

"Klonierung und funktionelle Charakterisierung des  
Extraneuronalen Monoamin-Transporters (EMT) des  
Hausschweins"

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-  
Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen Grades  
einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Liliane Henkes

aus Malmédy, Belgien

Berichter:

PD Dr. Dirk Gründemann

Universitätsprofessor Dr. Hermann Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Juli 2005

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliotheken online verfügbar.

## **Danksagung**

### *Für Mucki*

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Edgar Schömig für die freundliche Aufnahme ins Institut für Pharmakologie der Universität zu Köln und an PD Dr. Dirk Gründemann für die fachliche Betreuung meiner Arbeit.

In der von ihm geleiteten Arbeitsgruppe wurde mir eine große Hilfsbereitschaft entgegen gebracht, die die tägliche Arbeit erleichtert hat. Dafür möchte ich allen danken. Da ohne Humor und Witz aber nun mal alles noch besser geht, möchte ich besonders Stefanie Harlfinger, Dr. Andreas Lazar, Regina Baucks und Beatrix Steinrücken danken. Liebe Steffi, schön, dass du da warst und dir meine Musik gefallen hat und sie dir nie zu melancholisch war.

Prof. Dr. Hermann Wagner und PD Dr. Jörg Mey erklärten sich ohne Zögern dazu bereit, meine Arbeit extern zu betreuen. Für dieses Engagement und das mir entgegen gebrachte Vertrauen ein ganz herzliches Dankeschön! Es war ein schönes Gefühl, auch nach längerer Abwesenheit so freundlich aufgenommen zu werden.

Ein besonderer Dank geht an Knut Erdmann-Degenhardt, der mich immer unterstützt, nie an das Gelingen gezweifelt hat und immer für mich da war.

Kurt und Antje, auch euch vielen Dank für die Unterstützung in all den Jahren.

Danken möchte ich auch meiner Familie für ihren ständigen Zuspruch und Rückhalt.

Danke Ullchen, Dely und Fina!

Widmen möchte ich diese Arbeit meiner Mutter, Marie-Thérèse Mölter-Förster.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	8
1.1	Der Monoamin-Transport .....	8
1.2	<i>Uptake1</i> : neuronale Monoamin-Transporter .....	10
1.3	<i>Uptake2</i> : nicht-neuronale Monoamin-Transporter .....	10
1.4	Die nicht-neuronalen Monoamin-Transporter sind Mitglieder der ASF-Familie .....	11
1.5	Die Bedeutung des nicht-neuronalen Monoamintransports .....	14
1.6	Die Bedeutung des Extraneuronalen Monoamin-Transporters EMT .....	15
1.7	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit .....	17
2	Material und Methoden .....	18
2.1	Chemikalien und Enzyme .....	18
2.2	Puffer und Stammlösungen .....	18
2.3	Medien .....	20
2.4	Kits .....	21
2.5	Oligonukleotide .....	22
2.6	<i>E. coli</i> - Bakterienstamm .....	23
2.7	Plasmide .....	23
2.8	Eukaryonten-Zelllinie .....	24
2.9	Mikrobiologische Methoden .....	24
2.9.1	Kultur und Lagerung von <i>E.coli</i> .....	24
2.9.2	Herstellung elektrokompenter Bakterien .....	25
2.9.3	Transformation der Bakterien .....	26
2.10	Molekularbiologische Methoden .....	26
2.10.1	Phenol-Chloroform-Extraktion .....	26
2.10.2	Fällung von Nukleinsäuren .....	27
2.10.3	Die Behandlung von DNA mit Restriktionsenzymen .....	27
2.10.4	Glätten, Phosphorylieren und Dephosphorylieren von DNA-Enden .....	28
2.10.5	Ligation .....	29
2.10.6	Plasmid-Präparation .....	30
2.10.7	RNA-Präparation aus Geweben .....	30
2.10.8	DNA- Präparation aus Gewebe .....	32
2.10.9	Gelelektrophorese nativer DNA .....	32
2.10.10	DNA-Isolation durch UV-geschützte präparative Agarose-Gelelektrophorese .....	32
2.10.11	Gelelektrophorese denaturierter RNA .....	33
2.10.12	Poly-A <sup>+</sup> -Selektion aus Gesamt-RNA an Oligo-dT-Cellulose .....	34
2.10.13	Reverse Transkription .....	35
2.10.14	Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR, <i>polymerase chain reaction</i> ) .....	37
2.10.15	Kolonie-PCR .....	39
2.10.16	Sequenzier-PCR .....	39

2.10.17	Inverse PCR.....	40
2.10.18	Klonierung von PCR-Fragmenten .....	41
2.11	Zellkultur.....	42
2.11.1	Kultivierung von HEK-293-Zellen.....	42
2.11.2	Stabile Transfektion von HEK-293-Zellen.....	43
2.11.3	Aussaat der Zellen für Aufnahmeversuche.....	43
2.11.4	Messung der Substrataufnahme stabil transfizierter HEK-293-Zellen durch Flüssigszintillationszähler .....	44
2.11.5	Messung der Substrataufnahme stabil transfizierter HEK-293-Zellen durch LC-MS und LC-MS/MS 45	
2.11.6	Detektion von Aufnahmeunterschieden mittels <i>Difference shading</i> .....	46
2.12	Bestimmung der Proteinkonzentration in den Zelllysaten .....	47
2.13	Datenauswertung.....	48
3	Ergebnisse .....	49
3.1	Klonierung des offenen Leserahmens (ORF).....	49
3.1.1	Klonierungsstrategie.....	49
3.1.2	Auswahl des Materials .....	50
3.1.3	Klonierung eines ersten kurzen Fragmentes des EMTp .....	51
3.1.4	Kompletterung des offenen Leserahmens (ORF).....	55
	<i>Klonierung</i> .....	57
	<i>Klonierung</i> .....	59
	<i>Strategie und Wahl der Primer</i> .....	59
	<i>Sequenzierung</i> .....	66
3.1.5	Klonierung des gesamten ORF zwecks Expression in Zellkultur .....	67
	<i>Strategie</i> .....	67
	<i>PCR</i> .....	68
	<i>Sequenzierung</i> .....	70
3.1.6	Vergleich des orthologen Transporters aus Mensch, Ratte, Maus und Schwein.....	72
	Vergleich der Aminosäuresequenz .....	73
3.2	Funktionelle Charakterisierung des EMTp durch heterologe Expression.....	74
3.2.1	Stabile Transfektion .....	75
3.2.2	Aufnahmecharakteristika für 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (MPP+) und Hemmbarkeit durch Disprocynium 24 (D24).....	75
3.2.3	Physiologische Substrate für EMTp: Monoamine.....	80
3.2.4	Die Aufnahme von Acetylcholin durch EMTh und EMTp.....	85
3.2.5	Substratscreening für EMTp .....	86
3.3	Inverse PCR zur Amplifikation des Kernpromotors .....	88
3.3.1	EMTp .....	88
3.3.2	OCT2p.....	89
3.4	Ergebnisse- Anhang .....	92

3.4.1	cDNA-Alignment EMTp, -h, -m, -r .....	92
3.4.2	Lage der Primer zur Amplifikation des 5'- und 3'-ORFs.....	94
4	Diskussion .....	96
4.1	Strukturvergleich.....	96
4.2	Die Hemmung von EMTp durch D24.....	99
4.3	Die Aufnahme von Acetylcholin und die Plazenta als Modell-Organ .....	100
4.4	Aufnahme bekannter EMT-Substrate: Agmatin, Histamin und Noradrenalin, ein Vergleich.....	102
4.5	Neue Substrate für EMTp .....	104
4.6	Ausblick .....	105
5	Zusammenfassung .....	107
6	Summary .....	108
7	Literaturverzeichnis .....	109

## Abkürzungen

bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	DNA-Kopie der mRNA (complementary DNA)
cpm	Gezählte Ereignisse pro Minute
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G418	Geneticin
kb	Kilobasen
OD <sub>λ</sub>	Lichtabsorption bei einer optischen Weglänge von 1cm und der Wellenlänge λ
ORF	offener Leserahmen
RNA	Ribonukleinsäure
sc	überspiralisiert
SDS	Natriumdodecylsulfat
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
tRNA	Transfer-RNA
U	Einheit der Enzymaktivität
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung (= 9,81 m s <sup>-2</sup> )

## Einbuchstabencode der Aminosäuren

Alanin	A
Arginin	R
Asparagin	N
Aspartat	D
Cystein	C
Glutamat	E
Glutamin	Q
Glycin	G
Histidin	H
Isoleucin	I
Leucin	L
Lysin	K
Methionin	M
Phenylalanin	F
Prolin	P
Serin	S
Threonin	T
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Monoamin-Transport

Transmitter gewährleisten die Kommunikation zwischen Neuronen und Effektororgan. Stärke, Ausbreitung und Dauer des Signals werden neben anderen Faktoren durch die Inaktivierung des chemischen Botenstoffs bestimmt. Die Inaktivierung kann je nach Botenstoff extra- oder intrazellulär erfolgen.

Die Catecholamine Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin sowie andere Monoamine wie Serotonin und Histamin sind allesamt chemische Botenstoffe, die erst in die Zelle aufgenommen und dann metabolisiert werden. Als organische Kationen ist es ihnen nur schwer möglich durch die Zellmembran zu diffundieren, daher setzt in diesem Fall die gezielte Inaktivierung einen effizienten Transportmechanismus voraus. Als vorgeschalteter Mechanismus kommt den Monoamin-Transportern so eine wichtige modulatorische Rolle zu, eine veränderte Transporteffizienz hat einen direkten Einfluss auf die genannten Signalparameter. Je nach Wirkort der Monoamine wird ein veränderter Transportmechanismus mit verschiedenen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht. In der zentralen aminergen Neurotransmission werden Krankheiten wie Depression, Morbus Parkinson und Schizophrenie in diesem Zusammenhang diskutiert. Im peripheren Nervensystem sind Monoamine klassische Transmitter des Sympathischen Nervensystems, so dass hier eine Vielzahl von Kreislauf- und Organstörungen in Frage kommen.

Heute weiß man, dass zwei unterschiedliche Transportmechanismen die Wiederaufnahme der Monoamine gewährleisten.

1961 konnte ein aktiver Transport von Noradrenalin an sympathischen Nervenendigungen gezeigt werden (Hertting and Axelrod, 1961; Whitby et al., 1961). Ein separater Transporter für Dopamin wurde später durch den Befund einer klaren räumlichen Trennung von Dopamin- und Noradrenalin-Transport im Gehirn gefunden (Coyle and Snyder, 1969; Kuhar, 1973; Snyder and Coyle, 1969). Die Untersuchungen an sympathischen Nervenendigungen zeigten nicht nur eine Blockierung der Noradrenalinaufnahme und Retention durch

Sympathektomie, auch gewisse psychotrope Verbindungen, darunter trizyklische Antidepressiva und Kokain, erzielten die gleiche Wirkung (Axelrod et al., 1961).

1965 gelang es Iversen durch Versuche an perfundierten Rattenherzen und isoliertem Gewebe einen weiteren Wiederaufnahmemechanismus zu charakterisieren. Um diesen namentlich vom früher beschriebenen zu unterscheiden, erhielt er die Bezeichnung „*uptake2*“ im Gegensatz zu „*uptake1*“ (Iversen, 1965a).

*Uptake1* und *uptake2* unterscheiden sich in ihrer Substrataffinität und -selektivität, ihren Hemmstoffen, ihrem Transportmechanismus und ihrer Lokalisation. In Anlehnung an den letztgenannten Unterscheidungspunkt wird *uptake1* wegen der überwiegenden neuronalen Lokalisation als neuronaler, *uptake2* hingegen als nicht-neuronaler Wiederaufnahmemechanismus bezeichnet.

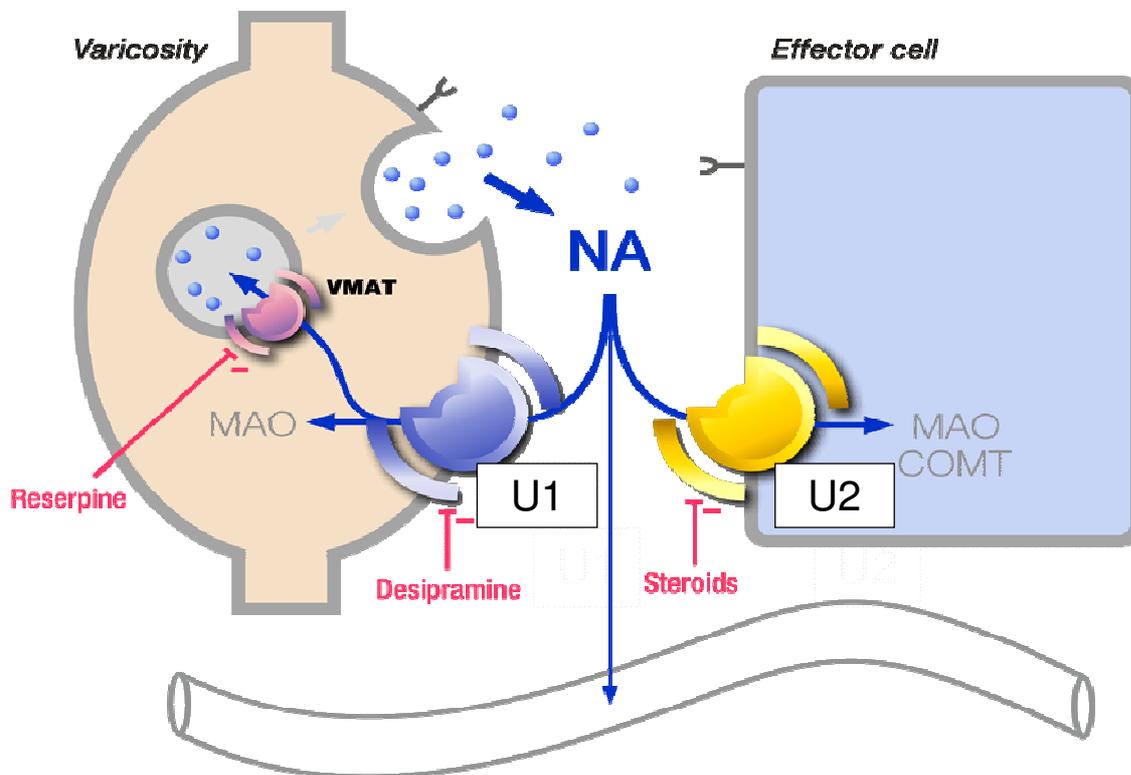


Abb. 1.1.1.: Gegenüberstellung des neuronalen (*uptake1*) und nicht-neuronalen (*uptake2*) Wiederaufnahmemechanismus nach Freisetzung von Noradrenalin in den synaptischen Spalt. (COMT: Catechyl-O-Methyl-Transferase; MAO: Monoaminoxidase; NA: Noradrenalin; VMAT: Vesikulärer Monoamin Transporter). Noradrenalin wird nach Aufnahme durch den neuronalen Transporter entweder durch MAO enzymatisch abgebaut oder durch VMAT in Vesikel zur Wiederverwendung gespeichert. Nach Aufnahme durch den nicht-neuronalen Transporter wird Noradrenalin durch die Enzyme MAO und COMT abgebaut. Die geeigneten Transportproteine sind durch unterschiedliche Substanzen hemmbar.

## 1.2 *Uptake1*: neuronale Monoamin-Transporter

Dank intensivster Forschung existieren heute profunde Kenntnisse über den neuronalen Transportmechanismus. Die neuronalen Monoamin-Transporter NET (Norepinehrin-Transporter) und DAT (Dopamin-Transporter) wurden Anfang der 90er Jahre aus der Ratte (Giros et al., 1991; Kilty et al., 1991; Shimada et al., 1991), dem Rind (Lingen et al., 1994; Usdin et al., 1991) und dem Menschen (Giros et al., 1992; Pacholczyk et al., 1991) kloniert. Ein neuronaler Epinephrintransporter (EPI) konnte bisher lediglich beim Frosch nachgewiesen werden (Apparsundaram et al., 1997), er zeigt eine hohe Homologie zu NET und DAT. Ob ein ähnlicher Transporter auch bei Säugern existiert, ist allerdings noch ungeklärt. Die molekulare Identifizierung von DAT und NET erlaubte die auf Sequenzähnlichkeit beruhende Einordnung in die SLC (engl. *solute carrier*) 6-Transporterfamilie. Die SLC6-Familie umfasst Natrium- und Chlorid-abhängige monospezifische Transporter für andere Transmitter und Aminosäuren wie Serotonin, GABA, Glycin, Prolin und Taurin (Borowsky and Hoffman, 1995; Masson et al., 1999). Für beide neuronalen Monoamintransporter ist Dopamin das beste Substrat, die Affinität zu Noradrenalin ist höher als für Adrenalin. Insgesamt ist die Affinität zu den Catecholaminen hoch, die maximale Aufnahmegeschwindigkeit niedrig.

## 1.3 *Uptake2*: nicht-neuronale Monoamin-Transporter

Nach der ersten Charakterisierung wurde *uptake2* als ein Wiederaufnahmesystem beschrieben, das eine vergleichsweise geringe Affinität für Catecholamine besitzt, Adrenalin Noradrenalin vorzieht und höhere Maximalaufnahmeraten aufweist. Der Transport ist alleine vom Membranpotential abhängig und weist ein völlig anderes pharmakologisches Inhibitionsprofil auf. So ist *uptake2* nicht sensitiv für eine Inhibierung durch trizyklische Antidepressiva und Kokain, lässt sich aber effizient durch O-methylierte Metabolite der Catecholamine sowie Steroide wie beispielsweise Corticosteroide hemmen (Bonisch, 1980). Die molekulare Identifizierung der nicht-neuronalen Monoamintransporter hinkte der neuronalen einige Jahre hinterher. Zu den Gründen hierfür zählt neben der als eher untergeordnet angesehenen Rolle dieser Transporter für die Catecholamin-Wiederaufnahme ein fehlendes Zellsystem, das diese Transporter spezifisch exprimiert. Erschwerend hinzu kam die sehr niedrige Affinität für Catecholamine, ihre prompte Metabolisierung nach deren

Aufnahme sowie der noch nicht zur Verfügung stehende pharmakologische Hemmstoff. Erst die Identifikation der menschlichen Nieren-Karzinomzelllinie (Caki-1) als *uptake-2*-exprimierendes System (Schömig and Schonfeld, 1990), des Neurotoxins MPP+ (1-Methyl-4-Phenylpyridinium) als besseres Substrat als die Catecholamine (Russ et al., 1992) und die Identifizierung von Isocyaninen und Pseudoisocyaninen als neue Klasse von potenten Inhibitoren des nicht- neuronalen Monoamin-Transports (Russ et al., 1993) ermöglichte letztendlich die Klonierung und funktionelle Untersuchung.

Der klassische corticosteroid-sensitive *uptake-2*-Transporter, der 1998 parallel aus der Caki-1-Zelllinie und der Rattenplazenta (Gründemann et al., 1998b; Wu et al., 1998) kloniert werden konnte, wird in Anlehnung an diese Funktion als extraneuronaler Monoamin-Transporter, EMT, bezeichnet. Nach einem Vergleich der Nukleinsäuresequenz stellte sich die sehr nahe verwandtschaftliche Beziehung zu den früher klonierten Organischen Kationen Transporter OCT1 und OCT2 heraus. Da auch diese neben anderen organischen Kationen Catecholamine transportieren und ebenfalls durch Corticosteroide hemmbar sind, werden OCT1, OCT2 und EMT in diesem Zusammenhang auch als „nicht-neuronale Monoamin-Transporter“ bezeichnet. Pharmakologisch stehen sich EMT und OCT2 näher (Martel et al., 1999), (Gründemann et al., 1998b), (Wu et al., 1998). EMT unterscheidet sich von beiden durch eine höhere Sensitivität für die Inhibierung durch O-Methyl-Isoprenalin, ein etablierter Uptake-2-Hemmstoff. Unter den Catecholaminen herrscht bei OCT2 eine klare Prävalenz zu Dopamin (Gründemann et al., 1998a), OCT1 transportiert Dopamin und Norepinephrin gleich gut (Braidert et al., 1998), im Gegensatz dazu ist Dopamin ein schlechtes Substrat für EMT. Unter den Catecholaminen weist EMT die höchste Affinität für Adrenalin auf (Gründemann et al., 1998b), (Martel et al., 1999).

#### **1.4 Die nicht-neuronalen Monoamin-Transporter sind Mitglieder der ASF-Familie**

Zur Elimination von Xenobiotika, Stoffwechselprodukten und anderen endogenen Substanzen ist der Organismus mit einer ganzen Reihe von Transportproteinen unterschiedlichster Spezifität ausgerüstet. Die SLC-(*solute carrier*-) Superfamilie stellt mit etwa 225 Mitgliedern beim Menschen die größte Transporter-Superfamilie dar. Während die Mehrzahl der Transporter hochspezifisch nur ganz bestimmte Substanzen transportiert (Glukose,



Chromosom 6 (Mensch) befinden (Eraly et al., 2003). Weiterhin teilen sie sich eine gemeinsame Genstruktur: 11 Exons und 10 Introns (Gründemann and Schomig, 2000), (Hayer et al., 1999), (Verhaagh et al., 1999). Die Aufklärung der Molekularstruktur erlaubte eine Vorhersage des entsprechenden Proteins. Laut dieser Vorhersage handelt es sich bei den nicht-neuronalen Monoamin-Transportern um ein integrales Protein, das 12 Transmembrandomänen aufweist. Charakteristisch sind die große extrazelluläre Schleife zwischen der ersten und der zweiten sowie die kleinere intrazelluläre zwischen der sechsten und der siebten Transmembrandomäne. Sowohl N- als auch C-Terminus befinden sich intrazellulär.

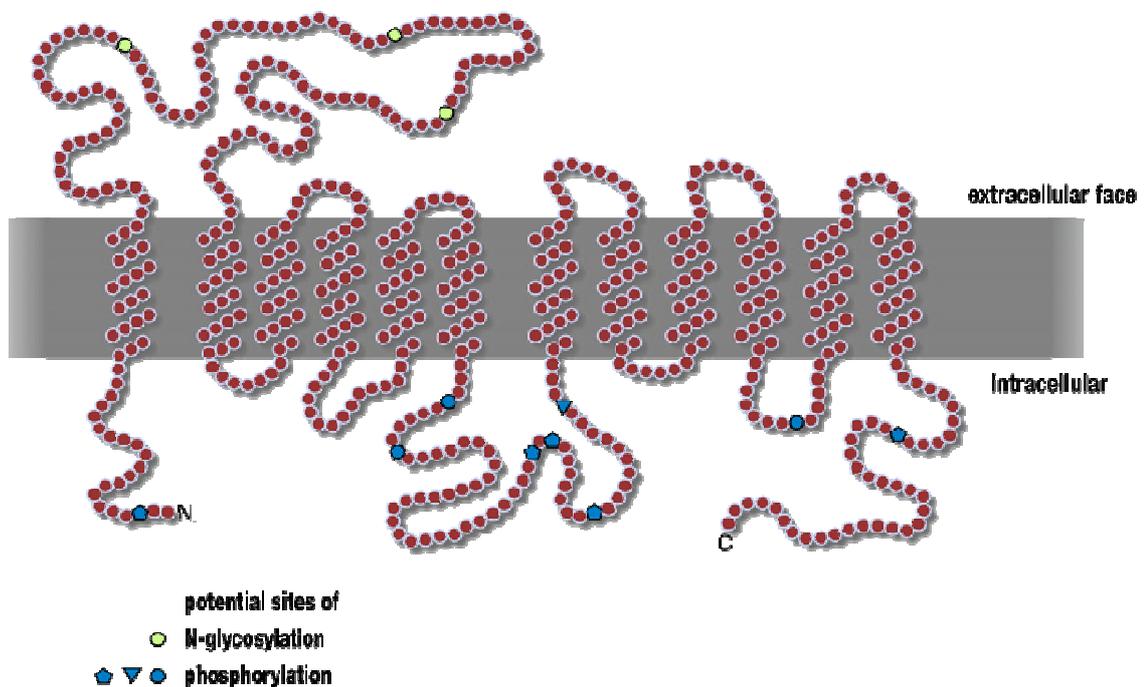


Abb. 1.4.2.: Membran-Topologie des Extraneuronalen Monoamin-Transporters. Die Vorhersage beruht auf Hydropathie-Analysen (Claros and von Heijne, 1994; Kyte and Doolittle, 1982). Demnach bildet EMT 12 Transmembran-Domänen, eine große extrazelluläre sowie eine kleinere intrazelluläre Schleife. Jede Kugel symbolisiert eine Aminosäure.

Weiterhin erlaubte die Klonierung eine extensive funktionelle Charakterisierung durch Expression in Oozyten und Säugerzellen. Bei dem Transport durch OCT1, -2 und EMT handelt es sich um eine erleichterte Diffusion von unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen, kleineren Verbindungen. Antreibende Kraft ist der Konzentrationsgradient des jeweilig zu transportierenden Substrates. Neben dem Substrat werden keine weiteren Ionen

transportiert, man spricht dabei von „Uniport“. Ein weiteres wichtiges Charakteristikum ist die Abhängigkeit des Transports vom Membranpotential. Zu den Substraten gehören Xenobiotika, Tyramin, Nukleoside und biogene Amine (Übersicht (Jonker and Schinkel, 2004)). Von allen drei Transportern nahezu gleich gut transportiert wird das Modellkation 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (MPP+), ein Neurotoxin, welches natürlicherweise nicht endogen vorkommt.

## 1.5 Die Bedeutung des nicht-neuronalen Monoamintransports

Noradrenalin, das über sympathische Nervenendigungen am menschlichen Herzen freigesetzt wird, wird zu 92% über die neuronalen Monoamintransporter wieder aufgenommen und kann so inaktiviert bzw. in Vesikel transportiert und somit recycelt werden. Lediglich 4% werden extraneuronal von den Herzmuskelzellen aufgenommen und dort metabolisiert. Restliche 4% entkommen beiden Aufnahmemechanismen und gelangen in den Blutstrom (Eisenhofer et al., 1996b). Diese klare Abhängigkeit der Catecholamin-Inaktivierung vom neuronalen Aufnahmemechanismus ist am Herzen besonders ausgeprägt, es gibt allerdings andere Organe, bei denen der nicht-neuronalen Aufnahme mehr Bedeutung zukommt. Solche Organe sind beispielsweise Niere oder Skelettmuskulatur (Kopin et al., 1998). Insgesamt betrachtet wird das vom sympathischen Nervensystem freigesetzte Noradrenalin zum überwiegenden Teil (87%) neuronal aufgenommen. 5% werden nicht-neuronal aufgenommen, 8% diffundieren in den Blutkreislauf (Eisenhofer, 1994). Betrachtet man die Noradrenalin-Aufnahme unmittelbar nach Freisetzung an der sympathischen Synapse, so ist die neuronale Wiederaufnahme nicht zuletzt wegen ihrer Nähe zum Ausschüttungsort der bestimmende Mechanismus für die Begrenzung des Signals.

Appliziert man einem Versuchstier Catecholamine und untersucht dann die daraus entstandenen Metabolite ist die relative Menge O-methylierter Metabolite größer als die deaminierter (Kopin and Gordon, 1963), (Maas and Landis, 1971), (Trendelenburg, 1986). Wie in Abb. 1.1.1. dargestellt, ist die dem Transport nachgeschaltete Metabolisierung in den beiden Transportmechanismen unterschiedlich. Die Metabolisierung nach nicht neuronaler Aufnahme erfolgt über COMT (Catechyl-O-Methyl-Transferase), die hohe Menge der O-methylierten Catecholamine bedeutet somit eine verstärkte Beteiligung dieses Transportsystems

an der Clearance zirkulierender Catecholamine. Weitere Untersuchungen mit dem klassischen *uptake2* Hemmstoff Disprocyinium<sup>24</sup> unterstützte diese Befunde. So beträgt die Beteiligung des nicht-neuronalen Transports an der Aufnahme exogen verabreichten Noradrenalins bei Ratten nahezu 70% (Eisenhofer et al., 1996c). Lediglich 20% des zirkulierenden Noradrenalins werden beim Menschen neuronal aufgenommen (Eisenhofer et al., 1991).

Neuronale und nicht-neuronale Aufnahme können vereinfacht als ein in Serie geschaltetes System verstanden werden. Noradrenalin wird unmittelbar nach dessen Freisetzung schnell mit hoher Affinität vorwiegend neuronal wieder aufgenommen. Noradrenalin, das aus dem synaptischen Spalt entweicht, tritt in die Blutbahn ein, wo es effizient vom nicht-neuronalen System inaktiviert wird. Diese vereinfachte Darstellung soll jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, dass beide Systeme auch in Konkurrenz parallel arbeiten, hier jedoch ist das neuronale meist überlegen (Übersicht (Stjärne, 1994)).

Adrenalin ist im Gegensatz zu Noradrenalin nach Freisetzung aus dem Nebennierenmark in großen Mengen im Blutstrom vorhanden und wird vorwiegend vom nicht neuronalen System inaktiviert. Dies ist neben der größeren Entfernung zum neuronalen Wiederaufnahmesystem (sympathische Synapsen) durch die höhere Affinität dieses Systems für Adrenalin bedingt (Iversen, 1965b), (Eisenhofer et al., 1990). Hinzu kommt, dass Adrenalin ein besseres Substrat für die nachgeschaltete Metabolisierung durch COMT ist (Paiva and Guimaraes, 1978), (Eisenhofer and Finberg, 1994) .

Eine Präsenz nicht-neuronaler Monoamintransporter konnte auch im Zentralen Nervensystem nachgewiesen werden (Busch et al., 1998), (Russ et al., 1996), (Staudt K., 1993), (Wu et al., 1998), eine mögliche Rolle in der Inaktivierung von Dopamin und Noradrenalin ist auch hier denkbar.

## **1.6 Die Bedeutung des Extraneuronalen Monoamin-Transporters EMT**

Die physiologische Bedeutung als nicht-neuronale Monoamin-Transporter von OCT1, -2 und EMT wird angesichts des überlappenden Substratspektrums durch ihre Lokalisation bestimmt. Während die Expression von OCT1 und OCT2 fast ausschließlich auf Exkretionsorgane wie Leber, Niere und Darm beschränkt ist (Gorboulev et al., 1997; Gründemann et al., 1994;

Okuda et al., 1996) und dort mit für die Entfernung der Catecholamine aus dem Blutstrom verantwortlich sind, lässt sich EMT an sehr vielen unterschiedlichen nicht-neuronalen Zelltypen nachweisen. Via RT-PCR wurde EMTh (h: human) in Gehirn, Herz und Leber nachgewiesen (Gründemann et al., 1998b), in späteren Untersuchungen auch Aorta, Skelettmuskulatur, Prostata, Drüsen, Plazenta und fötaler Lunge, kaum in Niere und Lunge (Kekuda et al., 1998). In-situ-Hybridisierungen an Rattenschnitten ergaben klare Signale in der Plazenta, Lunge und Herz, weniger starke in Magen, Niere und Skelettmuskulatur sowie ein sehr starkes Signal in einem Hirnareal, der Aria Postrema (Haag et al., 2004). Neuste Messungen via Real-Time-PCR zeigten beim Menschen besonders starke Signale in Speicheldrüsen und Prostata (unveröffentlichte Daten).

Obwohl EMT heute nicht mehr als der alleinige „*uptake2*-Transporter“ angesehen wird, spricht gerade diese sehr breite Gewebeverteilung für seine Rolle als „zweite Verteidigungslinie“ für Catecholamine, die der neuronalen Wiederaufnahme an der Synapse entkommen sind. Unter den nicht-neuronalen Monoamin-Transportern wird lediglich EMT im Herzen, dem Organ, an dem zuerst *uptake2* beschrieben worden war, hoch exprimiert. So zeigen EMT-knockout-Mäuse nach intravenöser Gabe von MPP+ eine um 73% verringerte MPP+-Akkumulation im Herzen (Zwart et al., 2001).

EMT zeigt bei allen bisher untersuchten Spezies eine ausgesprochen hohe Expression in der Plazenta. Hier konnte bei schwangeren knockout-Mäusen verglichen mit dem Wildtyp eine dreifach reduzierte MPP+-Akkumulation gezeigt werden. In der Plazenta kolokalisiert EMT mit MonoaminoxidaseA (MAO-A), zusammen könnten sie verantwortlich für die Elimination der im Embryo produzierten Catecholamine sein (Zwart et al., 2001).

Die Plazenta ist ein Beispiel für eine nicht-neuronale Freisetzung von Acetylcholin, auch in diesem Zusammenhang scheint EMT neben OCT1 eine entscheidende Rolle zu spielen (Wessler et al., 2001b).

Neben Catecholaminen und Monoaminen gehören auch andere organische Kationen zum Substratspektrum des EMT. Bedingt durch seine Lokalisation an einem typischen Exkretionsorgan wie der Niere ist seine Beteiligung an der Exkretion von Metaboliten und Xenobiotica wahrscheinlich.

## 1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

EMT ist ein wichtiger Mitspieler für die extraneuronale Wiederaufnahme und damit Inaktivierung von Catecholaminen und Monoaminen. Er ist zusammen mit OCT1 und -2 beteiligt an der Exkretion anderer organischer Kationen. Die Kenntnis der Substrate und der Lokalisation sind ein wichtiger Schlüssel zur Funktion eines Transporters. Unverzichtbar ist jedoch auch das Wissen um die Regulation des Gens und des Proteins. Mit der vorliegenden Arbeit sollte die Grundlage für eine erste Promotorcharakterisierung geschaffen werden. Ein Promotorsequenzvergleich zwischen mehreren orthologen Transportern kann dazu herangezogen werden, übereinstimmende Bereiche zu identifizieren. Diese konservierten Bereiche sind ein wichtiges Indiz für regulationsrelevante Domänen des Promotors, die dann weiter untersucht werden können. Je mehr phylogenetisch nicht zu nah verwandte Spezies verglichen werden, desto aussagekräftiger wird dieser Vergleich. Die EMT-Sequenz dreier Spezies ist bekannt: die des Menschen, der Maus und der Ratte. Die beiden letzten Spezies stehen phylogenetisch sehr nahe, so dass konservierte Bereiche selbst im Promotor keine Seltenheit sind. Um einen ausgedehnteren Vergleich zu ermöglichen, sollte der offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF) einer weiteren Spezies kloniert werden, um davon ausgehend den Promotor zu amplifizieren.

Als neue Spezies sollte der EMT des Hausschweins kloniert und charakterisiert werden. Kriterium für die neue Spezies war eine ausreichend große phylogenetische Entfernung zu den bereits charakterisierten Spezies Mensch, Maus und Ratte sowie eine gute Verfügbarkeit der benötigten Organe dieser Spezies.

Weiterhin sollte der neu klonierte orthologe Transporter EMT<sub>p</sub> (p steht für *pig*) heterolog exprimiert werden. Dies erlaubt eine funktionelle Charakterisierung und einen Vergleich zu den orthologen Transportern auf Funktionsebene.

## 2 Material und Methoden

Alle Lösungen wurden sofern nicht anders vermerkt bei Raumtemperatur angesetzt und gelagert. Reinstwasser wurde einer Millipore-Anlage entnommen.

### 2.1 Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien, die in dieser Arbeit verwandt wurden, stammten sofern nicht anders vermerkt von den Firmen Fluka (Neu- Ulm), Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen) und Promega (Mannheim). Enzyme wurden bei den Firmen Life Technologies (Eggenstein), Promega (Mannheim), QIAGEN (Hilden), Invitrogen (Karlsruhe), New England Biolabs (Frankfurt), MBI Fermentas (St. Leon- Rot) erworben. Folgende Restriktionsenzyme wurden eingesetzt: *Bst*BI, *Bss*, *Bst*, *Dsa*I, *Eco*RV, *Hinc*II, *Hind*III, *Pst*I, *Sac*II, *Sal*I, *Sma*I, *Sph*, *Xho*I. Medien für die Eukaryonten- Zellkultur sowie die Zutaten für die Nährmedien der Bakterien- Zellkultur wurden von der Firma Life Technologies (Eggenstein) bezogen.

### 2.2 Puffer und Stammlösungen

Im Folgenden sind die Zusammensetzungen der Stammlösungen und Puffer alphabetisch aufgelistet.

#### **Auftragslösung DNA-Gele**

10% Glyzerolblau

0,01% Bromphenol

0,05% Orange G

in TAE

#### **Auftragslösung RNA-Gele**

50% Glyzerolblau

0,25% Orange G  
in DEPC- Wasser

**1XBP**

0,5mol/l NaCl  
in EP

**1XDLG**

50% DMSO  
1mol/l Glyoxal (deionisiert)  
50µg/ml Ethidiumbromid  
in Laufpuffer für RNA-Gele

**Denaturierungslösung für RNA-Extraktion (DL)**

4M Guanidinisothiocyanat  
25mM Natriumcitrat  
0,5% N- Laurylsarkosin  
0,1M β- Mercaptoethanol

**1XEP**

10mmol/l Triethanolamin  
1mmol/l EDTA  
mit HCl eingestellt auf pH 7,5

**KRH-Puffer**

5,6mmol/l (+)- Glucose  
125mmol/l NaCl  
4,8mmol/l KCl  
1,2mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1,2mmol/l CaCl<sub>2</sub>  
1,2mmol/l MgSO<sub>4</sub>  
25mmol/l HEPES- NaOH pH 7,4

### **Laufpuffer RNA-Gele**

10mmol/l BES

0,1mmol/l EDTA

mit NaOH eingestellt auf pH 6,7

### **Poly-Ornithin-Lösung**

0,1g/l Poly-L-Ornithin

150mmol/l Borsäure

67mmol/l NaOH pH 8,4

### **RT-Puffer**

0,75M KCl

0,5M Triethanolamin

mit HCl eingestellt auf pH 8,7

### **1xTAE**

40mmol/l TRIS

1mmol/l EDTA

mit Essigsäure eingestellt auf pH 8

### **1xTE**

10mmol/l TRIS

1mmol/l EDTA

mit HCl eingestellt auf pH 8,0

### **Triton 0,1%**

0,1% Triton X-100 in 5mM TRIS

mit HCl auf pH 7,4 eingestellt

## **2.3 Medien**

### **Einfriermedium**

15% DMSO

40% FCS

45% DMEM (ohne FCS)

### **LB**

10g/l Casein-Hydrolysat

5g/l Hefeextrakt

5g/l NaCl

### **LB-Agar**

LB- Medium + 1,5% (w/v) Agar

### **SOB-Mg**

20g/l Casein-Hydrolysat

5g/l Hefeextrakt

10mmol/l NaCl

2,5mmol/l KCl

### **SOC**

10mmol/l MgCl<sub>2</sub>

10mmol/l MgSO<sub>4</sub>

20mmol/l Glucose

in SOB-Medium

## **2.4 Kits**

Folgende Kits wurden eingesetzt: QIAGEN Plasmid-Präparation-Kit (Mini/ Midi/ Maxi), QIAGEN DNA-Extraktion-Kit, QIAGEN PCR-Purification-Kit von QIAGEN (Hilden), BCA-Protein Assay kit von Perbio Science Deutschland (Bonn), BigDye Terminator Ready Reaction Kit v2.0 (ABI).

## 2.5 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma OPERON bezogen. Wegen der besseren Lagerungsmöglichkeiten wurden sie immer lyophilisiert geliefert, das 5'-Ende der Primer war nicht phosphoryliert. Es sind nur jene aufgeführt, die zu einem positiven Ergebnis geführt haben (keine degenerierten Primer).

Name	Länge (Basen)	Orientierung	Sequenz
F1OCT2	24	Sense	GCTTGGTCGCAGCCGTGCTGAGCT
R1OCT2	23	Antisense	CACAATCCTTTCTCTCTACCGCA
F1EMTal	21	Sense	CTGGGTGGTCCCTGAGTCTCC
R1EMTal	21	Antisense	TCCCAGGCGCATGACAAGTCC
R2EMTal	26	Antisense	TCTGAATTTACCAAATAAACAATTC
R3EMTal	20	Antisense	AAGACAGAAACAGCCCCCGC
R4EMTal	21	Antisense	TAATACACAAGGGTCTTTGAA
R5EMTal	21	Antisense	GAAATATGTCATAATGTTGTC
R6EMTal	22	Antisense	AATGTTTAGGATTGAGTAGGTT
Fx1EMTp	23	Sense	GGCCGCACCATGCCCTCCTTCGA
F1EMTp	24	Sense	GAAATATCTCTCGCCAAACTACAC
F3EMTp	21	Sense	GCGTTCTTACCTGAAGGAATA
F2EMTpnb	24	Sense	GGCATTTCGACCCAATTTCCCTGT
R1EMTp	25	Antisense	CGTGTAGTTTGGCGAGAGATATTC
R3EMTp (RTspez)	24	Antisense	TACACCACAGCGCTCGTGAACCAA
R4EMTp (RPromEMTh)	25	Antisense	GCGAAGGTGACGCCCGTCAGGCACA
FEMTplinkHindIII	25	Sense	GAGAAGCTTGCCACCATGCCCTCC
REMTplinkXhoI	24	Antisense	CTCCTCGAGTCCGGTGGGGCCTCA
RAEMTh	18	Antisense	GGTTTCAGGCAAAAGCAT
FFEMTh	23	Sense	CACCTTAGGCTATGCAGCAGACA
Fx1aEMTh	19	Sense	GGGCGGCGGGCGCACCATC

M13uni	17	Sense	GTAAAACGACGGCCAGT
M13rev	19	Antisense	GGAAACAGCTATGACCATG
NeoR2	19	Antisense	GCTGGCCCTTAATTTGGTT
FGAPDH	20	Sense	AAAGGGTCATCATCTCTGCC
RGAPDH	20	Antisense	TGACAAAGTGGTCGTTGAGG

## 2.6 *E. coli*- Bakterienstamm

Der in hier eingesetzte Stamm war DH10B (Grant et al., 1990); (Lorow, 1990), er trägt den Genotyp F<sup>-</sup>, *mcrA*,  $\Delta$  (*mrr-hsdRMS-mcrBC*),  $\Phi$ 80*dlacZ* $\Delta$ M15,  $\Delta$ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*,  $\Delta$ (*ara*, *leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*, *endA1*, *nupG*,  $\lambda$ .

## 2.7 Plasmide

**pUC19** ist ein Plasmid mit hoher Replikationsrate (Yanisch-Perron, 1985); (Balbas et al., 1986), es ist 2686bp lang und besitzt ein  $\beta$ -Laktamase-Gen (*amp<sup>r</sup>*) mit dessen Hilfe eine Ampizillin-Selektion möglich ist. Die Mehrfach-Klonierungsstelle (*multiple cloning site*) umfasst 54 Basen mit Erkennungssequenzen der gängigen Restriktionsenzyme.

**pUSNeo** ist 3694bp lang und besitzt eine niedrige Replikationsrate, es weist ebenfalls ein Ampizillinresistenz-Gen und eine Mehrfach-Klonierungsstelle auf.

**pcDSA3** ist ein Plasmid, welches die Expression von Fremd-DNA in Eukaryonten-Zellen ermöglicht, die Expression steht unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Das Plasmid ist 5446bp lang, in Bakterienkultur ist eine Selektion über Ampizillin, in Eukaryonten-Kultur eine mit Aminoglykosiden wie G418 möglich. pcDSA3 ist eine pcDNA3-Variante mit einem p15A-Ori für niedrigere Kopienzahlen.

## 2.8 Eukaryonten-Zelllinie

Die Fremd-DNA wurde in der humanen Nieren-Karzinom-Zelllinie HEK-293 (engl. *human embryonic kidney*, American Tissue Type Collection 1988, ATCC CFL-1573) exprimiert, die Zelllinie wurde ursprünglich mit Adenovirus Typ 5 transformiert (Graham, 1977).

## 2.9 Mikrobiologische Methoden

Alle Lösungen und Medien wurden autoklaviert bzw. sterilfiltriert (0,22µm Porengröße), alle Plastikutensilien wurden autoklaviert, Pinzetten u.ä. wurden sterilisiert. Die Arbeiten wurden an einer Reinraumwerkbank mit vertikaler Luftströmung (Heraeus, Hanau) durchgeführt. Vor Beginn der Arbeit wurden Hände und alle Gerätschaften mit 70% Ethanol desinfiziert, alle Metall- und Glasgegenstände wurden abgeflammt.

Medien wurden nach Autoklavierung für maximal vier Wochen bei 4°C gelagert, SOC-Medium, das nach Elektroporation als Medium dient, wurde nach Autoklavierung à 1ml aliquotiert und bei -20°C für längere Zeit gelagert.

Die zur Herstellung von Plattenkulturen benötigten Agar-Platten wurden aus LB-Agar, der vorher autoklaviert und für maximal vier Wochen bei 4°C gelagert wurde, gegossen. Dazu wurde der Agar bei 50°C verflüssigt und nach leichter Abkühlung in 10cm-Platten gegossen. Nach Abkühlen unter der Werkbank wurden die Platten für maximal vier Wochen bei 4°C gelagert.

Die zur Selektion benötigten Agar-Platten waren mit Ampizillin versetzt, hierzu war die Herstellungsweise gleich mit dem Unterschied, dass nach Abkühlung des Agars Ampizillin in einer Endkonzentration von 100µg/ml zugesetzt wurde. Ampizillin wurde in einer Konzentration von 100mg/ml zu 500µl bei -20°C aufbewahrt.

### 2.9.1 Kultur und Lagerung von *E.coli*

Für eine Plattenkultur wurden 100µl einer Bakteriensuspension auf eine Agarplatte aufgetragen und anschließend mit einem Drigalsky-Spatel gleichmäßig verteilt. Die Platte

wurde für 12 Stunden bzw. über Nacht in einem Brutschrank mit konstanten CO<sub>2</sub>-/ O<sub>2</sub>-/ Feuchtigkeitsbedingungen inkubiert. Zur Lagerung der Platten wurden diese mit einem Parafilm verdichtet und bei 4°C für maximal vier- acht Wochen aufbewahrt.

Zur Züchtung einer Flüssigkultur wurde eine Kolonie mit einer Platinöse in ein Medienvolumen zwischen 20 und 250ml übertragen. Die Inkubation erfolgte in einem Schüttelbrutschrank (Modell G25, New Brunswick Scientific, Edison, USA) bei 37°C, 200-300UpM und kontrollierten Gaspartialdrücken.

Zur längerfristigen Lagerung von Bakterien wurden so genannte „Glyzerolstocks“ angelegt, hierzu wurde 1ml Medium mit einer Kolonie angeimpft und bei 200UpM im Schüttelbrutschrank solange inkubiert, bis eine deutliche Trübung sichtbar war. Anschließend wurde die Suspension mit Glyzerol bis 10% verdünnt, in Kryoröhrchen umgefüllt und bei -80°C aufbewahrt.

## **2.9.2 Herstellung elektrokompenter Bakterien**

Bakterien mit hoher Elektrokompentenz liefern die Grundlage für eine erfolgreiche Klonierung. Von tiefgefrorenen DH10B-Zellen wurde ein Verdünnungsausstrich angelegt, nach Übernachts-Inkubation im Brutschrank wurden zwei Einzelkolonien gepickt und je 5ml SOB-Mg-Medium angeimpft. Diese Vorkultur wurde ebenfalls über Nacht im Schüttel-Brutschrank bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden je 200ml SOB-Mg- Medium mit der Vorkultur angeimpft und für etwa 2- 3 Stunden bis zu einer OD von 1 bei 600nm im Schüttelbrutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in Zentrifugenbehälter umgefüllt, für 15min auf Eis gestellt und bei 4°C und 2600g für 10min zentrifugiert. Das Pellet wurde in eiskalter 10%iger Glyzerollösung aufgenommen und für weitere 10min bei gleicher Beschleunigung zentrifugiert und der Vorgang wiederholt. Nach gründlichem Abdekantieren des letzten Glyzerolüberstandes wurden die Zellen im noch verbleibenden Glyzerol resuspendiert und à 27µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Die Elektrokompentenz wurde bestimmt, indem die Bakterien mit 25pg pUC19 elektroporiert und die Zahl der auf Ampizillin-Platten gewachsenen Kolonien bestimmt wurde. Die Elektrokompentenz betrug zwischen 10<sup>9</sup> und 10<sup>10</sup> Kolonien/µg Leervektor.

### **2.9.3 Transformation der Bakterien**

Fremd-DNA gelangte durch Elektroporation in die Bakterien. Bei diesem Verfahren wird das DNA-Bakterien-Gemisch für eine sehr kurze Zeit unter hohe Stromspannung gesetzt, wodurch die Membran der vorbehandelten Bakterien (2.3.2.) für kurze Zeit durchlässiger wird, auch für geladene Moleküle wie DNA (Calvin & Hanawalt, 1988; Dower et al., 1991; Hanahan et al., 1991; Solioz & Biens, 1990; Taketo, 1988).

Für die Elektroporation wurden 25µl elektrokompente Bakterien mit 1µl DNA (1- 10ng) gemischt, für 1min auf Eis inkubiert und in eine vorgekühlte Küvette (Elektrodenabstand 1mm, BioRad, München) überführt. Elektroporiert wurde mittels Gene Pulser und Pulse Controller bei 25µF, 200Ω, 1,6kV und einer Zeitkonstante unter 5ms. Unmittelbar nach der Elektroporation wurden die Bakterien in 1ml SOC-Medium aufgenommen und für 1 Stunde bei 300UpM im Schüttelschrank inkubiert und anschließend auf LB-Amp-Platten ausgestrichen.

Die eingesetzte DNA musste vorbehandelt werden, um rückständige Enzymreste und zu hohe Salzkonzentrationen zu entfernen. Dazu wurde erst eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt und die DNA anschließend nach Fällung zweimal mit 500µl 70%igem Ethanol gewaschen und in 0,5-fach TE-Puffer aufgenommen.

## **2.10 Molekularbiologische Methoden**

### **2.10.1 Phenol-Chloroform-Extraktion**

Dieser Vorgang dient der Befreiung der Nukleinsäuren von Proteinen. Durch organische Lösungsmittel wie Phenol und Chloroform werden die Proteine denaturiert und sammeln sich in einem wässrig-organischen Gemisch in der Interphase. Phenol wurde mit TRIS/HCl pH 8 (1mol/l) und TE äquilibriert und anschließend mit 8-Hydroxychinolin (0,1%) als Oxidationsschutz versetzt. TE-beschichtete Aliquots wurden bei 4°C gelagert.

Im ersten Schritt wird der Nukleinsäurelösung 1:1 Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol- (25:24:1) (PCI-) Lösung zugesetzt. Das Gemisch wird kurz gevortext und für 1min bei maximaler Beschleunigung (Eppendorf-Tischzentrifuge) zentrifugiert. Nach diesem Schritt sind die milchigen Proteine gut in der Interphase sichtbar. Die wässrige obere Phase wird unter Umgehung der Interphase vorsichtig entfernt, in ein frisches Polypropylen-Gefäß (Eppi)

überführt. Durch Zugabe des 0,5-fachen Volumens an TE-Puffer (im Fall von RNA EP) zum ersten Ansatz und erneuter Zentrifugation kann die restliche wässrige Phase entnommen und zur übrigen pipettiert werden. Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, CIA) wird in einem Verhältnis von 1:1 zur wässrigen Phase pipettiert, dadurch werden Phenolreste aus dem Ansatz entfernt. Die Mischung wird erneut gevortext und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wird die obere wässrige Phase in ein frisches Eppi überführt und kann durch Ethanol-fällung wieder konzentriert werden.

### **2.10.2 Fällung von Nukleinsäuren**

Nukleinsäuren wurden mittels Alkohol gefällt, dabei war das Ausgangsvolumen der Nukleinsäurelösung ausschlaggebend für die Wahl des Alkohols. Kleinere Volumina wurden mit 96%igem Ethanol (vergällt), größere mit Isopropanol gefällt.

Die zu fällende Nukleinsäure wurde mit 1/10x Volumen Natriumacetat (3M) pH 5,4 und 2,5x Volumen Ethanol bzw. 0,8xVolumen Isopropanol versetzt und für 10-45min bei Raumtemperatur oder 4°C (Kühlzentrifuge) und maximaler Beschleunigung zentrifugiert. Bei Konzentrationen unter 1µg/ml wurden 10µg lineares Polyacrylamid als Fällhilfe hinzu gesetzt (Gaillard and Strauss, 1990). Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet zur Entfernung der mit gefällten Salze mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend bei 60°C kurz getrocknet (Trockenschrank). Das trockene, durchsichtige Pellet wurde dann in ein adäquates Volumen TE, EP oder Reinstwasser aufgenommen. DNA, die für salzsensitive Reaktionen wie Elektroporation oder Ligationen gefällt wurde, wurde zweimal gewaschen und in 0,5xTE oder Wasser aufgenommen.

### **2.10.3 Die Behandlung von DNA mit Restriktionsenzymen**

Die im Labor gängigen Restriktionsendonukleasen vom TypII erkennen eine Sequenz von vier, sechs oder acht Basen, die Erkennungssequenzen sind meist Palindrome. Sie schneiden innerhalb dieser Erkennungssequenz, dabei werden glatte oder überhängende Enden erzeugt. Da die Preise der meisten Enzyme sehr hoch sind, wurde für jeden Restriktionsansatz die benötigte Enzymmenge berechnet. Dabei wird zunächst anhand der Zahl der Schnittstellen

einer Referenz-DNA, meist  $\lambda$ -DNA, berechnet, wie viel Doppelstrangspaltungen pro U und Stunde vom betreffenden Enzym durchgeführt werden. Dann wird aus der Länge und Masse der zu schneidenden DNA die Menge des Enzyms berechnet. Als Sicherheitsfaktor wurde die Enzymmenge der 2,5-fachen Stoffmenge der DNA berechnet. Das Volumen des Restriktionsansatzes war so gewählt, dass die Glyzerolkonzentration unter 5% blieb. Die Enzyme werden in einem Puffer geliefert, der meist 50% Glyzerol enthält, um die Bildung von Kristallen bei der Lagerungstemperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  zu verhindern. Die DNA, hier Plasmide oder genomische, wurde meist in einem Maßstab von 1-2 $\mu\text{g}$  verdaut. Doppelverdaue wurden bei passender Kompatibilität der Puffer simultan durchgeführt, ansonsten schloss sich hinter dem ersten Verdau eine PCI-Extraktion (2.4.1.) mit anschließender Fällung (2.4.2.) an.

Zur Kontrolle des Verdau wurde eine geringe Menge gelelektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

#### **2.10.4 Glätten, Phosphorylieren und Dephosphorylieren von DNA-Enden**

Diese Reaktionen gehörten zu den Vorbereitungen einer Klonierung.

Die 5'-Enden einer linearisierten Plasmid-DNA wurden dephosphoryliert, um die Zahl der Selbstligationen in einer anschließenden Ligation zu minimieren. Das hier zum Einsatz kommende Enzym war die Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP, engl. *Calf intestine alkaline phosphatase*). Pro  $\mu\text{g}$  DNA (1-3 $\mu\text{g}$ ) wurde ein U Enzym in einem 50 $\mu\text{l}$ -Ansatz eingesetzt, dem der dazu gelieferte Puffer zugesetzt wurde. Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die sehr stabile Phosphatase wurde durch PCI-Extraktion (2.4.1.) entfernt.

PCR-Produkte, die kloniert wurden, mussten vor der Ligation mit einem Vektor geglättet und phosphoryliert werden. Die zu glättenden überstehenden Enden entstehen im Zuge einer PCR, da die gängigen taq-Polymerasen einen 3'-Überhang erzeugen (Clark, 1988; Hu 1993). Die T4-Polymerase weist neben ihren Polymerase- unter bestimmten Bedingungen auch eine 3'-Exonuklease-Aktivität auf. Die Exonuklease-Aktivität wird in Anwesenheit von dNTPs im Reaktionsansatz limitiert, so dass definierte glatte Enden entstehen.

Primer, und damit die amplifizierten PCR-Produkte, weisen aus Kostengründen keinen Phosphatrest am 5'-Ende auf. Um eine Ligation mit einem 3'-OH-Ende eines Plasmids zu

ermöglichen, wurden die 5'-Enden des PCR-Produkts nachträglich phosphoryliert. Die T4-Kinase überträgt Phosphatgruppen von ATP auf DNA.

Glätten und Phosphorylieren wurden in einem gemeinsamen Reaktionsansatz durchgeführt:

10-100ng	PCR-Fragment
5µl	Puffer (5x) für T4 DNA-Polymerase
1µl	dNTPs (2,5mM)
1µl	ATP (625µM)
0,5µl	T4-Kinase (10U/µl)
0,5µl	T4 DNA-Polymerase

Das Endvolumen betrug 20µl, die Reaktion verlief über 20 min bei 25°C (Wasserbad).

### 2.10.5 Ligation

Bei einer Ligationsreaktion werden 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Ende von DNA-Stücken durch die T4 DNA-Ligase miteinander verbunden.

Bei einer Ligation glatter Enden wurden 150fmol Insert mit 50fmol Vektor im kleinst möglichen Volumen (meist 10µl) in Anwesenheit von 30U T4-DNA-Ligase und Puffer bei 25°C über Nacht inkubiert.

Bei der Ligation kohäsiver Enden betrug das Insert zu Vektor Stoffmengen-Verhältnis ebenfalls 3:1, bei zwei Inserts I: I: V= 3: 3: 1. Das Reaktionsvolumen wurde so gewählt, dass die Endkonzentration aller Enden nicht über 2nmol/l betrug, die T4-DNA-Ligase-Menge betrug 1-10U. Die Reaktion lief über Nacht bei 16°C.

Bei der Ligation fragmentierter genomischer DNA betrug die Endkonzentration 1-10ng/µl, es wurden 1-10U T4-DNA-Ligase eingesetzt, die Reaktion verlief über Nacht bei 16°C. Da hier die Fragmentlänge nicht bekannt war, wurden für die Berechnung der Stoffmengen-Konzentration der Enden im Endvolumen eine Länge von 1000bp angenommen.

### 2.10.6 Plasmid-Präparation

Zur Plasmid-Präparation wurden je nach Ausgangsvolumen die QIAGEN-Mini-/ Midi- oder Maxi-Kits benutzt. Bei der Präparation eines *low-copy*-Plasmids wie pUSNeo oder pcDSA3 wurde das Volumen des angeimpften Mediums verdoppelt. Das Kit beruht auf der Methode der Alkalischen Lyse zur Präparation von Plasmid-DNA. Die Bakterien werden nach Pelletierung mit NaOH und SDS aufgeschlossen, dabei denaturieren Proteine und die hochmolekulare genomische, nicht aber die kleinere zirkuläre Plasmid-DNA. Es folgt die Neutralisierung und Fällung mit Kaliumacetat, die Plasmid-DNA bleibt dabei in Lösung (Birnboim and Doly, 1979). Nach Zentrifugation wird der Überstand vorsichtig in ein frisches Eppi überführt und über eine Silica-Säule aufgereinigt und anschließend gefällt. Die Ausbeute variierte zwischen 0,5 und 5µg Plasmid pro ml Zellmedium.

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde ein Spot-Test durchgeführt. Hierbei wurde 1µl der DNA auf eine ethidiumbromidhaltige (5µg/ml) Agarose-Platte (1%w/v) aufgetragen und 10 min bei 37°C inkubiert. Unter UV-Licht wurde dann die Stärke der Fluoreszenz der DNA mit der einer Vergleichs-DNA, hier λ-DNA, die in einer Konzentrations-Reihe von 5-250ng/µl aufgetragen worden war, verglichen.

### 2.10.7 RNA-Präparation aus Geweben

Bei der RNA- Präparation aus Geweben und auch bei allen anderen Methoden, bei denen mit RNA gearbeitet wurde, galten bestimmte Vorsichtsmaßnahmen, um die Zerstörung durch RNasen zu verhindern. Wie bei allen anderen molekularbiologischen Methoden wurden Handschuhe getragen, die aber zusätzlich vor Beginn der Arbeit mit 70%igem Alkohol gereinigt wurden. Alle Glas- und Metallgeräte waren sterilisiert, alle Plastikutensilien autoklaviert. Vor Beginn wurden Arbeitsfläche und Geräte mit 0,1M NaOH, H<sub>2</sub>O-DEPC und 70%igem Alkohol abgewischt. Alle Lösungen, auch Reinstwasser, wurden mit Diethyl- Pyro-Carbonat (DEPC) versetzt (1:1000, v/v), 4-8 Stunden gerührt und anschließend autoklaviert. DEPC bindet an primäre und sekundäre Amine, wodurch die Aktivität von Enzymen wie die der RNasen zerstört wird (Penman, 1971; Williamson, 1971). DEPC ist giftig und wird daher durch Autoklavierung inaktiviert, wobei es zu Ethanol und CO<sub>2</sub> zerfällt. Da TRIS als Amin ebenfalls durch DEPC modifiziert wird, wurden beim Arbeiten mit RNA keine TRIS- sondern

Triethanolamin- Puffer verwandt. Zur Verdünnung von Alkoholen wurde DEPC- behandeltes Wasser benutzt.

Die Methode zur Isolierung von RNA beruht auf folgendem Prinzip: pulverisiertes Zellgewebe wird in einer Guanidinisothiocyanat-Lösung lysiert, GTC ist ein chaotropes Salz, das sehr effektiv Proteine, darunter auch RNasen, denaturiert und inaktiviert, wodurch schon während der Lyse eine Abbauschutz gewährleistet ist (Chirgwin et al., 1979); (Chomczynski and Sacchi, 1987). Dieser Schutz wird durch die Anwesenheit reduzierender Agenzien wie Mercaptoethanol (Aufbrechen von Disulfid-Bindungen) und Sarkosyl (Störung hydrophober Wechselwirkungen) verstärkt. Anschließend entfernt man Proteine und andere Zellbestandteile durch Zugabe von Phenol, da gleichzeitig der pH gesenkt wird, lösen sich auch kleinere DNA-Fragmente in der organischen Phase.

Tiefgefrorenes Gewebe wurde in kleinere Stücke à 2g geschnitten und mit flüssigem Stickstoff erneut schockgefroren und in einem Metallgefäß mit einem Stößel pulverisiert. Das Gewebepulver wurde mit 20ml DL (2.2.2.) versetzt, in ein Glasgefäß für Potter überführt und dort bei 800UpM homogenisiert. Das Homogenisat wurde dann in ein 50ml Falcon umgefüllt und folgende Lösungen wurden in dieser Reihenfolge hinzugesetzt: 2ml Natriumacetat (2M, pH4), 20ml Aqua Roti Phenol (pH 4,5- 5) und 8-10ml Chloroform-Isoamylalkohol (CIA). Nach jeder Zugabe wurde kräftig geschüttelt. Das Gemisch wurde 15min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C und 10000g (7000-7500rpm Ausschwing-Rotor, Sorvall-Zentrifuge, Newton, USA) für 30min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein frisches Poly-Styrol-Gefäß überführt und das gleiche Volumen CIA hinzugesetzt. Nach erneuter Zentrifugation unter identischen Bedingungen wurde der wässrigen Phase zur Fällung der RNA Isopropanol zum gleichen Volumenanteil zugesetzt und zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 500-1000µl H<sub>2</sub>O-DEPC aufgenommen und ggf. über Nacht im Kühlschrank gelöst.

Zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der gewonnen RNA wurde die Probe 1:100 vorverdünnt und 1µl in 69µl H<sub>2</sub>O-DEPC, die bereits in einer Einweg-Küvette vorlagen, verdünnt und photometrisch gemessen. ODs wurden bei 260 und 280nm gemessen. Die RNA-Konzentration berechnete sich dann aus  $C = OD_{260} * 40 * 7000$  [ng/µ]. Zur Bestimmung der Probenreinheit wurde der Quotient aus  $OD_{260}/OD_{280}$  bestimmt. Bei reiner RNA variiert dieser Wert zwischen 1,8 und 2,2 hier betrug der Wert normalerweise um 1,4. Bei ODs unter 0,1

wurde die RNA weniger verdünnt und erneut gemessen, um einen zu großen Messfehler zu vermeiden.

### **2.10.8 DNA- Präparation aus Gewebe**

Die DNA- wurde analog zur RNA-Präparation durchgeführt, Natriumacetat wurde durch 50x TAE ersetzt.

### **2.10.9 Gelelektrophorese nativer DNA**

Die Agarose-Gelelektrophorese nativer DNA dient der Auftrennung, Längenabschätzung und Aufreinigung. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass DNA bei pH-Werten über 7 negativ geladen und daher in einem angelegten elektrischen Feld mobil ist, sie wandert zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei bei linearen Molekülen lediglich von der Länge abhängig und ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der Basenpaaranzahl (Helling et al. 1974). Eine Längenabschätzung der aufgetragenen DNA wird ermöglicht, indem parallel ein Gemisch linearisierter  $\lambda$ -DNA unterschiedlichster Länge mit aufgetragen wird, in diesem Fall der 1kB- und der 100Bp-Marker von PEQLAB (Erlangen). Die Auflösung des Gels ist abhängig von der Porengröße und damit von der Agarosekonzentration des Gels. Für kleinere Fragmente wurden Gele mit 1,6%, für größere 1% Agarose eingesetzt. Die Agarose wurde in TAE-Puffer aufgekocht und nach kurzer Abkühlung in einen präparierten Schlitten mit Kamm gegossen. Die Proben wurden mit einem 4-fach konzentrierten Auftragspuffer versetzt und die Taschen des auspolymerisierten Gels gefüllt, die Auftrennung erfolgte in einer Elektrophoresekammer (BioRad) bei 5V/cm. Anschließend wurde das Gel mit einer ethidiumbromidhaltigen Lösung (1 $\mu$ g/ml in TAE) für 10min bei 60°C im Wärmeschrank gefärbt und auf einem UV-Tisch exponiert. In dem Fall, wo die DNA aus dem Gel isoliert werden sollte (2.4.9.), wurde dem TAE-Puffer Cytidin in einer Endkonzentration von 5mmol/l zugefügt (Gründemann and Schomig, 1996).

### **2.10.10 DNA-Isolation durch UV-geschützte präparative Agarose-Gelelektrophorese**

Die DNA-Bande der gewünschten Länge wurde rasch unter UV-Belichtung markiert und ohne Belichtung sorgfältig ausgeschnitten, um eine unnötige DNA-schädigende UV-

Exposition zu vermeiden. Ein zusätzlicher UV-Schutz bot das im Puffer vorhandene Cytidin (Gründemann and Schomig, 1996). Die Isolation der DNA aus dem ausgeschnittenen Agaroseblock erfolgte durch das QIAGEN Extraction-Kit, die Isolation erfolgte nach Herstelleranweisung. Das Prinzip beruht auf der Lösung der Agarose durch chaotrope Salze und eine anschließende Aufreinigung der DNA durch die Adsorption an eine Silica-Matrix. Der Verlust der DNA durch Extraktion war gemeinhin mit über 50% recht hoch. Eine Quantifizierung erfolgte über einen Spot-Test.

### **2.10.11 Gelelektrophorese denaturierter RNA**

RNA neigt sehr schnell dazu, Sekundärstrukturen auszubilden. In diesem Zustand ist jedoch eine Längenabschätzung durch Vergleich mit einem Marker nicht mehr möglich, da die Wanderungsgeschwindigkeiten der linearen und nicht linearen Moleküle nicht mehr vergleichbar sind. Aus diesem Grund ist es unumgänglich, die RNA vorher zu denaturieren, so dass Sekundärstrukturen nicht mehr ausgebildet werden können. Hierzu wurde Glyoxal und DMSO eingesetzt (Carmichael and McMaster, 1980). Als Laufpuffer diente BE, der verglichen mit TAE eine geringere Ionenstärke aufweist, die Färbung der RNA erfolgte während der Trennung durch Zugabe von Ethidiumbromid zur Probe (Gründemann and Koepsell, 1994). DLG wurde in einer 4/3-fachen Konzentration ohne Ethidiombromid im Vorfeld mit deionisiertem Glyoxal angesetzt (Sambrook et al., 1984) und bei -20°C gelagert. Alle Gele enthielte 1% Agarose, das in BE aufkochte und nach Abkühlung zum Schutz der RNA mit Natriumiodessigsäure (5mmol/l, Locker et al., 1979) versetzt wurde. Zur Behandlung der RNA wurde das DLG aufgetaut, mit Ethidiumbromid versetzt und in zu einem 3xVolumen zur RNA-Lösung gegeben (meist 500ng/µl, 1µl). Die Mischung wurde für 1 Stunde bei 50°C inkubiert. Der RNA-Marker wurde ebenfalls so behandelt (0,24- 9,5kB, Life Technologies). Nach Zugabe von 1µl Orange G wurde die Probe in die Taschen gefüllt und bei einer Spannung von 5V/cm aufgetrennt. Zur Vermeidung eines pH-Gradienten wurde der Puffer von der Anode zur Kathode durch eine Pumpe umgewälzt.

Mit Hilfe der RNA-Gelelektrophorese war eine zusätzliche Qualitäts-Kontrolle der präparierten RNA möglich.

### 2.10.12 Poly-A<sup>+</sup>-Selektion aus Gesamt-RNA an Oligo-dT-Cellulose

Zur Synthese doppelsträngiger cDNA wurde mRNA benötigt. Für die Selektion der mRNA aus der extrahierten Gesamt-RNA macht man sich die Anwesenheit eines Poly-A-Schwanzes bei der mRNA zu Nutze, der unter hohen Salzkonzentrationen an eine Oligo-dT-Matrix binden kann. Die übrigen Bestandteile der RNA, überwiegend tRNA und rRNA sowie mit präparierte DNA, passieren die Matrix ohne Bindung. Die mRNA kann nach einem Waschschrift durch Erniedrigung der Salzkonzentration leicht von der Oligo-dT-Matrix gelöst werden (Aviv and Leder, 1972);(Jacobson, 1987). Die RNA wurde zweifach selektiert, da es sich erwiesen hat, dass sich durch diesen Schritt die Reinheit erheblich erhöhen lässt (Jacobson, 1987).

Als Matrix diente Cellulose, die als Oligo-dT-Cellulose von der Firma Stratagene (Heidelberg) erworben wurde. 50mg der Cellulose wurden mit 5ml 0,1M NaOH aufgeschlämmt, nach Abdekantieren der NaOH wurde die Cellulose in eine 1ml Pipettenspitze gefüllt, die am spitzen Ende mit Quarzwolle gestopft worden war. Die so entstandene Oligo-dT-Säule wurde mit DEPC-Wasser und BP gewaschen, bis die aufgefangene Flüssigkeit einen pH-Wert unter 8 aufwies.

RNA wurde mit SDS (Endkonzentration 0,67%) und EDTA pH8 (Endkonzentration 6,7mM) versetzt und zur Denaturierung für 5min bei 65°C inkubiert. Die RNA wurde auf Eis abgeschreckt, 200µl 4xBP wurde hinzugefügt und die Lösung auf die Säule aufgefangen. Die aufgefangene Lösung wurde sofort ein weiteres Mal auf die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule mit 1xBP und WP gewaschen und die Poly-A- RNA mit 500µl 1xEP eluiert. Das Eluat wurde analog zur ersten auf die zweite Selektion vorbereitet, während die Säule mit 1ml DEPC-Wasser und 1ml 1xBP erneut äquilibriert wurde. Die frisch denaturierte RNA wurde nach Zugabe von 200µl 4xBP erneut auf die Säule gegeben und alle Schritte der ersten Selektion wurden ein zweites Mal durchlaufen. Nach Eluierung der mRNA wurde diese mit Isopropanol gefällt, gewaschen, getrocknet und in ein geeignetes Volumen DEPC-Wasser aufgenommen. Die Quantität und Qualität wurde durch photometrische Messung und denaturierende Gelelektrophorese ermittelt.

Die Säule wurde nach Gebrauch mit 1ml 0,1M NaOH zur Hydrolisierung von RNA-Resten und anschließend mit 1ml DEPC-Wasser und 1ml 1xBP behandelt. Zur Lagerung wurde die Säule mit 70%igem Ethanol beschichtet und bei -20°C aufbewahrt.

### 2.10.13 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird RNA bzw. mRNA durch die Reverse Transkriptase (Superscript II RNase H<sup>-</sup>, Invitrogen) in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Die cDNA kann dann zur Amplifikation eines bestimmten Transkriptes in eine PCR eingesetzt werden.

Vor der Umschreibung wurde die RNA mit RQ1-DNase (Promega) behandelt, um die RNA von möglichen DNA-Resten zu befreien. Hierzu wurden 20µg RNA mit Triethanolamin pH 7,5 (50mM) und MgCl<sub>2</sub> (5mM) zusammen mit 2U DNase bei 37°C für 30min inkubiert. Um die später synthetisierte cDNA nicht zu zerstören wurde die DNase durch eine PCI-Extraktion inaktiviert. Für die Umschreibung in cDNA wurde folgender Ansatz pipettiert:

75mM	KCl
50mM	Triethanolamin pH 9,7
7mM	MgCl <sub>2</sub>
10mM	DTT
je 1,5mM	dATP, dCTP, dGTP, dTTP
10µM	Randomisierte Hexamere
5µg	RNA
1000U	Superscript II RNase H <sup>-</sup> Reverse Transcriptase
	H <sub>2</sub> O ad 20µl

Die RNA wurde vorher bei 65°C für 5min denaturiert, um die Zugänglichkeit für die Reverse Transkriptase zu erhöhen. Zwei Negativkontrollen wurden für jede Umschreibung vorgenommen, ein Ansatz enthielt keine RNA, ein zweiter kein Enzym. Anhand dieser Kontrollen konnte später in einer PCR verifiziert werden, dass ein PCR-Produkt nicht aus einer Kontamination mit genomischer DNA stammte.

Der Reaktionsansatz wurde erst ohne RNA bei RT für 5min, dann bei 45°C für 2min inkubiert. Nach Zugabe der denaturierten RNA verlief die Reaktion bei 45°C für 1h. Das Enzym wurde anschließend für 10min bei 95°C inaktiviert, nach Abkühlung auf RT wurde der Ansatz erneut für 5min bei 65°C denaturiert und RNase behandelt. Dazu wurden zum Ansatz 5µl RNase-A (0,5mg/ml in Tris- HCl pH7,5 50% Glyzerol) hinzu pipettiert und 30min bei 37°C inkubiert. Die so synthetisierte einzelsträngige cDNA wurde direkt in eine PCR

eingesetzt oder vorher mit dem PCR-Purification Kit (QIAGEN) nach Herstelleranweisung aufgereinigt.

Bei einigen PCRs wurde statt einzelsträngiger cDNA doppelsträngige eingesetzt. Ausgangsmaterial war in diesem Fall mRNA (2.4.11.), statt randomisierter Hexamere wurde ein spezifischer Antisense-Primer für die Erststrangsynthese eingesetzt. Nach Synthese des Antisense-Stranges wurde die mRNA durch RNase H abgebaut, der Sense-Strang wurde anschließend von der DNA-Polymerase I synthetisiert, als Primer für die Polymerase dienten dazu die durch den mRNA-Abbau entstandenen RNA-Fragmente. Der fragmentierte Sense-Strang wurde anschließend durch eine Ligase zusammengefügt. Die durch die DNA Polymerase I entstandenen Überhänge wurden über die T4-DNA-Polymerase geglättet, RNA-Reste mit RNaseA verdaut und der Ansatz über das PCR-Purification Kit nach Herstelleranweisung aufgereinigt.

Die Erststrangsynthese verlief analog zum oben beschriebenen Ansatz, statt Gesamt-RNA wurden 5-10µg Poly-A-RNA und die doppelte Menge Reverse Transkriptase eingesetzt. Die Endkonzentration des spezifischen Primers (RTspez) betrug 0,1µM, mRNA und Primer wurden zusammen vor Beginn der Synthese bei 70°C für 2min Hitze denaturiert und anschließend auf Eis abgeschreckt.

Der Ansatz für die Zweitstrangsynthese war wie folgt zusammengesetzt:

25mM	Triethanolamin
100mM	KCl
10mM	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
5mM	MgCl <sub>2</sub>
Je 0,25mM	dATP, dCTP, dGTP, dTTP
5mM	DTT
0,15mM	B-NAD
80U	<i>E.coli</i> DNA-PolymeraseI
1,3U	<i>E.coli</i> RNaseH
6,4U	<i>E.coli</i> DNA-Ligase
	Reinstwasser ad 320µl

Die Endkonzentrationen beinhalten die Konzentrationen des Erststrangansatzes. Alle Reagenzien wurden auf Eis zum Erstansatz in der aufgelisteten Folge beigemischt. Die Reaktion verlief bei 16°C. Um einen vollständigen RNase-Abbau zu gewährleisten wurden nach 3h weitere 6,4U RNaseH schrittweise hinzugefügt. Der RNase-A-Verdau erfolgte analog zur beschriebenen Synthese von einzelsträngiger cDNA. Danach wurde dem Ansatz zur Glättung der Enden 3,2U T4-DNA-Polymerase beigemischt und für 10min bei 16°C inkubiert. Eine Aufreinigung erfolgte über das PCR-Purification-Kit (QIAGEN).

Doppelsträngige cDNA ist verglichen mit einzelsträngiger cDNA stabiler. Hier wurde für die Synthese ein spezifischer Reversed Primer eingesetzt, die so entstandene cDNA besteht somit zum größten Teil aus dem gewünschten Transkript, in diesem Fall EMT (Extraneuronaler Monoamin-Transporter), wodurch weniger unspezifische Nebenprodukte in der PCR zu erwarten sind und damit eine Begünstigung der gewünschten spezifischen Reaktion auftritt. Zum Einsatz kam diese cDNA bei der Amplifizierung des unbekanntes 5'-Endes der porzinen EMT-cDNA.

Vor ihrem Einsatz in eine spezifische PCR wurde nach jeder Umschreibung in eine einzelsträngige cDNA als Kontroll-PCR ein Fragment eines Haushaltsgen, hier GAPDH, amplifiziert. Nach Synthese einer doppelsträngigen cDNA folgte als Kontrolle die Amplifikation eines bereits aufgedeckten EMT-Bereichs.

#### **2.10.14 Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR, *polymerase chain reaction*)**

Die Optimierung von PCRs zur Amplifikation unbekannter Sequenzabschnitte war das Kernstück der vorliegenden Arbeit.

Zur exponentiellen Vervielfältigung von DNA-Stücken nutzt man die Sequenzinformation der beiden Enden des gewünschten Fragmentes und setzt diese als Oligonukleotide, die den Startpunkt des jeweiligen 5'-Endes von Sense- und Antisense-Strang definieren, ein (Saiki et al., 1988). In Anwesenheit von Desoxynukleotiden wird eine Verlängerung dieser Startpunkte durch eine hitzstabile DNA Polymerase vorgenommen. Diese Polymerase wurde erstmals aus dem hitzebeständigen Mikroorganismus *Thermus Aquaticus* isoliert und erhielt daher den Namen „taq-Polymerase“.

Die Bedingungen für eine Standard-PCR waren wie folgt:

Reaktionsansatz:

20mM	TRIS/HCl pH 8,4
50mM	KCL
2,3mM	MgCl <sub>2</sub>
Je 0,2mM	dATP, dCTP, dGTP, dTTP
0,5µM	Sense-Primer
0,5µM	Antisense-Primer
1,25U	Taq-DNA-Polymerase
1- 1250ng	DNA
	Reinstwasser ad 50µl

Reaktionsbedingungen:

2min	95°C	Erste Denaturierung	
30sek	95°C	Denaturierung	
1min	variabel	Annealingtemperatur	35 Zyklen
1min 30sek	72°C	Elongation	
10min	72°C	Finale Elongation	

Die taq-Polymerase wurde von der Firma Promega, die dNTPs von MBI-Fermentas und die Primer von OPERON bezogen. Alle PCRs wurden im Eppendorf Thermocycler/ Gradient-Cycler durchgeführt. Die DNA-Menge richtete sich nach der Art der DNA, einzelsträngige cDNA: 1250ng, genomische DNA: 100-300ng, doppelsträngige cDNA: 1-10ng, Plasmid-DNA: 1ng. Die Annealing-Temperatur richtete sich nach der Wahl der Primer.

Einige PCR-Fragmente konnten erst durch den Einsatz von taq-Polymerase-Abwandlungen, Additiven und veränderten Reaktionsbedingungen amplifiziert werden. Die PCR-Bedingungen sind in solchen Fällen im Ergebnis-Teil vermerkt.

Nach der Amplifikation wurde dem Reaktionsansatz für ein analytisches Gel (2.4.8.) 10µl Auftragslösung zugesetzt (2.2.2.) und 10µl aus diesem Gemisch aufgetragen.

### **2.10.15 Kolonie-PCR**

Nach Elektroporation wurde in manchen Fällen die Suche nach positiven Rekombinanten anhand eines Nachweises des eingebauten Fragmentes durch PCR vorgenommen. Dabei wurde der gesamte Klon direkt in die PCR eingesetzt (Friedman et al., 1988); (Gussow, 1989). Die Klone wurden mit einem sterilen Zahnstocher von der Platte gepickt und in den vorbereiteten Standard-Reaktions-Ansatz überführt, die Reaktion verlief unter Standard-Bedingungen. Nur die Erste Denaturierung wurde auf 5min erhöht, um einen Aufschluss der Bakterien zu gewährleisten. Vom noch am Zahnstocher verbliebenen Bakterienrest wurde eine Sicherheitskopie angelegt. Nach Analyse der PCR wurde von den daraufhin identifizierten positiven Rekombinaten eine Flüssig-Kultur angeimpft.

### **2.10.16 Sequenzier-PCR**

Zur Sequenzierung der klonierten Fragmente wurde das BigDye Terminator Ready Reaction Kit v2.0 benutzt, die Analyse erfolgte durch den automatischen Sequenzierer von ABI.

Die Sequenzier-Reaktion erfolgt nach der Didesoxymethode nach Sanger (Sanger et al., 1977). Der Terminator-Mix enthält die DNA-Polymerase, dNTPs, ddNTPs (Didesoxynukleotide). Jedes der vier ddNTPs ist mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert, der während der Elektrophorese mittels Laser angeregt und gemessen wird.

Eine Standard-Sequenzier-PCR war wie folgt zusammengesetzt:

0,5µl	DMSO
0,2µM	Sense- oder Antisense-Primer
100-200ng	DNA
4µl	Terminator-Mix
	Reinstwasser ad 10µl

Die Zugabe des Terminator-Mixes erfolgte erst nach der Ersten Denaturierung. Bei Sequenzierung von Abschnitten innerhalb von Plasmiden erfolgte keine vorherige Linearisierung. Die DNA war in 0,5x TE oder Reinstwasser gelöst.

Zur Sequenzierung sehr GC-reicher Abschnitte herrschten folgende Reaktionsbedingungen:

5min	94°C	Erste Denaturierung	
1min	94°C	Denaturierung	25 Zyklen
4min	64°C	Annealing/ Elongation	
10min	68°C	Finale Elongation	

### **2.10.17 Inverse PCR**

Die inverse PCR ermöglicht ausgehend von einem bekannten Bereich die gezielte Amplifikation unbekannter Sequenzabschnitte. Anders als bei der konventionellen PCR sind die Primer relativ zum bekannten Sequenzbereich zu einander entgegen gesetzt orientiert. Da die hier eingesetzte DNA ringförmig ist, erhält man ein lineares PCR-Produkt, in dem der unbekannte Bereich von den bekannten flankiert wird (s. auch Ergebnis- Teil). PCR-Ansätze und -Bedingungen liefen wie unter 2.4.13. beschrieben, lediglich die DNA-Matrix durchlief einige vorbereitende Schritte. Genomische DNA wurde wie unter 2.4.3. verdaut, dabei wurde Restriktionsenzyme gewählt, die die DNA parallel in möglichst 1000-1500Bp große Fragmente schneiden. Ohne weitere Aufreinigung wurde mit diesen Fragmente eine Ligation durchgeführt, die Bedingungen hierzu werden unter 2.4.5 beschrieben. Anschließend folgte eine PCI-Extraktion, nach Fällung wurde die nun zirkuläre DNA in die PCR eingesetzt.

### **2.10.18 Klonierung von PCR-Fragmenten**

Die überwiegende Mehrzahl der PCR-Fragmente wurde über glatte Enden kloniert, die Klonierung hatte in diesen Fällen lediglich die Vervielfältigung der Fragmente zum Ziel. Des Weiteren war durch den Einbau des PCR-Fragmentes, dessen genaue Sequenz meist nicht bekannt war, eine gezielte Sequenzierung ausgehend vom Plasmid möglich.

Als erstes wurde der Vektor glatt linearisiert, in dem ein Restriktionsenzym eingesetzt wurde, dessen Erkennungssequenz nicht im PCR-Fragment und kein zweites Mal im Plasmid vorlag (2.4.3.). Nach PCI-Extraktion (2.4.1.) und Einengung (2.4.2.) folgte die Dephosphorylierung der Enden (2.4.4.), um die Zahl der Selbstligationen zu minimieren. Zur Aufreinigung wurde der Vektor aus einem präparativen Gel ausgeschnitten (2.4.9.). Die Klonierung über glatte Enden ist verglichen mit der über kohäsive Enden äußerst ineffizient, die Zahl der Nebenprodukte und damit die negativer Klone sind sehr groß. Grund hierfür ist, dass zur Ligation von Vektor und Insert drei Ereignisse gleichzeitig eintreffen müssen: ein Insertmolekül muß mit einem Vektormolekül im Beisein einer Ligase zusammentreffen, ist bei dem Zusammentreffen kein Enzym in ausreichender Nähe vorhanden, findet keinerlei Anlagerung statt, da hier keine Hybridisierung überhängender Enden möglich ist. Um die ungünstigen Bedingungen nicht weiter zu verschlechtern, ist eine ausreichende Dephosphorylierung wichtig, daher wurden vor der Ligation mit dem Insert 100-200ng des dephosphorylierten Vektors in einem Ligationsansatz mit sich selbst ligiert und nach Elektroporation die Zahl der positiven Klone bestimmt. Eine dicht bewachsene Platte deutete auf eine unzureichende Dephosphorylierung hin. Der Vorgang wurde in solchen Fällen wiederholt.

Das zu klonierende PCR-Produkt wurde aus einem präparativen Gel ausgeschnitten (2.4.9.), die Enden wurden geglättet und phosphoryliert (2.4.4.). Nach PCI- Extraktion erfolgte dann die Ligation mit dem Vektor (2.4.5.).

Ein ebenfalls wichtiger Schritt war das Nachschneiden des Ligationsansatzes. Zum Nachschneiden wurde das Restriktionsenzym verwandt, mit dem der Vektor ursprünglich linearisiert worden war. Dies hatte den Effekt, dass nur Leervektoren, die sich erneut ligiert hatten, linearisiert wurden, jene mit Insert blieben unversehrt, da hier durch Einbau des Inserts die ursprünglich Schnittstelle nicht mehr vorlag.

Da Bakterien durch Elektroporation nur zirkuläre Moleküle aufnehmen, verringerte dies die Zahl der negativen Klone erheblich, der Hintergrund wurde verkleinert und damit die Zahl der zu analysierenden Klone.

Der Reaktionsansatz wurde über PCI-Extraktion aufgereinigt und auf die anschließende Elektroporation vorbereitet. Die Analyse der Klone erfolgte über Kolonie-PCR oder durch gelelektrophoretische Auftrennung der präparierten Plasmide mit anschließender Längenbestimmung.

Bei der Klonierung über kohäsive Enden war der Ablauf identisch, das Nachschneiden des Ligationsansatz war allerdings häufig nicht möglich, da das Insert über zwei unterschiedliche Schnittstellen eingebaut wurde. Da hier jedoch durch die Klonierungsstrategie (siehe Ergebnis-Teil) eine gezielte und gerichtete Vereinigung von Insert und Vektor gewährleistet war, war die Effizienz von Anfang an größer.

## **2.11 Zellkultur**

### **2.11.1 Kultivierung von HEK-293-Zellen**

HEK-293-Zellen wurden bei 37°C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre (5% CO<sub>2</sub>) auf beschichteten 175cm<sup>2</sup>-Plastikkulturflaschen (Becton Dickinson, Heidelberg) gezüchtet. Als Medium diente Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), dem 10%iges hitzedenaturiertes fötales Kälberserum (30min, 56°C) zugesetzt wurde. Eine Erneuerung des Mediums fand alle 2-3 Tage, eine Teilung der Kultur 12mal pro Woche statt. Die Zellen konnten dabei durch Klopfen der Flaschen einfach abgelöst werden. Zum Einfrieren der Zellen wurden sie in 15ml PBS geerntet, sedimentiert (700Upm, 5min) und in Einfriermedium resuspendiert. Kryoröhrchen wurden mit je 1,8ml Zellsuspension befüllt und die Zellen erst kurz auf Eis abgekühlt, dann in Styroporboxen für 1-2 Tagen bei -80°C und schließlich bis zur nächsten Nutzung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryoröhrchen in ein auf 37°C gewärmtes und mit 70% Ethanol befülltes Becherglas gesetzt. Die aufgetauten Zellen wurden anschließend in 18ml DMEM/FCS sedimentiert (700UpM/5min), in 10ml DMEM/FCS resuspendiert und eine mit 20ml Medium vorgelegte Zellkulturflasche gefüllt.

### **2.11.2 Stabile Transfektion von HEK-293-Zellen**

Bei der stabilen Transfektion wird Fremd-DNA ungerichtet ins Genom integriert. Die Fremd-DNA die hier eingesetzt wurde, war in den Vektor pcDSA3 integriert, so dass eine spätere Selektion der transfizierten Zellen durch G418 möglich war. Die Transfektion erfolgte durch Lipofektion.

Zwei Millionen Zellen wurden auf eine 75cm<sup>2</sup>-Flasche gegeben, nach 2-3 Tagen war eine Konfluenz von 20-30% erreicht. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Transfektion. Dazu wurden 10µg ungeschnittene und in TE gelöste Plasmid-DNA erst in 4ml DMEM und dann durch Mischen mit Tfx-50 in 4ml DMEM verdünnt. Diese Lösung wurde zu den Liposomen gegeben, wiederum gut gemischt und für 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde diese Lösung auf die Zellen gegeben, die vorher mit 15ml DMEM gewaschen wurden. Die Transfektionslösung verblieb im Brutschrank für 4h auf den Zellen. Danach wurde der Überstand durch 15ml DMEM/FCS ersetzt. Zu diesem Zeitpunkt wurde noch kein Antibiotikum hinzugefügt, sondern die Zellen für zwei Tage gezüchtet. Am dritten Tag wurden die Zellen auf Selektionsmedium umgestellt, dazu wurde dem Medium G418 in einer Endkonzentration von 0,3µg/ml sowie Glucose (30µg/ml) zugesetzt. Am nächsten Tag wurden die Zelltrümmer der nicht-transfizierten Zellen durch Mediumwechsel beseitigt. Die Zellen wuchsen unter Selektionsdruck heran, nach drei Wochen wurden sie auf eine 175cm<sup>2</sup>-Flasche ausgesät, die nach einer weiteren Woche dicht besiedelt war. Danach wurde mit DMEM/FCS weitergearbeitet. Nach drei- vier Wochen wurde die Selektion erneuert.

### **2.11.3 Aussaat der Zellen für Aufnahmeversuche**

Zwei bis drei Tage vor der Aufnahmemessung wurden kleine Schälchen (6mm) mit 1,5ml Poly-L-Ornithin befüllt, die nach 20 min wieder abgesaugt wurde. Die Zellen einer 175cm<sup>2</sup>-Flasche wurden sedimentiert, das Medium über den Zellen abgesaugt und durch 10-15ml frisches Medium ersetzt. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer- Zählkammer bestimmt und die Konzentration mit DMEM/FCS auf  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden 3ml DMEM/FCS in den Schälchen vorgelegt und 1ml Zellsuspension pro Schälchen beigefügt. Die Zellen wurden für 2-3 Tage im Brutschrank hochgezüchtet. Vor Beginn der Versuche

wurde die Konfluenz jedes Schälchen mikroskopisch nachgeprüft. Schälchen, die sich im Bewuchs von den übrigen stark unterschieden, wurden ausgesondert.

#### **2.11.4 Messung der Substrataufnahme stabil transfizierter HEK-293-Zellen durch Flüssigszintillationszähler**

Die für diese Messung eingesetzten Substrate und Hemmstoffe sind unter 2.2.2. aufgelistet. Zuerst wurden die Zellen mit KRH-Puffer vorinkubiert, dadurch werden Serumbestandteile abgetrennt, im Falle eines Hemmstoff-Versuchs dient sie der Bindung des Hemmstoffs an den Transporter. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Absaugstelle markiert, um den Zellverlust durch wiederholtes Ansetzen der Saugpipette zu minimieren und 4ml Vorinkubationslösung hinzu gegeben. Die Vorinkubationslösung war KRH-Puffer, dem im Falle der Hemmstoff-Versuche Disprocynium<sup>24</sup> je nach Versuchsansatz in einer Endkonzentration von 0,01-2,5µM hinzugefügt wurde. Die Dauer der Vorinkubation betrug 25-30min bei 37°C. Für die Substrataufnahme wurde die Vorinkubationslösung abgesaugt und durch 3ml Aufnahmelösung, die im Fall der Hemm-Versuche neben dem Substrat auch Hemmstoff einer Konzentration von 0,01-2,5µM enthielt. Die Substratkonzentration betrug zwischen 0,1-1000µM, die Radioaktivität betrug rein rechnerisch 30-40Bq/µl, die Aufnahmezeit 1min. Danach wurde die Aufnahmelösung abgesaugt und die weitere Aufnahme durch viermaliges Waschen der Zellen mit eiskalter KRH-Lösung gestoppt. Anschließend wurden die Zellen sofort mit 0,1% (v/v) Triton x-100 in 5mM TRIS-HCl pH 7,4 lysiert. Nach min. 20min wurden die Zelllysate homogenisiert, je 700µl wurden mit 2,1ml Szintillationscocktail (Quicksafe A, Zinsser Analytik) vermischt und in einem Flüssigszintillationszähler (Packard Tri-Carb 1600CA) ausgewertet. Jede Probe wurde für mindestens 10min gezählt. Zur Bestimmung der Nullrate wurde 100µl Vorinkubationslösung, zur Bestimmung der spezifischen Aktivität 100µl Aufnahmelösung mit 700µl Triton-Lösung und 2,1ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und gemessen. Die restlichen 300µl wurden zur Bestimmung des Proteingehaltes verwart.

Für jeden Messpunkt wurden jeweils drei Schälchen mit Transporter und drei mit Leervektor vermessen.

### **2.11.5 Messung der Substrataufnahme stabil transfizierter HEK-293-Zellen durch LC-MS und LC-MS/ MS**

Die Aufnahme von Substanzen, die nicht radioaktiv markiert vorliegen, kann alternativ durch LC-MS/ MS quantifiziert werden. In dieser Arbeit wurde lediglich die Aufnahme von Acetylcholin so gemessen.

Die Konzentration des Substrates war mit 10 $\mu$ M höher, um die Nachweisgrenze des Gerätes nicht zu unterschreiten. Der Aufnahmeversuch verlief wie unter 2.5.4. beschrieben. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Perchloroessigsäure (4mM). Zur Bestimmung des Proteingehalts wurden pro Messpunkt drei Schälchen mit 0,1%iger Triton x-100-Lösung lysiert.

Die Aufnahme von Substanzen aus einem Substanzgemisch wurde über LC-MS gemessen. Für diesen Versuch wurde je etwa 2g Aorta, Leber, Niere, Plazenta schockgefroren, im Mörser pulverisiert und in 12ml 1xKRH aufgenommen und anschließend am Potter homogenisiert. Zur Abtrennung von Schwebstoffen wurde die Lösung bei 10000g für 45min zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Falcon überführt und mit 1xKRH auf 40ml aufgefüllt. Alle Aufnahmelösungen waren klar. Die Aorta stammte von einem Kaninchen, Leber, Niere und Plazenta vom Hausschwein. Je drei Pärchen 293-pcDSA3 und 293-EMTp wurden für 30min mit den Homogenaten inkubiert. Als weiteres Substanzgemisch wurde den Zellen herkömmliches DMEM/FCS (10%) für 24h angeboten. Der Ablauf des Versuchs erfolgte wie unter 2.5.4. beschrieben. Die Zellen wurden mit 4mM Perchloroessigsäure lysiert.

LC-MS- und LC-MS/ MS- Analysen basierten auf einem Trippel-Quadrupol Massenspektrometer, das an ein HPLC-System und einem Autosampler gekoppelt ist (Thermo Electron GmbH Dreieich, Deutschland). Die Chromatographie wurde mit einer Normalphasensäule durchgeführt (Aquasil HILIC, 100\*3mm, 3 $\mu$ m, Thermo Electron GmbH, Dreieich Deutschland). Die Elution erfolgte mit 50% 0,1%iger Ameisensäure und 50% Methanol. Die Flussrate betrug 200 $\mu$ l/min und das Injektionsvolumen immer 20 $\mu$ l. Die Ionisation der Analyten erfolgte mit positivem Elektrospray, die Sprühspannung betrug dabei 4000V. Die Kapillar-Temperatur betrug 350°C. Für full-scan-Experimente wurde ein Massenbereich zwischen m/z 50-500 aufgenommen.

Die Dissoziation in der Kollisionszelle erfolgte durch Argonmoleküle (1,1mTorr) mit Kollisionsenergien von 20 und 30V. Für die Quantifizierung wurde der SRM-Modus (selected reaction monitoring) eingesetzt und spezifische Produkte der Analyten wurden detektiert.

Vor der Quantifizierung des aufgenommenen Acetylcholins wurde zur Kalibrierung eine Eichreihe mit Acetylcholin in Zelllysate gemessen (0-1 $\mu$ M), ein Peak bei einer Masse von 146, was der Masse von Acetylcholin entspricht, war deutlich sichtbar. Für die Quantifizierung wurde ein Acetylcholin-Fragment von m/z 87,1 beobachtet.

Zur Messung der Aufnahmespektren wurde als Standard ein Gemisch aus Carnitin m/z 162, MPP+ m/z 170 und Prolin m/z 116 verwendet.

#### **2.11.6 Detektion von Aufnahmeunterschieden mittels *Difference shading***

Bei der Betrachtung der Massenspektren als primäre Rohdaten wurde in vorangegangenen Versuchen innerhalb der Arbeitsgruppe schnell deutlich, dass aufgrund der Komplexität der Spektren ein optischer Vergleich zwischen Transporter- und Kontrollspektren zur Identifizierung von Unterschieden nicht machbar ist. Aus diesem Grund wurde von PD Dr. Gründemann eine Software entwickelt, die mit den Rohdaten der LC-MS-Analysen arbeitet. Diese Datensätze weisen die Dimensionen m/z, Zeit und Intensität auf. Zuerst werden die Daten in eine zweidimensionale Ebene projiziert, wobei die Intensität sigmoidal in 256 Graustufen dargestellt wird. Beim folgenden Vergleich zweier Datensätze wird ein gemeinsames Bild erzeugt. In diesem Bild sind Intensitätsunterschiede auf den einzelnen Massenspuren gut erkennbar. Bei der Kombination der einzelnen Farbkanäle werden Signale mit einer höheren Intensität in den Transporterspektren rot eingefärbt, der Hintergrund ist schwarz, so dass farbige Signale schnell auffallen. Türkise Banden werden von Signalen erzeugt, die in den Kontrollspektren intensiver sind.

Als interner Standard wurde ein Gemisch aus Carnitin, MPP+ und Prolin (1 $\mu$ M) mit 4mM Perchloressigsäure verglichen. Die folgende Abbildung zeigt den Vergleich dieser beiden Spektren. Zur besseren Sichtbarkeit auf hellem Hintergrund wurde das Bild invertiert, so dass hier türkise Signale höhere Intensitäten im Gemischspektrum bedeuten.

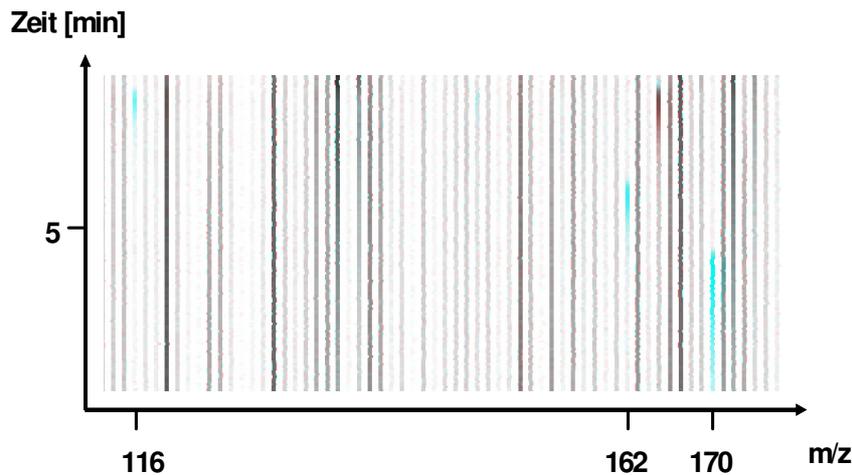


Abb. 2.5.6.1. Vergleich von 1 $\mu$ M Prolin, Carnitin und MPP+ in 4mM HClO<sub>4</sub> mit reinem HClO<sub>4</sub> mittels *Difference shading*. Prolin: [M-H<sup>+</sup>] m/z=116, RT 3min; Carnitin: [M-H<sup>+</sup>] m/z=162, RT 5min; MPP+: [M-H<sup>+</sup>] m/z 170, RT 7min.

## 2.12 Bestimmung der Proteinkonzentration in den Zellysaten

Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Assay der Firma Pierce (Vertrieb Deutschland Perbio Science) bestimmt. Das Prinzip dieses Tests beruht auf der Fähigkeit von Proteinen alkalisches Cu(II) zu Cu(I) zu reduzieren. Bei einem Überschuss von Cu(II) ist die Menge des entstandenen Cu(I) direkt proportional zur Proteinmenge. BCA (engl. bicinchoninic acid) ist eine chromogene Substanz die mit Cu(I) einen violett-farbenen Komplex bildet, der eine maximale Absorption bei 562nm aufweist.

Zur Kalibrierung wurde eine Eichreihe mit BSA (engl. bovine serum albumin) als Standard in einem Konzentrationsbereich von 0-454 $\mu$ g/ml gemessen. Dazu wurden fünf verschiedene BSA-Konzentrationen eingesetzt, BSA wurde in Lyselösung (0,1% TritonX-100) und NaCl (150mM) verdünnt. Die Proben wurden ebenfalls mit NaCl (150mM) 1:10 verdünnt. Nach Zugabe von Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und BCA wurde das Gemisch für 30min bei 37°C inkubiert und anschließend die Extinktion bei 564nm am ELISA-Reader (Beckman) gemessen.

## **2.13 Datenauswertung**

Zur Auswertung der Aufnahmeversuche wurde das Programm Sigma-Plot benutzt, Mittelwerte sind arithmetische Mittelwerte, Fehler sind als Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ausgedrückt.

Zur Bearbeitung von DNA-Sequenzen wurden die Programme Gene Construction Kit und McVector unter Mac benutzt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Klonierung des offenen Leserahmens (ORF)

#### 3.1.1 Klonierungsstrategie

Der ORF des Schweine-EMT (EMTp) wurde in mehreren Teilen amplifiziert und kloniert. Die sequenzierten Teilbereiche wurden zum Schluß zum vollständigen ORF zusammengefügt. Diese Sequenz diente dann als Vorlage für die Klonierung des gesamten ORFs zwecks heterologer Expression.

Möchte man kleinere Teile eines Gens, dessen Sequenz in anderen Spezies bereits bekannt ist, amplifizieren, gibt es grundsätzlich zwei Strategien. Zum einen vergleicht man die Aminosäuresequenz des entsprechenden Gens der bekannten Spezies und leitet dann von den Bereichen, die bei allen Spezies identisch sind, Primer ab. Diese Primer bestehen aus einem Nukleotidgemisch, da alle Aminosäuren mit Ausnahme von Methionin und Tryptophan von mehr als nur einem Triplet kodiert wird. Bei der Auswahl der identischen Bereiche sollte mindestens eine Folge von fünf Aminosäuren identisch sein, innerhalb dieser Folge ist es günstig, wenn die Aminosäuren von möglichst wenigen Nukleotidtripletts kodiert werden.

Zum anderen besteht die Möglichkeit, einen Speziesvergleich des Gens auf cDNA-Ebene durchzuführen. Die Primersequenz entspricht dann einem kurzen übereinstimmenden cDNA-Bereich. Dieser Bereich sollte mindestens eine Folge von 14 Nukleotiden umfassen. Da evolutionsbedingte und auch individuelle Mutationen sich nicht zwingend in einer veränderten Aminosäuresequenz niederschlagen, versprechen Primergemische aus identischen Aminosäuresequenzen die statistisch sicherste Methode, die unbekannte Sequenz einer neuen Spezies zu amplifizieren. Von Nachteil sind die Primergemische, weil sie um die Zielsequenz und andere ähnliche Sequenzen in der PCR konkurrieren. Die mangelnde Spezifität muss daher durch stringente PCR-Bedingungen erhöht werden. Dies bringt eine unter Umständen langwierige PCR-Optimierung mit sich. Ein cDNA-Vergleich liefert jeweils nur ein Primerpaar, was die PCR erleichtert. Da die Übereinstimmung bei einem Vergleich orthologer Nukleotidsequenzen kleiner ist, ist die Wahrscheinlichkeit mehrerer Folgen von 14 Nukleotiden geringer.

Nach anfänglichen Versuchen mit der sichereren Variante des Aminosäurevergleichs, die allesamt nicht zum gewünschten Ergebnis führten, wurden ausschließlich Amplifizierungsversuche mit der zweiten Strategie durchgeführt.

### 3.1.2 Auswahl des Materials

Ausgangsmaterial für die später in PCRs eingesetzte cDNA war RNA, die aus Schweineplazenta gewonnen wurde.

Bei der Wahl dieses Organs war ausschlaggebend, dass sowohl bei Nagern (Maus, Ratte) als auch beim Menschen hier die stärkste EMT-Expression zu finden ist.

Nach Extraktion der RNA wurden photometrisch die Quantität und die Reinheit bestimmt. Die Intaktheit der RNA wurde durch denaturierende RNA-Gelelektrophorese überprüft.

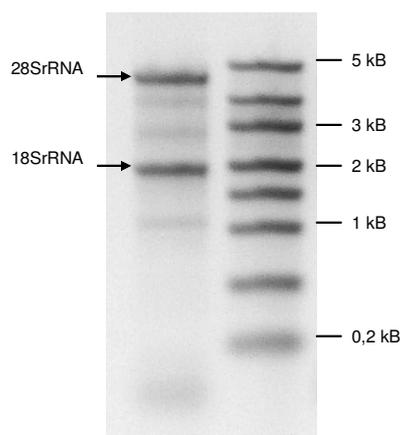


Abb. 3.1.2.1: Denaturierende RNA-Gelelektrophorese zur RNA-Analyse. Deutlich sichtbar sind die beiden größeren Untereinheiten, 18- und 28S, der rRNA. Dies belegt die Intaktheit der Gesamt- und somit auch der mRNA.

Für eine Standard-PCR wurde die RNA anschließend mittels randomisierter Hexamere in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Nach cDNA-Synthese und Abbau der verbliebenen RNA folgte eine PCR zur Amplifizierung von Beta-Actin, einem Haushaltsgen. Hiermit lässt sich überprüfen, ob die Umschreibung erfolgreich war und tatsächlich cDNA vorhanden ist.

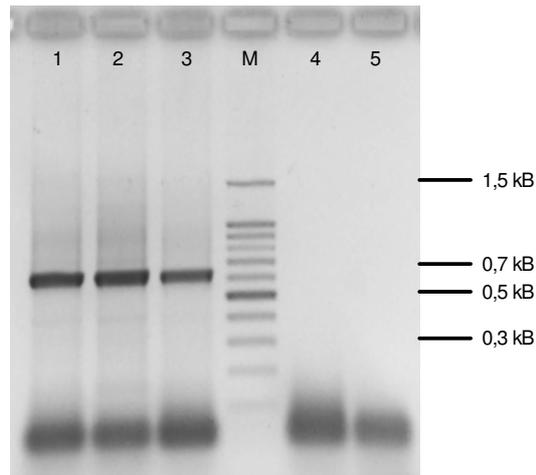


Abb. 3.1.2.2.: Ethidiumbromid gefärbtes Gel, aufgetragen sind die PCR-Proben zum Nachweis der Beta-Actin-Transkripte. Bahn 4 und 5 sind Nullproben. Erwartete Länge: 620bp.

### 3.1.3 Klonierung eines ersten kurzen Fragmentes des EMTp

Nach anfänglichen Versuchen, PCRs mit Primergemischen aus Aminosäuresequenzvergleichen zu optimieren, wurde zur zweiten Strategie gewechselt. Die Entscheidung, Primer von identischen cDNA-Bereichen abzuleiten, wurde durch den Umstand unterstützt, dass ein sehr kurzer EMT-cDNA-Abschnitt des Kaninchens publiziert wurde (Horvath et al., 2001). Dass zwei cDNA-Bereiche bei vier Spezies identisch sind, sprach dafür, dass die davon abgeleiteten Primer auch für Amplifikation der entsprechenden unbekanntes Schweinesequenz einsetzbar waren.

#### *Wahl der Primer*

In Anlehnung an die Publikation wurden die Primer F1EMT<sub>1</sub> und R1EMT<sub>1</sub> eingesetzt, mit diesen Primern wurde auch die kurze Kaninchen-EMT-Sequenz amplifiziert. Die Positionen dieser und aller folgenden Primer bezüglich der orthologen EMT-Sequenzen sind der Abbildung im Ergebnisanhang zu entnehmen.

### ***Amplifizierung eines kurzen cDNA-Abschnitts***

Die Primer wurden in eine Standard-PCR eingesetzt. Um bereits früh auszuschließen, dass es sich bei der Bande erwarteter Länge um ein unspezifisches Produkt handelte, wurden parallel zum Standardansatz zusätzlich zwei Ansätze gemischt, die jeweils nur einen der beiden Primer enthielten.

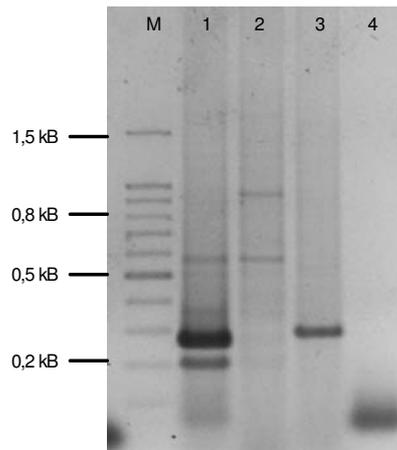


Abb. 3.1.3.2.: Ethidiumbromid gefärbtes Gel zur Analyse der PCR-Produkte. Ein PCR-Produkt der erwarteten Länge von 265bp wurde amplifiziert (Bahn 1), die Ansätze mit jeweils nur einem Primer ergaben Banden unterschiedlicher Längen, Bahn 2: PCR-Ansatz mit F1EMT, Bahn 2: PCR-Ansatz mit R1EMT. Nullprobe: Bahn 4.

Die PCR ergab eine klare Bande im erwarteten Längenbereich, die Ansätze mit nur einem Primer zeigten diese Bande nicht, dies war ein Indiz dafür, dass es sich bei der vorliegenden Bande um ein spezifisches PCR-Produkt handelte.

### ***Klonierung des PCR-Fragmentes***

Das PCR-Fragment wurde in einen Vektor einkloniert und nach Klonanalyse sequenziert. Dies hat mehrere Gründe. Einmal ist sicher gestellt, dass dank der Bakterien DNA in ausreichender Menge vorhanden ist. In einen Vektor kloniert kann das Fragment ausgehend von der *mutiple cloning site* (MCS) des Vektors unter Standardbedingungen vollständig sequenziert werden. Ein weiterer wichtiger Grund zeigt sich erst bei der Analyse der

Sequenzen. Für eine noch nicht klonierte Sequenz ergibt sich naturgemäß das Problem des Fehlens einer Referenzsequenz, anhand derer man Mutationen, die im Zuge der PCR durch die DNA-Polymerase entstanden sein könnten, leicht identifizieren kann. Es stellt sich also das Problem, wie man bei einem Vergleich der Sequenz einer neuen Spezies mit der der orthologen eine Mutation als Fehleinbau bei der PCR von einer natürlicherweise vorhandenen Mutation unterscheiden kann. Ist jedoch das Fragment in einen Vektor eingebaut und mehrere positive Klone werden sequenziert, ist es möglich, eine Konsensussequenz zu erstellen. Dies ist die Sequenz, die bei der Mehrzahl der sequenzierten Klone übereinstimmt. Es ist höchst unwahrscheinlich, dass der identische Fehleinbau bei allen Klonen vorkommt. Somit wird ein aussagekräftiger Sequenzvergleich möglich.

Die Bande im 265bp-Längenbereich wurde im UV-geschützten Gel ausgeschnitten (Gründemann and Schomig, 1996), aus dem Gel extrahiert und anschließend für die folgende blunt-end-Ligation mit dem Vektor pUC-19 präpariert. Der Vektor wurde mit SmaI linearisiert.

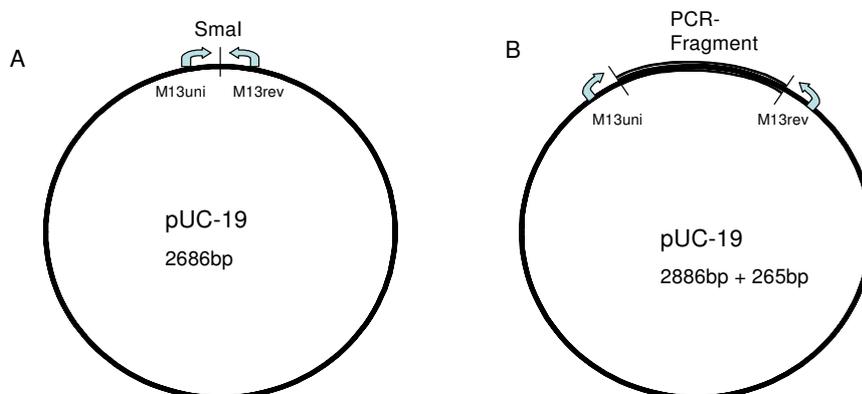


Abb. 3.1.3.3.: schematische Abbildung des Vektors pUC-19, Abb A zeigt die Lage der Primer M13uni und M13rev, die die Erkennungsschnittstelle für SmaI nah flankieren. Abb B zeigt den Vektor mit dem einligierten Fragment und die erweiterte Länge des Plasmids. Die Selektion erfolgte durch Ampizillin.

Das Ligationsprodukt wurde noch einmal mit SmaI geschnitten, um die Zahl der zirkulären Leerplasmide zu minimieren. DH10B-Zellen wurden durch Elektroporation transformiert, die Analyse von 16 unabhängigen Klonen erfolgte durch Kolonie-PCR mit den Primern M13uni

und M13rev. Die erwartete Länge der Klone, die das Insert trugen, betrug 366bp, die der Leervektoren 101bp. 15 der analysierten Klone zeigten Banden im erwarteten Längenbereich.

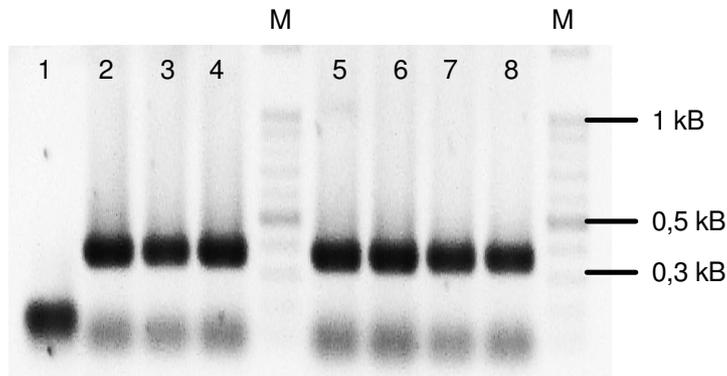


Abb. 3.1.3.4.: Kolonie-PCR zur Analyse der Klone, positive Klone zeigen PCR-Banden bei 366bp, Leervektoren bei 101bp. Die Klone der Bahnen 2, 3, 4, 7 und 8 wurden sequenziert.

### *Sequenzierung der Klone*

Fünf der positiven Klone wurden sequenziert, als Sequenzier-Primer fungierten hierbei M13uni und M13rev. Die aus den Sequenzen der einzelnen Klone resultierende Konsensussequenz (s. Abb. 3.1.3.5.) wurde mit den entsprechenden orthologen Nukleotid-Sequenzen verglichen. Die neue Sequenz zeigte eine 87%ige Identität zu EMTh und jeweils eine 84%ige Identität zu EMTm und -r auf Nukleinsäureebene und wies damit eine ausreichende Abweichung zu den bekannten Sequenzen auf, die eine Kontamination somit ausschloss.

Nun stand das erste Stück der EMTp-cDNA zur Verfügung.

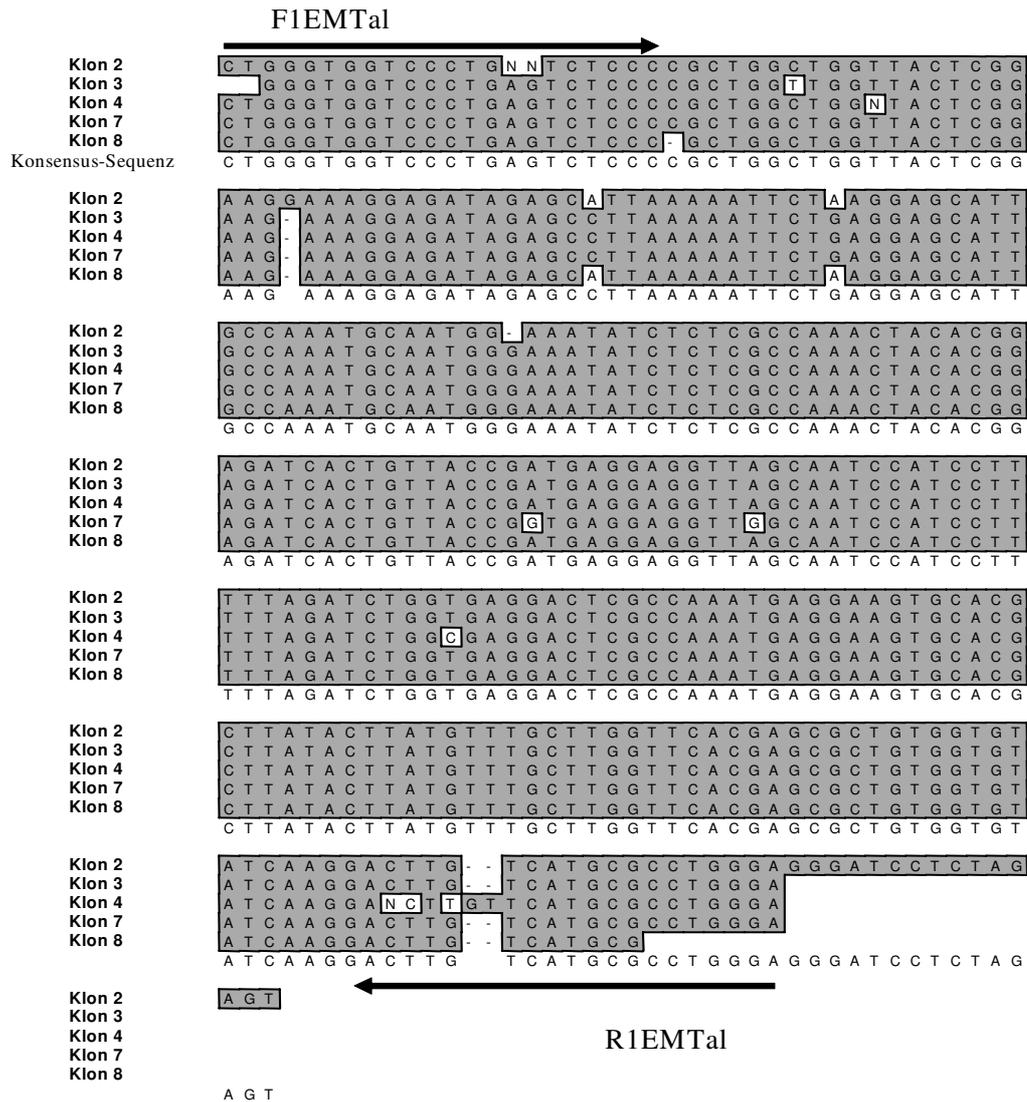


Abb. 3.1.3.5.: Vergleich der fünf sequenzierten Klone zur Erstellung einer Konsensussequenz (unterste Sequenz). Die Primer-Sequenzen zur Amplifikation des ersten EMTp-Fragmentes belegen die Vollständigkeit des klonierten PCR-Produktes. N steht für jedes Nukleotid, hier war die Sequenzierung nicht eindeutig.

### 3.1.4 Komplettierung des offenen Leserahmens (ORF)

Die Komplettierung des ORFs erfolgte in mehreren Teilstücken. In den folgenden Abschnitten werden Strategie und Bedingungen zur Klonierung der Einzelfragmente vorgestellt.

A)

### Strategie und Wahl der Primer

Ausgehend von dem bekannten Bereich des EMTp wurde der spezifische Primer F1EMTp abgeleitet. Zwei Antisense-Primer wurde abgeleitet von einem Alignment der drei bekannten Sequenzen, sie erhielten die Bezeichnung R2EMTaI und RAEMTh. Der Primer RAEMTh war bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden, er ist spezifisch für EMTh und wurde ebenfalls getestet, da er in einem Bereich bindet, in dem bis auf die letzte Base alle drei Sequenzen identisch sind.

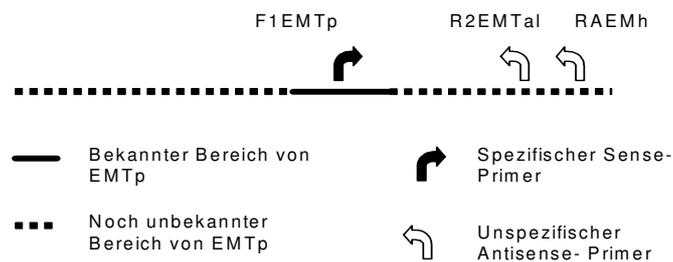


Abb. 3.1.4.1.: Schematische Abbildung zur Lage der Primer, die erwarteten Längen sind: F1EMTp/ R2EMTaI: 428bp, F1EMTp/ RAEMTh: 581bp.

### PCR

Die PCR wurde unter Standardbedingungen durchgeführt.

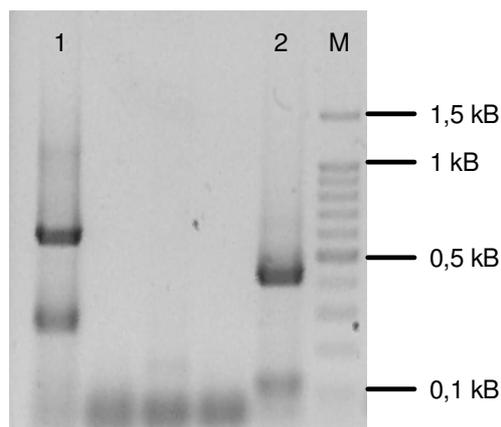


Abb. 3.1.4.2.: PCR mit jeweils einem spezifischen (Sense-) Primer und einem unspezifischen (Antisense-) Primer. Zwei verschiedene Antisense-Primer wurden parallel getestet. Beide Kombinationen erzeugten entsprechende Banden erwarteter Längen.

Die Fragmente aus der Primerkombination F1EMTp/RAEMTh (obere Bande Bahn 1, Insert 1) sowie F1EMTp/R2EMTal (Bande Bahn 5, Insert 2) wurden kloniert. Die Banden wurden im UV-geschützten Gel ausgeschnitten, extrahiert und zur Ligation mit pUC-19 vorbereitet.

### ***Klonierung***

Die Klonierung erfolgte analog zu der des ersten Fragmentes. Pro Insert wurden je 10 Klone über Kolonie-PCR mit M13-Primern analysiert. Je 3 Klone wurden nach Analyse sequenziert

### ***Sequenzierung***

Nur die Sequenzen von Insert 1 waren auswertbar, sie wurden mit denen der NCBI-Datenbanken verglichen. Alle drei Sequenzen zeigten eine große Ähnlichkeit zu EMTh (89%) und EMTm bzw. EMTr (84%) auf Nukleinsäureebene. Aus den Sequenzen der drei Klone resultierte die Konsensussequenz des zweiten Abschnittes von EMTp. Der zur Verfügung stehende Bereich betrug nun 846bp. Auffällig war die große Ähnlichkeit des bisher aufgedeckten Bereichs zu EMTh.

## ***B)***

### ***Wahl der Primer***

Für die Klonierung eines weiteren Fragmentes innerhalb des ORFs wurde ein spezifischer Reversed-Primer (R1EMTp) und ein unspezifischer Forward-Primer gewählt (FFEMTh). FFEMTh passt perfekt auf die EMTh-Sequenz, weicht allerdings nur bei drei Basen von der entsprechenden EMTm-, EMTr-Sequenz ab. Angesichts der sehr hohen Ähnlichkeit der bisher aufgedeckten EMTp-Sequenz erschien der Einsatz dieses bereits in der Datenbank vorhandenen Primers Erfolg versprechend.

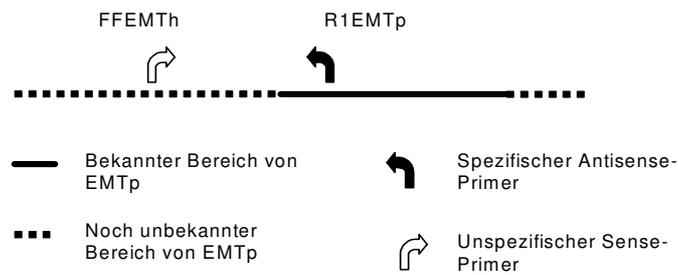


Abb. 3.1.4.3.: Schematische Darstellung zur Lage der Primer, die erwartete Länge des Fragmentes betrug 485bp.

### **PCR**

Die ausgewählten Primer wurden in eine Standard-PCR eingesetzt.

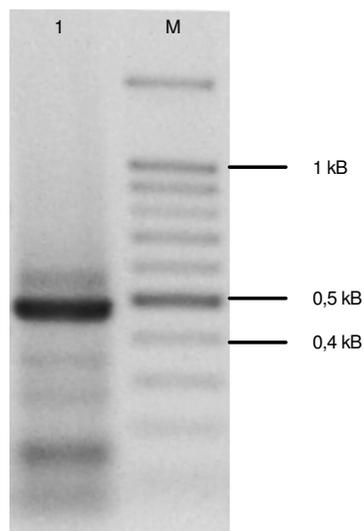


Abb. 3.1.4.4.: Analyse der PCR mit den Primern FFEMTh und R1EMTp, das Ethidiumbromid gefärbte Agarosegel zeigt in Bahn 1 eine Bande der erwarteten Länge von 485Bp.

Die mit diesen Primern erzeugte Bande wurde ausgeschnitten, präpariert und mit dem Vektor pUC-19 ligiert.

## ***Klonierung***

Die Klonierung erfolgte wie beschrieben. Eine Kolonie-PCR identifizierte positive Klone. 10 der insgesamt 15 getesteten Klone wiesen die erwartete Länge von 586bp auf, von diesen wurden 6 sequenziert.

## ***Sequenzierung***

Die Sequenzierung der DNA erfolgte mit den Universalprimern M13uni/M13rev. Vier der sequenzierten Klone waren auswertbar, sie zeigten nach Abgleich mit den Datenbanken eine 89%ige Identität mit EMTh und eine 83%ige mit EMTm/-r auf Nukleinsäureebene.

Die Klonierung dreier sich überlappender Fragmente lieferte die Sequenzaufklärung eines 1050bp langen Bereichs.

## ***C) 3'-Ende***

### ***Strategie und Wahl der Primer***

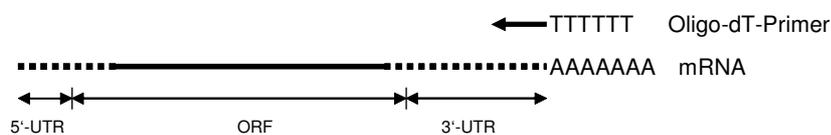
Beim Alignment der drei bekannten Sequenzen fällt auf, dass die Sequenzen kurz vor dem Stopcodon und in der gesamten 3'- untranslatierten Region (3'-UTR) sehr stark variieren (s. Ergebnisanhang). Aus diesem Grund ließ sich keine Region im 3'-UTR finden, die über eine ausreichende Länge größtenteils übereinstimmten. Zwei Strategien wurden parallel verfolgt, um das 3'-Ende zu amplifizieren.

### ***C1) Inverse PCR***

Die inverse PCR (Ochman et al., 1988; Triglia et al., 1988) erlaubt die gezielte Amplifizierung unbekannter Bereiche, indem Primer von einem bereits bekannten Bereich abgeleitet werden. Die Orientierung der Primer ist in diesem Fall verglichen mit einer herkömmlichen PCR entgegengesetzt. Da die DNA-Matrize zirkulär ist, wird im Zuge der PCR ausgehend vom bekannten Bereich der unbekannte amplifiziert. Für diese inverse PCR

wurde ausgehend von mRNA doppelsträngige cDNA synthetisiert. Zur Erststrang-Synthese wurde ein Oligo-dT-, zur Zweitstrang-Synthese ein EMTp-spezifischer Primer (Fx1EMTp) eingesetzt. Der Einsatz eines spezifischen Primers hat hier den Vorteil, dass nicht interessierende Bereiche des EMTp-Transkriptes nicht mit abgebildet werden. Dies hat zur Folge, dass das später zirkuläre Molekül nicht zu groß und die Verknüpfungsstelle des Ligationproduktes definiert ist. Abb. 3.1.4.5. veranschaulicht die Synthese der doppelsträngigen cDNA, die Ligation zum Ringschluss und die Lage der Primer zur Amplifikation des 3'-Endes.

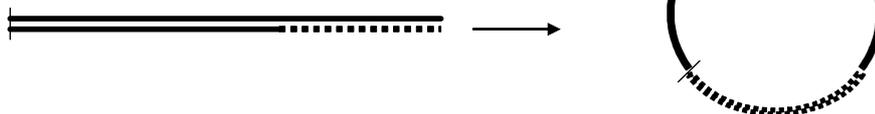
### Erststrangsynthese



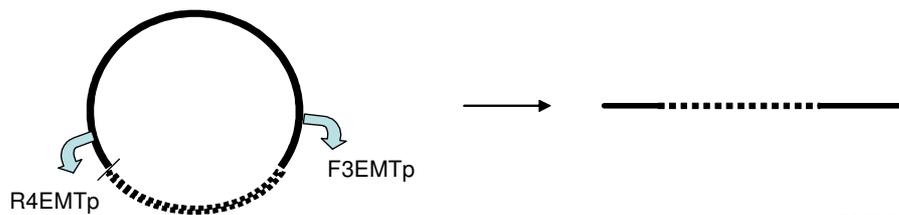
### Zweitstrangsynthese



### Ligation doppelsträngiger cDNA



### PCR



..... unbekannter Bereich  
 ————— bekannter Bereich

Abb.3.1.4.5.: Inverse PCR zur Amplifikation des unbekanntes 3'-Endes. Ausgehend von mRNA wurde mit Hilfe von Oligo-dT-Primern der Erststrang synthetisiert. Nach Abbau der RNA markiert der EMTp-spezifische Primer den Startpunkt für die Zweitstrangsynthese. Nach Ligation wurde die zirkuläre cDNA in eine PCR mit den Primern R4EMTp und F3EMTp eingesetzt. Beide Primer passen perfekt auf die EMTp-Sequenz. Beim erwarteten PCR-Produkt wird der unbekannte Bereich von den bekannten Abschnitten flankiert. Die erwartete Länge des PCR- Produktes betrug in Anlehnung an EMTh 1700Bp. Abkürzungen: UTR, untranslatierte Region.

## ***C2) Konventionelle PCR***

Ausgehend vom Alignment wurden vier verschiedene Antisense-Primer getestet, die nur in kleineren Bereichen auf alle drei Sequenzen passen, bei nicht übereinstimmenden Bereichen wurde angesichts der großen Ähnlichkeit im bisher sequenzierten Bereich die EMTh-Sequenz gewählt. Der Sense-Primer passt perfekt auf die EMTp-Sequenz.

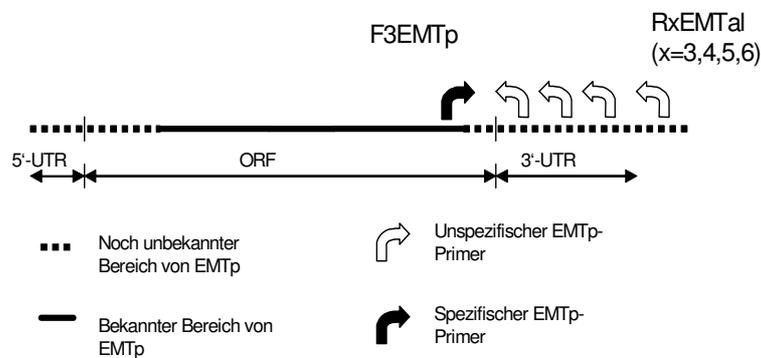


Abb. 3.1.4.6.: Schematische Abbildung zur Lage der Primer. Die Antisense-Primer stammten alle von einem cDNA-Alignmet der 3'-untranlatierten Region.

## ***PCR***

### ***C1) Inverse PCR***

Unter Standardbedingungen wurden drei verschiedene Annealing- Temperaturen getestet. Bei einer Annealing-Temperatur von 50°C konnte eine sehr schwache Bande erzeugt werden, die dem erwarteten Längenbereich entsprach.

Zur Verminderung der Nebenprodukte und Verstärkung des gewünschten Produktes wurde die Annealing-Temperatur von 60°C ausgehend pro Zyklus bis 50°C um 0,5°C gesenkt und für weitere 20 Zyklen diese Temperatur gehalten (touch-down-PCR mit Rampe), weiterhin wurde ausgehend von 65°C die Temperatur bis auf 45°C gesenkt (touch-down-PCR). Mit

dieser Technik erreicht man, dass das gewünschte Produkt bei einer anfänglich hohen Temperatur vor der Bildung unspezifischer Produkte amplifiziert wird und so zu einem frühen Zeitpunkt mengenmäßig im Vorteil ist. Auch wurde versucht, die Bildung von Nebenprodukten dadurch zu minimieren, dass  $MgCl_2$  erst nach der ersten Denaturierung zum Reaktionsansatz hinzugefügt wurde, so dass erst dann eine Amplifikation durch die taq-Polymerase erfolgte. Alle genannten Versuche, die Produktmenge durch Erhöhung der PCR-Spezifität zu erhöhen, schlugen fehl.

### ***C2) Konventionelle PCR***

Die PCR wurde unter Standardbedingungen mit einer sehr niedrigen Annealing-Temperatur ( $45^\circ C$ ) durchgeführt. Durch die niedrige Annealing-Temperatur sollte das Anlagern der nicht perfekt passenden Primer erleichtert werden.

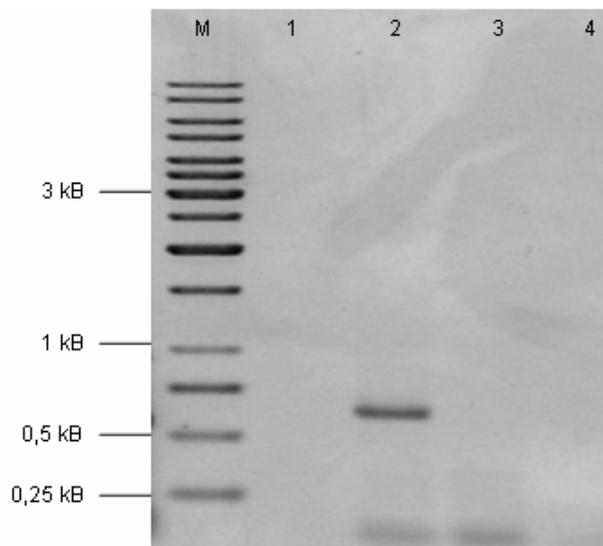


Abb. 3.1.4.8.: PCR-Produkte zur Amplifizierung des 3'-Endes. Bahn 1: F3EMTp/R3EMTal, Bahn 2: F3EMTp/R4EMTal, Bahn 3: F3EMTp/R5EMTal, Bahn 4: F3EMTp/R6EMTal. Lediglich mit dem Primerpaar F3EMTp/R4EMTal wurde ein Fragment der erwarteten Länge von ca. 585bp (in Anlehnung an EMTh) amplifiziert (Bahn 2).

Mit dem Primerpaar F3EMTp/R4EMTal wurde ein Fragment amplifiziert, welches ungefähr in dem erwarteten Längenbereich von 585bp lag. Die Menge des amplifizierten Produktes war

nicht besonders groß. Eine ausreichende DNA-Menge ist jedoch Voraussetzung für die Klonierung des Fragmentes, da die DNA nach der meist verlustreichen Gelextraktion mehrere Präparationsschritte durchlaufen muss, die ebenfalls einen DNA-Verlust zur Folge haben. Da sich die DNA-Menge auch nach Veränderung der PCR-Bedingungen nicht vergrößern ließ, wurde diese Bande nicht kloniert, sondern nach Extraktion direkt sequenziert. Da es sich bei dem noch ausstehenden Sequenzabschnitt um einen sehr kleinen Bereich handelte (ca. 108bp) war auch die Wahrscheinlichkeit eines Basenfehleinsbaus im Zuge der PCR relativ gering.

### *Sequenzierung*

Die Sequenz war gut lesbar und zeigte bis über das Stopcodon hinausgehend keine Unklarheiten.

### *D) 5'-Ende*

#### *Strategie und Wahl der Primer*

Der hier eingesetzte Primer Fx1aEMTh entspricht der EMTh-Sequenz 19 Basen vor dem Startcodon, der Primer enthält darüber hinaus das Startcodon. 9 Basen vor dem ATG sind bei allen drei Spezies identisch. Der Reversed Primer passt perfekt auf die EMTp-Sequenz. Die erwartete Länge des Fragmentes betrug 1157bp.

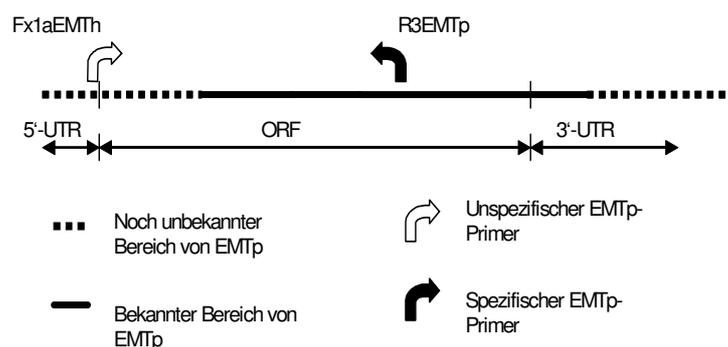


Abb. 3.1.4.9.: Zur Amplifizierung des noch verbleibenden 5'-Endes wurde das Primerpaar Fx1aEMTh und R3EMTp gewählt, die letzten drei Basen des F-Primers bilden das Startcodon. Die erwartete Länge des PCR-Produktes betrug 1157bp.

## ***PCR***

Aufgrund der bisherigen sehr großen Ähnlichkeit der vorliegenden EMTp-Sequenz zu EMTh musste davon ausgegangen werden, dass es sich wahrscheinlich bei dem noch nicht sequenzierten Bereich teilweise ebenfalls um eine sehr GC-reiche Region (bspw. >85% auf einer Länge von 200bp) handelte. Grundsätzlich sind sehr GC-reiche Fragmente schwierig zu amplifizieren, da die Zahl der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen höher ist. Die daraus resultierende höhere Stabilität des Doppelstranges kann dazu führen, dass die Denaturierung zu Beginn eines PCR-Zyklus nicht vollständig ist und damit eventuell Bereiche der DNA noch doppelsträngig vorliegen. Liegt die Zielsequenz gerade in diesem Bereich, ist eine Anlagerung der Primer und damit eine Amplifizierung erschwert. Ein weiteres Problem entsteht, wenn die DNA-Stränge frei liegen und somit zugänglich für die Primer sind. Die ebenfalls GC-reichen Primer binden auch relativ stabil an Regionen, die nicht perfekt komplementär sind. Diese nur teilweise Bindung ist auch bei Standard-Annealing-Temperaturen dennoch stabil. Diese Eigenschaft führt zu unspezifischen Produkten. Eine Anlagerung an nicht spezifische Bereiche wird durch möglichst stringente Bedingungen erschwert. Häufig reicht es nicht, die Annealing-Temperatur zu erhöhen. Alternativ können Additive wie DMSO oder Formamid alleine oder in Kombination zugesetzt werden (Baskaran et al., 1996; Dutton et al., 1993; Pomp and Medrano, 1991; Sarkar et al., 1990; Varadaraj and Skinner, 1994). Diese Substanzen erschweren ebenfalls die Anlagerung. Zur Erhöhung der Spezifität kann eine touch-down-PCR hilfreich sein (s. 3'-Ende, inverse PCR). Für die Amplifizierung des 5'-Endes erwiesen sich eine verlängerte erste Denaturierung bei einer höheren Temperatur sowie der Einsatz von DMSO (5%) im Ansatz als Erfolg versprechend. Die Annealingtemperatur betrug 55°C. Als template wurde hier aufgereinigte doppelsträngige cDNA eingesetzt, wobei die Aufreinigung ein kritischer Faktor war. Die Bande ließ sich ebenfalls mit einzelsträngiger aufgereinigter cDNA unter identischen Bedingungen amplifizieren, allerdings war hier die Zahl der Nebenprodukte höher und die gewünschte Bande schwächer. Nicht aufgereinigte doppelsträngige cDNA lieferte keine Bande.

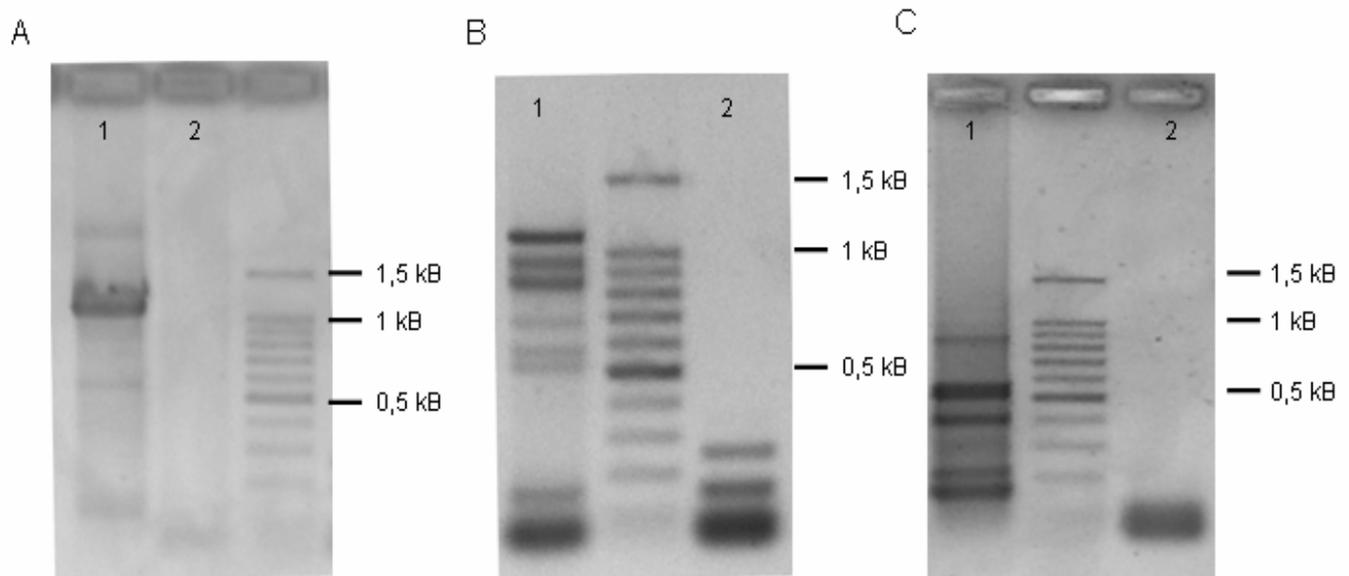


Abb. 3.1.4.8.: A) Mit dem Primerpaar Fx1aEMTh und R3EMTp wurde eine Bande erwarteter Länge (1157bp) erzeugt, als DNA-Matrize wurde aufgereinigte, doppelsträngige cDNA eingesetzt. B) Auch der Einsatz einzelsträngiger cDNA lieferte eine Bande im erwarteten Längenbereich, allerdings ist die Zahl der Nebenprodukte höher. C) Nicht aufgereinigte, doppelsträngige cDNA lieferte keine Bande im erwarteten Längenbereich.

Kritische Parameter waren demnach neben Annealingtemperatur der Einsatz eines organischen Lösungsmittels, DMSO, sowie aufgereinigter cDNA.

### ***Klonierung nach pUSNeo***

Die Bande aus Abb. A, Bahn 1 wurde ausgeschnitten und extrahiert. Klonierungsvektor für dieses Fragment war pUSNeo, ein low-copy-Plasmid, da sich die Klonierung des GC-reichen vorderen Bereichs von EMTh mit einem high-copy-Plasmid in vorangegangenen Versuchen innerhalb der Arbeitsgruppe als problematisch erwiesen hatte (Habilitationsschrift PD Dr. Gründemann). Aus noch ungeklärten Gründen scheint eine große Kopienzahl dieses EMT-Bereiches eine Belastung für die Bakterien darzustellen, die sich in einem sehr langsamen Wachstum der Bakterien und einer sehr schlechten Plasmid-DNA-Ausbeute äußert. PUSNeo wurde glatt linearisiert durch Restriktion mit EcoRV.

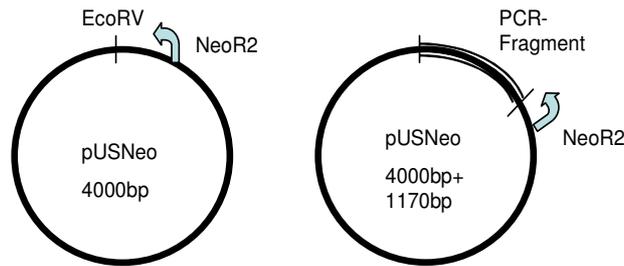


Abb. 3.1.4.9.: Zur Klonierung des letzten Fragmentes wurde pUSNeo eingesetzt, pUSNeo ist ein low-copy-Plasmid. Bei der Klonierung des entsprechenden Bereichs von EMTh hatte sich die Wahl eines low-copy-Plasmids als günstig erwiesen. Ein high-copy-Plasmid mit diesem Fragment bedeutete aus noch ungeklärten Ursachen eine zu hohe Belastung für die Bakterien. Eingetragen ist die EcoRV-Schnittstelle sowie den für die nachfolgende Sequenzierung eingesetzte Primer NeoR2.

Die Ligationsbedingungen blieben unverändert, entsprechend der Linearisierung wurde nach Ligation mit dem Enzym EcoRV nachgeschnitten. Die Analyse der Klone erfolgte durch gelelektrophoretische Auftrennung und Längenbestimmung der Plasmid-DNA. Drei der zehn getesteten unabhängigen Klone enthielten Plasmide der erwarteten Länge. Die DNA wurde präpariert und sequenziert.

### ***Sequenzierung***

Die Sequenzierungs-PCR erfolgte mit dem Primer NeoR2, ein Reversed-Primer, der kurz vor der EcoRV-Schnittstelle bindet. die Zielsequenzen der vorher verwandten Primer M13uni/M13rev sind zwar auch bei diesem Vektor vorhanden, befinden sich jedoch in relativ großer Entfernung von der EcoRV-Schnittstelle. Die Sequenzier-PCR-Bedingungen blieben gleich. Ein Vergleich der Sequenzen mit den Datenbanken zeigte für drei Klone eine erwartete hohe Übereinstimmung mit EMTh (89%) und EMTm/r (84%). Auch EMTp weist in Exon 1 einen sehr hohen GC-Gehalt auf.

Mit der Sequenzierung des letzten Fragmentes stand die EMTp-Sequenz des offenen Leserahmens vollständig zur Verfügung.

### **3.1.5 Klonierung des gesamten ORF zwecks Expression in Zellkultur**

Unter Vorlage der aus Teilklonierungen zusammengeführten EMTp-Sequenz wurde der gesamte ORF kloniert. Ziel war es, den Transporter des Schweins zur heterologen Expression zu bringen, um ihn so funktionell untersuchen zu können.

#### ***Strategie***

Vom ORF wurden erst zwei Fragmente amplifiziert, getrennt voneinander in Klonierungsvektoren vermehrt und nach Analyse aus dem jeweiligen Vektor ausgeschnitten, um dann zusammen mit einem Expressionsvektor ligiert zu werden. Diese Vorgehensweise hatte mehrere Gründe. Zum einen sind die Reaktionsbedingungen zur Amplifikation des vorderen GC-reichen Abschnitts zu stringent, um den gesamten übrigen Bereich mit ausgeglichenem GC-Gehalt zu amplifizieren. Zum anderen ist bei Amplifikation längerer Fragmente mit einer größeren Zahl von Punktmutationen hervorgerufen durch die taq-Polymerase zu rechnen. Als Expressionsvektor wurde pcDSA3 gewählt, ein low-copy-Plasmid. pcDSA3 ist eine Abwandlung des gängigen Expressionsvektors für eukaryotische Zelllinien, pcDNA3 (Akrigg et al., 1985; Boshart et al., 1985). pcDSA3 enthält einen p15A-Ori für niedrige Kopienzahlen und wurde innerhalb der Arbeitsgruppe entwickelt (PD Dr. D. Gründemann). Dieser Vektor sollte ebenfalls wie bei 3.1.5.B beschrieben die Belastung durch den GC-reichen vorderen Teil der EMTp-cDNA während der Vermehrung in Bakterien verringern. Die beiden Fragmente wurden nach HindIII und XhoI in diesen Vektor einkloniert.

#### ***Primerdesign für die Amplifikation***

Die EMTp-Sequenz weist eine Erkennungsschnittstelle für BstBI auf, die nur einmal vorkommt und die das Fragment in zwei fast gleiche Fragmente teilt (s. Abb. 3.1.5.1.). Diese Schnittstelle wurde zur späteren Wiedervereinigung der Teilstücke gewählt. Zur Einführung einer HindIII-Schnittstelle vor dem Startcodon wurde ein Forward-Primer mit der entsprechenden Erkennungssequenz eingesetzt. Der Reversed-Primer zur Amplifikation des hinteren Teilstückes enthielt die Erkennungssequenz für XhoI. Mit den eingeführten Schnittstellen war ein gerichteter Einbau in den Expressionsvektor gewährleistet.

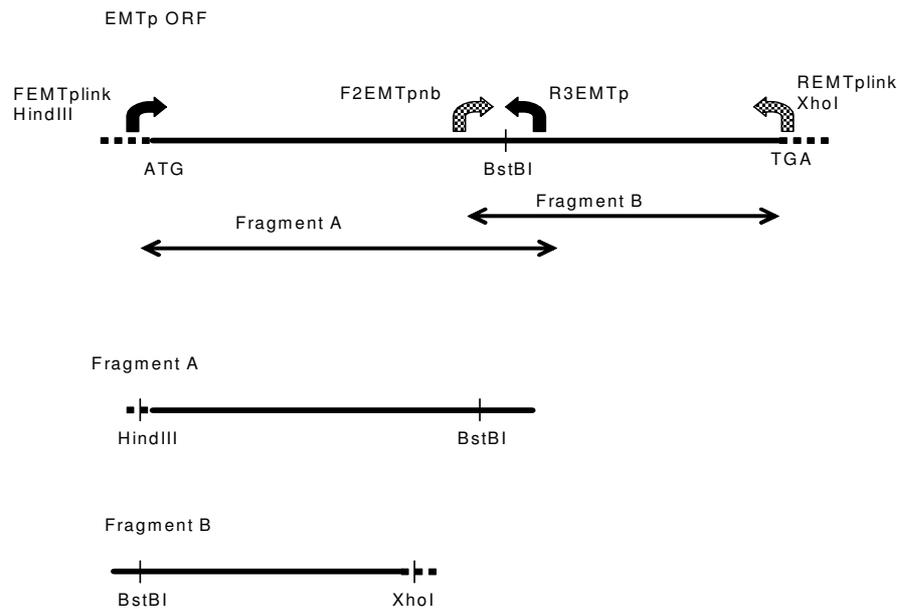


Abb. 3.1.5.1: Schematische Darstellung zur Amplifikation der beiden EMTp-ORF-Teilstücke. Fragment A erhält durch den Linker des F-Primers eine HindIII-Schnittstelle vor dem Startcodon, Fragment B eine XhoI-Schnittstelle hinter dem Stopcodon durch den Reversed Primer. Über diese Schnittstellen war ein gerichteter Einbau des Gesamtfragmentes in den Expressionsvektor möglich. Beide Teilbereiche reichten über die BstBI-Schnittstelle hinaus, über die sie später wieder verbunden werden konnten. Die erwarteten Längen betragen: Fragment A: 1175bp, Fragment B: 753bp.

## PCR

Für die Amplifikation des vorderen Teilbereichs wurde die taq- Polymerase von QIAGEN, die sich zusammen mit der mit gelieferten Q-Solution laut Hersteller zur Synthese GC-reicher Sequenzen eignet, getestet. Die genaue Zusammensetzung der Q-Solution ist nicht bekannt, sie soll Substanzen enthalten, die ähnlich wie DMSO und Formamid das Anlagern der Primer an die Zielsequenz erschweren (s. 3.1.4. D). In einem Vorversuch wurde die Wirkung steigender Annealing-Temperatur sowie der Zusatz von DMSO auf die Amplifizierung des GC-reichen Fragmentes mit dem Enzym und der Q-Solution getestet.

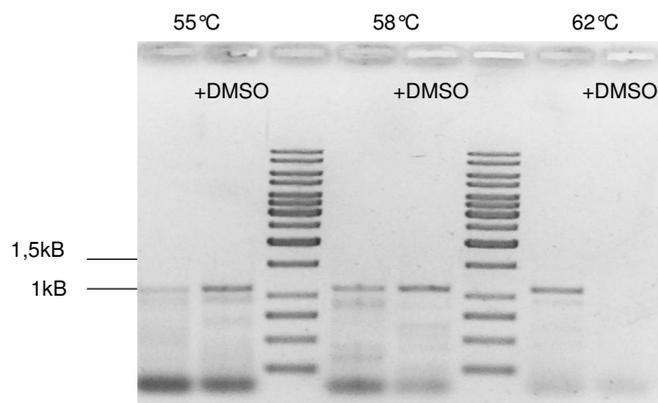


Abb. 3.1.5.2.: Zur Amplifizierung des 5'-Endes wurde das Enzym mit der dazu gelieferten Q-Solution von QIAGEN zur Amplifizierung GC-reicher Fragmente bei steigender Annealing-Temperatur und unter Zusatz von DMSO getestet. Bei 62°C Annealing-Temperatur ohne DMSO war die Zahl der Nebenprodukte am geringsten. Erwartete Länge: 753bp.

Bei einer Annealing-Temperatur von 55°C ist die Notwendigkeit eines zusätzlichen Additivs deutlich sichtbar, um die Bande der erwarteten Länge zu amplifizieren. Dies ändert sich mit steigender Annealing-Temperatur. Bei 62°C ohne zusätzlichem DMSO wurden wenig Nebenprodukte gebildet, so dass diese Reaktionsbedingungen für die Amplifikation des 5'-Fragmentes (Fragment A) beibehalten wurden.

Das Fragment B wurde unter Standardbedingungen amplifiziert.

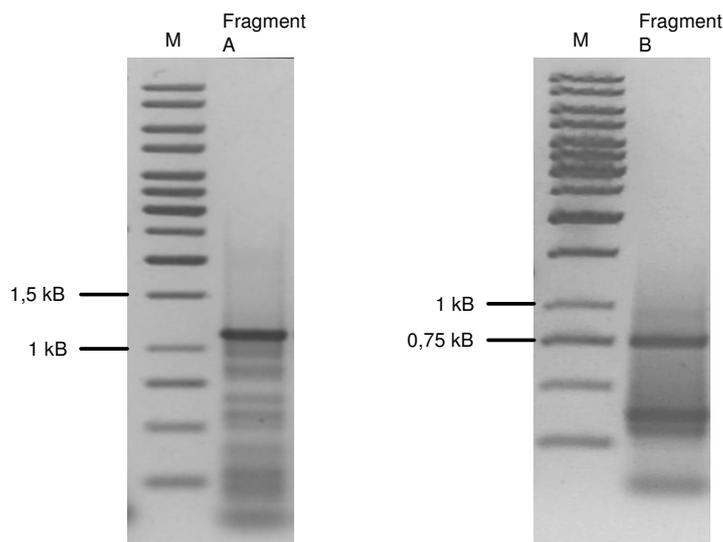


Abb. 3.1.5.3.: Amplifizierung der beiden Teilbereiche von EMTp, die Agarose-Gele zeigen die PCR-Produkte der Einzelfragmente, Fragment A: 1175bp, Fragment B: 753bp.

Die entsprechenden Banden wurden ausgeschnitten und zur blunt-end-Ligation mit den Klonierungsvektoren vorbereitet.

### ***Getrennte Klonierung der beiden Fragmente***

Fragment A wurde nach pUSNeo X EcoRV, Fragment B nach pUC19 X SmaI über blunt-end-Ligation kloniert.

Klone wurden durch Gelelektrophorese des supercoiled-Plasmids analysiert. Für Fragment A wurden aus 14 unabhängigen Klonen drei positive, für Fragment B aus 12 unabhängigen Klonen vier sequenziert.

### ***Sequenzierung***

Die Sequenzierung der Teilstücke bestätigte die bisherige Konsensussequenz.

Die Sequenzierung ergab für Fragment A einen Klon, der zwischen der eingebauten HindIII- und der BstBI-Schnittstelle komplett mit der vorläufigen Referenzsequenz übereinstimmte, die beiden anderen zeigten an unterschiedlichen Positionen Abweichungen. Bei den Klonen für Fragment B wies ebenfalls einer eine komplette Übereinstimmung zur Konsensussequenz auf.

### ***Konstruktion des Expressionsvektors***

Fragment A wurde über die Restriktionsenzyme HindIII und BstBI aus dem Vektor pUSNeo, Fragment B über die Enzyme XhoI und BstBI herausgeschnitten. Der Expressionsvektor pcDSA3 wurde mit XhoI und HindIII linearisiert.

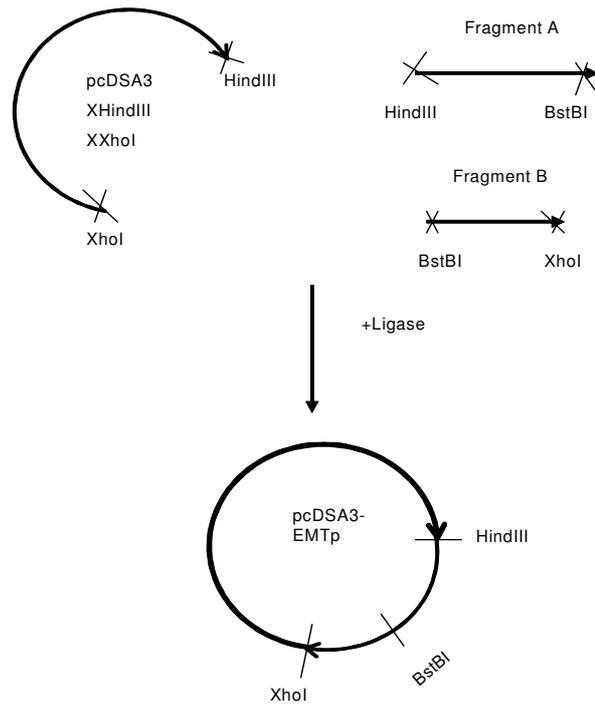


Abb. 3.1.5.4: Schematische Darstellung Einbau der Teilfragmente von EMTp in den Expressionsvektor pcDSA3. Pfeile symbolisieren die Orientierung der DNA, Kreuze die überhängenden Enden nach Verdau mit den entsprechenden Enzymen. Die beiden Fragmente wurden untereinander durch die Restriktionsschnittstelle BstBI und mit dem Vektor durch XhoI und HindIII verbunden.

Die Fragmente wurden in einem gemeinsamen Ligationsansatz mit dem Vektor und untereinander verbunden. Zur Vermehrung wurde das Konstrukt in DH10B Zellen kloniert und anschließend die Klone über Gelelektrophorese der Plasmide analysiert. Eine weitere Überprüfung erfolgte durch Restriktionsverdau mit den Enzymen XhoI und HindIII.

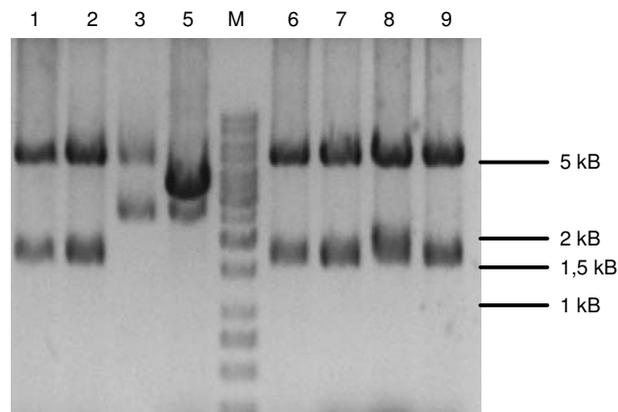


Abb. 3.1.5.5.: Doppelverdau der Plasmide mit XhoI und HindIII. Erwartet wurden zwei Banden der Länge 1684 (Insert, EMTp) und 5168bp (Vektor, pcDSA3). Klon sieben wurde zur weiteren Präparation ausgewählt.

Sechs der insgesamt neun weiter getesteten Klone zeigten Banden der erwarteten Längen. Klon sieben wurde zur Maxipräp angeimpft, die DNA zur Transfektion der eukaryotischen Zellen benutzt.

### **3.1.6 Vergleich des orthologen Transporters aus Mensch, Ratte, Maus und Schwein**

#### ***Vergleich der Nukleinsäuresequenz***

cDNA-Alignment siehe Ergebnis-Anhang.

Der Vergleich der neuen EMTp-cDNA ergibt eine Identität von 89% zu EMTh und eine 84- bzw. 83%ige zu EMTr/ -m.

## Vergleich der Aminosäuresequenz

EMTp	1	M P S F D I E A L L Q R R A G E F F G R F Q R R V F L L L C L T G V T F A F L F V G V V	40
EMTh	1	M P S F D I E A L L Q R R R V G E F F G R F Q R R V F L L L C L T G V T F A F L F V G V V	40
EMTm	1	M P T F D I E A L L R R K A G E F F G R F Q R R V F L L L C L T G V T F A F L F V G V V	40
EMTr	1	M P T F D I E A L L R R K A G E F F G R F Q R R V F L L L C L T G V T F A F L F V G V V	40
EMTp	41	F L G S Q P D H Y W C R G P S A T A L A E R C G W S P E E E W N R T T A P A S R L G	80
EMTh	41	F L G T Q P D H Y W C R G P S A T A L A E R C G W S P E E E W N R L T T A P A S R L G	80
EMTm	41	F L G S Q P D Y Y W C R G P R A T A L A E R C A W S P E E E W N N L T T T P E L H G	79
EMTr	41	F L G S Q P D Y Y W C R G P R A T A L A E R C A W S P E E E W N N L T T T P E L H G	79
EMTp	81	P E P P E R R R G D G R C Q R Y L L E A V N A S A A G P G A L S C A D P L A A F P	120
EMTh	81	P E P P E R R R G D G R C Q R Y L L E A V N A S A A G P G A L S C A D P L A A F P	118
EMTm	80	- V P A E R R R G Q G H C H R Y L L E A T N T S S E L S - - - - C D P L A A F P	113
EMTr	80	- V P A E R R R G Q G H C H R Y L L E A T N T S S E L S - - - - C D P L A A F P	113
EMTp	121	N R S A P L V P C R G G W R Y A Q A H S T I V S E F D L V C D V N A W M L D L T Q	160
EMTh	119	N R S A P L V P C R G G W R Y A Q A H S T I V S E F D L V C D V N A W M L D L T Q	158
EMTm	114	N R S A P L V P C S G D W R Y V E T H S T I V S E Q F D L V C S G N A W M L D L T Q	153
EMTr	114	N R S A P L V P C S G D W R Y V E T H S T I V S E Q F D L V C S G N A W M L D L T Q	153
EMTp	161	A I L N L G F L A G A F T L G Y A A D R Y G R I V I Y L I S C L G V G V T G V V	200
EMTh	159	A I L N L G F L T G A F T L G Y A A D R Y G R I V I Y L I S C L G V G V T G V V	198
EMTm	154	A I L N L G F L A G A F T L G Y A A D R Y G R L I V I Y L I S C F G V G I T G V V	193
EMTr	154	A I L N L G F L A G A F T L G Y A A D R Y G R L I V I Y L I S C F G V G I T G V V	193
EMTp	201	V A F A P N F P V L V V F R F L Q G V F G K G T W M T C Y V I V T E I V G S K Q	240
EMTh	199	V A F A P N F P V V F V I F R F L Q G V F G K G T W M T C Y V I V T E I V G S K Q	238
EMTm	194	V A F A P N F S V F V I F R F L Q G V F G K G A W M T C F V I V T E I V G S K Q	233
EMTr	194	V A F A P N F S V F V I F R F L Q G V F G K G A W M T C F V I V T E I V G S K Q	233
EMTp	241	R R I V G I V I Q M F F T L G I I I L P G I A Y F I P N W Q G I Q L A I T L P S	280
EMTh	239	R R I V G I V I Q M F F T L G I I I L P G I A Y F I P N W Q G I Q L A I T L P S	278
EMTm	234	R R I V G I V I Q M F F T L G I I I L P G I A Y F I P S W Q G I Q L A I S L P S	273
EMTr	234	R R I V G I V I Q M F F T L G I I I L P G I A Y F I P S W Q G I Q L A I S L P S	273
EMTp	281	F L F L L Y Y W A V P E S P R W L I T R K K G D R A L K I L R S I A K C N G K Y	320
EMTh	279	F L F L L Y Y W V V P E S P R W L I T R K K G D K A L Q I L R R V A K C N G K Y	318
EMTm	274	F L F L L Y Y W V V P E S P R W L I T R K K G E K A L Q I L R R V A K C N G K H	313
EMTr	274	F L F L L Y Y W V V P E S P R W L I T R K K G E K A L Q I L R R V A K C N G K H	313
EMTp	321	L S P N Y T E I T V T D E E V S N P S F L D L V R T R Q M R K C T L I L M F A W	360
EMTh	319	L S S N Y S E I T V T D E E V S N P S L D L V R T P Q M R K C T L I L M F A W	358
EMTm	314	L S S N Y S E I T V T D E E V S N P S F C L D L V R T P Q M R K C T L I L M F A W	353
EMTr	314	L S S N Y S E I T V T D E E V S N P S C L D L V R T P Q M R K C T L I L M F A W	353
EMTp	361	F T S A V V Y Q G L V M R L G I I G G N L Y I D F F I S G V V E L P G A L L I L	400
EMTh	359	F T S A V V Y Q G L V M R L G I I G G N L Y I D F F I S G V V E L P G A L L I L	398
EMTm	354	F T S A V V Y Q G L V M R L G L I G G N L Y I D F F I S G L V E L P G A L L I L	393
EMTr	354	F T S A V V Y Q G L V M R L G L I G G N L Y I M D F F I S G L V E L P G A L L I L	393
EMTp	401	L T I E R L E G R R L P F A A S N I V A G V A C L V T A F L P E G I P W L R T T A V	440
EMTh	399	L T I E R L G R R L P F A A S N I V A G V A S C L V T A F L P E G I A W L R T T V	438
EMTm	394	L T I E R L G R R L P F A A S N I V A G V S C L V T A F L P E G I P W L R T T V	433
EMTr	394	L T I E R L G R R L P F A A S N I V A G V S C L V T A F L P E G I P W L R T T V	433
EMTp	441	A T L G R L G I T M A F E I V Y L V N S E L Y P T T L R N F G V S L C S G L C D	480
EMTh	439	A T L G R L G I T M A F E I V Y L V N S E L Y P T T L R N F G V S L C S G L C D	478
EMTm	434	A T L G R L G I T M A F E I V Y L V N S E L Y P T T L R N F G V S L C S G L C D	473
EMTr	434	A T L G R L G I T M A F E I V Y L V N S E L Y P T T L R N F G V S L C S G L C D	473
EMTp	481	F G G I I A P F L L F R L A A I W L E L P L I I F G I L A S V C G G L V M L L P	520
EMTh	479	F G G I I A P F L L F R L A A I W L E L P L I I F G I L A S V C G G L V M L L P	518
EMTm	474	F G G I I A P F L L F R L A A I W L E L P L I I F G I L A S V C G G L V M L L P	513
EMTr	474	F G G I I A P F L L F R L A A I W L E L P L I I F G I L A S V C G G L V M L L P	513
EMTp	521	E T K G I A L P E T V D D V E K L G S P Y S C K C G R K N T T Q V S G S H L 558	558
EMTh	519	E T K G I A L P E T V D D V E K L G S P H S C K C G R K N K K T P V S R S H L 556	556
EMTm	514	E T K G I A L P E T V D D V E K L G S S Q L H Q C G R K K K T Q V S T S H V 551	551
EMTr	514	E T K G I A L P E T V D D V E K L G S S Q L H Q C G R K K K T Q V S T S N V 551	551

Abb. 3.1.6.1.: Aminosäuresequenzvergleich von EMT zwischen den Spezies Schwein (p), Mensch (h), Maus (m) und Ratte (r). Es gibt eine bemerkenswerte Übereinstimmung in weiten Bereichen, lediglich in zwei kurzen Abschnitten gibt es markante Unterschiede. Innerhalb dieser Divergenzen sind Mensch und Schwein sowie Maus und Ratte nahezu identisch.

Generell stimmt die EMTp-Aminosäuresequenz in weiten Bereichen mit der der EMTh-Sequenz überein.

Ein Vergleich der orthologen Proteine EMTh, -m, -p und -r auf Aminosäureebene weist in weiten Bereichen eine große Ähnlichkeit auf.

Unterschiede zeigen sich meist in einzelnen Aminosäuren. Es gibt lediglich zwei Bereiche, in denen jeweils eine Sequenz von Aminosäuren abweicht, einmal das Fehlen von vier Aminosäuren bei EMTm, -r gegenüber EMTh, -p sowie eine Reihe von fünf Aminosäuren, die bei EMTm und -r identisch sind und komplett von der entsprechenden Sequenz bei EMTh, -p abweichen.

### **3.2 Funktionelle Charakterisierung des EMTp durch heterologe Expression**

Die stabile Transfektion, bei der Fremd-DNA zufällig ins Genom integriert wird, ermöglicht die dauerhafte heterologe Expression der Fremd-DNA. Zur Untersuchung der funktionellen Eigenschaften des Transporters wurden mit EMTp-cDNA stabil transfizierte HEK-293-Zellen untersucht. Bei der Untersuchung von Transportvorgängen durch ein bestimmtes Protein ist es ungünstig, wenn die untersuchte Substanz bereits durch einfache Diffusion oder durch andere nicht heterolog exprimierte Transporter gut in die Zelle gelangt. HEK-293-Zellen weisen eine ausgesprochen geringe endogene Aufnahme für die untersuchten Substanzen auf und eignen sich daher sehr gut für Aufnahmeuntersuchungen verschiedener Substanzen durch ein heterolog exprimiertes Transportprotein. Zur Quantifizierung der geringen jedoch vorhandenen endogenen Aufnahme wurden HEK-293-Zellen parallel mit dem Leervektor pcDSA3 transfiziert. So entstanden die beiden Zelllinien 293-EMTp und 293-pcDSA3. Die Aufnahme einer Substanz in die Zelle durch EMTp berechnet sich aus der Gesamtaufnahme subtrahiert um die Aufnahme durch 293-pcDSA3-Zellen, man spricht dann von „spezifischer Aufnahme“. Mit Ausnahme von Acetylcholin waren alle untersuchten Substanzen radioaktiv markiert, dies hat den Vorteil, dass eine mögliche Metabolisierung nach Aufnahme der Substanz in die Zellen keine Rolle spielt, da die metabolisierte Substanz radioaktiv und damit messbar bleibt.

Charakterisiert wurde EMTp anhand der Kenngrößen Km- und Ki-Wert sowie der Transporteffizienz für verschiedene Substanzen.

Das Substanzspektrum eines Transporters gibt wichtige Hinweise auf seine physiologische Rolle. Bei den bisherigen Untersuchungen war ein ausgedehntes Screening nach möglichen Substraten zu langwierig, zu teuer oder schlichtweg nicht möglich, da die zu untersuchende Substanz nicht radioaktiv markiert synthetisiert werden konnte. Durch LC/MS kann das aus einem angebotenen Substanzgemisch aufgenommene Substanzspektrum gemessen werden. Das in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Gründemann entwickelte Programm „*difference shading*“ vergleicht das aufgenommene Spektrum zweier Zelllinie und identifiziert Aufnahmeunterschiede. Dieses Verfahren wurde ebenfalls für EMTp-exprimierende Zellen angewandt.

### **3.2.1 Stabile Transfektion**

Die Fremd-DNA wurde durch Fusion mit der Zelle eingeschleust. Bei der hierzu eingesetzten Lipofektion wird ein Gemisch von kationischen Lipiden zusammen mit einem ungeladenen Helferlipid (L-Dioleoylphosphatidylethanolamin, DOPE) in wässriger Lösung einer Ultraschallbehandlung unterzogen, bei der sich Liposomen bilden. Diese werden dann mit Zellkulturmedium und DNA gemischt und schließlich zur Fusion zu den HEK-293-Zellen gegeben (Felgner et al., 1987; Rose et al., 1991; Zhou and Huang, 1994). Das hier verwendete Lipofektionsreagenz stammte von Promega (Tfx<sup>TM</sup>), der genaue methodische Ablauf ist dem Methodenteil (2.) zu entnehmen. Nach etwa vier Wochen unter Selektionsdruck konnte mit den Aufnahmeversuchen begonnen werden.

### **3.2.2 Aufnahmecharakteristika für 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (MPP+) und Hemmbarkeit durch Disprocynium 24 (D24)**

#### ***Identifizierung von EMTp***

Zur Identifizierung des exprimierten und korrekt in die Zellmembran eingebauten Transporters wurden in einem ersten Versuch Zellen mit und ohne Transporter mit MPP+ einer Konzentration von 0,1µM für eine Minute inkubiert und anschließend gewaschen. MPP+ ist das beste Substrat (Russ et al., 1992), Disprocynium 24 (Russ et al., 1993) ein

potenter Hemmstoff für EMT, als weiteres Charakteristikum sollte auch EMTp durch diese Substanz in einer Konzentration von 2,5 $\mu$ M hemmbar sein.

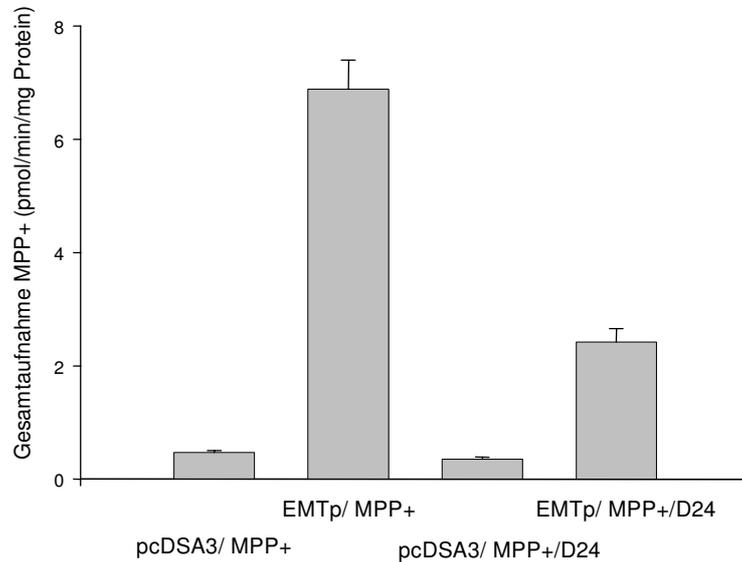


Abb. 3.2.2.1.: in einem gepaarten Versuch wurden jeweils drei Zellschälchen mit und ohne Transporter mit MPP+ in einer Konzentration von 0,1 $\mu$ M für eine Minute inkubiert, bei einem weiteren Versuch war neben MPP+ Disprocynium 24 (D24) als Hemmstoff anwesend (2,5 $\mu$ M).

Zellen, die mit der EMTp-cDNA transfiziert wurden, zeigten eine deutlich erhöhte Aufnahme gegenüber den Zellen mit Leervektor. Die initiale Aufnahmegeschwindigkeit (Clearance) der 293-EMTp-Zellen betrug 68,8  $\pm$ 9 $\mu$ l/min\*mg, die der 293-pcDSA3- Zellen 4,7  $\pm$ 0,7 $\mu$ l/min\*mg Protein. Es zeigte sich somit eine um den Faktor 15 erhöhte initiale Aufnahmegeschwindigkeit. In Anwesenheit von Disprocynium24 (2,5 $\mu$ M) wurde die Aufnahme nicht vollständig, jedoch deutlich gesenkt. Die Aufnahmegeschwindigkeit betrug in Anwesenheit des Hemmstoffs 24,2  $\pm$ 4,1 $\mu$ l/min\*mg Protein. Dieser erste Versuch belegte den erfolgreichen Einbau der EMTp-cDNA ins Zellgenom und deren Expression und Einbau in die Zellmembran.

### **Zeitverlauf der MPP+- Aufnahme**

Die MPP+-Aufnahme wurde zu verschiedenen Zeiten in 293-pcDSA3/ -EMTp-Zellen gemessen, die MPP+-Konzentration betrug 0,1µM. Der Zeitverlauf der MPP+-Aufnahme liefert die MPP+-Konzentration im Gleichgewicht, d.h. wenn die Nettoaufnahme null ist. Diese Konzentration gibt Aufschluss, wieviel Substrat in der Zelle angereichert wurde.

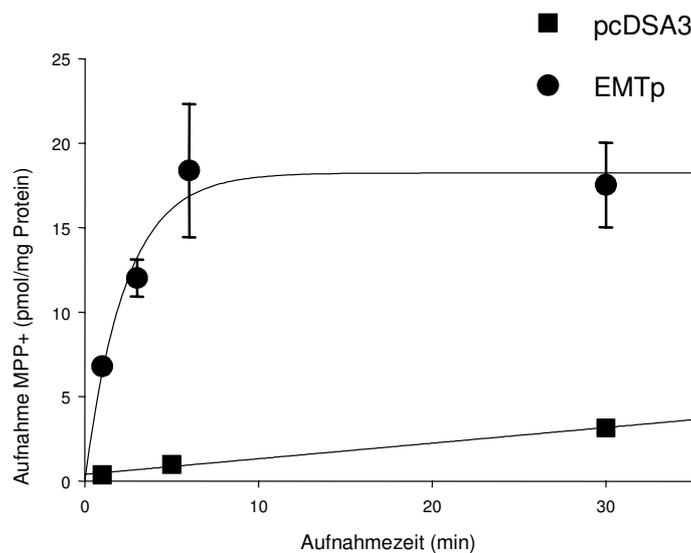


Abb. 3.2.2.2.: Zeitverlauf der MPP+-Aufnahme. Pro Zeitpunkt wurden je drei Schälchen 293-EMTp-Zellen gemessen. Die Aufnahme der 293-EMTp-Zellen ist die spezifische Aufnahme, zusätzlich gezeigt ist die linear verlaufende Aufnahme von MPP+ durch Diffusion. Messdaten der spezifischen Aufnahme wurden nach  $y = a \cdot (1 - \exp^{-b \cdot x})$  angepasst. Punkte repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM der drei Einzelmessungen.

Der Zeitverlauf der MPP+-Aufnahme zeigt eine Gleichgewichtsaufnahme von  $17,53 \pm 4,34$  pmol/min\*mg Protein. Dies entspricht bei einem intrazellulären Wasservolumen von  $6,7 \mu\text{l}/\text{mg}$  Protein (Martel *et al.*, 1996) und einer angenommenen Transfektionseffizienz von 100% einer minimalen MPP+-Anreicherung von  $2,61 \mu\text{M}$ . Gegenüber dem Medium wird MPP+ um den Faktor 26 in den Zellen angereichert.

### **Bestimmung des Km-Wertes für MPP+**

Für die Bestimmung des Km-Wertes wird die Aufnahme bei steigender Substratkonzentration gemessen. Hierbei ist es wichtig, dass echte Anfangsgeschwindigkeiten gemessen werden, da jede Substratanreicherung die Transportgeschwindigkeit wie in Abbildung 3.2.2.2. zu sehen ist vermindert. Mit dem vorangegangenen Versuch konnte verifiziert werden, dass nach einer

Minute Inkubationszeit das elektrochemische Gleichgewicht noch lange nicht erreicht ist, die Aufnahme verläuft in dieser Zeitspanne noch linear.

Der  $K_m$ -Wert ist eine wichtige kinetische Kenngröße für Transportsysteme. Er gibt an, bei welcher Substratkonzentration die halbmaximale Geschwindigkeit erreicht wird und zeigt somit, wie hoch die Affinität des Transporters zum jeweiligen Substrat ist. Der  $K_m$ -Wert ist unabhängig von der Zahl der exprimierten Transporter und erlaubt so einen direkten Vergleich verschiedener Transporter aus unterschiedlichen Versuchen. In Anlehnung an die bekannten  $K_m$ -Werte der orthologen Transporter wurde ein Konzentrationsbereich zwischen 10 und 1000  $\mu\text{M}$  gewählt.

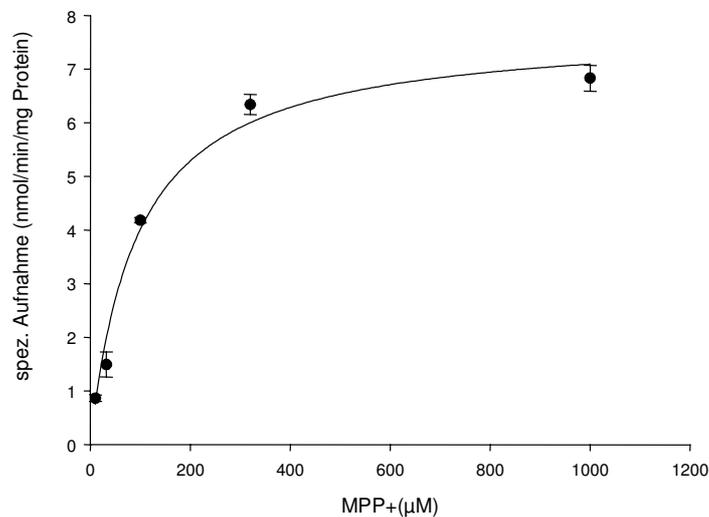


Abb. 3.2.2.3: Spezifische Aufnahme bei steigenden MPP<sup>+</sup>-Konzentrationen, Punkte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM, die Kurve wurde anhand der Einzelwerte an das Michaelis-Menten-Modell angepasst ( $v = v_{\text{max}} \cdot cS / K_m + cS$ ,  $v$  Initialgeschwindigkeit,  $v_{\text{max}}$  Maximalgeschwindigkeit,  $cS$  Konzentration des Substrates). Zu jeder Konzentration wurde je 3 Schälchen 293-EMTp und drei Schälchen 293-pcDSA3 gemessen, so dass für jede Konzentration die unspezifische Aufnahme (Aufnahme 294-pcDSA3) direkt berechnet werden konnte, die dann von der MPP<sup>+</sup>-Gesamtaufnahme der 293-EMTp-Zellen subtrahiert wurde.

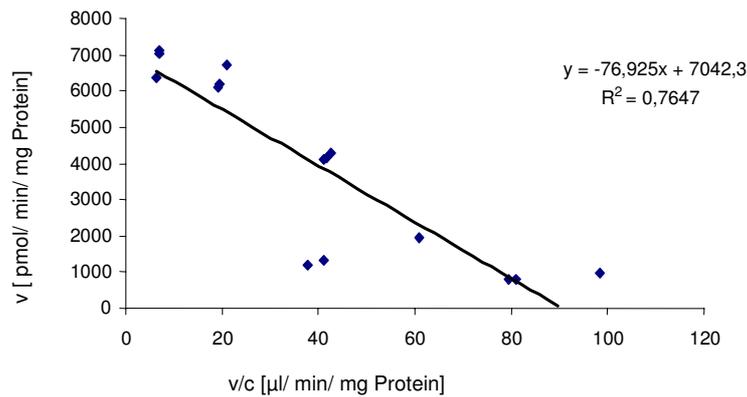


Abb. 3.2.2.4.: Linearisierung der Michaelis-Menten-Funktion nach Eadie-Hoffstee, aufgetragen ist die Initialgeschwindigkeit als Funktion des Quotienten  $v/c$ . Die Messpunkte verlaufen linear mit einem Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) von 0,7647.

Das Transportsystem ist sättigbar und erreicht eine Maximalaufnahmegeschwindigkeit ( $v_{max}$ ) von  $7,75 \pm 0,29 \text{ nmol/min} \cdot \text{mg Protein}$ . Der  $K_m$ -Wert liegt bei 94 (95% Konfidenzintervall 66- 120)  $\mu\text{M}$ . Dass die Messwerte tatsächlich dem einfachen Michaelis-Menten-Modell anzupassen sind, zeigt die Linearisierung. Die Messwerte liegen auf einer Geraden.

### **Bestimmung des $K_i$ - Wertes für Disprocynium24 (D24)**

Disprocynium24 ist der potenteste Hemmstoff für EMTh. Der IC-50-Wert ist die Hemmstoffkonzentration, bei der die Initialaufnahme eines Substrates um 50% reduziert ist. Der  $K_i$ -Wert gibt analog zum  $K_m$ -Wert an, mit welcher Affinität der Hemmstoff an den Transporter bindet. Aus der Michaelis-Menten-Gleichung kann die Beziehung zwischen  $K_i$ - und IC-50-Wert für einfache kompetitive Inhibitionsmodelle abgeleitet werden:  $\text{IC-50} = K_i \cdot (1 + cS/K_m)$ . Wählt man bei der Erstellung der Hemmkurve eine Substratkonzentration, die viel kleiner als der  $K_m$ -Wert des Substrates ist, wird  $\text{IC-50} = K_i$  und somit der  $K_i$ - Wert direkt aus den Hemmkurven ermittelbar. Zur Erstellung der Hemmkurven wird die Aufnahme von MPP+ (konstant  $0,1 \mu\text{M}$ ) nach 1min durch die Anwesenheit steigender D24-Konzentrationen gemessen. Die Initialaufnahme in Anwesenheit des Hemmstoffs wird relativ zur ungehemmten Aufnahme als Funktion der Hemmstoffkonzentration aufgetragen. Um den  $K_i$ -Wert von EMTh direkt mit dem von EMTh vergleichen zu können, wurde dieser parallel ermittelt. Eine 293-EMTh-Zelllinie war bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden.

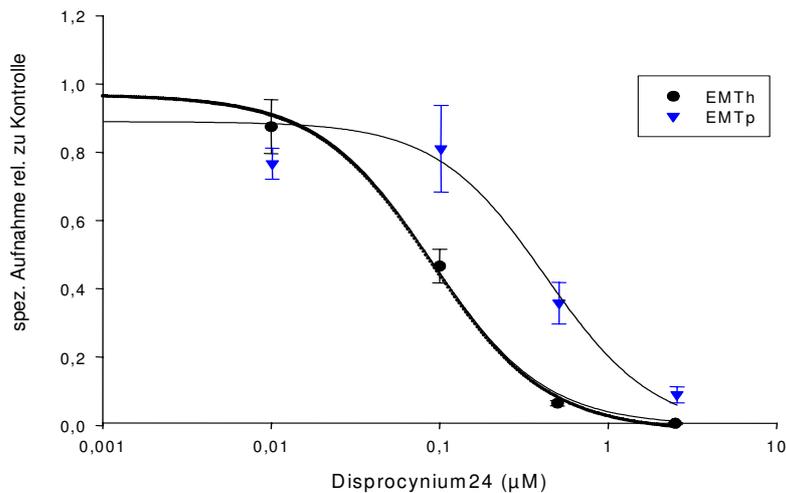


Abb. 3.2.1.5: Halblogarithmische Auftragung  $v_i/v$  als Funktion der D24-Konzentration für EMTp und EMTh zur Ermittlung des  $K_i$ -Wertes ( $v_i$ : Initialgeschwindigkeit in Anwesenheit des Hemmstoffs,  $v$ : Initialgeschwindigkeit). Die MPP<sup>+</sup>-Konzentration betrug konstant 0,1µM. Pro D24-Konzentration wurden je drei Schälchen 293-EMTp bzw. 293-EMTh gemessen. Der Hemmstoff wurde zur Gleichgewichtseinstellung 30min vor Zugabe des Substrates hinzugegeben. Zur Bestimmung der unspezifischen Aufnahme wurde die Gesamtaufnahme von jeweils drei Schälchen 293-pcDSA3 ohne und in Anwesenheit der höchsten Hemmstoffkonzentration gemessen. Sie betrug konstant  $0,255 \pm 0,014 \text{ pmol/min} \cdot \text{mg Protein}$ . Punkte repräsentieren jeweils Mittelwerte  $\pm$  SEM, die Einzelwerte wurden in Anlehnung an die Michaelis-Menten-Funktion nach  $y = a / [1 + (x/x_0)^b]$  angepasst. Hill- Koeffizient: EMTp:  $h = 1,34 \pm 0,063$ , EMTh:  $h = 0,97 \pm 0,04$ .

Der aus den Hemmkurven ermittelte  $K_i$ -Wert für Disprocynium24 beträgt bei EMTh  $88 \pm 15 \text{ nM}$  und stimmt gut mit dem Literaturwert von  $46 \text{ nM}$  (Gründemann et al., 2002) überein, die Aufnahme von MPP<sup>+</sup> ist durch D24 komplett hemmbar. Der ermittelte  $K_i$ -Wert bei EMTp beträgt  $415 \pm 158 \text{ nM}$  und ist damit etwas höher, auch ist die Aufnahme von MPP<sup>+</sup> bei der hier eingesetzten höchsten Konzentration von  $2,5 \mu\text{M}$  nicht vollständig hemmbar. Dieser Vergleich zeigt erste geringfügige Unterschiede zwischen EMTp und dem auf Aminosäureebene sehr ähnlichen EMTh auf.

### 3.2.3 Physiologische Substrate für EMTp: Monoamine

MPP<sup>+</sup> ist ein wie erwartet sehr gutes Substrat für EMTp (Abb. 3.2.2.1.), als Neurotoxin kommt es allerdings natürlicherweise nicht im Organismus vor. Die Untersuchung der

Transporteffizienz für physiologische Monoamine kann Aufschluß über die Funktion des Transporters geben. Die sehr hohen Aufnahmeraten für MPP<sup>+</sup> wurden als Vergleichswert herangezogen. Die Aufnahmen verschiedener möglicher Substrate wurde jeweils auf die MPP<sup>+</sup>-Aufnahme normiert, die parallel gemessen wurde. So konnten die Aufnahmen von Substanzen aus verschiedenen Versuchen direkt miteinander verglichen werden. Die Konzentrationen der getesteten Substanzen betrug 0,1µM und war somit nicht sättigend, die Aufnahmezeit betrug 1min.

### ***Aufnahme Histamin und Agmatin im Vergleich zu MPP<sup>+</sup>***

Histamin ist ein wichtiger Transmitter, Agmatin ist ebenfalls ein Amin, von dem angenommen wird, dass es als Neurotransmitter fungiert und indirekt die Zellproliferation hemmt (Babal et al., 2001; Satriano et al., 1998). Beide sind unter physiologischen Bedingungen positiv geladen und somit auf ein spezielles Transportsystem angewiesen.

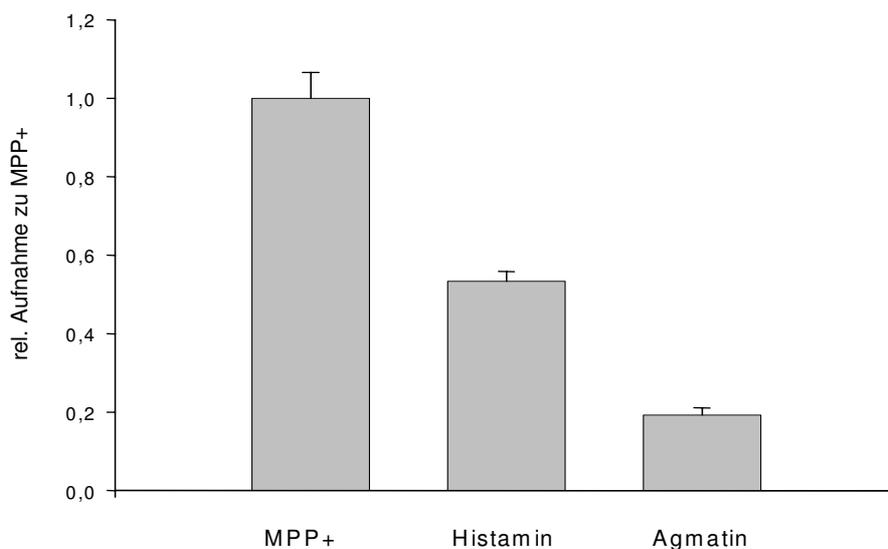


Abb. 3.2.3.1.: Relative Aufnahme von Histamin und Agmatin zu MPP<sup>+</sup>, alle Substanzen waren radioaktiv markiert, zur Ermittlung der spezifischen Aufnahme wurden für jede getestete Substanz drei 293-EMTp- und drei 293-pcDSA3 Schälchen gemessen. Alle Substanzen hatten eine Konzentration von 0,1µM, die Aufnahmezeit betrug 1min.

Nach Abzug der unspezifischen zeigt sich für beide Substanzen eine deutliche spezifische Aufnahme in die Zellen, sie sind somit Substrate für EMTp. Die Transporteffizienz ist

allerdings mit  $59 \pm 3 \mu\text{l}/\text{min} \cdot \text{mg}$  Protein für Histamin und  $21 \pm 2 \mu\text{l}/\text{min} \cdot \text{mg}$  Protein für Agmatin im Vergleich zu  $111 \pm 1 \mu\text{l}/\text{min} \cdot \text{mg}$  Protein für MPP+ merklich geringer.

### ***Aufnahme L-Noradrenalin und Cimetidin***

In einem Vorversuch war die Aufnahme von Noradrenalin im Vergleich zu MPP+ recht hoch, allerdings differierten die Werte stark, so dass der Versuch wiederholt und gleichzeitig parallel die Aufnahme in 293-EMTh-Zellen gemessen wurde. Die Aufnahmeraten für L-NA durch EMTh sind bekannt, so dass durch diese Kontrolle experimentelle Fehler ausgeschlossen werden konnten. Da Noradrenalin sehr schnell an der Luft/ in Lösung oxidiert, wurde der frisch angesetzten Lösung 1mM Ascorbinsäure als Oxidationsschutz hinzu gegeben. Noradrenalin abbauende Enzyme in der Zelle wurden nicht gehemmt, da die Metabolite radioaktiv markiert bleiben. Cimetidin ist ein klassisches organisches Kation, es wird therapeutisch als Histaminrezeptorblocker eingesetzt.

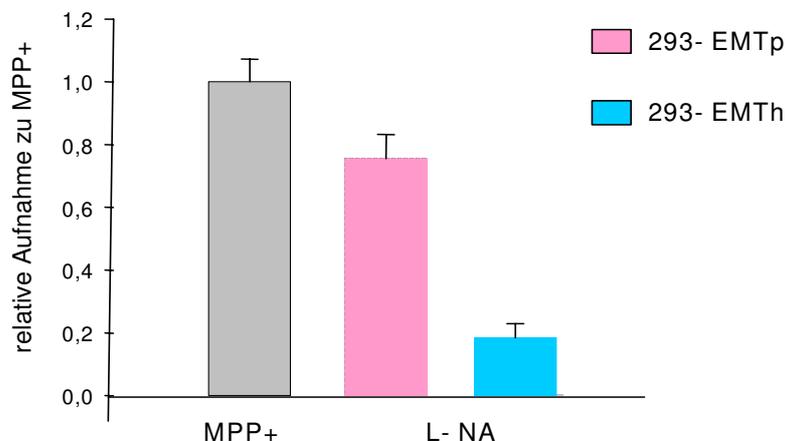


Abb. 3.2.3.2.: Spezifische Aufnahmeraten für Noradrenalin. Die spezifische MPP+-Aufnahme wurde parallel in beiden Zelllinien gemessen und als Vergleichswert herangezogen. Zur Bestimmung der unspezifischen Aufnahme wurden alle Substanzen an 293-pcDSA3-Zellen gemessen.

Die relative Aufnahme von Noradrenalin war in 293-EMTp- deutlich höher als in 293-EMTh-Zellen. Die Transporteffizienz für MPP+ war in den beiden Zelllinien unterschiedlich (EMTh:  $60,61 \pm 3,77 \mu\text{l}/\text{min} \cdot \text{mg}$  Protein; EMTp:  $37,25 \pm 2,67 \mu\text{l}/\text{min} \cdot \text{mg}$  Protein), außerdem war sie für EMTp verglichen mit den vorangegangenen Versuchen sehr niedrig. Der Grund für die Abnahme der MPP+-Aufnahme bei EMTp könnte am Alter der Zelllinie gelegen haben. Zum

Zeitpunkt dieses Versuchs waren die Zellen bereits vier Wochen ohne Selektionsdruck in Kultur. Während dieser Zeit könnten sich Zellen ohne Transporter vermehrt haben. Durch diese Zellen findet kein Transport statt, sie gehen aber in die Proteinbestimmung, die als Maß für die Transporterzahl herangezogen wird, mit ein und verfälschen somit das Ergebnis. Da in gepaarten Ansätzen für jede Zelllinie die MPP+-Aufnahmeraten gemessen wurde und alle anderen Aufnahmen auf diese normiert wurden, ist ein direkter Vergleich der beiden Zelllinien zulässig. Die Transporteffizienz für Noradrenalin beträgt  $28,11 \pm 2,87 \mu\text{l}/\text{min} \cdot \text{mg}$  Protein bzw.  $11,18 \pm 2,72 \mu\text{l}/\text{min} \cdot \text{mg}$  Protein für EMTp und EMTh.

Die Aufnahme von Cimetidin wurde parallel gemessen. Der Wert für die Gesamtaufnahme durch die 293-EMTh-Zellen lag mit  $0,72 \pm 0,04 \text{ pmol}/\text{min} \cdot \text{mg}$  Protein unterhalb des Wertes für die unspezifische Aufnahme durch die 293-pcDSA3-Zellen, dieser lag bei  $0,85 \pm 0,11 \text{ pmol}/\text{min} \cdot \text{mg}$  Protein. Die Gesamtaufnahme der 293-EMTp-Zellen betrug  $0,87 \pm 0,04 \text{ pmol}/\text{min} \cdot \text{mg}$  Protein und ist damit kaum von der unspezifischen zu unterscheiden. Die Aufnahme von Cimetidin durch EMTh wurde bereits untersucht (Gründemann et al., 1999), die dort erreichten Werte für die Gesamtaufnahme sind nicht höher, jedoch ist die unspezifische Aufnahme merklich geringer. Die hier gemessene unspezifische Aufnahme scheint unverhältnismäßig hoch zu sein. Ein dafür in Frage kommender experimenteller Fehler ist beispielsweise eine vergleichsweise größere Zelldichte auf den 293-pcDSA3-Platten.

### ***Km- Wert- Bestimmung für L-NA in 293-EMTp-Zellen***

Für Noradrenalin wurde zusätzlich der Km-Wert bestimmt, da hier die relative Transporteffizienz markant höher war als erwartet. Noradrenalin-Aufnahmen wurden in einem Konzentrationsbereich von  $10\text{-}1000 \mu\text{M}$  nach einer Minute gemessen.

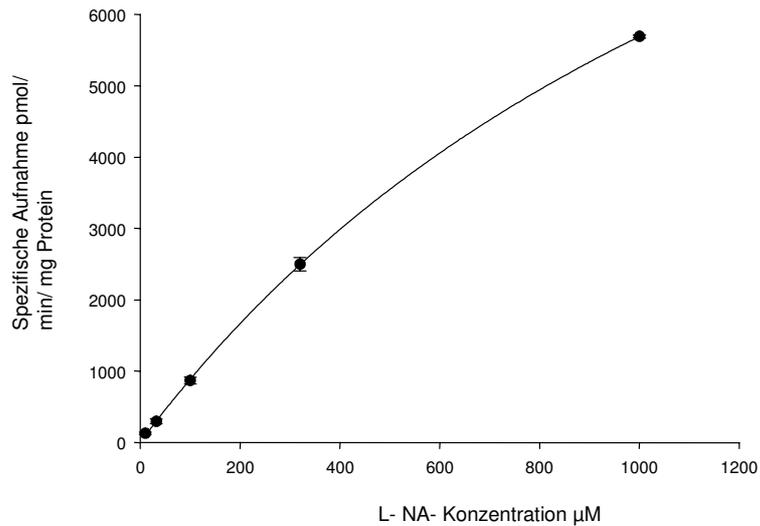


Abb. 3.2.3.3.: Spezifische Noradrenalinaufnahme als Funktion steigender Noradrenalinkonzentrationen. Pro Konzentration wurden 3 Schälchen mit 293-EMTp-Zellen gemessen. Die unspezifische Aufnahme wurde für zwei NA-Konzentrationen mit jeweils drei 293-pcDSA3-Schälchen bestimmt, die unspezifische Aufnahme stieg linear mit steigender Konzentration, Steigung 0,8,  $R^2 = 0,999$ . Punkte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM der drei Einzelmessungen, die Kurve wurde an die Einzelmessungen nach der Funktion  $y = a \cdot x / (b + x)$  in Anlehnung an die Michaelis- Menten- Gleichung  $v = v_{\text{max}} \cdot cS / (K_m + cS)$  angepasst.

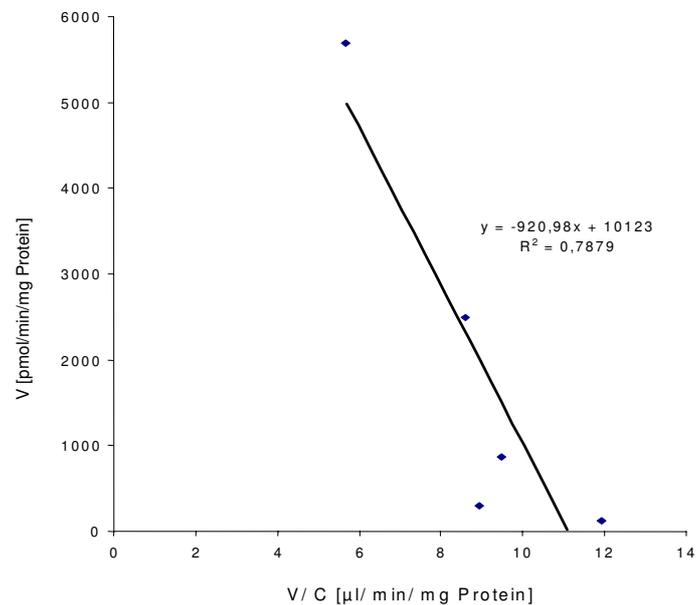


Abb. 3.2.3.4.: Linearisierung der Michaelis-Menten-Gleichung nach Eadie-Hoffstee. Die spezifische Aufnahme ist als Funktion des Quotienten  $v/cS$  aufgetragen. Die Mittelwerte der Einzelmessungen ergeben eine Gerade mit  $R^2 = 0,7879$ .

Der ermittelte  $K_m$ -Wert für Noradrenalin beträgt 1528 (95% Konfidenzintervall 1247-1818) $\mu$ M, die maximale Aufnahmerate  $14,4 \pm 0,8$  nmol/min\*mg Protein. Laut Literatur beträgt der  $K_m$ -Wert von EMTh für Noradrenalin 510 (95% Konfidenzintervall 360- 730)  $\mu$ M und ist damit um den Faktor drei kleiner. Die Affinität von EMTp zu Noradrenalin ist somit kleiner. Dieser Befund widerspricht nicht den Ergebnissen des vorherigen Versuchs, da eine erhöhte Transporteffizienz nicht zwingend eine höhere Affinität zum Substrat voraussetzt. Die Transporteffizienz ist auch ein Ausdruck für die Wechselzahl des Transporters, diese scheint bei EMTp größer zu sein als bei EMTh für das hier untersuchte Substrat.

### 3.2.4 Die Aufnahme von Acetylcholin durch EMTh und EMTp

Auch die Aufnahme von Acetylcholin wurde untersucht, da eine mögliche Rolle von EMT bei der Freisetzung von Acetylcholin aus der Plazenta diskutiert wird (Wessler et al., 2001b). Acetylcholin lag nicht radioaktiv vor, nach Lyse der Zellen wurde die Substanz über LC-MS/MS (s. Material und Methoden) detektiert und quantitativ bestimmt. Auch hier betrug die Aufnahmezeit 1min, die Konzentration  $10\mu$ M. Die Aufnahme von Acetylcholin wurde parallel für 293-EMTh-Zellen gemessen, auch für diesen Transporter wurde die Aufnahme bisher noch nicht untersucht.

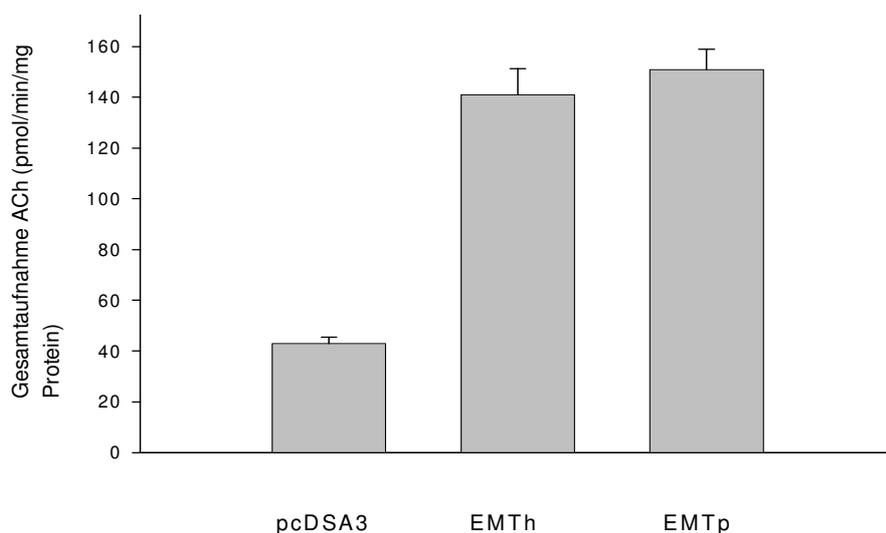


Abb. 3.2.4.1.: Aufnahme von Acetylcholin durch EMTh und EMTp verglichen mit 293-pcDSA3-Zellen. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Pro Zelllinie wurde drei Schälchen untersucht. Zelllinien, die EMT exprimieren, weisen eine deutliche höhere Aufnahme als Zellen mit Leervektor auf.

Die initiale Aufnahmegeschwindigkeit für Acetylcholin betrug bei EMTh  $14 \pm 1 \mu\text{l}/\text{min} \cdot \text{mg}$ , bei EMTp  $15 \pm 0,8 \mu\text{l}/\text{min} \cdot \text{mg}$  Protein. Zellen mit Leervektor wiesen eine Aufnahme von  $4 \pm 0,2 \mu\text{l}/\text{min} \cdot \text{mg}$  Protein auf, somit lag die durch die Transporter vermittelte Aufnahme deutlich über die unspezifische. Beide Transporter akzeptieren Acetylcholin als Substrat.

### 3.2.5 Substratscreening für EMTp

Mit LC-MS ist eine breite Substratsuche möglich. Für das Screening wurden 293-EMTp/-pcDSA3-Zellen verschiedene Organhomogenate sowie herkömmliches Zellkulturmedium (DMEM/FCS) für 30min angeboten. Mit Hilfe des in der Arbeitsgruppe entwickelten Verfahrens *difference shading* (s.Material und Methoden) sollte es möglich sein, Aufnahmeunterschiede zwischen beiden Zelllinien zu detektieren. Da die einzelnen vorher nicht bekannten Substanzen durch die LC-MS bereits nach Masse zu Ladungsverhältnis aufgetrennt wurden, ist die Masse der Substanz, die lediglich von der Zelllinie mit Transporter aufgenommen wird, bekannt. Dies erlaubt eine weitere Analyse dieser Substanz. So können durch Fragmentierung der Substanz weitere Indizien für die Identifizierung der Substanz und damit für weitere mögliche physiologische Aufgaben des Transporters gesammelt werden.

Gewebestücke aus Aorta, Leber, Niere und Plazenta vom Schwein wurden in KRH homogenisiert und den Zellen mit und ohne Transporter für 30Min angeboten. Desweiteren wurde den Zellen für 24h herkömmliches Zellkulturmedium (DMEM/FCS 10%) angeboten. Nach Lyse der Zellen wurde ein Massenspektrum aufgenommen und dieses dann zwischen beiden Zelllinien verglichen. Die folgende Abbildung macht Unterschiede in den verglichenen Massenspektren farblich deutlich. Blau markierte Flächen weisen auf eine erhöhte Aufnahme einer Substanz durch die 293-EMTp-Zellen hin. Beim Vergleich der beiden Zelllinien, die nur mit Zellkulturmedium inkubiert wurden, zeigte sich ein deutlicher Aufnahmeunterschied bei allen Paaren.

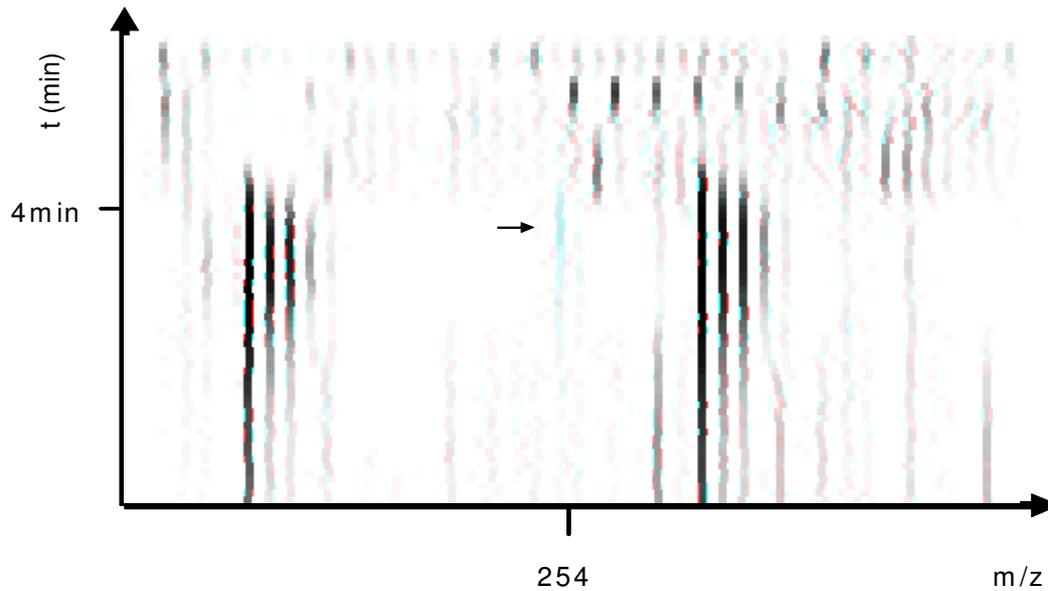


Abb. 3.2.5.1. Vergleich des aufgenommenen Substanzspektrums zwischen 293-pcDSA3- und 293-EMTp-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit DMEM/FCS 10% mittels difference shading. Bei allen drei Paaren ist jeweils ein deutliches Signal bei  $m/z$  254 nach einer Retentionszeit von 4min sichtbar. Da die Ladung ( $z$ ) 1 betrug, entsprach dies einer durch die 293-EMTp-Zellen aufgenommenen Masse von 254g/mol.

EMTp-exprimierende Zellen nehmen eine Substanz einer Masse von 254g/mol auf. Die bisher bekannten EMT-Substrate weisen allesamt niedrigere Massen auf. Dieser Versuch gibt somit einen ersten Hinweis auf ein bisher noch nicht bekanntes EMT-Substrat.

### **3.3 Inverse PCR zur Amplifikation des Kernpromotors**

Die inverse PCR ist ein elegantes Verfahren, unbekannte Sequenzabschnitte, die neben bekannten Abschnitten liegen, zu amplifizieren. Beide Primer passen perfekt auf die Zielsequenz, was eine spezifische Amplifikation in der PCR gewährleistet.

In meiner Arbeit habe ich dieses Verfahren für den Versuch, den stromaufwärts vom Startcodon gelegenen EMTp-Promotor zu amplifizieren, angewandt. Die Promotorsequenz erlaubt einen Vergleich mit den entsprechenden orthologen Sequenzen und somit die Identifizierung hoch konservierter Promotorbereiche. Diese Bereiche liefern den ersten Hinweis auf eine mögliche regulatorische Funktion.

#### **3.3.1 EMTp**

##### ***Auswahl des Materials, Primerdesign und Auswahl der Restriktionsenzyme***

Genomische DNA aus der Schweinezelllinie LLCPK1 diente als Ausgangsmaterial.

5 Primerpaare (s. Material und Methoden) wurden ausgehend von der vorliegenden EMTp-cDNA-Sequenz abgeleitet. Die genomische DNA wurde parallel mit insgesamt 6 Restriktionsenzymen (HincII, SmaI, Bsh, Bss, BstBI, DsaI und SacII) verdaut. Dabei existiert grundsätzlich die Schwierigkeit, dass die Erkennungsschnittstellen der Enzyme im unbekanntem Sequenzabschnitt nicht vorauszusagen sind. Dadurch ist auch die gewünschte Fragmentgröße für die Selbstligation nicht steuerbar. Es wurden Restriktionsenzyme gewählt, deren Erkennungssequenzen im bekannten ORF nicht zu häufig vertreten sind und die die EMTp-cDNA innerhalb des ersten Exons schneiden. Sowohl glatte als auch klebrige Enden produzierende Enzyme wurden eingesetzt.

##### ***PCR***

Der EMTh-Kernpromotorbereich sowie Exon1 liegen innerhalb einer CpG-Insel, eine Region mit einem sehr hohen GC-Gehalt und einer großen Zahl von CpG-Dinukleotiden (Gründemann and Schomig, 2000). Die EMTp-cDNA ist der EMTh-cDNA sehr ähnlich (s.

Ergebnis-Anhang) und auch bei EMTp ist Exon1 sehr GC-reich. Dies gilt wahrscheinlich auch für den EMTp-Promotor, dies erschwert die Amplifikation in der PCR (s. 3.1.4.D).

Bei 55°C unter Zugabe von DMSO wurden zwar Banden erzeugt, diese waren jedoch bei näherer Untersuchung (Sequenzierung oder PCR unter identischen Bedingungen mit Zugabe von linearisierter genomischer DNA statt zirkulärer) unspezifisch. Bei stringenteren Reaktionsbedingungen wurden keine PCR-Produkte erzeugt.

### **3.3.2 OCT2p**

Um auszuschließen, dass das Verfahren in der Durchführung Mängel aufweist, die das Misslingen verursachen, wurde ein Stück des Promotorbereiches eines anderen Transportergens mittels inverser PCR amplifiziert und sequenziert. OCT2 (*organic cation transporter2*) ist ein Transporter aus der gleichen Familie wie EMT, die Sequenz dieses Transporter ist für die hier untersuchte Spezies bekannt, so konnte das identische Ausgangsmaterial verwandt werden.

#### ***Auswahl des Materials, Primerdesign und Auswahl der Restriktionsenzyme***

Für diesen Kontrollversuch wurde die identische DNA verwandt, genomische DNA aus LLCPK1-Zellen. Von der bekannten DNA-Sequenz des Transportergens konnten auch hier perfekt passende Primer abgeleitet werden. Im Gegensatz zum EMTp-Ansatz war es nun hier möglich, optimale Restriktionsenzyme zu wählen, die Fragmente um 1000bp des interessierenden Bereichs produzierten. Dies ist eine Länge, mit der die nachfolgende Selbstligation sowie die PCR unproblematisch sind.

Ausgewählt wurden die Enzyme DsaI sowie PstI, ersteres produzierte ein OCT2p-Fragment, welches sich von Position -63 bis Position -1149, zweites eines zwischen Pos -37 und -1010 erstreckt. Innerhalb dieses Bereichs lagen die entgegengesetzt gerichteten Primer.

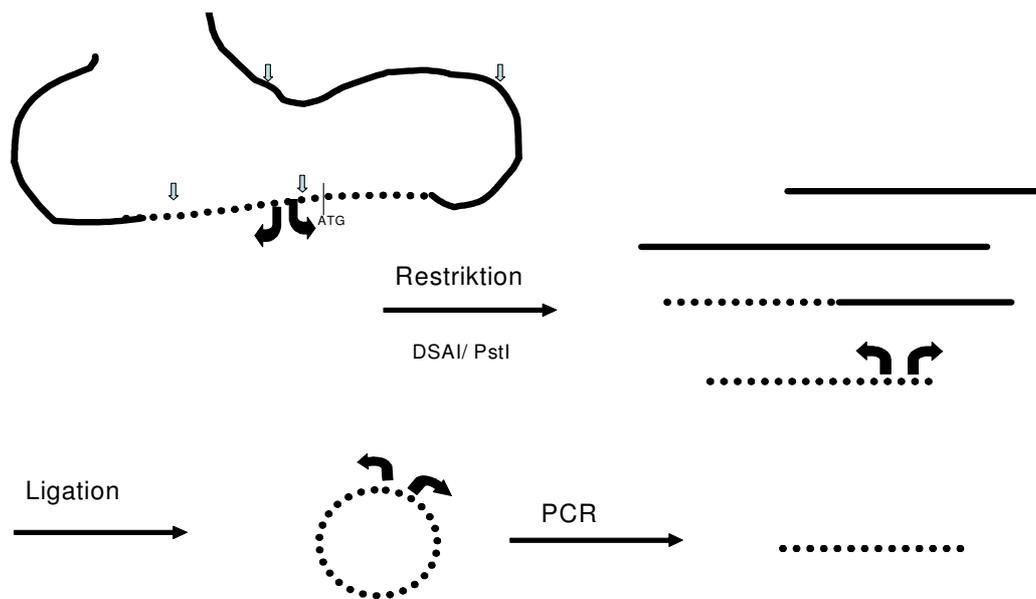


Abb. 3.3.2.1.: Schematische Darstellung der Amplifikation eines Teils des OCT2p-Promotors via Inverser PCR. Die OCT2p-Sequenz ist bekannt, so dass hier gezielt Restriktionsenzyme ausgewählt werden konnten, die ein ca. 1000bp langes Fragment aus dem Promotorbereich schneiden. Innerhalb dieses Stückes wurden Primer mit entgegengesetzter Orientierung abgeleitet. Nach Ligation der verdauten Fragmente konnte via PCR das Promotorfragment amplifiziert werden. Dieser Versuch diente als Kontrolle. Gestrichelte Linie: OCT2pGen innerhalb des Schweinegenoms.

### PCR und Sequenzierung

Die Fragmente wurden nach Aufreinigung verdünnt und ligiert (s. MM).

Nach Ligation erfolgte die PCR, dabei wurden identische Mengen zum EMTp-Versuch eingesetzt.

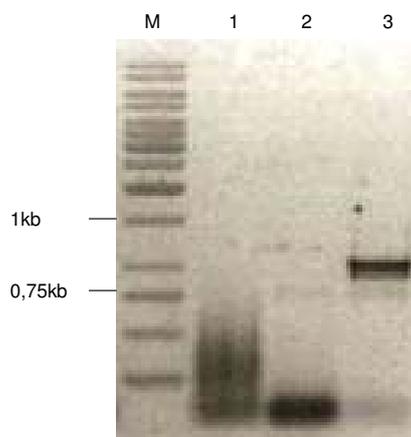


Abb. 3.3.2.2.: Inverse PCR zur Amplifikation des OCT2p-Promotors. Bahn 1 ist das Ergebnis einer PCR, in die als DNA-Matrize nicht ligierte DNA als Kontrolle eingesetzt wurde, Bahn 2 ist die Nullprobe mit Wasser, Bahn 3 ist das Ergebnis der PCR mit ligierter DNA. Die Bande wurde ausgeschnitten und direkt sequenziert.

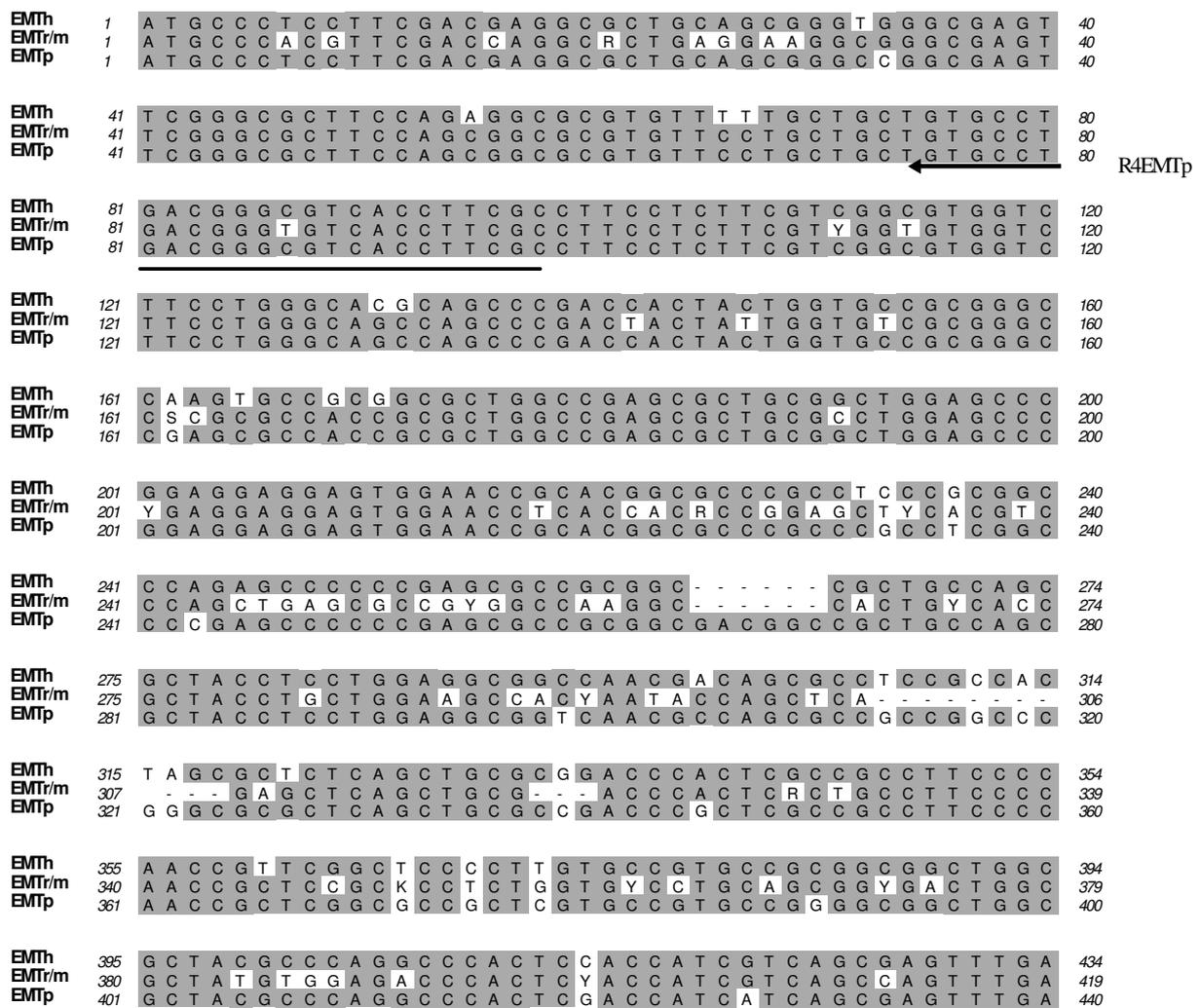
Die Sequenzierung mit den Amplifikationsprimern ergab eine 100%ige Ähnlichkeit zur veröffentlichten OCT2p-Sequenz.

Mit diesem Versuch wurde verifiziert, dass das Verfahren an sich realisierbar, angewandt auf die Amplifikation des EMTp-Promotors jedoch nicht erfolgreich war. Unter sieben verschiedenen Restriktionsenzymen sollte eines dabei sein, das stromaufwärts vom Startcodon in einem vernünftigen Abstand zur bekannten Schnittstelle innerhalb des ORFs schneidet. Es ist trotzdem möglich, dass diese Zahl nicht ausreicht.

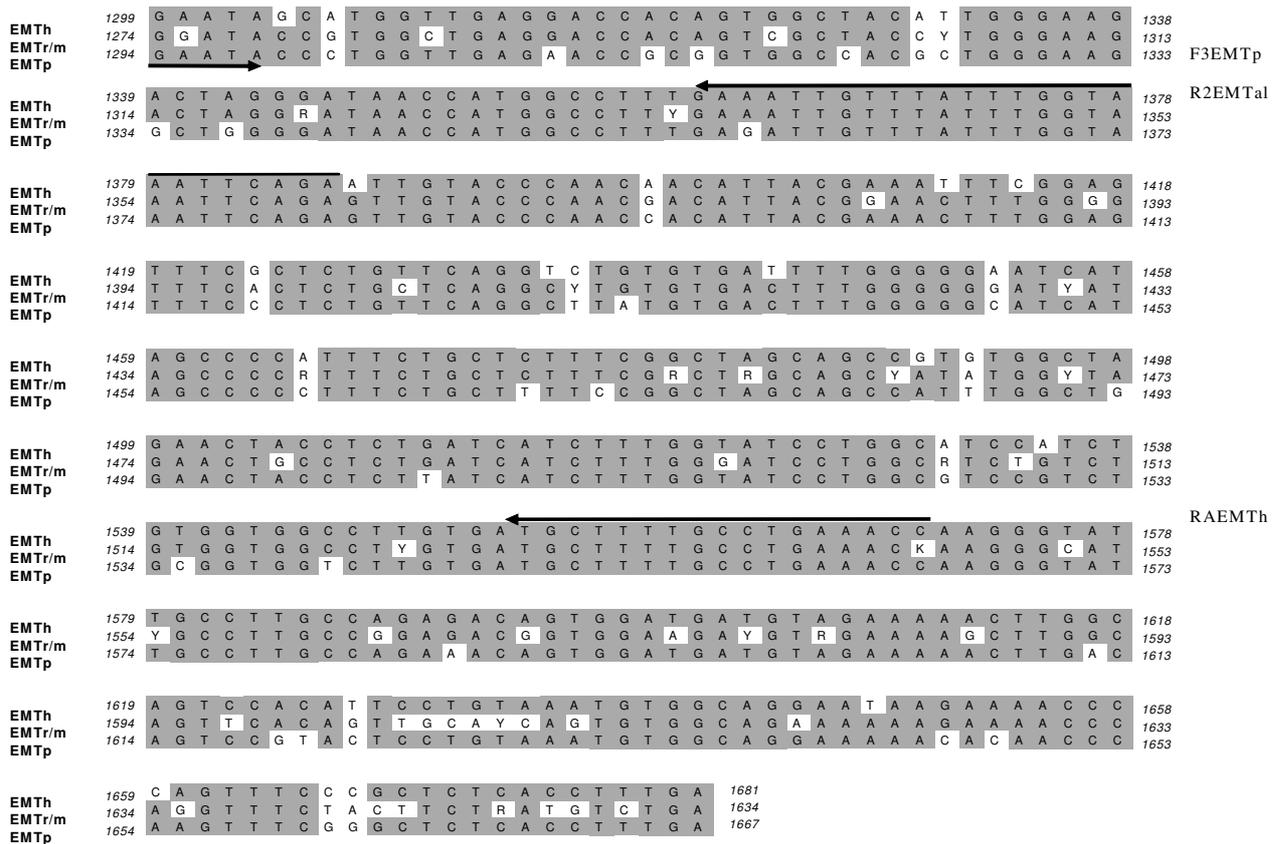
### 3.4 Ergebnisse- Anhang

#### 3.4.1 cDNA-Alignment EMTp, -h, -m, -r

Die folgende Abbildung zeigt die klonierte EMTp-Sequenz im Vergleich mit den anderen orthologen Transportern auf Nukleinsäureebene. Mittels Pfeile sind die Primer zur Amplifikation des EMTp-ORF eingetragen. Pfeile oberhalb der Sequenzen symbolisieren die aus einem Alignment stammenden Primer, jene unmittelbar unterhalb der EMTp-Sequenz die EMTp-spezifischen Primer.



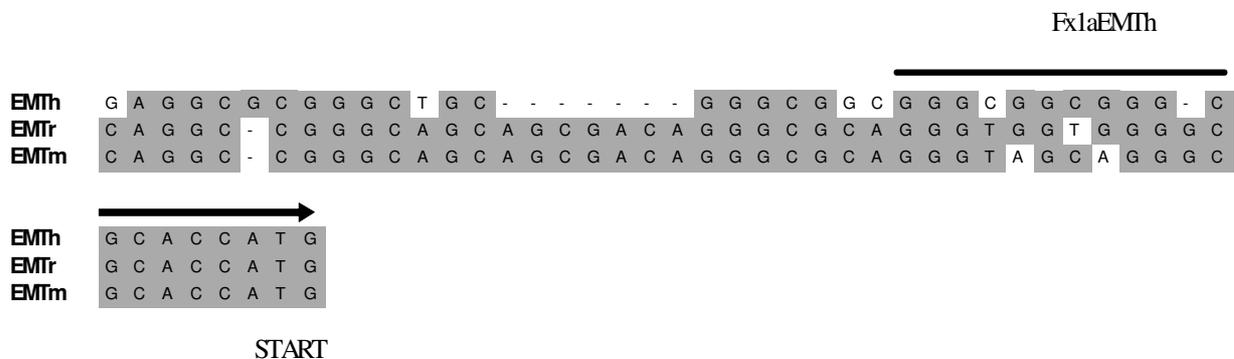
EMTh	435	C C T T G T C T G T G T C A A A T G C G T G G A T T G C T G G A C C T C A C C C A A A	474
EMTr/m	420	C C T T G T C T G T G T C R G C A A Y G C C T T G G A T T G C T T G G A C C T C A C C C A A A	459
EMTp	441	C C T C G T G T G T G T G A C A A T G C C T T G G A T T G C T T G G A C C T C A C C C A A A	480
			FEMTh
EMTh	475	G C C A T C C T G A A C C T C G G C T T C C T G A C T G G A G C A T T C A C C T	514
EMTr/m	460	G C C A T C Y T G A A C C T T G G C T T C C T G G C T G G G G C T T T T A C C T	499
EMTp	481	G C C A T C C T C A A C C T G G G C T T C C T G G C T G G G G C T T T C A C C T	520
		→	
EMTh	515	T A G G C T A T G C A G C A G A C A G G T A T Y G G C A G G A T C G T C A T T T A	554
EMTr/m	500	T G G G C T A T G C A G C G G A C A G A T A Y G G C A G G C T C A T C R T T T A	539
EMTp	521	T G G G C T A C G C A G C G G A C A G T A C G G A C G A A T A G T C A T T T A	560
EMTh	555	C T T G C T A T C C T G C C T T G G T G T T G G C G T C A C C T G G G G T T G T G	594
EMTr/m	540	C T T A A T A T C C T G T T C G G C G T T G G C A T C A C R G G A G T Y G T G	579
EMTp	561	C T T A A T A T C C T G C C T C G G T T G G C G T T G G C A T C A C C G G G C T Y G T G	600
EMTh	595	G T G G C C T T T G C A C C A A A C T T C C C T G T G T T T G T G A T C T T C C	634
EMTr/m	580	G T G G C R T T T G C R C C R A A A T T T T T C T G T G T T T G T G A T Y T T C C	619
EMTp	601	G T G G C A T T T G C A C C C A A A T T T C C C T G T G T T G T G T G T G T C T C C	640
		→	F2EMTpnb
EMTh	635	G C T T C C T G C A A G G T G T A T T T G G A A A G G G G A C G T G G A T G A C	674
EMTr/m	620	G C T T C C T R C A A G G R G T G T T T G G A A A G G G G G C C C T G G A T G A C	659
EMTp	641	G C T T C C T C C A A G G C G T G T T T G G A A A G G G A A C A T G G A T G A C	680
EMTh	675	T T G C T A C G T G A T T G T G A C A G A A A T A G T A G G T T C G A A A C A A	714
EMTr/m	660	T T G C T T Y G T G A T Y G T G A C A G A A A T A G T T G G T T C R A A A C A R	699
EMTp	681	A T G C T A C G T G A T T G T G A C G A A A T A G T A G G T T C G A A G C A A	720
EMTh	715	A G G A G G A T T G T G G G A A T C M G T G A T T C C A A A T G T T C T T T A C C C	754
EMTr/m	700	A G G A G G A T T G T G G G A A T C M G T G A T T C C A G A T G T T C T T C A C C C	739
EMTp	721	A G A A G G A T T G T G G G A A T A G T G A T T C A A A T G T T C T T C A C C T C	760
EMTh	755	T T G G A A T C A T A A T T C T C C C T Y G G A A T T G C C T A C A T T C A T C C C	794
EMTr/m	740	T C G G R A T C A T Y A A T T K C C Y G G R A T T G C C T A C T T C A C S C C	779
EMTp	761	T T G G A A T C A T A A T C C T C C C G G A A A T T G C C T A C T T T A T C C C	800
EMTh	795	C A A C T G G C A A G G A A T C C A G T T A G C C A T C A C G C T G C C C A G C	834
EMTr/m	780	C A G C T G G C A G G G C A T C C A G C T A G C C A T M T C K C T G C C Y A G C	819
EMTp	801	C A A C T G G C A A G G G A T C C A G C T G G C C A T C A C G C T G C C C A A C	840
		→	F1EMTal
EMTh	835	T T T C T C T T C C T C C T T T A T A C T G G G T G G G T C C C T G A G T C T C	874
EMTr/m	820	T T T C T C T T C C T C C T Y T A T T A C T G G G T G G G T C C C T G A G T C T C	859
EMTp	841	T T T C T C T T C C T C C T T T A T T A C T G G G C G G T C C C C G A A T C T C	880
EMTh			875
EMTr/m			860
EMTp			881
		C C C G T T G G C T G A T T	888
		C C C G C T G G C T G A T T C	873
		C C C G C T G G C T G T T	894
EMTh	889	A C T C G G A A G A A A G G A G A T A A A G C A T T A C A G A T C C T G A G A C	928
EMTr/m	874	A C C C G G A A G C A R G G A G A G A A A G C C T T G C A A A T C C T G A G G C	913
EMTp	895	A C T C G G A A G A A A G G A G A T A G A G C C T T A A A A T C C T G A G A	934
EMTh	929	G C A T T G C T A A G T G C A A A T G G G A A A T A C C C T C T C A T C A A A T T A	968
EMTr/m	914	G Y G T G G C T A A G T G C A A A T G G R A A A A C A C C T C T C R T C A A A T T A	953
EMTp	935	G C A T T G C C A A A T G C A A A T G G G A A A T A T C T C T G C C A A A C T A	974
		→	R1EMTp
EMTh	969	C T C A G A G A T C A C A T G T T A C A G A T G A A G G A A G T T A G T A A T C C A	1008
EMTr/m	954	C T C A G A G A T C A C A A G T T A C A G A T G A A G G A R G T C A G A R G T C C C A	993
EMTp	975	C A C G A G A T C A C A C T G T T A C C G A T G A A G G A G G T T A G C A A T C C A	1014
		→	F1EMTp
EMTh	1009	T C C T T T T A G A T C T G G T G A G A A C T C C C A A A T G A G G A A A T	1048
EMTr/m	994	T C C T G T T T A G A C C T T G T G A G R A C T C C C A A A T G A G G A A R T	1033
EMTp	1015	T C C T T T T A G A T C T G T G T G A G G A A C T C G C C A A A T G A G G A A G T	1054
EMTh	1049	G C A C A C T T A T T C T T A T G T T T G C T T G G T T C A C A A G C G C A G T	1088
EMTr/m	1034	G C A C R C A T Y C T Y A T G T T G C T T G G T T C A C R A G Y G C C G T	1073
EMTp	1054	G C A C G C T T A T A C T Y A T G T T T G C T T G G T T C A C G A G G C G T G T	1094
		→	R3EMTp
EMTh	1089	G G T G T A T C A A C G A C T T G T C A T G C G C C T G G G A A T T A T A G G G	1138
EMTr/m	1074	G G T G T A Y C A A G G A C T T G T C A T G C G C C T G G G A C T Y A T C G G A	1113
EMTp	1095	G G T G T A T C A A G A C T C G T C A T G C G C C T G G G A A T T A T A G G A	1134
			R1EMTal
EMTh	1139	G G C A A C C T C T A T A T A G A C T T T T C A T C T C G G G C G T G G T G G	1178
EMTr/m	1114	G G C A A C C T C T A C A T R G A C T T C T T T A T C T C K G G G C T C G T G G	1153
EMTp	1135	G G C A A C C T C T A T A T T G A C T T T T T C A T C T C G G G A G T G T G G	1173
EMTh	1179	A A C T G C C A G G A G C T C T C T T G A T C T T A C T A A C C A T T G A G C G	1218
EMTr/m	1154	A G C T G C C C G G A G C T C T C T T R A A T C C T T C T G A C C A T T G A G C G	1193
EMTp	1174	A A C T G C C A G G A G C C C T C T T G A T C C T A T T A A C C A T C G A G C G	1213
EMTh	1219	C C T T G G A C G A C G C C T C C C C T T T G C G G C A A G C A A T A T A G T G	1258
EMTr/m	1194	G C T T G G A C G A C G C C T T C C C C T T T G C S G C A A G C A A T A T A G T G	1233
EMTp	1214	T T T C I G G T C G A C G C C T A C C C T T T G C C G C A A G C A A T A T A G T G	1253
EMTh	1259	G C A G G G T G G C A T G C C T T G T C A C T G C G T T C T T A C C A G A A G	1298
EMTr/m	1234	G C A G G G T G G T C G T G T G T G T C A C T G C M T T T T A C C A G A A G	1273
EMTp	1254	G C A G G A G T G G C A T G C C T T G T C A C T G C G T T C T T A C C A G A A G	1293



### 3.4.2 Lage der Primer zur Amplifikation des 5'- und 3'-ORFs

Die folgenden Abbildungen zeigen Alignments der 5'-untranslatierten Region (UTR) sowie der 3'-UTR zur Ableitung der Primersequenzen.

#### 5'-UTR



3'-UTR

		STOP ←	
EMTh	A A A A C C C C A G T T T C C C G C T C T C A C C T T T G A G G C C C C C G A C		R3EMTaI
EMTm	A A A A C C C C A G G T T T C T A C T T C T G A T G T C T G A G G C C C C T G T G		
EMTr	A A A A C C C C A G G T T T C T A C T T C T A A T G T C T G A G G C C C C T G A G		
EMTh	A - A A G A C A G A A A G A A G G A G C T A T C C A G G A G C T G A T - - C C T		
EMTm	T - T G C C T G G A G G A C C A G A G A A G A C T G G A A T A T G - - - C C T		
EMTr	T C T G C C T G G A A G A C C A C A G A A G C T G A G C T T G G A A T A T G C C		
EMTh	C C T T G C A A A G C T G T G C C T T G C A G A G A T G C A C G T G T G C A T T		
EMTm	G T G C A G T G T G C T T C G C C T C C T C T A G G T G - - - - G C G C C C T		
EMTr	T T G C A G T G T G C T T C A C C T C C T C T A G G T G - - - - G C G C C G T		
EMTh	T C A G C T A C A T C A T G C C G C G C T G T T G T A A T A C T G T A T A A A G	←	R5EMTaI
EMTm	T C C A A G G A A C C G T A - - A A G A T T T C G G A G T A T T T A T A A A G G		
EMTr	T C C A A G G A A C C G T A - - A A G A T T C C A G A G T A T T T A T A T G G		
EMTh	A C C T C A A T C T A T C C A G A G T A T T T T A T A T A A A T G T T G G A T G	←	R6EMTaI
EMTm	T A T A A G A T G A A G A T T T A T C A T G C T G C C C A A G C T T C G G G G A		
EMTr	A A T A A G A T A A A G A T T T A T C A T G C T A C C C A A G C T T C T G G G A		
EMTh	A G T T A G G A T T T G T A A T G C T G T T - - G A A G T T T C T G G G A A C	←	R4EMTaI
EMTm	A C A C A T A A T C T T G G A C C T G T T T C A T G A A G A C C C A G T A G G T		
EMTr	A C A C A T A A C C T T T G A C C T C T T T A G C A A A G A T C C A G T A G G T		
EMTh	A C A T A A T A T G T A G C C		
EMTm	A C C G G A T T C T G G C T A G G T T C T C A T T C A G C A A G T C T C T C A		
EMTr	A C A C A G A T T C T G C C T A G G T T C T C T T T C A T T T G G A C C A A T G		

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Extraneuronale Monoamin-Transporter (EMT) aus einer neuen Spezies kloniert und heterolog exprimiert. Diese Daten können nun dazu herangezogen werden, die Sequenz und erste Transportercharakteristika mit denen der orthologen zu vergleichen. Ein Vergleich des Substratspektrums gibt wichtige Hinweise zur Identifizierung universal transportierter Substanzen, die mehr Einblicke in die physiologische und pathophysiologische Rolle des Transporters geben können. Dies ist besonders angesichts der Fülle der erwiesenermaßen und möglicherweise transportierten Substanzen von Bedeutung. Der Vergleich der Aminosäuresequenz mit eventuellen Unterschieden in einzelnen Aufnahmecharakteristika können erste Hinweise zur Untersuchung der Struktur- Funktion-Beziehung liefern.

Die Suche nach neuen Substraten ist grundlegend für das Verständnis über die Funktion eines Transporters.

### 4.1 Strukturvergleich

#### *EMT ist hoch konserviert*

Der codierende Bereich des orthologen Schweinetransporters ist 1677bp lang und weist eine bemerkenswerte Ähnlichkeit zum menschlichen EMT auf. Die Identität zwischen beiden Transportern beträgt auf Nukleinsäureebene 89%. Im Vergleich dazu ist sie bei OCT2, einem nah verwandten Transporter, zwischen den gleichen Spezies 85%. Erst kürzlich und nach Abschluss des experimentellen Teils dieser Arbeit wurde der EMT des Hundes kloniert und sequenziert (NCBI, genomische Sequenz NW\_139836), auch hier beträgt die Identität 89% zu EMTp und EMTh. Die Identität auf Aminosäureebene beträgt zwischen EMTp, EMTh und dem orthologen des Hundes 95%. Der Vergleich der orthologen Transporter identifiziert EMT zumindest den codierenden Bereich betreffend als hoch konserviertes Gen.

Auf Nukleinsäureebene weist EMTp einige typische Eigenschaften bezüglich der Nukleinsäurezusammensetzung auf. Für EMTh, dessen Genstruktur eingehend untersucht wurde (Gründemann and Schomig, 2000) zeigte sich, dass sich sowohl Kernpromotor als auch Exon1 innerhalb von sogenannten „CpG-Inseln“ befinden. CpG-Inseln werden von einer

Anhäufung von CpG-Dinukleotiden (das p steht dabei für die Phosphat-Gruppe, die die beiden Nukleotide verbindet) gebildet und kommen im Genom der Vertebraten weit weniger häufig vor als statistisch erwartet (Gardiner-Garden and Frommer, 1987). Ihre Funktion ist noch nicht in allen Details geklärt, sicher ist jedoch, dass die Methylierung von CpG-Dinukleotiden die Genaktivität beeinflusst. Gehäuft kommen CpG-Dinukleotide in den Promotoren von Haushalts-Genen vor. Eine Anhäufung von CpG-Dinukleotiden lässt sich auch bei EMTp zumindest in den ersten 400bp beobachten. Der GC-Gehalt ist in diesem Bereich sehr hoch und beträgt 79% und hat die Amplifikation erheblich erschwert. Die Klonierung von EMTp bestätigte die konservierte kuriose Genstruktur im kodierenden Bereich, dessen genaue Funktion und Bedeutung weiterer Untersuchung bedarf.

Neben der gezeigten hohen Konservierung innerhalb verschiedener Spezies ist EMT auch bei Individuen der gleichen Spezies erstaunlich stabil. Untersuchungen dazu wurden an EMTh vorgenommen (Lazar et al., 2003). Promotorkernregion, ORF sowie Exon-Intron-Grenzen von insgesamt 100 nicht miteinander verwandte Kaukasier wurden sequenziert. Lediglich 6 SNPs (engl.: single nucleotide polymorphism) und eine Deletion wurden detektiert. Keine dieser Varianten hatte einen Aminosäureaustausch zur Folge. OCT1 und OCT2, die beide beim Menschen in unmittelbarer Nähe zu EMT auf Chromosom 6 (Gründemann and Schomig, 2000), (Gründemann et al., 1998b), (Koehler et al., 1997) lokalisiert sind, zeigen beide verschiedene SNPs, die zu Aminosäureaustausch führen (Saito et al., 2002), (Leabman et al., 2002). Als eine mögliche Erklärung werden selektive Mechanismen diskutiert, die im Laufe der menschlichen Evolution gegen einen Aminosäureaustausch entwickelt wurden und die möglicherweise diesem Transporter eine Schlüsselrolle zuweisen.

Eine hohe Konservierung des codierenden Bereichs auch zwischen nicht allzu nah verwandten Spezies wie Mensch, Hund und Schwein könnte diese Überlegung untermauern.

### ***Der C-Terminus trägt einen PDZ-Liganden***

Bei einem Vergleich auf Aminosäureebene (s. Abb. 3.1.6.1.) fallen zwei Domänen ins Auge, in denen die orthologen Transporter voneinander abweichen. Ein Bereich erstreckt sich von Aminosäure 70-110, dieser Bereich entspricht laut Hydropathie-Modell (s. Abb 1.4.2) der großen extrazellulären Schleife. Der zweite Bereich befindet sich am unmittelbaren C-Terminus, hier weichen EMTr/m in einer Sequenz von fünf Aminosäuren EMTp und -h ab. Die folgende Abbildung zeigt den C-Terminus der orthologen Transporter.

EMTp	E	T	K	G	I	A	L	P	E	T	V	D	D	V	E	K	L	D	S	P	Y	S	C	K	C	G	R	K	N	T	T	Q	V	S	G	S	H	L
EMTh	E	T	K	G	I	A	L	P	E	T	V	D	D	V	E	K	L	G	S	P	H	S	C	K	C	G	R	N	K	K	T	P	V	S	R	S	H	L
EMTm	E	T	K	G	I	A	L	P	E	T	V	E	D	V	E	K	L	G	S	S	Q	L	H	Q	C	G	R	K	K	K	T	Q	V	S	T	S	D	V
EMTr	E	T	K	G	I	A	L	P	E	T	V	E	D	V	E	K	L	G	S	S	Q	L	H	Q	C	G	R	K	K	K	T	Q	V	S	T	S	N	V

Abb. 4.1.1. Vergleich des C-Terminus der orthologen Transporter. Nicht übereinstimmende Aminosäuren sind rot markiert.

EMTh und -p unterscheiden sich in diesem Bereich lediglich in einer einzigen Aminosäure voneinander. Der EMT-C-Terminus zeigt eine weitere Besonderheit. Bei allen Transportern ist die drittletzte Aminosäure ein Serin (S), die letzte eine hydrophobe Aminosäure, bei EMTp und -h ein Leuzin (L), bei EMTm und -r ein Valin (V). Die Sequenz X-S/T-X-Φ (X= jede Aminosäure, Φ= hydrophobe Aminosäure) ist eine Bindungsstelle für sogenannte PDZ-Domänen (Hung and Sheng, 2002). PDZ steht für PSD (post-synaptic-protein)-95/ Dlg (Disc-large, junction protein aus Drosophila)/ ZO-1 (ein tight junction- Protein)- Homologie, da diese drei Proteine die ersten waren, in denen solche Domänen gefunden wurden. PDZ-Domänen bestehen aus etwa 90 Aminosäuren und zahlreiche Protein aus unterschiedlichsten Organismen besitzen solche Domänen (Ponting, 1997). PDZ-Domänen in verschiedenen Proteinen vermitteln eine Protein-Protein-Interaktion, die die Faltung großer Proteine beeinflussen kann. Dadurch ist eine Regulation der Aktivität oder der Positionierung von Membranproteinen möglich, dies konnte beispielsweise für CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator), MRP2 (multi-drug-resistance-protein) und den Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher gezeigt werden (Kekuda et al., 1998), (Nies et al., 2002). Dass alle orthologen Transporter eine solche PDZ-Bindungsstelle tragen, weist auf einen möglichen essentiellen Regulationsmechanismus hin. Da die letzte Aminosäure nicht gleich ist, werden die orthologen Transporter wahrscheinlich von unterschiedlichen PDZ-Proteinen beeinflusst (Übersicht der verschiedenen PDZ- Bindungsstellen siehe (Hung and Sheng, 2002)).

Die Identifizierung nicht übereinstimmender Bereiche in einem ansonsten konservierten Protein eignet sich zur Untersuchung erster Struktur-Funktions-Beziehungen.

## 4.2 Die Hemmung von EMTp durch D24

Der  $K_i$ -Wert für Disprocynium 24 wurde parallel für EMTp und EMTh bestimmt und war mit  $415 \pm 158 \text{ nM}$  für EMTp etwas höher als für EMTh, dieser betrug in diesem Versuch  $88 \pm 15 \text{ nM}$ . Der in der Literatur vermerkte  $K_i$ -Wert für EMTh beträgt  $46 \text{ nM}$  (Gründemann et al., 2002) bzw.  $15 \text{ nM}$  (Habilitationsschrift PD Dr.Gründemann). Mit der hier eingesetzten höchsten Konzentration von  $2,5 \mu\text{M}$  war die MPP<sup>+</sup>-Aufnahme durch EMTp nicht vollständig hemmbar. Diese nicht vollständige Hemmung zeigte sich schon bei den Versuchen zur Identifizierung von EMTp (Abb. 3.2.1.1.). Bei zukünftigen in-vivo-Versuchen kann mit dieser Konzentration die unspezifische Aufnahme von EMTp nicht bestimmt werden. Entweder man setzt höhere Konzentrationen ein oder man bestimmt die unspezifische Aufnahme wie hier geschehen über die Aufnahme einer parallelen Zelllinie, die den Transporter nicht exprimiert. Diese eher moderaten Unterschiede zwischen EMTh und -p stehen im Einklang mit der großen Ähnlichkeit auf Aminosäureebene. Die schon erwähnte hohe Konservierung des orthologen EMT lässt vermuten, dass sich auch EMTm und -r nicht sonderlich im Hemmprofil durch D24 unterscheiden. Umso erstaunlicher waren die Ergebnisse zur Untersuchung der Hemmprofile dieser Transporter (Gründemann et al., 2002). Die erste erstaunliche Beobachtung war, dass die Affinität von EMTr zu D24 um zwei Größenordnungen kleiner war als die für EMTh ( $4 \mu\text{M}$  für EMTr,  $42\text{-}51 \mu\text{M}$  für EMTh). Die weitaus verwirrendere Beobachtung war eine konzentrationsabhängige Stimulation der MPP<sup>+</sup>-Aufnahme durch D24 bis zu einem Faktor von 1,5 (verglichen mit der ungehemmten MPP<sup>+</sup>-Aufnahme). Diese Aktivierung wurde weiter untersucht, dabei konnte eine Hyperpolarisierung ( $\text{K}^+$ - statt  $\text{Na}^+$ -Puffer) genauso wie eine *trans*-Stimulation (Aufnahmebeschleunigung durch Gegentransport eines interzellulären Substrates) als Ursache ausgeschlossen werden. Der nächstverwandte orthologe Transporter EMTm zeigte ähnliche Charakteristika. Als mögliche Ursache wurden dann damit begonnen, die bereits erwähnten zwei abweichenden Bereiche auf Aminosäureebene der orthologen Transporter zu untersuchen: die Extrazellulär-Schleife und der C-Terminus. Ein Austausch der Extrazellulär-Schleife zwischen EMTh und -r beeinflusste das Phänomen nicht (unveröffentlichte Daten). Der C-Terminus ist daher Gegenstand intensivster Untersuchung. Die Hypothese, nach der möglicherweise PDZ-Proteine diese Aktivierung bei EMTm/r verursachen, wird durch die

Tatsache unterstützt, dass auch EMTp statt eines Valins ein Leuzin als letzte Aminosäure der PDZ-Bindungsstelle trägt und keine Aktivierung zeigt. Ein Aminosäureaustausch an dieser Stelle hat unterschiedliche PDZ-Proteine als Bindungspartner zur Folge, die in unterschiedlichen Zelltypen vorkommen (Hung and Sheng, 2002), (Songyang et al., 1997).

### **4.3 Die Aufnahme von Acetylcholin und die Plazenta als Modell-Organ**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl EMTh als auch EMTp Acetylcholin als Substrat akzeptieren.

Acetylcholin gehört nicht auf dem ersten Blick zu den Substrat-Kandidaten des EMT, die nähere Hinweise auf seine physiologische Funktion geben könnten. Dies ist weniger bedingt durch seine chemische Struktur, sondern eher weil Acetylcholin als Neuro-Transmitter nach Freisetzung aus dem synaptischen Spalt anders als die Catecholamine zur Inaktivierung nicht auf ein spezielles Aufnahmesystem angewiesen ist. Acetylcholin wird extrazellulär durch die Acetylcholin-Esterase inaktiviert. Das entstandene Cholin wird zur Wiederverwendung durch den hochspezifischen Cholin-Transporter hChT1 (SLC5A7, (Apparsundaram et al., 2000)) wieder aufgenommen, EMT transportiert kein Cholin (Gründemann et al., 1999). Auch die neuronale Freisetzung ist nicht Transporter gebunden. Acetylcholin ist jedoch mehr als ein Neurotransmitter, auch wenn seine Funktion meist auf dieses Gebiet fokussiert wird. So ist Acetylcholin mehr oder weniger ubiquitär exprimiert und steht in Beziehung zu basalen, nicht-neuronalen Zellfunktionen wie Proliferation, Zell-Differenzierung, Organisation des Zytoskeletts und Zell-zu-Zell-Kontakte (Grando, 1997; Kawashima and Fujii, 2000; Sastry and Sadavongvivad, 1978; Wessler et al., 2001a; Wessler et al., 1998; Wessler et al., 1999). In diesem Zusammenhang spricht man auch von dem „nicht-neuronalen cholinergen System“. Trotz der weiten Verbreitung dieses Systems ist der Kenntnisstand über die zelluläre Organisation dieses Systems und seine biologische Bedeutung relativ begrenzt. Zur Untersuchung dieses Systems hat sich die Plazenta, eines der Organe, in denen alle orthologen EMTs gleichermaßen stark exprimiert werden, als Modell-Organ entwickelt. Dieses Organ exprimiert alle Komponenten des cholinergen Systems (Cholin-Acetyl-Transferase, ChAT, Acetylcholin, Rezeptoren, Cholinesterase) und wird nicht vom neuronalen cholinergen System beeinflusst, so dass hier keinerlei Interferenzen zwischen beiden Systemen existieren. Bei der Suche nach dem Freisetzungsmechanismus an nicht-neuronalem Gewebe wurden die

OCTs als Kandidaten-Transporter in der Plazenta untersucht (Wessler et al., 2001b). Sowohl direkte Inhibitoren (Chinin, Corticosteron) als auch Substrat-Inhibitoren (Amilorid, Verapamil) der OCTs hemmten die in- vivo- Freisetzung von Acetylcholin aus menschlichen Plazenta-Villi. L-Carnitin, das wichtigste Substrat für OCTN2, hatte keinerlei Effekt auf die Freisetzung. Zur näheren Spezifizierung der an der Acetylcholin-Freisetzung beteiligten OCTs wurden Anti-Sense Oligonukleotide gegen OCT1, 2 und 3 mRNA eingesetzt. Anti-OCT1 Oligonukleotide halbierten fast die Acetylcholin-Freisetzung und auch der hemmende Effekt der Anti-EMT Oligonukleotide auf die Freisetzung war signifikant. Anti-OCT2 Oligonukleotide hatten keinerlei Effekt.

Die Hinweise auf die Involvierung von EMT bei der Freisetzung von Acetylcholin wurden durch die Tatsache, dass EMTh und EMTp heterolog exprimiert Acetylcholin als Substrat akzeptieren, weiter unterstützt.

EMT wird in der Plazenta der Maus, der Ratte und des Menschen gleichermaßen stark exprimiert (Kekuda et al., 1998), (Verhaagh et al., 1999). Zur Klonierung von EMTp wurde RNA aus der Schweine-Plazenta entnommen und obwohl dies noch keine quantitativen Aussagen über die EMT-Expression zulässt, ist doch sicher, dass auch beim Schwein als weitere Spezies EMT in diesem Organ exprimiert wird. Untersuchungen an knock-out-Mäusen zeigten (Zwart et al., 2001) EMT als wichtiges Transportsystem zwischen Plazenta und Fötus, das zusammen mit MaoA (MonoaminoxidaseA) (Verhaagh et al., 2001) für die Inaktivierung der embryonalen Monoamine zuständig ist.

Neben dem Herzen (Zwart et al., 2001) ist die Plazenta das Organ, in dem die Funktion von EMT vordergründig wird, da hier Kompensierungsmechanismen durch andere Transporter möglicherweise geringer sind. Die Expression ist bei allen untersuchten Spezies hoch und die Funktionspalette vielfältiger als bislang angenommen.

Die weite Verbreitung des nicht-neuronalen cholinergen Systems und die große Zahl der Subtypen von muscarinischen und nicotinischen Rezeptoren erschweren die Identifikation einer möglichen pathophysiologischen Beteiligung. Eine der wenigen pathophysiologischen Veränderungen des nicht-neuronalen cholinergen Systems konnte 1962 gezeigt werden. So wurden erhöhte Acetylcholinwerte bei entzündlichen Hautkrankheiten festgestellt (Scott, 1962). Diese Befunde konnten jüngst bestätigt werden, als man einen 14-fachen Acetylcholin-Gehalt innerhalb der Epidermis bei einer atopischen Dermatitis nachweisen konnte (Wessler et al., 2003). Diese Hautkrankheiten werden wie andere entzündliche Krankheiten mit

Glucocorticoiden behandelt, diese reduzieren erwiesenermaßen das epitheliale Acetylcholin und die ChAT (Reinheimer et al., 1998). EMT wird in der Haut des Menschen exprimiert (RT-PCR, unveröffentlichte Bayer Daten) und Glucocorticoide sind potente Hemmstoffe des Transporters (Gründemann et al., 1998b). Zusammen mit der Tatsache, dass EMT Acetylcholin transportiert, deutet dies auf eine mögliche Rolle im pathophysiologischen Mechanismus der Acetylcholin-erhöhung bei entzündlichen Hautkrankheiten hin.

Da EMT genau wie das nicht-neuronale Acetylcholinsystem eine breite Gewebeverteilung aufweist, sind weitere Beteiligungen an diesem System nicht ausgeschlossen.

#### **4.4 Aufnahme bekannter EMT-Substrate: Agmatin, Histamin und Noradrenalin, ein Vergleich**

Agmatin ist ein extrazellulärer Botenstoff in Säugetieren und entsteht durch Decarboxylierung der Aminosäure L-Arginin. Die dazu notwendige Arginin-Decarboxylase befindet sich in Niere, Leber und Gehirn (Lortie et al., 1996). Agmatin selbst lässt sich im Plasma und weit verbreitet im Säugergewebe nachweisen (Raasch et al., 1995). Agmatin scheint in einer Vielzahl möglicher Funktionen involviert zu sein. So gibt es Hinweise, dass Agmatin anti-proliferative Wirkung besitzt (Satriano et al., 1998), (Babal et al., 2001). Auch eine mögliche Rolle als Neurotransmitter oder -modulator wird diskutiert, da es in spezifische Hirnregionen synthetisiert, in synaptischen Vesikeln gelagert, durch eine Depolarisation initiiert freigelassen und über eine Agmatinase und Diamin-Oxidase inaktiviert wird (Li et al., 1994). Auch eine Interaktion mit  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren und NMDA-Rezeptoren wurde gezeigt. Angesichts dieser Vielzahl von Interaktionen, die Agmatin besonders im Gehirn eingeht, ist es bisher noch nicht gelungen, ihm eine präzise Funktion zuzuordnen (Reis and Regunathan, 2000). Agmatin ist unter physiologischen Bedingungen ein- und zweifach positiv geladen und bedarf somit eines speziellen Transportmechanismus, um freigesetzt und wieder aufgenommen zu werden. Unter diesem Aspekt wurde EMTh/-r, OCT1h/-r sowie OCT2h/-r auf eine mögliche Transportaktivität hin untersucht (Gründemann et al., 2003). Nach Abzug der unspezifischen Aufnahme zeigte OCT1 beider Spezies kaum Agmatin-Aufnahme. Agmatin wurde hingegen sowohl von EMT als auch von OCT2 beider Spezies aufgenommen. Da die Aufnahme von MPP+ als bestes Substrat jeweils parallel mit gemessen wurde, können diese Daten direkt verglichen werden mit den Ergebnissen der Agmatin-Aufnahme durch den

weiteren orthologen Transporter EMTp. Die spezifische Aufnahme von EMTp für Agmatin betrug den 0,2-fachen Wert der parallel gemessenen MPP+-Aufnahme (Abb. 3.2.2.1.). Dies ist vergleichbar mit der durch EMTh gemessenen Aufnahme, die einen relativen Wert von 0,15 aufwies. Der orthologe Transporter der Ratte hingegen wies mit einem Faktor zwischen 0,5 und 0,6 eine höhere relative Aufnahme auf. Auch für OCT2 konnte dieser speziesabhängige Unterschied gezeigt werden. Ob diese durch eine höhere Affinität bedingt ist, wurde nicht gezeigt. Auch hier scheinen größere strukturelle Übereinstimmungen sehr ähnliche Transportcharakteristika zu bedingen.

Histamin gilt als das physiologisch beste Substrat für EMT, die spezifische Aufnahme durch EMTh erreicht die Hälfte der MPP+-Aufnahme (Gründemann et al., 1999). Es gibt praktisch keinen Unterschied in der Aufnahme von Histamin durch EMTp, sie erreicht ebenfalls einen relativen Wert um 0,5 der MPP+-Aufnahme (Abb. 3.2.2.1.).

Die Aufnahme von Noradrenalin wurde in dieser Arbeit für EMTp und EMTh gemessen (Abb. 3.2.2.2.). Die hier gemessene relative Aufnahme von Noradrenalin verglichen mit MPP+ durch EMTh wurde durch bereits vorhandene Literaturwerte bestätigt (Gründemann et al., 1998b). Die relative Aufnahme durch EMTp hingegen war deutlich höher. Um zu klären, ob dieser Effekt auf eine erhöhte Affinität zu Noradrenalin zurückzuführen ist, wurde der Km-Wert von EMTp für Noradrenalin bestimmt. Wider Erwarten war der Km-Wert mit 1528 (95% Vertrauensbereich 1247-1818) $\mu\text{M}$  höher als der Km-Werte von EMTh für Noaradrenalin 510 (95% Vertrauensbereich 360-730) $\mu\text{M}$  (Gründemann et al., 1998b). Ursache für die höhere Initialaufnahme von EMTp könnte eine höhere Wechselzahl des Transporters für Noradrenalin sein. Auch für EMTr wurde der Km- Wert bestimmt, er beträgt 432 $\mu\text{M}$  (Wu et al., 1998) und ist damit in der gleichen Größenordnung wie EMTh.

Die Transportcharakteristika von EMTp für bekannte EMT-Substrate erlauben einen Vergleich der orthologen Transporter. Es zeigt sich, dass speziesabhängige Unterschiede existieren. Diese gilt es beim Vergleich verschiedener Transporter der gleichen Familie zu berücksichtigen. Der Vergleich der orthologen Transporter kann zum aktuellen Zeitpunkt nur deskriptiv bleiben, da bisher noch zu wenig darüber bekannt ist, welche Aminosäuren tatsächlich mit dem Substrat in Verbindung treten. Mutagenese-Untersuchungen an organischen Kationen- und organischen Anionen-Transporter der SLC22-Familie deuten

darauf hin, dass die laut Hydrophathie vorhergesagten Transmembrandomänen 4, 8 und 10 möglicherweise zusammen mit anderen Domänen die Bindungsstelle bilden (zusammengefaßt in (Koepsell et al., 2003)). Die Interpretation dieser Untersuchungen ist jedoch limitiert, da die Membrantopologie biochemisch noch nicht bestimmt wurde. Hinzu kommt, dass noch nicht klar ist, ob die Transporter als Mono-, Di oder Oligomere operieren.

Somit sind die Voraussetzungen, um Unterschiede in der Aminosäuresequenz mit einem veränderten Transportverhalten zu einem bestimmten Substrat korrelieren zu können, noch nicht geschaffen.

#### **4.5 Neue Substrate für EMTp**

Zur Klärung der physiologischen und pathophysiologischen Funktion eines Transporters hat das Wissen um das Substrat, das mit hoher Effizienz transportiert wird, einen entscheidenden Anteil.

EMT transportiert Catecholamine, Monoamine sowie andere organische Kationen wie Cimetidin und Agmatin. Als bestes Substrat wird jedoch nach wie vor das Neurotoxin MPP<sup>+</sup> transportiert, das keine physiologische Rolle einnimmt. Es besteht durchaus die Möglichkeit, vor allem angesichts der bereits gefundenen ansehnlichen Zahl physiologisch relevanter Substrate, dass EMT weitere Substanzen möglicherweise effizienter transportiert. Zellen mit und ohne Transporter zeigten keine eindeutigen Unterschiede im Spektrum der aufgenommenen Substanzen aus Leber-, Niere-, Plazentahomogenisaten. Aus dem Aortahomogenisat deutete ein sehr schwaches Signal auf einen Aufnahmeunterschied. Nach 24-stündiger Inkubation mit herkömmlichem Zellkulturmedium (DMEM/FCS) zeigte sich jedoch ein sehr klares Signal bei einer Masse von 254g/mol bei allen drei verglichenen Pärchen. Zellen mit Transporter nehmen im Gegensatz zu Zellen mit Leervektor diese Masse auf. Dies ist ein erstes wichtiges Indiz für ein mögliches bisher nicht bekanntes Substrat von EMT. HEK-293-pcDSA3 und HEK-293-pcDSA3-EMTp sind zwei unterschiedliche Zelllinien mit möglicherweise weiteren Unterschieden als jene, die nur durch die Expression eines Transporters entstanden sind. Um daher mit Sicherheit auszuschließen, dass diese Masse tatsächlich bedingt durch den exprimierten Transporter aufgenommen wird und es sich dabei nicht um ein Artefakt handelt, sollte der Effekt auch bei einer Zelllinie eintreten, die den

Transporter konditionell exprimiert. Eine solche Zelllinie steht zurzeit noch nicht zur Verfügung.

## **4.6 Ausblick**

### *Substratsuche*

Neben der Wiederholung des Versuchs mit einer konditionell exprimierenden Zelllinie werden jetzt weitere Indizien gesammelt, die mehr Klarheit über die Identität der Substanz einer Masse von 254g/mol liefern. Erste Indizien liefern beispielsweise die Fragmentierung dieser Substanz und die anschließende massenspektrometrische Analysierung dieser Fragmente über LC-MS/MS. Eine Fragmentierung kann die funktionellen Gruppen der Muttermasse zeigen, die bereits eine Vielzahl von möglichen Kandidaten ausschließt. Ferner ist anzunehmen, dass die gesuchte Substanz unter physiologischen Bedingungen positiv geladen ist, da sie sonst nicht durch EMT aufgenommen worden wäre. Somit wird die gesuchte Substanz wahrscheinlich mindestens ein Stickstoff tragen.

### *Der EMT-Promotor*

Der EMT-Promotor weicht in vielerlei Hinsicht von einem Standard-Vertebraten-Promotor ab (Gründemann and Schomig, 2000). So gibt es weder eine TATA-Box noch CCAAT-Elemente, der Promotor weist zwei Transkriptionsstartpunkte auf, von dem der zweite wahrscheinlich ein Initiator-Element enthält. Sowohl Promotor als auch Exon 1 liegen innerhalb einer bereits erwähnten CpG-Insel, also mögliche Methylierungsstellen. Der Promotor weist verschiedene mögliche Bindungsstellen für ubiquitäre Transkriptionsfaktoren auf. Trotz seiner breiten Gewebeverteilung ist der Transporter einer strengen Regulation unterlegen, da es innerhalb der Gewebe und entwicklungsabhängig große Expressionsunterschiede gibt. Über die transkriptionelle Regulation ist bislang wenig bekannt. Das Wissen um Transkriptionsfaktoren, die die Expression eines Gens steuern, liefert jedoch unverzichtbare Einblicke in die Funktion seines Produktes. Mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren können durch einen Vergleich der Promotorsequenz der orthologen Transporter als Bereiche, in denen markante Übereinstimmungen gibt, identifiziert werden. Hochkonservierte Bereiche würden dann beispielsweise durch gezielte Mutagenese näher

untersucht werden. In Laufe meiner Arbeit ist es mir nicht gelungen, ausgehend vom EMTp-ORF den Promotor zu amplifizieren. Die Methode der inversen PCR auf ein anderes Gen, OCT2p, angewandt führte zum Erfolg. Es könnte durchaus sein, dass das passende Restriktionsenzym zur Fragmentierung des Genoms unter den bisher getesteten noch nicht dabei war.

Das EMT-Gen des Hundes steht neuerdings auch zur Verfügung, so dass ein wirklich breiter Promotorvergleich möglich ist.

### ***EMTp-Substrate***

Sowohl EMTp als auch EMTh akzeptieren Acetylcholin, dies sollte näher untersucht werden. Der Zeitverlauf der ACh-Aufnahme sowie ihre Konzentrationsabhängigkeit sollten bestimmt werden.

EMTh transportiert Cimetidin, dies konnte für EMTp nicht gezeigt werden. Aus Zeitgründen war eine Wiederholung nicht möglich. Dies sollte jedoch unbedingt geschehen, da sich in den bisher untersuchten Substraten kaum Unterschiede zwischen den beiden orthologen Transportern ergaben.

### ***Lokalisation***

EMT zeigt eine speziesabhängige Expression. Mit der nun zur Verfügung stehenden EMTp-Sequenz ist auch eine Lokalisation des Transporters im Schwein möglich. Übereinstimmende EMT-Lokalisationen bei den untersuchten Spezies liefern wichtige Hinweise auf die Schlüsselfunktion des Transporters.

## 5 Zusammenfassung

EMT gehört zu den nicht-neuronalen Monoamin-Transportern und ist somit mit verantwortlich für die Wiederaufnahme von Catecholaminen und Monoaminen nach ihrer Freisetzung in den synaptischen Spalt und aus der Zirkulation. EMT transportiert jedoch auch andere organische Kationen und seine Expression an typischen Exkretionsorganen weist ihm somit eine weitere Rolle als Organischer Kationen-Transporter zur Exkretion von Xenobiotika und physiologischen Metaboliten zu. In dem Zeitraum zwischen seiner erstmaligen Klonierung 1998 bis heute sind eine Menge Ergebnisse bezüglich Untersuchungen zu den Substraten und zur Lokalisation zusammen getragen worden. Erkenntnisse über die Regulation des Transporters als wichtiger Schlüssel zur Klärung seiner physiologischen und pathophysiologischen Rolle existieren dagegen kaum. Aus diesem Grund sollte die Grundlage für einen spezieübergreifenden Promotorvergleich zur Identifizierung konservierter und damit möglicherweise regulationsrelevanter Bereiche geschaffen werden. Die Klonierung eines weiteren orthologen Transporters stellt diese Grundlage dar.

Im Zuge meiner Arbeit ist es mir gelungen, den ORF des Schweine-Transporters erstmals zu klonieren. Ausgehend von der cDNA wurde eine EMTp-exprimierende Zelllinie geschaffen, anhand derer das funktionstüchtige Protein charakterisiert werden konnte. Dabei zeigte sich eine weitgehende Ähnlichkeit zum orthologen Menschen-Transporter. Dies steht im Einklang mit der großen Übereinstimmung auf Nukleinsäureebene. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Acetylcholin ein Substrat für EMT ist. Dies deutet auf eine mögliche Rolle des Transporters im „nicht-neuronalen Acetylcholin-System“ hin.

Der Vergleich der aufgenommenen Substanzspektren zwischen Transporter- und Kontrollzelllinie zeigte nach Inkubation mit DMEM/FCS ein deutliches, reproduzierbares Signal bei m/z 254. Da die bisher bekannten EMT-Substrate eine geringere Masse aufweisen, handelt es sich hierbei möglicherweise um ein neues EMT-Substrat.

## 6 Summary

Together with the other members of the non-neuronal monoamine-transporter family, EMT is responsible for the reuptake of catecholamines and monoamines after their release into the synaptic cleft and from the circulation. EMT in fact transports other organic cations and its expression at excretion organs designates it to a further role: that of an Organic Cation-Transporter, which allows excretion of xenobiotics and physiological metabolites.

From the first cloning of EMT in 1998 until now a lot has been discovered concerning its substrates and localization. This stays in contrast to how it is regulated, which is an important clue to clarify its physiological and pathophysiological role. In this area, facts are missing.

For that there was a need to provide the basics for an interspecific promoter comparison to identify conserved areas which are strong indices to be relevant for regulation. To allow this comparison to be a powerful tool for identifying “clue-regions”, EMT of a further species had to be cloned.

In the course of my work I succeeded in cloning the open reading frame (ORF) of the porcine EMT for the first time. Starting from the cDNA an EMTp (p: porcine)- expressing cell line has been created that allowed me to characterize the functional protein. In doing so an extensive similarity to the human EMT turned out which is consistent with that on nucleic acid basis. Beyond this it has been shown that acetylcholine is an EMT substrate. This indicates that EMT is possibly involved in the “non-neuronal acetylcholine system”.

The comparison of the recorded substance spectrum between transporter and control cell line showed after incubation with DMEM/FCS a clear and reproducible signal at  $m/z$  254. As up to now there is no known EMT substrate having such mass, it is maybe a new EMT substrate.

## 7 Literaturverzeichnis

- Akrigg A, Wilkinson GW and Oram JD (1985) The structure of the major immediate early gene of human cytomegalovirus strain AD169. *Virus Res* **2**:107-21.
- Apparsundaram S, Ferguson SM, George AL, Jr. and Blakely RD (2000) Molecular cloning of a human, hemicholinium-3-sensitive choline transporter. *Biochem Biophys Res Commun* **276**:862-7.
- Apparsundaram S, Moore KR, Malone MD, Hartzell HC and Blakely RD (1997) Molecular cloning and characterization of an L-epinephrine transporter from sympathetic ganglia of the bullfrog, *Rana catesbiana*. *J Neurosci* **17**:2691-702.
- Aviv H and Leder P (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**:1408-12.
- Axelrod J, Whitby LG and Hertting G (1961) Effect of psychotropic drugs on the uptake of H<sup>3</sup>-norepinephrine by tissues. *Science* **133**:383-4.
- Babal P, Ruchko M, Campbell CC, Gilmour SP, Mitchell JL, Olson JW and Gillespie MN (2001) Regulation of ornithine decarboxylase activity and polyamine transport by agmatine in rat pulmonary artery endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* **296**:372-7.
- Balbas P, Soberon X, Merino E, Zurita M, Lomeli H, Valle F, Flores N and Bolivar F (1986) Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives--a review. *Gene* **50**:3-40.
- Baskaran N, Kandpal RP, Bhargava AK, Glynn MW, Bale A and Weissman SM (1996) Uniform amplification of a mixture of deoxyribonucleic acids with varying GC content. *Genome Res* **6**:633-8.
- Birnboim HC and Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**:1513-23.
- Bonisch H (1980) Extraneuronal transport of catecholamines. *Pharmacology* **21**:93-108.
- Borowsky B and Hoffman BJ (1995) Neurotransmitter transporters: molecular biology, function, and regulation. *Int Rev Neurobiol* **38**:139-99.
- Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Hasler K, Fleckenstein B and Schaffner W (1985) A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* **41**:521-30.
- Breidert T, Spitzenberger F, Grundemann D and Schomig E (1998) Catecholamine transport by the organic cation transporter type 1 (OCT1). *Br J Pharmacol* **125**:218-24.
- Busch AE, Karbach U, Miska D, Gorboulev V, Akhoundova A, Volk C, Arndt P, Ulzheimer JC, Sonders MS, Baumann C, Waldegger S, Lang F and Koepsell H (1998) Human neurons express the polyspecific cation transporter hOCT2, which translocates monoamine neurotransmitters, amantadine, and memantine. *Mol Pharmacol* **54**:342-52.
- Carmichael GG and McMaster GK (1980) The analysis of nucleic acids in gels using glyoxal and acridine orange. *Methods Enzymol* **65**:380-91.
- Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ and Rutter WJ (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**:5294-9.
- Chomczynski P and Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**:156-9.
- Claros MG and von Heijne G (1994) TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *Comput Appl Biosci* **10**:685-6.

- Coyle JT and Snyder SH (1969) Catecholamine uptake by synaptosomes in homogenates of rat brain: stereospecificity in different areas. *J Pharmacol Exp Ther* **170**:221-31.
- Dutton CM, Paynton C and Sommer SS (1993) General method for amplifying regions of very high G+C content. *Nucleic Acids Res* **21**:2953-4.
- Eisenhofer G (1994) Plasma normetanephrine for examination of extraneuronal uptake and metabolism of noradrenaline in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **349**:259-69.
- Eisenhofer G, Esler MD, Cox HS, Meredith IT, Jennings GL, Brush JE, Jr. and Goldstein DS (1990) Differences in the neuronal removal of circulating epinephrine and norepinephrine. *J Clin Endocrinol Metab* **70**:1710-20.
- Eisenhofer G, Esler MD, Meredith IT, Ferrier C, Lambert G and Jennings G (1991) Neuronal re-uptake of noradrenaline by sympathetic nerves in humans. *Clin Sci (Lond)* **80**:257-63.
- Eisenhofer G and Finberg JP (1994) Different metabolism of norepinephrine and epinephrine by catechol-O-methyltransferase and monoamine oxidase in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **268**:1242-51.
- Eisenhofer G, Friberg P, Rundqvist B, Quyyumi AA, Lambert G, Kaye DM, Kopin IJ, Goldstein DS and Esler MD (1996b) Cardiac sympathetic nerve function in congestive heart failure. *Circulation* **93**:1667-76.
- Eisenhofer G, McCarty R, Pacak K, Russ H and Schomig E (1996c) Disprocynium24, a novel inhibitor of the extraneuronal monoamine transporter, has potent effects on the inactivation of circulating noradrenaline and adrenaline in conscious rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **354**:287-94.
- Eraly SA, Hamilton BA and Nigam SK (2003) Organic anion and cation transporters occur in pairs of similar and similarly expressed genes. *Biochem Biophys Res Commun* **300**:333-42.
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM and Danielsen M (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:7413-7.
- Friedman KD, Rosen NL, Newman PJ and Montgomery RR (1988) Enzymatic amplification of specific cDNA inserts from lambda gt11 libraries. *Nucleic Acids Res* **16**:8718.
- Gaillard C and Strauss F (1990) Ethanol precipitation of DNA with linear polyacrylamide as carrier. *Nucleic Acids Res* **18**:378.
- Gardiner-Garden M and Frommer M (1987) CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* **196**:261-82.
- Giros B, el Mestikawy S, Bertrand L and Caron MG (1991) Cloning and functional characterization of a cocaine-sensitive dopamine transporter. *FEBS Lett* **295**:149-54.
- Giros B, el Mestikawy S, Godinot N, Zheng K, Han H, Yang-Feng T and Caron MG (1992) Cloning, pharmacological characterization, and chromosome assignment of the human dopamine transporter. *Mol Pharmacol* **42**:383-90.
- Gorboulev V, Ulzheimer JC, Akhoundova A, Ulzheimer-Teuber I, Karbach U, Quester S, Baumann C, Lang F, Busch AE and Koepsell H (1997) Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA Cell Biol* **16**:871-81.
- Graham FLS, J.; Russel, W.C. & Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by a DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**:59- 74.
- Grando SA (1997) Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors. *J Investig Dermatol Symp Proc* **2**:41-8.

- Grant SG, Jessee J, Bloom FR and Hanahan D (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:4645-9.
- Gründemann D, Gorboulev V, Gambaryan S, Veyhl M and Koepsell H (1994) Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* **372**:549-52.
- Gründemann D, Hahne C, Berkels R and Schomig E (2003) Agmatine is efficiently transported by non-neuronal monoamine transporters extraneuronal monoamine transporter (EMT) and organic cation transporter 2 (OCT2). *J Pharmacol Exp Ther* **304**:810-7.
- Gründemann D and Koepsell H (1994) Ethidium bromide staining during denaturation with glyoxal for sensitive detection of RNA in agarose gel electrophoresis. *Anal Biochem* **216**:459-61.
- Gründemann D, Koschker AC, Haag C, Honold C, Zimmermann T and Schomig E (2002) Activation of the extraneuronal monoamine transporter (EMT) from rat expressed in 293 cells. *Br J Pharmacol* **137**:910-8.
- Gründemann D, Koster S, Kiefer N, Breidert T, Engelhardt M, Spitzenberger F, Obermüller N and Schomig E (1998a) Transport of monoamine transmitters by the organic cation transporter type 2, OCT2. *J Biol Chem* **273**:30915-20.
- Gründemann D, Liebich G, Kiefer N, Koster S and Schomig E (1999) Selective substrates for non-neuronal monoamine transporters. *Mol Pharmacol* **56**:1-10.
- Gründemann D, Schechinger B, Rappold GA and Schomig E (1998b) Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter. *Nat Neurosci* **1**:349-51.
- Gründemann D and Schomig E (1996) Protection of DNA during preparative agarose gel electrophoresis against damage induced by ultraviolet light. *Biotechniques* **21**:898-903.
- Gründemann D and Schomig E (2000) Gene structures of the human non-neuronal monoamine transporters EMT and OCT2. *Hum Genet* **106**:627-35.
- Gussow DC, T. (1989) Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* **17**:4000.
- Haag C, Berkels R, Grundemann D, Lazar A, Taubert D and Schomig E (2004) The localisation of the extraneuronal monoamine transporter (EMT) in rat brain. *J Neurochem* **88**:291-7.
- Hayer M, Bonisch H and Bruss M (1999) Molecular cloning, functional characterization and genomic organization of four alternatively spliced isoforms of the human organic cation transporter 1 (hOCT1/SLC22A1). *Ann Hum Genet* **63**:473-82.
- Hertting G and Axelrod J (1961) Fate of tritiated noradrenaline at the sympathetic nerve-endings. *Nature* **192**:172-3.
- Horvath G, Lieb T, Conner GE, Salathe M and Wanner A (2001) Steroid sensitivity of norepinephrine uptake by human bronchial arterial and rabbit aortic smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **25**:500-6.
- Hung AY and Sheng M (2002) PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J Biol Chem* **277**:5699-702.
- Iversen L (1965a) The uptake of catecholamines at high perfusion concentrations in the rat isolated heart: a novel catecholamine uptake process. *Br J Pharmacol* **25**:18-33.
- Iversen LL (1965b) The Uptake of Adrenaline by the Rat Isolated Heart. *Br J Pharmacol* **24**:387-94.
- Jacobson A (1987) Purification and fractionation of poly(A)+ RNA. *Methods Enzymol* **152**:254-61.

- Jonker JW and Schinkel AH (2004) Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *J Pharmacol Exp Ther* **308**:2-9.
- Kawashima K and Fujii T (2000) Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol Ther* **86**:29-48.
- Kekuda R, Prasad PD, Wu X, Wang H, Fei YJ, Leibach FH and Ganapathy V (1998) Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta. *J Biol Chem* **273**:15971-9.
- Kilty JE, Lorang D and Amara SG (1991) Cloning and expression of a cocaine-sensitive rat dopamine transporter. *Science* **254**:578-9.
- Koehler MR, Wissinger B, Gorboulev V, Koepsell H and Schmid M (1997) The two human organic cation transporter genes SLC22A1 and SLC22A2 are located on chromosome 6q26. *Cytogenet Cell Genet* **79**:198-200.
- Koepsell H, Schmitt BM and Gorboulev V (2003) Organic cation transporters. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **150**:36-90.
- Kopin IJ and Gordon EK (1963) Metabolism of administered and drug-released norepinephrine-7-H<sub>3</sub> in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **140**:207-16.
- Kopin IJ, Rundqvist B, Friberg P, Lenders J, Goldstein DS and Eisenhofer G (1998) Different relationships of spillover to release of norepinephrine in human heart, kidneys, and forearm. *Am J Physiol* **275**:R165-73.
- Kuhar MJ (1973) Neurotransmitter uptake: a tool in identifying neurotransmitter-specific pathways. *Life Sci* **13**:1623-34.
- Kyte J and Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**:105-32.
- Lazar A, Grundemann D, Berkels R, Taubert D, Zimmermann T and Schomig E (2003) Genetic variability of the extraneuronal monoamine transporter EMT (SLC22A3). *J Hum Genet* **48**:226-30.
- Leabman MK, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Ferrin TE, DeYoung J, Taylor T, Clark AG, Herskowitz I and Giacomini KM (2002) Polymorphisms in a human kidney xenobiotic transporter, OCT2, exhibit altered function. *Pharmacogenetics* **12**:395-405.
- Li G, Regunathan S, Barrow CJ, Eshraghi J, Cooper R and Reis DJ (1994) Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science* **263**:966-9.
- Lingen B, Bruss M and Bonisch H (1994) Cloning and expression of the bovine sodium- and chloride-dependent noradrenaline transporter. *FEBS Lett* **342**:235-8.
- Lorow JJ, D. (1990) Max efficiency DH10B: a new host for cloning methylated DNA. *Focus* **12**:19- 20.
- Lortie MJ, Novotny WF, Peterson OW, Vallon V, Malvey K, Mendonca M, Satriano J, Insel P, Thomson SC and Blantz RC (1996) Agmatine, a bioactive metabolite of arginine. Production, degradation, and functional effects in the kidney of the rat. *J Clin Invest* **97**:413-20.
- Maas JW and Landis DH (1971) The metabolism of circulating norepinephrine by human subjects. *J Pharmacol Exp Ther* **177**:600-12.
- Martel F, Ribeiro L, Calhau C and Azevedo I (1999) Comparison between uptake<sub>2</sub> and rOCT1: effects of catecholamines, metanephrines and corticosterone. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **359**:303-9.
- Masson J, Sagne C, Hamon M and El Mestikawy S (1999) Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacol Rev* **51**:439-64.

- Nies AT, Konig J, Cui Y, Brom M, Spring H and Keppler D (2002) Structural requirements for the apical sorting of human multidrug resistance protein 2 (ABCC2). *Eur J Biochem* **269**:1866-76.
- Ochman H, Gerber AS and Hartl DL (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* **120**:621-3.
- Okuda M, Saito H, Urakami Y, Takano M and Inui K (1996) cDNA cloning and functional expression of a novel rat kidney organic cation transporter, OCT2. *Biochem Biophys Res Commun* **224**:500-7.
- Pacholczyk T, Blakely RD and Amara SG (1991) Expression cloning of a cocaine- and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter. *Nature* **350**:350-4.
- Paiva MQ and Guimaraes S (1978) A comparative study of the uptake and metabolism of noradrenaline and adrenaline by the isolated saphenous vein of the dog. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **303**:221-8.
- Pomp D and Medrano JF (1991) Organic solvents as facilitators of polymerase chain reaction. *Biotechniques* **10**:58-9.
- Ponting CP (1997) Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. *Protein Sci* **6**:464-8.
- Raasch W, Regunathan S, Li G and Reis DJ (1995) Agmatine is widely and unequally distributed in rat organs. *Ann N Y Acad Sci* **763**:330-4.
- Reinheimer T, Munch M, Bittinger F, Racke K, Kirkpatrick CJ and Wessler I (1998) Glucocorticoids mediate reduction of epithelial acetylcholine content in the airways of rats and humans. *Eur J Pharmacol* **349**:277-84.
- Reis DJ and Regunathan S (2000) Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? *Trends Pharmacol Sci* **21**:187-93.
- Rose JK, Buonocore L and Whitt MA (1991) A new cationic liposome reagent mediating nearly quantitative transfection of animal cells. *Biotechniques* **10**:520-5.
- Russ H, Engel W and Schomig E (1993) Isocyanines and pseudoisocyanines as a novel class of potent noradrenaline transport inhibitors: synthesis, detection, and biological activity. *J Med Chem* **36**:4208-13.
- Russ H, Gliese M, Sonna J and Schomig E (1992) The extraneuronal transport mechanism for noradrenaline (uptake2) avidly transports 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **346**:158-65.
- Russ H, Staust K, Martel F, Gliese M and Schomig E (1996) The extraneuronal transporter for monoamine transmitters exists in cells derived from human central nervous system glia. *Eur J Neurosci* **8**:1256-64.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-91.
- Saito S, Iida A, Sekine A, Ogawa C, Kawauchi S, Higuchi S and Nakamura Y (2002) Catalog of 238 variations among six human genes encoding solute carriers (hSLCs) in the Japanese population. *J Hum Genet* **47**:576-84.
- Sanger F, Nicklen S and Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:5463-7.
- Sarkar G, Kapelner S and Sommer SS (1990) Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acids Res* **18**:7465.
- Sastry BV and Sadavongvivad C (1978) Cholinergic systems in non-nervous tissues. *Pharmacol Rev* **30**:65-132.

- Satriano J, Matsufuji S, Murakami Y, Lortie MJ, Schwartz D, Kelly CJ, Hayashi S and Blantz RC (1998) Agmatine suppresses proliferation by frameshift induction of antizyme and attenuation of cellular polyamine levels. *J Biol Chem* **273**:15313-6.
- Schömig E and Schonfeld CL (1990) Extraneuronal noradrenaline transport (uptake<sub>2</sub>) in a human cell line (Caki-1 cells). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **341**:404-10.
- Schömig E, Spitzenberger F, Engelhardt M, Martel F, Ording N and Grundemann D (1998) Molecular cloning and characterization of two novel transport proteins from rat kidney. *FEBS Lett* **425**:79-86.
- Scott A (1962) Acetylcholine in normal and diseased skin. *Br J Dermatol* **74**:317-22.
- Shimada S, Kitayama S, Lin CL, Patel A, Nanthakumar E, Gregor P, Kuhar M and Uhl G (1991) Cloning and expression of a cocaine-sensitive dopamine transporter complementary DNA. *Science* **254**:576-8.
- Snyder SH and Coyle JT (1969) Regional differences in H<sup>3</sup>-norepinephrine and H<sup>3</sup>-dopamine uptake into rat brain homogenates. *J Pharmacol Exp Ther* **165**:78-86.
- Songyang Z, Fanning AS, Fu C, Xu J, Marfatia SM, Chishti AH, Crompton A, Chan AC, Anderson JM and Cantley LC (1997) Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* **275**:73-7.
- Staudt K. RH, Gliese M. & Schömig E. (1993) The extraneuronal noradrenaline carrier (uptake<sub>2</sub>) exists in the human central nervous system. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **347**:R118.
- Stjärne L, Bao, J.X., Gonon, F., & Møghna, M. (1994) Nerve activity-dependent variations in clearance of released noradrenaline: regulatory roles for sympathetic neuromuscular transmission in rat tail artery. *Neuroscience* **60**:1021-1038.
- Trendelenburg U (1986) Rudolf Buchheim lecture. The metabolizing systems involved in the inactivation of catecholamines. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **332**:201-7.
- Triglia T, Peterson MG and Kemp DJ (1988) A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res* **16**:8186.
- Usdin TB, Mezey E, Chen C, Brownstein MJ and Hoffman BJ (1991) Cloning of the cocaine-sensitive bovine dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:11168-71.
- Varadaraj K and Skinner DM (1994) Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. *Gene* **140**:1-5.
- Verhaagh S, Barlow DP and Zwart R (2001) The extraneuronal monoamine transporter Slc22a3/Orct3 co-localizes with the Maa0 metabolizing enzyme in mouse placenta. *Mech Dev* **100**:127-30.
- Verhaagh S, Schweifer N, Barlow DP and Zwart R (1999) Cloning of the mouse and human solute carrier 22a3 (Slc22a3/SLC22A3) identifies a conserved cluster of three organic cation transporters on mouse chromosome 17 and human 6q26-q27. *Genomics* **55**:209-18.
- Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F and Kirkpatrick CJ (2001a) The biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans. *Jpn J Pharmacol* **85**:2-10.
- Wessler I, Kirkpatrick CJ and Racke K (1998) Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. *Pharmacol Ther* **77**:59-79.
- Wessler I, Kirkpatrick CJ and Racke K (1999) The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**:198-205.

- Wessler I, Reinheimer T, Kilbinger H, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Saloga J and Knop J (2003) Increased acetylcholine levels in skin biopsies of patients with atopic dermatitis. *Life Sci* **72**:2169-72.
- Wessler I, Roth E, Deutsch C, Brockerhoff P, Bittinger F, Kirkpatrick CJ and Kilbinger H (2001b) Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters. *Br J Pharmacol* **134**:951-6.
- Whitby LG, Axelrod J and Weil-Malherbe H (1961) The fate of H<sup>3</sup>-norepinephrine in animals. *J Physiol* **132**:193-201.
- Wu X, Kekuda R, Huang W, Fei YJ, Leibach FH, Chen J, Conway SJ and Ganapathy V (1998) Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monoamine transporter (uptake<sub>2</sub>) and evidence for the expression of the transporter in the brain. *J Biol Chem* **273**:32776-86.
- Yanisch-Perron CV, J & Messing, J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103- 119.
- Zhou X and Huang L (1994) DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* **1189**:195-203.
- Zwart R, Verhaagh S, Buitelaar M, Popp-Snijders C and Barlow DP (2001) Impaired activity of the extraneuronal monoamine transporter system known as uptake-2 in Orct3/Slc22a3-deficient mice. *Mol Cell Biol* **21**:4188-96.

## **Lebenslauf**

Name: Liliane Henkes  
Geburtsdatum: 14. 03. 1977  
Geburtsort: Malmédy, Belgien  
Familienstand: Ledig  
Staatsangehörigkeit: Belgisch

### **Schulbildung**

6/1995 Abitur am Königlichen Athenäum St.Vith (Belgien)

### **Hochschulbildung**

10/95- 8/2001 Studium der Biologie an der RWTH Aachen

3/1998 Vordiplom

7/2000 Diplomprüfungen in den Fächern Tierphysiologie, Mikrobiologie, Biotechnologie und Organische Chemie

9/2000- 8/2001 Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Zoologie/ Tierphysiologie der RWTH Aachen unter Leitung von Prof. Dr. H. Wagner und PD Dr. J. Mey.

Thema: „Einfluss von Retinsäure auf die Expression von Retinsäure auf die Expression von Neurotrophischen Zytokinen in OLN-93-Zellen“

16.08.2001 Diplom im Fach Biologie

11/2001- 11/2004 Wissenschaftliche Angestellte am Insitut für Pharmakologie der Universität zu Köln und dortige Durchführung der Experimente für die vorliegende Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. E. Schömig und PD Dr. D. Gründemann

6.07.2005 Mündliche Prüfung zur vorliegenden Dissertation