonian rats. *J Neurochem* 83:141-149
- Chaudry FA, Edwards RH, Fonnum F (2008) Vesicular Neurotransmitter Transporters as Targets for Endogenous and Exogenous Toxic Substances. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48:277-301
- Chen LT, Gilman AG, Kozasa T (1999) A candidate target for G protein action in brain. *J Biol Chem* 274:26931-26938
- Chen NF, Yu JZ, Skiba NP, Hamm HE, Rasenick MM (2003) A specific domain of G $\alpha$  required for the transactivation of G $\alpha$  by tubulin is implicated in the organization of cellular microtubules. *J Biol Chem* 278:15285-15290
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31:3497-3500
- Cismowski MJ (2006) Non-receptor activators of heterotrimeric G-protein signaling (AGS proteins). *Semin Cell Dev Biol* 17:334-344
- Cumbay MG, Watts VJ (2001) Heterologous sensitization of recombinant adenylate cyclases by activation of D(2) dopamine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 297:1201-120
- Darchen F, Scherman D, Henry JP (1989) Reserpine binding to chromaffin granules suggests the existence of two conformations of the monoamine transporter. *Biochemistry* 28:1692-1697
- Denker SP, McCaffery JM, Palade GE, Insel PA, Farquhar MG (1996) Differential distribution of alpha subunits and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on Golgi membranes of the exocrine pancreas. *J Cell Biol* 133:1027-1040
- De Vries L, Fischer T, Tronchère H, Brothers GM, Strockbine B, Siderovski DP, Farquhar MG (2000) Activator of G protein signaling 3 is a guanine dissociation inhibitor for G $\alpha$  i subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:14364-14369
- Dhingra A, Lyubarsky A, Jiang M, Pugh EN Jr, Birnbaumer L, Sterling P, Vardi N (2000) The light response of ON bipolar neurons requires G $\alpha$ o. *J Neurosci* 20:9053-9058
- Dhingra A, Jiang M, Wang TL, Lyubarsky A, Savchenko A, Bar-Yehuda T, Sterling P, Birnbaumer L, Vardi N (2002) Light response of retinal ON bipolar cells requires a specific splice variant of G $\alpha$ o. *J Neurosci* 22:4878-4884
- Edwards RH (2007) The Neurotransmitter Cycle and Quantal Size. *Neuron* 55:835-858
- Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS (2004) Leaky catecholamine stores: undue waste or a stress response coping mechanism? *Ann N Y Acad Sci* 1018:224-230
- Embry AC, Glick JL, Linder ME, Casey PJ (2004) Reciprocal signaling between the transcriptional cofactor Eya2 and specific members of the Galphai family. *Mol Pharmacol* 66:1325-1331
- Enomoto A, Murakami H, Asai N, Morone N, Watanabe T, Kawai K, Murakumo Y, Usukura J, Kaibuchi K, Takahashi M (2005) Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Dev Cell* 9:389-402

- Ercolani L, Stow JL, Boyle JF, Holtzman EJ, Lin H, Grove JR, Ausiello DA (1990) Membrane localization of the pertussis toxin-sensitive G-protein subunits alpha i-2 and alpha i-3 and expression of a metallothionein-alpha i-2 fusion gene in LLC-PK1 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4635-4639
- Erickson JD, Eiden LE, Hoffmann BJ (1992) Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10993-10997
- Erickson JD, Schäfer MK, Bonner TI, Eiden LE, 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 USA* 93:5166-5171
- Exner T, Jensen ON, Mann M, Kleuss C, Nurnberg B (1999) Posttranslational modification of Galphao1 generates Galphao3, an abundant G protein in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1327-1332
- Evers BM, Townsend CM, Upp JR, Allen E, Hurlbut SC, Kim SW, Rajaraman S, Singh P, Reubi JC, Thompson JC (1991) Establishment and characterization of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth. *Gastroenterology* 101:303-311
- Fan X, Brass LF, Poncz M, Spitz F, Maire P, Manning DR (2000) The alpha subunits of Gz and Gi interact with the eyes absent transcription cofactor Eya2, preventing its interaction with the six class of homeodomain-containing proteins. *J Biol Chem* 275:32129-32134
- Finn JP 3rd, Edwards RH (1998) Multiple residues contribute independently to differences in ligand recognition between vesicular monoamine transporters 1 and 2. *J Biol Chem* 273:3943-3947
- Finn JP 3rd, Edwards RH (1997) Individual residues contribute to multiple differences in ligand recognition between vesicular monoamine transporters 1 and 2. *J Biol Chem* 272:16301-16307
- Floor E, Leventhal PS, Wang YL, Meng LH, Chen WQ (1995) Dynamic Storage of Dopamine in Rat-Brain Synaptic Vesicles In-Vitro. *J Neurochem* 64:689-699
- Fon EA, Pothos EN, Sun BC, Killeen N, Sulzer D, Edwards RH (1997) Vesicular transport regulates monoamine storage and release but is not essential for amphetamine action. *Neuron* 19:1271-1283
- Forti L, Bossi M, Bergamaschi A, Villa A, Malgaroli A. (1997) Loose-patch recordings of single quanta at individual hippocampal synapses. *Nature* 388:874-878
- Fujita Y, Xu A, Xie L, Arunachalam L, Chou TC, Jiang T, Chiew SK, Kourtesis J, Wang L, Gaisano HY, Sugita S (2007) Ca<sup>2+</sup>-dependent activator protein for secretion 1 is critical for constitutive and regulated exocytosis but not for loading of transmitters into dense core vesicles. *J Biol Chem* 282:21392-21403
- Gainetdinov RR, Fumagalli F, Wang YM, Jones SR, Levey AI, Miller GW, Caron MG (1998) Increased MPTP neurotoxicity in vesicular monoamine transporter 2 heterozygote knockout mice. *J Neurochem* 70:1973-1978
- Greene LA, Tischler AS (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:2424-2428
- Hansson SR, Hoffmann BJ, Mezey E (1998) Ontogeny of vesicular monoamine transporter mRNAs VMAT1 and VMAT2. The developing rat central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 110:135-158
- Hayashi M, Haga M, Yatsushiro S, Yamamoto A, Moriyama Y (1999) Vesicular monoamine Transporter 1 is responsible for storage of 5-Hydroxytryptamine in rat pinealocytes. *J Neurochem* 73:2538-2545
- He JC, Neves SR, Jordan JD, Iyengar R (2006) Role of the Go/i signaling network in the regulation of neurite outgrowth. *Can J Physiol Pharmacol* 84:687-694

- Hell JW & Jahn R (1998) Preparation of synaptic vesicles from mammalian brain. *Cell Biology: laboratory handbook*, 2nd edition:102-110
- Henry JP, Botton D, Sagne C, Isambert MF, Desnos C, Blanchard V, Raisman-Vozari R, Krejci E, Massoulie J, Gasnier, B (1994) Biochemistry and molecular biology of the vesicular monoamine transporter from chromaffin granules. *J Exp Biol* 196:251-262
- Hollinger S & Hepler JR (2002) Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol Rev* 54:527-559
- Höltje M, von Jagow B, Pahner I, Lautenschlager M, Hörtnagl H, Nürnberg B, Jahn R, Ahnert-Hilger G (2000) The neuronal monoamine transporter VMAT2 is regulated by the trimeric GTPase Go(2). *J Neurosci* 20:2131-2141
- Höltje M, Winter S, Walther D, Pahner I, Hörtnagl H, Ottersen OP, Bader M, Ahnert-Hilger G (2003) The vesicular monoamine content regulates VMAT2 activity through G $\alpha_q$  in mouse platelets. *J Biol Chem* 278:15850-15858
- Iwabuchi K, Li B, Bartel P, Fields S (1993) Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* 8:1693-1696
- Jentsch TJ, Neagoe I, Scheel O. (2005) CLC chloride channels and transporters. *Curr Opin Neurobiol* 15:319-25
- Jiang M, Gold MS, Boulay G, Spicher K, Peyton M, Brabet P, Srinivasan Y, Rudolph U, Ellison G, Birnbaumer L (1998) Multiple neurological abnormalities in mice deficient in the G protein Go. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3269-3274
- Jiang M, Spicher K, Boulay G, Wang Y, Birnbaumer L (2001) Most central nervous system D2 dopamine receptors are coupled to their effectors by Go. *Proc Natl Acad Sci* 98:3577-3582
- Johnson RG, Carty SE, Scarpa A (1981) Proton: substrate stoichiometries during active transport of biogenic amines in chromaffin ghosts. *J Biol Chem* 256:5773-5780
- Johnson RG (1988) Accumulation of biological amines into chromaffin granules: a model for hormone and neurotransmitter transport. *Physiol Rev* 68:232-307
- Jones SR, Gainetdinov RR, Jaber M, Giros B, Wightman RM, Caron MG (1998) Profound neuronal plasticity in response to inactivation of the dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:4029-4034
- Jordan JD, Carey KD, Stork PJ, Iyengar R (1999) Modulation of rap activity by direct interaction of Galpha(o) with Rap1 GTPase-activating protein. *J Biol Chem* 274:21507-21510
- Katz B (1971) Quantal mechanism of neural transmitter release. *Science* 173:123-126
- Kinoshita M, Nukada T, Asano T, Mori Y, Akaike A, Satoh M, Kaneko S (2001) Binding of G alpha(o) N terminus is responsible for the voltage-resistant inhibition of alpha(1A) (P/Q-type, Ca(v)2.1) Ca(2+) channels. *J Biol Chem* 276:28731-28738
- Kleuss C, Hescheler J, Ewel C, Rosenthal W, Schultz G, Wittig B (1991) Assignment of G-protein subtypes to specific receptors inducing inhibition of calcium currents. *Nature* 353:43-48
- Knoth J, Zallakian M, Njus D (1981) Stoichiometry of H<sup>+</sup>-linked dopamine transport in chromaffin granule ghosts. *Biochemistry* 20:6625-6629
- Kozasa T, Jiang X, Hart MJ, Sternweis PM, Singer WD, Gilman AG, Bollag G, Sternweis PC (1998) p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Galpha12 and Galpha13. *Science* 280:2109-2111
- Kroll SD, Chen J, De Vivo M, Carty DJ, Buku A, Premont RT, Iyengar R (1992) The Q205LGo-alpha subunit expressed in NIH-3T3 cells induces transformation. *J Biol Chem* 267:23183-23188

- Kroslak T, Koch T, Kahl E, Höllt V (2001) Human phosphatidylethanolamine-binding protein facilitates heterotrimeric G protein-dependent signaling. *J Biol Chem* 276:39772-39778
- Kurochkin IV, Yonemitsu N, Funahashi SI, Nomura H (2001) ALEX1, a novel human armadillo repeat protein that is expressed differentially in normal tissues and carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 280:340-347
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Le-Niculescu H, Niesman I, Fischer T, DeVries L, Farquhar MG (2005) Identification and characterization of GIV, a novel Galpha i/s-interacting protein found on COPI, endoplasmic reticulum-Golgi transport vesicles. *J Biol Chem* 280:22012-22020
- Lesch KP, Gross J, Wolozin BL, Murphy DL, Riederer P. (1993) Extensive Sequence divergence between the human and rat brain vesicular monoamine transporter: possible molecular basis for species differences in the susceptibility to MPP+. *J Neural Transmission* 93:75-82
- Li S, Armstrong CM, Bertin N, Ge H, Milstein S, Boxem M, Vidalain PO, Han JD, Chesneau A, Hao T, Goldberg DS, Li N, Martinez M, Rual JF, Lamesch P, Xu L, Tewari M, Wong SL, Zhang LV, Berriz GF, Jacotot L, Vaglio P, Reboul J, Hirozane-Kishikawa T, Li Q, Gabel HW, Elewa A, Baumgartner B, Rose DJ, Yu H, Bosak S, Sequerra R, Fraser A, Mango SE, Saxton WM, Strome S, Van Den Heuvel S, Piano F, Vandenhaute J, Sardet C, Gerstein M, Doucette-Stamm L, Gunsalus KC, Harper JW, Cusick ME, Roth FP, Hill DE, Vidal M (2004) A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science* 303:540-543
- Li B, 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* 7:957-963
- Liu G, Choi S, Tsien RW (1999) Variability of neurotransmitter concentration and nonsaturation of postsynaptic AMPA receptors at synapses in hippocampal cultures and slices. *Neuron* 22:395-409
- Luo Y & Denker BM (1999) Interaction of heterotrimeric G protein Galphao with Purkinje cell protein-2. Evidence for a novel nucleotide exchange factor *J Biol Chem* 274:10685-10688
- Liu Y & Edwards RH (1997) Differential localization of vesicular acetylcholine and monoamine transporters in PC12 cells but not CHO cells. *J Cell Biol* 139:907-916
- Liu Y, Peter D, Roghani A, Schuldiner S, Prive GG, Eisenberg D, Brecha N, Edwards RH (1992) A cDNA that suppresses MPP+ toxicity encodes a vesicular amine transporter. *Cell* 70:539-551
- Liu Y, Schweitzer ES, Nirenberg MJ, Pickel VM, Evans CJ, Edwards RH (1994) Preferential localization of a vesicular monoamine transporter to dense core vesicles in PC12 cells. *J Cell Biol* 127:1419-1433
- Man-Son-Hing HJ, Codina J, Abramowitz J, Haydon PG (1992) Microinjection of the alpha-subunit of the G protein Go2, but not Go1, reduces a voltage-sensitive calcium current. *Cell Signal* 4:429-441
- Mao H, Zhao Q, Daigle M, Ghahremani MH, Chidiac P, Albert PR (2004) RGS17/RGSZ2, a novel regulator of Gi/o, Gz, and Gq signaling. *J Biol Chem* 279:26314-26322
- Maycox PR, Hell JW, Jahn R (1988) Glutamate uptake by brain synaptic vesicles. *J Biol Chem* 263:15423-15428
- Meng J, Glick JL, Polakis P, Casey PJ (1999) Functional interaction between Galpha(z) and Rap1GAP suggests a novel form of cellular cross-talk. *J Biol Chem* 274:36663-36669
- Merickel A, Rosandich P, Peter D, Edwards RH (1995a) Identification of residues involved in substrate recognition by a vesicular monoamine transporter. *J Biol Chem* 270:25798-25804

- Merickel A, Edwards RH (1995b) Transport of histamine by vesicular monoamine transporter-2. *Neuropharmacology* 34:1543-1547
- Merickel A, Kaback HR, Edwards RH (1997) Charged residues in transmembrane domains II and XI of a vesicular monoamine transporter form a charge pair that promotes high affinity substrate recognition. *J Biol Chem* 272:5403-5408
- Miller KG, Emerson MD, McManus JR, Rand JB (2000) RIC-8 (Synembryn): a novel conserved protein that is required for G(q)alpha signaling in the *C. elegans* nervous system. *Neuron*:289-299
- Miller KG, Rand JB (2000) A role for RIC-8 (Synembryn) and GOA-1 (G(o)alpha) in regulating a subset of centrosome movements during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 156:1649-1660
- Miller KG, Alfonso A, Nguyen M, Crowell JA, Johnson CD, Rand JB (1996) A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:12593-12598
- Montmayeur JP, Borrelli E (1994) Targeting of G alpha i2 to the Golgi by alternative spliced carboxyl-terminal region. *Science* 263:95-98
- Moriarty TM, Padrell E, Carty DJ, Omri G, Landau EM, Iyengar R (1990) Go protein as signal transducer in the pertussis toxin-sensitive phosphatidylinositol pathway. *Nature* 343:79-82
- Mosharov EV, Sulzer D (2005) Analysis of exocytotic events recorded by amperometry. *Nat Methods* 2:651-658
- Munton RP, Tweedie-Cullen R, Livingstone-Zatchej M, Weinandy F, Waidelich M, Longo D, Gehrig P, Potthast F, Rutishauser D, Gerrits B, Panse C, Schlapbach R, Mansuy IM (2007) Qualitative and quantitative analyses of protein phosphorylation in naive and stimulated mouse synaptosomal preparations. *Mol Cell Proteomics* 6:283-293
- Murthy VN, Sejnowski TJ, Stevens CF (1997) Heterogeneous release properties of visualized individual hippocampal synapses. *Neuron* 18:599-612
- Nakanishi N, Onozawa S, Matsumoto R, Hasegawa H, Yamada S (1995a) Cyclic AMP-dependent modulation of vesicular monoamine transport in pheochromocytoma cells. *J Neurochem* 64:600-607
- Nakanishi N, Onozawa S, Matsumoto R, Kurihara K, Ueha T, Hasegawa H, Minami N (1995b) Effects of protein kinase inhibitors and protein phosphatase inhibitors on cyclic AMP-dependent down-regulation of vesicular monoamine transport in pheochromocytoma PC12 cells. *FEBS Lett* 368: 411-414
- Nakata H, Kozasa T (2005) Functional characterization of Galphao signaling through G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1. *Mol Pharmacol* 67:695-702
- Natochin M, Campbell TN, Barren B, Miller LC, Hameed S, Artemyev NO, Braun JE (2005) Characterization of the G alpha(s) regulator cysteine string protein. *J Biol Chem* 280:30236-30241
- Neer EJ, Lok JM, Wolf LG (1984) Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide regulatory unit of brain adenylate cyclase. *J Biol Chem* 259:14222-14229
- Neubig RR, Siderovski DP (2002) Regulators of G-protein signalling as new central nervous system drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 1:187-197
- Nishimoto I, Okamoto T, Matsuura Y, Takahashi S, Okamoto T, Murayama Y, Ogata E (1993) Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature* 362:75-79
- Nusser Z, Cull-Candy S, Farrant M (1997). Differences in synaptic GABA(A) receptor number underlie variation in GABA mini amplitude. *Neuron* 19:697-709

- Ozaki H, Watanabe Y, Ikeda K, Kawakami K (2002) Impaired interactions between mouse Eyal harboring mutations found in patients with branchio-oto-renal syndrome and Six, Dach, and G proteins. *J Hum Genet* 47:107-116
- Partilla JS, Dempsey AG, Nagpal AS, Blough BE, Baumann MH, Rothman RB (2006) Interaction of amphetamines and related compounds at the vesicular monoamine transporter. *J Pharmacol Exp Ther* 319:237-246
- Peter D, Jimenez J, Liu Y, Kim J, Edwards RH (1994) The chromaffin granule and synaptic vesicle amine transporters differ in substrate recognition and sensitivity to inhibitors. *J Biol Chem* 269:7231-7237
- Peter D, Liu Y, Sternini C, de Giorgio R, Brecha N, Edwards RH (1995) Differential expression of two vesicular monoamine transporters. *J Neurosci* 15:6179-6188
- Peter D, Vu T, Edwards RH (1996) Chimeric vesicular monoamine transporters identify structural domains that influence substrate affinity and sensitivity to tetrabenazine. *J Biol Chem* 271:2979-2986
- Pfister M, Tóth T, Thiele H, Haack B, Blin N, Zenner HP, Sziklai I, Nürnberg P, Kupka S (2002) A 4-bp insertion in the *eya*-homologous region (*eyaHR*) of *EYA4* causes hearing impairment in a Hungarian family linked to DFNA10. *Mol Med* 8:607-611
- Polakis PG, Rubinfeld B, Evans T, McCormick F (1991) Purification of a plasma membrane-associated GTPase-activating protein specific for *rap1/Krev-1* from HL60 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:239-243
- Pothos EN, Przedborski S, Davila V, Schmitz Y, Sulzer D (1998a) D2-Like dopamine autoreceptor activation reduces quantal size in PC12 cells. *J Neurosci* 18:5575-5585
- Pothos EN, Davila V, Sulzer D (1998b) Presynaptic recording of quanta from midbrain dopamine neurons and modulation of the quantal size. *J Neurosci* 18:4106-4118
- Pothos EN, Larsen KE, Krantz DE, Liu Y, Haycock JW, Setlik W, Gershon MD, Edwards RH, Sulzer D (2000) Synaptic vesicle transporter expression regulates vesicle phenotype and quantal size. *J Neurosci* 20:7297-7306
- Prado VF, Martins-Silva C, de Castro BM, Lima RF, Barros DM, Amaral E, Ramsey AJ, Sotnikova TD, Ramirez MR, Kim HG, et al. (2006) Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. *Neuron* 51:601-612
- Pullarkat SR, Mysels DJ, Tan M, Cowen DS (1998) Coupling of serotonin 5-HT<sub>1B</sub> receptors to activation of mitogen-activated protein kinase (ERK-2) and p70 S6 kinase signaling systems. *J Neurochem* 71:1059-1067
- Qin N, Platano D, Olcese R, Stefani E, Birnbaumer L (1997) Direct interaction of  $\text{g}\beta\text{tagamma}$  with a C-terminal  $\text{g}\beta\text{tagamma}$ -binding domain of the Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha$ 1 subunit is responsible for channel inhibition by G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci* 94:8866-8871
- Ram PT, Iyengar R (2001) G protein coupled receptor signaling through the Src and Stat3 pathway: role in proliferation and transformation. *Oncogene* 20:1601-1606
- Rasenick MM, Wang N, Yan K (1990) Specific associations between tubulin and G proteins: participation of cytoskeletal elements in cellular signal transduction. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* 24:381-386
- Ribas C, Takesono A, Sato M, Hildebrandt JD, Lanier SM (2002) Pertussis toxin-insensitive activation of the heterotrimeric G-proteins Gi/Go by the NG108-15 G-protein activator. *J Biol Chem* 277:50223-50225
- Ross EM & Wilkie TM (2000) GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu Rev Biochem* 69:795-827

- Roychowdhury S, Panda D, Wilson L, Rasenick MM (1999) G protein alpha subunits activate tubulin GTPase and modulate microtubule polymerization dynamics. *J Biol Chem* 274:13485-13490
- Rubinfeld B, Munemitsu S, Clark R, Conroy L, Watt K, Crosier WJ, McCormick F, Polakis P (1991) Molecular cloning of a GTPase activating protein specific for the Krev-1 protein p21rap1. *Cell* 65:1033-1042
- Sanchis-Segura C, Spanagel R (2006) Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol* 11:2-38
- Sato M, Ribas C, Hildebrandt JD, Lanier SM (1996) Characterization of a G-protein activator in the neuroblastoma-glioma cell hybrid NG108-15. *J Biol Chem* 271:30052-30060
- Scheel AA, Pelham HR (1998) Identification of amino acids in the binding pocket of the human KDEL receptor. *J Biol Chem* 273:2467-2472
- Scherman D, Henry JP (1984) Reserpine binding to bovine chromaffin granule membranes. Characterization and comparison with dihydroterabenazine binding. *Mol Pharmacol* 25:113-122
- Schuldiner S, Shirvan A, Linial M (1995) Vesicular neurotransmitter transporters From bacteria to humans. *Physiological Rev* 75:369-392
- Schultess J, Danielewski O, Smolenski AP (2005) Rap1GAP2 is a new GTPase-activating protein of Rap1 expressed in human platelets. *Blood* 105:3185-3192
- Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD (1998) Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6<sup>th</sup> Edition, Lippincott Williams & Wilkins
- Simpson F, Martin S, Evans TM, Kerr M, James DE, Parton RG, Teasdale RD, Wicking C (2005) A novel hook-related protein family and the characterization of hook-related protein 1. *Traffic* 6:442-458
- Smine A, Xu X, Nishiyama K, Katada T, Gambetti P, Yadav SP, Wu X, Shi YC, Yasuhara S, Homburger V, Okamoto T (1998) Regulation of brain G-protein go by Alzheimer's disease gene presenilin-1. *J Biol Chem* 273:16281-16288
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85
- Song H, Ming G, Fon E, Bellocchio E, Edwards RH, Poo M (1997) Expression of a putative vesicular acetylcholine transporter facilitates quantal transmitter packaging. *Neuron* 18:815-826
- Speidel D, Varoqueaux F, Enk C, Nojiri M, Grishanin RN, Martin TF, Hofmann K, Brose N, Reim K (2003) A family of Ca<sup>2+</sup>-dependent activator proteins for secretion: comparative analysis of structure, expression, localization, and function. *J Biol Chem* 278:52802-52809
- Speidel D, Bruederle CE, Enk C, Voets T, Varoqueaux F, Reim K, Becherer U, Fornal F, Ruggieri S, Holighaus Y, Weihe E, Bruns D, Brose N, Rettig J (2005) CAPS1 regulates catecholamine loading of large dense-core vesicles. *Neuron* 46:75-88
- Sternweis PC, Robishaw JD (1984) Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain. *J Biol Chem* 259:13806-13813
- Stow JL, de Almeida JB, Narula N, Holtzman EJ, Ercolani L, Ausiello DA (1991) A heterotrimeric G protein, G alpha i-3, on Golgi membranes regulates the secretion of a heparan sulfate proteoglycan in LLC-PK1 epithelial cells. *J Cell Biol* 114:1113-1124
- Strittmatter SM, Valenzuela D, Sudo Y, Linder ME, Fishman MC (1991) An intracellular guanine nucleotide release protein for G<sub>0</sub>. GAP-43 stimulates isolated alpha subunits by a novel mechanism. *J Biol Chem* 266:22465-22471

- Takahashi N, Miner LL, Sora I, Ujike H, Revay RS, Kostic V, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Uhl GR (1997) VMAT2 knockout mice: heterozygous display reduced amphetamine-conditioned reward, enhanced amphetamine locomotion and enhanced MPTP toxicity. *Proc Natl Acad Sci* 94:9938–9943
- Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Brügger B, Ringler P, Müller SA, Rammner B, Gräter F, Hub JS, De Groot BL, Mieskes G, Moriyama Y, Klingauf J, Grubmüller H, Heuser J, Wieland F, Jahn R (2006) Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127:831-846
- Takesono A, Cismowski MJ, Ribas C, Bernard M, Chung P, Hazard S 3rd, Duzic E, Lanier SM (1999) Receptor-independent activators of heterotrimeric G-protein signaling pathways. *J Biol Chem* 274:33202-33205
- Tall GG, Krumins AM, Gilman AG (2003) Mammalian Ric-8A (synembryn) is a heterotrimeric G $\alpha$  protein guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem* 278:8356-8362
- Tan PK, Waites C, Liu Y, Krantz DE, Edwards RH (1998) A leucine-based motif mediates the endocytosis of vesicular monoamine and acetylcholine transporters. *J Biol Chem* 273:17351-17360
- Toutant M, Aunis D, Bockaert J, Homburger V, Rouot B (1987) Presence of three pertussis toxin substrates and Go  $\alpha$  immunoreactivity in both plasma and granule membranes of chromaffin cells. *FEBS Lett* 215:339-344
- Traver S, Bidot C, Spassky N, Baltauss T, De Tand MF, Thomas JL, Zalc B, Janoueix-Lerosey I, Gunzburg JD (2000) RGS14 is a novel Rap effector that preferentially regulates the GTPase activity of G $\alpha_{\text{pho}}$ . *Biochem J* 350:19-29
- Travis ER, Wang YM, Michael DJ, Caron MG, Wightman RM (2000) Differential quantal release of histamine and 5-hydroxytryptamine from mast cells of vesicular monoamine transporter 2 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:162-167
- Valenzuela D, Han X, Mende U, Fankhauser C, Mashimo H, Huang P, Pfeffer J, Neer EJ, Fishman MC (1997) G  $\alpha_{\text{o}}$  is necessary for muscarinic regulation of Ca $^{2+}$  channels in mouse heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:1727-1732
- van Biesen T, Hawes BE, Raymond JR, Luttrell LM, Koch WJ, Lefkowitz RJ (1996) G(o)-protein  $\alpha$ -subunits activate mitogen-activated protein kinase via a novel protein kinase C-dependent mechanism. *J Biol Chem* 271:1266-1269
- van Crielinge W & Beyaert R (1999) Yeast Two-Hybrid: State of the Art. *Biological Procedures Online* 2:1-38
- van der Kloot W (1991) The regulation of quantal size. *Prog Neurobiol* 36:93-130
- van der Kloot W, Colasante C, Cameron R, Molgó J (2000) Recycling and refilling of transmitter quanta at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 523:247-258
- van Dongen AM, Codina J, Olate J, Mattera R, Joho R, Birnbaumer L, Brown AM (1988) Newly identified brain potassium channels gated by the guanine nucleotide binding protein Go. *Science* 242:1433-1437
- Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hörtnagel H, Voits M, Fink H, Bader M (2003) Synthesis of Serotonin by a second Tryptophan hydroxylase isoform. *Science* 299:76
- Watts VJ, Wiens BL, Cumbay MG, Vu MN, Neve RL, Neve KA (1998) Selective activation of G $\alpha_{\text{pho}}$  by D2L dopamine receptors in NS20Y neuroblastoma cells. *J Neurosci* 18:8692-8699
- Wayne S, Robertson NG, DeClau F, Chen N, Verhoeven K, Prasad S, Tranebjärg L, Morton CC, Ryan AF, Van Camp G, Smith RJ (2001) Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late-onset deafness at the DFNA10 locus. *Hum Mol Genet* 10:195-200
- Webster RA (2001) *Neurotransmitters, Drugs and Brain Function*, John Wiley & Sons Ltd.

Willard FS, Crouch MF (2000) Nuclear and cytoskeletal translocation and localization of heterotrimeric G-proteins. *Immunol Cell Biol* 78:387-394

Wilson BS, Komuro M, Farquhar MG (1994) Cellular variations in heterotrimeric G protein localization and expression in rat pituitary. *Endocrinology* 134:233-244

Yao J, Hersh LB (2007) The vesicular monoamine transporter 2 contains trafficking signals in both its N-glycosylation and C-terminal domains. *J Neurochem* 100:1387-1396

Ye Q, Worman HJ (1995) Protein-protein interactions between human nuclear lamins expressed in yeast. *Exp Cell Res* 219:292-298

Zheng B, Lavoie C, Tang TD, Ma P, Meerloo T, Beas A, Farquhar MG (2004) Regulation of epidermal growth factor receptor degradation by heterotrimeric Galphas protein. *Mol Biol Cell* 15:5538-55

## Veröffentlichungen

### Publikationen:

Deletion of  $Go2\alpha$  abolishes cocaine-induced behavioral sensitization by disturbing the striatal dopamine system

Brunk I, **Blex C**<sup>\*)</sup>, Sanchis-Segura C, Sternberg J, Perreau-Lenz S, Bilbao A, Hörtnagl H, Baron J, Juranek J, Laube G, Birnbaumer L, Spanagel R and Ahnert-Hilger G  
FASEB J.; zur Publikation angenommen

Regulation of the murine monoamine oxidase A gene by circadian clock components implies clock influence on mood

Hampf G, Ripperger JA, Houben T, Schmutz I, **Blex C**, Brunk I, Ahnert-Hilger G, Meijer J and Albrecht U  
Curr Biol. 2008; 18:678-683

The first luminal domain of vesicular monoamine transporters mediates G-protein-dependent regulation of transmitter uptake

Brunk I, **Blex C**, Rachakonda S, Höltje M, Winter S, Pahner I, Walther DJ, Ahnert-Hilger G  
J Biol Chem. 2006 281:33373-33385

Regulation of vesicular monoamine and glutamate transporters by vesicle-associated trimeric G proteins: new jobs for long-known signal transduction molecules

Brunk I, Holtje M, von Jagow B, Winter S, Sternberg J, **Blex C**, Pahner I, Ahnert-Hilger G.  
Handb Exp Pharmacol. 2006; 175 :305-325

<sup>\*)</sup> gleichberechtigter Autor

### Tagungsbeiträge:

The first intravesicular domain of vesicular monoamine transporters serves as receptor-like structure in G-protein mediated regulation of monoamine storage

**Blex C**, Brunk I, Rachakonda S, Winter S, Höltje M, Walther D and Ahnert-Hilger G;  
Präsentation auf dem 7. Treffen der deutschen Neurowissenschaftlichen Gesellschaft, Göttingen 2007

Modulated monoamine storage in  $G\alpha2^{-/-}$  mice alters behavioural responses following cocaine but not amphetamine treatment

Brunk I, Sanchis-Segura C, **Blex C**, Sternberg J, Perreau-Lenz S, Hörtnagl H, Spanagel R and Ahnert-Hilger G

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Gudrun Ahnert-Hilger für die Überlassung des Themas und auch für die intensive und geduldige Betreuung während der gesamten Arbeit.

Herrn Professor Dr. Roland Lauster danke ich sehr für die unkomplizierte Übernahme der Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit seitens des Instituts für Biotechnologie der Technischen Universität Berlin.

Frau Professor Dr. Heide Hörtnagl danke ich für die Durchführung von großen Teilen der Monoaminbestimmungen mittels HPLC und Ihre Hilfe bei der Methodenetablierung in unserer Arbeitsgruppe.

Herrn Professor Dr. Lutz Birnbaumer danke ich für die Überlassung der  $G\alpha$ -Knockout-Mausmodelle und die cDNAs von  $G\alpha$  und  $Gq\alpha$ .

Für ihre kompetente fachliche Anleitung und moralische Unterstützung möchte ich mich insbesondere bei Irene und Krishna bedanken.

Ursel, die mir besonders bei der Herstellung stabil transfizierter Zelllinien eine große Hilfe war, gebührt ebenso großer Dank.

Für die Mithilfe in vielen kleinen und großen Dingen sowie das gute Arbeitsklima danke ich auch all meinen weiteren Kollegen am Institut für Anatomie der Charité, ausdrücklich: Annett, Birgit, Christian, Elisabeth, Jan, Jens, Johannes, Karin, Mahesh, Marion, Markus, Philipp, Suzan und Thomas.

Franziska und Irene danke ich an dieser Stelle außerordentlich für das Korrekturlesen und die Suche nach Tippfehlern.

Meiner Frau Franziska, unseren Familien und Freunden danke ich für die aus- und andauernde Unterstützung in jeglicher Art und Weise, Franziska auch insbesondere für Ihre Geduld.