

# D i s s e r t a t i o n

## **Regulation der Aktivität der vesikulären Monoamintransporter VMAT1 und VMAT2 in neuroendokrinen Zellen und Neuronen**

Zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr.rer.nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der  
Humboldt-Universität von

Markus Höltje

geb.09.08.1969 in Braunschweig

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof.Dr.Dr.h.c. Hans Meyer

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof.Dr. Bernd Ronacher

Gutachter: 1. Herr Prof.Dr. Harald Saumweber  
2. Frau Prof.Dr.Gudrun Ahnert-Hilger  
3. Herr Priv.Doiz.Dr. Klaus Buchner

eingereicht: 21.06.2000

Datum der Promotion: 12.09.2000

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation der Aktivität der vesikulären Monoamintransporter VMAT1 und VMAT2 durch heterotrimere G-Proteine untersucht.

In der humanen neuroendokrinen Zelllinie BON werden VMAT1 und VMAT2 exprimiert. Sie colokalisieren in diesen Zellen mit der  $\alpha$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins  $G_{\alpha_2}$  vorwiegend auf großen elektronendichten Vesikeln, den LDCVs. Die Aktivität beider Transporter unterliegt einer Regulation durch  $G_{\alpha_2}$ . Nach Aktivierung des G-Proteins kommt es zu einer Hemmung der vesikulären Monoaminaufnahme. Die Aktivität von VMAT2 wird dabei empfindlicher reguliert als die Aktivität von VMAT1.

In Primärkulturen von Rapheneuronen der Ratte wird VMAT2 als neuronale Variante des Transporters exprimiert. VMAT2 lokalisiert in diesen Neuronen überwiegend auf kleinen synaptischen Vesikeln, den SSVs. Hier kommt es zu einer Colokalisation mit  $G_{\alpha_2}$  auf diesem Vesikeltyp. Auch in Rapheneuronen wird die Aktivität von VMAT2 durch diese G-Protein Untereinheit gehemmt.

Elektronenmikroskopische Befunde belegen die Lokalisation von VMAT2 und  $G_{\alpha_2}$  auf SSVs von serotonergen Axonterminalen im präfrontalen Cortex der Ratte. An einer Präparation synaptischer Vesikel aus diesem Gehirnbereich konnte ebenfalls eine Hemmung der Transportaktivität von VMAT2 durch  $G_{\alpha_2}$  nachgewiesen werden.

Auch in Thrombozyten der Maus unterliegt die vesikuläre Serotoninaufnahme einer Hemmung durch ein heterotrimeres G-Protein. In chronisch entleerten Vesikeln aus Mäusen, in denen das Gen für die periphere Tryptophanhydroxylase deletionsmutiert vorlag, konnte zunächst keine Hemmung der Serotoninaufnahme durch heterotrimere G-Proteine beobachtet werden. Nach Vorbeladung der Vesikel mit Serotonin war dies jedoch der Fall. Die Aktivierung des G-Proteins wird somit sehr wahrscheinlich über den Füllungszustand der Vesikel gesteuert.

Schlagwörter

VMAT1, VMAT2, heterotrimere G-Proteine, Monoaminaufnahme

**Abstract-English**

In this study we investigated the regulation of the activity of the vesicular monoamine transporters VMAT1 and VMAT2 by heterotrimeric G-proteins.

In the human neuroendocrine cell line BON both transporters are expressed. They colocalize in these cells with the  $\alpha$ -subunit of the heterotrimeric G-protein  $G_{\alpha_2}$  predominantly on Large Dense Core Vesicles (LDCVs). The activity of both VMAT1 and VMAT2 is regulated by  $G_{\alpha_2}$ . G-protein activation results in a down-regulation of vesicular monoamine uptake. VMAT2 appears to be more sensitive towards the observed G-protein regulation than VMAT1.

Serotonergic raphe neurons in primary culture express VMAT2 as the neuronal form of the transporter. In these neurons VMAT2 predominantly localizes to Small Synaptic Vesicles (SSVs). Here, VMAT2 colocalizes with  $G_{\alpha_2}$  on SSVs. In these neurons  $G_{\alpha_2}$ -dependent down-regulation of VMAT2 activity was observed, too.

Immunoelectron microscopic analysis confirmed a localization of VMAT2 and  $G_{\alpha_2}$  on SSVs from serotonergic terminals in the rat prefrontal cortex. In addition,  $G_{\alpha_2}$ -dependent regulation of VMAT2 activity could also be demonstrated when using a crude synaptic vesicle preparation of this brain area.

Even in platelets obtained from mice the vesicular serotonin uptake is down-regulated by heterotrimeric G-proteins. In serotonin-depleted platelets from peripheral tryptophane-hydroxylase knockout mice no G-protein-dependent down-regulation of monoamine uptake was observed. After preincubation of the platelets with serotonin, the G-protein regulation was restored. Therefore, the vesicular transmitter content appears to be a likely factor of G-protein activation in platelets.

**Keywords**

VMAT1, VMAT2, heterotrimeric G-proteins, monoamine uptake

# IV

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Einleitung</b> .....   | <b>1</b>  |
| 1.1 Transmitter als Botenstoffe im Organismus .....  | 1         |
| 1.2 Transporter der Plasmamembran .....  | 2         |
| 1.3 Vesikuläre Speicherung der Transmittersubstanzen .....   | 3         |
| 1.4 Vesikuläre Transporter .....   | 4         |
| 1.5 Vesikuläre Speicherung der Monoamine .....   | 5         |
| 1.6 Regulation der vesikulären Speicherung.....  | 9         |
| 1.7 Heterotrimerer G-Proteine als Bestandteile vieler<br>Signaltransduktionsprozesse .....                               | 10        |
| 1.8 Fragestellung .....  | 12        |
| <b>2. Material und Methoden</b> .....  | <b>13</b> |
| 2.1 Chemikalien und Reagenzien .....   | 13        |
| 2.2 Puffer und Lösungen .....  | 16        |
| 2.3 Medien für die Zellkultur .....  | 19        |
| 2.4 Verwendete Antikörper .....  | 20        |
| 2.5 Durchführung der Experimente .....   | 22        |
| 2.5.1 Zellkultur.....  | 22        |
| 2.5.2 Permeabilisierung mit $\alpha$ -Toxin und Streptolysin-O .....   | 24        |
| 2.5.3 Monoaminaufnahme in permeabilisierte Zellen.....   | 25        |
| 2.5.4 Monoaminsekretion .....  | 26        |
| 2.5.5 Transfektion von COS Zellen .....  | 27        |
| 2.5.6 Protein-Gelelektrophorese und Immunoreplika-Analyse .....  | 28        |
| 2.5.7 Immunzytochemie .....  | 29        |
| 2.5.8 Elektronenmikroskopie .....  | 30        |
| 2.5.9 Subzelluläre Fraktionierung.....   | 30        |
| 2.5.10 Bestimmung von Protein-Konzentrationen .....  | 31        |
| 2.5.11 Präparation von synaptischen Vesikeln (LP2).....  | 32        |
| 2.5.12 Thrombozytenpräparation .....   | 32        |
| 2.6 Verwendete Geräte .....  | 33        |
| <b>3. Ergebnisse</b> .....   | <b>34</b> |
| 3.1 Poren-bildende Toxine als Werkzeuge zur Untersuchung intrazellulärer<br>Transportprozesse.....                       | 34        |
| 3.2 Regulation der vesikulären Serotoninaufnahme in permeabilisierte<br>BON Zellen durch heterotrimerer G-Proteine ..... | 38        |
| 3.2.1 Vesikuläre Aufnahme von Serotonin .....  | 38        |
| 3.2.2 Hemmung der vesikulären Aufnahme durch Aktivatoren<br>heterotrimerer G-Proteine .....                              | 39        |
| 3.2.3 Aufhebung der durch GTP $\gamma$ S und GMppNp induzierten<br>Hemmung durch Pertussis Toxin .....                   | 41        |
| 3.2.4 Hemmung der vesikulären Aufnahme durch G $\alpha$ <sub>o2</sub> .....  | 43        |
| 3.2.5 Spezifität der G-Protein Effekte auf die vesikuläre Aufnahme.....  | 45        |
| 3.3 Charakterisierung von polyklonalen Antikörpern gegen VMAT1<br>und VMAT2 .....  | 48        |
| 3.4 Untersuchungen zur subzellulären Verteilung von VMAT1<br>und VMAT2 in PC12 und BON Zellen .....                      | 50        |
| 3.4.1 In PC12 Zellen lokalisiert VMAT1 überwiegend auf LDCVs .....   | 50        |
| 3.4.2 In BON Zellen lokalisieren VMAT1 und VMAT2 überwiegend<br>auf LDCVs.....   | 52        |

## V

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 3.5       | Funktionelle Differenzierung zwischen der Aktivität von VMAT1 und VMAT2 in BON Zellen .....  | 55        |
| 3.6       | Unterschiedliche Empfindlichkeit der Aktivität von VMAT1 und VMAT2 gegenüber der Regulation durch $G\alpha_{o2}$ .....                                     | 59        |
| 3.7       | Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme in Neuronen.....   | 62        |
| 3.7.1     | Primärkulturen der Raphe als Modell zur Untersuchung der Speicherung von monoaminergen Transmittern .....  | 62        |
| 3.7.2     | Funktionelle Charakterisierung monoaminergener Neurone in Primärkultur der Raphe .....   | 64        |
| 3.7.3     | Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme in permeabilisierte Rapheneurone durch $G\alpha_{o2}$ .....  | 67        |
| 3.8       | VMAT2 und $G\alpha_{o2}$ auf monoaminergen synaptischen Vesikeln.....  | 71        |
| 3.8.1     | Lokalisation von VMAT2 und $G\alpha_{o2}$ auf synaptischen Vesikeln von Neuronen.....  | 72        |
| 3.8.2     | Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme in synaptische Vesikel durch $G\alpha_{o2}$ .....  | 75        |
| 3.9       | Die durch GMppNp vermittelte Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme in permeabilisierte Thrombozyten ist abhängig vom Füllungszustand der Vesikel ..... | 77        |
| <b>4.</b> | <b>Diskussion .....</b>  | <b>80</b> |
| 4.1       | BON Zellen als Modell zur Untersuchung der vesikulären Monoaminspeicherung .....   | 80        |
| 4.2       | In BON Zellen wird die vesikuläre Monoaminaufnahme durch $G\alpha_{o2}$ gehemmt.....   | 80        |
| 4.3       | In BON Zellen lokalisieren die vesikulären Monoamintransporter überwiegend auf LDCVs .....   | 81        |
| 4.4       | Die Aktivität von VMAT1 und VMAT2 wird in BON Zellen durch $G\alpha_{o2}$ reguliert.....   | 83        |
| 4.5       | Primärkulturen der Raphe stellen ein geeignetes Modell zur Untersuchung der vesikulären Monoaminspeicherung in Neuronen dar.....                           | 85        |
| 4.6       | Die Aktivität von VMAT2 wird in permeabilisierten Rapheneuronen durch $G\alpha_{o2}$ gehemmt.....  | 87        |
| 4.7       | VMAT2 und $G\alpha_{o2}$ lokalisieren in kultivierten Rapheneuronen und serotonergen Axonen aus dem präfrontalen Cortex auf SSVs.....                      | 88        |
| 4.8       | Funktionelle Bedeutung der Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme durch $G\alpha_{o2}$ .....  | 90        |
| 4.9       | Wie kommt es zur G-Protein-Aktivierung? .....  | 93        |
| 4.10      | Ausblick.....  | 95        |
| <b>5.</b> | <b>Literaturverzeichnis.....</b>   | <b>96</b> |

**Selbständigkeitserklärung**

**Danksagung**

## 1. Einleitung

### 1.1 Transmitter als Botenstoffe im Organismus

Die Aufrechterhaltung sämtlicher Körperfunktionen sowie die angepaßte Reaktion des Organismus auf interne Signale und externe Reize erfordert die Kommunikation unterschiedlicher Zellen und Gewebe miteinander. Spezialisierte Zellen kommunizieren über freigesetzte Botenstoffe wie Neurotransmitter, Hormone oder Wachstumsfaktoren. Eine übergeordnete Rolle bei der Kontrolle und Steuerung der Körperfunktionen kommt dabei Gehirn und Rückenmark, dem Zentralen Nervensystem, zu. Die Struktur des menschlichen Gehirns bilden etwa einhundert Milliarden ( $10^{11}$ ) Nervenzellen sowie die zehnfache Anzahl an Gliazellen. Eine einzelne Nervenzelle, das Neuron, kann wenige Hundert bis etwa 200.000 synaptische Kontakte ausbilden, an denen die Informationsübertragung über Neurotransmitter stattfindet.

Eine Vielzahl von Substanzen, die den Kriterien eines Neurotransmitters entsprechen, sind bisher charakterisiert worden. Sie lassen eine Einteilung in drei Klassen sinnvoll erscheinen:

Einfache Aminosäuren wie Glutamat,  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) oder Glyzin werden von 90 % aller Synapsen des ZNS als Neurotransmitter verwendet und sind für die schnelle synaptische Übertragung verantwortlich (Nicholls, 1994). Glutamat repräsentiert dabei den wichtigsten exzitatorischen (aktivierenden), GABA und Glyzin die wichtigsten inhibitorischen (hemmenden) Transmitter des ZNS.

Die zweite Klasse setzt sich aus den klassischen Neurotransmittern zusammen, deren Hauptvertreter Acetylcholin, die Katecholamine Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin, sowie Serotonin und Histamin darstellen. Die durch klassische Neurotransmitter vermittelten Effekte zeichnen sich zumeist durch ihren langsamen, oft aktivitätsmodulierenden Effekt aus. Für Acetylcholin gilt dies nur bedingt. Als Transmitter der motorischen Endplatte (Katz et al., 1957) steht Acetylcholin dort beispielhaft für eine schnelle synaptische Übertragung.

Die dritte Klasse besteht aus einer Vielzahl von Neuropeptiden, wie Cholezystokinin, Substanz P oder Somatostatin, die in sehr geringen Konzentrationen im ZNS vorliegen und, überwiegend nicht-synaptisch freigesetzt, ebenfalls modulatorische

Effekte vermitteln.

Generell können die Effekte über Ionenkanalrezeptoren (ionotrophe) oder G-Protein gekoppelte (metabotrophe) Rezeptoren übertragen werden.

Die Transmitterfreisetzung erfolgt überwiegend über den Mechanismus der Exozytose. In eukaryontischen Zellen existieren zwei unterschiedliche Formen der Exozytose: In allen Zellen findet sich eine *konstitutive* Sekretion, bei der Vesikel, die dem trans-Golgi Netzwerk entstammen, kontinuierlich zur Plasmamembran transportiert werden und dort mit dieser fusionieren. Dieser Prozeß dient hauptsächlich der Versorgung der Plasmamembran mit Protein- und Lipidkomponenten. Zusätzlich findet sich in vielen Zellen eine *regulierte* Sekretion, bei der Stoffe in sekretorischen Vesikeln gespeichert und konzentriert werden, bevor sie in die Nähe des Freisetzungsortes transportiert und nur auf einen Stimulus hin freigesetzt werden. Dieser Stimulus besteht zumeist in einer durch Depolarisation der Plasmamembran hervorgerufenen Öffnung von spannungsabhängigen  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen, die zum Anstieg der intrazellulären Konzentration freier  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen führt.

## 1.2 Transporter der Plasmamembran

Synaptische Übertragung beinhaltet die Freisetzung des Transmitters in den synaptischen Spalt, die Interaktion mit einem postsynaptischen Rezeptor und die darauffolgende Entfernung des Transmitters aus dem synaptischen Spalt. Eine schnelle Wiederaufnahme in die präsynaptische Zelle oder auch in Glia Zellen durch spezifische Plasmamembrantransporter ist dabei für die Beendigung der synaptischen Transmission – und damit auch für die physiologische Wirkung - vieler Neurotransmitter essentiell. Plasmamembrantransporter sind integrale Membranproteine. Die Energie zur Akkumulation der Substrate im Zytosol beziehen sie aus dem elektrochemischen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Ionengradienten über der Plasmamembran, der durch eine membranständige  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase generiert wird. Die bekannten Plasmamembrantransporter lassen sich in zwei Unterfamilien gruppieren: Die Hauptvertreter der einen Unterfamilie bilden fünf Glutamattransporter-Subtypen, die in der Genfamilie der exzitatorischen Aminosäure-Transporter (EAAT) zusammengefaßt werden (Arriza et al., 1994). Ihnen gemeinsam ist der Cotransport von Glutamat mit Natrium und Protonen in die Zelle hinein, im Austausch wird Kalium

hinaustransportiert. Zwei Topologiemodelle, die von 8 bzw. 10 Transmembrandomänen ausgehen, werden diskutiert (Slotboom et al., 1999). Eine weitgehende Sequenzhomologie zu den Glutamattransportern weisen zwei Transporter für neutrale Aminosäuren, ASCT1 und 2, auf (Arriza et al., 1993). In der anderen Unterfamilie sind eine Reihe von Transportern zusammengefaßt, die GABA, Glyzin, Katecholamine und andere Monoamine akkumulieren (Worrall und Williams, 1994). Hier kommt es zu einem Cotransport des Neurotransmitters mit Natrium und Chlorid in die Zelle. Diese  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -abhängigen Transporter unterscheiden sich durch den Besitz von 12 Transmembrandomänen von der Gruppe der Glutamattransporter (Guastella et al., 1990).

### **1.3 Vesikuläre Speicherung der Transmittersubstanzen**

Die Speicherung und Konzentrierung von Neurotransmittern oder auch Hormonen in sekretorischen Vesikeln stellt eine Voraussetzung für die Exozytose dar (Maycox et al., 1990). Eine zusätzliche Bedeutung der vesikulären Speicherung besteht im Schutz der Transmittermoleküle vor enzymatischem Um- oder Abbau, sowie dem Schutz der Zelle selbst vor toxisch wirkenden hohen Konzentrationen einiger Transmitter (Liu und Edwards, 1997).

Neurone und neuroendokrine Zellen speichern ihren Transmitter überwiegend in zwei verschiedenen Klassen von Vesikeln, die sich hinsichtlich ihrer Größe und Proteinzusammensetzung, der Biogenese und dem Mechanismus der regulierten exozytotischen Freisetzung unterscheiden.

In großen Vesikeln (> 70 nm im Durchmesser), die aufgrund ihres Proteingehalts elektronendicht erscheinen, und daher als LDCVs (Large Dense Core Vesicles) oder Granula (in neuroendokrinen Zellen) bezeichnet werden, erfolgt die Speicherung von Neuropeptiden und Hormonen. Letztere werden als Vorläufermoleküle synthetisiert, bevor sie in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums gelangen und über proteolytische Spaltungen und Transport zum Golgi-Komplex zum fertigen Transmitter modifiziert werden. Im trans-Golgi Netzwerk erfolgt die Konzentrierung und Speicherung in LDCVs (de Camilli und Jahn, 1990; Walter und Johnson, 1994).

Im Gegensatz zu Peptiden oder Hormonen werden die klassischen Neurotransmitter entweder im Zytoplasma neu synthetisiert oder über spezifische Transporter der Plasmamembran (s.o.) nach erfolgter exozytotischer Freisetzung wieder aus dem



Extrazellulärraum aufgenommen (Schloss et al., 1994). Ausschließlich in kleinen (40-50 nm im Durchmesser), elektronenmikroskopisch klaren, und in Neuronen als SSVs (Small Synaptic Vesicles) bezeichneten Vesikeln wird Acetylcholin, GABA, Glyzin oder Glutamat gespeichert (Südhof und Jahn, 1991; Edwards, 1992). Analoga dieses Vesikeltyps, die SLMVs (Synaptic-Like Microvesicles) existieren in neuroendokrinen Zellen. Während LDCVs dem trans-Golgi Netzwerk im Zellkörper entstammen und nach erfolgter Freisetzung des Sekrets für eine erneute Beladung auch dorthin zurücktransportiert werden müssen, entstammen SSVs einem lokalen „Recycling“ aus dem endosomalen Kompartiment in der synaptischen Endigung. Als Auslöser für die regulierte exozytische Membranfusion der SSVs mit der Plasmamembran fungiert eine sehr schnelle, durch Membrandepolarisation hervorgerufene, starke lokale Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration. Es besteht hier eine sehr enge zeitliche Kopplung zwischen extrazellulärem Signal und Transmitterfreisetzung an den sogenannten „aktiven Zonen“. Im Gegensatz dazu kommt es bei den LDCVs nicht zu einer verstärkten Akkumulation von Vesikeln an den aktiven Zonen, und nur vereinzelt wurden dort exozytische Ereignisse nachgewiesen. Hauptsächlich findet die Exozytose von LDCVs nicht-synaptisch statt. Es kommt somit nicht zu einer schnellen Bindung des Transmitters an einen postsynaptischen Rezeptor. Die durch Neuropeptide oder Hormone vermittelten langsamen und eher modulatorischen Effekte sind auch in Übereinstimmung mit einer längeren Diffusionsstrecke zu sehen. Die Exozytose von LDCVs ist, anders als bei SSVs, weniger genau an einzelne Aktionspotentiale gekoppelt. Sie erfolgt aufgrund der größeren räumlichen Distanz der Vesikel zu den  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen nach höherfrequenter Stimulation mit vergleichsweise langer zeitlicher Latenz auf den Stimulus (Neher, 1998).

In noradrenergen Neuronen findet sich ein weiterer Vesikeltyp, der in der Größe den SSVs entspricht, jedoch nach Behandlung des Gewebes mit Permanganat elektronendicht erscheint. Die Membran dieser SDCVs (Small Dense Core Vesicles) enthält Proteine, die Membrankomponenten sowohl von SSVs als auch von LDCVs darstellen. Die Frage, ob es sich um eine Art Hybrid aus SSVs und LDCVs handelt, wird diskutiert (Bauerfeind et al., 1995).

#### **1.4 Vesikuläre Transporter**

Vier verschiedene vesikuläre Transporteraktivitäten sind charakterisiert und die

verantwortlichen Transporterproteine teilweise kloniert: Die Transporterproteine für Acetylcholin (Parsons et al., 1993) und Glutamat (Naito und Ueda, 1983) erwiesen sich als spezifisch für den jeweiligen Transmitter. Der Acetylcholintransporter VACHT (Vesicular Acetylcholine Transporter) ist kloniert (Roghani et al., 1994). Für die vesikuläre Speicherung von GABA und Glyzin existiert mit dem VIAAT (Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter) ein gemeinsamer Transporter (Burger et al., 1991; Dumoulin et al., 1999). Zusätzlich existieren zwei Transporter für die vesikuläre Speicherung von Monoaminen, also Katecholamine, Serotonin und Histamin.

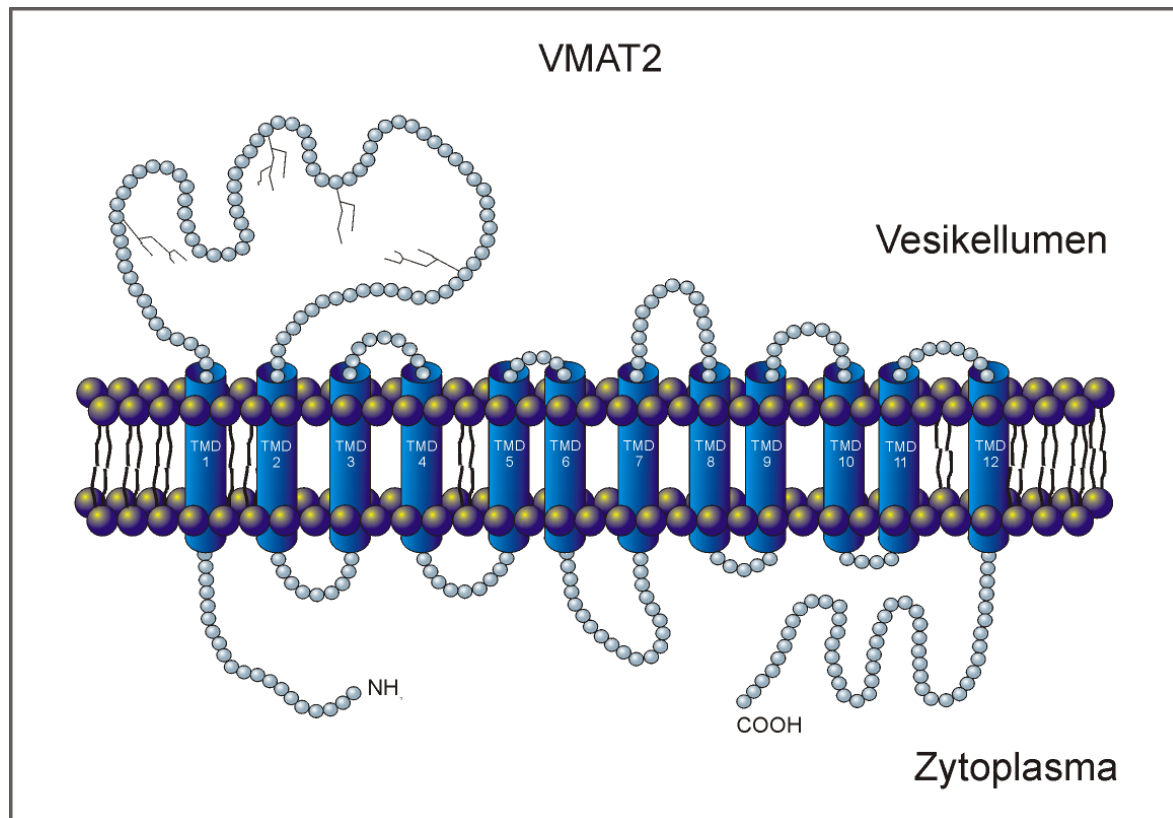
Die Energie zur Akkumulation von Transmittern in sekretorischen Speicherorganellen beziehen alle bekannten vesikulären Transporter aus einem von innen nach außen gerichteten elektrochemischen Protonengradienten über der Vesikelmembran. Generiert wird dieser Gradient durch eine vesikelständige  $H^+$ -ATPase, die unter ATP-Spaltung Protonen in das Lumen des Vesikels pumpt und so zu einer Ansäuerung führt (Njus et al., 1986; Nelson, 1992). Sowohl die elektrische Komponente  $\Delta\psi$  als auch der pH Gradient  $\Delta pH$  können in unterschiedlichem Ausmaß als treibende Kraft für den Transport der verschiedenen Transmitter in das Speicherorganell dienen.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht die Untersuchung der vesikulären Speicherung von Monoaminen sowie die Regulation dieses Transportprozesses, sie wird daher nachfolgend genauer behandelt werden.

## 1.5 Vesikuläre Speicherung der Monoamine

Im Säugerorganismus sind zwei strukturell sehr ähnliche vesikuläre Monoamintransporter bekannt. Sie unterscheiden sich jedoch bezüglich des Substratspektrums, der Gewebeverteilung und ihrer pharmakologischen Beeinflussbarkeit. Die vesikulären Monoamintransporter VMAT1 und VMAT2 der Ratte konnten vor einigen Jahren kloniert werden (Liu et al., 1992a/b; Erickson et al., 1992). Zunächst fiel auf, daß sich PC12 Zellen, nicht jedoch CHO Zellen als resistent gegen das Neurotoxin 1-Methyl-4-Phenylpyridin ( $MPP^+$ ) erwiesen. Durch Selektion von CHO Zellen, die sich nach Transfektion mit einer cDNA Bank aus PC12 Zellen als resistent gegen  $MPP^+$  erwiesen, konnte VMAT1 kloniert werden. Die Sequenzanalyse ergab ein Protein, das aus 521 Aminosäuren besteht. Die Analyse einer Gehirn cDNA-Bande ergab ein Protein mit 515 Aminosäuren. Beide Transporter besitzen ein Molekulargewicht von etwa 55 kDa und weisen 12

Transmembrandomänen auf (**Abbildung 1**).



*Abbildung 1*

**Sekundärstruktur von VMAT2 der Ratte (nach Liu und Edwards, 1997)**

Sie entsprechen damit einem Topologiemodell, das für alle vesikulären Transporter postuliert wird. Entsprechend diesem Modell besitzen VMAT1 und VMAT2 eine hydrophile Schleife zwischen den Transmembrandomänen (TMD) 1 und 2, die in das Lumen des Vesikels gerichtet ist. Sie enthält für VMAT1 drei, für VMAT2 vier mögliche Glykosylierungsstellen. Sowohl der n-Terminus als auch der c-Terminus befinden sich im Zytoplasma. Der Sequenzvergleich zwischen VMAT1 und VMAT2 ergab eine 78 %ige Homologie der beiden Transporter auf Aminosäureebene (Schuldiner et al., 1995). Die größte Divergenz existiert dabei in der luminalen Schleife.

Interessanterweise existieren starke strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zu einer Gruppe von bakteriellen Transportern, die für die Vermittlung von Antibiotika-Resistenzen verantwortlich sind (Schuldiner et al., 1995). Diese Tatsache lässt den evolutionären Ursprung der vesikulären Monoaminspeicherung in einem phylogenetisch alten „Entgiftungssystem“ vermuten.

Im Gegensatz zu den spezifischen Transportern der Plasmamembran akzeptieren beide vesikulären Transporter sämtliche Monoamin-Transmitter als physiologische Substrate (Peter et al., 1994). Sowohl VMAT1 als auch VMAT2 besitzen die höchste Affinität für Serotonin, während die Katecholamine Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin mit in dieser Reihenfolge abnehmender Affinität als Substrat erkannt werden. Die vesikuläre Speicherung dieser Monoamine stellt mit niedrigen  $K_m$ -Werten im Bereich zwischen ca. 0,1 bis 2  $\mu\text{M}$  für die humanen VMATs (Schuldiner et al., 1995) einen hochaffinen Transportprozeß dar. Insgesamt weist VMAT2 eine 2 bis 3-fach höhere Affinität für Serotonin und die Katecholamine auf als VMAT1. Ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Transportern besteht in der Fähigkeit, Histamin als Substrat zu verwenden. Sowohl VMAT1 als auch VMAT2 besitzen für Histamin die geringste Affinität, jedoch zeigt VMAT2 noch eine je nach Spezies 30 bis 100-fach höhere Affinität für Histamin als VMAT1 (Schuldiner et al., 1995).

Während für die vesikuläre Speicherung von GABA und Glyzin sowohl die elektrische als auch die chemische Komponente des Protonengradienten nötig sind (Liu und Edwards, 1997), ist für den Monoamintransport lediglich der pH-Gradient von Bedeutung. So kommt es zum Austausch von einem zytoplasmatischen Substratmolekül gegen zwei Protonen aus dem Lumen des Vesikels (Knoth et al., 1981).

Unterschiede ergeben sich in der Gewebeverteilung zwischen beiden Transportern, ebenso variiert die Verteilung zwischen den untersuchten Spezies. Den überwiegenden Typ des im peripheren Nervensystem und neuroendokrinen Zellen der Ratte exprimierten Transporters stellt VMAT1 dar (Liu et al., 1994; Peter et al., 1995). Die ursprüngliche Bezeichnung CGAT (Chromaffine Granule Amine Transporter) verweist dabei auf das Vorkommen von VMAT1 auf chromaffinen Granula der Zellen des Nebennierenmarks. Im Gegensatz dazu ist VMAT2 der vorwiegend im ZNS exprimierte Transportertyp (Liu et al., 1994; Peter et al., 1995; Erickson et al., 1996). Die ursprüngliche Bezeichnung SVAT (Synaptic Vesicle Amine Transporter) deutet auf diese neuronale Variante des Transporters hin.

Zusätzlich ließ sich VMAT2 ebenfalls in den Histamin-produzierenden ECL- (enterochromaffine-like) Zellen des Magens nachweisen (Dimaline und Struthers, 1996). Im Rind hingegen scheint VMAT2, neben seinem Vorkommen im ZNS, der Transporter des Nebennierenmarks zu sein (Krejci et al., 1993). Die

immunzytochemische Analyse der Verteilung von VMAT1 und VMAT2 im menschlichen Gewebe (Erickson et al., 1996) belegt das Vorkommen von VMAT1 in einigen Zellen sympathischer Ganglien, in praktisch allen Zellen des Nebennierenmarks sowie den enterochromaffinen Zellen des Duodenums. Im Gegensatz dazu ließ sich VMAT2 besonders stark im ZNS in den dopaminergen Neuronen der Substantia nigra nachweisen. VMAT1 kommt dagegen in allen Zellen des Nebennierenmarks, den ECL-Zellen der Mucosa des Magens und den endokrinen Zellen des Pankreas vor.

Anders als die übrigen klassischen Transmitter werden Monoamine sowohl in LDCVs als auch in SSVs und deren Analoga gespeichert (Johnson, 1988). Die Analyse der subzellulären Verteilung von VMAT1 in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks der Ratte und der davon abstammenden Phäochromozytom Zelllinie PC12 belegt das Vorkommen des Transporters hauptsächlich auf LDCVs (Liu et al., 1994). Die immunzytochemische Untersuchung eines Kerngebietes des Gehirns, des Nucleus tractus solitarius, wies VMAT2 auf SSVs, häufiger jedoch auf „tubovesikulären“ Strukturen und LDCVs katecholaminerger Neurone nach (Nirenberg et al., 1995).

Die Verfügbarkeit verschiedener potenter Inhibitoren der vesikulären Monoamintransporter hat wesentlich zum Verständnis ihrer Aktivität und Bedeutung beigetragen. Das Alkaloid Reserpin wurde als hochwirksames Antihypertensivum eingesetzt, jedoch aufgrund seiner depressionsfördernden Nebenwirkung vom Markt genommen. Reserpin bindet in nanomolaren Konzentrationen nahezu irreversibel an die zytoplasmatische Substratbindungsstelle von VMAT1 und VMAT2 (Darchen et al., 1989; Scherman und Henry, 1984), und führt so zu einer Entleerung zentralnervöser und peripherer Speicherorganellen. Tetrabenazin repräsentiert dagegen einen Inhibitor, der VMAT2 ähnlich stark inhibiert wie Reserpin, jedoch nur eine sehr geringe, im Fall der humanen Variante des Transporters praktisch keine Affinität für VMAT1 besitzt (Erickson et al., 1996). Tetrabenazin bindet nicht an der zytoplasmatischen Substratbindungsstelle, sondern vermutlich an einer in das Vesikellumen gerichteten Bindungsstelle (Liu et al., 1994). Radioaktiv markiertes Dihydro-tetrabenazin wird in funktionellen PET-Studien (PET: Positronen-Emissions-Tomographie) als Markersubstanz für die Verteilung von VMAT2 im Gehirn eingesetzt. Es besitzt damit eine große Bedeutung für das Studium und die Diagnose

des Parkinson-Syndroms, indem es den Untergang von dopaminergen Neuronen dokumentiert.

## 1.6 Regulation der vesikulären Speicherung

Über die Regulation der Aufnahme von Neurotransmittern in sekretorische Vesikel ist noch wenig bekannt. Eine Regulation der vesikulären Transportaktivität bietet die Möglichkeit, die Menge an gespeichertem Transmitter pro Vesikel zu variieren. Eine daraus resultierende variable quantale Freisetzung aus SSVs könnte damit die Aktivität einer Synapse beeinflussen. Ebenso sind Phasen in der Biosynthese sekretorischer Vesikel oder auch im metabolischen Zustand der Zelle denkbar, die eine Regulation der Beladung mit Transmittern erforderlich machen. Einige Arbeiten belegen die Variabilität der gespeicherten und freigesetzten Transmittermenge. So führt die Überexpression des vesikulären Acetylcholintransporters zu einer aktivitätsabhängigen Erhöhung des Acetylcholingehalts im Vesikel (Song et al., 1997). In PC12 Zellen hingegen führt die Aktivierung von Dopamin D2-Autorezeptoren zu einer Reduzierung der quantalen Freisetzung von Dopamin (Photos et al., 1998a). Die Tatsache, daß Monoamine und Acetylcholin, im Gegensatz zu Aminosäuretransmittern, auch in Puffern unterschiedlicher Ionen-Zusammensetzungen und -Konzentrationen stabil gespeichert bleiben (Johnson, 1988), schließt eine Regulation des Transmittergehalts allein durch einen Gleichgewichtsmechanismus, der sich zwischen zytoplasmatischem Milieu und Vesikelinhalt einstellt, weitgehend aus.

Hinweise auf eine differenzielle Genexpression der vesikulären Monoamintransporter ergeben Befunde an chromaffinen Zellen, in denen es während einer Dauerstimulation durch Depolarisierung zwar zu einer Verringerung der Anzahl an Granula, jedoch zu einer Erhöhung der Anzahl an Transportermolekülen pro Granulum kommt (Desnos et al., 1995). In PC12 Zellen führt die Stimulation von c-AMP abhängigen Signalkaskaden zu einer Hemmung der vesikulären Aufnahme von Serotonin (Nakanishi et al., 1995). Jedoch konnte nicht eindeutig gezeigt werden, ob diese Hemmung auf einer Regulation des Transporters oder dem Katecholamin-Metabolismus beruht. Die Tatsache, daß VMAT2, nicht jedoch VMAT1, konstitutiv phosphoryliert wird (Krantz et al., 1997), deutet auf eine mögliche unterschiedliche Regulation der beiden Transporter hin.

Eine bis dahin unbekannte Form der Regulation vesikulärer Transporter wurde in PC12 Zellen für VMAT1 nachgewiesen: Es kommt dort zu einer Regulation der Aktivität durch ein G-Protein. So hemmt die  $\alpha$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins  $G_{O_2}$  die vesikuläre Noradrenalinaufnahme in diese Zelllinie. Dabei handelt es sich um eine Interaktion des G-Proteins mit dem Transporter selbst, und nicht um eine durch die Veränderung des Protonengradienten hervorgerufene Modifikation der Transporteraktivität (Ahnert-Hilger et al., 1998).

### **1.7 Heterotrimere G-Proteine als Bestandteile vieler Signaltransduktionsprozesse**

Heterotrimere G-Proteine sind Bestandteile von Signaltransduktionsprozessen in einer Vielzahl von Zellen. Zusammen mit den „kleinen“ monomeren G-Proteinen stellen sie eine Klasse von Guanin-Nukleotid bindenden, membranassoziierten Proteinen dar. Das Heterotrimer setzt sich aus einer  $\alpha$ -, einer  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -Untereinheit zusammen. Bekannt sind zur Zeit 23 verschiedene  $\alpha$ -, 6 verschiedenen  $\beta$ - und 11 verschiedene  $\gamma$ -Untereinheiten. Die  $\alpha$ -Untereinheiten werden auf der Basis ihrer Aminosäuresequenzen und der durch sie vermittelten Effekte in die vier Klassen  $G_s$ ,  $G_{i/o}$ ,  $G_q$  und  $G_{12}$  eingruppiert. Die Nomenklatur des Heterotrimers folgt der Identität der  $\alpha$ -Untereinheit. Die Vielzahl an möglichen Kombinationen der Untereinheiten trägt zur Spezifität und Diversität sowohl der Interaktion zwischen Rezeptor und G-Protein als auch zwischen G-Protein und Effektor bei. Tatsächlich scheinen einige Rezeptortypen für bestimmte Kombinationen von G-Protein Untereinheiten spezifisch zu sein (Kalkbrenner et al., 1996). Alle heterotrimeren G-Proteine folgen einem gemeinsamen Aktivierungs-/ Inaktivierungszyklus, der eine reversible und spezifische Signaltransduktion erlaubt: Der erste Schritt der Aktivierung besteht in der Interaktion des G-Proteins mit einer zytoplasmatischen Domäne eines meist Liganden-aktivierten, heptahelikalen Rezeptors (Gudermann et al., 1995), aus der ein Austausch von an die  $\alpha$ -Untereinheit gebundenem GDP gegen GTP resultiert. Die so aktivierte  $\alpha$ -Untereinheit dissoziiert daraufhin vom  $\beta\gamma$ -Komplex ab. Sowohl die  $\alpha$ -Untereinheit als auch der  $\beta\gamma$ -Komplex können nun zu einer Modulation verschiedener Effektor-Proteine führen. Die Inaktivierung erfolgt durch eine intrinsische GTPase Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit, die zur hydrolytischen Spaltung

von GTP zu GDP und freiem Phosphat führt. Die inaktivierte  $\alpha$ -Untereinheit löst sich vom Effektor und kann mit einem  $\beta\gamma$ -Komplex wieder zu einem Heterotrimer reassoziieren, welches dann erneut für eine Aktivierung zur Verfügung steht. Diese Form der reversiblen Kopplung der einzelnen Komponenten der Signaltransduktion bietet den Vorteil einer vielfachen Verstärkung des extrazellulären Signals bereits auf der Ebene des G-Proteins. So aktiviert allein ein Rhodopsin-Lichtrezeptor der Retina bis zu 3000 G-Proteine in einer Sekunde (Hargrave et al., 1993).

Die durch heterotrimere G-Proteine der Plasmamembran vermittelten Effekte sind vielfältig. So aktivieren die  $\alpha$ -Untereinheiten der  $G_s$ -Unterklasse Adenylylzyklasen und Calcium-Kanäle (Iyengar, 1993). Die Aktivierung von  $G\alpha_{i2}$ , einem Mitglied der  $G_i$  Unterklasse, führt dagegen zu einer Hemmung der Adenylylzyklase-Aktivität (Nürnberg et al., 1995). Hauptsächlich im Gehirn und neuroendokrinen Zellen werden die beiden Subtypen  $G\alpha_{o1}$  und  $G\alpha_{o2}$  exprimiert. Sie stellen alternative Splicing-Varianten des  $G\alpha_{i2}$  Gens dar und vermitteln unter anderem die Hemmung von spannungsgesteuerten Calcium-Kanälen (Nürnberg et al., 1994). Die ubiquitär exprimierten  $\alpha$ -Untereinheiten der  $G_q$  Unterklasse führen hauptsächlich zu einer Stimulation der Aktivität von Phospholipasen des Typs C- $\beta$  (Sternweis et al., 1992). Auf sehr niedrigem Niveau erfolgt die Expression von  $\alpha$ -Untereinheiten der  $G_{12}$  Unterklasse, die unter anderem eine Rolle bei der Tumorgenese zu spielen (Xu et al., 1994).

Plasmamembranständige  $G\beta\gamma$  Untereinheiten konnten Interaktionen etwa mit spannungsgesteuerten Calcium-Kanälen (Ikeda, 1996), Kalium-Kanälen (Cohen et al., 1996) oder Phosphoinositol-3-Kinasen (Leopoldt et al., 1998) nachgewiesen werden.

Neben ihrer Existenz auf der Plasmamembran konnten G-Proteine ebenfalls auf Membranen intrazellulärer Organellen nachgewiesen werden. Über ihre Funktion auf diesen Kompartimenten ist wenig bekannt. Die Ausbildung verschiedener Hüll-Proteine von Vesikeln des Golgi-Komplexes scheint der Regulation durch ein heterotrimeres G-Protein der Pertussis Toxin sensitiven  $G_{i/o}$ -Klasse zu unterliegen (Ktistakis et al., 1992). Ebenso existieren Befunde, die auf eine Regulation der Synthese von Vesikeln des trans-Golgi Netzwerks durch ein extra großes G-Protein hinweisen (Kehlenbach et al., 1994). Immunzytochemische Untersuchungen konnten



komplette Sets heterotrimerer G-Proteine sowohl auf chromaffinen Granula von Nebennierenmarkszellen als auch auf SSVs von Neuronen nachweisen (Ahnert-Hilger et al., 1994). Aus diesen Beobachtungen ergeben sich Fragen nach weiteren Funktionen von G-Protein Untereinheiten auf sekretorischen Speicherorganellen. Wie erwähnt, belegen erste Ergebnisse die Beteiligung eines heterotrimeren G-Proteins bei der Kontrolle der Aktivität von VMAT1 in PC12 Zellen. Da diese Ergebnisse lediglich von einer einzelnen Zelllinie stammen, ist unklar, ob ein solcher Mechanismus generell in monoaminergen Zellsystemen und Geweben existiert.

## 1.8 Fragestellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Regulation der Aktivität vesikulärer Monoamintransporter durch heterotrimere G-Proteine in verschiedenen Systemen untersucht werden. Im einzelnen standen folgende Fragen im Mittelpunkt:

Stellt die Regulation vesikulärer Monoamintransporter durch heterotrimere G-Proteine ein allgemeines Prinzip in neuroendokrinen Zellen und Neuronen dar?

Wird ausschließlich die Aktivität von VMAT1 reguliert oder unterliegt VMAT2 ebenfalls einer Regulation durch heterotrimere G-Proteine?

Ist die Regulation auf einen Typ sekretorischer Vesikel beschränkt, oder gilt sie für die Monoaminspeicherung in LDCVs und SSVs?

Welche G-Proteine sind an der Regulation beteiligt?

Wie kommt es zur Aktivierung der G-Proteine?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Reagenzien

|   |  |
|---|--|
| 5-Hydroxy-[ <sup>3</sup> H] Tryptamintrifluoracetat<br>Serotonin, spez. Aktivität 3260Bq / mmol | Amersham (Dreieich)                                  |
| I-[7,8- <sup>3</sup> H] Noradrenalin<br>spez. Aktivität 444 Bq / mmol                           | Amersham (Dreieich)                                  |
| [2,5- <sup>3</sup> H] Histamindihydrochlorid<br>spez. Aktivität 1550 Bq / mmol                  | Amersham (Dreieich)                                  |
| Acrylamid Stammlösung (30%)   | Roth (Karlsruhe)                                     |
| Agarose   | Merck (Darmstadt)                                    |
| Ammoniumpersulfat   | Sigma (München)                                      |
| Araldit   | Serva (Heidelberg)                                   |
| α-Toxin   | Weller, Institut Ray-Roecky-<br>Weller (Baden-Baden) |
| ATP<br>Adenosin-5'-Triphosphat  | Sigma (München)                                      |
| B27 Supplement<br>(Eggenstein)  | Gibco Life Technologies                              |
| BCA<br>Natrium Bicinchoninsäure-4,4-di-<br>carboxy-2,2-Bichinolin                               | Sigma (St.Louis,. USA)                               |
| Bisacrylamid Stammlösung (30%)  | Roth (Karlsruhe)                                     |
| BSA<br>Rinderserum Albumin  | Sigma (St.Louis, USA)                                |
| Diaminobenzidin (DAB)   | Sigma (München)                                      |
| DMEM<br>„Dulbecco`s Modified Eagle Medium“  | Biochrom (Berlin)                                    |

|   |   |
|---|---|
| DMEM / HAM's F12  | Biochrom (Berlin)   |
| DMSO  | Roth (Karlsruhe)  |
| Dimethyl-Sulfoxid   |   |
| ECL <sup>TM</sup>   | Amersham (Buckinghamshire,<br>England)                      |
| Enhanced Chemiluminescence  |   |
| EDTA  | Roth (Karlsruhe)  |
| Ethylendiamintetraacetat  |   |
| Fluoxetin   | Biotrend (Köln)   |
| Hydrochlorid  |   |
| Formvar   | Serva (Heidelberg)  |
| Glutamin  | Biochrom (Berlin)   |
| Glutaraldehyd   | Fluka (Neu-Ulm)   |
| GMppNp  | Sigma (München)   |
| 5'-Guanylylimidodiphosphat  |   |
| G-Protein Untereinheiten  | Bernd Nürnberg, Institut für<br>Pharmakologie der FU Berlin |
| G $\alpha$ <sub>o1</sub> , G $\alpha$ <sub>o2</sub> , G $\alpha$ <sub>i1</sub> , und G $\alpha$ <sub>i2</sub> |   |
| GTP $\gamma$ S  | Sigma (München)   |
| Guanosin 5'-O-(3-thiotriphosphat)   |   |
| Heparin   | Ratiopharm (Ulm)  |
| HEPES   | Sigma (München)   |
| N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-<br>2-Ethansulfonsäure   |   |
| Histamin  | Sigma (München)   |
| Hydrochlorid  |   |
| Hybond C  | Amersham (Buckinghamshire,<br>England)                      |
| Nitrozellulose Membran  |   |
| Kaliumglutamat  | Sigma (München)   |
| Kälberserum, fötales  | Biochrom (Berlin)   |
| Ketavet   | Curamed Pharma GmbH<br>(Karlsruhe)                          |

|  |  |
|--|--|
| Kollagen   | Sigma (München)                                  |
| Lipofectin                                       | Gibco Life Technologies<br>(Eggenstein)          |
| LMW<br>Low Molecular Weight Marker               | Pharmacia Biotech (Uppsala,<br>Schweden)         |
| Magermilchpulver                                 | Glücksklee (München)                             |
| Mowiol   | Hoechst (Frankfurt/aM)                           |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)                       | Boehringer Mannheim                              |
| Neurobasal Medium (NBM)                          | Gibco Life Technologies<br>(Eggenstein)          |
| Optimem  | Biochrom (Berlin)                                |
| OptiPhase 'HighSafe 3`<br>Szintillationscocktail | Wallac (Turku, Finnland)                         |
| Osmiumtetroxid                                   | Merck (Darmstadt)                                |
| Penicilin / Streptomycin                         | Biochrom (Berlin)                                |
| Pertussis Toxin                                  | Calbiochem / Novabiochem<br>(Bad Soden / Taunus) |
| Pipes<br>Piperazin-N,N'-bis[2-ethansulfonsäure]  | Sigma (München)                                  |
| Pferdeserum                                      | Biochrom (Berlin)                                |
| Poly-L-Lysin                                     | Sigma (München)                                  |
| Ponceau S  | Sigma (St.Louis, USA)                            |
| Protease Inhibitoren:                            |  |
| Aprotinin  | Boehringer Mannheim                              |
| Leupeptin  | Boehringer Mannheim                              |
| Pepstatin  | Boehringer Mannheim                              |
| PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)               | Boehringer Mannheim                              |
| Reserpin   | Sigma (München)                                  |
| Rompun   | Bayer (Leverkusen)                               |
| Serotonin<br>Hydrochlorid                        | Sigma (München)                                  |

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| Streptolysin-O, Mutante 101       | U.Weller, Institut Ray-Roecky-Weller (Baden-Baden)               |
| TEMED                             | Sigma (München)  |
| Triton X-100                      | Roth (Karlsruhe)   |
| Tetanus Neurotoxin                | U.Weller, Institut Ray-Roecky-Weller (Baden-Baden)               |
| Tetanus Neurotoxin, leichte Kette | U.Weller, Institut Ray-Roecky-Weller (Baden-Baden)               |
| Tetrabenazin                      | Jean Pierre Henry, Institut de Biologie Physico-Chimique (Paris) |
| Wasserstoffperoxid                | Merck (Darmstadt)  |

## 2.2 Puffer und Lösungen

### Antikörper-Lösung für Immunoreplika-Analysen

1,5% w/v Rinderserum Albumin in TS Puffer

### Block-Lösung für Immunoreplika-Analysen

5% w/v Magermilchpulver

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

### Chlornaphtolentwicklung

2 ml 3 mg / ml  $\alpha$ -Chlornaphtol in DMSO

10 ml TS

10  $\mu$ l Wasserstoffperoxid (30%)

### Elektrophorese Puffer (10 X)

30 g Tris

144 g Glycin

10 g SDS

auf 1 Liter mit dH<sub>2</sub>O auffüllen

## Kaliumglutamat Puffer I (KG1)

|        |   |
|--------|---|
| 150 mM | Kaliumglutamat  |
| 20 mM  | Pipes   |
| 4 mM   | EGTA  |
| 1 mM   | Mg <sup>2+</sup> (freies), durch Zusatz von 111,4 µl 1 M Magnesiumacetat /100 ml Puffer<br>mit KOH auf pH 7,0 eingestellt |

## Kaliumglutamat Puffer III (KG3)

|        |   |
|--------|---|
| 150 mM | Kaliumglutamat  |
| 20 mM  | Pipes   |
| 4 mM   | EGTA  |
| 2 mM   | ATP   |
| 1 mM   | Mg <sup>2+</sup> (freies), durch Zusatz von 111,4 µl 1 M Magnesiumacetat /100 ml Puffer<br>mit KOH auf pH 7,0 eingestellt |

## Kaliumglutamat Puffer IV (KG4)

|        |   |
|--------|---|
| 150 mM | Kaliumglutamat  |
| 20 mM  | Pipes   |
| 4 mM   | EGTA  |
| 2 mM   | ATP   |
| 1 mM   | Mg <sup>2+</sup> (freies), durch Zusatz von 111,4 µl 1 M Magnesiumacetat /100 ml Puffer                                     |
| 15 µM  | Ca <sup>2+</sup> (freies), durch Zusatz von 78,28 µl 1 M CaCl <sub>2</sub> / 20 ml Puffer<br>mit KOH auf pH 7,0 eingestellt |

## Krebs-Hepes Puffer (KR)

|        |                   |
|--------|-------------------|
| 140 mM | NaCl              |
| 4,7 mM | KCl               |
| 2,5 mM | CaCl <sub>2</sub> |
| 15 mM  | Hepes             |

---

|        |                        |
|--------|------------------------|
| 1,2 mM | MgSO <sub>4</sub>      |
| 6,5 mM | Glucose                |
|        | auf pH 7,4 eingestellt |

## Phosphatpuffer (PBS)

|        |                                  |
|--------|----------------------------------|
| 140 mM | NaCl                             |
| 2,7 mM | KCl                              |
| 10 mM  | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> |
| 1,8mM  | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  |

## Ponceau-S Lösung

|          |                    |
|----------|--------------------|
| 0,5% w/v | Ponceau S          |
| 3% v/v   | Trichloressigsäure |

## Probenpuffer (Laemmli)

|          |   |
|----------|---|
| 12,48 ml | Sammelgel-Puffer ( 4 X )                    |
| 1,5 ml   | 0,1 M EDTA ( Na-Salz ) pH 7.0               |
| 15g      | Sacharose                                   |
| 5 ml     | 1,5 M DTT                                   |
|          | auffüllen auf 1 Liter mit dH <sub>2</sub> O |

## Sammelgel-Puffer (4 X)

|        |   |
|--------|---|
| 60,5 g | Tris pH 6,8                                 |
| 4 g    | SDS   |
|        | auffüllen auf 1 Liter mit dH <sub>2</sub> O |

## Trenngel-Puffer (4 X)

|         |   |
|---------|---|
| 181,7 g | Tris pH 8,8                                 |
| 4 g     | SDS   |
|         | auffüllen auf 1 Liter mit dH <sub>2</sub> O |

## Tris-Puffer (TS)

---

|        |      |
|--------|------|
| 20 mM  | Tris |
| 150 mM | NaCl |

#### Tyrode-Hepes 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>               |
| 20 mM   | Hepes                            |
| 5 mM    | Glucose                          |
| 1 mM    | MgCl <sub>2</sub>                |

auf pH 7,3 eingestellt

#### Immunoreplika Puffer (Semi Dry)

|          |                   |
|----------|-------------------|
| 48 mM    | Tris              |
| 385 mM   | Glycin            |
| 3,7 g/ml | SDS 10 %          |
| 800 ml   | dH <sub>2</sub> O |
| 200 ml   | Methanol          |

## 2.3 Medien für die Zellkultur

#### Kulturmedium für BON Zellen

|       |                           |
|-------|---------------------------|
| 45 ml | DMEM                      |
| 45 ml | DMEM / HAM'S F12          |
| 10 ml | fötales Kälberserum       |
| 1 ml  | Glutamin                  |
| 1 ml  | Penicillin / Streptomycin |

#### Kulturmedium für PC12 Zellen



|       |                           |
|-------|---------------------------|
| 85 ml | DMEM                      |
| 10 ml | Pferdeserum               |
| 5 ml  | fötales Kälberserum       |
| 1 ml  | Glutamin                  |
| 1 ml  | Penicillin / Streptomycin |

#### Dissoziationsmedium für Rapheneurone

|                               |                     |
|-------------------------------|---------------------|
| 50 ml                         | fötales Kälberserum |
| 5 ml                          | Glutamin            |
| 50 IE                         | Insulin             |
| 5 ml                          | Hepes 1 M           |
| 4 g                           | Glucose             |
| auffüllen auf 500 ml mit DMEM |                     |

#### Startermedium für Rapheneurone

|                                       |                 |
|---------------------------------------|-----------------|
| 5 ml                                  | Glutamat 2,5 mM |
| auffüllen auf 500 ml mit Kulturmedium |                 |

#### Kulturmedium für Rapheneurone

|                              |                           |
|------------------------------|---------------------------|
| 10 ml                        | B27                       |
| 1,25 ml                      | Glutamin                  |
| 5 ml                         | Penicillin / Streptomycin |
| auffüllen auf 500 ml mit NBM |                           |

## 2.4 Verwendete Antikörper

### Primäre Antikörper

| Antikörper                     | Bezugsquelle und Publikation  |
|--------------------------------|---|
| VMAT1<br>polyklonal, Kaninchen | R.Jahn, Max-Planck-Institut für<br>biophysikalische Chemie, Göttingen |
| VMAT2                          | R.Jahn, Max-Planck-Institut für<br>biophysikalische Chemie, Göttingen |

|   |   |
|---|---|
| polyklonal, Kaninchen   |   |
| Synaptobrevin II (Klon 69.1)<br>monoklonal, Maus                                    | Synaptic Systems, Göttingen<br>Edelmann et al. (1995)   |
| Synaptophysin (Klon 7.2)<br>monoklonal, Maus  | Synaptic Systems, Göttingen<br>Jahn et al. (1985 )  |
| Chromogranin A / B<br>polyklonal, Kaninchen   | Quartett, Berlin  |
| Chromogranin B<br>polyklonal, Kaninchen   | R.Fischer-Colbrie, Universität Innsbruck<br>Kroesen et al. (1996)   |
| Cytochrom b561<br>monoklonal, Maus  | B.Wiedenmann, Universitätsklinikum<br>Charité, Berlin<br>Ahnert-Hilger et al. (1993)  |
| Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase<br>polyklonal, Kaninchen                              | B.Wiedenmann, Universitätsklinikum<br>Charité, Berlin<br>Ahnert-Hilger et al. (1993)  |
| Serotonin<br>polyklonal, Kaninchen und Huhn   | R.W.Veh, Institut für Anatomie der<br>Charité, Berlin   |
| G $\alpha_c$ AS 6<br>polyklonal, Kaninchen  | G.Schultz, Institut für Pharmakologie der<br>FU Berlin<br>Spicher et al. (1992)   |
| G $\alpha_{o1}$ AS 248<br>polyklonal, Kaninchen                                     | G.Schultz, Institut für Pharmakologie der<br>FU Berlin<br>Spicher et al. (1992)   |
| G $\alpha_{o2}$ AS 371<br>polyklonal, Kaninchen<br><br>monoklonal, Maus (Klon 94.1) | G.Schultz, Institut für Pharmakologie der<br>FU Berlin<br>Laugwitz et al. (1996)<br><br>R.Jahn, Max-Planck-Institut für<br>biophysikalische Chemie, Göttingen |

### Sekundäre Antikörper

| Antikörper          | Bezugsquelle                          |
|---------------------|---------------------------------------|
| Pferd anti-Maus IgG | Vector Laboratories, Burlingham (USA) |

|  |  |
|--|--|
| Peroxidase-gekoppelt                               |  |
| Ziege anti-Kaninchen IgG<br>Peroxidase-gekoppelt   | Vector Laboratories, Burlingham (USA)  |
| Esel anti-Maus IgG<br>Texas Red-gekoppelt          | Jackson Laboratories, West Grove (USA) |
| Ziege anti-Kaninchen IgG<br>Texas Red-gekoppelt    | Jackson Laboratories, West Grove (USA) |
| Ziege anti Kaninchen IgG<br>Oregon Green-gekoppelt | Molecular Probes, Eugene (USA)         |
| Ziege anti-Huhn IgG<br>Alexa Green-gekoppelt       | Molecular Probes, Eugene (USA)         |

## 2.5 Durchführung der Experimente

### 2.5.1 Zellkultur

#### PC12 Zellen

PC 12 Zellen wurden in Kollagen-beschichteten Kulturschalen (Durchmesser 100 mm) bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> Gehalt in der Atmosphäre kultiviert. Zunächst wurde in einem Ansatz für 10 Schalen ein Gemisch aus 32 ml 30 %igem Ethanol und 1 ml Kollagen mit Hilfe eines Falcon 7107 Einmalfilter-Systems steriltriftriert. Danach wurden jeweils 3 ml in eine Schale pipettiert und kurz geschwenkt. Die Flüssigkeit wurde dann über mehrere Stunden unter der eingeschalteten Steril-Arbeitsbank eingetrocknet. Die so vorbehandelten Schalen wurden im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt. PC12 Zellen wurden mit einer Dichte von 2-2,5 x 10<sup>6</sup> je 100 mm Schale in Kulturmedium ausplattiert und einmal in der Woche zum Ausdünnen umgesetzt. Zum Umsetzen wurde das Medium abgesaugt und die Schale mit 5 ml PBS gespült. Darauf wurden die Zellen für 1 min mit 1 ml Trypsin-Lösung (1:10) überspült und anschließend für 2 min im Brutschrank stehen gelassen. Die Zellen wurden dann mit 2 ml PBS von der Schale gespült und für 2 min bei 1000 xg abzentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 1 ml Medium aufgenommen, gut resuspendiert und

in einer Dichte von  $1-2 \times 10^6$  je Schale mit je 8,5 ml Kulturmedium ausplattiert.

### **BON Zellen**

BON Zellen wurden in unbehandelten Schalen (100 mm Durchmesser) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> Gehalt in der Atmosphäre kultiviert. Die Zellen wurden mit einer Dichte von  $2,2-2,5 \times 10^6$  je Schale in Kulturmedium für BON Zellen ausplattiert und einmal in der Woche zum Ausdünnen (wie für PC12 Zellen beschrieben) umgesetzt.

### **Rapheneurone in Primärkultur**

Die Gehirne von embryonalen Wistar Ratten wurden am Embryonaltag (E)13 oder 14 präpariert. Das Alter der Embryonen wurde dabei über morphologische Kriterien der Extremitätenanlagen und des Kopfes nach Butler et al. (1987) bestimmt. Die Gehirne wurden in Dissoziationsmedium aufgenommen und die Meningen wurden vorsichtig vom Mittelhirn und Hirnstamm entfernt. Die dorsale Suture des Neuralrohres wurde eröffnet und ein Gewebestreifen von 0,25-0,5 mm Breite wurde entlang der Mittellinie des Mes- und Rhombenzephalons freipräpariert. Von diesem Streifen konnten drei verschiedene Regionen präpariert werden. Die am weitesten rostral gelegene Region wurde als R1 bezeichnet und erstreckte sich vom Isthmus des Rhombenzephalons 1,5 mm nach rostral. Die zweite Region, R2, wurde weiter caudal zwischen dem Isthmus und der Austrittsstelle der Hirnnerven aus der Pons präpariert. Die dritte Region, R3, wurde definiert als die Region, die sich 1,5 mm von der Austrittsstelle der Hirnnerven nach caudal erstreckte.

Primärkulturen von Rapheneuronen wurden nach einem modifizierten Protokoll von Brewer (1995) für Serum-freie Kulturen angelegt. Definierte Bereiche aus der Raphe (s.o.) wurden präpariert, 2X mit PBS gewaschen und für 15 min bei 37°C in einem Trypsin / EDTA Gemisch (0,05 % / 0,02 % w/v in PBS) inkubiert. Darauf wurden die Zellen 1X mit PBS und 1X mit Dissoziationsmedium gewaschen, bevor sie mechanisch mit Hilfe einer Feuer-polierten Pasteur-Pipette vereinzelt wurden. Die Zellen wurden dann für 2 min bei 210 xg und 21°C abzentrifugiert, in Startermedium redissoziiert und nach der Zählung in einer Neubauer-Kammer mit einer Dichte von 85000 Zellen / cm<sup>2</sup> auf 48-Loch Platten ausplattiert. Die Platten waren vorher mit poly-L-Lysin (0,5 % in PBS) für 1 h bei Raumtemperatur behandelt worden. Die Primärkulturen wurden bei 36,5°C und 5 % CO<sub>2</sub> Gehalt bis zu 5 Wochen kultiviert.

Ab Tag 4 der Kultur wurde die Hälfte des Mediums 2X in der Woche durch frisches Kulturmedium ersetzt.

### **2.5.2 Permeabilisierung mit $\alpha$ -Toxin und Streptolysin-O**

Zur Permeabilisierung der Zellen wurden die bakteriellen Zytolysine  $\alpha$ -Toxin und Streptolysin-O (SLO), Mutante 101, verwendet. Für alle Experimente, die nicht der Vorstellung der Permeabilisierungstechnik (siehe 3.1) dienten, wurde ausschließlich SLO verwendet.

Die zytolytische Aktivität beider Toxine wurde nach Lind et al. (1987) und Ahnert-Hilger et al. (1989) an Kaninchen-Erythrozyten bestimmt. Hierfür wurde eine Erythrozyten Suspension (2,5 % in PBS) mit verschiedenen Verdünnungen der Toxine versetzt. Nach Inkubation für 40 min bei 37°C wurde der hämolytische Effekt photometrisch bei 412 nm bestimmt. Der Kehrwert der Verdünnung des Toxins, bei der 50 % der Erythrozyten hämolysiert wurden, ergab die Anzahl der hämolytischen Einheiten (HE) / ml der unverdünnten Toxinpräparation.

#### **PC12 und BON Zellen**

Das Medium wurde entfernt und die semikonfluent gewachsenen Zellen wurden zunächst 2 X mit PBS, dann 1 X mit KG1 Puffer gewaschen. Darauf wurden sie mit 1 ml KG1 Puffer je Kulturschale suspendiert und bei 2000 xg für 2 min bei 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurden die sedimentierten Zellen in 100  $\mu$ l KG1 Puffer je Kulturschale aufgenommen und resuspendiert. Zur Permeabilisierung mit  $\alpha$ -Toxin wurde die Zellsuspension mit dem gleichen Volumen an Toxin in einer Aktivität von 50-100 HE / ml (in KG1 Puffer) für 20 min bei 36°C inkubiert. Um ungebundenes Toxin zu entfernen, wurde die Zellen bei 2000 xg für 2 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wurden für Experimente zur Monoamin Aufnahme oder Sekretion in KG3 Puffer mit den jeweiligen Zusätzen aufgenommen.

Zur Permeabilisierung mit SLO wurde die Zellsuspension (s.o.) mit dem gleichen Volumen an Toxin-Verdünnung in einer Aktivität von 50-100 HE / ml ( in KG1 Puffer, der als Reduktionsmittel 1 mM DTT enthielt ) für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden bei 2000 xg für 2 min bei 4 °C abzentrifugiert und in 100  $\mu$ l KG1 Puffer / Ansatz resuspendiert. Zur Porenbildung durch das an das Cholesterol in der

Plasmamembran gebundene SLO wurden die Zellen für 10 min bei 36°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 500 µl eiskaltem KG1 Puffer gewaschen und für 2 min bei 2000 xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wurden für Experimente zur Monoamin Aufnahme oder Sekretion in KG3 bzw. KG4 Puffer mit den jeweiligen Zusätzen aufgenommen.

### **Primärkulturen der Raphe**

Rapheneurone in Primärkultur wurden 1X mit PBS und 1X mit KG1 Puffer gewaschen, bevor sie mit 100 HE / ml SLO in KG1 Puffer (versetzt mit 0,1 % BSA) für 5 min auf Eis inkubiert wurden. Anschließend wurde die SLO-Lösung abgesaugt und die Zellen wurden für Experimente zur Monoamin Aufnahme in KG3 Puffer mit den jeweiligen Zusätzen inkubiert.

### **Thrombozyten**

Die sedimentierten Thrombozyten wurden in 50 µl Tyrode-Hepes Puffer je Tier suspendiert und mit dem gleichen Volumen an 20-30 HE / ml SLO (ebenfalls in Tyrode-Hepes Puffer) für 5 min auf Eis inkubiert. Die Thrombozyten wurden darauf bei 1000 xg für 5 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Nach dem Absaugen der SLO-Lösung wurden die Thrombozyten für Experimente zur Serotonin Aufnahme in KG3 Puffer mit den jeweiligen Zusätzen inkubiert .

### **2.5.3 Monoaminaufnahme in permeabilisierte Zellen**

Die Monoamin Aufnahme in permeabilisierte PC12 und BON Zellen (s.o.) wurde durch die Zugabe von 100 µl KG3 Puffer / Ansatz, der entweder 90 nM [<sup>3</sup>H]Noradrenalin, 90 nM [<sup>3</sup>H]Serotonin oder 200 nM [<sup>3</sup>H]Histamin enthielt, gestartet. Der Ansatz enthielt zusätzlich 1 mM Ascorbinsäure als Antioxidanz. Die Inkubation wurde normalerweise für 20 min bei 36°C durchgeführt. Die zu untersuchenden Substanzen, wie GTP-Analoga oder G-Protein Untereinheiten wurden diesem Inkubationsansatz zugefügt. Gestoppt wurde die Monoamin Aufnahme durch die Zugabe von 1 ml eiskaltem KG1 Puffer und die anschließende Zentrifugation bei 15000 xg. Die sedimentierten Zellen wurden in 100 µl Triton X-100 (0,4 %) aufgenommen und für 10 min bei 42°C unter heftigem Schütteln im Thermomixer lysiert. Von dem Lysat wurden 50 µl abgenommen, mit 4 ml Flüssigszintillator OptiPhase versetzt und für die Szintillationsmessung der aufgenommenen Radioaktivität in einem Beckman LS 6500 Zählautomat verwendet. Die übrigen 50 µl

wurden zur Bestimmung des Proteingehalts mit der BCA Methode verwendet. Die aufgenommenen Mengen an [<sup>3</sup>H]Monoamin sind in pmol / mg Protein angegeben. Berechnet wurde die aufgenommene Menge der Monoamine über die Anzahl der Zerfälle (DPM) / min und die spezifische Aktivität des jeweiligen eingesetzten Tritium-markierten Monoamins.

### **Rapheneurone**

Permeabilisierte Neurone wurden auf den Kulturplatten mit je 100 µl KG3 Puffer je Ansatz, der 1 mM Ascorbinsäure, 90 nM [<sup>3</sup>H]Serotonin oder [<sup>3</sup>H]Noradrenalin sowie die zu untersuchenden Substanzen enthielt, für 10 min bei 36°C inkubiert. Die Monoamin Aufnahme wurde durch die Zugabe von 500 µl eiskaltem KG1 gestoppt. Die Inkubations-Lösung wurde abgesaugt und die Neurone wurden noch einmal mit 500 µl eiskaltem KG1 Puffer gewaschen. Die anschließende Lyse der Zellen erfolgte durch die Inkubation für 10 min bei 42°C mit 100 µl Triton X –100 (0,4 %). Die Bestimmung der aufgenommenen Menge an [<sup>3</sup>H]Monoamin sowie des Proteingehalts erfolgte wie für PC12 und BON Zellen beschrieben.

### **Thrombozyten**

Die Experimente zur Serotoninaufnahme wurden nach Permeabilisierung ebenso wie in BON und PC12 Zellen durchgeführt

Die Inkubation neuroendokriner Zellen und Neurone mit Pertussis Toxin (100 ng / ml) oder Tetanus Neurotoxin (10 nM) erfolgte für 48 Stunden in Kulturmedium. In einigen Experimenten wurden die Zellen nach der Permeabilisierung für 20 min bei 36°C in KG1 Puffer inkubiert, der die leichte Kette von Tetanus Neurotoxin (1 µM bzw. 200 nM) enthielt.

## **2.5.4 Monoaminsekretion**

### **PC12 Zellen**

PC12 Zellen wurden in serumfreiem DMEM, versetzt mit 20 nM [<sup>3</sup>H]Noradrenalin und 1 mM Ascorbinsäure für 2 h im Brutschrank vorbeladen. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen noch einmal für 1-2 h in DMEM im Brutschrank belassen. Anschließend wurde das DMEM abgesaugt und die Zellen 3X mit Krebs-Hepes Puffer, sowie 1X mit KG1 Puffer gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden mit

500 µl KG1 Puffer / Schale abgeschwemmt und zur Permeabilisierung mit  $\alpha$ -Toxin oder SLO (Mutante 101) inkubiert. Zur Kontrolle wurden die Zellen nur mit KG1 Puffer inkubiert. Die Zellen wurden dann für 2 min bei 2000 xg abzentrifugiert, wieder in KG1 Puffer (100 µl / Ansatz) resuspendiert und für 10 min bei 36°C inkubiert. Darauf wurden die Zellen erneut für 2 min bei 3000 xg abzentrifugiert, mit 100 µl KG4 Puffer (15 µM freies  $\text{Ca}^{2+}$ ) je Ansatz resuspendiert und zur Stimulation der Sekretion für 10 min bei 36°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen bei 15.000 xg sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und für die Bestimmung des [ $^3\text{H}$ ]Noradrenalins mit der Methode der Flüssigkeits-Szintillationsmessung verwendet. Die Zellen selbst wurden mit 100 µl Triton X-100 versetzt und für 10 min bei 42°C lysiert. Das Lysat wurde dann ebenfalls zur Bestimmung der Menge des in den Zellen verbliebenen [ $^3\text{H}$ ]Noradrenalins mit der Methode der Flüssigkeits-Szintillationsmessung benutzt. Die Angaben des sezernierten [ $^3\text{H}$ ]Noradrenalins sind in Prozent des zu Beginn der Stimulation in den Zellen vorhandenen [ $^3\text{H}$ ]Noradrenalins gemacht.

### **Primärkulturen der Raphe**

Primärkulturen der Rapheneurone wurden zu unterschiedlichen Kulturzeitpunkten in DMEM, versetzt mit 20 nM [ $^3\text{H}$ ]Serotonin und 1 mM Ascorbinsäure für 4 h im Brutschrank vorbeladen. Die Inkubations-Lösung wurde abgesaugt und die Zellen 3X mit Krebs-Hepes Puffer gewaschen. Darauf erfolgte eine Zwischeninkubation für 10 min bei 36°C mit Krebs-Hepes Puffer, der 0,1 % BSA enthielt. Der Puffer wurde abgesaugt und durch frischen Krebs-Hepes Puffer ersetzt, der für die Stimulation der Sekretion einen auf 50 mM erhöhten  $\text{K}^+$ -Gehalt besaß. Die Stimulation erfolgte mit 100 µl des Puffers für 5 min bei 36°C. Die Bestimmung des [ $^3\text{H}$ ]Serotoningehalts im Überstand sowie in den Zellen erfolgte wie zuvor beschrieben.

### **2.5.5 Transfektion von COS Zellen**

Um die Spezifität und mögliche Kreuzreaktivität der verwendeten polyklonalen Antikörper gegen VMAT1 und VMAT2 zu testen, wurden COS Zellen mit der DNA des jeweiligen Transporters transient transfiziert. COS Zellen wurden in 35 mm Kulturschalen auf Glasplättchen bis zu 40 % Konfluenz kultiviert. Für die Transfektion einer Schale wurden 1-2 µg DNA (Transporter DNA im Plasmidvektor pcDNA3) in 100 µl serumfreiem Medium (Optimem) aufgenommen, 30 min bei Raumtemperatur



inkubiert, und dann mit 5 µl Lipofectin (ebenfalls in 100 µl Optimem) vermischt. Zur Ausbildung des DNA-Liposomen Komplexes wurde das Gemisch für weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Kulturmedium wurde abgenommen und die Zellen wurden 1X mit 2 ml Optimem gewaschen. Zur Transfektion wurden die Zellen mit dem DNA-Lipofectin Gemisch und 0,8 ml Optimem für 8 h im Brutschrank inkubiert. Darauf wurde das DNA-Lipofectin Gemisch durch Wachstumsmedium (DMEM) ersetzt, und die Zellen für 48h zur Proteinsynthese im Brutschrank belassen. Die erfolgreiche Synthese der Transporterproteine wurde immunzytochemisch überprüft.

### 2.5.6 Protein-Gelelektrophorese und Immunoreplika-Analyse

Protein Proben wurde elektrophoretisch in einem denaturierenden Natrium-Dodecylsulfat Polyacrylamid Gel-System (SDS-Page) nach der Methode von Laemmli (1970) aufgetrennt. Verwendet wurden 10 %ige Gele der Dicke von 0,75 mm. Die Protein-Proben wurden vor dem Aufbringen auf das Gel für 5 min bei 95°C zur Denaturierung erhitzt. Standard Marker-Proteine (LMW) von 14,4 bis 94 kDa wurden bei jedem Lauf des Gels mit aufgetragen.

Zusammensetzung der Gele:

| Trenngel 10 %            |        | Sammelgel 3,75 %         |         |
|--------------------------|--------|--------------------------|---------|
| Trenngel Puffer          | 1,5 ml | Sammelgel Puffer         | 500 µl  |
| Acrylamid Stammlösung    | 2 ml   | Acrylamid Stammlösung    | 250 µl  |
| Bisacrylamid Stammlösung | 0,8 ml | Bisacrylamid Stammlösung | 100 µl  |
| H <sub>2</sub> O         | 1,7 ml | H <sub>2</sub> O         | 1150 µl |
| TEMED                    | 8 µl   | TEMED                    | 2,6 µl  |
| 10 % Ammoniumpersulfat   | 75 µl  | 10 % Ammoniumpersulfat   | 20 µl   |

Die Elektrophorese wurde bei 20 mA / Gel für 80 min durchgeführt.

Die aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch vom Gel auf Hybond C Nitrozellulose Membranen transferiert und so immobilisiert. Die Stromstärke betrug 300 mA / Gel im 'semi-dry' Verfahren in einer Bio-Rad Trans Blot<sup>®</sup> SD Kammer unter Verwendung von 'semi-dry' Puffer. Nach dem Blot Verfahren wurden die Membranen in Ponceau-S Lösung gebracht, um die Banden der Marker-Proteine sichtbar zu machen und die Integrität der übrigen Proteine zu testen. Überschüssiges Ponceau-S wurde mit H<sub>2</sub>O abgewaschen. Die Membranen wurden getrocknet und, falls benötigt, mit dem Skalpell in horizontale oder vertikale Streifen geschnitten, wobei die Banden der Marker-Proteine als Anhaltspunkte für das apparente Molekulargewicht der Proteine dienten. Die Membranstreifen wurden mit einem Bleistift markiert und für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Block-Lösung inkubiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte bei 4°C über Nacht in Antikörper-Lösung. Danach wurden die Membranstreifen 4X für 15 min in Block-Lösung gewaschen. Die Inkubation mit dem an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper erfolgte bei Raumtemperatur für 1 h in Antikörper-Lösung. Anschließend wurden die Membranstreifen 3 X für 10 min in TS Puffer gewaschen. Alle Inkubations- und Wasch-Schritte wurden auf einem Schüttler durchgeführt. Zur Detektion der Meerrettich-Peroxidase Aktivität wurden die Membranstreifen für 1 min mit ECL-Lösung benetzt und zur Belichtung auf ECL-Film aufgelegt. Die Membranstreifen konnten anschließend noch zur Nachfärbung mit  $\alpha$ -Chlornaphthol verwendet werden.

### **2.5.7 Immunzytochemie**

BON und COS Zellen sowie Rapheneurone in Primärkultur wurden auf Glasplättchen in 35 mm Kulturschalen kultiviert und 2X für 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie für 15 min in eiskaltem Formalin (4 % in PBS) fixiert. Die fixierten Zellen wurden dann 2X für 10 min mit PBS gewaschen. Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen für 1 h mit PBS, das 2 % BSA, 5 % NGS und 0,1 % Triton X-100 enthielt, bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte in der Absättigungs-Lösung für 1,5 h bei 37°C in einer feuchten Kammer. Im Anschluß daran wurden die Zellen 2X für 10 min mit PBS gewaschen. Als sekundäre Antikörper dienten Oregon Green-fluoreszenzmarkiertes anti-Huhn bzw. anti-Kaninchen IgG, sowie Texas Red-

fluoreszenzmarkiertes anti-Kaninchen IgG. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte in PBS, versetzt mit 2 % BSA, für 1,5 h bei Raumtemperatur in der abgedunkelten feuchten Kammer. Ungebundene Antikörper wurden 2X für 10 min mit PBS abgewaschen und die Zellen in jeweils 10 µl Mowiol auf Objektträgern eingebettet. Ausgewertet wurden die Färbungen mit einem Leica DMLB Epifluoreszenz-Mikroskop. Die Bilder wurden mit einer SPOT Kamera der Firma INTAS, Göttingen, digital aufgenommen.

### **2.5.8 Elektronenmikroskopie**

Bereiche aus dem präfrontalen Cortex adulter Ratten wurden präpariert, in eiskaltem PBS aufgenommen, und in kleine Würfel von ca. 8 mm<sup>3</sup> geschnitten. Diese wurden zuerst für 2 h auf Eis und dann für 2 h bei Raumtemperatur in PBS, versetzt mit 4 % Formalin, 0,05 % Glutaraldehyd sowie 0,2 % Pikrinsäure, fixiert. Anschließend wurde das fixierte Gewebe für 2 h in PBS gewaschen und in 3 % Agarose (in PBS) zur Anfertigung von 50 µM dicken Vibratomschnitten eingebettet. Um die Aktivität der endogenen Peroxidase zu blockieren, wurden die Schnitte für 30 min in 0,5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. Die Schnitte wurden mit PBS gewaschen und für 30 min in Block-Lösung inkubiert. Die Inkubation mit einem polyklonalen anti-Serotonin Antikörper aus dem Huhn wurde für 24 h bei 4°C in Antikörper-Lösung durchgeführt. Die Detektion der Immunreaktivität erfolgte mit einem Kit von Vectastain, wobei Diaminobenzidin (DAB) als Chromogen verwendet wurde. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte für 30 min mit 1 % OsO<sub>4</sub> (in PBS) inkubiert, in aufsteigender Alkoholreihe dehydratisiert und in Araldit flach-eingebettet. Ultradünnschnitte von 70 nm wurden auf Formvar-behandelten (in 0,3 % Dichlorethan) Nickel-Objekthaltern 2 X für 7 min in 1 % Perjodat angeätzt, 2 X mit doppelt destilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen und nach der 'post-embedding' Methode (Wenzel et al., 1997) weiterbehandelt. Verwendet wurden hierfür polyklonale Antikörper gegen VMAT2, Gα<sub>o2</sub> und Synaptophysin sowie an 5 nM Goldpartikel gekoppeltes anti-Kaninchen IgG als sekundärer Antikörper.

### **2.5.9 Subzelluläre Fraktionierung**

Zur subzellulären Fraktionierung wurden 4-5 60 mm Kulturschalen semikonfluent gewachsener BON Zellen oder Rapheneurone 2X mit eiskaltem PBS gewaschen.

Die Zellen wurden mit 1 ml PBS pro Kulturschale abgeschwemmt und bei 2000 xg abzentrifugiert. Sämtliche folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt: Die Zellen wurden in 400 µl Homogenisierungs-Puffer aufgenommen, dem zuvor Leupeptin (2 µg / ml), Aprotinin (1 µg / ml) sowie PMSF (1 mM) als Protease-Inhibitoren zugesetzt worden waren. Die Zellsuspension wurde durch die 20-fache Passage durch eine 27G Kanüle homogenisiert. Das Homogenat wurde für 15 min bei 4000 xg zentrifugiert und der resultierende postnukleäre Überstand (PNÜ) wurde abgenommen. Während der Zentrifugation wurden mit einem Hoefer SG 15 Gradienten-Mischer mindestens 2 kontinuierliche Saccharose-Gradienten in den Konzentrationen von 0,35-2 M mit einem Volumen von 1,8 ml hergestellt. Der PNÜ von etwa 350 µl wurde vorsichtig auf den Gradienten aufgetragen und für 3 h in einem Beckman TLS 55 Rotor bei 86.000 xg zentrifugiert. Der zweite Gradient wurde dabei als Gegengewicht verwendet. Die Fraktionen von jeweils 60 µl wurden mit einer Kanüle über eine Schlauchpumpe vom Boden des Gradienten her abgesaugt und aufgefangen. Anschließend wurden die aufgefangenen Fraktionen noch einmal mit 1 ml 4 mM Hepes Puffer, pH 7,3, verdünnt und für 30 min bei 65.000 xg in einem Beckman TLA 100.4 Rotor abzentrifugiert. Die sedimentierten Membranen wurden dann in 50 µl 1X Laemmli Puffer aufgenommen und der Gelelektrophorese mit anschließender Immunoreplika-Analyse unterzogen.

### **2.5.10 Bestimmung von Protein-Konzentrationen**

Die Bestimmung von Protein-Konzentrationen erfolgte mit der Bicinchoninsäure (BCA) Methode nach Smith et al. (1985). Über Verdünnungsreihen wurde eine Standardkurve von 50 bis 400 µg / ml BSA hergestellt. Das BSA wurde üblicherweise in 0,4 % Triton-X100 angesetzt.

Die Standardwerte sowie die Proben wurden in Duplikaten in die Löcher einer 96-Loch Mikrotiter Platte (20 µl / Loch) pipettiert. Dazu wurden pro Loch 200 µl der BCA Reaktionslösung gegeben (eine Mischung aus Lösung A und B im Verhältnis 50:1, v / v). Die Mikrotiter Platte wurde dann für 30 min bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Platte für 10 min zum Abkühlen stehen gelassen, bevor die Absorption bei 550 nm in einem Elisa-Reader gemessen wurde. Die Protein-Konzentrationen der Proben wurden anhand der Standardkurve bestimmt.

### 2.5.11 Präparation von synaptischen Vesikeln (LP2)

Synaptische Vesikel wurden von adulten Wistar Ratten beider Geschlechter nach einem von Huttner et al. (1983) beschriebenen Protokoll präpariert. Alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt.

Zumeist wurde ein Tier für eine Präparation von synaptischen Vesikeln benötigt.

Die Ratte wurde mit Ether betäubt und dann dekapitiert. Das Gehirn wurde so schnell wie möglich entnommen und in 15 ml eiskalter Saccharose-Lösung (320 mM) aufgenommen, der folgende Protease-Inhibitoren zugesetzt worden waren: Aprotinin (1 µg / ml), Leupeptin (2 µg / ml), Pepstatin (2 µg / ml) und PMSF (0,1 mM). In einem Dounce-Homogenisator (900 rpm, 10X) wurde das Gehirn homogenisiert. Das Homogenat wurde darauf für 10 min bei 800 xg in einem Beckman Ti 70 Rotor zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde für 15 min bei 9200 xg zentrifugiert. Die sedimentierten Membranen wurden in 10 ml der Saccharose-Lösung resuspendiert und erneut für 15 min bei 9200 xg zentrifugiert. Das resultierende synaptosomale Pellet wurde in 1-1,5 ml der Saccharose-Lösung suspendiert, durch die Zugabe von 9 Volumenanteilen destilliertem H<sub>2</sub>O lysiert, und im Dounce-Homogenisator (2000 rpm, 3X) homogenisiert. Das Lysat wurde durch die Zugabe von HEPES (Endkonzentration 10 mM) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die folgende Zentrifugation für 20 min bei 25000 xg führte zum 1. Pellet des Lysats (LP1), das sich hauptsächlich aus Fragmenten der Plasmamembran zusammensetzt, sowie zum Überstand des 1. Lysats (LS1). Der Überstand wurde dann aufgeteilt und in einem Beckman TLA 100.4 Rotor (Röhrchenvolumen 3,5 ml) für 30 min bei 350.000 xg zentrifugiert. Diese letzte Zentrifugation führte zum 2. Pellet des Lysats (LP2), das sich hauptsächlich aus kleinen synaptischen Vesikeln zusammensetzt. Zur Resuspendierung des Pellets diente die 5-fache Passage durch eine 27 G Kanüle.

### 2.5.12 Thrombozytenpräparation

Die Mäuse wurden zunächst mit 50 µl Ketavet und 50 µl Rompun je 10 g Körpergewicht intraperitoneal narkotisiert. Danach wurde die Bauchhöhle eröffnet und die Vena cava freigelegt. Aus dieser wurde etwa 1 ml Blut mit einer Spritze abgenommen, in der 30 IU Heparin vorgelegt waren. Das abgenommene Blut wurde in ein Eppendorf-Röhrchen überführt, mit dem halben Volumen an Tyrode-HEPES

Puffer vermischt, und bei 200 xg für 7,5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das thrombozytenreiche Plasma wurde abgenommen und erneut bei 1000 xg für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die sedimentierten Thrombozyten wurden darauf in Tyrode-Hepes Puffer resuspendiert und zur Vorbereitung der Serotoninaufnahme mit SLO permeabilisiert.

## 2.6 Verwendete Geräte

### Zentrifugen

Beckman L-70 Ultrazentrifuge      Beckman Optima™ TL Ultrazentrifuge

Rotoren: TLS 55, TLA 100.4      Rotoren: Ti 70, SW 40

Beckman J2-HS      Eppendorf Zentrifuge 5402

Rotor: JA 14

### Elektrophorese

Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad)

Power Pac 200 Netzgerät (Bio-Rad)

Mini-Protean® II Elektrophorese-Kammer (Bio-Rad)

### Photometer

Dynatech MR 500 Elisa Reader (Dynatech)

UV 1202 UV-VIS Spektrophotometer (Shimadzu)

### Mikroskop

Leica DMLB Epifluoreszenz-Mikroskop mit Durchlichteinrichtung

### Szintillationsmessungen

Beckman LS 6500, Liquid Szintillation Counter

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Poren-bildende Toxine als Werkzeuge zur Untersuchung intrazellulärer Transportprozesse

Die Permeabilisierung von Zellen mit bakteriellen zytolytischen Toxinen bietet die Möglichkeit zum Studium intrazellulärer Prozesse. Sie ermöglicht eine gezielte Manipulation des intrazellulären Milieus und erlaubt das Einbringen von nicht oder nur sehr schwer membrangängigen Substanzen in das Zytosol. Mit Hilfe dieser Technik wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl von intrazellulären Prozessen untersucht. So etwa die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Membranfusion in PC12 Zellen (Ahnert-Hilger et al., 1985), in exokrinen Zellen des Pankreas (Stecher et al., 1992) und Synaptosomen (Bhakdi et al., 1993). An permeabilisierten Zellen konnten Aspekte der Membrandynamik des Golgi-Komplexes (Mironov et al., 1997) aufgeklärt werden. Nicht zuletzt konnte die Regulation von VMAT1 durch das heterotrimere G-Protein  $\text{Go}_2$  in permeabilisierten PC12 Zellen gezeigt werden (Ahnert-Hilger et al., 1998).

Zwei Poren-bildende Toxine,  $\alpha$ -Toxin und Streptolysin-O, gehören zu den experimentell etablierten Zytolysinen:  $\alpha$ -Toxin wird von *Staphylococcus aureus* produziert und bindet als Monomer an einen bis jetzt nicht identifizierten Rezeptor der Plasmamembran. In hohen Konzentrationen (50-200  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) wird  $\alpha$ -Toxin unspezifisch gebunden und bildet ringförmige Heptamere aus, die zur Porenbildung führen. Diese Poren erlauben jedoch nur die Passage von Molekülen mit einem Molekulargewicht bis zu 3 kDa (Bhakdi et al., 1993). Streptolysin-O (SLO) wird von *Streptococcus pyogenes* produziert und bindet an Cholesterol in der Plasmamembran. Die durch Oligomere des SLO gebildeten heterogenen Poren sind größer als die des  $\alpha$ -Toxins und lassen Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 150 kDa passieren (Bhakdi und Trantum-Jensen, 1987, Bhakdi et al., 1993).

Charakterisierte Präparationen (siehe Methoden) beider Toxine wurden verwendet, um einen direkten experimentellen Zugang zur Untersuchung der vesikulären Aufnahme und Sekretion von Tritium-markierten Monoaminen in neuroendokrinen Zelllinien zu erhalten. So konnte eine quantitative Analyse des in die Zellen aufgenommenen Monoamins durchgeführt werden. In der Ratten Phäochromozytom Zelllinie PC12 führte die Inkubation mit  $\alpha$ -Toxin oder SLO zu einer

konzentrationsabhängigen Permeabilisierung der Zellen (**Abbildung 2A**, dokumentiert ist das Ergebnis eines Trypan-Blau Ausschluß-Tests nach Inkubation mit SLO). In permeabilisierten Zellen konnte im Vergleich zu nicht permeabilisierten Zellen eine deutliche Steigerung der Reserpin-sensitiven und damit vesikulären (siehe Abschnitt 3.2.1) Noradrenalinaufnahme gemessen werden (**Abbildung 2B**). Die Inkubation mit einer SLO Konzentration von 55 hämolytischen Einheiten ( HE ) / ml führte zu einer maximalen Erhöhung der Aufnahme um das 8-fache auf etwa 2,2 pmol / mg Protein. Nach Permeabilisierung mit beiden Toxinen wurde ebenfalls eine verstärkte Noradrenalinsekretion gemessen (**Abbildung 2C**): So ließ sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulierte Sekretion von 25 % in unbehandelten Zellen in permeabilisierten Zellen auf maximal 58 % des aufgenommenen Noradrenalins um das 2 bis 3-fache steigern. Die basale Sekretion stieg nach Permeabilisierung von 13 % auf maximal 35 % ebenfalls an.

Der auch an der humanen neuroendokrinen Zelllinie BON (siehe Einleitung) durchgeführte Trypan-Blau Ausschluß-Test zeigt, daß diese Zelllinie ebenso durch die Inkubation mit  $\alpha$ -Toxin und SLO permeabilisiert werden konnte (**Abbildung 3A**, dokumentiert ist das Ergebnis eines Trypan-Blau Ausschluß-Tests nach Inkubation mit SLO). In permeabilisierten Zellen konnte eine im Vergleich zu nicht permeabilisierten Zellen deutlich gesteigerte vesikuläre Serotoninaufnahme gemessen werden (**Abbildung 3B**). So betrug die Reserpin-sensitive Aufnahme nach Permeabilisierung mit 100 HE / ml  $\alpha$ -Toxin mit 0,7 pmol / mg Protein etwa das 6-fache der in nicht permeabilisierte Zellen aufgenommenen Menge an Serotonin. Insgesamt war die Serotoninaufnahme bei Anwendung beider Toxine vergleichbar.

Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten weiterführenden funktionellen Experimente an BON Zellen, Neuronen und Thrombozyten wurde ausschließlich SLO zur Permeabilisierung verwendet. Die Größe der in der Plasmamembran erzeugten Poren ermöglichte im Gegensatz zum  $\alpha$ -Toxin auch das Einbringen von Proteinen, wie etwa G-Protein Untereinheiten oder der leichten Kette von Tetanus Neurotoxin, in die Zellen.



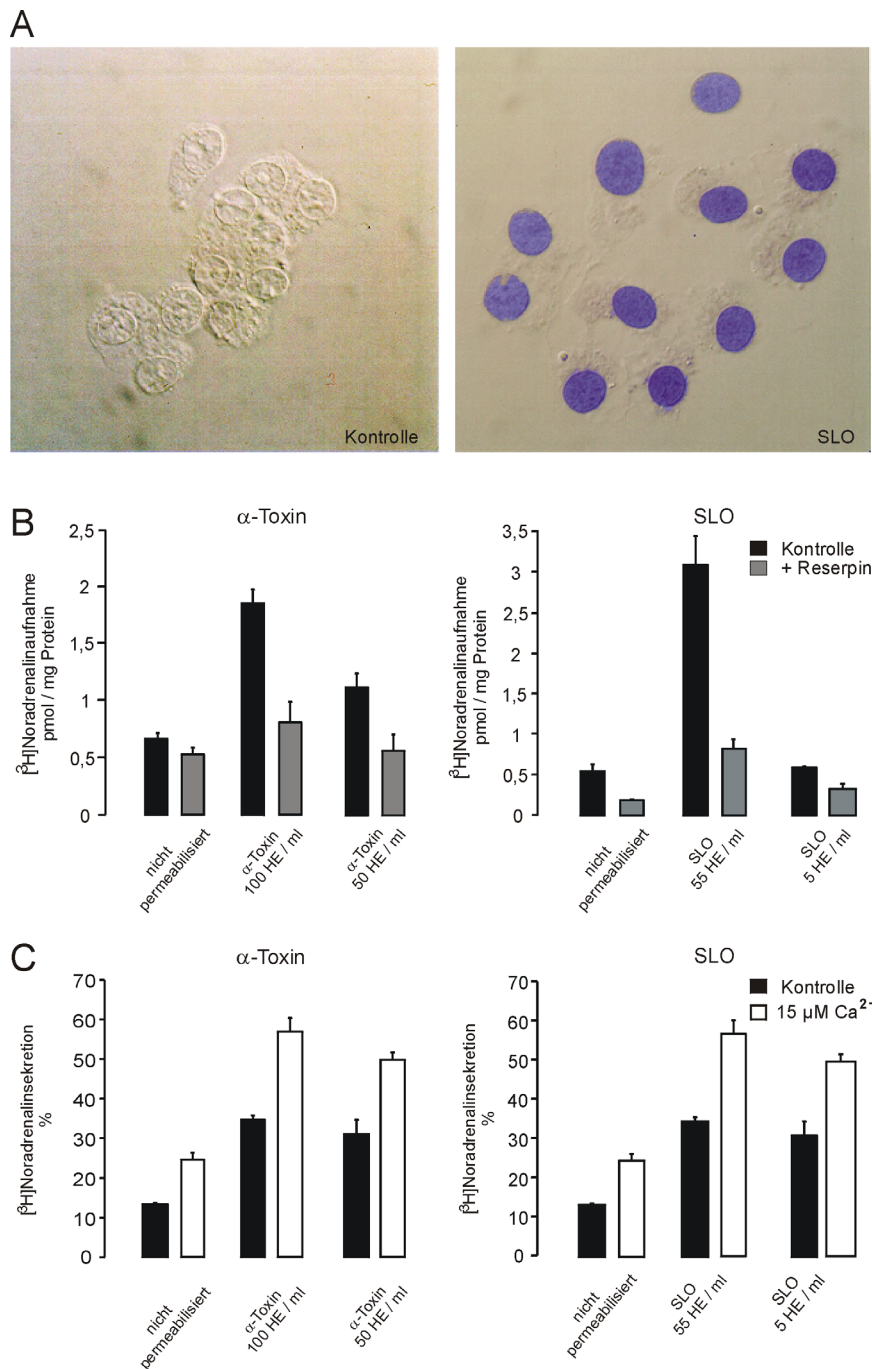


Abbildung 2

### Aufnahme und Sekretion von [ $^3\text{H}$ ]Noradrenalin nach Permeabilisierung von PC12 Zellen mit $\alpha$ -Toxin und Streptolysin-O (SLO)

#### A: Trypan Blau Ausschluß-Test in PC12 Zellen

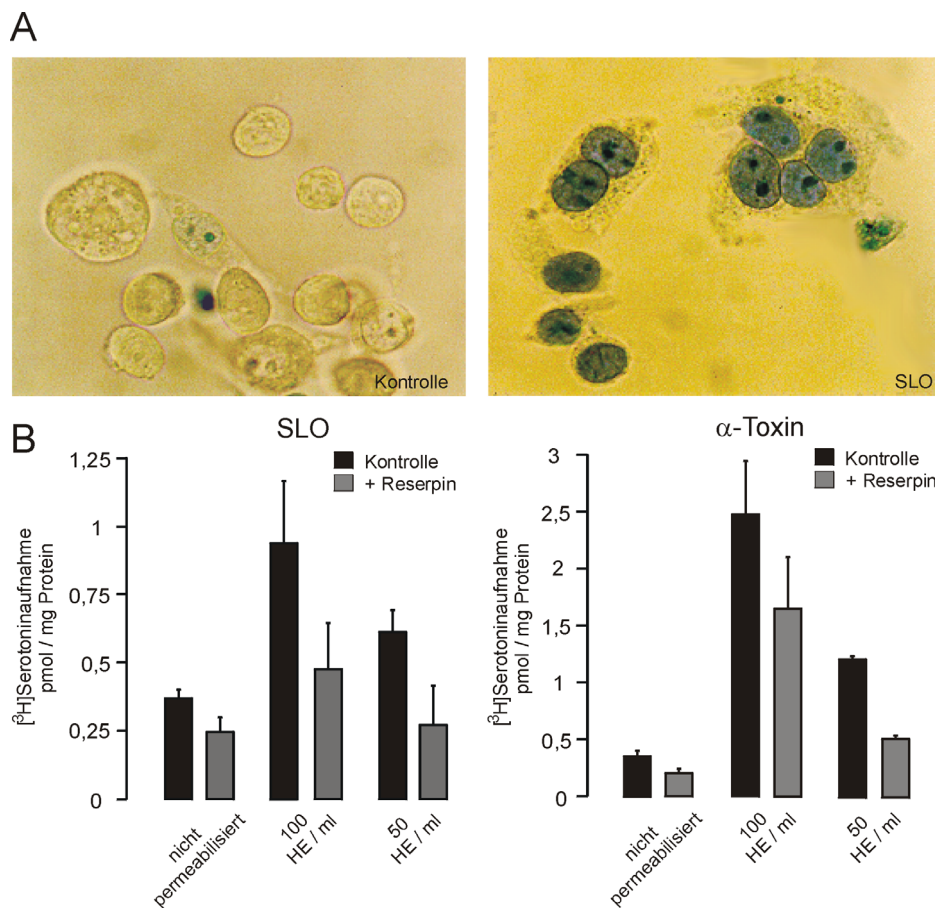
PC12 Zellen wurden gewaschen und für 5 Min mit Puffer oder 100 hämolytischen Einheiten (HE) / ml SLO bei 36°C inkubiert. Gleiche Volumina der Zellsuspension und Trypan Blau, einem nicht-membrangängigen Farbstoff, wurden vermischt und unter dem Lichtmikroskop (Phasenkontrast für Kontrollzellen) betrachtet. Eine komplette Färbung war nur in den SLO permeabilisierten Zellen, nicht jedoch in den Kontrollzellen, zu erkennen.

#### B: [ $^3\text{H}$ ]Noradrenalin Aufnahme in PC12 Zellen

PC12 Zellen wurden suspendiert und mit Puffer oder verschiedenen Konzentrationen an  $\alpha$ -Toxin oder SLO inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen mit 90 nM [ $^3$ H]Noradrenalin in KG / ATP Puffer für 20 min inkubiert. In den Toxin-behandelten Zellen konnte eine deutlich höhere [ $^3$ H]Noradrenalin Aufnahme als in den nicht-permeabilisierten Zellen gemessen werden. Die Permeabilisierung mit SLO hatte den stärksten Effekt, die Applikation von 55 HE / ml führte zu einer Erhöhung der Aufnahme um das 8-fache.

### C: [ $^3$ H]Noradrenalinsekretion in PC12 Zellen

PC12 Zellen wurden für 2 Stunden mit 40 nM [ $^3$ H]-Noradrenalin vorbeladen. Nach dem Abwaschen des Inkubationsmediums wurden die Zellen suspendiert und mit Puffer oder verschiedenen Konzentrationen an  $\alpha$ -Toxin oder SLO inkubiert. Die Stimulation erfolgte für 10 min bei 36°C in KG4 Puffer (15  $\mu$ M freies  $Ca^{2+}$ ). Die Toxin-behandelten Zellen zeigten eine deutlich höhere [ $^3$ H]Noradrenalinsekretion als die nicht permeabilisierten Zellen. Am stärksten war der Effekt bei der Permeabilisierung mit 100 HE / ml  $\alpha$ -Toxin, die zu einer Erhöhung der Sekretion um das 5-fache führte.



### Abbildung 3

#### Aufnahme von [ $^3$ H]Serotonin nach Permeabilisierung von BON Zellen mit Streptolysin-O (SLO) und $\alpha$ -Toxin

##### A: Trypan Blau Ausschluß-Test in BON Zellen

BON Zellen wurden gewaschen und für 5 Min mit Puffer oder 100 HE / ml SLO bei 36°C inkubiert. Gleiche Volumina der Zellsuspension und Trypan Blau wurden vermischt und unter dem Lichtmikroskop (Phasenkontrast für Kontroll Zellen) betrachtet. Eine komplette Färbung war nur in den SLO-permeabilisierten Zellen, nicht jedoch in den Kontrollzellen, zu erkennen.

##### B: [ $^3$ H]Serotoninaufnahme in BON Zellen

BON Zellen wurden suspendiert und mit Puffer oder unterschiedlichen Konzentrationen an  $\alpha$ -Toxin oder SLO inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen mit 90 nM [ $^3$ H]Noradrenalin in KG / ATP Puffer für 20 min inkubiert. In den Toxin-behandelten Zellen konnte eine deutlich höhere [ $^3$ H]Serotoninaufnahme als in den nicht permeabilisierten Zellen gemessen werden. Die Applikation von 100 HE / ml  $\alpha$ -Toxin oder SLO führte einer maximalen Erhöhung der Aufnahme um das 4 bis 5-fache.

### **3.2 Regulation der vesikulären Serotoninaufnahme in permeabilisierte BON Zellen durch heterotrimere G-Proteine**

Die Aktivierung der  $\alpha$ -Untereinheit  $G\alpha_{o2}$  hemmt die Aktivität von VMAT1 in PC12 Zellen (Ahnert-Hilger et al., 1998). Im diesem Abschnitt soll die Frage geklärt werden, ob der beobachtete Effekt spezifisch für PC12 Zellen ist oder ein generelles Prinzip der Regulation vesikulärer Transportprozesse in monoaminergen Zellen darstellt. Als Modell diente die humane neuroendokrine Zelllinie BON.

#### **3.2.1 Vesikuläre Aufnahme von Serotonin**

BON Zellen wurden mit SLO permeabilisiert und mit Tritium-markiertem Serotonin inkubiert. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen liess sich eine Serotoninaufnahme von 1,9 pmol / mg Protein messen (**Abbildung 4**). Um zu prüfen, ob es sich bei der beobachteten Aufnahme tatsächlich um den spezifischen Transport des Serotonins in sekretorische Vesikel handelte, wurde die Inkubation parallel mit ATP-freiem Puffer oder unter Zusatz von Reserpin als Inhibitor der beiden vesikulären Monoamintransporter VMAT1 und VMAT2 durchgeführt. Die Abwesenheit von ATP führte zu einer stark verminderten Aufnahme des Serotonins auf etwa 0,3 pmol / mg Protein. Ebenso bewirkte Reserpin eine komplette Blockierung der ATP-abhängigen Serotoninaufnahme.

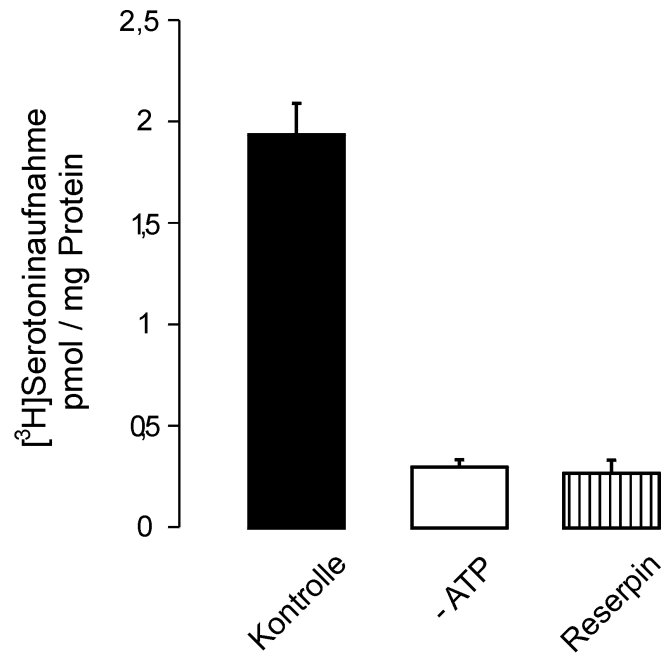


Abbildung 4

**Die [<sup>3</sup>H]Serotoninaufnahme in permeabilisierte BON Zellen ist ATP-abhängig und kann durch Reserpin blockiert werden**

BON Zellen wurden mit SLO permeabilisiert, gewaschen und für 20 min bei 36°C mit [<sup>3</sup>H]Serotonin (90 nM) in KG3 Puffer inkubiert. In Abwesenheit von ATP (KG1 Puffer) war nur eine unspezifische Akkumulation von Radioaktivität meßbar. Der Zusatz von Reserpin (Endkonzentration 5 µM) führte zu einer kompletten Hemmung der [<sup>3</sup>H]Serotoninaufnahme.

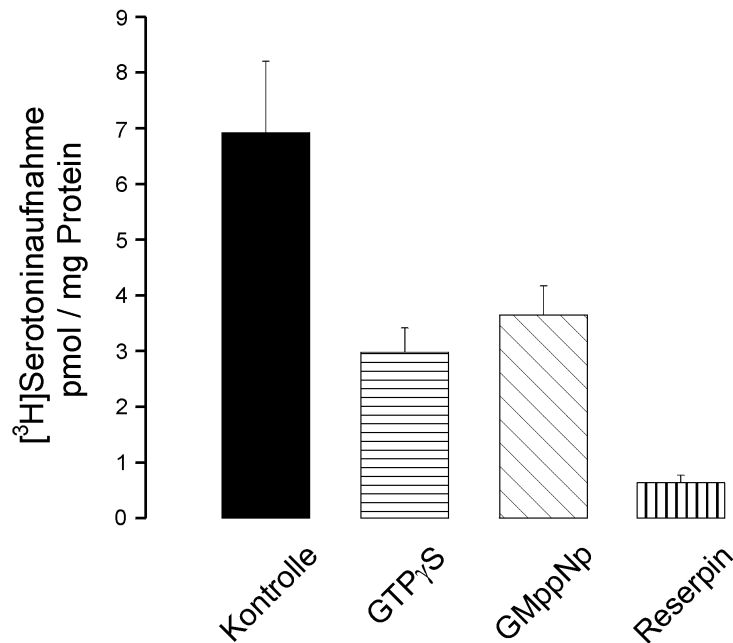
### 3.2.2 Hemmung der vesikulären Aufnahme durch Aktivatoren heterotrimerer G-Proteine

Um zu untersuchen, ob die vesikuläre Serotoninaufnahme in BON Zellen ein Prozeß ist, der durch (heterotrimere) G-Proteine reguliert wird, wurden Aktivatoren heterotrimerer G-Proteine eingesetzt. Verwendet wurden die nicht hydrolysierbaren GTP-Analoga GTP $\gamma$ S und GMppNp. Guanosintriphosphat (GTP) bindet an die  $\alpha$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine und führt zur Aktivierung der Untereinheit. GTP-Analoga GTP $\gamma$ S und GMppNp werden von der  $\alpha$ -Untereinheit als Substrat erkannt, können jedoch nicht hydrolysiert werden und stellen so eine anhaltende Aktivierung sicher.

Die Zugabe von GTP $\gamma$ S oder GMppNp zum Inkubationsansatz hemmte die Serotoninaufnahme von etwa 6,9 pmol / mg Protein auf 3 (GTP $\gamma$ S) bzw. 3,7 (GMppNp) pmol / mg Protein um 40-50% (**Abbildung 5**). Die als unspezifisch zu

betrachtende Aufnahme in Gegenwart von Reserpin betrug 0,6 pmol / mg Protein.

Die Inkubation mit steigenden Konzentrationen an Serotonin (5-450 nM) ergab eine konzentrationsabhängige vesikuläre Aufnahme des Serotonins (**Abbildung 6**), die im Konzentrationsbereich zwischen 250 und 450 nM in den Sättigungsbereich übergang. Über den gesamten Konzentrationsbereich ließ sich die vesikuläre Aufnahme durch GMppNp um 50-60 % hemmen. Für sämtliche Experimente zur Serotoninaufnahme in permeabilisierte BON Zellen wurde mit 90 nM eine Konzentration aus dem linearen Bereich der Transporter-Kinetik gewählt.



**Abbildung 5**

**Die vesikuläre Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Serotonin in permeabilisierte BON Zellen wird durch Aktivatoren heterotrimerer G-Proteine gehemmt**

BON Zellen wurden mit SLO permeabilisiert, gewaschen und für 20 min mit [<sup>3</sup>H]Serotonin und den angegebenen Zusätzen bei 36°C inkubiert. Die Zugabe der nicht-hydrolysierbaren GTP-Analoga GTP $\gamma$ S oder GMppNp zum Inkubationsansatz (Endkonzentrationen jeweils 50  $\mu$ M) führte zu einer Hemmung der Aufnahme des [<sup>3</sup>H]Serotonins um 50 %. Die Aufnahme in Gegenwart von Reserpin (Endkonzentration 5  $\mu$ M) repräsentiert die unspezifische Akkumulation von [<sup>3</sup>H]Serotonin.

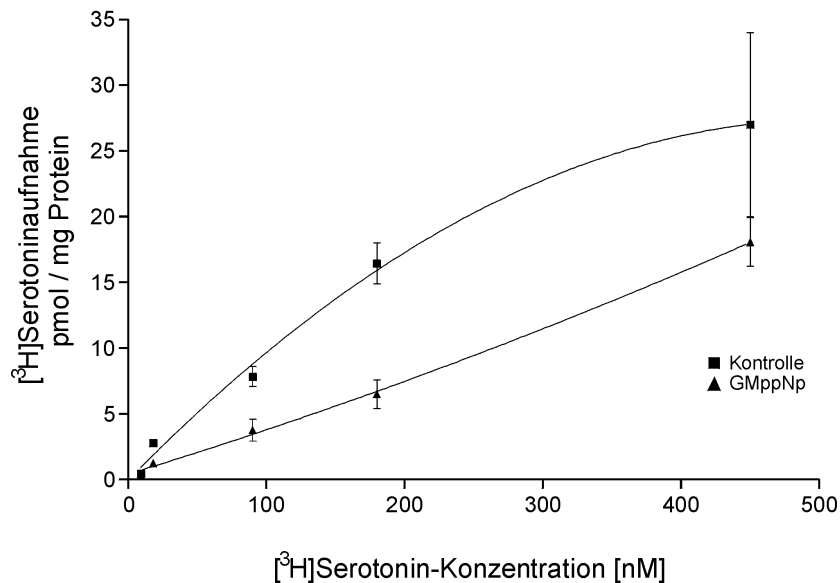


Abbildung 6

### Hemmung der konzentrationsabhängigen [<sup>3</sup>H]Serotoninaufnahme in permeabilisierte BON Zellen durch GMppNp

BON Zellen wurden mit SLO permeabilisiert, gewaschen und für 20 min mit steigenden Konzentrationen an [<sup>3</sup>H]Serotonin bei 36°C inkubiert. Die Zugabe des nicht hydrolysierbaren GTP-Analogons GMppNp zum Inkubationsansatz (Endkonzentration 50 µM) führte zu einer Hemmung der Aufnahme des [<sup>3</sup>H]Serotonins 50-60 % über den gesamten Konzentrationsbereich. Die unspezifische Aufnahme in Gegenwart von Reserpin betrug 0,04, 0,15, 0,58, 0,89 und 2,5 pmol / mg Protein.

### 3.2.3 Aufhebung der durch GTPγS und GMppNp induzierten Hemmung durch Pertussis Toxin

Um Hinweise auf die Identität des oder der beteiligten G-Proteine zu bekommen, wurden BON Zellen vor den Experimenten zur Serotoninaufnahme mit Pertussis Toxin inkubiert. Pertussis Toxin ist ein von *Bordetella pertussis* produziertes Enterotoxin, dessen Wirkmechanismus auf seiner ADP-Ribosyltransferase Aktivität beruht. Als spezifisches Substrat dienen dabei die α-Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine der G<sub>i/o</sub>-Klasse. Die Übertragung einer ADP-Ribosegruppe auf das Cystein<sup>352</sup> der α-Untereinheit läßt die α-Untereinheit in der inaktiven GDP-gebundenen Form verharren. Pertussis Toxin stellt somit ein Werkzeug zur Inaktivierung bestimmter G-Proteine dar, mit dem gezielt in die transmembranöse Signaltransduktion eukaryontischer Zellen eingegriffen werden kann.

Die Zugabe von GTPγS oder GMppNp zum Inkubationsansatz (**Abbildung 7**) führte in permeabilisierten BON Zellen zur erwarteten Hemmung der vesikulären (Reserpin-

sensitiven) Serotoninaufnahme, sie lag bei 55 % ( $\text{GTP}\gamma\text{S}$ ) bzw. 60 % (GMppNp). Die Vorinkubation der Zellen für 48 h mit Pertussis Toxin hob diese Hemmung fast vollständig auf.

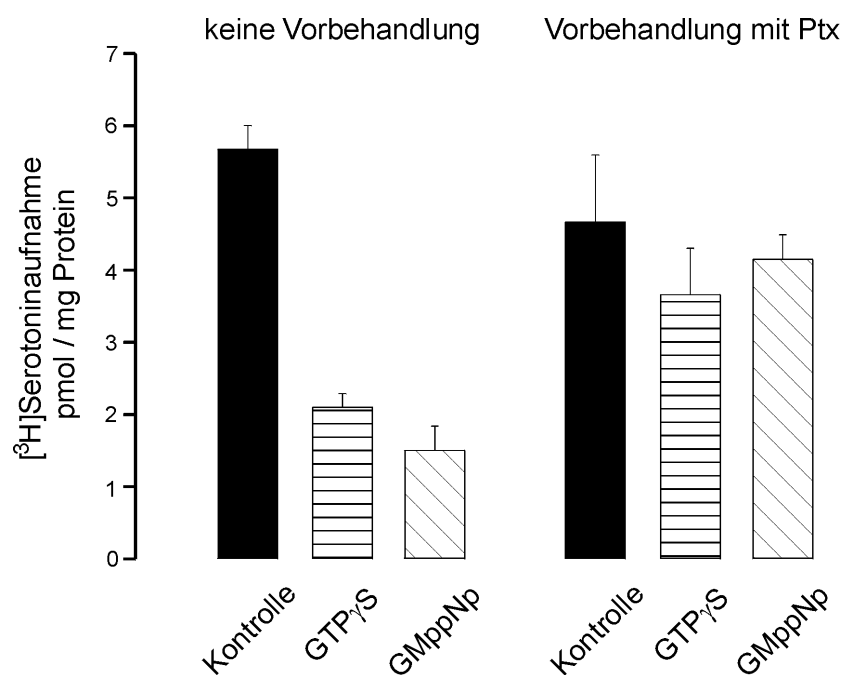


Abbildung 7

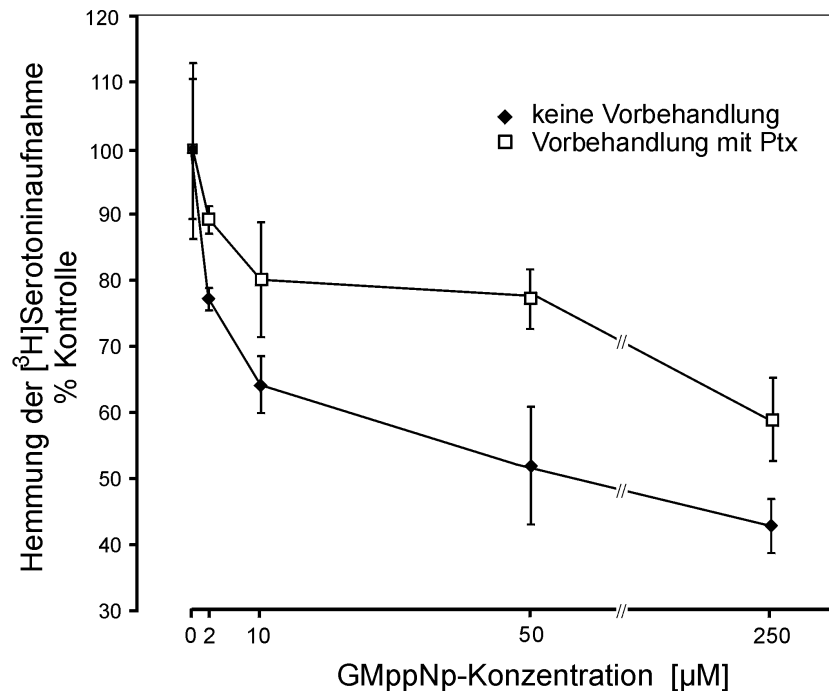
**Die Hemmung der [<sup>3</sup>H]Serotoninaufnahme durch GTP $\gamma$ S und GMppNp in permeabilisierten BON Zellen läßt sich durch Vorinkubation mit Pertussis Toxin (Ptx) aufheben.**

Die Zugabe von GTP $\gamma$ S oder GMppNp (50  $\mu\text{M}$ ) führte in SLO-permeabilisierten Zellen zu einer Hemmung von 55-60 % der [<sup>3</sup>H]Serotoninaufnahme. Die Vorbehandlung der Zellen für 48 Stunden mit Pertussis Toxin (100 ng / ml) hob diese Hemmung der [<sup>3</sup>H]Serotoninaufnahme durch die GTP-Analoga fast vollständig auf. Die unspezifische Aufnahme in Gegenwart von Reserpin wurde abgezogen und betrug  $0,93 \pm 0,05$  pmol / mg Protein für unbehandelte und  $0,83 \pm 0,1$  pmol / mg Protein für Toxin-behandelte Zellen.

Die Inkubation mit steigenden Konzentrationen an GMppNp dokumentierte, daß die durch Pertussis Toxin aufgehobene Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme jedoch auch von der Konzentration des angebotenen GTP-Analogons abhängig und damit reversibel ist (**Abbildung 8**). So ließ sich der Pertussis Toxin Effekt, der bei GMppNp-Konzentrationen zwischen 0,2 und 50  $\mu\text{M}$  mit maximal 20 % Hemmung im Gegensatz zu 48 % in unbehandelten Zellen noch sehr deutlich ausgeprägt war, bei einer GMppNp-Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  nicht mehr so deutlich darstellen. Die

durch GMppNp induzierte Hemmung betrug hier 40 %, im Gegensatz zu 55% in unbehandelten Zellen.

Die vorgestellten Experimente belegen, daß die vesikuläre Monoaminaufnahme in BON Zellen durch die Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen der  $G_{i/o}$ -Klasse gehemmt wird.



**Abbildung 8**

**Die Wirkung von Pertussis Toxin hängt von der Konzentration des angebotenen GMppNp ab**

Die Zugabe von steigenden Konzentrationen an GMppNp führte in SLO permeabilisierten Kontrollzellen zu einer dosisabhängigen Hemmung der  $[^3\text{H}]$ Serotoninaufnahme. Die Vorbehandlung der Zellen für 48 Stunden mit Pertussis Toxin führte zu einer partiellen Aufhebung dieser Hemmung, die aber bei einer GMppNP-Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  kaum noch vorhanden war. Die unspezifische Aufnahme in Gegenwart von Reserpin betrug  $2,64 \pm 0,34$  pmol / mg Protein für unbehandelte und  $1,7 \pm 0,21$  pmol / mg Protein für Toxin-behandelte Zellen.

**3.2.4 Hemmung der vesikulären Aufnahme durch  $G\alpha_o$**

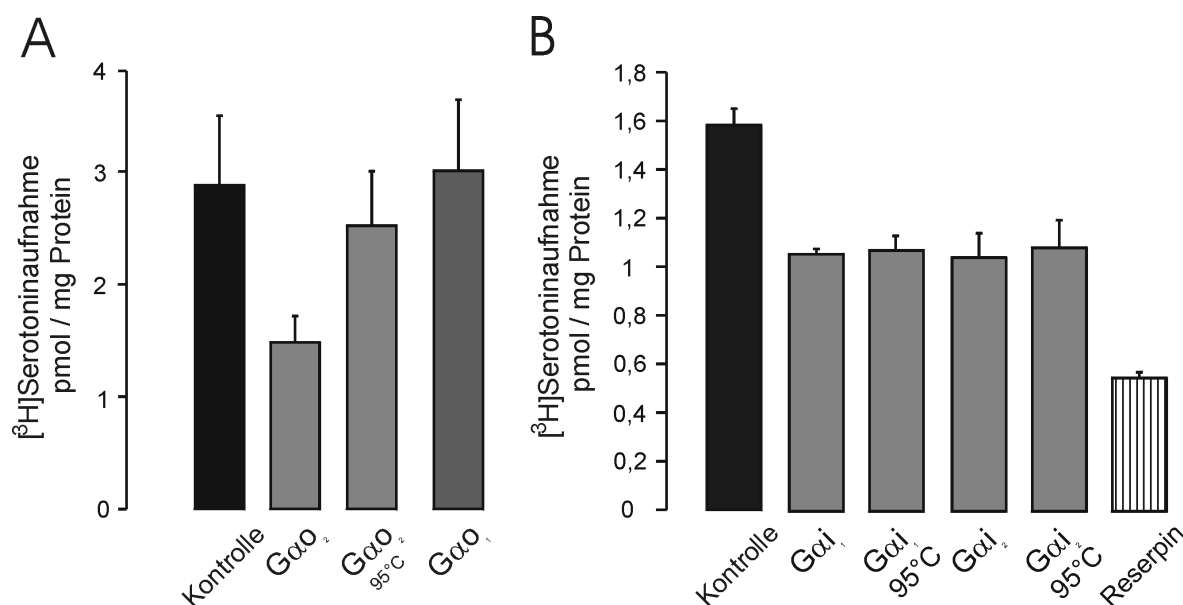
Um die für die Hemmung der Serotoninaufnahme verantwortlichen G-Proteine zu identifizieren, wurden dem Inkubationsansatz verschiedene gereinigte,  $\text{AlF}_4^-$ aktivierte  $\alpha$ -Untereinheiten der  $G_{i/o}$ -Klasse zugegeben. Die aktivierende Wirkung von  $\text{AlF}_4^-$  beruht dabei auf einer Stabilisierung des Zustands der  $\alpha$ -Untereinheit, der der GTP-gebundenen Form entspricht (Chabre, 1990).

Die Zugabe von  $G\alpha_o$  zum Inkubationsansatz führte in permeabilisierten BON Zellen



zu einer Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme von 2,9 pmol / mg Protein auf etwa 1,5 pmol / mg Protein (**Abbildung 9A**). Diese etwa 50 %ige Hemmung konnte durch vorhergehendes Kochen des  $G\alpha_2$  fast vollständig aufgehoben werden. Die Kontrolle der Hitzedenaturierung wurde durchgeführt, um mögliche Effekte auf die Aufnahme auszuschließen, die lediglich durch das Lösungsmittel, in dem die G-Protein Untereinheiten vorlagen, verursacht wurden.

Die Zugabe von  $G\alpha_1$  zum Inkubationsansatz hatte keinen Effekt auf die Serotoninaufnahme. Die Inkubation mit  $G\alpha_1$  und  $G\alpha_2$  führte zwar zu einer Hemmung der Serotoninaufnahme, jedoch konnte der Effekt durch Hitzedenaturierung nicht aufgehoben werden (**Abbildung 9B**) und mußte als unspezifisch betrachtet werden.



**Abbildung 9**

**Die [<sup>3</sup>H]Serotoninaufnahme in permeabilisierte BON Zellen wird durch  $G\alpha_2$  gehemmt**

**A:** Die Zugabe von gereinigtem,  $AlF_4^-$  aktiviertem,  $G\alpha_2$  (Endkonzentration 10 nM) zum Inkubationsansatz führte zu einer Hemmung der vesikulären [<sup>3</sup>H]Serotoninaufnahme von 50 %. Die Hitzedenaturierung von gereinigtem  $G\alpha_2$  (30 min bei 95°C) vor der Inkubation bewirkte eine fast vollständige Aufhebung des hemmenden Effekts. Ebenso zeigte der Zusatz von gereinigtem  $G\alpha_1$  (Endkonzentration 20 nM) keinen Effekt auf die [<sup>3</sup>H]Serotoninaufnahme. Die unspezifische Aufnahme in Gegenwart von Reserpin betrug  $0,83 \pm 0,1$  pmol / mg Protein.

**B:** Die Zugabe von gereinigtem,  $AlF_4^-$  aktiviertem,  $G\alpha_1$  oder  $G\alpha_2$  (Endkonzentration jeweils 10 nM) zum Inkubationsansatz führte zu einer Hemmung der [<sup>3</sup>H]Serotoninaufnahme von 30 %. Die Hitzedenaturierung der G-Protein Untereinheiten vor der Inkubation hatte keine Wirkung auf den hemmenden Effekt.

### 3.2.5 Spezifität der G-Protein Effekte auf die vesikuläre Aufnahme

Um experimentell zu bestätigen, daß die Zugabe der GTP-Analoga und  $G\alpha_2$  nicht zu einer gesteigerten Sekretion führt, und somit die beobachtete Hemmung nicht lediglich einen "Nettoeffekt" aus Aufnahme und Sekretion darstellte, wurden permeabilisierte BON Zellen mit der leichten Kette von Tetanus Neurotoxin inkubiert. Tetanus Neurotoxin wird unter anaeroben Bedingungen von *Clostridium tetani* produziert, im menschlichen Organismus (wie auch in vielen weiteren Taxa) über periphere Nervenendigungen aufgenommen und durch retrograden axonalen Transport bis ins Rückenmark transportiert. Hier führt es durch die spezifische Spaltung von Synaptobrevin, einem Protein des für die Exozytose essentiellen SNARE-Komplexes, in inhibitorischen Interneuronen zur Blockierung der GABA- bzw. Glyzinfreisetzung. Die daraus resultierende Enthemmung von Motoneuronen führt zu tetanischen Kontraktionen der quergestreiften Muskulatur. Tetanus Neurotoxin repräsentiert ein Toxin der A / B Familie, die sich aus einer leichten (A für "active") und einer schweren (B für "binding") Kette zusammensetzen. Während die schwere Kette der Internalisierung des Toxins dient, stellt die leichte Kette die proteolytisch wirksame Komponente dar.

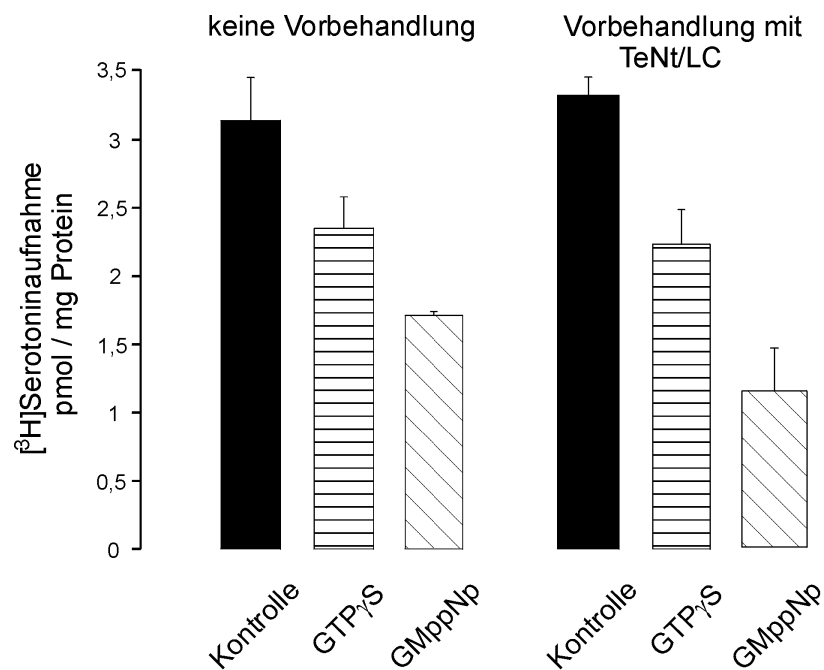
Es zeigte sich, daß eine Zwischeninkubation von permeabilisierten BON Zellen mit der leichten Kette von Tetanus Neurotoxin keinen Einfluß auf die durch  $GTP\gamma S$  und GMppNP vermittelte Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme hatte. Sie lag in nicht behandelten Zellen bei 25 % ( $GTP\gamma S$ ) bzw. 45 % (GMppNP) (**Abbildung 10**).

In Toxin-behandelten Zellen war die Hemmung durch  $GTP\gamma S$  mit 60 % sogar noch etwas stärker ausgeprägt.

Ebenso konnte in permeabilisierten BON Zellen, die mit der leichten Kette von Tetanus Neurotoxin inkubiert worden waren, durch gereinigtes  $G\alpha_2$  eine Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme um 50 % erzielt werden (**Abbildung 11A**). Das entsprach dem an nicht behandelten Zellen (siehe auch Abb.9A) beobachteten

Effekt. Die Hemmung konnte wiederum durch Hitze-denaturierung des  $G\alpha_2$  aufgehoben werden. Um zu überprüfen, ob die eingesetzte Konzentration des Toxins (1  $\mu M$ ) ausreichte, um Synaptobrevin vollständig zu spalten, wurde ein Teil der Zellsuspension für die Immunoreplika-Analyse verwendet (**Abbildung 11**). In permeabilisierten BON Zellen führte bereits eine Konzentration von 200 nM der

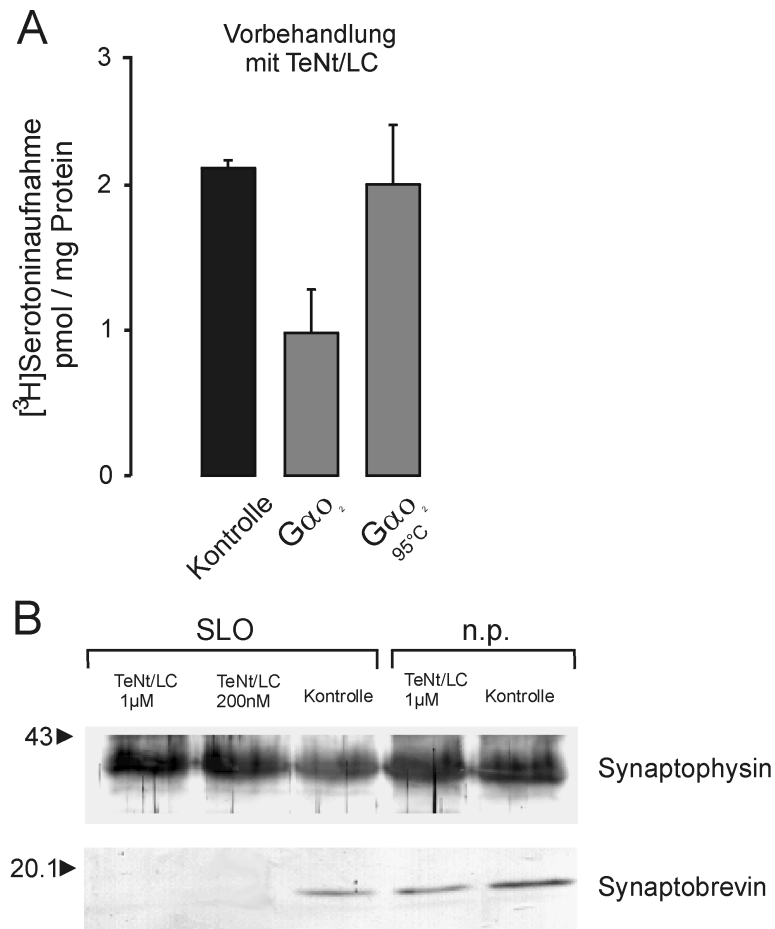
leichten Kette von Tetanus Neurotoxin zu einer spezifischen Spaltung von Synaptobrevin. In nicht permeabilisierten Zellen erfolgte keine Aufnahme der leichten Kette und damit keine Spaltung von Synaptobrevin. Synaptophysin, ein integrales Membranprotein kleiner synaptischer Vesikel und deren Analoga, wurde zur Kontrolle ebenfalls analysiert. Es wurde weder in permeabilisierten noch in nicht-permeabilisierten Zellen gespalten.



**Abbildung 10**

**Die Inkubation von permeabilisierten BON Zellen mit der leichten Kette von Tetanus Neurotoxin (TeNt / LC) beeinflusst die Hemmung der [<sup>3</sup>H]Serotoninaufnahme durch GTP $\gamma$ S und GMppNp nicht.**

Die Zugabe von GTP $\gamma$ S oder GMppNp (50  $\mu$ M) führte in SLO-permeabilisierten Zellen zu einer Hemmung der [<sup>3</sup>H]Serotoninaufnahme von etwa 35 % (GTP $\gamma$ S) bzw. 50 % (GMppNp). Wurden die Zellen für 20 min mit TeNt / LC (1  $\mu$ M) inkubiert, konnte eine ähnlich starke Hemmung beobachtet werden. Die unspezifische Aufnahme in Gegenwart von Reserpin betrug  $0,92 \pm 0,39$  pmol / mg Protein für unbehandelte und  $0,68 \pm 0,07$  pmol / mg Protein für Toxin-behandelte Zellen.



### Abbildung 11

#### Die Inkubation von BON Zellen mit TeNt/LC hat keinen Effekt auf die Hemmung der [<sup>3</sup>H]Serotoninaufnahme durch Gα<sub>o2</sub>

**A:** Die Zwischeninkubation der permeabilisierten Zellen für 20 min mit der leichten Kette von Tetanus Neurotoxin (TeNt/LC) hatte keinen Effekt auf die Hemmung der [<sup>3</sup>H]Serotoninaufnahme durch Gα<sub>o2</sub>. Die Zugabe von Gα<sub>o2</sub> führte auch hier zu einer Hemmung der [<sup>3</sup>H]Serotoninaufnahme von 50 %. Die Hitzedenaturierung des Gα<sub>o2</sub> bewirkte eine vollständige Aufhebung dieses Effekts. Die unspezifische Aufnahme in Gegenwart von Reserpin betrug 0,28±0,2 pmol / mg Protein.

**B:** Die Immunoreplika-Analyse von BON Zellen zeigt, daß unter den experimentellen Bedingungen wie in A aufgeführt die Zugabe von TeNt/LC (Endkonzentrationen 1 μM und 200 nM) zu SLO-permeabilisierten Zellen eine vollständige Spaltung von Synaptobrevin bewirkte. In nicht permeabilisierten Zellen ( n.p.) hatte das Toxin keinen Effekt. Das synaptische Protein Synaptophysin wurde weder in permeabilisierten noch in nicht permeabilisierten Zellen gespalten.

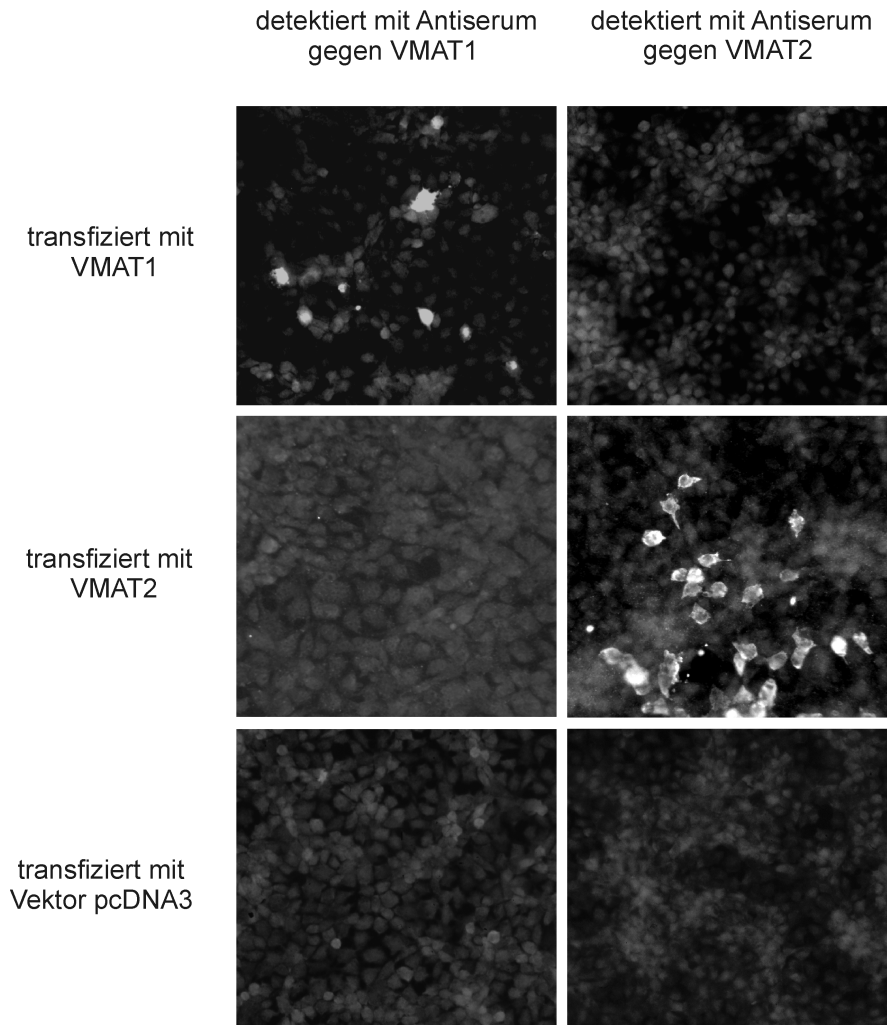
Die vorgestellten Ergebnisse belegen die Spezifität der durch GTP-Analoga und Gα<sub>o2</sub> vermittelten Effekte allein auf die vesikuläre Monoaminaufnahme.

### 3.3 Charakterisierung von polyklonalen Antikörpern gegen VMAT1 und VMAT2

Ob BON Zellen VMAT1, VMAT2 oder beide Transporter exprimieren, und wie sie subzellulär lokalisieren, wurde mit Hilfe Subtyp-spezifischer polyklonaler Antikörper überprüft.

Ein Kaninchen-Antiserum, daß gegen ein Gluthation S-Transferase (GST) Fusionsprotein des c-Terminus gerichtet war, wurde als Antikörper gegen VMAT1 eingesetzt. Für VMAT2 wurde sowohl ein Antiserum gegen ein Fusionsprotein des n-Terminus als auch ein Peptid-Antikörper gegen den c-Terminus verwendet. Um die Antikörper auf ihre Spezifität und mögliche Kreuzreaktivität zu testen, wurde die Fibroblasten Zelllinie COS mit dem eukaryontischen Plasmidvektor pcDNA3, in den die cDNA von VMAT1 oder VMAT2 inkloniert worden war, transient transfiziert. Die erfolgreiche Synthese der Transporterproteine wurde immunzytochemisch überprüft. Zusätzlich konnte die Spezifität der Antikörper in der Immunoreplika-Analyse von PC12 Zellen, die nur endogenes VMAT1 besitzen, sowie durch die Präabsorption mit rekombinantem Peptid aus dem C-Terminus von VMAT1 der Ratte getestet werden.

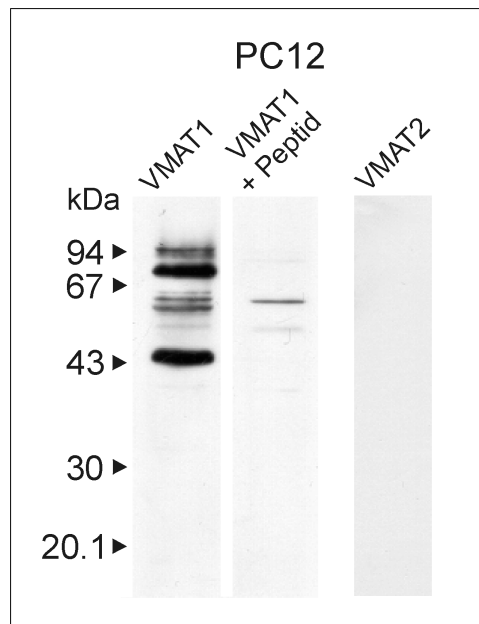
Die Antiseren erwiesen sich in der immunzytochemischen Analyse der transfizierten COS Zellen (**Abbildung 12**) als spezifisch für VMAT1 oder VMAT2 (verwendet wurde hier der Peptid-Antikörper), eine Kreuzreaktivität war nicht vorhanden. In der Immunoreplika-Analyse der PC12 Zellen wurden durch das anti-VMAT1 Antiserum eine Hauptbande mit einem Molekulargewicht von 55 kDa sowie einige weitere höhermolekulare Banden detektiert (**Abbildung 13**). Nach Präabsorption mit dem rekombinantem Peptid war kaum noch Immunreaktivität vorhanden, lediglich eine schmale Proteinbande bei ca. 60 kDa wurde detektiert. Die bei 55 kDa detektierte Proteinbande repräsentiert das Monomer, während die höhermolekularen Banden durch eine Glykosylierung oder die Dimerisierung des Transporters zu erklären sind (Liu et al., 1992a). Durch das anti-VMAT2 Antiserum wurden keine Proteinbanden detektiert.



**Abbildung 12**

**Die Antikörper gegen VMAT1 und VMAT2 sind spezifisch für das jeweilige Transporterprotein**

Zur Untersuchung der Spezifität der verwendeten Antikörper wurden COS Zellen mit der DNA von VMAT1, VMAT2 oder dem eukaryontischen Plasmidvektor pcDNA3 transient transfiziert. Die Proteinexpression beider Transporter wurde immunzytochemisch überprüft. Als sekundärer Antikörper diente Texas Red markiertes Ziege anti-Kaninchen IgG. Beide Antiseren erwiesen sich als spezifisch für das jeweilige Transporterprotein, eine Kreuzreaktivität trat nicht auf. In den zur Kontrolle mit dem Plasmidvektor transfizierten Zellen wurde ebenfalls keine Immunreaktivität nachgewiesen. Der Maßstab beträgt 10 µm.



*Abbildung 13*

**PC12 Zellen exprimieren nur VMAT1, kein VMAT2**

Ein postnukleärer Überstand von PC12 Zellen wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulose-Membran transferiert und mit polyklonalen Antiseren gegen VMAT1 und VMAT2 inkubiert. Die Immunoreplika-Analyse zeigt, daß durch das anti-VMAT1 Antiserum eine Hauptbande bei ca. 55 kDa, sowie einige weitere höhermolekulare Banden detektiert wurden. Die Präabsorbition mit 10 µg eines synthetisch hergestellten Peptids aus dem c-Terminus von VMAT1 der Ratte führte zum Verschwinden fast aller Banden. Lediglich eine schmale Bande bei ca. 60 kDa wurde weiterhin deutlich detektiert. Durch das anti-VMAT2 Antiserum wurden keine Proteinbanden detektiert.

### 3.4 Untersuchungen zur subzellulären Verteilung von VMAT1 und VMAT2 in PC12 und BON Zellen

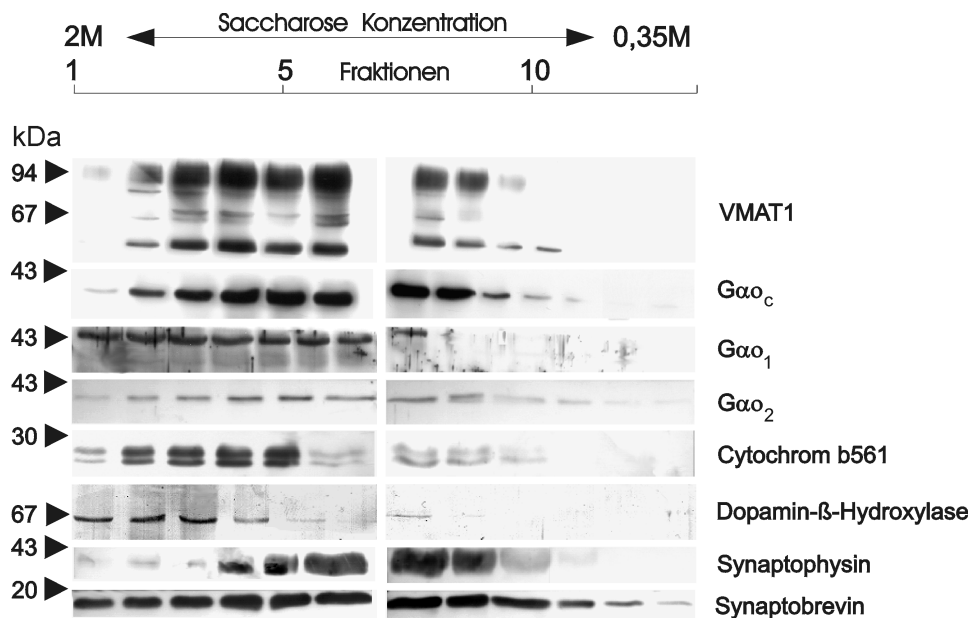
Nach der Charakterisierung der Antikörper konnte die Frage untersucht werden, welche Monoamintransporter in BON Zellen exprimiert werden. Hierfür wurde zunächst die Immunoreplika-Analyse eines postnukleären Überstands durchgeführt.

Weiterhin konnte an PC12 und BON Zellen mittels subzellulärer Fraktionierung untersucht werden, auf welchen Vesikeltypen, LDCVs oder SLMVs, die Transporter lokalisieren. Eine immunzytochemische Analyse der BON Zellen sollte die Verteilung von Serotonin sowie den exprimierten Monoamintransportern in der Zellkultur darstellen.

#### 3.4.1 In PC12 Zellen lokalisiert VMAT1 überwiegend auf LDCVs

Die subzelluläre Fraktionierung eines postnukleären Überstandes von PC12 Zellen

dokumentierte das Vorkommen von VMAT1 hauptsächlich in den schweren Membranfraktionen (**Abbildung 14**). Die Analyse der Membranfraktionen mit Antikörpern gegen Cytochrom b561 und Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase als Markerproteine für LDCVs zeigte, daß in den schweren Fraktionen hauptsächlich Membranen dieses Vesikeltyps sedimentierten. Die partielle Überschneidung mit Synaptophysin als Markerprotein der SLMVs deutete auf eine unvollständige Trennung von LDCVs und SLMVs in einem kleinen Bereich des Gradienten hin. Dies läßt eine Lokalisation von VMAT1 in geringerem Umfang auch auf SLMVs möglich erscheinen. Ausschließlich in den schweren Membranfraktionen fand sich  $G\alpha_1$ , während  $G\alpha_2$  in allen Fraktionen des Gradienten verteilt, jedoch hauptsächlich mit den LDCV Fraktionen assoziiert war. Bestätigt wurde diese Verteilung der G-Protein Untereinheiten durch die Analyse mit einem Antiserum, das gegen beide Untereinheiten ( $G\alpha_c$ ) gerichtet war, und den Hauptanteil des gesamten  $G\alpha$  in den schwereren Membranfraktionen nachwies. Synaptobrevin, ein Membranprotein sowohl der LDCVs als auch der SSVs, ließ sich in allen Fraktionen nachweisen.



**Abbildung 14**

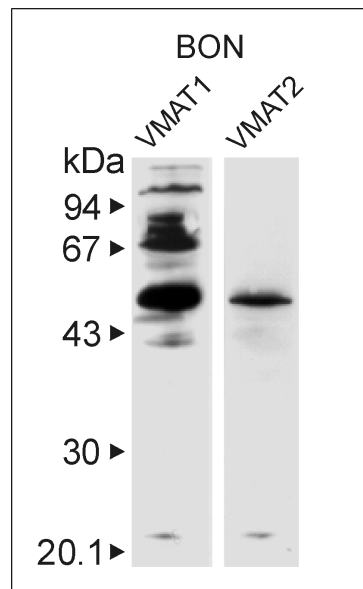
In PC12 Zellen kommt VMAT1 bevorzugt auf elektronendichten, großen Vesikeln ( LDCVs vor)



Aus einem Homogenat von PC12 Zellen wurde ein postnukleärer Überstand hergestellt und auf einen kontinuierlichen Saccharose-Gradienten (0,35-2 M) aufgetragen. Über eine Dichtegradienten-Zentrifugation erfolgte die subzelluläre Fraktionierung der Membranen. Die Immunoreplika-Analyse zeigt, daß VMAT1 in den schweren Membranfraktionen vorkommt. Die parallele Analyse der Membranfraktionen mit Antikörpern gegen Cytochrom b561 und Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase zeigte, daß sich VMAT1 hauptsächlich auf Membranen von LDCVs befand. Eine partielle Überschneidung von VMAT1 mit Synaptophysin, einem Markerprotein für SSVs und deren Analoga, war ebenfalls vorhanden. Ausschließlich in den schweren Fraktionen fand sich  $G\alpha_1$  während  $G\alpha_2$  über den gesamten Gradienten verteilt, hauptsächlich jedoch ebenfalls mit den Fraktionen der LDCVs assoziiert war. Ein gegen beide G-Protein Untereinheiten gerichtetes Antiserum ( $G\alpha_c$ ) belegt, daß sich der Hauptanteil des gesamten  $G\alpha$  in den schweren Fraktionen anreicherte. Synaptobrevin, als Membranprotein beider Vesikeltypen, fand sich sowohl in den schweren als auch den leichten Fraktionen des Gradienten.

### 3.4.2 In BON Zellen lokalisieren VMAT1 und VMAT2 überwiegend auf LDCVs

In der Immunoreplika-Analyse eines postnukleären Überstandes von BON Zellen (**Abbildung 15**) detektierten sowohl das anti-VMAT1 Antiserum als auch das anti-VMAT2 Antiserum Proteinbanden. Das Bandenmuster von VMAT1 entsprach dabei dem für PC12 Zellen beschriebenen. Durch das anti-VMAT2 Antiserum wurde lediglich eine Proteinbande bei 50-55 kDa detektiert.



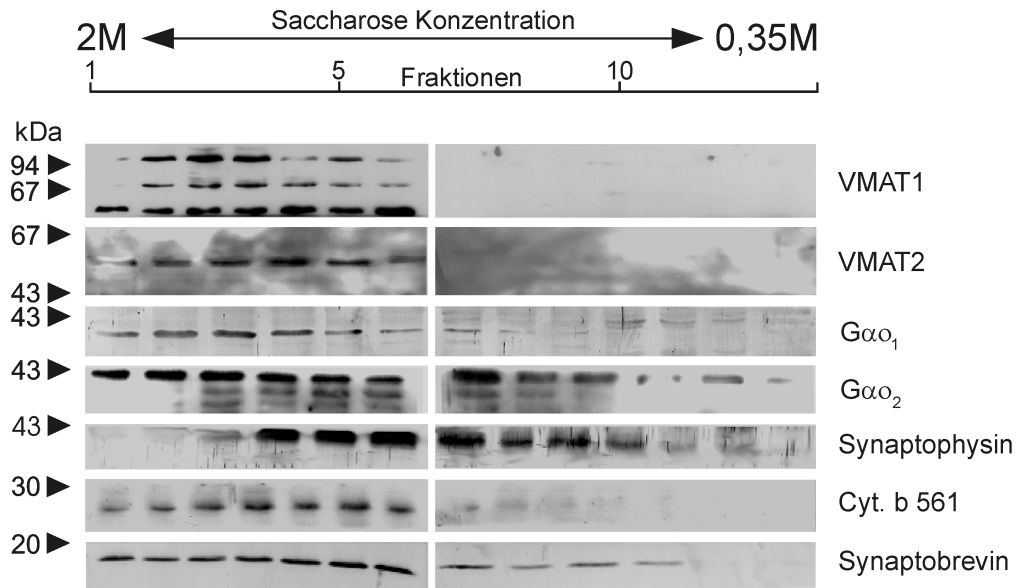
*Abbildung 15*

**BON Zellen exprimieren die vesikulären Monoamin-transporter VMAT1 und VMAT2**

---

Ein postnukleärer Überstand von BON Zellen wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulose-Membran transferiert und mit polyklonalen Antiseren gegen VMAT1 und VMAT2 inkubiert. Die Immunoreplika-Analyse zeigt, daß beide Antiseren eine Proteinbande bei ca. 55 kDa detektierten. Durch das anti-VMAT1 Antiserum wurden zusätzlich noch weitere höhermolekulare Banden (siehe PC12 Zellen) detektiert.

Die subzelluläre Fraktionierung des postnukleären Überstands von BON Zellen (**Abbildung 16**) dokumentierte eine Proteinverteilung, die der für PC12 Zellen beschriebenen ähnlich war. VMAT1 und VMAT2 waren hauptsächlich in den schweren Membranfraktionen lokalisiert. Die Analyse der Membranfraktionen mit einem Antikörper gegen Cytochrom b561 ließ erkennen, daß sich die schweren Fraktionen hauptsächlich aus Membranen der LDCVs zusammensetzten. Die partielle Überschneidung mit Synaptophysin deutete wie in der subzellulären Fraktionierung der PC12 Zellen auf eine unvollständige Trennung von LDCVs und SLMVs in einem kleinen Bereich des Gradienten hin. Ausschließlich in den schweren Membranfraktionen fand sich  $G\alpha_1$ , während  $G\alpha_2$  in allen Fraktionen, überwiegend aber in den LDCV Fraktionen lokalisierte. Synaptobrevin ließ sich in den Fraktionen beider Vesikeltypen nachweisen.

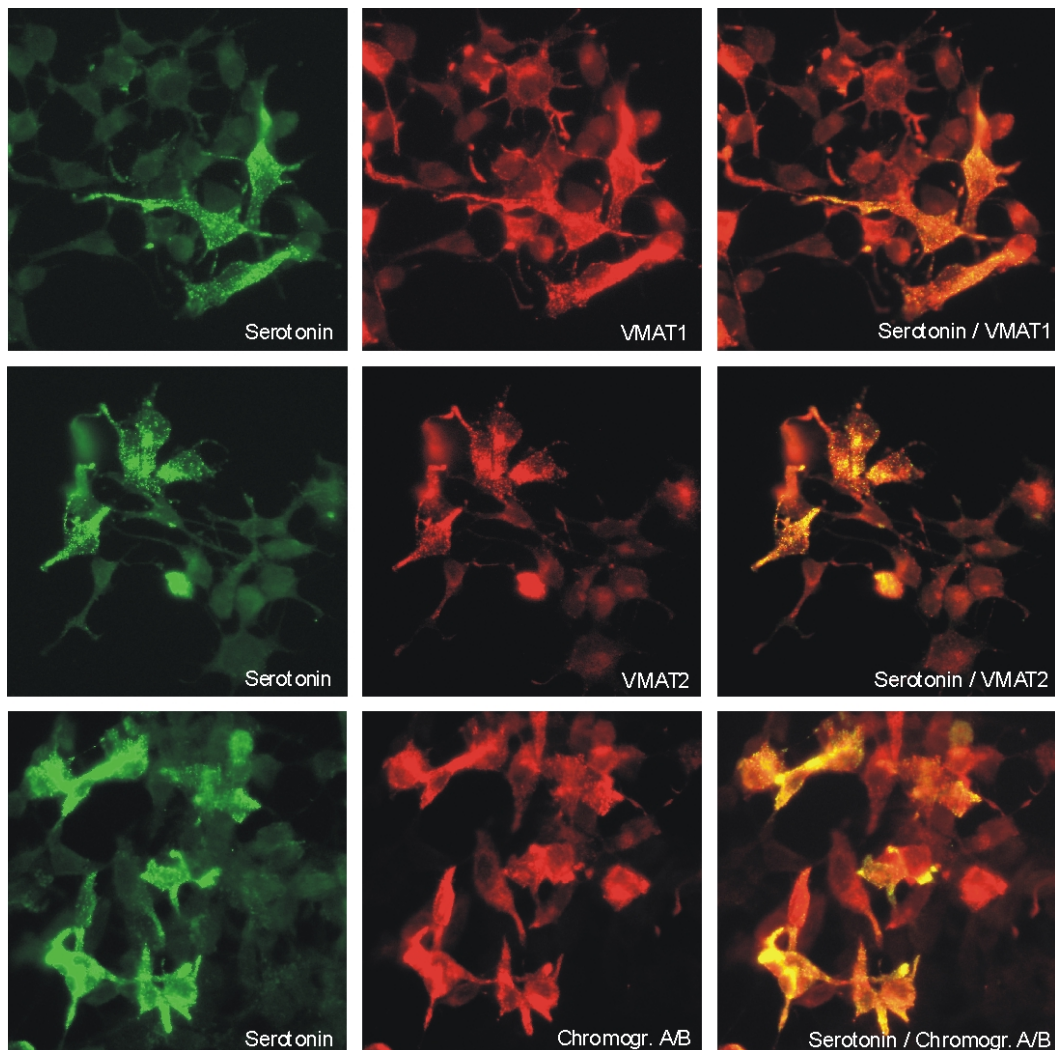


**Abbildung 16**

**In BON Zellen kommen VMAT1 und VMAT2 bevorzugt auf elektronendichten, großen Vesikeln (LDCVs) vor**

Aus einem Homogenat von BON Zellen wurde ein postnukleärer Überstand hergestellt und auf einen kontinuierlichen Saccharose-Gradienten (0,35-2M) aufgetragen. Über eine Dichtegradienten-Zentrifugation erfolgte die subzelluläre Fraktionierung der Membranen. Die Immunoreplika-Analyse dokumentiert die Lokalisation von VMAT1 und VMAT2 in den schweren Fraktionen. Die parallele Analyse der Membranfraktionen mit Antikörpern gegen Cytochrom b561 belegt, daß sich VMAT1 und VMAT2 hauptsächlich auf Membranen von LDCVs befinden. Eine partielle Überschneidung der beiden Transporter mit Synaptophysin, einem Markerprotein für SSVs und deren Analoga in neuroendokrinen Zellen, war ebenfalls vorhanden, jedoch geringer als bei PC12 Zellen. Ausschließlich in den schweren Fraktionen fand sich Gα<sub>o1</sub>, während Gα<sub>o2</sub> über den gesamten Gradienten verteilt, hauptsächlich jedoch ebenfalls mit den LDCV-Fractionen assoziiert war. Synaptobrevin fand sich sowohl in den schweren als auch den leichten Fraktionen des Gradienten.

Die Verteilung von VMAT1, VMAT2 und Serotonin in BON Zellen wurde zusätzlich immunzytochemisch untersucht (**Abbildung 17**). Eine Immunreaktivität für Serotonin ließ sich in 40-50 % aller Zellen nachweisen. In der Doppelimmunfluoreszenz wurde dabei die Colokalisation mit VMAT1 und VMAT2 deutlich. VMAT1 wurde in nahezu allen Zellen exprimiert, während VMAT2 nur in etwa 50 % der Zellen nachgewiesen werden konnte. Die Analyse der Verteilung von Chromogranin (der Antikörper war gegen die Subtypen A und B gerichtet), als Markerprotein für LDCVs, und Serotonin demonstrierte eine weitgehende Colokalisation in den Zellen. In wenigen Zellen ließ sich eine Immunreaktivität für Chromogranin, nicht jedoch für Serotonin nachweisen.



*Abbildung 17*

**Serotonin colokalisiert in BON Zellen mit VMAT1, VMAT2 und Chromogranin**

BON Zellen wurden gewaschen, mit Paraformaldehyd fixiert und mit einem anti-Serotonin Antikörper aus dem Huhn, sowie Antiseren aus dem Kaninchen gegen VMAT1, VMAT2 oder Chromogranin A/B inkubiert. Als sekundäre Antikörper dienten Oregon Green-markiertes anti-Huhn IgG sowie Texas Red-markiertes anti-Kaninchen IgG. Die Aufnahmen der linken Spalte zeigen die Serotonin-Immunreaktivität in 40-50 % der BON Zellen. In der Doppelimmunfluoreszenz wird die fast vollständige Colokalisation des Serotonins mit VMAT1 (obere Reihe), VMAT2 (mittlere Reihe) und Chromogranin A/B als Markerprotein für LDCVs (untere Reihe) deutlich. Der Maßstab beträgt 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.5 Funktionelle Differenzierung zwischen der Aktivität von VMAT1 und VMAT2 in BON Zellen

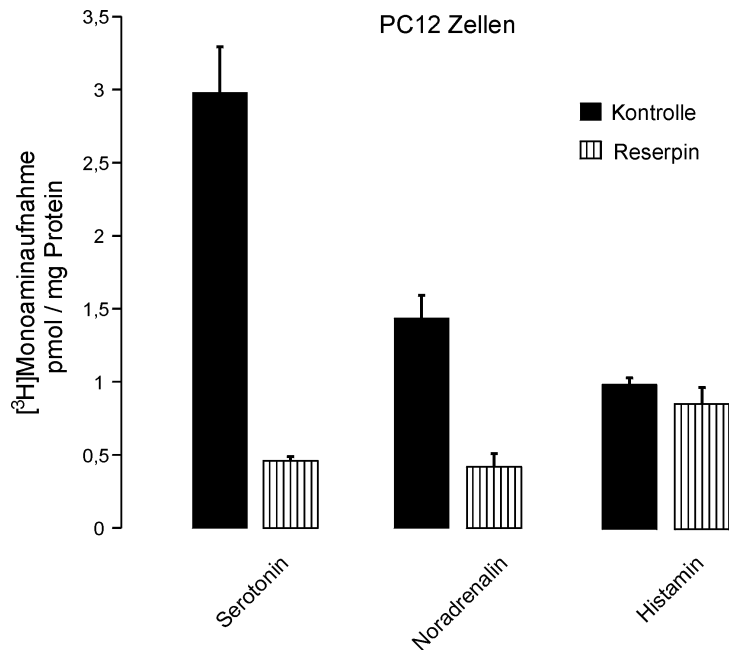
Um die Frage zu klären, ob der beobachteten Hemmung der vesikulären Serotinaufnahme durch  $G\alpha_{o2}$  (siehe 3.2.4) eine Regulation von VMAT1, VMAT2 oder von beiden Transportern zugrunde liegt, mußte funktionell zwischen der Aktivität

von VMAT1 und VMAT2 unterschieden werden.

VMAT2 wird durch Tetrabenazin (TBZ) wesentlich effektiver gehemmt als VMAT1. Besonders ausgeprägt ist dieser Unterschied zwischen den beiden humanen Varianten des Transporters: Hier hemmt TBZ den Serotonin Transport durch VMAT2 mit einem  $K_i$ -Wert von  $\sim 100$  nM (Serotonin Konzentration 90 nM), während eine TBZ Konzentration von 20  $\mu$ M keinen Effekt auf die Aktivität von VMAT1 hat (Erickson et al., 1996). Im Gegensatz zu den geringen Unterschieden in der Substrataffinität von VMAT1 und VMAT2 gegenüber Serotonin und den Katecholaminen (siehe Einleitung) weist VMAT2 eine etwa 30-fach höhere Affinität für Histamin als VMAT1 auf (Erickson et al., 1996).

Die beschriebenen Unterschiede bezüglich der Pharmakologie und des Substratspektrums boten Ansatzpunkte für die experimentelle Differenzierung zwischen der Aktivität von VMAT1 und VMAT2.

Zunächst wurde die Monoaminaufnahme in permeabilisierte PC12 Zellen, die nur endogenes VMAT1 exprimieren, anhand der Substrate Serotonin, Noradrenalin oder Histamin gemessen. Es zeigte sich, daß lediglich Serotonin und Noradrenalin spezifisch in die Vesikel aufgenommen wurden (**Abbildung 18**). Die Aufnahme von Histamin konnte durch die Zugabe von Reserpin nicht signifikant blockiert werden, und mußte daher als unspezifisch betrachtet werden. Das belegt, daß Histamin in der angebotenen Konzentration von 200 nM nicht als Substrat für VMAT1 dient.



**Abbildung 18**

**Permeabilisierte PC12 Zellen nehmen nur [<sup>3</sup>H]Serotonin und [<sup>3</sup>H]Noradrenalin, nicht aber [<sup>3</sup>H]Histamin spezifisch auf.**

Die Monoaminaufnahme in permeabilisierte PC12 Zellen wurde anhand der drei Substrate [<sup>3</sup>H]Serotonin (90 nM), [<sup>3</sup>H]Noradrenalin (90 nM) und [<sup>3</sup>H]Histamin (200 nM) gemessen. Die unspezifische Aufnahme in Gegenwart von Reserpin zeigt, daß nur Serotonin und Noradrenalin in die Vesikel der Zellen aufgenommen wurden. Die höchste spezifische Aufnahme von 2,5 pmol / mg Protein wurde mit [<sup>3</sup>H]Serotonin erzielt, [<sup>3</sup>H]Noradrenalin wurde mit 1 pmol / mg Protein aufgenommen. Die [<sup>3</sup>H]Histaminaufnahme von 1 pmol / mg Protein konnte mit Reserpin nicht signifikant blockiert werden und ist daher unspezifisch.

Um die spezifische Wirkung von TBZ auf die Aktivität von VMAT2 nachzuweisen, wurde die Serotoninaufnahme in permeabilisierte BON und PC12 Zellen gemessen. In BON Zellen konnte die Reserpin-sensitive Aufnahme von 2,6 pmol / mg Protein durch TBZ um 30 % auf 1,7 pmol / mg Protein gehemmt werden (**Abbildung 19**). Unter denselben experimentellen Bedingungen konnte in PC 12 Zellen die durch VMAT1 vermittelte Reserpin-sensitive Serotoninaufnahme von 4,7 pmol / mg Protein nicht durch TBZ blockiert werden.

Um die Aktivität von VMAT1 und VMAT2 experimentell getrennt darstellen zu können, wurde an permeabilisierten BON Zellen zum einen die Serotoninaufnahme in Gegenwart einer hohen Histamin-Konzentration (2 mM, nicht radioaktiv markiert), zum anderen die Aufnahme von Histamin (200 nM, Tritium-markiert) gemessen. Unter der zuerst genannten Bedingung konnte davon ausgegangen werden, daß die

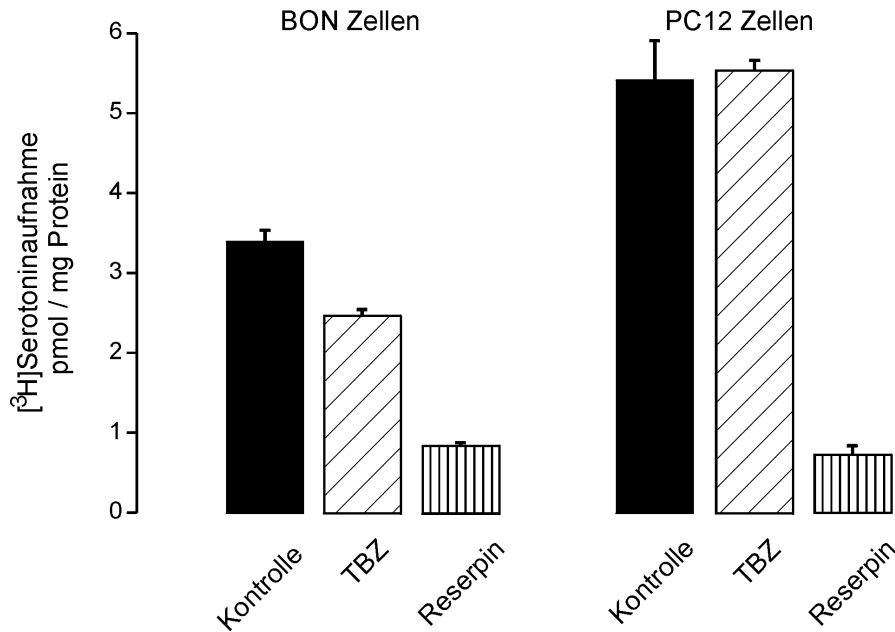


Abbildung 19

**Tetrabenazin ( TBZ ) hemmt die [<sup>3</sup>H]Serotoninaufnahme in permeabilisierte BON Zellen**

In permeabilisierten BON Zellen konnte die Reserpin-sensitive [<sup>3</sup>H]Serotoninaufnahme durch die Zugabe von TBZ (Endkonzentration 1  $\mu$ M) zum Teil blockiert werden. Wurden dieselben experimentellen Bedingungen auf permeabilisierte PC12 Zellen übertragen, zeigte sich, daß die Reserpin-sensitive [<sup>3</sup>H]Serotoninaufnahme nicht durch Zugabe von TBZ blockiert werden konnte.

hohe Histamin-Konzentration zu einer kompetitiven Verdrängung des Serotonins aus der Bindung mit VMAT2 führt und somit die gemessene Serotoninaufnahme nur die Aktivität von VMAT1 darstellt. Unter der zweiten experimentellen Bedingung sollte sich, wie bereits in Abbildung 18 demonstriert, nur die Aktivität von VMAT2 messen lassen, da Histamin in der geringen Konzentration von 200 nM nicht als Substrat für VMAT1 dient.

Die experimentellen Befunde bestätigten diese Annahmen: Die Reserpin-sensitive Serotoninaufnahme von 2,5 pmol / mg Protein konnte in Gegenwart von 2 mM Histamin nicht mehr durch TBZ gehemmt werden (**Abbildung 20A**) und charakterisierte die gemessene Aufnahme als VMAT1 Aktivität. Im Gegensatz dazu konnte die Reserpin-sensitive Histaminaufnahme von 0,4 pmol / mg Protein durch TBZ fast vollständig blockiert werden (**Abbildung 20B**), was die gemessene Aufnahme als VMAT2 Aktivität charakterisierte.

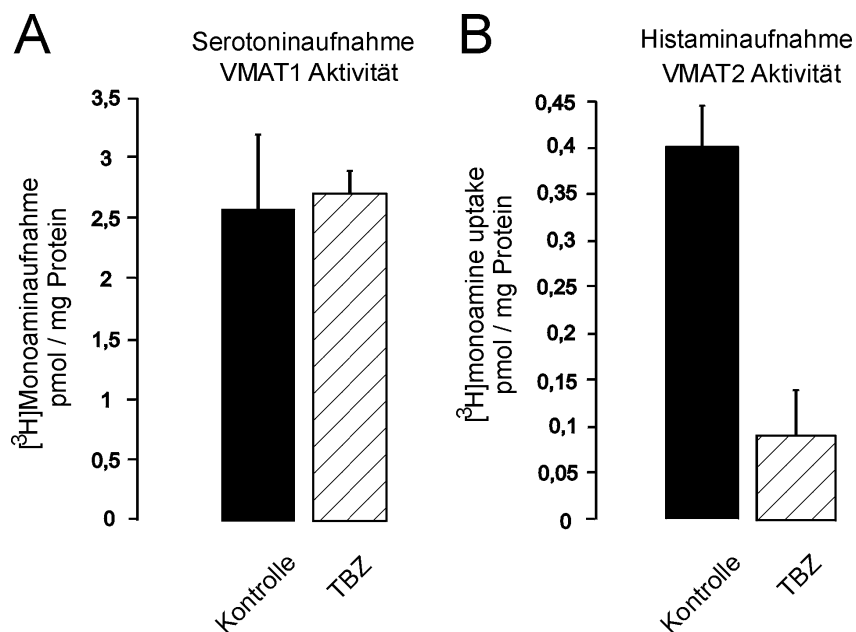


Abbildung 20

**In permeabilisierten BON Zellen kann funktionell zwischen der Monoaminaufnahme durch VMAT1 und VMAT2 differenziert werden.**

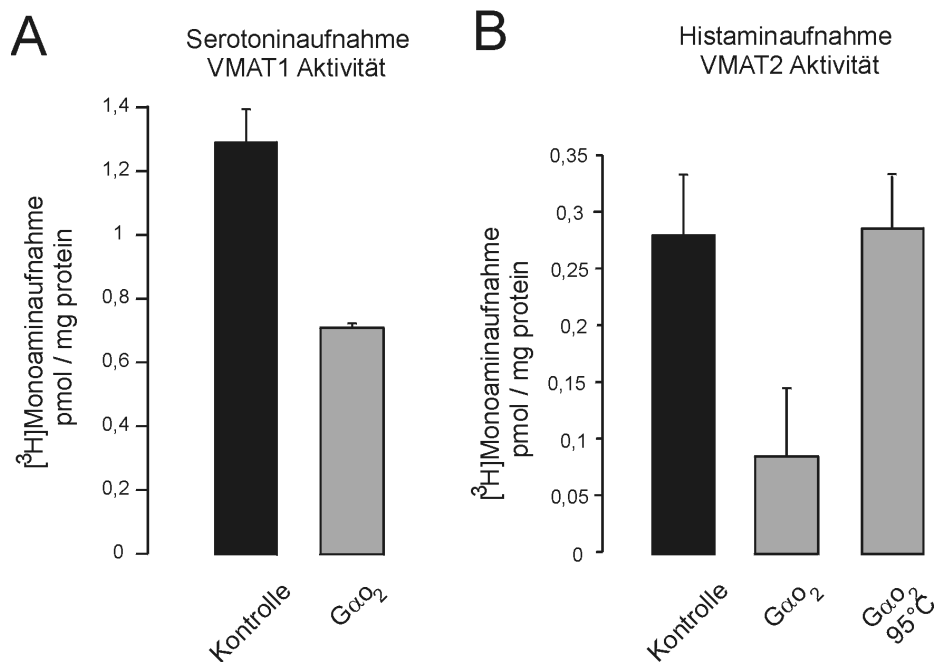
**A:** Die [<sup>3</sup>H]Serotoninaufnahme in permeabilisierte BON Zellen wurde in Gegenwart von Histamin (2 mM) als Substrat für den VMAT2 durchgeführt. Es zeigte sich, daß unter diesen Bedingungen eine Reserpin-sensitive Aufnahme stattfand, die jedoch nicht mehr durch TBZ blockierbar war. **B:** Wurde ausschließlich [<sup>3</sup>H]Histamin als Substrat angeboten, konnte die Reserpin-sensitive Aufnahme durch TBZ zu 80 % blockiert werden. Die unspezifische Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Serotonin in Gegenwart von Reserpin betrug  $2,2 \pm 1,3$  pmol / mg Protein, die unspezifische Aufnahme [<sup>3</sup>H]Histamin  $1,23 \pm 0,006$  pmol / mg Protein.

### 3.6 Unterschiedliche Empfindlichkeit der Aktivität von VMAT1 und VMAT2 gegenüber der Regulation durch $G\alpha_o_2$

Unter den beiden vorgestellten experimentellen Bedingungen konnte jetzt selektiv der Effekt von  $G\alpha_o_2$  auf die Aktivität von VMAT1 und VMAT2 untersucht werden.

Zunächst wurde der Effekt auf die Aktivität von VMAT1 untersucht: Die Reserpin-sensitive Serotoninaufnahme (in Gegenwart von 2 mM Histamin) von  $1,3$  pmol / mg Protein wurde durch die Zugabe von  $G\alpha_o_2$  um ca. 45 % auf  $0,7$  pmol / mg Protein gehemmt (**Abbildung 21A**). Um den Effekt von  $G\alpha_o_2$  auf die Aktivität von VMAT2 darzustellen, wurde die vesikuläre Histaminaufnahme gemessen: Die Reserpin-sensitive Histaminaufnahme von  $0,27$  pmol / mg Protein wurde durch die Zugabe von  $G\alpha_o_2$  um 70 % auf  $0,08$  pmol / mg Protein gehemmt (**Abbildung 21B**). Die Hitzedenaturierung von  $G\alpha_o_2$  hob diese Hemmung vollständig auf.





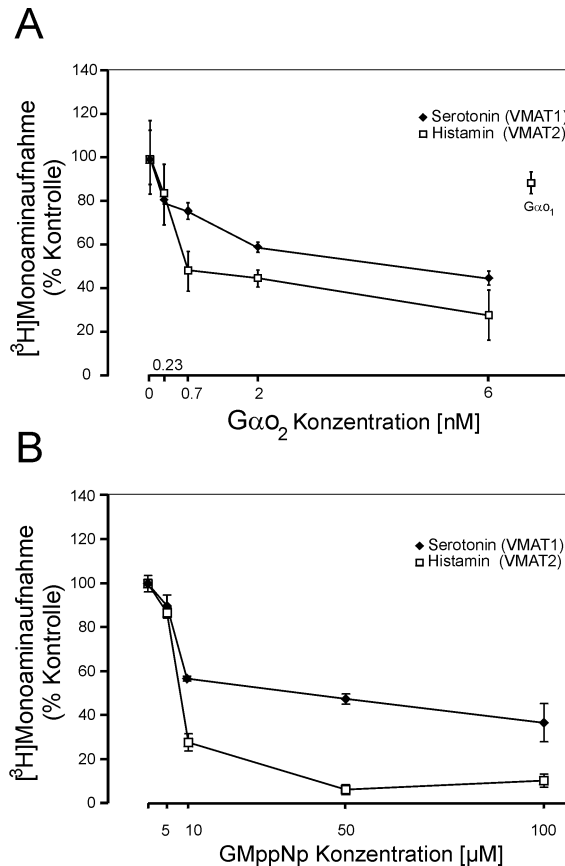
**Abbildung 21**

**Die Aktivität von VMAT1 und VMAT2 in permeabilisierten BON Zellen wird durch GαO<sub>2</sub> gehemmt**

Die [<sup>3</sup>H]Serotoninaufnahme wurde in Gegenwart von 2 mM Histamin (VMAT1 Aktivität) durchgeführt. **A:** Die Zugabe von gereinigtem GαO<sub>2</sub> (10 nM) führte zu einer Hemmung der Reserpin-sensitiven Aufnahme auf 55 % des Kontrollniveaus. **B:** Wurde [<sup>3</sup>H]Histamin (200 nM, VMAT2 Aktivität) als Substrat benutzt, führte die Zugabe von GαO<sub>2</sub> zu einer Hemmung der Reserpin-sensitiven Aufnahme auf etwa 30 % des Kontrollniveaus. Die Hitzedenaturierung des GαO<sub>2</sub> bewirkte eine vollständige Aufhebung dieses Effekts. Die unspezifische Monoaminaufnahme in Gegenwart von Reserpin betrug 0,42±0,035 pmol / mg Protein unter der VMAT1 Bedingung sowie 0,33±0,001 pmol / mg Protein unter der VMAT2 Bedingung.

Um die beobachtete unterschiedliche Empfindlichkeit von VMAT1 und VMAT2 gegenüber der Regulation durch GαO<sub>2</sub> genauer darzustellen, wurden permeabilisierte BON Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an GαO<sub>2</sub> und GMppNp inkubiert. Die Zugabe von steigenden Konzentrationen an GαO<sub>2</sub> (0,23-6 nM) führte zu einer dosisabhängigen Hemmung beider Transporteraktivitäten (**Abbildung 22A**). Im Bereich zwischen 0,7 und 6 nM wurde die VMAT2 Aktivität (Histaminaufnahme) stärker gehemmt als die VMAT1 Aktivität (Serotoninaufnahme). So führte GαO<sub>2</sub> in einer Konzentration von 0,7 nM bereits zu einer Hemmung der VMAT2 Aktivität um 50 %, während die Aktivität von VMAT1 erst bei einer GαO<sub>2</sub> Konzentration von 6 nM um 50 % gehemmt wurde. Die Zugabe von steigenden Konzentrationen an GMppNp (5-100 μM) führte ebenfalls zu einer dosisabhängigen Hemmung der beiden Transporteraktivitäten (**Abbildung 22B**). Beide Transporteraktivitäten wurden über

den gesamten Konzentrationsbereich durch GMppNp gehemmt. Auch hier zeigte sich eine höhere Empfindlichkeit von VMAT2 gegenüber der Regulation durch G-Proteine.



**Abbildung 22**

**In permeabilisierten BON Zellen ist VMAT2 empfindlicher gegenüber einer Hemmung durch Gα<sub>o2</sub> oder GMppNp**

**A:** Die Zugabe von steigenden Konzentrationen an Gα<sub>o2</sub> führte in permeabilisierten BON Zellen zu einer dosisabhängigen Hemmung der [<sup>3</sup>H]Monoaminaufnahme. Beide Transporteraktivitäten wurden in Konzentrationen zwischen 0,2 und 6 nM der G-Protein Untereinheit gehemmt. Im Bereich zwischen 0,7 und 6 nM wurde die [<sup>3</sup>H]Histaminaufnahme stärker gehemmt als die [<sup>3</sup>H]Serotoninaufnahme. Die unspezifische Monoaminaufnahme in Gegenwart von Reserpin betrug  $1,86 \pm 0,2$  pmol / mg Protein unter der VMAT1 Bedingung sowie  $0,33 \pm 0,03$  pmol / mg Protein unter der VMAT2 Bedingung.

**B:** Die Zugabe von steigenden Konzentrationen an GMppNp führte in permeabilisierten BON Zellen zu einer dosisabhängigen Hemmung der [<sup>3</sup>H]Monoaminaufnahme. Beide Transporteraktivitäten wurden in Konzentrationen zwischen 5 und 100 µM des GTP-Analogons gehemmt. Dabei war die Hemmung der [<sup>3</sup>H]Histaminaufnahme in Konzentrationen zwischen 10 und 100 µM sehr viel stärker ausgeprägt, als die Hemmung der [<sup>3</sup>H]Serotoninaufnahme. Die unspezifische Monoaminaufnahme in Gegenwart von Reserpin betrug  $1,03 \pm 0,2$  pmol / mg Protein unter der VMAT1 Bedingung sowie  $0,53 \pm 0,01$  pmol / mg Protein unter der VMAT2 Bedingung.

So führte GMppNp in einer Konzentration von 50 µM bereits zu einer Hemmung der VMAT2 Aktivität um ca. 90 %, während die Aktivität von VMAT1 bei einer GMppNp

Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  lediglich um 60 % gehemmt wurde.

### 3.7 Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme in Neuronen

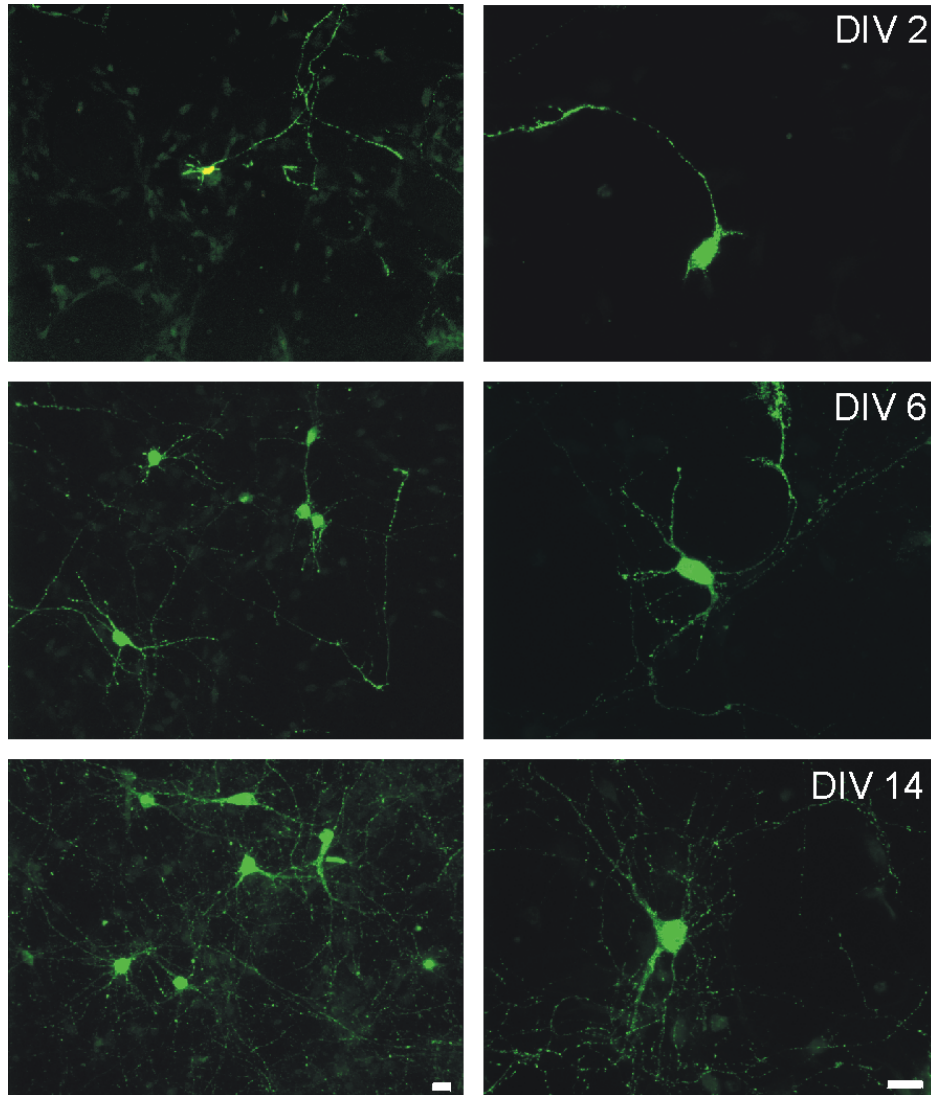
Die in den Abschnitten 3.2 bis 3.6 vorgestellten Ergebnisse dokumentieren eine Regulation (Hemmung) der vesikulären Monoaminaufnahme in der neuro-endokrinen Zelllinie BON, die sich vorwiegend auf die Speicherung von Monoaminen in LDCVs beschränkt. Weitere Experimente sollten klären, ob die vesikuläre Transmitterspeicherung in monoaminergen Neuronen ebenfalls einer solchen Regulation, möglicherweise auf der Ebene der SSVs, unterliegt.

#### 3.7.1 Primärkulturen der Raphe als Modell zur Untersuchung der Speicherung von monoaminergen Transmittern

Die o.a. Fragestellung wurde an Primärkulturen der Raphe aus der Ratte untersucht. Die serotonergen Neurone der Raphekerne innervieren im adulten Gehirn das Vorderhirn, Cerebellum und Rückenmark. Sie beeinflussen komplexe physiologische Funktionen wie Schlaf, Appetit und Verhalten (siehe Diskussion). Neben den serotonergen Neuronen befinden sich in den Raphekernen auch noch dopaminerge Neurone als weitere monoaminerge Zellpopulationen.

Die Präparation von drei unterschiedlichen Regionen der embryonalen Raphe (siehe Material und Methoden) sollte Aufschluß über regionale Unterschiede bezüglich des Gehalts an serotonergen Neuronen geben, um so Primärkulturen mit einem möglichst hohen Anteil an serotonergen Neuronen zu erhalten. Die Raphekulturen wurden dafür zu unterschiedlichen Kulturzeitpunkten immunzytochemisch analysiert. Ein serotonerger Phänotyp war bereits am Kulturtag 2 in einzelnen Neuronen der Regionen R1 (**Abbildung 23**) und R2 ausgebildet. Das Verzweigungsmuster dieser Neurone war zu diesem frühen Zeitpunkt in der Kultur noch wenig entwickelt. Innerhalb eines Zeitraums von 14 Tagen stieg die Anzahl der serotonergen Neurone an. Ebenso wurde die Morphologie der Zellen durch ein vermehrtes Aussprossen der neuronalen Fortsätze deutlich komplexer. Die quantitative Analyse (**Abbildung 24**) belegt, daß sich die Anzahl der serotonergen Neurone, bezogen auf die Gesamtzellzahl, in den Regionen R1 und R2 innerhalb von 14 Tagen etwa verdoppelte, sie lag dann bei 2,23 % (R1) bzw. 1,22 % (R2). In der am weitesten

caudal gelegenen Region R3 waren am Kulturtag 2 noch keine serotonergen Neurone zu identifizieren, nach 14 Tagen betrug der Anteil 0,96 %.



**Abbildung 23**

**Entwicklung serotonerger Neurone in Primärkultur aus der Raphe**

Rapheneurone aus der Region R1 wurden am Embryonaltag 13 (E13) präpariert und über die angegebenen Tage in Kultur genommen. Die immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der serotonergen Neurone erfolgte über ein polyklonales anti-Serotonin Antiserum, der sekundäre Antikörper war an den Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green gekoppelt. Bereits am zweiten Kulturtag (DIV: 'days in vitro') war in wenigen Zellen eine positive Immunreaktivität sichtbar. Die Aufnahmen auf der linken Seite lassen eine deutliche Zunahme der Anzahl der serotonergen Neurone über den Zeitraum von 14 Tagen erkennen. Die bei stärkerer Vergrößerung aufgenommenen Bilder der rechten Seite verdeutlichen, daß auch das Verzweigungsmuster dieser Neurone über den beobachteten Zeitraum intensiver wurde. Der Maßstab beträgt jeweils 10 µm.

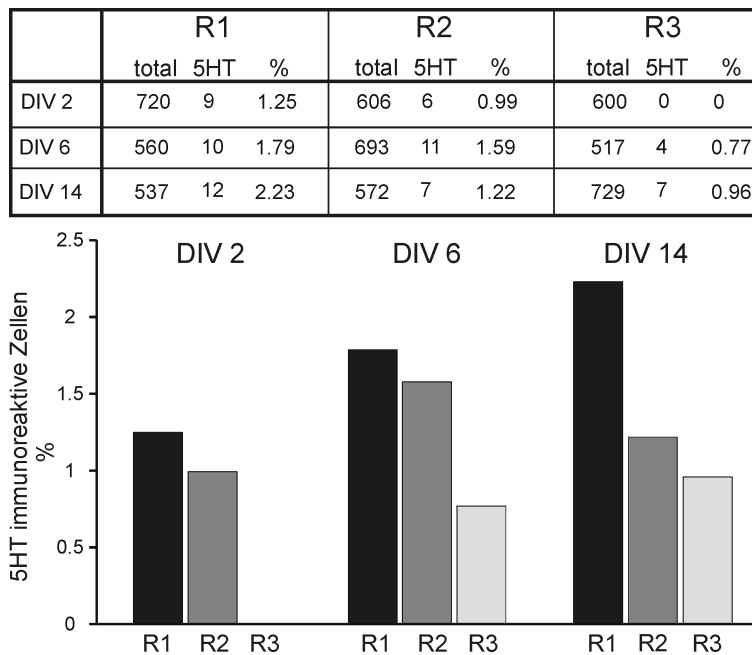


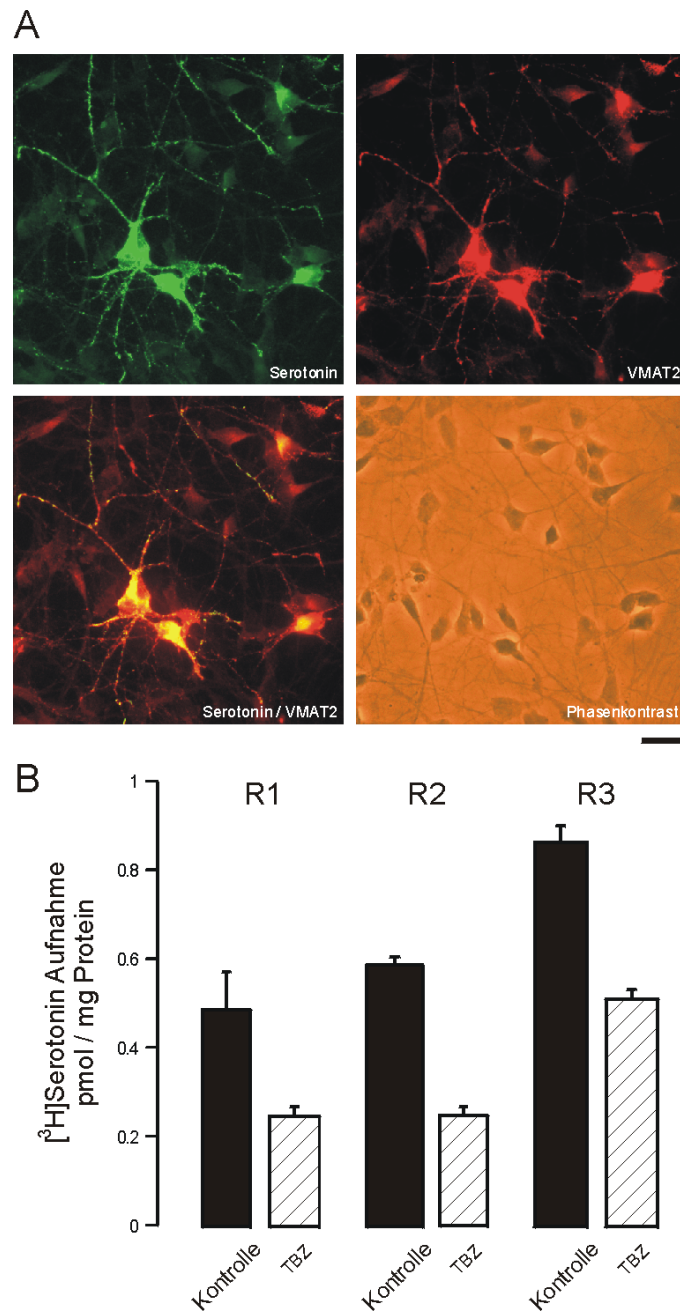
Abbildung 24

**Quantitative Analyse der Anzahl serotonerger Neurone in Primärkulturen aus drei unterschiedlichen Regionen (R1-R3) der embryonalen Raphe**

Die Neurone wurden am Tag E13 präpariert und für die angegebenen Tage in Kultur genommen. Der Anteil der serotonerger Neurone ist in Prozent der Gesamtzellzahl angegeben.

### 3.7.2 Funktionelle Charakterisierung monoaminerger Neurone in Primärkultur der Raphe

Zunächst wurde untersucht, ob die verwendeten Raphekulturen ein geeignetes Modell für die vesikuläre Monoaminaufnahme in Neuronen darstellten. Hierfür wurde die Expression von VMAT2 in den kultivierten Neuronen immunzytochemisch überprüft. Experimente zur vesikulären Serotoninspeicherung und Sekretion an nicht permeabilisierten Zellen dienten der funktionellen Charakterisierung der Neurone. Die immunzytochemische Analyse der Raphekulturen machte deutlich, daß Serotonin mit VMAT2 kolokalisierte (**Abbildung 25A**, dargestellt ist eine Mischkultur aus allen drei Regionen am Kulturtag 2, präpariert am Tag E 14). Einige nicht serotonerge Neurone waren immunpositiv für VMAT2, was sie ebenfalls als monoaminerger Neurone, vermutlich dopaminerge, auswies (s.o.). In Kulturen aus allen drei Regionen der Raphe (präpariert am Tag E 14) ließ sich bereits am Tag 2 der Kultur eine Serotoninaufnahme messen, die durch TBZ um 40-50 % gehemmt werden konnte (**Abbildung 25B**). Diese vesikuläre Aufnahme betrug in den drei Regionen 0,2-0,4 pmol / mg Protein.



**Abbildung 25**

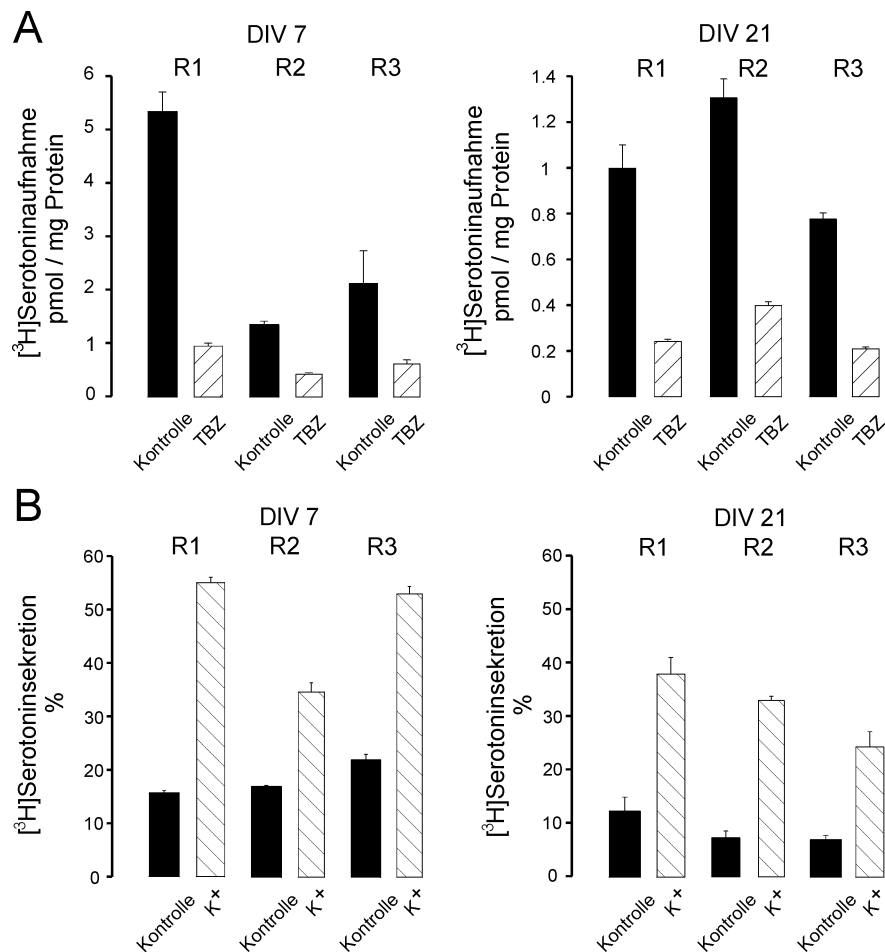
**Serotonerge Rapheneurone in Primärkultur exprimieren funktionelles VMAT2**

**A:** Die Doppelimmunfluoreszenz zeigt die Colokalisation von Serotonin (sekundärer Antikörper Oregon Green-markiert) und VMAT2 (sekundärer Antikörper Texas Red-markiert) in einzelnen Neuronen aus dem Gebiet R2 nach zwei Tagen (DIV 2) in Kultur. Der Maßstab beträgt 10  $\mu\text{m}$ .

**B:** Rapheneurone wurden am Tag E14 präpariert, in Kultur genommen und nach zwei Tagen mit [ $^3\text{H}$ ]Serotonin (4 Stunden, 40 nM) inkubiert. In den Regionen R1, R2 und R3 war eine [ $^3\text{H}$ ]Serotoninaufnahme meßbar, die in allen drei Fällen durch die Zugabe von TBZ (10  $\mu\text{M}$ ) zu 40-50 % blockiert werden konnte.

Um die Fähigkeit der Neurone zur Serotoninspeicherung und Sekretion auch nach längeren Kultivierungszeiten zu überprüfen, wurden Aufnahme- und Sekretions-

experimente an Tag 7 und Tag 21 der Kultur durchgeführt (**Abbildung 26**).



**Abbildung 26**

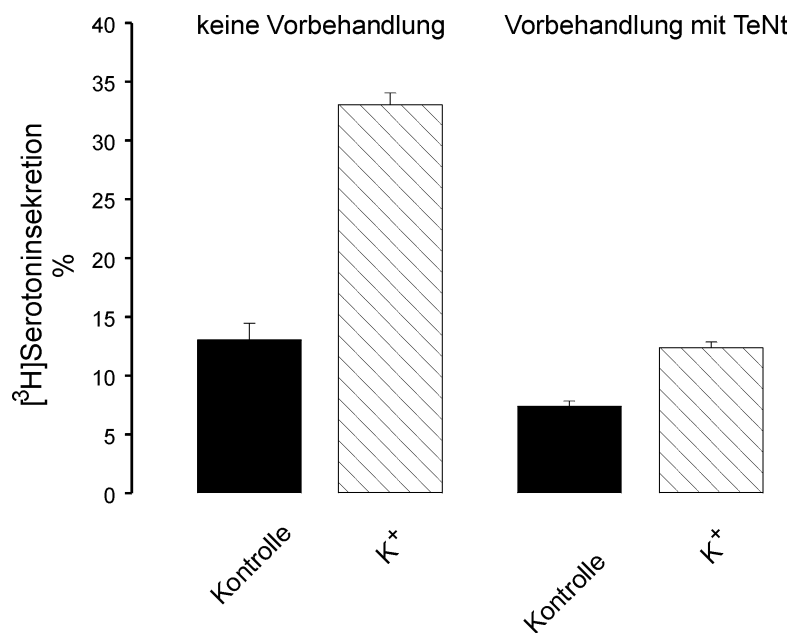
**Funktionelle Charakteristika der [<sup>3</sup>H]Serotoninaufnahme und -sekretion von Rapheneuronen in Primärkultur.**

**A:** Rapheneurone aus den drei Regionen R1, R2 und R3 wurden am Tag E14 präpariert und bis zu 21 Tage in Kultur genommen. Jeweils am 7. und am 21. Kulturtag wurden die Neurone mit [<sup>3</sup>H]Serotonin (4 Stunden, 40 nM) inkubiert und die vesikuläre Aufnahme gemessen. In allen drei Regionen war zu beiden untersuchten Zeitpunkten eine TBZ-sensitive (10 µM) Aufnahme zu messen. **B:** Parallel zu den Aufnahmemessungen wurde ebenfalls die Kalium-stimulierte Sekretion des zuvor aufgenommenen [<sup>3</sup>H]Serotonins gemessen. In allen drei Regionen konnte zu beiden Zeitpunkten eine Steigerung der Sekretion auf das 2 bis 3-fache der basalen Werte durch die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration auf 50 mM (5 min) erzielt werden.

In allen drei Regionen konnte zu beiden untersuchten Zeitpunkten eine vesikuläre (TBZ-sensitive) Aufnahme gemessen werden (**Abbildung 26A**). Die höchste Serotoninaufnahme wurde am Tag 7 in der Region R1 mit etwa 4,2 pmol / mg Protein gemessen, gegenüber einer Aufnahme von 0,8 bzw. 1,5 pmol / mg Protein für die Regionen R2 und R3. Dieser deutliche Unterschied ließ sich nach 21 Kulturtagen

nicht mehr darstellen, die Werte für die vesikuläre Aufnahme lagen hier zwischen 0,6 und 1,5 pmol / mg Protein. Die parallel zu den Aufnahmemessungen durchgeführten Experimente zur Sekretion (**Abbildung 26B**) ergaben, daß sich in den Kulturen aus allen drei Bereichen zu beiden Zeitpunkten eine Freisetzung von Serotonin messen ließ, die durch eine Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration auf 50 mM auf das 2 bis 3-fache (maximal 55 % des aufgenommenen Serotonins in Region R1 am Tag 7) der basalen Werte gesteigert werden konnte.

Wie erwartet, blockierte die Vorinkubation einer Mischkultur aus allen drei Regionen mit Tetanus Toxin (**Abbildung 27**) die Kalium-stimulierte Sekretion fast vollständig, die basale Sekretion wurde ebenfalls teilweise gehemmt.



**Abbildung 27**

**Die Vorinkubation von Rapheneuronen in Primärkultur mit TeNt blockiert die Kalium-stimulierte Sekretion von [<sup>3</sup>H]Serotonin**

Rapheneurone wurden am Tag E14 präpariert und für 14 Tage in Kultur genommen. Ein Teil der Neurone wurde vor der Messung für 48 Stunden mit TeNt (10 nM) inkubiert.

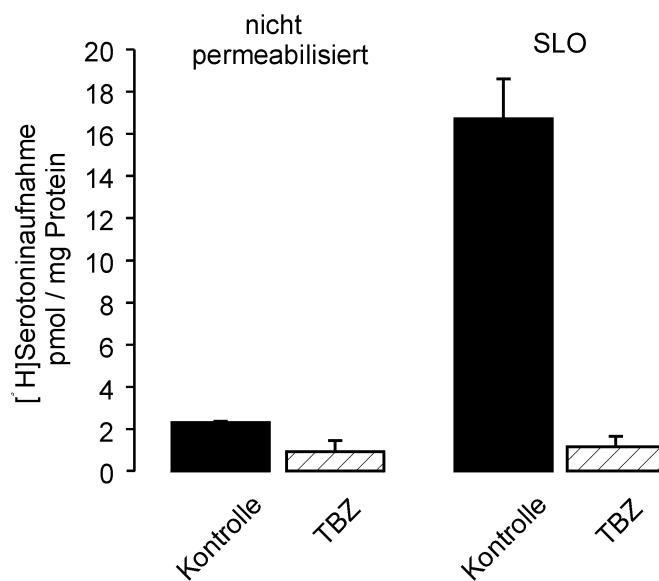
Nach der Inkubation der Zellen mit [<sup>3</sup>H]Serotonin erfolgte die Kalium-Stimulation. Deutlich wird, daß in den Toxin-behandelten Zellen die stimulierte Sekretion sehr stark reduziert war. Die basale Sekretion wurde ebenfalls mäßig gehemmt.

### 3.7.3 Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme in permeabilisierte Rapheneurone durch Gα<sub>o2</sub>.

Die Permeabilisierung von Neuronen ist experimentell wenig etabliert. Um die Frage



zu klären, ob die vesikuläre Monoaminaufnahme durch VMAT2 ein Transportprozeß ist, der auch in Neuronen einer Regulation durch heterotrimere G-Proteine unterliegt, wurde die an den neuroendokrinen Zelllinien PC12 und BON verwendete Permeabilisierungstechnik auf die Primärkulturen der Raphe übertragen. Dieser methodische Ansatz sollte, in Analogie zu den Experimenten an BON Zellen, über die Inkubation mit GTP-Analoga und gereinigten G-Protein Untereinheiten auch in Neuronen einen Zugang zur Untersuchung der Transporterregulation durch G-Proteine liefern. In den verwendeten Raphekulturen konnte nach Permeabilisierung mit SLO eine Aufnahme von Serotonin gemessen werden, die durch TBZ fast vollständig blockiert werden konnte. Sie übertraf mit 15 pmol / mg Protein die Aufnahme in nicht permeabilisierte Neurone um das 15-fache (**Abbildung 28**).



**Abbildung 28**

**Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Serotonin nach Permeabilisierung von Rapheneuronen mit SLO**

Rapheneurone in Primärkultur wurden mit PBS gewaschen und für 2 min mit 100 HE / ml SLO auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 min mit [<sup>3</sup>H]Serotonin inkubiert. In permeabilisierten Neuronen konnte eine deutlich höhere vesikuläre (TBZ-sensitive) Aufnahme als in nicht permeabilisierten Neuronen nachgewiesen werden.

Permeabilisierte Rapheneurone konnten nun mit den GTP-Analoga GTP $\gamma$ S und GMppNp inkubiert werden. Die Zugabe von GTP $\gamma$ S oder GMppNp zum Inkubationsansatz führte in den permeabilisierten Neuronen (**Abbildung 29A**) zu

einer Hemmung der Reserpin-sensitiven Serotoninaufnahme von 5,5 pmol / mg Protein um 35 % (GTP $\gamma$ S) bzw. 40 % (GMppNp). Die Vorbehandlung der Zellen mit Pertussis Toxin verhinderte die Hemmung der vesikulären Aufnahme von 3,7 pmol / mg Protein durch GTP $\gamma$ S und GMppNp vollständig. Eine Vorbehandlung der Zellen mit Tetanus Neurotoxin (**Abbildung 29B**) hatte dagegen keinen Effekt auf die Hemmung der Serotoninaufnahme durch die beiden GTP-Analoga und bestätigte eine spezifische Wirkung von GTP $\gamma$ S und GMppNp auf die vesikuläre Aufnahme.

Die Toxin-Experimente belegen, daß die Aktivität von VMAT2 auch in monoaminergen Neuronen einer Hemmung durch ein G-Protein der  $G_{i/o}$ -Klasse unterliegt (siehe auch Abschnitt 3.2.3 und 3.2.5). In einem folgenden Experiment wurde die Wirkung von  $G\alpha_{o2}$  auf die Monoaminaufnahme in permeabilisierte Rapheneurone untersucht (**Abbildung 30**). Gereinigtes  $G\alpha_{o2}$  führte zu einer Hemmung der vesikulären Noradrenalinaufnahme von 7,8 pmol / mg Protein um 35 %. Die parallel durchgeführte Inkubation mit GMppNp hatte den gleichen Effekt.

Die in Abschnitt 3.7 vorgestellten Ergebnisse dokumentieren eine Hemmung der Aktivität von VMAT2 durch  $G\alpha_{o2}$  auch in monoaminergen Rapheneuronen.

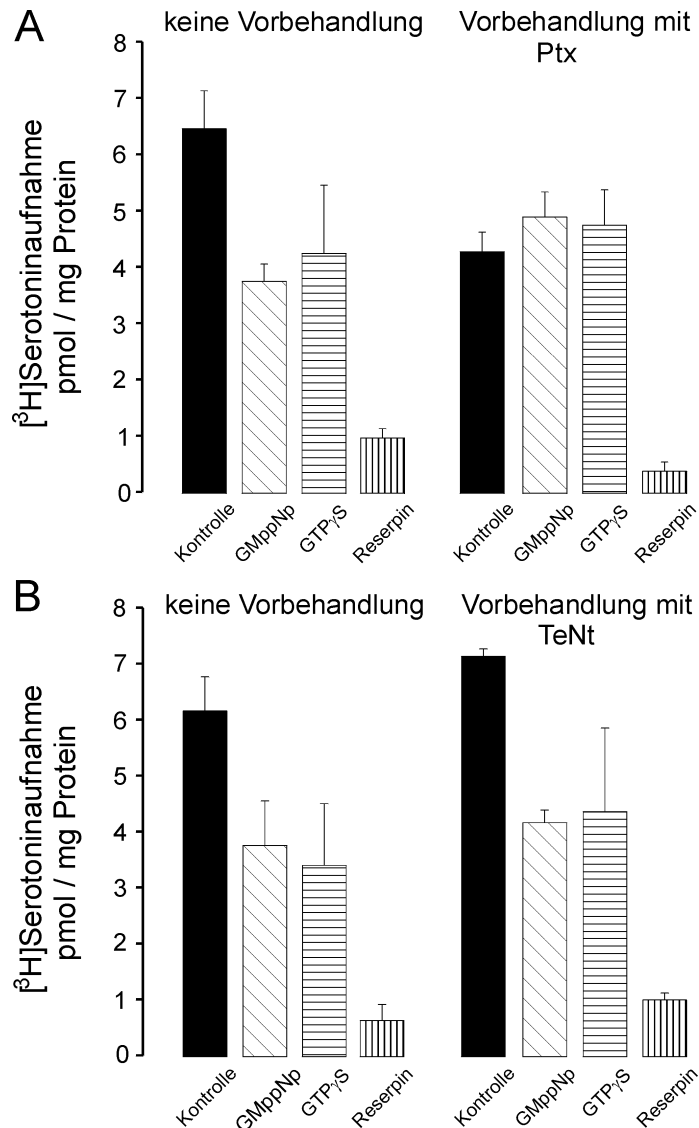


Abbildung 29

**Die Aufnahme von [ $^3$ H]Serotonin in permeabilisierten Rapheneuronen wird durch GTP $\gamma$ S und GMppNp gehemmt**

**A:** Rapheneurone (E14) wurden für 24 Tage in Kultur genommen und vor dem Experiment für 48 Stunden mit Puffer oder Ptx (100 ng / ml) behandelt. Vor der Inkubation mit [ $^3$ H]Serotonin (90 nM, 10 min) erfolgte die SLO-Permeabilisierung mit 100 HE / ml für 2 min. Die Zugabe von GTP $\gamma$ S oder GMppNp (jeweils 50  $\mu$ M) führte zu einer Hemmung der Reserpin-sensitiven [ $^3$ H]Serotoninaufnahme von etwa 40 % in den Kontrollzellen. Die Vorbehandlung mit Ptx verhinderte diese Hemmung vollständig.

**B:** Nach Vorinkubation für 48 h mit TeNt (1 nM) konnte die Hemmung der [ $^3$ H]Serotoninaufnahme durch GTP-Analoga nicht aufgehoben werden.

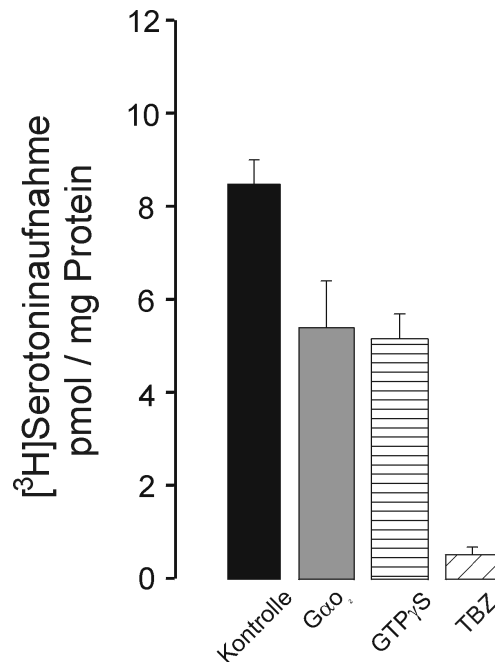


Abbildung 30

**Die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Serotonin in permeabilisierte Rapheneurone wird durch Gα<sub>o2</sub> gehemmt**

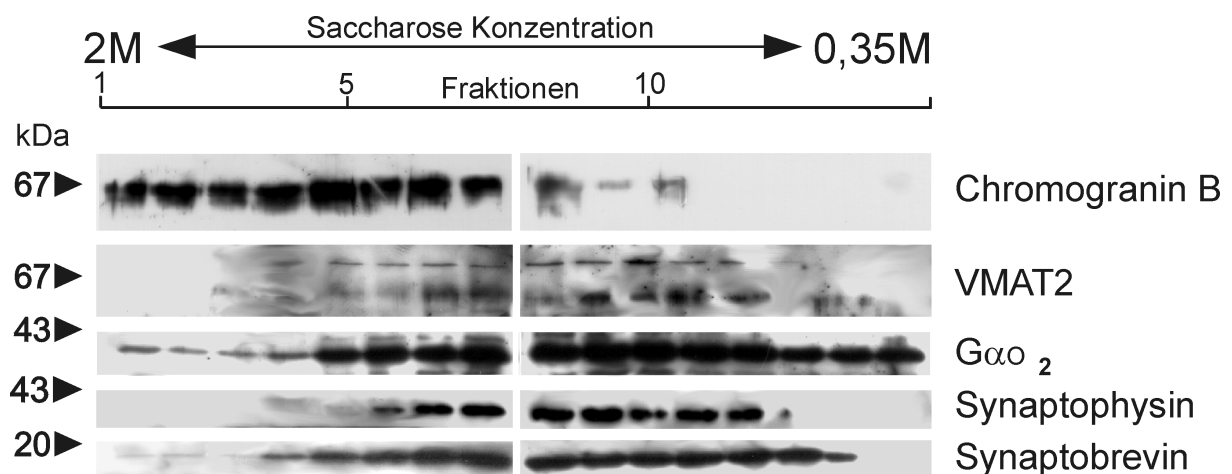
Das Experiment wurde ähnlich wie in Abb. 29 durchgeführt, jedoch wurde [<sup>3</sup>H]Noradrenalin als Substrat verwendet, und TBZ (10 μM) als spezifischer Inhibitor von VMAT2 eingesetzt. Die Zugabe von AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> aktiviertem Gα<sub>o2</sub> (10 nM) führt zu einer Hemmung der vesikulären Aufnahme, die dem der durch GTPγS vermittelten entspricht.

### 3.8 VMAT2 und Gα<sub>o2</sub> auf monoaminergen synaptischen Vesikeln

Um zu klären, auf welchem Vesikeltyp VMAT2 und Gα<sub>o2</sub> in monoaminergen Neuronen lokalisieren, wurden unterschiedliche experimentelle Ansätze verwendet. Zum einen sollte die subzelluläre Fraktionierung der Raphekulturen Hinweise auf die Lokalisation von VMAT2 und Gα<sub>o2</sub> in diesen Neuronen liefern. Zum anderen wurden Areale aus dem präfrontalen Cortex der Ratte mit Hilfe der Immun-elektronenmikroskopie hinsichtlich der Lokalisation von VMAT2 und Gα<sub>o2</sub> auf einzelnen Membrankompartimenten untersucht. Um die Transporter-G-Protein Interaktion funktionell auf isolierten Vesikeln nachzuweisen, wurden die Effekte von gereinigten G-Protein Untereinheiten und GMppNp auf die Serotoninaufnahme an Präparationen synaptischer Vesikel gemessen.

### 3.8.1 Lokalisation von VMAT2 und $G\alpha_2$ auf synaptischen Vesikeln von Neuronen

Zur Untersuchung der subzellulären Verteilung von VMAT2 und  $G\alpha_2$  wurde ein postnukleärer Überstand von 14 Tage alten Raphekulturen mittels einer Dichtegradienten-Zentrifugation analysiert. Die Immunoreplika-Analyse (**Abbildung 31**) zeigt, daß VMAT2 hauptsächlich auf Membranfraktionen lokalisierte, die sich aus SSVs zusammensetzten. Deutlich wurde dies durch die weitgehende Colokalisation mit Synaptophysin. Ebenfalls in den leichten Membranfraktionen, hauptsächlich den SSV Fraktionen, fand sich der Großteil des  $G\alpha_2$ . Geringere Mengen der G-Protein Untereinheit lokalisierten auch auf schweren Membranfraktionen, die sich, markiert durch ihren Chromogranin B Gehalt, aus LDCVs zusammensetzten, sie enthielten praktisch kein VMAT2. Synaptobrevin fand sich als Membranprotein beider Vesikeltypen sowohl in den Fraktionen der LDCVs als auch der SSVs.



**Abbildung 31**

**Der neuronale Monoamintransporter VMAT2 ist mit  $G\alpha_2$  auf kleinen synaptischen Vesikeln von Rapheneuronen colokalisiert.**

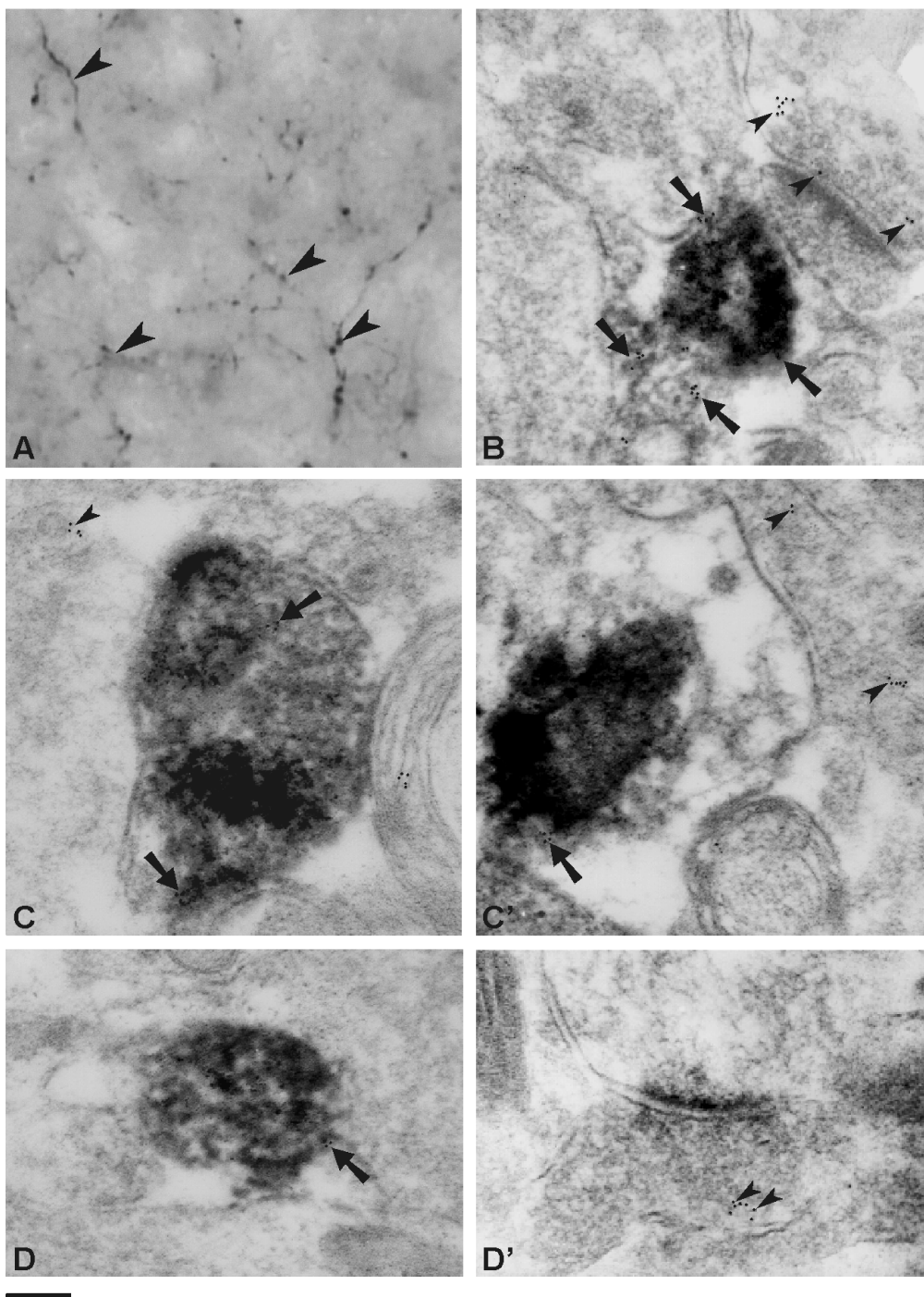
Rapheneurone wurden am Tag E14 präpariert und über 14 Tage in Kultur genommen. Aus einem Homogenat der Zellen wurde ein postnukleärer Überstand hergestellt und auf einen kontinuierlichen Saccharose-Gradienten (0,35-2 M) aufgetragen. Über eine Dichtegradienten-Zentrifugation erfolgte die subzelluläre Fraktionierung der Zellmembranen. Die Immunoreplika-Analyse zeigt, daß VMAT2 hauptsächlich auf Membranfraktionen lokalisiert ist, die den SSVs zuzurechnen sind. Dies wird durch die weitgehende Colokalisation mit Synaptophysin als Markerprotein für kleine synaptische Vesikel deutlich.

Im Bereich der SSV-Fraktionen fand sich ebenfalls der Großteil des  $G\alpha_2$ , das jedoch auch in den übrigen Membranfraktionen, wie etwa denen der LDCVs, markiert durch Chromogranin B, zu finden war. Synaptobrevin fand sich sowohl in den LDCV- als auch in den SSV- Fraktionen des Gradienten.

Um genauere Aussagen über die subzelluläre Verteilung von VMAT2 und  $G\alpha_2$  in monoaminergen Neuronen machen zu können, wurden Areale aus dem präfrontalen Cortex der Ratte immunelektronenmikroskopisch untersucht.

Zunächst wurden serotonerge Fasern, die aus der Raphe in den präfrontalen Cortex projizieren, nach Immunfärbung lichtmikroskopisch identifiziert (**Abbildung 32A**). Die elektronenmikroskopische Analyse dieser serotonergen Projektionen (identifiziert durch das DAB Präzipitat, siehe Methoden) zeigte, daß die Endigungen ausschließlich mit Vesikeln eines Typs, den SSVs, gefüllt waren (**Abbildung 32B,C,D**). Auf den SSVs sowohl der serotonergen als auch einiger nicht-identifizierter Endigungen fand sich, wie erwartet, Synaptophysin (**Abbildung 32B**). VMAT2 fand sich auf SSVs sowohl der serotonergen als auch anderer monoaminergen, vermutlich dopaminergen, Endigungen (**Abbildung 32C, C'**). Die Analyse der Verteilung von  $G\alpha_2$  machte deutlich, daß  $G\alpha_2$  ebenfalls auf SSVs serotonerger sowie nicht serotonerger Endigungen lokalisierte (**Abbildung 32D, D'**). Zusätzlich konnte  $G\alpha_2$  auch auf anderen Membranen, etwa der Plasmamembran, gefunden werden (nicht gezeigt).

Die in Abschnitt 3.8.1 vorgestellten experimentellen Befunde belegen eine Lokalisation von VMAT2 in serotonergen Neuronen ausschließlich auf SSVs.



*Abbildung 32*

**Immunelektronenmikroskopische Lokalisation von VMAT2 und  $G\alpha_o_2$  in serotonergen synaptischen Terminalen aus dem präfrontalen Cortex**

**A:** Die lichtmikroskopische Aufnahme eines Vibratomschnitts aus dem präfrontalen Cortex einer adulten Ratte zeigt die mit einem anti-Serotonin Antiserum aus dem Huhn markierten, mit der DAB Methode sichtbar gemachten, serotonergen Endigungen (Pfeilspitzen). Ausgehend von diesem Gewebe wurden Ultra-Dünnschnitte für die 'post-embedding' -Technik angefertigt. Verwendet wurden hierfür Antikörper gegen VMAT2,  $G\alpha_o_2$ , Synaptophysin sowie anti-Kaninchen IgG, konjugiert mit 5 nm Goldpartikeln, als sekundärer Antikörper.

**B:** Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt zwei Terminalen, von denen eine durch das DAB Präzipitat als serotonerg identifiziert werden konnte. Synaptophysin befand sich auf SSVs sowohl der serotonergen (Pfeile) als auch der anderen Terminalen (Pfeilspitzen). **C, C':** Die Aufnahmen stellen die elektronenmikroskopischen Details zweier serotonerger Terminalen dar. Auf einigen der SSVs dieser Terminalen war VMAT2 lokalisiert (Pfeile). VMAT2 fand sich ebenso auf einigen SSVs benachbarter monoaminerger Terminalen (Pfeilspitzen).

**D, D':** Die elektronenmikroskopische Aufnahme in D zeigt die Lokalisation von  $G\alpha_2$  auf SSVs einer serotonergen Varikosität (Pfeile). Die Aufnahme in D' zeigt, dass  $G\alpha_2$  auch auf synaptischen Vesikeln nicht-serotonerger Terminalen zu finden war. Maßstab: A 1  $\mu\text{m}$ ; B-D 150 nm

Die Aufnahme wurde freundlicherweise von Dr. Ingrid Pahner zur Verfügung gestellt.

### 3.8.2 Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme in synaptische Vesikel durch $G\alpha_2$

Für die funktionelle Analyse wurde aus dem präfrontalen Cortex eine Vesikelpräparation (LP2) hergestellt, die sich hauptsächlich aus SSVs zusammensetzt (Huttner et al. 1983).

Über die Immunoreplika-Analyse einer LP2 Vesikelpräparation (**Abbildung 33**) konnte nachgewiesen werden, daß VMAT2 und  $G\alpha_2$  auf den Membranen vorhanden waren. Wie für synaptischer Vesikel zu erwarten, ergab sich ein sehr intensives Immunsignal für Synaptophysin.

Um die Regulation der Monoaminaufnahme in synaptische Vesikel durch  $G\alpha_2$  nachzuweisen, wurde die Serotoninaufnahme unter Zugabe von gereinigten G-Protein Untereinheiten oder GMppNp gemessen (**Abbildung 34**). Die Zugabe von  $G\alpha_2$  zum Inkubationsansatz führte zu einer Hemmung der TBZ-sensitiven Serotoninaufnahme von 5,5 pmol / mg Protein um 45% (**Abbildung 34A**). Die Zugabe von GMppNp führte zu einer Hemmung von 50%. In einem ähnlichen Experiment wurde auch gereinigtes  $G\alpha_1$  zugegeben (**Abbildung 34B**). Nur  $G\alpha_2$ , nicht jedoch  $G\alpha_1$  führte zu einer Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme.



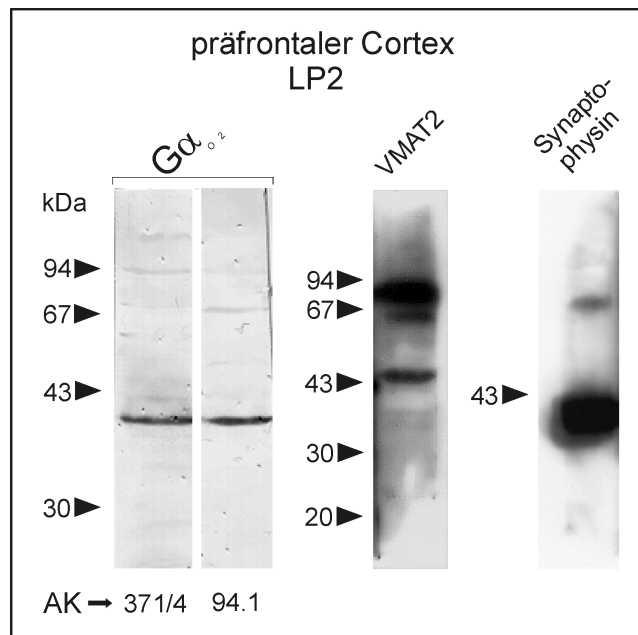


Abbildung 33

**Nachweis von Gα<sub>o2</sub>, VMAT2 und Synaptophysin auf synaptischen Vesikeln aus dem präfrontalen Cortex (LP2 Präparation).**

Die in der Immunoreplika-Analyse verwendeten Antikörper gegen Gα<sub>o2</sub> (371/4 polyklonal, 94.1 monoklonal), VMAT2 und Synaptophysin detektierten Proteinbanden, die den jeweiligen Molekulargewichten entsprachen. AK: Antikörper

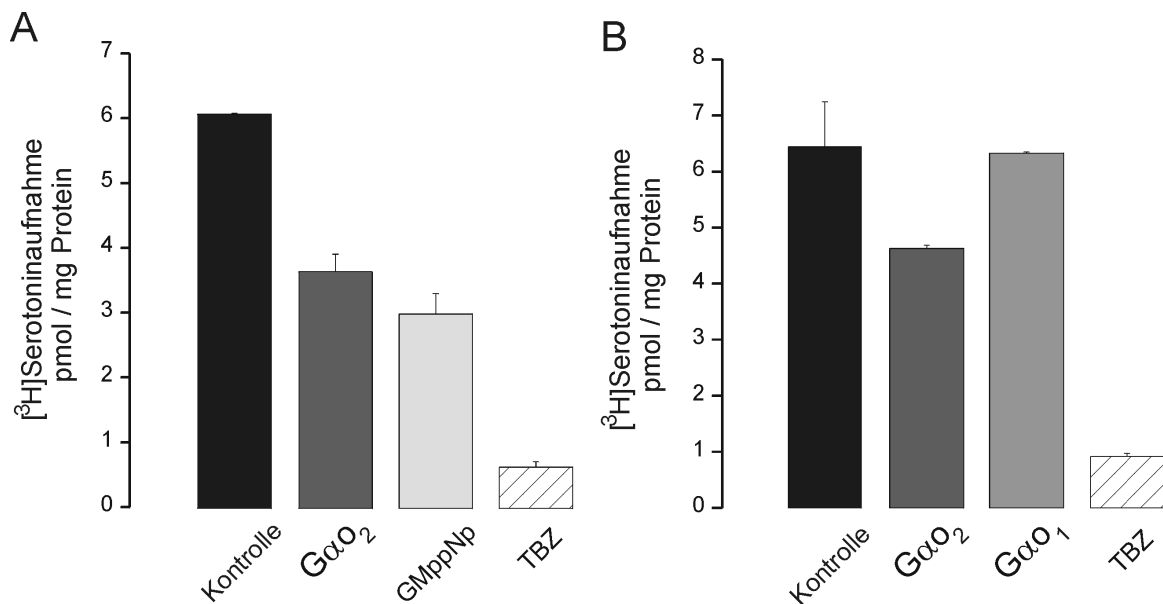


Abbildung 34

**Gα<sub>o2</sub> hemmt die [<sup>3</sup>H]Serotoninaufnahme in synaptische Vesikel aus dem präfrontalen Cortex**

**A:** Synaptische Vesikel (LP2) aus dem präfrontalen Cortex adulter Ratten wurden für 10 Minuten mit KG3 Puffer, der [<sup>3</sup>H]Serotonin (90 nM) und entweder Gα<sub>o2</sub> (10 nM), GMppNp (50 μM) oder TBZ (10 μM) enthielt, inkubiert. Die Zugabe von Gα<sub>o2</sub>, wie auch GMppNp führte zu einer Hemmung der TBZ sensitiven [<sup>3</sup>H]Serotoninaufnahme von 40-45 %. **B:** In einem ähnlichen Experiment wurden die Vesikel entweder mit gereinigtem, AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> aktiviertem Gα<sub>o1</sub> oder Gα<sub>o2</sub> inkubiert. Nur Gα<sub>o2</sub> aber nicht Gα<sub>o1</sub> führten zu einer Hemmung der vesikulären TBZ-sensitiven Aufnahme.

### 3.9 Die durch GMppNp vermittelte Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme in permeabilisierte Thrombozyten ist abhängig vom Füllungszustand der Vesikel

Blutplättchen oder Thrombozyten besitzen eine entscheidende Funktion bei der Blutgerinnung. Serotonin wird von ihnen über den Plasmamembrantransporter aufgenommen und in elektronendichten Granula gespeichert. Die Freisetzung des Serotonins trägt über die Bindung an 5HT<sub>2</sub>-Rezeptoren entscheidend zur Thrombozytenaggregation und Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur bei. In peripheren Geweben wird Serotonin hauptsächlich durch die enterochromaffinen Zellen des Verdauungstraktes synthetisiert und in die Blutbahn abgegeben (Racke et al., 1991). Die Aktivität der Tryptophan-Hydroxylase stellt dabei den Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt bei der Serotonin-Synthese dar.

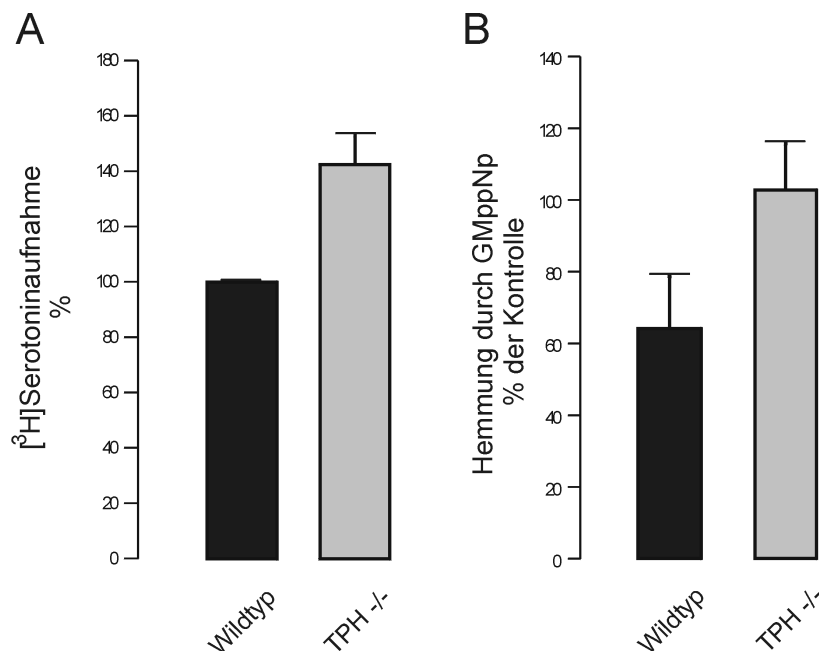
Die Verfügbarkeit genetisch modifizierter Mäuse, in denen eine Deletionsmutation für das Gen der peripheren Tryptophanhydroxylase vorlag, bot die Möglichkeit, die Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme in Abhängigkeit von der vorhandenen Substratkonzentration, und damit vermutlich auch dem Füllungszustand der Vesikel, zu untersuchen.

Nach Permeabilisierung der Thrombozyten ließ sich sowohl für den Wildtyp als auch für die Mutante eine Serotoninaufnahme messen, die durch Inkubation mit Reserpin oder Tetrabenazin vollständig blockiert werden konnte. Deutlich wurde dabei, daß die Thrombozyten der Deletionsmutanten eine gegenüber dem Wildtyp um etwa 40 % gesteigerte vesikuläre Serotoninaufnahme aufwiesen (**Abbildung 35 A**). Ein weiterer auffälliger Unterschied bestand in der Empfindlichkeit der Serotoninaufnahme gegenüber der Inkubation mit GMppNp: Die Inkubation mit dem GTP-Analogon führte in den Wildtyp-Thrombozyten zu einer Hemmung der vesikulären Aufnahme von fast 40% (**Abbildung 35 B**). Die Serotoninaufnahme in Thrombozyten der

Deletionsmutante konnte dagegen nicht durch GMppNp gehemmt werden.

Um zu untersuchen, ob dieser offensichtliche Verlust der Regulation ein Resultat des stark verminderten Serotonin Angebots, und damit auch höchstwahrscheinlich des Füllungszustands der Vesikel darstellt, wurden die Thrombozyten der Deletionsmutante vor den Aufnahme-Experimenten mit steigenden Serotonin Konzentrationen (nicht radioaktiv markiert) zwischen 1,5 und 150  $\mu\text{M}$  vorbeladen.

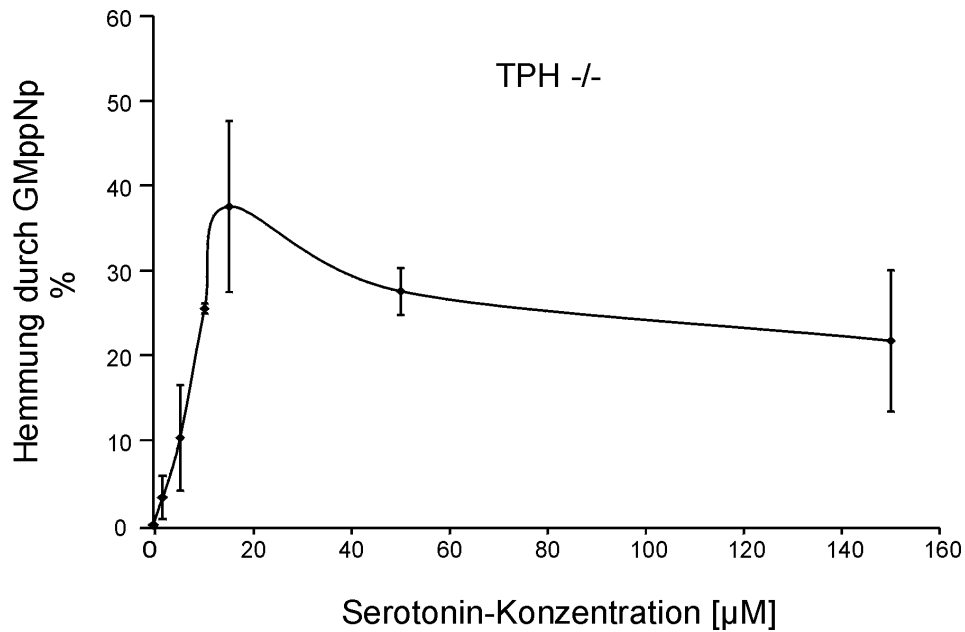
Die vesikuläre Serotoninaufnahme konnte jetzt in Abhängigkeit von der zuvor angebotenen Serotonin-Konzentration durch GMppNp gehemmt werden (**Abbildung 36**). Die Hemmung stieg zwischen 1,5 und 15  $\mu\text{M}$  Serotonin auf maximal ca. 35 % an, um bei 150  $\mu\text{M}$  Serotonin wieder auf 22 % abzunehmen



**Abbildung 35**

**[<sup>3</sup>H]Serotoninaufnahme in permeabilisierte Thrombozyten aus Wildtyp und Tryptophanhydroxylase-deletionsmutierten (TPH -/-) Mäusen**

Thrombozyten wurden mit SLO permeabilisiert und für 15 min bei 36°C mit 90 nM [<sup>3</sup>H]Serotonin inkubiert. **A:** Die vesikuläre Serotoninaufnahme in die Thrombozyten der Deletionsmutante übertraf die Aufnahme in die Wildtyp-Thrombozyten um 40 % (Wildtyp-Aufnahme auf 100 % gesetzt). **B:** Die Inkubation mit GMppNp führte im Wildtyp zu einer Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme von 38 %. In den Thrombozyten der Deletionsmutante hatte die Inkubation mit GMppNp jedoch keinen Effekt.



*Abbildung 36*

**Die Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme in Thrombozyten aus TPH -/- Mäusen kann durch die Vorinkubation mit Serotonin konzentrationsabhängig induziert werden.**

Thrombozyten der Tryptophanhydroxylase-Deletionsmutante wurden vor den Experimenten zur [<sup>3</sup>H]Serotoninaufnahme mit steigenden Konzentrationen an Serotonin (1,5 bis 150 µM, nicht radioaktiv markiert) vorinkubiert. Anschließend wurden die Thrombozyten permeabilisiert und gewaschen. Die Zugabe von GMppNp zum Inkubationsansatz führte zu einer Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme. Sie stieg zwischen 1,5 und 15 µM Serotonin auf maximal ca. 35 % an, um bei 150 µM Serotonin auf 22 % abzunehmen.

## 4. Diskussion

### 4.1 BON Zellen als Modell zur Untersuchung der vesikulären Monoaminspeicherung

Die humane neuroendokrine Zelllinie BON konnte vor einigen Jahren aus einem Tumor des Pankreas etabliert werden. BON Zellen speichern und sezernieren Serotonin, das diese Zellen als autokrinen Wachstumsfaktor benötigen (Ishizuka et al., 1992). Der Signaltransduktionsweg verläuft dabei über eine 5-HT Rezeptorgekoppelte Hemmung der Adenylylzyklaseaktivität. Elektronenmikroskopische Analysen belegen die Existenz von elektronendichten sekretorischen Vesikeln in BON Zellen (Parekh et al., 1994). Aufgrund dieser Eigenschaften erschien die Zelllinie geeignet zur Untersuchung der Regulation der vesikulären Speicherung von Monoaminen. Neben der einfachen Verfügbarkeit bieten Zelllinien gegenüber einer Untersuchung im Gewebe den Vorteil einer gezielteren Manipulation der Kultur- und Versuchsbedingungen. Zudem ermöglicht ein „reduziertes“ System, wie es Zelllinien darstellen, oftmals eine fokussiertere Beobachtung einzelner Prozesse.

BON Zellen ließen sich erfolgreich permeabilisieren. Dies stellte eine Voraussetzung für die Kontrolle des intrazellulären Milieus und den direkten Zugang zur Untersuchung intrazellulärer Transportprozesse dar.

### 4.2 In BON Zellen wird die vesikuläre Monoaminaufnahme durch $G\alpha_2$ gehemmt

In SLO-permeabilisierten BON Zellen konnte eine vesikuläre Aufnahme von Serotonin nachweisen werden. Die Inkubation der Zellen mit  $GTP\gamma S$  oder GMppNp führte zu einer deutlichen Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme. Dieser Prozeß ließ sich durch die Vorbehandlung der Zellen mit Pertussis Toxin aufheben. Damit war gezeigt, daß heterotrimere G-Proteine der  $G_{i/o}$ -Klasse an der Regulation der Transporteraktivität beteiligt sind. Pertussis Toxin belegt die Beteiligung von  $G_{i/o}$ -Proteinen im allgemeinen für Rezeptor-G-Protein Interaktionen, da die ADP-Ribosylierung den GDP/GTP Austausch verlangsamt. Darüber hinaus scheint jedoch auch die G-Protein-Effektor Interaktion aktivierter ADP-ribosylierter G-Proteine verlangsamt. Der teilweise reversible Charakter des Pertussis Toxin Effekts konnte

durch die Inkubation mit steigenden GMppNp-Konzentrationen auch für die Transporterregulation demonstriert werden.

Die Inkubation permeabilisierter BON Zellen mit verschiedenen präaktivierten G-Protein Untereinheiten ermöglichte es,  $G\alpha_2$  als die für die Hemmung verantwortliche Untereinheit zu identifizieren.

Die Spezifität der G-Protein-Effekte auf die vesikuläre Aufnahme konnte durch die Inkubation der Zellen mit Tetanus Neurotoxin demonstriert werden. Auch in Toxin-behandelten Zellen führte die Inkubation mit den GTP-Analoga und  $G\alpha_2$  zu einer Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme, die der in unbehandelten Zellen vergleichbar war.

#### **4.3 In BON Zellen lokalisieren die vesikulären Monoamintransporter überwiegend auf LDCVs**

Immunoreplika- Analysen und immunzytochemische Färbungen konnten zeigen, daß in BON Zellen VMAT1 und VMAT2 exprimiert werden. Die immunzytochemische Analyse der zellulären Verteilung ergab außerdem eine Colokalisation der beiden Transporter mit Serotonin, welches in 50 % aller Zellen nachgewiesen werden konnte. Ebenfalls in etwa der Hälfte der Zellen fand sich VMAT2, während VMAT1 in fast allen Zellen exprimiert wurde. In einigen Zellen, die für VMAT1 oder VMAT2 immunpositiv waren, ließ sich kein Serotonin nachweisen. Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine zuvor erfolgte massive Serotoninfreisetzung sein. Einzelne Zellen enthielten weder Transporterprotein noch Serotonin. Die Analyse der zellulären Verteilung von Chromogranin ergab eine weitgehende Colokalisation zwischen diesem in LDCVs gespeicherten Cosekret und Serotonin.

Bei BON Zellen handelt es sich um eine unklonierte Zelllinie (Townsend et al., 1993), was die beobachtete heterogene Transporterverteilung erklären könnte. Unklar ist in diesem Zusammenhang, aus welchem Anteil des Pankreas sich die Zellen zusammensetzen. Immunzytochemische Studien belegen das Vorkommen von VMAT2 ausschließlich im endokrinen Anteil des Pankreas (Erickson et al., 1996). Nicht nachgewiesen ist, ob VMAT1 möglicherweise im exokrinen Pankreas exprimiert wird.

Die subzelluläre Fraktionierung von BON Zellen ergab, daß beide Transporter sowie

$G\alpha_1$  und  $G\alpha_2$  auf den schweren Membranfraktionen der LDCVs zu finden waren. Die partielle Überschneidung beider Transporter mit Fraktionen der SLMVs ließ jedoch in geringerem Umfang auch eine Lokalisation von VMAT1 und VMAT2 auf diesem Vesikeltyp möglich erscheinen. Zusätzlich fand sich  $G\alpha_2$  auch in den Fraktionen, die sich aus SLMVs und (vermutlich) Fragmenten der Plasmamembran zusammensetzten. Ausschließlich in den LDCV-Fraktionen konnte  $G\alpha_1$  nachgewiesen werden.

Die Analyse der subzellulären Proteinverteilung in PC 12 Zellen dokumentierte ein Muster, das dem für BON Zellen nachgewiesenen sehr ähnlich war.

Neuroendokrine Zellen und die aus neuroendokrinen Tumoren abstammenden Zelllinien enthalten sowohl LDCVs als auch SLMVs (Navone et al., 1986; Wiedenmann et al., 1989). Während die Speicherung von Hormonen und anderen biogenen Peptiden in LDCVs erfolgt, werden in SLMVs hauptsächlich Aminosäuretransmitter wie GABA, Glyzin oder Glutamat gespeichert (Reetz et al., 1991; Ahnert-Hilger et al., 1996).

In den chromaffinen Granula der Zellen des Nebennierenmarks erfolgt die Speicherung der Katecholamine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin (Johnson, 1988). Die o.a. Ergebnisse zur Lokalisation von VMAT1 hauptsächlich auf den Membranen der LDCVs von PC 12 Zellen stimmen mit elektronenmikroskopischen Befunden an dieser Zelllinie überein. Sie wiesen VMAT1 ebenfalls überwiegend auf LDCVs, in geringem Ausmaß jedoch auch auf SLMVs nach (Liu et al., 1994).

Die subzelluläre Fraktionierung der BON Zellen verdeutlichte, daß die Speicherung von Monoaminen in dieser neuroendokrinen Zelllinie vorwiegend in LDCVs erfolgt.

Untersuchungen dokumentieren eine differentielle Lokalisation von  $G\alpha_1$  und  $G\alpha_2$  auf Membranen der LDCVs und SSVs (Ahnert-Hilger et al., 1994). Während die Verteilung der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine der  $G_{i/o}$ -Klasse für beide Vesikeltypen ähnlich war, ergaben sich Unterschiede in der Verteilung der  $\alpha$ -Untereinheiten: Auf SSVs von Gehirnhomogenaten der Ratte konnten  $G\alpha_1$ ,  $G\alpha_2$  sowie  $G\alpha_i$  und  $G\alpha_j$  nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu fand sich auf chromaffinen Granula aus dem Rind lediglich  $G\alpha_2$ . Generell kommen  $G_o$ -Untereinheiten in Neuronen und neuroendokrinen Zellen in hohen Konzentrationen vor. Sie können in diesen Zelltypen bis zu 2 % des Gesamtproteins ausmachen

(Sternweis und Robishaw, 1984).

Für BON Zellen konnte in dieser Arbeit die Existenz von  $G\alpha_2$  und  $G\alpha_1$  überwiegend auf der Membran von LDCVs dokumentiert werden. Welche Funktion  $G\alpha_1$  auf der Vesikelmembran ausübt, ist nicht bekannt. An der Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme ist diese Untereinheit jedoch nicht beteiligt.

#### **4.4 Die Aktivität von VMAT1 und VMAT2 wird in BON Zellen durch $G\alpha_2$ reguliert**

Das gemeinsame Vorkommen von VMAT1 und VMAT2 in BON Zellen auf LDCVs ermöglichte es, die Regulation beider Transporter vergleichend unter denselben experimentellen Bedingungen zu untersuchen.

Die vorhandenen Unterschiede bezüglich der Affinität für Histamin sowie der Sensitivität gegenüber Tetrabenazin eigneten sich sehr gut für eine experimentelle Differenzierung zwischen der Aktivität von VMAT1 und VMAT2. Die alternative Methode der Transfektion einer Fibroblasten-Zelllinie mit der jeweiligen Transporter-DNA hätte den Nachteil von Spezies- und Gewebeunterschieden, sowie mögliche Probleme durch das „Sortieren“ der Transporter auf unterschiedliche Zellkompartimente beinhaltet.

Beide Transporter weisen für Histamin eine im Vergleich zu den übrigen Monoaminen geringe Affinität auf, jedoch besitzt VMAT2 noch eine deutlich höhere Affinität für dieses Substrat als VMAT1. In Übereinstimmung damit repräsentiert VMAT2 auch den in Histamin-produzierenden Zellen exprimierten Transportertyp (Dimaline und Struthers, 1996). Im Gegensatz zu den Katecholaminen und dem Indolamin Serotonin weist Histamin einen unsubstituierten aromatischen Ring auf. Dies scheint verantwortlich für die schlechteren Transporteigenschaften und die Unterschiede in der Affinität zu beiden Transportern zu sein (Schuldiner et al., 1995). PC12 Zellen, die nur VMAT1 exprimieren, dienten zur Überprüfung der Ansätze. Erwartungsgemäß konnte hier keine vesikuläre Histaminaufnahme gemessen werden. Dies konnte als Beleg dafür genommen werden, daß Histamin in der angebotenen geringen Konzentration nicht als Substrat für VMAT1 diene.

Tetrabenazin wurde benutzt, um VMAT2 zu hemmen. Da dieser Inhibitor für VMAT1 generell eine sehr geringe, für die humane Variante des Transporters praktisch keine



Affinität besitzt, konnte VMAT2 sehr selektiv gehemmt werden.

So konnten zwei verschiedene Versuchsbedingungen erarbeitet werden, die es gestatteten, die Aktivität von VMAT1 und VMAT2 in BON Zellen getrennt zu untersuchen:

Zur Untersuchung der Aktivität von VMAT1 wurde die Serotoninaufnahme in Gegenwart einer hohen Histamin-Konzentration (nicht radioaktiv markiert) gemessen. Hier sollte das in dieser Konzentration angebotene Histamin zu einer kompetitiven Verdrängung des Serotonins aus der Bindung mit VMAT2 führen. Die Zugabe von Tetrabenazin zum Inkubationsansatz bestätigte diese Annahme: Die vesikuläre Serotoninaufnahme konnte nicht mehr durch diesen Inhibitor blockiert werden, was die Aufnahme als VMAT1-Aktivität charakterisierte.

Um die Aktivität von VMAT2 experimentell darzustellen, wurde die vesikuläre Aufnahme von Histamin als Substrat für diesen Transportertyp gemessen (s.o.). Hier führte die Inkubation mit Tetrabenazin zu einer annähernd vollständigen Blockierung der Histaminaufnahme. Dies kennzeichnete die gemessene Aufnahme als VMAT2 Aktivität. Ausgehend von diesen Ergebnissen konnte nun selektiv der Effekt von  $G\alpha_2$  auf die Aktivität von VMAT1 und VMAT2 untersucht werden.

Die Zugabe von  $G\alpha_2$  zum Inkubationsansatz führte unter beiden experimentellen Bedingungen zu einer Hemmung der Monoaminaufnahme. Dabei erwies sich VMAT2 jedoch empfindlicher gegenüber der Hemmung durch  $G\alpha_2$  als VMAT1. Bestätigt wurde die höhere Empfindlichkeit von VMAT2 gegenüber der G-Protein Regulation auch durch die Inkubation mit GMppNp, wobei endogenes  $G\alpha_2$  aktiviert wurde.

Die Ergebnisse zur Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme in BON Zellen können wie folgt zusammengefaßt werden:

In der humanen neuroendokrinen Zelllinie BON wird die vesikuläre Monoaminaufnahme durch  $G\alpha_2$  reguliert.

Es kommt hier zu einer Hemmung der Aktivität der beiden in dieser Zelllinie exprimierten vesikulären Monoamintransporter VMAT1 und VMAT2 durch diese G-Protein Untereinheit.

Diese Regulation gilt vorwiegend für LDCVs.

Eine Beteiligung von SLMVs an der Serotoninspeicherung und damit auch eine

Regulation der SLMV-ständigen Transporteraktivität kann aufgrund der geringen, jedoch vorhandenen Colokalisation von VMAT1, VMAT2 und  $G\alpha_{o2}$  auch auf diesem Vesikeltyp nicht ausgeschlossen werden.

Die Aktivität von VMAT2 erwies sich als empfindlicher gegenüber der Regulation durch die G-Protein Untereinheit.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die bisher nur für die Zelllinie PC12 nachgewiesene Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme (Ahnert-Hilger et al., 1998) ein Prinzip darstellt, welches zumindest in neuroendokrinen Zelllinien aus unterschiedlichen sekretorischen Geweben verwirklicht ist. Sie zeigen weiterhin, daß diese Regulation auch in verschiedenen Spezies – PC 12 Zellen stammen aus der Ratte, BON Zellen repräsentieren eine menschliche Zelllinie – existiert. Ein weiterer wichtiger Aspekt, auch im Hinblick auf einen ähnlichen Mechanismus im Zentralen Nervensystem, war die Erkenntnis, daß die Interaktion zwischen Transporter und G-Protein Untereinheit nicht auf VMAT1 beschränkt bleibt, sondern auch für VMAT2 besteht. Die im Vergleich zu VMAT1 erhöhte Sensitivität von VMAT2 gegenüber der Hemmung durch  $G\alpha_{o2}$  könnte im Zusammenhang mit der unterschiedlichen Gewebeverteilung beider Transporter zu sehen sein. VMAT2 stellt die überwiegend im ZNS exprimierte neuronale Variante des Transporters dar (Peter et al., 1995; Erickson et al., 1996). Es ist vorstellbar, daß die Transmitterspeicherung dort einer empfindlicheren Regulation als in peripheren sekretorischen Geweben unterliegt. In diesem Zusammenhang ist möglicherweise auch die Tatsache zu sehen, daß nur VMAT2, nicht jedoch VMAT1, konstitutiv phosphoryliert wird (Krantz et al., 1997).

#### **4.5 Primärkulturen der Raphe stellen ein geeignetes Modell zur Untersuchung der vesikulären Monoaminspeicherung in Neuronen dar**

Die vorangehend diskutierten Ergebnisse dokumentieren eine Hemmung der vesikulären Monoaminaufnahme, die vorwiegend auf die Speicherung der Monoamine in LDCVs beschränkt sein dürfte. Daraus ergab sich die Frage, ob ein ähnlicher Mechanismus auch für die Monoaminaufnahme in SSVs von Neuronen erfolgt.

Als Modellsystem zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden Primärkulturen der

Raphe aus der Ratte verwendet. Als nicht-karzinoid transformierte Zellen können sie den Zelllinien BON und PC12 gegenübergestellt werden. Die Raphekerne enthalten Populationen von serotonergen Neuronen, die entlang der Mittellinie des Hirnstamms vom Mittelhirn zum verlängerten Rückenmark lokalisiert sind. Von dort projizieren sie diffus in fast alle Bereiche des ZNS. Das serotonerge System übt eine wichtige Funktion bei der Kontrolle komplexer physiologischer Verhaltensfunktionen wie Schlaf (Jouvet, 1999), Appetit (Leibowitz et al., 1998) oder auch Aggressionssteuerung (Kavoussi et al., 1997; Ferris et al., 1999) aus. Zudem trägt Serotonin entscheidend zur Differenzierung des Gehirns während der Embryonalentwicklung bei (Lauder und Krebs, 1978; Chubakov et al., 1986).

Für Serotonin konnte die Speicherung in SSVs serotonerger Projektionen im Rückenmark nachgewiesen werden (Fried et al., 1988; Iverfeldt et al., 1989). Elektronenmikroskopische Analysen bestätigen dies für serotonerge Axone aus dem präfrontalen Cortex von Affen (Smiley et al., 1996).

Um die Primärkulturen auf ihren Gehalt an serotonergen Neuronen zu untersuchen, wurden die Zellen immunzytochemisch analysiert. Bereits nach zwei Tagen in der Kultur ließ sich Serotonin in einzelnen Neuronen nachweisen. Dies kann in Übereinstimmung mit der Tatsache gesehen werden, daß das serotonerge System zu den am frühesten in der Embryonalentwicklung vorhandenen Transmittersystemen gehört (Aitken und Törk, 1988). Innerhalb des beobachteten Kulturzeitraums erhöhte sich der Anteil der serotonergen Neurone. Ebenfalls ab Tag 2 in der Kultur ließ sich VMAT2 in den serotonergen Neuronen nachweisen. Das verstärkte Aussprossen der neuronalen Fortsätze mit zunehmender Kulturdauer kann als „Reifen“ der Zellen interpretiert werden. Die funktionelle Charakterisierung der Rapheneurone dokumentierte, daß ab Kulturtag 2 über mehrere Wochen eine vesikuläre Serotoninaufnahme, ebenso wie eine Kalium-stimulierte und durch Tetanus Neurotoxin blockierbare Serotoninfreisetzung gemessen werden konnte.

Die Voraussetzungen für eine vesikuläre Speicherung und Freisetzung von Monoaminen scheint somit in Rapheneurone ähnlich früh wie die Fähigkeit zur Serotonin-Synthese entwickelt zu sein. Diese funktionellen Eigenschaften können offensichtlich auch über einen längeren Zeitraum in Kultur aufrecht erhalten werden.

#### 4.6 Die Aktivität von VMAT2 wird in permeabilisierten Rapheneuronen durch $G\alpha_2$ gehemmt

Um die Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme in Rapheneuronen zu untersuchen, wurde die an BON und PC 12 Zellen angewandte Permeabilisierungstechnik auch an den Primärkulturen aus der Raphe eingesetzt. Funktionelle Untersuchungen an permeabilisierten Neuronen sind bisher wenig etabliert. Eingesetzt wurde diese Technik zumeist lediglich in immunzytochemischen Studien an Primärkulturen von Neuronen (Noel et al., 1999) oder Neuroblastoma-Zelllinien (Chambaut-Guerin et al., 1997).

Nach Permeabilisierung der Rapheneurone mit SLO ließ sich eine gegenüber nicht-permeabilisierten Zellen deutlich gesteigerte Serotoninaufnahme messen, die durch die Inkubation mit Tetrabenazin blockiert werden konnte. Aufgrund der Umgehung der substratspezifischen Plasmamembrantransporter repräsentierte die gemessene Serotoninakkumulation nun den vesikulären Transport aller in der Kultur vorhandenen monoaminergen, also auch dopaminergen, Neurone.

In Analogie zu den an BON Zellen durchgeführten Experimenten konnten permeabilisierte Rapheneurone jetzt mit G-Protein Aktivatoren inkubiert werden. Die Ergebnisse ließen auf eine Beteiligung heterotrimerer G-Proteine bei der Regulation der vesikulären Monoaminspeicherung auch in Rapheneuronen schließen: So kam es nach Inkubation der Zellen mit  $GTP\gamma S$  oder GMppNp zu einer Hemmung der vesikulären Serotoninaufnahme. Die Vorbehandlung der Raphekulturen mit Pertussis Toxin verhinderte diese Hemmung vollständig und erlaubte die Einordnung des verantwortlichen G-Proteins in die Pertussis Toxin sensitive  $G_{i/o}$ -Klasse. Die Spezifität der Effekte auf die vesikuläre Aufnahme wurde wie in BON Zellen durch Vorinkubation der Zellen mit Tetanus Neurotoxin sichergestellt.

Um zu klären, ob die Hemmung der vesikulären Monoaminaufnahme in Rapheneuronen auf der Regulation von VMAT2 durch  $G\alpha_2$  beruht, wurde die Wirkung dieser Untereinheit auf die Aufnahme untersucht. Durch die Inkubation mit  $G\alpha_2$  konnte die vesikuläre Monoaminaufnahme ebenfalls gehemmt werden.

Die an Primärkulturen der Raphe durchgeführten Experimente konnten demonstrieren, daß es auch in monoaminergen Neuronen zu einer Regulation der Transmitterspeicherung durch  $G\alpha_2$  kommt. Die Tatsache, daß es sich um die

gleiche Untereinheit handelt, die auch in BON und PC12 Zellen für eine Hemmung der vesikulären Monoaminaufnahme verantwortlich ist, dokumentiert deutlich eine generelle Funktion dieser G-Protein Untereinheit auf intrazellulären Speicherorganellen.

#### **4.7 VMAT2 und $G\alpha_2$ lokalisieren in kultivierten Rapheneuronen und serotonergen Axonen aus dem präfrontalen Cortex auf SSVs**

Unterschiedliche experimentelle Ansätze wurden verwendet, um die Frage zu klären, auf welchem Vesikeltyp VMAT2 und  $G\alpha_2$  lokalisieren. Zunächst sollte wiederum die subzelluläre Fraktionierung der Rapheneurone Hinweise auf die Verteilung des Transporters und der G-Protein Untereinheit auf SSVs oder LDCVs liefern.

Monoamine können in Neuronen in unterschiedlichen Zellorganellen gespeichert werden: In Neuronen der Substantia nigra scheint die Dopaminspeicherung nur zu einem geringen Teil in SSVs oder LDCVs zu erfolgen. Der Großteil wird in tubovesikulären Strukturen, die vermutlich dem glatten endoplasmatischen Retikulum zuzurechnen sind, gespeichert. Zumindest müssen die Befunde zur Lokalisation von VMAT2 auf diesen Endomembrankompartimenten so interpretiert werden (Nirenberg et al., 1996). Für Serotonin konnte, wie erwähnt, die Speicherung in SSVs nachgewiesen werden. Ultrastrukturelle Untersuchungen belegen jedoch auch die Existenz von LDCVs in serotonergen Axon-Terminalen des Striatums (Soghomonian et al., 1989). Eine Besonderheit stellt die Noradrenalinspeicherung dar. In noradrenergen Neuronen kann die Speicherung in kleinen elektronendichten Vesikeln erfolgen, die möglicherweise einen Mischtyp aus SSVs und LDCVs repräsentieren (Bauerfeind, 1995).

Die subzelluläre Fraktionierung der kultivierten Rapheneurone ergab ein Verteilungsmuster von VMAT2 und  $G\alpha_2$ , das sich deutlich von dem in BON und PC12 Zellen vorgefundenen unterschied: So fand sich VMAT2 überwiegend auf Membranen der SSVs. Membranfraktionen der LDCVs wiesen nur sehr geringe Mengen des Transporters auf. Ebenfalls in den leichten Membranfraktionen fand sich der Großteil des  $G\alpha_2$ . Geringere Mengen der G-Protein Untereinheit konnten auch in den LDCV- Fraktionen nachgewiesen werden.

Um die Lokalisation von VMAT2 und  $G\alpha_2$  auf sekretorischen Vesikeln serotonerger

Neurone genauer analysieren zu können, wurde der präfrontale Cortex der Ratte als Projektionsgebiet der Rapheneurone immunelektronenmikroskopisch untersucht.

Die Analyse des Vesikeltypen dokumentierte, daß die serotonergen Endigungen ausschließlich mit SSVs angefüllt waren. Auf diesen Vesikeln konnte sowohl VMAT2 als auch  $G\alpha_o2$  nachgewiesen werden. Auf den SSVs einiger nicht identifizierter Neurone fanden sich ebenfalls VMAT2 und  $G\alpha_o2$ . Vermutlich handelte es sich bei diesen offensichtlich ebenfalls monoaminergen Zellen um dopaminerge Endigungen.

Diese Ergebnisse dokumentieren die Lokalisation von VMAT2 und  $G\alpha_o2$  in serotonergen Projektionen im präfrontalen Cortex ausschließlich auf SSVs. Sie bestätigen damit die Ergebnisse zur subzellulären Verteilung in kultivierten Rapheneuronen. Im Gegensatz dazu ist die vorwiegende Lokalisation der VMATs in PC12 und BON Zellen auf LDCVs zu sehen.

Um diese morphologischen Ergebnisse auch funktionell zu bestätigen, wurde versucht, die Hemmung der vesikulären Monoaminaufnahme durch  $G\alpha_o2$  auch an isolierten synaptischen Vesikeln nachzuweisen. Hierfür wurde aus dem präfrontalen Cortex eine Vesikelpräparation (LP2) hergestellt, die sich hauptsächlich aus SSVs zusammensetzt (Huttner, 1983). Eine vollständige Aufreinigung der LP2 Präparation in Richtung kleiner synaptischer Vesikel war durch Immunisolierung über Synaptophysin möglich. Dies erschien jedoch nicht geeignet, da bei dieser Methode mit dem Verlust von regulatorischen Membrankomponenten, z.B. G-Protein Untereinheiten, zu rechnen ist (Ahnert-Hilger et al., 1994).

Auf den Vesikeln der LP2 Präparation ließen sich VMAT2 und  $G\alpha_o2$  ebenso wie das zur Kontrolle untersuchte Synaptophysin in der Immunoreplik-Analyse nachweisen. An den isolierten Vesikeln konnte schließlich direkt eine vesikuläre Serotoninaufnahme gemessen werden, die durch die Inkubation mit GMppNp oder  $G\alpha_o2$  stark gehemmt werden konnte.

Diese Daten belegen, daß die Regulation von VMAT2 durch  $G\alpha_o2$  auch für SSVs des ZNS zutrifft

## 4.8 Funktionelle Bedeutung der Regulation der vesikulären

### Monoaminaufnahme durch $G\alpha_2$

Die vorgestellten Ergebnisse der an der neuroendokrinen Zelllinie BON, neuronalen Primärkulturen der Raphe und Präparationen aus dem präfrontalen Cortex durchgeführten Experimente dokumentieren die Funktion von vesikelständigem  $G\alpha_2$  bei der Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme. In diesen monoaminergen Zellsystemen und Geweben existiert somit ein G-Protein-Effektor System, bei dem es zu einer Hemmung der Aktivität von VMAT1 und VMAT2 durch die  $\alpha$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins  $G\alpha_2$  kommt. Die Regulation der Transporteraktivität bleibt dabei nicht auf die Monoaminaufnahme in LDCVs beschränkt, sondern erfolgt auch auf SSVs von Neuronen.

Die Daten zur Histaminaufnahme in BON Zellen und Noradrenalinaufnahme in Rapheneurone bestätigten, daß es sich bei den untersuchten Transportvorgängen ausschließlich um die spezifische Akkumulation in sekretorischen Vesikeln handelte. Hiermit konnte ausgeschlossen werden, daß es nach Inkubation mit dem Tritium-markierten Transmitter zu einem Austausch mit dem bereits in den Vesikeln gespeicherten Transmitter (Serotonin) über den Transporter kam.

Die Hemmung der Aktivität vesikulärer Monoamintransporter durch  $G\alpha_2$  repräsentiert somit ein allgemeines Prinzip der Regulation dieses Transportprozesses durch ein Element der intrazellulären Signaltransduktion in peripheren neuroendokrinen Geweben und zentralnervösen Neuronen. Dieser Mechanismus reguliert in verschiedenen Spezies die Monoaminspeicherung in LDCVs und SSVs bzw. deren Analoga.

Unterschiedliche Funktionen der durch G-Proteine vermittelten Hemmung der Aktivität vesikulärer Monoamintransporter sind denkbar.

Eine wichtige Funktion könnte darin bestehen, über die Aktivität der Transporter den Füllungszustand der Vesikel zu beeinflussen. Die freigesetzte Transmittermenge bestimmt die postsynaptische oder hormonelle Antwort auf einen Stimulus. Sie stellt somit einen entscheidenden Parameter dar, der die Aktivität einer Synapse oder sekretorischen Zelle bestimmt. Die Variabilität des freigesetzten Transmitterquantums konnte bereits für monoaminerge sekretorische Vesikel nachgewiesen werden. So steigert der neurotrophe Faktor GDNF (glial-derived neurotrophic factor)

die quantale Freisetzung aus dopaminergen Neuronen etwa um das 4-fache (Pothos et al., 1998b). Durch die zusätzliche Gabe von L-DOPA, einer Vorstufe in der Dopamin-Synthese, konnte eine ähnlich starke Erhöhung der quantalen Freisetzung erzielt werden. In PC 12 Zellen dagegen führte die über D2-Autorezeptoren vermittelte Hemmung der Tyrosinhydroxylase-Aktivität zu einer verminderten quantalen Freisetzung (siehe Einleitung). Die präsynaptische Regulation der freigesetzten Transmittermenge dürfte besonders in neuromodulatorischen Systemen eine große Bedeutung besitzen, in denen es durch die sehr weiträumige Diffusion des Transmitters zu einer Beeinflussung einer hohen Anzahl postsynaptischer Neurone kommt. Ein Beispiel für eine solche für viele monoaminerge Systeme zutreffende „Überflutung“ postsynaptischer Zellen ist die Dopamin-Freisetzung aus den Neuronen des Nucleus accumbens (Garris et al., 1994). Auch die in nicht-monoaminergen Vesikeln gespeicherte Transmittermenge kann moduliert werden. So kommt es durch die Überexpression des Acetylcholintransporters auf SSVs zu einer deutlichen Steigerung des vesikulären Acetylcholingehalts bis auf das 10-fache (Song et al., 1997).

An der neuromuskulären Endplatte der Schlange (*Thamnophis sirtalis*) erfolgt eine aktivitätsabhängige Modifikation des Transmitterquantums. Nach andauernder Stimulation motorischer Nerven kam es in einer Population sekretorischer Vesikel zu einer Verringerung des freigesetzten Transmitterquantums, während die Transmittermenge einer anderen Population unverändert blieb (Searl et al., 1990). Interpretiert werden könnten die zwei unterschiedlich beladenen Vesikelpopulationen als zum Zeitpunkt der Stimulation bereits „fertige“ (gleichbleibender Acetylcholingehalt) bzw. im Verlauf der Stimulation neu gebildete (verringertes Acetylcholingehalt) Vesikel.

Die Regulation der Aktivität von VMAT1 und VMAT2 durch  $G\alpha_o$  könnte der Faktor sein, der den Füllungszustand monoaminerner Vesikel aktivitätsabhängig steuert und somit auch zur synaptischen Plastizität beiträgt.

Die generelle Bedeutung der Aktivität vesikulärer Monoamintransporter für den Füllungszustand sekretorischer Vesikel zeigt sich in transgenen Tieren, in denen die Gene für die Transporter funktionell ausgeschaltet worden sind. An isolierten Mastzellen aus Mäusen, die homozygot für die VMAT2 Deletionsmutante waren, ließ sich nach exozytotischer Membranfusion amperometrisch keine Monoaminsekretion



nachweisen (Travis et al., 2000). Zellen aus heterozygoten Tieren sezernierten eine geringere Menge an Histamin und Serotonin als die Wildtyp-Zellen. Während homozygote Tiere nach wenigen Tagen sterben, zeigen sich heterozygote Tiere sensibler gegenüber einigen Neurotoxinen oder Pharmaka, erreichen jedoch ohne gravierende Störungen das Erwachsenenalter (Takahashi et al., 1997).

Im Zusammenhang mit einer schnellen Wiederbeladung besonders der SSVs – hier erfolgt das lokale Recycling innerhalb von 1-2 min (Betz und Bewick, 1992) – könnte eine durch  $G\alpha_o2$  bewirkte Erhöhung der  $K_m$ -Werte der Transporter gesehen werden: Die vesikuläre Speicherung von Monoaminen repräsentiert einen hochaffinen Transportprozeß. Die  $K_m$ -Werte als Maß für die Affinität der Transporter zu den einzelnen Substraten liegen im niedrigen mikromolaren Bereich (siehe Einleitung). Sie stehen damit im Gegensatz zu den im millimolaren Bereich liegenden  $K_m$ -Werten der vesikulären Transportaktivitäten für Acetylcholin (Parson et al., 1993), Glutamat und GABA / Glyzin (Maycox et al., 1988; Burger et al., 1991). Als funktionelle Konsequenz dieser hohen Affinität geht die vesikuläre Monoaminspeicherung bereits bei sehr niedrigen Substratkonzentrationen in Sättigung über. Darin dürfte ein limitierender Schritt für die schnelle Wiederbeladung der SSVs bestehen. Eine Verringerung der Substrataffinität besonders von VMAT2 durch  $G\alpha_o2$  könnte den Mechanismus darstellen, der eine schnelle Wiederbeladung synaptischer Vesikel bei hohem Monoaminangebot ermöglicht.

Ein essentieller Aspekt der Regulation der vesikulären Monoaminaufnahme kann im Zusammenhang mit dem Schutz der Zelle vor toxisch wirkenden Substanzen gesehen werden. Da vor allem hohe Dopamin-Konzentrationen bzw. dessen oxidative Abbauprodukte toxisch auf mitochondriale ATPasen wirken (Rosenberg 1988), ist die Aufrechterhaltung einer niedrigen zytoplasmatischen Konzentration dieses Transmitters entscheidend für das Überleben der Zelle. Auch bezüglich anderer, pathophysiologisch bedeutsamer Substanzen wie Amphetamine, MPP<sup>+</sup>, Ethidium oder Rhodamin konnte für VMAT1 und VMAT2 eine Transportaktivität nachgewiesen werden (Yelin und Schuldiner, 1995). Das Substratspektrum ähnelt somit dem der phylogenetisch eng verwandten bakteriellen Toxin-exportierenden Transporterproteine (Schuldiner et al., 1995). Die Abwesenheit vesikulärer Monoamintransporter in periglomerulären dopaminergen Zellen des Bulbus

olfactorius (Peter et al., 1995) macht diese Neurone vermutlich zu den ersten vom Parkinson-Syndrom betroffenen Zellen (Daniel und Hawkes, 1992).

Eine durch  $G\alpha_2$  bewirkte Erhöhung der  $K_m$ -Werte der VMATs könnte die Zelle dazu befähigen, selbst hohe Konzentrationen toxischer Substanzen effektiv aus dem Zytoplasma zu entfernen.

Der Effekt einer selektiven Ausschaltung der Aktivität von vesikelständigem  $G\alpha_2$  auf den Organismus konnte bislang nicht demonstriert werden. Die Deletionsmutation des  $G\alpha$  Gens führte zu einer verringerten Lebenserwartung der Mäuse (Jiang et al., 1998). Auffällig sind dabei unterschiedliche neurologische Störungen, die zum teilweisen Verlust der motorischen Steuerung oder einer erhöhten Schmerzempfindlichkeit der homozygoten Tiere führen.

#### 4.9 Wie kommt es zur G-Protein-Aktivierung?

Verschiedene Mechanismen, die zu einer Aktivierung von  $G\alpha_2$ , und damit zu einer Hemmung der vesikulären Monoaminaufnahme führen, sind denkbar.

Möglicherweise existiert ein Sensor im Vesikelinneren, der den Transmittergehalt registriert und den Transportprozeß herunterreguliert, etwa wenn ein bestimmter Füllungszustand erreicht ist. Als Sensor könnte dabei ein vesikelständiger Transmembranrezeptor dienen, der ähnlich den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Plasmamembran über eine Interaktion mit einem Liganden (aus dem Vesikellumen) zur Aktivierung des G-Proteins führt. Bis jetzt ist lediglich ein Beispiel für ein Protein auf dem Endomembransystem bekannt, dessen Topologie dem eines heptahelikalen G-Protein-gekoppelten Rezeptors entspricht. Der KDEL-Rezeptor auf Membranen des Golgi-Apparates ist am Rücktransport löslicher Proteine zum endoplasmatischen Retikulum beteiligt (Scheel und Pelham, 1998).

Ein Auslöser für die Hemmung der vesikulären Aufnahme könnte sowohl ein volles, aber auch ein leeres Vesikel sein. Die Hemmung der Transporteraktivität eines leeren Vesikels könnte während der Biosynthese oder dem endozytotischen Recycling-Prozeß sekretorischer Vesikel sinnvoll sein. In beiden Fällen dürfte sich die Zusammensetzung des Vesikelinneren von dem eines „reifen“ Vesikels unterscheiden. Eine Beteiligung von vesikelständigen  $\alpha$ -Untereinheiten von  $G\alpha$  zumindest bei der Regulation der exozytotischen Membranfusion konnte in

chromaffinen und PC 12 Zellen nachgewiesen werden (Vitale et al., 1994; Ahnert-Hilger et al., 1998).

Alternativ dazu könnte es auch zu einer Aktivierung des G-Proteins durch zytoplasmatische Faktoren kommen. Denkbar wäre im bereits diskutierten Zusammenhang eine Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Substratkonzentration. Interessanterweise erfolgt die Aktivierung plasmamembranständiger G-Proteine der G<sub>o</sub>-Klasse nicht ausschließlich über Membranrezeptoren. Mit GAP43, einem in Wachstumskegeln von Neuriten aktiven Protein (Strittmatter et al., 1990), sowie dem Alzheimer Amyloid-Vorläufer Protein (Nishimoto et al., 1993) existieren zwei weitere bekannte Aktivatoren für G<sub>o</sub>.

Zwei verschiedene Modelle der Regulation des Füllungsstatus sekretorischer Vesikel werden diskutiert (Williams, 1997): Das „set point“ Modell geht von einem festgelegten Füllungsgrad des Vesikels aus, der nicht überschritten wird. Eine Veränderung der Aktivität vesikulärer Transporter würde demnach lediglich zu einer schnelleren oder langsameren Vesikelfüllung, nicht jedoch zu einer Veränderung der gespeicherten Transmittermenge führen. Das „steady state“ Modell geht hingegen von einem Fließgleichgewicht aus, das sich zwischen Transmitteraufnahme und einem Leck-Mechanismus der Vesikelmembran einstellt. In diesem Fall würde sich der Füllungsgrad des Vesikels abhängig von der Aktivität der Transporter auf unterschiedlichem Niveau einstellen. Die Ergebnisse, die eine Erhöhung des freigesetzten Transmitterquantums belegen (s.o.), würden sich unter der Annahme, daß die Größe des Vesikels unverändert bleibt, also nur mit dem „steady state“ Modell erklären lassen. Kommt es jedoch zu einer – möglicherweise aktivitätsabhängigen - Veränderung der Vesikelgröße, könnten diese Befunde jedoch auch mit dem „set point“ Modell erklärt werden.

Die in den Experimenten an Thrombozyten erhaltenen Befunde sprechen für eine Regulation der Transporteraktivität über den Füllungsstatus des Vesikels:

In Thrombozyten der Tryptophanhydroxylase-Deletionsmutante konnte zunächst keine Hemmung der Serotoninaufnahme durch GMppNp gemessen werden. Nach Vorinkubation der Thrombozyten mit Serotonin ließ sich jedoch eine Hemmung nachweisen, die der im Wildtyp beobachteten entsprach. Vermutlich kommt es in der Deletionsmutante über die Verarmung des Serotonin-Angebots zu einer chronischen

Entleerung der Speicherorganellen, die eine Hemmung der Transporteraktivität über den G-Protein-Mechanismus verhindert. Durch die Vorbeladung der Vesikel mit Serotonin, wodurch das System wieder in Richtung Wildtyp verschoben wurde, konnte also ein Zustand geschaffen werden, in dem die Regulation der Transporteraktivität durch  $G\alpha_2$  einsetzte. Eine Beteiligung zytoplasmatischer Faktoren bzw. der Substratkonzentration an der Regulation ist in diesem System durch die Permeabilisierung und das Waschen nach Vorinkubation mit Serotonin unwahrscheinlich.

#### **4.10 Ausblick**

Zu klären bleibt, ob es sich bei der Regulation der Transporteraktivität um eine direkte Interaktion der G-Protein Untereinheit mit dem Transporter handelt, oder ob die Hemmung über die Aktivierung zusätzliche Faktoren – möglicherweise Kinasen oder Phospholipasen – erfolgt. Experimente mit Methoden der Immunpräzipitation sowie chemischem „Crosslinking“ lieferten noch keine eindeutigen Ergebnisse. Ein weiterer interessanter Aspekt liegt in der Frage, ob die beschriebene Regulation durch  $G\alpha_2$  auch für die vesikuläre Speicherung anderer Transmitterstoffe, wie Acetylcholin, Glutamat oder GABA und Glyzin zutrifft.

## 5. Literaturverzeichnis

- Ahnert-Hilger G, Bhakdi S, Gratzl M (1985) Minimal requirements for exocytosis. A study using PC 12 cells permeabilized with staphylococcal alpha-toxin. *J Biol Chem* 260:12730-12734.
- Ahnert-Hilger G, Mach W, Fohr KJ, Gratzl M (1989) Poration by alpha-toxin and streptolysin O: an approach to analyze intracellular processes. *Methods Cell Biol* 31:63-90.
- Ahnert-Hilger G, Grube K, Kvols L, Lee I, Monch E, Riecken EO, Schmitt L, Wiedenmann B (1993) Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours contain a common set of synaptic vesicle proteins and amino acid neurotransmitters. *Eur J Cancer* 29A:1982-1984.
- 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, Kutay U, Chahoud I, Rapoport T, Wiedenmann B (1996) Synaptobrevin is essential for secretion but not for the development of synaptic processes. *Eur J Cell Biol* 70:1-11.
- 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.
- Aitken AR, Törk I (1988) Early development of serotonin-containing neurons and pathways as seen in wholemount preparations of the fetal rat brain. *J Comp Neurol* 274:32-47.
- Arriza JL, Kavanaugh MP, Fairman WA, Wu YN, Murdoch GH, North RA, Amara SG (1993) Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family. *J Biol Chem* 268:15329-15332.
- Arriza JL, Fairman WA, Wadiche JI, Murdoch GH, Kavanaugh MP, Amara SG (1994) Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J Neurosci* 14:5559-5569.
- Bauerfeind R, Jelinek R, Hellwig A, Huttner WB (1995) Neurosecretory vesicles can be hybrids of synaptic vesicles and secretory granules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7342-7346.
- Betz WJ, Bewick GS, Ridge RM (1992) Intracellular movements of fluorescently labeled synaptic vesicles in frog motor nerve terminals during nerve stimulation. *Neuron* 9:805-813.
- Bhakdi S, Weller U, Walev I, Martin E, Jonas D, Palmer M (1993) A guide to the use of pore-forming toxins for controlled permeabilization of cell membranes. *Med Microbiol Immunol Berl* 182:167-175.

- Bhakdi S, Tranum-Jensen J (1987) Damage to mammalian cells by proteins that form transmembrane pores. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 107:147-223.
- Brewer GJ (1995) Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. *J Neurosci Res* 42:674-683.
- Burger PM, Hell J, Mehl E, Krasel C, Lottspeich F, Jahn R (1991) GABA and glycine in synaptic vesicles: storage and transport characteristics. *Neuron* 7:287-293.
- Chabre M (1990) Aluminofluoride and beryllifluoride complexes: a new phosphate analogs in enzymology. *Trends Biochem Sci* 15:6-10.
- Chambaut Guerin AM, Rouher C, Gauthereau X (1997) p55 tumour necrosis factor receptors distribution in neuroblastoma cells. *Neuroreport* 8:1451-1456.
- Chubakov AR, Gromova EA, Konovalov GV, Sarkisova EF, Chumasov EI (1986) The effects of serotonin on the morpho-functional development of rat cerebral neocortex in tissue culture. *Brain Res* 369:285-297.
- Cohen NA, Sha Q, Makhina EN, Lopatin AN, Linder ME, Snyder SH, Nichols CG (1996) Inhibition of an inward rectifier potassium channel (Kir2.3) by G-protein betagamma subunits. *J Biol Chem* 271:32301-32305.
- Daniel SE, Hawkes CH (1992) Preliminary diagnosis of Parkinson's disease by olfactory bulb pathology. *Lancet* 340:186
- 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.
- De Camilli P, Jahn R (1990) Pathways to regulated exocytosis in neurons. *Annu Rev Physiol* 52:625-645.
- Desnos C, Laran MP, Langley K, Aunis D, Henry JP (1995) Long term stimulation changes the vesicular monoamine transporter content of chromaffin granules. *J Biol Chem* 270:16030-16038.
- Dimaline R, Struthers J (1996) Expression and regulation of a vesicular monoamine transporter in rat stomach: a putative histamine transporter. *J Physiol Lond* 490:249-256.
- Dumoulin A, Rostaing P, Bedet C, Levi S, Isambert MF, Henry JP, Triller A, Gasnier B (1999) Presence of the vesicular inhibitory amino acid transporter in GABAergic and glycinergic synaptic terminal boutons. *J Cell Sci* 112:811-823.
- Edelmann L, Hanson PI, Chapman ER, Jahn R (1995) Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *EMBO J* 14:224-231.
- Edwards RH (1992) The transport of neurotransmitters into synaptic vesicles. *Curr Opin Neurobiol* 2:586-594.
- Erickson JD, Eiden LE, Hoffman BJ (1992) Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 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 U S A* 93:5166-5171.
- Ferris CF, Stolberg T, Delville Y (1999) Serotonin regulation of aggressive behavior in male golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Behav Neurosci* 113:804-815.
- Fried G, Franck J, Brodin E (1988) Differential distribution of 5-hydroxytryptamine and substance P in synaptosomal vesicles of rat ventral spinal cord. *Neurosci Lett* 91:315-320.
- Garris PA, Ciolkowski EL, Pastore P, Wightman RM (1994) Efflux of dopamine from the synaptic cleft in the nucleus accumbens of the rat brain. *J Neurosci* 14:6084-6093.
- Guastella J, Nelson N, Nelson H, Czyzyk L, Keynan S, Miedel MC, Davidson N, Lester HA, Kanner BI (1990) Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. *Science* 249:1303-1306.
- Gudermann T, Nürnberg B, Schultz G (1995) Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function. *J Mol Med* 73:51-63.
- Hargrave PA, Hamm HE, Hofmann KP (1993) Interaction of rhodopsin with the G-protein, transducin. *Bioessays* 15:43-50.
- Huttner WB, Schiebler W, Greengard P, De Camilli P (1983) Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. *J Cell Biol* 96:1374-1388.
- Ikeda SR (1996) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380:255-258.
- Ishizuka J, Beauchamp RD, Townsend CM, Jr., Greeley GH, Jr., Thompson JC (1992) Receptor-mediated autocrine growth-stimulatory effect of 5-hydroxytryptamine on cultured human pancreatic carcinoid cells. *J Cell Physiol* 150:1-7.
- Iverfeldt K, Serfozo P, Diaz Arnesto L, Bartfai T (1989) Differential release of coexisting neurotransmitters: frequency dependence of the efflux of substance P, thyrotropin releasing hormone and [<sup>3</sup>H]serotonin from tissue slices of rat ventral spinal cord. *Acta Physiol Scand* 137:63-71.
- Iyengar R (1993) Molecular and functional diversity of mammalian Gs-stimulated adenylyl cyclases. *FASEB J* 7:768-775.
- Jahn R, Schiebler W, Ouimet C, Greengard P (1985) A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4137-4141.
- 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 U S A* 95:3269-3274.
- Johnson RG (1988) Accumulation of biological amines into chromaffine granules: a model for hormone and neurotransmitter transport. *Physiol Rev* 68: 232-307
- Jouvet M (1999) Sleep and serotonin: an unfinished story. *Neuropsychopharmacology* 21:24S-27S.
- Kalkbrenner F, Dippel E, Wittig B, Schultz G (1996) Specificity of interaction between receptor and G protein: use of antisense techniques to relate G-protein subunits to function. *Biochim Biophys Acta* 1314:125-139.
- Kavoussi R, Armstead P, Coccaro E (1997) The neurobiology of impulsive aggression. *Psychiatr Clin North Am* 20:395-403.
- Kehlenbach RH, Matthey J, Huttner WB (1994) XL alpha s is a new type of G protein [published erratum appears in *Nature* 1995 May 18;375(6528):253]. *Nature* 372:804-809.
- Knoth J, Zallakian M, Njus D (1981) Stoichiometry of H<sup>+</sup>-linked dopamine transport in chromaffin granule ghosts. *Biochemistry* 20:6625-6629.
- Krantz DE, Peter D, Liu Y, Edwards RH (1997) Phosphorylation of a vesicular monoamine transporter by casein kinase II. *J Biol Chem* 272:6752-6759.
- Krejci E, Gasnier B, Botton D, Isambert MF, Sagne C, Gagnon J, Massoulie J, Henry JP (1993) Expression and regulation of the bovine vesicular monoamine transporter gene. *FEBS Lett* 335:27-32.
- Kroesen S, Marksteiner J, Leitner B, Hogue Angeletti R, Fischer C, Winkler H (1996) Rat brain: distribution of immunoreactivity of PE-11, a peptide derived from chromogranin B. *Eur J Neurosci* 8:2679-2689.
- Ktistakis NT, Linder ME, Roth MG (1992) Action of brefeldin A blocked by activation of a pertussis-toxin-sensitive G protein. *Nature* 356:344-346.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lauder JM, Krebs H (1978) Serotonin as a differentiation signal in early neurogenesis. *Dev Neurosci* 1:15-30.
- Laugwitz KL, Allgeier A, Offermanns S, Spicher K, Van Sande J, Dumont JE, Schultz G (1996) The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:116-120.
- Leibowitz SF, Alexander JT (1998) Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight. *Biol Psychiatry* 44:851-864.
- Leopoldt D, Hanck T, Exner T, Maier U, Wetzker R, Nürnberg B (1998) Gbetagamma stimulates phosphoinositide 3-kinase-gamma by direct interaction with two domains of the catalytic p110 subunit. *J Biol Chem* 273:7024-7029.
- Lind I, Ahnert-Hilger G, Fuchs G, Gratzl M (1987) Purification of alpha-toxin from *Staphylococcus aureus* and application to cell permeabilization. *Anal Biochem* 164:84-89.



- Liu Y, Peter D, Roghani A, Schuldiner S, Prive GG, Eisenberg D, Brecha N, Edwards RH (1992a) A cDNA that suppresses MPP<sup>+</sup> toxicity encodes a vesicular amine transporter. *Cell* 70:539-551.
- Liu Y, Roghani A, Edwards RH (1992b) Gene transfer of a reserpine-sensitive mechanism of resistance to N-methyl-4-phenylpyridinium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:9074-9078.
- Liu Y, Schweitzer ES, Nirenberg MJ, Pickel VM, Evans CJ, Edwards R (1994) Preferential localization of a vesicular monoamine transporter to dense core vesicles in PC12 cells. *J Cell Biol* 127:1419-1433.
- Liu Y, Edwards RH (1997) The role of vesicular transport proteins in synaptic transmission and neural degeneration. *Annu Rev Neurosci* 20:125-156.
- Maycox PR, Deckwerth T, Hell JW, Jahn R (1988) Glutamate uptake by brain synaptic vesicles. Energy dependence of transport and functional reconstitution in proteoliposomes. *J Biol Chem* 263:15423-15428.
- Maycox PR, Hell JW, Jahn R (1990) Amino acid neurotransmission: spotlight on synaptic vesicles. *Trends Neurosci* 13:83-87.
- Mironov A, Colanzi A, Silletta MG, Fiucci G, Flati S, Fusella A, Polishchuk R, Mironov A, Jr., Di Tullio G, Weigert R, Malhotra V, Corda D, De Matteis MA, Luini A (1997) Role of NAD<sup>+</sup> and ADP-ribosylation in the maintenance of the Golgi structure. *J Cell Biol* 139:1109-1118.
- Naito S, Ueda T (1983) Adenosine triphosphate-dependent uptake of glutamate into protein I-associated synaptic vesicles. *J Biol Chem* 258:696-699.
- Nakanishi N, Onozawa S, Matsumoto R, Hasegawa H, Yamada S (1995) Cyclic AMP-dependent modulation of vesicular monoamine transport in pheochromocytoma cells. *J Neurochem* 64:600-607.
- Navone F, Jahn R, Di Gioia G, Stukenbrok H, Greengard P, De C (1986) Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. *J Cell Biol* 103:2511-2527.
- Neher E (1998) Vesicle pools and Ca<sup>2+</sup> microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* 20:389-399.
- Nelson N (1992) Structural conservation and functional diversity of V-ATPases. *J Bioenerg Biomembr* 24:407-414.
- Nicholls DG (1994) *Proteins, transmitters and synapses*. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK
- Nirenberg MJ, Liu Y, Peter D, Edwards RH, Pickel VM (1995) The vesicular monoamine transporter 2 is present in small synaptic vesicles and preferentially localizes to large dense core vesicles in rat solitary tract nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8773-8777.
- Nirenberg MJ, Chan J, Liu Y, Edwards RH, Pickel VM (1996) Ultrastructural localization of the vesicular monoamine transporter-2 in midbrain dopaminergic neurons: potential sites for somatodendritic storage and release of dopamine. *J Neurosci* 16:4135-4145.

- Nishimoto I, Okamoto T, Matsuura Y, Takahashi S, Murayama Y, Ogata E (1993) Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature* 362:75-79.
- Njus D, Kelley PM, Harnadek GJ (1986) Bioenergetics of secretory vesicles. *Biochim Biophys Acta* 853:237-265.
- Noel J, Ralph GS, Pickard L, Williams J, Molnar E, Uney JB, Collingridge GL, Henley JM (1999) Surface expression of AMPA receptors in hippocampal neurons is regulated by an NSF-dependent mechanism. *Neuron* 23:365-376.
- Nürnberg B, Spicher K, Harhammer R, Bosserhoff A, Frank R, Hilz H, Schultz G (1994) Purification of a novel G-protein alpha o-subtype from mammalian brain. *Biochem J* 300:387-394.
- Nürnberg B, Gudermann T, Schultz G (1995) Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 2. G proteins: structure and function [ published erratum appears in *J Mol Med* 1995 Jul;73(7):379]. *J Mol Med* 73:123-132.
- Parekh D, Ishizuka J, Townsend CM, Jr., Haber B, Beauchamp RD, Karp G, Kim SW, Rajaraman S, Greeley G, Jr., Thompson JC (1994) Characterization of a human pancreatic carcinoid in vitro: morphology, amine and peptide storage, and secretion. *Pancreas* 9:83-90.
- Parsons SM, Bahr BA, Rogers GA, Clarkson ED, Noremborg K, Hicks BW (1993) acetylcholine transporter-vesamicol receptor pharmacology and structure. *Prog Brain Res* 98:175-81
- 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.
- 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.
- Racke K, Schworer H, Agoston DV, Kilbinger H (1991) Evidence that neuronally released vasoactive intestinal polypeptide inhibits the release of serotonin from enterochromaffin cells of the guinea pig small intestine. *Acta Endocrinol Copenh* 124:203-207.
- Reetz A, Solimena M, Matteoli M, Folli F, Takei K, De Camilli P (1991) GABA and pancreatic beta-cells: colocalization of glutamic acid decarboxylase (GAD) and GABA with synaptic-like microvesicles suggests their role in GABA storage and secretion. *EMBO J* 10:1275-1284.

- Roghani A, Feldman J, Kohan SA, Shirzadi A, Gundersen CB, Brecha N, Edwards RH (1994) Molecular cloning of a putative vesicular transporter for acetylcholine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10620-10624.
- 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 dihydrotetabenazine binding. *Mol Pharmacol* 25:113-122.
- Schloss P, Puschel AW, Betz H (1994) Neurotransmitter transporters: new members of known families. *Curr Opin Cell Biol* 6:595-599.
- Schuldiner S, Shirvan A, Linial M (1995) Vesicular neurotransmitter transporters: from bacteria to humans. *Physiol Rev* 75:369-392.
- Searl T, Prior C, Marshall IG (1990) The effects of L-vesamicol, an inhibitor of vesicular acetylcholine uptake, on two populations of miniature endplate currents at the snake neuromuscular junction. *Neuroscience* 35:145-156.
- Slotboom DJ, Konings WN, Lolkema JS (1999) Structural features of the glutamate transporter family. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:293-307.
- Smiley JF, Goldman-Rakic PS (1996) Serotonergic axons in monkey prefrontal cerebral cortex synapse predominantly on interneurons as demonstrated by serial section electron microscopy. *J Comp Neurol* 367:431-443.
- 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 [published erratum appears in *Anal Biochem* 1987 May 15;163(1):279]. *Anal Biochem* 150:76-85.
- Soghomonian JJ, Descarries L, Watkins KC (1989) Serotonin innervation in adult rat neostriatum. II. Ultrastructural features: a radioautographic and immunocytochemical study. *Brain Res* 481:67-86.
- 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.
- Spicher K, Nürnberg B, Jäger B, Rosenthal W, Schultz G (1992) Heterogeneity of three electrophoretically distinct Go alpha-subunits in mammalian brain. *FEBS Lett* 307:215-218.
- Stecher B, Ahnert-Hilger G, Weller U, Kemmer TP, Gratzl M (1992) Amylase release from streptolysin O-permeabilized pancreatic acinar cells. Effects of Ca<sup>2+</sup>, guanosine 5'-[gamma-thio]triphosphate, cyclic AMP, tetanus toxin and botulinum A toxin. *Biochem J* 283:899-904.
- 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.
- Sternweis PC, Smrcka AV (1992) Regulation of phospholipase C by G proteins. *Trends Biochem Sci* 17:502-506.

- Strittmatter SM, Valenzuela D, Kennedy TE, Neer EJ, Fishman MC (1990) Go is a major growth cone protein subject to regulation by GAP-43. *Nature* 344:836-841.
- Südhof TC, Jahn R (1991) Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling. *Neuron* 6:665-677.
- Takahashi N, Miner LL, Sora I, Ujike H, Revay RS, Kostic V, Jackson Lewis V, Przedborski S, Uhl GR (1997) VMAT2 knockout mice: heterozygotes display reduced amphetamine-conditioned reward, enhanced amphetamine locomotion, and enhanced MPTP toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9938-9943.
- Townsend CM, Jr., Ishizuka J, Thompson JC (1993) Studies of growth regulation in a neuroendocrine cell line. *Acta Oncol* 32:125-130.
- 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 U S A* 97:162-167.
- Vitale N, Thierse D, Aunis D, Bader MF (1994) Exocytosis in chromaffin cells: evidence for a MgATP-independent step that requires a pertussis toxin-sensitive GTP-binding protein. *Biochem J* 300:217-227.
- Walter P, Johnson AE (1994) Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* 10:87-119.
- Wiedenmann B, Huttner WB (1989) Synaptophysin and chromogranins/secretogranins--widespread constituents of distinct types of neuroendocrine vesicles and new tools in tumor diagnosis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 58:95-121.
- Williams J (1997) How does a vesicle know it is full? *Neuron* 18:683-686.
- Worrall DM, Williams DC (1994) Sodium ion-dependent transporters for neurotransmitters: a review of recent developments. *J Biochem* 297:425-36
- Xu N, Voyno Yassenetskaya T, Gutkind JS (1994) Potent transforming activity of the G13 alpha subunit defines a novel family of oncogenes. *Biochem Biophys Res Commun* 201:603-609.
- Yelin R, Schuldiner S (1995) The pharmacological profile of the vesicular monoamine transporter resembles that of multidrug transporters. *FEBS Lett* 377:201-207.

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, Markus Höltje, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Markus Höltje

Berlin, den 19.06.2000

## **Danksagung**

Frau Prof. Dr. Gudrun Ahnert-Hilger möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas und die sehr angenehme und engagierte Betreuung der Arbeit danken., Herrn Prof. Dr. Harald Saumweber danke ich für die Begutachtung der Arbeit und die Vertretung vor dem Fachbereich Biologie. Ebenso gilt ein Dank Herrn PD Dr. Klaus Buchner für die Begutachtung der Arbeit.

Meinen Kollegen im Institut für Anatomie danke ich vor allem für die methodische Unterstützung und das gute Arbeitsklima. Namentlich gedankt seien: Thomas J., Ingrid, Anja, Dirk, Achim, Britta, Thomas S., Andreas, Christoph, Sandra und Evi.

Hartmut Hilger gebührt Dank für das Korrekturlesen der Arbeit.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich für die stetige Unterstützung in jeder Hinsicht.

Ein ganz besonderer Dank geht natürlich an Katharina.