

# **Gemeinsames Vorkommen von VGLUT und VGAT auf synaptischen Vesikeln und in inhibitorischen und exzitatorischen Nervenendigungen**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat.  
im Fach Biologie

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

**Dipl.-Biol. Johannes-Friedrich Zander**

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:  
Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:  
Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter:

1. Prof. Dr. Gudrun Ahnert-Hilger
2. PD. Dr. Matthias R. Hennig
3. Prof. Dr. Christian Rosenmund

**Tag der mündlichen Prüfung:** 23.7.2010



## Zusammenfassung

Synaptische Vesikel (SV) besitzen eine gemeinsame Proteinausstattung, die in Abhängigkeit des Nervenzelltyps bezüglich des Neurotransmittertransporters variiert. In glutamatergen Neuronen kommen die vesikulären Glutamattransporter (VGLUT)1, VGLUT2 und VGLUT3 vor. GABAerge Neurone verfügen über den vesikulären GABA-Transporter (VGAT). Die strenge Trennung der Glutamat- und GABA-Speicherung in unterschiedlichen Neuronen gewährleistet die exakte Funktionsweise neuronaler Netzwerke. Unter bestimmten Bedingungen weisen jedoch glutamaterge Neurone einem dualen Neurotransmitterphänotyp auf, der diese Neurone zur GABA-Freisetzung befähigt. Einige entscheidende Proteine GABAerger Nervenendigungen wurden auf Proteinebene und mRNA-Niveau nachgewiesen. GABAerge Transmission glutamaterger Neurone wurde anhand elektrophysiologischer Studien gezeigt.

Die vorliegende Arbeit untersucht das Ausmaß einer möglichen Kollokalisierung der VGLUT und VGAT. Zum Einsatz kommen die Immunisolierung von SV, Neurotransmitteraufnahmeversuche mit aufgereinigten und immunisolierten SV und die elektronenmikroskopische Postembedding-Methode. Immunisolierungen aus dem gesamten Gehirn der Ratte zeigen, dass die VGLUT1-SP VGLUT2 und die VGLUT2-SP auch VGLUT1 enthält. Beide VGLUTs kommen gemeinsam auf dem selben SV vor. Die VGLUT2-SP beinhaltet VGAT-tragende SV und in der VGAT-SP befindet sich VGLUT2. Transporterspezifische SPs aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien (P5, P15 und P30) zeigen in der frühen Entwicklungsphase eine ausgeprägte vesikuläre Kollokalisierung von VGLUT2 und VGAT. Immunisierte SVs sind zur Neurotransmitteraufnahme befähigt und damit funktionell intakt. SV der VGAT-SP akkumulieren neben GABA auch Glutamat. Die Hemmung von VGLUT offenbart ihren unterstützenden Einfluss auf die vesikuläre GABA- und Monoaminaufnahme. Damit moduliert die VGLUT-Aktivität die Neurotransmitterspeicherung in nicht glutamatergen Neuronen. Doppelmarkierungsversuche im Postembedding-Verfahren zeigen die synaptische Kollokalisierung der VGLUT und VGAT in glutamatergen hippocampalen und cerebellären Moosfaserendigungen. Dagegen ist VGAT weder in den ausschließlich VGLUT1-positiven cerebellären Parallelfaserendigungen noch in den ausschließlich VGLUT2-positiven Kletterfaserendigungen detektierbar. Die cerebellären GABAergen Korbzellenendigungen beinhalten auch VGLUT2. Diese Befunde liefern den morphologischen Beweis für die gemeinsame synaptische Freisetzung von GABA und Glutamat aus speziellen großen glutamatergen und GABAergen präsynaptischen Nervenendigungen.



## Abstract

Synaptic vesicles (SV) are equipped with a common set of proteins. Dependent on the type of nerve cell SV differ in their neurotransmitter transporters, i.e. the vesicular glutamate transporters (VGLUT) 1 and VGLUT2 in types of glutamatergic neurons and the vesicular GABA transporter (VGAT) in types of GABAergic neurons. The strict separation of glutamate and GABA storage generally guarantees the precise function of neuronal networks. However, GABA may be released by glutamatergic neurons under certain conditions as shown by electrophysiological studies.

The project aims to analyse the extent of a putative vesicular and synaptic co-localisation of VGLUTs and VGAT using immunoisolations, neurotransmitter uptakes assays, and post-embedding electron microscopy.

The immunoisolations from whole brain of adult rats revealed that VGLUT1 immunisolates contain VGLUT2 and VGLUT2 immunisolates also have VGLUT1 indicating the vesicular co-localisation of both VGLUTs. VGLUT2 immunisolates harbour in addition VGAT and VGAT immunisolates also contain VGLUT2. Transporter-specific immunisolations from rat brain at different postnatal levels (P5, P15 and P30) show a pronounced vesicular co-localisation of VGLUT2 and VGAT during these early developmental stages.

Transmitter uptake studies using glutamate and GABA proved the functional integrity of immunisolated vesicles. VGAT immunisolates concentrate glutamate in addition to GABA. Using the specific inhibitor trypan blue we found that VGLUT activity improves GABA as well as monoamine uptake into synaptic vesicles. Thus VGLUT activity modulates transmitter storage in non-glutamatergic neurons.

Post-embedding immunogold double labelling indicates a synaptic co-localisation of VGLUTs and VGAT in glutamatergic hippocampal and cerebellar mossy fibre terminals while VGAT was not seen in cerebellar parallel fibre (VGLUT1-positive only) and climbing fibre (VGLUT2-positive only) terminals. Remarkably, cerebellar GABAergic basket cell terminals also contain VGLUT2. These findings provide the morphological evidence for a synaptic co-release of GABA and glutamate from some glutamatergic and GABAergic terminals.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Informationsübertragung im Nervensystem . . . . .	1
1.2	Die Synapse . . . . .	1
1.3	Die Neurotransmitter . . . . .	2
1.4	Das synaptische Vesikel . . . . .	4
1.5	Ausgewählte vesikuläre Proteine . . . . .	5
1.5.1	Synaptophysin . . . . .	5
1.5.2	Rab5 . . . . .	5
1.5.3	Die vesikulären Glutamatttransporter . . . . .	6
1.5.4	Die vesikulären Transporter für inhibitorische Aminosäuren . . . . .	8
1.5.5	Die vesikulären Monoamintransporter . . . . .	9
1.5.6	Der vesikuläre Acetylcholintransporter . . . . .	10
1.5.7	Die vesikulären Transporter für exzitatorische Aminosäuren . . . . .	10
1.6	Der duale NT-Phänotyp von Synapsen . . . . .	10
1.7	Ziel der Arbeit . . . . .	11
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1	Materialien . . . . .	13
2.1.1	Feststoffe, Lösungen und Materialien . . . . .	13
2.1.2	Radioaktiv markierte Neurotransmitter . . . . .	15
2.1.3	Antisera und ihre Verdünnungen . . . . .	15
2.1.3.1	Primäre monoklonale Antikörper (Maus) gegen: . . . . .	15
2.1.3.2	Primäre polyklonale Antisera (Meerschweinchen) . . . . .	16
2.1.3.3	Primäre polyklonale Antisera (Kaninchen) . . . . .	16
2.1.3.4	Sekundär- und Verbindungsantikörper . . . . .	17
2.1.3.5	Kontrollpeptide . . . . .	17
2.2	Puffer/Lösungen . . . . .	17
2.2.1	Puffer für subzelluläre Fraktionierung . . . . .	17
2.2.2	Puffer für Westernblot und Immundetektion . . . . .	18
2.2.3	Puffer für BCA-Test . . . . .	19
2.2.4	Puffer für Dynabead-Beschichtung und Vesikelisolierung . . . . .	20
2.2.5	Puffer für Neurotransmitteraufnahme-Experimente . . . . .	21

2.2.6	Lösungen für die Elektronenmikroskopie . . . . .	21
2.2.6.1	Perfusion . . . . .	21
2.2.6.2	Einbettung in Lowycryl HM20 . . . . .	22
2.2.6.3	Kontrastierungsmittel: . . . . .	22
2.2.6.4	Lösungen für Postembedding-Prozeduren . . . . .	22
2.3	Geräte . . . . .	23
2.3.1	Subzelluläre Fraktionierung . . . . .	23
2.3.2	Immunisolierung . . . . .	24
2.3.3	Westernblot-Analyse . . . . .	24
2.3.4	Neurotransmitteraufnahme . . . . .	24
2.3.5	Elektronenmikroskopie . . . . .	24
2.4	Software . . . . .	24
2.5	Versuchstiere . . . . .	25
2.6	Methoden . . . . .	25
2.6.1	Präparation synaptischer Vesikel . . . . .	25
2.6.2	BCA-Test . . . . .	26
2.6.3	Proteingelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	26
2.6.4	Westernblot und Immundetektion . . . . .	27
2.6.5	Immunisolierung synaptischer Vesikel . . . . .	27
2.6.5.1	Dialyse des Linkerantikörpers (“Umpuffern”) . . . . .	28
2.6.5.2	Antikörperbeschichtung: M-500 Subcellular Beads . . . . .	28
2.6.5.3	Antikörperbeschichtung: Pan-Mouse-IgG-/M-280-Beads . . . . .	29
2.6.5.4	Immunisolierung synaptischer Vesikel . . . . .	29
2.6.6	Densitometrie . . . . .	30
2.6.7	Präadsorption der Antikörper . . . . .	31
2.6.8	Silberfärbung aufgetrennter Proteine . . . . .	32
2.6.9	Immunelektronenmikroskopische Analysen . . . . .	32
2.6.9.1	Gewebevorbereitung . . . . .	32
2.6.9.2	Gefriersubstitution . . . . .	32
2.6.9.3	Trimmen und Ultradünnschnitte . . . . .	33
2.6.9.4	Postembedding-Immungold-Markierung (PIM) . . . . .	33
2.6.9.5	Befilmen der Grids . . . . .	34
2.6.10	Neurotransmitteraufnahme in synaptische Vesikel . . . . .	34
2.6.10.1	NT-Aufnahme in SV der LP2-Fraktion . . . . .	34
2.6.10.2	NT-Aufnahme in immunisierte SV . . . . .	35
2.6.11	Quantitative Analyse der Immunsignale . . . . .	36
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> . . . . .	<b>37</b>
3.1	Anreicherung synaptischer Vesikelproteine . . . . .	37
3.2	Spezifität der Antikörper - Präadsorption . . . . .	37
3.3	Etablierung der Immunisierungstechnik . . . . .	38
3.3.1	Optimierung der Beadkonzentration . . . . .	39

3.3.2	Optimierung der Antikörpermenge . . . . .	40
3.3.3	Optimierung des Materialeinsatzes . . . . .	41
3.3.4	Kreuzreaktivität des Sekundärantikörpers . . . . .	42
3.3.5	Spezifität der Immunsolierung . . . . .	43
3.3.5.1	Immunsolierung im Präadsorptionstest . . . . .	43
3.3.5.2	Immunsolierung aus Syp-KO-Mäusen . . . . .	44
3.3.6	Optimierung der Immunsolierung gegen VGAT . . . . .	45
3.3.7	Optimieren der Negativkontrolle . . . . .	45
3.3.8	Effizienz der Immunsolierung . . . . .	46
3.3.9	Qualitative Unterschiede im Proteinbesatz der SP . . . . .	47
3.4	Vesikuläre Proteinausstattung . . . . .	48
3.4.1	Die NT-Transportersubpopulationen . . . . .	48
3.4.2	Allgemeine Proteinausstattung der SP . . . . .	49
3.4.3	Relative Häufigkeiten der SV-Proteine in den SPs . . . . .	50
3.5	Syp-SP versus Rab5-SP . . . . .	51
3.5.1	Qualitative Analyse . . . . .	51
3.5.2	Proteinhäufigkeiten auf der Syp- und Rab5-SP . . . . .	51
3.6	SPs aus verschiedenen Gehirnarealen . . . . .	53
3.6.1	SPs aus dem Cerebellum und Hippokampus . . . . .	53
3.6.2	SPs aus dem Cortex, Hirnstamm und Striatum . . . . .	54
3.7	NT-Transporterkolokalisation in verschiedenen Entwicklungsstadien . . . . .	55
3.7.1	Qualitative Analyse . . . . .	55
3.7.2	Quantitative Analyse . . . . .	56
3.8	Neurotransmitteraufnahme synaptischer Vesikel . . . . .	57
3.8.1	Neurotransmitteraufnahme in Vesikel der LP2-Fraktion . . . . .	57
3.8.2	Vesikuläre Subpopulationen aus der LS1-Fraktion . . . . .	58
3.8.3	5HT-Aufnahme in SV der Syp-SP . . . . .	58
3.8.4	NT-Aufnahme in transporterspezifische SP . . . . .	59
3.8.5	Keine GABA-Aufnahme der VGLUT2-SP . . . . .	60
3.8.6	Glutamataufnahme in die SV der Syp- und VGAT-SP . . . . .	61
3.8.7	Partielle Hemmung der GABA-Aufnahme . . . . .	62
3.8.8	Die Hemmung der Glutamatdecarboxylase und der VGLUT . . . . .	63
3.8.9	Einfluss des Chloridtransports der VGLUT auf die GABA-Aufnahme . . . . .	64
3.8.10	Vesikuläre Kolokalisation von VMAT2 und den VGLUT . . . . .	65
3.9	Veränderungen der vesikulären Proteinausstattung nach Stimulation . . . . .	66
3.10	NT-Transporterkolokalisationen auf synaptischer Ebene . . . . .	66
3.10.1	VGLUT1, VGLUT2 und VGAT in verschiedenen Synapsen . . . . .	68
3.10.2	Kolokalisationen auf synaptischer Ebene: Hippokampus . . . . .	70
3.10.3	Quantifizierung der Immungoldmarkierungen . . . . .	72
3.10.4	Kolokalisationen auf synaptischer Ebene: Cerebellum . . . . .	73
3.10.5	Schlussfolgerungen zu den EM-Untersuchungen . . . . .	74

<b>4 Diskussion</b>	<b>77</b>
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse . . . . .	77
4.2 Möglichkeiten und Grenzen der angewendeten Methoden . . . . .	78
4.2.1 Immunisolationstechnik . . . . .	78
4.2.1.1 Möglichkeiten: . . . . .	78
4.2.1.2 Grenzen: . . . . .	79
4.2.2 Neurotransmitteraufnahmeversuche . . . . .	79
4.2.2.1 Möglichkeiten: . . . . .	79
4.2.2.2 Grenzen: . . . . .	79
4.2.3 Elektronenmikroskopische Methoden . . . . .	79
4.2.3.1 Möglichkeiten: . . . . .	79
4.2.3.2 Grenzen: . . . . .	80
4.3 Vesikuläre Kolokalisation der NT-transporter . . . . .	80
4.3.1 Allgemeine vesikuläre Proteine . . . . .	80
4.3.2 Die Syp-SP . . . . .	81
4.3.3 Die VGLUT1-SP . . . . .	81
4.3.4 Die VGLUT2-SP . . . . .	82
4.3.5 Die VGAT-SP . . . . .	84
4.3.6 Energiebilanz der vesikulären Transporterkolokalisation . . . . .	85
4.3.7 Die Rab5-SP . . . . .	87
4.4 Synaptische Kolokalisation der NT-Transporter . . . . .	88
4.4.1 VGLUT1 und VGLUT2 in glutamatergen Neuronen . . . . .	88
4.4.2 VGAT in glutamatergen Neuronen . . . . .	89
4.4.3 VGLUT2 in GABAergen Neuronen . . . . .	90
4.4.4 VGLUT in monoaminergen Neuronen . . . . .	92
4.5 Offene Fragen und Ausblick . . . . .	94
<b>Abkürzungen</b>	<b>95</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>97</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Das synaptische Vesikel . . . . .	4
1.2	Sekundärstrukturen der VGLUTs . . . . .	7
1.3	Glutamattransport durch VGLUT1 . . . . .	7
1.4	VGAT-Sekundärstruktur . . . . .	8
1.5	Sekundärstruktur und Transportmechanismus von VMAT1/2 . . . . .	9
2.1	Subzelluläre Fraktionierung . . . . .	26
2.2	Immunisolation . . . . .	30
2.3	Prinzip der WB-Quantifizierung . . . . .	31
3.1	Anreicherung synaptischer Vesikel . . . . .	38
3.2	Präadsorptionstest . . . . .	39
3.3	Optimierung der Immunisolierung: Beadkonzentration . . . . .	40
3.4	Optimieren der Immunisolierung: Antikörpermenge . . . . .	41
3.5	Optimierung der Immunisolierung: Materialeinsatz . . . . .	41
3.6	Kreuzreaktivität der Sekundärantikörper . . . . .	43
3.7	Immunisolierung im Präadsorbktionstest . . . . .	44
3.8	Reinheit der Immunisolierung . . . . .	44
3.9	Optimierung der Immunisolierung gegen VGAT . . . . .	45
3.10	Optimierung der Negativkontrollen . . . . .	46
3.11	Effizienz der Immunisolierung . . . . .	47
3.12	Silberfärbung der SV-SP. . . . .	48
3.13	Vergleich der SPs bezüglich der NT-Transporter . . . . .	49
3.14	Vergleich der SP bezüglich allgemeiner SV-Proteine . . . . .	49
3.15	Relative Häufigkeiten der SV-Proteine: adult . . . . .	50
3.16	Vergleich verschiedener Kompartimente . . . . .	52
3.17	Quantitativer Vergleich der zwei Kompartimente . . . . .	52
3.18	SPs aus Cerebellum und Hippokampus . . . . .	53
3.19	SV-SP aus dem Cortex, Hirnstamm und Striatum . . . . .	54
3.20	Kolokalisation in Entwicklungsstadien . . . . .	55
3.21	Relative Häufigkeiten der SV-Proteine im P5-Stadium . . . . .	56
3.22	NT-Aufnahmen in SV der LP2-Fraktion . . . . .	57
3.23	Immunisolierungen aus der LS1-Fraktion . . . . .	58
3.24	5HT-Aufnahme der Syp-SP . . . . .	59

3.25	NT-Aufnahme an SP . . . . .	60
3.26	GABA-Aufnahme durch die VGLUT2-SP . . . . .	61
3.27	Glutamataufnahme an der Syp- und VGAT-SP . . . . .	61
3.28	Partielle Hemmung der GABA-Aufnahme . . . . .	62
3.29	Hemmung der GAD und VGLUT während der GABA-Aufnahme . . . . .	63
3.30	Einfluss des Cl <sup>-</sup> auf die GABA-Aufnahme . . . . .	64
3.31	Kolokalisation von VMAT2 und VGLUT . . . . .	65
3.32	Vesikuläre SPs nach Stimulation . . . . .	67
3.33	NT-Transporter in verschiedenen Synapsen . . . . .	68
3.34	Kolokalisationen der NT-Transporter: CA3-Region: MF-Synapsen . . . . .	71
3.35	Stärke der Immunmarkierung in den CA3-MFS. . . . .	72
3.36	Anzahl der Goldpartikel pro $\mu\text{m}^2$ . . . . .	73
3.37	Kolokalisationen in den cerebellären MF . . . . .	74
4.1	Schema der vesikulären Subpopulationen . . . . .	84
4.2	Schema der vesikulären Kolokalisation von VGLUT und VGAT . . . . .	86
4.3	VGAT und VGLUT2 in GABAergen cerebellären Korbzellen . . . . .	91

# Tabellenverzeichnis

1.1	Kriterien des synaptischen Neurotransmitterphänotyps . . . . .	3
1.2	Plasmamembrantransporter . . . . .	3
2.1	Zusammensetzungen der Trenngele . . . . .	19
2.2	Zusammensetzung des Sammelgels . . . . .	20
2.3	Zusätze für der NT-Aufnahmelösungen . . . . .	35
4.1	Zusammenfassung der Kolokalisationen . . . . .	93



# 1 Einleitung

## 1.1 Informationsübertragung im Nervensystem

Das Zentralnervensystem gewährleistet die adäquate Reaktion eines Organismus auf Umweltreize. Hauptaufgaben des Systems sind die Integration sensibler Reize aus dem Inneren und der Peripherie des Organismus, die motorische Koordination als auch die Regulation innerorganismischer Abläufe. Camillo Golgi und Ramón y Cajal identifizierten die über Synapsen vernetzten Neurone als die Grundbausteine des Nervensystems. Die Zahl der Neurone im menschlichen Gehirn wird auf  $10^{11}$  geschätzt. Ein typisches Neuron kann bis zu 2000 synaptische Kontakte eingehen und/oder von anderen Neuronen eine ähnlich große Zahl synaptischer Eingänge erhalten. Dabei kommunizieren die Nervenzellen mittels Botenstoffen – Neurotransmitter – miteinander, für die die Zielneurone spezifische Rezeptoren besitzen.

Eine ständige Anpassung des Organismus an wechselnde Umweltbedingungen setzt ein präzise ablaufendes und dennoch dynamisches System voraus. Die Synapse kann aktivitätsabhängig Form und Antwortigenschaften von Neuronen beeinflussen. Dieses Phänomen – die synaptische Plastizität – ist die Basis für Gedächtnisleistungen und das Lernen und schließt die Modulation synaptischer Kontakte ein. Dabei stehen Langzeit-Potenzierung (LTP, Lomo (1966)) und Langzeit-Depression (LTD) für den Mechanismus, wie das Gehirn Informationen speichert. Aber auch die kurzzeitige Bahnung bzw. Depression im Bereich von 10 bis 100ms setzt ein plastisches System voraus (als Überblick Koch (1997)).

## 1.2 Die Synapse

Die zelluläre Struktur für die Übersetzung von elektrischen in chemische Signale und umgekehrt ist die Synapse. Es werden zwei Synapsentypen unterschieden: die elektrische und die chemische Synapse. An *elektrischen Synapsen* findet die direkte Signalübertragung statt, indem Neurone durch Kanäle (gap junctions) eine elektrische Kopplung eingehen. An diesen Stellen erfolgt eine fast verzögerungs- und verlustfreie Reizleitung auf die Folgezelle.

An den *chemischen Synapsen* findet eine indirekte Signaltransmission statt, da der prä- und postsynaptische Bereich durch den synaptischen Spalt (20-40nm) getrennt sind. Die Präsynapse gewährleistet die Reizleitung über den synaptischen Spalt mit Hilfe von chemischen Neurotransmittern (NT).

## 1 Einleitung

Diese NTs werden präsynaptisch in synaptischen Vesikeln (SV) gespeichert. Durch das an der Präsynapse ankommende Aktionspotential werden als Folge einer Depolarisation der Plasmamembran spannungsabhängige Calciumkanäle geöffnet, woraufhin Calciumionen in die Synapse einströmen. Die ansteigende intrazelluläre Calciumkonzentration löst eine Fusion synaptischer Vesikel mit der präsynaptischen Plasmamembran aus. Es werden drei Theorien diskutiert, die das Binden (Exozytose) bzw. das Lösen (Endozytose) des SV zur Plasmamembran beschreiben: 1.) über den langsamen kompletten Endo-/Exozytosemechanismus (Jahn, 1999) oder über die schnellen Wege 2.) „*kiss and run*“ (Klingauf et al., 1998) und 3.) die clathrin- und dynamininvolvierte 1-Schritt-Vesikelknospung (Takei et al., 1996). In jedem Fall wird der NT aus den Vesikeln in den synaptischen Spalt entlassen. Die Menge des NT, die aus einem einzelnen Vesikel freigesetzt wird, wird als Quantum bezeichnet (del Castillo und Katz, 1954; Katz, 1971). Die ausgeschütteten Neurotransmittermoleküle diffundieren innerhalb von ca. 0,2ms bis zu mehrere hundert Mikrometer weit, und beeinflussen damit diffus ein relativ weiträumiges postsynaptisches Areal. An der Postsynapse wird das chemische Signal der Präsynapse in ein elektrisches Signal umgewandelt. Auf der postsynaptischen Membran sind ionotrope (direkte) bzw. metabotrope (indirekte) Rezeptoren lokalisiert. Diese Rezeptoren binden den NT spezifisch. Dadurch entstehen in der postsynaptischen Membran Poren bzw. werden Reaktionskaskaden ausgelöst. In Abhängigkeit der Quantenzahl des NT und des aktivierten Rezeptortyps kann die postsynaptische Membran eine Änderung in der Ionenpermeabilität und/oder eine Änderung in der biochemischen Aktivität erfahren. Ein einzelnes NT-Quantum ist nicht ausreichend, um eine postsynaptische Antwort auszulösen (Fatt und Katz, 1952; Van der Kloot, 2003). Die Kombination aus Neurotransmittertyp und postsynaptischem Rezeptor wirkt entweder exzitatorisch (Einstrom von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$ ) oder inhibitorisch (Einstrom von  $\text{Cl}^-$  und  $\text{K}^+$ ) auf die postsynaptische Zelle.

## 1.3 Die Neurotransmitter

Neurotransmitter sind kleine Aminosäuren oder neuroaktive Peptide, die von der Synapse eines Neurons ausgeschüttet werden und ein anderes Neuron oder Effektororgan in spezifischer Weise beeinflussen. Die Neurotransmittersynthese erfolgt entweder in der Nervenendigung (Aminosäuren) bzw. im Zellkörper (Peptide). Spezifische Enzyme die in die Synthese eines NT involviert sind, können als „Marker“ für den NT-Phänotyp eines Neurons genutzt werden (Tab. 1.1). Ein Molekül gilt als NT, wenn folgende Kriterien erfüllt sind: 1.) Seine Synthese muss im Neuron stattfinden und 2.) in der präsynaptischen Endigung lokalisiert sein und in ausreichender Menge ausgeschüttet werden, um an der Zielzelle oder dem Zielorgan eine entsprechende Reaktion auslösen zu können. 3.) Das exogene Applizieren eines NT in angemessenen Konzentrationen löst die gleichen Reaktionen wie ein endogener NT aus. Und 4.) muss ein Mechanismus vorhanden sein, der den NT von seinem Wirkort entfernt (Kandel et al., 1991). Folgende fünf NT-Klassen werden unterschieden: 1.) Zu den inhibitorisch wirkenden Aminosäuren zählen  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) und Glyzin, und 2.) zu den exzitatorischen zählen L-Glutamat und Aspartat. 3.) Einige Vertreter der biogenen Amine sind Acetylcholin, (Nor)Adrenalin, Dopamin und Serotonin, aber auch ATP und Adenosin. 4.) Unter die Stoffklasse der Neuropeptide, die hauptsächlich neuromodulatorisch wirken und axonal aus dem Soma zur Terminalie transportiert werden,

zählen unter anderem Endorphine, Enkephaline, Insulin, Substanz P, Oxytocin, Vasopression und Somatostatin. 5.) Auch lösliche Gase wie Stickstoff und Kohlendioxid können als Transmitter wirken. Neurotransmitterkolokalisationen klassischer Neurotransmitter und neuroaktiver Peptid treten ebenfalls auf (Abs. 1.6). Die NTs werden in dem selben Neuron synthetisiert und gemeinsam ausgeschüttet (Hökfelt et al., 1987). Der freigesetzte Neurotransmitter muss aus dem synaptischen Spalt

**Tabelle 1.1 – Kriterien zur Charakterisierung des synaptischen Neurotransmitterphänotyps** Diese Tabelle fasst die Marker der wesentlichen Synapsen zusammen, anhand derer der synaptische NT-Phänotyp bestimmt werden kann. 5HT=Serotonin, ChAT=Cholinacetyltransferase, DA=Dopamin, GDH=Glutamatdehydrogenase, Morphol.=Morphologie, TrH=Tryptophanhydroxylase, TyH=Tyrosinhydroxylase, VNNTT=vesikulärer NT-Transporter.

	Synapsentyp				
	cholinerg	GABAerg	glutamaterg	serotonerg	dopaminerg
<b>NT</b>	Acetylcholin	GABA/Glyzin	Glutamat	5HT	DA
<b>Enzym</b>	ChAT	GAD65/67	GDH	TyH	TrH
<b>VNNTT</b>	VACHT	VGAT	VGLUT	VMAT(1)/2	

entfernt werden, da die Synapse ansonsten in der Refraktärphase verbleiben würde. Das Entfernen des NTs geschieht entweder durch Diffusion aus dem synaptischen Spalt, durch enzymatischen Abbau (hauptsächlich in cholinergen Systemen durch die Acetylcholinesterase Liu und Edwards (1997)) oder durch den wohl häufigsten Mechanismus – den  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ionengradientengetriebenen Transport mittels Plasmamembrantransportern (Tab. 1.2). Die klassischen Transmitter Dopamin, GABA, Glyzin, Noradrenalin und Serotonin werden durch die entsprechenden  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -angetriebenen Plasmamembrantransporter in die synaptische Endigung zurücktransportiert. Im Gegensatz dazu wird Glutamat zuerst in die Astrozyten transloziert, dort zu Glutamin umgewandelt und anschließend in die Synapse zurücktransportiert (Tab. 1.2) (Robinson und Dowd, 1997). Die Inaktivierung neuroaktiver Peptide nach der Freisetzung erfolgt relativ langsam durch den proteolytischen Abbau extrazellulärer Peptidasen. Aufgrund des Syntheseortes neuroaktiver Peptide muss nach der Freisetzung dieser Peptide eine erneute Anlieferung aus dem Zellkörper erfolgen.

**Tabelle 1.2 – Plasmamembrantransporter (PMNTT).** Diese Tabelle fasst die wesentlichen Neurotransmitter und die entsprechenden NT-Transporter an der Plasmamembran zusammen. 5HT=Serotonin, AD=Adrenalin, DAT=Dopamintransporter, EAAT=Transporter für exzitatorisch wirkende Aminosäuren, GAT=GABA-Transporter, GLAST=Glutamatttransporter der Astrozyten, GLT=Glutamatttransporter, GLYT=Glyzintransporter, NET=Noradrenalintransporter, PM=Plasmamembran, SERT=Serotonintransporter, \* = an der astrozytären PM. Als Überblick Edwards (2007).

	Synapsentyp					
	cholinerg	GABAerg	glutamaterg	dopaminerg	serotonerg	
<b>NT</b>	ACh	GABA/Glyzin	Glutamat	(Nor)AD	DA	5HT
<b>PMNTT</b>	Cholin	GAT1-4 GLYT1-2	EAAT1-5 GLT1 GLAST*	NET	DAT	SERT

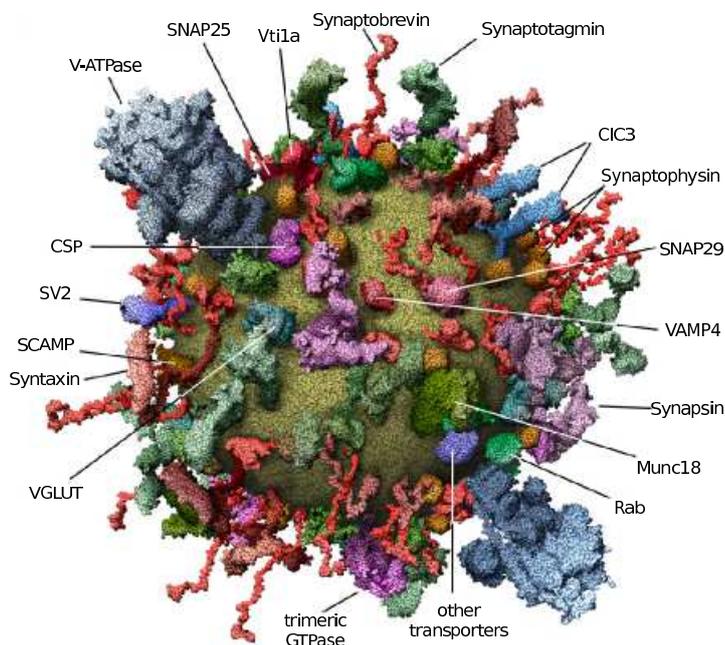
## 1.4 Das synaptische Vesikel

In fast allen Neuronen findet die Speicherung und Ausschüttung chemischer Neurotransmitter, aber auch der neuroaktiven Peptide, durch eine bläschenförmige Zellorganelle – das synaptische Vesikel (SV) – statt (Abb. 1.1). In Neuronen bzw. Synapsen sind zwei Vesikeltypen zu unterscheiden: die kleinen synaptischen Vesikel (small synaptic vesicles, SSV) und die großen, aufgrund ihres Proteingehalts, elektronendichten Vesikel (large dense-core vesicles, LDCV). Die Analoga in den neuroendokrinen Zellen wie z.B. in der Hypophyse werden „small synaptic-like micro vesicles“ (SLMV) und Granula (large dense-core granules) genannt. Darüber hinaus findet man sogenannte „small dense-core vesicles“ (SDCV) in Neuronen, die durch Hybridisierung aus den SSV und den LDCV entstehen können (Bauerfeind et al., 1995).

Damit das synaptische Vesikel befüllt werden kann, ist ein aktiver transportergestützter Prozess notwendig, der durch den elektrochemischen Gradienten ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) über die Vesikelmembran angetrieben wird. Für die Erzeugung und Aufrechterhaltung dieses Gradienten ist die ATP-verbrauchende V-ATPase zuständig, die das Vesikellumen durch Protoneneinstrom azidifiziert und damit auch positive Ladungen akkumuliert.

Die SVs werden in der synaptischen Endigung in drei Gruppen unterschiedlich schnell transmitterfreisetzungsbereiter SVs unterteilt, die nicht räumlich getrennt sein müssen: 1.) freisetzungsbereite Vesikel (Readily Releasable Pool = RRP, Birks und MacIntosh (1961)), 2.) rezirkulierende SVs (Recycling Pool) und 3.) Reservevesikel (Reservepool, RP) (als Überblick Rizzoli und Betz, 2005). Die Frei-

**Abbildung 1.1 – Das synaptische Vesikel.** Das synaptische Vesikel ist eine Zellorganelle in der Präsynapse, die zahlreiche Proteine, die in die Transmitterbeladung und die Endo-/Exozytose involviert sind, trägt. Das SV schützt den NT vor dem enzymatischen Abbau und entlässt den NT nach der Fusion mit der präsynaptischen Plasmamembran in den synaptischen Spalt. Nach endozytotischen Prozessen erfolgt eine Umorganisation der vesikulären Proteinausstattung und die erneute Neurotransmitterbeladung des SV. Nach dieser Wiedereingliederung in den Kreislauf steht es für einen weiteren Exo-/Endozytosezyklus zur Verfügung. Abbildung verändert nach Takamori et al. (2006).



setzung niedermolekularer Neurotransmitter ist ein exozytotischer Prozess aus kleinen synaptischen Vesikeln. Im Gegensatz zur Exozytose aus SVs, werden Peptide fast ausschließlich aus den LDCV entlassen. Biochemie und Beladungsmechanismen entsprechen denen der sekretorischen Granula. Die Fusion der LDCV ist jedoch in geringerem Maße an einzelne Aktionspotentiale gekoppelt (Neher, 1998) und findet präferentiell in einiger Entfernung zur aktiven Zone statt (als Überblick: De Camilli und

Jahn (1990)). Der Exozytose von SVs folgt ihre Rezyklierung durch die clathrinabhängige Endozytose und im Weiteren das Durchlaufen endosomaler Zwischenprodukte (Südhof, 2004). Aufgrund des Endozytose-Exozytose-Zyklus ist die Proteinausstattung des SV variabel (Takamori et al., 2006). Die umfangreichen Arbeiten von Takamori et al. bestimmten die grundsätzliche Zusammensetzung eines SV aus den folgenden Grundbausteinen: Proteine  $17,1 \cdot 10^{-18} \text{g/Vesikel}$ , Phospholipide  $8,8 \cdot 10^{-18} \text{g/Vesikel}$  und Cholesterin  $3,7 \cdot 10^{-18} \text{g/Vesikel}$ . Es ergibt sich eine hypothetische Gesamttrockenmasse eines SV von  $29,16 \cdot 10^{-18} \text{g/Vesikel}$ , von der ca. 67,5% auf Proteine zurückzuführen sind. Das SV trägt mehr als 80 Proteine (Morciano et al., 2005), wohingegen Clathrinvesikeln ca. 200 Proteine besitzen (Blondeau 2004), die in sehr unterschiedlicher Kopienzahl je Vesikel vorhanden sind (z.B. 1,4 Kopien der V-ATPase und 69,8 Kopien des Synaptobrevin; Takamori et al. (2006)).

## 1.5 Ausgewählte vesikuläre Proteine

### 1.5.1 Synaptophysin

Synaptophysin (Syp) wurde unabhängig von zwei Arbeitsgruppen als eines der ersten vesikulären Membranproteine entdeckt (Jahn et al., 1985; Wiedenmann und Franke, 1985). Zwei Isoformen des Proteins sind bekannt: Syp1 (Syp) und Syp2 (Synaptoporin, Sypor). Syp nimmt ca. 10% der gesamten Proteinmasse ein und ist mit rund 32 Kopien, neben Synaptobrevin (Syb), das zweithäufigste vesikuläre Protein (Takamori et al., 2006). Syp kommt auf allen SVs vor (Navone et al., 1986) und wird deshalb auch häufig als Marker für synaptische Vesikel verwendet. Trotz dieser hohen vesikulären Präsenz zeigen Deletionsmutanten keine phänotypischen Veränderungen. Zur Zeit wird davon ausgegangen, dass Syp regulatorische Funktionen in der Präsynapse übernimmt. So wurde gefunden, dass die synaptische Effizienz an der muskulären Endplatte durch eine Erhöhung der Kopienzahl des Proteins Syp mittels Transfizierung oder eine Verringerung durch einen Antisenseansatz erhöht bzw. erniedrigt wird. Des Weiteren interagiert Syp in reifen Neuronen mit Syb unter Ausbildung eines Syp-Syb-Komplexes (Edelmann et al., 1995; Becher et al., 1999). Dieser Komplex reguliert die Teilnahme des Syb am SNARE-Komplex, der für die Exozytose entscheidend ist. Ferner wurde vermutet, dass Syp für die Stabilität und starke Krümmung der vesikulären Membran verantwortlich ist. Syp ist am Transport und Andocken der SV an die Plasmamembran beteiligt (Scheller, 1995; Südhof, 1995). Weiterhin moduliert Syp die Aktivität des plasmamembranständigen GABA-Transporters GAT1 (Quick et al., 1997).

### 1.5.2 Rab5

Rab-Proteine sind kleine GTPasen, die den Transport der SV während der Exo- und Endozytose regulieren und an der Kontrolle des Andockens und der Fusion der SV an bzw. mit der Plasmamembran beteiligt sind. Rund 60 verschiedene Rab-Proteine, die spezifisch mit bestimmten Organellen oder

Kreisläufen assoziiert sind, wurden bisher identifiziert (als Überblick Ng und Tang, 2008).

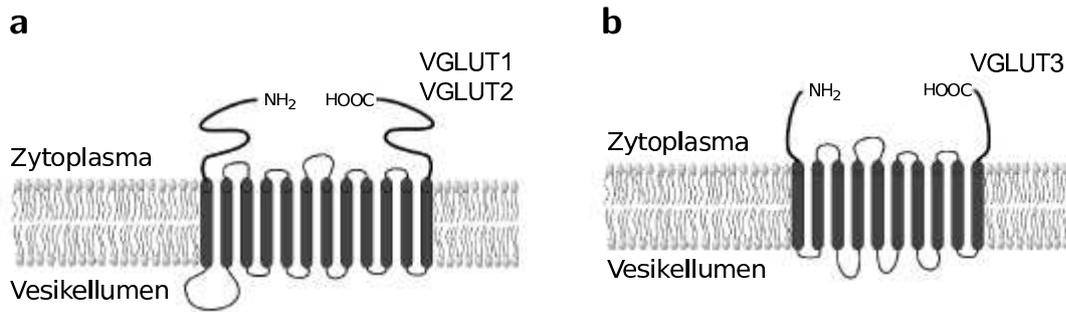
Rab5, als ein Mitglied dieser Proteinfamilie, hat ein Molekulargewicht von 25kDa und ist zytoplasmatisch vor Allem mit frühen Endosomen, seltener auch mit den SV assoziiert. Allgemein ist es in den endozytotischen SV-Transport von der Plasmamembran zu den frühen Endosomen involviert (Chavrier et al., 1990). Frühe Endosomen sind Kompartimente des endozytischen Membrantransportweges, mit denen Endozytosevesikel, nach Verlust des Clathrinmantels, fusionieren. Drei spezielle Funktionen für Rab5 in Neuronen und Gliazellen werden derzeit diskutiert: 1.) präsynaptisch und vesikulär lokalisiert gewährleistet es die Uniformität der SV, indem homotypische Fusionen verhindert werden (Shimizu et al., 2003), 2.) in Motorneuronen des Rückenmarks ist Rab5 präsynaptisch in den retrograden Transport und die endosomale Sortierung von Neurotrophinen und deren Rezeptoren involviert (Deinhardt et al., 2006) und 3.) ist Rab5 auch an dem endozytotischen Entfernen des AMPA-Rezeptors aus der postsynaptischen Membran während der Langzeitdepression beteiligt (Brown et al., 2005).

Rab5 dient häufig als Marker für die frühe Endosomen (Shimizu et al., 2003).

### 1.5.3 Die vesikulären Glutamattransporter

In allen Zellen spielt Glutamat eine wesentliche Rolle im Zellstoffwechsel und ist ein Bestandteil von Proteinen. L-Glutamat ist der häufigste exzitatorische Neurotransmitter im ZNS der Säugetiere. Die Beladung der SV mit Glutamat erfolgt spezifisch durch die vesikulären Glutamattransporter (VGLUT). Von diesem NT-Transportertyp sind drei Isoformen bekannt: VGLUT1 (Bellocchio et al., 2000; Takamori et al., 2000a), VGLUT2 (Hayashi et al., 2001; Fremeau et al., 2001; Takamori et al., 2001) und VGLUT3 (Gras et al., 2002; Schäfer et al., 2002; Takamori et al., 2002). Ursprünglich wurden VGLUT1 (Abb. 1.2a) jedoch als gehirnspezifischer (brain-specific  $\text{Na}^+$ -dependent inorganic phosphate cotransporter, BNPI, Ni et al. (1994)) bzw. VGLUT2 (Abb. 1.2a) als differentiationassoziiertes  $\text{Na}^+$ -abhängiger Phosphattransporter (differentiation-associated  $\text{Na}^+$ -dependent inorganic phosphate cotransporter, DNPI, Aihara et al. (2000)) beschrieben. Als Phosphattransporter transportieren VGLUT1/2 anorganisches Phosphat in das Zytoplasma der Präsynapse. Eine weitere Eigenschaft des VGLUT1 ist seine Fähigkeit,  $\text{Cl}^-$ -Ionen in das SV zu transportieren. Die optimalen extrazellulären  $\text{Cl}^-$ -Konzentrationen liegen hier bei 1-10mM (Naito und Ueda, 1985; Reimer et al., 2001; Schenck et al., 2009). Glutamat besitzt auch eine Funktion in der osmotischen Regulation hormonhaltiger Nervenendigungen (Kawasaki et al., 2005). VGLUT1 und VGLUT2 durchspannen die Vesikelmembran mit je zwölf Transmembrandomänen und die C- und N-Termini weisen ins Zytoplasma. Ein „Standard“-SV trägt jeweils zehn Kopien von VGLUT1 oder VGLUT2 (Takamori et al., 2006).

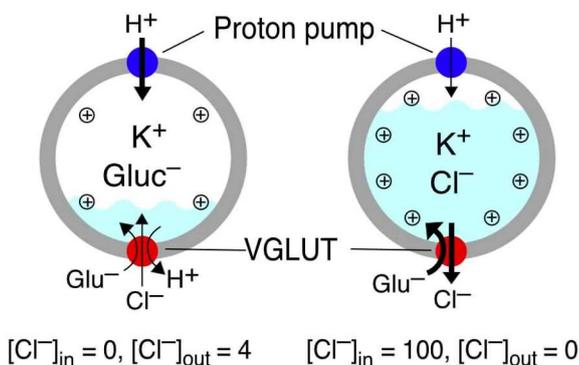
VGLUT1 und VGLUT2 sind hauptsächlich in glutamatergen Neuronen zu finden. Ihre Verteilung ist komplementär. VGLUT1 ist der am häufigsten exprimierte vesikuläre NT-Transporter im adulten Gehirn und lässt sich beispielsweise hauptsächlich im Hippokampus, Cortex und Cerebellum nachweisen (Fremeau et al., 2001). VGLUT2 ist dagegen im Hirnstamm, in den tiefen cerebellären Nuclei und im Thalamus/Hypothalamus detektierbar (Fremeau et al., 2001). Eine strenge Trennung von VGLUT1 und VGLUT2 auf zellulärer Ebene wurde in den Synapsen im cerebellären Cortex gefunden (Hioki et al., 2003). Beide Transporter können jedoch auch in bestimmten Entwicklungsstadien auf dem sel-



**Abbildung 1.2 – Sekundärstrukturen der VGLUTs.** Die angenommene Struktur von VGLUT1 und 2 (a) mit zwölf und für VGLUT3 (b) mit zehn Transmembrandomänen. C- und N-Terminus weisen ins Zytoplasma. Angepasst nach Liguz-Leczna und Skangiel-Kramska (2007).

ben SV vorkommen (Wojcik et al., 2004; Herzog et al., 2006; Nakamura et al., 2005).

VGLUT1 und VGLUT2 zeigen ähnliche Glutamataufnahmeeigenschaften (Bellocchio et al., 2000; Takamori et al., 2000a). Die halbmaximale Sättigung der Transporter ( $K_M$ -Wert) liegt bei 1-2mM Glutamat. Damit ist die Affinität dieser VGLUT zum Glutamat relativ niedrig (Edwards, 2007). Die VGLUTs (inklusive VGLUT3) können durch verschiedene Inhibitoren (häufig Farbstoffe) spezifisch gehemmt werden (Thompson et al., 2005; Patel et al., 2007). Die Neurotransmitteraufnahmeeigenschaften der drei VGLUT-Isoformen sind sehr ähnlich. Die nichtüberlappende Expressierung dieser Transporter im Gehirn gewinnt hinsichtlich der unterschiedlichen NT-Freisetzungswahrscheinlichkeiten an reinen VGLUT1- und VGLUT2-positiven Synapsen an Bedeutung (Takamori et al., 2001; Wojcik et al., 2004). Der Glutamattransport (Abb. 1.3) gewinnt seine Energie aus dem elektrochemischen



**Abbildung 1.3 – Glutamattransport durch VGLUT1.** Das Schema zeigt die vesikuläre Glutamataufnahme durch VGLUT1. Die Aufnahme wird durch den elektrochemischen Gradienten angetrieben. Die Glutamataufnahme der VGLUT hängt von der elektrischen Komponente ( $\Delta\Psi$ ) dieses elektrochemischen Gradienten ab. Das Vesikellumen wird durch diesen Gradienten positiv geladen und azidifiziert. Der VGLUT1 besitzt zusätzlich eine  $Cl^-$ -Transportfunktion. Die Abbildung verdeutlicht das Zusammenspiel der Transportsysteme bei unterschiedlichen intra- bzw. extraluminale  $Cl^-$ -Konzentrationen. Abbildung entnommen aus Schenck et al. (2009).

Gradienten ( $\Delta\mu H^+ = \Delta pH + \Delta\Psi$ ), der im Vesikellumen sowohl positive Ladungen konzentriert als auch das Innere azidifiziert. Dabei sind die VGLUTs in stärkerem Maße von  $\Delta\Psi$  als vom  $\Delta pH$  abhängig (Maycox et al., 1988, 1990). Für die Beladung der SV mit einem Molekül Glutamat wird mindestens ein  $H^+$  nach außen transportiert. Der vesikuläre Neurotransmitterfüllstand ist von der Transporteranzahl auf dem SV abhängig, wobei jedoch ein VGLUT-Molekül für eine vollständige Befüllung ausreicht (Daniels et al., 2006). Synaptische Vesikel sind jedoch nie komplett gefüllt, was durch die VGLUT1-Überexpressierung gezeigt werden konnte. Der Füllstand eines SV ist nicht entscheidend für seine Fusion mit der präsynaptischen Plasmamembran (Wojcik et al., 2004).

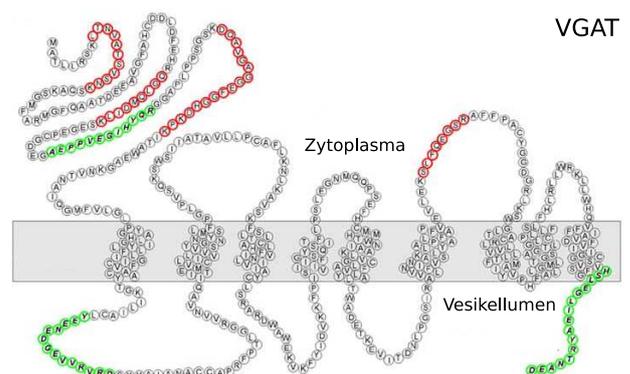
VGLUT1-Knockout-Mäuse besitzen Defizite in der glutamatergen Signalübertragung (Wojcik et al., 2004; Fremeau et al., 2004a; Balschun et al., 2009) und VGLUT2-Knockout-Mäuse sterben schon bei

der Geburt (Moechars et al., 2006; Wallén-Mackenzie et al., 2006). Das zeigt, dass VGLUTs essentiell für die glutamaterge Transmission sind.

VGLUT3 ist in cholinergen Interneuronen des ventralen und dorsalen Striatums (Gras et al., 2002), serotoninerger Neuronen der medialen und dorsalen Raphekerne und in GABAergen Interneuronen des Hippokampus und des cerebellären Cortex exprimiert (Herzog et al., 2004; Freneau et al., 2002). Dieser Transporter wirkt in diesen Synapsen wahrscheinlich als Kotransporter (Oliveira et al., 2003; Ahnert-Hilger et al., 2003). Weiterhin wurde von Gras et al. (2008) gezeigt, dass VGLUT3 zusammen mit dem VAcHT vesikulär kolokalisiert. Dadurch sind synergistische Effekte möglich, die eine Verbesserung der ACh-Aufnahme in diese Vesikel bewirken. VGLUT3 (Abb. 1.2b) besitzt im Gegensatz zu VGLUT1 und VGLUT2 zehn Transmembrandomänen und stimmt strukturell zu 75% mit den beiden VGLUTs überein. Der  $K_M$ -Wert von VGLUT3 liegt mit 0,6mM etwas niedriger als für VGLUT1/2, und die Glutamataufnahme hängt stärker vom  $\Delta$ pH ab (Gras et al., 2002). Seal et al. (2008) zeigten, dass VGLUT3-Knockout-Mäuse taub sind. Ferner haben diese Knockout-Mäuse nicht-convulsive Anfälle.

#### 1.5.4 Die vesikulären Transporter für inhibitorische Aminosäuren

Der häufigste inhibitorisch wirkende NT im ZNS ist GABA. Für die vesikuläre GABA-Beladung ist der vesikuläre GABA-Transporter (VGAT), auch als vesikulärer Transporter für inhibitorisch wirkende Aminosäuren (VIAAT) bekannt, verantwortlich (Abb. 1.4). Dieser Transporter akkumuliert neben GABA auch Glyzin in SV. VGAT wurde zuerst durch Sagné et al. (1997) in der Maus kloniert. Das VGAT-Molekül kommt wahrscheinlich zehnmal je Vesikel vor (vergleiche VGLUT, Takamori et al. (2006)). Neueste Erkenntnisse ergaben, dass sich die Topologie des VGAT mit neun Transmembrandomänen von der der anderen Transporter mit gerader Transmembrandomänenanzahl unterscheidet. Der C-Terminus weist ins Vesikellumen (Martens et al., 2008). VGAT wird in glyzinerger und GABAergen Neuronen exprimiert (Chaudhry et al., 1998; Wojcik et al., 2006). Die Affinität des VGAT zu



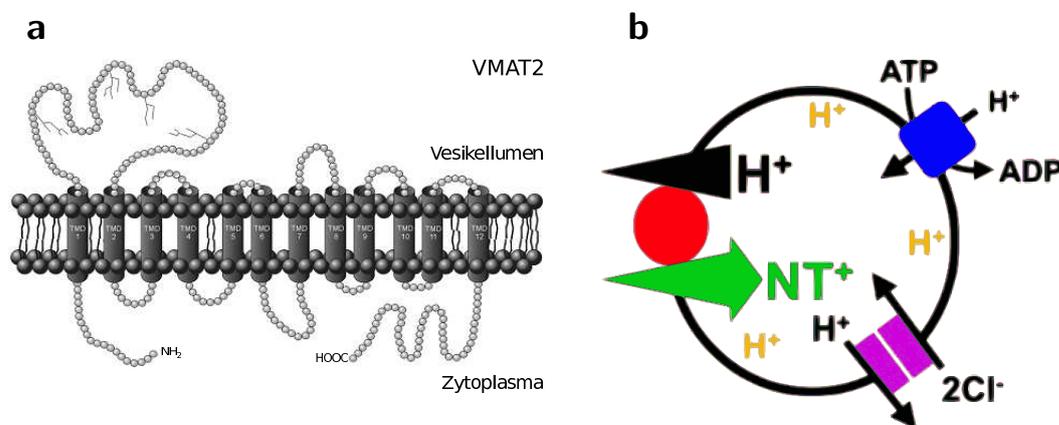
**Abbildung 1.4 – VGAT-Sekundärstruktur.** VGAT besitzt neun Transmembrandomänen und der C-Terminus reicht in das Vesikellumen. Angepasst nach Martens et al. (2008).

seinem Substrat GABA ist mit einem  $K_M$ -Wert von ca. 5mM niedriger als die der VGLUTs zu Glutamat (Edwards, 2007). Glyzin wird mit noch niedrigerer Affinität von diesem Transporter erkannt und kann die GABA-Aufnahme hemmen ( $IC_{50}=25mM$ ). Im Austausch für ein Proton (eventuell ähnlich wie bei den VGLUTs) wird ein GABA-Moleküle in das Vesikellumen transportiert (Johnson, 1988; Hell et al., 1990; Maycox et al., 1990; Reimer et al., 1998; Schuldiner et al., 1995). Der Transport

von GABA hängt zu ungefähr gleichen Teilen von  $\Delta\Psi$  und  $\Delta\text{pH}$  ab. Die vesikelmembranassoziierte Glutamatdecarboxylase-Isoform (GAD) 65 interagiert höchstwahrscheinlich mit dem VGAT, woraus eine erhöhte VGAT-Aktivität bzw. vesikuläre GABA-Beladung resultiert (Jin et al., 2003). Deshalb sind für VGAT geringere zytosolische GABA-Konzentrationen für die GABA-Aufnahme ausreichend. Die Abwesenheit von VGAT in VGAT-Knockout-Mäuse führt zu Sterblichkeit im Embryonalstadium, zu abdominalen Defekten und einer Gaumenspalte. Weiterhin bewirkt der Verlust von VGAT einen deutlichen Rückgang der synaptischen Übertragung sowohl an GABA- als auch an glyzinerger Neuronen (Wojcik et al., 2006).

### 1.5.5 Die vesikulären Monoamintransporter

Die Beladung der SV mit Monoaminen erfolgt durch die vesikulären Monoamintransporter (VMAT) 1 und 2 (Abb. 1.4a). Ursprünglich wurden diese Transporter in den chromaffinen Granula charakterisiert. VMAT1 kommt nicht im Gehirn vor und wurde zuerst in PC12 Zellen (Liu et al., 1992) und VMAT2 aus dem Rattengehirn kloniert (Liu et al., 1992, 1994; Erickson et al., 1996). Die VMATs kommen mit ca. zehn Kopien pro SV vor (Takamori et al., 2006). Beide Transporter besitzen ähnlich strukturelle Eigenschaften. So haben die VMATs zwölf Transmembrandomänen und C- und N-Terminus sind jeweils in das Zytoplasma gerichtet. Eine luminal Schleife mit drei (VMAT1) bzw. vier (VMAT2) Glykosylierungsstellen ist für die Regulation der Transporteraktivität zuständig (Henry et al., 1994). VMAT2 ist der dominante Transporter im Gehirn, kommt aber auch in Neuronen und anderen Zellen



**Abbildung 1.5 – Sekundärstruktur und Transportmechanismus von VMAT1/2.** (a) Beide Transporter besitzen zwölf Transmembrandomänen, eine zytoplasmatische Lokalisation des C- und N-Terminus und drei (VMAT1) bzw. vier (VMAT2) Glykosylierungsstellen. (b) Die Monoaminaufnahme der VMATs zeigt eine stärkere Abhängigkeit von der chemischen Komponente ( $\Delta\text{pH}$ ) des elektrochemischen Gradienten. VMATs transportieren zwei Protonen im Gegentausch mit einem protonierten NT-Molekül. (a) angepasst nach Liu und Edwards (1997) und (b) entnommen aus Edwards (2007).

der Körperperipherie (sympathische Neurone und enterochromaffine Zellen) sowie in Thrombozyten vor (Höltje et al., 2003). VMAT1 ist dagegen nur in der Peripherie zu finden (Hayashi et al., 1999). Beide Isoformen transportieren Serotonin, Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin mit  $K_M$ -Werten im mikro- (VMAT1) bis submikromolaren (VMAT2) Bereich (Edwards, 2007). Dabei werden zwei Protonen aus dem SV-Lumen gegen ein zytosolisches Monoamin ausgetauscht (Johnson et al., 1981; Knoth

et al., 1981; Schuldiner et al., 1995). VMAT2 hat eine zwei- bis dreimal höhere Affinität für Monoamine als VMAT1 und transportiert im Gegensatz zu VMAT1 auch Histamin (Peter et al., 1994; Erickson et al., 1996). Die Monoaminaufnahme der VMAT kann durch Reserpin, das auf der zytoplasmatischen Seite bindet, spezifisch gehemmt werden (Sano et al., 1958; Pletscher et al., 1962; Pletscher, 1976; Toll und Howard, 1980; Scherman und Henry, 1984). Ein weiterer je nach Tierart deutlich effektiverer Inhibitor ist Tetrabenazin (Peter et al., 1994; Erickson et al., 1996). Der Monoamintransport der VMAT ist im Gegensatz zu den VGLUT und dem VGAT hauptsächlich vom  $\Delta\text{pH}$  getrieben (Edwards, 2007). Bei VMAT2-Knockout-Mäuse ist die Monoaminspeicher im Gehirn dramatisch reduziert und es findet keine Monoaminausschüttung mehr statt (Fon et al., 1997; Takahashi et al., 1997). Folglich sterben diese Knockout-Tiere wenige Tage nach der Geburt.

### 1.5.6 Der vesikuläre Acetylcholintransporter

Acetylcholin wird durch den vesikulären Acetylcholintransporter (VACHT) in die SV transferiert. Dieser Transporter wurde erstmals in der Ratte kloniert. Der VACHT ist mit ca. zehn Molekülkopien pro SV vertreten (Takamori et al., 2006). Dieser Transporter besitzt zwölf Transmembrandomänen und ist genetisch mit den VMATs verwandt. VACHT kommt nur auf den kleinen SVs im peripheren Nervensystem und in zentralcholinergen Synapsen vor. Im Gegensatz zu den VMATs besitzt VACHT deutlich höhere  $K_M$ -Werte (im millimolaren Bereich). Bei dem VACHT-vermittelten Acetylcholintransport werden jeweils zwei Protonen aus dem Vesikellumen gegen ein zytosolisches Acetylcholinmolekül ausgetauscht (Schuldiner et al., 1995). Die VACHT-Aktivität ist stärker vom  $\Delta\text{pH}$  als vom  $\Delta\Psi$  getrieben und kann eine Synergie mit VGLUT3 eingehen (Edwards, 2007; Gras et al., 2008).

### 1.5.7 Die vesikulären Transporter für exzitatorische Aminosäuren

Ein Transporter, der erst in jüngster Zeit entdeckt wurde, ist Sialin. Dieser Transporter gehört in die Gruppe der vesikulären Transporter für exzitatorisch wirkende Aminosäuren (VEAT). Sialin hat eine zweifache physiologische Funktion. In Abhängigkeit von seiner Lokalisierung ist Sialin in hippocampalen Neuronen (in der CA1-Region) und den SLMV der Pinealozysten für die Glutamat- und Aspartatspeicherung verantwortlich. Aspartat ist eine exzitatorisch wirkende Aminosäure, die zusammen mit Glutamat gespeichert, aber nicht von den VGLUTs transportiert wird. In Lysosomen dagegen exportiert dieser Transporter  $\text{H}^+$ -gekoppelt Sialinsäure (Miyaji et al., 2008).

## 1.6 Der duale NT-Phänotyp von Synapsen

Das Postulat von Sir Henry Dale – „Dales Prinzip“ (Eccles et al., 1954) – besagt, dass ein Neuron nur eine einzige klassische Transmittersubstanz an all seinen Synapsen freisetzen kann (Dale, 1934, 1952). Eine Vielzahl von späteren Arbeiten, von denen hier nur einige Erwähnung finden sollen, machten

jedoch Anpassungen bzw. Erweiterungen dieses Prinzips notwendig.

Auf der *synaptischen* Ebene konnte die stimulationsabhängige Koausschüttung von Neurotransmittern und Neuropeptiden (Hökfelt et al., 1984) und weiteren neuroaktiven Substanzen gezeigt werden. Die Untersuchungen zur gemeinsamen Ausschüttung *klassischer* Neurotransmitter ergab zum Beispiel, dass PC12-Zellen ACh und Katecholamine zusammen freisetzen und periphere Neurone unter bestimmten Bedingungen ihren katecholaminergen Phänotyp in einen cholinergen verändern können (Greene und Rein, 1977). Ferner sind diese Neurone in der Lage Norepinephrin und ATP freizusetzen. Eine Koausschüttung von GABA, Glyzin und ACh konnte an Neuronen des Rückenmarks nachgewiesen werden (Furshpan et al., 1976). Dales Postulat musste erneut angepasst werden, als bekannt wurde, dass an unterschiedlichen Synapsen des selben Neurons in *Aplysia californica* sogar nichtklassische Neurotransmitter freigesetzt werden können (Sossin et al., 1990). Schließlich ergaben sich die ersten Hinweise, dass Monoamine und Glutamat aus nichtglutamatergen Neuronen gemeinsam freigesetzt werden können (Sulzer et al., 1998). Der hier involvierte NT-Transporter ist wahrscheinlich VGLUT3 (Boulland et al., 2004). VGLUT3 wird nicht nur in monoaminergen und cholinergen sondern auch in GABAergen präsynaptischen Endigungen des Hippokampus exprimiert (Fremeau et al., 2002). In der corticalen Schicht 5 wurden VGLUT1 und VGAT sowohl synaptisch als auch vesikulär kolokalisierend nachgewiesen (Fattorini et al., 2009).

In frühen Entwicklungsstadien hippocampaler Körnerzellen wurden neben glutamatergen auch GABAerge Marker gefunden (GABA, Bergersen et al. (2003); GAD67, Sandler und Smith (1991); Sloviter et al. (1996) und VGAT auf der mRNA-Ebene durch Single-Cell PCR Gómez-Lira et al. (2005)). Im adulten Gehirn geht der GABAerge Phänotyp der Körnerzellen des Hippokampus verloren, kann aber aktivitätsabhängig (durch epileptische Anfälle oder Überreizungen, Schwarzer und Sperk (1995)) vorübergehend wieder in Erscheinung treten (Gutiérrez (2000) und als Überblick Gutiérrez (2005)). Die Stimulierung dieser Zellen bewirkt sowohl glutamat- als auch GABA-vermittelte Antworten an den postsynaptischen Neuronen. Neueste Studien zeigten die Kolokalisation von VGLUT2 und VGAT in einer Subpopulation von Neuronen des Gyrus dentatus (Boulland et al., 2009). Eine gemeinsame Ausschüttung von Glutamat und GABA in den hippocampalen Moosfasersynapsen wird kontrovers diskutiert (Uchigashima et al., 2007). Ein Überblick über die Transmitter- und Transporterkolokalisationen liefern Sulzer und Rayport (2000); Gundersen (2008); Seal und Edwards (2006).

Neben der synaptischen Kolokalisierung konnten verschiedene Transporter auch auf dem selben SV nachgewiesen werden (Herzog et al., 2006; Gras et al., 2008).

## 1.7 Ziel der Arbeit

Die Vielzahl der Studien über Kolokalisationen von Neurotransmittern bzw. Neurotransmittertransportern auf den selben oder separaten Vesikeln oder in Synapsen zeigen deutlich, dass die Situation „ein Neuron – ein Neurotransmitter“, wie von Dale behauptet, nicht immer gilt. Ins Besondere wird derzeit kontrovers diskutiert, ob rein glutamaterge Nervenendigungen wie die Moosfasersynapsen der CA3-Region des Hippokampus auch zu einer GABAergen Transmission in der Lage sind. Diese Diskussion resultiert aus der Tatsache, dass in diesen Synapsen noch nicht alle notwendigen Komponenten

## 1 Einleitung

für die gemeinsame Beladung, Speicherung, den Transport und die Freisetzung von Glutamat und GABA auf der Proteinebene nachgewiesen wurden.

Zusätzlich ist zur Zeit noch nicht geklärt, ob ein SV *in vivo* mit zwei gegensätzlich agierenden Neurotransmittern beladen werden kann. Um weitere beteiligte Komponenten für einen dualen NT-Phänotyp dieser Synapsen zu finden, werden in der vorliegenden Arbeit folgende Ziele verfolgt:

1. Etablieren der Technik der Immunisolierung synaptischer Vesikel aus dem Gehirn bzw. aus Gehirnanaren der Maus und Ratte.
2. Nachweis vesikulärer Neurotransmittertransporter in vesikulären Subpopulationen.
3. Etablieren der Technik zur Neurotransmitteraufnahme in immunisierte Vesikel bzw. vesikuläre Subpopulationen.
4. Vergleich der Proteinausstattung unterschiedlicher präsynaptischer Organellen – den SV und frühen Endosomen.
5. Analyse der Kollokalisierung vesikulärer Neurotransmittertransporter in ausgewählten glutamatergen und GABAergen präsynaptischen Endigungen.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Feststoffe, Lösungen und Materialien

Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) (Sigma-Aldrich, München)  
Agar, reinst (Merck, Darmstadt)  
Ammoniumpersulfat (APS) (Sigma-Aldrich, München)  
Araldit CY 221 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)  
Ascorbinsäure (Sigma, Deutschland)  
(2,2-Azino-bis-[3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure]-di-Ammonium-Salz (ABTS) (Fluka Chemie GmbH, Steinheim)  
Bafilomycin A1 (Sigma-Aldrich)  
BCA Protein Assay Reagent A (Thermo Scientific)  
Bleizitrat ((Merck, Darmstadt)  
Borsäure (ICN Biomedicals Inc.)  
Bromphenolblau (Sigma-Aldrich, Deutschland)  
Dialyseschlauch 8mm Typ 8/32 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)  
Dithiothreitol (DTT) (Biomol, Deutschland)  
Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, Deutschland)  
Dynabeads M-280 Sheep anti-Mouse (Invitrogen, Deutschland)  
Dynabeads M-500 Subcellulare (Invitrogen, Deutschland)  
Dynabeads Pan-Mouse-IgG (Invitrogen, Deutschland)  
Enhanced Chemiluminescence (ECL) (GE Healthcare, München)  
Entwicklerlösung Bonimix (Blach-Röntgen, Assamstadt)  
Epon Beschleuniger DMP-30 (Fluka Chemie GmbH, Steinheim)  
Epon Härter MNA (Fluka Chemie GmbH, Steinheim)  
Epon Härter n-DDSA (Fluka Chemie GmbH, Steinheim)  
Ethanol (Herbeta Arzneimittel, Berlin)  
Ethyldiaminotetraazetat (EDTA) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)  
Fixierlösung Bonimix (Blach-Röntgen, Assamstadt)  
Formvar (Merck, Darmstadt)  
GABA (Sigma-Aldrich)

## 2 Materialien und Methoden

Gel-Blotting-Papier (VWR International, Darmstadt)  
Gelatinekapseln (Plano GmbH, Wetzlar)  
Glutaraldehyd (GA) (Fluka Chemie GmbH, Steinheim)  
Glycin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)  
Hämoglobin, Rind (Sigma, Deutschland)  
HEPES, N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (Biochrom, Berlin)  
n-Hexan (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)  
Hydroxypropyl Methacrylat (HPMA) (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)  
Nitrozellulose Membran, Hybond C (Amersham, GE Healthcare, München)  
3-Mercaptopropionsäure (MPA) (Aldrich)  
L-Glutaminsäure Monokaliumnitratsalz Monohydrat (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)  
Kaliumgluconat (Sigma, Deutschland)  
Ketamin (WDT, Deutschland)  
Kunstharz - Lowicryl HM20 (Polysciences, Warrington, PA)  
Kupfersulfat Pentahydrat (Merck, Darmstadt)  
Magermilchpulver für Western Blot (Molkerei Heideblume, Elsdorf)  
Maleinsäure (Fluka Chemie GmbH, Steinheim)  
Marker für niedermolekulare Proteine (LMW) (Fermentas, Deutschland)  
Medetomidin (Pfizer GmbH, Orion Pharma)  
Methanol (Merck, Darmstadt)  
Natriumazid (Aldrich, Deutschland)  
Natriumkarbonat (Sigma-Aldrich, Deutschland)  
Natriumdodecylsulfat (SDS) (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)  
Natriumthiosulfat (Sigma-Aldrich, Deutschland)  
Netzchen (200-Mesh Nickel-, Kupfernetzchen bzw. mit Schlitz) (Plano GmbH, Wetzlar)  
Nigericin (Sigma, Deutschland)  
Normales Ziegen Serum (NGS) (PAN Biotech GmbH, Aidenbach)  
Szintillatorlösung - Optiphase Hisafe 3 (Perkin Elmer LAS)  
Osmiumtetroxid (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)  
Paraformaldehyd (Electron Microscopy, Hatfield, PA)  
Phenylmethylsulfonfluorid (PMSF) (Sigma-Aldrich, Deutschland)  
Pikrinsäure (Fluka Chemie GmbH, Steinheim)  
Piperazin-N,N'-bis[2-ethansulfonsäure] (Pipes) (Sigma, Deutschland)  
Ponceau S (Sigma-Aldrich, München)  
Propylenoxid (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)  
Protease Inhibitor Cocktail (Pi) (Sigma-Aldrich, München)  
Reserpin (Sigma, Deutschland)  
Rinder-Serumalbumin (BSA), Fraktion V, pH 7,0 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)  
Rinder-Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, München)  
Rinder-Serum Albumin, acetyliert (BSA<sup>e</sup>) (Aurion, Wageningen, Niederlande)  
Rotiphorese Gel 40 (19:1) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

Saccharose (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)  
 Silbernitrat (Sigma, Deutschland)  
 TEMED, N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)  
 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol (Tris) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)  
 Triton X-100 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)  
 Trypan Blau (Sigma, Deutschland)  
 Tween-20 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)  
 Uranylacetat (Merck, Darmstadt)  
 Valinomycin (Sigma, Deutschland)

### 2.1.2 Radioaktiv markierte Neurotransmitter

L-[3,4-<sup>3</sup>H]-Glutaminsäure; spezif. Aktivität: 2,22TBq (60Ci)/mmol;  
 54fmol = 1000DPM; Moravsek Bio- and Radiochemicals, CA, USA  
 5-Hydroxy-[<sup>3</sup>H]-tryptamintrifluoroacetat; spezif. Aktivität: 4,7TBq (127Ci)/mmol;  
 78fmol = 1000DPM; GE Healthcare, München  
 4-Amino-n-[2,3-<sup>3</sup>H]buttersäure spezif. Aktivität: 3,22TBq (87Ci)/mmol;  
 37fmol = 1000DPM; GE Healthcare, München

### 2.1.3 Antiseren und ihre Verdünnungen

#### 2.1.3.1 Primäre monoklonale Antikörper (Maus) gegen:

Name	Verdünn./Akm.			Hersteller + Katnr.
	EM	II	WB	
$\alpha$ -Adaptin (Cl.AC1-M11)			1:2000	Dianova: MA3-061
NMDA-Rezeptor 1			1:5000	Synaptic Systems: 114 011
Rab5		0,5 $\mu$ g	1:5000	Synaptic Systems: 108 011
Synaptobrevin 2 (VAMP 2)			1:10000	Synaptic Systems: 104 211
Synaptogyrin (Cl. 80.1)				Synaptic Systems: 103 011
Synaptophysin 1		0,5 $\mu$ g	1:10000	Synaptic Systems: 101 001
Synatxin HPC-1			1:5000	Sigma: S0664
VGAT (Cl. 117G4)		1 $\mu$ g	1:2000	Synaptic Systems: 131 011
VGLUT1 (Cl. 317D5)		0,5 $\mu$ g		Synaptic Systems: 135 311
VGLUT1 (Cl. 317G6)		0,5 $\mu$ g		Synaptic Systems: 135 511
VGLUT2 (Cl. 321A8)		0,5 $\mu$ g		Synaptic Systems: 135 411
VGLUT2 (Cl. 234D6)		0,5 $\mu$ g		Synaptic Systems: 135 611

EM = Elektronenmikroskopie, II = Immunisolierung, WB = Westernblot, Verdünn.=Verdünnung,

A<sub>km</sub>=Antikörpermenge: A<sub>km</sub>/10<sup>7</sup> Beads (Pan-Mouse-IgG).

Für die Beschichtung der M-500 Subcellular Beads wurden 4μg der entsprechenden Antikörper je 10<sup>7</sup> Beads verwendet.

### 2.1.3.2 Primäre polyklonale Antiseren (Meerschweinchen)

Name	Verdünnungen			Hersteller + Katnr.
	EM	II	WB	
GLAST			1:5000	Chemicon: AB 1782
GLT1			1:5000	Chemicon: AB 1783
VGAT			1:2000	Chemicon International, Hampshire, UK
VGAT	1:50			Synaptic Systems: 131 005
VGLUT1	1:200			Synaptic Systems: 135 304
VGLUT2			1:5000	Chemicon International, Hampshire, UK
VGLUT3			1:2500	Chemicon International, Hampshire, UK

### 2.1.3.3 Primäre polyklonale Antiseren (Kaninchen)

Name	Verdünnungen			Hersteller + Katnr.
	EM	II	WB	
AP3 bzw. AP180			1:5000	Synaptic Systems: 155 003
Clathrin LCA H-55			1:1000	Santa Cruz Biotechnologies: Sc-28276
GAD65	1:100		1:5000	Chemicon: AB5082
GAD67	1:100		1:5000	Chemicon International Inc.
Rab5			1:5000	Stressgen: KAP-GP006
Synaptogyrin 1			1:10000	Synaptic Systems: 103 002
Synaptoporin			1:1000	Synaptic Systems: 102 002
Synaptophysin 1			1:11111	Synaptic Systems: 101 002
Synaptotagmin 1			1:5000	Synaptic Systems: 105 002
VGAT			1:2000	Synaptic Systems: 131 002
VGLUT1	1:100		1:10000	Synaptic Systems: 135 302
VGLUT2	1:100		1:10000	Synaptic Systems: 135 402
VGLUT3 C-Term.			1:2500	Synaptic Systems/R. Jahn
VGLUT3 N-Term.			1:2500	Synaptic Systems/R. Jahn
VMAT2			1:2000	Synaptic Systems:138 302

EM = Elektronenmikroskopie, II = Immunisolierung, WB = Westernblot

### 2.1.3.4 Sekundär- und Verbindungsantikörper

#### Westernblot:

peroxidase-markiert	Verdünnung	Hersteller
Ziege anti-Maus	doppPAk	Vector Lab., Burlingame, CA, USA
Pferd anti-Kaninchen	doppPAk	Vector Lab., Burlingame, CA, USA
Ziege anti-Kaninchen	doppPAk	Vector Lab., Burlingame, CA, USA
Ziege anti-Meerschweinchen	doppPAk	Dianova, Hamburg

doppPAk=halbe Konzentration der Primärantikörperverdünnung.

#### Immunisolierung:

unmarkiert	Verdünnung	Hersteller + Katnr.
Ziege anti-Maus IgG, Fc spezifisch	10 $\mu$ g	Sigma-Aldrich: M3534-1ML
Normales Maus IgG	0,5 $\mu$ g	Santa Cruz Biotechnol.: sc-2025

Die Sekundärantikörpermengen sind jeweils auf 10<sup>7</sup> Beads bezogen.

#### Elektronenmikroskopie:

goldmarkiert (5+10nm)	Verdünnung	Hersteller + Katnr.
Ziege gegen-Kaninchen	1:20	British Biocell, UK, EM.GAR5/10
Ziege gegen-Meerschweinchen	1:20	British Biocell, UK, EM.GAG5/10

### 2.1.3.5 Kontrollpeptide

Name	Hersteller + Katnr.
VGLUT1	Synaptic Systems: 135-3P
VGLUT2	Synaptic Systems: 135-4P
VGAT	Synaptic Systems: 131-0P

## 2.2 Puffer/Lösungen

### 2.2.1 Puffer für subzelluläre Fraktionierung

#### Saccharose-Puffer:

320mM Saccharose  
4mM HEPES/KOH pH 7,5

#### Homogenisierungspuffer:

Saccharose-Puffer

1 $\mu$ L/mL Pi

1mM PMSF

**Lyse-Puffer:**

ddH<sub>2</sub>O

10mM HEPES/KOH pH 7,5

1 $\mu$ L/mL Pi

1mM PMSF

## 2.2.2 Puffer für Westernblot und Immundetektion

**10x-TS-Puffer** (10-fache Stammlösung):

200mM Tris

1,5M NaCl

pH 7,5

**1x TS-Puffer:**

10x-TS-Puffer 1:10 mit Aqua dest. verdünnt

**TS/Tween-20:**

TS-Puffer

0,1% Tween-20

**Antikörper-Blocklösung:**

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

**Ammoniumpersulfat-Stammlösung:**

10% in ddH<sub>2</sub>O

**Blocklösung:**

5%(v/v) Magermilchpulver

Tween 20 (0,1% (v/v))

TS-Puffer

**Elektrophorese-Puffer (10-fach):**

250mM Tris

2M Glycin

35mM SDS

**Western Blot-Transferpuffer (Semi-Dry):**

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

**Probenpuffer nach Maniatis (4-fach):**

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

**Ponceau-S-Färbelösung:**

0,5% (w/v) Ponceau S  
 3% (v/v) Trichloressigsäure

**Tris 1:**

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

**Tris 2:**

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

**Tabelle 2.1 – Zusammensetzungen der Trenngele**

Trenngel [%]	12%	10%	8%
Tris 2	2,5mL	2,5mL	2,5mL
Akryl-/Bisakrylamid	3mL	2,5mL	2mL
dH <sub>2</sub> O	4,5mL	5mL	5,5mL
TEMED	5μL	5μL	5μL
APS	50μL	50μL	50μL

**2.2.3 Puffer für BCA-Test****Lösung B:**

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

**Tabelle 2.2 – Zusammensetzung des Sammelgels**

<b>Sammelgel [%]</b>	<b>4%</b>
Tris 1	1,25mL
Akryl-/Bis-Acrylamid	0,5mL
dH <sub>2</sub> O	3,25mL
TEMED	2,5 $\mu$ L
APS	25 $\mu$ L

### 2.2.4 Puffer für Dynabead-Beschichtung und Vesikelisolierung

#### **Borat-Puffer:**

0,1M Borsäure  
pH 9,5

#### **0,1M Phosphat-Puffer (PB):**

2,62g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O  
11,5g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
pH 7,4  
auf 1000mL auffüllen

#### **Phosphat-gepufferte Saline (PBS):**

0,88g NaCl  
100mL 0,01M Phosphat-Puffer

#### **PBS + NaN<sub>3</sub>:**

10mL PBS  
0,02% NaN<sub>3</sub> (0,002g)

#### **PBS/BSA:**

0,1% (w/v) BSA auf 80mL PBS (siehe oben)  
mit 0,01M Phosphat-Puffer auf 100mL auffüllen  
pH 7,4

#### **Tris/BSA:**

0,2M Tris  
0,1% (w/v) BSA  
pH 8,5

#### **Puffer A für Vesikelisolierung:**

PBS, pH 7,4  
2 mM EDTA

5% BSA (w/v)

## 2.2.5 Puffer für Neurotransmitteraufnahme-Experimente

### **KG3-Puffer:**

150mM Kalium-Glutamat

20mM Pipes

4mM EGTA

2mM ATP (Natriumsalz)

2,871mM MgCl<sub>2</sub> (d.h., 1mM freies Mg<sup>2+</sup>)

pH 7,0

### **KGC3-Puffer:**

150mM Kalium-Gluconat

20mM Pipes

4mM EGTA

2mM ATP (Natriumsalz)

2,871mM MgCl<sub>2</sub> (d.h., 1mM freies Mg<sup>2+</sup>)

pH 7,0

### **KG-50mM-KCl:**

100mM Kalium-Glutamat

50mM KCl

20mM Pipes

4mM EGTA

2mM ATP (Natriumsalz)

2,871mM MgCl<sub>2</sub> (d.h., 1mM freies Mg<sup>2+</sup>)

pH 7,0

## 2.2.6 Lösungen für die Elektronenmikroskopie

### 2.2.6.1 Perfusion

#### **Perfusionsfixanz:**

0,1M Natriumphosphatpuffer (NaPB), pH 7,4

4% Paraformaldehyd

0,05% Glutaraldehyd

0,2% Pikrinsäure

### 2.2.6.2 Einbettung in Lowycryl HM20

#### 0,1M Phosphatpuffer (PB):

19mL von 0,2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

81mL von 0,2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

pH 7,4

#### 0,1M PBS:

8g NaCl

0,2g KCl

1,44g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH 7,45

#### 0,05M Tris-Maleat-Puffer:

50mL von 24,2g/L Tris und 23,2g/L Maleinsäure

54mL von 0,2 n NaOH

ddH<sub>2</sub>O

pH 7,4

#### Saccharose-Tris-Maleat-Puffer:

0,05M Trismaleat-Puffer

0,5M, 1M, 1,5M bzw. 2M Saccharose

### 2.2.6.3 Kontrastierungsmittel:

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

Bleizitrat nach Reynolds (REYNOLDS, 1963)

### 2.2.6.4 Lösungen für Postembedding-Prozeduren

#### 1x PBS:

8 g NaCl

0,2 g KCl

1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
in 800 mL  $\text{dH}_2\text{O}$   
pH 7.4 mit HCl. Mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1L. Sterilisieren.

**PBST-Puffer:**

1x PBS buffer  
0,001% Tween 20 (Stock 1% in PBS)  
0,001% Triton X-100 (Stock 1% in PBS)

**Blockpuffer und 1-AB-Puffer:**

PBST-Puffer  
2% BSA  
5% NGS

**2-AB-Puffer:**

PBST buffer  
0,5% BSA<sup>C</sup>

## 2.3 Geräte

### 2.3.1 Subzelluläre Fraktionierung

Binokular (Charité, Berlin)  
Guillotine (Udo Basile, Biological Research Apparatus, Italien)  
Homogenisator Rotor (VWR, Heidolph RZR 2021, Deutschland)  
Hand-Homogenisator, Spaltmaß 0,1 - 0,15mm (Wheaton, Potter-Elvehjem, Fisher Scientific GmbH, Schwerte)  
Kaltlichtlampe KL 1500 LCD (Schott AG, Mainz)  
Mikrotiterplatte, 96 Kavitäten (Falcon)  
Nadel, 23 und 27G Microlance (BD, Spanien)  
Rotor TLA 100.4 (Beckman Coulter GmbH, Krefeld)  
Spektrophotometer HT2 (Anthos Mikrosysteme, Krefeld)  
Zentrifuge. Centrifuge 5471C (Eppendorf, Hamburg)  
Zentrifuge, Optima MAX Ultracentrifuge (Beckman Coulter GmbH, Krefeld)

### **2.3.2 Immunisolierung**

Magnet: Dynal MPC-S (Invitrogen, Dynal Biotech: 120.20)

Probenmischer, Dynal Sample Mixer MX1 (Invitrogen, Deutschland)

### **2.3.3 Westernblot-Analyse**

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

Gelkammern Mini-PROTEAN 3 Cell (Biorad)

PowerPac HC (Biorad)

Scanner:

- CanoScan 8800F (Canon)

- ScanMaker 4800 (Microtek)

Trans-Blot SD, SemiDry-Transfer Cell (Biorad)

### **2.3.4 Neurotransmitteraufnahme**

Optima TL Ultracentrifuge (Beckman Coulter)

Rotor TLA 120.1 (Beckman Coulter)

Spektrophotometer MR5000 (Dynatech)

Szintillator LS6500 (Beckman Coulter)

Thermomixer (Eppendorf 5436)

### **2.3.5 Elektronenmikroskopie**

Elektronenmikroskop ZEISS EM900 mit integrierter Digitalkamera

Gefriersubstitutionsapparatur (Leica EM AFS, Austria)

Ultra-Mikrotom Ultracut S (Leica)

## **2.4 Software**

LabImage 1D 2006 (Kapelan BioImaging GmbH, Halle/Saale)

LabVIEW 6.1 (National Instruments)

Soft Imaging Viewer (Soft Imaging Systems GmbH)

EsiVision Pro 3.2 (Soft Imaging Systems GmbH)

## 2.5 Versuchstiere

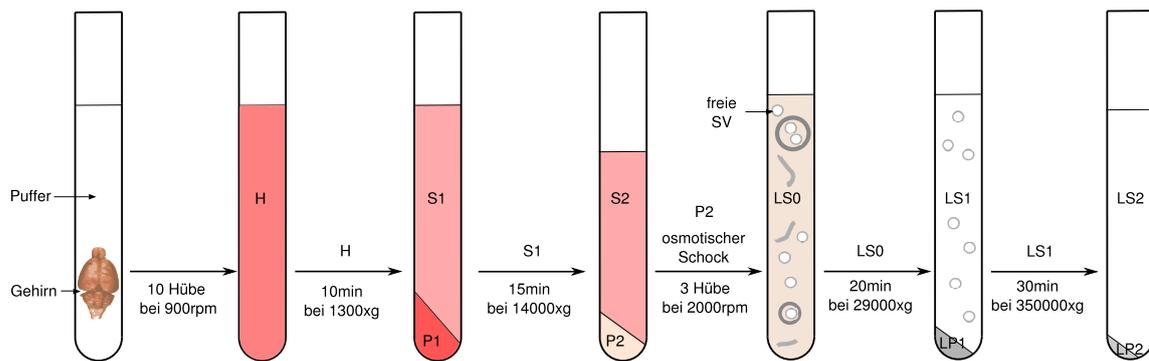
Weibliche Ratten (Stamm: Wistar) wurden von der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM), dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), der Firma Charles River Laboratories International, Inc. oder der Firma Harlan Winkelmann GmbH bezogen. Sie wurden bis zu den Versuchen bei ca. 22°C und einem Tag-Nacht-Zyklus (12h:12h) im Tierstall des Instituts gehalten. Das Zucht- bzw. Haltungsfutter stand für die Tiere *ad libitum* zur Verfügung. Für einige Versuche wurden Wildtypmäuse (WT-Mäuse) des Stammes NMRI (Harlan Winkelmann) und für den Vergleich WT gegen Knockout (KO) wurden WT-Mäuse des Stammes Black 6 (FEM) verwendet. Die  $G_{\alpha 2}^{-/-}$  Mäuse wurden von Prof. Dr. Lutz Birnbaumer, die  $G_{\alpha}^{-/-}$  Mäuse von Prof. Dr. Stefan Offermann, die  $Syp^{-/-}$  Mäuse von Prof. Dr. Thomas Südhof und die Ratten nach "Kindling" von Prof. Dr. Uwe Heinemann freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

Unter Beachtung des Tierschutzgesetzes wurde versucht, im Rahmen der Möglichkeiten, das Versuchsdesign auf ein Minimum an Tiertötungen anzupassen.

## 2.6 Methoden

### 2.6.1 Präparation synaptischer Vesikel

Die Fraktionierung eines Mäuse- bzw. Rattengehirns bzw. der Gehirnareale (Abb. 2.1) erfolgte auf Eis nach einem abgewandelten Protokoll von (Nagy et al., 1976) und (Huttner et al., 1983). Danach wurde das Tier mit Diethylether betäubt und anschließend mittels einer Guillotine dekapitiert. Bei der Verwendung von Mäusen wurden diese durch zerivkale Dislokation getötet. Die Schädelkalotte wurde mit zwei Schnitten entlang der Schädelnähte geöffnet und nach oben aufgeklappt, um das Gehirn freizulegen. Das Gehirngewebe wurde (meist ohne Bulbi olfactorii) entnommen und sogleich in eiskalten Homogenisierungspuffer aufgenommen. Die Präparation der Gehirnareale (Cerebellum, Cortex, Hippokampus, Hirnstamm und Striatum) erfolgte unter einem Binokular auf einem Kühlblock. Das entnommene Gewebe wurde anschließend in entsprechend reduziertem Volumen des Homogenisierungspuffers aufgenommen. Anschließend wurde das Gehirn in einem Homogenisator (Wheaton, Potter-Elvehjem, Spaltmaß 0,1 - 0,15mm) mit 10 Hüben bei 900rpm homogenisiert (Homogenat = H). In einem ersten Zentrifugationsschritt ( $1358xg_{max}$ , 10min, 4°C, Optima MAX Ultracentrifuge, Rotor TLA- 100.4) wurden Zellkerne und Membranfragmente abzentrifugiert. Das entstandene Pellet 1 (P1) wurde verworfen und der Überstand 1 (S1) einem zweiten Zentrifugationsschritt ( $13906xg_{max}$ , 15min, 4°C) zugeführt. Das resultierende Pellet 2 (P2 = Synaptosomen) wurde anschließend in Lysepuffer resuspendiert (1 Teil P2 : 9 Teile Lysepuffer) und einem osmotischen und mechanischen Schock in einem Homogenisator mit drei Hüben bei 2000rpm unterzogen. Damit wurden die Synaptosomen aufgebrochen. Der erhaltene Lyseüberstand 0 (LS0) enthält freie synaptische Vesikel (SV), prä- und postsynaptische Membranen und reassemblierte Synaptosomen (Pseudosynaptosomen). Der LS0 wurde zentrifugiert ( $29000xg_{max}$ , 20min, 4°C), was in einem Lysepellet 1 (LP1) mit prä- und postsynapti-



**Abbildung 2.1 – Schema der subzellulären Fraktionierung.** Synaptische Vesikel (SV) wurden aus Gehirngewebe der Ratte oder Maus durch differentielle Zentrifugationsschritte angereichert. H = Homogenat, LP1 = Lysepellet 1, LP2 = Lysepellet 2, LS0 = Lyseüberstand 0, LS1 = Lyseüberstand 1, LS2 = Lyseüberstand 2, P1 = Pellet 1, P2 = Pellet 2, SV = synaptische Vesikel. Mit Veränderungen basierend auf Huttner et al. (1983).

schen Membranen und dem Lyseüberstand (LS1) mit freien SV resultierte. Der LS1 wurde abschließend zentrifugiert ( $347648xg_{max}$ , 30min,  $4^{\circ}C$ ), was das Lysepellet 2 (LP2) ergab, in dem SV angereichert sind. Das LP2 wurde in dem für das folgende Experiment entsprechenden Puffer resuspendiert, indem es jeweils nacheinander fünfmal durch eine 23G- und eine 27G-Nadel gezogen wurde.

Die LS0-Fraktion wurde als Ausgangsmaterial für die Immunisolierungen mit folgender Westernblot-Analyse, die LS1-Fraktion für Immunisolierungen mit folgender Neurotransmitteraufnahme und die LP2-Fraktion für die Neurotransmitteraufnahme an grob aufgereinigten SV verwendet (Abb. 2.1).

## 2.6.2 BCA-Test

Die Proteinkonzentration der einzelnen Gehirnfractionen wurde mittels des BCA-Tests nach einem Protokoll von Smith et al. (1985) bestimmt. Dazu wurde eine Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen = „Wells“, Falcon) mit je  $20\mu l$  Probe beschickt. Es wurden Doppelbestimmungen für den Leerwert (Basispuffer) und für den BSA-Standard von 50, 100, 200, 300 und  $500\mu g$  pro Well durchgeführt. Für die Ermittlung der Proteinkonzentrationen der Proben wurden Vierfachbestimmungen für drei verschiedene Verdünnungen aufgenommen. Alle Proben wurden mit  $200\mu L$  einer 50:1-Mischung von BCA-Lösung A und B ( $CuSO_4$ ) versetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Proben für 30min bei  $60^{\circ}C$  im Wasserbad. Die Extinktion der abgekühlten Proben wurde bei 550nm in einem Spectrophotometer ermittelt. Der Leerwertmittelwert wurde von dem BSA-Standard und den Proben abgezogen.

## 2.6.3 Proteingelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinproben wurden in Probenpuffer aufgenommen und für 10min bei  $90^{\circ}C$  gekocht. Im Probenpuffer vorhandenes Dithiothreitol (DTT) spaltet Disulfidbrücken und SDS bewirkt an den Proteinen eine einheitlich negative Ladungsverteilung. So wurden Proteine durch eine eindimensionale Gelelektrophorese in einem denaturierenden SDS-Polyakrylamidgel ladungsunabhängig nach ihren Molekulargewichten aufgetrennt. Die Proteinproben durchliefen das Sammelgel bei 80V und das Trenngel bei

135V in Richtung der Anode, bis die Lauffront das Gelende erreicht (ca. 1h 30min). Jedes Gel wurde zusätzlich mit einem Molekulargewichtsmarker (LMW) beladen, der die Molekulargewichte in entsprechender Laufhöhe anzeigt. Es wurden 1mm dicke Gele verwendet, die in eine Elektrophoresekammer eingebracht wurden und von SDS-Elektrophoresepuffer umgeben waren.

#### 2.6.4 Westernblot und Immundetektion

Die Gele mit den aufgetrennten Proteinproben, Nitrozellulosemembranen und Filterpapieren wurden in Semi-Dry-Puffer eingeweicht und anschließend nach dem „Sandwich“-Prinzip zusammengesetzt. Im folgenden Westernblot-Verfahren wurden die Proteine bei 20V für 75min mittels Halbtrockenverfahren auf die Nitrozellulosemembran (Hybond C) transferiert.

Proteine wurden nun mittels Immundetektion spezifisch nachgewiesen. Es bindet dabei ein spezifischer Primärantikörper an ein Epitop (monoklonaler Antikörper) oder mehrere Epitope (polyklonaler Antikörper) des Zielproteins auf der Membran. Der Primärantikörper wurde durch die Bindung eines enzymgekoppelten Sekundärantikörpers markiert.

Die Proteine wurden vor der Immundetektion zunächst unspezifisch mit Ponceau S-Lösung einige Sekunden gefärbt und anschließend bis auf stark gefärbte Banden und den Molekulargewichtsmarker (LMW) in  $\text{dH}_2\text{O}$  entfärbt. Mit Hilfe des LMW konnten Proteine mit bestimmtem Molekulargewicht aus der Membran herausgeschnitten werden. Anschließend wurden unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membranen durch Inkubieren in Blocklösung (1h, bei RT) blockiert. Danach erfolgte eine Inkubation mit einer Primärantikörperlösung über Nacht bei 4°C. Nicht gebundene Primärantikörper wurde dann mit Blockpuffer (viermal je 15min bei RT) abgewaschen. Die Membran wurde anschließend mit einer Sekundärantikörperlösung für 1h bei RT inkubiert. Die Membranen wurden danach fünfmal 15min in TS + Tween 20 und einmal 15min in TS-Puffer gewaschen. Zur Sichtbarmachung der gebundenen Antikörper wurden die Membranen 30s in ECL-Lösung inkubiert und abschließend für die Belichtung eines Film in einer Dunkelkammer verwendet. Alle Inkubationen erfolgten unter kontinuierlichem Schütteln oder Schwenken.

#### 2.6.5 Immunisolierung synaptischer Vesikel

Die Immunisolierung diente der Extraktion unterschiedlicher Vesikelsubpopulationen (SP) aus ausgewählten subzellulären Fraktionen (Ausgangsmaterial, Abb. 2.1). Für die Antikörperbeschichtung wurden magnetische Kügelchen (Beads) der Typen M-500 Subcellular ( $1,4 \cdot 10^7$  Beads = 1mg Beads), Pan-Mouse-IgG Beads (vorbeschichtet mit einem Antikörper: Mensch gegen Maus, Fc-spezifisch,  $1,4 \cdot 10^7$  Beads ca. 1mg Beads) bzw. M-280 (vorbeschichtet mit einem Antikörper Ziege gegen Maus) verwendet. Aufgrund eines Eisenoxidkerns können diese Beads mit Hilfe eines Magneten konzentriert werden. Beads wurden dazu mit Antikörpern gegen Syp, VGLUT1, VGLUT2, VGAT und Rab5 beschichtet. Die Immunisolierung wurde in der direkten Technik durchgeführt, d.h. das Ausgangsmaterial wurde zu den beschichteten Beads gegeben.

Die M-500 Subcellular Beads kamen aufgrund der glatten Oberfläche, die besonders gut für elektronenmikroskopische Anwendungen geeignet ist, zum Einsatz. Diese Beads sind nicht mit einem Linkerantikörper vorbeschichtet und mussten vor der Verwendung für die Immunsolierung mit einem Linkerantikörper beschichtet werden. Ihre Oberfläche ist tosyl-aktiviert und bindet somit Proteine kovalent durch primäre Amin- ( $\text{NH}_2$ ) und Sulfhydrylgruppen (SH).

### 2.6.5.1 Dialyse des Linkerantikörpers ("Umpuffern")

Die Bindung des Linkerantikörpers (Mensch gegen Ziege, Fc-spezifisch) erfolgte bei pH 9,5 in einem 0,1M Borat-Puffer. Daher musste die werkzeitige Pufferlösung des Antikörpers gegen den Borat-Puffer ausgetauscht werden. Hierzu wurde ein Dialyseschlauch (Typ 8/32, 8mm) in 200mL ddH<sub>2</sub>O, mit einer Spatelspitze EDTA versetzt und zweimal 2min in der Mikrowelle erhitzt. EDTA komplexiert zweiwertige Ionen und das Erhitzen bewirkt ein Permeabilisieren des Schlauches mit entsprechender Porengröße. Anschließend wurde der Schlauch zweimal mit ddH<sub>2</sub>O gespült, erhitzt und zweimal das Schlauchinnere mit einer Pipette gespült. Ein Schlauchende wurde verschlossen und mit 500 $\mu\text{L}$  Antikörper befüllt. Luftblasen wurden herausgedrückt und der Schlauch mit einer Klammer verschlossen. Die Dialyse erfolgte in 450mL Boratpuffer für 20h bei 4°C auf einem Magnetrührer. Während dieser Zeit wurde der Puffer dreimal gewechselt. Der pH-Wert des erhaltenen Dialysats wurde mittels Indikatorpapier überprüft.

### 2.6.5.2 Antikörperbeschichtung: M-500 Subcellular Beads

**Beschichtung mit Linkerantikörper:** Alle Schritte erfolgten auf Eis. 500 $\mu\text{L}$  des Linkerantikörpers wurden mit Boratpuffer auf 710 $\mu\text{L}$  aufgefüllt.  $5 \cdot 10^8$  Beads/mL wurden magnetisch konzentriert, dreimal mit PBS und dreimal mit Boratpuffer gewaschen. Danach wurden Beadpellet und Antikörper zusammengegeben und in eine 12-Well-Platte überführt, mit Parafilm abgedeckt und bei 37°C unter Rütteln auf einer Heizplatte in einer Styroporbox für 16 bis 24h inkubiert.

Anschließend wurden die Beads in Eppendorfgefäße überführt, magnetisch konzentriert und der Überstand mit dem ungebundenen Antikörper schockgefroren. Die Beads wurden anschließend zweimal 5min in PBS/BSA, einmal 4h bei 37°C in 0,2M Tris/BSA unter Schütteln (siehe oben) und einmal 5min in PBS/BSA gewaschen. Die vorbeschichteten Beads konnten in PBS/BSA/0,02%NaN<sub>3</sub> bei 2-8°C mehrere Monate gelagert werden.

**Beschichtung mit Primärantikörper:** Die Beschichtung erfolgte mit  $8 \cdot 10^7$  Beads und 32 $\mu\text{L}$  Antikörper in einem Endvolumen von 160 $\mu\text{L}$  PBS/BSA ( $5 \cdot 10^8$  Beads/mL) bei 2-8°C über Nacht. Die Inkubation fand in schrägliegenden Eppendorfgefäßen bei 1000rpm auf einem Vortexer statt. Das Beadpellet wurde viermal gewaschen (5min, bei 4°C trituriert = aufziehen und ausstoßen durch eine Pipette) und bis zur Verwendung in PBS/BSA/NaN<sub>3</sub> aufbewahrt.

**Immunisierung mit M-500 Subcellular Beads:** Es wurde mit 1mg Beads gearbeitet, die in 700 $\mu$ L Puffer A resuspendiert wurden. 75 $\mu$ g der LS0-Fraktion wurden ebenfalls in Puffer A resuspendiert (Endvolumen von 300 $\mu$ L) und zusammen mit den Beads in einer abgedeckten 12-Well-Platte auf einem Horizontalschüttler (160rpm) für mindestens 12h und 2-8°C inkubiert. Als Kontrolle für unspezifisch gebundenes Material wurden die linkerantikörper-beschichteten Beads ohne Primärantikörper verwendet.

Die Proben wurden in Eppendorfgefäße überführt, die Beads mit den isolierten Vesikeln durch einen Magneten an der Gefäßwand konzentriert, der Überstand abgenommen und zur späteren Weiterbearbeitung auf Eis aufbewahrt. Das Beadpellet wurde dreimal in 1mL Puffer A gewaschen. Es wurde eine ungefähre Proteinkonzentration von 2 $\mu$ g/ $\mu$ L mit 37,5 $\mu$ L Probenpuffer pro 75 $\mu$ g LS0 eingestellt (Annahme: alles Protein wird gebunden). Der Isolierungsüberstand (1mL) wurde mit 2mL Puffer A in einem 3,2mL Ultrazentrifugenröhrchen gemischt und zentrifugiert (347648 $\times$  $g_{max}$ , 15min, 4°C, Rotor TLA-100.4). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 75 $\mu$ L Probenpuffer (Konzentration: 1 $\mu$ g/ $\mu$ L) durch zehnmaliges Aufziehen in einer 27G-Nadel resuspendiert. Alle Proben wurden bei -25 bis -32°C aufbewahrt.

### 2.6.5.3 Antikörperbeschichtung: Pan-Mouse-IgG- und M-280-Beads

Das Protokoll des Herstellers wurde in geänderter Form angewandt: 10<sup>7</sup> Pan-Mouse-IgG Beads bzw. 10<sup>7</sup> M-280 Beads wurden mit 0,5 $\mu$ g (Maus gegen-Syp, -VGLUT1, -VGLUT2, -Rab5) bzw. 1 $\mu$ g (Maus gegen-VGAT) monoklonalem Antikörper in PBS/BSA in dem Startvolumen der Beadlösung für 2h bei 4°C auf einem Vortexer inkubiert, wodurch ein Absetzen der Beads verhindert werden sollte. Eine gleiche Menge Beads wurde parallel ohne primären Antikörper (oAk-Beads, Pan-Mouse-IgG Beads) bzw. mit normalem Maus-IgG (IgG-Beads, M-280-Beads) inkubiert und diente als Kontrolle für unspezifisch gebundenes Material. Anschließend wurden die Beads viermal mit 1mL PBS/BSA durch Triturieren (20-mal) gewaschen.

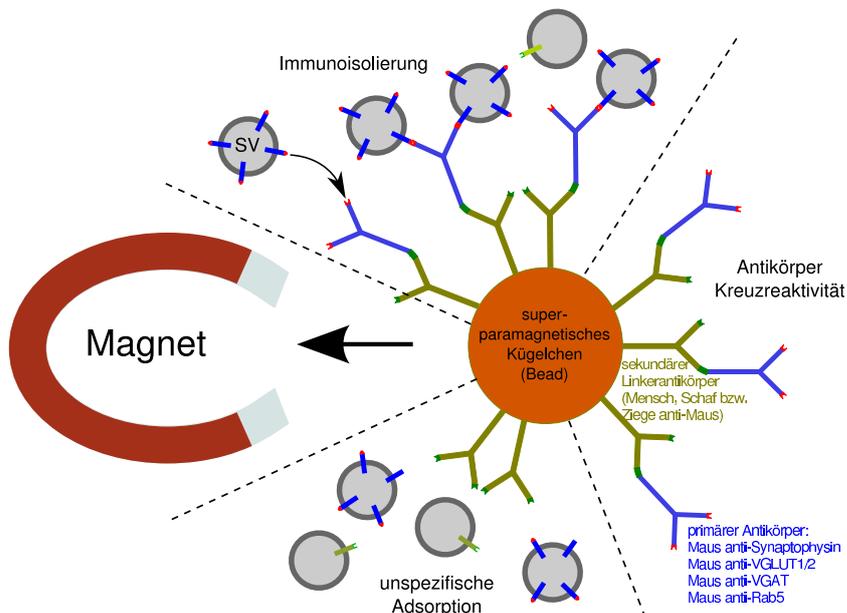
Zur Aufbewahrung beschichteter Beads, wurden diese in PBS/BSA mit 0,02% Natriumazid in einem definiertem Volumen aufgenommen.

### 2.6.5.4 Immunisierung synaptischer Vesikel

Die Immunisierung (Abb. 2.2) erfolgte über Nacht bei 4°C an einem Probenmischer mit 75 $\mu$ g Vesikelfraktion pro 1mg Beads in Puffer A (Endvolumen: 1mL bzw. für VGAT-Beads: 0,5mL). Anschließend wurden die SV-Bead-Komplexe magnetisch konzentriert und der Überstand zur Weiterbearbeitung auf Eis aufbewahrt. SV-Bead-Komplexe wurden insgesamt je dreimal in 1mL Puffer A bzw. PBS/0,1%BSA gewaschen (15- bis 20-mal trituriert). Die Proben wurden anschließend in neue Probengefäße überführt, da Proteine unspezifisch durch Wechselwirkungen mit der Gefäßwand an dieser hängen bleiben und durch Probenpuffer abgewaschen worden wären. Zum Schluss wurden die SV-Bead-Komplexe bzw. oAk-Bead-Komplexe magnetisch konzentriert, in Probenpuffer aufgenommen und eine theore-

tische Konzentration von  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  eingestellt, unter der Annahme, dass das gesamte Protein isoliert wurde. Der Überstand wurde abzentrifugiert ( $347648xg_{max}$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 15min, Rotor TLA-100.4), in Pro-

**Abbildung 2.2 – Prinzip der Immunisolierung.** Das Schema für die Immunisolierung zeigt drei Bedingungen: 1. oben) die Inkubation *mit* SV an vollständig beschichteten Beads 2. rechts) die Inkubation *ohne* SV an vollständig beschichteten Beads und 3. unten) die Inkubation *ohne* SV an *un*beschichteten Beads. Nach der Inkubation wurde das beadgebundene Material mittels eines Magneten konzentriert und der Überstand abgenommen.



benpuffer aufgenommen (theoretische Konzentration:  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) und durch zehnmaliges Aufziehen durch eine 27G-Nadel resuspendiert.

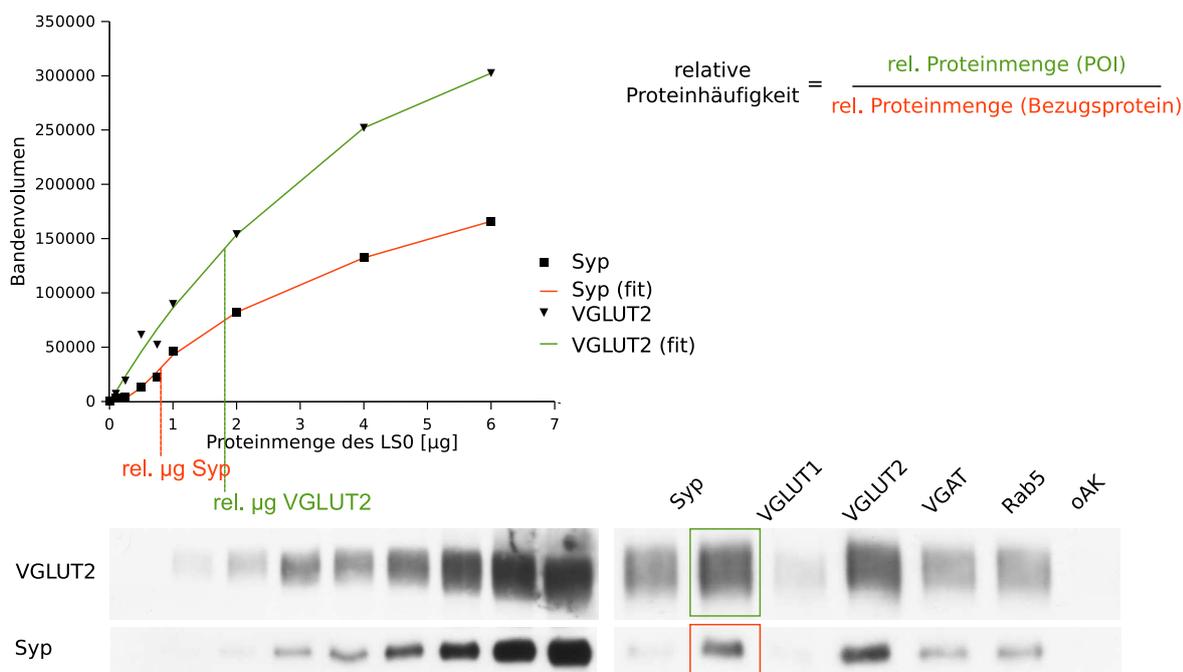
Die Immunisolate für die Analyse mit dem SDS-PAGE/WB-Verfahren wurden hauptsächlich durch Verwendung der Pan-Mouse-IgG-Beads generiert. In seltenen Fällen musste aus firmenpolitischen Gründen auf die M-280-Beads zurückgegriffen werden. Diese Experimente sind an der veränderten Negativkontrollbedingung (IgG) erkennbar.

## 2.6.6 Densitometrie

Die densitometrische Vermessung der Bandenvolumen erfolgte mit Hilfe der Software LabImage 2006 1D (Kapelan Imaging Solutions, Halle/Saale). Es wurden dazu Standardkurven mit Probenpuffer als Leerwert, aufsteigenden Mengen des Ausgangsmaterials (LS0-Fraktion) und die Immunisolate der WB-Analyse unterzogen und die entsprechenden Proteine detektiert. Mit Hilfe der Standardkurve wurde die relative Menge des Proteins im Ausgangsmaterial bestimmt. Das Bandenvolumen der oAk-Isolierung wurde als unspezifische Isolierung betrachtet und von den Bandenvolumen der Isolate subtrahiert. Anhand der Standardkurve, die möglichst den Sättigungsbereich der ECL-Reaktion erreichen sollte, wurden 2 bzw.  $4\mu\text{g}$  pro Isolat für die Beladung der Gele gewählt (Abb. 2.3).

An die Werte der Standardkurve wurde eine polynomiale Regressionskurve vierter bzw. fünfter polynomialer Ordnung angepasst (eigene Programmierung, LabVIEW 6.1, National Instruments). Mittels dieser Regressionskurve wurde das Verhältnis der relativen Proteinmengen a) des gesuchten, kolokalisierenden Proteins (POI) und b) dem Protein, gegen das isoliert wurde (Bezugsprotein), berechnet. Dieses Verhältnis gibt Aufschluss über die Menge des POIs auf der jeweiligen vesikulären Subpopulation (SP) bzw. des Vesikels. Eine Aussage über die Kopienanzahl des POI pro Vesikel kann nicht

getroffen werden. Durch die Verwendung von Standardkurven sind die Verhältnisse sowohl unabhängig von der Affinität und Avidität der Antikörper als auch von der Belichtungsdauer der Filme. Dadurch ist die Standardkurve des entsprechenden Proteins auf die Berechnung eines Proteins einer anderen WB-Analyse übertragbar. Insbesondere bei der Quantifizierung von Proteinen mit ähnlichen Molekulargewichten ist diese Übertragbarkeit wichtig, da die WB-Banden dieser Proteine nicht sauber voneinander zu trennen sind. Es mussten jedoch für diese Proteine getrennte WB-Analysen durchgeführt werden. Ferner durften die Signale der Immunisolate in der WB-Analyse den Sättigungsbereich der ECL-Reaktion nicht erreichen.



**Abbildung 2.3 – Prinzip der WB-Quantifizierung.** Es wurden Probenpuffer als Leerwert, aufsteigende Mengen des Ausgangsmaterials der Immunisolierung (LS0-Fraktion) und die Immunisolate aufgetragen und die Bandenvolumen ermittelt. Anhand der resultierenden Standardkurve wurden die relativen Proteinmengen für die entsprechenden Proteine in den Immunisolaten bestimmt. Anschließend wurden die Verhältnisse aus der relativen Proteinmenge des kolokalisierenden Proteins (POI) und des Proteins, gegen das isoliert wurde (Bezugsprotein), errechnet. Im Rahmen: Formel zur Berechnung der relativen Häufigkeit der Proteine.

### 2.6.7 Präadsorption der Antikörper

Für die WB-Analyse wurde zur Bestimmung der Spezifität der Antikörper der Präadsorptionstest durchgeführt. Dazu wurden 10 µg des Kontrollpeptids, das zur Immunisierung des antikörperproduzierenden Tieres verwendet wurde, in 1 mL Antikörperlösung mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert (30 min, bei RT, gelegentliches Schütteln). Die Verdünnungen der Antikörper entsprachen denen in der WB-Analyse. Es wurden je 10 µg P2 (Ratte) pro Gelspur analysiert und jeweils ein Nitrozellulosestreifen mit und ohne präadsorbiertem Antikörper inkubiert. Eine erfolgreiche Präadsorption ist durch das Fehlen der spezifischen Bande des untersuchten Proteins erkennbar.

Die monoklonalen Primärantikörper, die bei der Immunisolierung Verwendung fanden, wurden eben-

falls mit dem Präadsorptionstest untersucht. Nach der Beschichtung und dem Waschen der Pan-Mouse-IgG-Beads (Abs. 2.6.5.4) wurden diese mit  $10\mu\text{g}$  Kontrollpeptids je  $1,4 \cdot 10^7$  Beads unter ständigem Schütteln für 1h bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die präadsorbierten Beads viermal in je 1mL Inkubationspuffer (PBS+0,1%BSA) durch Triturieren gewaschen und der weiteren Immunisierungsprozedur zugeführt (Abs. 2.6.5.4).

### 2.6.8 Silberfärbung aufgetrennter Proteine

Die Silberfärbung aufgetrennter Proteine im Polyakrylamidgel erfolgte nach Shevchenko et al. (1996). Das Gel wurde zuerst in 50% Methanol und 5% Essigsäure in ddH<sub>2</sub>O für 20min fixiert und anschließend für 10min in 50% Methanol gewaschen. Die Essigsäure wurde durch zehnmütiges Waschen in ddH<sub>2</sub>O entfernt. Die Reduktion und Sensibilisierung erfolgte für 1min in 0,02% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Anschließend wurde zweimal 1min in ddH<sub>2</sub>O gespült und nachfolgend für 20min bei  $4^\circ\text{C}$  in gekühlter 0,1% AgNO<sub>3</sub>-Lösung inkubiert. Das Gel wurde zweimal 1min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Entwicklung erfolgte in 0,04% Formalin (aus 37% Formaldehyd in ddH<sub>2</sub>O) und 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Diese Lösung wurde bei aufkommender Gelbfärbung der Gele erneuert. Die Entwicklung hatte in transparenter Lösung zu erfolgen. Nach dem Erreichen der gewünschten Farbtintensität wurde der Entwickler entfernt und die Reaktion mit 5% Essigsäure gestoppt. Die Lagerung der entwickelten Gele erfolgte in 1% Essigsäure bei  $4^\circ\text{C}$ . Die Gele wurden zur Auswertung in Plastikfolie eingeschweißt und anschließend mit einem handelsüblichen Scanner digitalisiert.

### 2.6.9 Immunelektronenmikroskopische Analysen

#### 2.6.9.1 Gewebepreparation

Die Einbettung des Gehirngewebes erfolgte mit Ratte, die durch ein Gemisch aus Medetomidin ( $500\mu\text{g}/\text{kg}$  Körpergewicht) und Ketamin ( $75\text{mg}/\text{kg}$  Körpergewicht) anesthesiert und durch den linken Herzventrikel mit frischem Perfusionsfixanz perfundiert wurden. Das Gehirn wurde entnommen, die gewünschten Areale herauspräpariert und über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  in frischem Perfusionsfixanz nachfixiert und aufbewahrt.

#### 2.6.9.2 Gefriersubstitution

Es wurden vom Hippokampus und Cerebellum koronale Schnitte mit einer Dicke von 1 - 2mm angefertigt. Diese wurden nach zwei verschiedenen Protokollen gefriereschützt.

**Protokoll 1:** Die Schnitte wurden sechsmal 10min in 0,1M PB gewaschen und in eine aufsteigende Glycerolreihe (10, 20, 30% je 1h) in PB eingetaucht und über Nacht in 30% Glycerol bei  $4^\circ\text{C}$  belassen. Am nächsten Tag wurde das Gewebe auf einem Filterpapier getrocknet und in  $-70^\circ\text{C}$  kaltes n-Hexan

getaucht.

**Protokoll 2:** Die Schnitte wurden sechsmal 15min in 0,1M PB gewaschen. Anschließend wurden sie sechsmal 10min in 0,05M Tris-Maleat-Puffer, je 1h in 0,5M, 1M, 1,5M Saccharose in Tris-Maleat-Puffer und 1h in 2M Saccharose in Tris-Maleat-Puffer bei RT über Nacht bei 4°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte auf einem Filterpapier getrocknet und auf einem Metallblock eingefroren.

Die eingefrorenen Proben wurden in Methanol in eine vorgekühlte Kammer (-90°C) einer Gefriersubstitutionsapparatur überführt. Das Gewebe wurde zwei bis dreimal für je 1h in kaltem Methanol (-90°C) gewaschen und über Nacht in wasserfreiem Methanol (-90°C) mit 2% Uranylacetat (w/v) als Kontrastmittel inkubiert. Am dritten Tag wurden die Proben mehrmals in wasserfreiem Methanol gewaschen um restliches Wasser und Uranylacetatreste zu entfernen, bevor sie vom Kunstharz (Lowycryl HM20) durchdrungen wurden. Während dieses Prozesses wurde die Temperatur schrittweise programmgesteuert von -90°C auf -50°C (über Nacht bei -50°C) erhöht. Am vierten Tag wurde der Einbettprozess bei -50°C mit steigendem Verhältnis aus Harz und Methanol (je 1h: 1:2, 1:1, 2:1) fortgeführt. Schließlich wurden die Proben in reinem Harz zweimal 1h und bei -50°C über Nacht inkubiert. Am fünften Tag wurden die Proben in Gelatine kapseln, gefüllt mit reinem Harz (-50°C), überführt. Die Polymerisation des Harzes fand über Nacht bei -50°C mittels einer UV-Lampe (Wellenlänge 360nm) statt. Von Tag sechs bis zehn polymerisierten die Proben bei schrittweisem Anstieg der Temperatur (-50°C bis -20°C und von -20°C bis +20°C) aus. Zum Schluss wurden die eingebetteten Proben aus den Gelatine kapseln gelöst und zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt.

### 2.6.9.3 Trimmen und Ultradünnschnitte

Die Blöcke mit eingebettetem Material wurden mit einer Rasierklinge getrimmt, sodass eine trapezoide Fläche entstand. Mit einem Ultramikrotom wurden 40-70nm dünne einzelne bzw. Schnitte in Serie abgetragen. Diese Schnitte wurden auf formvar-befilmte Kupfer- bzw. Nickelgrids (Nickelnetzchen) platziert und bis zur weiteren Bearbeitung (Kontrastierung oder zytochemische Markierungen) bei RT aufbewahrt.

### 2.6.9.4 Postembedding-Immungold-Markierung (PIM)

Alle Schritte der PIM mit Ausnahme der Primärantikörperinkubation wurden bei RT durchgeführt. Für Doppelmarkierungen wurden 70nm-Schnitte verwendet, die zweimal 5min in 0,1M PBS und 0,001% Triton X-100 und Tween-20 inkubiert wurden und für 90min in PBS mit 0,001% Triton X-100, Tween-20 und 2% BSA und 5% NGS geblockt wurden. Nach der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper in Blocklösung über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer (Petrischale mit feuchten Filterpapieren) inkubiert. Die Inkubation wurde durch mehrmaliges Waschen in PBS/0,001% Triton X-100/0,001% Tween-20 gestoppt. Der Primärantikörper wurde durch 5 bzw. 10nm goldpartikelmarkierten Sekundärantikörper aus dem Kaninchen oder

Meerschweinchen sichtbar gemacht. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 75min in einer feuchten Kammer in PBS (+ 0,001% Triton X-100, + 0,001% Tween 20, + 0,5% azetyliertes BSA<sup>c</sup>). Danach wurden die Schnitte mehrmals in PBS (+ 0,001% Triton X-100, + 0,001% Tween-20), dann in reinem PBS und abschließend in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Zur Kontrastierung wurden die Schnitte 2min auf Tropfen von 2% Uranylacetat in ddH<sub>2</sub>O und anschließend für 30s auf Bleizitrat (nach Reynolds) inkubiert. Unmittelbar nach der Kontrastierung wurden die Schnitte in ddH<sub>2</sub>O gewaschen, schnell mit Filterpapieren an der Kante getrocknet und dunkel gelagert. Markierte Strukturen wurden mittels eines Elektronenmikroskops fotografiert und als digitalisiertes Foto abgelegt. Alle kontrastierten Grids sind dunkel zu lagern, um ein Ausbleichen zu verhindern.

### 2.6.9.5 Befilmen der Grids

Die Ultradünnschnitte wurden auf Silber- oder Kupfergrids (Slots oder mit Gittermaß: 200-Mesh) aufgebracht. Um dem Schnitt Stabilität gegen die mechanische und thermische Beanspruchung durch den Elektronenstrahl zu verleihen, wurde eine Befilmung der Grids in Formvar (1% Formvar (w/v) in Chloroform) vorgenommen. Diese Glasobjektträger wurden zu 2/3 in Formvar eingetaucht und dieser dann mit gleichmäßiger Geschwindigkeit abgelassen. Die Geschwindigkeit des Ablassens bestimmt die Filmdicke. Die Farbe des Films sollte blau (dünn) bis golden (dick) sein, um eine ausreichende Stabilität zu gewährleisten. Nach 30s Trocknungszeit wurde der Film von den Rändern des Objektträgers mit einer Rasierklinge getrennt. Der Objektträger wurde nun langsam senkrecht in sauberes dH<sub>2</sub>O getaucht, wodurch sich der Film ablöste und auf dem Wasser schwamm. Grids wurden dann auf den schwimmenden Film gelegt, den man an Parafilm anschwimmen ließ, um ihn so aus dem Wasser zu nehmen. Nach kurzer Trocknung wurden die Grids mit einer Pinzette vom Parafilm abgehoben und staubfrei gelagert. Die Stabilität des Films ohne Schnitt wurde am Elektronenmikroskop durch unterschiedlich starke Bestrahlung getestet.

## 2.6.10 Neurotransmitteraufnahme in synaptische Vesikel

### 2.6.10.1 NT-Aufnahme in SV der LP2-Fraktion

Alle Arbeitsschritte erfolgten innerhalb kürzester Zeit und bei niedriger Temperatur (auf Eis), um die Funktionstüchtigkeit der SV zu erhalten. Das LP2 wurde im entsprechenden Aufnahmebuffer resuspendiert (Abs. 2.6.1). Die Neurotransmitteraufnahme (NT-Aufnahme) in die SV der LP2-Fraktion, erfolgte in dem entsprechenden Aufnahmebuffer (Abs. 2.2.5), der zusätzlich den tritiummarkierten (<sup>3</sup>H-) und/oder den unmarkierten NT und andere Zusätze enthielt (Tab. 2.3).

Die Ansätze wurden bei 25°C für 10min und 1400rpm in einem Thermomixer inkubiert. Die NT-Aufnahme wurde mit 380µL eiskaltem NT-Aufnahmebuffer gestoppt. Die SVs wurden anschließend pelletiert (435000xg<sub>max</sub> Rotor TLA-120.1, 4°C, 10min) und dann einmal mit 550µL und einmal mit 600µL Aufnahmebuffer ohne Zusätze gewaschen. Das Pellet wurde zwischen den Waschschr

resuspendiert, um ein Herausfließen des NT aus den SV zu verhindern. Anschließend wurden die Proteine der SV-Membranen in 200 $\mu$ L 0,4% Triton X-100 für 30min bei 35°C und 1400rpm im Thermomixer herausgelöst. Dadurch wird der aufgenommene NT in den Puffer abgegeben. 100 $\mu$ L des Überstandes wurden in 4mL Szintillatorlösung gegeben und kräftig gemischt. In einem Szintillator wurden die radioaktiven Zerfälle pro Minute in DPM ermittelt. Die Messwerte wurden geräteintern über 1min gemittelt. Für die NT-Aufnahme wurden Vierfachbestimmungen und für die Aufnahme in Gegenwart von Inhibitoren des jeweiligen Transporters wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Der KGC3-Puffer wurde standardmäßig für die GABA- und Glutamat-Aufnahme bzw. KG3-Puffer für die 5HT-Aufnahme verwendet.

**Tabelle 2.3 – Zusätze für die NT-Aufnahmelösungen.**

Komponenten	Inhibitor	Konzentration	Spezifität	Literatur
GABA-Aufnahme				
<sup>3</sup> H-GABA		1 $\mu$ M		
GABA		199 $\mu$ M		
	Bafilomycin	2 $\mu$ M	V-ATPase	Fykse und Fonnum (1988)
	Nigericin	5 $\mu$ M	unspezif.	Fykse und Fonnum (1988)
	Valinomycin	20 $\mu$ M	unspezif.	Fykse und Fonnum (1988)
Glutamat-Aufnahme				
<sup>3</sup> H-Glutamat		0,5 $\mu$ M		
Kaliumglutamat		49,5 $\mu$ M		
	Trypanblau	1 $\mu$ M	VGLUT	Roseth et al. (1995)
Serotonin-Aufnahme				
<sup>3</sup> H-Serotonin		40nM		
Ascorbinsäure		1mM		
	Reserpin	6 $\mu$ M	VMAT1/2	Johnson (1988)

### 2.6.10.2 NT-Aufnahme in immunisierte SV

Für die NT-Aufnahme an immunisierten SV wurden primärantikörper-beschichtete M-280 Sheep anti-Mouse IgG Beads mit 35 bis 55 $\mu$ g LS1 pro 10<sup>7</sup> Beads (Endvolumen: ca. 10mg Bead + 1mL LS1 + 0,5mL des entsprechenden Aufnahmebuffers) für 2h bei 4°C unter ständigem Schütteln und Rotieren (DynaL Samplemischer MX1) inkubiert (siehe Abs. 2.6.5.4). Nach der Inkubation wurden die Immunsolate dreimal in dem entsprechenden Aufnahmebuffer je 10x schonend trituriert. Dieser Ansatz wurde zu je 60 $\mu$ L auf 0,5mL Ultrazentrifugen-Röhrchen aufgeteilt und der NT-Aufnahme, wie im Abs. 2.6.10.1 beschrieben, zugeführt. Der erste Zentrifugationsschritt erfolgte bei 435680xg<sub>max</sub>, 10min und 4°C im Rotor TLA-120.1. Nach der Behandlung und Lyse mit Triton-X 100 wurden die Beads in einem letzten Zentrifugationsschritt (108920xg<sub>max</sub>, 10min, 4°C, Rotor TLA-120.1) von der flüssigen Phase getrennt und der Überstand wie beschrieben weiterbearbeitet (Abs. 2.6.10.1).

### **2.6.11 Quantitative Analyse der Immunsignale**

Für die statistische Analyse wurde der ein- bzw. zweiseitige Studentische t-Test für unterschiedliche Varianzen verwendet.

Die Ermittlung der Proteinkonzentrationen erfolgte durch Vierfachbestimmungen. Die Datenerhebung zur NT-Aufnahme erfolgte teils durch Dreifachexperimente mit Vierfachbestimmungen. Experimente mit anschließender Quantifizierung der Westernblotsignale wurden drei- bis viermal wiederholt. Für die elektronenmikroskopischen Arbeiten erfolgten je Gehirnareal zwei unabhängige Einbettungen. Je Markierungsbedingung wurden mindestens 25 präsynaptische Nervenendigungen von zwei unterschiedlichen Schnitten vermessen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Anreicherung synaptischer Vesikelproteine

Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden an synaptischen Vesikeln (SV) der Ratte bzw. Maus und an synaptischen Endigungen der Ratte durchgeführt. Anhand von SDS-PAGE/Westernblot-Analysen (WB-Analysen) soll die Anreicherung von SV demonstriert werden.

Eine grundlegende Methode synaptische Vesikel aufzureinigen ist die subzelluläre Fraktionierung des Gehirns. Hierbei werden SVs schrittweise angereichert (Abb. 3.1). Das homogenisierte Gehirn adulter Ratten wurde durch mehrere Zentrifugationsschritte in die subzellulären Gehirnfractionen Homogenat (H), Pellet 1, 2 (P1, 2), die Fraktionen nach osmotischer Lyse 0, 1, 2 (LS0, 1 und 2) und die daraus gewonnenen Pellets (LP1 und 2) aufgeteilt. Es wurden 5 bzw. 10 $\mu$ g Protein je Fraktion und Spur auf die Gele aufgetragen. In den Fraktionen wurden anschließend das vesikelassoziierte Protein (Rab5), prä- und postsynaptische Proteine (Syntaxin HPC1, NMDA-Rezeptor 1) und vesikuläre Transmembranproteine (Syp, Syg, Sypor und Syb und die vesikulären Neurotransmittertransporter VGLUT1, VGLUT2 und VGAT) nachgewiesen. Dabei wurden Antikörper, die in verschiedenen Wirtstieren hergestellt wurden, verwendet.

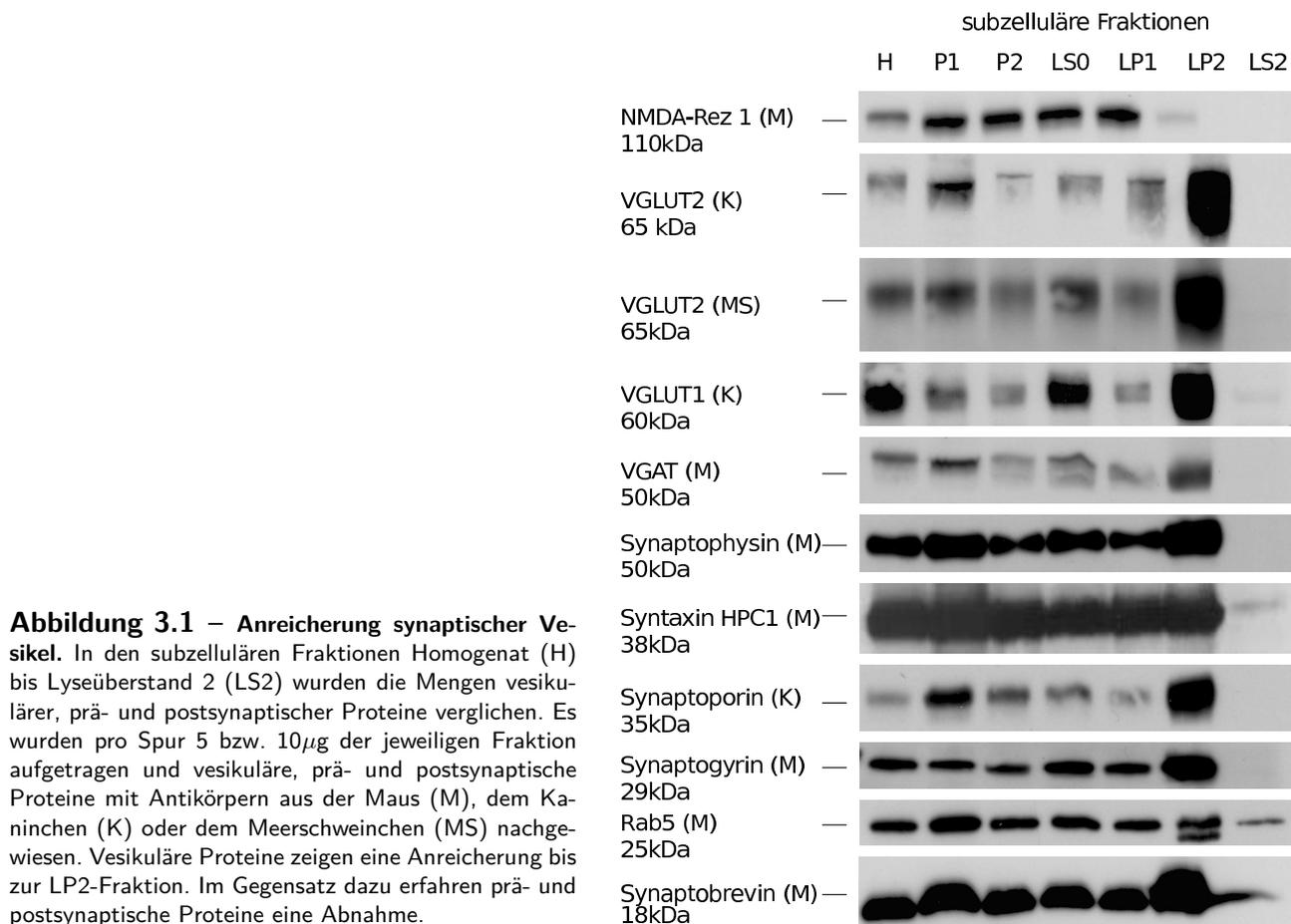
Das vesikelassoziierte Protein Rab5 und die vesikulären Transmembranproteine zeigen eine Anreicherung. Der postsynaptische NMDA-Rezeptor 1 wurde bis zum LP1 angereichert und erfuhr eine Abnahme mit fortschreitender Anreicherung der SV. Der Lyseüberstand LS2 enthält zytosolische Komponenten und Proteine, die transient mit Vesikeln assoziiert bzw. von ihnen dissoziiert sind (z.B. Rab5). Der Proteinnachweis mit Antikörpern aus unterschiedlichen Wirtstieren erbrachte vergleichbare Signale.

Mit der Methode der subzellulären Fraktionierung ist es somit möglich SV anzureichern.

### 3.2 Spezifität der Antikörper - Präadsorption

Die Spezifität der Antikörper ist entscheidend für die Detektion des entsprechenden Proteins. Darum wurde im Folgenden die Spezifität der Antikörper gegen ausgewählte Proteine, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, untersucht.

Die Antikörper, gerichtet gegen die vesikulären Neurotransmittertransporter (NT-Transporter) VGLUT1, VGLUT2 und VGAT, wurden hierzu mittels eines Präadsorptionstests untersucht. Jeder



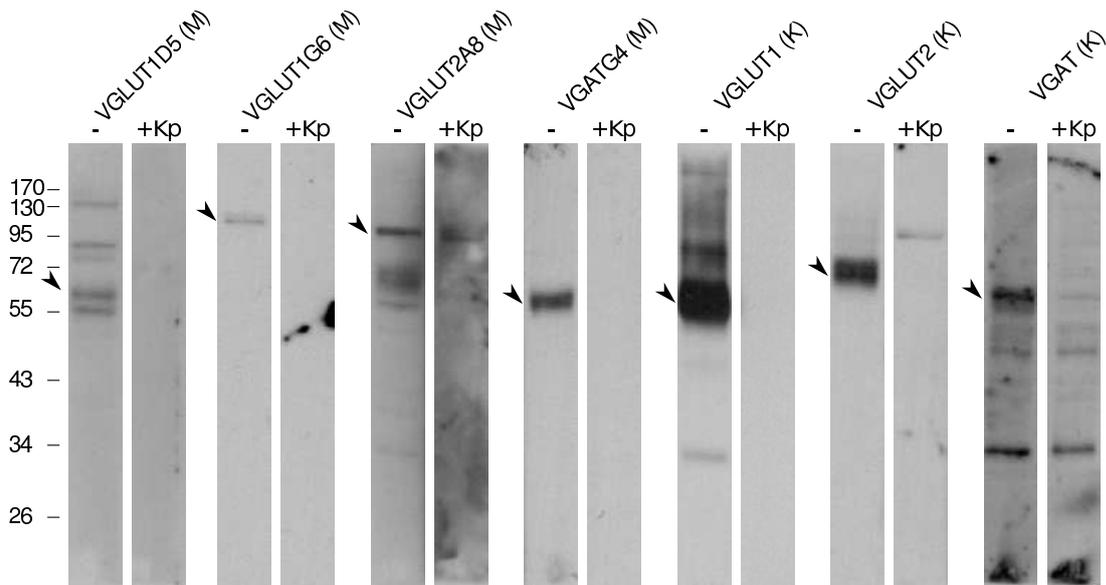
Antikörper wurde mit und ohne Inkubation durch sein entsprechendes Kontrollpeptid, das zur Immunisierung des Wirtstieres verwendet wurde, an der Gehirnfraction P2 einer adulten Ratte getestet (Abb. 3.2). Es wurden mono- und polyklonale Antikörper aus der Maus bzw. aus dem Kaninchen untersucht.

Die Inkubation mit 10µg der entsprechenden Kontrollpeptide reichte aus, um die untersuchten Antikörper – in den Verdünnungen, die auch für die WB-Analysen eingesetzt wurden – spezifisch und vollständig abzusättigen. Dadurch konnte die Bindung der Antikörper an das Proteine im Blot unterdrückt werden.

Der Antikörper VGLUT1G6 wird vom Hersteller nicht für WB-Analysen empfohlen und zeigte nur eine verdrängbare Bande bei 120kDa, die wahrscheinlich VGLUT1-Dimere darstellt. Der VGLUT1G6-Antikörper ist für Immunisierungs- bzw. Präzipitationsversuche empfohlen und wird daher für die folgenden Immunisierungen verwendet.

### 3.3 Etablierung der Immunisierungstechnik

Die Immunisierung ist eine anerkannte Methode, um die Proteinausstattung von Organellen, wie den synaptischen Vesikeln, zu untersuchen. Mit Hilfe dieser Methode können nicht nur Vesikel im Allge-



**Abbildung 3.2 – Präadsorptionstest.** Die Spezifität der Antikörper gegen die vesikulären Neurotransmittertransporter VGLUT1, VGLUT2 und VGAT wurde mit dem Präadsorptionstest im WB-Verfahren untersucht. Jede Gelspur wurde mit  $10\mu\text{g}$  der P2-Fraktion beladen. Anschließend wurde ein Blotstreifen mit dem Antikörper gegen den entsprechenden NT-Transporter inkubiert. Ein anderer Blotstreifen wurde mit dem gleichen Antikörper nach Präadsorption mit  $10\mu\text{g}$  des entsprechenden Kontrollpeptids, das zur Immunisierung des Wirtstieres verwendet wurde, inkubiert. Die Inkubation der Blots mit dem unbehandelten Antikörper (jeweils links je Spurenpaar) ergab eine Bande auf Höhe des Molekulargewichtes des gesuchten NT-Transporters. Die Präadsorption mit dem entsprechenden Kontrollpeptid verhindert die Markierung des NT-Transporters (jeweils rechts je Spurenpaar, „+Kp“). Die untersuchten Antikörper, hergestellt in der Maus (M), wurden für Immunisierungsversuche verwendet. Die untersuchten Antikörper, hergestellt im Kaninchen (K) wurden für die WB-Analysen verwendet. Der Antikörperklon VGLUT1G6 ist laut Hersteller nicht für den Westernblot geeignet, ist jedoch gegen das gleiche Kontrollpeptide wie VGLUT1D5 gerichtet und wurde für die Immunisierungen verwendet. Die Molekulargewichte des Proteinmarkers sind in kDa links aufgeführt. „-“: Immunisierung unter Standardbedingungen; „+Kp“: Vorinkubation des Primäntikörpers mit dem Kontrollpeptid.

meinen, sondern auch bestimmte Vesikelsubtypen, die zusammen eine vesikuläre Subpopulation (SP) bilden, angereichert werden. Diese SP kann anschließend z.B. durch Proteomic- oder WB-Analysen hinsichtlich ihres Proteinbesatzes untersucht werden. Die WB-Analyse setzt voraus, dass das gesuchte Protein bekannt und ein Antikörper gegen dieses Proteine vorhanden ist.

Für die vorliegende Studie musste die Immunisolierung synaptischer Vesikel aus subzellulären Fraktionen des Gehirns im Labor der AG Ahnert-Hilger zunächst etabliert werden. Hierzu wurden verschiedene Parameter wie die Beadkonzentration, Primäntikörpermenge und die Menge der eingesetzten Vesikelfraktion optimiert werden. Damit sollten spezifische Isolierungen mit maximaler Isolierungsausbeute und die Reduzierung unspezifisch gebundenen Materials erreicht werden.

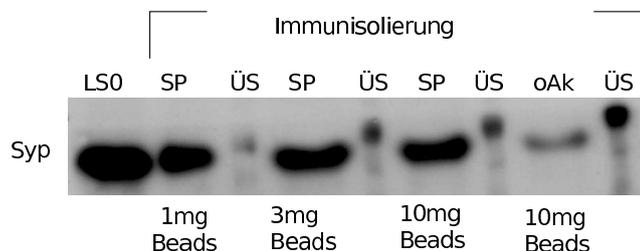
### 3.3.1 Optimierung der Beadkonzentration

Größere Mengen entsprechend beschichteter Beads sollen die Interaktionen zwischen SV und Antikörper erhöhen. Um die optimale Beadmenge für die Immunisierungsprozedur zu ermitteln (vergleiche Abb. 2.2), wurde eine SP generiert, die eine Mischung aus sekretorischen SV enthält.

Es wurden 1, 3 und 10mg Beads (M-500 Subcellular) mit einem gegen Syp gerichteten Antikörper in

einem konstanten Bead-anti-Syp-Antikörperverhältnis ( $4\mu\text{g}$  Antikörper/ $1,4 \cdot 10^7$  Beads  $\hat{=}$  1mg Beads) beschichtet. Das vesikuläre Protein Syp diente in diesem Versuch als Marker für SV. Als Kontrolle auf unspezifisch gebundenes Material wurden 10mg Beads ohne Primärantikörper (oAk) verwendet. Die antikörperbeschichteten und unbeschichteten Beads wurden mit einer konstanten Menge der LS0-Fraktion ( $75\mu\text{g}$  LS0-Fraktion, Herstellerempfehlung:  $10\text{-}200\mu\text{g}$ ) inkubiert (Abb. 3.3).

Das Ausgangsmaterial (LS0-Fraktion), das Immunisolat (SP), die Isolierung mit Beads ohne Pri-



**Abbildung 3.3 – Optimierung der Immunisierungsmethode: Beadkonzentration.** Beads (Typ: M-500 Subcellular) wurden mit einem konstanten Bead-anti-Syp-Antikörperverhältnis ( $4\mu\text{g}$  Antikörper/ $1,4 \cdot 10^7$  = 1mg Beads) beschichtet. Es wurden sowohl 1, 3 und 10mg der beschichteten Beads als auch 10mg der Beads ohne Primärantikörper als Kontrolle für unspezifisch gebundenes Material mit jeweils konstanter Menge der LS0-Fraktion ( $75\mu\text{g}$ ) inkubiert. Die LS0-Fraktion, die Isolate und Isolierungsüberstände wurden im SDS-PAGE/WB-Verfahren bezüglich einer Syp-Präsenz analysiert. Im Vergleich zum Einsatz von 1mg Beads ist eine geringe Steigerung der Isolierungseffizienz beim Einsatz von 3mg Beads zu verzeichnen. Die schwachen Banden in den ÜS-Fractionen liegen in der noch nicht ausreichend angepassten Rückgewinnung dieser Fraktion begründet.  $1\text{mg Beads} \hat{=}$   $1,4 \cdot 10^7$  Beads. SP = SV-Subpopulation, ÜS = Isolierungsüberstand, oAk = Isolierung ohne Primärantikörper.

märantikörper (oAk) und nichtisolierte Bestandteile (Isolierungsüberstand = ÜS) wurden im SDS-PAGE/WB-Verfahren analysiert.

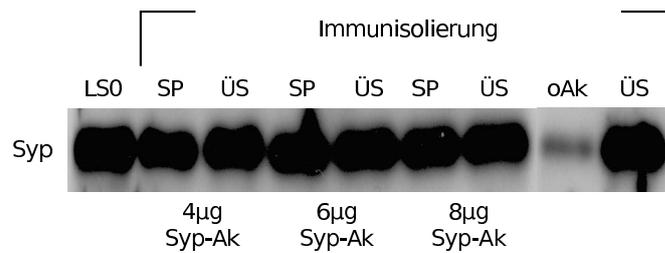
Die Detektion des Syp in den Isolaten zeigte nur eine geringfügige Erhöhung der Isolierungseffizienz bei einer Verdreifachung der eingesetzten Beadmenge (von 1mg auf 3mg Beads). Die Verwendung von 10mg Beads bewirkte keine weitere Steigerung der Isolierungseffizienz. Die Negativkontrolle wies eine drastisch reduzierte Menge isolierter SV auf.

Aufgrund des geringeren Materialeinsatzes und der nur geringfügigen Verbesserung der Isolierungseffizienz bei der Verwendung von 3 und 10mg Beads, wurde 1mg der Beads mit der jeweiligen Antikörperbeschichtung für die weiteren Immunisierungsversuche verwendet.

### 3.3.2 Optimierung der Antikörpermenge

Des Weiteren sollte die optimale Menge des Primärantikörpers für die Beschichtung der Beads ermittelt werden.

Dazu wurden jeweils konstante Beadmengen (1mg, M-500 Subcellular) mit 4, 6 und  $8\mu\text{g}$  des Antikörpers gegen Syp beschichtet (Abb. 3.4) und anschließend mit konstanten Mengen des Ausgangsmaterials ( $75\mu\text{g}$  LS0-Fraktion) inkubiert. Als Kontrolle auf unspezifisch gebundenes Material wurden 1mg Beads ohne Primärantikörper (oAk) verwendet. Das Ausgangsmaterial, die SPs, die Isolierung ohne Primärantikörper (oAk) und die entsprechenden ÜS wurden mittels SDS-PAGE/WB-Verfahren analysiert. In allen Proteinproben wurde Syp als Marker für SV verwendet. Die Bandenstärken des Syp-Nachweises zeigten keine deutliche Verbesserung der Isolierungseffizienz bei erhöhtem Antikörper-



**Abbildung 3.4 – Optimierung der Immunsolierungsmethode: Antikörpermenge.** Je 1mg Beads (M-500 Subcellular) wurde mit 4, 6 und 8µg Antikörper gegen Syp beschichtet und mit jeweils konstanter Menge der LS0-Fraktion (75µg) inkubiert. Die Inkubation der Beads ohne Primärantikörper diente der Kontrolle auf unspezifisch gebundenes Material. Die LS0-Fraktion, die Isolate und Isolierungsüberstände wurden mit dem SDS-PAGE/WB-Verfahren bezüglich des SV-Markerproteins Syp analysiert. Eine Steigerung der Isolierungseffizienz mit erhöhtem Antikörperansatz ist nicht erkennbar. 1mg Beads  $\hat{=}$   $1,4 \cdot 10^7$  Beads. SP = SV-Subpopulation, ÜS = Isolierungsüberstand, oAk = Isolierung ohne Primärantikörper.

pereinsatz. Weiterhin konnte in diesem Versuch die ÜS-Rückgewinnung optimiert werden, was an stärkeren Banden in den ÜS deutlich wird (vgl. Abb. 3.3).

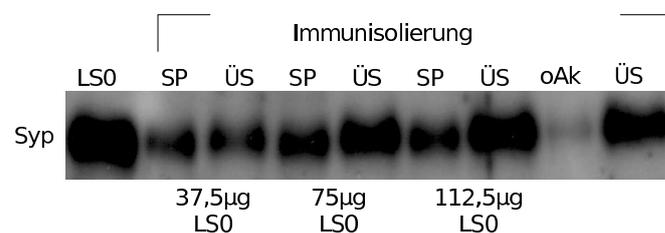
Für die weiteren Beadbeschichtungen werden 4µg Antikörper je 1mg Beads verwendet wurden.

### 3.3.3 Optimierung des Materialeinsatzes

Schließlich sollte der Materialeinsatz der LS0-Fraktion für die Immunsolierung optimiert werden. In diesem Fall sollte die Wahrscheinlichkeit für Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen durch eine Zunahme der Menge des angebotenen Epitops erhöht werden (vergleiche Abs. 3.3.1, Abb. 3.3).

Dafür wurden jeweils Beads (M-500 Subcellular) mit einem konstanten Bead-anti-Syp-Antikörperverhältnis ((4µg Antikörper/ $1,4 \cdot 10^7$  Beads  $\hat{=}$  1mg Beads)) mit aufsteigenden Mengen der LS0-Fraktion inkubiert (37,5 (halbe), 75 und 112,5µg (doppelte) Menge der LS0-Ausgangsmenge, Abb. 3.5). Das Ausgangsmaterial, die SPs, die Isolierung ohne Primärantikörper (oAk) und die entsprechenden ÜS wurden mittels SDS-PAGE/WB-Verfahren analysiert und Syp als Marker für SV in den Blots detektiert.

Die stärkste Bande für Syp war in der Inkubation mit 75µg der LS0-Fraktion erkennbar. Eine Ver-



**Abbildung 3.5 – Optimierung der Immunsolierungsmethode: Materialeinsatz.** Die Immunsolierung erfolgte mit Beads (M-500 Subcellular) eines konstanten Bead-anti-Syp-Antikörperverhältnisses (4µg Antikörper/ $1,4 \cdot 10^7$  Beads  $\hat{=}$  1mg Beads). Diese wurden mit verschiedenen Mengen der LS0-Fraktion inkubiert (37,5, 75, 112,5µg LS0-Fraktion). Die Inkubation der Beads ohne Primärantikörper diente der Kontrolle auf unspezifisch gebundenes Material. Die LS0-Fraktion, die Isolate und Isolierungsüberstände wurden mit dem SDS-PAGE/WB-Verfahren bezüglich der Syp-Präsenz analysiert. Die Inkubation mit 75µg der LS0-Fraktion zeigte das stärkste Signal. 1mg Beads  $\hat{=}$   $1,4 \cdot 10^7$  Beads. SP = SV-Subpopulation, ÜS = Isolierungsüberstand, oAk = Isolierung ohne Primärantikörper.

doppelung der eingesetzten Materialmenge verbessert die Isolierungsausbeute nicht. Die Signalstärke

nimmt nur in dem entsprechenden ÜS zu.

Das bedeutet, dass alle Antikörperbindungsstellen mit Syp besetzt bzw. abgesättigt waren. Die weiteren Immunsolierungen wurden demzufolge mit  $75\mu\text{g}$  der LS0-Fraktion je  $1\text{mg}$  Beads durchgeführt. Durch eine zeitweilige Änderung der Produktpalette des Herstellers, wurden die nachfolgenden Versuche mit Beads des Types Pan-Mouse-IgG durchgeführt. Aufgrund ähnlicher Eigenschaften dieser Beads wurde nur die Antikörpermenge für die Beschichtung dieser Beads auf  $0,5\text{-}1\mu\text{g}$  Antikörper je  $10^7$  Beads ( $1\text{mg} \cong 1,4 \cdot 10^7$  Beads) geändert.

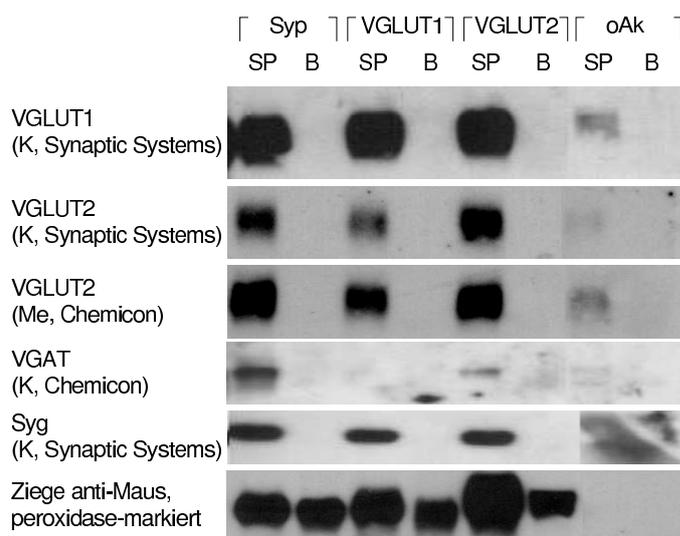
#### 3.3.4 Kreuzreaktivität des Sekundärantikörpers

Antikörper werden in einem Wirtstier gezielt gegen artspezifische Aminosäuresequenzen (Epitope) gebildet. Bindet der resultierende Antikörper auch unabhängig von der Tierart an Epitope, kann es zu unerwünschten Antikörper-Antigen-Bindungen – Kreuzreaktionen – kommen. Dieser Fall kann z.B. zwischen dem peroxidasemarkierten, gegen Kaninchen gerichteten Pferdeserum, dem peroxidase-markierten, gegen Meerschweinchen gerichteten Pferdeserum, dem peroxidase-markierten, gegen Maus gerichteten Ziegenserum, die in der WB-Analyse verwendet werden und den in der Maus hergestellten Primärantikörpern, die für die Immunsolierungen verwendet wurden, auftreten. In diesem Fall würden die peroxidase-markierten Antikörper des Serums der WB-Analyse an die schweren (Molekulargewicht  $50\text{kDa}$ ) und die leichten Ketten (Molekulargewicht:  $25\text{kDa}$ ) des Primärantikörpers der Immunsolierung binden. Um diese falschpositiven Signale auszuschließen, wurde ein Test auf die Kreuzreaktivität der verwendeten Antiseren und Antikörper durchgeführt (Abb. 3.6).

Die Immunsolierungen mit Antikörpern gegen Syp, VGLUT1, VGLUT2 und ohne Primärantikörper (oAk, Kontrolle) wurden mit den antikörperbeschichteten Beads ohne Vesikelinkubation (Abb. 3.6, B) verglichen (Schema der Immunsolierung: Abb. 2.2). Transporterproteine und andere vesikuläre Transmembranproteine mit einem Molekulargewicht von ca.  $25$  bzw.  $50\text{kDa}$  wurden mit der WB-Analyse detektiert. Als Nachweis der schweren und leichten Ketten der Primärantikörper in den Immunsolaten und den B-Proben wurde mit einem peroxidasegekoppelten, gegen Maus gerichteten Ziegenserum inkubiert (Positivkontrolle).

Es konnten für die peroxidase-markierten Sekundärantikörper, die gegen Kaninchen- und Meerschweinchen-IgG gerichtet sind, keine Banden auf der Höhe der schweren Ketten bzw. der leichten Ketten in den B-Proben festgestellt werden, d.h. die peroxidase-markierten Sekundärantikörper reagieren nicht kreuzreaktiv mit den Primärantikörpern aus der Maus. Der Nachweis mit dem peroxidasegekoppelten, gegen Maus gerichteten Ziegenserum produziert deutliche Banden in den Isolaten und den B-Proben auf der Höhe der leichten ( $25\text{kDa}$ , nicht gezeigt) und der schweren Kette ( $50\text{kDa}$ ). In den oAk-Proben ist aufgrund des Fehlens der Primärantikörper kein Signal detektierbar.

Der Proteinnachweis in den Immunsolaten wurde nachfolgend überwiegend mit Antikörpern aus dem Kaninchen durchgeführt.



**Abbildung 3.6 – Kreuzreaktivität der peroxidasemarkierten Sekundärantikörper.** Die Sekundärantikörper der WB-Analyse wurden auf Kreuzreaktivität mit den Primärantikörpern der Immunsolierung getestet. Dazu wurden die Syp-, VGLUT1-, VGLUT2-SP, die Kontrolle auf unspezifisch gebundenes Material (oAk) und die jeweiligen beschichteten Beads ohne gebundene SV aufgetragen. In den Proben wurden nur die Proteine detektiert, die ein ähnliches Molekulargewicht wie die schweren (50 kDa, z.B. VGLUT1/2 und VGAT) und leichten Ketten (25 kDa, z.B. Syg) der Antikörper besitzen. Es wurden Antikörper verschiedener Spezies und Firmen getestet. Die schweren Ketten des Primärantikörpers konnten nicht mit gegen Kaninchen- oder Meerschweinchen-IgG gerichteten peroxidasemarkierten Sekundärantikörper nachgewiesen werden. Das peroxidasegekoppelte, gegen Maus gerichtete Ziegenserum bindet an die schweren Ketten des Primärantikörpers der Immunsolierung (Blot mit leichter Kette nicht gezeigt) der SP- und B-Proben (Blot unten, Spur 1-6). Das Fehlen des Primärantikörpers in der oAk-Probe wird durch fehlende Banden angezeigt (Blot unten, Spur 7+8). Verwendete Beads: Pan-Mouse-IgG. B = Bead-Antikörper-Komplex, K = Kaninchen, Me = Meerschweinchen, oAk = ohne Primärantikörper, SP = Subpopulation.

### 3.3.5 Spezifität der Immunsolierung

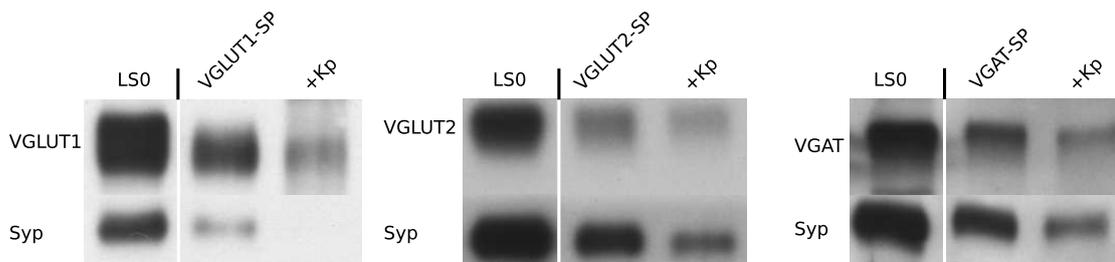
Ein Problem der Immunsolierung stellen Bestandteile des Ausgangsmaterials dar, die unspezifisch an beadgekoppelte Antikörper binden. Deshalb wurde die Spezifität der Antikörper während der Immunsolierung mit zwei verschiedenen Ansätzen untersucht — dem Präadsorptionstest und der Immunsolierung aus Syp<sup>-/-</sup>-Mäusen.

#### 3.3.5.1 Immunsolierung im Präadsorptionstest

Der Präadsorptionstest, mit dem die Spezifität der Antikörper in der WB-Analyse untersucht wurde (Abb. 3.2), wurde mit den monoklonalen Primärantikörpern gegen VGLUT1, VGLUT2 und VGAT in Immunsolierungsexperimenten in ähnlicher Weise wiederholt (Abb. 3.7).

Die Antikörperbindungsstellen für das vesikelständige Epitop wurden durch die Präadsorption mit dem entsprechenden Kontrollpeptid besetzt. Daraus folgte eine reduzierte Isolierungseffizienz in den +Kp-Proben.

Die jeweiligen Antikörper binden das Kontrollpeptid spezifisch, womit nur die freien Bindungsstellen für die Isolierung SV zur Verfügung stehen. Die vollständige Absättigung der Antikörper mit dem Kontrollpeptid ist wahrscheinlich auch durch einen erhöhten Kontrollpeptideinsatz unter Standard-



**Abbildung 3.7 – Immunisolierung im Präadsorbtionstest** Die in der Immunisolierung verwendeten beadgekoppelten Primärantikörper wurden in diesem Test mit dem jeweiligen Kontrollpeptid, das zur Immunisierung des Wirtstieres verwendet wurde, vorinkubiert und der weiteren Immunisolierung unterzogen. Es wurden  $10\mu\text{g}$  des Kontrollpeptid je  $1,4 \cdot 10^7$  komplett beschichtete Beads verwendet. Aufgetragen sind die LS0-Fraktion und die Isolate ohne (-) und mit vorgeschalteter Kontrollpeptidvorinkubation der Primärantikörper (+Kp). Der WB-Nachweis erfolgte für Syp, VGLUT1, VGLUT2 und VGAT. In allen kontrollpeptidbehandelten Proben sinkt die Immunisolierungseffizienz im Vergleich zur Isolierung unter Standardbedingungen. Verwendeter Beadtyp: Pan-Mouse-IgG.

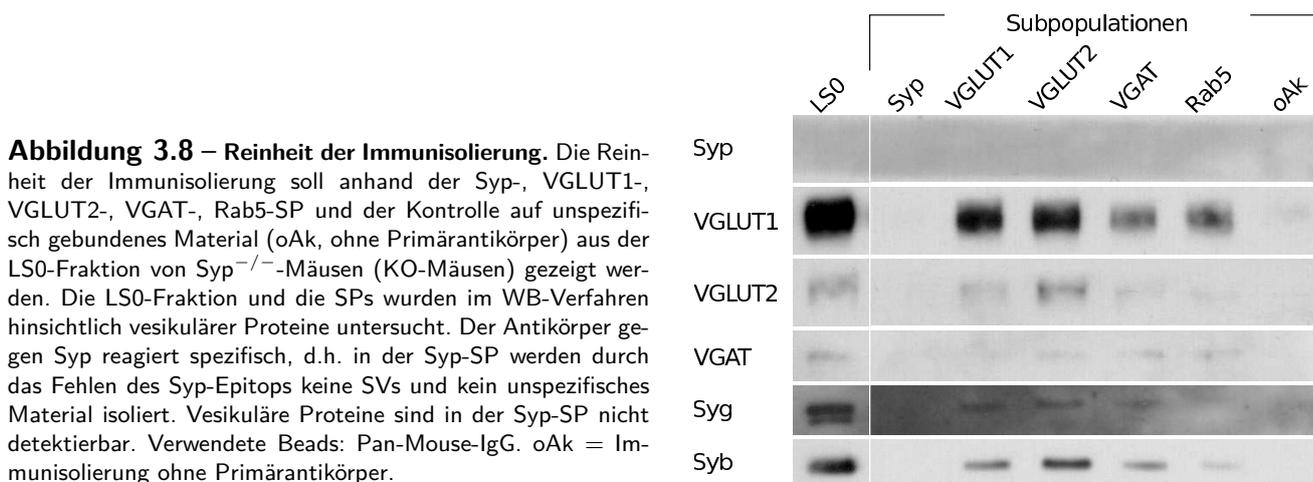
bedingungen nicht zu erreichen. Ebenso ist eine 100%ige Isolierung mit geringeren Mengen des zu isolierenden Materials (Kontrollpeptid) unwahrscheinlich (vergleiche Abb. 3.5 und 3.11).

### 3.3.5.2 Immunisolierung aus Syp-KO-Mäusen

Die Primärantikörper der Immunisolierung sind gegen ein spezifisches Protein gerichtet. Im Gegensatz dazu ist die oAk-Bedingung aufgrund des fehlenden Primärantikörpers gegen kein bestimmtes Protein gerichtet. Zelluläres Material kann unspezifisch aufgrund der Anwesenheit eines beadgebundenen spezifischen Primärantikörpers binden.

Um die Bindung unspezifischen Materials zu prüfen, wurden als weitere Kontrolle auf Reinheit der Immunisolierung Syp-, VGLUT1-, VGLUT2-, VGAT- und Rab5-SPs aus adulten Syp<sup>-/-</sup>-Mäusen generiert. Die oAk-Bedingung ohne Primärantikörper diente der Kontrolle auf unspezifisch gebundenes Material (Abb. 3.8).

Der Nachweis für Syp in der LS0-Fraktion, den SP und der oAk-Bedingung war negativ, was die Abwe-



**Abbildung 3.8 – Reinheit der Immunisolierung.** Die Reinheit der Immunisolierung soll anhand der Syp-, VGLUT1-, VGLUT2-, VGAT-, Rab5-SP und der Kontrolle auf unspezifisch gebundenes Material (oAk, ohne Primärantikörper) aus der LS0-Fraktion von Syp<sup>-/-</sup>-Mäusen (KO-Mäusen) gezeigt werden. Die LS0-Fraktion und die SPs wurden im WB-Verfahren hinsichtlich vesikulärer Proteine untersucht. Der Antikörper gegen Syp reagiert spezifisch, d.h. in der Syp-SP werden durch das Fehlen des Syp-Epitops keine SVs und kein unspezifisches Material isoliert. Vesikuläre Proteine sind in der Syp-SP nicht detektierbar. Verwendete Beads: Pan-Mouse-IgG. oAk = Immunisolierung ohne Primärantikörper.

senheit dieses Proteins demonstriert. Als Folge konnte keine Syp-SP generiert werden. Daher konnten weder Transporterproteine noch andere vesikuläre Proteine in der Syp-SP nachgewiesen werden. Die-

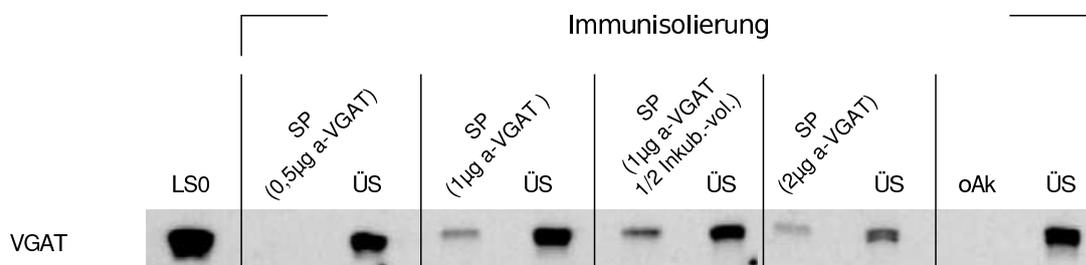
ses Experiment zeigt exemplarisch, dass durch die Immunisolierung mit einem spezifischen Antikörper kein unspezifisch gebundenes Material aufgrund von Aggregationen oder unspezifischen Anheftungen angereichert wird.

Der Antikörper gegen Syp reagiert somit hochspezifisch. KO-Mäuse, in denen die vesikulären NT-Transporter bzw. Rab5 fehlen, sind nicht (ausreichend lange) lebensfähig bzw. standen dem Labor nicht zur Verfügung.

### 3.3.6 Optimierung der Immunisolierung gegen VGAT

VGAT kommt im Vergleich zu Syp, VGLUT1 und VGLUT2 deutlich weniger häufig im Gehirn vor. Das hat eine geringere Immunisierungsausbeute VGAT-tragender SV zur Folge. Die Immunisolierung mit Antikörpern gegen VGAT musste darum gezielt optimiert werden (Abb. 3.9).

In diesem Fall wurden Beads mit einem Bead-Antikörperverhältnis von  $10^7$  Beads zu 0,5, 1 und



**Abbildung 3.9 – Optimierung der Immunisolierung gegen VGAT.** Zur Optimierung der Immunisolierungen gegen VGAT wurden konstante Beadmengen mit verschiedenen Antikörpermengen beschichtet bzw. wurde das Inkubationsvolumen reduziert. Zusätzlich wurde die LS0-Fraktion und die Isolierungsüberstände aufgetragen. Hier wurden Beads des Typs Pan-Mouse-IgG verwendet. Eine Verdoppelung der Antikörpermenge und Halbierung des Inkubationsvolumen erwiesen sich als optimal. Die SP wurden im SDS-PAGE/WB-Verfahren analysiert. Verwendete Beads: Pan-Mouse-IgG. ÜS = Isolierungsüberstand, oAk = Isolierung ohne Primärantikörper.

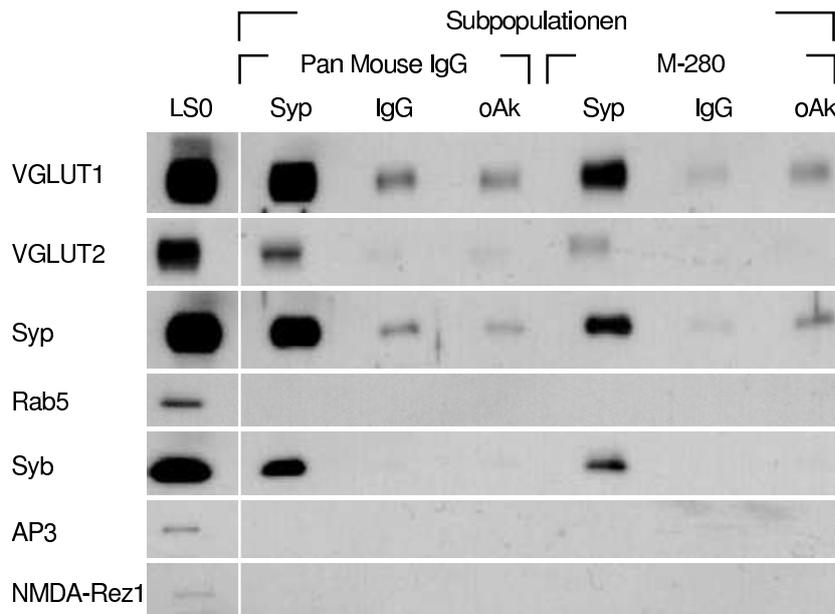
$2\mu\text{g}$  des Antikörpers gegen VGAT beschichtet. In einem weiteren Ansatz wurden Beads mit einem Bead-Antikörperverhältnis von  $10^7$  Beads zu  $1\mu\text{g}$  des Antikörper gegen VGAT in einem doppelkonzentrierten Vesikelansatz inkubiert. Beads ohne Primärantikörper (oAk) dienten der Kontrolle auf unspezifisch gebundenes Material.

In dem konzentrierteren Vesikelansatz erhöht sich die Wahrscheinlichkeit der Antikörper-Antigen-Interaktion. Die Detektion des VGAT in diesem Ansatz zeigte das stärkste Signal.

Im Folgenden wird der Ansatz mit erhöhter Vesikelmenge für die weiteren Immunisolierung gegen VGAT verwendet.

### 3.3.7 Optimieren der Negativkontrolle

Da für die Immunisolierungen, die nur mittels SDS-PAGE/WB-Verfahren analysiert werden sollten Pan-Mouse-IgG Beads und für Neurotransmitteraufnahmeversuche M-280 Beads verwendet wurden, mussten die Negativkontrollbedingungen für beide Beadtypen angepasst werden (Abb. 3.10).



**Abbildung 3.10 – Optimierung der Negativkontrollen.** Ziel dieses Versuchs ist die Optimierung der Negativkontrollen hinsichtlich der Vermeidung unspezifisch gebundenen Materials. Es wurden Immunsolierungen aus dem Gehirn einer adulten Ratte mit Antikörpern gegen Syp beschichteten Pan-Mouse-IgG- und M-280-Beads durchgeführt. Der Test auf die Bindung unspezifischen Material während der Immunsolierung wurde sowohl durch die Beschichtung der Beads mit normalem (unspezifischem) Maus-IgG (IgG) als auch ohne Primärantikörper (oAk) untersucht. Die LS0-Fraktion und die Syp-SPs wurden bezüglich der aufgeführten Proteine mit dem WB-Verfahren analysiert. Die Negativkontrolle mit Pan-Mouse-IgG-Beads zeigte *ohne* Primärantikörper und die mit M-280-Beads *mit* unspezifischem IgG eine geringere Bindung von unspezifischem Material. oAk = Isolierung ohne Primärantikörper; IgG = mit unspezifischem IgG aus der Maus.

Es wurde eine Syp-SP sowohl mit Pan-Mouse-IgG Beads als auch mit M-280 Beads isoliert. Zur Vermeidung der Bindung von unspezifischem Material während der Immunsolierung wurden als Negativkontrolle Beads zum einen mit unspezifischen Primärantikörpern (IgG, normales IgG aus der Maus) beschichtet. Zum anderen wurden Kontrollbeads ohne Primärantikörper (oAk) für die Immunsolierung verwendet. Die LS0-Fraktion, die Syp-SPs und die Kontrollbeads wurden mit dem WB-Verfahren hinsichtlich einiger vesikulärer, prä- und postsynaptischer Proteine analysiert.

Mittels der Immunsolierung mit Pan-Mouse-IgG Beads, die gegen Syp gerichtet war, konnten SVs stärker angereichert werden, als bei Verwendung der M-280 Beads. An Pan-Mouse-IgG Kontrollbeads hat ohne Beschichtung mit normalem Maus-IgG weniger unspezifisches Material gebunden. Im Gegensatz dazu wurde durch die M-280 Kontrollbeads nach Beschichtung mit normalem Maus-IgG weniger Material unspezifisch isoliert.

In den weiteren Experimenten werden die Pan-Mouse-IgG Kontrollbeads *ohne* und die M-280 Kontrollbeads *mit* dem normalen Maus-IgG beschichtet.

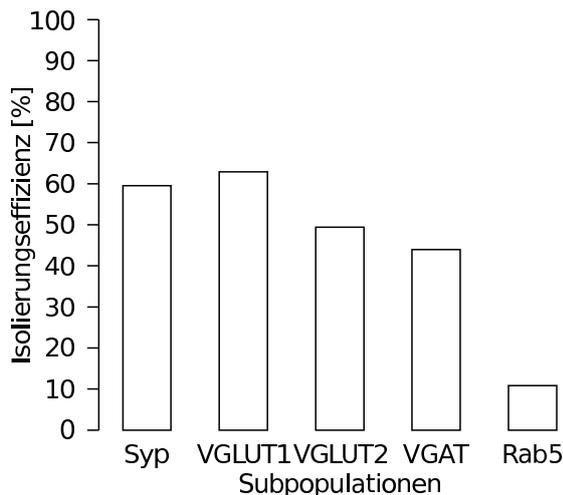
### 3.3.8 Effizienz der Immunsolierung

Die Immunsolierungseffizienz wird hier definiert als die Menge synaptischer Vesikel mit einem bestimmten Protein (in %), die aus der Gesamtmenge der SV im Ausgangsmaterials isoliert werden kann. Die Isolierungseffizienz gibt Aufschluss über die Güte der Immunsolierung. Das Bandenvolu-

men des entsprechenden Proteins im Ausgangsmaterial entspricht 100%. Die Isolierungseffizienz wird durch die Affinität, die Spezifität des Primärantikörpers und die Häufigkeit des entsprechenden Proteins im Ausgangsmaterial (Gehirn bzw. Gehirnfraction) beeinflusst. Mit dem folgenden Versuch wurde die Effizienz der Immunsolierung abgeschätzt (Abb. 3.11).

Die Isolierungseffizienzen wurden für die Syp-, VGLUT1-, VGLUT2-, VGAT- und Rab5-SP anhand eines repräsentativen Experiments bestimmt. Für die Kontrolle auf unspezifisch gebundenes Material wurden Beads ohne Primärantikörperbeschichtung verwendet. Die Werte der Isolierungseffizienzen wurden durch die Werte der Negativkontrolle (oAk) korrigiert.

Aus der LS0-Fraktion konnten ca. 60% der Syp-, 63% der VGLUT1-, 49% der VGLUT2-, 43% der



**Abbildung 3.11 – Effizienz der Immunsolierung.** Zur Bestimmung der Immunsolierungseffizienz wurden eine Syp-, VGLUT1-, VGLUT2-, VGAT- und Rab5-SP angereichert. Die LS0-Fraktion und die SPs wurden im WB-Verfahren auf ausgewählte Proteine untersucht. Die Bandenvolumina wurden ermittelt und mit dem Bandenvolumen der Kontrollisolierung (oAk) korrigiert. Die Effizienzwerte sind in Prozent aufgetragen. Die SV-Menge im Ausgangsmaterial entspricht 100%. Dargestellt sind Einzelbestimmungen für jede SP. Verwendeter Beadtyp: Pan-Mouse-IgG.

VGAT- und 11% der Rab5-tragenden Vesikel isoliert werden.

Eine geringere Isolierungsmenge für VGLUT2 und VGAT korreliert mit der geringeren Expressierung dieser Proteine im Gehirn. Es konnten deutlich geringere Mengen Rab5-tragender SV bzw. früher Endosomen isoliert werden. Rab5 ist ein vesikel- bzw. endosomenassoziiertes Protein. Dieses Protein könnte sich vor oder während des Isolierungsprozesses teilweise von den Vesikeln/Endosomen ablösen.

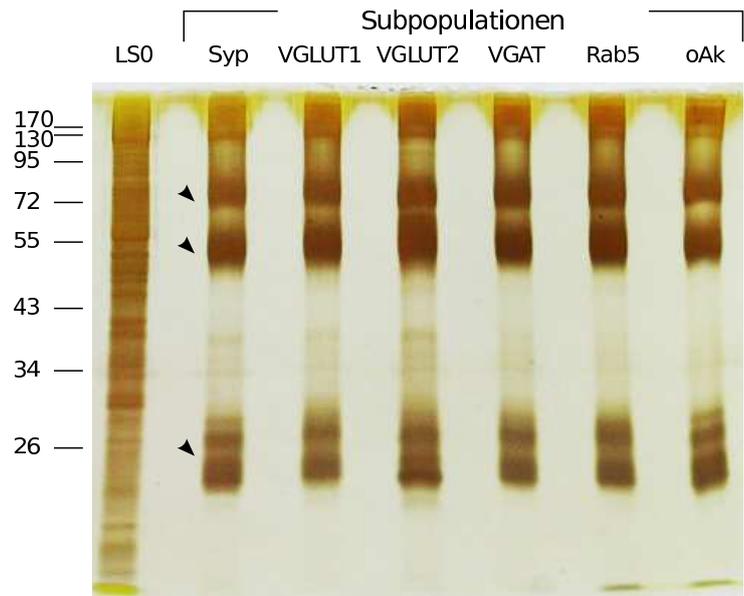
#### 3.3.9 Qualitative Unterschiede im Proteinbesatz der vesikulären Subpopulationen

Mit Hilfe einer Silberfärbung wurden die SPs zuerst unspezifisch auf qualitative Unterschiede in der Proteinausstattung untersucht (Abb. 3.12).

Hierzu wurden das Ausgangsmaterial (LS0-Fraktion), die fünf SPs und die Kontrolle auf unspezifisch gebundenes Material (oAk) aufgetragen. Die Proteine wurden mit dem SDS-PAGE-Verfahren in einem relativ weiten Molekulargewichtsbereich aufgetrennt (ca. 17 bis 170kDa).

Im Vergleich zur LS0-Fraktion sind in den SP durch die selektive Isolierung der Vesikel deutlich weniger Proteinbanden zu erkennen. Ursache für die deutlichen Banden in den SP und der Kontrollbedingung sind die leichten (25kDa) und schweren Ketten (50kDa) des Primärantikörpers der Immunsolierung und das Rinderserumalbumin (BSA), das zum Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen der Beads verwendet wurde (Pfeile, exemplarisch für die Syp-SP, Abb. 3.12). Im Bereich zwischen 26 und 55kDa

**Abbildung 3.12 – Silberfärbung der SV-SP.** Die LS0-Fraktion und die SPs wurden auf qualitative Unterschiede untersucht. Dazu wurden die Proben dem SDS-PAGE-Verfahren unterzogen und die Proteine anschließend durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Die Proben liefen in einem 10%igen Gel. Deutlich zu erkennen sind sowohl die Banden der schweren (ca. 50kDa) und leichten (ca. 25kDa) Kette der Antikörper als auch die Bande des BSA bei ca. 65kDa (Pfeile, Beispiel: Syp-SP). Diese Banden maskieren die gesuchten Proteine.



sind schwache Banden um 38kDa in allen SPs und der LS0-Fraktion erkennbar. In diesem Bereich befinden sich vesikuläre Transmembranproteine wie Syp, Syg und Synaptopodin, die als Marker für SV dienen. Eine Anreicherung der Proteine, gegen die die Immunisolierung gerichtet war (VGLUT1, VGLUT2, VGAT und Rab5) ist aufgrund der Überlagerung der Banden bei 25 und 50kDa nicht erkennbar. Die Unterschiede der Bandenintensitäten spiegeln auch die unterschiedlichen Isolierungseffizienzen wieder.

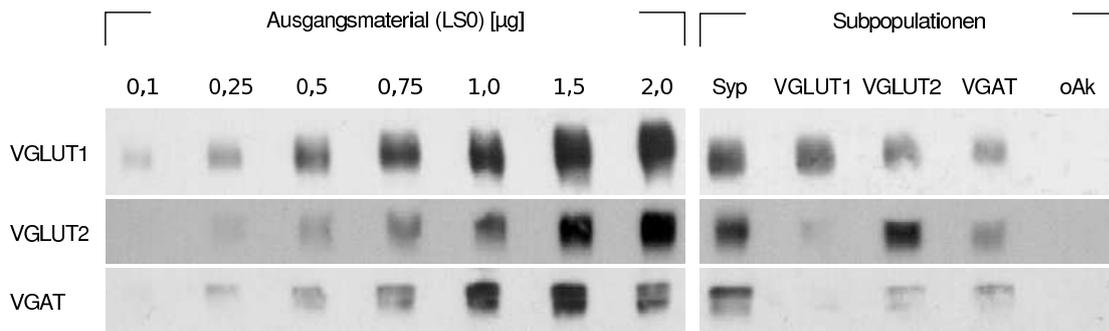
Der Nachweis von Proteinen mittels Silberfärbung ist aufgrund der geringen Mengen isolierten Materials nicht sensitiv genug. Daher lassen diese Ergebnisse keine Aussage über eventuelle Unterschiede in der Proteinausstattung der SP zu.

## 3.4 Vesikuläre Proteinausstattung

### 3.4.1 Die Subpopulationen der vesikulären Neurotransmittertransporter

Im Folgenden wurden die Syp-, VGLUT1-, VGLUT2- und VGAT-SPs untereinander verglichen und Unterschiede zwischen den SP verdeutlicht. Die Proteinausstattungen dieser SP wurden zuerst bezüglich der Neurotransmittertransporter (NT-Transporter) VGLUT1, VGLUT2 und VGAT untersucht. Aus der LS0-Fraktion des Gesamtgehirns adulter Ratten wurden Syp-, VGLUT1-, VGLUT2- und VGAT-SPs isoliert. Die subpopulationsdefinierenden Proteine dienen als Marker der jeweiligen SP. Die Kontrolle auf unspezifisch gebundenes Material erfolgte anhand der oAk-Kontrolle.

Das Signal der LS0-Fraktion (Abb. 3.13, links) repräsentiert die Menge der NT-Transporter im gesamten Gehirn. Innerhalb der Syp-SP, die die Protein- bzw. Transporterausstattung eines sekretorischen Vesikels zeigt, sind die drei Transporter detektierbar. Für die Transporter-SPs (Abb. 3.13, rechts) gilt in jedem Fall, dass der SP-definierende Transporter nachweisbar ist. Die Vesikel der VGLUT1-SP tragen zusätzlich VGLUT2 und in der VGLUT2-SP können VGLUT1 und VGAT detektiert werden.



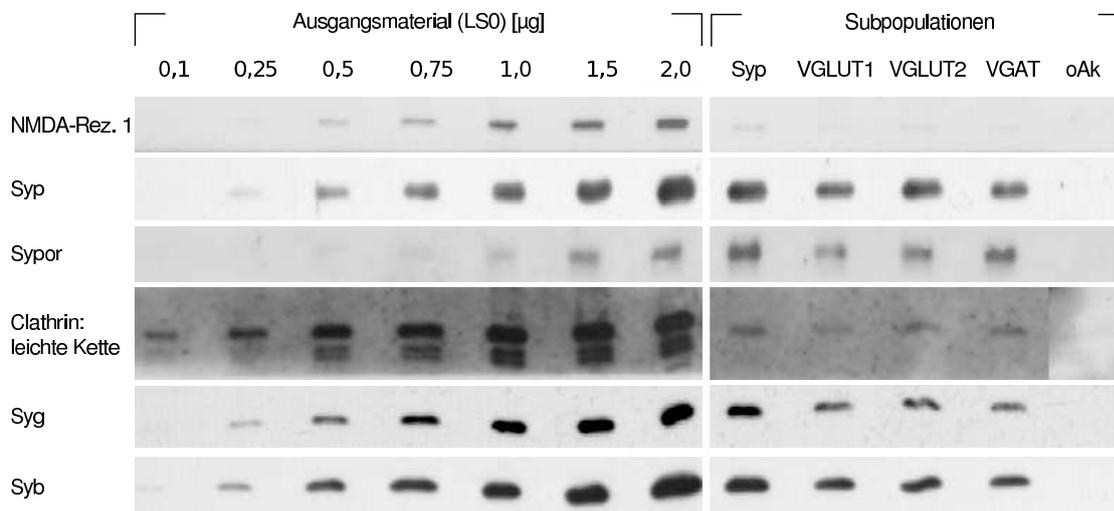
**Abbildung 3.13 – Vergleich der SP bezüglich der NT-Transporter.** Die Syp-, VGLUT1-, VGLUT2- und VGAT-SP aus dem Gesamtgehirn adulter Ratten wurden auf Unterschiede in der Transporterproteinausstattung untersucht. Die Konzentrationsreihe des Ausgangsmaterials (links) diente der späteren Berechnung relativer Proteinmengen bestimmter Proteine. Das Ausgangsmaterial (LS0-Fraktion in aufsteigenden Mengen; links), die SPs und die Kontrollbeads (jeweils rechter Teil der Abb.) wurden einer WB-Analyse unterzogen. Es sind Unterschiede zwischen den VGLUT-SP und der VGAT-SP zu erkennen. Insbesondere die VGLUT2- und VGAT-SP zeigen eine Überlappung in der Transporterausstattung. Die Kontrollbedingung (oAk) zeigt eine unspezifische Immunisolierung ohne Primäntikörper. Verwendeter Beadtyp: Pan-Mouse-IgG.

In der VGAT-SP kolokalisieren VGLUT1 und VGLUT2.

### 3.4.2 Allgemeine Proteinausstattung der Subpopulationen

Die Analyse der SP erfolgte ähnlich wie im vorangegangenen Versuch (Abs. 3.4.1).

Die SPs wurden bezüglich eines postsynaptischen Proteins (NMDA-Rez. 1) und einiger allgemeiner



**Abbildung 3.14 – Vergleich der vesikulären Subpopulationen bezüglich allgemeiner Vesikelproteine.** Die Syp-, VGLUT1-, VGLUT2- und VGAT-SP aus dem Gesamtgehirn adulter Ratten wurden bezüglich der aufgeführten allgemeinen SV- und postsynaptischen Proteine verglichen. Die Konzentrationsreihe des Ausgangsmaterials (links, LS0-Fraktion) diente der späteren Berechnung relativer Proteinmengen bestimmter Proteine. Das Ausgangsmaterial, die SPs (rechts) und die Kontrollbeads (rechts) wurden einer WB-Analyse unterzogen. Es sind keine deutlichen Unterschiede zwischen den SP erkennbar. Die oAk-SP zeigt eine unspezifische Immunisolierung ohne Primäntikörper. Verwendeter Beadtyp: Pan-Mouse-IgG.

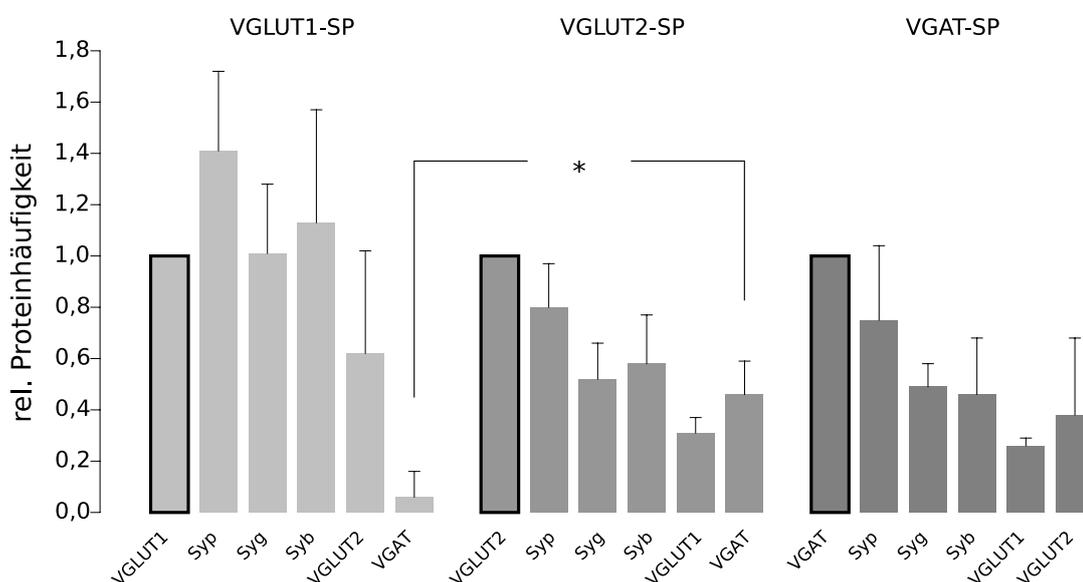
Vesikelproteine wie Syp, Syg, Sypor, Clathrin und Syb untersucht (Abb. 3.14).

Erwartungsgemäß lässt sich der NMDA-Rezeptor 1 im Ausgangsmaterial (vereint prä- und postsynaptische Bestandteile) deutlich nachweisen. Die anderen vesikulären Proteine, außer dem transient auf den SV vorkommenden Clathrin, sind in der LS0-Fraktion, in der Syp-SP und in allen Transporter-SP ohne deutliche Unterschiede detektierbar.

### 3.4.3 Relative Häufigkeiten der SV-Proteine in den vesikulären Subpopulationen

Nachfolgend wird der qualitative Vergleich der SPs durch eine Quantifizierung der Ergebnisse der WB-Analyse für die VGLUT1-, VGLUT2- und VGAT-SP (Abb. 3.13 und 3.14) auf dem semi-quantitativen Niveau ergänzt (Abb. 3.15).

Aus den Konzentrationsreihen der WB-Analyse (Abb. 3.13 und 3.14, links) wurden Standardkurven



**Abbildung 3.15 – Vergleich der relativen Häufigkeiten der SV-Proteine innerhalb und zwischen den SP.** Aus den Standardkurven (berechnet aus der Konzentrationsreihe der LS0-Fraktion) wurden die relativen Proteinmengen (in  $\mu\text{g}$ ) der entsprechenden Proteine ermittelt. Die relative Häufigkeit ist das Verhältnis aus der relativen Proteinmenge des gesuchten Proteins (POI) und des Bezugsproteins, gegen das isoliert wurde. Die relativen Häufigkeiten der Bezugsproteine auf den SP wurden auf „1“ ( $\hat{=}$  100%) gesetzt und sind durch eine schwarze Umrandung hervorgehoben. Die relativen Häufigkeiten sind mit Standardabweichungen dargestellt. N = 3.

für jedes untersuchte Protein ermittelt, die anschließend für die Berechnung der relativen Proteinmenge im Ausgangsmaterial verwendet wurden. Mit der relativen Proteinmenge wurde die relative Häufigkeit eines Proteins auf dem SV bestimmt (Abb. 2.3). Es wurden die relativen Häufigkeiten der Proteine VGLUT1, VGLUT2, VGAT, Syp, Syg und Syb auf den Vesikeln der drei Transporter-SP berechnet. Die relative Häufigkeit ist hier definiert als das Verhältnis aus der relativen Proteinmenge des gesuchten Proteins (POI) und des Bezugsproteins im Ausgangsmaterial (vgl. Abs. 2.6.6). So ist das resultierende Verhältnis des subpopulationsdefinierenden Proteins in der entsprechenden SP immer „1“. Die Bezugsproteine – VGLUT1, VGLUT2 und VGAT – entsprechen den Proteinen, gegen die immunisoliert wurde.

Die relativen Häufigkeiten der Proteine der allgemeinen Proteinausstattung (Syp, Syg und Syb) zei-

gen in der VGLUT2- und VGAT-SP keine signifikanten Unterschiede. Die VGLUT1-SP zeigt ähnliche Verhältnisse wie die anderen beiden SP. Jedoch ist die Tendenz zu höheren relativen Häufigkeiten verglichen mit den VGLUT2- und VGAT-SP zu erkennen. Die VGLUT2- und VGAT-SP weisen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich VGLUT1 und VGLUT2 auf. Die Präsenz von VGLUT2 auf der VGAT-SP und von VGAT auf der VGLUT2-SP konnte auch in der quantitativen Analyse der Proteine bestätigt werden. Auf den Vesikeln der VGLUT2-SP befindet sich signifikant mehr VGAT als auf den SV der VGLUT1-SP.

## 3.5 **Syp-Subpopulation versus Rab5-Subpopulation**

### 3.5.1 **Qualitative Analyse**

Durch die vorangegangene Analyse wurde die Proteinausstattung auf synaptischen Vesikeln, also innerhalb eines Organellentyps, untersucht. Das SV durchläuft nach seiner Endozytose einige Stationen bis es rezirkuliert ist. So entstehen Kompartimente bzw. vesikuläre Strukturen mit synaptischen Vesikelproteinen, die aber nicht oder nur bedingt die Eigenschaften von SV haben. Nachfolgend werden daher zwei verschiedene Kompartimente – das synaptische Vesikel und das frühen endosomale Kompartiment – auf qualitative Unterschiede im Proteinbesatz verglichen.

Dazu wurden Immunisolierungen an Gehirnen adulter Ratten durchgeführt. Syp diente als Marker für ein sekretorisches SV und Rab5 als Marker für frühe Endosomen (Bucci et al., 1994; von Mollard et al., 1994). Mit Hilfe dieser Markerproteine wurden eine Syp- und eine Rab5-SP aufgereingt. Die Immunisolierung ohne Primärantikörper (oAk) gibt Aufschluss über die Unspezifität der Immunisolierung (Abb. 3.16). Die Beladung der Gele erfolgte mit aufsteigenden Mengen des Ausgangsmaterials (LS0-Fraktion), woraus Standardkurven für eine quantitative Analyse ermittelt wurden. Das Vorkommen der NT-Transporter, des assoziierten Proteins Rab5 und der Proteine der generellen Proteinausstattung wurde in allen SP analysiert.

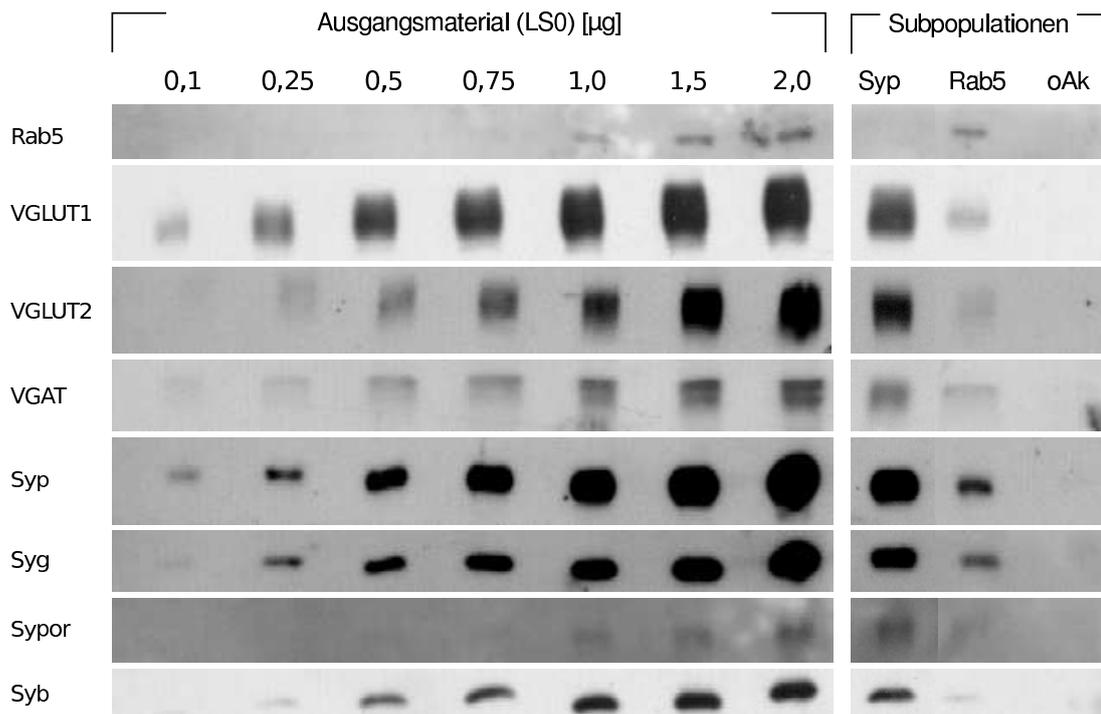
Erwartungsgemäß sind alle untersuchten Proteine im Ausgangsmaterial detektierbar. Außer Rab5 in der Syp-SP konnten alle weiteren untersuchten Proteine in beiden SP nachgewiesen werden. Die Rab5-tragende Strukturen wurden im Vergleich zur Syp-SP in geringeren Mengen isoliert.

### 3.5.2 **Proteinhäufigkeiten in der Syp- und Rab5-Subpopulation**

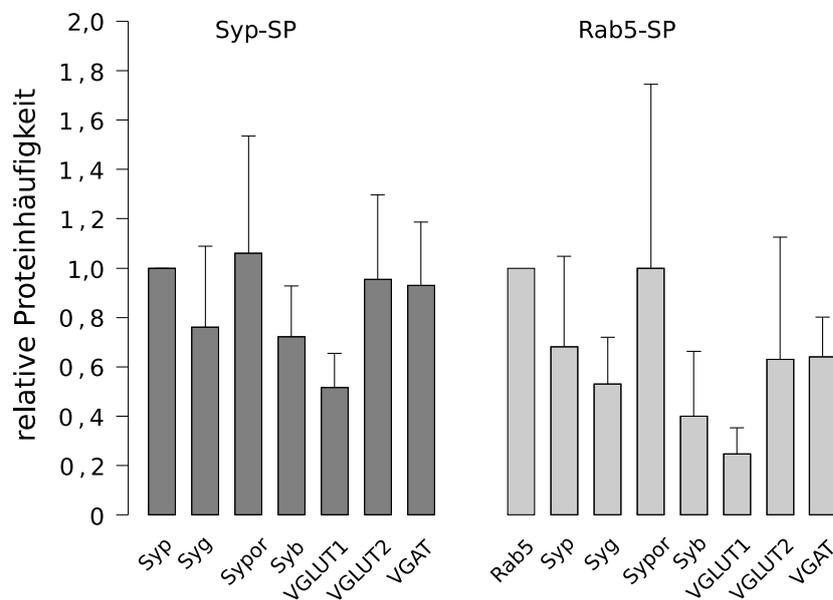
Die qualitative Analyse des vorangegangenen Abschnitts wurde durch eine semi-quantitative Analyse ergänzt (Abb. 3.17).

Das Vorgehen der Analyse erfolgte wie in Abschnitt 3.4.3.

Die Analyse der beiden Kompartimente ergab keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Proteinausstattungen. Beide SPs bzw. Kompartimente zeigen deutliche Signale für VGLUT1, VGLUT2 und VGAT. Die relative Häufigkeit von VGLUT1 ist in beiden SP mit der VGLUT2- und VGAT-SP



**Abbildung 3.16 – Vergleich der Proteinausstattung der SV und frühen Endosomen.** Es wurden Immunisolats mit dem SV-Kompartiment (Syp-SP) und dem frühen endosomalen Kompartiment (Rab5-SP) aufgereinigt. Zusätzlich erfolgte eine Isolierung ohne Primärantikörper (oAk). Die aufgeführten Proteine wurden mittels WB-Verfahren analysiert. Sowohl in der Konzentrationsreihe des Ausgangsmaterials (0,1 - 2 µg, links) als auch in den SP sind die aufgeführten Proteine bis auf Rab5 in der Syp-SP nachweisbar. Die Konzentrationsreihen dienen der Quantifizierung der relativen Proteinmengen und späteren Berechnung der relativen Häufigkeiten der aufgeführten Proteine. Verwendeter Beadtyp: Pan-Mouse-IgG



**Abbildung 3.17 – Quantitativer Vergleich der zwei Kompartimente.** Mittels Immunisolierung wurden eine Syp-SP und eine Rab5-SP generiert. Es wurden relative Proteinmengen berechnet, indem das Protein von Interesse (POI) mit dem Bezugsprotein, gegen das isoliert wurde, ins Verhältnis gesetzt wurden. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Proteinbestz beider Kompartimente. Es sind die relativen Proteinmengen der angegebenen Proteine pro SP mit Standardabweichungen dargestellt. N = 3.

vergleichbar (Abb. 3.15). Insgesamt zeigte sich die Tendenz für einen geringeren Proteinbesatz auf der Rab5-SP im Vergleich zur Syp-SP. Ursache hierfür könnte ein Auswertungsartefakt sein, da für die Rab5-SP größere Probenmengen in der WB-Analyse zum Einsatz kamen. Für die quantitative Analyse wurde der erhöhte Proteineinsatz durch ein lineares Modell anstelle eines Sättigungsmodells in der Signalentwicklung im WB korrigiert.

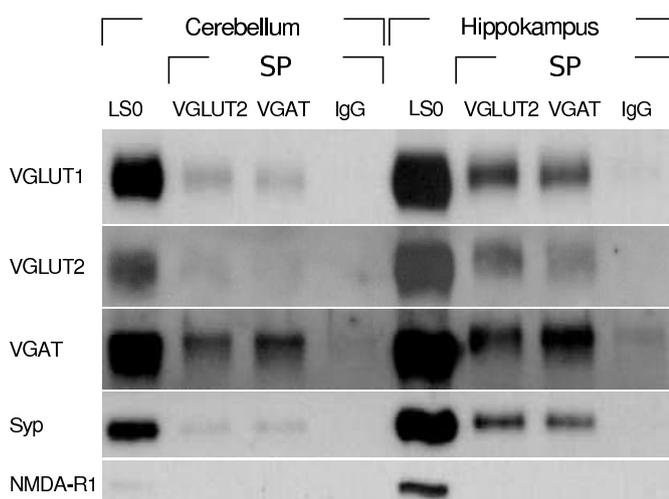
## 3.6 Subpopulationen aus verschiedenen Gehirnarealen

### 3.6.1 Subpopulationen aus dem Cerebellum und Hippokampus

In den vorangegangenen Untersuchungen wurden SPs stets aus dem Gesamtgehirn isoliert. Die folgenden Untersuchungen sollen zeigen, ob eine Immunisolierung, mit Antikörpern gerichtet gegen die NT-Transporter, auch aus speziellen Gehirnarealen möglich ist. Damit können aufgrund der weitestgehend komplementären Verteilung der VGLUT und VGAT auf bestimmte Gehirnareale (Herzog et al. (2001), Fremeau et al. (2001), Fremeau et al. (2004b), Kaneko und Fujiyama (2002), Kaneko et al. (2002), Hisano et al. (2002) und McIntire et al. (1997)) Unterschiede in der vesikulären Verteilung der Transporter in ausgewählten Gehirnarealen untersucht werden.

Zuerst wurden die Gehirnareale Cerebellum und Hippokampus untersucht. Das Cerebellum und die Hippokampi adulter Ratten wurden subzellulär bis zur LS0-Fraktion fraktioniert. Anschließend wurden VGLUT2- und VGAT-SPs isoliert und auf die Präsenz von Syp, dem NMDA-Rezeptor 1 und die Kolokalisation der NT-Transporter untersucht (Abb. 3.18). Die Kontrolle auf unspezifisch isoliertes Material erfolgte mit Beads, die mit unspezifischen Maus-IgG beschichtet sind (IgG).

Im Cerebellum waren VGLUT1, VGLUT2 und Syp in beiden SP im Vergleich zum Ausgangsmaterial



**Abbildung 3.18 – Vesikuläre SPs aus dem Cerebellum und dem Hippokampus.** Es wurden VGLUT2- und VGAT-SPs aus dem Cerebellum (links) und den Hippokampi (rechts) adulter Ratten isoliert. Die Proteinausstattungen der LS0-Fraktion und der SP wurden mittels WB-Verfahren bezüglich der aufgeführten Proteine analysiert. IgG = Kontrolle auf unspezifisch gebundenes Material mit beadgebundenem normalem Maus-IgG, SP = Subpopulation. Verwendeter Beadtyp: M-280 (0,5 bzw.  $1\mu\text{g}/10^7$  Beads)

schwach markiert. Hinsichtlich dieser Proteine unterscheiden sich die beiden SPs nicht. Es konnten VGAT-tragende SVs in beiden Immunisolaten angereichert werden. Der NMDA-Rezeptor 1 ist erwartungsgemäß nur im Ausgangsmaterial und hier aber auch nur schwach nachweisbar. Aus dem Cerebellum ist die Isolierung einer VGLUT2- und VGAT-SP nur mit geringerer Menge möglich. Im

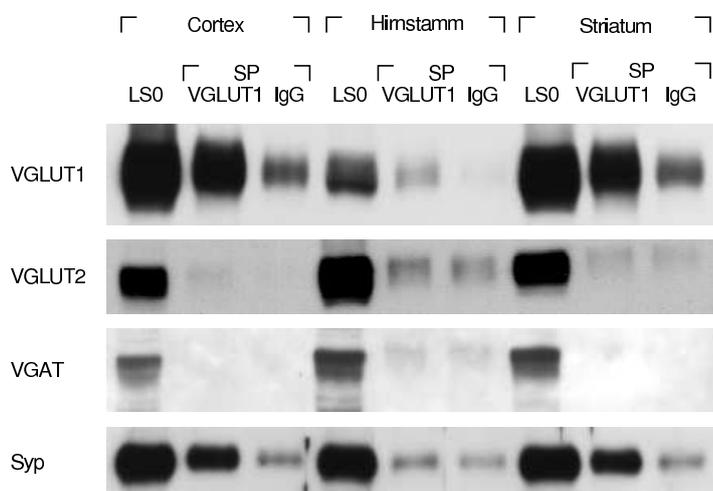
Hippokampus sind der NMDA-Rezeptor 1, Syp, VGLUT1 und VGLUT2 deutlich stärker exprimiert. VGAT ist auf den SV der VGLUT2-SP und VGLUT2 auf den SV der VGAT-SP nachweisbar. Aus dem Hippokampus könnten insgesamt größere Mengen synaptischer Vesikel isoliert werden. Eine Gemeinsamkeit beider Gehirnareale ist, dass VGAT sowohl in der VGAT-SP als auch in der VGLUT2-SP detektierbar ist.

### 3.6.2 Subpopulationen aus dem Cortex, Hirnstamm und Striatum

Im Weiteren wurden der Cortex, der Hirnstamm und das Striatum hinsichtlich einer möglichen Kolo-  
kalisierung der NT-Transporter VGLUT1, VGLUT2 und VGAT untersucht.

Es wurde eine VGLUT1-SP aus der LS0-Fraktion der jeweiligen Gehirnregion angereichert. Das Ausgangsmaterial und diese SPs wurden hinsichtlich der Transporter und Syp untersucht (Abb. 3.19). Die Kontrolle auf unspezifisch isoliertes Material erfolgte mit Beads, die mit unspezifischen Maus-IgG beschichtet sind (IgG).

Erwartungsgemäß ist VGLUT1 im Cortex und Striatum stärker exprimiert als im Hirnstamm. Die



**Abbildung 3.19 – VGLUT1-SP aus dem Cortex, Hirnstamm und Striatum.** Es wurden VGLUT1-SPs aus dem Cortex, Hirnstamm und Striatum isoliert und die Verteilung der aufgeführten Proteine mittels WB-Verfahren analysiert. Die Kontrolle auf unspezifisch gebundenes Material erfolgte mit beadgebundenem normalem Maus-IgG. SP = Subpopulation. Verwendete Beads: M-280 ( $0,5\mu\text{g}/10^7$  Beads).

Immunisierungs-  
menge aus dem Hirnstamm mit Antikörpern gegen VGLUT1 ist im Gegensatz zur Isolierung aus dem Gesamtgehirn stark reduziert.

VGLUT2 ist in der LS0-Fraktion des Hirnstamms am deutlichsten sichtbar. Dagegen liegt das VGLUT2-Signal in den drei SP nur geringfügig über dem des jeweiligen Hintergrundsignals (IgG).

Wie auch schon in den Isolaten aus dem Gesamtgehirn (Abb. 3.13 und 3.15) ersichtlich, ist VGAT nicht bzw. kaum in den arealspezifischen VGLUT1-SP nachweisbar. Aufgrund des hohen Myelinanteils im Hirnstamm können wahrscheinlich nur geringere Mengen immunisoliert werden .

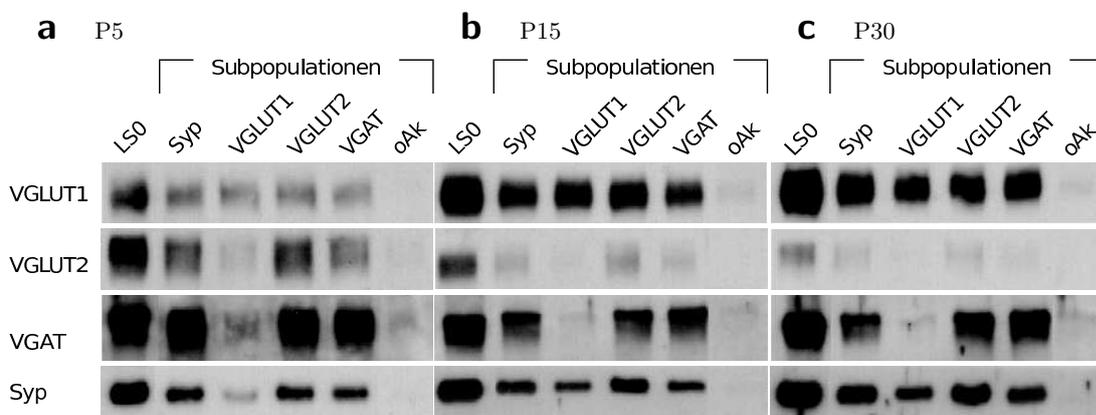
## 3.7 NT-Transporterkolokalisation in verschiedenen Entwicklungsstadien

### 3.7.1 Qualitative Analyse

Nachdem die Kolokalisation der NT-Transporter in verschiedenen Transporter-SPs, unterschiedlichen Zellkompartimenten und Gehirnarealen überprüft wurde, stellte sich die Frage, ob diese Kolokalisation entwicklungsbedingten Veränderungen unterliegt oder nur im adulten Gehirn vorkommt?

Zu diesem Zweck wurden Immunisolierungen gegen Syp, VGLUT1, VGLUT2 und VGAT aus dem gesamten Rattengehirn in unterschiedlichen postnatalen Entwicklungsstadien durchgeführt (P5, P15 und P30, Abb. 3.20). Die Immunisolierung ohne Primärantikörper (oAk) gibt Aufschluss über die Unspezifität der Immunisolierung.

Zu erkennen ist eine schwache Exprimierung des VGLUT1 im P5-Stadium, die mit fortschreitender



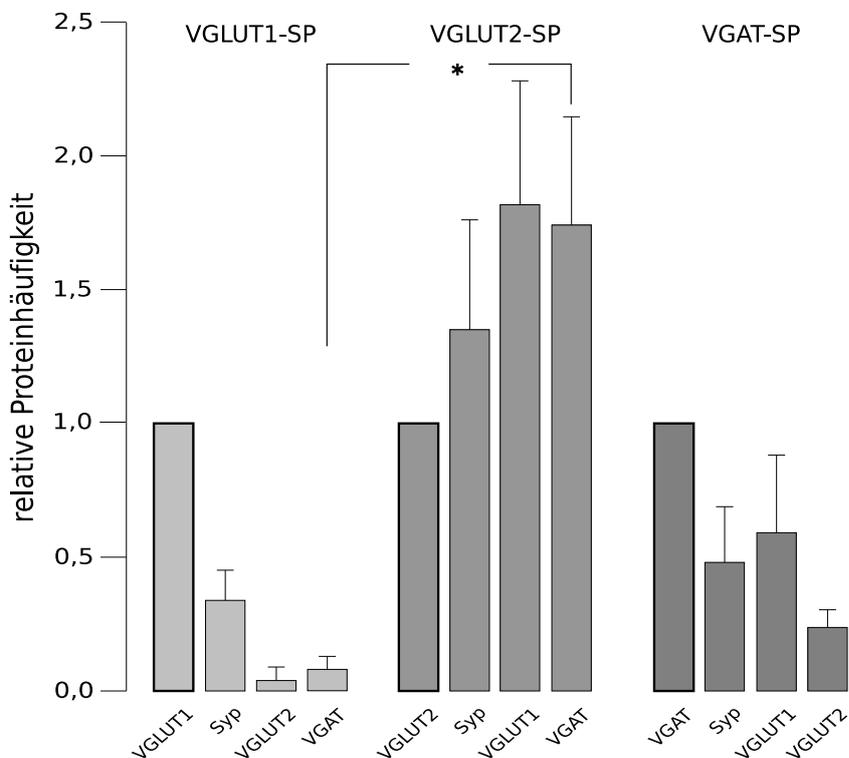
**Abbildung 3.20 – Kolokalisation der NT-Transporter in verschiedenen Entwicklungsstadien** Die Kolokalisation der NT-Transporter VGLUT1/2 und VGAT wurde in Immunisolierungen in drei postnatalen Entwicklungsstadien am Gesamtgehirn der Ratte untersucht ( a = P5, b = P15, c = P30). Im P5-Stadium ist VGLUT1 schwach exprimiert. VGLUT2 und VGAT zeigen eine starke Exprimierung. In diesem Stadium ist bereits eine Kolokalisation von VGLUT1/2 und VGAT sowohl in der VGLUT2-SP als auch in der VGAT-SP zu erkennen. In den folgenden Stadien bleibt diese Kolokalisation bestehen, wobei VGLUT1 zunehmend stärker und VGLUT2 zunehmend schwächer exprimiert werden. a - c gleiche Belichtungsdauer. oAk = Immunisolierung ohne Primärantikörper. N: P5 = 3, P15=1, P30=1 bzw. 4.

Entwicklung bis zum P30-Stadium im Ausgangsmaterial und in allen untersuchten SP deutlich zunimmt. Dadurch können größere Mengen VGLUT1-tragender SV angereichert werden. Es ist bekannt, dass VGLUT2 in frühen Stadien die dominante VGLUT-Isoform im Gehirn ist. Später sind weniger präsynaptische Endigungen mit VGLUT2 und auch VGAT ausgestattet. Diese Verschiebung der Verhältnisse ist auch in den LS0-Fraktionen und den SP erkennbar. Schon in den frühen Entwicklungsstadien (P5 und P15) ist die Lokalisierung von VGLUT2 auf den Vesikeln der VGAT-SP aber auch von VGAT auf den Vesikeln der VGLUT2-SP klar ersichtlich. VGLUT1 ist in allen SP nachweisbar. Die Untersuchungen am P30-Stadium zeigen die SPs und ihre vesikuläre Proteinausstattung einer Ratte vor dem Adultstadium. Daher unterscheiden sich die SPs aus Gehirnen des P30-Stadiums und die SPs aus Gehirnen adulter Tiere (Abs. 3.4.1 und 3.4.3).

### 3.7.2 Quantitative Analyse

Die qualitative Analyse der Proteinausstattung der SP aus Abschnitt 3.7.1 wurde durch eine semiquantitative Analyse des Proteinbesatzes der VGLUT1-, VGLUT2- und VGAT-SP aus dem Gesamtgehirn der Ratte im P5-Stadium ergänzt (Abb 3.21).

Die relativen Proteinhäufigkeiten wurden mit Hilfe der Standardkurven, die sich aus den Konzentri-



**Abbildung 3.21 – Relative Häufigkeiten vesikulärer Proteine in transporterspezifischen SPs im P5-Stadium.**

Diese Abbildung stellt den Vergleich der relativen Häufigkeiten vesikulärer Proteine innerhalb und zwischen den transporterspezifischen SP in P5-Ratte dar. Mit Hilfe von Konzentrationsreihen aus dem Startmaterial (LS0-Fraktion) wurden Standardkurven für die jeweiligen Proteine berechnet. Anhand der Standardkurven wurde für jedes Protein die relative Proteinmenge im Ausgangsmaterial bestimmt und daraus die relative Proteinhäufigkeit ermittelt. Die relative Häufigkeit ist das Verhältnis aus der relativen Proteinmenge des gesuchten Proteins (POI) und des Bezugsproteins (NT-Transporter), gegen das isoliert wurde. Die relative Häufigkeit des Bezugsproteins jeder SP ist in der Darstellung stark umrandet.  $p = 0,02$ .  $N = 3$ .

onsreihen des Ausgangsmaterials ergaben, analog zu denen des adulten Gehirns ermittelt. Die relativen Proteinhäufigkeiten in den SP wurden für VGLUT1, VGLUT2, VGAT und Syp ermittelt.

Die Isolierungsmenge der VGLUT1-SP ist aufgrund der schwächeren VGLUT1-Exprimierung geringer. Das zeigte auch die qualitative Untersuchung (Abb. 3.20). Die VGLUT1-SP des P5-Stadiums ist durch einen geringeren Proteinbesatz charakterisiert. Im Gegensatz dazu ist der Proteinbesatz der VGLUT2-SP im Vergleich zur VGLUT1- und VGAT-SP höher. Das spricht für einen höheren Anteil der SV, die zusätzlich zum VGLUT2 entweder VGLUT1 oder VGAT tragen. Erstaunlicherweise kommen VGLUT1 und VGAT — im Gegensatz zur VGLUT2-SP aus dem adulten Gehirn — häufiger in der VGLUT2-SP der P5-Präparation vor (Abb. 3.15). In der VGAT-SP finden sich neben VGAT auch die anderen untersuchten Transporter. Diese SP besitzt eine ähnliche Proteinausstattung wie die VGAT-SP aus dem adulten Gehirn.

### 3.8 Neurotransmitteraufnahme synaptischer Vesikel

Die Kolokalisation der NT-Transporter — im speziellen VGLUT2 und VGAT — wurde bisher nur auf der Ebene der Proteinausstattung eines SV betrachtet. Daraus ergeben sich folgende Fragen:

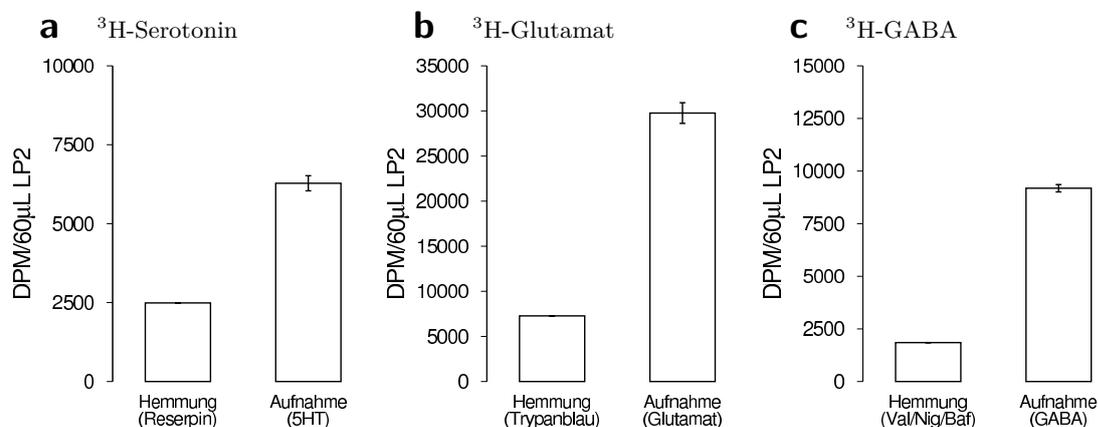
1. Sind immunisolierte SV funktionell aktiv bzw. zur Transmitteraufnahme fähig?
2. Wenn ja, hat die vesikuläre Kolokalisation der NT-Transporter eine funktionelle Relevanz?

#### 3.8.1 Neurotransmitteraufnahme in Vesikel der LP2-Fraktion

Zu Beginn wurde die Aufnahme der Neurotransmitter Serotonin (5HT), Glutamat und GABA durch den entsprechenden NT-Transporter an der Vesikelfraktion LP2 unter Standardbedingungen (Abb. 3.22) anhand etablierter Protokolle getestet (Brunk et al., 2008).

Als Kontrolle wurden im Fall der Transporter VMAT2 und der VGLUT (alle drei Isoformen) die Inhibitoren Reserpin bzw. Trypanblau verwendet (Abb. 3.22a und b). Eine spezifische Hemmung des VGAT ist nach heutigem Kenntnisstand noch nicht möglich. Deswegen wurde die GABA-Aufnahme durch die Hemmung des elektrochemischen Gradienten ( $\Delta\mu H^+$ ) mit Valinomycin, Nigericin und Bafilomycin durchgeführt (Abb. 3.22c).

Ohne Hemmung der Transporter wurden die entsprechenden Neurotransmitter im Vesikellumen ange-



**Abbildung 3.22 – NT-Aufnahmen in SV der LP2-Fraktion.** Die Aufnahme der radioaktiv markierten NTs wurde in Zerfallsereignisse pro Minute (DPM) gemessen. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der y-Achsen. a und c wurden mit der LP2-Fraktion aus der Ratte und b mit der LP2-Fraktion aus der Maus durchgeführt. Die Vesikel der LP2-Fraktion nehmen sowohl 5HT (a, rechts), Glutamat (b, rechts) als auch GABA (c, rechts) auf. Dabei zeigen der VMAT2 und die VGLUT jeweils eine deutliche Reduzierung der Transportleistung in Gegenwart des spezifischen Inhibitors (a und b, jeweils links). Durch das Zusammenbrechen des  $\Delta\mu H^+$  wird deutlich weniger GABA aufgenommen (c, links). Nig = Nigericin, Val = Valinomycin und Baf = Bafilomycin.

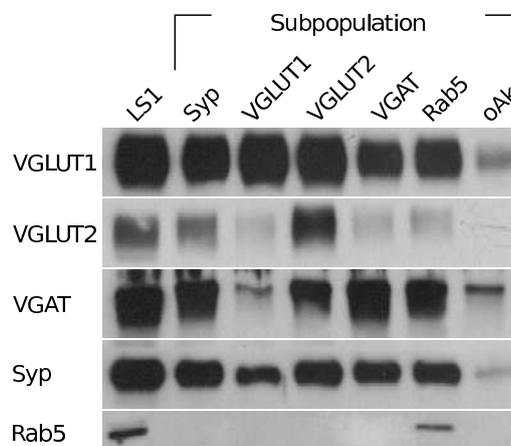
reichert. Beim Einsatz der Inhibitoren erfolgt in jedem Fall ein eindeutiger Abfall der Transportleistung (Abb. 3.22).

### 3.8.2 Vesikuläre Subpopulationen aus der LS1-Fraktion

Die NT-Aufnahme in immunisolierte SV setzt voraus, dass in großer Menge SV isoliert werden können und diese nach der Isolierung in einer noch funktionell aktiven Form vorliegen. Eine hohe Isolierungseffizienz begünstigt die Detektion geringerer Unterschiede in den Eigenschaften des betreffenden Transportsystems.

Für die NT-Aufnahme in immunisolierte SV wurde die LS0-Fraktion einem weiteren Zentrifugations-schritt unterzogen (Abb. 2.1, LS1-Fraktion). Die resultierende LS1-Fraktion enthält im Vergleich zur LS0-Fraktion keine Plasmamembranen, was den Zugang der beadgekoppelten Antikörper zu den entsprechenden SV während der Immunisolierung erleichtern sollte. Anhand einer WB-Analyse wurde im Anschluss qualitativ geprüft, ob die vesikuläre NT-Transporterausstattung der SPs aus der LS0- und LS1-Fraktion ähnlich sind (Abb. 3.23). Es wurde eine Syp-, VGLUT1-, VGLUT2-, VGAT- und eine Rab5-SP isoliert. Die Isolierungseffizienz der LS1-Fraktion ist gegenüber der der LS0-Fraktion

**Abbildung 3.23 – Immunisolierungen aus der LS1-Fraktion.** Die Syp-, VGLUT1-, VGLUT2-, VGAT- und Rab5-SP aus dem Gesamthirn adulter Ratten wurden aus der LS1-Fraktion isoliert und im WB-Verfahren bezüglich der aufgeführten Proteine untersucht. Die Inkubation der Beads ohne Primärantikörper diente der Kontrolle auf unspezifisch gebundenes Material. Insbesondere die Isolierungseffizienz für Rab5 ist gegenüber der Isolierung aus der LS0-Fraktion erhöht. Das subpopulationspezifische Expressionsmuster der NT-Transporter stimmt mit dem Muster der Isolierung aus der LS0-Fraktion (Abb. 3.13, 3.14) überein. oAk = Isolierung ohne Primärantikörper.



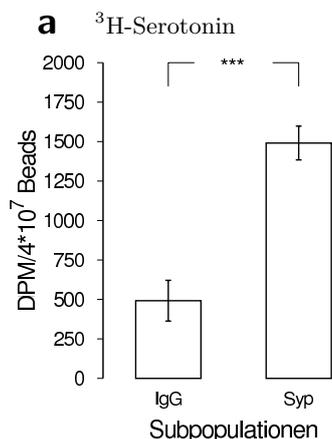
deutlich erhöht. Das ist auch an einem deutlichen Nachweis für Rab5 und den anderen Proteine auf der Rab5-SP erkennbar (vergleiche auch mit der Immunisolierung aus der LS0-Fraktion, Abb. 3.16). Das Proteinausstattungsmuster der SP aus der LS1-Fraktion weist im Vergleich zu dem aus der LS0-Fraktion keine wesentlichen Unterschiede auf (siehe auch Abb. 3.13, 3.14). Auch hier sind VGLUT1 und VGLUT2 in der VGAT-SP sowie VGLUT1 und VGAT in der VGLUT2-SP kolokalisiert. Die VGLUT1-SP trägt zusätzlich nur VGLUT1 aber kein VGAT.

Eine ausreichende Menge an SV ist insbesondere für die NT-Aufnahme an immunisolierten SV entscheidend. Mit dem angewendeten Versuchsansatz konnte eine Erhöhung der Menge isolierter SV erreicht werden.

### 3.8.3 5HT-Aufnahme in SV der Syp-Subpopulation

Die Aufnahme der verschiedenen NT konnte eindeutig an der LP2-Fraktion gezeigt werden (Abb. 3.22). Immunisolierungen, die für die NT-Aufnahme bestimmt waren, wurden mit Beads des Typs M-280 (0,5-1  $\mu$ g Antikörper/1,4 $\cdot$ 10<sup>7</sup> Beads) durchgeführt, da diese Beads in der IgG-Kontrollbedingung weniger unspezifische Aufnahme zeigten (Abs. 2.6.5.3). Im Vergleich zur NT-Aufnahme in SV der LP2-Fraktion

ist die NT-Aufnahme in immunisolierte SV aufgrund geringer Mengen isolierter SV erschwert. Darum wurde zu Beginn mit der Serotonin-Aufnahme (5HT-Aufnahme) durch den NT-Transporter VMAT2 ein robustes Transportsystem gewählt. Der  $K_D$ -Wert des VMAT2 zu seinem Substrat 5HT liegt im nanomolaren Bereich. Dieser Transporter besitzt im Vergleich zu VGLUT1/2 und VGAT die höchste Affinität zu seinem Substrat. Die Syp-SP beinhaltet auch eine Teilmenge der VMAT2-tragender SV. Daher kann anhand dieser SP die 5HT-Aufnahme in immunisolierte SV überprüft werden (Abb. 3.24). Die Kontrolle auf die unspezifische 5HT-Aufnahme erfolgte in SV einer unspezifischen SP (isoliert mit



**Abbildung 3.24 – 5HT-Aufnahme durch die Vesikel der Syp-SP.** Mit unspezifisch (IgG) und spezifisch (Syp) immunisierten SV aus der LS1-Fraktion wurde die 5HT-Aufnahme durchgeführt. VMAT2 wird durch Reserpin spezifisch gehemmt (nicht gezeigt). Dabei zeigt sich, dass der VMAT2-tragende Anteil der Vesikel einer Syp-SP 5HT aufnimmt. Die dargestellten DPM-Werte sind durch die Werte der reserpinsensitiven Aufnahme korrigiert. 4-fach-Bestimmungen. t-Test, einseitig, ungleiche Varianz:  $p = 0,000013$ .

beadgekoppeltem unspezifischem IgG aus der Maus). Die 5HT-Aufnahme wurde an einer Syp-SP durchgeführt. Die 5HT-Aufnahme durch VMAT2 in SV der IgG- und Syp-SP wurde durch Reserpin gehemmt.

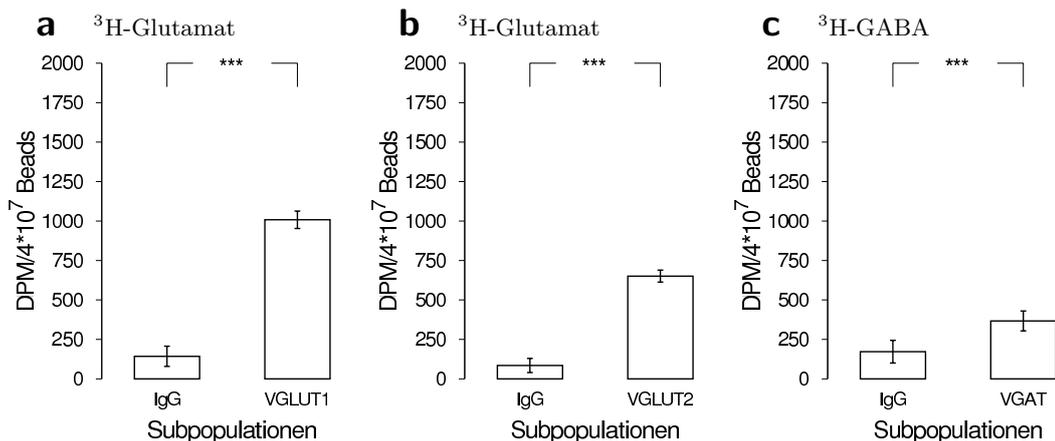
Dieser Versuch zeigt, dass neurotransmitteraufnahmekompetente SVs isoliert wurden. Die SV der IgG-SP, die unspezifisch gebunden sind, nehmen gegenüber der Syp-SP signifikant weniger Neurotransmitter auf.

Die deutlich reduzierte NT-Aufnahme beider SP weist auf eine drastisch verminderte Menge SV im Vergleich zur NT-Aufnahme in SV der LP2-Fraktion hin (NT-Aufnahme in SV der LP2-Fraktion, Abb. 3.22).

### 3.8.4 NT-Aufnahme in transporterspezifische Subpopulationen

Die vorangegangenen Versuche haben bereits verdeutlicht, dass NT-aufnahmefähige SV durch die Immunisolierung angereichert werden können. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass ein bestimmter Transporter innerhalb einer SP mit unterschiedlichen Transportern selektiv aktiviert werden kann. Im Folgenden wurde überprüft, ob die SV der transporterspezifischen SPs in der Lage sind, ihren entsprechenden Neurotransmitter aufzunehmen.

Dazu wurden die VGLUT1- und VGLUT2-SP jeweils der Glutamat- und die VGAT-SP der GABA-Aufnahme unterzogen (Abb. 3.25). Die Glutamataufnahme der VGLUT-SP wurde mit Trypanblau spezifisch und die GABA-Aufnahme der VGAT-SP mit Valinomycin und Bafilomycin unspezifisch gehemmt. Die Kontrolle auf unspezifische NT-Aufnahme erfolgte an SV einer unspezifischen SP (IgG-



**Abbildung 3.25 – NT-Aufnahme an den transporterspezifischen SPs.** Die VGLUT1- und VGLUT2-SP zeigen eine deutliche Glutamat- (a und b) und die Vesikel der VGAT-SP eine GABA-Aufnahme (c). Die Immunisolierung mit der IgG-SP stellt die Glutamat- bzw. GABA-Aufnahme an unspezifisch gebundenen SV dar. Die Aufnahmeversuche erfolgten mit den entsprechenden Standardpuffern. Aufgetragen sind die Mittelwerte der Zerfallsereignisse pro Minute (DPM), die durch die inhibitorsensitive Aufnahme korrigiert wurden. Die NT-Aufnahme der VGLUT1- und VGLUT2-SP wurde durch Trypanblau und die GABA-Aufnahme der VGAT-SP durch Valinomycin und Bafilomycin gehemmt. Anzahl der Bestimmungen: (a) = 3, (b) = 4, (c) = 4. t-Test: einseitig, ungleiche Varianz, p-Werte: (a) = 0,000005; (b) = 0,0000079; (c) = 0,0069.

SP, isoliert mit beadgekoppeltem unspezifischem IgG aus der Maus).

Alle untersuchten transporterspezifischen SPs nehmen gegenüber den IgG-SP signifikant mehr des angebotenen Neurotransmitters auf. Dabei zeigt die VGLUT1-SP eine höhere Glutamataufnahme als die VGLUT2-SP (Abb. 3.25a und 3.25b).

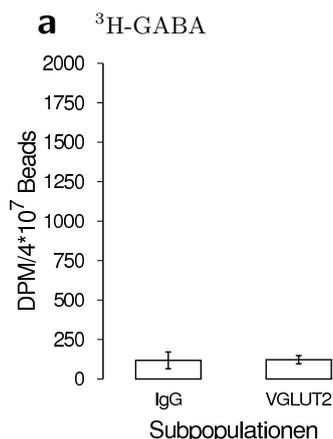
Insgesamt ist die Menge isolierter Vesikel der VGLUT1-, VGLUT2- und VGAT-SP ausreichend, um die Glutamat- bzw. GABA-Aufnahme an isolierten SV zu zeigen (vergleiche Abs. 3.8.1).

### 3.8.5 Keine GABA-Aufnahme der VGLUT2-SP

Wie die WB-Analyse deutlich zeigte, befanden sich zusätzlich zum VGLUT2 auch VGLUT1 sowie VGAT auf den Vesikeln der VGLUT2-SP (Abb. 3.13). Der GABAerge Charakter eines VGLUT2-tragenden SV sollte deshalb auch anhand der GABA-Aufnahme überprüft werden (Abb. 3.26).

Um einen eventuell synergistischen Effekt von VGLUT2 und VGAT zu zeigen, wurden experimentelle Bedingungen gewählt, in denen der <sup>3</sup>H-GABA-Transport in SV der VGLUT2-SP in Gegenwart von 150mM unmarkiertem Glutamat stattfand (KG-Puffer). Die Hemmung von VGLUT1, VGLUT2 und VGAT erfolgte in diesem Fall unspezifisch mit Nigericin, Valinomycin und Bafilomycin.

Die GABA-Aufnahme in die SV der VGLUT2-SP kann unter diesen Bedingungen allerdings nicht gezeigt werden. Die VGAT-vermittelte GABA-Aufnahme in die SV der VGLUT2-SP ist wahrscheinlich aufgrund der geringen Anzahl an VGAT-Kopien auf diesen Vesikeln sowie der geringen Affinität des VGAT zu seinem Substrat (millimolarer  $K_M$ -Wert) mit diesem methodischen Ansatz nicht aufzulösen.



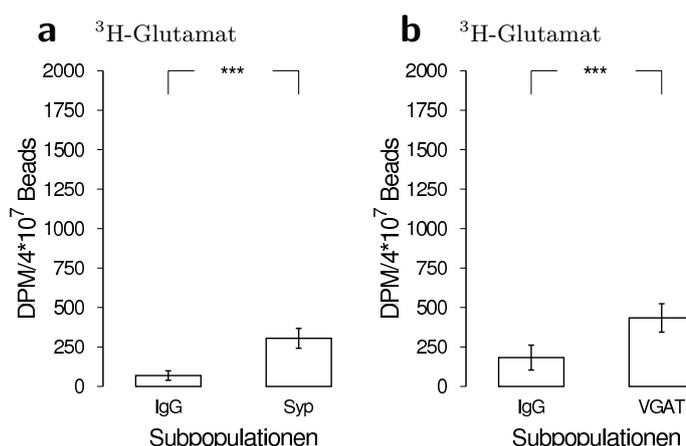
**Abbildung 3.26 – GABA-Aufnahme in die SV der VGLUT2-SP.** Die Aufnahme markierten GABAs ( $^3\text{H-GABA}$ ) in SV der VGLUT2-SP erfolgte zusätzlich in Gegenwart von 150mM unmarkiertem Glutamat. Die NT-Aufnahme wurde durch Nigericin, Valinomycin und Bafilomycin unspezifisch gehemmt. Dargestellt sind die gemittelten Zerfallereignisse pro Minute (DPM), die durch die inhibitorsensitive Aufnahme korrigiert wurden. IgG = unspezifische SP. 4-fach-Bestimmungen. t-Test: einseitig, ungleiche Varianz, n. s..

### 3.8.6 Glutamataufnahme in die SV der Syp- und VGAT-SP

Die VGLUTs besitzen eine höhere Affinität zu ihrem Substrat als VGAT ( $K_M\text{-VGLUT} = 1\text{-}3\text{mM} < K_M\text{-VGAT} = 5\text{mM}$ ). Der experimentelle Nachweis der Glutamataufnahme in die SV der VGAT-SP — und damit die Präsenz der VGLUT auf den Vesikeln der VGAT-SP — ist als Folge dieser höheren Affinität möglicherweise leichter zu erbringen (Abb. 3.27).

Für die Untersuchung, ob die Glutamataufnahme aus einer Teilmenge isolierter SV möglich ist, wurde zu Beginn die  $^3\text{H}$ -Glutamataufnahme in die SV der Syp-SP untersucht. Aufgrund ihrer Eigenschaft als vesikuläre Mischpopulation beinhaltet sie auch VGLUT-tragende SV, die zur Glutamataufnahme befähigt sein sollten. Die VGLUT-Isoformen müssen sich jedoch nicht auf dem selben Vesikel befinden. Wie für die SV der Syp-SP wurde die Glutamataufnahme auch an den SV der VGAT-SP durchgeführt. Die VGLUTs wurden in beiden SP spezifisch durch Trypanblau gehemmt.

Die Vesikel der Syp- und VGAT-SP nahmen signifikant mehr Glutamat auf als die IgG-SP. Die Gluta-



**Abbildung 3.27 – Glutamataufnahme an der Syp- und VGAT-SP.** Die Glutamataufnahme erfolgte an der Syp- (a) und VGAT-SP (b). Die NT-Aufnahme wurde in jeder SP mit Trypanblau gehemmt. Die Kontroll-SP (IgG-SP) diente der Bestimmung der unspezifischen NT-Aufnahme. Aufgetragen sind die Mittelwerte der Zerfallereignisse pro Minute, die durch die trypanblausensitive Aufnahme korrigiert wurden (DPM). Beide SPs zeigten einen eindeutigen Transport von Glutamat ins SV. Die IgG-SP zeigte im Vergleich zur Syp- und VGAT-SP eine signifikant niedrigere Glutamataufnahme. 4-fach-Bestimmungen. t-Test: einseitig, ungleiche Varianz, p-Werte: (a) = 0,0015; (b) = 0,0069.

mataufnahme der Syp- und VGAT-SP liegt nach der Hemmung mit Trypanblau signifikant über der Aufnahme der unspezifischen IgG-SP.

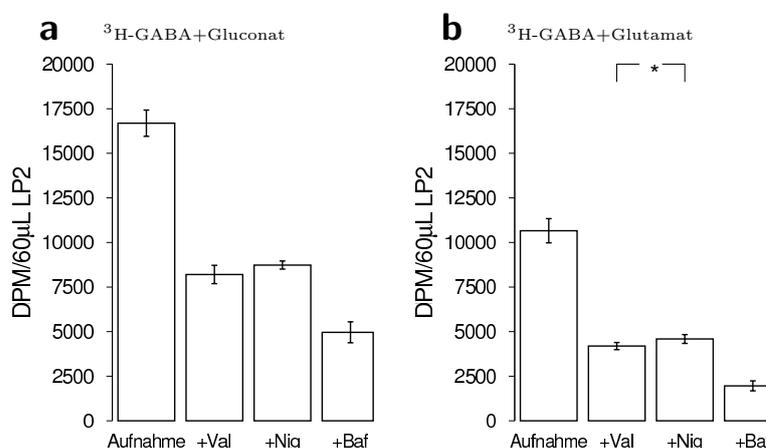
Dieses Experiment beweist eindeutig, dass die Vesikel der VGAT-SP auch Glutamat im Vesikellumen akkumulieren können. Es wurde demzufolge eine VGAT-SP angereichert, in der die VGLUTs und

VGAT zumindest in einer Teilmenge dieser SP auf demselben Vesikel koloalisieren.

### 3.8.7 Partielle Hemmung der GABA-Aufnahme

Die GABA-Aufnahme konnte bisher nicht an immunisolierten VGLUT2-tragenden Vesikeln nachgewiesen werden (Abb. 3.26). Mit einem höheren Vesikeleinsatz könnten auch geringe Unterschiede in den Transportleistungen aufgedeckt werden. Deshalb wurde für die weiteren Versuche die LP2-Fraktion verwendet, die größere Mengen SV enthält.

Das Membranpotential ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) setzt sich aus den Komponenten  $\Delta\Psi$  und  $\Delta\text{pH}$  zusammen ( $\Delta\mu\text{H}^+ = \Delta\Psi + \Delta\text{pH}$ ). Der Glutamattransport der VGLUT hängt hauptsächlich vom  $\Delta\Psi$  und der GABA-Transport von  $\Delta\Psi$  und  $\Delta\text{pH}$  ab (Überblick, Edwards (2007)). Deshalb wurden im Folgenden die Transporteraktivitäten während der GABA-Aufnahme untersucht, indem die  $\Delta\Psi$  und  $\Delta\text{pH}$  separat verändert wurden (Abb. 3.28). Die GABA-Aufnahme wurde in Abwesenheit (mit Gluconat, Abb. 3.28a)



**Abbildung 3.28 – Partielle Hemmung der GABA-Aufnahme.** Die  $^3\text{H}$ -GABA-Aufnahme fand in Gegenwart von unmarkiertem Gluconat (a) und in Gegenwart von unmarkiertem Glutamat (b) statt. In beiden Fällen erfolgte eine teilweise Hemmung der  $^3\text{H}$ -GABA-Aufnahme durch Valinomycin bzw. Nigericin. Die vollständige Hemmung der  $^3\text{H}$ -GABA-Aufnahme erfolgte durch Bafilomycin. Die  $^3\text{H}$ -GABA-Aufnahme ist zwischen Abbildung 3.28a und 3.28b nur eingeschränkt vergleichbar, da es sich um getrennte Experimente handelt, in denen die gewonnenen Vesikelmengen variabel sind. Aufgetragen sind die Mittelwert der Zerfallsereignisse pro Minute (DPM). 4-fach-Bestimmungen, t-Test, zweiseitig, ungleiche Varianz, p-Werte: (a) Val/Nig = n. s.; (b) Val/Nig = 0,05.

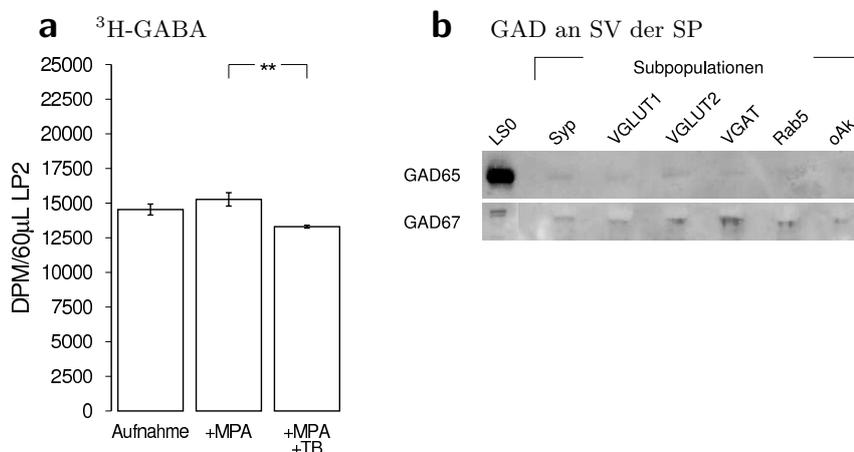
und in Anwesenheit (Abb. 3.28b) von Glutamat gemessen. Weiterhin erfolgte eine getrennte Behandlung mit Valinomycin und Nigericin. Valinomycin lässt das  $\Delta\mu\text{H}^+$  zusammenbrechen, indem es die Membranleitfähigkeit für  $\text{K}^+$ -Ionen deutlich erhöht. Nigericin hebt ebenfalls das  $\Delta\mu\text{H}^+$  auf, indem es als Antiporter für  $\text{K}^+$ - und  $\text{H}^+$ -Ionen wirkt. Somit unterdrückt Nigericin das  $\Delta\text{pH}$  und Valinomycin das  $\Delta\Psi$ . Die vollständige Hemmung des Transports erfolgte durch die Blockade der V-ATPase mit Bafilomycin.

In Gegenwart von Gluconat bewirkt Valinomycin einen 50%- und Nigericin einen 49%igen Abfall der GABA-Aufnahme. In Gegenwart von Glutamat ist ein signifikanter Unterschied in der GABA-Aufnahme zwischen der Hemmung mit Valinomycin (61%) und mit Nigericin (57%) festzustellen. Folglich scheint die VGAT-Aktivität etwas mehr von der elektrogenen Komponente des  $\Delta\mu\text{H}^+$  als

von der chemischen Komponente abzuhängen. Die Behandlung mit Bafilomycin senkt die GABA-Aufnahme auf das Hintergrundniveau (in Gluconatgegenwart: um 70%; in Glutamatgegenwart: um 82%).

### 3.8.8 Die Hemmung der Glutamatdecarboxylase und der VGLUT

Die vesikuläre Aufnahme von GABA durch den VGAT ist aufgrund seiner geringen Affinität zum GABA nicht optimal ( $K_D$ -Werte im millimolaren Bereich). Zudem ist die GABA-Konzentration in Vesikelnähe *in vivo* relativ niedrig. Die GABA-Beladung wird daher durch das vesikelassoziierte Protein Glutamatdecarboxylase (GAD) unterstützt, indem es auf der Vesikeloberfläche Glutamat in GABA umwandelt (siehe VGAT-SP in Abb. 3.29b). Für NT-Aufnahmeexperimente an SV der VGAT-SP bedeutet diese Umwandlung, dass radioaktiv markiertes GABA in Gegenwart von unmarkiertem Glutamat durch unmarkiertes GABA verdünnt wird. Folglich wird auch unmarkiertes GABA aufgenommen. Da dieses unmarkierte GABA nicht messbar ist, sind feine Unterschiede in den Transporteigenschaften nicht nachweisbar. Die Isoformen GAD65 und GAD67 lassen sich jedoch unter anderem durch die 3-Mercaptopropionsäure (MPA) spezifisch hemmen (Engel et al., 2001; Jin et al., 2003). Zur Demonstration des Beitrages, den die VGLUTs für die GABA-Aufnahme auf VGAT-tragenden SVs leisten, wurde der Effekt der GAD-Hemmung bezüglich der GABA-Aufnahme untersucht (Abb. 3.29a). Der GABA-Transport erfolgte unter Standardbedingungen mit der Ausnahme, dass der Aufnahme-



**Abbildung 3.29 – Hemmung der GAD und der VGLUT während der GABA-Aufnahme.**

(a) Während der  $^3\text{H}$ -GABA-Aufnahme in Gegenwart von unmarkiertem Glutamat wurden GAD65/67 durch  $10\mu\text{M}$  MPA gehemmt (+MPA). Zusätzlich wurde der VGLUT-Beitrag an der VGAT-vermittelten GABA-Aufnahme durch Trypanblau gehemmt (+MPA+TB). Die vollständige Hemmung erfolgte mit Nigericin, Valinomycin und Bafilomycin. Dargestellt ist der Mittelwert der Zerfallsereignisse pro Minute (DPM, hintergrundkorrigiert durch die Werte der vollständigen Hemmung). Diese Experiment zeigt deutlich den unterstützenden Effekt der VGLUT auf die GABA-Aufnahme in VGAT-tragende SV. 4-fach-Bestimmungen. t-Test, zweiseitig, ungleiche Varianz:  $p_{MPA/MPA+TB} = 0,0028$ .

(b) zeigt den Nachweis der GAD-Isoformen in der LS0-Fraktion und den SP in der WB-Analyse. GAD67 ist sowohl in der VGLUT2- als auch in der VGAT-SP verstärkt nachweisbar.

puffer unmarkiertes Glutamat anstelle von Gluconat enthielt. Die Kontrolle auf die unspezifische NT-Aufnahme erfolgte durch die vollständige Hemmung der GABA-Aufnahme mit Nigericin, Valinomycin und Bafilomycin.

Die erste Säule (Abb. 3.29a, links) zeigt die Aufnahme von radioaktiv markiertem GABA. Mit Hemmung der GAD (+MPA, 10 $\mu$ M) wurde unmarkiertes GABA weniger stark verdünnt, was in der Summe zu einer höheren Aufnahme des radioaktiv markierten GABA führte. Wurden dann zusätzlich auch die VGLUTs gehemmt (Abb. 3.29a, +MPA+TB), ergab sich eine signifikante Reduzierung der GABA-Aufnahme.

Dieses Experiment zeigt eindeutig die Koexistenz der VGLUT auf VGAT-tragenden SV in Verbindung mit einem fördernden Einfluss der VGLUT auf die GABA-Aufnahme. Mit Verwendung des GAD-Inhibitors MPA lassen sich geringe Unterschiede im Hinblick auf das synergistische Transportverhalten der VGLUTs und VGAT besser untersuchen.

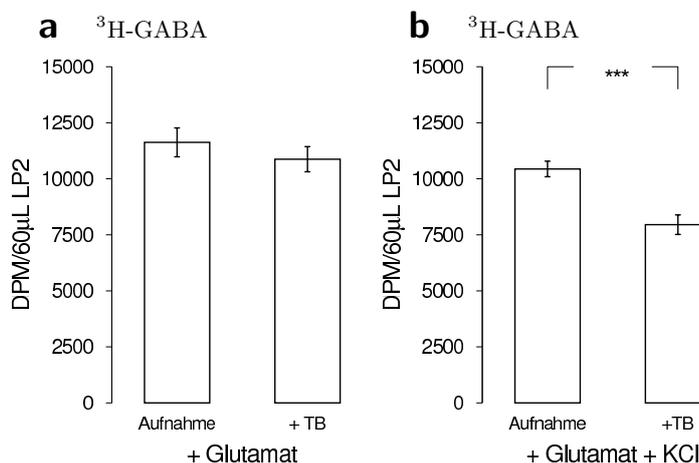
### 3.8.9 Einfluss des Chloridtransports der VGLUT auf die GABA-Aufnahme

Der VGLUT1 transportiert nicht nur Glutamat, sondern auch Chloridionen über die Vesikelmembran ins Vesikellumen. Diese Transporteigenschaft könnte auch für den VGLUT2 zutreffen (Schenck et al., 2009). Dadurch wird das Vesikellumen stärker azidifiziert und die GABA-Aufnahme durch VGAT erleichtert.

Um das zu prüfen, wurde in einem ersten Ansatz die GABA-Aufnahme in Gegenwart von 150mM Glutamat durchgeführt und die VGLUTs durch Trypanblau gehemmt (Abb. 3.30a). In einem zweiten Ansatz wurde die KCl-Konzentration im Aufnahmepuffer auf 50mM erhöht (und Glutamat auf 100mM reduziert, Abb. 3.30b) und die Aufnahme durch Trypanblau gehemmt.

Die Aufnahme ohne zusätzliches Chlorid ergab diesmal keinen signifikanten Unterschied zwischen der

**Abbildung 3.30 – Einfluss der Cl<sup>-</sup>-Konzentration auf die GABA-Aufnahme.** Die GABA-Aufnahme wurde in Gegenwart von 150mM Glutamat (a) bzw. 100mM Glutamat und 50mM KCl (b) durchgeführt. Die VGLUTs wurden in beiden Fällen durch Trypanblau und die GADs durch 10 $\mu$ M MPA blockiert. Die komplette Hemmung erfolgte mit Nigericin, Valinomycin und Bafilomycin. Dargestellt ist der Mittelwert der Zerfallsereignisse pro Minute (DPM, inhibitor-korrigiert). Gezeigt ist je ein repräsentatives Beispiel mit 3-fach-Bestimmungen. t-Test: zweiseitig, ungleiche Varianz, p-Werte: (a) = n.s., (b) p = 0,00093.



normalen GABA-Aufnahme und der mit Trypanblauhemmung (vergleiche Abs. 3.8.8). Im Gegensatz dazu bewirkte die erhöhte Chloridkonzentration einen signifikanten Unterschied mit und ohne Trypanblau (24%ige Inhibition).

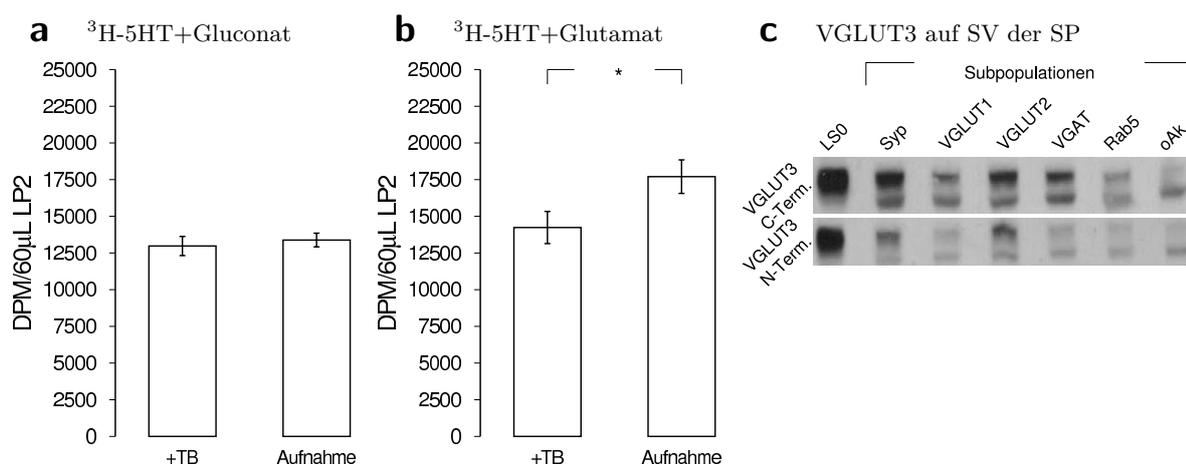
Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die Chloridtransporteigenschaften der VGLUTs zumindest einen Einfluss auf die GABA-Aufnahme VGLUT- und VGAT-tragender SV haben können.

## 3.8.10 Vesikuläre Kolokalisation von VMAT2 und den VGLUT

Die vorliegende Arbeit betrachtete bisher die vesikuläre Kolokalisation von VGLUT(1)/2 und VGAT. Gras et al. haben gezeigt, dass auch andere NT-Transporter vesikulär kolokalisieren können. Sie fanden, dass VACHT und VGLUT3 in der gleichen SP bzw. auf dem gleichen SV vorkommen und synergistisch kooperieren. In der Arbeit von Gras et al. (2008) lag der Schwerpunkt der Untersuchungen auf dem hauptsächlich monoaminergen System, im Striatum. Der VGLUT3 unterstützt dabei den VACHT bei der vesikulären Beladung mit dem Neurotransmitter Acetylcholin (Gras et al., 2008). Da angenommen wird, dass VGLUT3 als Kotransporter sowohl in cholinergen wie auch serotonergen Synapsen fungiert, wurde im Folgenden auf funktionelle Weise die vesikuläre Kolokalisation von VMAT2 und VGLUT3 untersucht.

Die Abbildung 3.31 zeigt die 5HT-Aufnahme in SV der LP2-Fraktion aus dem Gesamtgehirn einer Ratte in Gegenwart von Gluconat (Abb. 3.31a) und Glutamat (Abb. 3.31b). Die Hemmung der VGLUT – also auch von VGLUT3 – erfolgte spezifisch durch Trypanblau (+TB).

Der Serotonintransport (5HT-Transport) durch VMAT2 wurde signifikant durch die Hemmung der



**Abbildung 3.31 – Kolokalisation von VMAT2 und VGLUT.** Die 5HT-Aufnahme wurde sowohl in Gluconatgegenwart (a) als auch in Glutamatgegenwart (b) an den SV der LP2-Fraktion durchgeführt. Die vesikuläre Kolokalisation der VGLUT und VMAT2 und der aufnahmefördernde Einfluss der VGLUT auf die 5HT-Aufnahme wird durch die VGLUT-Hemmung mit Trypanblau nur in Gegenwart von Glutamat deutlich. Der VMAT2 wurde spezifisch durch Reserpin gehemmt. Dargestellt ist die Aufnahme von 5HT in Zerfallsereignisse pro Minute (DPM, korrigiert mit der reserpininhibierten Aufnahme). 4-fach-Bestimmungen. t-Test: einseitig, ungleiche Varianz, p-Werte: (a) n.s., (b) = 0,013.

(c) Gezeigt ist der VGLUT3-Nachweis im Ausgangsmaterial und in den verschiedenen Subpopulationen mit Antikörpern gegen den C- und N-Terminus.

VGLUTs nur in Gegenwart von Glutamat reduziert.

Somit kann zumindest von einer unilateralen Beeinflussung der 5HT-Aufnahme und einer vesikulären Kolokalisation ausgegangen werden.

### 3.9 Veränderungen der vesikulären Proteinausstattung nach Stimulation

Die Beispiele der vorangegangenen Arbeit beschrieben die Proteinausstattung von SV und eine vesikuläre Kolokalisation bestimmter NT-Transporter im Gesamtgehirn von Ratten, das keinen pathologischen Veränderungen unterlag. Es gibt jedoch Krankheitsbilder, die Umorganisationen neuronaler Netzwerke beinhalten, wie z.B. die Epilepsie. Bei einer Epilepsie handelt es sich um pathologische Übererregungen bestimmter Neurone, in die degenerative Effekte, wie der Verlust von Nervengewebe, neuronale Umorganisationen und Veränderungen der synaptischen Proteinausstattung involviert sind. In der Vergangenheit wurden zwei anerkannte funktionelle Epilepsie-Tiermodelle etabliert: das „Kindling“-Modell (Goddard et al., 1969) und das „Status epilepticus“-Modell. Epileptische Anfälle werden durch ein Ungleichgewicht in der neuronalen Erregung und Hemmung hervorgerufen, in dem Glutamat/Glutamatrezeptoren und GABA/GABA-Rezeptoren eine entscheidende Rolle spielen (Coulter, 2001). Die glutamatergen hippocampalen CA3-Moosfasern (CA3-MF) synthetisieren bei epileptischen Anfällen vermehrt GAD67 und schütten auch GABA aus (Ramírez und Gutiérrez, 2001; Sperk et al., 2003). So erfolgt eine GABA-vermittelte Hemmung durch aktivitätsabhängige Expression GABAerger Markerproteine (Gutiérrez und Heinemann, 2001). Folglich wird die CA3-Erregung in frequenzabhängiger Weise reduziert.

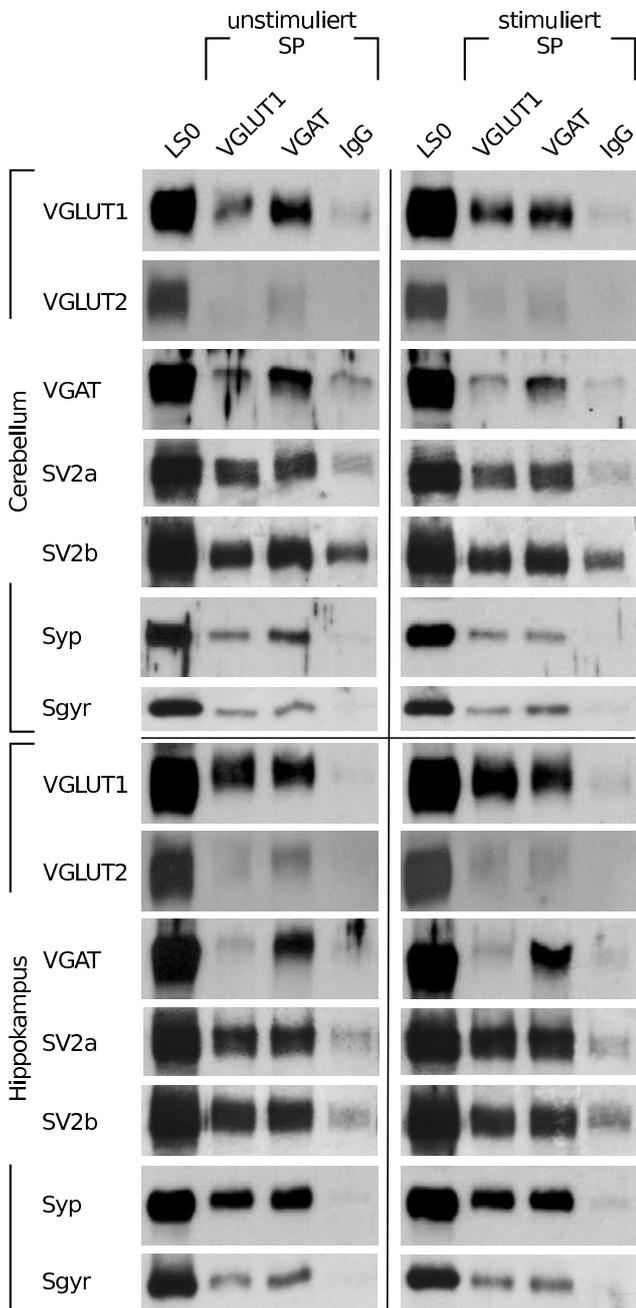
In der vorliegenden Arbeit wurden VGLUT1- (dominanter NT-Transporter im Hippokampus) und VGAT-SPs aus dem Hippokampus und Cerebellum stimulierter Ratten und von Kontrolltieren gewonnen, um die postulierte Hochregulation GABAerger Markerproteine, wie VGAT, in stimulierten hippocampalen Moosfasersynapsen (MFS) zu bestätigen (Abb. 3.32).

Diese Hochregulation konnte auf der vesikulären Ebene im Ausgangsmaterial (LS0-Fractionen des Hippokampus und des Cerebellums) nicht gefunden werden. Die VGLUT1-SP zeigte in beiden Gehirnnarealen keine Veränderung nach Stimulation. Auch die SVs der VGAT-SP nach Stimulation zeigten in diesen Arealen keine erhöhten VGAT-Mengen im Vergleich zum unstimulierten Gewebe.

Die Moosfasern (MF) decken mit ca. 5% einen relativ kleinen Teil des Hippokampus ab (nur in der CA3-Region). Das Auflösungsvermögen der Immunsolierung ist für diesen Nachweis wahrscheinlich nicht sensitiv genug.

### 3.10 NT-Transporterkolokalisationen auf synaptischer Ebene

Bisher wurde die Kolokalisation vesikulärer Neurotransmittertransporter nur auf der Ebene des synaptischen Vesikels betrachtet. Es wurde durch WB-Analysen festgestellt, dass VGLUT2 und VGAT auf dem selben SV bzw. in der selben vesikulären Subpopulation vorkommen. Anschließend wurde die funktionelle Intaktheit synaptischer Vesikel gezeigt. Aufgrund dieses Befundes konnte auch eine funktionelle Relevanz dieser Kolokalisation mit Hilfe von Neurotransmitteraufnahmen gefunden werden. Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit erfolgten bisher stets mit einer subzellulären Fraktion des Gehirns oder spezieller Gehirnnareale. Daher lässt dieser Ansatz keine Aussage über die Verteilung der NT-Transporterkolokalisation auf bestimmte Synapsentypen zu.



**Abbildung 3.32 – Vesikuläre SPs nach Stimulation.** Aus dem Cerebellum und Hippokampus von Kontrolltieren und stimulierten („gekündelten“) Ratten wurden LS0-Fractionen hergestellt, aus denen anschließend VGLUT1- und VGAT-SPs generiert wurden. Die LS0-Fractionen und SPs wurden mittels SDS-PAGE/WB-Verfahren hinsichtlich der aufgeführten Vesikelproteine analysiert. Es zeigten sich in den Gehirnebenen, für die Stimulationsbedingungen und die VGLUT1- und VGAT-SP keine deutlichen Unterschiede.

Im Folgenden wird die synaptische Kollokalisierung der NT-Transporter VGLUT1, VGLUT2 und VGAT in ausgewählten synaptischen Endigungen im Hippokampus und Cerebellum adulter Ratten beschrieben. Exzitatorische Synapsen sind durch VGLUT1 und VGLUT2, asymmetrische Kontakte (angehäuftes elektronendichtes Material an der postsynaptischen Membran) und die runde Form der SV identifizierbar. Inhibitorische Synapsen sind im Gegensatz dazu durch symmetrische Kontakte, die pleiomorphe Form der SV und eine VGAT-positive Markierung charakterisierbar. Die Verteilung der entsprechenden NT-Transporter und anderer relevanter Proteine wird im Postembedding-Immungold-Verfahren durch Einzel- oder Doppelmarkierung analysiert.

#### 3.10.1 VGLUT1, VGLUT2 und VGAT in verschiedenen Synapsen

Zu Beginn der Untersuchungen auf synaptische Kollokalisierung der NT-Transporter wurde die Spezifität der Antikörper gegen die Transporter VGLUT1, VGLUT2 und VGAT überprüft.

Die Spezifität der Antikörper gegen VGLUT1 wurde an den Parallelfasern (Pf) in der Molekularschicht des Cerebellums getestet. Diese Synapsen sind ausschließlich VGLUT1-positiv (Freneau et al., 2001). Abbildung 3.33a zeigt eine Pf, die einen asymmetrischen Kontakt mit dem Dendritendorn einer Purkinjezelle bildet (Pfeilköpfe). Die VGLUT1-Markierung liegt ausschließlich innerhalb dieser Präsynapse in unmittelbarer Nähe der SV bzw. auf den SV.

Die Spezifität des Antikörpers gegen VGLUT2 wurde an den präsynaptischen Endigungen der Kletterfasersynapsen (Kf) des Cerebellums überprüft. Diese Endigungen sind ausschließlich VGLUT2-positiv (Hisano et al., 2002). Abbildung 3.33c zeigt eine Kf, die im Kontakt mit einem Purkinjezellendriten steht. Die VGLUT2-Markierung ist ausschließlich in unmittelbarer Nähe oder auf den SV zu beobachten. In dieser exzitatorischen präsynaptischen Endigung ist keine asymmetrische Kontaktstelle angeschnitten.

Die Spezifität des Antikörpers gegen VGAT wurde an den GABAergen präsynaptischen Endigungen der Pyramidenzellschicht der hippocampalen CA3-Region getestet. Abbildung 3.33e zeigt eine GA-

---

**Abbildung 3.33 – NT-Transporter in verschiedenen Synapsen.** Die Spezifität der Antikörper gegen VGLUT1, VGLUT2 und VGAT wurde in ausgewählten exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen im Hippokampus und dem Cerebellum adulter Ratten mittels Einzelmarkierungen im Postembedding-Verfahren überprüft.

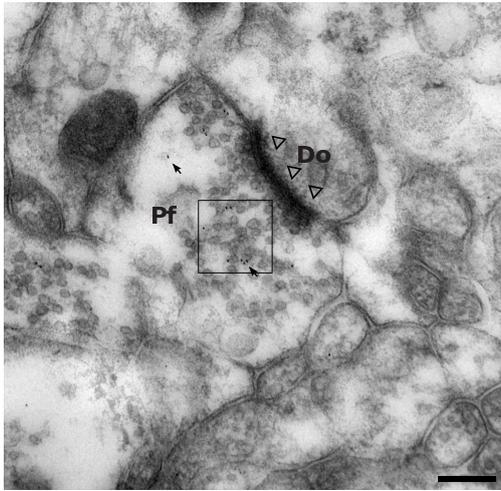
(a) Die Spezifität der Antikörper gegen VGLUT1 wurde an den Parallelfasersynapsen (Pf) in der Molekularschicht des Cerebellums getestet. Die Pf bildet eine asymmetrische Verbindung mit dem Dendritendorn einer Purkinjezelle (Pfeilköpfe). Diese Synapse ist VGLUT1-positiv markiert (Pfeile).

(c) Die Spezifität des Antikörpers gegen VGLUT2 wurde an den präsynaptischen Endigungen der Kletterfasersynapsen (Kf) des Cerebellums überprüft. Die präsynaptische Endigung einer cerebellären Kletterfaser steht im Kontakt mit einem Purkinjezellendriten und zeigt eine VGLUT2-positiv Markierung (Pfeile).

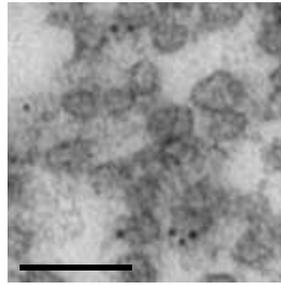
(e) Die Spezifität des Antikörpers gegen VGAT wurde an den GABAergen präsynaptischen Endigungen der Pyramidenzellschicht der hippocampalen CA3-Region getestet. Eine inhibitorische symmetrische Synapse (lange Pfeile) befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu einer asymmetrischen Synapse (Pfeilköpfe), die je eine synaptische Verbindungen mit einem Dendritenschaf eingehen. Eine VGAT-Markierung ist nur im präsynaptischen Teil der symmetrischen Synapse sichtbar.

Abbildung (b), (d) und (f) zeigen die umrandeten Bereiche in den Übersichten in vergrößerter Darstellung. Die Markierungen wurden in den Übersichten zur besseren Sichtbarkeit durch schwarze Punkte ähnlicher Größe hervorgehoben. Verwendete Primärantikörper: (a) Kaninchen anti-VGLUT1, (c) Kaninchen anti-VGLUT2 und (e) Kaninchen anti-VGAT. Den = Dendrit, Do = Dorn eines Purkinjezellendriten, Kf = Kletterfasersynapse, Pf = Parallelfasersynapse. Maßstäbe: Übersichten: 200nm, Auschnitte: 100nm. Entstanden mit freundlicher Unterstützung durch Dr. A. Münster-Wandowski.

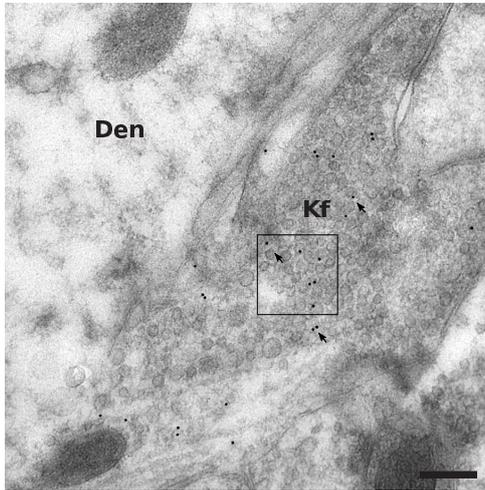
**a** VGLUT1 (5nm)



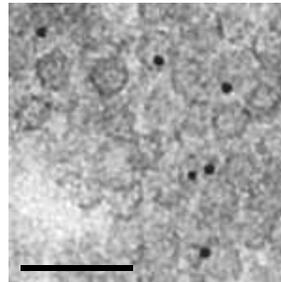
**b** VGLUT1



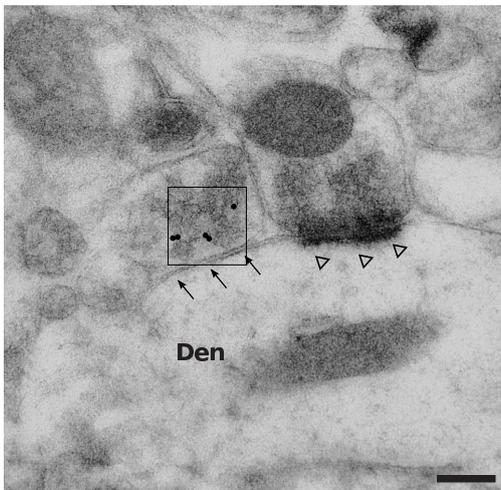
**c** VGLUT2 (10nm)



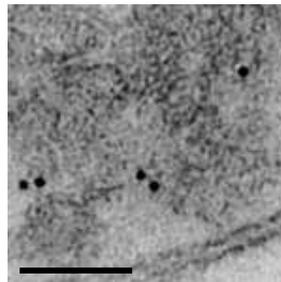
**d** VGLUT2



**e** VGAT (10nm)



**f** VGAT



BAerge Präsynapse (linke Endigung). Diese Synapse bildet einen symmetrischen Kontakt zu einem Dendriten (Pfeile). Diese präsynaptische Endigung befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu einer exzitatorischen präsynaptischen Endigung (rechte Endigung), die einen asymmetrischen Kontakt zu einem Dendriten bildet (Pfeilköpfe). Eine VGAT-Markierung ist ausschließlich auf den SV der symmetrischen präsynaptischen Endigung zu beobachten.

#### 3.10.2 Kolokalisationen auf synaptischer Ebene: Hippokampus

Der Hippokampus ist einerseits aufgrund der leichten Identifizierbarkeit, einer deutlichen Schichtung und andererseits durch seine fundamentale Rolle bei Lern- und Erinnerungsprozessen eine der am intensivsten untersuchten Gehirnareale. Er gliedert sich in drei Bereiche – Gyrus dentatus, Cornu ammonis (Ammonshorn) und Subiculum – weshalb man auch von der Hippokampus-Formation spricht. Die Körnerzellen des Gyrus dentatus projizieren die sogenannten Moosfaseraxone in die CA3-Region des Hippokampus, wo deren präsynaptische Endigungen — die Moosfasersynapsen (CA3-MFS, Durchmesser 3-5 $\mu$ m) — synaptische Kontakte mit großen dornartigen Erweiterungen der apicalen und basalen Dendriten der CA3-Pyramidenzellen ausbilden (Shepherd, 2004).

Neben Glutamat – dem dominierenden Neurotransmitter in den CA3-MFS (Storm-Mathisen und Fonnum, 1972) – kommen auch Peptide wie Dynorphin und Enkephalin (van Daal et al., 1989) und Zn<sup>2+</sup> (Charton et al., 1985) in diesen Synapsen vor. Neuere Befunde belegen auch GAD- und GABA-Immunreaktivitäten in diesen Synapsen (Sloviter et al., 1996).

Diese großen glutamatergen MFS wurden für die Untersuchung der synaptischen Kolokalisation der NT-Transporter VGLUT1, VGLUT2 und VGAT aufgrund der beschriebenen Präsenz zweier gegensätzlich wirkenden Neurotransmitter – Glutamat und GABA – ausgewählt.

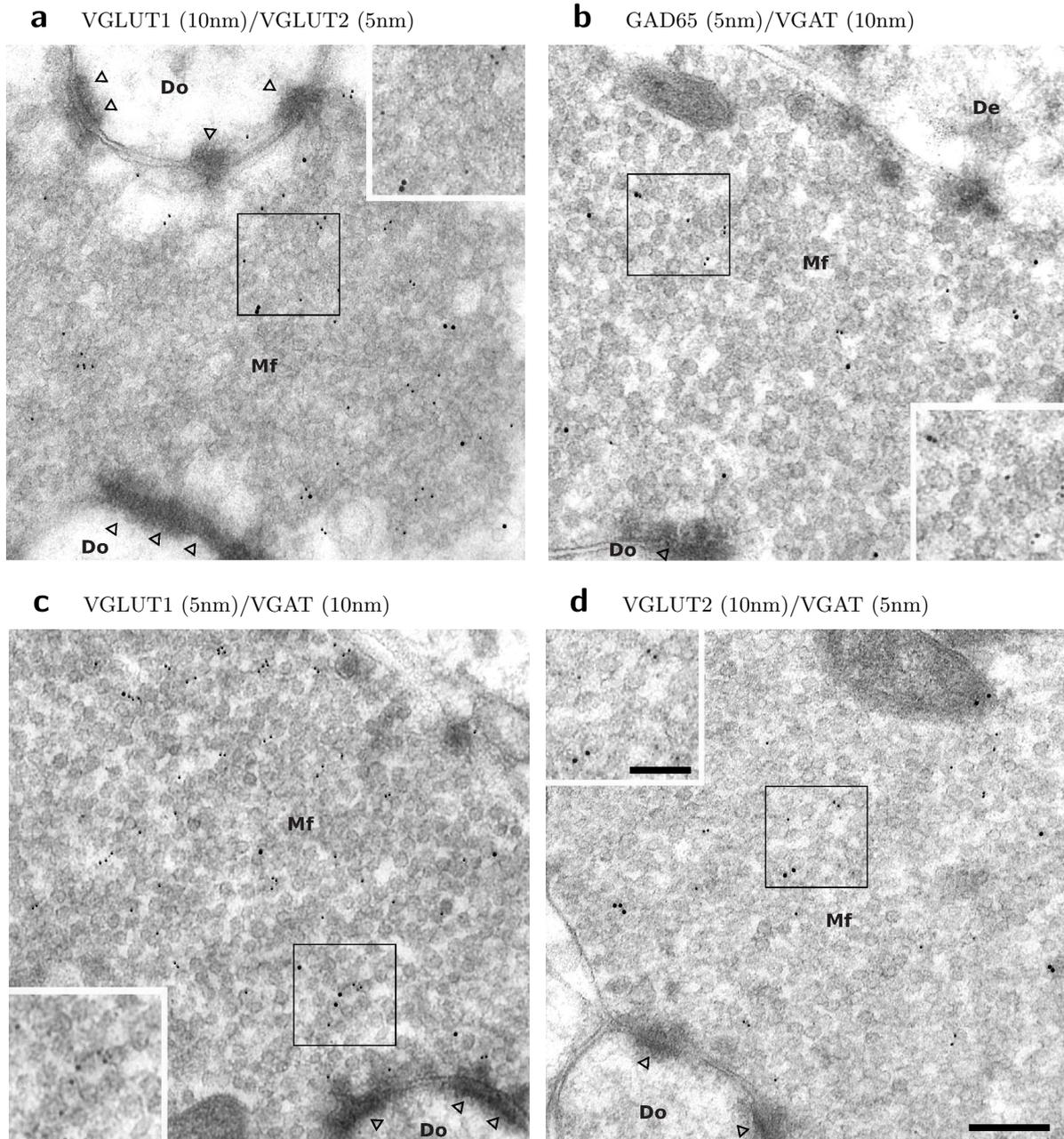
Zufällig ausgewählte CA3-MFS wurden bezüglich der Kolokalisation von VGLUT1, VGLUT2, VGAT und GAD65 mittels Doppelmarkierungen im Postembedding-Immungold-Verfahren untersucht (Abb. 3.34). Als Kontrolle auf Unspezifität der Immunreaktivität diente die unspezifische Markierung in postsynaptischen Bereichen und anderen nicht präsynaptischen Strukturen wie Dendriten und Zellkernen.

Abbildung 3.34a zeigt einen Ausschnitt einer CA3-MFS, in der diese Endigung asymmetrische Verbindungen mit Dendritendornen eingeht. Die Markierungen lagen für VGLUT1 und VGLUT2 deutlich im Bereich des SV-Clusters. Die Immunreaktivität für VGLUT1 (kleine Partikel) war höher als für VGLUT2 (große Partikel).

Abbildung 3.34b zeigt einen Ausschnitt einer CA3-MFS. In dieser Endigung wurden GAD65 (kleine Partikel) und VGAT (große Partikel) gemeinsam markiert. Die Immunreaktivitäten beider Proteine lagen im Bereich der SV.

Abbildung 3.34c zeigt einen Ausschnitt einer CA3-MFS. In dieser Endigung waren VGLUT1 (große Partikel) und VGAT (kleine Partikel) gemeinsam markierbar. Die Goldpartikel lagen auch hier im Bereich der Vesikel. Die Immunreaktivität für VGLUT1 war höher als für VGAT.

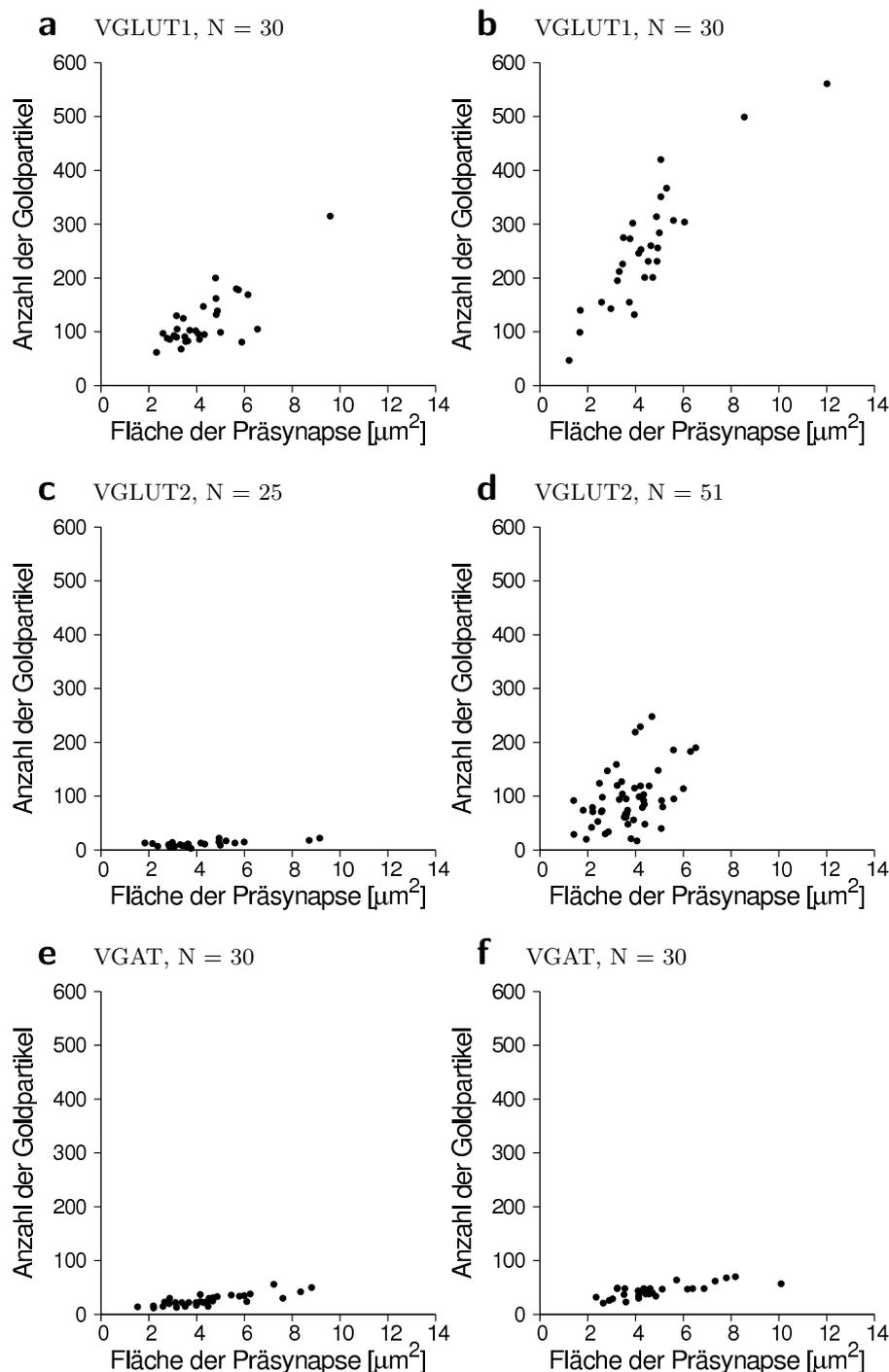
Abbildung 3.34d zeigt einen Ausschnitt einer CA3-MFS, in der VGLUT2 und VGAT in der selben synaptischen Endigung markiert wurden. VGLUT2 wurde häufiger markiert als VGAT.



**Abbildung 3.34 – Kolokalisationen der NT-Transporter in den MF-Synapsen der hippocampalen CA3-Region.** Die Kolokalisationen von VGLUT1, VGLUT2, VGAT und GAD65 wurden mittels Doppelmarkierungen im Postembedding-Immungold-Verfahren in MFS der CA3-Region des Hippokampus zweier adulter Ratte untersucht – (a) VGLUT1 und VGLUT2, (b) GAD65 und VGAT, (c) VGLUT1 und VGAT und (d) VGLUT2 und VGAT. Die MFS bilden einen oder mehrere asymmetrische Kontakte (Pfeilköpfe) zu Dendritendornen der Pyramidenzellen. Die Goldpartikel sind ausschließlich im Bereich der SV zu finden. Die umrandeten Bereiche in den Übersichten wurden in den Ausschnitten vergrößert dargestellt. Die Goldpartikel wurden in den Übersichten zur besseren Sichtbarkeit durch schwarze Punkte ähnlicher Größe hervorgehoben. De = Dendrit, Do = Dendritendorn, Mf = Moosfasersynapse. Maßstäbe: Übersicht: 200nm; Ausschnitt: 100nm. Entstanden mit freundlicher Unterstützung durch Dr. A. Münster-Wandowski.

Die postsynaptischen Areale (Do) und Bereiche ohne SV zeigten in allen vier Beispielen keine unspezifischen Markierungen.

## 3.10.3 Quantifizierung der Immungoldmarkierungen



**Abbildung 3.35** – Stärke der Immunmarkierung in den CA3-MFS gemessen in Goldpartikel/ $\mu\text{m}^2$ . Die Detektion der Transporter VGLUT1, VGLUT2 und VGAT in den CA3-MFS erfolgte durch Einzelmarkierungen (Goldpartikelgröße = 10nm) im Postembedding-Verfahren. Es wurden MFS der Hippokampi von zwei adulten Ratten vermessen (Tier 1: a, c, e und Tier 2: b, d, f), wobei sich die Einbettungsprozeduren leicht unterschieden. Es wurden jeweils 25 bis 51 präsynaptische Endigungen mit einer Fläche von 3,7 bis 4,8 $\mu\text{m}^2$  vermessen.

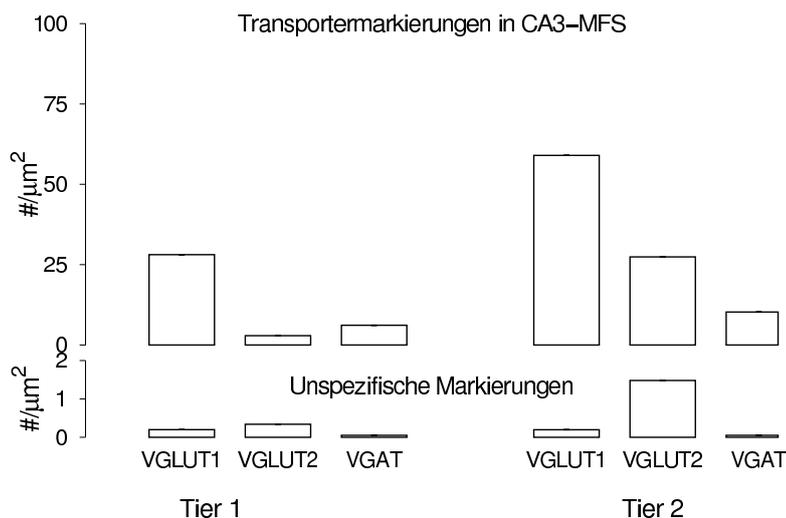
Die Immungoldmarkierungen für VGLUT1, VGLUT2 und VGAT in den CA3-MFS sollten im Anschluss quantifiziert werden.

Dazu wurden die jeweiligen Transporter in den MFS mit 10nm großen Goldpartikeln einzeln markiert. Die Einzelmarkierungen vereinfachten die automatische Detektion der Goldpartikel. Es wurde die Partikelanzahl pro präsynaptischer Fläche in  $\mu\text{m}^2$  bestimmt. Es wurden 25 bis 51 Präsynapsen mit einer Fläche von  $3,7$  bis  $4,8\mu\text{m}^2$  vermessen. Die Partikelanzahl wurde als Funktion der präsynaptischen Fläche aufgetragen (Abb. 3.35). Als Kontrolle auf Unspezifität der Markierung wurden Goldpartikel pro Fläche im Bereich von Dendriten und Zellkernen ausgezählt. Das methodische Vorgehen der Immungoldmarkierung und insbesondere die Wahl der Antikörper war für beide Tiere identisch.

Die Immungoldmarkierungen in den MFS von Tier 2 waren für alle Transporter im Vergleich zum Tier 1 stärker. Die MFS von Tier 1 waren für VGLUT1 am stärksten (Abb. 3.35a) und für VGLUT2 am schwächsten markiert (Abb. 3.35c). Die Markierung für VGLUT2 im Tier 1 (Abb. 3.35c) fiel deutlich schwächer aus als bei Tier 2 (Abb. 3.35d).

Die meisten Partikel pro MFS-Fläche von Tier 2 wurden für VGLUT1 (Abb. 3.35b) gefolgt von VGLUT2 (Abb. 3.35d) und VGAT (Abb. 3.35f) ermittelt. Erwartungsgemäß ist in allen Fällen ein proportionaler Anstieg der Partikelanzahl zu der Synapsenfläche festzustellen. Abbildung 3.36 zeigt die auf  $1\mu\text{m}^2$  normierte Partikelanzahl je Transporter und Tier. Die Partikelanzahl der unspezifischen Markierung ist in Abbildung 3.36 unten dargestellt.

Der glutamaterge Charakter der MFS wird durch starke VGLUT1- und VGLUT2-Markierungen und



**Abbildung 3.36 – Anzahl der Goldpartikel pro  $\mu\text{m}^2$ .** Dargestellt ist der Vergleich von Tier 1 und Tier 2 bezüglich der Einzelmarkierungen für die NT-Transporter VGLUT1, VGLUT2 und VGAT. Die Goldpartikelanzahl pro präsynaptischer Fläche (obere Abbildung) und die Goldpartikelanzahl aufgrund unspezifischer Markierung im Bereich der Dendriten und Zellkerne (untere Abbildung) wurde auf  $1\mu\text{m}^2$  normiert. # = Goldpartikelanzahl. N: ausgezählten MFS, siehe Abb. 3.35; N: ausgezählte andere Strukturen: Tier 2/VGLUT2 = 5, andere jeweils 4.

ein GABAerger Charakter durch den VGAT-Nachweis in dem selben Synapsentyp deutlich.

### 3.10.4 Kolokalisationen auf synaptischer Ebene: Cerebellum

Die vorangegangenen Untersuchungen zeigten, dass spezielle glutamaterge Synapsen im Hippokampus neben VGLUT auch VGAT aufweisen. Nachfolgend wurde daher ein spezieller glutamaterger Synapsentyp im Cerebellum – die präsynaptischen Endigungen der cerebellären Moosfasern (MF) – auf die Kolokalisation von VGLUT und VGAT untersucht. Diese MF bilden Synapsen mit den cerebellären Körnerzellen, die ihrerseits auf die Purkinjezellen verschaltet sind. Die Mehrheit der MF verwendet Glutamat als Neurotransmitter. Neben diesem NT wurden aber auch neuroaktive Peptide, Somato-

statin und Acetylcholin nachgewiesen (siehe Shepherd, 2004). Aufgrund der hohen Variabilität der verwendeten Neurotransmitter ist die cerebelläre MF ein interessanter Kandidat für die Untersuchung der Kolokalisation von VGLUT und VGAT. GABA-gefüllte SVs könnten in diesen Präsynapsen für eine Modulation der postsynaptischen Antwort sorgen und zur synaptischen Plastizität beitragen.

Zufällig ausgewählte cerebelläre MFs wurden mit Doppelmarkierungen im Postembedding-Verfahren bezüglich der Kolokalisierung von VGLUT1, VGLUT2 und VGAT untersucht (Abb. 3.37). Als Kontrolle auf Unspezifität der Immunreaktivität diente die unspezifische Markierung in postsynaptischen Bereichen und anderen nicht präsynaptischen Strukturen wie Dendriten und Zellkernen.

Die Übersichten (Abb. 3.37a, c, e) und deren Ausschnitte (Abb. 3.37b, d, f) zeigen in jedem Fall die Kolokalisation für die entsprechenden Transporter. Dabei liegen die Goldpartikel in unmittelbarer Nähe SV bzw. darüber. VGLUT1 ist im Vergleich zu VGLUT2 stärker exprimiert, wohingegen VGAT die schwächste Markierung zeigt. Die Spezifität der Markierung wird durch fehlende Goldpartikel auf Mitochondrien und Strukturen ausserhalb der Synapsen deutlich.

Der glutamaterge Charakter der cerebellären MF kommt durch starke VGLUT1- und VGLUT2-Markierungen zum Ausdruck. Zusätzliche GABAerge Eigenschaften in diesem Synapsentyp können anhand der Markierung für VGAT gezeigt werden.

#### 3.10.5 Schlussfolgerungen zu den elektronenmikroskopischen Untersuchungen

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen haben gezeigt, dass VGLUT1, VGLUT2 und VGAT gemeinsam präferentiell in großen präsynaptischen Endigungen vorkommen. Im Gegensatz dazu stehen die ausschließlich VGLUT1-positiven Parallel- und die ausschließlich VGLUT2-positiven Kletterfasersynapsen. Durch die komplementäre Transportermarkierung in den Parallel- und Kletterfasern kommt auch die Spezifität der Markierung für den jeweiligen Transporter zum Ausdruck.

---

**Abbildung 3.37 – Kolokalisationen in den cerebellären MF.** Die synaptische Kolokalisation von VGLUT1, VGLUT2 und VGAT wurde in den präsynaptischen Endigungen der glutamatergen MF in der Körnerzellschicht des Cerebellums adulter Ratten untersucht. Die NT-Transporter wurden mittels Doppelmarkierungen im Postembedding-Verfahren markiert.

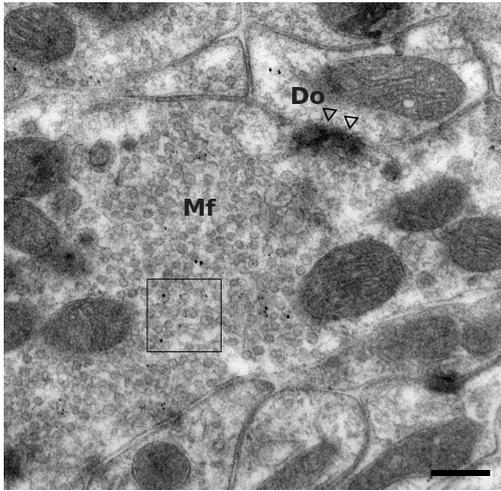
(a) Eine cerebelläre MF bildet einen asymmetrischen Kontakt mit einem Dendritendorn. VGLUT1 und VGLUT2 wurden gemeinsam in der selben MF markiert. (b) zeigt SVs mit Goldmarkierungen in einem vergrößerten Ausschnitt dieser MF.

(c) In einer cerebellären MF waren VGLUT1 und VGAT gemeinsam detektierbar. (d) zeigt SVs mit Goldmarkierungen in einem vergrößerten Ausschnitt dieser MF.

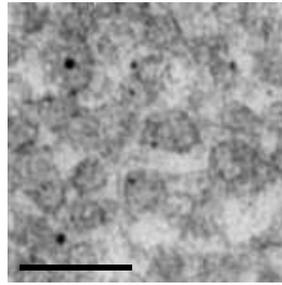
(e) Abgebildet ist ein Ausschnitt einer cerebellären MF, die eine asymmetrische Verbindung mit einem Dendriten bildet. VGLUT2 und VGAT kolokalisierten in dieser MF. (f) zeigt SVs mit Goldmarkierungen in einem vergrößerten Ausschnitt dieser MF.

Die Goldpartikel in den Übersichten wurden zur besseren Sichtbarkeit mit schwarzen Punkten ähnlicher Größe hervorgehoben. De = Dendrit, Do = Dendritendorn, Mf = cerebelläre Moosfasersynapse. Maßstäbe: Übersicht: 200nm, Ausschnitt: 100nm. Entstanden mit freundlicher Unterstützung durch A. Münster-Wandowski.

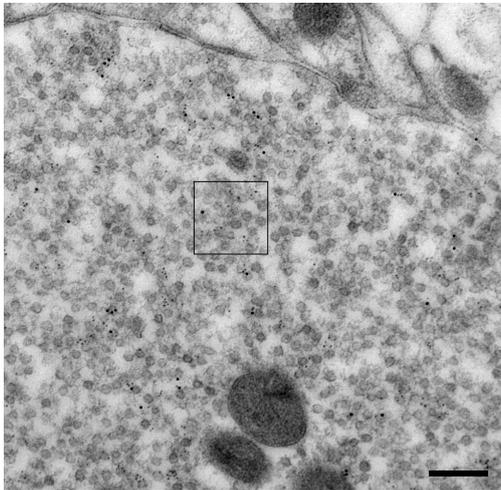
**a** VGLUT1 (5nm)/VGLUT2 (10nm)



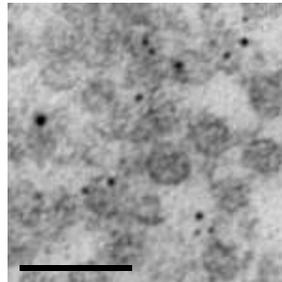
**b**



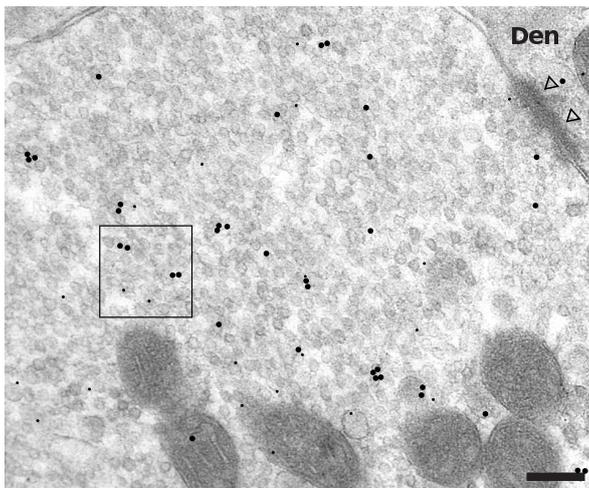
**c** VGLUT1 (5nm)/VGAT (10nm)



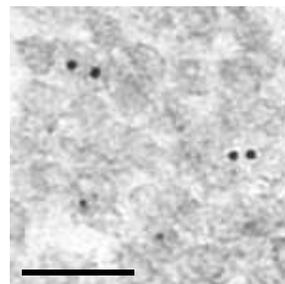
**d**



**e** VGLUT2 (10nm)/VGAT (5nm)



**f**





# 4 Diskussion

## 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mit Hilfe der im Rahmen der Arbeit erfolgreich etablierten Technik der Immunsolierung konnten bestimmte Vesikel-SPs aus dem vollständigen Gehirn und Gehirnarealen adulter Ratten und zu einzelnen Stadien der Hirnentwicklung gewonnen werden.

1. Über Antikörper gegen Syp konnte eine SP isoliert werden, die die Gesamtheit der SV im Gehirn repräsentiert.
2. Drei spezielle vesikuläre SPs, die VGLUT1-, VGLUT2- und VGAT-tragenden vesikulären SPs, wurden isoliert.
3. Es wurde eine SP der frühen Endosomen über das Markerprotein Rab5 isoliert.

Es folgte die qualitative und quantitative Analyse des Proteinbesatzes der fünf Vesikel-SP mit Hilfe der SDS-PAGE/Westernblot-Technik.

1. Alle fünf aus dem vollständigen Gehirn adulter Tiere isolierten Vesikel-SPs unterscheiden sich bezüglich ihrer Ausstattung mit allgemeinen vesikulären Proteinen (z.B. Syb, Syg) kaum.
2. Dagegen ergaben sich Unterschiede aber auch (interessanterweise) Überlappungen hinsichtlich des Vorkommens vesikulärer Neurotransmittertransporter.
3. Die SVs der VGLUT2-SP tragen neben VGLUT1 auch **VGAT**.
4. Die VGAT-SP beinhaltet auch **VGLUT2-tragende SV**. VGLUT1 ist weniger stark vertreten.
5. Mit der VGLUT1-SP wurden VGLUT2-tragende aber keine VGAT-tragenden SVs koioliert.
6. Dieses Muster ist schon während früher Phasen der Hirnentwicklung offensichtlich.

Mit Hilfe der Neurotransmitter-Aufnahme-Experimente wurde gezeigt, dass die über Immunsolierungen gewonnenen SV-SP ihre speziellen funktionellen Eigenschaften behalten haben. Es ergaben

sich Hinweise auf die Kooperation zweier verschiedener – auf einem SV kolokalisierter – vesikulärer Transmittertransporter.

1. Die GABA-Aufnahme (über VGAT) der VGAT-SP wird durch die **VGLUT2-Aktivität** (Befunde der Immunisolierung) **unterstützt**.
2. Für VMAT2-tragende SVs konnte gezeigt werden, dass deren 5HT-Aufnahme durch die Aktivität (eines) der VGLUT gefördert wird.

Da die durch Immunisolierungen gewonnenen SP stets SV aus vielen verschiedenen Synapsen bzw. Synapsentypen enthalten, wurden nun mit Hilfe immunoelektronenmikroskopischer Methoden definierte Synapsen hinsichtlich der drei vesikulären Transmittertransporter VGLUT1, VGLUT2 und VGAT untersucht.

1. In den Moosfaserendigungen im Hippokampus und Cerebellum wurden neben VGLUT1 auch VGLUT2 und **VGAT** gefunden werden.
2. Die Korbzellendigungen im Cerebellum wiesen neben VGAT auch **VGLUT2** auf.

Die vorliegende Untersuchung bestätigte somit auf drei Ebenen eine Kolokalisation von VGLUT und VGAT und erbrachte Hinweise für eine Kooperation beider Transportertypen.

## 4.2 Möglichkeiten und Grenzen der angewendeten Methoden

Im Folgenden werden die Möglichkeiten und Grenzen der verwendeten analytischen Methoden erläutert.

### 4.2.1 Immunisolierungstechnik

#### 4.2.1.1 Möglichkeiten:

Mit Hilfe der Immunisolierung können abhängig vom verwendeten Antikörper Zellen und Zellorganellen (z.B. SV oder Endosomen) aus einem Gewebehomogenat spezifisch angereichert werden. Das Isolat kann anschließend weiteren Anwendungen zugeführt werden.

Ist die Immunisolierung gegen ein Markerprotein aller synaptischen Vesikel gerichtet, kann z.B. mittels WB- oder auch Proteomic-Analysen die *gemeinsame* Proteinausstattung synaptischer SV untersucht werden. Ist die Immunisolierung gegen ein anderes subtyp-spezifisches SV-Protein gerichtet, können SV-SPs angereichert werden, deren Proteinausstattung sich von der Gesamtheit aller SV unterscheidet.

#### 4.2.1.2 Grenzen:

Mit einer Immunisolierung, gerichtet gegen einen vesikulären NT-Transporter (z.B. A), lässt sich eine SV-SP anreichern, die diesen Transporter beinhaltet (Voraussetzung: Vorkommen dieses Transports im Ausgangsmaterial und korrekte Ausrichtung seines Epitops). Sind weitere Transporter (z.B. B und C) auf den isolierten SV dieser SP vorhanden, kann mittels WB-Analyse nur für *einen* dieser Transporter (z.B. B) mit Bestimmtheit eine vesikuläre Kolo-kalisation mit Transporter A, angenommen werden. Transporter C könnte sich zusammen mit Transporter A auch auf einem anderen SV befinden.

Die Proteinverhältnisse der hier im WB-Verfahren untersuchten Transporter-SP lassen weder eine Aussage über den prozentualen Anteil des jeweiligen Proteins auf einem SV noch über dessen Kopienzahl zu. Sie stellen lediglich das Verhältnis zwischen dem gesuchten Protein (POI) und dem Bezugsprotein dar.

Mit der Immunisolierung kann keine Aussage über vesikuläre Proteinausstattung in speziellen Synapsen getroffen werden.

### 4.2.2 Neurotransmitteraufnahmeversuche

#### 4.2.2.1 Möglichkeiten:

Mit NT-Aufnahmeversuchen ist es möglich SV-SP auch auf funktioneller Ebene zu charakterisieren und unterstützende Effekte bzw. Kooperationen zwischen Proteinen wie den NT-Transportern aufzudecken.

#### 4.2.2.2 Grenzen:

Mit radioaktiv markierten Neurotransmittern und spezifischen NT-Transporterinhibitoren sind – sofern mindestens einer den anderen beeinflusst – zwei unterschiedliche Transporter auf dem selben SV nachweisbar. Eine spezifische Hemmung der NT-Transporter ist Voraussetzung für die gezielte Trennung der Transportaktivitäten verschiedener NT-Transporter. Zur Zeit ist jedoch keine spezifische VGAT-Hemmung möglich.

### 4.2.3 Elektronenmikroskopische Methoden

#### 4.2.3.1 Möglichkeiten:

Mit dieser Methode sind mehrere Proteine gemeinsam (durch die Wahl der Goldpartikelgröße) auf dem ultrastrukturellen Niveau in speziellen präsynaptischen Endigungen detektierbar. Sie ermöglicht damit den Nachweis einer Transporterkolo-kalisation innerhalb einer präsynaptischen Endigung.

#### 4.2.3.2 Grenzen:

1) Die Anzahl der für den Primärantikörper erreichbaren Epitope ist aufgrund einer einzigen Schnittebene durch das eingebettete Gewebe stark reduziert. Der Nachweis einer vesikulären Kolo-kalisation mittels Postembeddingverfahren ist aufgrund der geringen Wahrscheinlichkeit, zwei Epitope auf dem selben Vesikel nachzuweisen, deutlich erschwert. 2) Aufgrund der geringen Größe eines Vesikels (Durchmesser 30-50nm) und des im Verhältnis dazu relativ großen Antikörpers ist eine Mehrfachmarkierung auf dem selben SV aus sterischen Gründen schwierig. 3) Aufgrund der Größe des Komplexes aus Primär- und goldmarkiertem Sekundärantikörper (ca. 10nm) ist die Zuordnung eines Goldpartikels zu einem individuellen SV in Gewebeschnitten mit einer relativ hohen SV-Dichte kaum möglich.

### 4.3 Vesikuläre Kolo-kalisation der NT-transporter

Die klassische Sichtweise zur Funktion eines Neurons, das nur einen klassischen Neurotransmitter an all seinen Synapsen ausschüttet, wurde in den letzten Jahren mehrfach herausgefordert. Es konnte für verschiedene Synapsentypen gezeigt werden, dass eine Kolo-kalisation verschiedener NT-Transporter bzw. eine gemeinsame Ausschüttung unterschiedlicher NT-Kombinationen möglich ist. Somit ist der Phänotyp dieser Synapsen deutlich variabler als bisher angenommen. Der Aufbau dieser Synapsen, aber auch deren synaptische Vesikel (SVs), müssen auf diese Anforderungen hin abgestimmt werden. Die SVs müssen innerhalb einer Synapse den Transport unterschiedlicher NTs bewerkstelligen. Dabei muss das SV an die Art und Menge des vesikulär gespeicherten Neurotransmitters angepasst werden.

#### 4.3.1 Allgemeine vesikuläre Proteine

Mit Hilfe der Immunisolierung wurden aus dem Gehirn adulter Ratten fünf verschiedene SV-SPs aufgereinigt: eine Syp-, VGLUT1-, VGLUT2- und VGAT-tragende SV-SP sowie eine Rab5-haltige SP sogenannter früher Endosomen. Diese SV-SPs wurden mittels einer SDS-PAGE/Westernblot-Analyse auf das Vorhandensein allgemeiner vesikulärer Proteine wie Syp und Syg, getestet. Dabei ergaben sich keine gravierenden Unterschiede im Proteinebesatz zwischen den einzelnen SP. Quantitative Analysen zeigten, dass die analysierten Proteine in unterschiedlichen Mengen vorkommen. Die SVs der VGLUT1-SP besaßen die größten und die der VGAT-SP die geringsten Proteinmengen (Abb. 3.15). Untersuchungen an vesikulären VGLUT1-, VGLUT2 und VGAT-SP aus dem cerebralen Cortex kamen zu ähnlichen Ergebnissen (Bragina et al., 2009). Eine andere Arbeit an VGLUT1- und VGAT-SP zeigte, dass z.B. Syb Teil einer gemeinsamen Proteinausstattung dieser SPs ist (Grønberg et al., 2010).

### 4.3.2 Die Syp-SP

Mit Hilfe der Immunisolierung konnte über Syp eine vesikuläre Population, die repräsentativ für ein sekretorisches SV ist, angereichert werden. Das wurde an der Detektierbarkeit aller untersuchten vesikulären Proteine in der Syp-SP deutlich (Syp-SP in Abb. 3.13 und 3.14). In der Arbeit von Burré et al. (2006) wurde eine SV-SP mit einem monoklonalen Antikörper gegen das vesikuläre Markerprotein SV2 aufgereinigt. In dieser SV-SP konnten sie ebenfalls die Proteine Syp, Sypor, Syg, Syb, VGLUT1 und VGAT nachweisen. Auch die Arbeit von Takamori et al. (2006) bestätigt die Befunde der vorliegenden Arbeit bezüglich des Vorkommens dieser allgemeinen Proteine innerhalb einer SV-SP.

### 4.3.3 Die VGLUT1-SP

Die Immunisolierung mit Antikörpern gegen VGLUT1 hat eine SP ergeben, in der die Vesikel erwartungsgemäß sowohl Proteine der gemeinsamen Vesikelausstattung (Syp, Syg und Syb) als auch den NT-Transporter VGLUT1 tragen. Zu diesem Ergebnis kamen auch Bragina et al. (2009) (hier an corticalen Synaptosomen).

Zusätzlich zu den Proteinen, die alle SVs besitzen, tragen die SVs der VGLUT1-SP neben VGLUT1 auch VGLUT2. VGAT ist hingegen nur in sehr geringen Mengen detektierbar (qualitativ: Abb. 3.14 und quantitativ: 3.15). Die Kolokalisierung von VGLUT1 und VGLUT2 wurde auch im Neocortex der Ratte nachgewiesen (Fattorini et al., 2009). Das konnte mit einer Immunisolierung aus dem Cortex hier jedoch nicht bestätigt werden (Abb. 3.19). Aus der Arbeit von Herzog et al. an juvenilen Mäusen ist bekannt, dass es ein kleines Zeitfenster für eine vesikuläre Kolokalisation von VGLUT1 und VGLUT2 im Hippokampus gibt. Die VGLUT1/VGLUT2-Kolokalisation ist somit sowohl in unterschiedlichen Spezies (Ratte/Maus) als auch in verschiedenen Entwicklungsstadien nachweisbar. Eine unspezifische Aggregation VGLUT1- und VGLUT2-haltiger SV kann in diesem Zusammenhang ausgeschlossen werden, da unter diesen Bedingungen auch VGAT in der VGLUT1-SP detektierbar sein müsste. Fattorini et al. kamen zu dem Befund, dass VGAT auch auf VGLUT1-tragenden SVs des Neocortex lokalisiert ist (Fattorini et al., 2009). Dieses Ergebnis konnte durch die vorliegende und andere Arbeiten (Takamori et al., 2000a; Grønberg et al., 2010) weder für das gesamte Gehirn (Abb. 3.14, rechts) noch für den Cortex (Abb. 3.19, links) bestätigt werden. Möglicherweise war hier die Menge des isolierten Materials zu gering, um die schwache VGAT-Exprimierung nachzuweisen. Zusammengefasst zeigt das, dass die VGLUT1/VGLUT2-Kolokalisation kein spezies- und entwicklungsstadiumsspezifisches Phänomen ist.

Die Koexprimierung von VGLUT1 und VGLUT2 kann einen Einfluss auf die Quantumgröße haben, womit schließlich die postsynaptische Antwort und damit die synaptische Plastizität eines Neurons moduliert werden. Die Präsenz beider Transporter auf dem selben SV in einer bestimmten Synapse reduziert die Wahrscheinlichkeit für ausschließlich VGLUT1- bzw. VGLUT2-positive SV an den aktiven Zonen innerhalb einer Synapse (siehe im Gegensatz dazu für nicht vesikulär kolokalisierende Transporter: Fremeau et al. (2004a)). Folglich ist die weiträumigere Beeinflussung postsynaptischer Areale durch verschiedenartig agierende Synapsen einer synaptischen Endigung nicht gewährleistet

(Herzog et al., 2006).

Die Erhebungen der vorliegenden Arbeit lassen keine Aussage über die Kopienzahl von VGLUT1 und VGLUT2 pro SV zu. Einerseits könnten die VGLUT1-Moleküle pro SV durch VGLUT2-Moleküle ergänzt werden. Andererseits könnte eine bestimmte Anzahl von VGLUT1 gegen VGLUT2 ausgetauscht werden. Im ersten Fall würde eine stärkere bzw. schnellere Glutamatbeladung des SV folgen, was eine Veränderung der Quantenereignisse zur Folge hätte. Im zweiten Fall würde die Beladung der SV mit Glutamat aufgrund der gleichen Transporteigenschaften von VGLUT1 und VGLUT2 so ablaufen, als ob nur eine VGLUT-Isoform auf den SV lokalisiert ist.

Eine Kolo-kalisation bedeutet allerdings nicht, dass alle VGLUT1-tragenden SVs auch VGLUT2 besitzen müssen. Es ist vielmehr davon auszugehen, dass SVs in bestimmten Synapsen nur VGLUT1 tragen. Beispiele hierfür sind die Parallelfasern im Cerebellum (vergleiche Abb. 3.33a) oder die Schaffer-kollaterale in der hippocampalen CA1-Region (Nachweis nicht geführt). Fremeau et al. (2004a) schließen eine vesikuläre Kolo-kalisation von VGLUT1 und VGLUT2 in hippocampalen Pyramidenzellen aus, da die vesikuläre Quantengröße bei einem fehlenden Transporter (im Fall der VGLUT1<sup>-/-</sup>-Maus) erniedrigt sein müsste. Die kleinen exzitatorischen postsynaptischen Ströme (mESPC) sind bei Wildtyp und KO-Tieren jedoch gleich.

Die isolierten SVs der VGLUT1-SP sind funktionell intakt, was sich durch die Glutamataufnahme in diese SV bestätigen ließ (Abb. 3.24a). Unspezifisch gebundenes Material (Isolierung mit normalem Maus-IgG) weist dagegen eine stark reduzierte Aufnahme (Negativkontrolle) auf. Takamori et al. isolierten ebenfalls eine VGLUT1-SP aus dem Gesamtgehirn, unterwarfen diese einer Glutamataufnahme und kamen zu ähnlichen Ergebnissen (Takamori et al., 2000a). Die Bindung des beadgekoppelten Antikörpers an die VGLUT1-Epitope der SV hat wahrscheinlich nur einen geringen Einfluss auf den Glutamattransport. Aufgrund der wahrscheinlich gleichmäßigen Verteilung der VGLUT1-Moleküle (ca. zehn Moleküle je SV) in der SV-Membran sind nur wenige VGLUT1-Moleküle von der Antikörperbindung betroffen (Abb. 2.2).

Da VGLUT1 und VGLUT2 in der VGLUT1-SP kolo-kalisieren und beide sehr ähnliche Transporteigenschaften besitzen, variieren je nach Kopienanzahl beider Transporter ihre Beiträge zum Glutamattransport. VGLUT1 dürfte aufgrund der höheren Anreicherung in der VGLUT1-SP stärker involviert sein, da auch ausschließlich VGLUT1-tragende SVs isoliert werden.

VGLUT1- und VGLUT2-haltige Synapsen unterscheiden sich in der Freisetzungswahrscheinlichkeit des Glutamats (Takamori et al., 2001; Varoqui et al., 2002; Liu, 2003; Wojcik et al., 2004). Welchen Einfluss die vesikuläre VGLUT1/VGLUT2-Kolo-kalisation auf diese Freisetzungswahrscheinlichkeit glutamaterger Synapsen hat, kann mit den vorliegenden Daten nicht beantwortet werden. Es bleibt zu klären, ob die VGLUTs weitere Eigenschaften besitzen, die die jeweilige Synapse modulatorisch beeinflussen.

### 4.3.4 Die VGLUT2-SP

Die Immunisolierung mit Antikörpern gegen VGLUT2 hat eine SP ergeben, in der die Vesikel erwartungsgemäß sowohl Proteine der gemeinsamen Vesikelausstattung als auch den Neurotransmittertransporter VGLUT2 tragen. Die Immunisolierung gegen VGLUT2-tragende SVs aus dem gesamten

Gehirn und dem Hippokampus (Abb. 3.18) der Ratte zeigt eine Anreicherung des VGLUT2. Neben diesem Transporter sind auch VGLUT1 und VGAT auf den SV der VGLUT2-SP nachweisbar (qualitativ, Abb. 3.13 und quantitativ, 3.15). Boulland et al. isolierten dagegen aus einer hippokampalen LS1-Fraktion eine VGLUT2-SP, die weder VGLUT1- noch VGAT-tragende SVs enthielt. Insbesondere die Signale für die vesikulären Markerproteine Syb und Syp im Überstand und Ausgangsmaterial weisen auf eine niedrige Isolierungseffizienz ihrer Immunisolierung hin. Damit könnten die Mengen von VGLUT1 und VGAT auf dieser VGLUT2-SP unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Sie überprüften ihre Befunde weiterhin auf elektronenmikroskopischer Ebene und bestätigten ihre eigenen Ergebnisse. Die Anzahl der für den Primärantikörper erreichbaren Epitope ist auf EM-Ebene methodisch bedingt stark reduziert. So ist der Nachweis einer vesikulären Kolokalisation mit elektronenmikroskopischen Verfahren aufgrund der geringen Wahrscheinlichkeit, zwei unterschiedliche Epitope auf dem selben Vesikel nachzuweisen, deutlich erschwert (Boulland et al., 2009).

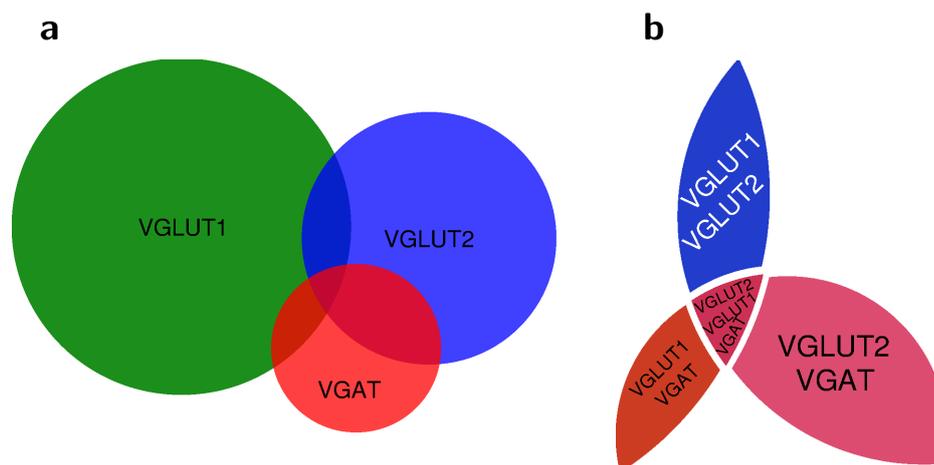
Aufgrund der Befunde aus Abschnitt 4.3.3 ist bekannt, dass VGLUT2 auf den SV der VGLUT1-SP vorkommt. Als Folge dieser Überlappung wird VGLUT1 auch mit den VGLUT2-tragenden Vesikeln koisoliert.

Die VGLUT2-SP stellt somit eine Mischpopulation dar, in der die SVs entweder ausschließlich VGLUT2-positiv oder VGLUT1- und VGLUT2-positiv oder aber auch VGLUT2- und VGAT-positiv sind. Das bedeutet, dass die SVs der VGLUT2-SP mindestens einen weiteren Transportertyp tragen können. Die Konstellation, in der ein SV drei unterschiedliche Transporter trägt, ist zwar ein mögliches Ereignis, kann mit den verwendeten Methoden und den vorliegenden Daten jedoch nicht gezeigt werden (Abb. 4.1).

Die Präsenz von VGAT auf SV der VGLUT2-SP bedeutet einerseits, dass beide Transporter gegensätzlich wirkende Neurotransmitter (Glutamat und GABA) in dem selben SV anreichern könnten. Andererseits wäre auch ein neurotransmitterunabhängiger Einfluss durch den  $\text{Cl}^-$ -Transport des VGLUT2 denkbar.

In der VGLUT2-SP sind beide Transporter, VGLUT1 und 2, an der Glutamataufnahme beteiligt (Abb. 3.25b). Wahrscheinlich ist der Transport in SV dieser SP in höherem Maß von VGLUT2 beeinflusst, da dieser VGLUT stärker angereichert wurde. VGLUT2 wird im adulten Gehirn seltener exprimiert als VGLUT1, was sich in geringeren Mengen isolierter VGLUT2-tragender SV niederschlägt. Andererseits ist anzunehmen, dass auf einem SV, das z.B. neben VGLUT2 auch VGAT-Moleküle trägt, die Kopienzahl je Transporter (durch Substitution) reduziert ist. Damit wird die Glutamataufnahme durch weniger VGLUT2-Moleküle je SV bewerkstelligt. In Folge dessen wird mehr Zeit zur Befüllung des SV benötigt (z.B. Schuske und Jorgensen, 2004). VGAT hätte unter diesen Bedingungen einen eher nachteiligen Effekt auf die Glutamataufnahme.

Ein Nachweis für eine GABA-Aufnahme ist für die immunisolierten SV der VGLUT2-SP aufgrund der geringen Affinität des GABA zu VGAT nur bedingt möglich. Möglicherweise ist der VGAT-Anteil in der VGLUT2-SP zu niedrig, um eine nachweisbare GABA-Aufnahme zu erhalten (Abb. 3.26). Bei einer Kolokalisation beider Transporter sind VGLUT2 und VGAT wahrscheinlich nur halb so oft je Vesikel vertreten. Die Folge wäre, ähnlich wie für die VGLUTs und die Glutamataufnahme, eine verminderte GABA-Aufnahme durch VGAT (Schuske und Jorgensen, 2004).



**Abbildung 4.1 – Schema der vesikulären Subpopulationen.** (a) Dieses Schema stellt die vesikulären Subpopulationen dar, die in dieser Arbeit betrachtet wurden. Dabei ist die Häufigkeit der jeweiligen transporterspezifischen Vesikel im Gesamtgehirn durch unterschiedlich große Flächen symbolisiert. Diese Darstellung zeigt bereits die Überlappungen der verschiedenen Subpopulationen, die weiteren Unterteilungen innerhalb einer SP entsprechen. (b) Diese Darstellung zeigt vergrößert die sich überlappenden SP. Hier symbolisiert der Flächeninhalt die Wahrscheinlichkeit und Häufigkeit des Auftretens dieser Misch-SP. Die Überlappungszone (ÜZ) in der Mitte (Dreifachkolokalisation) ist theoretisch möglich, aber auf Grundlage der vorliegenden Daten nicht zu bestätigen. Die „VGLUT1/VGAT“-ÜZ ist ebenfalls relativ unwahrscheinlich, da die Proteinausstattung beider SP bezüglich der Transporter nicht identisch ist. Die „VGLUT1/2“-ÜZ spiegelt die wahrscheinlichste Situation im juvenilen und die „VGLUT2/VGAT“-ÜZ die im adulten Gehirn wider.

#### 4.3.5 Die VGAT-SP

Die Immunisolierung mit Antikörpern gegen VGAT hat eine SP ergeben, in der die Vesikel erwartungsgemäß sowohl Proteine der gemeinsamen Vesikelausstattung (Syp, Syg und Syb) als auch den Neurotransmittertransporter VGAT tragen (Abb. 3.13 und 3.14, jeweils rechts). VGAT-tragende Vesikel sind in dieser SP deutlich angereichert (Abb. 3.15, rechts). Vesikel dieser SP sind zusätzlich mit VGLUT2 und in geringerem Maße auch mit VGLUT1 ausgestattet. Die hier angereicherte VGAT-SP ähnelt der von Takamori et al. (2000b) isolierten VGAT-SP, in der auch diverse Proteine der gemeinsamen Vesikelausstattung wie Stgm, Syp, Stx1, Syg und Syb nachweisbar sind. In einer anderen Studie fanden sie, dass VGLUT1 nicht auf SV der VGAT-SP lokalisiert ist (Takamori et al., 2000a,b). Das heißt, VGLUT1 und VGAT befanden sich auf unterschiedlichen SV. Diese Befunde decken sich mit den vorliegenden Daten, denn VGLUT1 ist auch hier deutlich schwächer exprimiert (Abb. 3.15, rechts). Fattorini et al. isolierten eine VGAT-SP aus dem Neocortex und zeigten die vesikuläre Kolokalisation mit VGLUT1, wohingegen diese SP frei von VGLUT2 war (Fattorini et al., 2009). Das widerspricht teilweise den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, da hier eine VGAT-SP isoliert wurde, die ebenfalls eine VGAT-VGLUT2-Kolokalisation zeigte (Abb. 3.13, Abs. 3.4.1). Ursache für diese unterschiedlichen Ergebnisse können regionale Unterschiede in der Exprimierung der kolokalisierenden Transporter sein, die im gesamten Gehirn, nicht aber in bestimmten Gehirnarealen detektierbar sind. In einer Studie an einer VGAT-SP aus dem Hippokampus waren weder VGLUT1 noch VGLUT2 nachweisbar (Boulland et al., 2009). Diese Befunde können durch die Daten der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden (Abb. 3.18).

Vesikel, die beide Transporter – VGLUT1 und VGAT – tragen, sind aufgrund der vorliegenden Daten

ein seltenes Ereignis in Synapsen des Gesamtgehirns, da die VGLUT1- und VGAT-SP keine vollständige Überlappung bezüglich dieser Transporter zeigen (vergleiche die relativen Häufigkeiten Abb. 3.15, VGAT (links) und VGLUT1 (rechts)). Theoretisch möglich wäre auch eine Kolokalisation aller drei Transporter auf einem SV (Schema Abb. 4.1). Diese Situation kann mit den Daten dieser Arbeit nicht erklärt werden. Zudem können nach Ikin et al. (1996) vesikuläre SPs neben SV auch einen geringen Anteil früher Endosomen enthalten. Ursache hierfür ist eine gemeinsame Protein- bzw. Transporterausstattung beider Organelltypen. Diese Möglichkeit ist jedoch für die in der vorliegenden Arbeit generierten SP unwahrscheinlich, da Rab5 als Marker für die frühen Endosomen auf den isolierten SV nicht nachweisbar war (Abb. 3.16 und 3.17, vergleiche Abs. 4.3.4).

Die SVs der VGAT-SP der vorliegenden Studie sind zur GABA-Aufnahme in der Lage. Jin et al. isolierten ebenfalls funktionell intakte VGAT-tragende SV, wählten dazu jedoch einen anderen Ansatz. Sie reicherten VGAT-tragende SV an, indem die Immunsolierung gegen das GABA-synthetisierende und vesikelassoziierte Protein GAD65 gerichtet war. Jin et al. zeigten die GAD65-abhängige Verminderung der GABA-Aufnahme in Gegenwart von GAD65-Inhibitoren und damit die Funktionsfähigkeit isolierter SV. Zudem bewiesen sie, dass nur das durch GAD65 neu synthetisierte GABA von den SV aufgenommen wird (Jin et al., 2003). Liegt GAD65 in der vesikeldissoziierten Form vor, kann auch GAD67-synthetisiertes zytosolisches GABA direkt vom VGAT aufgenommen werden. In der VGAT-SP-Präparation der vorliegenden Arbeit sind die beiden GAD-Isoformen wahrscheinlich nur in Spuren auf dem Vesikel vorhanden. Dadurch wird die Hemmung der noch vorhandenen GAD durch die verstärkte Aufnahme des  $^3\text{H}$ -GABA kompensiert (Abb. 3.29a).

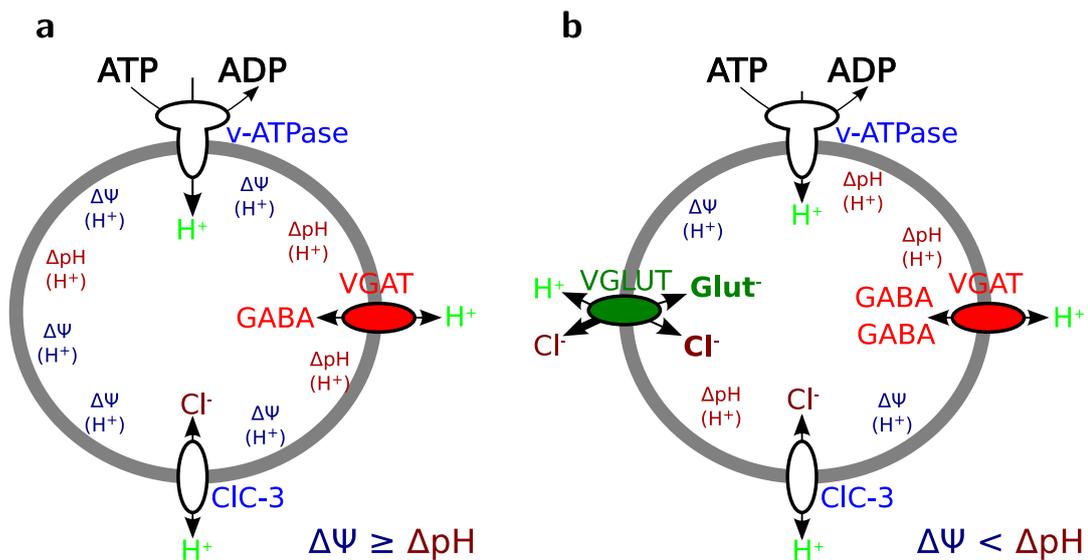
Die Bindung des Antikörpers gegen VGAT an das VGAT-Epitop (in Folge der Immunsolierung) sollte die GABA-Aufnahme kaum beeinflussen, da nur wenige VGAT-Moleküle an der Antikörper-Antigen-Bindung teilhaben (Abb. 3.25c).

Die vorliegende Arbeit konnte eine VGAT-VGLUT-Kolokalisierung (isoformenunspezifischer Nachweis) auf funktioneller Ebene durch die Glutamat-Aufnahme in SV der VGAT-SP bestätigen (Abb. 3.27b). Da VGAT spezifisch nur GABA bzw. Glyzin aber nicht Glutamat transportiert, wird Glutamat nur durch die VGLUT-Isoformen (VGLUT2 oder VGLUT3), die mit dem VGAT vesikulär kolokalisieren, in den SV konzentriert. Da wahrscheinlich einige VGAT-Moleküle durch VGLUT(2) substituiert sind, erfolgt die Befüllung der SV mit Glutamat verlangsamt, d.h. es wird weniger Glutamat je Zeiteinheit aufgenommen (vergleiche Abs. 4.3.4, Schuske und Jorgensen (2004)). Takamori et al. verwendeten eine VGAT-SP ebenfalls für GABA- und Glutamataufnahmeversuche und zeigten eine deutliche GABA- und eine sehr schwache Glutamataufnahme. Die geringe Glutamataufnahme der VGAT-tragenden Vesikel interpretierten sie als Lokalisierung von VGLUT(1) und VGAT auf unterschiedlichen SV, was auch durch die vorliegenden Daten bestätigt wurde (Takamori et al., 2000a).

#### 4.3.6 Energiebilanz der vesikulären Transporterkolokalisation

Wie kann der unterstützende Einfluss, den die VGLUTs während der GABA- und Serotoninbeladung eines SV ausüben (Abb. 3.29a), erklärt werden?

Beide Transportertypen – VGLUT und VGAT – hängen in unterschiedlicher Weise vom elektroche-



**Abbildung 4.2 – Schema der vesikulären Kollokalisierung von VGLUT und VGAT.** Schema (a) zeigt VGAT als alleinigen NT-Transporter auf einem Vesikel, der GABA bedingt gut transportieren kann.  $\Delta\text{pH}$  und  $\Delta\Psi$  können gleichmaßen genutzt werden. In dieser Situation kann  $\Delta\Psi$  leicht überwiegen, da ein Anion zur Kompensation positiver Ladungen fehlt. Das Schema (b) beschreibt eine mögliche Vesikelausstattung, in der VGLUT(2) und VGAT auf dem selben SV vorkommen. Durch einen Glutamat- und  $\text{Cl}^-$ -Eintrag wird in dieser Konstellation die GABA-Aufnahme durch einen  $\Delta\text{pH}$ -Anstieg begünstigt ( $\text{HCl}$ -Anreicherung), der zusätzliche Triebkraft für die GABA-Beladung liefern kann. Allgemein gilt, dass der Glutamattransport von dem Membranpotential ( $\Delta\Psi$ ) und der GABA-Transport von dem Membranpotential ( $\Delta\Psi$ ) und dem pH-Gradient ( $\Delta\text{pH}$ ) abhängt. Weitere Schlüsselfaktoren sind die V-ATPase und Chloridtransporter wie z.B. CIC-3.

mischen Gradienten ab – VGLUT hauptsächlich vom  $\Delta\Psi$  und VGAT zu ähnlichen Teilen von  $\Delta\Psi$  und  $\Delta\text{pH}$  (Maycox et al., 1988; Hell et al., 1990) (Abb. 4.2b). Die VGLUT-vermittelte Glutamatbeladung eines SV kann allein aufgrund des  $\Delta\Psi$  erfolgen, wobei eine Ladungskompensation durch einen VGLUT-vermittelten  $\text{Cl}^-$ -Ausstrom notwendig ist. Zytosolisch vorhandenes  $\text{Cl}^-$  bewirkt jedoch eine VGLUT-vermittelte Glutamataufnahme, die anteilig auch vom  $\Delta\text{pH}$  abhängig ist. Dieser Anstieg des  $\Delta\text{pH}$  erfolgt durch den VGLUT-vermittelten  $\text{Cl}^-$ -Einstrom (Nettoproduktion von  $\text{HCl}$ ) (Schenk et al., 2009).  $\text{H}^+/\text{Cl}^-$ -Antiporter (CIC-3), die an der SV-Membran arbeiten, transportieren ebenfalls Chloridionen in das SV-Lumen (Matsuda et al., 2008) und sorgen auch für einen vesikulären  $\Delta\text{pH}$ -Anstieg. CIC-3-Knockout-Mäusen zeigen dagegen eine normale Glutamatbeladung und Neurotransmission (Stobrawa et al., 2001). GABA selbst hat als ungeladenes Molekül (Zwitterion) weder einen Einfluss auf  $\Delta\text{pH}$  noch auf  $\Delta\Psi$ . Sein Einstrom in das SV ist jedoch mit einem  $\text{H}^+$ -Ausstrom verbunden, der durch die V-ATPase kompensiert werden muss.

Da der VGAT von  $\Delta\text{pH}$  und  $\Delta\Psi$  abhängt, fördern die VGLUT-Aktivitäten mit einer Erhöhung des  $\Delta\text{pH}$  die vesikuläre GABA-Aufnahme.

Obwohl in der vorliegenden Arbeit die Glutamataufnahme in GABAerge SV gezeigt werden konnte, ist zur Zeit nicht klar, ob Glutamat tatsächlich in GABAergen SV aufgenommen wird. Eventuell sind die glutamat- und chloridtransportierenden Eigenschaften der VGLUT in diesem Zusammenhang getrennt zu betrachten. So resultiert aus einer größeren zytosolischen Chlorid- und reduzierten Glutamatkonzentration (50mM  $\text{Cl}^-$ ; 100mM Glutamat Abb. 3.30b) eine höhere GABA-Aufnahme. Dieser VGLUT-Beitrag lässt sich durch Trypanblau hemmen.

Die VGLUTs liefern ebenfalls einen Beitrag zur Beladung synaptischer Vesikel mit Monoaminen durch VMAT2 (Abb. 3.31b). Hier ist ein ähnlicher synergistischer Mechanismus denkbar, wie für VACHT und VGLUT3 (Gras et al., 2008), da sowohl VACHT als auch VMAT eine ähnliche Bilanz in der Ladungs- und Protonenbewegung haben. Welche der drei VGLUT-Isoformen in die Monoaminaufnahme durch VMAT involviert ist, bleibt zur Zeit noch ungeklärt.

Die unterstützende Wirkung der Glutamataufnahme für die GABA-Beladung von SV kann mit den derzeit bekannten Ladungs- und Protonenverschiebungen nicht gänzlich erklärt werden. Es sind weitere Untersuchungen zu den genauen Transfermodalitäten der einzelnen Transporter notwendig.

#### 4.3.7 Die Rab5-SP

In den Abbildungen 3.16 und 3.17 wird der Proteinbesatz der Syp- und der Rab5-SP qualitativ und quantitativ verglichen. Es konnten sowohl die Proteine der gemeinsamen Ausstattung der SV als auch Transporterproteine mittels WB-Analyse in beiden SP detektiert werden. Das lässt auf eine ähnliche Proteinausstattung bezüglich der untersuchten Proteine und eine Überlappung zwischen dieser und den Transporter-SP schließen. Rab5 ist sowohl in der Syp- als auch in den Transporter-SPs nicht nachweisbar (vergleiche auch Abb. 3.23). In anderen Studien, in denen frühe Endosomen mit Antikörpern gegen Rab5 aus dem gesamten Gehirn isoliert wurden, stellte man fest, dass dieses Immunosolat eine Mischung bestehend aus kleinen SV (SSV) und anderen Organelltypen (uni-, bi- und multilamellaren Vesikeln) ist (von Mollard et al., 1994; Ikin et al., 1996). Ikin et al. zeigten ferner, dass sich nur Rab5-haltige Kompartimente durch die Anwesenheit des Glykoproteins Amyloidproteinprecursor (APP) von der Syp-SP eindeutig abgrenzen lassen (Ikin et al., 1996).

Membranstücke synaptischer Vesikel bzw. synaptische Vesikelproteine sind im Zuge der Wiedereingliederung für weitere Endo-/Exozytosezyklen transient auch auf frühen Endosomen anzutreffen. Damit könnten sich auch VGLUT1/2 und VGAT in der endosomalen SP wiederfinden (Abb. 3.16 und 3.17). Diese Tatsache könnte das Trennen von SV und frühen Endosomen erschweren. Dagegen spricht, dass Rab5 in den Transporter-SP nicht nachweisbar war. Ferner sollte eine entsprechende Neurotransmitteraufnahme in frühe Endosomen nicht möglich sein, da das feine Zusammenspiel aus  $\Delta pH$  und  $\Delta \Psi$ , wie im SV, nicht gegeben sein dürfte.

Im Gegensatz zu den Transporter-SP (Abb. 4.1a, b) kann mit der Immunsolierung gegen Rab5 und den WB-Analysen nur die Präsenz eines Transporters je Endosom eindeutig gezeigt werden. Das Vorkommen mehrerer Transporter ist jedoch durch Endozytosemechanismen (Vesikelknospung aus einem endozytierten Endosomen) möglich und auch wahrscheinlich.

Somit ist die Proteinausstattung eines Endosoms, wie auch die eines SV, variabel.

## 4.4 Synaptische Kolokalisation der NT-Transporter

### 4.4.1 VGLUT1 und VGLUT2 in glutamatergen Neuronen

Die Exprimierung verschiedener Transporter auf dem gleichen oder auf verschiedenen Vesikeln innerhalb des gleichen Terminals erfordert regulatorische Prozesse um die Rekrutierung synaptischer Vesikel unter physiologischen Bedingungen zu gewährleisten (Gutiérrez, 2008a,b). VGLUT1 und VGLUT2 können auf verschiedenen Vesikeln und demzufolge an unterschiedlichen Freisetzungszonen innerhalb einer Synapse lokalisiert sein (Fremeau et al., 2004a). Diese Transporter sind aber auch auf dem selben SV anzutreffen, was die vorliegende und andere Studien zeigen (Wojcik et al., 2004; Herzog et al., 2006). Aus einem solchen Vesikel wird nur Glutamat ausgeschüttet. Im Gegensatz dazu stehen Vesikel, die VGLUT und VGAT tragen und zwei gegensätzlich wirkende klassische Neurotransmitter (GABA und Glutamat) möglicherweise akkumulieren und ausschütten können.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Exprimierung von VGLUT1 und VGLUT2 in speziellen Synapsen, den hippocampalen und cerebellären Moosfasersynapsen (MFS), untersucht und dort auch gemeinsam nachgewiesen. Trotz der komplementären Verteilung dieser NT-Transporter im Gehirn, gibt es in jüngster Zeit immer häufiger Hinweise für ihre synaptische Kolokalisierung. So bestätigen Hisano et al. (2002) und Hioki et al. (2003) auf dem Immunfluoreszenzniveau und auf mRNA-Ebene die Befunde dieser Studie bezüglich der VGLUT1- und VGLUT2-Kolokalisation in MFS bestimmter Regionen des cerebellären Cortex. Darüber hinaus wurden beide Transporter in den medialen Habenularkernen im Rattenepithalamus gefunden (Sakata-Haga et al., 2001). Es wurde vorgeschlagen, dass beide Transporter in bestimmte Glutamat- oder Phosphattransportereignisse involviert sind. Beide Transporter könnten einen heteromultimeren Komplex bilden, sodass verschiedene Eigenschaften des Glutamat- und Phosphattransports erreicht werden. VGLUT1 und VGLUT2 könnten auch unabhängig voneinander Glutamat und Phosphat als Folge unterschiedlicher Kinetiken transportieren. Unterschiede in den Transporteigenschaften sowohl für Glutamat als auch für Phosphat sind jedoch nicht bekannt (Fremeau et al., 2001). Beide Transporter können jedoch auch auf SV und Denscore-vesikeln verteilt sein, um Glutamat selektiv in vesikuläre Strukturen zu transportieren. Fremeau et al. (2004a) und Wojcik et al. (2004) fanden VGLUT1 und VGLUT2 im Hippokampus und dem Cortex neugeborener Mäuse synaptisch kolokalisiert. Darüber hinaus sind VGLUT1 und VGLUT2 in den verschiedensten Gehirnarealen bis zum P14-Stadium auf der mRNA-Ebene gemeinsam nachgewiesen worden (Danik et al., 2005). In den nächsten Wochen der Ontogenese geht diese Kolokalisierung zugunsten von VGLUT1 verloren. Wojcik et al. demonstrierten das gemeinsame vesikuläre Auftreten beider Transporter, wohingegen Fremeau et al. anhand von VGLUT1-KO-Mäusen eine Verteilung auf getrennte Synapsen annehmen. Weitere Studien an Mäusen zeigen VGLUT1 und VGLUT2 im selben Vesikelpool hippocampaler Moosfasersynapsen. Neben VGLUT1 ist VGLUT2 in der frühen Phase der Entwicklung des Gehirns auch in den CA3-Pyramidenzellen exprimiert (Miyazaki et al., 2003; Boulland et al., 2004; Danik et al., 2005; Gras et al., 2005). Überraschenderweise sollen VGLUT1 und VGLUT2 über die postnatale Entwicklung hinaus auch in einer Subpopulation der Schaffer-Kollateralen gemeinsam vorkommen (bisher als ausschließlich VGLUT1-positive Synapsen angenommen) (Herzog et al.,

2006).

In Schuske und Jorgensen (2004) werden drei mögliche Szenarien beschrieben, wie VGLUT1 und VGLUT2 auf SV oder präsynaptische Endigungen verteilt sind:

1. Innerhalb einer Synapse auf dem selben Vesikel
2. Innerhalb einer Synapse auf getrennten Vesikeln
3. In unterschiedlichen Synapsen auf getrennten Vesikeln

Nur Möglichkeit 2) kann durch die vorliegenden Daten für beide MF-Typen (im Hippokampus und im Cerebellum) eindeutig bestätigt werden. Aufgrund der Schwierigkeiten des Nachweises vesikulärer Kollokalisierungen mit elektronenmikroskopischen Methoden (Abs. 4.2.3) lassen die Daten keine Aussage über Möglichkeit 1) zu. Eine Exprimierung beider Transporter ausschließlich in getrennten MFS (Punkt 3) stellt wahrscheinlich im Gehirn adulter Ratten eine Ausnahme dar. VGLUT1 und VGLUT2 sind innerhalb beider Moosfasertypen gleichmäßig verteilt. D.h., keiner dieser Transporter ist häufiger an der Synapsenperipherie bzw. an den aktiven Zonen anzutreffen.

Mit den vorliegenden Daten kann nicht erklärt werden, welchen Einfluss eine Kollokalisierung von VGLUT1 und VGLUT2 innerhalb der selben präsynaptischen Endigung hat. Da für VGLUT1- bzw. VGLUT2-positive Neurone unterschiedliche Wahrscheinlichkeiten für die Transmitterausschüttung angenommen werden, ist eine Feinabstimmung der Antworteigenschaften dieser Neurone denkbar.

#### 4.4.2 VGAT in glutamatergen Neuronen

GABAerge Synapsen profitieren wahrscheinlich von dem Vorhandensein der VGLUT, indem die GABA-Aufnahme verbessert wird. In der vorliegenden Arbeit wurden die hippokampalen und cerebellären MFSs untersucht. Bisher wurde davon ausgegangen, dass diese Synapsen rein glutamaterg wirken. Der Nachweis von VGLUT1 und VGLUT2 in dieser Arbeit bestätigt diese Befunde zunächst. In jüngster Zeit gibt es vermehrt Hinweise, dass diese hippokampalen Synapsen auch GABAerge Eigenschaften besitzen. Bergersen et al. (2003) wiesen in hippokampalen MFSs auf elektronenmikroskopischem Niveau sowohl Glutamat als auch GABA nach. Mit dem Nachweis von VGAT (auf dem mRNA-Niveau, (Gómez-Lira et al., 2005)) und GAD67 (mittels Immunreaktionen, (Sloviter et al., 1996)) konnten weitere präsynaptische GABAerge Marker nachgewiesen werden. Wie die neonatalen auditorischen Neurone des Nucleus olivaris superior lateralis (Gillespie et al., 2005) können auch die hippokampalen MFSs parallel GABA und Glutamat freisetzen (Walker et al., 2001; Gutiérrez et al., 2003; Kasyanov et al., 2004; Safiulina et al., 2006). Darüber hinaus wurden VGLUT2 und VGAT auf der Proteinebene in einer Gruppe präsynaptischer Endigungen der Kerne supramamillärer Neurone im Gyrus dentatus adulter Ratten gefunden. Diese Präsynapsen bilden symmetrische und asymmetrische Kontakte zu den Dendriten der Körnerzellen des Gyrus dentatus aus. Das weist auf unterschiedliche Neurotransmitterfreisetzungszonen hin (Boulland et al., 2009). Bis dato sind nur immunzytochemische Daten für die Existenz von VGAT in hippokampalen MFSs vorhanden (Safiulina et al., 2006).

Die vorliegende Arbeit ergänzt diese Daten mit dem Nachweis von VGAT auf dem ultrastrukturellen Niveau im Hippokampus adulter Ratten. Darüber hinaus konnte auch VGAT als GABAerger Marker neben VGLUT1 und VGLUT2 in den glutamatergen cerebellären MFSs gezeigt werden (Abb. 3.34 und 3.37).

Der GABAerge Phänotyp der untersuchten glutamatergen Neurone ist nach wie vor umstritten. Obwohl dieser Phänotyp der großen glutamatergen MFS auf allen Ebenen nachgewiesen wurde, geben insbesondere elektrophysiologische erhobene Daten Grund zum Zweifeln. Eine Schwachstelle in den üblichen Methoden der Stimulierung hippokampaler Moosfasern könnte die Kostimulation angrenzender GABAerger Interneurone sein. Deren Reizleitung ist auch nach gezielter Hemmung der MF-Transmission zumindest im unvollständig entwickelten Nagergehirn messbar (Uchigashima et al., 2007).

GABA hat in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums in glutamatergen Synapsen eine andere Wirkung. Im Gehirn postnataler Ratten (<P10) wirkt zeitgleich mit Glutamat vorhandenes GABA depolarisierend, was eine NMDA-Rezeptoraktivierung zur Folge hat. Ab P22 werden VGAT und GAD67 herunterreguliert. Eine Neurotransmitterkoausschüttung dient sowohl der Aufrechterhaltung und Optimierung des räumlichen und zeitlichen Musters der Neurotransmission als auch der Feinabstimmung und Reifung von Synapsen (Gutiérrez, 2005). Mit fortschreitender Entwicklung wirkt GABA hyperpolarisierend (Seal und Edwards, 2006).

GABA in diesen glutamatergen Synapsen wirkt autoregulatorisch, indem es präsynaptisch lokalisierte GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Ruiz et al., 2003; no und Gutiérrez, 2005) und GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren aktiviert (Chandler et al., 2003), womit die Glutamatfreisetzung moduliert wird.

Ein weiterer Effekt des GABA in glutamatergen Synapsen könnte in Bezug auf pathologische Übererregung zu sehen sein (van der Hel et al., 2009). Die GABAerge Transmission könnte dieser nachteiligen Übererregung entgegenwirken und die Wahrscheinlichkeit epilepsieauslösender Veränderungen im juvenilen Gehirn vermindern. Da auch die adulten CA3-MFSs GABAerge Eigenschaften besitzen (vorliegende Arbeit), stellt der GABAerge Apparat auch für den adulten Hippokampus eine entscheidende Kontrollinstanz dar. Die Wirkung von VGLUT2 auf eine bessere vesikuläre GABA-Beladung (Abs. 4.3.6) könnte diesen Kontrollmechanismus weiter fördern. Eine Umstrukturierung der vesikulären Proteinausstattung bezüglich der untersuchten vesikulären NT-Transporter ist offenbar nicht involviert (siehe Hippokampus und Cerebellum nach „Kindling“, Abb. 3.32).

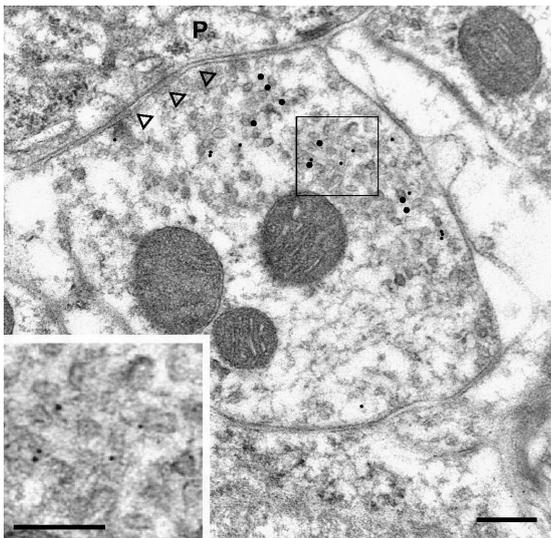
Offensichtlich ist GABA in einigen glutamatergen Synapsen wie den hippokampalen und cerebellären MFS vorhanden, wohingegen auch rein glutamaterge Synapsen wie die der Kletter- und Parallelfasern existieren (Tab. 4.1). Anscheinend ist dieser duale NT-Phänotyp ein Charakteristikum großer komplexer Synapsen wie den MFSs und der cerebellären Korbzellen (Abs. 4.4.3), die mehrere synaptische Kontakte bilden können und/oder eine Vielzahl synaptischer Vesikel beherbergen.

#### 4.4.3 VGLUT2 in GABAergen Neuronen

Eine synaptische Kollokalisierung von VGLUT2 und VGAT wurde in den GABAergen Korbzellen des Cerebellums durch eine Studie in der eigenen Arbeitsgruppe gefunden (Abb. 4.3, unveröffentlichte

Daten). Dass GABAerge Neurone zu glutamaterger Transmission in der Lage sind, zeigen Transfizierungsexperimente mit VGLUT1 und VGLUT2. Diese Zellen formen in Kultur autaptische Synapsen (synaptische Verbindungen mit dem selben Neuron) (Takamori et al., 2000a, 2001; Gutiérrez und Heinemann, 2006). GABAerge Neurone des Nucleus olivaris superior lateralis des auditorischen Systems setzen auch Glutamat während der Entwicklung frei. Freigesetztes Glutamat aktiviert einen NMDA-Rezeptor-vermittelten postsynaptischen  $Ca^{2+}$ -Einstrom, wodurch letztlich die synaptische Stärke verändert wird (Gillespie et al., 2005).

VGLUT2 kann in GABAergen Synapsen unterschiedlichen Aufgaben dienen: Zum einen befähigt es



**Abbildung 4.3 – Eine GABAerge Korbzelle im Cerebellum mit VGAT- und VGLUT2-Markierung** Die Übersicht zeigt eine GABAerge Korbzellenendigung, die einen symmetrischen Kontakt mit einer Purkinjezelle bildet (Pfeilköpfe). Diese Korbzellenendigung zeigt SV in typisch geringer Dichte. Neben VGAT (kleine Goldpartikel) ist ebenfalls VGLUT2 – jedoch kein VGLUT1 – markiert. Die Markierungen sind gleichmäßig über den Bereich der SV verteilt. Die Goldpartikelmarkierungen sind in der Übersicht zur besseren Sichtbarkeit durch Überlagerung mit schwarzen Punkten ähnlicher Größe hervorgehoben. Ein Bereich wurde vergrößert dargestellt (Rahmen und Ausschnitt). Goldmarkierungen: Kaninchen anti-VGAT: 5nm, Meerschweinchen anti-VGLUT2: 10nm. P = Purkinjezelle. Maßstäbe: Übersicht: 200nm, Ausschnitt: 100nm. Verwendet nach freundlicher Genehmigung durch I. Mitschke (unveröffentlichte Daten).

GABAerge Neurone Glutamat freizusetzen, was zur Modulation der postsynaptischen Antwort führt. Zum anderen verbessern die VGLUT die vesikuläre GABA-Beladung und eventuell auch dessen Speicherung (Abb. 3.27b, 3.29a). Unter *in vitro*-Bedingungen konnte die Glutamataufnahme an VGAT-tragenden SV demonstriert werden. Ob *in vivo* tatsächlich Glutamat in diesen SV akkumuliert wird, ist zur Zeit nicht abschließend geklärt. Neben Glutamat transportieren die VGLUTs auch  $Cl^-$ , das hier von größerer Bedeutung sein könnte (Abb. 3.30b). Eventuell ist nur diese Transportfunktion aktiv. Wie die Glutamat- bzw. Chloridtransporteigenschaften aktiviert werden, ist z. Z. noch nicht verstanden. Möglicherweise wird der eine Transportweg zugunsten des anderen verstärkt. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass VGLUT2 in GABAergen Synapsen vesikelständig kein Glutamat aufnimmt. Erst nachdem VGLUT2 über Vesikel an die Plasmamembran transportiert wurde, liegt dieser Transporter in einer aktiven Form vor, die dann anorganisches Phosphat ins präsynaptische Zytosol transferiert. Schließlich ergaben neueste Studien an Purkinjezellen, dass Endigungen GABAerger Neurone nach einer vollständigen Blockierung der elektrischen Aktivität neben den üblichen symmetrischen auch asymmetrische Synapsen mit postsynaptischen Glutamatrezeptoren ausbilden können. Die richtige Zuordnung aus präsynaptisch freigesetztem Transmitter und den postsynaptischen NT-Rezeptoren wird an GABAergen Synapsen aktivitätsbedingt reguliert. Dabei wurde keine Hochregulation des Glutamats in diesen GABAergen Synapsen gefunden, was für eine metabolische Aufgabe des Glutamats spricht (Cesa et al., 2008). Eine Untersuchung des glutamatergen Apparats auf Vollständigkeit erfolgte an dieser Stelle nicht. So könnte das Vorhandensein von VGLUT2 einen Hinweis auf den Aktivitätszustand der GABAerge Synapse liefern.

#### 4.4.4 VGLUT in monoaminergen Neuronen

Nicht nur GABAerge sondern auch einige monoaminerge Neurone besitzen mit VGLUT einen weiteren NT-Transportertyp. Die glutamaterge Kotransmission ist eine viel diskutierte Besonderheit dopaminergener Neurone in der Area tegmentalis ventralis (VTA) (Kaneko et al., 1990; Sulzer et al., 1998). VGLUT2 konnte in monoaminerge Neuronen auf der mRNA-Ebene (Kawano et al., 2006; Mendez et al., 2008) und der Proteinebene gefunden werden (Descarries et al., 2008). Sulzer et al. (1998) beschrieben, dass monoaminerge Neurone in Kultur VGLUT exprimieren und glutamaterge Autapsen formen.

VGLUT2 wird in dopaminergen Neuronen mit Belohnungseffekten im Zusammenhang mit Drogenmissbrauch diskutiert. Kürzlich wurde gezeigt, dass VGLUT2 in monoaminergen Neuronen sowohl für die normale emotionale Reaktionsfähigkeit als auch für die psychostimulantienvermittelte Verhaltensaktivierung zuständig ist (Birgner et al., 2009).

Die vorliegende Studie erarbeitete erste Hinweise, dass die beschriebene synaptische Kollokalisierung auch auf vesikulärer Ebene zu finden ist, indem die SVs glutamaterge und monoaminerge Eigenschaften vereinen (Abb. 3.31b). So ist die VMAT2-vermittelte Serotoninaufnahme durch den VGLUT-Inhibitor Trypanblau anteilig hemmbar. Das deutet auf eine Mitwirkung der VGLUT, wahrscheinlich VGLUT3, bei der Monoaminbeladung monoaminerges SV hin. Wie für VGLUT3 so wird auch die Rolle des VGLUT2 als Kotransporter in nichtglutamatergen Synapsen immer wahrscheinlicher. Das gemeinsame Vorkommen von VMAT2 und VGLUT erweitert und moduliert die Antworteigenschaften monoaminerges Neurone (Abb. 3.31b,c). Auf vesikulärer Ebene sind Synergieeffekte, wie von Gras et al. (2008) beobachtet, aufgrund ähnlicher Ladungs- und Protonenbilanzen während der Monoaminenaufnahme denkbar.

**Tabelle 4.1 – Zusammenfassung der Kolo-kalisationen.** Die Kolo-kalisationen der Neurotransmittertransporter VGLUT1, VGLUT2 und VGAT wurden auf vesikulärer Ebene sowohl durch Immunisierungen und Neurotransmitteraufnahmen (auch VMAT2) als auch auf synaptischer Ebene mit der Postembedding-Immungold-Technik untersucht. Auf der ultrastruktureller Ebene wurden die Kolo-kalisationen in synaptischen Endigungen sowohl aus der CA3-Region des Hippokampus als auch in verschiedenen Synapsen des Cerebellums ausgewertet. MFS=Moosfasersynapse, KoZS=Korbzellensynapse, KIZS=Kletterfasersynapse, PFZ=Parallelfasersynapse, \* = nicht bestimmte VGLUT-Isoform (eventuell VGLUT3), n.g.=nicht getestet, + = Kolo-kalisation, - = keine Kolo-kalisation.

	Kolo-kalisationen										
	vesikulär					synaptisch					
	Subpopulationen					Hippokampus		Cerebellum			
	VGLUT1	VGLUT2	VGAT	VMAT2		MFS		MFS	KoZS	KIFS	PFS
VGLUT1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
VGLUT2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
VGAT	-	+	+	n.g.	+	+	+	+	+	-	-
VMAT2	n.g.	n.g.	n.g.	+	-	-	-	-	-	-	-

## 4.5 Offene Fragen und Ausblick

1. Die VGLUT- und VGAT-vermittelten Ladungs- und Protonenverschiebungen sind nicht vollständig bekannt, wodurch sich der VGLUT-Beitrag bei der GABA-Aufnahme rechnerisch nicht klar zeigen lässt.
2. Die Chloridtransportfunktion der VGLUT(1-3) ist momentan nur teilweise verstanden. Zum einen ist nicht sicher, ob dieser Transport ein  $H^+/Cl^-$ -Antiporter ist. Wenn ja, sind ein oder mehrere  $H^+$  involviert? Zum anderen ist offen, ob diese Funktion nicht auch Chlorid gegen Glutamat austauscht. Ebenfalls ungeklärt ist, was bestimmt, wann Chlorid über die VGLUT ein- oder ausströmt.
3. Wird Glutamat in GABAergen SV akkumuliert? Zwar weisen die Ergebnisse unter artifiziellen Bedingungen auf eine Glutamataufnahme hin, jedoch kann unter realen Bedingungen auch der beschriebene Chloridtransport vorherrschen.
4. Immunisierungsversuche mit Antikörpern gegen VMAT2 mit nachfolgendem VGLUT-Nachweis und umgekehrt sind notwendig, um die Kolokalisation beider Transporter zu bestätigen.
5. Der GABAerge Phänotyp der hippokampalen Moosfaserendigungen im adulten Tier sollte durch elektrophysiologische Arbeiten – unter Vermeidung der Kostimulation inhibitorischer Interneurone – bestätigt werden. Denkbar wäre das gezielte Ausschalten von VGAT oder VGLUT in den MFS in einem Cre-KO-Modell.
6. Die Funktion der Kolokalisationen von VGLUT und VGAT in den großen glutamatergen sowie GABAergen cerebellären Synapsen muss auch auf elektrophysiologischem Wege bestätigt werden.

# Abkürzungen

Abkürzung	Erklärung
$\Delta\text{pH}$	pH-Gradient
$\Delta\Psi$	elektrogener Gradient
$\Delta\mu\text{H}^+$	$\text{H}^+$ -elektrochemischer Gradient
5HT	Serotonin
ACh	Acetylcholin
Ak	Antikörper
AP2/3/180	Adapter Protein 2/3/180
AS	Aminosäure
Bq	Becquerel
DA	Dopamin
Da	Dalton
DAT	Dopamintransporter der PM
d/ddH <sub>2</sub> O	einfach bzw. doppelt destilliertes Wasser
DPM	Zerfallsereignisse pro Minute
EAAT	Transporter für exzitatorisch wirkende ASs der PM
EM	Elektronenmikroskopie
GA	Glutaraldehyd
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GAT	GABA-Transporter der PM
GLAST	Glutamat-Aspartattransporter der PM
GLT1	Glutamatttransporter 1 der PM
GLYT	Glyzintransporter der PM
H	Homogenat
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
IgG	Immunglobulin bzw. Immunisierung mit normalem Maus-IgG
ii-SV	immunisolierte Vesikel
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
K <sub>M</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
KO	Knockout-Modell
LDCV	Large Dense Core Vesicle
LMW	Low molecular weight marker
LP1	Lysepellet 1
LP2	Lysepellet 2
LS0	Lyseüberstand 0
LS1	Lyseüberstand 1
LS2	Lyseüberstand 2
MF/MFS	Moosfaser/Moosfasersynapsen bzw. -endigungen
NET	Norepinephrintransporter
NT	Neurotransmitter
oAk	Immunisierung ohne Primärantikörper
P1	Pellet 1
P2	Pellet 2 = synaptosomales Pellet
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung

#### 4 Abkürzungen

Abkürzung	Erklärung
PC12	Pheocytochroma Zelllinie 12
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pi	Protein-Inhibitor-Cocktail
PM	Plasmamembran
PMNNTT	NT-Transporter der Plasmamembran
POI	Protein von Interesse
RNA	Ribonukleinsäure
RLi	Nucleus linearis rostralis
RT	Raumtemperatur
S1	Überstand 1
S2	Überstand 2
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulphat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SERT	Serotonintransporter der PM
SLMV	small synaptic-like microvesicle
SNAREs	synaptosomenassoziierte Proteinrezeptoren
SP	Subpopulation
Syg	Synaptogyrin
Stgm	Synaptotagmin
Syb	Synaptobrevin
Syg	Synaptogyrin
Syp	Synaptophysin
Sypor	Synaptoporin
Sytx	Syntaxin
TB	Trypanblau
VAChT	vesikulärer Acetylcholintransporter
VAMP	vesikelassoziiertes Membranprotein; VAMP2 $\hat{=}$ Synaptobrevin
V-ATPase	vakuoläre ATPase
VGAT	vesikulärer GABA-Transporter
VGLUT1-3	vesikulärer Glutamat-Transporter 1 bis 3
VIAAT	vesikulärer Transporter für inhibitorische AS
VMAT1+2	Vesikulärer Monoamintransporter 1 und 2
VTA	Area ventralis tegmentalis
v/v	Volumen pro Volumen
WB	Westernblot
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
x g	Erdbeschleunigung
ZNS	Zentralnervensystem

# Literaturverzeichnis

- Ahnert-Hilger, G, Höltinge, M, Pahner, I, Winter, S und Brunk, I: Regulation of vesicular neurotransmitter transporters. In: *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, Band 150(NIL):S. 140–60, 2003. URL <http://www.springerlink.com/media/bd1bm48wlh2qypb4wr8x/contributions/g/v/9/x/gv9x4fkjfrhuy65.pdf>.
- Aihara, Y., Mashima, H., Onda, H., Hisano, S., Kasuya, H., Hori, T., Yamada, S., Tomura, H., Yamada, Y., Inoue, I., Kojima, I. und Takeda, J.: Molecular cloning of a novel brain-type na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. In: *J Neurochem*, Band 74(6):S. 2622–2625, 2000. URL <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/119005231/HTMLSTART>.
- Balschun, Detlef, Moechars, Diederik, Callaerts-Vegh, Zsuzsanna, Vermaercke, Ben, Acker, Nathalie Van, Andries, Luc und D'Hooge, Rudi: Vesicular glutamate transporter vglut1 has a role in hippocampal long-term potentiation and spatial reversal learning. In: *Cereb Cortex*, 2009. doi:10.1093/cercor/bhp133. URL <http://dx.doi.org/10.1093/cercor/bhp133>.
- Bauerfeind, R., Jelinek, R., Hellwig, A. und Huttner, W. B.: Neurosecretory vesicles can be hybrids of synaptic vesicles and secretory granules. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 92(16):S. 7342–7346, 1995.
- Becher, A, Drenckhahn, A, Pahner, I, Margittai, M, Jahn, R und Ahnert-Hilger, G: The synaptophysin-synaptobrevin complex: a hallmark of synaptic vesicle maturation. In: *J Neurosci*, Band 19(6):S. 1922–31, 1999.
- Bellocchio, E. E., Reimer, R. J., Fremereau, R. T. und Edwardst, R. H.: Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. In: *Science*, Band 289(5481):S. 957–960, 2000.
- Bergersen, Linda, Ruiz, Arnaud, Bjaalie, Jan G, Kullmann, Dimitri M und Gundersen, Vidar: Gaba and gabaa receptors at hippocampal mossy fibre synapses. In: *Eur J Neurosci*, Band 18(4):S. 931–941, 2003.
- Birgner, Carolina, Nordenankar, Karin, Lundblad, Martin, Mendez, José Alfredo, Smith, Casey, le Grevès, Madeleine, Galter, Dagmar, Olson, Lars, Fredriksson, Anders, Trudeau, Louis-Eric, Kullander, Klas und Wallén-Mackenzie, Asa: Vglut2 in dopamine neurons is required for psychostimulant-induced behavioral activation. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. doi:10.1073/pnas.0910986107. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0910986107>.
- Birks, R. und MacIntosh, FC: Acetylcholine metabolism of a sympathetic ganglion. In: *Biochemistry and Cell Biology*, Band 39(4):S. 787–827, 1961.
- Boulland, Jean-Luc, Jenstad, Monica, Boekel, Amber J, Wouterlood, Floris G, Edwards, Robert H, Storm-Mathisen, Jon und Chaudhry, Farrukh A: Vesicular glutamate and gaba transporters sort to distinct sets of vesicles in a population of presynaptic terminals. In: *Cereb Cortex*, Band 19(1):S. 241–248, 2009. doi:10.1093/cercor/bhn077. URL <http://dx.doi.org/10.1093/cercor/bhn077>.
- Boulland, Jean-Luc, Qureshi, Tayyaba, Seal, Rebecca P, Rafiki, Amina, Gundersen, Vidar, Bergersen, Linda H, Fremereau, Robert T, Edwards, Robert H, Storm-Mathisen, Jon und Chaudhry, Farrukh A: Expression of the vesicular glutamate

- transporters during development indicates the widespread corelease of multiple neurotransmitters. In: *J Comp Neurol*, Band 480(3):S. 264–280, 2004. doi:10.1002/cne.20354. URL <http://dx.doi.org/10.1002/cne.20354>.
- Bragina, L., Giovedì, S., Barbaresi, P., Benfenati, F. und Conti, F.: Heterogeneity of glutamatergic and gabaergic release machinery in cerebral cortex: analysis of synaptogyrin, vesicle-associated membrane protein, and syntaxin. In: *Neuroscience*, Band —:S. —, 2009. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.11.009. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.11.009>.
- Brown, Tyler C, Tran, Irwin C, Backos, Donald S und Esteban, José A: Nmda receptor-dependent activation of the small gtpase rab5 drives the removal of synaptic ampa receptors during hippocampal ltd. In: *Neuron*, Band 45(1):S. 81–94, 2005. doi:10.1016/j.neuron.2004.12.023. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.023>.
- Brunk, Irene, Blex, Christian, Sanchis-Segura, Carles, Sternberg, Jan, Perreau-Lenz, Stephanie, Bilbao, Ainhoa, Hörtnagl, Heide, Baron, Jens, Juranek, Judyta, Laube, Gregor, Birnbaumer, Lutz, Spanagel, Rainer und Ahnert-Hilger, Gudrun: Deletion of go2alpha abolishes cocaine-induced behavioral sensitization by disturbing the striatal dopamine system. In: *FASEB J*, Band 22(10):S. 3736–3746, 2008. doi:10.1096/fj.08-111245. URL <http://dx.doi.org/10.1096/fj.08-111245>.
- Bucci, C., Wandinger-Ness, A., Lütcke, A., Chiariello, M., Bruni, C. B. und Zerial, M.: Rab5a is a common component of the apical and basolateral endocytic machinery in polarized epithelial cells. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 91(11):S. 5061–5065, 1994.
- Burré, Jacqueline, Beckhaus, Tobias, Schägger, Hermann, Corvey, Carsten, Hofmann, Sandra, Karas, Michael, Zimmermann, Herbert und Volkandt, Walter: Analysis of the synaptic vesicle proteome using three gel-based protein separation techniques. In: *Proteomics*, Band 6(23):S. 6250–6262, 2006. doi:10.1002/pmic.200600357. URL <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200600357>.
- Cesa, Roberta, Morando, Laura und Strata, Piergiorgio: Transmitter-receptor mismatch in gabaergic synapses in the absence of activity. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 105(48):S. 18988–18993, 2008. doi:10.1073/pnas.0806979105. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0806979105>.
- Chandler, Kate E, Princivalle, Alessandra P, Fabian-Fine, Ruth, Bowery, Norman G, Kullmann, Dimitri M und Walker, Matthew C: Plasticity of gaba(b) receptor-mediated heterosynaptic interactions at mossy fibers after status epilepticus. In: *J Neurosci*, Band 23(36):S. 11382–11391, 2003.
- Charton, G., Rovira, C., Ben-Ari, Y. und Leviel, V.: Spontaneous and evoked release of endogenous zn<sup>2+</sup> in the hippocampal mossy fiber zone of the rat in situ. In: *Exp Brain Res*, Band 58(1):S. 202–205, 1985.
- Chaudhry, F. A., Reimer, R. J., Bellocchio, E. E., Danbolt, N. C., Osen, K. K., Edwards, R. H. und Storm-Mathisen, J.: The vesicular gaba transporter, vgat, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as gabaergic neurons. In: *J Neurosci*, Band 18(23):S. 9733–9750, 1998. URL <http://www.jneurosci.org/cgi/reprint/18/23/9733.pdf>.
- Chavrier, P., Parton, R. G., Hauri, H. P., Simons, K. und Zerial, M.: Localization of low molecular weight gtp binding proteins to exocytic and endocytic compartments. In: *Cell*, Band 62(2):S. 317–329, 1990.
- Coulter, D. A.: Epilepsy-associated plasticity in gamma-aminobutyric acid receptor expression, function, and inhibitory synaptic properties. In: *Int Rev Neurobiol*, Band 45:S. 237–252, 2001.
- Dale, H. H.: Pharmacology and nerve endings. In: *Proc. R. Soc. Med.*, Band 28:S. 319–332, 1934.
- Dale, H. H.: *Transmission of effects from nerve-endings*. Oxford University Press., 1952.

- Daniels, Richard W, Collins, Catherine A, Chen, Kaiyun, Gelfand, Maria V, Featherstone, David E und DiAntonio, Aaron: A single vesicular glutamate transporter is sufficient to fill a synaptic vesicle. In: *Neuron*, Band 49(1):S. 11–16, 2006. doi:10.1016/j.neuron.2005.11.032. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2005.11.032>.
- Danik, Marc, Cassoly, Estelle, Manseau, Frédéric, Sotty, Florence, Mouginot, Didier und Williams, Sylvain: Frequent coexpression of the vesicular glutamate transporter 1 and 2 genes, as well as coexpression with genes for choline acetyltransferase or glutamic acid decarboxylase in neurons of rat brain. In: *J Neurosci Res*, Band 81(4):S. 506–521, 2005. doi:10.1002/jnr.20500. URL <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.20500>.
- De Camilli, P. und Jahn, R.: Pathways to regulated exocytosis in neurons. In: *Annu Rev Physiol*, Band 52:S. 625–645, 1990. doi:10.1146/annurev.ph.52.030190.003205. URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ph.52.030190.003205>.
- Deinhardt, Katrin, Salinas, Sara, Verastegui, Carole, Watson, Rose, Worth, Daniel, Hanrahan, Sarah, Bucci, Cecilia und Schiavo, Giampietro: Rab5 and rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway. In: *Neuron*, Band 52(2):S. 293–305, 2006. doi:10.1016/j.neuron.2006.08.018. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.018>.
- del Castillo, J. und Katz, B.: Quantal components of the end-plate potential. In: *J Physiol*, Band 124(3):S. 560–573, 1954.
- Descarries, Laurent, Bérubé-Carrière, Noémie, Riad, Mustapha, Bo, Grégory Dal, Mendez, J. Alfredo und Trudeau, Louis-Eric: Glutamate in dopamine neurons: synaptic versus diffuse transmission. In: *Brain Res Rev*, Band 58(2):S. 290–302, 2008. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.10.005. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.10.005>.
- Eccles, J. C., Fattorini, P. und Koketsu: Cholinergic and inhibitory synapses in a pathway from motor-axon collaterals to motoneurons. In: *J Physiol*, Band 126(3):S. 524–562, 1954.
- Edelmann, L., Hanson, P. I., Chapman, E. R. und Jahn, R.: Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. In: *EMBO J*, Band 14(2):S. 224–231, 1995.
- Edwards, Robert H: The neurotransmitter cycle and quantal size. In: *Neuron*, Band 55(6):S. 835–858, 2007. doi:10.1016/j.neuron.2007.09.001. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2007.09.001>.
- Engel, D., Pahner, I., Schulze, K., Frahm, C., Jarry, H., Ahnert-Hilger, G. und Draguhn, A.: Plasticity of rat central inhibitory synapses through gaba metabolism. In: *J Physiol*, Band 535(Pt 2):S. 473–482, 2001. URL <http://jp.physoc.org/cgi/content/full/535/2/473>.
- Erickson, J. D., Schafer, M. K., Bonner, T. I., Eiden, L. E. und Weihe, E.: Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 93(10):S. 5166–5171, 1996.
- Fatt, P. und Katz, B.: Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. In: *J Physiol*, Band 117(1):S. 109–128, 1952.
- Fattorini, Giorgia, Verderio, Claudia, Melone, Marcello, Giovedi, Silvia, Benfenati, Fabio, Matteoli, Michela und Conti, Fiorenzo: Vglut1 and vgat are sorted to the same population of synaptic vesicles in subsets of cortical axon terminals. In: *J Neurochem*, Band 110(5):S. 1538–1546, 2009. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06251.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06251.x>.
- Fon, E. A., Pothos, E. N., Sun, B. C., Killeen, N., Sulzer, D. und Edwards, R. H.: Vesicular transport regulates monoamine storage and release but is not essential for amphetamine action. In: *Neuron*, Band 19(6):S. 1271–1283, 1997.

- Freneau, R T Jr, Troyer, M D, Pahner, I, Nygaard, G O, Tran, C H, Reimer, R J, Bellocchio, E E, Fortin, D, Storm-Mathisen, J und Edwards, R H: The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. In: *Neuron*, Band 31(2):S. 247–60, 2001.
- Freneau, Robert T, Burman, Jonathon, Qureshi, Tayyaba, Tran, Cindy H, Proctor, John, Johnson, Juliette, Zhang, Hui, Sulzer, David, Copenhagen, David R, Storm-Mathisen, Jon, Reimer, Richard J, Chaudhry, Farrukh A und Edwards, Robert H: The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 99(22):S. 14488–14493, 2002. doi:10.1073/pnas.222546799. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.222546799>.
- Freneau, Robert T, Kam, Kaiwen, Qureshi, Tayyaba, Johnson, Juliette, Copenhagen, David R, Storm-Mathisen, Jon, Chaudhry, Farrukh A, Nicoll, Roger A und Edwards, Robert H: Vesicular glutamate transporters 1 and 2 target to functionally distinct synaptic release sites. In: *Science*, Band 304(5678):S. 1815–1819, 2004a. doi:10.1126/science.1097468. URL <http://dx.doi.org/10.1126/science.1097468>.
- Freneau, Robert T, Voglmaier, Susan, Seal, Rebecca P und Edwards, Robert H: Vgluts define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. In: *Trends Neurosci*, Band 27(2):S. 98–103, 2004b. doi:10.1016/j.tins.2003.11.005. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2003.11.005>.
- Furshpan, E. J., MacLeish, P. R., O’Lague, P. H. und Potter, D. D.: Chemical transmission between rat sympathetic neurons and cardiac myocytes developing in microcultures: evidence for cholinergic, adrenergic, and dual-function neurons. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 73(11):S. 4225–4229, 1976.
- Fykse, E. M. und Fonnum, F.: Uptake of gamma-aminobutyric acid by a synaptic vesicle fraction isolated from rat brain. In: *J Neurochem*, Band 50(4):S. 1237–1242, 1988.
- Gillespie, Deda C, Kim, Gunsoo und Kandler, Karl: Inhibitory synapses in the developing auditory system are glutamatergic. In: *Nat Neurosci*, Band 8(3):S. 332–338, 2005. doi:10.1038/nn1397. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nn1397>.
- Goddard, G. V., McIntyre, D. C. und Leech, C. K.: A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. In: *Exp Neurol*, Band 25(3):S. 295–330, 1969.
- Gómez-Lira, Gisela, Lamas, Mónica, Romo-Parra, Héctor und Gutiérrez, Rafael: Programmed and induced phenotype of the hippocampal granule cells. In: *J Neurosci*, Band 25(30):S. 6939–6946, 2005. doi:10.1523/JNEUROSCI.1674-05.2005. URL <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1674-05.2005>.
- Gras, Christelle, Amilhon, Bénédicte, Lepicard, Eve M, Poirel, Odile, Vinatier, Jacqueline, Herbin, Marc, Dumas, Sylvie, Tzavara, Eleni T, Wade, Mark R, Nomikos, George G, Hanoun, Naïma, Saurini, Françoise, Kemel, Marie-Louise, Gasnier, Bruno, Giros, Bruno und Mestikawy, Salah El: The vesicular glutamate transporter vglut3 synergizes striatal acetylcholine tone. In: *Nat Neurosci*, Band 11(3):S. 292–300, 2008. doi:10.1038/nn2052. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nn2052>.
- Gras, Christelle, Herzog, Etienne, Belenchi, Gian Carlo, Bernard, Veronique, Ravassard, Philippe, Pohl, Michel, Gasnier, Bruno, Giros, Bruno und Mestikawy, Salah El: A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. In: *J Neurosci*, Band 22(13):S. 5442–5451, 2002. URL <http://www.jneurosci.org/cgi/content/full/22/13/5442>.
- Gras, Christelle, Vinatier, Jacqueline, Amilhon, Bénédicte, Guerci, Aline, Christov, Christo, Ravassard, Philippe, Giros, Bruno und Mestikawy, Salah El: Developmentally regulated expression of vglut3 during early post-natal life. In: *Neuropharmacology*, Band 49(6):S. 901–911, 2005. doi:10.1016/j.neuropharm.2005.07.023. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.07.023>.

- Greene, L. A. und Rein, G.: Synthesis, storage and release of acetylcholine by a noradrenergic pheochromocytoma cell line. In: *Nature*, Band 268(5618):S. 349–351, 1977.
- Grønborg, Mads, Pavlos, Nathan J, Brunk, Irene, Chua, John J E, Münster-Wandowski, Agnieszka, Riedel, Dietmar, Ahnert-Hilger, Gudrun, Urlaub, Henning und Jahn, Reinhard: Quantitative comparison of glutamatergic and gabaergic synaptic vesicles unveils selectivity for few proteins including mal2, a novel synaptic vesicle protein. In: *J Neurosci*, Band 30(1):S. 2–12, 2010. doi:10.1523/JNEUROSCI.4074-09.2010. URL <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4074-09.2010>.
- Gundersen, V.: Co-localization of excitatory and inhibitory transmitters in the brain. In: *Acta Neurol Scand Suppl*, Band 188:S. 29–33, 2008. doi:10.1111/j.1600-0404.2008.01028.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0404.2008.01028.x>.
- Gutiérrez, R.: Seizures induce simultaneous gabaergic and glutamatergic transmission in the dentate gyrus-ca3 system. In: *J Neurophysiol*, Band 84(6):S. 3088–3090, 2000.
- Gutiérrez, R. und Heinemann, U.: Kindling induces transient fast inhibition in the dentate gyrus-ca3 projection. In: *Eur J Neurosci*, Band 13(7):S. 1371–1379, 2001. URL <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/119027779/HTMLSTART>.
- Gutiérrez, Rafael: The dual glutamatergic-gabaergic phenotype of hippocampal granule cells. In: *Trends Neurosci*, Band 28(6):S. 297–303, 2005. doi:10.1016/j.tins.2005.04.005. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2005.04.005>.
- Gutiérrez, Rafael und Heinemann, Uwe: Co-existence of gaba and glu in the hippocampal granule cells: implications for epilepsy. In: *Curr Top Med Chem*, Band 6(10):S. 975–978, 2006. URL <http://www.benthamdirect.org/pages/content.php?CTMC/2006/00000006/00000010/0008R.SGM>.
- Gutiérrez, Rafael, Romo-Parra, Héctor, Maqueda, Jasmín, Vivar, Carmen, Ramírez, Mónica, Morales, Miguel A und Lamas, Mónica: Plasticity of the gabaergic phenotype of the "glutamatergic" granule cells of the rat dentate gyrus. In: *J Neurosci*, Band 23(13):S. 5594–5598, 2003.
- Gutiérrez, Raffael (Hg.): *Co-existence and Co-release of Classical Neurotransmitters. Ex uno plures.*, Springer Verlag, Kapitel Co-release of classical neurotransmitters., S. 15–22. 2008a.
- Gutiérrez, Raffael (Hg.): *Co-existence and Co-release of Classical Neurotransmitters. Ex uno plures.*, Springer Verlag, Kapitel The dual glutamatergic/GABAergic phenotype of the hippocampal granule cells., S. 181–202. 2008b.
- Hayashi, M., Haga, M., Yatsushiro, S., Yamamoto, A. und Moriyama, Y.: Vesicular monoamine transporter 1 is responsible for storage of 5-hydroxytryptamine in rat pinealocytes. In: *J Neurochem*, Band 73(6):S. 2538–2545, 1999.
- Hayashi, M., Otsuka, M., Morimoto, R., Hirota, S., Yatsushiro, S., Takeda, J., Yamamoto, A. und Moriyama, Y.: Differentiation-associated na<sup>+</sup>-dependent inorganic phosphate cotransporter (dnpi) is a vesicular glutamate transporter in endocrine glutamatergic systems. In: *J Biol Chem*, Band 276(46):S. 43400–43406, 2001. doi:10.1074/jbc.M106244200. URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M106244200>.
- Hell, J. W., Maycox, P. R. und Jahn, R.: Energy dependence and functional reconstitution of the gamma-aminobutyric acid carrier from synaptic vesicles. In: *J Biol Chem*, Band 265(4):S. 2111–2117, 1990.
- Henry, J. P., Botton, D., Sagne, C., Isambert, M. F., Desnos, C., Blanchard, V., Raisman-Vozari, R., Krejci, E., Massoulie,

- J. und Gasnier, B.: Biochemistry and molecular biology of the vesicular monoamine transporter from chromaffin granules. In: *J Exp Biol*, Band 196:S. 251–262, 1994.
- Herzog, E., Bellenchi, G. C., Gras, C., Bernard, V., Ravassard, P., Bedet, C., Gasnier, B., Giros, B. und Mestikawy, S. El: The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. In: *J Neurosci*, Band 21(22):S. RC181, 2001. URL <http://www.jneurosci.org/cgi/reprint/21/22/RC181>.
- Herzog, E., Gilchrist, J., Gras, C., Muzerelle, A., Ravassard, P., Giros, B., Gaspar, P. und Mestikawy, S. El: Localization of vglut3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. In: *Neuroscience*, Band 123(4):S. 983–1002, 2004.
- Herzog, Etienne, Takamori, Shigeo, Jahn, Reinhard, Brose, Nils und Wojcik, Sonja M: Synaptic and vesicular colocalization of the glutamate transporters vglut1 and vglut2 in the mouse hippocampus. In: *J Neurochem*, Band 99(3):S. 1011–1018, 2006. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04144.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04144.x>.
- Hioki, H., Fujiyama, F., Taki, K., Tomioka, R., Furuta, T., Tamamaki, N. und Kaneko, T.: Differential distribution of vesicular glutamate transporters in the rat cerebellar cortex. In: *Neuroscience*, Band 117(1):S. 1–6, 2003.
- Hisano, Setsuji, Sawada, Kazuhiko, Kawano, Michihiro, Kanemoto, Mizuki, Xiong, Guoxiang, Mogi, Koichi, Sakata-Haga, Hiromi, Takeda, Jun, Fukui, Yoshihiro und Nogami, Haruo: Expression of inorganic phosphate/vesicular glutamate transporters (bnpi/vglut1 and dnpi/vglut2) in the cerebellum and precerebellar nuclei of the rat. In: *Brain Res Mol Brain Res*, Band 107(1):S. 23–31, 2002.
- Hököfelt, T., Johansson, O. und Goldstein, M.: Chemical anatomy of the brain. In: *Science*, Band 225(4668):S. 1326–1334, 1984.
- Hököfelt, T., Millhorn, D., Seroogy, K., Tsuruo, Y., Ceccatelli, S., Lindh, B., Meister, B., Melander, T., Schalling, M. und Bartfai, T.: Coexistence of peptides with classical neurotransmitters. In: *Experientia*, Band 43(7):S. 768–780, 1987.
- Höltje, Markus, Winter, Sandra, Walther, Diego, Pahner, Ingrid, Hörtnagl, Heide, Ottersen, Ole Petter, Bader, Michael und Ahnert-Hilger, Gudrun: The vesicular monoamine content regulates vmat2 activity through galphaq in mouse platelets. evidence for autoregulation of vesicular transmitter uptake. In: *J Biol Chem*, Band 278(18):S. 15850–15858, 2003. doi:10.1074/jbc.M212816200. URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M212816200>.
- Huttner, W. B., Schiebler, W., Greengard, P. und De Camilli, P.: Synapsin i (protein i), a nerve terminal-specific phosphoprotein. iii. its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. In: *J Cell Biol*, Band 96(5):S. 1374–1388, 1983. URL <http://www.jcb.org/cgi/reprint/96/5/1374>.
- Ikin, A. F., Annaert, W. G., Takei, K., Camilli, P. De, Jahn, R., Greengard, P. und Buxbaum, J. D.: Alzheimer amyloid protein precursor is localized in nerve terminal preparations to rab5-containing vesicular organelles distinct from those implicated in the synaptic vesicle pathway. In: *J Biol Chem*, Band 271(50):S. 31783–31786, 1996.
- Jahn, R.: Recycling of synaptic vesicle membrane within nerve terminals. In: *Brain Res Bull*, Band 50(5-6):S. 313–314, 1999.
- Jahn, R., Schiebler, W., Ouimet, C. und Greengard, P.: A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 82(12):S. 4137–4141, 1985.
- Jin, Hong, Wu, Heng, Osterhaus, Gregory, Wei, Jianning, Davis, Kathleen, Sha, Di, Floor, Eric, Hsu, Che-Chang, Kopke, Richard D und Wu, Jang-Yen: Demonstration of functional coupling between gamma -aminobutyric acid

- (gaba) synthesis and vesicular gaba transport into synaptic vesicles. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 100(7):S. 4293–4298, 2003. doi:10.1073/pnas.0730698100. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0730698100>.
- Johnson, R. G.: Accumulation of biological amines into chromaffin granules: a model for hormone and neurotransmitter transport. In: *Physiol Rev*, Band 68(1):S. 232–307, 1988.
- Johnson, R. G., Carty, S. E. und Scarpa, A.: Proton: substrate stoichiometries during active transport of biogenic amines in chromaffin ghosts. In: *J Biol Chem*, Band 256(11):S. 5773–5780, 1981.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H. und Jessell, T. M.: *Principles of neural science*. Appleton & Lange, dritte Auflage, 1991.
- Kaneko, T., Akiyama, H., Nagatsu, I. und Mizuno, N.: Immunohistochemical demonstration of glutaminase in catecholaminergic and serotonergic neurons of rat brain. In: *Brain Res*, Band 507(1):S. 151–154, 1990.
- Kaneko, Takeshi und Fujiyama, Fumino: Complementary distribution of vesicular glutamate transporters in the central nervous system. In: *Neurosci Res*, Band 42(4):S. 243–250, 2002.
- Kaneko, Takeshi, Fujiyama, Fumino und Hioki, Hiroyuki: Immunohistochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat brain. In: *J Comp Neurol*, Band 444(1):S. 39–62, 2002.
- Kasyanov, Alexander M, Safiulina, Victoria F, Voronin, Leon L und Cherubini, Enrico: Gaba-mediated giant depolarizing potentials as coincidence detectors for enhancing synaptic efficacy in the developing hippocampus. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 101(11):S. 3967–3972, 2004. doi:10.1073/pnas.0305974101. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0305974101>.
- Katz, B.: Quantal mechanism of neural transmitter release. In: *Science*, Band 173(992):S. 123–126, 1971.
- Kawano, Michihiro, Kawasaki, Akiko, Sakata-Haga, Hiromi, Fukui, Yoshihiro, Kawano, Hitoshi, Nogami, Haruo und Hisano, Setsuji: Particular subpopulations of midbrain and hypothalamic dopamine neurons express vesicular glutamate transporter 2 in the rat brain. In: *J Comp Neurol*, Band 498(5):S. 581–592, 2006. doi:10.1002/cne.21054. URL <http://dx.doi.org/10.1002/cne.21054>.
- Kawasaki, Akiko, Hoshi, Koichi, Kawano, Michihiro, Nogami, Haruo, Yoshikawa, Hiroyuki und Hisano, Setsuji: Up-regulation of vglut2 expression in hypothalamic-neurohypophysial neurons of the rat following osmotic challenge. In: *Eur J Neurosci*, Band 22(3):S. 672–680, 2005. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04240.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04240.x>.
- Klingauf, J., Kavalali, E. T. und Tsien, R. W.: Kinetics and regulation of fast endocytosis at hippocampal synapses. In: *Nature*, Band 394(6693):S. 581–585, 1998. doi:10.1038/29079. URL <http://dx.doi.org/10.1038/29079>.
- Knoth, J., Zallakian, M. und Njus, D.: Stoichiometry of h<sup>+</sup>-linked dopamine transport in chromaffin granule ghosts. In: *Biochemistry*, Band 20(23):S. 6625–6629, 1981.
- Koch, C.: Computation and the single neuron. In: *Nature*, Band 385(6613):S. 207–210, 1997. doi:10.1038/385207a0. URL <http://dx.doi.org/10.1038/385207a0>.
- Liguz-Leczna, Monika und Skangiel-Kramska, Jolanta: Vesicular glutamate transporters (vgluts): the three musketeers of glutamatergic system. In: *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, Band 67(3):S. 207–218, 2007. URL [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17957901?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed\\_ResultsPanel.Pubmed\\_DefaultReportPanel.Pubmed\\_RVDocSum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17957901?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum).

- Liu, Guosong: Presynaptic control of quantal size: kinetic mechanisms and implications for synaptic transmission and plasticity. In: *Curr Opin Neurobiol*, Band 13(3):S. 324–331, 2003.
- Liu, Y. und Edwards, R. H.: The role of vesicular transport proteins in synaptic transmission and neural degeneration. In: *Annu Rev Neurosci*, Band 20:S. 125–156, 1997. doi:10.1146/annurev.neuro.20.1.125. URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.neuro.20.1.125>.
- Liu, Y., Peter, D., Roghani, A., Schuldiner, S., Privé, G. G., Eisenberg, D., Brecha, N. und Edwards, R. H.: A cdna that suppresses mpp+ toxicity encodes a vesicular amine transporter. In: *Cell*, Band 70(4):S. 539–551, 1992.
- Liu, Y., Schweitzer, E. S., Nirenberg, M. J., Pickel, V. M., Evans, C. J. und Edwards, R. H.: Preferential localization of a vesicular monoamine transporter to dense core vesicles in pc12 cells. In: *J Cell Biol*, Band 127(5):S. 1419–1433, 1994.
- Lomo, T.: Frequency potentiation of excitatory synaptic activity in the dentate area of the hippocampal formation. In: *Acta Physiol Scand*, Band 68(Suppl 277):S. 128, 1966.
- Martens, Henrik, Weston, Matthew C, Boulland, Jean-Luc, Grønborg, Mads, Grosche, Jens, Kacza, Johannes, Hoffmann, Anke, Matteoli, Michela, Takamori, Shigeo, Harkany, Tibor, Chaudhry, Farrukh A, Rosenmund, Christian, Erck, Christian, Jahn, Reinhard und Härtig, Wolfgang: Unique luminal localization of vgat-c terminus allows for selective labeling of active cortical gabaergic synapses. In: *J Neurosci*, Band 28(49):S. 13125–13131, 2008. doi:10.1523/JNEUROSCI.3887-08.2008. URL <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3887-08.2008>.
- Matsuda, James J, Filali, Mohammed S, Volk, Kenneth A, Collins, Malia M, Moreland, Jessica G und Lamb, Fred S: Overexpression of clc-3 in hek293t cells yields novel currents that are ph dependent. In: *Am J Physiol Cell Physiol*, Band 294(1):S. C251–C262, 2008. doi:10.1152/ajpcell.00338.2007. URL <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00338.2007>.
- Maycox, P. R., Deckwerth, T., Hell, J. W. und Jahn, R.: Glutamate uptake by brain synaptic vesicles. energy dependence of transport and functional reconstitution in proteoliposomes. In: *J Biol Chem*, Band 263(30):S. 15423–15428, 1988.
- Maycox, P. R., Hell, J. W. und Jahn, R.: Amino acid neurotransmission: spotlight on synaptic vesicles. In: *Trends Neurosci*, Band 13(3):S. 83–87, 1990.
- McIntire, S. L., Reimer, R. J., Schuske, K., Edwards, R. H. und Jorgensen, E. M.: Identification and characterization of the vesicular gaba transporter. In: *Nature*, Band 389(6653):S. 870–876, 1997. doi:10.1038/39908. URL <http://dx.doi.org/10.1038/39908>.
- Mendez, Jose Alfredo, Bourque, Marie-Josée, Bo, Gregory Dal, Bourdeau, Mathieu L, Danik, Marc, Williams, Sylvain, Lacaille, Jean-Claude und Trudeau, Louis-Eric: Developmental and target-dependent regulation of vesicular glutamate transporter expression by dopamine neurons. In: *J Neurosci*, Band 28(25):S. 6309–6318, 2008. doi:10.1523/JNEUROSCI.1331-08.2008. URL <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1331-08.2008>.
- Miyaji, Takaaki, Echigo, Noriko, Hiasa, Miki, Senoh, Shigenori, Omote, Hiroshi und Moriyama, Yoshinori: Identification of a vesicular aspartate transporter. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 105(33):S. 11720–11724, 2008. doi:10.1073/pnas.0804015105. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0804015105>.
- Miyazaki, Taisuke, Fukaya, Masahiro, Shimizu, Hidemi und Watanabe, Masahiko: Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre-purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum. In: *Eur J Neurosci*, Band 17(12):S. 2563–2572, 2003.
- Moechars, Diederik, Weston, Matthew C, Leo, Sandra, Callaerts-Vegh, Zsuzsanna, Goris, Ilse, Daneels, Guy, Buist,

- A., Cik, M., van der Spek, P., Kass, Stefan, Meert, Theo, D'Hooge, Rudi, Rosenmund, Christian und Hampson, R. Mark: Vesicular glutamate transporter vglut2 expression levels control quantal size and neuropathic pain. In: *J Neurosci*, Band 26(46):S. 12055–12066, 2006. doi:10.1523/JNEUROSCI.2556-06.2006. URL <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2556-06.2006>.
- Morciano, Marco, Burré, Jacqueline, Corvey, Carsten, Karas, Michael, Zimmermann, Herbert und Volkandt, Walter: Immunolocalization of two synaptic vesicle pools from synaptosomes: a proteomics analysis. In: *J Neurochem*, Band 95(6):S. 1732–1745, 2005. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03506.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03506.x>.
- Nagy, A., Baker, R. R., Morris, S. J. und Whittaker, V. P.: The preparation and characterization of synaptic vesicles of high purity. In: *Brain Res*, Band 109(2):S. 285–309, 1976.
- Naito, S. und Ueda, T.: Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. In: *J Neurochem*, Band 44(1):S. 99–109, 1985.
- Nakamura, Kouichi, Hioki, Hiroyuki, Fujiyama, Fumino und Kaneko, Takeshi: Postnatal changes of vesicular glutamate transporter (vglut)1 and vglut2 immunoreactivities and their colocalization in the mouse forebrain. In: *J Comp Neurol*, Band 492(3):S. 263–288, 2005. doi:10.1002/cne.20705. URL <http://dx.doi.org/10.1002/cne.20705>.
- Navone, F., Jahn, R., Gioia, G. Di, Stukenbrok, H., Greengard, P. und De Camilli, P.: Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. In: *J Cell Biol*, Band 103(6 Pt 1):S. 2511–2527, 1986.
- Neher, E.: Vesicle pools and ca<sup>2+</sup> microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. In: *Neuron*, Band 20(3):S. 389–399, 1998.
- Ng, Ee Ling und Tang, Bor Luen: Rab gtpases and their roles in brain neurons and glia. In: *Brain Res Rev*, Band 58(1):S. 236–246, 2008. doi:10.1016/j.brainresrev.2008.04.006. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.04.006>.
- Ni, B., Rosteck, P. R., Nadi, N. S. und Paul, S. M.: Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 91(12):S. 5607–5611, 1994.
- no, Mario Trevi und Gutiérrez, Rafael: The gabaergic projection of the dentate gyrus to hippocampal area ca3 of the rat: pre- and postsynaptic actions after seizures. In: *J Physiol*, Band 567(Pt 3):S. 939–949, 2005. doi:10.1113/jphysiol.2005.092064. URL <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2005.092064>.
- Oliveira, A.L.R., Hydling, F., Olsson, E., Shi, T., Edwards, R.H., Fujiyama, F., Kaneko, T., Hokfelt, T., Cullheim, S. und Meister, B.: Cellular localization of three vesicular glutamate transporter mRNAs and proteins in rat spinal cord and dorsal root ganglia. In: *Synapse*, Band 50(2), 2003.
- Patel, Sarjubhai A, Nagy, Jon O, Bolstad, Erin D, Gerdes, John M und Thompson, Charles M: Tetrapeptide inhibitors of the glutamate vesicular transporter (vglut). In: *Bioorg Med Chem Lett*, Band 17(18):S. 5125–5128, 2007. doi:10.1016/j.bmcl.2007.07.006. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.07.006>.
- Peter, D., Jimenez, J., Liu, Y., Kim, J. und Edwards, R. H.: The chromaffin granule and synaptic vesicle amine transporters differ in substrate recognition and sensitivity to inhibitors. In: *J Biol Chem*, Band 269(10):S. 7231–7237, 1994.

- Pletscher, A.: Transport of monoamines in membranes of adrenal chromaffin granules: physiological and pharmacological aspects. In: *Bull Schweiz Akad Med Wiss*, Band 32(4-6):S. 181–190, 1976.
- Pletscher, A., Brossi, A. und Gey, KF: Benzoquinolizine derivatives: A new class of monamine decreasing drugs with psychotropic action. In: *International Review of Neurobiology: V. 4*, Band —:S. 275, 1962.
- Quick, M W, Corey, J L, Davidson, N und Lester, H A: Second messengers, trafficking-related proteins, and amino acid residues that contribute to the functional regulation of the rat brain GABA transporter GAT1. In: *J Neurosci*, Band 17(9):S. 2967–79, 1997. URL <http://www.jneurosci.org/cgi/reprint/17/9/2967>.
- Ramírez, M. und Gutiérrez, R.: Activity-dependent expression of gad67 in the granule cells of the rat hippocampus. In: *Brain Res*, Band 917(2):S. 139–146, 2001.
- Reimer, R. J., Fon, E. A. und Edwards, R. H.: Vesicular neurotransmitter transport and the presynaptic regulation of quantal size. In: *Curr Opin Neurobiol*, Band 8(3):S. 405–412, 1998.
- Reimer, R. J., Freneau, R. T., Bellocchio, E. E. und Edwards, R. H.: The essence of excitation. In: *Curr Opin Cell Biol*, Band 13(4):S. 417–421, 2001.
- REYNOLDS, E. S.: The use of lead citrate at high ph as an electron-opaque stain in electron microscopy. In: *J Cell Biol*, Band 17:S. 208–212, 1963.
- Rizzoli, Silvio O und Betz, William J: Synaptic vesicle pools. In: *Nat Rev Neurosci*, Band 6(1):S. 57–69, 2005. doi: 10.1038/nrn1583. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1583>.
- Robinson, M. B. und Dowd, L. A.: Heterogeneity and functional properties of subtypes of sodium-dependent glutamate transporters in the mammalian central nervous system. In: *Adv Pharmacol*, Band 37:S. 69–115, 1997.
- Roseth, S., Fykse, E. M. und Fonnum, F.: Uptake of l-glutamate into rat brain synaptic vesicles: effect of inhibitors that bind specifically to the glutamate transporter. In: *J Neurochem*, Band 65(1):S. 96–103, 1995.
- Ruiz, Arnaud, Fabian-Fine, Ruth, Scott, Ricardo, Walker, Matthew C, Rusakov, Dmitri A und Kullmann, Dimitri M: Gabaa receptors at hippocampal mossy fibers. In: *Neuron*, Band 39(6):S. 961–973, 2003.
- Safulina, Victoria F, Fattorini, Giorgia, Conti, Fiorenzo und Cherubini, Enrico: Gabaergic signaling at mossy fiber synapses in neonatal rat hippocampus. In: *J Neurosci*, Band 26(2):S. 597–608, 2006. doi:10.1523/JNEUROSCI.4493-05.2006. URL <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4493-05.2006>.
- Sagné, C., Mestikawy, S. El, Isambert, M. F., Hamon, M., Henry, J. P., Giros, B. und Gasnier, B.: Cloning of a functional vesicular gaba and glycine transporter by screening of genome databases. In: *FEBS Lett*, Band 417(2):S. 177–183, 1997.
- Sakata-Haga, H., Kanemoto, M., Maruyama, D., Hoshi, K., Mogi, K., Narita, M., Okado, N., Ikeda, Y., Nogami, H., Fukui, Y., Kojima, I., Takeda, J. und Hisano, S.: Differential localization and colocalization of two neuron-types of sodium-dependent inorganic phosphate cotransporters in rat forebrain. In: *Brain Res*, Band 902(2):S. 143–155, 2001.
- Sandler, R. und Smith, A. D.: Coexistence of gaba and glutamate in mossy fiber terminals of the primate hippocampus: an ultrastructural study. In: *J Comp Neurol*, Band 303(2):S. 177–192, 1991. doi:10.1002/cne.903030202. URL <http://dx.doi.org/10.1002/cne.903030202>.

- Sano, I., Kakimoto, Y. und Taniguchi, K.: Binding and transport of serotonin in rabbit blood platelets and action of reserpine. In: *Am J Physiol*, Band 195(2):S. 495–498, 1958.
- Schäfer, Martin K-H, Varoqui, H el ene, Defamie, Norah, Weihe, Eberhard und Erickson, Jeffrey D: Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. In: *J Biol Chem*, Band 277(52):S. 50734–50748, 2002. doi:10.1074/jbc.M206738200. URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M206738200>.
- Scheller, R. H.: Membrane trafficking in the presynaptic nerve terminal. In: *Neuron*, Band 14(5):S. 893–897, 1995.
- Schenck, Stephan, Wojcik, Sonja M, Brose, Nils und Takamori, Shigeo: A chloride conductance in vglut1 underlies maximal glutamate loading into synaptic vesicles. In: *Nat Neurosci*, Band 12(2):S. 156–162, 2009. doi:10.1038/nn.2248. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nn.2248>.
- Scherman, D. und Henry, J. P.: Reserpine binding to bovine chromaffin granule membranes. characterization and comparison with dihydrotetrabenazine binding. In: *Mol Pharmacol*, Band 25(1):S. 113–122, 1984.
- Schuldiner, S., Shirvan, A. und Linial, M.: Vesicular neurotransmitter transporters: from bacteria to humans. In: *Physiol Rev*, Band 75(2):S. 369–392, 1995.
- Schuske, Kim und Jorgensen, Erik M: Neuroscience. vesicular glutamate transporter–shooting blanks. In: *Science*, Band 304(5678):S. 1750–1752, 2004. doi:10.1126/science.1100475. URL <http://dx.doi.org/10.1126/science.1100475>.
- Schwarzer, C. und Sperk, G.: Hippocampal granule cells express glutamic acid decarboxylase-67 after limbic seizures in the rat. In: *Neuroscience*, Band 69(3):S. 705–709, 1995.
- Seal, Rebecca P, Akil, Omar, Yi, Eunyoung, Weber, Christopher M, Grant, Lisa, Yoo, Jong, Clause, Amanda, Kandler, Karl, Noebels, Jeffrey L, Glowatzki, Elisabeth, Lustig, Lawrence R und Edwards, Robert H: Sensorineural deafness and seizures in mice lacking vesicular glutamate transporter 3. In: *Neuron*, Band 57(2):S. 263–275, 2008. doi:10.1016/j.neuron.2007.11.032. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2007.11.032>.
- Seal, Rebecca P und Edwards, Robert H: Functional implications of neurotransmitter co-release: glutamate and gaba share the load. In: *Curr Opin Pharmacol*, Band 6(1):S. 114–119, 2006. doi:10.1016/j.coph.2005.12.001. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2005.12.001>.
- Shepherd, Gordon M. (Hg.): *The Synaptic Organization of the Brain*. Oxford University Press, 2004.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. und Mann, M.: Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. In: *Anal Chem*, Band 68(5):S. 850–858, 1996. URL <http://pubs.acs.org/cgi-bin/article.cgi/ancham/1996/68/i05/html/ac950914h.html>.
- Shimizu, Hideyuki, Kawamura, Satoru und Ozaki, Koichi: An essential role of rab5 in uniformity of synaptic vesicle size. In: *J Cell Sci*, Band 116(Pt 17):S. 3583–3590, 2003. doi:10.1242/jcs.00676. URL <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.00676>.
- Sloviter, R. S., Dichter, M. A., Rachinsky, T. L., Dean, E., Goodman, J. H., Sollas, A. L. und Martin, D. L.: Basal expression and induction of glutamate decarboxylase and gaba in excitatory granule cells of the rat and monkey hippocampal dentate gyrus. In: *J Comp Neurol*, Band 373(4):S. 593–618, 1996. doi:gt;3.0.CO;2-X. URL <http://dx.doi.org/gt;3.0.CO;2-X>.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke,

- N. M., Olson, B. J. und Klenk, D. C.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. In: *Anal Biochem*, Band 150(1):S. 76–85, 1985.
- Sossin, W. S., Sweet-Cordero, A. und Scheller, R. H.: Dale's hypothesis revisited: different neuropeptides derived from a common prohormone are targeted to different processes. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 87(12):S. 4845–4848, 1990.
- Sperk, Günther, Schwarzer, Christoph, Heilman, Jutta, Furtinger, Sabine, Reimer, Richard J, Edwards, Robert H und Nelson, Nathan: Expression of plasma membrane gaba transporters but not of the vesicular gaba transporter in dentate granule cells after kainic acid seizures. In: *Hippocampus*, Band 13(7):S. 806–815, 2003. doi:10.1002/hipo.10133. URL <http://dx.doi.org/10.1002/hipo.10133>.
- Stobrawa, S. M., Breiderhoff, T., Takamori, S., Engel, D., Schweizer, M., Zdebik, A. A., Bösl, M. R., Ruether, K., Jahn, H., Draguhn, A., Jahn, R. und Jentsch, T. J.: Disruption of clc-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. In: *Neuron*, Band 29(1):S. 185–196, 2001.
- Storm-Mathisen, J. und Fonnum, F.: Localization of transmitter candidates in the hippocampal region. In: *Prog Brain Res*, Band 36:S. 41–58, 1972.
- Südhof, T. C.: The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. In: *Nature*, Band 375(6533):S. 645–653, 1995. doi:10.1038/375645a0. URL <http://dx.doi.org/10.1038/375645a0>.
- Südhof, Thomas C: The synaptic vesicle cycle. In: *Annu Rev Neurosci*, Band 27:S. 509–547, 2004. doi:10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412. URL <http://arjournals.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412?cookieSet=1>.
- Sulzer, D., Joyce, M. P., Lin, L., Geldwert, D., Haber, S. N., Hattori, T. und Rayport, S.: Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. In: *J Neurosci*, Band 18(12):S. 4588–4602, 1998.
- Sulzer, D. und Rayport, S.: Dale's principle and glutamate corelease from ventral midbrain dopamine neurons. In: *Amino Acids*, Band 19(1):S. 45–52, 2000.
- Takahashi, N., Miner, L. L., Sora, I., Ujike, H., Revay, R. S., Kostic, V., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S. und Uhl, G. R.: Vmat2 knockout mice: heterozygotes display reduced amphetamine-conditioned reward, enhanced amphetamine locomotion, and enhanced mptp toxicity. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 94(18):S. 9938–9943, 1997.
- Takamori, S., Malherbe, P., Broger, C. und Jahn, R.: Molecular cloning and functional characterization of human vesicular glutamate transporter 3. In: *EMBO reports*, Band 3(8):S. 798–803, 2002.
- Takamori, S., Rhee, J. S., Rosenmund, C. und Jahn, R.: Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. In: *Nature*, Band 407(6801):S. 189–194, 2000a. doi:10.1038/35025070. URL <http://dx.doi.org/10.1038/35025070><http://www.nature.com/nature/journal/v407/n6801/pdf/407189a0.pdf>.
- Takamori, S., Rhee, J. S., Rosenmund, C. und Jahn, R.: Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (vglut2). In: *J Neurosci*, Band 21(22):S. RC182, 2001.
- Takamori, S., Riedel, D und Jahn, R: Immunoisolation of GABA-specific synaptic vesicles defines a functionally distinct subset of synaptic vesicles. In: *J Neurosci*, Band 20(13):S. 4904–11, 2000b. URL <http://www.jneurosci.org/cgi/content/full/20/13/4904>.
- Takamori, Shigeo, Holt, Matthew, Stenius, Katinka, Lemke, Edward A, Grønborg, Mads, Riedel, Dietmar, Urlaub, Hen-

- ning, Schenck, Stephan, Brügger, Britta, Ringler, Philippe, Müller, Shirley A, Rammner, Burkhard, Gräter, Frauke, Hub, Jochen S, Groot, Bert L De, Mieskes, Gottfried, Moriyama, Yoshinori, Klingauf, Jürgen, Grubmüller, Helmut, Heuser, John, Wieland, Felix und Jahn, Reinhard: Molecular anatomy of a trafficking organelle. In: *Cell*, Band 127(4):S. 831–846, 2006. doi:10.1016/j.cell.2006.10.030.
- Takei, K., Mundigl, O., Daniell, L. und De Camilli, P.: The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. In: *J Cell Biol*, Band 133(6):S. 1237–1250, 1996.
- Thompson, Charles M, Davis, Erin, Carrigan, Christina N, Cox, Holly D, Bridges, Richard J und Gerdes, John M: Inhibitor of the glutamate vesicular transporter (vglut). In: *Curr Med Chem*, Band 12(18):S. 2041–2056, 2005.
- Toll, L. und Howard, B. D.: Evidence that an atpase and a protonmotive force function in the transport of acetylcholine into storage vesicles. In: *J Biol Chem*, Band 255(5):S. 1787–1789, 1980.
- Uchigashima, Motokazu, Fukaya, Masahiro, Watanabe, Masahiko und Kamiya, Haruyuki: Evidence against gaba release from glutamatergic mossy fiber terminals in the developing hippocampus. In: *J Neurosci*, Band 27(30):S. 8088–8100, 2007. doi:10.1523/JNEUROSCI.0702-07.2007. URL <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0702-07.2007>.
- van Daal, J. H., Zanderink, H. E., Jenks, B. G. und van Abeelen, J. H.: Distribution of dynorphin b and methionine-enkephalin in the mouse hippocampus: influence of genotype. In: *Neurosci Lett*, Band 97(3):S. 241–244, 1989.
- van der Hel, W. Saskia, Verlinde, Suzanne A M W, Meijer, Dimphna H M, de Wit, Marina, Rensen, Marije G, van Gassen, Koen L I, van Rijen, Peter C, van Veelen, Cees W M und de Graan, Pierre N E: Hippocampal distribution of vesicular glutamate transporter 1 in patients with temporal lobe epilepsy. In: *Epilepsia*, 2009. doi:10.1111/j.1528-1167.2009.02054.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02054.x>.
- Van der Kloot, William: Loading and recycling of synaptic vesicles in the torpedo electric organ and the vertebrate neuromuscular junction. In: *Prog Neurobiol*, Band 71(4):S. 269–303, 2003.
- Varoqui, Helene, Schäfer, Martin K H, Zhu, Heming, Weihe, Eberhard und Erickson, Jeffrey D: Identification of the differentiation-associated na<sup>+</sup>/pi transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. In: *J Neurosci*, Band 22(1):S. 142–155, 2002.
- von Mollard, G. Fischer, Stahl, B., Walch-Solimena, C., Takei, K., Daniels, L., Khoklatchev, A., De Camilli, P., Südhof, T. C. und Jahn, R.: Localization of rab5 to synaptic vesicles identifies endosomal intermediate in synaptic vesicle recycling pathway. In: *Eur J Cell Biol*, Band 65(2):S. 319–326, 1994.
- Walker, M. C., Ruiz, A. und Kullmann, D. M.: Monosynaptic gabaergic signaling from dentate to ca3 with a pharmacological and physiological profile typical of mossy fiber synapses. In: *Neuron*, Band 29(3):S. 703–715, 2001. URL [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6WSS-4CC2XVR-16&\\_coverDate=03%2F31%2F2001&\\_alid=446497652&\\_rdoc=1&\\_fmt=&\\_orig=search&\\_qd=1&\\_cdi=7054&\\_sort=d&view=c&\\_acct=C000055104&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=1853498&md5=a1c9a262a6a6c421170f1c26c64306d3](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WSS-4CC2XVR-16&_coverDate=03%2F31%2F2001&_alid=446497652&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_qd=1&_cdi=7054&_sort=d&view=c&_acct=C000055104&_version=1&_urlVersion=0&_userid=1853498&md5=a1c9a262a6a6c421170f1c26c64306d3).
- Wallén-Mackenzie, Asa, Gezelius, Henrik, Thoby-Brisson, Muriel, Nygård, Anna, Enjin, Anders, Fujiyama, Fumino, Fortin, Gilles und Kullander, Klas: Vesicular glutamate transporter 2 is required for central respiratory rhythm generation but not for locomotor central pattern generation. In: *J Neurosci*, Band 26(47):S. 12294–12307, 2006. doi:10.1523/JNEUROSCI.3855-06.2006. URL <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3855-06.2006>.
- Wiedenmann, B. und Franke, W. W.: Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. In: *Cell*, Band 41(3):S. 1017–1028, 1985.

## Literaturverzeichnis

- Wojcik, S. M., Rhee, J. S., Herzog, E., Sigler, A., Jahn, R., Takamori, S., Brose, N. und Rosenmund, C.: An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (vglut1) in postnatal development and control of quantal size. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 101(18):S. 7158–7163, 2004. doi:10.1073/pnas.0401764101. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0401764101>.
- Wojcik, Sonja M, Katsurabayashi, Shutaro, Guillemin, Isabelle, Friauf, Eckhard, Rosenmund, Christian, Brose, Nils und Rhee, Jeong-Seop: A shared vesicular carrier allows synaptic corelease of gaba and glycine. In: *Neuron*, Band 50(4):S. 575–587, 2006. doi:10.1016/j.neuron.2006.04.016. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2006.04.016>.

# Veröffentlichungen

## Artikel

1. **Zander JF**, Münster-Wandowski A, Brunk I, Pahner I, Gómez-Lira G, Heinemann U, Gutiérrez R, Laube G und Ahnert-Hilger G (2010): „Synaptic and vesicular co-existence of VGLUT and VGAT in selected excitatory and inhibitory synapses.“, J Neurosci, Band 30(22): S. 7634 –7645.

## Posterbeiträge

1. **Zander JF**, Münster-Wandowski A, Brunk I, Pahner I, Laube G, Ahnert-Hilger G (2009): „Vesicular and synaptic co-existence of the vesicular GABA and vesicular glutamate transporters“; Society for Neuroscience, Chicago, Posternr.: 133.2.
2. **Zander JF**, Münster-Wandowski A, Brunk I, Pahner I, Ahnert-Hilger G (2009): „Co-existence of VGLUT1/2 and VGAT in vesicular subpopulations and synaptic terminals“, GRK 1123 Berichtskolloquium, Berlin.
3. **Zander JF**, Mitschke I, Ahnert-Hilger G (2007): „Differential protein make-up in synaptic vesicle subpopulations: A biochemical study using immunoisolation“, 7. Treffen der deutschen Neurowissenschaftlichen Gesellschaft, Göttingen, Posternr.: T6-3A.

## Vorträge

1. **Zander JF**, Münster-Wandowski A, Brunk I, Mitschke I, Ahnert-Hilger G (2009): „Co-existence of VGLUT1, VGLUT2 and VGAT in vesicular subpopulations and synaptic terminals“, GRK 1123 Fall Symposium – Part II, Berlin.
2. **Zander JF**, Münster-Wandowski A, Brunk I, Mitschke I, Ahnert-Hilger G (2008): „The vesicular and synaptic co-existence of glutamatergic and GABAergic neurotransmitter transporters“, 5<sup>th</sup> International PhD Symposium – Berlin Brain Days, Berlin.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Ahnert-Hilger für das Überlassen des Themas und die Übernahme meiner Betreuung. Sie war stets diskussionsbereit und hatte für die kleinen und größeren Sorgen rund um das Entstehen der Arbeit immer ein offenes Ohr.

PD Dr. Matthias Hennig danke ich für die Übernahme der Betreuung seitens der Biologie an der Humboldt Universität.

Ich danke ferner Dr. Ingrid Mitschke für das Überlassen des Themas, das Korrekturlesen meiner Arbeit und die produktiven Anmerkungen.

PD Dr. Gregor Laube danke ich für viele nützliche Hinweise und tiefere Einblicke in das elektronenmikroskopische Arbeiten und andere Methoden.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Agnieszka Münster-Wandowski, die sich mit unermüdlicher Hingabe der Elektronenmikroskopie widmete und mir damit einen großen Dienst erwies.

Irene danke ich für die Hilfestellungen insbesondere bei der Einarbeitung in die Uptakeversuche, viele viele beantwortete Fragen und für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Markus danke ich ebenfalls für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die hilfreichen Anmerkungen dazu.

Ich möchte Anne, Birgit, Marion und Suzan — den TAs aus unserem Labor — danken, die die Labore im Hintergrund am Laufen halten und immer für volle Schränke sorgten. Allen voran danke ich Elisabeth, die mich in der Anfangsphase an die Hand nahm und mich in die hohe Kunst des Westernblottings einweihte.

Meinen netten Leidensgenossen Jens, Karin, Mahesh und Philipp danke ich für eine wunderbar angenehme Laboratmosphäre und viele unterhaltsame Stunden über den Laboralltag hinaus.

Den Kollegen aus meinem Büro danke ich für die Stille und Ruhe, die mir das Denken erleichtert hat.

Meiner Familie danke ich, die sich stets um mich sorgten und mein Werden mit Interesse verfolgten.

Wenn es wieder einmal später wurde, musste sie auf mich warten. Danke — Jana — für dein Verständnis, deine Geduld und das Korrekturlesen.

# Selbständigkeitserklärung

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

Berlin, den 16.3.2010

Johannes-Friedrich Zander