# Klonierung und pharmakologische Charakterisierung des Noradrenalintransporters (NAT) der Maus und kovalente Markierung und partielle Aufreinigung des humanen NAT-Proteins

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von Andrea Muck aus Berlin

2004

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

- 1. Referent: Prof. Dr. H. Bönisch
- 2. Referent Prof. Dr. K. Mohr

Tag der Promotion:

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung und Fragestellung	1
1. Neurotransmitter-Transporter	2
2. Die noradrenerge Synapse	7
3. Der Noradrenalintransporter	10
3.1 Pharmakologie, Topologie, Molekularbiologie	10
3.2 Struktur-Funktions-Beziehungen	13
3.3 Biochemie	14
3.4 Regulation	16
4. Zielsetzung	19
B. Material und Methoden	
1. Material	
1.1 Arbeitsgeräte	20
1.2 Verbrauchsmaterial	
1.3 Computer-Software	23
1.4 Kits für die Molekularbiologie	23
1.5 Chemikalien	24
1.6 Radiochemikalien	27
1.7 Strukturformeln	27
1.8 Nährmedien für die Bakterienkultur	
1.9 Puffer und Lösungen	
1.10 Enzyme	
1.11 Antikörper	
1.12 Nukleinsäuren	
1.13 Zelllinien	
1.14 Vektoren	
2. Methoden	41
2.1 Zellkulturmethoden	41
2.1.1 Kultivierung eukaryotischer Monolayer-Zellen	41
2.1.2 Kultivierung einer eukaryotischen Supensionskultur	
2.1.3 Kultivierung eukaryotischer Zellen in einem Minireaktor (miniPE	RM <sup>®</sup> ) . 43
2.1.4 Polyornithinbeschichtung von Oberflächen (HEK293-Zellen)	44
2.1.5 Zellzählung	
2.2 Molekularbiologische Methoden	

2.2.1 Plasmid Mini-Präparation mit dem "Spin-Miniprep Kit" (Qiagen)	. 44
2.2.2 Plasmid Mega-Preparation mit dem "Plasmid Mega Kit" (Qiagen)	. 45
2.2.3 Isolierung von RNA	. 45
2.2.4 Konzentrationsbestimmungen von DNA und RNA	. 45
2.2.5 Gelelektrophorese	. 46
2.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)	. 47
2.2.7 Klonierungstechniken	. 48
2.2.8 DNA-Sequenzierung	. 50
2.2.9 Gerichtete Mutagenese	. 50
2.2.10 Transiente Transfektion der Zellen	. 51
2.2.11 Stabile Transfektion von Zellen	. 52
2.3 Biochemische Methoden	. 53
2.3.1 Proteinbestimmung nach Lowry	. 53
2.3.2 Proteinbestimmung nach dem DC Proteinassay	. 53
2.3.3 Proteinfällung	. 54
2.3.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	. 54
2.3.5 Coomassie Färbung von Polyacrylamidgelen	. 55
2.3.6 Western-Blot	. 55
2.3.7 Ponceau S Färbung	. 56
2.3.8 Membranpräparation	. 56
2.3.9 Differentialzentrifugation	. 57
2.3.10 Saccharosegradientenzentrifugation	. 58
2.3.11 Solubilisierung	. 58
2.3.12 Proteinaufreinigung mit IMAC (immobilisierte Metallchelat-	
Affinitätschromatographie)	. 59
2.4 Pharmakologische Methoden	. 61
2.4.1 [ <sup>3</sup> H]-NA-Aufnahmestudien	. 61
2.4.2 [ <sup>3</sup> H]-Nioxetin-Bindungsstudien	. 62
2.4.3 Protektionsversuche	. 63
2.4.4 Datenauswertung	. 64
C. Ergebnisse	. 65
1. Der Noradrenalintransporter der Maus (mNAT)	. 65
1.1 Klonierung und molekularbiologische Charakterisierung des mNAT	. 65
1.1.1 Klonierung und Sequenzierung der mNAT-cDNA	. 65

1.1.2 Vergleich der Aminosäuresequenz des mNAT-WT mit den NATs	
anderer Spezies	. 67
1.1.3 Topologisches Modell des mNAT	.71
1.1.4 Umklonierung des mNAT in den eukaryotischen Expressionsvektor	
pcDNA3.1 (-)	. 72
1.2 Biochemisch-pharmakologische Eigenschaften des mNAT-WT und des	
mNAT-I505V)	.72
1.2.1 [ <sup>3</sup> H]-Noradrenalin-Aufnahme durch den mNAT-WT und mNAT-I505V	
in transient transfizierte HEK293-Zellen	.72
1.2.2 Bestimmung von $K_D$ und $B_{max}$ der [ <sup>3</sup> H]-Nisoxetin-Bindung des mNAT-	
WT und des mNAT-I505V	. 75
1.2.3 Hemmung der [ <sup>3</sup> H]-NA-Aufnahme durch NAT-Substrate und -	
Inhibitoren	. 77
2. Pharmakologische und biochemische Charakterisierung des hNAT mit N-	
terminalem Poly-Histidin-Tag und Express-Epitop (hNAT-His)	. 81
2.1 Funktionelle Expression des hNAT-His in CHO-Zellen	. 81
2.2 Pharmakologische Charakterisierung des hNAT-His	. 82
2.2.1 [ <sup>3</sup> H]-Nisoxetin-Bindung an den hNAT-His	. 82
2.2.2 [ <sup>3</sup> H]-NA-Aufnahme durch den hNAT-His	. 87
2.2.3 Untersuchungen am hNAT-His mit dem NAT-Substrat Xylamin	. 88
2.2.4 Versuche zur Etablierung einer Suspensionskultur	. 93
2.3 Biochemische Charakterisierung des hNAT-His Proteins	. 96
2.3.1 Membranpräparation: Vergleich von Differentialzentrifugation mit	
Saccharosegradientenzentrifugation	. 96
2.3.2 Solubilisierung des hNAT-His	. 98
2.3.3 Austestung verschiedener Antikörper zum Nachweis des hNAT-His in	า
Western-Blot	. 99
2.3.4 Aufreinigung des hNAT-His-Proteins mittels immobilisierter	
Metallchelat-Affinitätschromatographie (IMAC) und Nachweis mittels	
SDS-PAGE und Western-Blot	103
D. Diskussion	111
1. Klonierung und pharmakologische Charakterisierung des	
Noradrenalintransporters der Maus (mNAT)	111

2. Der humane Noradrenalintransporter mit Poly-His-Tag und Express-Epitop
(hNAT-His)115
2.1 Funktionelle Expression des hNAT-His117
2.2 Pharmakologische Charakterisierung des hNAT-His118
2.3 Kovalente Markierung des hNAT-His120
2.4 Partielle Aufreinigung des hNAT-His122
E. Zusammenfassung 125
F. Anhang 128
1. Vergleich der pK <sub>i</sub> -Werte von NAT-Substraten und NAT-Inhibitoren für die
Hemmung der [ <sup>3</sup> H]-NA-Aufnahme des mNAT-WT mit den pK <sub>i</sub> -Werten des
rNAT, hNAT und bNAT128
2. Abkürzungen 129
G. Literaturverzeichnis
H. Danksagung
I. Lebenslauf

### A. Einleitung und Fragestellung

Biologische Membranen sind Strukturen, die als Permeabilitätsschranken dienen und so eine Kompartimentierung von Räumen ermöglichen. Sie bestehen zum größten Teil aus Lipiden und Proteinen, wobei ihr Verhältnis zwischen 1:4 und 4:1 schwanken kann. Für die Organisation der Membranen gilt das von Singer und Nicolson (1972) vorgeschlagene Fluid-Mosaik-Modell nachdem die Membran aus einer Phospholipiddoppelschicht mit eingelagerten Proteinen besteht, welche ein Mosaik bilden. Die Membranen sind dabei keine starren Strukturen, sondern permanent in lateraler Bewegung.

Von besonderer Bedeutung ist die Plasmamembran, die die Zellen von ihrer Umgebung abgrenzt. Zur Kommunikation mit den Zellen ihrer Umgebung und zur Regulation der Ionenzusammensetzung des Intrazellularraumes beinhalten sie Pumpen, Kanäle, Rezeptoren und Enzyme. Ihr Proteingehalt liegt bei ca. 50%.

Diese Proteine können in integrale und periphere Membranproteine eingeteilt werden. Fast alle integralen Membranproteine durchspannen die Lipiddoppelschicht (Transmembranproteine) und können nur mit Detergentien oder organischen Lösungsmitteln aus der Membran gelöst (solubilisiert) werden. Periphere Membranproteine sind an die Oberfläche von Transmembranproteinen gekoppelt und lassen sich schon unter sehr milden Bedingungen (z. B. mit Lösungen hoher Ionenstärke) solubilisieren.

Zur Kommunikation zwischen einzelnen Zellen oder Zellverbänden sezernieren spezielle Zellen oder Zellgruppen Botenstoffe, die an ihren Zielzellen bestimmte Effekte auslösen. Im tierischen Organismus haben sich zu diesem Zweck der Informationsweiterleitung zwei Systeme entwickelt: Das Hormonsystem und das Nervensystem.

Das Hormonsystem sezerniert Botenstoffe, die in die Blutbahn abgegeben werden und über weite Distanzen wirken können. Die Botenstoffe vermitteln ihre Wirkung über Rezeptoren, die in oder auf den Effektorzellen lokalisiert sein können. Das hormonelle System ist für die länger dauernde und globale Steuerung der Zellfunktionen zuständig.

Im Gegensatz hierzu dient das Nervensystem der schnellen und gezielten Informationsübertragung. Auch hier werden Botenstoffe, die Neurotransmitter (NT), sezerniert. Bei dem neuronalen System findet die Informationsübertragung aber lokal begrenzt an den Synapsen statt. Dies sind Kontaktstellen zwischen Nervenzellen oder Nervenzellen und Effektorzellen (z.B. Muskelzellen), die durch einen synaptischen Spalt getrennt sind. Die Neurotransmitter werden bei der Informationsweiterleitung in den synaptischen Spalt freigesetzt und interagieren mit den prä- und postsynaptischen Rezeptoren. Nach erfolgter Reizweiterleitung ist eine rasche Elimination des Neurotransmitters aus dem synaptischen Spalt essentiell, um eine erneute Informationsübertragung zu ermöglichen. Diese Elimination kann durch enzymatische Spaltung (z.B. Acetylcholin durch die Acetylcholinesterase), Abdiffusion und insbesondere durch Aufnahme via Transporter (Neurotransmitter-Transporter) in prä- oder postsynaptische Axone oder extra-neuronale Zellen (z.B. Gliazellen) erfolgen.

#### 1. Neurotransmitter-Transporter

Die Neurotransmitter können in zwei Hauptgruppen untergliedert werden. Eine Gruppe sind die Neuropeptide, zu denen z.B. die Tachykinine (Substanz P, Neurokinin A, Neurokinin B), Bradykinin und die opioiden Peptide (Endorphine, Enkephaline, Dynorphine) gehören. Sie bestehen aus 5-10 Aminosäuren (AS) und werden in der Regel durch Enzyme abgebaut.

Bei der zweiten Gruppe handelt es sich um die "klassischen" Neurotransmitter zu der die biogenen Amine (Acetylcholin, Histamin, Serotonin, Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin) und die AS Glutaminsäure (Glutamat), Asparaginsäure (Aspartat), Glycin und γ-Aminobuttersäure (GABA) zählen. Bis auf einige Ausnahmen (z.B. Acetylcholin) erfolgt ihre Elimination aus dem synaptischen Spalt durch Neurotransmitter-Transporter (NTT). Adrenalin und Noradrenalin waren hier die ersten Neurotransmitter, für die eine Aufnahme durch spezifische Transportsysteme beschrieben wurden (Axelrod 1971, Iversen 1975).

In der neuronalen Zelle können die NT durch vesikuläre NTT in synaptische Vesikel transportiert werden.

Sowohl an der Plasmamembran als auch an den vesikulären Membranen ist der NT-Influx an einen transmembranalen Ionen-Gradienten gekoppelt, welcher die benötigte Energie für den Rücktransport bereitstellt (Kanner und Schuldiner 1987).

Die Neurotransmitter-Transporter können in Superfamilien, Familien und Subfamilien untergliedert werden, wobei ihre Struktur, Ionenabhängigkeit und Lokalisation als Einteilungskriterien herangezogen werden (Masson et al. 1999).

Das letztere Kriterium führt zu einer Einteilung in zwei Superfamilien: 1) die plasmamembranständigen NTT und 2) den vesikulären NTT.

Die plasmamembranständigen NTT lassen sich nach ihrer Ionenabhängigkeit noch weiter untergliedern: in A) Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-abhängige NTT, B) Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-abhängige NTT und C) organische Kationentransporter (siehe Abb. 1).

## 1) Plasmamembranständige Transporter

Erst in den neunziger Jahren wurde der erste NTT, der γ-Aminobuttersäuretransporter der Ratte (rGAT) (Guastella et al. 1990), kloniert, gefolgt von dem humanen Noradrenalintransporter (hNAT) (Pacholczyk et al. 1991). Ein Sequenzvergleich zeigte eine sehr hohe Sequenzhomologie (68%) und legte den Grundstein für die Homologieklonierung einer ganzen Gruppe ähnlicher Transporter (Nelson et al. 1998).

## A) Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-abhängige NTT

Die Familie der Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>abhängigen NTT kann in die Subfamilien der Monoamintransporter für Dopamin (DAT), Noradrenalin (NAT), und Serotonin (SERT) und der Aminosäuretransporter (Transporter der AS Betain, Creatin, GABA, Glycin, Prolin, Taurin) untergliedert werden.

Die Mitglieder der Familien bestehen aus ca. 600 AS, haben intrazellulär lokalisierte Nund C-Termini, 12 Transmembrandomänen (TMD) und eine große extrazelluläre Schleife zwischen TMD 3 und 4 mit 2-4 *N*-Glykosylierungsstellen und ein Leucin-Zipper-Motiv in der TMD 2. Ein weiteres gemeinsames Merkmal ist ihre Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup> Abhängigkeit (Graefe und Bönisch 1988), wobei der Co-Transport vermutlich dem Influx durch einen Ionenkanal gleicht. Für den NAT konnte ein Verhältnis für Na<sup>+</sup>:Cl<sup>-</sup>:Noradrenalin (NA) von 1:1:1 gezeigt werden (Friedrich und Bönisch 1986).

## B) Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-abhängige NTT

Die Familie der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-abhängigen NTT kann ebenfalls noch weiter untergliedert werden. Man unterscheidet die exzitatorischen AS-Transporter (EAATs), die Glutamat und Aspartat transportieren, und die Transporter für neutrale AS (ASCTs) (Fairmen et al. 1995).

Mitglieder dieser Familie bestehen aus 525 bis 570 AS, wobei die genaue Membrantopologie noch nicht ausreichend geklärt ist. Postuliert werden 6 N-terminale  $\alpha$ -Helices und 4 C-terminale β-Faltblätter (Stoffel et al. 1996) mit intrazellulärem N- und C-Terminus. Zwischen TMD 3 und TMD 4 befindet sich eine große extrazelluläre Schleife mit mehreren Glykosylierungsstellen.

Der Transport der Substrate erfolgt hier vermutlich im Co-Transport mit 2 oder 3 Na<sup>+</sup>-Ionen bei gleichzeitigem Antiport von einem K<sup>+</sup>- und einem Cl<sup>-</sup>-Ion (Bouvier et al. 1992, Levy et al. 1998).

C) organische Kationentransporter (nicht-neuronale Monoamintransporter)

Der organische Kationentransporter (OCT) der Ratte war der erste, der 1994 von Gründemann et al. kloniert wurde. Mit Hilfe des Homologiescreenings folgten Klonierungen weiterer Transporter dieser Familie.

Die "klassischen" OCTs bestehen aus 555 AS und durchziehen in 12 TMDs die Plasmamembran. Zwischen der TMD 1 und 2 befindet sich eine große extrazelluläre Schleife und zwischen TMD 6 und 7 liegt eine große intrazelluläre Schleife. N- und C-Termini sind intrazellulär lokalisiert. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Familien besteht bei den OCTs keine Ionenabhängigkeit. Sie verwenden als treibende Kraft größtenteils das Membranpotential.

Da die OCTs neben Kationen und Xenobiotika auch die Monoamine NA, Adrenalin, Serotonin sowie Histamin transportieren, wird für sie auch die Bezeichnung nichtneuronale Monoamintransporter verwendet.

Neben den "klassischen" OCTs existieren noch weitere Transporter mit hohen Aminosäureübereinstimmungen wie z.B. der hOCTN1 (SLC22A4, Tamai et al. 1997), der hOCTN2 (SLC22A5, Wu et al. 1998a), der hOCTCTL2 (Reece et al. 1998), der hOCTCTL3 und der hOCTCTL4 (Nishiwaki et al. 1998).

1) Vesikuläre NTT

Die vesikulären NTT befinden sich in der Membran der Vesikel in Neuronen. Ihre Aufgabe ist die Aufnahme der Monoamine Dopamin (DA), NA, Adrenalin und Serotonin in die Speichervesikel. Dabei können zwei vesikuläre NTT unterschieden werden: der vesikuläre Monoamintransporter 1 (VMAT1) und der vesikuläre Monoamintransporter 2 (VMAT2) (Übersicht: Schuldiner et al. 1995).

Beide bestehen aus 525 AS und 12 TMD mit intrazellulär lokalisierten N- und C-Termini. Zwischen TMD 1 und 2 liegt eine große, luminale Schleife, welche vermutlich glykosyliert ist.

Der Substrattransport ist Protonen-abhängig. Für den Einwärtstransport jedes Substratmoleküls wird ein H<sup>+</sup>-Ion aus den Vesikeln heraustransportiert. Die Aufrechterhaltung des elektrochemischen Gradienten geschieht durch eine H<sup>+</sup>/ATPase.

Auch der vesikuläre Acetylcholintransporter sowie die Transporter der inhibitorischen AS GABA und Glycin und der vesikuläre Glutamattransporter gehören zu dieser Familie (McIntire et al. 1997, Sagne et al. 1997, Bellocchio et al. 2000).

# Abb. 1: Untergliederung der Neurotransmitter-Transporter (NTT) in Superfamilien, Familien und Subfamilien

Die Einteilung erfolgte in Anlehnung an Masson et al. (1999). Dargestellt sind die putativen Transmembrandomänen mit N- und C-Terminus sowie intra- und extrazelluläre Schleifen und potentielle *N*-Glykosylierungsstellen.

## 2. Die noradrenerge Synapse

Das vegetative Nervensystem lässt sich aufgrund morphologischer und funktioneller Kriterien in zwei Teilsysteme, den parasympathischen und den sympathischen Teil, untergliedern. Vereinfacht gesagt, ist hierbei der Parasympathikus für trophotrope und der Sympathikus für ergotrope Reaktionen verantwortlich.

Bei dem Sympathikus ist in den Ganglien Acetylcholin und an postganglionären Neuronen NA der Botenstoff. Weiter kommt NA in Neuronen des zentralen Nervensystems (ZNS) und im Nebennierenmark vor.

Noradrenerge Kerngruppen liegen in der Formatio reticularis, der Pons, der Medulla oblongata und vor allem im Locus coeruleus (am Boden der Rautengrube). Aszendierende und deszendierende Axone erreichen weite Gebiete des ZNS einschließlich Rückenmark, Kleinhirn- und Großhirnrinde. Die zentralen Neurone sollen bei der Regelung des Schlaf-Wach-Rhythmus, der Nahrungsaufnahme und des Kreislaufes eine Rolle spielen. In der Peripherie innervieren postganglionäre, sympathische Neurone unter anderem den Herzmuskel, die Bronchialmuskulatur und die glatte Muskulatur der Blutgefäße. Abb. 2 zeigt die Vorgänge an der noradrenergen Synapse im Überblick, welche nachfolgend erläutert werden.

1) Synthese: NA wird in den Nervenendigungen aus der AS Tyrosin gebildet, welche von den Nervenzellen aus dem Extrazellulärraum aufgenommen oder aus der aromatischen AS Phenylalanin gebildet wird. Diese wird durch die Tyrosinhydroxylase (TH) in L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) umgewandelt. Bei dieser Reaktion handelt es sich um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der NA-Synthese. Interessant ist auch, dass die TH außer im Nebennierenmark nur in catecholaminergen Neuronen vorkommt.

L-DOPA wird nun durch die Aromatische-L-Aminosäuredecarboxylase zu Dopamin verstoffwechselt, welches anschließend durch den vesikulären Monoamintransporter in die synaptischen Vesikel transportiert wird. Dieser Transport nutzt den pH-Gradienten aus, der durch eine ATP-abhängige Protonenpumpe aufrecht erhalten wird. Der nachfolgende Schritt vom Dopamin zum NA wird durch das Enzym Dopamin-ß-Hydroxylase katalysiert.

2) Freisetzung: Das in den Vesikeln gespeicherte NA wird durch Exozytose freigesetzt. Dabei docken die gefüllten Vesikel an eine sensitive Zone der präsynaptischen Membran. Nach diesem Erstkontakt folgt ein Reifungsprozeß, der als Priming bezeichnet wird. Eine Depolarisation der präsynaptischen Membran bedingt einen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom, der eine Verschmelzung von Zell- und Vesikelmembran herbeiführt. Die NT werden so in den synaptischen Spalt entleert.

Die Vesikelmembranen werden nun "recycelt", d.h. sie werden internalisiert und bilden erneut Vesikel. Nach vermehrter Protonenaufnahme zur Wiederherstellung des pH-Gradienten werden sie mit Hilfe von Endosomen regeneriert und stehen einer erneuten Füllung mit NT zur Verfügung (Südhof 1995).

Für das freigesetzte NA befinden sich auf den post- und präsynaptischen Membranen Rezeptoren. Sie werden als Adrenozeptoren bezeichnet und lassen sich in  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\beta_3$ -Adrenozeptoren untergliedern. Es handelt sich hierbei um G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die ihre Signale über "second messenger" z.B. cAMP und Inositoltriphosphat vermitteln. In der Peripherie vermittelt NA z.B. via  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren an den glatten Muskelzellen eine Vasokonstriktion und via  $\beta_1$ -Adrenozeptoren an den Herzmuskelzellen positiv inotrope, chronotrope, dromotrope und bathmotrope Wirkungen. Antagonisten der Rezeptoren können daher unter anderem zur Senkung des Blutdrucks eingesetzt werden.

Über  $\beta_2$ -Adrenozeptoren an den glatten Muskelzellen der Bronchialmuskulatur verursacht NA eine Erschlaffung dieser, weshalb sich Agonisten an diesen Rezeptoren gut in der Asthma-Therapie einsetzen lassen.

Die Erregung präsynaptischer Autorezeptoren führt zu einer Modulation der NA-Freisetzung, wobei durch  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren eine Verminderung und durch  $\beta_2$ -Adrenozeptoren eine Steigerung der Freisetzung bewirkt wird.

3) Elimination: Die Elimination von NA aus dem synaptischen Spalt erfolgt zu ca. 90% durch neuronale Rückaufnahme in das Axon mit dem Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-abhängigen Noradrenalintransporter. Der größte Teil des aufgenommenen NA wird mit Hilfe des VMAT in die Vesikel transportiert, kann aber auch durch die Monoaminoxidase (MAO) zu inaktiven Metaboliten abgebaut werden.

NA wird teilweise auch durch einen Na<sup>+</sup>-unabhängigen Transporter aus dem Extrazellulärraum entfernt. Der verantwortliche Transporter, der OCT3, ist sowohl im ZNS

8

(Gliazellen) als auch in der Peripherie (Herzmuskelzellen, Drüsenzellen, Muskelzellen) zu finden (Eisenhofer 2001). In diesen Zellen wird NA durch die MAO oder die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) abgebaut

#### Abb. 2: Schematische Darstellung einer peripheren noradrenergen Synapse

Die Bildung von Dihydrophenylalanin (Dopa) aus Tyrosin (Tyr) wird durch die Tyrosinhydroxylase (TH) katalysiert. Dopa wird, katalysiert durch die Aromatische-L-Aminosäuredecarboxylase, anschließend zu Dopamin (DA) umgesetzt. Der vesikuläre Monoamintransporter transportiert DA in die synaptischen Vesikel. Hier wird DA durch die Dopamin-β-Hydroxylase in Noradrenalin (NA) umgesetzt. Durch eine Depolarisation der präsynaptischen Membran kommt es zur Exozytose des NA. Dieses interagiert anschließend mit post- und präsynaptischen Rezeptoren. Die Inaktivierung des NA erfolgt präsynaptisch durch neuronale Wiederaufnahme mittels uptake<sub>1</sub> (NAT) und z.T. postsynaptisch mittels uptake<sub>2</sub> (OCT3). Zu einem geringen Teil gelangt NA durch Diffusion aus dem synaptischen Spalt in die Blutbahn. Aufgenommenes NA wird entweder wieder in synaptische Vesikel rücktransportiert oder mittels Monoaminoxidase (MAO) bzw. Catechol-O-Methyltransferase (COMT) abgebaut.

## 3. Der Noradrenalintransporter

#### 3.1 Pharmakologie, Topologie, Molekularbiologie

Der NAT kommt hauptsächlich in der Plasmamembran noradrenerger Neurone vor, wird aber auch in einigen nicht-neuronalen Geweben, wie der Plazenta und den Endothelzellen der Lunge exprimiert (Eisenhofer 2001).

Die Existenz eines aktiven Transportsystems in sympathischen Nervenendigungen zur Eliminierung von NA aus dem synaptischen Spalt wurde bereits 1961 von Hertting und Axelrod propagiert, die eine Akkumulation von [<sup>3</sup>H]-NA in den Nervenzellen beobachteten, welche sich durch trizyklische Antidepressiva und Cocain hemmen ließ.

Erste pharmakologische Untersuchungen des Transporters erfolgten an isolierten Geweben und Zellkulturen, die den NAT konstitutiv exprimieren z.B. Phäochromocytom-Zellen der Ratte (PC12-Zellen) und humane Neuroblastom-Zellen (SKN-SH-SY5Y).

Der NAT ist sättigbar und zeigt eine hohe Affinität zu seinem Substrat NA ( $K_m \approx 1 \mu M$ ), transportiert aber auch Dopamin und Adrenalin. Die indirekten Sympathomimetika Tyramin und Amphetamin werden ebenfalls vom NAT transportiert (Bönisch 1984, Trendelenburg et al. 1987). Strukturelle Voraussetzungen für den Transport von β-Phenylethylamin-Derivaten ist das Fehlen sperriger Substituenten am Stickstoff und von Methoxygruppen am aromatischen Ring. Auch andere Substanzen, wie das dopaminerge Neurotoxin 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>), Amezinium und Guanethidin werden vom NAT als Substrate erkannt (Bönisch und Trendelenburg 1988, Graefe und Bönisch 1988).

Der Substrattransport ist Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>abhängig und erfolgt in Richtung des Natriumgradienten ins Innere des Neurons, wobei zuerst Na<sup>+</sup> und dann Cl<sup>-</sup> gebunden werden muss, um NA aufnehmen zu können. Interessanterweise können Cl<sup>-</sup>-Ionen durch Br<sup>-</sup>oder SCN<sup>-</sup>-Ionen ersetzt werden, während Na<sup>+</sup>-Ionen für die Transportfunktion absolut essentiell sind (Harder und Bönisch 1985, Friedrich und Bönisch 1986).

Auch die Bindung von NAT-Inhibitoren, wie z.B. Desipramin und Nisoxetin, ist Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-abhängig. Während das stöchiometrische Verhältnis (Na<sup>+</sup>:Cl<sup>-</sup>:NA) bei den Substraten 1:1:1 beträgt, sind für die Inhibitoren 2 Na<sup>+</sup>-Ionen notwendig. Möglicherweise interagieren die Inhibitoren zusätzlich zu den Substratbindungsstellen mit einer weiteren

Na<sup>+</sup>-abhängigen Bindungsstelle des Transporters (Michael-Hepp et al. 1992, Bönisch und Brüss 1994).

Der NA-Transport kann auch in umgekehrter Richtung erfolgen. Dies geschieht z.B. durch Hemmung der für die Aufrechterhaltung des Natriumgradienten verantwortlichen Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Auch die indirekten Sympathomimetika Tyramin und Amphetamin bewirken einen Auswärtstransport von NA. Sie werden von dem NAT ins Neuron transportiert und konkurrieren an dem VMAT mit NA um den Transport in die Vesikel. Dadurch steigt die intrazelluläre NA Konzentration und es kommt zur Carrier-vermittelten Ausschüttung von NA (Trendelenburg et al. 1987). Das lipophile Amphetamin gelangt über die Blut-Hirn-Schranke auch ins ZNS und verursacht durch die NA-Freisetzung eine Antriebssteigerung. Eine ebenso gesteigerte DA-Freisetzung verursacht Euphorie, was zu der häufigen missbräuchlichen Anwendung der Substanz führt.

Durch Expressionsklonierung wurde 1991 die cDNA des humanen Noradrenalintransporters (hNAT) isoliert, welche ein Protein aus 617 AS mit einem Molekulargewicht von 69 kDa kodiert (Pacholczyk et al. 1991). Das hNAT Gen wurde von unserer Arbeitsgruppe auf Chromosom 16q12.2 kartiert (Brüss et al. 1993). Es erstreckt sich über 45 kb und besteht aus 14 Introns und 15 Exons (Pörzgen et al.1995).

Hydrophobizitätsanalysen sowie Antikörperexperimente postulieren 12 α-helikale TMD mit intrazellulären N- und C-Termini (Brüss et al. 1995). Zwischen TMD 3 und 4 befindet sich eine große extrazelluläre Schleife mit 3 *N*-Glykosylierungsstellen. In der TMD 2 befindet sich ein Leucin-Zipper-Motiv, welches für die Dimerisierung von Proteinen verantwortlich gemacht wird. In der zweiten intrazellulären Schleife ist eine Proteinkinase C Bindungsstelle mit einer Konsensussequenz von [S/T]-X-[R/K] lokalisiert. Weiter besitzt der hNAT zwei Caseinkinase II Bindungsstellen (AS 19 und 538). Die Topologie des hNAT ist in Abb. 3 dargestellt.

Nach der Klonierung des hNAT folgten die Klonierungen des bovinen NAT (bNAT), des Ratten-NAT (rNAT) und murinen NAT (mNAT) (Lingen et al. 1994, Brüss et al. 1997, Fritz et al. 1998).

Vergleiche der Aminosäuresequenzen und der Pharmakologie eines Transporters verschiedener Spezies bieten erste Einblicke in für die Ligand-Bindung potentiell

wichtigen Domänen bzw. AS. Der bNAT und der rNAT zeigen eine 93% Homologie zu dem hNAT, während der mNAT zu 94% mit dem hNAT übereinstimmt.

Paczkowski et al. (1999) verglichen in einer Studie die pharmakologischen Eigenschaften von hNAT, bNAT und rNAT. Trotz der nur geringfügig variierenden AS-Sequenz wurden Unterschiede in den Affinitäten zu NA, Adrenalin, MPP<sup>+</sup> und Cocain berichtet.



#### Abb. 3: Putative Membrantopologie und funktionelle Domänen des hNAT.

CHO: N-Glykosylierungsstelle; NH2: N-Terminus; COOH: C-Terminus; PKC: Proteinkinase C Phosphorylierungsstelle; CKII: Caseinkinase II Phosphorylierungsstelle.

#### 3.2 Struktur-Funktions-Beziehungen

Mit der Klonierung der cDNA des NAT ergaben sich völlig neue Möglichkeiten weitere Kenntnisse über die Transporterfunktion zu erhalten. So konnten durch die Etablierung heterologer Expressionssysteme, gerichtete Mutagenesestudien und der Bildung von Chimären wichtige Informationen über die Struktur-Funktions-Beziehung der Transporter gewonnen werden.

Durch Konstruktion von Chimären zwischen dem NAT und DAT (Buck und Amara 1994, Giros et al. 1994) und NAT und SERT (Stephan et al. 1997) und pharmakologische Charakterisierungen dieser gelang die Zuweisung einzelner Domänen zu bestimmten Funktionen der Transporter.

So ist die N-terminale Region mit den TMD 1-5 bei dem Na<sup>+</sup>/CI<sup>-</sup>-Transport involviert und für den Aufnahmemechanismus wichtig. An der Substraterkennung und der Inhibitorbindung sind die TMD 5-8 beteiligt. Die C-terminale Region mit TMD 9-12 sind für die Stereoselektivität bedeutsam.

Die hohe Homologie der Monoamintransporter untereinander führte zur Annahme, dass hochkonservierte Regionen auf wichtige strukturelle Elemente für die Funktion der Transporter hinweisen. Durch Mutageneseversuche wurden einige der konservativen AS auf ihre Funktion bei dem Substrattransport oder der Inhibitorbindung untersucht. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die AS Tryptophan (Trp80) und Arginin (Arg81) in der TMD 1 und die AS Glutamat (Glu113) in der TMD 2 für den Substrattransport essentiell sind. Auch die AS Asparagin (Asp75) in der TMD 1 sowie die AS Serin (Ser 354) in der TMD 7 sind sowohl für den Substrattransport als auch die Inhibitorbindung wesentlich. Der AS-Austausch Asp75Ala führte zu einem fast vollständigem Verlust der [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme und der [<sup>3</sup>H]-Desipramin-Bindung. Ein Austausch Ser354Ala führte zu einer starken Reduktion der [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme (-50%) sowie der [<sup>3</sup>H]-Desipramin-Bindung (-90%) (Bönisch et al. 1999).

Obwohl der DAT und der NAT unter den Monoamintransportern die stärkste Verwandtschaft aufweisen, zeigen sie deutliche Unterschiede im Hinblick auf die Bindung trizyklischer Antidepressiva (TCA). Nachdem durch Studien an Chimären die Bedeutung der TMD 5-8 für die TCA-Bindung gezeigt worden war, wurden von Roubert et al. (2000) 18 AS dieser Region durch gerichtete Mutagenese ersetzt. Die Mutation Phe316Cys und Ala336Ser in der TMD 6 führten zu einer 30-fachen Reduktion der Desipramin-Bindung. Die Doppelmutation Ser399/Gly400  $\rightarrow$  Pro399/Leu400 in der TMD 8 verminderte den inhibitorischen Effekt von Desipramin um den Faktor 3000, ohne jedoch den Transport zu beeinflussen. Dies zeigt, dass die beiden AS kritisch für die Bindung der TCA sind. Bei Untersuchungen natürlich vorkommender hNAT-Varianten wurde z.B. bei der Gly478Ser-Variante ein 4fach erhöhter K<sub>m</sub> bei unveränderter V<sub>max</sub> nachgewiesen (Runkel et al. 2000). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass einzelne AS für verschiedene Funktionen des Transporters große Bedeutungen haben können.

Trotz des starken Zuwachses an Informationen über die Monoamintransporter sind der genaue Transportmechanismus und die für die Ligand-Bindung wesentlichen AS aber noch nicht im Detail geklärt. Da der NAT Angriffspunkt verschiedener Pharmaka zur Behandlung von z.B. Depression, ADHD und Fettleibigkeit ist (Bray 1993, DeGrado et al. 1993, Iversen 2000), sind weitere Untersuchungen erstrebenswert. Die Entwicklung neuer Arzneimittel mit verbesserten Wirkungs- und Nebenwirkungsprofilen wären so möglich.

#### 3.3 Biochemie

In Solubilisierungsversuchen konnte der Noradrenalintransporter aus PC12-Zellen und dem Nebennierenmark des Rindes mit Hilfe von Detergentien ohne Funktionsverlust aus der Plasmamembran herausgelöst werden (Schömig und Bönisch 1986, Michael-Hepp et al. 1992). Als geeignetes Detergens erwies sich hier Digitonin.

Da der NAT natürlicherweise von den PC12-Zellen exprimiert wird (55000 Transporter/Zelle), wurden Digitonin-solubilisierte PC12-Membranen als Ausgangsmaterial für Aufreinigungsversuche verwendet. Durch den Einsatz verschiedener chromatographischer Methoden (Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltrationschromatographie und Affinitätschromatographie) konnte in der gereinigten Fraktion nach SDS-PAGE eine Proteinbande bei 55 kDa identifiziert werden (Bönisch et al. 1990). Bislang konnte der NAT aber nicht hoch aufgereinigt werden. Bis auf den Glutamat-Transporter und den Transporter für GABA (Radian und Kanner 1986, Danbold et al. 1990) gelang bisher auch bei anderen Monoamintransportern keine hohe Aufreinigung.

Ein Protein mit einem Molekulargewicht von 55 kDa wurde durch Markierungsversuche mit [<sup>3</sup>H]-Desmethylxylamin (DMX) als NAT identifiziert (Bönisch et al. 1991). DMX gehört, wie auch Xylamin und DSP-4, zu den ß-Haloalkylaminen. Diese Neurotoxine zyklisieren in wässriger Lösung zu einem Aziridinium-Ion (siehe Abb. 4). Sie werden

vom NAT als Substrat erkannt und binden während des Transportes kovalent an diesen und führen so zu seiner Hemmung. Dabei interagieren die Aziridinium-Ionen vor allem mit Thiolen (Cysteinen).

Neben den oben genannten Substanzen führt auch das Thiol-modifizierende *N*-Ethylmalimid (NEM) zu einer Hemmung des [<sup>3</sup>H]-NA-Transportes und der Bindung des Inhibitors [<sup>3</sup>H]-Desipramin. Dies und die Tatsache, dass hohe Konzentrationen von Dithioerythriol und 2-Mercaptoethanol die [<sup>3</sup>H]-Desipramin-Bindung verhindern, zeigt, dass Thiole eine besondere Bedeutung für die unbeeinträchtigte Funktion des Transporters haben (Bönisch et al. 1990, Kitayama und Toshihioro 1996, Foley und Cozzi 2001). Welche Cysteinreste für die Bindung der ß-Haloalkylamine verantwortlich sind, konnte bislang noch nicht geklärt werden.

Durch Biotinylierungsversuche und Behandlung des NAT mit Glykosidasen (Endoglykosidase H oder *N*-Glykosidase F) ist heute bekannt, dass es sich bei der 55 kDa Bande um eine Form des NAT im frühen Glykosylierungsstadium handelt. Der hochglykosylierte, monomere NAT zeigt eine Bande bei ca. 80 kDa und der unglykosylierte NAT eine Bande bei 45 kDa (Brüss et al. 1995, Melikian et al. 1996, Hahn et al. 2003). Es konnten aber auch Banden bei ca. 112 kDa detektiert werden (Brüss et al. 1995, Melikian et al. 1996, Baumann und Blakely 2002), die möglicherweise eine dimere Form des NAT Proteins darstellen.



#### Abb. 4: Zyklisierung von β-Haloalkylaminen zu einem Aziridinium-Ion

Dargestellt ist die Zyklisierung der β-Haloalkylamine Xylamin und DSP-4 in wässriger Lösung zum Aziridinium-Ion. Dieses interagiert mit Thiolen durch Bildung kovalenter Brücken. β-Haloalkylamine können zur kovalenten Markierung des NAT eingesetzt werden.

#### 3.4 Regulation

Aufgrund ihrer wichtigen physiologischen Rolle ist ein genaues Verständnis der Regulation der NA<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>abhängigen NTT von großem Interesse. Bis vor kurzem galt noch die Hypothese, dass es sich bei den Transportern um relativ stabile Funktionseinheiten handelt, die schwer zu regulieren sind. Neuere Untersuchungen zeigen das Gegenteil.

Von großer Bedeutung bei der Regulation der Transporter ist die Phosporylierung durch Kinasen, wobei die Effekte der Proteinkinase C am bestem charakterisiert sind. So führt eine Aktivierung der PKC durch Phorbolester (z.B. PMA) zu einer Abnahme der V<sub>max</sub> der [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme bei unverändertem K<sub>m</sub>, weshalb eine Umverteilung der Transporter angenommen wird (Apparsundaram et al. 1998a, Daniels und Amara 1999). Bindungsversuche sowie Biotinylierungs- und Immunofluoreszenzexperimente bestätigen diese Theorie. Sie zeigen ebenfalls eine Abnahme der Transporterdichte in der Plasmamembran bei gleichbleibender Gesamttransporterzahl (Apparsundaram et al. 1998b).

Obwohl der NAT potentielle Bindungsstellen für die PKC aufweist, wurde eine direkte Phosphorylierung zunächst ausgeschlossen, da auch nach Entfernung der PKC-Konsensus-Stelle eine PMA-induzierte Internalisierung des Transporters beobachtet wurde (Bönisch et al. 1998). In Immunopräzipitationsstudien wurde jedoch kürzlich eine Phosporylierung des NAT nachgewiesen (Blakely und Baumann 2000). Ob die internalisierten Transporter in Lysosomen abgebaut oder in Endosomen recycelt werden ist noch nicht geklärt (Melikian und Buckley 1999, Daniels und Amara 1999). Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Co-Lokalisation des NAT mit dem Syntaxin 1A, einem präsynaptischen SNARE-Protein, welches an den N-terminalen Bereich des NAT bindet und die Oberflächenexpression des Transporters fördert. PKC-

Aktivatoren trennen diese Interaktion. Da Syntaxin 1A auch an der Fusion von NA-Vesikeln beteiligt ist, kann ein komplexer, dynamischer Zyklus von Interaktionen der NA-Freisetzung und Rückaufnahme angenommen werden (Sung et al. 2003).

Neben der PKC sind auch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (Abnahme der Transporterfunktion) und die Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Proteinkinase (Zunahme der Transporterfunktion) an der Regulation des NAT beteiligt (Zahniser und Doolen 2001). Der Nachweis der Assoziation von NAT, DAT und SERT mit Phosphatasen (PP2A) zeigt, dass die Regulierung der Transporter nicht nur durch Kinasen, sondern auch durch Phosphatasen beeinflusst wird (Blakely und Baumann 2000).

Für die Oberflächenexpression ist neben den oben genannten Faktoren und der korrekten Glykosylierung (Melikian et al. 1996, Nguyen und Amara 1996) auch die AS-Sequenz des C-Terminus des NAT wesentlich (Burton et al. 1998, Baumann und Blakely 2002). Torres et al. (2001) konnten eine Interaktion des synaptischen PDZ-Domänen-enthaltenden Proteins Pick1 und dem C-Terminus des NAT nachweisen. PDZ-Domänen-enthaltende Proteine sind wesentlich an der Expression, Lokalisation und Funktion von Membranproteinen beteiligt. Die hier verantwortliche PDZ-Domäne gehört zu der Klasse II, welche an die Sequenz  $\Phi$ -X- $\Phi$  ( $\Phi$  = hydrophobe AS) binden.

Neben den erwähnten heteromeren Protein-Interaktionen spielen auch Oligomerisierungen der Monoamintransporter einer Rolle bei der Regulation des NAT. Kilic und Rudnick (2000) konnten eine Dimerisierung des SERT mit funktionellen Interaktionen nachweisen. Bei dem NAT soll es zu dominant-negativen Interaktionen zwischen Splice-Varianten des Transporters kommen (Kitayama et al. 1999). Da der NAT Angriffspunkt verschiedener Pharmaka ist, ist die Kenntnis der Regulation des Transporters durch chronische Pharmakon-Verabreichung von besonderer Relevanz. Eine Exposition des Transporters (PC12-Zellen) mit Desipramin für 3 Tage führte zu einer Abnahme der B<sub>max</sub> der [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung bei unverändertem K<sub>D</sub> sowie einer Abnahme der [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme, was möglicherweise auf eine Verminderung der Transporterexpression an der Zellmembran zurückzuführen ist (Zhu und Ordway 1997). Gleiches wurde bei hNAT exprimierenden HEK Zellen beobachtet (Zhu et al. 1998). Auch eine längere Gabe von Amphetamin (3 Tage) reduzierte die B<sub>max</sub> der [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung an den hNAT auf 46% ohne die hNAT mRNA zu beeinflussen. Die Abnahme der Transporterdichte in der Membran konnte durch Immunofloureszenz bestätigt werden (Zhu et al. 2000). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Transporter nicht nur extrazelluläre Neurotransmitter-Konzentrationen regulieren, sondern selbst einem ständigen Prozess der Regulation unterliegen.

Interessante Ergebnisse werden sicher auch Untersuchungen an NAT-Knockout-Mäusen liefern. Erste Untersuchungen zeigten bereits, dass eine Zerstörung des NAT-Gens zu reduzierten NA-Konzentrationen im Gehirn (55-70% Reduktion) und einer Verminderung an freigesetztem NA (60% Reduktion) sowie einer um das sechsfache verminderten NA-Clearance bei gleichzeitiger Abnahme an  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren führt (Xu et al. 2000).

## 4. Zielsetzung

Es ist immer noch nicht bekannt, welche Aminosäuren Ligandbindungsstellen für NAT-Substrate darstellen. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sollten letztendlich auch einen Beitrag zur Klärung dieser Frage leisten.

Ein Ziel der Arbeit war die Klonierung, funktionelle Expression und pharmakologische Charakterisierung des NAT der Maus (mNAT). Damit würde neben dem NAT des Menschen, des Rindes und der Ratte eine weitere Speziesvariante zum Vergleich der AS-Sequenz und damit zum Erkennen hochkonservierter und für die gemeinsame Funktion wichtiger AS zur Verfügung stehen. Durch den pharmakologischen Vergleich mit den Eigenschaften der anderen Speziesvarianten kann wiederum auf Besonderheiten von AS, die nur beim mNAT vorkommen, rückgeschlossen werden.

Ein weiteres Ziel war die Etablierung von Methoden, die eine aussichtsreiche Aufreinigung des hNAT-Proteins nach kovalenter Markierung mit dem NAT-Substrat und "Suizid-Inhibitor" Xylamin ermöglichen. Bisher waren hierfür nur Gewebe oder Zellen, die den NAT nativ und in nicht sehr hoher Dichte exprimieren (z.B. Rinder-Nebennierenmark, Ratten-Phäochromozytomzellen) eingesetzt worden. Nicht nur durch Einsatz von stabil transfizierten CHO-Zellen, die den hNAT in hoher Dichte exprimieren, sondern auch durch die Anfügung eines Polyhistidinrestes an den N-Terminus des hNAT, die eine Aufreinigung des hNAT-Proteins über Metallchelat-Säulen ermöglicht, sollte eine bessere Ausgangssituation geschaffen werden.

Hierbei sollte auch geprüft werden, ob sich durch diese Manipulation die pharmakologischen Eigenschaften des hNAT verändern.

Weiterhin sollten an diesem Transporter Untersuchungen zur irreversiblen Inaktivierung des NAT durch kovalente Bindung von Xylamin durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang galt es auch zu prüfen, ob die gleichzeitige Gabe von Substraten oder Inhibitoren des NAT vor einer irreversiblen Inaktivierung des NAT schützt.

## **B.** Material und Methoden

## 1. Material

## 1.1 Arbeitsgeräte

Analysenwaage	A 210 P, Sartorius	
	FA 3100-2iEC, Faust	
Autoklav	Automat 20, Webeco	
	Bioclav KSK 117, Schütt	
Beleuchtungstisch	Just-Normlicht	
Brutschrank	BE 500, Memmert	
	B 5060 EK/CO <sub>2</sub> , Heraeus	
Elektrapette	MultiElektrapette ADJ 1250, Technomara	
Elektrophoresekammer (vertikal)	Penguin P& DS Doppelgelsystem, Owl	
	Scientific incl. Gelgießstand, Glasplatten,	
	Spacer und Beutel	
Geltrockner	LB1210B, Berthold	
Heizrührer	Ikamag RH, Ika	
Lumi-Imager	Roche	
Magnet	Dynal MPC	
Membranpumpe	Typ EKF45, Greiffenberger Antriebstechnik	
	GmbH	
Mikroskop	Diavert, Leitz	
miniPERM®	Vivascience	
Neubauer-Zählkammer	Brand	
pH-Meter	pH 522, WTW	
Photodokumentation	MWG Biotech	
umfasst: UV/VIS Leuchtisch	TFP-M/WL	
Kamera	KP-M1U, Hitachi	
Thermoprinter	P66E, Mitsubishi	
Bildschirm	IM400-E, Javelin	

Photometer	DU-64, Beckmann	
	GeneQuant II, Pharmacia	
Pipetten	Varipette, Eppendorf	
	PreCision, Finpipett	
	Pipetman, Gilson	
Pipettenstopfautomat	Typ P500, Bachofer	
Röntgenkassetten	X-Omatic Kassette mit Verstärkerfolie, Kodak	
Rotoren	TST 28,38 Beckmann	
	TFT 65,38 Beckmann	
Schüttelinkubator	TR-125, Infors AG	
Schüttler	VF-2, Ika	
Sequenzer	LI-COR 4200, MWG	
Spannungsgeräte	Modell 493, ISCO	
	2303 Multidrive XL, Pharmacia LKB	
	ECPS 3000/150 Pharmacia LKB	
Speedvac Concentrator	SVC 100H, Savant	
Sterilarbeitsbank	HA 2448 GS, Heraeus	
	Gelaire, Bio-Flow	
Sterilisator	S 40, Memmert	
Szintillationszähler	LS 5000 TD, Beckmann	
Tank-Blot Kammer	Trans-Blot Cell, Mod. No. 1703910, BioRad	
Thermocycler	BioMed TC 100, Braun-Melsungen	
	Trioblock (mit Deckelheizung), Biometra	
Vortexgerät	Vibrax-VXR,	
	Ika Vortex Genie 2, Bender & Holbein	
Ultra-Turrax	T25, Janke & Kungel	
Wasseraufbereitung	Easy Pure RF, Barnstedt	
Wasserbad	Hartenstein	
Zellharvester	Brandel	
Zellhomogenisator	Wheaton Potter	

## Zentrifugen

Tischzentrifugen 5114 und 5402, Eppendorf 1K15 und 2K15, Sigma CPKR (Rotor: GH-3.7) Beckmann JS-21 (Rotor: JA-20) Beckmann

## 1.2 Verbrauchsmaterial

Blotting-Papier	3M-Chr, Whatmann
Einfrierbox	Nalgene
Einfrierröhrchen	Nunc, 1,8 ml
Filmrolle für Thermoprinter	K65HM, Mitsubishi
Frischhaltefolie	Saran Wrap, Roth
Kanülen	Braun
Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schüll
Nylonfilter	Hybond N+, Amersham
Petrischalen	Saarstedt
Pipettenzubehör	Standardtips 10 µl, Eppendorf
	10-100 μl, 100 - 1000 μl, Saarstedt,
	10 µI,100 µI,1000 µI, FX-E, Südlabor
Reaktionsgefäße	Safelock 0,5 ml und 2 ml,
	Eppendorf
	1,5 ml Saarstedt
Spritzen	2 ml, 5 ml, 50 ml, Braun
Sterilfilter	Typ GVPP, 0,22 μm, Millipore
Sterile Plastikpipetten	5 ml, 10ml, 25 ml, Falcon
Zählröhrchen	12 ml, PE, Packard
Zellkulturflaschen	175 $cm^2$ , 75 $cm^2$ , 25 $cm^2$ , Nunc
Zellkultur Multiwell-Platten	6er-Well, 24er-Well, Nunc
Zellkulturschalen	10 cm, Nunc
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml, Nunc
Zellkulturplatten	12-well, Multiwell, Falcon

# 1.3 Computer-Software

www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/
bl2.html
www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi
Hitachi Software Engineering Co.,
www.expasy.ch
Graph Pad Software
IntelliGenetics
Boehringer

# 1.4 Kits für die Molekularbiologie

Advantage Genomic Polymerase	Clontech
Expand Long Template PCR System	Roche
Fail Safe PCR System	Biozym
Gene Elute Agarose Spin Columns	Sigma
Mouse Genome Walker Kit	Clontech
Original TA Cloning Kit	Invitrogen
Plasmid Mega Kit	Qiagen
Random Primed DNA Labeling Kit	Roche
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Spin Miniprep Kit	Qiagen
QiaAmp Blood Midi Kit	Qiagen
Thermo Sequenase fluorescent labelled	
primer cycle sequencing kit with	
7-deaza-dGTP	Amersham

## 1.5 Chemikalien

Acrylamid	Roth
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 40%	Appligene
Agar-Agar	Merck
Agarose (for electrophoresis)	Serva
Ammoniumperoxodisulfat	Merck und BioRad
Ampicillin	Roche
Ascorbinsäure	Merck
Bactotrypton	Life Technologies
BES (N,N-bis[2-hydroxyethyl]-2-	
aminoethanesulfonic acid)	Sigma
Beta-Mercaptoethanol	Sigma
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	BioRad
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma
Calciumchlorid Dihydrat	Merck
Caseinhydrolysat	Life Technologies
Hühner Serum	Life Technologies
Chloroform	Merck
Cocain	Drug Houses of Australia
Coomassie Brilliant Blue	Serva
DC Proteinassay	BioRad
Desipramin	Sigma
Destilliertes Wasser (Zellkulturgrad)	Life Technologies
D-Glukose	Merck
Dimethylformamid (DMF)	Fluka
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's	
Medium)	Sigma
Dodecylmaltosid	Anatrace
Dopamin	Sigma

Essigsäure (100%)	Merck
Adrenalin	Sigma
Ethanol absolut	Merck
Ethidiumbromid	Roche
Ethylendiamintetraacetat, Na-Salz	
(EDTA, Titriplex III)	Merck
Ficoll 400	Sigma
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	Merck
Fötales Kälberserum (FKS)	Sigma, Pan Systems
Gelatine	Merck, Sigma
Geneticin (G 418)	Sigma
Glycerol (87%)	Merck
Glycin	Serva
Harnstoff	Merck
Hefeextrakt	Life Technologies
His-Select <sup>™</sup> Nickel Affinitätsgel	Sigma
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-	
ethansulfonsäure (HEPES)	Roth
Imipramin	Novartis Pharma
leopropapal	
Isopioparior	Merck
Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid (IPTG	Merck )Roche
Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid (IPTG Kaleidoscope Prestained Standards	Merck )Roche BioRad
Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid (IPTG Kaleidoscope Prestained Standards Kaliumchlorid	Merck )Roche BioRad Merck
Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid (IPTG Kaleidoscope Prestained Standards Kaliumchlorid Kaliumhydrogenphosphat	Merck )Roche BioRad Merck Merck
Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid (IPTG Kaleidoscope Prestained Standards Kaliumchlorid Kaliumhydrogenphosphat Kupfersulfatpentahydrat	Merck )Roche BioRad Merck Merck Merck
Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid (IPTG Kaleidoscope Prestained Standards Kaliumchlorid Kaliumhydrogenphosphat Kupfersulfatpentahydrat Lipofectamin	Merck )Roche BioRad Merck Merck Merck Gibco BRL
Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid (IPTG Kaleidoscope Prestained Standards Kaliumchlorid Kaliumhydrogenphosphat Kupfersulfatpentahydrat Lipofectamin LumiLight Western Blotting Substrate	Merck )Roche BioRad Merck Merck Merck Gibco BRL Roche
Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid (IPTG Kaleidoscope Prestained Standards Kaliumchlorid Kaliumhydrogenphosphat Kupfersulfatpentahydrat Lipofectamin LumiLight Western Blotting Substrate Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck )Roche BioRad Merck Merck Merck Gibco BRL Roche Merck
Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid (IPTG Kaleidoscope Prestained Standards Kaliumchlorid Kaliumhydrogenphosphat Kupfersulfatpentahydrat Lipofectamin LumiLight Western Blotting Substrate Magnesiumchlorid Hexahydrat Magnesiumsulfat Heptahydrat	Merck )Roche BioRad Merck Merck Merck Gibco BRL Roche Merck Merck Merck
Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid (IPTG Kaleidoscope Prestained Standards Kaliumchlorid Kaliumhydrogenphosphat Kupfersulfatpentahydrat Lipofectamin LumiLight Western Blotting Substrate Magnesiumchlorid Hexahydrat Magnesiumsulfat Heptahydrat MEM (Minimum Essential Medium Eagle)	Merck )Roche BioRad Merck Merck Gibco BRL Roche Merck Merck Sigma
Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid (IPTG Kaleidoscope Prestained Standards Kaliumchlorid Kaliumhydrogenphosphat Kupfersulfatpentahydrat Lipofectamin LumiLight Western Blotting Substrate Magnesiumchlorid Hexahydrat Magnesiumsulfat Heptahydrat MEM (Minimum Essential Medium Eagle) 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP <sup>+</sup> )	Merck )Roche BioRad Merck Merck Merck Gibco BRL Roche Merck Merck Sigma Rbi
Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid (IPTG Kaleidoscope Prestained Standards Kaliumchlorid Kaliumhydrogenphosphat Kupfersulfatpentahydrat Lipofectamin LumiLight Western Blotting Substrate Magnesiumchlorid Hexahydrat Magnesiumsulfat Heptahydrat MEM (Minimum Essential Medium Eagle) 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP <sup>+</sup> ) Mineralöl	Merck PRoche BioRad Merck Merck Merck Gibco BRL Roche Merck Merck Sigma Rbi Sigma
Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid (IPTG Kaleidoscope Prestained Standards Kaliumchlorid Kaliumhydrogenphosphat Kupfersulfatpentahydrat Lipofectamin LumiLight Western Blotting Substrate Magnesiumchlorid Hexahydrat Magnesiumsulfat Heptahydrat MEM (Minimum Essential Medium Eagle) 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP <sup>+</sup> ) Mineralöl Natriumacetat (NaAc)	Merck PRoche BioRad Merck Merck Merck Gibco BRL Roche Merck Merck Sigma Rbi Sigma Merck

Natriumchlorid	Merck
Natriumcitrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fluka
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumisethionat	Sigma
Natriumphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Roth
Natriumkaliumtartrat	Merck
Natriumpyruvat	Life Technologies
Ni <sup>2+</sup> -NTA Magnetic Agarose Beads	Qiagen
Nisoxetin HCL	Sigma
Non-essential Amino Acids (NEAA)	Life Technologies
Noradrenalin	Sigma
O-Methylisoprenalin (OMI)	Boehringer, Ingelheim
Pargylin HCl	Sigma
Penicillin/ Streptomycin-Lösung	Sigma
(25:24:1)	
Pargylin	Sigma
Proteaseinhibitorcocktail	Serva
RNase Zap	Ambion
Salzsäure (37%)	Merck
Scintillator 199 TM	Packard
Sequagel XR	Biozym
SMEM (Spinner Minimum Essential	
Medium Eagle)	Sigma
N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin	
(TEMED)	Sigma
Trichloressigsäure	Merck
Tris-(hydroxymethylen)-aminomethan	Roth/Merck
Triton X-100	Bio-Rad
Trockenmilchpulver (fettfrei)	Glücksklee
Trypsin	Life Technologies
Trypsin/EDTA	Sigma
# Tween 20

(Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat)	Sigma
U-0521 (3,4-Dihydroxy-2-Methylpropio-	
phenon)	Tocris
X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-	
D-galactopyranosid)	Roche/Roth
Xylamin	ICN
Zeozin	Gibco

# 1.6 Radiochemikalien

[ <sup>3</sup> H]-Nisoxetin, 86,00 Ci/mmol	NEN Du Pont
[ <sup>3</sup> H]-Noradrenalin, 49,70 Ci/mmol	NEN Du Pont

# 1.7 Strukturformeln

Transporter-Substrate:





Dopamin (DA)









MPP+

# Transporter-Inhibitoren:





Cocain

Nisoxetin



Desipramin R = H

Imipramin R = CH3



Xylamin

1.8 Nährmedien	für	die	Bakterienkultur
----------------	-----	-----	-----------------

LB-Medium, pH 7	1% Bactotrypton oder Caseinhydrolysat 0,5% Hefextrakt 1% NaCl
LB/Amp-Medium	LB-Medium mit 200µg/ ml Ampicillin
SOC-Medium	2% Caseinhydrolysat 0,5% Hefeextrakt 0,5% NaCl 2,5 mM KCl
Zugabe nach dem Autoklavieren:	10 mM MgCl <sub>2</sub> 10mM MgSO <sub>4</sub> 0,2% Glukose , sterilfiltriert
XIA-Platten	LB-Medium mit X-Gal (40 µg/ml), IPTG (50µg/ml) und Ampicillin (200 µg/ml), 1,5% Agar-Agar

# 1.9 Puffer und Lösungen

Ammoniumperoxodisulfat (APS)	10%, frisch oder gelagert bei -20°C
Ampicillin	10%, aliquotiert, bei -20°C
Blotting-Puffer	192 mM Glycin
	50 mM Tris-HCl
	20% Methanol
	0,02% SDS
Bindungspuffer (B Puffer)	135 mM NaCl
	5 mM KCl
	10 mM Tris
	1 mM MgSO <sub>4</sub>
	1,02 mM Ascorbinsäure
	рН 7,4
Chloroform/ Isoamylalkohol	Chlorofom:Isoamylalkohol 24:1
Cocain-Stammlösung	1 mM Cocain in $H_2O$
Coomassie-Blau Lösung	0,5% Coomassie-Blau in $H_2O$
Desipramin-Stammlösung	1 mM Desipramin in H <sub>2</sub> O
DNA-Probenpuffer (5x)	15% Ficoll 400
	5x TBE
	0,25% Bromphenolblau

Dopamin-Stammlösung	1mM Dopamin
	100 mM Ascorbinsäure
	in 0,1 N HCl gelöst
DTT-Stammlösung	1mM DTT in $H_2O$
Elutionspuffer A	0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	10 mM Tris-HCI
	8 M Harnstoff
	1% Dodecylmaltosid
	Proteaseinhibitorcocktail (Serva)
	(nach Angaben des Herstellers verdünnt)
	pH 4,5
Elutionspuffer B1	300 mM NaCl
	50 mM Natriumphosphat
	250 mM Imidazol
	1% Dodecylmaltosid
	Proteaseinhibitorcocktail (Serva)
	(nach Angaben des Herstellers verdünnt)
	pH 8,0
Elutionspuffer B2	300 mM NaCl
	50 mM Natriumphosphat
	4 M Harnstoff
	1% Dodecylmaltosid
	Proteaseinhibitorcocktail (Serva)
	(nach Angaben des Herstellers verdünnt)
	pH 4,5
Adrenalin-Stammlösung	1 mM Adrenalin
	100 mM Ascorbinsäure
	in 0.1 N HCL

Equilibrierungspuffer A	0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM Tris-HCL 8 M Harnstoff 1% DodecyImaltosid Proteaseinhibitorcocktail Serva (nach Angaben des Herstellers verdünnt) pH 8,0
Equilibrierungspuffer B1	300 mM NaCl 50 mM Natriumphosphat 5 mM Imidazol 1% DodecyImaltosid Proteaseinhibitorcocktail (Serva) (nach Angaben des Herstellers verdünnt) pH 8,0
Equilibrierungspuffer B2	300 mM NaCl 50 mM Natriumphosphat 4 M Harnstoff 1% Dodecylmaltosid Proteaseinhibitorcocktail (Serva) (nach Angaben des Herstellers verdünnt) pH 8,0
Erststrang Puffer	250 mM Tris HCl pH 8,3 375 mM KCl 15 mM MgCl <sub>2</sub>
Ethidiumbromid-Lösung	1% in $H_2O$ , lichtgeschützt bei 4°C
G418 (Geneticin)	40 mg/ml in PBS sterilfiltriert, -20°C

Gelatinelösung (1%)	1% in H <sub>2</sub> O (Zellkulturgrad), Autoklavieren, über Nacht stehen lassen, Autoklavieren, 4°C
Gelatinelösung (0,1%)	Gelatinelösung 1% 1:10 in H <sub>2</sub> O (Zellkulturgrad) verdünnen, 4°C
Glycerol (50%)	in H <sub>2</sub> O, autoklavieren
HBS-Puffer (HEPES-Buffered-Saline,10x)	1,37 M NaCl 50 mM g KCl 88 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 50 mM Glukose 210 mM g HEPES in 180 ml H <sub>2</sub> O (Zellkulturgrad) auf pH 7,2 einstellen, auf 200 ml auffüllen, steril- filtrieren
HEPES (1M)	2,38 g HEPES in 10 ml H <sub>2</sub> O lösen, sterilfiltrieren
Imipramin-Stammlösung	1 mM Imipramin in H <sub>2</sub> O
IPTG-Lösung	(200 mg/ml) in H <sub>2</sub> O
KRH-Puffer (Krebs-Ringer-Hepes)	<ul> <li>125 mM NaCl</li> <li>4,8 mM KCl</li> <li>5,6 mM Glukose</li> <li>1,2 mM CaCl<sub>2</sub></li> <li>1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></li> <li>1,2 mM MgSO<sub>4</sub></li> <li>25 mM HEPES (pH 7,4)</li> <li>1 mM Ascorbinsäure (nötig, bei oxidations- empfindlichen Substanzen z.B. NA. DA)</li> </ul>

Ligationspuffer	60 mM Tris HCl ph 7,5 60 mM MgCl <sub>2</sub> 50 mM NaCl 1 mg/ml BSA 70 mM ß-Mercaptoethanol 1 mM ATP
	20 mM DTT
	10 mivi Spermiaine
Lowry Lösung A	8% Na₂CO₃ 0,2 N NaOH
	frisch angesetzt!
	1,6% (v/v) Lösung B2
	0,4% (v/v) Lösung B1
Lowry Lösung B1	2% CuSO <sub>4</sub> x5H <sub>2</sub> O
Lowry Lösung B2	2,5% Na-K-Tartrat x4H <sub>2</sub> O
Lowry Lösung C	8% (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
	0,8% (w/v) NaOH)
	0,04% (w/v) Na-K-Tartrat
	0,008% (w/v) CuSO <sub>4</sub>
MPP <sup>+</sup> -Stammlösung	1 mM MPP+ in H <sub>2</sub> O
Nisoxetin-Stammlösung	10 mM Nisoxetin in $H_2O$
Noradrenalin-Stammlösung	250 mM Noradrenalin
	100 mM Ascorbinsäure
	in 0,1 N HCl

PBS (10x)	1,37 M NaCl 27 mM KCl 83 mM Na₂HPO₄ 14 mM KH₂PHO₄
Phenol/Chloroform	Phenol:Chloroform:Iso- amylalkohol (25:24:1) gesättigt mit 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0
Ponceau S Lösung	0,2% Ponceau S 3% Trichloressigsäure in einer dunklen Flasche bei RT lagern
Proteingel-Laufpuffer (10x)	250 mM Tris 1,92 M Glycin 1 % SDS
Proteingelfixierer	30% Ethanol 10% Eisessig
Saccharoselösung	35% (m/v) Saccharose in Bindungspuffer
SDS (10%)	10% in $H_2O$ , zum Lösen auf 68°C erhitzen
SDS-PAGE-Probenpuffer (2x)	120 mM Tris-HCl pH 6,8 20% Glycerol (v/v) 10% beta-Mercaptoethanol (v/v) 6% SDS (w/v) 0,01% Bromphenolblau (w/v)
SSC (20 x)	3 M NaCl 0,3 M NaCitrat

TBE (10x )	1 M Tris HCI
	1 M Borsäure
	20 mM EDTA, pH 8
	50 mM Tris
	0.005% Twoop 20
	рн 7,5
TE-Puffer (pH 8)	10 mM Tris HCl, pH 8
	1mM EDTA
TE-Puller (pH 9)	
	1mm EDTA
Tris-HCl pH 6,8	1M Tris-HCI in $H_2O$
	рН 6,8
Tris-HCI nH 8 8	1.5  M Tris-HCl in H <sub>2</sub> O
	μη ο,ο
Trypsin-Lösung	5% Trypsin in 1x PBS, sterilfiltriert
Waschpuffer A	0,1 M NaH2PO4
	10 mM Tris-HCl
	8 M Harnstoff
	0,5% Dodecylmaltosid
	Proteaseinhibitor (Serva)
	(nach Angaben des Herstellers verdünnt)
	рН 6,3

Waschpuffer B1	300 mM NaCl
	0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	10 mM Imidazol
	0,5% Dodecylmaltosid
	Proteaseinhibitorcocktail (Serva)
	(nach Angaben des Herstellers verdünnt)
	рН 8,0
Waschpuffer B2	300 mM NaCl
	0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,5% Dodecylmaltosid
	Proteaseinhibitorcocktail (Serva)
	(nach Angaben des Herstellers verdünnt)
	pH 6,3
Y Cal	20 mg/ml in DME lightgaachützt
X-Gal	20 mg/mi in Divir, lichtgeschutzt

# 1.10 Enzyme

Klenow-Enzym	Roche
Proteinase K	Roche
T4-DNA-Ligase	Roche
RNase A	Roche
RNase H	Roche
Rnasin Rnase Inhibitor	Promega
Restriktionsendonukleasen	Roche
Superscript II RNase H <sup>-</sup> Reverse	
Transcriptase	Life Technologies
Taq-DNA-Polymerase	Life Technologies
T4-Polynukleotidkinase	Promega

# 1.11 Antikörper

Anti-Express Antikörper	Invitrogen
AK 301 (N6-28)	Eurogentech
AK 219 (C590-607)	Eurogentech
AK 218 (C590-607	Eurogentech
AK 216 (L371-384)	Eurogentech
AK 215 (L211-226)	Eurogentech
AK 214 (L211-226)	Eurogentech
AK 1 (As 195-208)	Eurogentech
AK2 (As 211-226)	Eurogentech
"goat-anti-mouse" IgG (HRP gekoppelt)	BioRad
"goat-anti-rabbit" IgG (HRP gekoppelt)	BioRad

# 1.12 Nukleinsäuren

dNTPs	MBI
Mouse placenta total RNA	Clontech

# 1.13 Zelllinien

COS 7 (DSMZ: ACC60)	afrikanische Affennierenzellen
СНО	Ovar-Zellen des chinesischen Hamsters
HEK293 (DSMZ: ACC 305)	humane embryonale Nierenzellen

Zellkulturmedien:

a) CHO

# Monolayer

### MEM + 10% FKS + 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung (Pen/Strep):

Das lyophilisierte Medium wurde in destilliertem  $H_2O$  gelöst und mit NaHCO<sub>3</sub> versetzt. Das Medium wurde sterilfiltriert und anschließend bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch wurde das Medium mit 10% FKS, Penicillin G (100 I.E./ ml ) und Streptomycin (100 µg/ml) versetzt.

### Suspensionskultur

SMEM + 10% FKS + 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung (Pen/Strep):

Das lyophilisierte Medium wurde in destilliertem  $H_2O$  gelöst und mit 1 g/l Glucose sowie 20 mM HEPES versetzt. Das Medium wurde sterilfiltriert und konnte bei 4°C gelagert werden. Vor Gebrauch wurde das Medium mit 10% FKS, Penicillin G (100 I.E./ ml) und Streptomycin (100 µg/ml) versetzt.

b) HEK293 und COS 7

DMEM/HAM'S F12 + 10% FKS + 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung (Pen/Strep): Jedes der lyophilisierten Medien (DMEM und HAM'S F12) wurde in destilliertem H<sub>2</sub>O gelöst und mit NaHCO<sub>3</sub> versetzt. Die Medien wurden sterilfiltriert und anschließend 1:1 gemischt. Das entstandene Medium wurde bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch wurde das Medium mit 10% FKS, Penicillin G (100 I.E./ml ) und Streptomycin (100 µg/ml) versetzt.

# 1.14 Vektoren

Alle nachfolgend genannten Firmen bieten über ihre www-Seite (URL jeweils www.{Firmenname}.com) leicht auffindbare, ausführliche Informationen zu jedem der hier genannten Vektoren (Restriktionskarte, Sequenz, MCS (Multiple Clonig Site), physische Karte). Daher wird hier auf die bildliche Darstellung der Vektoren verzichtet. Wichtige Charakteristika seien nachfolgend genannt:

### pCR2.1 (TA-Cloning Kit, Invitrogen)

Der Vektor ist 3,9 kb groß und besitzt eine Ampicillin- und Kanamycin-Resistenz, weiterhin zwei bakterielle Replikationsstartpunkte (ori), einen für dsDNA (CoIE1) und einen für ssDNA (f1). Die Multiple Cloning Site (MCS) liegt innerhalb des LacZ-Gens und ermöglicht eine "blau-weiß" Selektion" rekombinanter Klone. Einklonierte Inserts können mit M13-Primern sequenziert und mit Hilfe des T7-Promotors *in vitro* transkribiert werden. Die MCS wurde mit EcoRI geöffnet und beiderseits ein Adapteroligonukleotid ligiert, das einen 3'-dT-Überhang besitzt. Da die Taq-DNA-Polymerase meist einen 3'-dA-Überhang hinterlässt, eignet sich der Vektor sehr gut zur Klonierung von PCR Produkten.

### pcDNA3.1 (-) (Invitrogen)

Der Vektor ist ein eukaryotischer Expressionsvektor. Der Vektor ist 5,4 kb groß und besitzt eine Ampicillin- und Neomycin-Resistenz, einen T7-Promotor für *in vitro* Transkription und einen f1-Replikationsstartpunkt für ssDNA. Durch die Neomycin-Resistenz ist er für die Etablierung stabil transfizierter Zellen verwendbar. Die Expression von einklonierten cDNAs erfolgt von einem CMV-Promotor (und Enhancer) aus. Der MCS nachgeschaltet befindet sich ein BGH (Bovine Growth Hormone) polyA-Signal. Die MCS hat im Bezug auf einige Restriktionsschnittstellen eine umgekehrte Orientierung zum pcDNA3. Sequenzierungen erfolgen mit SP6- oder BGH-Primern.

### pcDNA4/HisMax (Invitrogen)

Der Vektor ist ein Eukaryotischer Expressionsvektor. Dieser ist 5,3 kb groß und besitzt eine Ampicillin- und eine Zeocin-Resistenz, einen T7 Promotor für *in vitro* Transkription und einen f1-Replikationsstartpunkt für ssDNA. Durch die Zeozin-Resistenz ist er für die Etablierung stabil transfizierter Zellen verwendbar. Die Expression von einklonierten cDNAs erfolgt von einem CMV-Promotor (und Enhancer) aus. Weiter enthält der Vektor 3 "reading frames" um die Klonierung eines Proteins mit N-terminalem His-Tag und Express<sup>™</sup>Epitop zu ermöglichen. Der MCS nachgeschaltet befindet sich ein BGH (Bovine Growth Hormone) polyA-Signal.

# 2. Methoden

#### 2.1 Zellkulturmethoden

#### 2.1.1 Kultivierung eukaryotischer Monolayer-Zellen

Die Kultivierung adhärenter, eukaryotischer Zelllinien (HEK293- und CHO-Zellen) erfolgte bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre. Die sterilfiltrierten Fertigmedien wurden vor dem Benutzen mit 10% FKS und 1% Pen/Strep Lösung als Antibiotikum versetzt und auf 37°C vorgewärmt. CHO-Zellen wurden in MEM, HEK293-Zellen in DEMEM/Ham`s F12 (1:1) kultiviert.

#### 2.1.1.1 Auftauen von Zellen

In ein 50 ml Falcon Zentrifugenröhrchen wurden 40 ml und in eine 175 ml Zellkulturflasche 20 ml aufgewärmtes Medium vorgelegt. Die in einem Einfrierröhrchen befindlichen Zellen wurde schnell im 37°C Wasserbad aufgetaut und in das Falcon-Röhrchen gegeben. Anschließend wurde für 5 min bei 1000 Upm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 10 ml Kultur-Medium resuspendiert und in die 175 ml Zellkulturflasche gegeben. Ein Mediumwechsel erfolgte 24 h später.

#### 2.1.1.2 Mediumwechsel

Durch Farbumschlag des pH-Indikators Phenolrot von rot (neutral) nach gelb (sauer) wurde die Notwendigkeit eines Mediumwechsels angezeigt. Das alte Medium wurde abgesaugt und durch die gleiche Menge an frischem Medium ersetzt.

#### 2.1.1.3 Teilung der Zellkulturen

Die konfluenten Zellen wurden wie folgt von dem Kulturflaschenboden abgelöst. a) Bei den CHO-Zellen wurde das Medium vollständig abgesaugt. Nach einmaligem waschen mit PBS wurden die Zellen mit 3-4 ml 0,25% Trypsin (Stammlösung: 5% in 1x PBS) versetzt und bei 37°C bis zum Ablösen der Zellen inkubiert.

b) Die HEK293-Zellen wurden nach Absaugen des Kulturmediums in einem kleinen Mediumrest mechanisch durch Klopfen auf die Zellkulturflasche abgeschlagen.

Den abgelösten Zellen wurden 20 ml Medium zugegeben und die Zellsuspension wurde bei 1000 Upm für 5 min pelletiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren in 30 ml frischem Medium resuspendiert und je nach Bedarf geteilt

### 2.1.1.4 Einfrieren von Zellen

Die Zellen einer 175 ml Flasche wurden wie unter 2.1.1.3 beschrieben vom Boden abgelöst und pelletiert. Die Resuspension erfolgte in 4,5 ml Medium unter Zusatz von 0,5 ml DMSO. Durch Auf- und Abpipettieren wurde die Suspension gut gemischt, in 1.5 ml Aliquots auf die Einfrierröhrchen (Cryovials) verteilt und in einer Einfrierbox langsam auf -80 °C gebracht. Nach 24 h wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt oder für kurze Zeit bei -80°C gelagert.

# 2.1.2 Kultivierung einer eukaryotischen Supensionskultur

Die CHO-Zellen wurden neben der Monolayerkultur auch in einer Suspensionskultur gezüchtet. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre unter Rotation bei 60 Upm. Es wurde ein spezielles HEPES gepuffertes Suspensions-kultur-Fertigmedium (Spinner MEM, Sigma) verwendet, welches vor dem Gebrauch mit 10% FKS und 1% Pen/Step Lösung versetzt und auf 37°C erwärmt wurde.

# 2.1.2.1 Ansatz der Supensionskultur

Für den Ansatz einer Suspensionskultur wurden Monolayerzellen aus 2 konfluenten Zellkulturflaschen (wie unter 2.1.1.3 beschrieben) vom Flaschenboden abgelöst und pelletiert. Die Zellen wurden anschließend in 40 ml Medium resuspendiert und in ein steriles 250 ml Weithalsglasgefäß mit einem konkaven Rührfisch gegeben. Die Flasche wurde mit einem nur leicht zugeschraubten Deckel verschlossen.

### 2.1.2.2 Mediumwechsel bei der Suspensionskultur

Zum Entfernen des alten Mediums wurden 2/3 der Zellsuspension in ein Falcon Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1000 Upm für 5 min zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt, das Pellet in der äquivalenten Menge frischem Medium resuspendiert und in das Schraubgefäß gegeben. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage.

# 2.1.3 Kultivierung eukaryotischer Zellen in einem Minireaktor (miniPERM®)

Der miniPERM<sup>®</sup> ist ein kleiner Bioreaktor zur Kultivierung von Zellen in hohen Dichten. Er besteht aus zwei Modulen. Das Produktionsmodul, die eigentliche Zellkulturkammer, hat ein Volumen von 40 ml und enthält die Zellen. Sie ist durch eine Dialysemembran, welche Nährstoffe und im Medium gelöste Gase, aber keine Zellen passieren lässt, von dem Versorgungsmodul getrennt. Das Versorgungsmodul hat ein Volumen von 600 ml und wird mit dem Kulturmedium DEMEM/MEM (1:1) gefüllt. In dem Minireaktor wurden CHO-Zellen unter Rotation (5 Upm) bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre kultiviert. Das Fertigmedium wurde vor Gebrauch erwärmt und mit 10% FKS und 1% Pen/Strep-Lösung versetzt.

# 2.1.3.1 Ansatz des Minireaktors

Es wurden CHO-Zellen aus 6 Monolayerflaschen abgelöst (siehe 2.1.1.3), pelletiert und in gerade so viel neuem Medium resuspendiert, dass eine Zelldichte von 3x 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt wurde. 35 ml der Suspension wurden mit einer Kanüle in das Produktionsmodul des miniPERM<sup>®</sup> gespritzt. In das Versorgungsmodul wurden 350-400 ml Medium gegeben und der Minireaktor wurde auf die Rotationsvorrichtung gestellt.

# 2.1.3.2 Mediumwechsel des Minireaktors (miniPERM<sup>®</sup>)

Bei Farbumschlag des pH-Indikators im Medium (siehe 2.1.1.2) wurde das verbrauchte Medium aus dem Produktionsmodul abgegossen und durch eine äquivalente Menge an frischem Medium ersetzt.

### 2.1.4 Polyornithinbeschichtung von Oberflächen (HEK293-Zellen)

Zur Herstellung der Polyornithin-Lösung wurden 100 µg/ml Polyornithin in einer Mischung aus 150 mM Borsäure und in 67 mM NaOH gelöst und sterilfiltriert. Die Polyornithin-Lösung wurde entweder bei 4°C gelagert und dann innerhalb von 4 Wochen verbraucht oder für längere Zeit bei -20°C eingefroren. Der Boden von Multiwellplatten wurde mit dieser Lösung bedeckt und für 15-20 min bei RT inkubiert. Nach Absaugen der Lösung wurden die Wells 1x mit PBS gewaschen.

### 2.1.5 Zellzählung

Für die Zellzählung wurden 10 µl Zellsuspension zwischen die Neubauerkammer und ein Deckgläschen pipettiert. Die Zellen innerhalb der Quadrate der Neubauerkammer wurden unter dem Mikroskop gezählt. Der Mittelwert aus vier Eckquadraten wurde mit 1x 10<sup>4</sup> multipliziert und stellt die Anzahl der Zellen pro 1 ml Zellsuspension dar. Um die Zellzahl pro mg Protein zu bestimmen wurde der Proteingehalt der Zellsuspension nach Lowry et al. (1951) bestimmt. Die Zelldichte (Zellen/ml) wurde nun durch den Proteingehalt (mg/ml) dividiert.

### 2.2 Molekularbiologische Methoden

# 2.2.1 Plasmid Mini-Präparation mit dem "Spin-Miniprep Kit" (Qiagen)

Diese Methode dient der Gewinnung von geringen Mengen an DNA (bis 15 µg) und beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Die Nukleinsäuren werden hierbei reversibel an eine Silicagel-Marix Säule gebunden. Diese Bindung ist abhängig von pH und Salzkonzentration. Von einer Bakterien-Übernachtkultur wurden 1-2 ml für die Plasmid Mini-Präparation eingesetzt, welche nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde. Die Plasmid-DNA (ca. 6 µg Ausbeute von 2 ml Bakteriensuspension) konnte ohne weitere Aufreinigung für die Sequenzierung verwendet werden. Vorteil dieser Methode ist, dass sie ohne Phenol/Chloroform zur DNA-Isolierung und Reinigung durchgeführt werden kann.

### 2.2.2 Plasmid Mega-Preparation mit dem "Plasmid Mega Kit" (Qiagen)

Um größere Mengen an Plasmid-DNA für die Transfektionen zu gewinnen, wurde das Qiagen "Plasmid Mega Kit" verwendet. Der erste Schritt war eine Plasmid Mini-Präparation, die mit 2 ml einer 3 ml Bakterien-Übernachtkultur durchgeführt wurde. Die DNA wurde anschließend durch Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Mit dem verbliebenem 1 ml wurde in 500 ml LB Medium (mit Antibiotikum) eine Übernachtkultur angeimpft. Für die Plasmid-Präparation wurde die gesamte E. coli-Suspension aus dieser Kultur eingesetzt. Die Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers und lieferte 0,5 bis 2,5 mg Plasmid-DNA. Nach Ermittlung der DNA Menge wurde eine Konzentration von 1  $\mu$ g/ $\mu$ l eingestellt.

#### 2.2.3 Isolierung von RNA

Die Isolierung von "total" RNA erfolgte mit dem "RNeasy Mini Kit" von Qiagen. Zuerst wurden alle Geräte, Arbeitsplatz und Handschuhe mit dem RNase Inhibitor "RNase Zap" (Ambion) behandelt, da eine Kontamination mit RNase zu einer rascheren Degradierung der isolierten RNA führt. Vorteil der Methode ist die Vermeidung von Phenol. Zusammen mit dem "QIAShredder" (Qiagen) zur Homogenisierung von Zelllysaten können in einem Experiment innerhalb von ca. 30 min 50-100 µg Gesamt-RNA über eine Silica-Matrix isoliert werden. Die Isolation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die so erhaltene RNA konnte für die RT-PCR verwendet werden.

### 2.2.4 Konzentrationsbestimmungen von DNA und RNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte photometrisch durch Messung der Absorbtion von Nukleinsäuren bei einem Absorbtionsmaximum von 260 nM (A<sub>260</sub>) bzw. 280 nM (A<sub>280</sub>) bei Proteinen. Die Bestimmung wurde mit dem Photometer GeneQuant II (Pharmacia) durchgeführt. Zunächst wurde das Gerät mit dem jeweiligen Lösungsmittel der Proben kalibriert und anschließend die Proben in einer 1:100 Verdünnung vermessen. Konzentrationen von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml einzelsträngiger DNA oder 20 µg/ml Oligonukleotide weisen bei einer Wellenlänge von 260 nM einen Extinktionswert von 1 auf. Ein Verhältnis A<sub>260</sub> zu A<sub>280</sub> von 1,8-1,95 zeigt reine DNA an, während ein größerer Wert RNA und ein kleinerer Wert Proteinverunreinigungen anzeigt.

### 2.2.5 Gelelektrophorese

#### 2.2.5.1 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese von DNA und RNA

Zur Trennung von DNA–Fragmenten unterschiedlicher Größe (ca. 20-10000 bp) wurden diese auf einem 0,5–2% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Zuerst wurde die Agarose in 1x TBE aufgekocht, mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und die Lösung in einen horizontalen Gelgießstand gegossen. Nach dem Erkalten des Gels wurden die Proben mit 1/5 Vol. DNA-Probenpuffer verdünnt, aufgetragen und die Elektrophorese mit 1x TBE als Laufpuffer bei 1-5 V/cm durchgeführt.

#### 2.2.5.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten wurde mit den "GenElute Agarose Spin Columns" (Sigma) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Mit einem Skalpell wurde das Gelstück, welches das gewünschte DNA-Fragment enthielt, unter UV Licht ausgeschnitten und auf die mit 100 µl TE (pH 8,0) equilibrierte Säule gegeben. Anschließend wurde für 10 min bei 12000 g und RT zentrifugiert. Das Eluat enthielt die DNA in 1x TE Puffer. Diese konnte zur weiteren Aufreinigung noch einer Phenol/Chloroform–Extraktion unterzogen werden.

#### 2.2.5.3 cDNA Erst-Strangsynthese (Reverse Transkription)

Für die cDNA Erststrang-Synthese wurde die Superscript II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transkriptase (Life Technologies) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Zuerst wurden 1-5 µg Gesamt-RNA und 1 µl Oligo(dT)<sub>18</sub> – Primer (500 µg/ml) mit sterilem und RNase-freiem H<sub>2</sub>O auf 12 µl aufgefüllt. Die Mischung wurde für 10 min auf 70°C erhitzt und dann schnell auf Eis gegeben. Es folgte eine kurze Zentrifugation. Nach Zugabe von 4 µl 5x Erststrang Puffer, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTP-Mix und 1 µl (200 Units) Reverse Transkriptase wurde die Lösung für 50 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde nun für 15 min bei 70°C abgestoppt. Die RNA konnte durch Inkubation mit 2 Units RNase H bei 37°C für 30 min verdaut werden.

## 2.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (polymerase chain reaction) Methode stellt eine der wichtigsten Arbeitsmethoden der Molekularbiologie sowie der Diagnostik dar. Die PCR dient der exponentiellen Amplifikation von DNA durch folgende Schritte:

1) zyklischen Denaturierung der eingesetzten DNA (Matritze/Template)

2) Anlagerung von Sense und Antisense-Primern (Annealing)

3) Verlängerung der Primer von 5` nach 3` durch die eingesetzte Polymerase (Elongation).

Diese 3 Reaktionen erfolgen bei unterschiedlichen Temperaturen. Um mehrere DNA-Fragmente gleichzeitig zu amplifizieren, können PCR-Reaktionen mit mehreren Oligonukleotiden durchgeführt werden.

### Standard-PCR-Protokoll:

Die Reaktion wurde in 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Eingesetzt wurden 10x Reaktionspuffer, 0,5-4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTPs, 0,5 - 1  $\mu$ M sense- und antisense-Primer, Template-DNA im pg- $\mu$ g Bereich und 1-5 Units Taq–Polymerase in einem Gesamtvolumen von 50-100  $\mu$ l.

Die Schmelztemperatur der Primer sowie die Länge und Basenzusammensetzung der Template-DNA bestimmt das Temperaturprofil. Die Annealing-Temperatur lag normalerweise 5-10°C unter der Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) der Primer. Ein typisches PCR-Temperaturprogramm sah folgendermaßen aus:

- 1. Denaturierung: 94°C, 4 min
- 2. Denaturierung: 94°C, 30-60 s
- 3. Primeranheftung (Annealing): 50-70°C, 15-60 s
- 4. Kettenverlängerung (Extension): 68-72°C, 1 min/kb

Die Schritte 2-4 werden 30-40x wiederholt.

Um die Spezifität der PCR zu erhöhen, kann ein Hot-Start durchgeführt werden, bei dem die Taq-Polymerase erst nach der ersten Denaturierung zugegeben wird. Dadurch wird die Bildung unspezifischer DNA-Fragmente bei niedrigen Temperaturen verhindert. Der Zusatz von Pwo Polymerase, die als "proofreading" (fehlerkorrigierendes) Enzym dient, ermöglicht die Amplifizierung auch größerer Templates (z.B.: "Expand Long Template PCR System" (Roche)). Vorteil hierbei ist eine geringere Fehlerrate.

# 2.2.7 Klonierungstechniken

### 2.2.7.1 Klonierung von PCR-Produkten

PCR Produkte wurden mit dem "Original TA-Cloning Kit" (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers kloniert. Entscheidend hierbei ist die Eigenschaft der Taq-Polymerase an das 3´-Ende des amplifizierten Fragmentes einen Adenosinrest anzuhängen. Der in diesem Kit verwendete Klonierungsvektor pCR2.1 besitzt am 3´-Ende einen Thymidinrest. Dadurch ist eine direkte Klonierung des PCR-Produktes möglich. Eine "blau-weiß" Selektion (durch Klonierung in den open reading frame des lacZ Gens und Zugabe von IPTG und X-Gal) erleichterte die Suche nach positiven Klonen.

### 2.2.7.2 Enzymatische Spaltung von DNA

Die Spaltung von DNA erfolgt mit Hilfe von Restriktionsenzymen. Diese schneiden an spezifischen Erkennungsequenzen der DNA. Die so gebildeten Fragmente können einzelsträngige Überhänge ("sticky ends") oder überhangslose Enden ("blunt ends") aufweisen. Nachfolgend wird ein Restriktionsverdau in einem 20 µl Standardansatz beschrieben:

0,5-1  $\mu$ g DNA, 2  $\mu$ l Restriktionspuffer (10x), 1  $\mu$ l Restriktionsenzym(e) (5-10 U/ $\mu$ l). Fehlendes Volumen wird mit destilliertem H<sub>2</sub>O ergänzt.

Die Restriktionspuffer unterscheiden sich je nach verwendetem Enzym. Beim Erwerb eines Enzyms wird der jeweils optimale Restriktionspuffer mitgeliefert (z.B.: Roche, Stratagene).

Sollen größere Mengen DNA gespalten werden, so muss der Restriktionsansatz entsprechend verändert werden.

### 2.2.7.3 Ligation von DNA-Enden

Die Bildung einer Phosphodiesterbrücke zwischen einer 3'-Hydroxylgruppe und einer 5'-Phosphatgruppe wird unter Spaltung von ATP durch das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert. Um ein DNA-Insert in einen Vektor zu ligieren wurden 0,5-1  $\mu$ g Spenderund Empfängervektor mit denselben oder kompatiblen Restriktionsenzymen verdaut. Mindestens eines der beiden Enzyme sollte "sticky ends" liefern. Geöffneter Vektor und ausgeschnittenes Insert wurden über ein Agarosegel und anschließende Elution isoliert. Im anschließenden Ligationsansatz (10  $\mu$ I) wurden Vektor und Insert (je 10-100 ng) im molaren Verhältnis 1:1 bis 1:10, 10x Ligationspuffer und 1 $\mu$ I Ligase (1 U/ $\mu$ I) über Nacht bei 14°C ligiert. Ligationen mit "blunt ends" können auch über Nacht bei 22°C inkubiert werden.

### 2.2.7.4 Transformation kompetenter Bakterien

Die Transformation der kompetenten Bakterien (INV $\alpha$ F<sup>'</sup>) erfolgte nach Vorschrift des "Original TA Cloning Kit" (Invitrogen). Dabei wurden zu 100 µl kompetenter Zellen 2 µl β-Mercaptoethanol zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurden 1-2 µl der Ligation in den Ansatz pipettiert. Es folgte eine Inkubation für 30 min auf Eis. Anschließend wurden die Zellen einem Hitzeschock (30 s, 42°C) unterzogen und erneut 2 min auf Eis inkubiert. Zuletzt wurden 250 µl SOC Medium zugegeben und 1 h bei 37°C mit 225 Upm geschüttelt. Die Zellen wurden auf XIA Platten ausplatiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.2.7.5 Anlegen von Bakterien-Dauerkulturen

Eine Einzelkolonie von einer XIA-Platte wurde über Nacht in 3 ml LB/Amp Medium inkubiert, sodass die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase waren. In einem Einfrierröhrchen wurden 300 ml 50% Glycerol und 700 µl Bakterien-Suspension vermischt und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Mischung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.2.8 DNA-Sequenzierung

Die Didesoxynukleotid-Kettenabbruch Sequenzierung nach Sanger et al. (1977) mit dem "Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deazadGTP" (Amersham) erfolgte durch "cycle sequencing". Als Matrize diente 1 µg gereinigte (siehe 2.2.1) Plasmid DNA. Diese wird mit 2 pmol des mit dem Floureszensfarbstoff IRD 800 markierten Primer und 0,7 µl DMSO versehen und mit H<sub>2</sub>O auf 21 µl aufgefüllt. Jeweils 4,5 µl des DNA/Primer-Master-Mix wurden zu 1,5 µl des jeweiligen A-(Mischung aus d-ATP und dd-ATP), G- (Mischung aus d-GTP und dd-GTP), C-(Mischung aus d-CTP und dd-CTP) oder T- (Mischung aus d-TTP und dd-TTP) Reagenz pipettiert und mit Mineralöl überschichtet. Die Reaktionsbedingungen wurden den Primerlängen angepaßt:

1.	Denaturierung:	2 min 95°C
2.	Denaturierung:	15 s 95°C
3.	Annealing:	15 s bei einer Temperatur die, 3°C höher
		liegt als die Schmelztemperatur des Primers
4.	Extension:	15 s 70°C

### Die Schritte 2 - 4 werden 30x wiederholt.

Die mit 4 µl Stopp-Puffer versetzten Proben wurden durch Pipettieren auf Parafilm vom Mineralöl befreit und auf das nach der Vorschrift von MWG hergestellte Sequenzgel (Sequagel XR, Biozym) aufgetragen. Die Bedingungen für den Lauf des Gels wurden nach der Vorschrift von MWG eingestellt. Die Auftrennung der Sequenzreaktion erfolgte mit dem LI-COR DNA Sequencer 4200 (MWG).

### 2.2.9 Gerichtete Mutagenese

Gerichtete Mutagenese mit dem "QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit" (Stratagene): Die Versuche erfolgten im einzelnen nach den Angaben des Herstellers. Hier sei zum besseren Verständnis das Prinzip des Kits beschrieben:

Der Vorteil des Systems liegt in seiner Geschwindigkeit und darin, dass statt Taq-DNA-Polymerase die sehr viel genauere (6-fach, laut Angabe des Herstellers) PfuTurbo-DNA-Polymerase verwendet wird; nachteilig ist hier der hohe Preis. Als Template einer "zirkulären" PCR dient eine in einen Vektor klonierte cDNA. Sense- und AntisensePrimer, die beide die gewünschten Mutationen tragen, werden komplementär zueinander ausgesucht.

In der PCR lagern sich die Primer nach dem Denaturieren des zirkulären Plasmids an derselben Stelle jeweils auf dem komplementären Template-Einzelstrang an. Durch Kettenverlängerung entsteht im Idealfall ein doppelsträngiges Plasmid. Da die Polymerase nur eine Kettenverlängerung, nicht jedoch einen Lückenschluß katalysiert, bleibt auch nach vollständiger "Replikation" des Plasmids ein Einzelstrangbruch am Übergang von neu-polymerisiertem Zweitstrang zum 5'-Ende des Primers, von dem aus die Polymerisation beginnt.

Nach der zyklischen *"in vitro*-Replikation" durch die PCR wird die parentale, nicht mutierte Plasmid-Fraktion mit dem Restriktionsenzym Dpnl verdaut. Dabei macht man sich zunutze, dass Dpnl nur dann an seiner Erkennungsstelle schneidet, wenn sie methyliert ist. Dies ist nur bei der aus *E. coli* stammenden parentalen Plasmid-DNA der Fall, nicht jedoch bei der neusynthetisierten DNA. Die Plasmide werden in XL1-Blue transformiert, in den Bakterien werden die Einzelstrangbrüche geschlossen. Eine Sequenzreaktion zur Erfolgskontrolle muss angeschlossen werden.

#### 2.2.10 Transiente Transfektion der Zellen

Die Transfektion erfolgte durch Lipofektion. Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in 24er Well-Zellkulturplatten in 500 µl Medium ohne Pen/Strep Lösung ausgesät, sodass sie am Tag der Transfektion 30-40% konfluent waren. Für jedes Well wurden 800 ng cDNA mit 50 µl Opti-MEM (Life Technologies) verdünnt und vorsichtig gemischt. 2 µl Lipofektamin (Life Technologies) wurden ebenfalls mit 50 µl Opti-MEM vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Die beiden Lösungen wurden vereint und für 20 min bei RT inkubiert. Eine eventuelle Trübung hatte keine Auswirkung auf die Transfektion. 100 µl des Ansatzes wurden in jedes Well gegeben und für 7 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in feuchter Atmosphäre inkubiert. Die Inkubationslösung wurde abgesaugt und durch 500 µl Medium ohne Pen/Strep Lösung ersetzt. Nach weitern 48 h konnten die Aufnahmeversuche durchgeführt werden.

Zellen für die Membranpräparation wurden in 175 ml Zellkulturflaschen in 44,0 ml Medium ohne Pen/Strep ausgesät. Die Transfektion erfolgte bei 30-40% Konfluenz mit einer Mischung aus 70 µg cDNA, 175 µl Lipofektamin und 8,8 ml Opti-MEM. cDNA und Lipofektamin wurden dazu mit jeweils 4,7 ml Opti-MEM versetzt und nach 5 min

Inkubationszeit vereint. Die Mischung wurde für 20 min bei RT inkubiert und in die Zellkulturflasche gegeben. Nach 7 h Inkubation bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> in feuchter Atmosphäre wurde die Transfektions-Lösung durch 43.99 ml Medium ersetzt. Die Membranpräparation erfolgte 48 h später.

#### 2.2.11 Stabile Transfektion von Zellen

Zur Gewinnung stabiler Zellklone müssen die Zellen mehrere Wochen einem Selektionsdruck in Form eines Antibiotikums ausgesetzt werden. Nur die Zellen, die die Plasmid-DNA in das Wirtsgenom integrieren, überleben die Behandlung. Die Zellen wurden in Zellkulturschalen ausgesät und (wie unter 2.2.10 beschrieben) transfiziert. Nach 48 h wurde mit der Selektion begonnen. Bei dem Vektor pcDNA3.1(-)wurde G418 (800µg/ml) und bei dem Vektor pcDNA4 His/Max Zeozin (200 µg/ml) eingesetzt. Das Medium mit Antibiotikum wurde alle 2 Tage erneuert. Resistente Kolonien wurden vereinzelt, indem die Zellkulturschale unter dem Mikroskop im Bereich der Kolonie von unten farblich markiert wurde. Ein steriler Zylinder wurde dann mit steriler Vaseline an einem Ende eingefettet und über die Kolonie gestülpt. Durch Auf- und Abpipettieren von 100 µl Medium lösten sich die Zellen innerhalb des Zylinders vom Boden der Schale und konnten in eine Vertiefung einer 12er Well-Zellkulturplatte überführt werden. Es wurden in der Regel 10-20 Klone isoliert und unter weiterer Behandlung mit Antibiotikum kultiviert bis sie in 175 ml Zellkulturflaschen konfluent waren. Um zu überprüfen, ob nicht nur das Antibiotikum-Resistenzgen, sondern auch das Insert in das Genom integiert wurde, folgten Aufnahme oder Bindungsversuche.

### 2.3 Biochemische Methoden

#### 2.3.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) erfolgte durch photometrische Messung eines blauen Farbkomplexes, dessen Farbintensität abhängig von der Menge an vorhandenem Protein ist. Die Färbung entsteht durch Reaktion eines Kupfer-Protein-Komlexes mit dem Folin-Reagenz. Zur Vermeidung von Präzipitatbildungen wurden alle Schritte bei RT durchgeführt. Die Herstellung der Lösung C erfolgte durch Zugabe von 1,6 ml B2-Lösung und 0,4 ml B1 Lösung zu 100 ml frisch hergestellter Lösung A. Es wurden jeweils 2 ml Lösung C zu den Proben (100 µl Probe und 900 µl Aqua dest.), dem Leerwert (100 µl Zelllysis-Lösung und 900 µl aqua dest.) und den Standards [100 µl Zelllysis-Lösung und 100 µl wässriger BSA-Standard (50/100/300/500/700 µg/µl) und 800 µl Aqua dest.] gegeben und gemischt. Nach 15 min Inkubation wurden 200 µl Folin-Reagenz zugegeben und sofort gemischt. Die photometrische Messung bei 750 nm wurde nach 50 min Inkubationszeit durchgeführt.

### 2.3.2 Proteinbestimmung nach dem DC Proteinassay

Der DC Protein Assay von Bio-Rad ist eine weitere kolorimetrische Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration. Vorteil dieser Methode ist seine Kompatibilität mit vielen Detergentien in geringen Konzentrationen sowie DTT (bis 1 mM). Die Farbentwicklung beruht auf der Reaktion der Proteine mit alkalischer Kupfertartratlösung und dem Folin Reagens.

Zunächst wurde die Lösung A` hergestellt, indem zu jedem ml benötigtem Reagens A 20 µl Reagens S gegeben wurden. Es wurden jeweils 20 µl der Proben, Standards (0,2, 0,5 0,7 1,0, 1,2 und 1,5 mg/ml) und Probenpuffer für den Leerwert mit 100 µl Lösung A` versetzt und gut gemischt. Anschließend wurden 800 µl Lösung B hinzugefügt und der Ansatz wurde sofort gemischt. Nach 15 min konnte die Lösung bei 750 nM photometrisch vermessen werden.

### 2.3.3 Proteinfällung

Um die Proteinkonzentration der Proben nach der Proteinaufreinigung zu erhöhen und um störende Substanzen abzutrennen wurden die Proteine zunächst gefällt und anschließend in der gewünschten Menge Puffer aufgenommen.

# 2.3.3.1 Trichloressigsäurefällung

Bei der Trichloressigsäurefällung wurden die Proben 1:1 mit Trichloressigsäure (10%) versetzt und 1 h stehen gelassen. Anschließend wurden die gefällten Proteine abzentrifugiert (10 min; 10000 *x g*) und 2x mit Aceton gewaschen. Acetonreste wurden unter Vakuum in dem Speedvac Concentrator abgezogen. Die Proben wurden in dem gewünschten Volumen PBS aufgenommen und konnten nach Zugabe von SDS-PAGE-Probenpuffer für die SDS-PAGE eingesetzt werden. Alle Schritte erfolgten bei 4°C.

### 2.3.3.2 Acetonfällung

Die Proben wurden im Verhältnis 1:4 mit eiskaltem Aceton versetzt und 1 h auf Eis stehen gelassen. Die gefällten Proteine wurde abzentrifugiert (10 min; 10000 x g) und die Acetonreste unter Vakuum in dem Speedvac Concentrator abgezogen. Anschließend wurden die Proteine in der benötigten Menge PBS aufgenommen. Nach SDS-PAGE-Probenpuffer Zugabe konnte eine SDS-PAGE durchgeführt werden.

### 2.3.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE erfolgte nach Lämmli et al. (1970). Als erstes wurden 2 Minigele (10x 10 cm) zwischen zwei mit Spacern getrennten und eingetüteten Glasplatten gegossen. Die Gele waren wie folgt zusammengesetzt:

Trenngel (ca.75% des Gesamtgels): 9,6 ml Aqua dest., 5 ml 40% Acrylamid/Bisacryamid (29:1), 5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) und 200 µl 10% SDS. Zum Polymerisationsstart wurden 200 µl 10% APS und 10 µl TEMED zugegeben. Nach dem Gießen wurde das Gel mit 1 ml Wasser überschichtet und für 20 min bis zur vollständigen Auspolymerisation stehen gelassen. Anschließend wurde das Wasser abgezogen und das Sammelgel gegossen. Sammelgel (25% des Gesamtgels): 7,4 ml Aqua dest., 1,275 ml 40% Acrylamind/Bisacryamid (29:1), 1,25 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8), und 100 µl 10% SDS. Durch Zugabe von 100 µl 10% APS und 10 µl TEMED wurde die Polymerisation gestartet. Das Gel wurde schnell gegossen und die Probenkämme zur Vermeidung von Luftblasen sehr langsam eingesteckt. Nach 20 min war das Gel auspolymerisiert. Die Gele wurden nun in die Elektrophoresekammer gespannt und mit ca. 500 ml Proteingel-Laufpuffer (1x) gefüllt. Die Kämme wurden vorsichtig herausgezogen und die Probentaschen mit Hilfe einer Kanüle mit Laufpuffer durchspült. Die Proben wurden mit 2x Probenpuffer versetzt und konnten dann aufgetragen werden. In die erste Probentasche wurde ein Molekulargewichtsmarker (Kaleidoscope-Marker, BioRad) aufgetragen, um die Trennung direkt beobachten zu können und um später das Molekulargewicht der Proteine zu bestimmen. Die Elektrophorese wurde bei 25 mA und 150 V für ca. 2 h durchgeführt. Das Gel konnte mit Coomassie-Lösung gefärbt oder für einen Western-Blot verwendet werden.

#### 2.3.5 Coomassie Färbung von Polyacrylamidgelen

Die getrennten Proteine konnten durch Anfärben mit Coomassie-Blau auf dem Gel sichtbar gemacht werden. Dafür wurde das Gel für ca. 20 min in einer 0,5% Coomassie-Blau Lösung auf einem Schüttler geschwenkt. Anschließend wurde das Gel mit einer Proteingelfixierer-Lösung aus 10% Eisessig und 30% Ethanol entfärbt bis die Banden klar zu erkennen waren. Das Gel wurde auf ein Whatman Filterpapier gelegt, mit Einmachfolie bedeckt und auf einem Geltrockner bei 80°C für 1 h unter Vakuum getrocknet. Das fixierte Gel konnte so aufbewahrt werden.

#### 2.3.6 Western-Blot

Nach der Auftrennung der Proteine durch die SDS PAGE (siehe 2.3.4) konnten diese mit Hilfe des Western-Blot Verfahrens auf eine Membran übertragen werden. Spezielle Proteinbanden wurden anschließend durch Antikörperreaktionen sichtbar gemacht. Es wurde ein Membranstück (Nitrozellulose) in der Größe des Gels und 6 etwas größere Whatman Papiere zurechtgeschnitten. Die Membran wurde in Aqua dest. und die Whatman Papiere in Blotting Puffer equilibriert. Der Aufbau erfolgte folgendermaßen: schwarze Seite der Kassette, Schwamm, 3 Whatman Papiere, Gel, Membran, 3

Whatman Papiere, Schwamm und dann die weiße Seite der Kassette. Die Kassette wurde so in den Tank gehängt, dass die schwarze Seite zur schwarz markierten Kathode zeigte. Der Blotvorgang wurde für ca. 3 h bei RT, 100 V und 150 mA durchgeführt. Die Proteine werden durch das SDS negativ geladen und wandern beim Blotten zur Anode, d.h. in Richtung der Membran. Zur Prüfung des Proteintransfers konnte die Membran mit Ponceau S Färbelösung gefärbt werden (siehe 2.3.7). Nach dem Blot wurde die Membran über Nacht in Blockinglösung (3% BSA in TBST bei dem Anti-Expess-Antibody; 1% Milchpulver in TBST bei allen anderen AK) inkubiert. Es folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (Anti-Express-Antikörper 1:1000 verdünnt; alle anderen AK 1:500 verdünnt) für 1,5 h. Um Antikörperlösung zu sparen, wurde die Membran mit dem Antikörper in Folie eingeschweißt. Nach dreimaligem Waschen für 10 min mit TBST-Puffer wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper in der Verdünnung 1:5000 für 1 h inkubiert. Für den Anti-Expess-AK wurde ein "goat-anti-mouse" IgG mit gekoppeltem Enzym (horse-radish peroxidase (HRP)) eingesetzt und für die übrigen AK ein "goat-anti-rabbit" IgG, ebenfalls mit HRP gekoppelt. Anschließend wurde die Membran nochmals 3x 10 min mit TBST-Puffer gewaschen und mit 6 ml Substrat (LumiLight, Roche) für 10 min versehen. Die Detektion wurde am Lumi-Imager durchgeführt.

#### 2.3.7 Ponceau S Färbung

Der Erfolg des Proteintransfers (siehe 2.3.6) wurde durch Anfärben der Proteine auf der Membran mit Ponceau S Lösung überprüft. Die Membran wurde für 5 min mit der Ponceau S Lösung inkubiert und kurz mit Aqua dest. gewaschen. War der Transfer erfolgreich konnte man die dunkelrot gefärbten Proteinbanden erkennen. Die Membran wurde durch mehrmaliges Waschen in Aqua dest. entfärbt, bevor die Blockinglösung zugegeben wurde.

#### 2.3.8 Membranpräparation

Alle folgenden Schritte der Membranpräparationen wurden auf Eis durchgeführt. a) Membranen für die Aufreinigung und Charakterisierung des hNAT-His Nach Entfernen des Kulturmediums wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und mit 6 ml 0,1x PBS (mit Proteaseinhibitorcocktail, Serva) mit einem Zellschaber aus den Kulturflaschen gekratzt und in Zenrifugenröhrchen gegeben. Die Zellen wurden für 15 min in dem hypotonen Puffer inkubiert, 10x mit dem Potter bei 1000 Upm aufgeschlossen. Anschließend wurde das Zellhomogenat jeweils 1x durch Kanülen mit den Durchmessern 0,4 und 0,6 µm gepresst. Das Zellhomogenat wurde dann für 5 min bei 3000 *x g* zentrifugiert und das Pellet (P1) verworfen. Nach Zentrifugation des Überstandes (S1) für 20 min bei 40000 *x g* wurde der Überstand (S2) verworfen und das Pellet (P2) nach einmaligem waschen mit PBS in einem definiertem Volumen des für die Aufreinigung benötigten Equilibrierungspuffer (für die Ni<sup>2+</sup>-NTA Beads Equilibrierungspuffer A; für das His-Select<sup>™</sup> Nickel Affinitätsgel Equilibrierungspuffer B1 oder B2 ) resuspendiert. Der Proteingehalt wurde nach dem BioRad Assay (2.3.2) bestimmt. Die Membranen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließen bei −80°C bis zum Gebrauch gelagert.

b) Membranen für mNAT-Bindungsversuche

Nach Absaugen des Mediums und einmaligem Waschen mit Puffer B (Bindungspuffer) wurden die Zellen mit 8 ml Puffer B unter Zusatz von Proteaseinhibitorcocktail mechanisch abgeschabt. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Ultra-Turrax-Homogenators (2x 5; 100 W) homogenisiert und bei 40000 x g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet 1x mit Puffer B gewaschen und anschließend in diesem resuspendiert. Der Proteingehalt wurde nach Lowry et al. (1951) (2.3.1) bestimmt und ein Gehalt von 1 mg/ml eingestellt. Die Membranen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

#### 2.3.9 Differentialzentrifugation

Die Geschwindigkeit mit der ein Teilchen bei der Zentrifugation sedimentiert wird durch seine Dichte und Größe bestimmt. Unterschiedliche Sedimentationsgeschwindigkeiten sind die Vorraussetzung bei der Differentialzentrifugation. Sie trennt Zellbestandteile durch unterschiedliche Zentrifugationszeiten oder Rotationsgeschwindigkeiten.

Zellmembranen (siehe 2.3.8), die zu Proteinaufreinigungszwecken präpariert wurden konnten durch Differentialzentrifugation "vorgereinigt" werden. Nach dem Aufschluss und der Homogenisierung der Zellen wurde das Homogenat für 5 min bei 1000 x g zentrifugiert. Das Pellet P1 bestehend aus Zellbestandteilen höherer Dichte und Größe (z.B. intakte Zellen, Kerne) wurde verworfen. Der Überstand (S1) wurde für 25 min bei 40000 x g zentrifugiert. Der Überstand (S 2), welcher lösliche und Proteine sehr

geringer Dichte und Größe (z.B. endoplasmatisches Reticulum, Ribosomen) enthielt, wurde verworfen. Das entstandene Pellet (P 2) enthielt die Zellmembranen und wurde 1x mit Bindungs-Puffer gewaschen, wieder zentrifugiert (40000 x g) und in einer definierten Menge Bindungspuffer resuspendiert. Es folgte eine Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) (2.3.1).

#### 2.3.10 Saccharosegradientenzentrifugation

Im vorliegenden Fall handelte es sich genauer um eine Zentrifugation auf einem Saccharosekissen mit einer Dichte, die etwas über der Dichte von Plasmamembranen liegt. Plasmamembranen haben eine Dichte von ca. 1,12 g/cm<sup>3</sup>. Partikel mit höherer Dichte wandern in das Saccharosekissen, während Plasmamembranen über dem Kissen verbleiben. Eine solche vereinfachte Methode wurde von Bönisch (1998) als Alternative zu einer aufwendigeren Saccharosegradientenzentrifugation beschrieben. Zunächst wurde eine 35%ige Saccharoselösung hergestellt (35% Saccharose in

Bindungspuffer mit Proteaseinhibitor) und in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Zellsuspension wurde vorsichtig über das Saccharosekissen geschichtet und bei 100000 x g für 60 min bei 4°C zentrifugiert. Die Schicht über der Saccharoselösung wurde vorsichtig abgenommen und mit Bindungspuffer verdünnt. Es folgte eine Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) (2.3.1).

### 2.3.11 Solubilisierung

Membranproteine sind in ihrer natürlichen Umgebung von hydrophoben Lipidschichten umgeben und bleiben nach dem Zellaufschluß mit diesen vergesellschaftet. Um sie in Lösung zu bringen und zu halten, müssen Detergentien verwendet werden. Detergentien sind amphiphile Moleküle, die einen hydrophilen und einen hydrophoben Anteil besitzen. Sie interagieren mit dem Protein und ersetzten gewissermaßen die natürliche Umgebung des Proteins ersetzen. Sie lagern sich zu Mizellen zusammen bei denen der hydrophobe Anteil nach innen und der hydrophile Anteil nach außen zeigt. In diese Mizellen wird das Membranprotein eingebaut. Als Detergens wurde hier Dodecylmaltosid verwendet, da es sehr mild ist und das Protein nicht denaturiert.

Alle folgenden Schritte erfolgten bei 4°C. Nach der Zellmembranpräparation (2.3.8) wurden die Zellmembranen in dem für die Solubilisierung benötigtem Puffer resuspen-

diert, sodass eine Detergenz-Endkonzentration von 1% und ein Protein/Detergens Verhältnis von 10 vorlag. Für die Ni<sup>2+</sup>-NTA (Nitrilotriessigsäure) Beads wurde Equilibrierungspuffer A und für das His-Select<sup>TM</sup> Nickel Affinitätsgel Equilibrierungspuffer B2 (denaturierend Bedingungen) oder B1 (native Bedingungen) eingesetzt. Die Mischung wurde für 1 h geschüttelt und anschließend bei 180000 *x g* zentrifugiert. Der klare Überstand erfüllte die erfüllte nach Hjelmeland und Chrambach (1984) die Kriterien eines Solubilisates (bei 150000 *x g* nicht zu pelletieren).

# 2.3.12 Proteinaufreinigung mit IMAC (immobilisierte Metallchelat-Affinitätschromatographie)

Bei der Affinitätschromatographie wird ein Molekül (Adsorbent) reversibel an einen individuellen, matrixgebundenen Bindungspartner gebunden. Bei der IMAC ist eine Metall-chelatierende Gruppe (hier Nitrilotriessigsäure) am Säulenmaterial immobilisiert. Ein Metallion (Ni<sup>2+</sup> oder Co<sup>2+</sup>) wird so gebunden, dass eine oder mehrere Koordinationsbindungen für eine Interaktion mit Histidinresten von Proteinen zur Verfügung stehen. Die gebundenen Moleküle werden mittels Gradientenelution von dem Säulenmaterial getrennt. Als eluierendes Agens kann Imidazol oder Puffer mit niedrigem pH eingesetzt werden. Die IMAC kann unter nativen und denaturierenden Bedinungen durchgeführt werden. Es wurden beide Verfahren, die sich nur in der Pufferzusammensetzung unterscheiden, getestet.

# 2.3.12.1 Proteinaufreinigung mit Ni<sup>2+</sup>-NTA Magnetic Agarose Beads

Ni<sup>2+</sup>-NTA Magnetic Agarose Beads (Qiagen) sind Kügelchen aus Agarose, die magnetische Partikel enthalten. Sie haben einen Durchmesser von 20-70 µm und Metall-chelatierende NTA kovalent an ihre Oberfläche gebunden. Diese ist mit Nickel beladen und eignet sich gut zur Bindung von Proteinen mit einem Polyhistidin-Anhang (6x His-Tag) unter nativen und denaturierenden Bedingungen. Mit Hilfe einer Magnet-vorrichtung werden die Beads am Rand des Eppendorfgefäßes zurückgehalten, wodurch ein einfacher Lösungsmittelaustausch möglich ist und Zentrifugationsschritte erspart werden. Die Aufreinigung mit den Ni<sup>2+</sup>-NTA Magnetic Agarose Beads erfolgte im Batch-Verfahren bei RT.

200 µl Beadsuspension wurden in einem Eppendorfgefäß mit 500 µl Solubilisat (2.3.11) versetzt und für 30 min geschüttelt. Der Überstand wurde abgenommen und die Beads wurden 8x mit Waschpuffer A gewaschen. Die Elution erfolgte mit 2x 60 µl Elutionspuffer A. Von allen Fraktionen wurde der Proteingehalt mit dem BioRad Assay (2.3.2) ermittelt und die Proben mit 2x SDS PAGE Probenpuffer versetzt. Es folgten SDS-PAGE und Western Blot (siehe 2.3.4 und 2.3.6). Mit dem Lumi Analyst Programm konnte der Grad der Aufreinigung (Ermittlung der optischen Dichte) bestimmt werden.

# 2.3.12.2 Proteinaufreinigung mit dem His-Select<sup>™</sup> Nickel Affinitätsgel

Alle Aufreinigungsschritte mit dem His-Select<sup>™</sup> Nickel Affinitätsgel (Sigma) erfolgten bei 4°C im Batch-Verfahren.

Es wurden 900 µl der in Equilibrierungspuffer B1 (bei nativen Bedingungen) oder Equilibrierungspuffer B2 (bei denaturierenden Bedingungen) solubilisierten Membranen mit 300 µl der His-Select<sup>TM</sup> Nickel Affinitätsgel-Suspension versetzt und 1 min geschüttelt. Die Suspension wurde 30 s bei 5000 *x g* zentrifugiert und der Überstand abgenommen und verwahrt. Das Gel wurde 8x mit Waschpuffer B1 (nativ) oder Waschpuffer B2 (denaturierend) gewaschen. Nach jeder Waschung erfolgte eine Zentrifugation bei 5000 *x g* für 30 s. Das Protein wurde mit 2x 200 µl Elutionspuffer B1 (native Bedingungen) oder Elutionspuffer B2 (denaturierende Bedingungen) eluiert. Der Proteingehalt aller Fraktionen wurde mit dem BioRad Assay (2.3.2) ermittelt. Es folgte SDS-PAGE und Western-Blot (siehe 2.3.4 und 2.3.6)

## 2.4 Pharmakologische Methoden

### 2.4.1 [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahmestudien

Die Aufnahme Studien wurden zur Bestimmung der Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Noradrenalin ([<sup>3</sup>H]-NA) an auf 24er-Well-Zellkulturplatten wachsenden Zellen durchgeführt. Bei allen Experimenten handelt es sich um Dreifachbestimmungen. Die spezifische [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme durch den NAT wurde als Differenz der Aufnahme des Substrates in Abwesenheit und Gegenwart des spezifischen NAT-Inhibitors Nisoxetin (10  $\mu$ M) ermittelt. Die Konzentration des Radioliganden [<sup>3</sup>H]-NA lag bei allen Versuchen bei 10 nM. Für die Ermittlung von IC<sub>50</sub>-Werten für die Hemmung der [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme wurden sechs verschiedene Konzentrationen der zu untersuchenden Substanz eingesetzt. Die Substrate und Inhibitoren wurden sowohl bei der Vorinkubation als auch bei der Hauptinkubation in den nötigen Konzentrationen eingesetzt. Die Aufnahmedauer betrug 2 min bei 37°C. Der Wasch- und Inkubationspuffer (KRH-Puffer) enthielt zur Hemmung des Abbaus von Noradrenalin den MAO-Inhibitor (Monoaminoxidase-Inhibitor) Pargylin (1  $\mu$ M) und den COMT-Inhibitor (Catechyl-O-Methyltransferase-Inhibitor) U-0521 (10  $\mu$ M). Für die Bestimmung der Natrium- und Chloridabhängigkeit wurden die Ionen durch Lithium bzw. Isothionat ersetzt.

Zuerst wurde das Kulturmedium von den 24er-Well-Platten abgesaugt und die Zellen wurden 2x mit 1 ml KRH Puffer gewaschen. Die anschließende Vorinkubation erfolgte durch Zugabe von 1 ml der vorgewärmten Vorinkubationlösung für 15 min bei 37°C. Die Lösung wurde abgesaugt und 500 µl Hauptinkubationslösung wurden zugegeben. Nach erfolgter Hauptinkubation wurden die Zellen rasch 3x mit eiskaltem KRH Puffer gewaschen und zur Lyse mit 500 µl 0,1% TritonX-100-Lösung für 1 h inkubiert. 300 µl des Zelllysates wurden in Zählfläschchen (Mini PolyQ Vials) pipettiert, mit 5 ml Szintillationscocktail versetzt und die dpm-Werte mit Hilfe eines Szintillationszählers (Beckmann) ermittelt. Mit 100 µl des Lysates wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al. 1951) (2.3.1) durchgeführt.

# 2.4.2 [<sup>3</sup>H]-Nioxetin-Bindungsstudien

Alle Bindungsversuche wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt. Zur Ermittlung der spezifischen Bindung wurde die Bindung von [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin in Anwesenheit von NA (250  $\mu$ M) oder Desipramin (10  $\mu$ M) bestimmt und von den in Abwesenheit der Inhibitoren ermittelten Werten subtrahiert. In allen Experimenten wurden [<sup>3</sup>H]-Nisoxetinkonzentrationen von 1 nM (bei B<sub>max</sub> Bestimmungen auch 3 nM) eingesetzt. Die Inkubationszeit bei der Hauptinkubation betrug 40 min (zur Ermittlung der Zeitkinetik auch 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, und 60 min) bei RT (zur Überprüfung der Temperaturabhängigkeit von B<sub>max</sub> und K<sub>d</sub> auch bei 2°C ).

a) Bindung an adhärente Zellen

Die Versuche wurden an in 24er-Well-Kulurplatten wachsenden Zellen durchgeführt. Zunächst wurde das Kultur-Medium abgesaugt und die Zellen 2x mit Bindungspuffer gewaschen. Es folgte die Vorinkubation in Anwesenheit der Inhibitoren oder Substrate in den gewünschten Konzentrationen für 15 min. Nach Absaugen der Vorinkubationslödie Hauptinkubation durchgeführt. Anschließend sung wurde wurde die Hauptinkubationslösung abgesaugt und die Zellen 3x mit eiskaltem Bindungspuffer gewaschen. Die Zelllyse erfolgte durch Inkubation mit 500 µl 0,1% Triton-X-100 für 1 h. 300 µl der Zellsuspension wurden in Zählfläschchen (Mini PolyQ Vials) überführt und mit 5 ml Szintillationscocktail versetzt. Im Szintillationszähler (Beckmann) wurden die dpm-Werte ermittelt. 100 µl Zelllysat wurde zur Proteinbestimmung (nach Lowry et al. 1951) verwendet (siehe 2.3.1).

### b) Bindung an Zellmmbranen

Nach Ermittlung des Proteingehaltes (Lowry et al. 1951) der Membransuspension wurde eine Proteinkonzentration von 1  $\mu$ g/ $\mu$ l eingestellt. Die Versuche wurden in Eppendorfgefäßen ohne Deckel in einem Zell-Harvester (Brandel) durchgeführt. Es wurde zuerst eine 1.25 nM [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Stammlösung in Bindungspuffer hergestellt. Von den weiteren Substanzen (Inhbibtoren) wurden ebenfalls Stammlösungen in 10x der gewünschten Endkonzentration hergestellt. Der Gesamtansatz betrug 500  $\mu$ l und setzte sich wie folgt zusammen:
400 μl [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Stammlösung (1.25 nM) = 1 nM Endkonzentration 50 μl Substanzstammlösung oder Bindungspuffer 50 μl Zellmembransuspension

Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe der Zellmembransuspension. Nach 40 min Hauptinkubation wurde der gesamte Ansatz schnell unter Vakuum durch einen GF/F Filter gesaugt. Die Filter mit den zurückgehaltenen Zellmembranen wurden 3x mit eiskaltem Bindungspuffer gewaschen und in Zählfläschchen (Mini PolyQ Vials) überführt. Nach Zugabe von 5 ml Szintillationscocktail wurden diese für mindestens 2 h geschüttelt und die dpm-Werte im Szintillationszähler gemessen.

### 2.4.3 Protektionsversuche

Um zu prüfen, ob Xylamin mit den Ligand-Bindungsstellen des hNAT-His interferiert, wurden Protektionsversuche durchgeführt. Die Zellen wurden hierzu in Gegenwart und Abwesenheit eines großen Überschusses an NAT-Liganden, welche reversibel an den NAT binden (Cocain 250 µM, Noradrenalin 1000 µM), mit Xylamin (30 µM) inkubiert. Zur Kontrolle dienten Zellen, die nur mit Puffer (KRH-Puffer bei Aufnahme; Bindungspuffer bei Bindung an Membranen) inkubiert wurden. Die Xylamin-Lösung (30µM) wurde immer frisch hergestellt und kurz erwärmt, damit sich das Aziridinium-Ion, welches die reaktive Form des Xylamins darstellt, bilden konnte. Zur Bestimmung der Natriumabhängigkeit der Xylamin-Bindung wurde im KRH-Puffer NaCl durch LiCl substituiert.

a) Protektionsversuche an intakten Zellen

Die Zellen wurden in 24er-Well Zellkulturplatten ausgesät. Die Inkubation erfolgte durch Zugabe von 1 ml der jeweiligen Lösungen für 90 min bei 37°C. Nach der Inkubation wurden die Zellen 5x mit 1 ml warmen (37°C) KRH Puffer gewaschen. Die Zellen wurden anschließen mit 500  $\mu$ l 10 nM [<sup>3</sup>H]-Noradrenalin für 2 min bei 37°C inkubiert. Die Aufnahmereaktion wurde durch schnelles Absaugen der Hauptinkubationslösung und 3x Waschen mit 1 ml eiskaltem KRH Puffer beendet. Die Zelllyse erfolgte durch Zugabe von 500  $\mu$ l 0,1% Triton-X-100 für 1 h. 300  $\mu$ l Zelllysat wurden in Zählröhrchen (Mini PolyQ Vials) überführt und die dpm-Werte im Szintillationszähler gemessen. 100  $\mu$ l Zelllysat dienten zur Ermittlung des Proteingehaltes nach Lowry et al. (1951) (2.3.1).

### b) Protektionsversuch an Membranen

Zellen wurden in 175 ml Zellkulturflaschen bis zu ihrer Konfluenz kultiviert (2.1). Das Medium der Zellen wurde abgesaugt und die Zellen 1x mit PBS gewaschen. Mit 10 ml der jeweiligen Lösungen folgte eine Inkubation bei 37°C für 90 min im Brutschrank. Anschließend wurden die Zellen 5x mit 10 ml Bindungspuffer gewaschen. Es folgte eine Membranpräparation (2.3.8) mit anschließender Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) (2.3.1). Der Proteingehalt wurde auf 1  $\mu$ g/ $\mu$ l eingestellt. Danach wurde ein Bindungsversuch mit [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin (2.4.2) durchgeführt.

### 2.4.4 Datenauswertung

Die im Szintillationszähler ermittelte Aktivität wurde in dpm (desintegrations per minute) angegeben. Aus diesen Werten konnte mit Hilfe der spezifischen Aktivität und der entsprechenden Proteinkonzentration ein entsprechender Wert in fmol/mg Protein errechnet werden. Diese Werte wurden dann mit Hilfe des Prism GraphPad Programmes analysiert und weiterverarbeitet. Das Programm passt Daten, die einer Sättigungskinetik gehorchen, mittels nicht-linearer Regression an kinetischen Gleichungen nach der "least square fitting" an. Diese leiten sich von der Michaelis-Menten-Kinetik ab.

Für die Aufnahmekinetik:  $Y = V_{max} X/[K_m + X]$ 

Für die Bindungskinetik:  $Y = B_{max} X/[K_d+X]$ 

Für die Hemmung der Aufnahme/Bindung: Y =  $100/(1+10^{(X-LogIC_{50})})$ . Aus den IC<sub>50</sub>-Werten wurden mit Hilfe der Gleichung nach Cheng Prusoff Gleichung (1973) K<sub>i</sub>-Werte berechnet.

Alle Ergebnisse wurden statistisch auf signifikante Abweichungen mittels Student`s t-Test, post-hoc t-Test und ANOVA überprüft.

## C. Ergebnisse

## 1. Der Noradrenalintransporter der Maus (mNAT)

1998 wurde von Fritz et al. erstmals die cDNA des mNAT kloniert. Im Gegensatz zu dem hNAT, bNAT und rNAT, deren pharmakologische Eigenschaften bereits bekannt sind (Paczkowski et al. 1999), ist der murine Noradrenalintransporter aber noch nicht pharmakologisch charakterisiert worden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der mNAT kloniert und die pharmakologischen Eigenschaften näher untersucht werden.

### 1.1 Klonierung und molekularbiologische Charakterisierung des mNAT

### 1.1.1 Klonierung und Sequenzierung der mNAT-cDNA

Die zur Amplifizierung des mNAT eingesetzte "Gesamt-RNA" wurde aus der Plazenta einer Labormaus (Black 6 C57) gewonnen, da der NAT hier in großer Menge exprimiert wird (Ramamoorthy et al. 1993).

Zunächst wurde die RNA mittels einer Reversen-Transkriptase (Superskript II, Life Technologies) in cDNA umgeschrieben. Die zur Amplifikation eingesetzten "sense" (5`-ATGCTTCTGGCGCGGATGA) und "antisense" (5`-TCAGATGGCCAGCCAGTGT

TGC-3`) Primer wurden aus der bekannten mNAT-Sequenz (EMBL/GenBank Datenbank Accession-Nr. U76306) abgeleitet. Die den mNAT kodierende Nukleotidsequenz wurde mittels PCR amplifiziert, wobei eine Taq-Polymerase (Life Technologies) und folgendes Temperaturprogramm verwendet wurde.

1. Denaturierung:	94°C, 1 min
2. Primeranheftung:	60°C, 1 min
3. Kettenverlängerung:	72°C, 1 min

Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese getrennt, die benötigte Bande (1872 bp Fragment) ausgeschnitten und mit GeneElute Säulen aufgereinigt. Nach Einklonieren in den Vektor pCR 2.1 folgte die Sequenzierung nach Sanger et al. (1977) mit T7 und Sp6 Primern (B.2.2.8). Die erhaltene Nukleotidsequenz wurde in der EMBL/GenBank Datenbank (Accession-Nr. Aj439987) abgelegt. Die hiervon abgeleitete Aminosäuresequenz wird in Abb. 5 gezeigt.

Ein Vergleich der Nukleotidsequenz mit der von Fritz et al. (1998) veröffentlichten zeigte drei Basenaustausche, die zu einer Änderung der AS-Sequenz führten (Tab. 1). Zwei der AS-Austausche lagen am C-Term an den Positionen 609 (Leu609Phe) und 610 (Pro610Gln). Da sowohl Phenylalanin (609) als auch Glutamin (610) in den AS-Sequenzen des hNAT, rNAT und bNAT konserviert sind, ist anzunehmen, dass die von uns gefundenen AS die korrekten an diesen Positionen sind. Der dritte Austausch befand sich an Position 505 (Ile505Val). Ein Vergleich mit den AS-Sequenzen der anderen Spezies zeigt, dass Isoleucin an dieser Stelle konserviert ist und es sich hier um die richtige Aminosäure handelt. Der mNAT-Wild-Typ (mNAT-WT) enthält also die Aminosäuren Isoleucin an Position 505, Phenylalanin an Position 609 und Glutamin an der Stelle 610.

Da der Ile505Val Austausch an einer bei den Noradrenalintransportern der anderen Spezies hochkonservierten Position liegt und der Austausch einer einzelnen Aminosäure die Substratbindung oder die Funktion eines Transporters beeinträchtigen kann (Kitayama et al. 1992, Danek-Burgess und Justice 1999, Roubert et al. 2000, Hahn et al. 2003), galt es zu untersuchen, ob der Ile505Val-Aminosäureaustausch relevante Konsequenzen für die pharmakologischen Eigenschaften des Transporters hat. Daher sollten in den folgenden Versuchen die Eigenschaften des mNAT-WT und der Variante mNAT-I505V untersucht werden. Der mNAT-WT wurde hierzu aus unserer mNAT-I505V Variante durch Mutagenese hergestellt. Um den von Fritz et al. (1998) klonierten Transporter von unserem Maustransporter zu unterscheiden, wurde nachfolgend dieser, wie publiziert, als mNET (NET = norepinephrine transporter) bezeichnet.

	Region zwischen TMD10 & TMD11	C-terminale Region
mNET (Fritz et al. 1998) Accession-Nr. U76306	<b>D I Q (506)</b> GAC ATC CAG (1518)	<b>Q <u>L</u> <u>P</u> (610)</b> CAG TTA CCC (1831)
mNAT-I505V (AG Bönisch) Accession-Nr. Aj439987	<b>D <u>V</u> Q</b> GAC GTC CAG	<b>Q F Q</b> CAG TTC CAG
mNAT-WT (AG Bönisch/Wildtyp)	D I Q GAC ATC CAG	<b>Q F Q</b> CAG TTC CAG
rNAT (Brüss et al. 1997) Accession-Nr. Y13223	<b>d i q</b> Gac atc cag	<b>Q F Q</b> CAG TTC CAG
bNAT (Lingen et al. 1994) Accession-Nr. X79015	D I Q GAC ATC CAG	<b>Q F Q</b> CAG TTC CAG
hNAT (Pacholczyk et al. 1991) Accession-Nr. M65105	D I Q GAC ATC CAG	<b>Q F Q</b> CAG TTC CAA

# Tab. 1: Vergleich von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der verschiedenen Varianten des Maus-NAT (mNAT) mit den NAT-Sequenzen der Ratte (rNAT), des Rindes (bNAT) und des Menschen (hNAT).

Nicht konservierte Basen der Nukleotidsequenzen, die zu Aminosäureaustauschen führen, sind grau unterlegt. Die entsprechenden Aminosäuresequenzen sind fett gedruckt und die ausgetauschten Aminosäuren unterstrichen.

## 1.1.2 Vergleich der Aminosäuresequenz des mNAT-WT mit den NATs anderer Spezies

Wie bereits erwähnt, sind vor dem mNAT noch drei weitere Spezieshomologe des NAT kloniert worden. Der humane NAT war der erste, der 1991 von Pacholczyk et al. kloniert wurde. Er besteht, wie der mNAT aus 617 AS. Es folgten der NAT des Rindes (bNAT) (Lingen et al. 1994) mit einer Länge von 615 AS und der Ratte (rNAT) (Brüss et al.

1997) bestehend aus 617 AS. In Abb. 5 ist der Vergleich der Aminosäuresequenz des mNAT-WT mit denen der oben genannten NATs dargestellt.

Durch den Vergleich wird ersichtlich, dass mNAT/hNAT zu 94%, mNAT/bNAT zu 91% und mNAT/rNAT zu 93% identisch sind.

mNAT-WT:	1	MLLARMNPQV	QPEL <mark>G</mark> GA <mark>D</mark> PL	<mark>P</mark> EQP <mark>LRP</mark> CKT	<mark>A</mark> D <mark>L</mark> LVVKERN	40
bNAT:	1	MLLARMNPQV	QPEN <mark>G</mark> GAGPG	SEQP <mark>P</mark> RKR	KEVLVVKERN	38
hNAT:	1	MLLARMNPQV	QPENNGA <mark>D</mark> TG	<mark>P</mark> EQP <mark>LR</mark> ARK <mark>T</mark>	<mark>A</mark> E <mark>L</mark> LVVKERN	40
rNAT:	1	MLLARMKPQV	QPEL <mark>G</mark> GA <mark>D</mark> QL	<mark>P</mark> EQP <mark>LRP</mark> CKT	<mark>A</mark> D <mark>L</mark> LVVKERN	40
				TMD1		
mNAT-WT:	41	GVQ <mark>C</mark> LLA <mark>S</mark> QD	SD <mark>A</mark> QPRETWG	K <mark>K</mark> IDFLLSVV	GFAVDLANVW	80
bNAT:	39	GVQ <mark>C</mark> LLA <mark>S</mark> RD	<mark>G</mark> DEQPRETWG	K <mark>K</mark> IDFLLSVV	GFAVDLANVW	88
hNAT:	41	GVQ <mark>C</mark> LLAPRD	<mark>G</mark> D <mark>A</mark> QPRETWG	K <mark>K</mark> IDFLLSVV	GFAVDLANVW	80
rNAT:	41	GVQ <mark>C</mark> LLA <mark>S</mark> QD	<mark>G</mark> D <mark>A</mark> QPRETWG	KEIDFLLSVV	GFAVDLANVW	80
		TMI	)2			
mNAT-WT:	83	RFPYL <mark>C</mark> YKNG	GGAFLIPYTL	FLIIAGMPLF	YMELALGQ <mark>Y</mark> N	120
bNAT:	79	RFPYL <mark>C</mark> YKNG	GGAFLIPYTL	FLIIAGMPLF	YMELALGQ <mark>Y</mark> N	118
hNAT:	83	RFPYL <mark>C</mark> YKNG	GGAFLIPYTL	FLIIAGMPLF	YMELALGQ <mark>Y</mark> N	120
rNAT:	83	RFPYL <mark>C</mark> YKNG	GGAFLIPYTL	FLIIAGMPLF	YMELALGQFN	120
			TMD3			
mNAT-WT:	121	REGAATVWKI	<mark>C</mark> PFFKGVGYA	VILIALYVGF	YYNVIIAWSL	160
bNAT:	119	REGAATVWKI	<mark>C</mark> PFFKGVGYA	VILIALYVGF	YYNVIIAWSL	158
hNAT:	121	REGAATVWKI	<mark>C</mark> PFFKGVGYA	VILIALYVGF	YYNVIIAWSL	160
rNAT:	121	REGAATVWKI	<mark>C</mark> PFFKGVGYA	VILIALYVGF	YYNVIIAWSL	160
mNAT-WT:	161	YYLFASFTLN	LPWTN <mark>C</mark> GHSW	NSPN <mark>C</mark> TDPKL	LNASVLGDHT	200
bNAT:	159	YYLF <mark>S</mark> SFT <mark>PT</mark>	LPWT <mark>DC</mark> GH <mark>A</mark> W	NSPN <mark>C</mark> TDPKL	LNSSVLGNHT	198
hNAT:	161	YYLF <mark>S</mark> SFT <mark>PT</mark>	LPWT <mark>DC</mark> GH <mark>A</mark> W	NSPN <mark>C</mark> TDPKL	LNGSVLGNHT	200
rNAT:	161	YYLF <mark>S</mark> SFT <mark>PT</mark>	LPWT <mark>DC</mark> GH <mark>A</mark> W	NSPN <mark>C</mark> TDPKL	LNASVLGDHT	200
					TMD4	
mNAT-WT:	201	KYSKYKFTPA	AEFYERGVLH	LHESSGIHDI	GLPQWQLLL <mark>C</mark>	240
bNAT:	199	KYSKYKFTPA	AEFYERGVLH	LHESSGIHDI	GLPQWQLLL <mark>C</mark>	238
hNAT:	201	KYSKYKFTPA	AEFYERGVLH	LHESSGIHDI	GLPQWQLLL <mark>C</mark>	240
rNAT:	201	KYSKYKFTPA	AEFYERGVLH	LHESSGIHDI	GLPQWQLLL <mark>C</mark>	240

			TMI	)5		
mNAT-WT:	241	L <mark>MV</mark> VIVVL <mark>Y</mark> F	SLWKGVKTSG	KVVWITATLP	Y <mark>F</mark> VLFVLLVH	280
bNAT:	239	LIIVVIVLFF	SLWKGVKTSG	KVVWITATLP	YLVLFVLLVH	278
hNAT:	241	L <mark>MV</mark> VVIVL <mark>Y</mark> F	SLWKGVKTSG	KVVWITATLP	Y <mark>F</mark> VLFVLLVH	280
rNAT:	241	L <mark>MV</mark> VIVVL <mark>Y</mark> F	SLWKGVKTSG	KVVWITATLP	Y <mark>F</mark> VLFVLLVH	280
					TMD6	
mNAT-WT:	283	G <mark>V</mark> TLPGASNG	INAYLHIDFY	RLKEATVWID	AATQIFFSLG	320
hNAT:	279	GITLPGASNG	INAYLHIDFY	RLKEATVWID	AATQIFFSLG	318
bNAT:	283	G <mark>V</mark> TLPGASNG	INAYLHIDFY	RLKEATVWID	AATQIFFSLG	320
rNAT:	283	G <mark>V</mark> TLPGASNG	INAYLHIDFY	RLKEATVWID	AATQIFFSLG	320
			TN	/ID7		
mNAT-WT:	321	AGFGVLIAFA	SYNKFDNN <mark>C</mark> Y	RDALLTS <mark>T</mark> IN	<mark>CV</mark> TSF <mark>I</mark> SGFA	360
bNAT:	319	AGFGVLIAFA	SYNKFDNN <mark>C</mark> Y	RDALLTS <mark>T</mark> IN	<mark>CV</mark> TSF <mark>I</mark> SGFA	358
hNAT:	321	AGFGVLIAFA	SYNKFDNN <mark>C</mark> Y	RDALLTSSIN	<mark>C</mark> ITSFVSGFA	360
rNAT:	321	AGFGVLIAFA	SYNKFDNN <mark>C</mark> Y	RDALLTS <mark>T</mark> IN	<mark>CV</mark> TSF <mark>I</mark> SGFA	360
					TMD8	
mNAT-WT:	361	IFSILGYMAH	EHKV <mark>N</mark> IEDVA	TEGAGLVF <mark>I</mark> L	YPEAISTLSG	400
bNAT:	359	IFSILGYMAH	EHKV <mark>N</mark> IEDVA	TEGAGLVF <mark>I</mark> L	YPEAISTLSG	398
hNAT:	361	IFSILGYMAH	EHKV <mark>N</mark> IEDVA	TEGAGLVF <mark>I</mark> L	YPEAISTLSG	400
rNAT:	361	IFSILGYMAH	EHKV <mark>KIEDVA</mark>	TEGAGLVFVL	YPEAISTLSG	400
mNAT-WT:	401	STFWA <mark>V</mark> LFFL	MLLALG <mark>L</mark> DSS	MGGMEAVITG	LADDFQVLKR	440
bNAT:	399	STFWAIVFFI	MLLALGIDSS	MGGMEAVITG	LADDFQVLKR	438
hNAT:	401	STFWA <mark>V</mark> VFFV	MLLALG <mark>L</mark> DSS	MGGMEAVITG	LADDFQVLKR	440
rNAT:	401	STFWA <mark>V</mark> LFFL	MLLALG <mark>L</mark> DSS	MGGMEAVITG	LADDFQVLKR	440
	-	[MD9			TMD10_	
mNAT-WT:	441	HRKLFT <mark>C</mark> VV <mark>T</mark>	ISTFLLA <mark>L</mark> F <mark>C</mark>	ITKGGIYVLT	LLDTFAAGTS	480
bNAT:	439	HRKLFTFAVS	FGTFLLA <mark>L</mark> F <mark>C</mark>	ITKGGIYVLT	LLDTFAAGTS	478
hNAT:	441	HRKLFTFGV <mark>T</mark>	FSTFLLA <mark>L</mark> F <mark>C</mark>	ITKGGIYVLT	LLDTFAAGTS	480
rNAT:	441	HRKLFT <mark>C</mark> AV <mark>T</mark>	LGTFLLAMF <mark>C</mark>	ITKGGIYVLT	LLDTFAAGTS	480

TMD:	
------	--

TMD11

					_	
mNAT-WT:	481	ILFAVLMEAI	GVSWFYGVDR	FSNDIQQMMG	F <mark>K</mark> PGLYWRL <mark>C</mark>	520
bNAT:	479	ILFAVLMEAI	GVSWFYGVDR	FSNDIQQMMG	F <mark>K</mark> PGLYWRL <mark>C</mark>	518
hNAT:	481	ILFAVLMEAI	GVSWFYGVDR	FSNDIQQMMG	FRPGLYWRL <mark>C</mark>	520
rNAT:	481	ILFAVLMEAI	GVSWFYGVDR	FSNDIQQMMG	F <mark>K</mark> PGLYWRL <mark>C</mark>	520
					TMD12	
mNAT-WT:	521	WKFVSPAFLL	FVV <mark>V</mark> VSIINF	KPLTYDDYTY	P <mark>P</mark> WANWVGWG	560
bNAT:	519	WKFVSPAFLL	FVVIVSIINF	KPLTYDDYIF	PLWANWVGWG	558
hNAT:	521	WKFVSPAFLL	FVV <mark>V</mark> VSIINF	KPLTYDDYIF	P <mark>P</mark> WANWVGWG	560
rNAT:	521	WKFVSPAFLL	FVV <mark>V</mark> VSIINF	KPLTYDDYVY	P <mark>P</mark> WANWVGWG	560
mNAT-WT:	561	IA <mark>L</mark> SSMILVP	<mark>A</mark> Y <mark>VI</mark> YKFLSI	<mark>R</mark> GS <mark>LW</mark> ERVAY	GITP <mark>EN</mark> EHHL	600
bNAT:	559	IAGSSMVLVP	<mark>A</mark> YIVYKFFST	<mark>R</mark> GSIRERLAY	GITPASEHHL	598
hNAT:	561	IA <mark>L</mark> SSMVLVP	IY <mark>VI</mark> YKFLST	QGS <mark>LW</mark> ERLAY	GITP <mark>EN</mark> EHHL	600
rNAT:	561	IA <mark>L</mark> SSMILVP	<mark>A</mark> Y <mark>VI</mark> YKFFSI	<mark>R</mark> GS <mark>LW</mark> ERVAY	GITP <mark>EN</mark> EHHL	600
mNAT-WT:	601	VAQRDVRQFQ	L <mark>Q</mark> HWLAI 61	7		
bNAT:	599	VAQRDIRQFQ	L <mark>Q</mark> HWLAI 619	5		
hNAT:	601	VAQRDIRQFQ	L <mark>Q</mark> HWLAI 61	7		
rNAT:	601	VAQRDVRQFQ	LRHWLAI 61	7		

Abb. 5: AS-Sequenz des mNAT-WT im Vergleich zur AS-Sequenz des hNAT, bNAT und rNAT.

Identische (konservierte) Aminosäuren sind grau, ähnliche (homologe) Aminosäuren gelb und Cysteinreste rot unterlegt. Die Lage der durch Hydrophobizitätsanalyse ermittelten Transmembrandomänen (TMD) ist mit einem Strich oberhalb der Sequenzen dargestellt.

### 1.1.3 Topologisches Modell des mNAT

Der mNAT ist ein integrales Membranprotein bestehend aus 617 AS. Die Hydrophobizitätsanalyse zeigt einen Transporter, welcher die Membran mit 12 Transmembrandomänen durchzieht und intrazelluläre N- und C-Termini aufweist. Weitere Merkmale sind eine große extrazelluläre Schleife zwischen TMD 3 und TMD 4, zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen und Bindungsstellen für die Proteinkinase C (PKC) und CaseinkinaseII (CKII).

#### Abb. 6: Topologisches Modell des mNAT-WT.

Die einzelnen Aminosäuren sind als Kreise dargestellt. Die grauen Kreise zeigen bei dem mNAT-WT, hNAT, bNAT und rNAT identische AS. Weiter sind die N-Glykosylierungsstellen (Y) und potentielle Bindungsstellen für Proteinkinase C (PKC) und Caseinkinase II (CKII) eingezeichnet. Der Pfeil zeigt die Position des Aminosäureaustausches der von uns gefundenen Variante (mNAT-I505V).

# 1.1.4 Umklonierung des mNAT in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1 (-)

mNAT-WT Klone wurden mit Hilfe der gerichteten Mutagenese nach dem "Quick change" Protokoll gewonnen. Als Vorlage diente die mNAT-I505V cDNA in dem Vektor pCR2.1. Es wurden zwei Primer mit der spezifischen Mutation (G1513A) eingesetzt, um die Mutation Valin gegen Isoleucin an Position 505 herbeizuführen. mNATmuts (5`-GGTTCAGCAATGACATCCAGCAGATGATGGGGG-3`)

mNATmutas (5`-CCCCATCATCTGG<u>A</u>TGTCATTGCTGAACC-3`)

Durch Sequenzierung wurden die gewünschten Basenaustausche verifiziert.

Die mNAT-WT cDNA und die mNAT-I505V cDNA wurden aus dem pCR2.1-Vektor mit den Restriktionsenzym *Xhol/Hind*III herausgeschnitten und nach der elektrophoretischen Auftrennung aus dem Gel eluiert und aufgereinigt. Es folgte die Ligation der cDNAs in den ebenfalls mit *Xhol/Hind*III aufgeschnittenen pcDNA3.1 (-) Vektor.

## 1.2 Biochemisch-pharmakologische Eigenschaften des mNAT-WT und des mNAT-I505V)

# 1.2.1 [<sup>3</sup>H]-Noradrenalin-Aufnahme durch den mNAT-WT und mNAT-I505V in transient transfizierte HEK293-Zellen

## 1.2.1.1 Bestimmung von $V_{\text{max}}$ und $K_{\text{m}}$

Zunächst wurden für den mNAT-WT und den mNAT-I505V die  $V_{max}$  und der K<sub>m</sub> der [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme (2 min) bei NA Konzentrationen von 20, 100, 300, 1000, 3000 und 6000 nM bestimmt. Die Aufnahmeversuche (B.2.4.1) wurden mit transient transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Varianten des mNAT zu erkennen (Abb. 7). Die V<sub>max</sub> des mNAT-WT lag bei 123,2 ± 25,6 pmol/mg Protein/min und die des mNAT-I505V bei 117,4 ± 18,2 pmol/mg Protein/min. Die K<sub>m</sub>-Werte lagen für den mNAT-WT bei 3,2 ± 0,1  $\mu$ M und für den mNAT-I505V bei 4,6 ± 0,73  $\mu$ M. Die Werte unterschieden sich nicht signifikant und korrelieren mit Literaturdaten anderer Spezies (Paczkowski et al. 1999).



#### Abb. 7: Kinetik der spezifischen [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme des mNAT-WT und des mNAT-I505V.

Gezeigt sind die Sättigungskurven der Nisoxetin-hemmbaren (10 µM) [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme (2 min) durch den mNAT-WT und mNAT-I505V bei [<sup>3</sup>H]-NA-Konzentrationen von 20, 100, 300, 1000, 3000 und 6000 nM sowie die V<sub>max</sub> und K<sub>m</sub>-Werte. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. aus n = 5 Experimenten. Die Kurven wurden mittels nicht-linearer Regression ermittelt.

## 1.2.1.2 Abhängigkeit der [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme von der Anwesenheit von Natriumund Chloridionen

Der NAT gehört zu der Familie der Na<sup>+</sup>/CI-abhängigen Neurotransmitter-Transporter. Daher war es von Interesse die Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Abhängigkeit des mNAT-WT und des mNAT-I505V zu untersuchen. Dazu wurde die [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme in stabil transfizierte HEK293-Zellen bei Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Anwesenheit (Kontrolle) sowie mit Natrium-freiem (Na<sup>+</sup> ersetzt durch Li<sup>+</sup>) oder Chlorid-freiem (Cl<sup>-</sup> ersetzt durch Isethionat) Puffer bestimmt. Die Inkubation mit [<sup>3</sup>H]-NA bei einer Konzentration von 10 nM für 2 min führte bei der Kontrolle zu einer [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme von  $186,1 \pm 31,8$  fmol/mg Protein/min. Der selektive NAT-Inhibitor Nisoxetin unterdrückte die [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme sowohl bei dem mNAT-WT (4.5 ± 0.5% der Kontrolle) als auch bei dem mNAT-I505V (5.8 ± 0.3% der Kontrolle) fast vollständig (Abb. 8). Die Abwesenheit von Natrium (Ersatz durch Lithium) reduzierte die [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme auf 9,4 ± 2,0% der Kontrolle bei dem mNAT-WT und auf 11,1 ± 2,3% beim mNAT-I505V. Bei Ersatz von Chlorid durch Isethionat wurde die Aufnahme auf 21,1 ± 6,0% der Kontrolle (mNAT-WT) sowie 16,8 ± 2,2% der Kontrolle (mNAT-I505V) vermindert. Es konnte also gezeigt werden, dass sich der mNAT-I505V und der mNAT-WT in Bezug auf die Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Abhängigkeit nicht signifikant unterscheiden und sie die typische Eigenschaft eines NAT zeigen (Lingen et al. 1994, Brüss et al. 1997).



#### Abb. 8: Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>Abhängigkeit der [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme.

Dargestellt ist die [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme (10 nM; 2 min) in mit a) dem mNAT-WT oder b) dem mNAT-I505V stabil transfizierten HEK293-Zellen. Diese wurde durch Anwesenheit von Nisoxetin (10  $\mu$ M) sowie durch Abwesenheit von Natrium (Ersatz durch Lithium) oder Chlorid (Ersatz durch Isethionat) fast vollständig gehemmt. Gezeigt sind die Mittelwerte ± S.E.M. aus n = 5 Experimenten.

# 1.2.2 Bestimmung von K<sub>D</sub> und B<sub>max</sub> der [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung des mNAT-WT und des mNAT-I505V

Die für die Bindungsversuche eingesetzten Membranen wurden aus HEK293-Zellen gewonnen, die mit der cDNA des mNAT-WT oder des mNAT-I505V transient transfiziert waren. Ein Vergleich der  $B_{max}$  und des K<sub>D</sub>-Wertes der [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung (1, 3, 10, 20, 30, und 60 nM; 40 min) des mNAT-WT und des mNAT-I505V ergab in 5 Versuchen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten. Die  $B_{max}$  lag bei dem mNAT-WT bei 18,3 ± 1,1 pmol/ mg Protein und bei dem mNAT-I505V bei 16,9 ± 2,6

pmol/mg Protein. Die K<sub>D</sub>-Werte betrugen 5,9  $\pm$  0,3 nM (mNAT-WT) und 6,9  $\pm$  0,7 nM (mNAT-I505V). Beide Parameter korrelieren mit Literaturangaben der anderen Spezies (Paczkowski et al. 1999, Apparsundaram et al. 1998a).



# Abb. 9: $B_{max}$ und $K_D$ Bestimmung der [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung des mNAT-WT und des mNAT-I505V.

Gezeigt wird die Sättigungskurve der spezifischen, Desipramin-sensitiven (10  $\mu$ M) [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung (1, 3, 10, 20, 30 und 60 nM; 40 min) des mNAT-WT und des mNAT-I505V an aus transient transfizierten HEK293-Zellen gewonnenen Membranen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E.M. aus n = 5 Experimenten. Die Kurven wurden durch nicht-lineare Regression ermittelt.

### 1.2.3 Hemmung der [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme durch NAT-Substrate und -Inhibitoren

Für die Untersuchung des mNAT-WT und mNAT-I505V waren als weitere Parameter die Hemmeffekte der NAT-Inhibitoren Desipramin (0,3, 1, 3, 10, 30 und 100 nM), Imipramin (0,3, 1, 3, 10, 30 und 100 nM) und Cocain (0,3, 1, 3, 10, 30 und 100  $\mu$ M) sowie der NAT-Substrate MPP<sup>+</sup> (0,3, 1, 3, 10, 30 und 100  $\mu$ M), Adrenalin (0,3, 1, 3, 10, 30 und 100  $\mu$ M) und Dopamin (0,3, 1, 3, 10, 30 und 100  $\mu$ M) auf die [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme (10 nM; 2 min) von Interesse. Dazu wurden die IC<sub>50</sub>-Werte für die Hemmung der [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme der oben genannten Substanzen in mit dem mNAT-WT oder dem mNAT-I505V stabil transfizierten HEK293-Zellen bestimmt. Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden nach Cheng und Prussof (1973) in K<sub>i</sub>-Werte umgerechnet.

Abb. 10 und Abb. 11 zeigen, dass die [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme durch den mNAT-WT und den mNAT-I505V konzentrationsabhängig sowohl durch MPP<sup>+</sup>, Dopamin und Adrenalin als auch durch Desipramin, Imipramin und Cocain gehemmt wird. Die mittleren pK<sub>i</sub>- und K<sub>i</sub>-Werte der Substrate und Inhibitoren sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Die pK<sub>i</sub>-Werte der Substrate (Adrenalin, Dopamin und MPP<sup>+</sup>) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem mNAT-WT und dem mNAT-I505V (p > 0,05). Auch bei den trizyklischen Antidepressiva (Imipramin und Desipramin) waren zwischen dem mNAT-WT und dem NAT-I505V keine signifikanten Unterschiede der pK<sub>i</sub>-Werte feststellbar. Für Cocain war ein geringer aber signifikanter Unterschied der pK<sub>i</sub>-Werte zwischen dem mNAT-WT (6,128 ± 0,092) und dem mNAT-I505V (6,548 ± 0,026) erkennbar (p < 0,01), was auf eine höhere Affinität des mNAT-I505V zu diesen Inhibitor hinweist.

Komponente	$pK_i$ -Wert ± S.E.M. (in Klammern: mittlerer $K_i$ -Wert)		
	m NAT-WT	m NAT-1505V	
Substrate:			
MPP+	5.977 ± 0.029 (1.11 µM)	6.046 <i>± 0.050</i> (0.92 μM)	
(-)-Adrenalin	5.007 <i>± 0.076</i> (10.5 μM)	5.044 <i>± 0.111</i> (10.2 μM)	
Dopamin	6.346 <i>± 0.026</i> (0.46 μM)	6.717 <i>± 0.1</i> 23 (0.23 μM)	
Inhibitoren:			
Desipramin	8.244 ± 0.054 (5.88 nM)	8.489 ± 0.090 (3.53 nM)	
Imipramin	7.514 ± 0.068 (32.1 nM)	7.822 ± 0.227 (17.2 nM)	
Cocain	6.128 ± 0.092 (745 nM)	6.548 ± 0.026 (285 nM)**	

#### Tab. 2: K<sub>i</sub>- und pK<sub>i</sub>-Werte von NAT-Substraten und -Inhibitoren für die Hemmung der [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme in mit dem mNAT-WT oder mNAT-I505V stabil transfizierte HEK293-Zellen.

Gezeigt werden die pK<sub>i</sub>-Werte ± S.E.M. aus n = 5 Experimenten (K<sub>i</sub>-Werte in Klammern). Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden durch Prozent der Inhibition der spezifischen [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme (2 min; 10 nM) berechnet und unter Annahme einer kompetitiven Inhibition in K<sub>i</sub>-Werte (Cheng und Prussof, 1973) umgerechnet. Die Daten wurden mittels gepaartem post hoc t-Test analysiert. \*\* p< 0,01



Abb. 10: Konzentrationsabhängige Hemmung der [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme durch Adrenalin, MPP<sup>+</sup> und Dopamin in mit dem a) mNAT-WT oder b) mNAT-I505V stabil transfizierten HEK293-Zellen.

Gezeigt werden die Mittelwerte ( $\pm$  S.E.M.) der Aufnahme und die hieraus errechneten Inhibitionskurven (n = 5 Experimente).



#### Abb. 11: Konzentrationsabhängige Hemmung der [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme durch Desipramin, Imipramin und Cocain in mit dem a) mNAT-WT oder b) mNAT-I505V stabil transfizierten HEK293-Zellen.

Gezeigt werden die Mittelwerte ( $\pm$  S.E.M.) der Aufnahme und die hieraus errechneten Inhibitionskurven (n = 5 Experimente).

## 2. Pharmakologische und biochemische Charakterisierung des hNAT mit Nterminalem Poly-Histidin-Tag und Express-Epitop (hNAT-His)

### 2.1 Funktionelle Expression des hNAT-His in CHO-Zellen

Das anfängliche Problem bei der Aufreinigung sowie der Untersuchung von Funktion und Struktur von Membranproteinen ist die Wahl eines geeigneten heterologen Expressionssystems. Wichtig, neben der ausreichenden Menge des zu untersuchenden und aufzureinigenden Proteins, ist vor allem eine hohe Plasmamembranexpression und eine normale Funktion. Voraussetzung hierfür sind die korrekte Faltung und die richtigen posttranslationalen Modifikationen des Membranproteins (Tate et al. 2003).

Der hNAT ist ein *N*-glykosyliertes Membranprotein, bestehend aus 12 Transmembrandomänen mit intrazellulärem N- und C-Terminus. Die *N*-Glykane verbessern die korrekte Faltung des Transporters und dessen Stabilität in der Membran, sind aber nicht notwendig für den Noradrenalin-Transport per se (Melikian et al. 1996, Nguyen und Amara 1996).

Da es sich bei dem hNAT um ein Glykoprotein handelt, dessen Zuckerketten nach dem "High Mannose" Prinzip verknüpft werden, eignen sich nur Säugetierzellen oder Insektenzellen zur Expression des Transporters, weil sie nach diesem Schema verknüpfen. In der vorliegenden Arbeit sollten als Expessionssystem CHO-Zellen getestet werden.

Weiter sollte der hNAT zu Proteinaufreinigungszwecken mit einem Poly-His-Tag versehen werden, um den Einsatz der Affinitätschromatographie (B.2.3.12) zu ermöglichen. Außerdem sollte ein Epitop eingefügt werden, welches den spezifischen Nachweis im Western–Blot ermöglicht (B.2.3.6). Die Einfügung des His-Tags und des Epitops ist aber nur am N-Terminus möglich, da Modifikationen am C-Terminus den Reifungsprozess des Proteins sowie dessen Oberflächenexpression vermindern (Burton et al. 1998, Torres et al. 2001, Baumann und Blakely 2002).

Als Vektor wurde der pcDNA4/HisMax Vektor eingesetzt. Die cDNA des hNAT wurde über Bam HI und Xho I Schnittstellen in die "multiple cloning site" des Vektors einkloniert (B.1.14).

Der mit dem pcDNA4/HisMax Vektor exprimierte hNAT besitzt 6 Histidinreste (His-Tag) und ein Epitop (Express-Epitop) am N-Terminus und sollte mit den folgenden Versuchen näher charakterisiert werden.

### 2.2 Pharmakologische Charakterisierung des hNAT-His

### 2.2.1 [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung an den hNAT-His

### 2.2.1.1 Zeitverlauf der spezifischen [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung

Bei Nisoxetin handelt es sich um einen selektiven NAT Inhibitor, welcher mit hoher Affinität an nur eine Bindungsstelle des Transporters bindet. Die Bindung ist Na<sup>+</sup>- und CI<sup>-</sup>abhängig. Nisoxetin ist 1000x potenter in der Aufnahmehemmung von NA als der von Serotonin und 400x potenter in der Hemmung der NA-Aufnahme im Vergleich zur Dopamin-Aufnahme (Tejani-Butt et al. 1990, Tejani-Butt 1991). Weiter hat Nisoxetin wenig bzw. keine Affinität zu vielen Neurotransmitter Rezeptoren (Wong et al. 1982). Der Vorteil des Einsatzes von [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin als Radioligand im Vergleich zu Desipramin ist seine geringere unspezifische Bindung (Lee et al. 1982, Backstrom et al. 1989). Zunächst wurde die Zeit der Bindung von [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin an den hNAT-His bis zur Einstellung des Equilibriums ermittelt. Dazu wurden die mit dem hNAT-His stabil transfizierten CHO-Zellen (siehe B.2.2.11) in Multiwell-Zellkulturplatten herangezogen. Es folgten [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindungsversuche (1 nM) wie unter B.2.4.2 beschrieben bei Hauptinkubationszeiten von 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 und 60 min. Das Equilibrium wurde nach 40 min erreicht und blieb auch nach 60 min unverändert (Abb. 12). Es wurde daher eine Inkubationszeit von 40 min für die folgenden Experimente gewählt.



# Abb. 12: Zeitkinetik der [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung an mit dem hNAT-His stabil transfizierten CHO-Zellen.

Ermittelt wurde die spezifische, NA-sensitive (250  $\mu$ M) [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung (1 nM) nach 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, und 60 min. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. von 5 unabhängigen Versuchen (n = 5) in Dreifachbestimmungen.

# 2.2.1.2 Bestimmung von $B_{max}$ und $K_D$ der spezifischen [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung an intakten Zellen

Um die Anzahl an [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindungsstellen in der Zellmembran der mit dem hNAT-His stabil transfizierten CHO-Zellen zu ermitteln, wurde die maximale Bindung (B<sub>max</sub>) an intakten Zellen bestimmt. Weiter sollte getestet werden, ob das His-Tag und Express-Epitop Einfluss auf die Inhibitorbindung haben.

Für die Versuche wurden die mit dem hNAT-His stabil transfizierten CHO-Zellen (B.2.2.10) in Multiwell-Zellkulturplatten ausgesät und an diesen Bindungsversuche nach B.2.4.2 bei [<sup>3</sup>H]-Nisoxetinkonzentrationen von 1, 3, 10, 20 und 80 nM bei RT durchgeführt. Die B<sub>max</sub> lag bei 1,72  $\pm$  0,25 pmol/mg Protein und der K<sub>D</sub>-Wert bei 9,4  $\pm$  2,3 pmol/mg Protein (Abb. 13 a). Beide Kinetik-Parameter stimmen mit Literaturangaben

des hNAT überein (Apparsundaram et al. 1998a, Danek-Burgess and Justice 1999, Paczkowski et al. 2002, Paczkowski und Bryan-Lluka 2004). Dies zeigt, dass das His-Tag und das Express-Epitop am N-Terminus keinen Einfluss auf die Nisoxetin-Bindung an den hNAT-His haben.

Zur Prüfung, ob eine NA-sensitive Bindung von Nisoxetin eventuell auch an intrazellulären Transporterproteinen stattfindet, wurden auch Versuche bei 2°C durchgeführt. Die  $B_{max}$  bei 2°C betrug 1,42 ± 0,08 pmol/mg Protein und der K<sub>D</sub>-Wert lag bei 9,9 ± 0,9 nM. Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant von den bei RT ermittelten (siehe Abb. 13 b).

NA gelangt bei 2°C weder durch Transport über den NAT noch durch Diffusion in die Zellen. Offensichtlich findet auch bei RT kein nennenswerter NA-Transport statt, sonst hätte sich beim Vergleich zwischen RT und 2°C ein Unterschied gezeigt. Die NA-sensitive Bindung von [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin findet somit also nur am NAT der Plasmamembran statt.



# Abb. 13: Bestimmung von $K_D$ und $B_{max}$ der [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung an intakten Monolay-erzellen bei RT und 2°C

Dargestellt sind die Sättigungskurven der spezifischen, NA-sensitiven (250  $\mu$ M) [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung (1, 3, 10, 20 und 80 nM) an mit dem hNAT-His stabil transfizierten CHO-Zellen bei a) RT und b) 2°C. Bei den gezeigten Werten handelt es sich um Mittelwerte ± S.E.M. aus n = 5 Experimenten.

# 2.2.1.3 Bestimmung von $B_{max}$ und $K_D$ der spezifischen [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung an Membranen

Die kinetischen Konstanten  $B_{max}$  und  $K_D$  wurden auch an isolierten Membranen ermittelt. Für die Membranpräparation wurden mit dem hNAT-His stabil transfizierte (B.2.2.11) Monolayerzellen (CHO) aus mehreren (5-10) konfluenten 175 ml Zellkulturflaschen verwendet. Diese wurden mechanisch vom Flaschenboden abgelöst und wie unter B.2.3.8 beschrieben präpariert. Die Bindungsversuche (B.2.4.2) erfolgten bei [<sup>3</sup>H]-Nisoxetinkonzentrationen von 1, 3, 10, 20 und 80 nM. Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung wurde NA (250 µM) eingesetzt.

Die  $B_{max}$  lag bei 3,51 ± 0,44 pmol/mg Protein und der K<sub>D</sub> bei 4,9 ± 0,34 nM (Abb. 14).



#### Abb. 14: Bestimmung von B<sub>max</sub> und K<sub>D</sub> der [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung an Membranen

Gezeigt wird die Sättigungskurve der spezifischen, NA-sensitiven (250  $\mu$ M) [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung an Membranen. Diese wurden aus mit dem hNAT-His stabil transfizierten CHO-Zellen gewonnen. Die [<sup>3</sup>H]-Nisoxetinkonzentrationen lagen bei 1, 3, 10, 20, und 80 nM. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E.M. aus n = 5 Experimenten.

### 2.2.2 [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme durch den hNAT-His

### 2.2.2.1 Bestimmung von V<sub>max</sub> und K<sub>m</sub> der [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme

Zur Prüfung, ob das His-Tag und das Express-Epitop einen Einfluss auf den NA-Transport haben, wurde die Aufnahmekinetik von Noradrenalin untersucht.

Durch [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahmeversuche (siehe B.2.4.1) an mit dem hNAT-His stabil transfizierten CHO-Zellen (B.2.2.11) wurde ein K<sub>m</sub>-Wert von 1,16 ± 0,26  $\mu$ M ermittelt, welcher mit den Angaben der Literatur zum hNAT übereinstimmt (Paczkowski et al. 1999, Runkel et al. 2000, Paczkowski et al. 2002). Weiter zeigt die [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme eine V<sub>max</sub> von 20,3 ± 4,0 pmol/mg Protein/min.



#### Abb. 15: Kinetik der spezifischen [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme an stabil transfizierten CHO-Zellen.

Gezeigt ist die Sättigungskurve der Nisoxetin-hemmbaren (10  $\mu$ M) [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme (2 min) durch den hNAT-His bei [<sup>3</sup>H]-NA-Konzentrationen von 10, 100, 250, 750, 2000 und 5000 nM sowie V<sub>max</sub> und K<sub>m</sub>-Werte. Angegeben sind Mittelwerte ± S.E.M. aus n = 5 Experimenten.

# 2.2.2.2 Ermittlung der Turnover-Zahl und der Transporterdichte des hNAT-His in CHO-Zellen

Aus der  $B_{max}$  der [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung des hNAT-His und der  $V_{max}$  der [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme durch den hNAT-His konnte die Anzahl des Transportzyklen pro Minute (Turnover-Zahl) für ein hNAT-His Molekül bestimmt werden. Sie errechnet sich aus dem Verhältnis  $V_{max}/B_{max}$  und lag bei 11,9 min<sup>-1</sup>.

Weiter konnte aus der  $B_{max}$  an intakten Zellen und der Anzahl von Zellen pro Milligramm Protein (4421000 Zellen/mg Protein) die Transporterdichte/Zelle ermittelt werden. Sie betrug 269000 Transporter/Zelle.

### 2.2.3 Untersuchungen am hNAT-His mit dem NAT-Substrat Xylamin

# 2.2.3.1 Konzentrationsabhängige Hemmung der [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung durch Xylamin

Xylamin ist ein Substrat des NAT, das während seines Transportes kovalent an diesen bindet und hierdurch eine irreversible Hemmung des NAT auslöst (Dudley et al. 1990). Xylamin interagiert somit sowohl mit der NA-Aufnahme als auch mit der Bindung von Nisoxetin (Bönisch und Harder 1986). Xylamin wurde bisher noch nicht auf eine Interaktion mit der Bindung von Nisoxetin am hNAT-His geprüft. In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob das His-Tag und das Express-Epitop Einfluss auf die Inhibierung der [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung durch Xylamin haben.

Zunächst sollte die optimale Inkubationszeit von Xylamin ermittelt werden. Hierzu wurden die  $IC_{50}$ -Werte für die Hemmung der [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung (1 nM) durch Xylamin (0,1, 1, 3, 10, 30 und 100  $\mu$ M) bei 3 verschiedenen Vorinkubationszeiten (10, 30 und 90 min) bestimmt.

Nach 10 min betrug die IC<sub>50</sub> von Xylamin 9,4 ± 2,1  $\mu$ M, nach 30 min 8,6 ± 2,8  $\mu$ M und nach 90 min lag sie bei 5,6 ± 1,7  $\mu$ M. Der IC<sub>50</sub>-Wert wurde durch eine Verlängerung der Inkubationszeit von 30 auf 90 min noch reduziert und für nachfolgende Versuche wurde daher eine Vorinkubationszeit von 90 min gewählt. Da die IC<sub>50</sub>-Werte mit den

Literaturangaben übereinstimmen (Dudley et al. 1990), ist anzunehmen, dass das His-Tag und das Express-Epitop keinen Einfluss auf die Xylamin-Bindung haben (Abb. 16).



# Abb. 16: Konzentrationsabhängige Inhibierung der spezifischen [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung durch Xylamin an stabil transfizierten CHO-Zellen bei verschiedenen Inkubationszeiten.

Gezeigt wird die Hemmung der NA-sensitiven (250  $\mu$ M) [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung (1 nM; 40 min) an den NAT-His. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. der Bindung und die aus den mittleren IC<sub>50</sub>-Werten errechneten Inhibitionskurven bei unterschiedlichen Vorinkubationszeiten (10, 30 und 90 min) mit Xylamin (n = 5).

### 2.2.3.2 Konzentrationsabhängige Hemmung der [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme durch Xylamin

Es sollte nun gezeigt werden, dass die Einführung des His-Tags und des Express-Epitops auch die Inhibierung der [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme nicht beeinflusst.

Die Bestimmung der IC<sub>50</sub> von Xylamin für die [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahmehemmung (Xylaminkonzentrationen: 0,1, 1, 3, 10, 30, 100  $\mu$ M) in mit dem hNAT-His stabil transfizierte CHO-Zellen ergab einen Wert von 1,9 ± 0,4  $\mu$ M. Dieser stimmt mit den durch [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung bestimmten Werten (siehe 2.2.3.1) und den Literaturangaben

### Ergebnisse

(Kammerer et al. 1979, Koide et al. 1986, Dudley et al. 1990) überein. Das His-Tag und Express-Epitop haben also keinen Einfluss auf die Xylaminbindung.



# Abb. 17: Konzentrationsabhängige Inhibierung der spezifischen [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme durch Xylamin in stabil transfizierte CHO-Zellen.

Gezeigt wird die Xylamin-induzierte Hemmung der Nisoxetin-sensitiven (10  $\mu$ M) [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme (10 nM; 2 min) durch den hNAT-His. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. der Aufnahme und die aus den mittleren IC<sub>50</sub>-Werten errechneten Inhibitionskurven (n = 5).

# 2.2.3.3 Protektion des hNAT-His durch Noradrenalin und Cocain (an intakten Zellen)

Es ist bekannt, dass sowohl Inhibitoren als auch Substrate des Noradrenalintransporters (im Überschuss von ca. 500x) vor der Inaktivierung des hNAT durch Xylamin schützen können (Koide et al. 1986, Dudley et al. 1990).

Zur näheren Charakterisierung der Xylamin-Bindungsstelle des hNAT-His sollten Protektionsversuche mit einem NAT-Inhibitor und einem NAT-Substrat an stabil transfizierten CHO-Zellen durchgeführt werden. Als Inhibitor wurde Cocain (250  $\mu$ M) und als Substrat NA (1000  $\mu$ M) eingesetzt. Stabil transfizierte CHO-Zellen wurden für

90 min mit Xylamin, Xylamin und Cocain, Xylamin und NA oder mit Natrium-freiem Puffer (NaCl ersetzt durch LiCl) inkubiert. Die Kontrollzellen wurden nur mit KRH-Puffer inkubiert (B.2.4.3). Nach mehrmaligem Waschen (5x 5 min) erfolgte die Bestimmung der Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-NA (10 nM; 2 min).



# Abb. 18: Protektion des hNAT-His vor der Inaktivierung durch Xylamin mit Cocain, NA und Natrium-freien Puffer an intakten Zellen.

Die stabil transfizierten CHO-Zellen wurden 90 min in An- und Abwesenheit der Protektoren Cocain (C, 250  $\mu$ M) und NA (1000  $\mu$ M) mit Xylamin (X, 30  $\mu$ M) bei 37°C inkubiert. Nach intensivem Waschen (5x 5 min) wurde die [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme (10 nM; 2 min) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E.M der [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle aus n = 4 Experimenten. \* P< 0,05

Aus Abb. 18 ist ersichtlich, dass Xylamin die [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme auch nach intensivem Waschen hemmt ( $30,9 \pm 6,7\%$  der Kontrolle). Dieser Hemmeffekt von Xylamin ist Natrium-abhängig und bei Ersatz der Natrium-Ionen durch Lithium-Ionen signifikant vermindert ( $60,0 \pm 6,2\%$  der Kontrolle). Sowohl NA ( $99,8 \pm 22,2\%$  der Kontrolle) als auch Cocain ( $96,4 \pm 16,5\%$  der Kontrolle) schützen vor der Inaktivierung des hNAT-His durch Xylamin.

Zur Demonstration, dass die Xylamin-Bindung an den hNAT-His nicht reversibel ist, wurden nach Beendigung von Protektionsversuchen aus diesen Zellen Membranen isoliert und mit diesen ein [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindungsversuch durchgeführt.

### Ergebnisse

Die stabil transfizierten CHO-Zellen wurden bis zu ihrer Konfluenz in 175 ml Zellkulturflaschen gezüchtet. Sie wurden anschließend für 90 min mit Xylamin (30  $\mu$ M) in An- und Abwesenheit der Protektoren NA (1000  $\mu$ M) oder Cocain (250  $\mu$ M) bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Kontrollzellen wurden nur mit KRH-Puffer inkubiert. Die Zellen wurden nun 5x 5 min mit PBS gewaschen und anschließend homogenisiert, um Membranen zu gewinnen (Membranpräparation nach B.2.3.8). Dabei wurden die Zellen mit Kanülen aufgeschlossen, zentrifugiert, gewaschen und nochmals zentrifugiert. Nach der Proteinbestimmung wurde die [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung (1 nM) an den Membranen bestimmt.



# Abb. 19: [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung an Zellmembranen nach Protektion des hNAT-His vor der Inaktivierung durch Xylamin mit Cocain und NA.

Die stabil transfizierten CHO-Zellen wurden 90 min in An- und Abwesenheit der Protektoren Cocain (C, 250  $\mu$ M) und NA (1000  $\mu$ M) mit Xylamin (X, 30  $\mu$ M) bei 37°C inkubiert. Nach intensivem Waschen (5x 5 min) erfolgte eine Membranpräparation. Anschließend wurde ein [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindungsversuch (1 nM) durchgeführt. Gezeigt werden die Mittelwerte ± S.E.M der [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung von n = 5 Experimenten. \*\*\* p < 0,001

Aus Abb. 19 wird ersichtlich, dass die Exposition intakter Zellen mit Xylamin eine Inhibierung der [ ${}^{3}$ H]-Nisoxetin-Bindung an Membranen dieser Zellen (10,6 ± 4,2% der Kontrolle) bewirkt, d.h., dass auch nach der zeitaufwendigen Membranpäparation die Hemmung bestehen blieb. Dies ist ein Hinweis auf die Irreversibilität der Bindung von

Xylamin an den hNAT-His. Auch hier schützen Cocain (135,7  $\pm$  7,2% der Kontrolle) und NA (113,8  $\pm$  9,8% der Kontrolle) vor der Inhibition der [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung durch Xylamin.

### 2.2.4 Versuche zur Etablierung einer Suspensionskultur

Ein kritischer Faktor bei der Aufreinigung eines heterolog exprimierten Membranproteins ist die Gewinnung einer ausreichenden Menge des aufzureinigenden Proteins. Wichtig hierbei ist die Wahl eines geeigneten Expressionssystems, welches das benötigte Protein in ausreichender Quantität exprimiert (Tate et al. 2003). Als Expressionssystem wurden die mit dem hNAT-pcDNA4-His/Max Vektor stabil transfizierten CHO-Zellen verwendet (siehe 2.1).

Des weiteren ist ein System erforderlich, in dem der das Protein exprimierende Organismus in größerer Menge kultiviert werden kann, um so die Proteinmenge weiter zu steigern. Zu diesem Zweck sollten die CHO-Zellen als Suspensionskultur gezüchtet werden. CHO-Zellen sind Säugetierzellen und eignen sich gut zur Überexpression glykosylierter Proteine. Diese Zellen werden in der Industrie zur Arzneistoffproduktion (z.B. Etanercept, Erythropoetin) eingesetzt und dort in Fermentern gezüchtet. Sie können aber auch im Labormaßstab in Suspension gehalten werden (Rohaizah et al. 2000). Dies sollte hier versucht werden.

Für den Ansatz der Suspensionskultur wurden Zellen aus 2 konfluenten Monolayerzellkulturflaschen in 40 ml Medium resuspendiert (siehe B.2.1.2) und in einer 250 ml Weithalsglasflasche kultiviert. Durch Rühren mit einem konkaven Rührfisch (60 Upm) wurde die Kultur bewegt und so der Gasaustausch in der Kultur ermöglicht. Gleichzeitig wurde das Anwachsen der Zellen an den Flaschenboden und die Flaschenwand verhindert. Die Zelldichte wurde in unterschiedlichen Abständen kontrolliert. Sie lag anfänglich bei 138 x 10<sup>4</sup> Zellen/ml und reduzierte sich innerhalb von 2 Wochen auf 9,3 x  $10^4$  Zellen/ml (siehe Abb. 20). Die Zelldichte konnte auch nach längerer Kultivierung (über 6 Wochen) nicht über eine Zahl von 42 x  $10^4$  Zellen/ml erhöht werden.

Optisch waren die Suspensionszellen größer und runder als gerade abgelöste Monolayerzellen (Abb. 21). Ursache dafür ist vermutlich die ständige Belastung durch das Rühren der Suspensionskultur



### Abb. 20: Zelldichte der Suspensionskultur

Dargestellt ist die Zellzahl der CHO-Suspensionskultur an den Tagen 1, 15, 24, 31 und 40. Angegeben sind die Mittelwerte ± S.E.M. aus 3 Suspensionskulturansätzen. Die Zellzählungen wurden als Triplikate durchgeführt.



### Abb. 21: CHO His/Max Suspensionszellen.

Photographische Darstellung der stabil transfizierten CHO-His/Max-Suspensionszellen in der Vergrößerung 20x. Deutlich zu erkennen ist die Cluster-Bildung der Suspensionszellen.

Weiter wurde getestet, ob die für die Zellen belastende Kultivierung als Suspensionskultur Einfluss auf die Expression des hNAT-His Proteins hatte. Hierzu wurden  $B_{max}$  und  $K_D$  der [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung an über Nacht auf Multiwells angewachsenen Suspensionszellen bestimmt (siehe B.2.4.2). Die eingesetzten [<sup>3</sup>H]-Nisoxetinkonzentrationen betrugen 1, 2, 4, 8 und 16 nM.

Die Werte unterschieden sich mit  $B_{max} = 2,5 \pm 0,4$  pmol/mg Protein und  $K_D = 5,2 \pm 2,0$  nM (siehe Abb. 22) nicht signifikant von den  $B_{max}$  und  $K_D$ -Werten der Monolayerkultur (siehe 2.2.1.2). Die Haltung der Zellen als Monolayerkultur verminderte die Expression des hNAT-His Proteins also nicht.



# Abb. 22: Bestimmung von $B_{max}$ und $K_D$ der [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung an stabil transfizierten Suspensionszellen

Dargestellt ist die Sättigungskurve der spezifischen, NA (250  $\mu$ M) sensitiven [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung (1, 2, 4, 8 und 16 nM) an intakten, den hNAT-His exprimierenden Suspensionszellen. Diese wurden über Nacht auf Polyornithin beschichteten Multiwells angezüchtet. Gezeigt sind Mittelwerte ± S.E.M. aus n = 3 Experimenten.

Da die Suspensionskultur aber in Bezug auf die Zellmenge keinen Vorteil gegenüber der Monolayerkultur zeigte und die Pflege der Suspensionskultur aufwendiger ist, wurden die CHO-Zellen weiter als Monolayerkultur gezüchtet. Die Etablierung einer Suspensionskultur unter den gegebenen Umständen war nicht vorteilhaft.

### 2.3 Biochemische Charakterisierung des hNAT-His Proteins

## 2.3.1 Membranpräparation: Vergleich von Differentialzentrifugation mit Saccharosegradientenzentrifugation

Für die Aufreinigung des hNAT-His standen als Ausgangsmaterial die mit dem hNAT-His stabil transfizierten CHO-Zellen zur Verfügung. Die Zellen wurden als Monolayerkultur gezüchtet. Vor der Solubilisierung sollten aus den Zellen Membranen präpariert werden. Da es für die Proteinaufreinigung wichtig ist eine möglichst große Menge funktionsfähigen Proteins einzusetzen, wurden verschiedene Verfahren zur Membranpräparation getestet.

Als Zell-Aufschlussmethoden wurden Ultraschall (Ultra-Turrax, T25) und mechanische Gewebe-Homogenisierung mit einem Gewebe-Homogenisator (Wheaton Potter) verglichen. Dabei wurden die Zellen nach ihrem Ablösen vom Flaschenboden in hypotonem Puffer inkubiert (15 min) und anschließend entweder mit dem Ultra-Turrax oder dem Gewebehomogenisator (B.2.3.8) aufgeschlossen. Es folgte ein [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindungsversuch (1 nM) an dem Zellhomogenisat.

Weiter sollte versucht werden, mit Hilfe von Zentrifugtionstechniken die Membranen "vorzureinigen". Als Zentrifugationsverfahren wurden die Differential- und Saccharosegradientenzentrifugation (Saccharosekissenzentrifugation) verglichen. Beide Verfahren nutzen die Tatsache, dass Teilchen, bedingt durch ihre Größe und Dichte, unterschiedliche Sedimentationsgeschwindigkeiten aufweisen.

Die Differentialzentrifugation vermag Zellbestandteile durch variierende Zentrifugationszeiten oder Rotationsgeschwindigkeiten aufzutrennen.

Nach dem Aufschluss der Zellen wurden diese für 5 min bei 1000 x g zentrifugiert. Das Pellet P1, bestehend aus Zellbestandteilen höherer Dichte und Größe (z.B. ganze Zellen, Kerne), wurde verworfen. Der Überstand (S1) wurde für 25 min bei 40000 x gzentrifugiert. Der Überstand (S 2), welcher lösliche Proteine und Proteine sehr geringer Dichte und Größe (z.B. endoplasmatisches Reticulum, Ribosomen) enthielt, wurde verworfen. Das entstandene Pellet (P 2) enthielt die Membranen und wurde 1x mit Bindungs-Puffer gewaschen, wieder zentrifugiert (40000 x g) und in einer definierten Menge Bindungspuffer resuspendiert. Nach der Proteinbestimmung (Lowry et al. 1951) folgte eine [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung (1nM) an den Membranen.

Bei unzureichender Trennung, kann über die Dichte des Mediums eine bessere Auftrennung der Teilchen erzielt werden. Für die Erzeugung des Dichtegradienten in Form eines Kissens wurde Saccharose eingesetzt. Die Membransuspension wurde über ein 35% iges Saccharosekissen geschichtet und bei 100000 x g für 60 min bei 4°C zentrifugiert. Die Schicht über der Saccharoselösung wurde vorsichtig abgenommen und mit Bindungspuffer verdünnt. Es folgte eine Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) sowie [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindungsversuche (1nM).



# Abb. 23: Vergleich verschiedener Aufschlussverfahren (Potter, Ultraschall) und Zentrifugationsverfahren (Differentialzentrifugation, Saccharosekissenzentrifugation) für die Membranpräparation.

Dargestellt ist die spezifische NA (250  $\mu$ M)-sensitive [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung (1nM) an mit Ultraschall oder Potter aufgeschlossenen Membranen. Das Zellhomogenat wurde unbehandelt eingesetzt oder zuvor einer Saccharosegradientenzentrifugation oder einer Differentialzentrifugation unterzogen. Angegeben sind die Mittelwerte ± S.E.M. aus n = 3 Versuchen.

Wie in Abb. 23 ersichtlich, ist die spezifische [ ${}^{3}$ H]-Nisoxetin-Bindung bei den mit dem Potter aufgeschlossenen Membranen höher als bei den mit Ultraschall behandelten Zellen. Sie betrug bei ersterem Verfahren bei 13,7 ± 4,8 fmol/mg Protein für das Zellhomogenat, 141,2 ± 3,6 fmol/mg Protein nach der Zentrifugation auf einem Saccharosekissen und 194,0 ± 19,6 fmol/mg Protein nach der Differentialzentrifugation. Nach Ultraschallbehandlung zeigten die Membranen eine spezifische [ ${}^{3}$ H]-Nisoxetin-Bindung von 20,6 ± 1,2 fmol/mg Protein im Zellhomogenat, 14,9 ± 0,6 fmol/mg Protein nach der Saccharosezentrifugation und 96,8 ± 5,5 fmol/mg Protein nach der Differentialzentrifugation.

Als Aufschlussverfahren bei der Membranpräparation ist also die Gewebe-Homogenisierung mittels Potter vorteilhafter als der Aufschluss der Zellen mit Ultraschall. Grund dafür ist möglicherweise eine Denaturierung der empfindlichen Membranproteine durch die Wärmeentwicklung bei der Ultraschallbehandlung.

Zur "Vorreinigung" der Zellen erwies sich die Differentialzentrifugation als geeigneter als das Saccharosekissen. Die Membranen zu Proteinaufreinigungszwecken wurden deshalb mit dem Potter aufgeschlossen und einer Differentialzentrifugation unterzogen.

### 2.3.2 Solubilisierung des hNAT-His

Der Noradrenalintransporter ist ein integrales Membranprotein, welches mit 12 Transmembrandomänen in der Phospolipiddoppelschicht verankert ist. Zu Aufreinigungszwecken muss der Transporter zunächst solubilisiert werden. Dazu sind Detergentien nötig, die das Protein möglichst quantitativ aus der Membran lösen, ohne die Proteinfunktion zu zerstören. Die Detergentien lagern sich dabei mit ihrem hydrophoben Bereich an den hydrophoben Bereich des Proteins und es entstehen Protein-Phospolipid-Detergenskomplexe.

Ein Detergens, welches sich gut zur Solubilisierung des NAT eignet, ist das nichtionische Detergens Digitonin (Schömig und Bönisch 1986, Bönisch et al. 1990, Michael-Hepp et al. 1992). Allerdings weist Digitonin zahlreiche Nachteile auf wie z.B. sein hohes Molekulargewicht, eine niedrige kritische mizellare Konzentration (CMC), ungenügende Reinheit und eine hohe Toxizität (Davis 1983).
Da sich das nicht-ionische Detergens Dodecylmaltosid bei der Solubilisierung des SERT bewährt hat und die CMC größer ist (C. G. Tate, persönliche Mitteilung), sollte es in den folgenden Versuchen auch zur Solubilisierung des hNAT-His eingesetzt werden. Als Ausgangsmaterial für die Solubilisierung dienten Zellmembranen aus transfizierten CHO-Zellen, die den hNAT-His stabil exprimieren (B.2.3.8). Diese wurden zur Solubilisierung mit Dodecylmaltosid (1%) 1 h bei 4°C geschüttelt (800 Upm) und anschließend durch Zentrifugation bei 4°C (1 h, 180000 x g, TI 50 Rotor) von den nicht solubilisierten Membranbestandteilen abgetrennt (B.2.3.11). Der nach dieser Zentrifugation gewonnene Überstand erfüllte nach Hjelmeland und Chrambach (1984) die Kriterien eines Solubilisiertem hNAT-His konnten nun Verfahren zur Proteinaufreinigung geprüft werden (C.2.3.4).

# 2.3.3 Austestung verschiedener Antikörper zum Nachweis des hNAT-His im Western-Blot

Um den hNAT-His im Western-Blot nachweisen zu können, wurden zunächst verschiedene spezifische NAT-Antikörper getestet. Dazu wurden COS7-Zellen mit der hNAT-His-cDNA oder zu Kontrollzwecken mit dem leeren Vektor transient transfiziert. Die Zellen wurden in SDS-PAGE-Probenpuffer (2x) solubilisiert und nach Verdünnung wurden die Zellproteine mittels SDS-PAGE (B.2.3.4) aufgetrennt. Anschließend wurde das hNAT-His Protein mit Hilfe der in Tab. 3 aufgeführten Antikörper (AK) im Western-Blot (B.2.3.6) nachgewiesen.

Bezeichnung	gewonnen aus	gegen	Verdünnung	Herkunft
AK 214	Kaninchen	As 211-226		
AK 215				Furgentec
AK 216		As 371-384		(Charge
AK 218		As 590-607	1:500	(enarge 1993)
AK 219				10007
AK 301		As 6-28		
AK 1		As 195-208		Eurogentec
AK 2		As 211-226		(Charge
				2000)
Anti-Express	Maus	Express-Epitop	1:1000	Invitrogen
AK				

### Tab. 3: Antikörper zum Nachweis des hNAT oder des Express-Epitops.

Dargestellt sind die getesteten Antikörper (AK), deren Bezeichnung, Herkunft, eingesetzte Verdünnung sowie der Organismus aus dem sie gewonnen wurden. Weiter ist der Bereich der AS-Sequenz des hNAT angegeben gegen die sich die AK richten.

Wie in Abb. 24 ersichtlich, eigneten sich nur 4 AK zur Detektion des hNAT-His im Western-Blot. Von den NAT-AK war der AK 301 am geeignetsten. Zu erkennen waren hiermit zwei Banden (Abb. 24 a). Die erste Bande bei 191 kDa stellt vermutlich ein Aggregat des hNAT dar. Bei der 83 kDa Bande handelt es sich um das auch in der Literatur beschriebene monomere, hochglykosylierte hNAT-Protein (Melikian et al. 1994, Melikian et al. 1996).

Mit den Antikörpern AK 214 und 215 konnte der hNAT-His ebenfalls im Western-Blot nachgewiesen werden (Abb. 24 b). Der AK 215 zeigte ebenfalls die Banden bei 191 kDa (aggregiertes Protein) und bei 83 kDa (monomerer, hochglykosylierter hNAT). Der AK 214 detektierte die Bande bei 83 kDa und eine zusätzliche Bande bei 59 kDa (teilglykosyliertes, unreifes hNAT-Protein). Der Anti-Express AK eignete sich auch zum Nachweis des hNATs mit His-Tag und Express-Epitop (Abb. 24 c). Er zeigte Banden bei 191 kDa (aggregiertes Protein) und 83 kDa (monomerer, hochglykosylierter hNAT-His). Dieser AK wurde bei den nachfolgenden Versuchen eingesetzt.

a)



b)



101



#### Abb. 24: Test der NAT Antikörper im Western-Blot.

Dargestellt sind Western-Blots nach Auftrennung des Gesamt-Zelllysates von COS7-Zellen, die mit der cDNA des hNAT-His oder leerem Vektor (K) transient transfiziert wurden. Für die Spur wurden die lysierten Zellen einer Vertiefung eines 6er Multiwells mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Primäre AK waren die in Tab. 3 beschriebenen AK:

a) AK 216, 218, 219 und 302 (1:500)

b) AK 1, 2, 214 und 215 (1:500)

c) Anti-Express AK (1:500 und 1:800).

Als sekundärer AK wurde für a) und b) ein "goat-anti-rabbit" HRP gekoppeltes IgG eingesetzt (1:5000); bei c) war der sekundäre AK ein "goat-anti-mouse" gekoppeltes IgG (1:5000). Die Detektion erfolgte durch Messung der Chemilumineszens nach Substratzugabe (Lumi Light) am Lumi-Imager.

## 2.3.4 Aufreinigung des hNAT-His-Proteins mittels immobilisierter Metallchelat-Affinitätschromatographie (IMAC) und Nachweis mittels SDS-PAGE und Western-Blot

Die Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen und reversiblen Adsorption eines Moleküls (Adsorbent) an einen individuellen, matrixgebundenen Bindungspartner. Bei der IMAC ist eine Metall-chelatierende Gruppe, hier Nitrilotriessigsäure, am Säulenmaterial immobilisiert. Ein multivalentes Übergangsmetallion wird so gebunden, dass eine oder mehrere Koordinationsbindungen für eine Interaktion mit den basischen Gruppen von Proteinen zur Verfügung stehen. Vor allem Histidinreste binden spezifisch an die freien Koordinationsstellen, sodass Poly-His-getagte Proteine gut binden. Die gebundenen Moleküle werden mittels Gradientenelution von dem Säulenmaterial getrennt. Als eluierendes Agens kann Imidazol oder Puffer mit niedrigem pH eingesetzt werden. Die IMAC kann unter nativen und denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden. Hier sollten beide Verfahren getestet werden. Die Proteinaufreinigung erfolgte im Batch-Verfahren, da so weniger Protein und teures Säulenmaterial benötigt wurde.

#### 2.3.4.1 Aufreinigung mit magnetischen Agarose-Beads

Bei den magnetischen Agarose Beads ist die Ni<sup>2+</sup>-chelatierende Nitrilotriessigsäure kovalent an Kügelchen aus Agarose gebunden. Diese enthalten magnetische Partikel und können so mit einer Magnetvorrichtung am Rand eines Eppendorfgefäßes zurückgehalten werden. Dies ermöglicht die Abnahme von Überstand, Waschpuffer oder Eluat ohne Zentrifugationsschritte.

Nach der Solubilisierung des hNAT-His Proteins mit 1% Dodecylmaltosid in Equilibrierungspuffer A (pH 8,0) wurde das Solubilisat auf die magnetischen Agarose-Beads gegeben. Die Suspension wurde für 30 min bei 4°C geschüttelt. Es folgten 8 Waschschritte bei pH 6,3 und die Elution des Proteins bei pH 4,5 (B.2.3.12.1).

Von den einzelnen Fraktionen wurde nun der Proteingehalt bestimmt und in allen Fraktionen ein identischer Gehalt eingestellt (zur Konzentrierung der Fraktionen wurden die Proteine mittels Acetonfällung oder Trichloressigsäurefällung gefällt und in einer definierten Menge PBS aufgenommen). Die Proben wurden nun mit SDS-PAGE Probenpuffer (1:1) versetzt und auf zwei SDS-PAGE Gele aufgetragen. Nach erfolgter SDS-PAGE wurde ein Gel mit Coomassie Lösung gefärbt und das andere für einen Western-Blot mit anschließender AK-Reaktion verwendet (B.2.3.6).

Die Coomassie-Färbung (Abb. 25 a) und insbesondere der Western-Blot (Abb. 25 b) zeigten die in der Literatur beschriebene hNAT-Bande bei 83 kDa und eine weitere bei 191 kDa (Melikian et al. 1996, Hahn et al. 2003). Bei der 83 kDa Bande handelt es sich um den monomeren, hochglykosylierten hNAT, während die 191 kDa Bande eine aggregierte Form des Proteins darstellt. Im Eluat war die Intensität der 83 kDa Bande erhöht und die Anzahl anderer Proteinbanden erniedrigt. Im Überstand und der Waschfraktion waren die hNAT-Banden stark abgeschwächt.

Die Ermittlung der optischen Dichte (Abb. 26) ergab eine Aufreinigung des monomeren hNAT-His Proteins (83 kDa) um den Faktor 4,7. Durch diese Methode konnte also eine partielle Aufreinigung des hNAT-His erzielt werden.

a)

b)

### Abb. 25: Aufreinigung des hNAT-His mit magnetischen Ni<sup>2+</sup> NTA Agarose Beads.

Dargestellt sind a) die Coomassie Färbung und b) der Western Blot der einzelnen Fraktionen (Solubilisat, Überstand, Waschfraktion und Eluat) nach 10% SDS-PAGE. Auf der rechten Seite sind die Molekulargewichte der hNAT-His Proteinbanden angezeigt. Für die Detektion der hNAT-His Banden nach dem Western-Blot wurde der Anti-Express AK (primär) und der "goat-anti-mouse" HRP-gekoppelter AK (sekundär) sowie das LumiLight Substrat eingesetzt. Die Chemilumineszenz wurde am Lumi-Imager gemessen.



# Abb. 26 Ermittlung der Intensität der hNAT-His Banden nach Aufreinigung des Proteins mit Ni<sup>2+</sup> NTA Agarose-Beads.

Gezeigt wird die optische Dichte der hNAT-His Proteinbanden des Solubilisates (Solu), des Überstandes (Ü), der Waschfraktion (W1) und des Eluates nach SDS-PAGE (in den einzelnen Fraktionen wurde ein identischer Proteingehalt eingestellt und ca 5 µg/Gelspur aufgetragen.) und Western-Blot. Die optische Dichte wurde mit dem Lumi Analyst Programm ermittelt und in % des Solubilisates umgerechnet.

## 2.3.4.2 Säulenchromatographische Aufreinigung

#### a) denaturierende Bedingungen

Der solubilisierte hNAT-His (1% Dodecylmaltosid in Equilibrierungspuffer B2) wurde bei pH 8,0 an das His-Select<sup>™</sup> Nickel-Affinitätsgel gebunden. Nach 8 Waschschritten (Waschpuffer B2) bei pH 6,3 folgte die Elution des Proteins bei pH 4,5 (Elutionspuffer B2). Der Proteingehalt aller Fraktionen wurde mit dem BioRad-Assay (B.2.3.2) ermittelt und alle Fraktionen wurden auf einen identischen Gehalt (ca. 5 µg/Gelspur) eingestellt. Zur Konzentrierung des Proteins wurden eine TCA oder Acetonfällung durchgeführt. Es folgte die elektrophoretische Analyse der Fraktionen mittels SDS-PAGE und Western-Blot (siehe B.2.3.4 und B.2.3.6).



# Abb. 27: Aufreinigung des hNAT-His mit dem His-Select<sup>™</sup> Nickel Affinitätsgel unter denaturierenden Bedingungen.

Dargestellt ist der Western Blot der einzelnen Fraktionen (Solubilisat, Überstand, Waschfraktionen 1, 2, und 3 und Eluat) nach 10% SDS-PAGE. Auf der rechten Seite sind die Molekulargewichte der hNAT-His Proteinbanden angezeigt. Für die Detektion der hNAT-His Banden nach dem Western-Blot wurde der Anti-Express AK (primär) und der "goat-anti-mouse" HRP-gekoppelte AK (sekundär) sowie das LumiLight Substrat eingesetzt. Die Chemilumineszenz wurde am Lumi-Imager gemessen.

Mit dem Western-Blot konnten der monomere hNAT-His (83 kDa) sowie die aggregierte Form des Proteins (191 kDa) nachgewiesen werden (Abb. 27). Eine weitere Bande war bei 112 kDa erkennbar, welche vermutlich eine dimere Form des Transporters darstellt.

Die Bestimmung der optischen Dichte (Abb. 28) der Banden zeigte eine Aufreinigung des monomeren hNAT-His (83 kDa) um den Faktor 13,3, der dimeren Form des Transporters (112 kDa) um den Faktor 42,3 und der aggregierten Form um den Faktor 86,5. Insgesamt, einschließlich der aggregierten Form des hNAT-His, konnte der Transporter um den Faktor 47 aufgereinigt werden.

Das His-Select<sup>™</sup> Nickel Affinitätsgel ist also zur partiellen Aufreinigung des hNAT-His geeignet.



# Abb. 28: Ermittlung der Intensität der hNAT-His Banden nach Aufreinigung des Proteins mit dem His-Select<sup>™</sup> Nickel Affinitätsgel (denaturierend).

Gezeigt wird die optische Dichte der hNAT-His Proteinbanden des Solubilisates (Solu), des Überstandes (Ü), der Waschfraktionen (W1,2,3) und des Eluates nach SDS-PAGE (in den einzelnen Fraktionen wurde ein identischer Proteingehalt eingestellt und ca 5  $\mu$ g/Gelspur aufgetragen.) und Western-Blot. Die optische Dichte wurde mit dem Lumi Analyst Programm ermittelt und in % des Solubilisates umgerechnet.

## b) native Bedingungen

Bei der Aufreinigung His-getagter Proteine unter nativen Bedingungen macht man sich die Eigenschaft des Imidazols zunutze, diese aufgrund struktureller Ähnlichkeit von dem Säulenmaterial zu verdrängen,

Der hNAT-His wurde mit 1% Dodecylmaltosid in Equilibrierungspuffer B1 solubilisiert und auf das His-Select<sup>™</sup> Nickel Affinitätsgel aufgetragen. Der Equilibrierungspuffer B1 enthielt 5 mM Imidazol, um unspezifische Bindungen zu vermindern. Gewaschen wurde mit Waschpuffer W1, welcher 10 mM Imidazol enthielt. Zur Elution wurde eine Imidazolkonzentration von 250 mM (Elutionspuffer B1) eingesetzt.



# Abb. 29: Aufreinigung des hNAT-His mit dem His-Select<sup>™</sup> Nickel Affinitätsgel unter nativen Bedingungen.

Dargestellt ist der Western Blot der einzelnen Fraktionen (Solubilisat, Überstand, Waschfraktionen 1, 2, 3 und 4 und Eluat) nach 10% SDS-PAGE. Auf der rechten Seite sind die Molekulargewichte der hNAT-His Proteinbanden angezeigt. Für die Detektion der hNAT-His Banden nach dem Western-Blot wurde der Anti-Express AK (primär) und der "goat-anti-mouse" HRP-gekoppelte AK (sekundär) sowie das LumiLight Substrat eingesetzt. Die Chemilumineszenz wurde am Lumi-Imager gemessen

Die elektrophoretische Analyse der Fraktionen mittel SDS-PAGE und Western-Blot zeigte die Banden des monomeren hNAT-His (83 kDa), des dimeren hNAT-His (112 kDa) und der aggregierten Form des Proteins (191 kDa) (Abb. 29).

Die Bestimmung der optischen Dichte konnte eine Aufreinigung des monomeren hNAT-His um den Faktor 28,4, der dimeren Form um den Faktor 33,3 und des aggregierten hNAT-His um den Faktor 281 ermittelt werden (Abb. 30). Insgesamt (monomere, dimere und aggregierte Form) wurde der hNAT-His 114x aufgereinigt. Mit dem His-Select<sup>™</sup> Nickel Affinitätsgel ist die partielle Aufreinigung des hNAT-His unter nativen Bedingungen ebenfalls möglich.



# Abb. 30: Ermittlung der Intensität der hNAT-His Banden nach Aufreinigung des Proteins mit dem His-Select<sup>™</sup> Nickel Affinitätsgel (nativ).

Gezeigt wird die optische Dichte der hNAT-His Proteinbanden des Solubilisates (Solu), des Überstandes (Ü), der Waschfraktion (W1,2,3,4) und des Eluates nach SDS-PAGE (in den einzelnen Fraktionen wurde ein identischer Proteingehalt eingestellt und ca 5  $\mu$ g/Gelspur aufgetragen.) und Western-Blot. Die optische Dichte wurde mit dem Lumi Analyst Programm ermittelt und in % des Solubilisates umgerechnet.

## **D.** Diskussion

## 1. Klonierung und pharmakologische Charakterisierung des Noradrenalintransporters der Maus (mNAT)

Der in der Plasmamembran noradrenerger Neurone lokalisierte Noradrenalintransporter (NAT) ist im ZNS und in der Peripherie verantwortlich für die rasche neuronale Aufnahme und somit Eliminierung von Noradrenalin (NA) aus dem synaptischen Spalt (Eisenhofer 2001).

Da der NAT essentiell für die NA-Homeostase ist, führen Dysregulationen des Transporters zu komplexen Störungen wie Depression (Borowski et al. 1995), Aufmerksamkeitsdefizit-Syndrom (Pliszka et al. 1994) oder dem post-traumatischen Stress-Syndrom (Yataham et al. 1996). Weiter ist der Transporter primäres Target von Psychostimulantien wie Amphetamin und Cocain sowie wichtiger Antidepressiva wie z.B. des trizyklischen Antidepressivums Desipramin oder des selektiven NAT-Inhibitors Reboxetin.

Zur Entwicklung neuer Arzneistoffe, die mit dem Transporter interagieren, wäre die Kenntnis der an der Ligandbindung beteiligten AS im Hinblick auf eine verbesserte Wirksamkeit und das Nebenwirkungsprofil von besonderer Bedeutung.

Der NAT bildet mit dem Dopamintransporter (DAT) und dem Serotonintransporter (SERT) innerhalb der Familie der Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-abhängigen Neurotransmitter-Transporter die Subfamilie der Monoamintransporter, welche viele strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten aufweisen. Daher ist zur Identifizierung für die Ligandbindung essentieller AS eine Untersuchung hochkonservativer und nicht-konservativer AS zwischen den Transportern naheliegend.

Bei Substanzen, die selektiv an nur einen Transporter binden (z.B. Desipramin an den NAT), ist die Untersuchung von AS von Bedeutung, die sich innerhalb der Transporterfamilie unterscheiden (Roubert et al. 2000). Für Substrate, welche Affinitäten zu mehreren Monoamintransportern zeigen (z.B. Dopamin), sind AS, die in der Familie hochkonserviert sind von großem Interesse (Danek-Burgess und Justice 1999).

Aber auch innerhalb einer Subfamilie kann es Spezies-Unterschiede geben. Eine Studie über den SERT ergab eine höhere Potenz der trizyklischen Antidepressiva (TCA) und eine geringere Potenz von Amphetamin für den SERT der Ratte im Vergleich zum menschlichen SERT (Barker et al. 1994). Bei dem DAT wurde eine abnehmende Affinität für MPP<sup>+</sup> sowie für Cocainanaloga in der Reihenfolge Mensch > Ratte > Rind berichtet (Lee et al. 1996).

Paczkowski et al. verglichen 1999 die pharmakologischen Eigenschaften des humanen NAT (hNAT) (Pacholczyk et al. 1991) mit dem bovinen NAT (bNAT) (Lingen et al. 1994) und dem Ratten NAT (rNAT) (Brüss et al. 1997). hNAT und bNAT sind zu 93% identisch, hNAT und rNAT zu 93% und bNAT und rNAT zu 91%. Hier wurden Unterschiede der Affinitäten für Natrium-Ionen (Ratte > Rind), Substrate (NA, Adrenalin, MPP<sup>+</sup>) (Mensch > Ratte) und Cocain (Mensch > Rind) festgestellt. Dies zeigt, dass auch geringe Unterschiede der Aminosäuresequenz der einzelnen Spezies zu signifikanten Änderungen der Transporterfunktion führen können.

1998 wurde von Fritz et al. auch der NAT der Maus kloniert. Dieser als mNET bezeichnete Transporter wurde bislang aber noch nicht näher pharmakologisch charakterisiert. Da jede weitere Information über Eigenschaften des NAT hilfreich bei der Aufklärung potentieller Ligand-Bindungsstellen ist, ist auch die weitere Charakterisierung dieser Transporter sinnvoll.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Transporter von uns kloniert und als mNAT bezeichnet. Die zur cDNA-Synthese verwendete "Gesamt-RNA" wurde aus muriner Plazenta gewonnen, einem Ort hoher NAT-Expression (Ramamoorthy et al. 1993). Der anfängliche Einsatz von Gehirn-RNA war nicht erfolgreich, da der Transporter hier vermutlich in zu geringer Menge exprimiert wird. Dies ist auch in anderen Studien geschildert worden (Fritz et al. 1998).

Bei einem Vergleich der Nukleotidsequenz mit der von Fritz et al. (1998) veröffentlichten konnten 3 AS-Austausche festgestellt werden. Zwei der AS-Austausche betrafen den C-Terminus an den AS-Positionen 609 (Leu609Phe) und 610 (Pro610Gln). Die Tatsache, dass sowohl Phenylalanin (609) als auch Glutamin (610) in den Aminosäuresequenzen des hNAT, rNAT und bNAT konserviert sind, legt die Vermutung nahe, dass Phe und Glu die korrekten Aminosäuren an diesen Positionen sind. Der dritte Austausch war in Position 505 (Ile505Val) lokalisiert. Da dieser Austausch bei wiederholten Klonierungen und Sequenzierungen detektiert wurde, ist es wahrscheinlich, dass es sich um eine natürlich vorkommende Variante handelt. Ein Vergleich mit den AS-Sequenzen der anderen NAT-Spezies zeigt, dass Isoleucin an dieser Stelle konserviert ist und es sich hiermit wahrscheinlich um die richtige Aminosäure in dieser Position handelt. Der

mNAT-Wild-Typ (mNAT-WT) enthält also die Aminosäuren Isoleucin in Position 505, Phenylalanin in Position 609 und Glutamin in Position 610. Die von uns gefundene mNAT-Variante unterscheidet sich vom mNAT-WT nur durch den Austausch von Isoleucin in Position 505 gegen Valin. Sie wurde als mNAT-I505V bezeichnet.

Wie mehrfach in der Literatur beschrieben (Kitayama et al. 1992, Danek-Burgess und Justice 1999, Roubert et al. 2000, Runkel et al. 2000, Hahn et al. 2003), kann der Austausch einer einzelnen AS bereits die Substratbindung oder die Funktion eines Transporters beeinträchtigen. Dies und die Tatsache, dass der gefundene AS-Austausch an einer bei den anderen Spezies hochkonservierten Stelle liegt, befürworteten die Untersuchung der Konsequenz des AS-Austausches für die pharmakologischen Eigenschaften des Transporters. Daher sollten in den folgenden Versuchen die Eigenschaften des mNAT-WT und der Variante mNAT-I505V näher bestimmt werden.

Die durch K<sub>m</sub> und V<sub>max</sub> gekennzeichnete Sättigungskinetik der Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-NA zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den mNAT-WT und der Variante mNAT-VI505V. Auch die Affinität (K<sub>D</sub>) zu dem selektiven NAT-Inhibitor Nisoxetin und die B<sub>max</sub> der [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung der beiden Varianten unterschieden sich nicht signifikant. Die Mutation hat also weder Einfluss auf die Affinität zu dem Substrat NA und Inhibitor Nisoxetin noch auf die Funktion des Transporters oder die mittels der B<sub>max</sub> von Nisoxetin bestimmte Membranexpression.

Die Ermittlung der Hemmeffekte der NAT-Substrate DA, Adrenalin und MPP<sup>+</sup> zeigte keinen signifikanten Unterschied in ihren pK<sub>i</sub>-Werten in der Hemmung des NA-Tranportes zwischen dem mNAT-WT und der Variante mNAT-I505V. Auch die pK<sub>i</sub>-Werte der Inhibitoren Desipramin und Imipramin unterschieden sich nicht signifikant. Der Austausch Isoleucin gegen Valin bei der Variante mNAT-I505V hat also keinen Einfluss auf die Affinität zu den oben genannten Substraten und Inhibitoren. Diese AS ist vermutlich weder an der Bindung der trizyklischen Antidepressiva noch der Substrate beteiligt und führt auch zu keiner Konformationsänderung mit funktionellen Folgen.

Die Untersuchung des Hemmeffektes von Cocain auf die mNAT-Varianten zeigte jedoch einen zwar geringen aber signifikanten (p < 0,01) Unterschied der pK<sub>i</sub>-Werte zwischen dem mNAT-WT (pK<sub>i</sub> = 6,128 ± 0,092) und der mNAT-I505V Variante (pK<sub>i</sub> = 6,548 ± 0.026). Dies weist auf eine höhere Affinität des letzteren zu dem Inhibitor hin. Eine weniger hydrophobe AS (Valin) an der Position 505 scheint die Bindung dieses Liganden zu erhöhen.

Die Tatsache, dass dieser AS-Austausch die Bindungseigenschaften von Cocain, aber nicht die von typischen NAT-Substraten beeinflusst, unterstreicht die Theorie, dass für die Cocain-Bindung zum Teil Determinanten wichtig sind, die unabhängig von der Substratbindung sind (Giros et al. 1994).

Die Feststellung, dass der AS-Austausch (Ile505Val) die Affinität zu Cocain, aber nicht die zu den trizyklischen Antidepressiva ändert, korreliert mit den Ergebnissen von Mutagenesestudien (Roubert et al. 2000) und Studien an NAT-Chimären (Giros et al. 1994, Buck und Amara 1995), die zeigten, dass sich die Bindungsstellen von Cocain teilweise von denen der TCA unterscheiden.

Weiter konnte gezeigt werden, dass die [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme beider Varianten Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-abhängig ist und durch 10 µM Nisoxetin praktisch vollständig gehemmt wird. Die sehr geringe Nisoxetin-resistente Komponente kann durch unspezifische Bindung von NA und zu einem geringen Teil durch Diffusion von NA in die Zellen zustande kommen.

Der mNAT-WT und die Variante mNAT-I505V zeigten also die typischen Eigenschaften eines NAT. Da aber erhebliche Unterschiede zwischen den Varianten fehlen kann angenommen werden, dass der IIe505Val Austausch keine wesentlichen Konsequenzen für die pharmakologischen Eigenschaften des mNAT hat. Es handelt sich vermutlich um einen natürlich vorkommenden Polymorphismus des mNAT, der durch Austausch einer einzigen Base zustande kommt.

Ein Vergleich der vorliegenden Ergebnisse des mNAT-WT mit den pharmakologischen Daten des Rinder-, Mensch- und Ratten-NAT (Paczkowski et al. 1999) (siehe Anhang Tab. 4) zeigt, dass der pK<sub>m</sub>-Wert des mNAT-WT für die [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme signifikant (p < 0,001) niedriger war als die pK<sub>m</sub>-Werte der anderen Spezies (hNAT, bNAT und rNAT). Dies deutet auf eine geringere Affinität des mNAT-WT zu dem Substrat NA hin.

Die pK<sub>i</sub>-Werte von Adrenalin wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen dem mNAT-WT und dem rNAT auf, waren aber bei dem bNAT und hNAT signifikant (p < 0,001) höher. Adrenalin hat somit eine höhere Affinität zu den letzteren.

Bei MPP<sup>+</sup> waren die pK<sub>i</sub>-Werte des hNAT (p < 0,001), bNAT (p < 0,001) und rNAT (p < 0,05) im Vergleich zu dem mNAT signifikant höher und zeigten also eine größere Affinität zu dem Substrat. Die pK<sub>i</sub>-Werte von Dopamin ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Spezies. Bei Cocain war der pK<sub>i</sub>-Wert des mNAT-WT signifikant niedriger als der des hNAT und bNAT (p < 0,001), zeigte aber keinen Unterschied im Vergleich zum rNAT. rNAT und mNAT-WT haben also eine geringere Affinität zu dem Inhibitor Cocain. Der pK<sub>i</sub> für Imipramin lag bei dem hNAT, bNAT und

rNAT signifikant niedriger als bei dem mNAT-WT (p < 0,001), was auf eine höhere Affinität des trizyklischen Antidepressivums zu dem letzteren hindeutet. Desipramin zeigte keine signifikanten Unterschiede in den pK<sub>I</sub>-Werten der verschiedenen Spezies. Der Vergleich zwischen den Spezies zeigt die enge Verwandtschaft des Maus- und Ratten-NAT, da die pharmakologischen Daten der Nagetiere weniger Unterschiede aufweisen. Die geringen aber signifikanten Änderungen im pharmakologischen Verhalten der Transporter der einzelnen Spezies unterstreicht, dass auch kleinste Variationen der Aminosäuresequenz die Ligandbindung und die Funktion der Carrier beeinflussen können. Allerdings muss hinzugefügt werden, dass die Experimente an den anderen Speziesvarianten des NAT nicht parallel durchgeführt wurden und dass Paczkowski et al. (1999) andere Zellen (COS 7) verwendeten, was zu den Variationen der pharmakologischen Eigenschaften beigetragen haben könnte. Das Fehlen von gravierenden Unterschieden zwischen den Transportern zeigt jedoch, dass der mNAT-WT die typischen Eigenschaften eines NAT aufweist und die in anderen Studien gewonnene Daten auf die Eigenschaften des mNAT-WT extrapoliert werden können.

## 2. Der humane Noradrenalintransporter mit Poly-His-Tag und Express-Epitop (hNAT-His)

Die Monoamintransporter NAT, DAT und SERT zeigen viele gemeinsame strukturelle Charakteristika: 12 TMD, eine große extrazelluläre Schleife zwischen TMD 3 und TMD 4 mit *N*-Glykosylierungsstellen und intrazellulär lokalisierte N- und C- Termini (Uhl und Hartig 1992, Giros und Caron 1993).

Neben den strukturellen zeigen sie auch funktionelle Gemeinsamkeiten. Der DAT und der NAT transportieren DA mit höherer Affinität als NA und werden durch Psychostimulantien wie Cocain und Amphetamin gehemmt (Gu et al. 1994, Buck und Amara 1995). NAT und SERT sind beide Angriffspunkt der trizyklischen Antidepressiva Amitryptilin und Imipramin (Richelson und Pfemming 1984, Barker und Blakely 1996). Allerdings gibt es auch pharmakologische Unterschiede. So hemmen Desipramin und Nisoxetin selektiv den NAT, GBR12909 den DAT, während der SERT selektiv durch Fluoxetin und andere SSRI (Selektive Serotonin Re-uptake Inhibitoren) inhibiert wird (Anderson et al. 1989, Giros et al 1994, Tatsumi et al. 1997). Als primäres Target wichtiger Antidepressiva und von Psychostimulantien ist der NAT von besonderem medizinischen Interesse. Die Klärung der Struktur-Wirk-Beziehung für Inhibitoren und Substrate könnte zur Entwicklung wirksamerer und nebenwirkungsärmerer Arzneistoffe mit Angriffspunkt an dem hNAT beitragen. Daher ist die Ermittlung der für die Bindung der Inhibitoren und Substrate wichtigen Domänen bzw. Aminosäuren von großer pharmakologischer Relevanz.

Eine bislang häufig genutzte Möglichkeit zur Identifizierung der für die Substrat- und Inhibitorbindung verantwortlichen AS ist die gerichtete Mutagenese. Dabei wurden hauptsächlich AS mit funktionellen Gruppen, die in Mechanismen wie Ladungstransfer (Lys, Arg, Glu und Asp), Amin-Fixierung (Ser), *N*-Glykosylierung (Asn) oder Tertiär-Struktur-Stabilisierung (Pro und Cys) involviert sind, untersucht (Kitayama et al. 1992, Lin et al. 1996, Melikian et al. 1996, Chen et al. 1997, Bönsich et al. 1999).

Durch Studien an Chimären zwischen dem DAT und NAT (Giros et al. 1994) und dem SERT und NAT (Stephan et al. 1997) konnten Funktionen von ganzen Domänen näher charakterisiert werden. So sind z.B. die N-terminale Region mit TMD 1–5 des NAT für den Aufnahmemechanismus und die Ionenabhängigkeit, die TMD 5-8 für die Cocainund TCA-Bindung und die TMD 9-12 und der C-Terminus für die Stereoselektivität und Affinität der Substrate von großer Bedeutung (Giros et al. 1993, Buck und Amara 1994). Ein weiterer Ansatz zur Identifizierung der an der Substrat- und Inhibitorbindung

beteiligten AS ist die kovalente Markierung des Transporters mit anschließender Identifizierung der markierten AS des gereinigten NAT-Proteins. Hierzu eignen sich Thiol-modifizierende Agentien wie N-Ethylmaleimid (NEM) (Schömig et al. 1988a) und vor allem die noradrenergen Neurotoxine Xylamin und DSP-4 (Dudley et al. 1990).

Die weiteren Ziele der vorliegenden Arbeit waren daher die Charakterisierung der Interaktion von Xylamin mit dem hNAT, die Expression (in CHO-Zellen) und pharmakologische Charakterisierung eines hNAT mit N-terminalen Tags ("Anhängen"), die sich zur Proteinaufreinigung und/oder Protein-Identifizierung (mittels Antikörper) eignen sowie die Entwicklung von Methoden für eine Aufreinigung des hNAT-Proteins.

### 2.1 Funktionelle Expression des hNAT-His

Von großer Bedeutung bei der Aufreinigung von Membranproteinen ist ein geeignetes heterologes Expressionssystem, welches das zu untersuchende Protein in hoher Menge exprimiert. Weitere Vorraussetzung ist eine hohe Oberflächenexpression und die unbeeinträchtigte Funktion des Proteins. Das Membranprotein muss daher korrekt gefaltet und mit den wesentlichen posttranslationalen Modifikationen versehen werden (Tate et al. 2003).

Bei dem NAT ist die *N*-Glykosylierung für die richtige Faltung und die Stabilität in der Membran von großer Wichtigkeit, wenngleich sie für den NA-Transport an sich nicht zwingend notwendig ist (Melikian et al. 1996, Nguyen und Amara 1996).

Die *N*-Glykane der Glykoproteine von Säugetierzellen werden durch Glykosyltransferasen nach einem einheitlichen biochemischen Schema aufgebaut. Bei dem NAT werden die Zuckerbäume nach dem "high-Mannose" Prinzip verknüpft, welches neben den Säugetierzellen nur bei Insektenzellen zu finden ist. Daher war der Einsatz von Säugetierzellen naheliegend und es wurden CHO-Zellen als Expressionssystem verwendet.

Zu Proteinaufreinigungszwecken wurde der hNAT mit einem Poly-Histidin-Tag versehen, welches den Einsatz der Affinitätschromatographie ermöglicht. Außerdem wurde ein Epitop (Express-Epitop) eingefügt, um den spezifischen Nachweis im Western-Blot zu gewährleisten. Die Einfügung des His-Tags und des Epitops war aber nur am N-Terminus möglich, da Modifikationen am C-Terminus den Reifungsprozess des Proteins sowie seine Oberflächenexpression vermindern (Burton et al. 1998, Torres et al. 2001, Baumann und Blakely 2002). Hierzu wurde in unserem Labor (PD Dr. M. Brüss) die cDNA des hNAT über Bam HI und Xho I Schnittstellen in die "multiple cloning site" des Vektors pcDNA4/HisMax (Invitrogen) einkloniert und das Genprodukt hNAT-His genannt.

### 2.2 Pharmakologische Charakterisierung des hNAT-His

Zur Ermittlung der Auswirkungen des His-Tags und des Express-Epitops am N-Terminus auf die Funktion des Transporters und dessen Oberflächenexpression wurde der modifizierte hNAT-His pharmakologisch charakterisiert.

Zuerst wurden Bindungsversuche mit dem selektiven NAT-Inhibitor [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin an intakten Zellen durchgeführt. Nachdem die Zeit bis zur Einstellung eines Equilibriums der Bindung (40 min) ermittelt worden war, wurde die maximale Bindung (B<sub>max</sub>) und der K<sub>D</sub> von [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin bestimmt. Apparsundaram et al. (1998a) hatten bereits gezeigt, dass die [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung an intakten Zellen mit den durch Biotinylierung gewonnenen Ergebnissen übereinstimmen. Daher ist die B<sub>max</sub> ein direktes Maß für die Expression des Transporters in der Plasmamembran.

Der hNAT-His zeigte eine dem hNAT-Wild-Typ (WT) entsprechende Oberflächenexpression ( $B_{max} = 1,72 \pm 0,25$  pmol/mg Protein) und auch die Affinität des Transporters zu dem Inhibitor Nisoxetin ( $K_D = 9,4 \pm 2,3$  nM) entspricht den Literaturangaben des hNAT-WT (Apparsundaram et al. 1998a, Danek-Burgess and Justice 1999, Paczkowski et al. 2002, Paczkowski und Bryan-Lluka 2004).

Um auszuschließen, dass das zur Bestimmung der spezifischen Bindung eingesetzte NA durch Transport oder Diffusion in die Zellen gelangt und dort an intrazelluläre Transporterproteine bindet, wurden auch Versuche bei 2°C durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche wiesen jedoch keinen signifikanten Unterschied zu den oben genannten bei RT erhobenen Ergebnissen auf. Die kinetischen Konstanten B<sub>max</sub> und K<sub>D</sub> wurden zusätzlich auch an isolierten Zellmembranen ermittelt. Die B<sub>max</sub> lag hier mit 3,51 ± 0,44 pmol/mg Protein um den Faktor 2 höher als an intakten Zellen und der K<sub>D</sub> war mit 4,9 ± 0,34 nM vergleichbar mit dem an intakten Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Modifikationen am N-Terminus keinen Einfluss auf die Nisoxetin-Bindung an den hNAT-His haben und dass der Transporter in ausreichender Menge in die Plasmamembran integriert wird. Mit einer Transporterdichte von 269000 Transportern/Zelle (bei 4421000 Zellen/mg Protein) erreichte unser Expressionssystem die Menge des Standard-Baculovirus-Expressionssystems, das häufig für die Proteinexpression aufzureinigender Proteine verwendet wird (Tate et al. 2003).

Weiter wurde untersucht, ob das His-Tag und das Express-Epitop am N-Terminus des hNAT-His Einfluss auf die Aufnahmekinetik von Noradrenalin hatten.

In [ ${}^{3}$ H]-NA-Aufnahmeversuchen wurde ein K<sub>m</sub>-Wert für NA von 1,16 ± 0,26 µM ermittelt, welcher sich nicht von dem des hNAT Wild-Typ unterscheidet (Paczkowski et al. 1999, Runkel et al. 2000, Paczkowski et al. 2002).

Allerdings war der V<sub>max</sub>-Wert mit 20,3  $\pm$  4,0 pmol/mg Protein/min niedriger als die in der Literatur für den hNAT-WT veröffentlichten Werte (Paczkowski et al. 2002).

Auch die sogenannte Turnover-Zahl, d.h. die Anzahl von Transportzyklen in der Minute, die sich aus dem Verhältnis der V<sub>max</sub> der NA-Aufnahme zur B<sub>max</sub> der Nisoxetin-Bindung errechnet, lag mit 11,9 min<sup>-1</sup> deutlich unter den in der Literatur mit 80-120 min<sup>-1</sup> angegebenen Werten (Bönisch und Harder 1986, Paczkowski und Bryan-Lluka 2004).

Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass der Translokationsprozess des hNAT-His im Vergleich zum hNAT Wild-Typ verlangsamt ist und somit die Funktion des Transporters durch das His-Tag und Express-Epitop beeinträchtigt wird. Vermutlich führen das His-Tag und/oder das Express-Epitop zu strukturellen Veränderungen des Transporters, welche die Konformationsänderungen, die zur Substrattranslokation nötig sind, verlangsamen.

Möglicherweise werden auch Regulationsprozesse des Transporters durch die Einführung des Epitops gestört. Das präsynaptische SNARE-Protein (soluble Nethymalimide-sensitive factor attachment protein receptor) Syntaxin 1A bindet z.B. an den N-terminalen Bereich des NAT und fördert so die Oberflächenexpression des Transporters bei gleichzeitiger Verminderung der Funktion. PKC-Aktivatoren hemmen diese Interaktion und führen zu einer Herunterregulierung der NAT-Aktivität in einer Syntaxin-abhängigen Weise (Sung et al. 2003).

Auch für den C-Terminus sind Interaktionen mit Proteininteraktion-vermittelnden Proteinen bekannt. Torres et al. (2001) konnten eine Co-Lokalisation der Monoamintransporter mit dem PDZ-Domänen-beinhaltenden Protein PICK 1 nachweisen. Der Verlust der PDZ-Bindungsstelle am C-Terminus der Transporter führt zu Störungen im Membran-Targeting und somit zu einer Abnahme der Transporterdichte in der Plasmamembran.

### 2.3 Kovalente Markierung des hNAT-His

Die Neurotoxine Xylamin und DSP-4 sowie die  $\alpha$ -Adrenozeptorantagonisten Dibenamin und Phenoxybenzamin gehören zu der Gruppe der ß-Haloalkylamine (Jaim-Etcheverry und Zieher 1983, Ross 1987). Phenoxybenzamin und Dibenamin interagieren hauptsächlich mit postsynaptische  $\alpha$ -Rezeptoren. Phenoxybenzamin hemmt aber auch die nicht-neuronalen Monoamintransporter hOCT<sub>1</sub>, hOCT<sub>2</sub> und OCT<sub>3</sub> (Hayer-Zillgen et al. 2002). Xylamin und DSP-4 interagieren mit dem Noradrenalintransporter (Kammerer et al. 1979, Cho et al. 1980, Fischer und Cho 1982).

Xylamin zyklisiert in wässriger Lösung rasch zu seiner Wirkform, dem Aziridinium-Ion, welches vom NAT als Substrat erkannt wird und diesen irreversibel hemmt (Ransom et al. 1981). Die Akkumulation von Xylamin ist Na<sup>+</sup>-und Cl<sup>-</sup>-abhängig und durch Desipramin sowie Cocain hemmbar (Fischer et al. 1983).

Da das reaktive Aziridium-Ion vor allem mit Thiolen (SH-Gruppen) kovalente Bindungen eingeht (Dudley et al. 1990), sind die Cysteinreste des hNAT für die Inhibierung durch Xylamin von besonderer Bedeutung. Der hNAT besitzt 10 Cysteinreste an den Positionen 44, 86, 131, 185, 176, 240, 339, 351, 460 und 520, die bei der Bindung von Bedeutung sein könnten. Die Tatsache, dass alle Cysteinreste des hNAT bei den Spezieshomologen konserviert sind (Abb. 5), unterstreicht diese Annahme.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der hNAT-His durch Xylamin gehemmt wird. Die [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung an den hNAT-His wurde durch Xylamin mit einer  $IC_{50}$  von  $5,6 \pm 1,7$  µM inhibiert, und auch die [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme war durch Xylamin hemmbar ( $IC_{50} = 1,9 \pm 0,4$  µM). Die Werte entsprechen den von Koide et al. (1986) und Bönisch und Harder (1986) für den rNAT der PC12 Zellen gewonnenen Daten. Die Modifikationen am N-Term des hNAT-His haben also keinen Einfluss auf die Xylamin-Bindung an den Transporter. Das alkylierende Agens kann zur kovalenten Markierung des hNAT-His eingesetzt werden. Sowohl der Inhibitor Cocain als auch das Substrat NA konnten vor der Hemmung der [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindung an den hNAT-His durch Xylamin schützen. Auch die Hemmung der [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme durch Xylamin wurde durch Anwesenheit von Cocain und NA verhindert.

Die Tatsache, dass diese Liganden als Protektoren vor der Inaktivierung des h-NAT-His durch Xylamin fungieren, legt die Vermutung nahe, dass ihre Bindungsstellen zumindest teilweise mit denen von Xylamin übereinstimmen. Dies wiederum unterstreicht die Bedeutung von Cysteinresten bei der Inhibitor- und Substratbindung und der Funktion des Transporters.

Allerdings kann nicht ganz ausgeschlossen werden, dass die Protektion des hNAT-His durch NA und Cocain vor der Inaktivierung durch Xylamin dadurch zustande kommt, dass die Bindung von NA bzw. Cocain zu einer Konformationsänderung des Transporters führt und Xylamin daher nicht mehr an bestimmte Cysteinreste binden kann.

Weiter zeigten die Protektionsversuche, dass der Hemmeffekt von Xylamin, wie auch die Bindung des Substrates NA und des Inhibitors Cocain, Natrium-abhängig ist. Diese weitere Gemeinsamkeit kann als ein zusätzlicher Hinweis angesehen werden, dass die Liganden zumindest teilweise identische Bindungsstellen aufweisen.

Die Fähigkeit des hNAT-His [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin zu binden oder [<sup>3</sup>H]-NA zu binden und zu transportieren konnte nach einer Exposition der Zellen mit Xylamin auch durch intensives Waschen nicht wieder hergestellt werden.

Dies und die Tatsache, dass die Xylamin-Bindung auch nach einer zeitaufwendigen Isolierung der Zellmembranen Xylamin-exponierter Zellen bestehen blieb, steht im Einklang mit der Vorstellung, dass Xylamin kovalente Bindungen mit dem NAT eingeht (Dudley et al. 1990). Diese Annahme wird durch Literaturbefunde, die eine direkte Markierung des rNAT durch [<sup>3</sup>H]-Xylamin (Dudley et al. 1990, Howard et al. 1990) und dem sich wie Xylamin verhaltenden Derivat [<sup>3</sup>H]-Desmethyl-Xylamin (Michael-Hepp und Bönisch 1990, Bönisch et al. 1990) ermöglichen, bestätigt. Die in Sondersynthesen hergestellten, tritiierten Verbindungen markierten ein Protein mit einem Molekulargewicht von 50-55 kDa. Das Molekulargewicht dieses Proteins ist jedoch geringer als erwartet, was darauf hindeutet, dass dieses Protein möglicherweise ein Abbauprodukt des NAT darstellt.

### 2.4 Partielle Aufreinigung des hNAT-His

Für die Proteinaufreinigung ist es wichtig eine möglichst große Menge funktionsfähigen Proteins einzusetzen. Da man Membranproteine bereits durch Zentrifugationsverfahren gut "vorreinigen" kann, wurden verschiedene Verfahren zur Membranpräparation getestet. Dabei wurden die Differentialzentrifugation und die Zentrifugation auf einem Saccharosekissen verglichen.

Das physikalische Prinzip der Zentrifugation ist eine Trennung nach Dichte und Größe. Diese beiden Faktoren beeinflussen die Geschwindigkeit mit der ein Teilchen bei der Zentrifugation sedimentiert. Unterschiedliche Sedimentationsgeschwindigkeiten sind die Vorraussetzung bei der Differentialzentrifugation. Sie vermag Zellbestandteile durch unterschiedliche Zentrifugationszeiten oder Rotationsgeschwindigkeiten aufzutrennen. Unterscheiden sich die Sedimentationsgeschwindigkeiten von Partikeln für eine Differentialzentrifugation nicht ausreichend, kann über die Dichte des Mediums ein selektierender Einfluss eingebracht werden. Dies kann die Konzentration des gewünschten Teilchens noch erhöhen. Für die Erzeugung des Dichtegradienten in Form eines Stufengradienten wird meist Saccharose eingesetzt, da sie preiswert und inert gegenüber biologischen Materialien ist.

Die weniger aufwendige Differentialzentrifugation zeigte eine höhere "Vorreinigung" (Faktor 14) des hNAT-His als die Zentrifugation mit dem Saccharosekissen (Faktor 5) und wurde für die weiteren Präparationen eingesetzt.

Für den Zell-Aufschluss wurde eine Homogenisierung mittels Potter gewählt, da sich diese Methode gegenüber einem Aufschluss durch Ultraschall als vorteilhafter erwies. Grund dafür ist möglicherweise eine Denaturierung der empfindlichen Membranproteine durch die Wärmeentwicklung bei der Ultraschallbehandlung.

Membranproteine müssen vor ihrer Aufreinigung aus der Zellmembran extrahiert werden. Zu diesem als Solubilisierung bezeichneten Vorgang müssen Detergentien eingesetzt werden. Dabei werden vor allem nicht-ionische und zwitterionische Detergentien verwendet, da diese recht mild sind und die Proteinfunktion nicht beeinträchtigen (Kühlbrandt et al. 1988, Thomas und McNamee 1990).

Bisher wurde zur Solubilisierung des NAT das nicht-ionische Detergens Digitonin eingesetzt (Schömig und Bönisch 1986, Bönisch et al. 1990, Michael-Hepp et al. 1992). Leider zeigt Digitonin aber viele Nachteile, wie ein hohes Molekulargewicht, eine niedrige kritische mizellare Konzentration (CMC) sowie ungenügende Reinheit und eine hohe Toxizität (Hjemeland und Chrambach 1984).

Das Detergens Dodecylmaltosid, welches ebenfalls zu den nicht-ionischen Detergentien gehört, eignet sich sehr gut zur Solubilisierung von Membranproteinen. Da es sich bei der Solubilisierung des SERT bewährt hat (C. G. Tate, persönliche Mitteilung) und zusätzlich eine hohe CMC aufweist, wurde es in den vorliegenden Versuchen zur Solubilisierung des hNAT-His eingesetzt.

Das Prinzip der Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen, reversiblen Adsorption eines Proteins (Adsorbent) an einen über einen Abstandhalter (Spacer) an eine Matrix (Agarose, Polyacrylamid) gekoppelten Bindungspartner. Spezifische Wechselwirkungen werden nun genutzt, um den Adsorbenten aus einem komplexen Gemisch heraus zu adsorbieren. Typische Bindungspartner sind z.B. Antigene und Antikörper, Glykoproteine und Lectine oder Rezeptoren und Liganden (Gerard et al. 1990, Cuatrecasas 1970).

Eine besondere Art der Affinitätschromatographie ist die immobilisierte Metallchelat-Affinitätschromatographie (IMAC). Bei dieser ist eine Metall-chelatierende Substanz, meist Nitrilotriessigsäure (NTA), kovalent an eine Matrix gebunden. Von dieser wird ein Metallion (Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>) so komplexiert, dass noch Koordinationsplätze für Bindungen mit basischen Proteinen zur Verfügung stehen. An diese binden spezifisch Histidin-Reste, sodass Poly-His-getagte Proteine gebunden werden. Eluiert wird mit sinkendem pH oder Verdrängung durch Imidazol. Die Metallchelat-Affinitätschromatographie wurde bereits erfolgreich zur Aufreinigung von Proteinen eingesetzt (Fucentese et al. 1997, Sievert et al. 1998).

Zur Aufreinigung des hNAT-His wurden zunächst magnetische Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose Beads eingesetzt. Es wurde unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von 8 M Harnstoff gearbeitet und mit sinkendem pH (pH 4,5) eluiert. Die Analyse der Fraktionen mittels SDS PAGE und Western-Blot zeigte 2 Proteinbanden (191 und 83 kDa). Bei der 191 kDa Bande handelt es sich um ein Aggregat des Proteins. Die auch in der Literatur beschriebene 83 kDa Bande stellt den monomeren, hochglykosylierten hNAT-His dar (Melikian et al. 1996, Hahn et al. 2003). Die Intensität der 83 kDa Bande nahm bei gleichzeitiger Abnahme anderer Proteinbanden im Eluat zu. Durch Analyse der optischen Dichte der einzelnen Fraktionen wurde eine Aufreinigung des monomeren, hochglykosylierten hNAT-His um den Faktor 4,7 festgestellt. Die magnetischen Agarose Beads sind zur Aufreinigung des hNAT-His unter den gegebenen Bedingungen nicht optimal.

Die Methode wurde daher weiter optimiert (4 M Harnstoff, 4°C) und anderes Säulenmaterial (His-Select<sup>™</sup>) eingesetzt, welches es auch erlaubt in größerem Maßstab zu arbeiten. Zunächst wurde weiter im Batch-Verfahren unter denaturierenden Bedingungen gearbeitet. Mittels Western-Blot konnten im Eluat wieder der monomere, hochglykosylierte hNAT-His (83 kDa) sowie die aggregierte Form des Proteins (191 kDa) nachgewiesen werden. Eine weitere Protein-Bande war bei 112 kDa erkennbar, welche in der Literatur als voll ausgereifter hNAT-His beschrieben wird (Bauman und Blakely 2002). Vermutlich handelt es sich hierbei um eine dimere Form des Transporters. Der hNAT hat im Bereich der 2 TMD ein putatives Leucin-Zipper-Motiv, das für die Dimerisierung von Proteinen verantwortlich ist (Vrana et al. 1994). Es ist also wahrscheinlich, dass es sich bei der 112 kDa Bande um ein Dimer des hochglykosylierten hNAT-His (83 kDa) handelt, welches während der SDS-PAGE nicht voll entfaltet wird. Die Bestimmung der optischen Dichte der Banden zeigte eine Aufreinigung des monomeren hNAT-His um den Faktor 13,3. Die dimere Form des Transporters konnte 42fach aufgereinigt werden. Insgesamt konnte eine Aufreinigung des hNAT-His-Proteins, einschließlich der aggregierten Form, um den Faktor 47 erzielt werden.

Die Metallchelat-Affinitätschromatographie wurde auch unter nativen Bedingungen getestet. Hierbei macht man sich die Eigenschaft des Imidazols zunutze, die Hisgetagten Proteine aufgrund struktureller Ähnlichkeit von dem Säulenmaterial zu verdrängen. Nach elektrophoretischer Analyse der bei der Aufreinigung erhaltenen Fraktionen mittels SDS-PAGE und Western-Blot konnten die Banden des monomeren hNAT-His (83 kDa), des dimeren hNAT-His (112 kDa) und der aggregierten Form des Proteins (191 kDa) detektiert werden. Es konnte eine Aufreinigung des monomeren hNAT-His um den Faktor 28,4 und der dimeren Form um den Faktor 33,3 erzielt werden. Das hNAT-His-Protein konnte insgesamt (monomere, dimere und aggregierte Form) um den Faktor 114 aufgereinigt werden. Mit dem His-Select<sup>™</sup> Nickel Affinitätsgel ist also die partielle Aufreinigung des hNAT-His unter nativen Bedingungen möglich.

## E. Zusammenfassung

Der Noradrenalintransporter (NAT) in der Plasmamembran noradrenerger Neurone ist verantwortlich für die rasche Inaktivierung von Noradrenalin (NA) aus dem synaptischen Spalt und damit für die Aufrechterhaltung der NA-Homöostase. Der NAT gehört zur Familie der Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-abhängigen Neurotransmittertransporter und hier, zusammen mit dem Serotonintransporter (SERT) und dem Dopamintransporter (DAT), zur Subfamilie der Monoamintransporter.

Der Transporter ist Angriffspunkt klinisch bedeutender Antidepressiva (z.B. Desipramin, Nortriptylin, Maprotilin) und das NAT-Gen ist ein Kandidatengen für Depression. Für die Entwicklung selektiverer und nebenwirkungsärmerer Antidepressiva ist die Kenntnis der Ligand-Bindungsstelle(n) des humanen NAT (hNAT) von Bedeutung. Die vorliegende Arbeit stellt einen Beitrag dar, diesem Ziel etwas näher zu kommen.

Eine gesicherte Kenntnis hochkonservierter Aminosäure (AS)-Sequenzbereiche von NATs verschiedener Spezies liefert starke Hinweise auf wichtige gemeinsame Funktionsbereiche, wie z.B. die Ligand-Bindungsstellen. Nur bei einer Spezies abweichende AS in konservierten Bereichen können gefundene Speziesunterschiede erklären. Ein erstes Ziel der Arbeit war daher, eine weitere Speziesvariante des NAT, den NAT der Maus (mNAT) zu klonieren, in HEK293-Zellen funktionell zu exprimieren und pharmakologisch zu charakterisieren.

Der mNAT weist mit dem NAT des Rindes (bNAT), des Menschen (hNAT) und der Ratte (rNAT) eine 91 bis 94%ige AS-Identität auf. Bei der Klonierung des mNAT wurde eine offensichtlich natürlich vorkommende Variante, mNAT-I505V, in welcher aufgrund eines Basenaustauschs Isoleucin in Position 505 gegen Valin ausgetauscht war, gefunden. Diese Variante und der durch Mutagenese hergestellte mNAT-Wild-Typ (mNAT-WT) wurden pharmakologisch auf Eigenschaften des Transports von [<sup>3</sup>H]-NA und der Bindung des selektiven NAT-Inhibitor [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin untersucht.

Die kinetischen Konstanten des Transports von [<sup>3</sup>H]-NA (K<sub>m</sub> und V<sub>max</sub>) und der Bindung von [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin (K<sub>D</sub> und B<sub>max</sub>) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Varianten, d.h. der AS-Austausch hatte keinen Einfluss auf die Affinität (K<sub>m</sub>, K<sub>D</sub>) dieser Liganden (NA und Nisoxetin) und die maximale Transportrate bzw. Membranexpression (V<sub>max</sub>, B<sub>max</sub>). Auch in Bezug auf die Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> -Abhängigkeit unterschieden sich die zwei Varianten nicht. Bezüglich der Affinitäten (gemessen als pK<sub>i</sub>-Werte) der Substrate Dopamin, Adrenalin und MPP<sup>+</sup> und der Inhibitoren Desipramin und Imipramin zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Nur Cocain wies in diesem Vergleich eine höhere Affinität zum mNAT-I505V auf.

Beim Vergleich der am mNAT-WT erhobenen Befunde mit publizierten Daten für den hNAT, bNAT und rNAT zeigten sich, bis auf Desipramin und Dopamin, einige kleine, aber signifikante Unterschiede: 1) Der mNAT-WT besitzt eine geringere Affinität zu NA als die NATs der anderen Spezies; 2) rNAT und mNAT zeigen im Vergleich zu hNAT und bNAT eine geringere Affinität für Adrenalin und Cocain; 3) der mNAT-WT hatte eine höhere Affinität zu dem Antidepressivum Imipramin als die anderen Transporter; 4) das Neurotoxin und NAT-Substrat MPP<sup>+</sup> hat zum mNAT-WT eine geringere Affinität als zu den anderen NATs.

Der Speziesvergleich zeigt also die enge Verwandtschaft des Maus- und Ratten-NAT. Die geringen aber signifikanten Änderung im pharmakologischen Verhalten der Transporter der einzelnen Spezies unterstreicht, dass auch kleinste Variationen der Aminosäuresequenz die Ligandbindung und die Funktion der Transporter beeinflussen können. Das Fehlen von gravierenden Unterschieden zwischen den Transportern zeigt jedoch, dass der mNAT-WT die typischen Eigenschaften eines NAT aufweist.

Das noradrenerge Neurotoxin Xylamin ist ein "Suizidsubstrat" des NAT, denn es bindet während des Transports kovalent an den NAT; daher eignet sich Xylamin zur Markierung von AS der Ligandbindungsstelle des NAT. Diese AS lassen sich identifizieren, wenn es gelingt das NAT-Protein aufzureinigen. Ein weiteres Ziel war daher die Charakterisierung der Interaktion dieses ß-Haloalkylamins mit dem NAT und die Entwicklung von Methoden zur Isolierung des NAT.

Für diese Untersuchungen wurde jedoch nicht der "normale" hNAT (Wildtyp-hNAT) eingesetzt sondern ein hNAT, der sich durch die Einführung von Polyhistidinresten mittels Metallchelat-Affinitätschromatographie leichter aufreinigen und mittels Antikörpern gegen ein zusätzliches Epitop leichter nachweisen lässt (z.B. im Western-Blot).

Dieser hNAT-His mit einem "Polyhistidin-Anhang" ("His-Tag") und einem "Express-Epitop" am intrazellulären N-Terminus wurde zunächst auf eventuelle Änderungen seiner Funktion und Pharmakologie überprüft. Mit Hilfe der B<sub>max</sub> der [<sup>3</sup>H]-NisoxetinBindung konnte gezeigt werden, dass dieser Transporter in ausreichender Menge in der Zellmembran transfizierter CHO-Zellen exprimiert wird, wobei er sich in seiner Affinität zu [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin nicht vom Wildtyp-hNAT unterscheidet. Auch die Affinität zu seinem Substrat [<sup>3</sup>H]-NA wurde nicht beeinflusst. Allerdings war die V<sub>max</sub> des NA-Transports und die aus V<sub>max</sub> und B<sub>max</sub> errechnete Turnover-Zahl (Anzahl von Transportzyklen/min) des hNAT-His im Vergleich zum Wildtyp-hNAT deutlich verringert. Dies weist auf einer verminderte Transportleistung des hNAT-His durch die Einführung der Reste im N-Terminus hin.

Sowohl der NA-Transport als auch die Nisoxetin-Bindung wurden durch Xylamin zeitund konzentrationsabhängig gehemmt. Der Hemmeffekt blieb auch nach Isolierung der Zellmembranen bestehen, d.h. er war im [<sup>3</sup>H]-Nisoxetin-Bindungstest an Zellmembranen noch voll erhalten. Die gleichzeitige Anwesenheit des Inhibitors Cocain oder des Substrats NA (bei der Exposition der Zellen mit Xylamin) verhinderte diese kovalente Interaktion von Xylamin, was beweist, dass Xylamin an die Ligandbindungsstelle(n) des NAT bindet.

Schließlich wurden noch Methoden zur Aufreinigung des hNAT-His entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass eine partielle Aufreinigung des hNAT-His mit Hilfe der Metallchelat-Affinitätschromatographie möglich ist. Mittels SDS-PAGE und Western-Blots konnte nachgewiesen werden, dass mit dieser Affinitätschromatographie das hNAT-Protein unter denaturierenden Bedingungen um den Faktor 47 und unter nativen Bedingungen um den Faktor 114 aufgereinigt wird.

## F. Anhang

 Vergleich der pK<sub>i</sub>-Werte von NAT-Substraten und NAT-Inhibitoren f
ür die Hemmung der [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme des mNAT-WT mit den pK<sub>i</sub>-Werten des rNAT, hNAT und bNAT.

	pK <sub>i</sub> -Wert ± S.E.M. (K <sub>i</sub> -Wert in Klammern)			
	mNAT-WT	rNAT	hNAT	bNAT
Substrate				
Noradrenalin *	5,494 ± 0,051	$5,869 \pm 0,039$	6,112 ± 0,039	$6,009 \pm 0,048$
	(3200 nM)	(1354 nM)	(772 nM)	(979 nM)
Dopamin	$6,346 \pm 0,026$	$6,406 \pm 0,065$	$6,492 \pm 0,061$	6,401 ± 0,055
	(460 nM)	(392 nM)	(323 nM)	(397 nM)
	$5,977 \pm 0,029$	$6,109 \pm 0,030$	$6,295 \pm 0,030$	$6,244 \pm 0,032$
	(1110 nM)	(778 nM)	(507 nM)	(570 nM)
Adropolio	$5,007 \pm 0,076$	$5,187 \pm 0,04$	$5,435 \pm 0,034$	5,301 ± 0,033
Adrenalin	(10,5 µM)	(6,50 µM)	(3,68 µM)	(5,00 μM)
Inhibitoren				
Desipramin	$8,244 \pm 0,054$	8,133 ± 0,091	$8,069 \pm 0,046$	$8,052 \pm 0,023$
	(5,88 nM)	(7,36 nM)	(8,54 nM)	(8,88 nM)
Iminromin	$7,514 \pm 0,068$	$7,085 \pm 0,080$	$6,929 \pm 0,047$	$7,029 \pm 0,063$
imipramin	(32,1 nM)	(82,2 nM)	(118 nM)	(93,6 nM)
Cocain	$6,128 \pm 0,092$	$6,400 \pm 0,037$	$6,664 \pm 0,087$	$6,702 \pm 0,049$
	(745 nM)	(398 nM)	(217 nM)	(197 nM)

# Tab. 4: Vergleich der pK<sub>i</sub>-Werte von NAT-Substraten und -Inhibitoren für die Hemmung der [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme des mNAT-WT mit denen rNAT, hNAT und bNAT.

Gezeigt werden die von uns für dem Maus-NAT (mNAT) und die von Paczkowski et al. (1999) für den Rinder- (bNAT), Mensch- (hNAT) und Ratten-NAT (rNAT) gezeigten pK<sub>i</sub>-Werte ± S.E.M. aus n = 3-5 Experimenten (K<sub>i</sub>-Werte in Klammern). Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden durch Prozent der Inhibition der spezifischen [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme (2 min; 10 nM) berechnet und unter Annahme einer kompetitiven Inhibition in K<sub>i</sub>-Werte (Cheng und Prussof, 1973) umgerechnet. Die Daten wurden mittels gepaartem post hoc t-Test analysiert. \* für NA sind die pK<sub>m</sub>/K<sub>m</sub>-Werte angegeben

## 2. Abkürzungen

А	Adenin oder Ampère
ASCT	Transporter für neutrale AS
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
b	bovin
BES	N,N-Bis[2-hydroxy-ethyl]-2-aminoethansulfonsäure
BGH	bovine growth hormone
B <sub>max</sub>	maximale Bindung
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin
С	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
СНО	Ovarzellen des Chinesischen Hamsters
CK II	Caseinkinase II
CMV	Cytomegalie
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
COS-Zellen	Nierenzelline der grünen Meerkatze
DA	Dopamin
Da	Dalton
DAT	Dopamin-Transporter
(d)dNTP	(Di)Desoxynukleotide ((d)dGTP, (d)dATP, (d)dTTP und (d)dCTP)
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulpeccos Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat (dGTP, dATP, dTTP oder dCTP)
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
dpm	Zerfälle pro Minute

## Anhang

DTT	Dithiothreitol
EAAT	Exzitatorischer Aminosäure-Tranporter
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetat, Na-Sa
EtOH	Ethanol
f	femto (10 <sup>-15</sup> )
FKS	fetales Kälberserum
G	Guanin
a	Gramm oder Erdbeschleunigung
G418	Geniticin
GABA	γ-Aminobuttersäure
GAT	GABA-Transporter
G-Protein	GuanyInukleotid-bindendes Protein
h	Stunde oder human
HFK-Zellen	Human-Embryonic-Kidney-Zellen
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-ethansulfonsäure
His-Tag	Histidin(6x)-Tag
HRP	horse radish peroxidase
IPTG	Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid
k	kilo (10³)
kb	Kilobasenpaar
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
K <sub>m</sub>	Michaelis-Konstante
KRH	Krebs-Ringer-HEPES
1	Liter
lacZ	Gen für die ß-Galactosidase
LB	Luria-Bertani
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
m	milli $(10^{-3})$ oder murin
Μ	molar (mol/l)
MAO	Monoaminoxidase
MCS	Multiple Cloning Site
MEM	Minimum Essential Medium Eagle

MIBG	Meta-Iodobenzylguanidin
min	Minute
mRNA	messenger-RNA
MPP⁺	1-Methyl-4-Phenylpyridiniumiodid
n	nano (10 <sup>-9</sup> )
NA	Noradrenalin
NaAc	Natriumacetat
NAT	Noradrenalin-Transporter
NGF	Nerve Growth Factor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NT	Neurotransmitter
NTT	Neurotransmitter-Transporter
OCT	organischer Kationentransporter
ori	Origin of Replication-Initiation (Replikationsstartpunkt)
_	
	pico (10)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saine
PC12-Zellen	Phaochromozytomzeilinie der Ratte
PCR	
Pen	
PKC	Proteinkinase C
r	Ratten-
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SERT	Serotonin-Transporter
SKN-Zellen	humane Neuroblastomzellinie
SMEM	Spinner Minimal Essential Medium Eagle
SSC	standart saline citrat
ssDNA	einzelsträngige DANN
Strep	Streptomycin

Т	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBST	Tris buffered saline Tween20
TCA	tricyclische Antidepressiva, Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin
TH	Tyrosinhydroxylase
TMD	Transmembrandomäne
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	2-Amino-2-(Hydrxymethyl)-1,3-propandiol
U	unit
U0521	3,4-Dihydroxy-2-Methylpropiophenon
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VMAT	vesikulärer Monoamin-Transporter
V <sub>max</sub>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
Vol	Volumen
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-galactopyranosid
XIA	X-gal, IPTG, Ampicillin
ZNS	Zentralnervensystem

#### G. Literaturverzeichnis

- Andersen PH (1989) The dopamine uptake inhibitor GBR12909: selectivity and molecular mechanism of action. Eur J Pharmacol 166:493-504
- Apparsundaram S, Schroeter S, Giovanetti E, Blakely RD (1998a) Acute regulation of norepinephrine transport: II. PKC-modulated surface expression of human norepinephrine transporter proteins. J Pharmacol Exp Ther 287:744-751
- Apparsundaram S, Galli A, DeFelice LJ, Hartzell HC, Blakely RD (1998b) Acute regulation of norepinephrine transport: I. protein kinase C- linked muscarinic receptors influence transport capacity and transporter density in SK-N-SH cells. J Pharmacol Exp Ther 287:733-743

Axelrod J (1971) Noradrenalin: Fate and control of its biosynthesis. Science 173:598-606

- Axelrod J, Whitby LG, Hertting G (1961) Effect of psychotropic drugs on the uptake of <sup>3</sup>H-Norepinephrine by tissues. Science 133:383-384
- Backstrom IT, Ross SB, Marcusson JO (1989) [<sup>3</sup>H]Desipramine binding to rat brain tissue: binding to both noradrenergic uptake sites and sites not related to noradrenergic neurons. J Neurochem 52:1099-1106
- Barker El, Blakely RD (1996) Identification of a single amino acid, phenylalanine 586, that is responsible for high affinity interactions of tricyclic antidepressants with the human serotonin transporter. Mol Pharmacol 50:957-965
- Barker EL, Kimmel HL, Blakely RD (1994) Chimeric human and rat serotonin transporters reveal domains involved in recognition of transporter ligands. Mol Pharmacol 46:799-807
- Baumann A, Blakely RD (2002) Determinants within the C-terminus of the human norepinephrine transporter dictate transporter trafficking, stability, and activity. Arch Biochem Biophys 404:80-91
- Bellocchio EE, Reimer RJ, Fremeau RT Jr, Edwards RH (2000) Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. Science 289:957-960
- Blakely RD, Bauman AL (2000) Biogenic amine transporters: regulation in flux. Curr Opin Neurobiol 10:328-336

Bönisch H (1984) The transport of (+)amphetamine by the neuronal noradrenaline carrier. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 327:267-272

- Bönisch H (1998) Transport and drug binding kinetics in membrane vesicle preparations. Methods Enzymol (Neurotransmitter Transporters; ed: S.G. Amara) 296:259-278
- Bönisch H, Brüss M (1994) The Noradrenaline transporter of the neuronal plasma membrane. Ann New York Acad Sci 733:193-202
- Bönisch H, Harder R (1986) Binding of <sup>3</sup>H-desipramine to the neuronal noradrenaline carrier of rat pheochromocytoma cells (PC 12 cells). Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 334:403-411
- Bönisch H, Trendelenburg U (1988) The mechanism of action of indirectly acting sympathomimetic amines. In: Trendelenburg U, Weiner N (eds) Handbook of Experimental Pharmacology 90/I, pp 247-277
- Bönisch H, Martiny-Baron B, Blum B, Michael-Hepp J (1990) Biochemical characterization of the neuronal sodium-dependent noradrenaline transporter. J Neural Transm 32:413-419
- Bönisch H, Paulus G, Martiny-Baron G, Lingen B, Coppenburger D (1991) Molecular aspects of the neuronal noradrenaline transporter. J. Neural Transm. 34:11-17
- Bönisch H, Hammermann R, Brüss M (1998) Role of protein kinase C and second messengers in regulation of the norepinephrine transporter. Adv Pharmacol 42:183-186
- Bönisch H, Runkel F, Roubert C, Giros B, Brüss M (1999) The human desipramine-sensitive noradrenaline transporter and the importance of defined amino acids for its function. J Auton Pharmacol 19:327-333
- Bouvier M, Szatkowski M, Amato A, Attwell D (1992) The glial cell glutamate uptake carrier countertransports pH-changing anions. Nature 360:471-474
- Borowsky B, Hoffman BJ (1995) Neurotransmitter transporters: molecular biology, function, and regulation. Int Rev Neurobiol 38:139-199
- Bray GA (1993) Use and abuse of appetite-supressant drugs in the treatment of obesity. Ann Intern Med 119:707-713
- Brüss M, Kunz J, Lingen B, Bönisch H (1993) Chromosomal mapping of the human gene for the tricyclic antidepressant-sensitive noradrenaline transporter. Hum Genet 91:278-280
- Brüss M, Hammermann R, Brimijoin S, Bönisch H (1995) Antipeptide antibodies confirm the topology of the human norepinephrine transporter. J Biol Chem 270:9197-9201
- Brüss M, Pörzgen P, Bryan-Lluka LJ, Bönisch H (1997) The rat norepinephrine transporter: molecular cloning from PC12 cells and functional expression. Mol Brain Res 52:257-262
- Buck KJ, Amara SG. (1994) Chimeric dopamine-norepinephrine transporters delineate structural domains influencing selectivity for catecholamines and 1-methyl-4-phenylpyridinium. Proc Natl Acad Sci USA 91:12584-12588
- Buck KJ, Amara SG (1995) Structural domains of catecholamine transporter chimeras involved in selective inhibition by antidepressants and psychomotor stimulants. Mol Pharmacol 48:1030-1037
- Burton LD, Kippenberger AG, Lingen B, Brüss M, Bönisch H, Christie DL (1998) A variant of the bovine noradrenaline transporter reveals the importance of the C-terminal region for correct targeting to the membrane and functional expression. Biochem J 330:909-914
- Chen JG, Liu-Chen S, Rudnik G (1997) The third transmembrane domain of the serotonin transporter contains residues associated with substrate and cocaine binding. Biochemistry 36:1416-1486
- Cheng Y, Prusoff WH. (1973) Relationship between the inhibition constant (K<sub>i</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. Biochem Pharmacol 22:3099-3108

Cho AK, Ransom RW, Fischer JB, Kammerer RC (1980) The effects of xylamine, a nitrogen mustard, on <sup>3</sup>H-norepinephrine accumulation in rabbit aorta. J Pharmacol Exp Ther 214:324-327

Cuatrecasas P (1970) Protein purification by affinity chromatography. J biol Chem 245:3059-3065

- Danbold NC, Pines G, Kanner BI (1990) Purification and reconstitution of the sodium- and potassiumcoupled glutamate transporter glycoprotein from rat brain. Biochemistry 29:6734-6740
- Danek-Burgess KS, Justice JB, Jr (1999) Effects of serine mutations in transmembrane domain 7 of the human norepinephrine transporter on substrate binding and transport. J Neurochem 73:656-664
- Daniels GM, Amara SG (1999) Regulated trafficking of the human dopamine transporter. J Biol Chem 274:35794-35801
- Davis A (1983) The use of <sup>3</sup>H-Ro 11-2465 in solubilization, partial purification and reconstitution of platelet imipramine binding sites. Soc Neurosci Abstr 9:334
- De Grado TR, Hutchins GD, Toorongian SA, Wieland DM, Schwaiger M (1993) Myocardial kinetics of carbon-11-metahydroxyephedrine:retention mechanism and effects of norepinephrine, J Nucl Med 34:1287-1293
- Dudley MW, Howard BD, Cho AK (1990) The interaction of the beta-haloethylamines, Xylamin, and DSP-4 with catecholaminergic neurons. Annu Rev Pharmacol Toxicol 30:387-403
- Eisenhofer G (2001) The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines. Pharmacol Ther 91:35-62
- Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG (1995) An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. Nature 375:599-603
- Fischer JB, Cho AK (1982) Inhibition of <sup>3</sup>H-norepinephrine uptake in organ cultured rat superior cervical ganglia by xylamine. J Pharmacol Exp Ther 320:115-119

- Fischer JB, Waggamann LA, Ransom RW, Cho AK (1983) Xylamine, an irreversible inhibitor of norepinephrine uptake, is transported by this same uptake mechanism in cultured rat surperior cervical ganglia. J Pharmacol Exp Ther 226:650-655
- Foley K, Cozzi N (2001) Inhibition of transport function and desipramine binding at the human noradrenaline transporter by N-ethylmalimide and protection by substrate analogs. Naunyn Schmiedeberg`s Arch Phamacol 365:457-461
- Friedrich U, Bönisch H (1986) The neuronal noradrenaline transport system of PC-12 cells: kinetic analysis of the interaction between noradrenaline, Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> in transport. Naunyn Schmiedeberg s Arch Pharmacol 333:246-252
- Fritz JD, Jayanthi LD, Thoreson MA, Blakely RD (1998) Cloning and chromosomal mapping of the murine norepinephrine transporter. J Neurochem 70:2241-2251
- Fucentese M, Winterhalter KH, Murer H, Biber J (1997) Functional expression and purification of histidine-tagged rat renal Na/phosphate (NaPi-2) and Na/sulfate (NaSi-1) cotransporters. Membrane Biol 160:111-117

Gerard C (1990) Purification of glycoproteins. Methods Enzymol 182:529-539

- Giros B, Caron MG. (1993) Molecular characterization of the dopamine transporter. Trends Pharmacol Sci 14:43-49
- Giros B, Wang YM, Suter S, McLeskey SB, Pifl C, Caron MG (1994) Delineation of discrete domains for substrate, cocaine, and tricyclic antidepressant interactions using chimeric dopaminenorepinephrine transporters. J Biol Chem 269:15985-15988
- Graefe KH, Bönisch H (1988) The transport of amines across the axonal membranes of noradrenergic and dopaminergic neurons. Handb Exp Pharmacol 90:193-246
- Gründemann D, Gorboulev V, Gambaryan S, Vehyl M, Koepsell H (1994) Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. Nature 372:549-552

- Gu H, Wall SC, Rudnick G (1994) Stable expression of biogene amines transporters reveals differences in inhibitor sensitivity, kinetics, and ion dependence. J Biol Chem 269:7124-7130
- Guastella J, Nelson N, Nelson H, Czyzyk L, Keynan S, Miedel MC, Davidson N, Lester HA, Kanner BI (1990) Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. Science 249:1303-1306
- Hahn M, Robertson D, Blakely RD (2003) A mutation in the human norepinephrine transporter gene (SLC6A2) associated with orthostatic intolerance disrupts surface expression of mutant and wild-type transporters. J Neurosci 23:4470-4478
- Harder R, Bönisch H (1985) Effect of monovalent ions on the transport of noradrenaline across the plasma membrane of neuronal cells (PC 1 cells). J Neurochem 45:1154-1162
- Hayer-Zillgen M, Brüss M, Bönisch H (2002) Expression and comparison of the pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3. Br J Pharmacol 136:829-836
- Hertting G, Axelrod J (1961) Fate of tritiated noradrenaline at sympathetic nerve endings. Nature 192:172-173
- Hjemeland LM, Chrambach A (1984) Solubilization of functional membrane-bound receptors. In: Membranes, detergents, and receptor solubilization. Alon R Liss Inc, New York 35-46
- Howard BD, Cho AK, Zhang M-B, Koide M, Lin S (1990) Covalent labeling of the cocaine-sensitive catecholamine transporter. J Neurosci Res 26: 149-158
- Iversen LL (1975) The uptake mechanisms for biogenic amines. Handbook of Psychopharmacolgy 3:381-442
- Iversen L (2000) Neurotransmitter transporters: fruitful targets for CNS drug discovery. Mol Psychiatry 5:357-362

- Jaim-Etcherverry G, Zieher LM (1983) 2-Chlorethylamines: new chemical tools for the study of noradrenergic neuron. Trends Pharmacol Sci 4:473-475
- Kammerer RC, Amiri B, Cho AK (1979) Inhibition of uptake of catecholamines by benzylamine derivates. J Med Chem 22:352-355
- Kanner BI, Schuldiner S (1987) Mechanism of transport and storage of neurotransmitters. CRC Crit Rev Biochem 22:1-38
- Kilic F, Rudnick G (2000) Oligomerization of serotonin transporter and its functional consequences. Proc Natl Acad Sci USA 97:3106-3111
- Kitayama S, Toshihioro D (1996) Cellular and molecular aspects of monoamine neurotransmitter transporter. J Pharmacol 72:195-208
- Kitayama S, Shimada S, Xu H, Markham L, Donovan DM, Uhl GR (1992) Dopamine transporter sitedirected mutations differentially alter substrate transport and cocaine binding. Proc Natl Acad Sci USA 89:7782-7785
- Kitayama S, Ikeda T, Mitsuhata C, Sato T, Morita K, Dohi T (1999) Dominant negative isoform of rat norepinephrine transporter produced by alternative RNA splicing. J Biol Chem 274:10731-10736
- Koide M, Cho AK, Howard BD (1986) Charcterization of xylamine binding to proteins of PC12 phaeochromocytoma cells. J Neurochem 47:1277-1285
- Kühlbrandt W (1988) Three-dimensional crystallization of membrane proteins. Quart Rev Biophysics 21:429-477
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685
- Lee CM, Snyder SH (1982) Characterization of [<sup>3</sup>H]-desipramine binding associates with neuronal noepinephrine uptake sites in rat brain membranes. J Neurochem 2:1515-1525

- Lee FJS, Pristupa ZB, Ciliax BJ, Levey AI, Niznik HB (1996) The dopamine transporter carboxylterminal tail. J Biol Chem 271:20885-20894
- Levy LM, Warr O, Attwell D (1998) Stoichometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na<sup>+</sup>-dependent glutamate uptake. J Neursci 18:9620-9628
- Lin F, Lester HA, Mager S (1996) Single-channel currents produced by the serotonin transporter and analysis of a mutation affecting ion permeation. Biophys J 71:3126-3135
- Lingen B, Brüss M, Bönisch H (1994) Cloning and expression of the bovine sodium- and chloridedependent noradrenaline transporter. FEBS Lett 342:235-238
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265-275
- Masson J, Sagne C, Hamon M, El Mestikawy S (1999) Neurotransmitter transporters in the central nervous system. Pharmacol Rev 51:439-464
- McIntire SL, Reimer RJ, Schuske K, Edwards RH, Jorgensen EM (1997) Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. Nature 389:870-876
- Melikian HE, Buckley (1999) Membrane trafficking regulates the activity of the human dopamin transporter J Neurosci 19:7699-7710
- Melikian HE, Mc Donald JK, Gu H, Rudnick G, Moore KR, Blakely RD (1994) Human norepinephrine transporter. Biosynthetic studies using a site-directed polyclonal antibody. J Biol Chem 269:12290-12297
- Melikian HE, Ramamoorthy S, Tate CG, Blakely RD (1996) Inability to N-glycosylate the human norepinephrine transporter reduces protein stability, surface trafficking, and transport activity but not ligand recognition. Mol Pharmacol 50:266-276

- Michael-Hepp J, Bönisch H (1990) Labelling of the neuronal noradrenaline carrier with a xylamine derivative. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (Suppl) 341: R 82
- Michael Hepp J, Blum B, Bönisch H (1992) Characterization of the <sup>3</sup>H-desipramine binding site of the bovine adrenomedullary plasma membrane. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 346:203-207
- Nelson N (1998) The family of Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> neurotransmitter transporters. J Neurochem 71:1785-1803
- Nguyen TT, Amara SG (1996) N-linked oligosaccharides are required for cell surface expression of the norepinephrine transporter but do not influence substrate or inhibitor recognition. J Neurochem 67:645-655
- Nishiwaki T, Daigo Y, Tamari M, Fujii Y, Nakamura Y (1998) Molecular cloning, mapping, and characterization of two novel human genes, ORCTL3 and ORCTL4, bearing homology to organic-cation transporters. Cytogenet Cell Genet 83:251-255.
- Pacholczyk T, Blakely RD, Amara SG (1991) Expression cloning of a cocaine- and antidepressantsensitve human noradrenaline transporter. Nature 350:350-354
- Paczkowski FA, Bryan-Lluka LJ (2004) Role of proline residues in the expression and function of the human noradrenaline transporter. J Neurochem 88:203-211
- Paczkowski FA, Bryan-Lluka LJ, Porzgen P, Bruss M, Bonisch H (1999) Comparison of the pharmacological properties of cloned rat, human, and bovine norepinephrine transporters. J Pharmacol Exp Ther 290:761-767
- Paczkowski FA, Bönisch H, Bryan-Lluka LJ (2002) Pharmacologycal properties of the naturally occurring Als457Pro variant of the human norepinephrine transporter. Pharmacogenetics 12:165-173
- Pliszka SR, Maas JW, Javors MA, Rogeness GA, Baker J (1994) Urinary catecholamines in attentiondeficit hyperactivity disorder with and without comorbid anxiety. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 33:1165-1173

- Pörzgen P, Bönisch H, Brüss M (1995) Molecular cloning and organization of the coding region of the human norepinephrine transporter gene. Biochem Biophys Res Commun 215:1145-1150
- Radian R, Kanner BI (1986) Reconstitution and purification of the neuronal sodium- and chloridecoupled y-aminobutyric acid transport glykoprotein form rat brain. J Biol Chem 260:11859-11865
- Ramamoorthy S, Bauman AL, Moore KR, Han H, Yang Feng T, Chang AS, Ganapathy V, Blakely RD (1993) Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. Proc Natl Acad Sci USA 90:2542-2546
- Ransom RW, Kammerer RC, Cho AK (1982) Chemical transformation of xylamine (N-2-chlorethyl-Nethyl-2-methylbenzylamine) in solution. Mol Pharmacol 21:380-386
- Reece M, Prawitt D, Landers J Kast C, Gros P, Housman D, Zabel BU, Pelletier J (1998) Functional characterization of ORCTL2-an organic cation transporter expressed in the renal proximal tubules. FEBS Lett 433:245-250
- Richelson E, Pfemming M (1984) Blockade by antidepressants and related compounds of biogenic amine uptake into rat brain synaptosomes: most antidepressants selectively block norepinephrine uptake. Eur J Pharmacol 104:277-286
- Rohaizah IJ, John PE, Paul T, Dhinakar SK (2000) Engineering CHO-cells to overexpress a secreted reporter protein upon induction from mouse mammary tumor virus promotor. Biotech Bioeng 67:134-140
- Ross SB (1987) Pharmacological an toxicological exploitation of amine transporters. Trends Pharmacol Sci 6:227-231
- Roubert C, Cox P, Brüss M, Hamon M, Bönisch H, Giros B (2000) Determination of residues in the norepinephrine transporter that are critical for tricyclic antidepressant affinity. J Biol Chem 276:8254-8260
- Runkel F, Brüss M, Nöthen M, Stöber G, Propping P, Bönisch H (2000) Pharmacological properties of naturally occurring variants of the human norepinephrine transporter. Pharmacogenetics 10:397-405

- Sagne C, El Mestikawy S, Isambert MF, Hamon M, Henry JP, Giros B, Gasnier B (1997) Cloning of a functional vesicular GABA and glycine transporter by screening of genome databases. FEBS Lett 417:177-183
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467
- Schömig EJ, Bönisch H (1986) Solubilization and characterization of the <sup>3</sup>H-desipramine binding site of rat phaeochromocytoma cells (PC12). Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmakol 334:203-207
- Schömig E, Michael-Hepp J, Bönisch H (1988a) Inhibition of neuronal noradrenaline uptake (uptake1) and desipramine binding by N-ethylmaleimide (NEM). Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 337:633-636
- Schuldiner S, Shirvan A, Linial M (1995) Vesicular neurotransmitter transporters: from bacteria to humans. Physiol Rev 75:369-392
- Sievert MK, Thiriot DS, Edwards RH, Ruoho AE (1998) High-efficiency expression and characterization of the synaptic-vesicle monamine transporter from baculovirus-infected insect cells. J Biochem 330:959-966
- Singer SJ, Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175:720-731
- Stephan MM, Chen MA, Penado KMY, Rudnick G (1997) An extracellular loop region of the serotonin transporter may be involved in the translocation mechanism. Biochemistry 36:1322-1328
- Stoffel W, Sasse J, Duker M, Müller R, Hofmann K, Fink T, Lichter P (1996) Human high affinity, Na<sup>+</sup>dependent L-glutamate/L-aspartate transporter GLAST-1 (EAAT-1): Gene structure and localization to chromosome 5p11-p12. FEBS Lett 386:189-193
- Südhof TC (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. Nature 375:645-653

- Sung U, Apparsundaram S, Galle A, Kristopher MK, Savchenko V, Schroeter S, Quick MW, Blakely RD (2003) A regulated interacton of syntaxin 1A with the antidepressant-sensitive norepinephrine transporter establishes catecholamine clearance capacity. J Neurosci 23:1697-1709
- Tamai I, Yabuuchi H, Nezu J, Sai Y, Oku A, Shimane M, Tsuji A (1997) Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. FEBS Lett 419:107-111
- Tate CG, Haase J, Baker C, Boorsma M, Magnani F, Vallis Y, Willians DC (2003) Comparison of seven different heterologous protein expression systems for the production of the serotonin transporter. Biochim Biophys Acta 1610:141-153
- Tatsumi M, Groshan K, Blakely RD, Richelson E (1997) Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. Eur J Pharmacol 340:249-258
- Tejani-Butt SM (1991) <sup>3</sup>H-Nisoxetine: a Radioligand for Quantification of norepinephrine uptake sites by autoradiographie or by homogenate binding. J Pharmacol Exp Ther 260:427-426
- Tejani-Butt SM, Brunswick DJ, Frazer A (1990) [<sup>3</sup>H]nisoxetine: an new Radioligand for norepinephrine uptake sites in brain. Eur J Pharmacol 191:239-243

Thomas und McNamee (1990) Purification of membrane proteins. Methods Enzymol 182:499-520

- Torres GE, YaoWD, Mohn AR, Quan H, Kim KM, Levey AI, Staudinger J, Caron M (2001) Funktional interaction between monoamine plasma membrane transporters and the synaptic PDZ Domain-containing Protein PICK 1. Neuron 30:121-134
- Trendelenburg U, Langeloh A, Bönisch H (1987) Mechanism of action of indirectly acting sympathomimetic amines. Blood vessels 24:261-270
- Uhl GR, Hartig (1992) Transporter explosion: Update on uptake. Trend Pharmakol Sci 13:421-425
- Vrana KE, Walker SJ, Rucker P, Liu X (1994) A carboxyl terminal leucine zipper is required for tyrosine hydroxylase tetramer formation. J Neurochem 63 : 2014-2020
- Wong DT; Threlkeld PG, Best KI, Bymaster FP (1982) A new inhibitor of norepinephrine uptake devoid of affinity for receptors in rat brain. J Pharmacol Exp Ther 222:61-65

- Wu X, Prasad PD, Leibach FH, Ganapathy V, (1988a) cDNA sequence, transport function, and genomic organisation of the human OCTN2, a new member of of the organic cation transporter familiy. Biochem Biophys Res Commun 246:589-595
- Xu F, Gainetdinov RR, Wetsel WC, Jones SR, Bohn LM, Miller GW, Wang YM, Caron MG (2000) Mice lacking the norepinephrine transporter are supersensitive to psychostimulants. Nat Neurosci 3:465-471
- Yatham LN, Sacamano J, Kusumakar V (1996) Assessment of noradrenergic functioning in patients with non-combat- related posttraumatic stress disorder: a study with desmethylimipramine and orthostatic challenges. Psychiatry Res 63:1-6
- Zahnizer NR, Doolen S (2001) Chronic and acute regulation of Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> -dependent neurotransmitter transporter: drugs, substrates, presynaptic receptors, and signalling systems. Pharmacol Ther 92:21-55
- Zhu MY, Ordway GA (1997) Down-regulation of norepinephrine transporters on PC12 cells by transporter inhibitors. J Neurochem 68:134-41
- Zhu MY, Blakely RD, Apparsundaram S, Ordway GA (1998) Down-regulation of the human norepinephrine transporter in intact 293-hNET cells exposed to desipramine. J Neurochem 70:547-555
- Zhu MY, Shamburger S, Li J, Ordway GA (2000) Regulation of the human norepinephrine transporter by cocain and amphetamine. J Pharmacol Exp Ther 195:951-959

Eigene Veröffentlichungen während der Doktorarbeit:

Muck A, Werner SY, Brüss M, Bönisch H (2004) Molecular cloning and functional characterization of the murine norepinephrine transporter. In prep.

## H. Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Bönisch danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die ständige und freundliche Diskussionsbereitschaft und seine stets hervorragende Betreuung.

Herrn Prof. Dr. K. Mohr danke ich herzlich für die Übernahme der Betreuung dieser externen Doktorarbeit und seine freundliche Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. M. Göthert danke ich für die Möglichkeit, am Institut für Parmakologie und Toxikologie eine Dissertation anzufertigen.

Herrn PD Dr. M. Brüß danke ich für die Beantwortung vieler Fragen, für viele methodische Hinweise und die Durchsicht des Manuskriptes.

Herrn Dr C. G. Tate danke ich für die Ermöglichung des Auslandsaufenthaltes am MRC Laboratory of Molecular Biology, die Einarbeitung in neue Methoden und seine Gastfreundschaft.

Frau P. Breiden und Frau B. Wentzel danke ich sehr herzlich für sehr viel Hilfe bei Zellkultur und Aufnahmeversuchen.

Herrn R. Gilsbach danke ich für viel Hilfe und parktische Ratschläge im Umgang mit der EDV.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere Sandra Combrink, Sandra Werner, Natalie Kopp, Volkert Steinhagen, Birger Wenge und Felix Distelmaier danke ich für das ausgezeichnete Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit im Labor.

Frau Friederike Muck, Herrn Jörg Ellinger und Herrn Jan Walkembach danke ich für die Durchsicht des Manuskriptes.