

**Molekulare Interaktion von
alkylierenden, noradrenergen Neurotoxinen
mit dem humanen Noradrenalintransporter**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Birger Wenge

aus Aachen

Bonn 2008

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

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr 2008

Erstgutachter und Betreuer: Prof. Dr. Heinz Bönisch
Zweitgutachter: Prof. Dr. Klaus Mohr
Fachnahes Mitglied: Prof. Dr. Michael Wiese
Fachangrenzendes Mitglied: Prof. Dr. Brigitte Schmitz

Tag der mündlichen Prüfung: 24.06.2008

***Für meine Familie
und Kathi***

Abkürzungen und Symbole

16-BAC	Benzyltrimethyl- <i>N</i> -hexadecylammoniumchlorid
2D	zweidimensional
A	Absorption (Extinktion)
A	Adenin, Ampère
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
B _{max}	maximale Bindungskapazität
BSA	Bovines Serum Albumin
C	<i>Crosslinking</i> (Vernetzungsgrad), Cytosin
cDNA	<i>complementary Desoxyribonucleic Acid</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
Ci	Curie
Da	Dalton
DAT	Dopamintransporter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
dpm	<i>desintegrations per minute</i>
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀	<i>Effective Concentration 50 %</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
ES	extrazelluläre Schleife
g	Gramm, <i>Gravity</i>
G	Guanin
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GRAVY	<i>Grand Avarage of Hydrophobicity</i>
[³ H]	Tritium
h	human, <i>hour</i>
<i>h</i>	Plancksche Konstante
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IC ₅₀	<i>Inhibitory Concentration 50 %</i>
IEF	isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G

IS	intrazelluläre Schleife
kb	Kilobasenpaar
K_D	Gleichgewichtskonstante der Dissoziation
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation</i>
MAT	Monoamintransporter
MOWSE	<i>Molecular Weight Search</i>
MPP ⁺	1-Methyl-4-phenylpyridinium
MS	Massenspektrometrie
MTSEA	(Aminoethyl)-Methanthiosulfonat- hydrobromid
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl- terazoliumbromid
m/V	Masse pro Volumen
NA	Noradrenalin
NAT	Noradrenalintransporter
NEM	<i>N</i> -Ethylmaleimid
n_H	Hill-Koeffizient
OCT	<i>Organic Cation Transporter</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
p. i.	<i>post infectionem</i>
pI	isoelektrischer Punkt
P/S	Penicillin/Streptomycin
Rb ⁺	Rubidiumion
RLU	<i>Relative Light Units</i>
SCAM	<i>substituted-cysteine accessibility method</i>
SERT	Serotonintransporter
PVDF	Polyvinylidendifluorid
s	Sekunde
s_x	Standardfehler des Mittelwerts
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
T	Thymin, Totalacrylamidkonzentration
T_m	Schmelztemperatur
TM	Transmembrandomäne
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TOF	<i>Time of Flight</i>
TZA	trizyklisches Antidepressivum
U	<i>unit</i>
UV	ultraviolett
V	Volt

V_{\max}

maximale Aufnahmegeschwindigkeit

V/V

Volumen pro Volumen

X-Gal

5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Valin	Val	V
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y

A. Einleitung	1
1. Der Noradrenalintransporter	1
1.1 Die Pharmakologie des NAT	3
1.2 Der Transportmechanismus	4
1.3 Struktur-Funktionsbeziehungen	7
1.3.1 Ein Strukturmodell des NAT abgeleitet von der Kristallstruktur eines bakteriellen Leucintransporters.....	11
1.3.2 Kovalent interagierende Substanzen als Hilfsmittel bei der Strukturaufklärung	12
1.4 Protein-Protein-Interaktionen und Regulation.....	14
2. 2D-Gelelektrophorese von Membranproteinen – Stand der Technik	16
Zielsetzung.....	18
B. Material und Methoden.....	19
1. Material	19
1.1 Geräte.....	19
1.2 Verbrauchsmaterial.....	21
1.3 Labor-Kits	22
1.4 Chemikalien	22
1.5 Radiochemikalien	25
1.6 Strukturformeln relevanter Substanzen	26
1.7 Puffer und Lösungen	27
1.7.1 Puffer und Lösungen für die Zellkultur	27
1.7.2 Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie	27
1.7.3 Puffer und Lösungen für die Biochemie	28
1.7.4 Wirkstoff-Stammlösungen	31
1.7.5 Physiologische Puffer.....	32
1.8 Zelllinien, Nähmedien und Bakterienstämme	32
1.8.1 Eukaryote Zelllinien.....	32
1.8.2 Bakterienstämme	33
1.8.3 Nährmedien für die Bakterienkultur.....	34
1.9 Vektoren	34
1.10 Enzyme.....	35
1.11 Antikörper	35
1.12 Datenbanken und Computerprogramme	36
2. Methoden.....	36
2.1 Methoden der Zellkultur	36
2.1.1 Kultivierung von Säugerzellen.....	36

2.1.2 Kultivierung von Insektenzellen	37
2.1.3 Kryokonservierung von Zellen	37
2.1.4 Bestimmung der Zellzahl	38
2.2 Molekularbiologische Methoden	38
2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion.....	38
2.2.2 Gerichtete Mutagenese.....	39
2.2.3 DNA-Sequenzierung	40
2.2.4 Hitzeschock-Transformation kompetenter Bakterien	41
2.2.5 Bakterien-Dauerkulturen	41
2.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA	42
2.2.7 Ethanolpräzipitation von DNA	42
2.2.8 Konzentrationsbestimmung von DNA	43
2.2.9 Restriktionsverdau von DNA	43
2.2.10 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese von DNA	43
2.2.11 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	44
2.2.12 Subklonierung von DNA.....	44
2.2.13 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen	45
2.2.14 Erzeugung eines rekombinanten Baculovirus zur Infektion von Sf9-Zellen.....	45
2.3 Biochemische Methoden	47
2.3.1 Membranpräparation.....	47
2.3.2 Proteinbestimmung nach Lowry.....	48
2.3.3 Biotinylierung von Membranproteinen zur Kontrolle der Zelloberflächen- expression.....	48
2.3.4 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.....	49
2.3.5 2D-Gelelektrophorese.....	49
2.3.6 16-BAC-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.....	50
2.3.7 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	52
2.3.8 Western Blot	52
2.3.9 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen	53
2.4 Fluoreszenzmikroskopie.....	54
2.5 Pharmakologische Methoden	55
2.5.1 Aufnahmeversuche	55
2.5.2 Bindungsversuche	57
2.5.3 Zytotoxizitätstests	58
2.5.4 Auswertung und Analyse pharmakologischer Daten	59

C. Ergebnisse	62
1. Identifizierung und Charakterisierung funktionell bedeutender Aminosäuren des hNAT	62
1.1 Versuche mit dem Sulfhydrylreagenz NEM	62
1.1.1 Konzentrationsabhängige Inhibition der [³ H]NA-Aufnahme und der [³ H]Nisoxetin-Bindung durch NEM	62
1.1.2 Zeitabhängigkeit der Inhibition der [³ H]NA-Aufnahme und der [³ H]Nisoxetin-Bindung durch NEM	64
1.1.3 Protektion der NA-Aufnahme und Nisoxetin-Bindung mit NAT-Liganden und Substraten vor einer Inaktivierung durch NEM.....	65
1.1.4 Der Einfluss von NEM auf B _{max} und K _D der [³ H]Nisoxetin-Bindung	70
1.1.5 Nachweis der indirekten Inhibition der NA-Aufnahme durch NEM.....	70
1.1.6 Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Reduktion des ATP-Gehalts in HEK293-Zellen durch NEM.....	75
1.1.7 Effekt von Ouabain und SCH28080 auf den ATP-Gehalt von HEK293-Zellen .	76
1.1.8 Konzentrationsabhängige Reduktion des ATPs in verschiedenen Zelllinien durch NEM	77
1.2 Funktionelle Bedeutung der Cysteine des hNAT	78
1.2.1 Expression und Funktion von Cystein-gegen-Alanin-Mutanten des hNAT	78
1.2.2 Kontrolle der Zelloberflächenexpression der hNAT-Mutanten C176A und C185A durch Oberflächenbiotinylierung.....	85
1.2.3 Ermittlung der subzellulären Lokalisation nicht-funktioneller hNAT-Cys-Mutanten durch Fluoreszenzmikroskopie.....	86
1.2.4 Konzentrationsabhängige Inhibition der [³ H]Nisoxetin-Bindung der hNAT-Cys/Ala-Mutanten durch NEM.....	89
1.3 Funktionelle Bedeutung der Histidine des hNAT und ihre Interaktion mit NEM.....	91
1.4 Versuche mit den β-Haloalkylaminen DSP4 und Xylamin	96
1.4.1 Zeitabhängigkeit der irreversiblen Inhibition der [³ H]NA-Aufnahme durch DSP4 und Xylamin.....	96
1.4.2 Protektion der [³ H]NA-Aufnahme vor einer Inhibition durch DSP4.....	97
1.4.3 Interaktion von DSP4 mit neuronalen und nicht-neuronalen Monoamintransportern	99
1.4.4 Interaktion von DSP4 mit Cys/Ala-, His/Ala- und Asp-, Glu-hNAT-Mutanten..	103
1.4.5 Konzentrationsabhängige Inhibition des [³ H]MPP ⁺ -Transports von chimären Noradrenalin-Dopamin-Transportern durch DSP4.....	105
1.4.6 Selektive Zytotoxizität von DSP4 für NAT-exprimierende Zellen	110
2. Versuche zur Überexpression des hNAT in Sf9-Insektenzellen.....	112
2.1 Erzeugung eines rekombinanten hNAT-Baculovirus	113

2.2 Expressionsversuche von rekombinantem hNAT in Sf9-Insektenzellen	114
3. Versuche zur 2D-gelelektrophoretischen Auftrennung des hNAT-Proteins.....	116
3.1 Versuche zur Auftrennung des hNAT mittels 2D-IEF/SDS-PAGE	116
3.2 Entwicklung einer Elektrophoreseapparatur zur Auftrennung von Membranproteinen mittels kationisch rehydratisierter Gelstreifen.....	118
3.2.1 Auftrennung integraler Membranproteine aus HEK293-Zellen mittels 2D 16-BAC-Gelstreifen/SDS-PAGE	121
3.2.2 Auftrennung des hNAT-Proteins mittels 2D 16-BAC-Gelstreifen/SDS-PAGE .	123
3.2.3 Nachweis der Reproduzierbarkeit der 2D 16-BAC-Gelstreifen/SDS-PAGE	124
D. Diskussion.....	127
1. Gewinnung von Strukturinformationen des hNAT mittels gerichteter Mutagenese und kovalent interagierender Inhibitoren	127
1.1 Unterschiedliche Mechanismen bei der Hemmung von Aufnahme und Bindung des hNAT durch NEM	127
1.2 Charakterisierung der kovalenten Interaktion von NEM mit dem hNAT	130
1.3 Funktionelle Bedeutung der Cysteine des hNAT.....	132
1.4 Interaktion von NEM mit einem Histidin der großen extrazellulären Schleife.....	135
1.5 Interaktion des noradrenergen Neurotoxins DSP4 mit Monoamintransportern.....	141
2. Insektenzellen als Expressionssystem für den hNAT	146
3. Strategien zur elektrophoretischen Auftrennung des hNAT.....	149
3.1 Anwendung der klassischen 2D-Gelelektrophorese.....	149
3.2 Entwicklung einer neuen Elektrophoreseapparatur zur Auftrennung von Membranproteinen	150
E. Zusammenfassung	156
F. Anhang.....	159
1. Mutagenese-Primer	159
2. Technische Zeichnungen der Elektrophoreseapparatur für kationisch rehydratisierte Streifen	162
G. Literaturverzeichnis.....	164
Danksagung	183
Lebenslauf.....	185

A. Einleitung

1. Der Noradrenalintransporter

Vor fast 50 Jahren beschrieben Julius Axelrod und seine Mitarbeiter zum ersten Mal das Prinzip der Wiederaufnahme zur Erklärung wie freigesetztes Noradrenalin (NA) aus dem synaptischen Spalt zurück in sympathische Nervenendigungen gelangt (Hertting und Axelrod 1961). Mittels radioaktiv markierter Katecholamine verfolgten die Wissenschaftler das Schicksal dieser Amine nach intravenöser Injektion in Versuchstieren. Dabei beobachteten sie eine selektive Anreicherung von radioaktiv markiertem Adrenalin und von NA in sympathisch innervierten Organen wie der Milz und dem Herzen. Diese Anreicherung war an das Vorhandensein intakter, sympathischer Nervenendigungen gebunden und ließ sich durch Kokain hemmen. Axelrod postulierte, dass der erkannte Wiederaufnahme-Prozess einen wichtigen Mechanismus zur Inaktivierung von Neurotransmittern darstellt. Dieser Mechanismus ist mittlerweile detailliert erforscht und man weiß, dass für die besagte Wiederaufnahme bestimmte integrale Proteine der präsynaptischen Plasmamembran verantwortlich sind – die Neurotransmittertransporter. Durch die rasche Entfernung der Neurotransmitter, die während der Neurotransmission in den synaptischen Spalt freigesetzt werden, verhindern die Transporter die permanente Stimulation synaptischer Rezeptoren. Nur so ist zwischen Neuronen eine Informationsübertragung entsprechend der Frequenz eingehender Aktionspotentiale gewährleistet. Eine Ausnahme stellt die Inaktivierung des Acetylcholins und einiger Peptide dar, welche zur Beendigung der Neurotransmission durch membranständige Enzyme gespalten werden.

Abbildung 1 veranschaulicht die Vorgänge während der Neurotransmission in einer noradrenergen Synapse. Die rasche Wiederaufnahme des aus noradrenergen Neuronen des peripheren und zentralen Nervensystems in den synaptischen Spalt freigesetzten Neurotransmitters NA wird durch den Noradrenalintransporter (NAT) bewerkstelligt. Dadurch trägt dieser wesentlich zur NA-Homöostase bei. Nach der Wiederaufnahme ins Zytoplasma des präsynaptischen Neurons erfolgt dann entweder die Desaminierung des NA durch die mitochondriale Monoaminoxidase (MAO) oder sein Transport in Speichervesikel. Diese Aufnahme erfolgt durch den vesikulären

Monoamintransporter (VMAT), der auch Dopamin und Serotonin in den entsprechenden Neuronen in die Speichervesikel transportiert. Ein Teil des freigesetzten NA diffundiert aus dem synaptischen Spalt und unterliegt dem Abtransport durch Kapillaren oder wird von Effektorzellen aufgenommen und dort abgebaut.

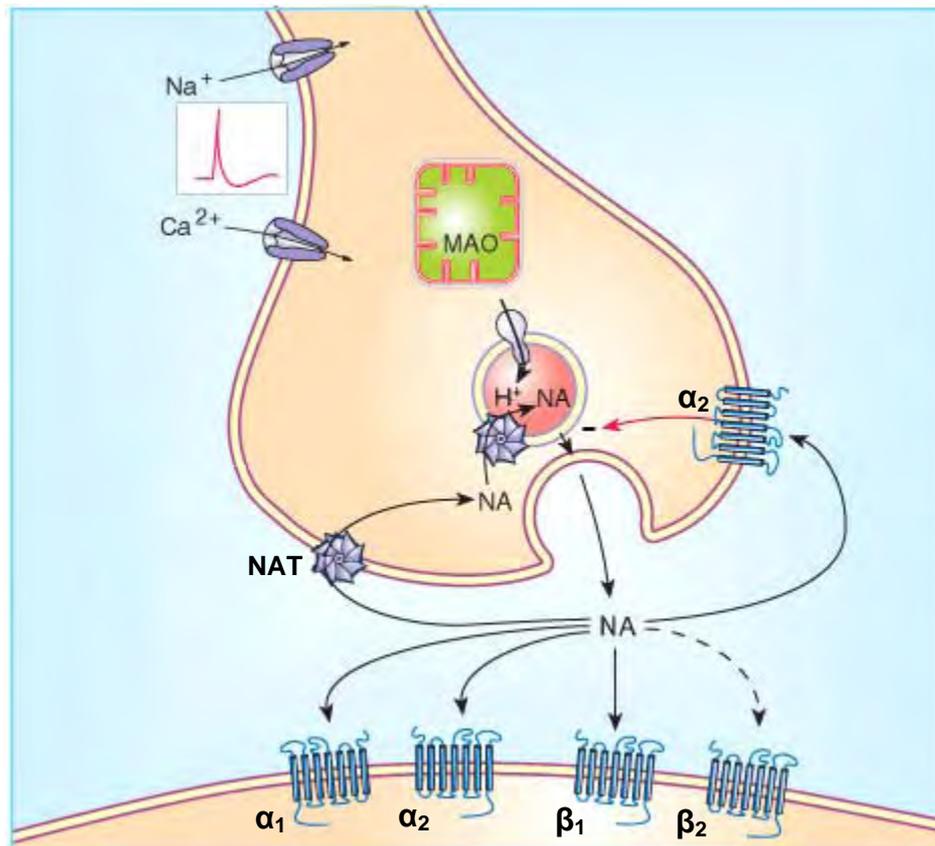


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer noradrenergen Synapse (modifiziert nach Aktories et al. [2005])

Im Axolemm der Nervenendigung eingehende Aktionspotentiale bewirken die Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle. Der Ca^{2+} -Einstrom hat das Verschmelzen von Speichervesikeln mit dem Axolemm zur Folge, wodurch NA in den synaptischen Spalt freigesetzt wird. NA kann so mit Adrenozeptoren (α_1 , α_2 , β_1 , β_2) der postsynaptischen Membran interagieren, was entsprechende nachgeschaltete Signalkaskaden auslöst. Die Erregung präsynaptischer α_2 -Autorezeptoren kann im Sinne einer negativen Rückkopplung die weitere NA-Freisetzung modulieren. Die rasche Wiederaufnahme des NA aus dem synaptischen Spalt erfolgt durch den NAT. Ins Axoplasma aufgenommenes NA wird entweder durch die mitochondriale MAO abgebaut oder zur erneuten Speicherung durch den VMAT unter Nutzung eines elektrochemischen Gradienten in die Vesikel transportiert.

Durch die Hemmung des NAT können bestimmte Substanzen in das beschriebene Fließgleichgewicht eingreifen und dementsprechend die Funktion des Sympathikus ändern. Hierzu zählen z.B. Kokain, indirekte Sympathomimetika und trizyklische Antidepressiva (TZA) (siehe unten).

Einen Meilenstein in der Erforschung des NAT stellte die Expressionsklonierung des humanen NAT (hNAT) aus cDNA der humanen Neuroblastomzelllinie SKNSH im Jahre 1991 durch Pacholczyk et al. dar. Der Vergleich der Aminosäuresequenz des NAT mit der des zuvor von Guastella et al. (1990) klonierten γ -Aminobuttersäure (GABA)-Transporters (GAT) deckte die sehr hohe Sequenzhomologie (68 %) der beiden Transporter auf. Diese Feststellung legte den Grundstein für die Homologieklonierung einer ganzen Gruppe ähnlicher Transporter. Auf der Basis konservierter Sequenzen zwischen NAT und GAT ließen sich so die Gene des verwandten Dopamintransporters (DAT) und des Serotonintransporters (SERT) verschiedener Spezies isolieren. Das Gen des hNAT (SLC6A2) konnte von unserer Arbeitsgruppe auf Chromosom 16p12.2 lokalisiert werden (Brüss et al. 1993). Es umfasst etwa 45 kb und enthält 14 Exons und 15 Introns (Pörzgen et al. 1996).

Die Neurotransmittertransporter werden in diverse Familien und Subfamilien untergliedert, wobei ihre Struktur, Ionenabhängigkeit und Lokalisation als Einteilungskriterien herangezogen werden. So gehört der NAT zusammen mit dem DAT und dem SERT zur Familie der Na^+/Cl^- -abhängigen Neurotransmittertransporter. Diese Familie wird nach dem Nomenklatur-System der *Human Genome Organization* (HUGO) als SLC6 bezeichnet und kann in zwei Subfamilien untergliedert werden (Chen et al. 2004). NAT, DAT und SERT bilden die Subfamilie der neuronalen Monoamintransporter (MATs), während die Aminosäuretransporter (Transporter für Betain, Creatin, GABA, Glycin, Prolin, Taurin) die zweite Subfamilie darstellen.

Ein Vergleich der Primärstrukturen ergab eine Sequenzhomologie von 80 % zwischen hNAT und hDAT sowie 68 % zwischen hNAT und hSERT.

1.1 Die Pharmakologie des NAT

Substrate und Inhibitoren des NAT stellen Pharmaka dar, die bei verschiedenen Indikationen Einsatz finden. Aber auch viele missbräuchlich verwendete Psychostimulantien sowie bestimmte Neurotoxine interagieren mit dem NAT.

Unter den Pharmaka sind an erster Stelle die zu den selektiven oder nicht-selektiven NAT-Inhibitoren zählenden Antidepressiva zu nennen. Durch die Hemmung des NAT (und SERT) erhöhen sie die NA- (und Serotonin) -Konzentration im synaptischen Spalt zentraler Neurone, was nach wie vor als primäre Ursache ihrer antidepressiven Wirkung angesehen wird (Coppen 1967; Leonard 1997). Wichtige Vertreter selektiver NAT-Inhibitoren sind das trizyklische Antidepressivum Desipramin und das strukturell unähnliche Reboxetin. Doch NAT-Inhibitoren erwiesen sich auch als hilfreich zur Therapie anderer Erkrankungen. So wird Atomoxetin erfolgreich zur Behandlung des Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndroms (ADHS) eingesetzt (Simpson und Plosker 2004) und Sibutramin ist ein wirksames Anorektikum zur Behandlung der Fettleibigkeit (Luque und Rey 1999).

Der NAT stellt neben dem DAT und dem SERT eine Zielstruktur der beiden bedeutendsten Psychostimulantien - Kokain und Amphetamin - dar. Während es sich beim Kokain um einen nicht-selektiven und kompetitiven Inhibitor der MATs handelt, zählt das indirekte Sympathomimetikum Amphetamin zu den MAT-Substraten. Es wird in die jeweiligen Nervenendigungen aufgenommen und bewirkt als schwache Base an den Vesikeln eine Umverteilung der vesikulären Monoamine ins Zytoplasma, wodurch die intrazelluläre NA- bzw. Dopamin-Konzentration steigt. Dies hat eine Umkehrung der Transportrichtung des NAT und des DAT zur Folge und somit die Transporter-vermittelte Ausschüttung dieser Monoamine (Trendelenburg et al. 1987; Sulzer et al. 1995) (siehe A.1.2).

Schließlich stellen auch das dopaminerge Neurotoxin 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (MPP^+), das Antiarrhythmikum Bretylium⁺ und das Antihypotensivum Amezinium NAT-Substrate dar (Bönisch und Brüss 2006).

1.2 Der Transportmechanismus

Der Substrattransport durch den NAT ist abhängig von Na^+ und Cl^- . Der Na^+ -Gradient über der Plasmamembran ($[Na^+]$ außen hoch) stellt die hauptsächliche Triebkraft dar und bestimmt die Translokationsrichtung (Sonders et al. 2005). Diese ist normalerweise, dem Gradienten folgend, von extra- nach intrazellulär gerichtet. Das intrazellulär negative Membranpotential, welches durch den K^+ -Gradienten erzeugt wird, trägt ebenfalls zur Triebkraft bei. Der NAT zählt somit, wie auch DAT und SERT, zu den sekundär aktiven Transportern. Die beiden genutzten Ionengradienten werden unter Energieverbrauch von der Na^+/K^+ -

ATPase aufrechterhalten. Folglich bewirkt eine Hemmung dieses Enzyms z.B. durch das Herzglykosid Ouabain oder einen Mangel an ATP eine Reduktion der NA-Aufnahme. Auf diese Weise ist sogar eine Umkehrung der Translokationsrichtung möglich - ein Phänomen, wie es bei der myokardialen Ischämie beobachtet wird (Schömig et al. 1991). Die während einer protrahierten Ischämie auftretende Hypoxie, ATP-Depletion und Absenkung des pH-Werts beeinflussen die NA-Speicherung und erhöhen die Aktivität des Na^+/H^+ -Austauschers. Dadurch wird seinerseits die intrazelluläre Konzentration von NA und Na^+ erhöht. Dieser Zustand verursacht eine Umkehrung der Translokationsrichtung des NAT, was die massive Transporter-vermittelte Freisetzung von NA zur Folge hat (Kübler und Strasser 1994).

Experimentell kann ein Auswärtstransport auch durch das Absenken der extrazellulären Na^+ -Konzentration induziert werden (Bönisch et al. 1986). Bemerkenswert ist die Tatsache, dass andere einwertigen Kationen, wie Li^+ , die besondere Rolle, die Na^+ als Kosubstrat der neuronalen MATs spielt, nicht übernehmen können, während sich Cl^- -Ionen durch Br^- oder SCN^- -Ionen ersetzen lassen (Harder und Bönisch 1985; Bryan-Lluka und Bönisch 1997).

Die Kopplung von Neurotransmitter-Aufnahme und Na^+ -Gradient könnte insofern von physiologischer Bedeutung sein, als dass der Transport kurzzeitig im Moment der Depolarisations-induzierten Katecholamin-Freisetzung unterbunden wird (Kuhar et al. 2006).

Na^+ und Cl^- beeinflussen sowohl die Affinität (K_m) von NA zum NAT als auch seine Translokationsgeschwindigkeit (V_{\max}). Diese Beobachtung und die Tatsache, dass beide Ionen für die Bindung kompetitiver NAT-Inhibitoren, wie Desipramin, essentiell sind, haben zu einem Transport-Modell geführt, welches auf einem mobilen Porenmechanismus mit veränderlicher Zugänglichkeit des Substrats zu seiner Bindungsstelle beruht (Bönisch und Brüss 2006).

Nach dieser Modellvorstellung bindet zunächst das Kosubstrat Na^+ von extrazellulärer Seite an den freien und beweglichen Transporter, woraufhin dieser gewissermaßen in einer bestimmten Konformation fixiert wird. Im nächsten Schritt erfolgt die Bindung des Substrats NA und des Kosubstrats Cl^- , dies führt zu einem Rückgewinn an Beweglichkeit des Transporters. Es folgt die Translokation von Substrat und Kosubstraten und deren Dissoziation vom NAT auf intrazellulärer Seite. Der Transporter kehrt daraufhin entweder in seinen freien, unbeladenen

Zustand zurück, um den beschriebenen Zyklus erneut zu durchlaufen, oder in die Substrat-beladene Form und katalysiert so einen Auswärtstransport. Da das kotransportierte Na^+ die Substrat-Bindung auf intrazellulärer Seite erleichtert, forciert es auch den Transporter-induzierten NA-Efflux (Langeloh et al. 1987). Aus diesem Grund können Substanzen durch ihre Eigenschaft, einen Auswärtstransport zu induzieren als NAT (bzw. DAT oder SERT)-Substrate identifiziert werden (Chen et al. 1998).

Die Translokationsrate der NA-Aufnahme beträgt etwa zwischen 1 und 2,5 Transportzyklen pro Sekunde (Bönisch und Harder 1986; Gu et al. 1996). Nach dem oben beschriebenen Transport-Modell wird NA in Form des protonierten NA^+ transportiert und das stöchiometrische Verhältnis von NA^+ zu den kotransportierten Ionen beträgt $1 \text{ NA}^+ : 1 \text{ Na}^+ : 1 \text{ Cl}^-$.

Interessanterweise sind für die Bindung von Inhibitoren, wie Desipramin oder Nisoxetin 2 Na^+ -Ionen nötig. Diese Tatsache kann möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass diese Inhibitoren zusätzlich zur Substratbindungsstelle noch mit einer weiteren Na^+ -abhängigen Bindungsstelle des Transporters interagieren (Michael-Hepp et al. 1992; Bönisch und Brüss 1994).

Weitere mechanistische Erkenntnisse bezüglich Substrat-Bindung und -Transport des NAT gelangen mit Hilfe der räumlich-auflösenden Echtzeit-Fluoreszenz-Mikroskopie und dem fluoreszierenden Substrat ASP^+ . Unter Verwendung dieser Technik konnten Schwartz et al. (2003) zeigen, dass die Bindung des Substrats tief innerhalb einer Pore, im Inneren des Transporter-Proteins erfolgt und abhängig von Cl^- doch unabhängig von Na^+ -Ionen ist. Die Analyse der Kinetik des Transportprozesses ergab, dass die initiale Substratbindungsrate die Translokationsrate etwa 100fach übertrifft (Schwartz et al. 2005). Die Autoren stellten daraufhin die Hypothese auf, dass dem NAT dadurch gewissermaßen eine Pufferfunktion für NA zukommt.

Zusätzlich zum klassischen Transportmechanismus weist der NAT, wie auch der DAT und der SERT, Kanal-ähnliche Eigenschaften auf (Mager et al. 1994; Galli et al. 1996; Sonders et al. 1997). Mittels elektrophysiologischer Techniken ließen sich in heterologen Zellen, die die rekombinanten Transporter exprimierten, Leitfähigkeiten nachweisen, welche nicht von der fixen Stöchiometrie des Substrattransports herrühren konnten. Im Fall aller drei Transporter bewirkten

Aufnahme-Inhibitoren eine Hemmung dieser ungekoppelten Leitfähigkeiten. Solche Beobachtungen führten schließlich zur Annahme der Existenz einer Wasser-gefüllten Pore, die den Transporter während des Transport-Zyklus durchzieht. Inwiefern diese Leitfähigkeiten ausreichen das Membranpotential zu verändern und ob sie einen Einfluss auf die Wirkungen von Antidepressiva und Psychostimulantien haben, ist noch nicht geklärt.

1.3 Struktur-Funktionsbeziehungen

Der hNAT enthält 617 Aminosäuren. Mittels Hydrophobizitätsanalyse der Primärstruktur ließen sich 12 putative Transmembrandomänen (TMs) ermitteln. Das in Abbildung 2 veranschaulichte Topologiemodell mit intrazellulär lokalisierten N- und C-Termini sowie 6 extrazellulären und 5 intrazellulären Schleifen (IS) konnte durch Antikörperexperimente von unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden (Brüss et al. 1995). Charakteristisch ist das Vorhandensein einer großen extrazellulären Schleife (ES) zwischen TM3 und TM4, die drei potentielle N-Glykosylierungsstellen trägt und höchstwahrscheinlich eine Disulfidbrücke enthält. Auf Grund ihrer hohen Sequenzhomologie ist es verständlich, dass die neuronalen MATs viele gemeinsame Strukturmerkmale aufweisen und so bestätigten bisher alle experimentellen Studien das beschriebene topologische Modell auch im Fall des DAT und des SERT (Hersch et al. 1997; Androutsellis-Theotokis und Rudnick 2002).

Die genaue Struktur des NAT bzw. seiner Ligandbindungsstelle(n) ist jedoch noch immer nicht aufgeklärt. Daher stellt die Identifikation von Aminosäuren oder Domänen, die an der Substrattranslokation und Inhibitorbindung beteiligt sind, nach wie vor ein Gebiet intensiver Forschungstätigkeit dar und ist auch ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit.

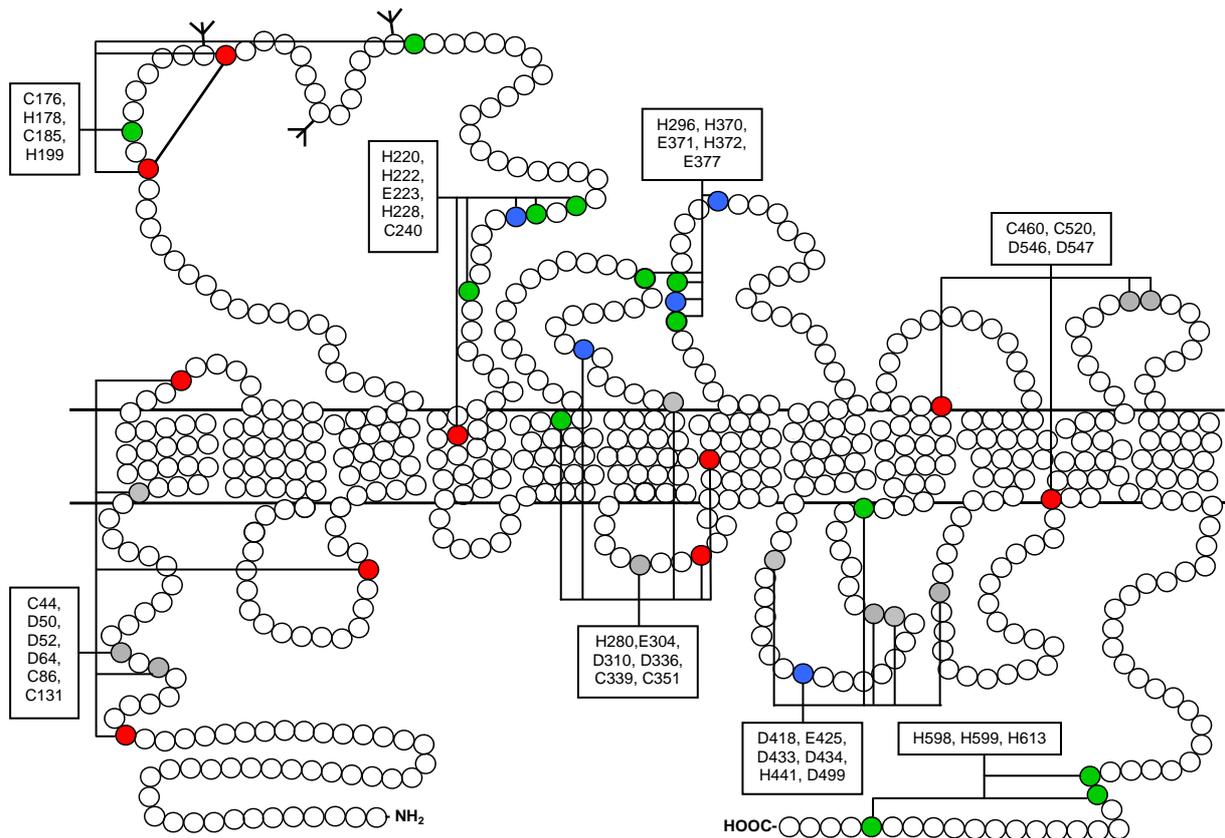


Abbildung 2: Topologiemodell des hNAT

Der hNAT ist mit 12 Transmembrandomänen dargestellt. Die Plasmamembran wird durch zwei dunkle, horizontale Linien symbolisiert. Die ES2 enthält eine Disulfidbrücke und Glykosylierungen an Asparagin 184, 192 und 198, die durch Dreizacke versinnbildlicht werden. Farblich dargestellt sind die in dieser Arbeit mutierten Aminosäuren, deren jeweilige Position in der Primärstruktur mit angegeben ist (blau: Glutamat, grau: Aspartat, grün: Histidin, rot: Cystein).

Zur Identifizierung funktionell bedeutender Regionen und Aminosäuren werden in erster Linie die folgenden drei Verfahren verwendet: Analyse von chimären Transportern, gerichtete Mutagenese und *substituted-cysteine accessibility method* (SCAM). So gelang es Giros et al. (1994) mit Hilfe chimärer Konstrukte zwischen NAT und DAT nachzuweisen, dass die N-terminale Region einschließlich TM1 bis TM5 in den Transportmechanismus und dessen Ionenabhängigkeit involviert ist. Gleichzeitig wurde erkannt, dass der Bereich zwischen TM6 bis TM8 wahrscheinlich den Ort der Kokain- und TZA-Bindung darstellt, während der C-terminale Teil ab TM9 die Stereoselektivität und Spezifität von Substraten bedingt. Ähnliche Studien mit anders rekombinierten NAT/DAT-Chimären wurden auch von Buck und Amara (1994; 1995) durchgeführt. Was den Ort der TZA- und Kokain-

Bindung anbelangt, deckten sich ihre Ergebnisse mit denen von Giros et al. (1994), doch bezüglich des Substrattransports stellten Buck und Amara eine Beteiligung der Region von TM4 bis TM8 fest. Dies zeigt die tatsächliche Komplexität des Translokationsmechanismus.

Sehr detailliert wurde speziell die Region zwischen TM5 und TM8 auf ihre Bedeutung für die Desipramin-Bindung hin untersucht. Dazu verwendeten Roubert et al. (2001) hNAT-Mutanten bei denen Aminosäuren der besagten Region gegen die entsprechenden, nicht-konservierten Aminosäuren des Desipramin-unempfindlichen hDAT ausgetauscht wurden. Auf diese Weise ließ sich demonstrieren, dass der Doppelaustausch von Serin und Glycin in den Positionen 399 und 400 innerhalb der TM8 gegen Prolin bzw. Leucin eine etwa 3000fache Reduktion der Affinität von Desipramin bewirkte, ohne die Affinität von NA, Dopamin oder Kokain zu beeinflussen (Roubert et al. 2001).

Die Bindungsstellen des hNAT für Substrate, Kokain und TZA sind offenbar verschieden, aber überlappend (Bönisch und Brüss 2006). So konnte ein Motiv innerhalb der IS1 (GQXXRXG) identifiziert werden, das für die Bindung von Kokain, nicht jedoch für die TZA-Bindung von Bedeutung ist. Ebenso wirkt sich eine Mutation von Glutamat 113 innerhalb der TM2 unterschiedlich auf die Bindungsaffinität von Substraten, Kokain, Nisoxetin und Desipramin aus (Sucic et al. 2002; Sucic und Bryan-Lluka 2007).

Ausgehend von der Molekülstruktur der Katecholamine wurden von verschiedenen Forschergruppen gezielt hydrophobe und geladene Reste innerhalb der TMs untersucht, die potentiell mit der Aminogruppe, dem π -Elektronensystem des aromatischen Rings oder den vicinalen Hydroxylgruppen interagieren könnten. Nur wenige konservierte, ladungstragende Aminosäuren befinden sich innerhalb der TMs der MATs. Umso bedeutender war die Feststellung, dass die Mutation eines unter den MATs hoch konservierten Aspartats aus der TM1 (Asp75 des hNAT) den Verlust der Transportaktivität sowohl im Fall des NAT, des DAT als auch des SERT bewirkte, ohne die Zelloberflächenexpression der mutierten Proteine zu reduzieren (Kitayama et al. 1992; Barker et al. 1999; Bönisch et al. 1999). Beim SERT war der Austausch des entsprechenden Aspartats gegen Glycin, Alanin oder Asparagin zusätzlich mit einer drastischen Affinitätsminderung zu Kokain und dem TZA Imipramin verbunden (Barker et al. 1999). Im Fall des

DAT verlor Dopamin die Fähigkeit die Bindung des Kokain-Analogons CFT zu inhibieren (Kitayama et al. 1992).

Insgesamt betrachtet legen diese Befunde die Vermutung nahe, dass das Aspartat in TM1 maßgeblich an der Substrat-Bindung beteiligt ist, wahrscheinlich über eine ionische Wechselwirkung zwischen seiner Carboxylatgruppe und der protonierten Aminogruppe der Substrate. Interessanterweise ist das besagte Aspartat nur bei den MATs konserviert. Andere Transporter der gleichen Familie besitzen in dieser Position ein Glycin. Untersuchungen von Chen et al. (2001) lieferten jedoch Hinweise, dass an der Substraterkennung des DAT wahrscheinlich noch weitere Aspartate (Asp313, Asp435 und Asp476) beteiligt sind.

Bei der Suche nach Aminosäuren, die möglicherweise mit dem aromatischen Ring der Katecholamine interagieren, wurden mehrere Studien am DAT durchgeführt (Chen et al. 2001; Lin et al. 1999; 2000). Nach Austausch der meisten Phenylalanine und Tryptophane innerhalb der 12 TMs des DAT zeichnete sich ab, dass die Mutation eines Phenylalanins aus TM3 gegen Alanin mit einem drastischen Affinitätsverlust der Mutante F155A für Dopamin einherging.

Zwischen Rezeptoren für Katecholamine (Adrenozeptoren und Dopaminrezeptoren) und den MATs besteht eine gewisse Ähnlichkeit, was das Vorhandensein zweier konservierter und innerhalb einer TM nahe beieinander liegender Serinreste anbelangt. Im Fall der β -Adrenozeptoren sind diese zwei in TM5 vorkommenden Serine für die Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit den vicinalen Hydroxylgruppen des gebundenen Katecholamins verantwortlich (Strader et al. 1987). In einer gewissermaßen homologen Position befinden sich beim NAT und DAT zwei konservierte Serine innerhalb der TM7. Kitayama et al. (1992) demonstrierten am DAT, dass die Mutation dieser beiden Serine gegen Alanin mit einer ausgeprägten Reduktion des Dopamin-Transports einhergeht. Sie stellten daraufhin die Hypothese auf, dass die beiden Serine innerhalb der TM7 des DAT in ähnlicher Weise für die Katecholamin-Bindung verantwortlich sein könnten, wie die entsprechenden zwei Serine der Katecholamin-Rezeptoren. Allerdings lieferten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe (Bönisch et al. 1999) sowie von Burgess und Justice (1999) Befunde, die die Gültigkeit dieser Theorie im Fall der homologen Serine des NAT (S354 und S357) nicht bestätigen.

Kürzlich gelang es Forrest et al. (2007) zu zeigen, dass das Serin in Position 372 des SERT der Ratte (entspricht S354 im hNAT) zusammen mit weiteren Resten

aus TM2 (Y121) und TM6 (S336 und N368) höchstwahrscheinlich an der koordinativen Cl⁻-Bindung beteiligt ist. Sehr eindrucksvoll belegt auch eine zeitgleich veröffentlichte Studie von Zomot et al. (2007) die Bedeutung dieses Serins für die Cl⁻-Bindung weiterer Vertreter der Na⁺/Cl⁻-abhängigen Neurotransmittertransporter. Der Austausch des entsprechenden Serins aus TM7 des GABA-Transporters (GAT) sowie des DAT gegen eine negativ geladene Aminosäure verursachte in beiden Fällen eine Cl⁻-Unabhängigkeit des Substrattransports, während nach Austausch des Serins gegen Alanin oder Glycin dieses Phänomen nicht beobachtet wurde.

1.3.1 Ein Strukturmodell des NAT abgeleitet von der Kristallstruktur eines bakteriellen Leucintransporters

Insgesamt betrachtet ist das Verständnis der Funktionsweise des NAT noch sehr lückenhaft zumal eine genaue Kenntnis seiner Struktur bis heute nicht vorliegt. Ein exaktes Bild des räumlichen Aufbaus inklusive der Ligandbindungstasche(n) des NAT würde erst die Kristallstruktur des Transporters liefern. Doch die Kristallographie eines eukaryotischen MAT ist bis heute nicht gelungen. Ein Grund hierfür liegt in der enormen Schwierigkeit ausreichende Mengen des hochreinen Transporter-Proteins zu gewinnen (Kniazeff et al. 2005). Demnach stellte die erfolgreiche Aufklärung der Kristallstruktur des Na⁺-abhängigen Leucintransporters (LeuT) des Eubakteriums *Aquifex aeolicus* durch Yamashita et al. (2005) eine bedeutende Leistung dar, da es sich zudem um den ersten kristallographierten Vertreter der SLC6-Familie handelte.

Trotz evolutionär relativ geringer Verwandtschaft wird die Kristallstruktur des bakteriellen LeuT von verschiedenen Forschergruppen zur Konstruktion von Strukturmodellen der MATs von Säugern und deren Ligandbindungstaschen herangezogen (Singh et al. 2007; Zhou et al. 2007; Indarte et al. 2008). Doch problematisch ist hierbei in erster Linie das geringe Maß an Sequenzhomologie zwischen dem bakteriellen LeuT und seinen eukaryotischen Homologen. So zeigt die Primärstruktur des bakteriellen LeuT mit der von NAT, DAT und SERT gerade einmal 24, 20 bzw. 21 % Übereinstimmung (Beuming et al. 2006). Strukturvoraussagen nach dem Sequenzabgleich von Proteinen mit solch geringem Maß an Ähnlichkeit sind kritisch zu betrachten (Rost 1999). Dies wurde z.B. durch die Feststellung verdeutlicht, dass das Sulfhydrylreagenz 2-(Aminoethyl)-Methanthiosulfonathydrobromid (MTSEA) während einer SCAM-

Analyse mit eingefügten Cysteinen in der intrazellulären Hälfte der TM5 des SERT reagiert, welche nach dem abgeleiteten Strukturmodell des LeuT nicht zugänglich sein dürften (Zhang und Rudnick 2005; Jacobs et al. 2007). Überdies enthalten die humanen Transporter wesentlich größere hydrophile Segmente, einschließlich des NH₂- und des COOH-Terms sowie der extra- und intrazellulären Schleifen (Rudnick 2007). Zudem sind die eukaryotischen Transporter, im Gegensatz zu ihren bakteriellen Homologen, glykosyliert.

Schließlich sind gewisse Unterschiede bezüglich des Mechanismus der Substrattranslokation zu erwarten. Der LeuT ist ein Aminosäuretransporter und die Carboxylatgruppe des Leucins scheint an der koordinativen Bindung eines kotransportierten Na⁺-Ions beteiligt zu sein (Yamashita et al. 2005). Den Substraten der MATs hingegen fehlt diese Carboxylatgruppe. Ferner ist der bakterielle LeuT im Gegensatz zu den eukaryotischen MATs nicht Cl⁻-abhängig.

Diese Punkte verdeutlichen, dass zur Validierung solch abgeleiteter Homologiemodelle ergänzende, biochemische bzw. pharmakologische Daten unerlässlich sind.

1.3.2 Kovalent interagierende Substanzen als Hilfsmittel bei der Strukturaufklärung

Die gerichtete Mutagenese bietet die Möglichkeit zur gezielten strukturellen Variation eines Proteins. So erlaubt es die Erzeugung von Punktmutationen, z.B. bestimmte Eigenschaften von Transporterproteinen wie die Binde- und Translokationseigenschaften gezielt zu verändern. Diese integralen Membranproteine lassen sich so positionsweise abtasten, um festzustellen, welche Aminosäuren für die Aufrechterhaltung der 3D-Struktur, für die Einnahme einer bestimmten Konformation oder für die Wechselwirkung mit einem Liganden von entscheidender Bedeutung sind.

Ein effizientes Hilfsmittel um die funktionelle Bedeutung definierter Aminosäurereste zu charakterisieren stellt ferner der Einsatz von Substanzen dar, die selektiv mit bestimmten funktionellen Gruppen kovalent interagieren. Auf diese Weise können Strukturelemente des Proteins, die für die Ligandbindung und Substrattranslokation wesentlich sind, identifiziert und ihre funktionelle Bedeutung charakterisiert werden. 3D-Strukturmodelle von Transportern können auf diese Weise erstellt bzw. auf ihre Relevanz hin überprüft werden.

Besonders die Bedeutung der nativen Cysteine des NAT für Substrattransport und Ligandbindung wurde schon von verschiedenen Forschergruppen mittels diverser Sulfhydrylreagenzien untersucht und die Ergebnisse kontrovers diskutiert (Schömig et al. 1988; Foley und Cozzi 2002; Sucic und Bryan-Lluka 2005). Cysteine können innerhalb eines Proteins eine Reihe von Funktionen erfüllen. Zu den wichtigsten Eigenschaften zählt sicherlich die Fähigkeit zur Ausbildung von Disulfidbrücken, welche die Tertiär- bzw. Quartärstruktur mitbestimmen. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass der bakterielle LeuT, im Gegensatz zu den relativ cysteinreichen MATs, kein Cystein enthält.

Aus der Fülle der Sulfhydrylreagenzien wurde für Untersuchungen von Transporterproteinen, so auch des NAT, bevorzugt das *N*-Ethylmaleimid (NEM) eingesetzt (van Iwaarden et al. 1992). NEM ist ein *N*-alkyliertes Imid der Maleinsäure. Die lipophile Substanz enthält eine leicht polarisierbare Doppelbindung, über die es mit Thiolgruppen kovalente Addukte bildet (Abbildung 3). NEM hemmt irreversibel den NAT und NAT-Liganden schützen davor. Es wurde daher angenommen, dass ein Cystein an der Ligandbindung des NAT beteiligt ist (Schömig et al. 1988; Foley and Cozzi 2002). Es gilt jedoch zu beachten, dass die Substanz unter bestimmten Umständen auch unspezifische Reaktionen eingehen kann, dazu zählt z. B. die Alkylierung der Imidazolgruppe von Histidinen (Brewer und Riehm 1967).



Abbildung 3: Reaktion von *N*-Ethylmaleimid mit einer Sulfhydrylgruppe

Besondere Verbindungen stellen die β -Haloalkylamine DSP4 und Xylamin dar. Dabei handelt es sich um selektive, noradrenerge Neurotoxine und um Substrate des NAT (Dudley et al. 1990). Die transportierte Form ist dabei wahrscheinlich jeweils das in wässriger Lösung aus den Substanzen entstehende, gegenüber Nucleophilen hochreaktive Aziridiniumion (Abbildung 4) (Ransom et al. 1982). Da DSP4 und Xylamin irreversible Inhibitoren des NAT sind (Howard et al. 1990), wird

angenommen, dass das Aziridiniumion während seiner Translokation eine kovalente Interaktion mit der Seitenkette einer Aminosäure innerhalb der Substrat/Ligandbindungstasche des NAT-Proteins eingeht, was den Transporter dauerhaft blockiert (Fischer et al. 1983). Demnach können die β -Haloalkylamine DSP4 und Xylamin gewissermaßen als „Suizidsubstrate“ bezeichnet werden, die sich eignen die Ligandbindungstasche des NAT selektiv zu markieren.

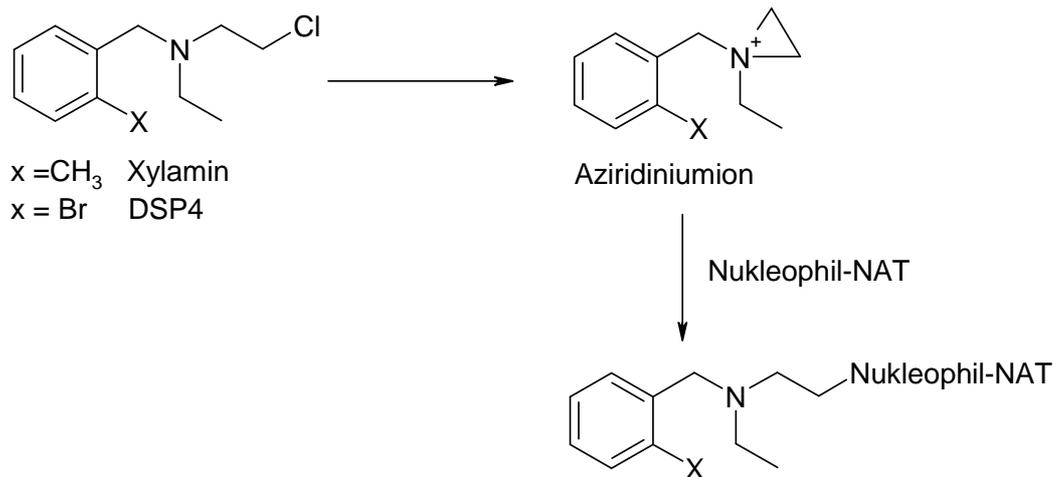


Abbildung 4: Reaktionsmechanismus der β -Haloalkylamine

Die β -Haloalkylamine Xylamin und DSP4 zyklisieren in wässriger Lösung zu einem Aziridiniumion, das innerhalb der Ligandbindungstasche des NAT eine nukleophile Aminosäure alkyliert.

1.4 Protein-Protein-Interaktionen und Regulation

Die meisten Modelle der Transporterfunktion basieren auf der Vorstellung, dass die Transporter als eine singuläre Einheit, d.h. als Monomer existieren. Es bestehen allerdings Hinweise, dass die MATs möglicherweise als Oligomere in der Plasmamembran vorliegen (Farhan et al. 2006). Tatsächlich enthalten z.B. NAT und DAT innerhalb der TM2 mehrere konservierte Leucine in Anordnung eines klassischen Dimerisierungsmotives (sogenanntes *Leucine-Zipper-Motiv*). Mutationen innerhalb des *Leucine-Zippers* des DAT verhindern die Plasmamembranexpression des Transporters und seine Interaktion mit dem Wildtyp-DAT. Daher stellten Torres et al. (2003a) die Hypothese auf, dass die TM2 an einer Protein-Protein-Interaktion des DAT beteiligt ist und die Oligomerisierung eine essentielle Grundvoraussetzung für seine Expression in der Plasmamembran

darstellt. Auch Oligomere des SERT konnten durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Mikroskopie in der Plasmamembran transfizierter HEK293-Zellen detektiert werden (Schmid et al. 2001). Über die physiologische Bedeutung einer möglichen Oligomerisierung der Neurotransmittertransporter herrscht jedoch noch Unklarheit, nicht zuletzt weil sie offensichtlich keine Voraussetzung für die Substrat-Bindung und Translokation darstellt (Sitte und Freissmuth 2003).

Die Interaktion der PDZ-Domäne des synaptischen Proteins PICK1 mit dem Aminosäure-Motiv Leu-Ala-Ile des C-Terminus des NAT (Distelmaier et al. 2004) sowie des DAT (Torres et al. 2001) ist von entscheidender Bedeutung für eine vollständige Zelloberflächenexpression der Transporter. So verursacht im Fall des NAT das Fehlen dieses Motivs (z.B. in einer Spleißvariante) oder die Mutation der Aminosäuren eine drastische Reduktion der Zelloberflächenexpression. Derartige hNAT-Varianten zeigen außerdem einen dominant-negativen Effekt auf die Plasmamembranexpression des Wildtyp-NAT. Die physiologische Bedeutung der PICK1-Interaktion könnte somit in einer Regulation der Transporter-Dichte liegen. Doch noch zahlreiche weitere Möglichkeiten der akuten und chronischen Regulation des NAT bzw. seiner Funktion sind mittlerweile bekannt. So kann eine Regulation unter anderem bewirkt werden durch Veränderungen in der Transkription des Gens, der Translation oder Stabilität der mRNA, durch posttranslationale Modifikationen oder Interaktionen mit dem Zytoskelett. Eine Übersicht liefern Zahniser und Doolen (2001).

Da der NAT einen Angriffspunkt verschiedener Pharmaka darstellt, ist die Kenntnis seiner Regulation durch chronische Pharmakon-Verabreichung von besonderer Relevanz. *In vitro* Untersuchungen an PC12-Zellen, die konstitutiv den NAT der Ratte exprimieren, belegten, dass die chronische Desipramin- oder Nisoxetin-Exposition sowohl die Zahl der Nisoxetin-Bindungsstellen als auch die NA-Aufnahme reduziert (Zhu und Ordway 1997). Auch an HEK293-Zellen, die nach stabiler Transfektion den hNAT exprimierten, ließ sich diese Antidepressiva-induzierte Herabregulation des NAT nachweisen (Zhu et al. 1998).

Bei der Regulation des NAT ist dessen Phosphorylierung durch Kinasen offenbar von besonderer Bedeutung. So führt die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) durch Phorbolester in NAT-exprimierenden Zellen zu einer relativ rasch eintretenden Reduktion der NA-Aufnahme und Nisoxetin-Bindung. Interessanterweise wurde diese schnelle Herabregulation ebenfalls im Fall der

hNAT-Variante S259A beobachtet, bei der durch Mutation die potentielle PKC-Konsensus-Stelle entfernt wurde (Bönisch et al. 1998). Dass jedoch tatsächlich eine Phosphorylierung des NAT-Proteins stattfindet, konnte von Blakely und Bauman (2000) nachgewiesen werden. Sie demonstrierten ferner, dass die Stimulation von Muskarinrezeptoren in SKN-SH-Zellen zur PKC-induzierten Herabregulation des NAT führt und dass diese durch eine Internalisierung des phosphorylierten Transporters zustande kommt (Apparsundaram et al. 1998).

2. 2D-Gelelektrophorese von Membranproteinen – Stand der Technik

Der Ort der Interaktion eines kovalent bindenden Inhibitors innerhalb der Ligandbindungstasche eines Proteins kann theoretisch massenspektrometrisch ermittelt werden. Auf diese Weise ließen sich eventuell die durch DSP4 oder NEM markierten Peptide des NAT identifizieren. Eine Voraussetzung für diese Vorgehensweise ist jedoch eine hochreine Probe des zu analysierenden Proteins. Nach wie vor stellt die 2D-Gelelektrophorese, mit der isoelektrischen Fokussierung (IEF) als erster Dimension gefolgt von einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) für die zweite Dimension, die Methode mit dem höchsten Auflösungsvermögen für komplexe Proteingemische dar (Zahedi et al. 2005). So ist mit dieser Methode die gleichzeitige Auftrennung von über 2000 verschiedenen Proteinen aus einer Probe möglich (Görg et al. 2004). Bemerkenswert ist die Tatsache, dass etwa zwei Drittel aller Zielstrukturen für Pharmaka Membranproteine darstellen (Rabilloud 2003). Es ist daher verständlich, dass speziell die Analyse der Membranproteine von wachsendem Interesse in der pharmakologischen Forschung ist. Die moderne Vorgehensweise bei der Proteom-Analyse nutzt die Kombination aus 2D-Gelelektrophorese zur Trennung der Proteine und Massenspektrometrie zu ihrer Identifikation (Rais et al. 2004). Doch aufgetrennt werden meist ausschließlich die löslichen und hydrophilen Proteine. Die Trennung und Analyse integraler Membranproteine bereitet auf Grund ihrer hohen Lipophilie und schlechten Löslichkeit während der IEF oft große Schwierigkeiten. Artikel, die diesen Umstand beschreiben, sind zahlreich (Santoni et al. 2000; Braun et al. 2007; Mattow et al. 2007).

Als eine Ursache für diese Limitierung gilt die Tatsache, dass die IEF ausschließlich mit nicht-ionischen bzw. zwitterionischen Detergentien kompatibel ist. Deren relativ niedrige Solubilisationskraft reicht jedoch oft nicht aus, um hoch hydrophobe Proteine, besonders in der Nähe ihres isoelektrischen Punktes, im

solubilisierten Zustand zu halten und ihre Präzipitation zu verhindern (Luche et al. 2003).

Zur verbesserten Auftrennung hydrophober Membranproteine wurden verschiedene, alternative, gelbasierte 2D-Verfahren entwickelt. Zu nennen sind hier die doppelte SDS-PAGE (Rais et al. 2004) oder Techniken, die ein kationisches Detergenz wie Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) bzw. Benzyltrimethyl-N-hexadecylammoniumchlorid (16-BAC) in der ersten und SDS in der zweiten Dimension nutzen (Hartinger et al. 1996; Zahedi et al. 2005; Helling et al. 2006). Bei diesen Methoden kommen ionische Detergentien bei beiden Dimensionen zum Einsatz und der Parameter, nach dem die Trennung erfolgt, ist in beiden Dimensionen die molekulare Masse der Proteine. Die Zweidimensionalität der Trennung kommt durch die unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine zustande, die diese in Abhängigkeit ihres Solubilisationszustandes (kationisch/anionisch) und der ionischen Bedingungen zeigen. Die Protein-Spots auf den resultierenden 2D-Gelen sind in Form einer diagonalen Ellipse angeordnet.

Von diesen 2D-Verfahren zur Membranprotein-Trennung wird am häufigsten die ursprünglich von Macfarelane (1989) beschriebene und später von Hartinger et al. (1996) modifizierte 16-BAC/SDS-PAGE angewendet. Das entsprechende Protokoll sieht für die erste Dimension den Gebrauch eines aziden Kaliumphosphat-Puffers sowie zur Solubilisation der Proteine das kationische Detergenz 16-BAC vor. Anschließend folgt eine diskontinuierliche SDS-PAGE. Jedoch im Vergleich zur einfach handhabbaren und hoch reproduzierbaren 2D IEF/SDS-PAGE, bei der auf Trägerfolie gebundene Gelstreifen die erste Dimension darstellen (Görg et al. 1988), sind die oben beschriebenen Protokolle für Membranproteine äußerst umständlich in der Handhabung. Die Methoden sind ferner relativ zeitaufwändig, besitzen eine vergleichsweise geringe Reproduzierbarkeit und sind mit dem Verlust niedrig exprimierter Proteine verbunden.

Eine weiterentwickelte Methode, die die genannten Nachteile überwindet und die bequeme Handhabbarkeit auf Trägerfolie gebundener Gelstreifen mit der hohen Trennleistung für Membranproteine der 2D 16-BAC/SDS-PAGE verbindet, wäre eine wünschenswerte Ergänzung des biochemischen Methodenspektrums.

Zielsetzung

Die Ligandbindungsstelle des NAT ist trotz intensiver Forschungsbemühungen verschiedener Arbeitsgruppen bis heute nicht aufgeklärt. Die genaue Kenntnis ihrer Struktur würde zum besseren Verständnis der Funktionsweise des NAT beitragen und die zielgerechte Synthese spezifischerer, therapeutisch einsetzbarer NAT-Inhibitoren erleichtern. Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand die Intention mittels kovalent interagierender NAT-Inhibitoren Informationen über die Ligandbindungsstelle des hNAT zu gewinnen. Im Folgenden sollen kurz einige Aufgaben, Kernpunkte und Fragestellungen dieser Arbeit zusammengefasst werden:

- Aminosäuren, die zur Ligandbindung beitragen, sollten mittels der kovalent interagierenden Substanzen NEM und DSP4 identifiziert werden. Die Bedeutung der Cysteine und Histidine des hNAT bezüglich Ligandbindung, Substrattransport, Zelloberflächen-Expression galt es zu klären.
- Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, mittels rekombinanter NAT/DAT-Chimären die Region des hNAT einzugrenzen, die affinitätsbestimmend für das noradrenerge Neurotoxin und NAT-Substrat DSP4 ist. Darüber hinaus sollte die Interaktion von neuronalen und nicht-neuronalen MATs mit DSP4 untersucht werden. NA wird Na^+ - und Cl^- -unabhängig durch die extraneuronalen organischen Kationentransporter OCT₁, OCT₂ und OCT₃ transportiert (Junker und Schinkel 2004). Wenn DSP4 spezifisch den NAT inaktiviert, sollte es keine irreversible Hemmung der OCTs bewirken; dies galt es zu klären.
- Des Weiteren sollte geprüft werden, ob sich Sf9-Insektenzellen in Form eines Baculovirus-Expressionssystems zur Gewinnung größerer Mengen funktionellen hNAT-Proteins eignen. Ein hoch effektives Überexpressionssystem stellt gewissermaßen eine Grundvoraussetzung zur erfolgreichen Strukturaufklärung des NAT dar.
- Schließlich sollte eine Methode zur 2D-gelelektrophoretischen Auftrennung hoch hydrophober Transmembranproteine wie dem hNAT etabliert werden mit dem Ziel den Transporter einer massenspektrometrischen Detektion zugänglich zu machen.

B. Material und Methoden

1. Material

1.1 Geräte

Analysenwaage	A 210 P, Sartorius
Autoklav	Bioclav KSK 117, Schütt
Beleuchtungstisch	Dia-NL Leuchtplatte 2, Just-Normlicht
Brutschränke	BE 500, Memmert
	B 5060 EK/CO ₂ , Heraeus
Einfrierbehälter	5100 Cryo 1°C Freezing container, Nalgene
Film-Entwickler	CP1000, AGFA
Flachbettgelkammern	Eigenbau der Institutswerkstatt
Fluoreszenzmikroskop	Eclipse TE 2000-E, Nikon
Geldokumentation:	
UV/VIS Transluminator	TFP-M/WL, MWG Biotech
Steuerungscomputer	1M400-E, Scanalytics
Kamera	KP-M1U, Hitachi
Thermoprinter	P66E, Mitsubishi
Bildschirm	IM400-E, Javelin
Hämocytometer	Neubauer, Brand
Heizblock	Thermostat 5320, Eppendorf
Heizrührer	Ikamag RH, Ika
Isoelektrische Fokussiereinheit	Biotech Multiphor 2, Pharmacia
Kippschüttler	RT-1S, Fröbel Labortechnik
Kontaminationsmonitor	LB 1210B, Berthold
Kühlzentrifugen	JS-21, Beckman
	Centrifuge 5402, Eppendorf
Laborwaage	SBC53, Scaltec
Lumi-Imager	Lumi-Imager F1, Boehringer Mannheim
Luminometer	Centro LB 960, Berthold
Membranpumpe	Typ EKF45, Greiffenberger Antriebstechnik GmbH

Mikroskop	Diavert, Leitz
PAGE-Systeme	MultiLong, Biometra XCell SureLock, Invitrogen
pH-Meter	pH 522, WTW
Photometer	DU-64, Beckman GeneQuant II, Pharmacia
Pipetten	Varipette, Eppendorf Pipetman, Gilson
Pipettenstopfautomat	Typ P500, Bachofer
Rotor	TFT 65.38, Kontron
Schüttler	VF-2, Ika
Sequenzier	LI-COR 4200, LI-COR
SpeedVac-Konzentrator	SVC 100H, Savant
Stromversorgungsgeräte	Appligene 3000, Appligene Oncor Modell 493, ISCO 2303 Multidrive XL, Pharmacia LKB EPS 3500 XL, Pharmacia LKB
Sterilarbeitsbänke	HA 2448 GS, Heraeus Gelaire, Bio-Flow
Sterilisator	S 40, Memmert
Szintillationszähler	LS 5000 TD, Beckman
Thermocycler	Triothermoblock, Biometra
Tischzentrifugen	5114 und 5402, Eppendorf 1K15 und 2K15, Sigma CPKR (Rotor: GH-3.7), Beckman JS-21 (Rotor: JA-20), Beckman
Vortexgeräte	Vibrax-VXR, Ika Vortex Genie 2, Bender & Holbein
Ultra-Turrax	T25, Janke & Kungel
Wasseraufbereitung	Easy Pure RF, Barnstedt
Wasserbäder	FK, Haake
Western-Blot Systeme	Trans-Blot Cell, BioRad Xcell II Blot Module, Invitrogen
Zellharvester	MOR-24, Brandel
Zellhomogenisator	Potter 7 ml, Wheaton

1.2 Verbrauchsmaterial

Blotting-Papier	3MM-Chr, Whatman
Deckgläser	24 x 24 mm, Brand
Einfrierröhrchen	1,8 ml, Nunc
Filme für Western Blots	High performance chemiluminescence film, GE
Filmrolle für Thermoprinter	K65HM, Mitsubishi
Frischhaltefolie	Saran Wrap, Roth
Kanülen	Sterican 0,45 x 25 mm, Braun 1412 LL – 20, Acufirm
Kunststoff-Küvetten	Curvettes 10 x 10 x 24 mm, Sarstedt
Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schüll
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenzubehör	Standardtips 10 µl, Eppendorf 10-100 µl, 100 - 1000 µl, Sarstedt 10 µl, 100 µl, 1000 µl, FX-E, Südlabor
Polyacrylamidgele	NuPAGE 10 % Bis-Tris 1 mm, Invitrogen
Reaktionsgefäße	LoBind 0,5 ml, 2 ml, Eppendorf Safelock 0,5 ml, 1,5 ml, Eppendorf 1,5 ml, Sarstedt
Skalpelle	No.10, Feather
Spritzen	2 ml, 5 ml, 50 ml, Braun
Sterilfilter	Typ GVPP, 0,22 µm, Millipore
Sterile Plastikpipetten	5 ml, 10 ml, 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, 96er-Well, Nunc
Zellkulturschalen	10 cm, Nunc
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml, Nunc

1.3 Labor-Kits

BaculoDirect Expression Kit	Invitrogen
CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	Promega
Fast Plasmid Mini	Eppendorf
GenElute HP Plasmid Maxiprep Kit	Sigma
Original TA Cloning Kit	Invitrogen
Plasmid Mega Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QuickChange Mutagenesis Kit	Stratagene
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Amersham

1.4 Chemikalien

16-BAC	Sigma
Acrylamid	Amersham
Acrylamid/ <i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid (29:1), 40 %	Appligene
Agar-Agar	Merck
Agarose (Gelelektrophorese)	Serva
Agarose (IEF)	Amersham
Ameziniummetilsulfat	BASF
Ammoniumnitrat	Roth
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma
(D)-Amphetaminsulfat	Sigma
Amphotericin B	Sigma
Ampicillin	Roche
Ascorbinsäure	Merck
ATP	Sigma
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	BioRad
Bupropionhydrochlorid	Sigma
Bretyliumtosylat	BASF

BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma
Calciumchloriddihydrat	Merck
CHAPS	Amersham
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva
Desipraminhydrochlorid	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothrethiol (DTT)	Sigma
DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium)	Sigma
DSP4	Sigma
POD Lumi-Light Western Blotting substrate	Roche
Essigsäure (100 %)	Merck
Ethanol absolut	Merck
Ethidiumbromid	Roche
Ethylendiamintetraacetat, Na-Salz (EDTA, Titriplex III)	Merck
Ethylenglykoltetraacetat, Na-Salz (EGTA)	Boehringer
EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin	Pierce
Ficoll 400	Sigma
Folin-Ciocalteau-Phenol Reagenz	Merck
Formaldehyd-Lösung 30 %	Fluka
Fötale Kälberserum (FKS)	Sigma, Pan Systems
Geneticin G418	Sigma
Ganciclovir	Sigma
(D)-Glucose	Merck
(L)-Glutamin	Merck
Glycerol (87%)	Merck
Glycin	Serva
Harnstoff	Merck, Amersham
Hefeextrakt	Life Technologies
<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2- ethansulfonsäure (HEPES)	Roth

Iodacetamid	Fluka
Indian Ink	Pelikan
Isopropanol	Merck
Isopropylthio- β -D-galaktosid (IPTG)	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Merck
Kanamycin	Gibco
Kokainhydrochlorid	Sigma
Kupfersulfatpentahydrat	Merck
LumiLight Western Blotting Substrate	Roche
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck
MEM (Minimum Essential Medium Eagle)	Sigma
Methanol	Riedel de Haen
Methoxyessigsäure	Sigma
Mineralöl	Sigma
2-(<i>N</i> -Morholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma
Mowiol 4-88	Roth
MPP ⁺ -Iodid (1-Methyl-4-phenylpyridinium)	RBI
MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	Sigma
Natriumacetat	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fluka, Amersham
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Roth
Natrium(meta)vanadat	Fluka
Natriumkaliumtartrat	Merck
<i>N</i> -Ethylmaleimid	Sigma
NeutrAvidin	Pierce
Nisoxetinhydrochlorid	Sigma
Noradrenalinhydrochlorid	Sigma
Ouabain	Sigma

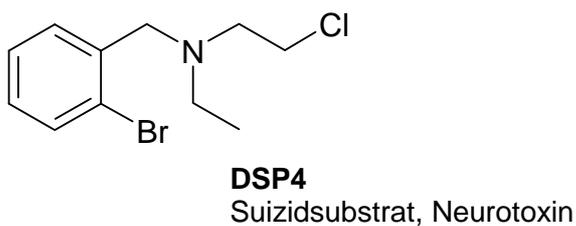
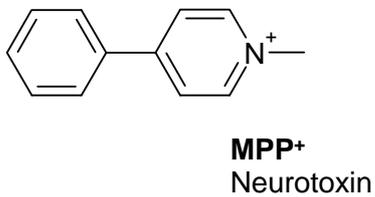
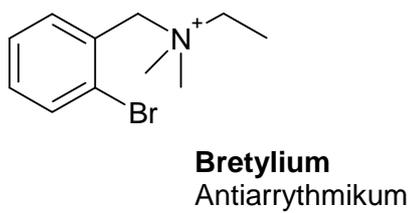
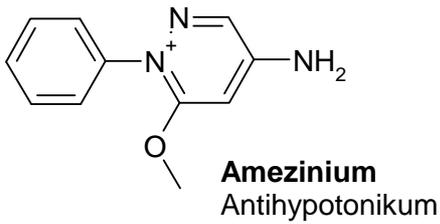
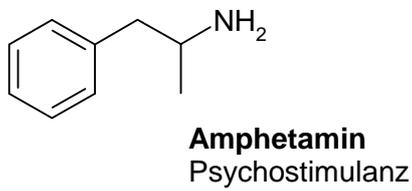
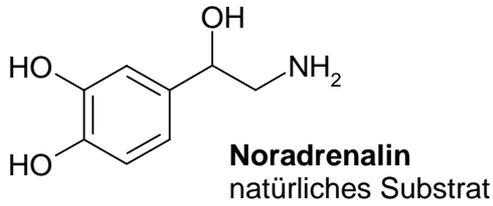
Pargylinhydrochlorid	Sigma
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Sigma
Poly-L-Ornithin	Sigma
Ponceau S	Sigma
Proteaseinhibitorcocktail	Serva
RotiBlock	Roth
Salzsäure (37 %)	Merck
SCH-28080	Sigma
Scintillator 199 TM	Packard
Sequagel XR	National Diagnostics
Sequagel complete Buffer reagent	National Diagnostics
Servalyt 3-10 Iso-Dalt	Serva
Silbernitrat	Roth
Streptomycinsulfat	Sigma
Tetracyclin	Sigma
<i>N, N, N, N</i> -Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma
TransIT-293	Mirus
Trichloressigsäure	Merck
Tris-(hydroxymethylen)-aminomethan	Roth, Merck
Triton X-100	Bio-Rad
Trypsin/EDTA	Sigma
U-0521 (3,4-Dihydroxy-2-methylpropio- phenon)	Tocris
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D- galactopyranosid)	Roche
Xylamin	ICN

1.5 Radiochemikalien

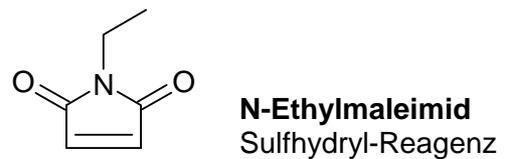
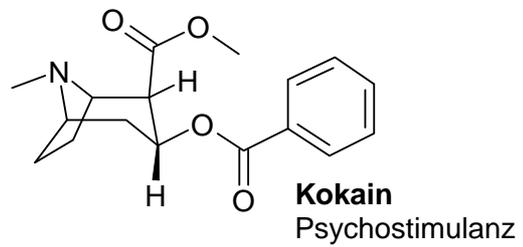
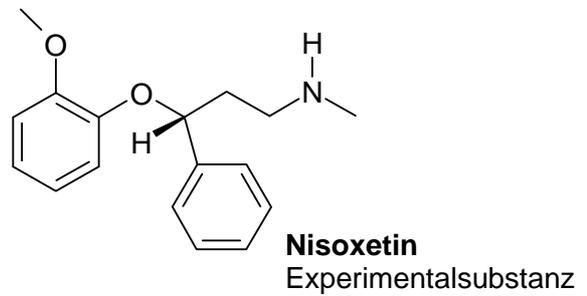
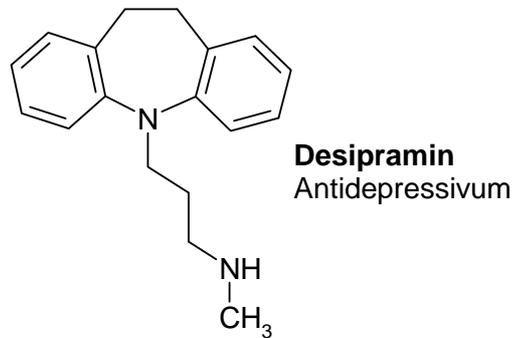
[<i>N</i> -Metyl- ^3H]Nisoxetin, 85,00 Ci/mmol	PerkinElmer
[Ring-2,5,6- ^3H]($-$)Noradrenalin, 53,40 Ci/mmol	PerkinElmer
[^3H]MPP $^+$, 80,00 Ci/mmol	Biotrend
^{86}Rb idium ($^{86}\text{Rb}^+$), 0,01 MCi	Biotrend

1.6 Strukturformeln relevanter Substanzen

NAT-Substrate



NAT-Nicht-Substrat-Inhibitoren



1.7 Puffer und Lösungen

Mit H₂O ist immer *Aqua destillata* gemeint. Eine von Raumtemperatur (RT) abweichende Lagertemperatur ist angegeben.

1.7.1 Puffer und Lösungen für die Zellkultur

G418 (Geneticin)	40 mg/ml in PBS, sterilfiltriert, -20°C
PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM KH ₂ PO ₄
Polyornithin-Lösung	0,1 % (m/V) Polyornithin in H ₂ O 150 µM Borsäure 67 mM NaOH sterilfiltriert, 4°C (haltbar: 30 d), -20°C
Penicillin/Streptomycin-Lösung	10000 U/ml Penicillin G 10 mg/ml Streptomycin
Trypanblau-Lösung	1 % (m/V) in PBS
Trypsin-Lösung	0,25 % (m/V) in PBS, 4°C

1.7.2 Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie

Ampicillin	10 % (m/V) in H ₂ O, aliquotiert, -20°C
DNA-Probenpuffer (5x)	15 % (m/V) Ficoll 400 in 5x TBE 0,25 % (m/V) Bromphenolblau
Ethidiumbromid-Lösung	1 % (m/V) in H ₂ O, lichtgeschützt, 4°C

Glycerol	50 % (V/V) in H ₂ O, autoklaviert
IPTG-Lösung	20 % (m/V) in H ₂ O
Natriumacetat-Lösung	3 M Natriumacetat in H ₂ O
TBE-Puffer	0,1 M Tris HCl 0,1 M Borsäure 2 mM EDTA, pH 8,0
TE-Puffer	10 mM Tris HCl 1 mM EDTA, pH 8,0

1.7.3 Puffer und Lösungen für die Biochemie

1.7.3.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Ammoniumperoxodisulfat (APS)	10 % (m/V) in H ₂ O, frisch
Acrylamid/ <i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid (AA/Bis)	30 % (m/V) Acrylamid 0,8 % (m/V) <i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid lichtgeschützt, 4°C, Lösung entgasen
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris Base 0,4 % (m/V) SDS pH 8,8 mit HCl, 4°C
Sammelgelpuffer (4x)	250 mM Tris Base 0,4 % (m/V) SDS pH 6,8 mit HCl, 4°C
Probenpuffer	60 mM Tris Base 5,0 % (m/V) SDS 10 % (V/V) Glycerin 0,001 % Bromphenolblau 0,1 % (m/V) DTT (frisch zugeben)

Laufpuffer	25 mM Tris Base 192 mM Glycin 0,1 % SDS, 4°C
Coomassie-Blau-Lösung	0,1 % (m/V) Coomassie R250 50 % (V/V) Methanol 10 % (V/V) Essigsäure 40 % (V/V) H ₂ O
Coomassie-Blau-Entfärber/ Fixierer	30 % (V/V) Methanol 10 % (V/V) Essigsäure 60 % (V/V) H ₂ O

1.7.3.2 Isoelektrische Fokussierung

Lysispuffer	4 % (m/V) CHAPS 6 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 0,1 % (m/V) DTT 0,2 % (V/V) Trägerampholyte
Rehydratationsspuffer	1 % (m/V) CHAPS 6 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 0,1 % (m/V) DTT 2 % Trägerampholyte

1.7.3.3 16-BAC-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Trenngelbuffer	400 mM Methoxyessigsäure/KOH (pH 3,0) 4 M Harnstoff 0,05 % (m/V) 16-BAC 0,001 % (m/V) Methylengrün (fakultativ)
----------------	---

Material und Methoden

Sammelgelpuffer	400 mM Essigsäure/KOH (pH 4,0) 4 M Harnstoff 0,05 % (m/V) 16-BAC 0,001 % (m/V) Methylengrün (fakultativ)
Anodenpuffer	478 mM Essigsäure 540 mM Glycin 0,1 % (m/V) 16-BAC
Kathodenpuffer	400 mM Methoxyessigsäure/KOH (pH 3,0) 0,1 % (m/V) 16-BAC
Probenpuffer	5 mM H ₃ PO ₄ /KOH (pH 7,4) 4 mM Harnstoff 1 mM EDTA 10 % (V/V) Glycerin 2 % (m/V) 16-BAC 5 mM DTT 0,001 % (m/V) Methylengrün
TRIS-Puffer	50 mM TRIS, pH 6,8
Äquibrierungslösung 1	50 mM TRIS 6 mM Harnstoff 30 % (V/V) Glycerol 2 % (m/V) SDS 1 mM EDTA 0,01 % (m/V) Bromphenolblau
Äquibrierungslösung 2	Äquibrierungslösung 1 0,1 % (m/V) DTT
Äquibrierungslösung 3	Äquibrierungslösung 1 50 mM Iodacetamid

1.7.3.4 Western Blot

Transfer-Puffer	190 mM Glycin 50 mM Tris-HCl 20 % (V/V) Methanol 0,02 % (m/V) SDS
Ponceau S-Lösung	0,2 % (m/V) Ponceau S 3 % (m/V) Trichloressigsäure

1.7.3.5 Proteinbestimmung nach Lowry

Lösung A	8 % (m/V) Na ₂ CO ₃ 0,2 N NaOH 1,6 % (V/V) Lösung B2 0,4 % (V/V) Lösung B1
Lösung B1	2 % CuSO ₄ x 5 H ₂ O
Lösung B2	2,5 % Na-K-Tartrat x 4 H ₂ O

1.7.4 Wirkstoff-Stammlösungen

Die angegebenen Wirkstoff-Stammlösungen wurden aliquotiert bei -20°C gelagert. Lösungen aller anderen eingesetzten Wirkstoffe oder Substanzen wurden jeweils am Versuchstag frisch hergestellt.

Amphetamin	10 mM in H ₂ O
Bupropion	10 mM in DMSO
Decynium 22	1 mM in DMSO
Desipramin	1 mM in H ₂ O
Kokain	1 mM in H ₂ O
MPP ⁺	1 mM in H ₂ O
Nisoxetin	10 mM in H ₂ O
Pargyline	10 mM in H ₂ O
U-0521	10 mM in H ₂ O

1.7.5 Physiologische Puffer

KRH-Puffer (Krebs-Ringer-Hepes)	125 mM NaCl 4,8 mM KCl 5,6 mM Glukose 1,2 mM CaCl ₂ 1,2 mM KH ₂ PO ₄ 1,2 mM MgSO ₄ 25 mM HEPES (pH 7,4) Schutz für Katecholamine: 1 mM Ascorbinsäure 1 µM U-0521 1 µM Pargyline
MES/EGTA-Puffer	150 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 5 mM EGTA 5 mM Glukose 0,01 % (m/V) Streptomycin 10 mM MES, pH 6,1

1.8 Zelllinien, Nähmedien und Bakterienstämme

1.8.1 Eukaryote Zelllinien

C6 (ATCC¹ Nr.: CCL-107)

Die Zelllinie C6 wurde aus Gliazellen eines Glioblastoms der Ratte *rattus norvegicus* etabliert.

Nährmedium: DMEM + 10 % FKS + 1 % P/S

CHO (ATCC Nr.: CCL-61)

CHO-Zellen sind Ovarzellen des chinesischen Hamsters *Cricetulus griseus*.

Nährmedium: MEM + 10 % FKS + 1 % P/S

COS7 (ATCC Nr.: CRL-1651)

COS7-Zellen wurden aus der Niere der afrikanischen Affenart *Cercopithecus aethiops* etabliert. Es handelt sich um eine Fibroblasten-Zelllinie, die mit dem SV40-Virus T-Antigen stabil transformiert wurde.

Nährmedium: DMEM + 10 % FKS + 1 % P/S

HEK293 (ATCC Nr.: CRL-1573)

Die Zelllinie HEK293 wurde geschaffen als Transformationsprodukt einer menschlichen embryonalen Nierenzelle (*human embryonic kidney*) mit Genom-Teilen des menschlichen Adenovirus 5.

Nährmedium: DMEM + Ham's F12 + 10 % FKS + 1 % P/S

JAR (ATCC Nr.: HTB-144)

JAR-Zellen entstammen einer humanen Choriokarzinom-Zelllinie.

Nährmedium: RPMI + 10 % FKS + 1 % P/S

PC12 (ATCC Nr.: CRL-1721)

PC12-Zellen sind Phäochromozytomzellen der Ratte *rattus norvegicus*.

Nährmedium: RPMI + 10 % DHS + 5 % FKS + 1 % P/S

Sf9 (ATCC Nr.: CRL-1711)

Sf9-Zellen sind Ovarzellen des Falters *Spodoptera frugiperda*.

Nährmedium: Sf-900 II SFM (Gibco)

SK-N-SH SY5Y (DSMZ² Nr.: ACC 209)

Bei SK-N-SH SY5Y handelt es sich um eine humane Neuroblastom-Zelllinie.

Nährmedium: DMEM + 10 % FKS + 1 % P/S

¹ATCC: American Tissue Culture Collection

²DSMZ: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen

1.8.2 Bakterienstämme

NovaBlue Singles Competent Cells

Novagen

XL1-Blue Supercompetent Cells

Stratagene

1.8.3 Nährmedien für die Bakterienkultur

Kanamycin-Agar-Platten	10 µg/ml Kanamycin 1,5 % (m/V) Agar-Agar in LB-Medium
LB-Medium, pH 7	1 % (m/V) Bactotrypton oder 0,5 % (m/V) Hefeextrakt 42,5 mM NaCl
LB/Amp-Medium	200 µg/ml Ampicillin in LB-Medium
SOC-Medium	2 % (m/V) Caseinhydrolysat 0,5 % (m/V) Hefeextrakt 85 mM NaCl 2,5 mM KCl Zugabe nach dem Autoklavieren: 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 0,2 % Glucose, sterilfiltriert
XIA-Agar-Platten	40 µg/ml X-Gal 50 µg/ml IPTG 200 µg/ml Ampicillin 1,5 % (m/V) Agar-Agar in LB-Medium

1.9 Vektoren

pcDNA3 (Invitrogen)

Die für funktionelle Untersuchungen erzeugten hNAT-Mutanten lagen im 5,4 kb großen, eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3 vor. Er trägt Resistenzgene für Ampicillin und Neomycin.

pcDNA3.1/NT-GFP (Invitrogen)

Dieser 6,2 kb große Vektor ermöglicht eine Expression von N-terminal mit *Cycle 3 GFP* markierten, rekombinanten Proteinen in eukaryotischen Zellen. Die Resistenzgene sind identisch mit denen des Vektors pcDNA3.

pENTR3C (Invitrogen)

Dieser 2,7 kb große Vektor ermöglicht eine gerichtete Subklonierung mittels Gateway[®]-Technologie (B.2.2.14.1), vermittelt über *attL*-Sequenzen, die die *multiple cloning site* flankieren. Eine Kozak-Konsensussequenz ermöglicht eine Translation in eukaryotischen Systemen. Er trägt ein Kanamycin-Resistenzgen.

1.10 Enzyme

<i>Bam</i> H I (Restriktionsenzym)	Fermentas
<i>Eco</i> R I (Restriktionsenzym)	Fermentas
<i>Hind</i> III (Restriktionsenzym)	Fermentas
<i>Dpn</i> I (Restriktionsenzym)	Fermentas
<i>Sma</i> I (Restriktionsenzym)	Fermentas
LR Clonase II Enzym Mix (Rekombinase-Enzym-Mischung)	Invitrogen
T4-DNA-Ligase	Invitrogen
PfuTurbo DNA Polymerase	Stratagene
<i>Xba</i> I (Restriktionsenzym)	Fermentas
<i>Xho</i> I (Restriktionsenzym)	Fermentas

1.11 Antikörper

Epitop	Spezies	Klasse	Spezifität	Enzym-Kopplung	Firma
Anti-NAT	Maus	IgG	monoklonal	-	Fab Technologies
Anti-NAT	Ziege	IgG	polyklonal	-	Santa Cruz
Anti-Maus	Esel	IgG	monoklonal	Peroxidase	Bio-Rad
Anti-Ziege	Esel	IgG	monoklonal	Peroxidase	Santa Cruz

1.12 Datenbanken und Computerprogramme

Baselmg IRV4.1	LI-COR
BLAST at NCBI	www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/
ClustalW	www.ch.embnet.org
Entrez at NCBI	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/
ExPASy Proteomics Server	www.expasy.org
HMMTOP 2.0	
ProtParam	
TMHMM 2.0	
GraphPad Prism 4	Graph Pad Software
Image Master 2D Platinum	Amersham Biosciences
Lumi Analyst	Boehringer
MASCOT	www.matrixscience.com
MDL ISIS Draw 2.5	MDL
MikroWin 2000 Version 4.37	Mikrotek
Office 2000 (Word, Excel, PowerPoint)	Microsoft
OligoAnalyzer 3.0	IDT

2. Methoden

2.1 Methoden der Zellkultur

2.1.1 Kultivierung von Säugerzellen

Die verwendeten Säugerzelllinien wurden als Monolayerkulturen in Plastikkulturflaschen bei 37°C unter 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Alle verwendeten Nährmedien sind unter B.1.8.1 aufgeführt. Die Intervalle der Mediuerneruerung und der Subkultivierung variierten, abhängig von Metabolismus und Wachstumsgeschwindigkeit, je nach Zelllinie. Ein Farbumschlag des im Nährmedium enthaltenen pH-Indikators Phenolrot von rot nach gelb zeigte die Notwendigkeit einer Mediuerneruerung an. Die Zellen wurden routinemäßig unter dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet und der jeweilige Vitalitätszustand kontrolliert. Einen Tag bevor die Zellen Konfluenz erreichten, wurde ihre Subkultivierung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mechanisch durch Abklopfen vom Kulturflaschenboden sowie durch mehrfaches

Spülen mit Medium in Suspension gebracht und anschließend durch Zentrifugieren für 5 min bei 500 g pelletiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 10 ml frischem Medium resuspendiert und in entsprechender Verdünnung in ein neues Kulturgefäß ausgesät. Die besonders fest adhärent wachsenden Zelllinien SK-N-SH SY5Y und CHO mussten zur Subkultivierung mit Trypsin vom Kulturflaschenboden abgelöst werden. Nach einmaligem Waschen mit 10 ml PBS wurden die Zellen mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm von Trypsin-Lösung überschichtet und ca. 3 - 5 min bei 37°C bis zum Ablösen inkubiert. Der Trypsinierungsprozess musste unmittelbar nach dem Ablösen der Zellen durch Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt werden.

Für pharmakologische Versuche wurden Zellen in mit Polyornithin beschichteten Multiwell-Platten ausgesät. Der Boden der Multiwell-Platten wurde 20 min mit einer Polyornithin-Lösung inkubiert. Nach dem Absaugen der Lösung wurden die Wells einmal mit PBS gewaschen. Diese Art der Beschichtung gewährleistet ein festeres Anheften der Zellen an den Kulturgefäßboden, was Zellverluste während Wasch- und Inkubationsschritten vermindert.

2.1.2 Kultivierung von Insektenzellen

Die Kultivierung von Sf9-Insektenzellen erfolgte als Monolayerkultur in Plastikkulturflaschen bei 27°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre ohne zusätzliche CO₂-Begasung. Eine Mediuernerneuerung wurde alle 3 Tage durchgeführt. Das Subkultivieren erfolgte nach Abklopfen der Zellen vom Kulturflaschenboden, wie unter B.2.1.1 beschrieben, mit einem Subkulturintervall von 6 - 7 Tagen.

2.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Die Langzeitlagerung der Zelllinien erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C. Zum Einfrieren wurden die Zellen einer konfluent bewachsenen 175 ml-Kulturflasche, wie unter B.2.1.1 beschrieben, abgelöst, abzentrifugiert (5 min, 500 g) und in 4,5 ml Medium resuspendiert. Dieses Einfriermedium enthielt 10 % DMSO. Aliquote von 1,5 ml wurden in Einfriereröhrchen unter Verwendung eines Einfrierbehälters mit einer Kühlungsrate von 1°C/min auf -80°C gebracht. Nach 24 h konnten die Röhrchen in den Flüssigstickstoffbehälter überführt werden.

Das Auftauen von kryokonservierten Zellen, um diese wieder in Kultur zu bringen, muss im Gegensatz zum Einfrieren, rasch erfolgen. Dazu wurde ein

Einfrierröhrchen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und der Inhalt in 20 ml vorgewärmtes Medium (37°C) überführt und abzentrifugiert (5 min, 500 g). Nach dem Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet in 25 ml Medium (37°C) resuspendiert und die Suspension in einer 175 ml-Kulturflasche ausgesät. Ein erster Mediumwechsel erfolgte nach 24 h.

2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mit Hilfe eines Hämocytometers (Neubauer-Zählkammer) durchgeführt. Zur tot/lebend-Differenzierung wurden 100 µl der zu bestimmenden Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit einer 0,05 %igen Trypanblau-Lösung verdünnt. Der Farbstoff Trypanblau passiert nur die Plasmamembran nekrotischer Zellen, so dass diese im Gegensatz zu vitalen Zellen blau angefärbt wurden. Von dieser Verdünnung wurden 10 µl so in die gereinigte Zählkammer gefüllt, dass die Kapillarkräfte die Suspension selbst in den Zwischenraum zwischen Deckglas und Kammer saugten. Unter dem Mikroskop wurden dann bei 100facher Vergrößerung die Zellen in den äußeren 4 Großquadraten ausgezählt. Die Zellzahl (N) pro Milliliter Suspension ergab sich nach folgender Formel:

$$N = \frac{n \cdot 10^4 \cdot VF}{4}$$

N = Zellzahl pro Milliliter Suspension

n = Zellzahl der äußeren 4 Großquadrate

VF = Verdünnungsfaktor

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) nach Mullis und Faloona (1987) ist eine Methode zur *in vitro* Amplifikation beliebiger Nukleinsäureabschnitte. Dabei wird zunächst doppelsträngige DNA durch Erhitzen denaturiert, das heißt in zwei Einzelstränge aufgeschmolzen. Nach Absenken der Temperatur hybridisieren kurze, zu bestimmten Abschnitten komplementäre Oligonukleotide (Primer) mit den Einzelsträngen. Dies wird als *Annealing* bezeichnet. Beim darauf folgenden Schritt der Elongation verlängert die

eingesetzte hitzestabile DNA-Polymerase die Primer von 5´ nach 3´ komplementär zum jeweiligen Einzelstrang. Diese drei temperaturabhängigen Schritte Denaturierung, *Annealing* und Elongation bilden einen Zyklus, der mit Hilfe eines „Thermocyclers“ mehrfach durchlaufen wird. Da auch die neu gebildeten DNA-Stränge wieder als Matrize (*Template*) dienen, ist der Grad der Amplifikation exponentiell.

Standard-PCR-Protokoll:

Ein Ansatz enthielt 5 – 50 ng *Template*-DNA, je 100 ng *sense* und *antisense* Primer, 1 µmol dNTPs, 1 U Polymerase und Reaktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Folgendes Standard-Temperaturprogramm wurde benutzt:

1. initiale Denaturierung	4 min	94°C
2. Denaturierung	30 – 60 s	95°C
3. <i>Annealing</i>	15 – 60 s	50 – 70°C
4. Elongation	1 min/kb	68 – 70°C

Die Schritte 2 – 4 wurden 20 – 40x wiederholt.

Das genaue Temperaturprofil wurde durch die Schmelztemperatur (T_m) der Primer und die Basenzusammensetzung der *Template*-DNA bestimmt.

2.2.2 Gerichtete Mutagenese

Der gezielte Basenaustausch innerhalb einer cDNA-Sequenz mit dem Ziel eine bestimmte Aminosäure im resultierenden Protein durch eine definierte andere zu ersetzen wird als gerichtete Mutagenese bezeichnet. Alle in dieser Arbeit beschriebenen Mutanten wurden unter Verwendung des „QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kits“ nach Herstellerangaben erzeugt. Die diesem Kit zugrunde liegende Methode ist eine Variante der PCR, bei der die DNA mittels spezieller, die Mutation tragender Primer amplifiziert wird. Die parentale *Template*-DNA wird im Anschluss an die PCR-Reaktion durch das Restriktionsenzym *DpnI* selektiv verdaut (B.2.2.9). Da die *Template*-DNA aus einer Plasmid-Präparation stammt, also in *Escherichia coli* repliziert wurde, trägt nur sie die für eine *DpnI*-Restriktion entscheidende Methylierung an der Base Guanin. Im Anschluss an den Verdau des Mutterstrangs kann der Ansatz, der jetzt nur noch die mutierte DNA

enthält, für eine Hitzeschock-Transformation kompetenter Bakterien (B.2.2.4) benutzt werden.

Auswahl der Mutagenese-Primer

Die verwendeten Mutagenese-Primer (F.1) wurden von der Firma MWG synthetisiert und nach folgenden Kriterien ausgewählt:

- *sense* und *antisense* Primer müssen den/die gewünschten Basenaustausch(e) enthalten
- die Primer müssen eine Länge zwischen 25 und 45 Basen haben
- die Primer sollten mit den Basen Guanin oder Cytosin enden
- der Guanin/Cytosin-Anteil (% GC) der Primer sollte mindestens 40 % betragen
- der/die Basenaustausch(e) sollten in der Mitte des Primers liegen, mit mindestens 10 – 15 Basen Abstand zu den Enden
- die Primer sollten eine Schmelztemperatur (T_m) $\geq 78^\circ\text{C}$ haben, wobei sich T_m nach folgender Formel berechnet:

$$T_m = 81,5 + 0,41 \times (\% \text{ GC}) - 675 / N - \% \text{ mismatch}$$

% GC und % *mismatch* sind ganze Zahlen.

N = Primerlänge in Basen

% *mismatch* = prozentualer Anteil der ausgetauschten Basen

2.2.3 DNA-Sequenzierung

Zur Kontrolle auf zufällig aufgetretene, unerwünschte Punktmutationen während einer gerichteten Mutagenese wurde jeweils eine Sequenzierung der Gesamtsequenz von der Firma MWG durchgeführt. Eine Erfolgskontrolle der gewünschten Punktmutation konnte durch Sequenzieren unter Verwendung des „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ (Amersham) schnell durchgeführt werden. Das dabei angewandte Prinzip war eine Kettenabbruchsequenzierung nach Sanger et al. (1977) mittels Didesoxynukleotiden und Fluoreszenzfarbstoff-markierten Primern (IRD 800).

Zunächst wurde ein Ansatz bestehend aus DNA (1 μg), 2 pmol Primer (IRD 800) und 0,7 μl DMSO mit H_2O auf 21 μl Gesamtvolumen aufgefüllt. Von dieser DNA/Primer-Mischung wurden jeweils 4,5 μl zu 1,5 μl des A-, G-, C- und T-

Reagenzes in 4 separaten 500 µl-Reaktionsgefäßen pipettiert und mit 15 µl Mineralöl überschichtet. Die nachfolgenden Schritte fanden in einem Thermocycler statt:

1. initiale Denaturierung	2 min	95°C
2. Denaturierung	15 s	95°C
3. <i>Annealing</i>	15 s	Temperatur = $T_m(\text{Primer}) + 3^\circ\text{C}$
4. Elongation	15 s	70°C

Die Schritte 2 – 4 wurden 30x wiederholt.

Die mit 4 µl Stop-Puffer versetzten Proben wurden durch Pipettieren auf Parafilm vom Mineralöl befreit und auf ein nach Vorschrift von MWG hergestelltes Sequenziergel (Sequagel XR, National Diagnostics) aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung und die Detektion der markierten Fragmente erfolgte im LI-COR DNA Sequencer 4200 (MWG) nach Vorschrift von MWG.

2.2.4 Hitzeschock-Transformation kompetenter Bakterien

Chemisch kompetente Bakterien, wie die verwendeten Stämme XL1-Blue (Stratagene) und NovaBlue (Novagen), sind in der Lage Plasmid-DNA durch Hitzeschock-Transformation aufzunehmen und zu replizieren (Bergmans et al. 1981). Dazu wurde zunächst ein Aliquot (50 µl) der Bakterien langsam auf Eis aufgetaut und 1 µl Plasmid-DNA-Lösung (50 – 100 ng) zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz 30 min bei 4°C inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 45 s bei exakt 42°C, gefolgt von 2 min Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 500 µl SOC-Medium (ohne Antibiotikum) folgte eine Inkubation bei 37°C im Schüttler. Während dieser Zeit exprimierten die transformierten Bakterien die für die Selektion entscheidenden Resistenzfaktoren. Von diesem Ansatz wurden abschließend 250 µl auf einer Agar-Platte, die das entsprechende Antibiotikum enthielt, ausgestrichen und für 12 h bei 37°C inkubiert. Die mit Einzelkolonien bewachsenen Platten waren unter Luftausschluß bei 4°C für 4 Wochen lagerbar.

2.2.5 Bakterien-Dauerkulturen

Zur Herstellung einer Bakterien-Dauerkultur wurden 3 ml LB/Amp-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und der Ansatz bei 37°C über Nacht im Schüttler

inkubiert. Von der entstandenen Flüssigkultur wurden 300 µl mit 700 µl Glycerin (50%, steril) in einem Einfriergefäß vorsichtig vermischt und 15 min bei 20°C inkubiert. Das Glycerin verhindert die Bildung von Eiskristallen, die während des Einfrierprozesses die Bakterienzelle schädigen würden. Anschließend wurde die Mischung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA

2.2.6.1 Plasmid Mini-Präparation

Zur Präparation geringer Mengen Plasmid-DNA (5 – 15 µg) aus 2 ml Bakterien-Übernachtskultur wurde das „Fast Plasmid Mini Kit“ (Eppendorf) verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Bei diesem Verfahren werden die Bakterien zunächst alkalisch lysiert und die Plasmid-DNA aus dem Lysat nach Aufreinigung über ein Säulchen mit Silicagel-Matrix gewonnen.

2.2.6.2 Plasmid Maxi-Präparation

In Analogie zur Mini-Präparation wurde zur Gewinnung einer größeren Menge Plasmid-DNA (500 – 1000 µg) eine Maxi-Präparation durchgeführt. Dazu wurde das „GenElute HP Plasmid Maxiprep Kit“ (Sigma) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Die hierzu benötigten 150 ml Übernachtskultur wurden mit 100 µl einer vorausgegangenen Mini-Präparation (B.2.2.6.1) angeimpft. Die von der Silicagel-Säule eluierte DNA wurde zur Reinigung mit Ethanol präzipitiert (B.2.2.7). Nach dem Lösen in H₂O wurde die Konzentration auf 1 µg/µl eingestellt (B.2.2.8).

2.2.7 Ethanolpräzipitation von DNA

Die gebräuchlichste Methode zur Konzentrierung und Reinigung von Nukleinsäuren ist die Präzipitation mit Ethanol. In Gegenwart monovalenter Kationen (hier: Na⁺) bildet DNA in Ethanol einen unlöslichen Niederschlag, der durch Zentrifugation isoliert wird. Zur wässrigen Nukleinsäurelösung wurde das 2,5-fache Volumen eiskalten Ethanols (96 %) und 1/10 Volumenteil Natriumacetat-Lösung (3 M, pH 5,2) zugegeben. Der Fällungsansatz wurde bei -20°C für 12 h inkubiert und anschließend zentrifugiert (13 000 g, 4°C). Zum Entfernen des mitgefällten Salzes wurde das Nukleinsäurepellet anschließend mit 3 ml eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren (13 000 g, 4°C) wurde

das Pellet in der SpeedVac (Savant) durch Evakuieren kurz (5 min) getrocknet und in 200 μl H_2O gelöst.

2.2.8 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA basiert auf dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei 260 nm. In einer Quarzküvette von 1 cm Schichtdicke besitzt eine Lösung, die 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doppelsträngige DNA enthält, bei dieser Wellenlänge einen Absorptionswert von $A_{260} = 1$. Auf der Grundlage des Lambert-Beerschen Gesetzes kann somit die Konzentration einer unbekanntes DNA-Lösung bestimmt werden.

Die Messungen erfolgten mit dem Photometer GeneQuant II (Pharmacia) nach Kalibrierung mit dem jeweiligen Lösungsmittel der Proben. Dabei wurde die Verdünnung einer Probe so gewählt, dass der gemessene Extinktionswert im Bereich von 0,1 – 1,0 lag. Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt, basierend auf der Absorption der aromatischen Aminosäurereste, bei 280 nm. Durch Bestimmung des Verhältnisses der Absorption sowohl bei 260 nm als auch bei 280 nm ließ sich die Reinheit der DNA-Lösung abschätzen, dabei zeigte eine reine DNA-Lösung einen A_{260}/A_{280} -Wert zwischen 1,8 – 1,9.

2.2.9 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsenzyme sind bakterielle Endonukleasen, die nach Bindung an spezifische Erkennungssequenzen, die Phosphordiesterbindungen beider Stränge eines DNA-Moleküls hydrolytisch spalten. Dabei können Fragmente mit einzelsträngigen (kohäsiven) Überhängen („*sticky ends*“) oder überhanglose Fragmente („*blund ends*“) entstehen. Die Restriktionen wurden unter Verwendung des jeweils erforderlichen Puffers mit einer Enzymmenge von 1 U/ μg DNA bei 37°C für 1 h durchgeführt.

2.2.10 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren unterschiedlicher Größe voneinander getrennt werden. Sie kann zur relativ genauen und reproduzierbaren Größenbestimmung linearer DNA-Fragmente genutzt werden. Dabei besteht über einen weiten Größenbereich der DNA eine lineare Abhängigkeit zwischen dem Logarithmus der Länge des Fragments (in bp) und der relativen Wanderungsdistanz (in cm, bezogen auf die gesamte

Wanderungsstrecke) im Agarosegel. Die Größenbestimmung erfolgte anhand eines mitaufgetragenen Längenstandards. Es wurden routinemäßig 0,7 – 1,0 %ige Agarosegele verwendet. Zu deren Herstellung wurde die Agarose in TBE-Puffer aufgekocht, die Lösung mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) versetzt und zum Gelieren in eine horizontale Flachbettgelkammer gegossen. Die Proben und der Längenmarker wurden mit DNA-Probenpuffer versetzt, aufgetragen und die Elektrophorese bei 1 – 5 V / cm mit TBE-Puffer als Laufpuffer durchgeführt.

Der planare Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und macht diese im Gel unter UV-Licht (254-366 nm) sichtbar. So lassen sich in Agarosegelen durch Färbung mit Ethidiumbromid noch 10 bis 20 ng doppelsträngige DNA nachweisen (Gottlieb und Chavko 1987).

2.2.11 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Bande des gewünschten, unter UV-Licht (254 nm) sichtbaren DNA-Fragments wurde mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Zur Extraktion der DNA aus diesem Gelstück wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.12 Subklonierung von DNA

Idealerweise können zum Herausschneiden des zu subklonierenden Fragments aus dem Spendervektor und zum Linearisieren des Empfängervektors die gleichen oder kompatible Restriktionsenzyme benutzt werden. Besaßen die beiden Vektoren keine identischen Schnittstellen, konnten per PCR entsprechende Restriktionsenzym-Erkennungssequenzen an ein DNA-Fragment angehängt werden. Dabei wurden Primer verwendet, die die Sequenz der Schnittstelle am 5´-Ende als überhängendes Ende trugen. Das entstandene PCR-Produkt und der Empfängervektor wurde anschließend mit dem entsprechenden Restriktionsenzym geschnitten, nach Auftrennung im Agarosegel (B.2.2.10) mit Ethanol präzipitiert (B.2.2.7) und schließlich ligiert. Die Ligation erfolgte nach Angaben des Herstellers durch das Enzym T4-DNA-Ligase, das Bestandteil des „Original TA-Cloning Kits“ (Invitrogen) war. Der Ligationsansatz konnte direkt zur Transformation von kompetenten Bakterien genutzt werden (B.2.2.4).

2.2.13 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen

Die transiente Transfektion von HEK293-Zellen erfolgte mit dem Reagenz TransIT-293 (Mirus) per Lipofektion. Für Aufnahme- und Bindungsversuche (B.2.5.1 und B.2.5.2) wurden 5×10^5 Zellen in 450 μl Medium ohne P/S pro Vertiefung in einer 24er Multiwell-Platte 24 h vor der Transfektion ausgesät. Die Konfluenz der Zellen musste am Tag der Transfektion 50 – 60 % betragen. Pro Vertiefung wurden zunächst 20 μl Medium ohne FKS und P/S mit 1,2 μl TransIT-293 gemischt. Nach 10 min Inkubation bei 20°C wurden 0,4 μl DNA-Lösung (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) zugegeben und nach vorsichtigem Mischen weitere 15 min bei 20°C inkubiert. Dieser Transfektionsansatz wurde schließlich tropfenweise zu den Zellen pipettiert.

Die Transfektion von ganzen Zellkulturflaschen erfolgte in analoger Weise ausgehend von einem entsprechend größeren Transfektionsansatz. Für eine 175-cm² Flasche wurden 1,8 ml Medium ohne FKS und P/S, 110 μl TransIT-293 und 37 μl DNA-Lösung (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) eingesetzt.

2.2.14 Erzeugung eines rekombinanten Baculovirus zur Infektion von Sf9-Zellen

Für die Versuche zur Überexpression des hNAT-Proteins in Sf9-Insektenzellen wurde das Prinzip der Baculovirus-Transfektion verwendet. Der dafür benötigte rekombinante Baculovirus wurde unter Verwendung des „BaculoDirect Expression Kits“ (Invitrogen) hergestellt.

2.2.14.1 Herstellung rekombinanter Baculovirus-DNA mittels Gateway®-Technologie

Das „BaculoDirect Expression Kit“ ermöglicht den direkten *in vitro*-Transfer einer bestimmten DNA-Sequenz in das linearisierte Baculovirusgenom unter Verwendung der Gateway®-Technologie. Die Gateway®-Technologie ist eine universelle Klonierungsmethode, die auf dem gerichteten Rekombinationssystem des Bakteriophagen Lambda basiert (Landy 1989). Sie ermöglicht eine schnelle und effiziente Subklonierung, unabhängig von Restriktionsschnittstellen. Dabei findet, vermittelt über bestimmte Rekombinationsenzyme, ein konservativer, intermolekularer Austausch zweier DNA-Sequenzen statt, die von spezifischen Konsensussequenzen, den so genannten *att-sites* (engl. Abkürzung für *attachment-sites*), flankiert werden.

Die gewünschte DNA-Sequenz musste zunächst in den Donor-Vektor pENTR3C (Invitrogen) zwischen die darauf enthaltenen Konsensussequenzen *attL1* und *attL2* subkloniert werden (B.2.2.12). Das linearisierte Baculovirusgenom, das den Zielvektor darstellte, enthielt die für die Rekombination notwendigen homologen Bereiche *attR1* und *attR2*. Für die LR-Rekombinationsreaktion wurden 10 µl Baculovirus-DNA (30 ng/µl), 2 µl Donor-Vektor-Lösung (100 ng/µl), 4 µl TE-Puffer und 4 µl „LR Clonase II Enzym Mix“ vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde für 12 h bei 25°C inkubiert. Eine erfolgreiche Rekombination konnte per PCR (B.2.2.1) nachgewiesen werden.

2.2.14.2 Transfektion von Sf9-Zellen und Isolierung von rekombinalem Baculovirus

Zur Erzeugung rekombinanter Baculoviren wurden 8×10^5 Sf9-Insektenzellen in 2 ml Sf-900 II SFM Medium pro Vertiefung in einer 6er Multiwell-Kulturschale ausgesät und unter Verwendung von Cellfectin Reagent (Invitrogen) gemäß den Herstellerangaben mit rekombinanter Baculovirus-DNA aus 2 µl Rekombinationsansatz transfiziert.

Die Zellen wurden anschließend bei 27°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert und täglich auf Anzeichen einer viralen Infektion unter dem Mikroskop untersucht. Diese Inkubation erfolgte in Anwesenheit von 100 µM Ganciclovir. Ganciclovir ist ein Nukleotid-Analogon, das enzymatisch durch die Herpes Simplex Virus Typ 1 Thymidin-Kinase (HSV1 tk) phosphoryliert wird und in dieser aktivierten Form in die DNA inkorporiert, deren Replikation hemmt. Bei einer erfolgreichen Rekombinationsreaktion wird das HSV tk1-Gen aus dem Baculovirusgenom durch das Zielgen ersetzt. Dadurch kann eine Ganciclovir-Negativ-Selektion gegen nicht-rekombinanten Baculovirus erfolgen, womit die Durchführung eines „Plaque-Assays“ überflüssig wird.

Im späten Stadium der Infektion (120 h *post infectionem* [p. i.]) wurde das virushaltige Inoculum P1 in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt, zentrifugiert (10 min, 1000 g) und der Überstand unter Zusatz von 10 % FKS bei -80°C in 500 µl-Aliquoten gelagert. Zur Erzeugung eines Inoculums P2 mit höherem Virustiter wurden Sf9-Zellen, wie oben beschrieben, ausgesät und mit 50 µl Inoculum P1 in Anwesenheit von 100 µmol Ganciclovir infiziert. Der Überstand wurde wie zuvor 120 h p. i. gewonnen.

Die Expressionskontrolle des rekombinanten Proteins erfolgte durch Western-Blot-Analyse (B.1.7.3.4) oder [³H]MPP⁺-Aufnahmeversuche (B.2.5.1). Dazu wurden 5×10^5 Sf9-Zellen in 1 ml Medium pro Vertiefung in einer 24er Multiwell-Platten ausgesät und mit verschiedenen Mengen Inoculum P2 (oder höher) infiziert. Die Expressionskontrollen erfolgten 24, 48, 72, 96 h p. i.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Membranpräparation

Zur Aufreinigung und Trennung des hNAT-Proteins durch elektrophoretische Methoden wurden Zellmembranen von transfizierten HEK293-Zellen mittels Differentialzentrifugation gewonnen. Die Temperatur aller verwendeten Lösungen sowie die Temperatur aller Zentrifugationsschritte betrug 4°C.

Nach Entfernen des Kulturmediums wurden die konfluent gewachsenen Zellen einer 175 ml Kulturflasche nach Zugabe von 5 ml PBS mit einem Zellschaber vom Kulturflaschenboden abgeschabt und durch Zentrifugieren für 5 min bei 1000 g pelletiert. Die pelletierten Zellen wurden in 2 ml PBS mit 1% Proteaseinhibitorcocktail (Serva) resuspendiert und mit einem Zellhomogenisator (Potter, Wheaton) auf Eis homogenisiert. Anschließend wurde das Zellhomogenat durch eine Kanüle (0,4 x 20 mm) in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 1000 g zentrifugiert. Das resultierende Pellet (P1), das aus Zellkernen, Mitochondrien und größeren Zellfragmenten bestand, wurde verworfen. Der Überstand (S1) wurde für 50 min bei 40 000 g zentrifugiert. Das nun erhaltene Pellet (P2) bestand größtenteils aus Plasmamembranen, während der Überstand (S2) lösliche, zytoplasmatische Proteine enthielt. Um Proteine, die adhäsiv an Plasmamembranen gebunden haben zu entfernen, wurde das Pellet P2 in 3 ml einer eiskalten 0,1 M Natriumcarbonat-Lösung (pH 11,5) resuspendiert und die Suspension 30 min auf Eis inkubiert. Diese Carbonatbehandlung bewirkte eine zusätzliche Aufreinigung integraler Membranproteine (Fujiki et al. 1982). Anschließend wurde die Suspension für 50 min bei 40 000 g zentrifugiert und der Überstand (S3) verworfen. Das Pellet (P4) wurde in 3 ml H₂O resuspendiert und erneut für 50 min bei 40 000 g zentrifugiert, um restliches Carbonat auszuwaschen. Das resultierende Pellet (P5), das nun aus gereinigten Plasmamembranen bestand, wurde in 100 µl H₂O resuspendiert, in LoBind-Gefäße (Eppendorf) überführt und der Proteingehalt, wie unter B.2.3.2

beschrieben, bestimmt. Die Membranen wurden dann in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

2.3.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung wurde nach Lowry et al. (1951) durchgeführt. Diese Methode beruht auf zwei Reaktionen, nämlich der Komplexbildung zwischen den Peptidbindungen und Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung (Biuretreaktion) und anschließender Reduktion des gelben Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz durch den biuretähnlichen Komplex. Die resultierende intensive Blaufärbung wird zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration auf der Grundlage des Lambert-Beerschen Gesetzes genutzt.

Zunächst wurden folgende Ansätze hergestellt:

100 μl BSA-Standard (50/100/300/500/700 mg/l) + 100 μl Lysispuffer + 800 μl H_2O
100 μl Proteinprobe + 900 μl H_2O
100 μl Lysispuffer + 900 μl H_2O (Leerwert)

Jeder Ansatz wurde mit 2 ml frisch hergestellter Lösung A (B.1.7.3.5) versetzt und gemischt. Nach 15 min Inkubation bei 20°C wurden 200 μl Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz zugegeben, sofort gemischt und weitere 50 min bei 20°C inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte nach Nullabgleich gegen den proteinfreien Leerwert bei einer Wellenlänge von 750 nm. Mittels der Eichgeraden konnte die Probenkonzentration durch lineare Regression ermittelt werden.

2.3.3 Biotinylierung von Membranproteinen zur Kontrolle der Zelloberflächenexpression

Zur Kontrolle der Zelloberflächenexpression können Membranproteine selektiv, kovalent biotinyliert und anschließend über diese Biotinreste mit Hilfe von Avidin-beschichteter Polymerkügelchen affinitätsgereingt werden.

Die Biotinylierung erfolgte unter Verwendung des „EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin“-Reagenzes (Pierce). Dazu wurden 5×10^7 Zellen in 2 ml PBS resuspendiert und bei 20°C für 30 min mit 80 μl einer 10 mM Sulfo-NHS-SS-Biotin-Lösung inkubiert. Die Zellen wurden anschließend 3 x mit PBS gewaschen. Da das Biotinylierungsreagenz membranimpermeabel ist, fand die Kopplungsreaktion nur an ϵ -Aminogruppen extrazellulärer Lysine von Transmembranproteinen statt.

Die Affinitätsreinigung von biotinyliertem Protein erfolgte anschließend durch „UltraLink immobilized NeutrAvidin“ (Pierce). Die Zellen wurden dafür zunächst in 1,5 ml Lysis-Puffer mit 0,1% Protease-Inhibitor Mix HP (Serva) lysiert und mit 500 µl NeutrAvidin-Suspension für 12 h bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die NeutrAvidin-Polymerkügelchen wurden 3 x mit je 2 ml PBS gewaschen, in 100 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen, mit einem Vortex-Schüttler gemischt und 10 min bei 60°C inkubiert. Nach Abzentrifugieren des NeutrAvidins (5 min bei 5000 g) wurden die Proteine des Überstands durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (B.2.3.4) getrennt und schließlich per Western-Blot-Analyse (B.2.3.8) detektiert.

2.3.4 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Eine denaturierende SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE; SDS: *sodium dodecyl sulfate*, Natriumdodecylsulfat) wurde durchgeführt nach Laemmli (1970) unter Verwendung eines diskontinuierlichen Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystems. Die dabei verwendeten Plattengele (Breite 12 cm x Länge 11 cm x Dicke 1 mm) bestanden aus 8 cm Trenngel und 3 cm Sammelgel folgender Zusammensetzung:

Trenngel (Acrylamid 10 %):

12,5 ml H₂O
7,5 ml Trenngelpuffer
10 ml AA/Bis
15 µl TEMED
150 µl APS

Sammelgel (Acrylamid 3 %):

6 ml H₂O
2,5 ml Sammelgelpuffer
1,5 ml AA/Bis
5 µl TEMED
50 µl APS

Parallel zu den Proben (50 µg Protein in 15 µl Probenpuffer pro Tasche) wurde stets ein farbiger Molekulargewichtsmarker (Fermentas) mit aufgetragen. Sobald die Bromphenolblau-Lauffront das Trenngel erreicht hatte, wurden die Elektrophoresebedingungen von 30 mA bei 80 V auf 60 mA bei 200 V geändert.

2.3.5 2D-Gelelektrophorese

Bei der klassischen 2D-Gelelektrophorese (Klose 1975; O'Farrell 1975) werden die Proteine nach zwei unterschiedlichen Parametern, ihrem isoelektrischen Punkt (*pI*) in der ersten und ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit in der zweiten

Dimension aufgetrennt. Die isoelektrische Fokussierung wurde mit Hilfe von Gelstreifen durchgeführt, die dann zur Entwicklung der zweiten Dimension auf ein SDS-Gel übertragen wurden.

2.3.5.1 Isoelektrische Fokussierung

Während der isoelektrischen Fokussierung (IEF) wandern Proteine im elektrischen Feld durch einen pH-Gradienten, bis sie an den pH-Wert gelangen, an dem ihre Nettoladung und damit ihre elektrophoretische Beweglichkeit Null beträgt. Dies ist der isoelektrische Punkt.

Es wurden Acrylamid-Gelstreifen als Trennmatrix verwendet, diese wurden mit einer Lösung aus freien Trägerampholyten (Serva) (B.1.7.3.2) für 2 h rehydratisiert, wodurch sich nach Anlegen eines elektrischen Feldes ein stabiler pH-Gradient in den Streifen ausbildete. Die Herstellung der Gelstreifen (10 cm x 0,3 cm) erfolgte wie bei Westermeier (2001) beschrieben. Die in Lysispuffer (B.1.7.3.2) gelösten Proteinproben wurden mit Hilfe von Probenplättchen auf das Gel aufgetragen und die IEF auf einer Multiphor II (Pharmacia LKB) durchgeführt.

2.3.5.2 Äquilibration von Gelstreifen für die zweite Dimension

Die Gelstreifen wurden 3 x 5 min in einer Äquilibrationwanne (Bio-Rad) mit TRIS-Puffer gewaschen und anschließend nacheinander 3 x 15 min in je 1 ml Äquilibrationlösung 1, 2 und 3 inkubiert. Ein äquilibrierter Streifen wurde mit Hilfe einer Pinzette auf die Oberkante eines 10 %igen SDS-Gels aufgebracht und die Elektrophorese bei 35 mA für 12 h durchgeführt.

2.3.6 16-BAC-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Ein spezielles 2D-Elektrophoreseverfahren zur Auftrennung integraler Membranproteine ist die Benzyltrimethyl-N-hexadecylammoniumchlorid (16-BAC)/SDS-PAGE (Macfarlane 1989). Bei dieser Methode wird die Tatsache genutzt, dass Proteine entweder kationisch oder anionisch solubilisiert eine unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit aufweisen. So stellt bei diesem Verfahren eine azide Elektrophorese mit dem kationischen Detergenz 16-BAC solubilisierter Proteine die erste Dimension dar, gefolgt von einer konventionellen SDS-PAGE für die zweite Dimension.

Die 16-BAC-PAGE wurde mit Hilfe einer im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Apparatur durchgeführt, die hierbei erstmals die Verwendung von Gelstreifen ermöglichte. Die Durchführung ist im Ergebnisteil unter C.3.2 ausführlich geschildert.

Herstellung neutraler Gelstreifen für die 16-BAC-PAGE

Die Herstellung der neutralen, auf Trägerfolie gebundenen Acrylamidgelstreifen erfolgte, mit Ausnahme weniger Modifikationen, wie bei Westermeier (2001) beschrieben. Die Porengröße ließ sich über die Totalacrylamidkonzentration (T) und den Vernetzungsgrad (C, engl.: *crosslinking*) genau einstellen. Dabei gilt, dass die Porengröße bei konstantem C und steigendem T kleiner wird. Bei konstantem T und steigendem C folgt die Porengröße einer parabolischen Funktion mit großen Poren bei hohen und niedrigen C-Werten, das Minimum liegt bei C = 4 %. T und C ließen sich nach folgenden Formeln berechnen:

$$T = \frac{(a + b) \cdot 100}{V} [\%] \quad C = \frac{b \cdot 100}{a + b} [\%]$$

a = Masse Acrylamid in g

b = Masse *N-N'*-Methylenbisacrylamid in g

V = Volumen in ml

Die Dimensionen der Gießkassette betragen 21 cm x 25 cm, und die Acrylamidgele, die für die Herstellung der Streifen dienten, wurden mit 5 cm Sammelgel (5 % T, 2 % C) und 16 cm Trenngel (Gradient von 4 – 16 % T, 2 % C) hergestellt. Nachdem das polymerisierte Gel mit H₂O gewaschen wurde (3 x 10 min), erfolgte eine Inkubation (15 min) in 2,5 % Glycerol und schließlich die Trocknung innerhalb von 12 h bei 20°C unter Ventilation. Ein 13 µm dicker Schutzfilm (handelsübliche Frischhaltefolie) wurde vorsichtig auf das getrocknete Gel aufgewalzt und dieses mit Hilfe einer Papierschneidemaschine in 3 mm breite und 18 cm lange Streifen zerschnitten. Die so vorgefertigten Streifen konnten bis zu ihrem Gebrauch bei -20°C gelagert werden.

2.3.7 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

In einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennte Proteine konnten mit einer Nachweisgrenze von 200 – 400 ng Protein pro Bande durch Färbung mit Coomassie R250 sichtbar gemacht werden. Dazu wurde das Gel zunächst 30 min in Fixier-Lösung inkubiert, dann 30 min in Coomassie-Blau-Lösung gefärbt und schließlich 1 h in Coomassie-Blau-Entfärbter entfärbt. Alle Schritte fanden bei 20°C auf einem Kippschüttler statt.

2.3.8 Western Blot

Beim so genannten Western Blotting (Towbin et al. 1979) werden die in einem Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine über Elektrotransfer auf eine Trägermembran übertragen und dort für eine nachfolgende Immunodetektion immobilisiert. Dabei bleibt die lokale Auflösung der elektrophoretischen Trennung durch das senkrecht über dem Gel angelegte elektrische Feld erhalten.

Die verwendeten Apparaturen Trans-Blot Cell (BioRad) und Xcell II Blot Module (Invitrogen) ermöglichten das so genannte Tankblotting (Bittner et al. 1980). Die Handhabung der Blotmodule erfolgte nach Angaben der Hersteller. Geblottet wurde auf Nitrocellulose-Membran (Schleicher und Schüll) bei 20°C mit der Trans-Blot Cell für 3 h bei 100 V und mit dem Xcell II Blot Module für 2 h bei 30 V. Nach dem Transfer wurde die Membran zur Kontrolle der Transferleistung für 30 s mit Ponceau S-Lösung inkubiert und anschließend mit H₂O bis zur vollständigen Entfärbung gewaschen. Um eine unspezifische Absorption von Antikörpern zu verhindern, wurde die Membran zunächst für 2 h mit Roti-Blok (Roth) behandelt und schließlich für 24 h bei 4°C auf einem Kippschüttler mit einer Lösung des primären Antikörpers inkubiert. Anschließend wurde die Membran für 3 x 10 min mit Roti-Blok gewaschen. Es folgte die Inkubation (1 h) mit dem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper und mehrere Waschschrte (5 x 10 min mit Roti-Blok und 1 x 10 min mit PBS). Die Detektion erfolgte nach Zugabe von „POD Lumi-Light Western Blotting substrate“ (Roche) auf die Membran entweder im Lumi-Imager (Roche) oder mittels Belichtung eines fotografischen Films.

Folgende Antikörper-Lösungen (in Roti-Blok) wurden verwendet:

primär: Maus monoklonal Anti-NAT IgG (Mab Technologies) 1:1000

sekundär: Esel monoklonal Anti-Maus IgG-HRP (Bio-Rad) 1:5000

oder

primär: Ziege polykolnal Anti-NAT IgG (Santa Cruz) 1:1000

sekundär: Esel monoklonal Anti-Ziege IgG-HRP (Santa Cruz) 1:10000

2.3.9 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen

Die Identifizierung von Proteinen aus 2D 16-BAC/SDS-Gelen per Matrix-unterstützter Laserdesorption/ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (engl.: *Matrix-assisted Laser-Desorption Ionisation time-of-flight mass spectrometry*, MALDI-TOF-MS) wurde freundlicherweise von Frau Dr. Julia Grabitzki aus dem Institut für Biochemie des Universitätsklinikums Giessen durchgeführt.

Die Coomassie-gefärbten Protein-Spots wurden dafür zunächst mit Hilfe eines ExQuest (Biorad) „Spotauschneiders“ aus dem Gel gestanzt und in 100 µl H₂O in LoBind Reaktionsgefäße überführt. Unter Schütteln wurde das Gelmaterial mit 100 µl 50 mM NH₄HCO₃ gewaschen und anschließend mit dem gleichen Puffer, der zusätzlich 50 % wässriges Acetonitril enthielt, entfärbt. Nach dem Entfernen dieser Lösung bewirkte die Zugabe von 30 µl Acetonitril ein Schrumpfen der Gelstückchen, die anschließend in der Vakuumzentrifuge getrocknet wurden. Der tryptische Verdau der Proben erfolgte innerhalb von 12 h bei 37°C mit 0,5 µg Trypsin in 25 µl 25 mM NH₄HCO₃. Die Peptide wurden schließlich mit 10 µl 0,1%iger Trifluoressigsäure aus dem Gelmaterial extrahiert und bei -20°C bis zu ihrem weiteren Gebrauch gelagert.

Als Matrix diente 2,5-Dihydroxybenzoesäure in 50 % Acetonitril / 1 % Phosphorsäure. Die MALDI-TOF-MS-Messungen wurden mit einem Ultraflex TOF/TOF (Bruker) Massenspektrometer durchgeführt. Das Gerät war ausgestattet mit einem Stickstoff-Laser und einer LIFT-MS/MS Vorrichtung. Die Messungen erfolgten im positiven „Reflektron“-Modus und ergaben Summenspektren, die aus 200 – 400 Einzelspektren bestanden.

Die Proteine wurden anhand der *Fingerprint*-Massenspektren ihrer tryptischen Peptide unter Verwendung der MASCOT MSDB-Datenbank (www.matrixscience.com) identifiziert (Perkins et al. 1999). Die Irrtumswahrscheinlichkeit bei so identifizierten Proteinen wurde entsprechend des

MOWSE (*molecular weight search*)-basierten Scores errechnet (Pappin et al. 1993). Dabei handelt es sich um einen in der MASCOT Software integrierten Algorithmus. Ein Score von ≥ 74 entsprach einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\leq 5\%$.

Die Analyse von Proteinen aus 2D IEF/SDS-Gelen per MALDI-TOF-MS wurde als Dienstleistung vom Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg durchgeführt.

2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Ermittlung der subzellulären Lokalisation verschiedener GFP-gekoppelter hNAT-Varianten wurden HEK293-Zellen zunächst auf runden Deckgläschen ($\varnothing = 1,5$ cm; Dicke = 0,2 mm) in 24er Multiwell-Platten ausgesät und mit der jeweiligen cDNA der zu untersuchenden hNAT-Variante im Vektor pcDNA3.1 NT-GFP transient transfiziert. Nach 48 h wurden die auf den Deckgläschen adhärent wachsenden Zellen kurz (etwa 1 s) mit MES/EDTA-Puffer (37°C) gewaschen und anschließend für 20 min bei 37°C mit einer Lösung aus 3 % Paraformaldehyd in MES/EDTA-Puffer fixiert. Zum Anfertigen eines Präparates wurde das Deckgläschen (Zellen nach unten) in einen Tropfen (10 μ l) Mowiol 4-88 (Roth), der auf einen Objektträger (76 mm x 26 mm) aufgebracht war, gelegt und schließlich bei 4°C für 12 h getrocknet.

Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. D. O. Fürst am Institut für Zellbiologie der Universität Bonn durchgeführt. Verwendet wurde ein inverses Fluoreszenzmikroskop vom Typ Eclipse TE 2000-E (Nikon). Gemäß dem Exzitationsmaximum des *Cycle 3 GFPs* wurde eine Anregungswellenlänge von 395 nm gewählt. Das Emissionsmaximum lag bei 507 nm.

2.5 Pharmakologische Methoden

2.5.1 Aufnahmeversuche

2.5.1.1 [³H]Monoaminaufnahmeversuche

Die [³H]Monoaminaufnahme ([³H]Noradrenalin oder [³H]MPP⁺) wurde in HEK293-Zellen bestimmt, die nach stabiler oder transienter Transfektion den entsprechenden Transporter oder die Transporter-Variante exprimierten. Zunächst wurde das Zellkultur-Medium von den 24er Multiwell-Platten abgesaugt und die Zellen 3 x mit je 1 ml KRH-Puffer gewaschen. Bei Versuchen mit [³H]NA enthielt der Puffer zusätzlich 1 mM Ascorbinsäure, 10 µM U-0591 (Catechol-O-Methyltransferase-Inhibitor) und 1 µM Pargyline (Monoaminoxidase-Inhibitor). Die Temperatur aller Wasch- und Inkubationsschritte betrug 37°C. Die Zellen wurden für die jeweils angegebene Zeit mit einer Lösung der Testsubstanz vorinkubiert und anschließend, je nach Versuchsbedingungen, mit KRH-Puffer gewaschen. Die [³H]Monoaminaufnahme wurde durch Zugabe von 10 nM [³H]NA oder [³H]MPP⁺ gestartet. Das Beenden dieser Hauptinkubation erfolgte nach genau 10 min durch Absaugen der Inkubationslösung und 3maliges Waschen mit 4°C kaltem KRH-Puffer.

Bei Versuchen zur Ermittlung der Auswaschbarkeit von Substanzen von HEK293-Zellen, die einen bestimmten Transporter exprimierten, wurden nach der Vorinkubation die im Einzelnen angegebenen Waschzeiten eingehalten. Für die Bestimmung der halbmaximalen Hemmkonzentration (IC₅₀) und des Hill-Koeffizienten (n_H) wurden die zu untersuchenden Substanzen in ansteigenden Konzentrationen eingesetzt und waren dabei während Vor- und Hauptinkubation anwesend. Zur Bestimmung der Zeit bis zur halbmaximalen Hemmung (t_{1/2}) wurden verschiedene Vorinkubationszeiten mit einer bestimmten Konzentration der Testsubstanz gewählt. Für die Bestimmung der maximalen Aufnahmegeschwindigkeit (V_{max}) und der Michaelis-Menten-Konstanten (K_m) wurde eine 2minütige Hauptinkubation mit ansteigenden Konzentrationen [³H]MPP⁺ (0,01/ 0,5/ 1/ 2,5/ 5/ 10 µM) durchgeführt.

Anschließend wurden die Zellen mit 500 µl 0,1 % Triton X-100 Lösung pro Vertiefung lysiert. In einem Zählröhrchen (Packard) wurden 300 µl dieses Zelllysates mit 5 ml Szintillationscocktail gemischt und die enthaltene Radioaktivität durch Ermittlung der dpm-Werte (dpm: *desintegrations per minute*)

mit Hilfe eines LS 5000 TD Flüssigszintillationszählers (Beckman) quantifiziert. Ein Aliquot von 100 µl wurde für die Proteinbestimmung (B.2.3.2) benutzt.

Die spezifische Monoaminaufnahme durch einen Transporter wurde als Differenz der Aufnahme des Substrats in Abwesenheit und Gegenwart eines spezifischen Inhibitors ermittelt. Alle Experimente wurden als Dreifach- oder Vierfachbestimmung durchgeführt und mindestens dreimal wiederholt.

2.5.1.2 Protektionsversuche zur Aufnahme

Verschiedene Substrate und Nicht-Substrat-Liganden wurden bezüglich ihrer Fähigkeit getestet, die NA-Aufnahme vor einer irreversiblen Inhibition durch N-Ethylmaleimid (NEM) oder DSP4 zu protektieren. Dafür wurden in 24er Multiwell-Platten ausgesäte HEK293-hNAT Zellen 15 min bei 37°C in Gegenwart einer potentiellen Protektor-Substanz (30 µM oder 1 mM) vorinkubiert. Während eines zweiten Vorinkubationsschrittes (90 min, 37°C) waren zusätzlich 150 µM NEM oder 30 µM DSP4 anwesend. Zellen, die nur mit der potentiellen Protektor-Substanz behandelt wurden, dienten als Kontrolle. Anschließend wurden die Zellen 5 x 5 min mit KRH-Puffer (37°C) gewaschen und für 10 min bei 37°C mit 10 nM [³H]NA in KRH-Puffer inkubiert. Das Beenden dieser Inkubation und die Bestimmung der Radioaktivität und des Proteingehalts erfolgten wie unter B.2.5.1.1 beschrieben.

2.5.1.3 ⁸⁶Rb⁺-Aufnahmeversuche (Na⁺/K⁺-ATPase-Versuche)

Die ⁸⁶Rb⁺-Aufnahme in HEK293-Zellen wurde genutzt, um die Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität zu bestimmen und den Einfluss bestimmter Substanzen auf diesen Parameter zu ermitteln.

Die Versuche wurden wie [³H]Monoaminaufnahmeversuche durchgeführt, mit Ausnahme der im Folgenden aufgeführten Unterschiede. Alle Experimente fanden hinter einer Bleiabschirmung statt. Die Zellen wurden in 12er Multiwell-Platten ausgesät. Nach einer Vorinkubation mit der Testsubstanz wurden die Zellen pro Vertiefung mit 500 µl KRH-Puffer, der ⁸⁶Rb⁺ (1 µCi/ml) enthielt, für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen, wie unter B.2.5.1.1 beschrieben, gewaschen und mit 750 µl 0,1 % Triton X-100 pro Vertiefung lysiert. Die Bestimmung der aufgenommenen Radioaktivität erfolgte aus 500 µl des Lysates mit Hilfe eines LS 5000 TD Flüssigszintillationszählers (Beckman).

2.5.2 Bindungsversuche

2.5.2.1 [³H]Nisoxetin-Bindungsversuche

Zur Bestimmung der [³H]Nisoxetin-Bindung (Tejani-Butt 1992) und ihrer Hemmung durch Testsubstanzen wurden in 24er Multiwell-Platten ausgesäte HEK293-Zellen verwendet, die nach transienter Transfektion entweder den hNAT-WT oder eine hNAT-Mutante exprimierten. Für die Bestimmung von IC₅₀-Werten wurden die Zellen 3 x mit KRH-Puffer (37°C) gewaschen und für 15 bzw. 90 min mit ansteigenden Konzentrationen der Testsubstanz in KRH-Puffer (37°C) inkubiert. Zur Bestimmung des Zeitverlaufs der Inhibition wurden ansteigende Vorinkubationszeiten mit einer Konzentration der Testsubstanz gewählt. Nach dem Waschen der Zellen (5 x 5 min) mit KRH-Puffer (37°C) folgte eine Hauptinkubation für 90 min bei 4°C mit 1 nM [³H]Nisoxetin. Bei Sättigungsexperimenten zur Ermittlung der Dissoziationskonstanten (K_D) und der Anzahl spezifischer Bindungsstellen (B_{max}) wurden die Zellen mit ansteigenden Konzentrationen (1, 3, 10, 20, 30 nM) [³H]Nisoxetin inkubiert.

Das Beenden der Hauptinkubation und die anschließende Bestimmung der gebundenen Radioaktivität und des Proteingehalts erfolgte wie unter B.2.5.1.1 beschrieben. Die unspezifische Bindung wurde bestimmt als Bindung in Gegenwart von 10 µM Desipramin (~2 000 x K_i) und von der jeweiligen Totalbindung subtrahiert.

2.5.2.2 Protektionsversuche zur Bindung

Verschieden Substrate und Nicht-Substrat-Inhibitoren des hNAT wurden getestet, inwiefern sie vor einer irreversiblen Inaktivierung der [³H]Nisoxetin-Bindung durch NEM protektieren. Dazu wurden in 24er Multiwell-Platten ausgesäte, transient transfizierte HEK293-hNAT-Zellen 3 x mit KRH-Puffer gewaschen und 15 min bei 4°C bzw. 37°C mit der potentiellen Protektorsubstanz (1 mM in KRH) vorinkubiert. Während einer zweiten Vorinkubation (90 min, 4°C bzw. 37°C) waren zusätzlich 5 mM NEM anwesend. Als Kontrolle dienten homolog, allerdings in Abwesenheit von NEM, behandelte Zellen. Alle nachfolgenden Schritte wurden durchgeführt wie unter B.2.5.1.1 beschrieben.

2.5.3 Zytotoxizitätstests

2.5.3.1 ATP-Test

Für die Bestimmung des ATP-Gehalts vitaler Zellen wurde das „CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay“ (Promega) Reagenz eingesetzt. Der Versuch basierte auf der Luciferase/Luciferin-Reaktion (Abbildung 5) bei der in Gegenwart von Mg^{2+} und ATP Oxyluciferin entsteht und Energie in Form von Lumineszenz freigesetzt wird (Conti et al. 1996). Da die Luciferase-Reaktion ATP benötigt, ist die Lumineszenz proportional zum Gehalt an zellulärem ATP und somit ein Indikator für die metabolische Aktivität einer Zelle (Crouch et al. 1993). Das emittierte Lumineszenz-Licht wurde mit einem Centro LB 960 (Berthold) Luminometer gemessen. Für EC_{50} -Bestimmungen wurden 2×10^4 Zellen in 90 μ l steril-filtriertem KRH-Puffer pro Vertiefung in einer 96er Multiwell-Platte ausplattiert und 10 μ l der Testlösung (10 x Testkonzentration in KRH-Puffer) zugegeben. Nach vorsichtigem Schütteln wurden die Platten bei 37°C unter 5 % CO_2 für 90 min bzw. 24 h inkubiert. Für die Bestimmung von $t_{1/2}$ der ATP-Reduktion wurden verschiedene Inkubationszeiten mit einer Testkonzentration gewählt. Nach der Vorinkubation wurden pro Vertiefung 100 μ l CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay-Reagenz zugegeben und die Platten unter leichtem Schütteln bei 20°C in Dunkelheit für 10 min inkubiert. Danach erfolgte die Messung der Lumineszenz mit einer Messdauer von 1 s pro Vertiefung. Alle Experimente wurden als Vierfachbestimmung durchgeführt und mindestens dreimal wiederholt.

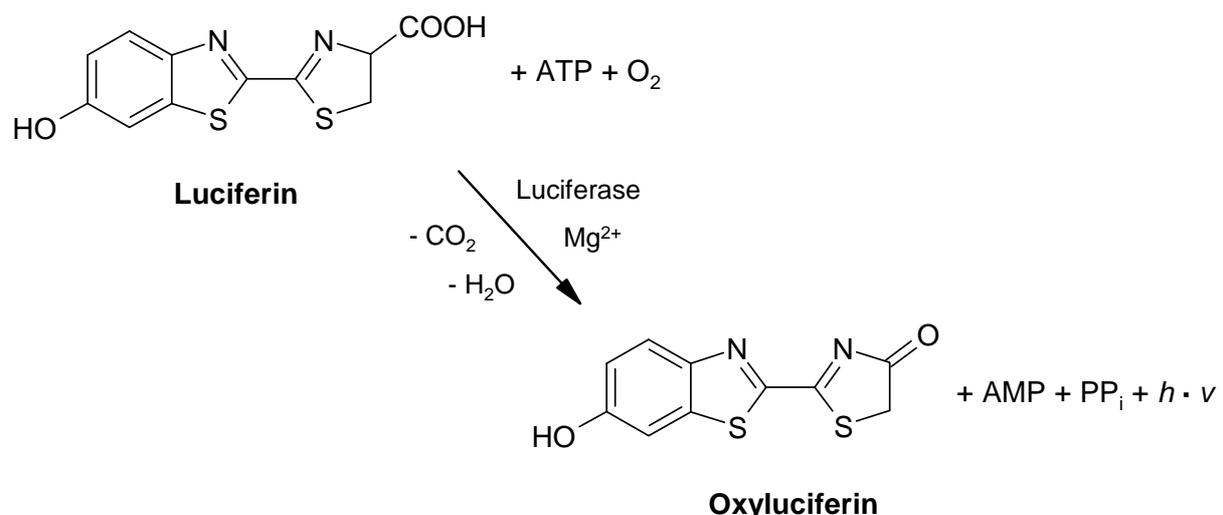


Abbildung 5: Luciferase/Luciferin-Reaktion

2.5.3.2 MTT-Test

Dieser kolorimetrische Zytotoxizitätstest basiert auf der Reduktion des gelben Tetrazoliumsalses MTT zum blau-violetten MTT-Formazan durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase vitaler Zellen (Abbildung 6). Die Extinktion des gelösten Formazans bei einer Wellenlänge von 550 nm ist dabei direkt proportional zur Anzahl vitaler Zellen und deren Stoffwechselaktivität (Mosmann 1983).

Zur Bestimmung des EC_{50} -Wertes einer Testsubstanz wurden in einer 24er Multiwell-Platte 2×10^4 Zellen in 900 μ l farblosem RPMI-Medium (ohne Phenolrot) pro Vertiefung ausgesät und 100 μ l Testlösung (10 x Testkonzentration in RPMI-Medium) zugegeben. Der Ansatz wurde insgesamt 24 h bei 37°C unter 5 % CO_2 inkubiert. Nach 22 h wurden 10 μ l einer MTT-Stammlösung (50 mg/ml in PBS) zugegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurde die gesamte Lösung über den Zellen abgesaugt und diese durch Zugabe von 500 μ l DMSO + 4 % HCl konz. pro Vertiefung lysiert. Das Lysat wurde bei 10 000 g für 2 min zentrifugiert und die Extinktion des Überstands in einer Halbmikroküvette bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt. Alle Experimente wurden als Vierfachbestimmung durchgeführt und mindestens dreimal wiederholt.

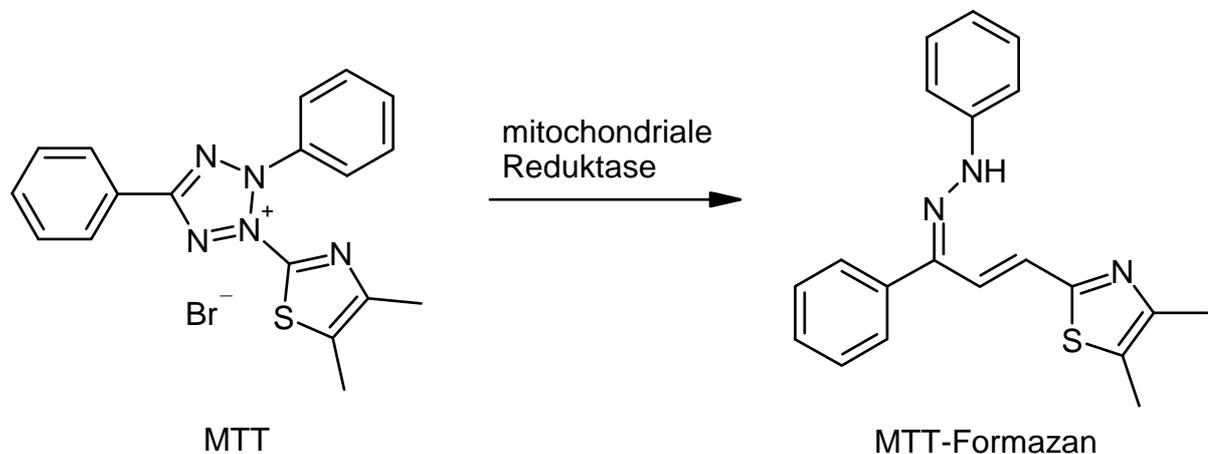


Abbildung 6: Reduktion von MTT zu Formazan

2.5.4 Auswertung und Analyse pharmakologischer Daten

Die Auswertung von Rohdaten zur Ermittlung der pharmakologischen Parameter erfolgte durch die Computerprogramme GraphPad Prism 4.0 und Microsoft Excel.

Die Bestimmung von B_{\max} und K_D

Durch die Messung der Radioaktivität (dpm) einer Probe konnte bei bekannter spezifischer Aktivität des Radioliganden (Ci/mol), nach Einbeziehen der jeweiligen Proteinkonzentration, die Menge des gebundenen Radioliganden in fmol/mg Protein angegeben werden. Zur Ermittlung der spezifischen Bindung (B_L) wurde die jeweils ermittelte unspezifische Bindung von der Gesamtbindung subtrahiert. Nach arithmetischem Auftragen von B_L gegen die Ligandkonzentration ($[L]$) konnten die Bindungsparameter B_{\max} und K_D mittels nichtlinearer Regressionsanalyse auf Grundlage des Massenwirkungsgesetzes anhand der Langmuir-Isotherme ermittelt werden.

Es gilt:

$$B_L = \frac{B_{\max} \cdot [L]}{[L] + K_D}$$

Bestimmung von V_{\max} und K_m

Analog konnten nach nichtlinearer Regression über die Michaelis-Menten-Gleichung die Aufnahmeparameter V_{\max} und K_m bestimmt werden, wenn die pro Zeiteinheit spezifisch transportierte Menge eines Radiosubstrates gegen die Substratkonzentration $[S]$ aufgetragen wurde. Die Aufnahmegeschwindigkeit (V) wurde dabei in pmol/mg Protein/min angegeben.

Es gilt:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{[S] + K_m}$$

Bestimmung von IC_{50} und n_H

Wurde der prozentual zur Kontrolle durch einen bestimmten Inhibitor gehemmte Anteil der spezifischen Bindung bzw. der spezifischen Aufnahme (Y) gegen den Logarithmus der Inhibitor-Konzentration (X) aufgetragen, konnten nach nichtlinearer Regression aus der resultierenden sigmoiden Dosis-Wirkungskurve der IC_{50} -Wert und der Hill-Koeffizient (n_H) ermittelt werden.

Es gilt:

$$Y = \text{Minimum} + \frac{100 - \text{Minimum}}{1 + 10^{(\log IC_{50} - X) \cdot n_H}}$$

Statistische Auswertung

Alle angegebenen Werte sind arithmetische Mittelwerte aus mindestens jeweils drei Einzelversuchen. Als Maß der Streuung ist der Standardfehler des Mittelwerts (s_x) angegeben. Die Mittelwerte von zwei Gruppen wurden mittels eines zweiseitigen, ungepaarten Student's t-Tests auf statistisch signifikante Unterschiede geprüft. Um auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen einer Kontrolle und zwei oder mehr von einander unabhängigen Gruppen zu testen wurde das statistische Modell der einseitigen Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) mit anschließendem Dunnett's post-hoc Test durchgeführt. Für die statistischen Tests wurde das Computerprogramm GraphPad Prism 4.0 verwendet. Als statistisch relevantes Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von $\leq 0,05$ (*) angenommen. Bei einer geringeren Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,01$ (**) galt der Unterschied als hoch signifikant; p-Werte von $\leq 0,001$ (***) wurden als extrem signifikant eingestuft.

C. Ergebnisse

1. Identifizierung und Charakterisierung funktionell bedeutender Aminosäuren des hNAT

1.1 Versuche mit dem Sulfhydrylreagenz NEM

1.1.1 Konzentrationsabhängige Inhibition der [³H]NA-Aufnahme und der [³H]Nisoxetin-Bindung durch NEM

Für die Bestimmung der konzentrationsabhängigen, irreversiblen Inhibition der NA-Aufnahme wurden HEK293-hNAT-Zellen für 90 min mit ansteigenden Konzentrationen NEM vorinkubiert, anschließend 25 min lang gewaschen und schließlich in Gegenwart und Abwesenheit von 10 µM Nisoxetin mit [³H]NA (10 nM, 10 min) inkubiert (Details siehe: B.2.5.1.1). Für die Inhibition der spezifischen, Nisoxetin-sensitiven NA-Aufnahme ergab sich ein mittlerer IC₅₀-Wert von 31,5 µM, sowie ein Hill-Koeffizient von -3,01, der auf eine höhere Kooperativität hinweist (Abbildung 7 A). Der ermittelte IC₅₀-Wert ist in guter Übereinstimmung mit dem von Schömig et al. (1988) publizierten Wert (14 µM) für PC12-Zellen.

Zur Bestimmung der konzentrationsabhängigen Inhibition der spezifischen (Desipramin [10 µM]-sensitiven) [³H]Nisoxetin-Bindung (1 nM, 90 min, 4°C) wurden intakte HEK293-hNAT-Zellen 15 und 90 min mit ansteigenden NEM-Konzentrationen vorinkubiert und anschließend 25 min lang gewaschen (B.2.5.2.1). Es resultierte eine konzentrationsabhängige und irreversible, d.h. auswaschresistente Inhibition der [³H]Nisoxetin-Bindung. Im Unterschied zur kompletten Hemmung der NA-Aufnahme, zeigte sich ein Anteil von etwa 29 % der spezifischen Nisoxetin-Bindung als resistent gegen eine Inhibition durch NEM. Der IC₅₀-Wert betrug nach 15 min 2,04 mM und sank nach 90 min Vorinkubationszeit auf 270 µM, was darauf hindeutet, dass die inhibitorische Potenz von NEM deutlich von der Kontaktzeit zum NAT abhängig ist. Die korrespondierenden Hill-Koeffizienten der Bindungshemmung sowohl nach 15 als auch nach 90 min lagen bei einem Wert von etwa -1 (Abbildung 7 B).

Im Vergleich zur NA-Aufnahme erwies sich die Nisoxetin-Bindung demnach als weniger empfindlich gegen eine Inhibition durch NEM, ebenfalls zeigten die

ermittelten Hill-Koeffizienten der Dosis-Wirkungskurven einen deutlichen Unterschied.

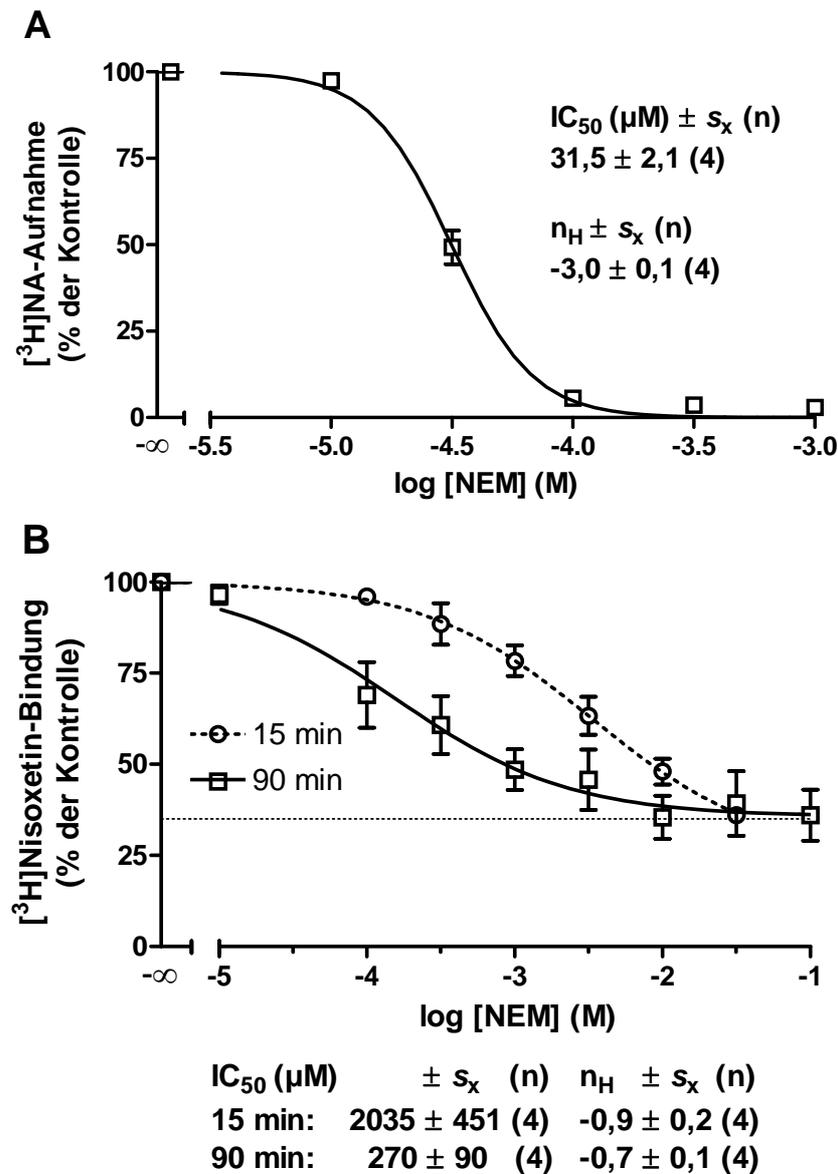


Abbildung 7: Konzentrationsabhängige Inhibition der spezifischen $[^3\text{H}]$ NA-Aufnahme (A) und $[^3\text{H}]$ Nisoxetin-Bindung (B) durch NEM an intakten HEK293-hNAT-Zellen

Die konzentrationsabhängige Inhibition der spezifischen (Nisoxetin [10 μM]-sensitiven) $[^3\text{H}]$ NA-Aufnahme (10 nM, 10 min, 37°C) (A) und der spezifischen (Desipramin [10 μM]-sensitiven) $[^3\text{H}]$ Nisoxetin-Bindung (1 nM, 90 min, 4°C) (B) wurde bestimmt nach 90 min (Bindungshemmung auch nach 15 min) Vorinkubation (37°C) mit ansteigenden Konzentrationen von NEM gefolgt von 5 x 5 min Waschen der Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm s_x$ (% der Kontrolle) der spezifischen $[^3\text{H}]$ NA-Aufnahme (A) und $[^3\text{H}]$ Nisoxetin-Bindung (B) von 4 separaten, mit Vierfachbestimmungen durchgeführten Experimenten.

1.1.2 Zeitabhängigkeit der Inhibition der [³H]NA-Aufnahme und der [³H]Nisoxetin-Bindung durch NEM

Die unterschiedlichen Werte für IC_{50} und n_H im Fall von Aufnahme- und Bindungshemmung durch NEM deuteten darauf hin, dass es zwei verschiedene Zielstrukturen für die Substanz gibt. Zur Prüfung, ob der Aufnahme- und Bindungshemmung auch jeweils eine unterschiedliche Kinetik zugrunde liegt, wurde der zeitliche Verlauf der Hemmung von NA-Aufnahme und Nisoxetin-Bindung an intakten HEK293-hNAT-Zellen ermittelt.

Die Hemmung der NA-Aufnahme durch NEM erfolgte schnell; so betrug die spezifische [³H]NA-Aufnahme (10 nM, 10 min, 37°C) nach etwa 5 min Inkubation mit 500 µM NEM noch 50 %. Nach 90 min war praktisch keine Aufnahme mehr zu beobachten (98 % Inhibition) (Abbildung 8 A). Zur Bestimmung des Zeitverlaufs der Inhibition der spezifischen [³H]Nisoxetin-Bindung wurden 500 µM und 5 mM NEM eingesetzt. Wie in Abbildung 8 B dargestellt, wurde der NEM-sensitive Anteil der [³H]Nisoxetin-Bindung durch 500 µM NEM nach etwa 14 min und durch 5 mM nach etwa 16 min um 50 % reduziert. In Übereinstimmung mit den Befunden aus C.1.1.1 erwies sich nach 90 min Kontaktzeit zu NEM (500 µM und 5 mM) ein Anteil von etwa 27 % der spezifischen Gesamtbindung als resistent gegen eine Hemmung durch die Substanz. Insgesamt betrachtet verlief die Hemmung der Nisoxetin-Bindung durch NEM damit langsamer als die Hemmung der NA-Aufnahme.

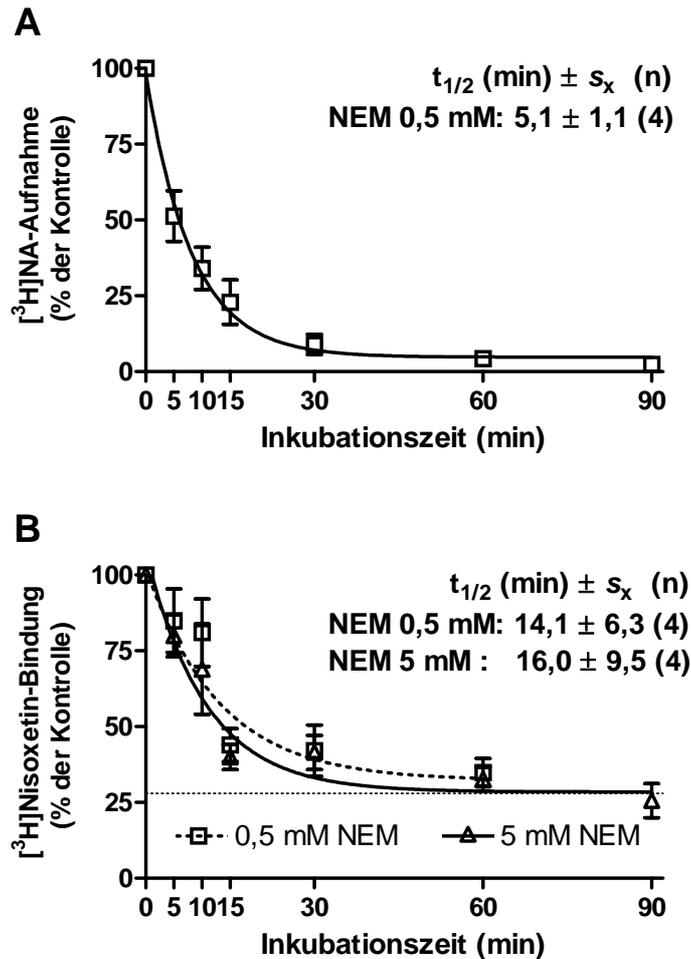


Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf der Inhibition von [³H]NA-Aufnahme (A) und [³H]Nisoxetin-Bindung (B) durch NEM an intakten HEK293-hNAT-Zellen

Gezeigt ist die Zeitabhängigkeit der Inhibition der spezifischen (Nisoxetin [10 μ M]-sensitiven) [³H]NA-Aufnahme (10 nM, 10 min, 37°C) (A) und der spezifischen (Desipramin [10 μ M]-sensitiven) [³H]Nisoxetin-Bindung (1 nM, 90 min, 4°C) (B), ermittelt durch verschiedene Vorinkubationszeiten (37°C) mit 0,5 mM (Bindung auch 5 mM) NEM gefolgt von 5 x 5 min Waschen der Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm s_x (% der Kontrolle) der spezifischen [³H]NA-Aufnahme (A) und [³H]Nisoxetin-Bindung (B) von 4 separaten, mit Vierfachbestimmungen durchgeführten Experimenten.

1.1.3 Protektion der NA-Aufnahme und Nisoxetin-Bindung mit NAT-Liganden und Substraten vor einer Inaktivierung durch NEM

Falls für die Hemmung von Aufnahme und Bindung durch NEM eine kovalente Interaktion innerhalb der Ligand-/Substrat-Bindungsstelle des NAT verantwortlich ist, sollte die simultane Anwesenheit eines NAT-Liganden vor einer irreversiblen Inhibition schützen. Es existieren bereits Befunde von erfolgreich durchgeführten

Protektionsversuchen der Desipramin-Bindung am NAT der Ratte, durchgeführt mit PC12-Zellmembranen (Schömig et al. 1988). Die folgenden Protektionsversuche für NA-Aufnahme und Nisoxetin-Bindung wurden an intakten HEK293-hNAT-Zellen durchgeführt.

Die NAT-Substrate NA, MPP⁺ und Amezinium sowie die Nicht-Substrat-Liganden und NAT-Inhibitoren Kokain und Bupropion wurden bezüglich ihrer Fähigkeit untersucht, die NA-Aufnahme vor einer Inhibition durch NEM zu protektieren. Die Substanzen wurden dabei in einer Konzentration von 30 µM eingesetzt, was einem Wert von mindestens 30 x ihrer IC₅₀ entspricht (Bönisch and Harder 1986). NA und Kokain wurden zusätzlich in einer Konzentration von 1 mM getestet, dies entspricht etwa 5000 x ihrer IC₅₀ für die Inhibition der NA-Aufnahme (Bönisch and Harder 1986). Die Zellen wurden zunächst 15 min mit den potentiellen Protektor-Substanzen in Abwesenheit von NEM vorinkubiert. Während einer zweiten Vorinkubation (90 min) waren zusätzlich 150 µM NEM anwesend. Nach einer darauf folgenden 25minütigen Auswaschphase wurde die spezifische [³H]NA-Aufnahme (10 nM, 10 min, 37°C) in Abwesenheit von Protektor-Substanz und/oder NEM bestimmt. Keine der getesteten Substanzen konnte vor einer Inhibition der NA-Aufnahme durch NEM schützen. Die verbleibende NA-Aufnahme nach Vorinkubation mit einem Protektor war etwa identisch mit der nach alleiniger NEM-Inkubation (Abbildung 9 A). Selbst bei einer Konzentration von 1 mM zeigten NA und Kokain keinen Protektionseffekt (Einschub Abbildung 9 A).

Im Unterschied zur NA-Aufnahme konnte die Nisoxetin-Bindung vor einer NEM-induzierten Hemmung durch NAT-Substrate und den NAT-Inhibitor Kokain protektiert werden (Abbildung 9 B). Die getesteten Substrate waren: NA, MPP⁺, Amezinium und Bretylium. Die Protektor-Substanzen wurden dabei in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt. Zunächst wurden die Zellen 15 min mit einer Lösung des Protektors vorinkubiert, in der darauf folgenden 90minütigen Inkubation waren zusätzlich 5 mM NEM anwesend. Nach dem Entfernen der Protektor-Substanzen und des nicht-gebundenen NEM durch gründliches Waschen, war die gemessene [³H]Nisoxetin-Bindung (1 nM, 90 min, 4°C) in Gegenwart von Protektor plus NEM nicht signifikant verschieden von der jeweiligen NEM-freien Kontrolle.

Die Unterschiede in der Protektierbarkeit der NA-Aufnahme und der Nisoxetin-Bindung sprechen für unterschiedliche Mechanismen der NEM-Hemmwirkung.

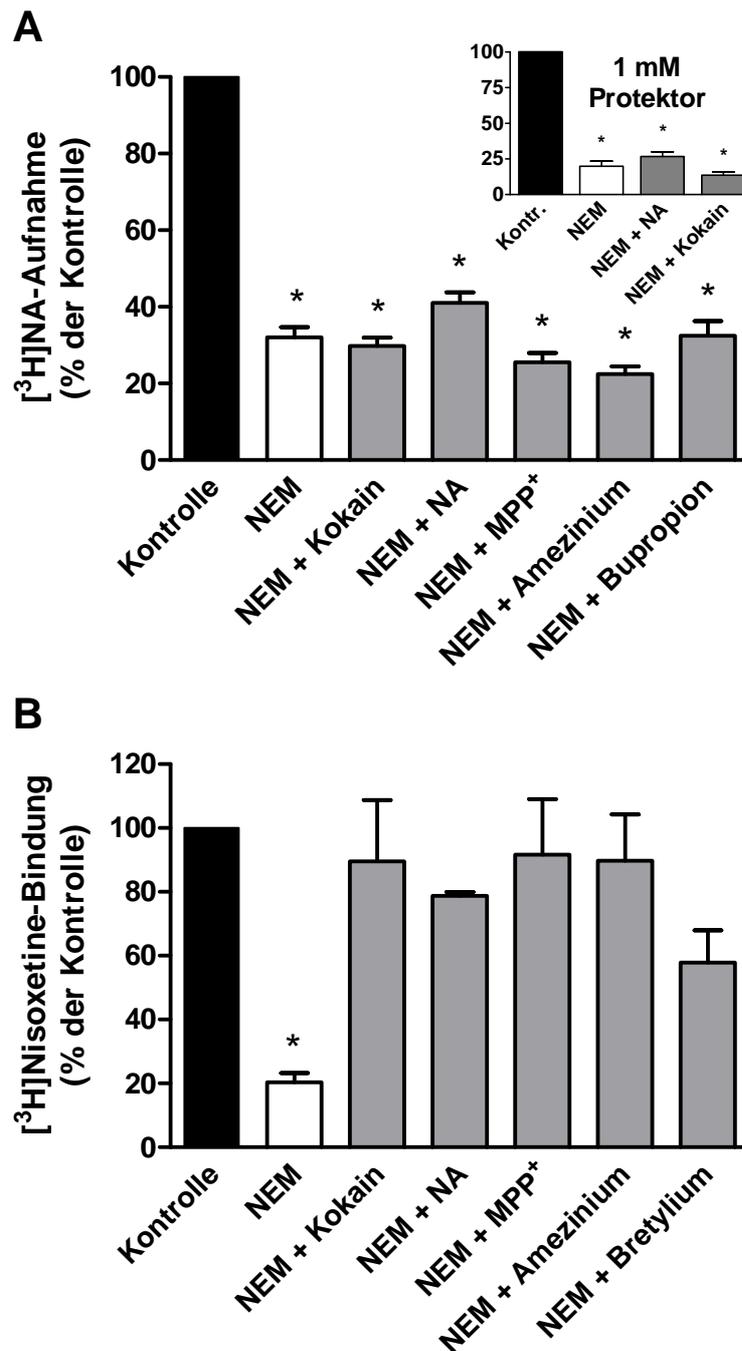


Abbildung 9: Versuche zur Protektion der [3H]NA-Aufnahme (A) und der [3H]Nisoxetine-Bindung (B) vor einer Inhibition durch NEM mit NAT-Liganden und Substraten

Die spezifische [3H]NA-Aufnahme konnte nicht vor einer Inhibition durch NEM mit NAT-Substraten und Inhibitoren geschützt werden (A). Die Zellen wurden 90 min mit 150 μ M NEM in An- und Abwesenheit von 30 μ M der potentiellen Protektor-Substanz inkubiert. NA und Kokain wurden auch in einer Konzentration von 1 mM getestet (Einschub in A). Nach der Vorinkubation wurden die Zellen 5 x 5 min gewaschen und die [3H]NA-Aufnahme (10 nM, 10 min, 37°C) bestimmt. Die spezifische [3H]Nisoxetine-Bindung konnte

durch NAT-Substrate und Kokain vor einer Inhibition durch NEM bei 37°C protektiert werden (B). Nach 90minütiger Vorinkubation mit 5 mM NEM in An- und Abwesenheit der Protektor-Substanz (1 mM) wurden die Zellen gewaschen (s.o.) und die [³H]Nisoxetin-Bindung (1 nM, 90 min, 4°C) bestimmt. Die Daten wurden mittels *one-way ANOVA* und anschließendem Dunnett's post-hoc Test analysiert (*, $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 3-4$). Gezeigt sind Mittelwerte $\pm s_x$ (% der Kontrolle) der spezifischen [³H]NA-Aufnahme (A) und der spezifischen [³H]Nisoxetin-Bindung (B).

Wurden hingegen alle Inkubationsschritte des Protektionsexperiments der Nisoxetin-Bindung bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt, zeigten NA und Kokain keinen Protektionseffekt (Abbildung 10). Offensichtlich verhindert eine Temperaturniedrigung eine für Protektionseffekte notwendige Konformationsänderung des NAT.

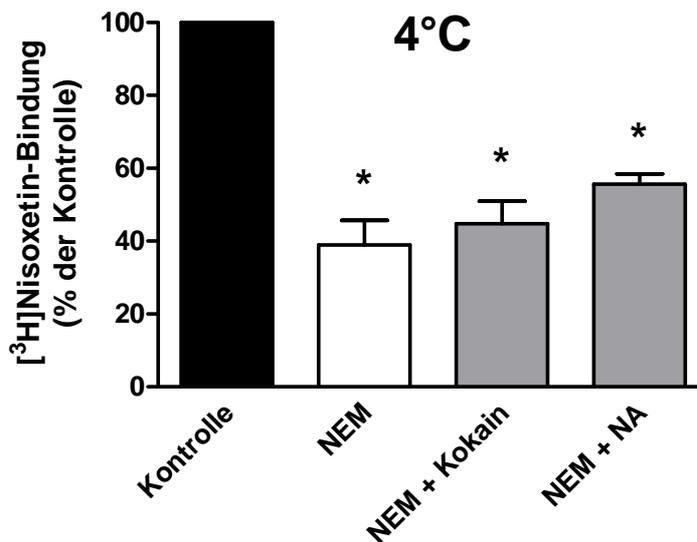


Abbildung 10: NEM-Inhibition der [³H]Nisoxetin-Bindung: Verlust der Protektionseffekte von Kokain und NA durch Temperaturniedrigung auf 4°C

Die spezifische [³H]Nisoxetin-Bindung konnte bei einer Temperatur von 4°C nicht mehr vor einer Inhibition durch NEM mit NA oder Kokain protektiert werden. Die Experimente wurden, wie in der Legende zu Abbildung 9 B beschrieben, durchgeführt mit dem Unterschied, dass die Temperatur aller Inkubationsschritte 4°C betrug. Die Daten wurden mittels *one-way ANOVA* und anschließendem Dunnett's post-hoc Test analysiert (*, $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 3$). Gezeigt sind Mittelwerte $\pm s_x$ (% der Kontrolle) der spezifischen [³H]Nisoxetin-Bindung.

Auswaschbarkeit der Protektor-Substanzen

Die meisten der während der Protektionsversuche (C.1.1.3) getesteten Protektor-Substanzen waren nach 90minütiger Kontaktzeit von den Zellen zum großen Teil wieder auswaschbar (Abbildung 11). Zur Ermittlung des zeitlichen Verlaufs des Auswaschprozesses wurden HEK293-hNAT-Zellen für 90 min mit 30 μM der Test-Substanzen inkubiert. Die verwendeten Substanzen waren der NAT-Inhibitor Kokain und die NAT-Substrate NA, Breytilium, MPP⁺ und Amezinium. Nach unterschiedlichen Auswaschzeiten (10, 20, 30, 40 min) mit KRH-Puffer (37°C) wurde anschließend die spezifische [³H]NA-Aufnahme bestimmt.

Die in die Zellen aufgenommenen NAT-Substrate ließen sich schlechter auswaschen; am ausgeprägtesten galt dies für die permanent positiv geladenen Substanzen Amezinium und MPP⁺. Offensichtlich diffundieren diese Substanzen sehr schlecht aus der Zelle. Der Einsatz hochlipophiler NAT-Inhibitoren wie Nisoxetin oder Desipramin als Protektoren wurde bei den Protektionsversuchen bewusst vermieden, da sie durch ihre lange Retention in der Plasmamembran praktisch nicht auswaschbar sind (Zhu et al. 2004). Diese Substanzen würden dadurch selber eine anhaltende Inhibition des NAT bewirken, die von einer irreversiblen Inaktivierung durch NEM nicht zu unterscheiden wäre.

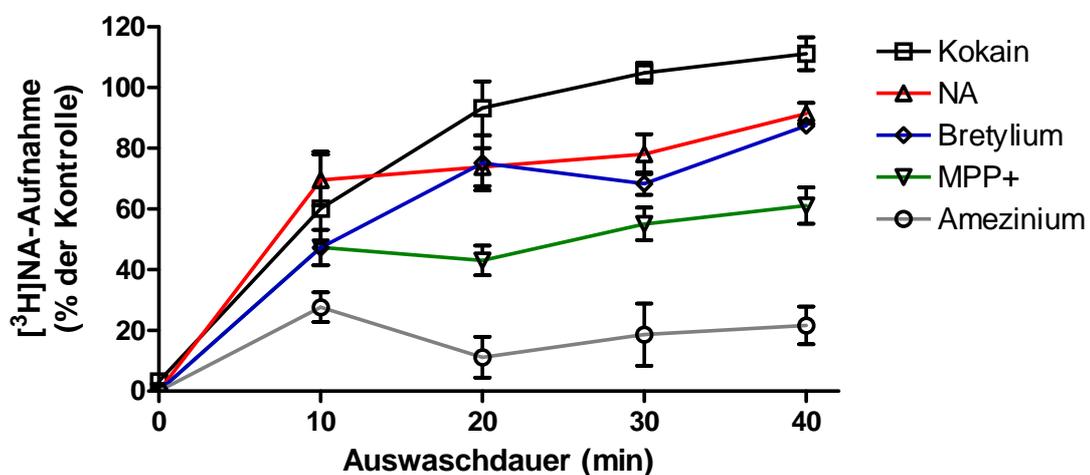


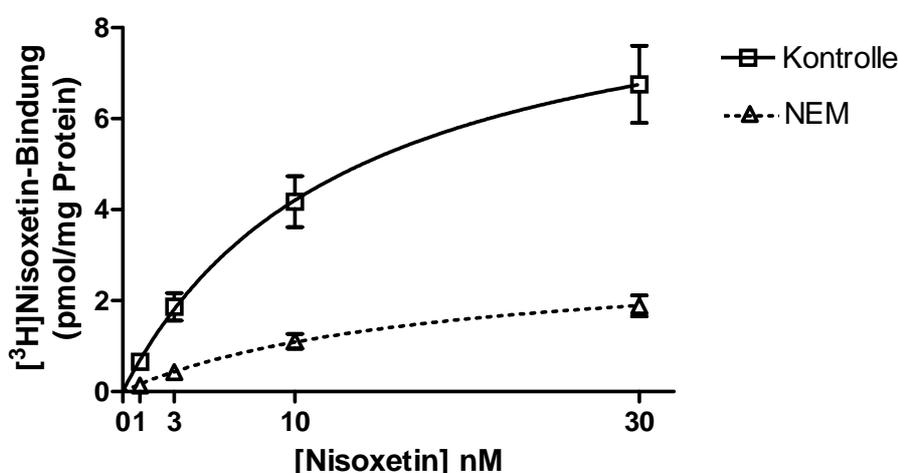
Abbildung 11: Spezifische [³H]NA-Aufnahme nach Vorinkubation mit NAT-Substraten und Kokain nach unterschiedlichen Auswaschzeiten

Zur Ermittlung der Auswaschbarkeit von potentiellen Protektor-Substanzen wurde nach einer Vorinkubation (90 min) mit 30 μM der Substanz unterschiedlich lange gewaschen und die spezifische (Nisoxetin [10 μM]-sensitive) [³H]NA-Aufnahme (10 nM, 10 min, 37°C) ermittelt. Die Kontrolle enthielt keinen Protektor. Gezeigt sind Mittelwerte $\pm s_x$ der spezifischen [³H]NA-Aufnahme (% der Kontrolle) aus n = 3 Versuchen.

1.1.4 Der Einfluss von NEM auf B_{\max} und K_D der [^3H]Nisoxetin-Bindung

Es wurde der Effekt einer 90minütigen Vorinkubation (37°C) mit 5 mM NEM auf die Sättigungsbindung von [^3H]Nisoxetin (10 nM, 90 min, 4°C) untersucht (Abbildung 12).

Die Bindung in Abwesenheit von NEM war charakterisiert durch einen K_D -Wert von $13,6 \pm 1,9$ nM und einen Wert für B_{\max} von $9,8 \pm 1,1$ pmol/mg ($n = 4$). NEM verursachte eine signifikante (etwa 3fache) Verringerung des B_{\max} -Wertes auf $3,6 \pm 0,5$ nM ohne den K_D -Wert ($13,6 \pm 1,9$ pmol/mg, $n = 4$) signifikant zu beeinflussen.



	K_D (nM) $\pm s_x$	B_{\max} (pmol/mg) $\pm s_x$	(n)
Kontrolle:	$13,6 \pm 1,9$	$9,8 \pm 1,1$	(4)
NEM:	$18,8 \pm 2,5$	$3,6 \pm 0,5$	(4)

Abbildung 12: Bestimmung von B_{\max} und K_D der [^3H]Nisoxetin-Bindung an intakten HEK293-hNAT-Zellen mit und ohne NEM-Vorinkubation

Gezeigt sind die Sättigungshyperbeln der spezifischen (Desipramin [10 μM]-sensitiven) [^3H]Nisoxetin-Bindung an intakten HEK293-hNAT-Zellen mit und ohne NEM-Vorinkubation (5 mM, 90 min). Die dargestellten Mittelwerte $\pm s_x$ stammen aus $n = 4$ von einander unabhängigen Experimenten.

1.1.5 Nachweis der indirekten Inhibition der NA-Aufnahme durch NEM

Die große Empfindlichkeit der NA-Aufnahme gegenüber NEM und die deutlich unterschiedlichen Eigenschaften der Substanz bei der Hemmung von NA-Aufnahme im Vergleich zur Nisoxetin-Bindung deuteten darauf hin, dass nicht eine direkte Inaktivierung des NAT-Proteins, sondern ein für die NA-Aufnahme

entscheidender, indirekter Mechanismus für die beobachteten Unterschiede verantwortlich sein muss.

Es sollte daher untersucht werden, ob NEM möglicherweise durch eine Inhibition der Na^+/K^+ -ATPase von HEK293-Zellen eine Reduktion des Na^+ - und K^+ -Gradienten über der Plasmamembran bewirkt, was eine indirekte Hemmung der NA-Aufnahme in HEK293-hNAT-Zellen zur Folge hätte.

1.1.5.1 Inhibition der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in HEK293-Zellen (Na^+/K^+ -ATPase-Versuche)

Da Rb^+ durch die Na^+/K^+ -ATPase wie K^+ als Substrat erkannt und so in kultivierte Zellen transportiert wird, ist seine zelluläre Aufnahme ein Indikator für die Aktivität dieses Enzyms (Smith 1977). Die Na^+/K^+ -ATPase ist verantwortlich für die Aufrechterhaltung des Na^+ - und K^+ -Gradienten und somit für die treibende Kraft des Monoamintransports durch den NAT. Es wurden deshalb die Effekte von NEM auf die Rb^+ -Aufnahme durch in Spuren beigeseztes $^{86}\text{Rb}^+$ bestimmt und mit denen von Na^+/K^+ -ATPase-Inhibitoren verglichen.

Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Inhibition der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in HEK293-Zellen durch NEM

NEM (500 μM) verursachte nach 90 min Inkubation (37°C) eine vollständige und konzentrationsabhängige Hemmung der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in HEK293-Zellen. Die Inhibition war charakterisiert durch einen IC_{50} -Wert von 10,7 μM sowie einen Hill-Koeffizienten von -3,2 (Abbildung 13 A). Die Reduktion der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme durch NEM (0,5 mM) verlief mit einem Wert für $t_{1/2} = 5,6$ min schnell (Abbildung 13 B). Damit entsprachen die Charakteristika der NEM-vermittelten Inhibition der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in HEK293-Zellen praktisch denen für die Inhibition der NA-Aufnahme (C.1.1.1 und C.1.1.2). Dies deutete darauf hin, dass NEM tatsächlich die NA-Aufnahme über eine Inaktivierung der Na^+/K^+ -ATPase hemmt.

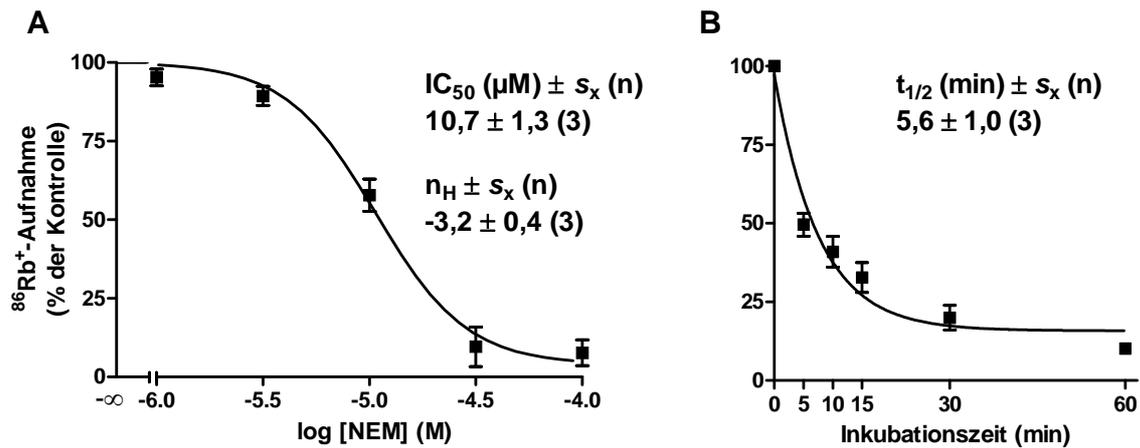


Abbildung 13: Konzentrations- (A) und zeitabhängige (B) Inhibition der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in HEK293-Zellen durch NEM

Die Versuche zur Bestimmung der Konzentrations- (A) und Zeitabhängigkeit (B) der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme (1 $\mu\text{Ci} / \text{ml}$, 30 min, 37°C) in HEK293-Zellen wurden durchgeführt, wie unter C.1.1.1 und C.1.1.2 für die Hemmung der NA-Aufnahme beschrieben. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm s_x$ der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme (% der Kontrolle) von 3 - 4 separaten, mit Dreifachbestimmungen durchgeführten Experimenten.

Inhibition der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in HEK293-Zellen durch Ouabain, Vanadat und SCH28080

Die Annahme einer indirekten Inhibition der NA-Aufnahme als Folge einer Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase durch NEM sollte verifiziert werden, indem die Effekte von NEM auf die $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in HEK293-Zellen mit denen der Na^+/K^+ -ATPase-Inhibitoren Ouabain und Vanadat verglichen wurden. Wie in Abbildung 14 dargestellt, verursachten das Herzglykosid Ouabain (5 mM) nur $24,1 \pm 3,2 \%$ ($n = 9$) und Vanadat (100 μM) nur $30,3 \pm 4,9 \%$ ($n = 3$) Hemmung der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in HEK293-Zellen. Da die eingesetzten Konzentrationen mindestens 10 x der IC_{50} für die Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase entsprachen (Gonzalez-Garcia et al. 1987; Koenderink et al. 2001), deutete diese unvollständige Hemmung der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme auf die Existenz weiterer K^+ -Transporter in HEK293-Zellen hin. Aus diesem Grund wurde zusätzlich die Wirkung der Testsubstanz SCH28080 untersucht. Dabei handelt es sich um einen selektiven Inhibitor, der auch in Nierenzellen exprimierten, gastrischen Form der H^+/K^+ -ATPase (Codina et al. 2000). Die Substanz besitzt keine Affinität zur Na^+/K^+ -ATPase (Vagin et al. 2003).

SCH28080 (1 mM) reduzierte die $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in HEK293-Zellen um $68,8 \pm 7,6 \%$ ($n = 5$).

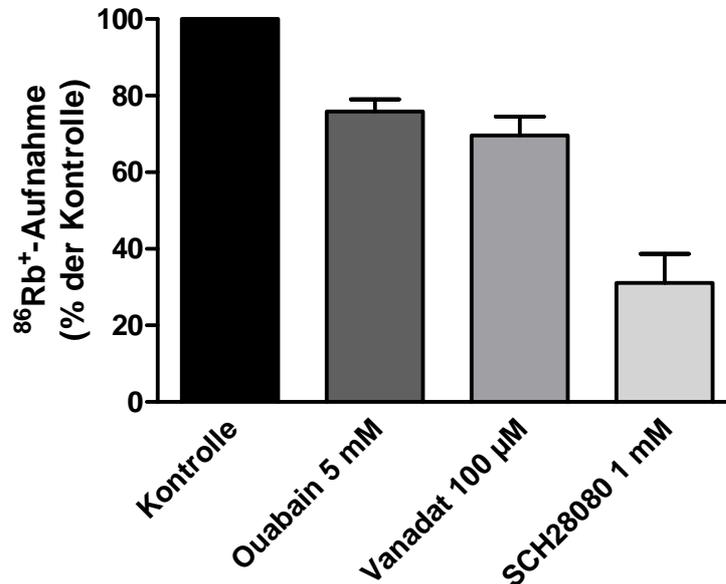


Abbildung 14: Inhibition der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in HEK293-Zellen durch Ouabain, Vanadat und SCH28080

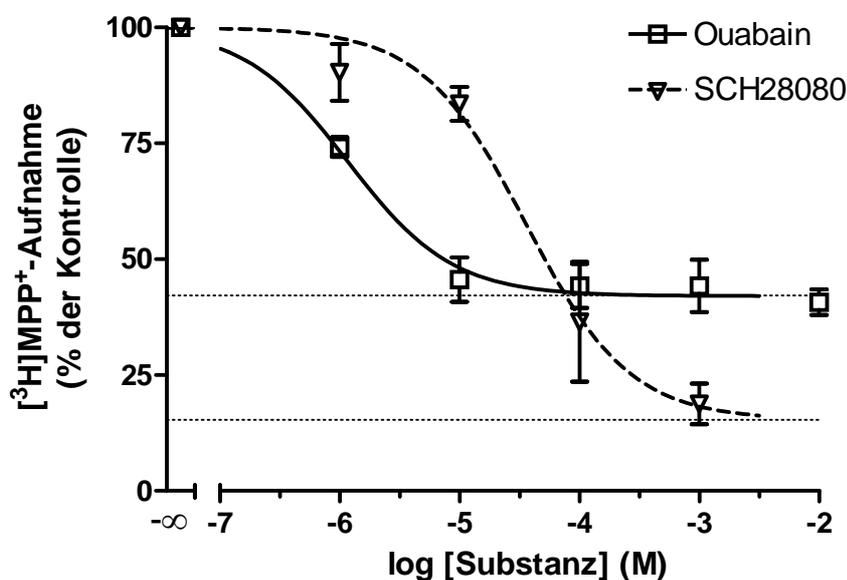
Für die Bestimmung des hemmenden Effektes von Ouabain, Vanadat und SCH28080 auf die $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme wurden HEK293-Zellen mit 5 mM Ouabain, 100 µM Vanadat oder 1 mM SCH28080 vorinkubiert (60 min, 37°C). Nach Zugabe von 1 µCi / ml $^{86}\text{Rb}^+$ wurde für weitere 30 min inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm s_x$ der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme (% der Kontrolle) von 3 - 9 separaten, mit Dreifachbestimmungen durchgeführten Experimenten.

1.1.5.2 Inhibition der [^3H]MPP $^+$ -Aufnahme in HEK293-hNAT-Zellen durch Ouabain und SCH28080

Zur Kontrolle, inwiefern die Reduktion der Rb^+ -Aufnahme mit einer Hemmung der Monoaminaufnahme korreliert, wurde die Hemmung der [^3H]MPP $^+$ -Aufnahme in HEK293-hNAT-Zellen durch Ouabain und SCH28080 untersucht. Das verwendete NAT-Substrat MPP $^+$ hat gegenüber dem Katecholamin NA den Vorteil weniger oxidationsempfindlich zu sein.

Ouabain verursachte eine konzentrationsabhängige Hemmung der [^3H]MPP $^+$ -Aufnahme in HEK293-hNAT-Zellen. Die resultierende Dosis-Wirkungskurve lieferte einen IC_{50} -Wert von 1,5 µM sowie einen Hill-Koeffizienten von -0,9 (Abbildung 15). In Übereinstimmung mit der maximal möglichen Inhibition der

$^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme (Abbildung 14) war auch die maximale Hemmung der $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme durch Ouabain nicht vollständig, sondern betrug nur etwa 57 %. Der Betrag der maximal möglichen Hemmung der $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme durch SCH28080 war mit etwa 85 % deutlich größer. Die Hemmung durch SCH28080 war charakterisiert durch einen IC_{50} -Wert von 23,4 μM und einen Hill-Koeffizienten von -1,3 (Abbildung 15). Diese Ergebnisse sprechen für die Existenz einer zusätzlichen, jedoch Ouabain-unempfindlichen Na^+/K^+ -ATPase bzw. weiterer SCH28080-sensitiver Ionen-Transporter in HEK293-Zellen, die durch NEM vollständig inaktiviert werden können.



	IC_{50} (μM) $\pm s_x$	$n_H \pm s_x$	(n)
Ouabain:	$1,5 \pm 0,8$	$-0,9 \pm 0,1$	(5)
SCH28080:	$23,4 \pm 1,1$	$-1,3 \pm 0,6$	(3)

Abbildung 15: Konzentrationsabhängige Inhibition der $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme in HEK293-hNAT-Zellen durch Ouabain und SCH28080

Die Effekte des Na^+/K^+ -ATPase-Inhibitors Ouabain und des H^+/K^+ -ATPase-Inhibitors SCH28080 auf die $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme (10 nM, 10 min, 37°C) in HEK293-hNAT-Zellen wurden bestimmt wie im Wesentlichen unter (C.1.1.1) für NEM beschrieben. Die Messung der Aufnahme erfolgte nach 60 min Vorinkubation (37°C) mit ansteigenden Konzentrationen der Substanzen. Es sind Mittelwerte $\pm s_x$ der spezifischen $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme (% der Kontrolle) aus $n = 4 - 5$ separaten, mit Dreifachbestimmungen durchgeführten Experimenten dargestellt. Die gepunkteten Linien veranschaulichen den Betrag der verbleibenden $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme nach maximaler Hemmung durch Ouabain und SCH28080.

1.1.6 Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Reduktion des ATP-Gehalts in HEK293-Zellen durch NEM

Zum Nachweis, ob die fast vollständige Inhibition der Monoamin- und Rb^+ -Aufnahme durch eine NEM-vermittelte Inhibition der zellulären ATP-Synthese zustande kommt, wurden die Effekte von NEM auf den ATP-Gehalt von HEK293-Zellen untersucht.

Abbildung 16 A zeigt, dass NEM eine konzentrationsabhängige Depletion des ATPs in HEK293-Zellen bewirkt. Die halbmaximale Reduktion (EC_{50}) wurde bei einer NEM-Konzentration von $11,2 \mu\text{M}$ beobachtet und die Dosis-Wirkungskurve hatte einen Hill-Koeffizienten von $-1,6$. Die Verringerung des zellulären ATPs durch NEM erfolgte schnell, so betrug die Zeit bis zur halbmaximalen Reduktion etwa 6 min (Abbildung 16 B). Diese Ergebnisse belegen deutlich, dass NEM in geringen Konzentrationen die NA-Aufnahme über eine Inhibition der zellulären ATP-Synthese hemmt. Durch das Erschöpfen des zellulären ATPs können der Na^+ - und K^+ -Gradient, die treibende Kraft des NA-Transports durch den NAT, nicht aufrechterhalten werden.

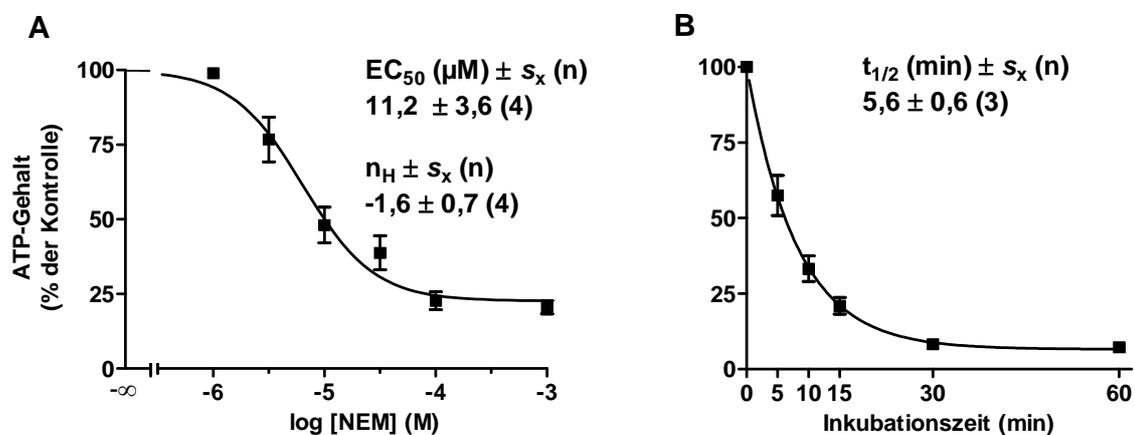


Abbildung 16: Konzentrations- (A) und zeitabhängige (B) Reduktion des ATP-Gehalts in HEK293-Zellen durch NEM

Zur Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit der ATP-Reduktion in nativen HEK293-Zellen durch NEM wurden 2×10^4 HEK293-Zellen pro Vertiefung in 96er-Multiwell-Platten ausplattiert und mit ansteigenden Konzentrationen von NEM bei 37°C für 90 min inkubiert (A). Zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufes wurden verschiedene Inkubationszeiten mit $500 \mu\text{M}$ NEM gewählt (B). Anschließend wurden die Zellen permeabilisiert und die Menge an freigesetztem ATP über die Luciferase / Luciferin-Reaktion quantifiziert (für Details

siehe B.2.5.3.1). Eine Interaktion der Luciferase / Luciferin-Reaktion mit NEM konnte durch Vorversuche ausgeschlossen werden. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm s_x$ zellulären ATPs (% der Kontrolle) aus 3 – 5 separaten Experimenten, durchgeführt mit Vierfachbestimmungen.

1.1.7 Effekt von Ouabain und SCH28080 auf den ATP-Gehalt von HEK293-Zellen

Ouabain (5 mM) verursachte erwartungsgemäß mit $12,0 \pm 3,2$ % Reduktion keine nennenswerte Veränderung der ATP-Menge in HEK293-Zellen. Eine Inkubation mit SCH28080 hingegen bewirkte nach 90 min (37°) eine deutliche Verringerung des intrazellulären ATPs um $58,0 \pm 9,0$ % (Abbildung 17).

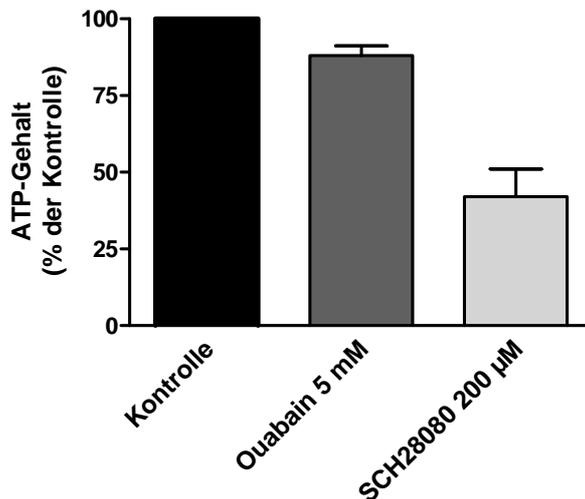


Abbildung 17: ATP-Gehalt von HEK293-Zellen nach Inkubation mit Ouabain und SCH28080

Der Effekt auf die intrazelluläre ATP-Menge von HEK293-Zellen nach Inkubation (90 min, 37°C) mit Ouabain (5 mM) und SCH28080 (200 μM) wurde bestimmt wie in der Legende zu Abbildung 16 beschrieben. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm s_x$ zellulären ATPs (% der Kontrolle) aus 3 – 4 separaten Experimenten, durchgeführt mit Vierfachbestimmungen.

1.1.8 Konzentrationsabhängige Reduktion des ATPs in verschiedenen Zelllinien durch NEM

Die ATP-depletierende Wirkung von NEM konnte neben HEK293 auch bei PC12, JAR, SKN-SH SY5Y, C6, CHO und COS-7-Zellen beobachtet werden. Die getesteten Zelllinien zeigten dabei zum Teil deutliche Unterschiede bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber NEM (Abbildung 18 und Tabelle 1). Der größte ermittelte Unterschied um etwa den Faktor 40 bestand zwischen den EC_{50} -Werten bei PC12 ($5,2 \pm 1,7 \mu\text{M}$) und COS-7-Zellen ($203,6 \pm 28,9 \mu\text{M}$). Generell zeichnete sich ab, dass die Nagerzellen (CHO, PC12, C6) empfindlicher gegenüber NEM waren als Primatenzellen (HEK293, JAR, SK-N-SY5Y, COS-7). Die im Fall der getesteten Zelllinien ermittelten EC_{50} -Werte sowie die dazugehörigen Hill-Koeffizienten sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

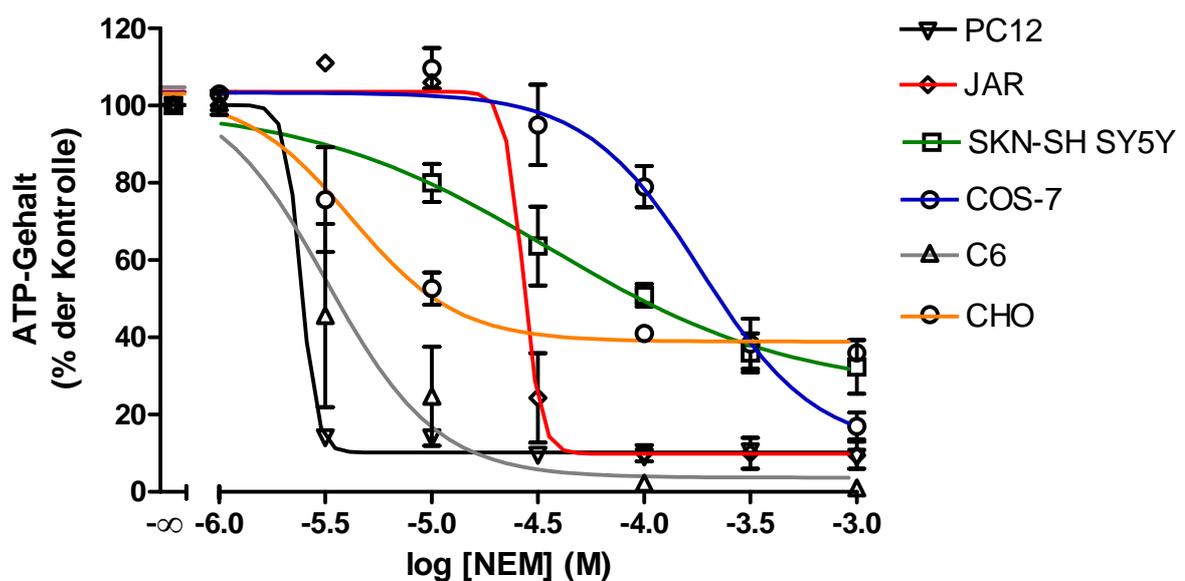


Abbildung 18: Konzentrationsabhängige Depletion des ATPs in PC12, JAR, SK-N-SH SY5Y, COS-7, C6 und CHO-Zellen durch NEM

Die konzentrationsabhängige Reduktion des ATP-Gehalts in den angegebenen Zelllinien durch NEM wurde bestimmt wie in der Legende zu Abbildung 16 A für HEK293-Zellen beschrieben. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm s_x$ zellulären ATPs (% der Kontrolle) aus 3 – 6 separaten Experimenten, durchgeführt mit Vierfachbestimmungen.

Zelllinie	Spezies	Gewebe	EC ₅₀ (µM) ± s _x (n)	n _H ± s _x (n)
CHO	<i>crictetus griseus</i>	Ovarien	4,9 ± 1,6 (3)	-3,7 ± 1,2 (3)
PC12	<i>rattus norvegicus</i>	Nebenniere	5,2 ± 1,7 (4)	-5,8 ± 2,1 (4)
C6	<i>rattus norvegicus</i>	Neuroglia	6,11 ± 2,5 (4)	-3,8 ± 0,7 (4)
HEK293	<i>homo sapiens</i>	Niere	11,2 ± 3,6 (4)	-1,6 ± 0,7 (4)
JAR	<i>homo sapiens</i>	Plazenta	37,7 ± 12,0 (3)	-9,5 ± 1,9 (3)
SK-N-SY5Y	<i>homo sapiens</i>	Nervenzellen	43,3 ± 20,2 (3)	-0,9 ± 0,1 (3)
COS-7	<i>cercopith. aethiops</i>	Niere	203,6 ± 28,9 (3)	-1,9 ± 0,5 (3)

Tabelle 1: EC₅₀-Werte und Hill-Koeffizienten für die ATP-Reduktion durch NEM in verschiedenen Zelllinien

Angegeben sind die Mittelwerte für die EC₅₀ und die Hill-Koeffizienten der ATP-Reduktion durch NEM in den getesteten Zelllinien, ermittelt aus den in den Legenden von Abbildung 18 und Abbildung 16 A beschriebenen Experimenten.

1.2 Funktionelle Bedeutung der Cysteine des hNAT

1.2.1 Expression und Funktion von Cystein-gegen-Alanin-Mutanten des hNAT

Zur Kontrolle, ob ein definiertes der 10 Cysteine (Cys, C) des hNAT (Abbildung 2) von essentieller Bedeutung für die Transportfunktion und/oder die Nisoxetin-Bindung ist, wurden zunächst alle Cysteine einzeln durch gerichtete Mutagenese (B.2.2.2) gegen die Aminosäure Alanin (Ala, A) ausgetauscht. Die resultierenden Cys/Ala-Mutanten wurden transient in HEK293-Zellen exprimiert und zum Vergleich mit dem hNAT-Wildtyp (hNAT-WT) hinsichtlich Substrattransport und Nisoxetin-Bindung pharmakologisch charakterisiert.

Die 8 hNAT-Mutanten C44A, C86A, C131A, C240A, C339A, C351A, C460A und C520A waren voll funktionell und zeigten im Vergleich zum hNAT-WT, geprüft durch *one-way ANOVA*, keine statistisch signifikanten Unterschiede in Bezug auf die spezifische [³H]NA-Aufnahme (10 nM, 10 min, 37°C) und die [³H]Nisoxetin-Bindung (1 nM, 90 min, 4°C) (Abbildung 19). Dies war gleichzeitig ein Beleg für die korrekte Proteinfaltung und Expression in der Plasmamembran dieser 8 Mutanten. Die [³H]NA-Aufnahme und [³H]Nisoxetin-Bindung durch C460A und C520A war im Vergleich zum hNAT-WT tendenziell erniedrigt. Ein Austausch der Cysteine in

Position 176 oder 185, die eine Disulfidbrücke innerhalb der großen ES2 des hNAT bilden, resultierte in einem praktisch vollständigen Verlust sowohl der Nisoxetin-Bindung als auch der Transportaktivität dieser Mutanten (Abbildung 19).

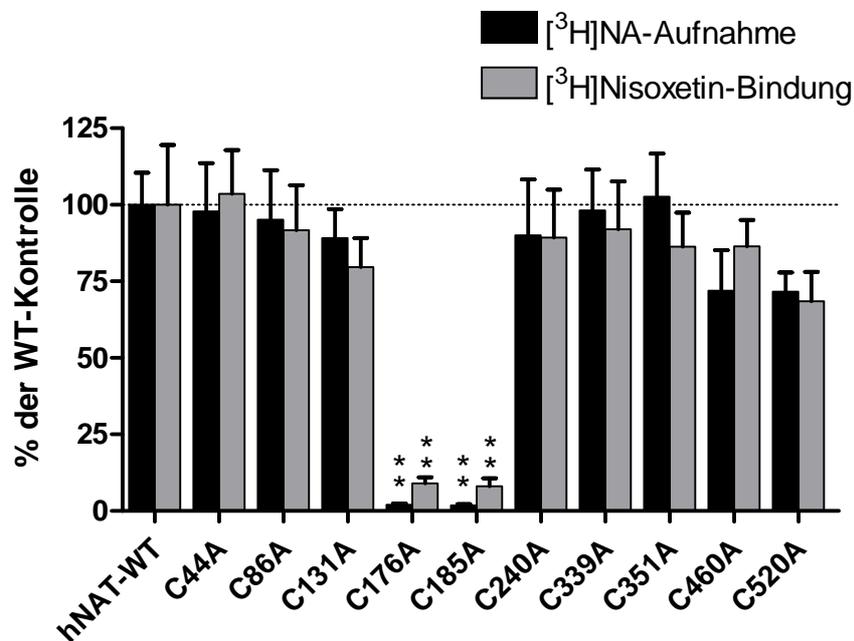


Abbildung 19: [³H]NA-Aufnahme und [³H]Nisoxetin-Bindung von hNAT-WT und hNAT-Cys/Ala-Mutanten

Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm s_x$ ($n = 4 - 9$) der spezifischen (Nisoxetin [$10 \mu\text{M}$]-sensitiven) [³H]NA-Aufnahme (10 nM , 10 min , 37°C) und der spezifischen (Desipramin [$10 \mu\text{M}$]-sensitiven) [³H]Nisoxetin-Bindung als % der hNAT-WT-Kontrolle. Die Mutanten wurden mit dem hNAT-WT mittels *one-way ANOVA* und anschließendem Dunnett's post-hoc Test verglichen. Nur C176A und C185A zeigten im Vergleich zum hNAT-WT eine hoch signifikante Reduktion sowohl des [³H]NA-Transports als auch der [³H]Nisoxetin-Bindung (**, $p < 0,01$ vs. hNAT-WT).

Zur vollständigen funktionellen Charakterisierung der 8 aktiven Cys/Ala-Mutanten wurden die Parameter V_{max} und K_m der Sättigungskinetik der [³H]MPP⁺-Aufnahme sowie B_{max} und K_D der [³H]Nisoxetin-Bindung jeder Mutante bestimmt. Die ermittelten Werte wurden anschließend per *one-way ANOVA* auf statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zum hNAT-WT geprüft.

Für die spezifische, sättigbare [³H]MPP⁺-Aufnahme (1 min , 37°C) in transient transfizierte HEK293-Zellen ergaben sich V_{max} - und K_m -Werte der untersuchten Cys/Ala-Mutanten, die sich statistisch nicht signifikant von denen des hNAT-WT unterschieden (Abbildung 20 A-D und Tabelle 2). Der für hNAT-WT ermittelte K_m -

Wert von $0,5 \pm 0,2 \mu\text{mol}$ war in guter Übereinstimmung mit den Angaben aus der Literatur (Apparsundaram et al. 1998).

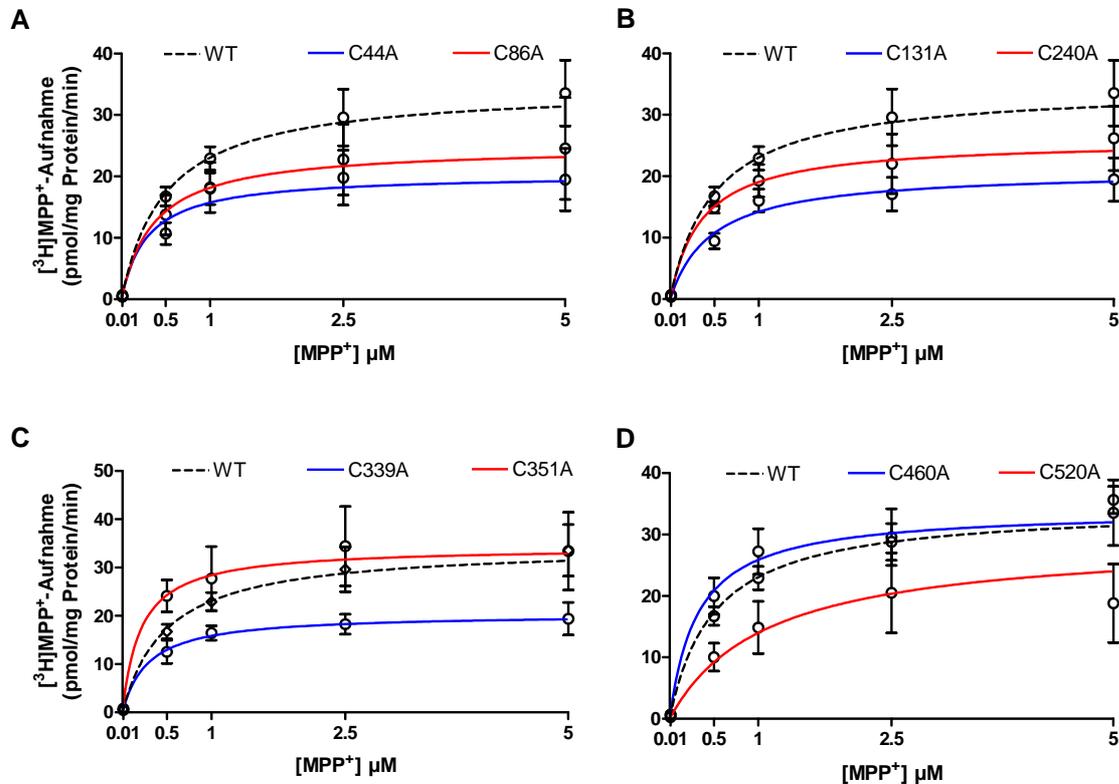


Abbildung 20: Sättigungskinetik der spezifischen $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme von hNAT-WT und hNAT-Cys/Ala-Mutanten

Dargestellt sind die Sättigungshyperbeln der spezifischen (Nisoxetin [$10 \mu\text{M}$]-sensitiven) $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme (37°C , 1 min). Die Kurve des hNAT-WT (gestrichelte Linie) ist zur Orientierung jeweils (in A-D) mit dargestellt. Die Versuche wurden an intakten, transient transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Die gezeigten Mittelwerte $\pm s_x$ stammen aus $n = 3 - 4$ von einander unabhängigen Experimenten.

Die spezifische $[^3\text{H}]\text{Nisoxetin}$ -Bindung (4°C , 90 min) an intakten, transient transfizierten HEK293-Zellen war sowohl im Fall von hNAT-WT als auch der 8 funktionellen Cys/Ala-Mutanten sättigbar (Abbildung 21 A-D). Es wurden dabei keine statistisch signifikanten Unterschiede der Parameter B_{max} und K_D im Vergleich zum hNAT-WT festgestellt (Tabelle 2). Der ermittelte K_D -Wert des hNAT-WT lag bei $3,5 \pm 0,6 \text{ nmol}$ und deckte sich mit publizierten Angaben (Danek Burgess und Justice 1999). Tendenziell am deutlichsten erhöht war der K_D -Wert von C520A. Der B_{max} -Wert war hier gleichzeitig erniedrigt.

Aus den Werten für B_{\max} der [^3H]Nisoxetin-Bindung und V_{\max} der [^3H]MPP $^+$ -Aufnahme konnte die Anzahl der Transportzyklen pro Minute (Transporter-Wechselzahl) für ein Transportermolekül bestimmt werden (Bönisch and Harder 1986). Sie errechnet sich aus dem Verhältnis V_{\max}/B_{\max} und lag für den hNAT-WT bei 13 min^{-1} . Die Mutationen hatten keinen wesentlichen Einfluss auf die Transporter-Wechselzahl (Tabelle 2).

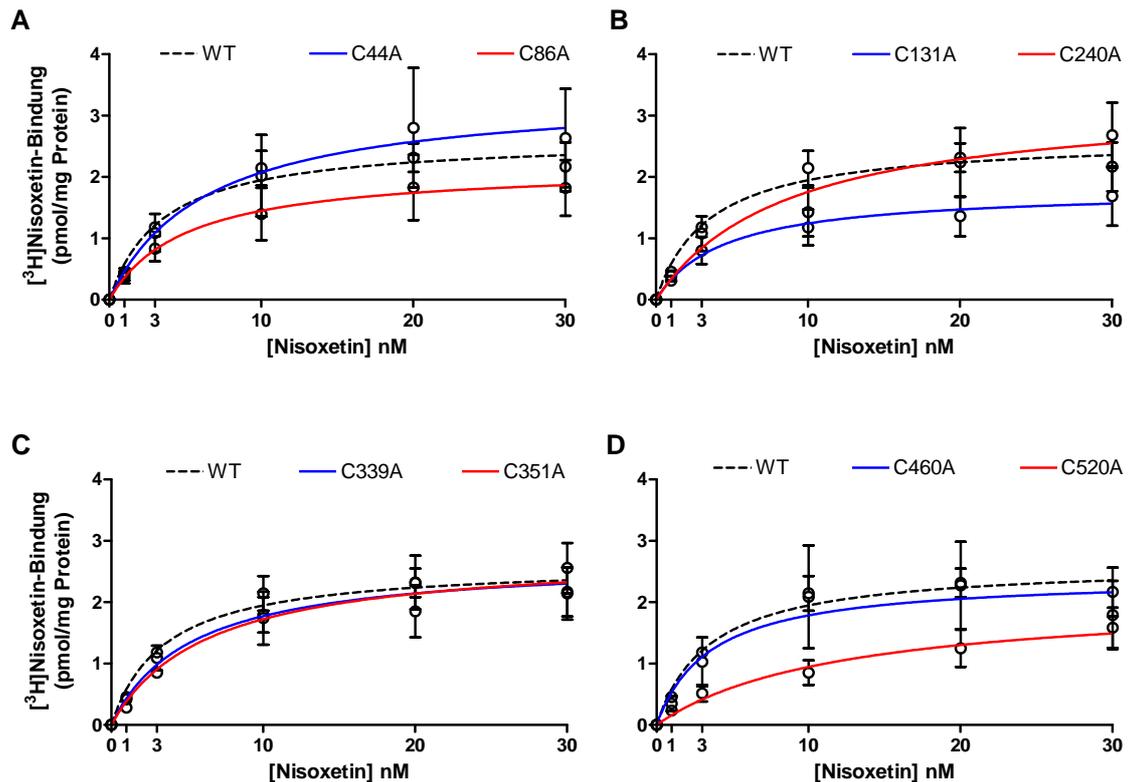


Abbildung 21: Sättigungskinetik der spezifischen [^3H]Nisoxetin-Bindung von hNAT-WT und hNAT-Cys/Ala-Mutanten

Dargestellt sind die Sättigungshyperbeln der spezifischen (Desipramin [$10 \mu\text{M}$]-sensitiven) [^3H]Nisoxetin-Bindung (4°C , 90 min). Die Kurve des hNAT-WT (gestrichelte Linie) ist zur Orientierung jeweils (in A - D) mit dargestellt. Die Versuche wurden an intakten, transient transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Die gezeigten Mittelwerte $\pm s_x$ stammen aus $n = 3 - 4$ von einander unabhängigen Experimenten.

Transporter	$[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme		$[^3\text{H}]\text{Nisoxetin}$ -Bindung		
	K_m (μM) $\pm s_x$ (n)	V_{\max} (pmol/mg Protein/min)	K_D (nM) $\pm s_x$ (n)	B_{\max} (pmol/mg Protein)	V_{\max}/B_{\max} (min^{-1})
hNAT-WT	$0,5 \pm 0,2$ (3)	$34,9 \pm 6,6$	$3,5 \pm 0,6$ (3)	$2,6 \pm 0,4$	13
C44A	$0,3 \pm 0,1$ (3)	$20,6 \pm 5,4$	$5,7 \pm 1,4$ (4)	$4,0 \pm 0,9$	5
C86A	$0,4 \pm 0,3$ (3)	$25,8 \pm 9,2$	$3,8 \pm 1,3$ (3)	$2,5 \pm 0,6$	10
C131A	$0,5 \pm 0,2$ (3)	$21,5 \pm 4,8$	$4,0 \pm 1,8$ (4)	$1,9 \pm 0,5$	11
C240A	$0,3 \pm 0,1$ (3)	$25,9 \pm 5,6$	$4,4 \pm 0,3$ (3)	$3,4 \pm 0,3$	8
C339A	$0,3 \pm 0,1$ (3)	$20,0 \pm 1,9$	$5,9 \pm 1,1$ (3)	$2,8 \pm 0,5$	7
C351A	$0,3 \pm 0,2$ (3)	$38,0 \pm 14,6$	$6,3 \pm 1,3$ (3)	$2,9 \pm 0,6$	6
C460A	$0,4 \pm 0,1$ (3)	$34,3 \pm 0,7$	$5,0 \pm 1,8$ (3)	$2,5 \pm 0,7$	13
C520A	$0,5 \pm 0,2$ (3)	$22,8 \pm 7,5$	$15,5 \pm 8,3$ (4)	$2,0 \pm 0,4$	11

Tabelle 2: Kinetische Parameter für $[^3\text{H}]\text{Nisoxetin}$ -Bindung und $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme von hNAT-WT und hNAT-Cys/Ala-Mutanten

Die Werte für B_{\max} und K_D sowie V_{\max} und K_m wurden durch nicht-lineare Regressionsanalyse der in den Abbildung 20 und Abbildung 21 gezeigten Daten ermittelt. Angegeben sind Mittelwerte $\pm s_x$ von $n = 3 - 4$ unabhängigen Experimenten, die mit Dreifachbestimmungen durchgeführt wurden. Die Daten wurden mittels *one-way ANOVA* und anschließendem Dunnett's post-hoc Test (Mutante vs. hNAT-WT) analysiert. Das Verhältnis V_{\max}/B_{\max} wurde bestimmt aus mittleren V_{\max} - und B_{\max} -Werten und dient als Maß der Transporter-Wechselzahl.

Multipler Austausch von Cysteinen

Da keines der 8, in reduzierter Form vorliegenden, Cysteine einzeln von essentieller Bedeutung für den Substrattransport und die Ligandbindung des hNAT war, sollte überprüft werden, welche Auswirkung ein gemeinsamer Austausch von mehreren oder allen dieser 8 Cysteine auf die Funktionalität des Transporters hat. Dazu wurden durch gerichtete Mutagenese zunächst alle 8 Cysteine in einer Variante (CX₈A) gemeinsam gegen Alanin und in einer weiteren (CX₈S) gegen Serin ausgetauscht. Mit den resultierenden Mutanten CX₈A und CX₈S wurden $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahmeversuche durchgeführt. Wie Abbildung 22 veranschaulicht, war jedoch weder im Fall von CX₈A noch im Fall von CX₈S eine spezifische $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme feststellbar.

Es wurden daher auch 3 Mutanten, die als sequentielle Zwischenschritte bei der Erzeugung von CX₈S anfielen, bezüglich der [³H]MPP⁺-Aufnahme untersucht. Auf diese Weise sollte aufgeklärt werden, ab welchem Cysteinaustausch der Funktionsverlust auftrat. Aus der Reihenfolge der nacheinander ausgetauschten Cysteine resultierten die folgenden Varianten:

CX₂S gegen Serin ausgetauschte Cysteine in Position: 86, 520

CX₃S gegen Serin ausgetauschte Cysteine in Position: 86, 460, 520

CX₄S gegen Serin ausgetauschte Cysteine in Position: 86, 339, 460, 520

Der gemeinsame Austausch von Cys86 und Cys520 gegen Serin in Mutante CX₂S verursachte eine etwa 70%ige Reduktion der spezifischen [³H]MPP⁺-Aufnahme im Vergleich zum hNAT-WT. Wurde zusätzlich noch Cys460 gegen Serin ersetzt (Mutante CX₃S), bewirkte dies eine weitere Verringerung des Transports, so dass hier noch etwa 10% der Aufnahme des WT gemessen wurden. Die Mutante CX₄S, bei der zusätzlich auch Cys339 mutiert wurde, war schließlich, wie CX₈S und CX₈A inaktiv (Abbildung 22).

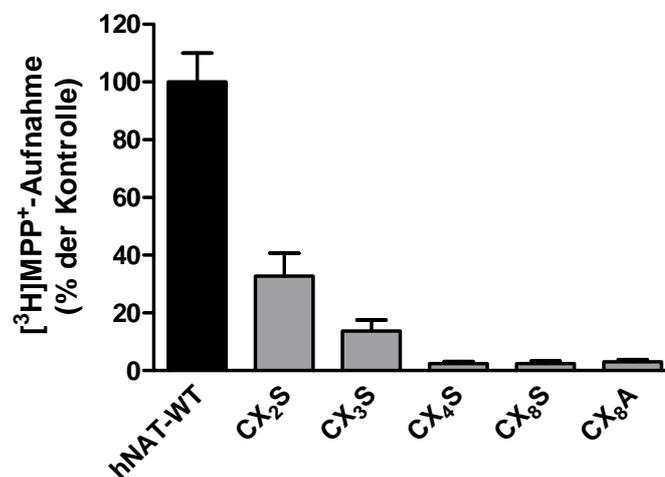


Abbildung 22: [³H]MPP⁺-Aufnahme von hNAT-WT und hNAT-Varianten mit multiplem Cysteinaustausch

Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm s_x$ ($n = 3$) der spezifischen (Nisoxetin [10 μ M]-sensitiven) [³H]MPP⁺-Aufnahme (10 nM, 10 min, 37°C) als % der hNAT-WT-Kontrolle.

Die noch Transportaktivität zeigenden Varianten CX₂S und CX₃S wurden bezüglich [³H]MPP⁺-Aufnahme und [³H]Nisoxetin-Bindung funktionell charakterisiert (Abbildung 23). CX₂S zeigte eine im Vergleich zum hNAT-WT statistisch hoch signifikant reduzierte V_{max} bei einem gleichzeitig tendenziell erhöhten K_m-Wert für [³H]MPP⁺. Der Wert für B_{max} war signifikant erniedrigt und der K_D-Wert von [³H]Nisoxetin ebenfalls tendenziell erhöht. Die konkreten Werte sind in Tabelle 3 angegeben.

Im Fall der Mutante CX₃S nahmen die Expressionsdichte und damit auch die Transportgeschwindigkeit von MPP⁺ nochmals ab. Die B_{max} sank auf einen im Vergleich zum hNAT-WT statistisch hoch signifikant unterschiedlichen Wert, während die Affinität zu Nisoxetin durch den zusätzlichen Cysteinaustausch nicht weiter verringert wurde (Tabelle 3).

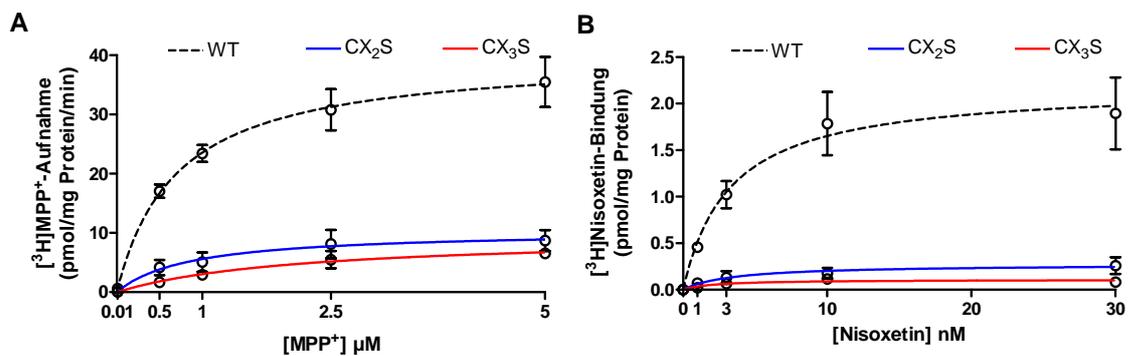


Abbildung 23: Sättigungskinetik der spezifischen [³H]MPP⁺-Aufnahme (A) und der spezifischen [³H]Nisoxetin-Bindung (B) von hNAT-WT sowie der hNAT-Mutanten CX₂S und CX₃S

Dargestellt sind die Sättigungshyperbeln der spezifischen (Nisoxetin [10 µM]-sensitiven) [³H]MPP⁺-Aufnahme (37°C, 1 min) (A) und der spezifischen (Desipramin [10 µM]-sensitiven) [³H]Nisoxetin-Bindung (4°C, 90 min). Die Versuchsbedingungen entsprachen den in den Legenden zu Abbildung 20 und Abbildung 21 angegebenen.

Transporter	$[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme		$[^3\text{H}]\text{Nisoxetin}$ -Bindung	
	K_m (μM) $\pm s_x$ (n)	V_{\max} (pmol/mg Protein/min)	K_D (nM) $\pm s_x$ (n)	B_{\max} (pmol/mg Protein)
hNAT-WT	$0,7 \pm 0,1$ (4)	$40,5 \pm 5,5$	$1,7 \pm 0,4$ (3)	$1,4 \pm 0,4$
CX ₂ S	$2,9 \pm 1,3$ (4)	$16,3 \pm 3,9$ **	$4,4 \pm 0,9$ (3)	$0,3 \pm 0,1$ *
CX ₃ S	$3,6 \pm 0,7$ (4)	$13,3 \pm 2,4$ **	$3,2 \pm 1,6$ (3)	$0,1 \pm 0,01$ **

Tabelle 3: Kinetische Parameter der $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme und $[^3\text{H}]\text{Nisoxetin}$ -Bindung von hNAT-WT und multiplen hNAT-Cys/Ser-Mutanten

Die Werte für B_{\max} und K_D sowie V_{\max} und K_m wurden durch nicht-lineare Regressionsanalyse der in Abbildung 23 gezeigten Daten ermittelt. Angegeben sind Mittelwerte $\pm s_x$ von $n = 3 - 4$ unabhängigen Experimenten, die mit Dreifachbestimmungen durchgeführt wurden. Die Daten wurden mittels *one-way ANOVA* und anschließendem Dunnett's post-hoc Test (Mutante vs. hNAT-WT) analysiert. Vom hNAT-WT statistisch signifikant unterschiedliche Werte sind gekennzeichnet (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ vs. hNAT-WT).

1.2.2 Kontrolle der Zelloberflächenexpression der hNAT-Mutanten C176A und C185A durch Oberflächenbiotinylierung

Für den DAT und den SERT konnte bereits gezeigt werden, dass die Cysteine innerhalb der ES2, die als ein Cystin vorliegen, essentiell für die Expression dieser Transporter an der Zelloberfläche sind (Wang et al. 1995; Chen et al. 2007). Es sollte daher geprüft werden, ob der Funktionsverlust der beiden hNAT-Mutanten C176A und C185A ebenfalls auf ein Ausbleiben der Zelloberflächenexpression dieser Mutanten zurückzuführen ist. Der Nachweis erfolgte durch Western-Blot-Analyse der, über ein SDS-Gel getrennten, biotinylierten Membranproteine (B.2.3.3) von HEK293-Zellen, die zuvor entweder mit cDNA von hNAT-WT, C176A oder C185A transient transfiziert worden waren.

Der hNAT-WT konnte als eine singuläre Bande von etwa 70 kDa per Immunodetektion nachgewiesen werden, während im Falle der beiden Mutanten ein Signal ausblieb (Abbildung 24). Dieser Befund belegt den Verlust der Membranexpression dieser beiden Cys/Ala-Mutanten. Eine Disulfidbrücke zwischen C176 und C185 muss daher als essentiell für die korrekte Insertion des hNAT-Proteins in die Plasmamembran angesehen werden.

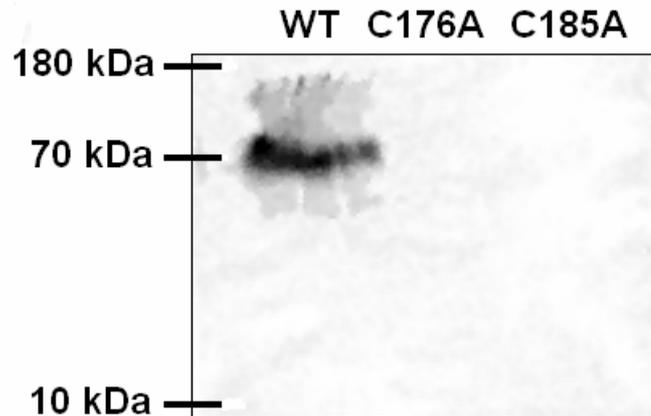


Abbildung 24: Ausbleiben der Zelloberflächenexpression von C176A und C185A

Gezeigt ist ein Western-Blot von Membranproteinen oberflächenbiotinylierter HEK293-Zellen, die mit cDNA von hNAT-WT, C176A bzw. C185A transient transfiziert wurden. Die ausgetauschten Cysteine liegen innerhalb der ES2 und bilden dort eine Disulfidbrücke, die von Bedeutung für die Membranexpression des NAT ist. Zur Orientierung sind die Positionen von 3 Größenmarkerbanden (10, 70, 180 kDa [PageRuler, Fermentas]) mit dargestellt.

1.2.3 Ermittlung der subzellulären Lokalisation nicht-funktionaler hNAT-Cys-Mutanten durch Fluoreszenzmikroskopie

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation der nicht-funktionalen hNAT-Cys/Ala-Mutanten C176A, C185A, CX₈A, CX₈S und CX₄S wurden diese als *Cycle 3 GFP*-Fusionsproteine transient in HEK293-Zellen exprimiert und die Zellen fluorezenzmikroskopisch untersucht. Auf diese Weise konnte geprüft werden, ob der Funktionsverlust von CX₈A, CX₈S und CX₄S auf einem Ausbleiben der Membranexpression dieser Varianten beruht.

Zur Erzeugung der *Cycle 3 GFP*-Fusionsproteine wurde die cDNA des hNAT-WT sowie die der Varianten CX₈A, CX₈S und CX₄S aus dem Vektor pcDNA3 unter Verwendung der Restriktionsenzyme *Xho*I und *Xba*I in den Vektor pcDNA3.1/NT-GFP subkloniert. Dieser Vektor ermöglichte die Expression der Transportervarianten mit einem N-terminal gekoppelten GFP. Die Varianten C176A-GFP und C185A-GFP wurden durch gerichtete Mutagenese, ausgehend von der cDNA des hNAT-WT-GFP, direkt im Vektor pcDNA3.1/NT-GFP erzeugt.

Das N-terminale GFP hatte keinen Einfluss auf Membranexpression und Funktionalität des hNAT. Dies konnte aus der unveränderten Transportleistung von hNAT-WT-GFP im Vergleich zum hNAT-WT geschlossen werden (Daten nicht

gezeigt). Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigen dies (Schwartz et al. 2005).

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind in Abbildung 25 illustriert. Im Fall der Zellen, die den hNAT-WT exprimierten, war das Fluoreszenzsignal fast ausschließlich auf den Bereich der Plasmamembran begrenzt. Die Transporter schienen dabei in den bereits von Distelmaier et al. (2004) beschriebenen *Clustern* innerhalb der Plasmamembran exprimiert worden zu sein (markiert durch Pfeile in Abbildung 25 A). Zur Kontrolle nicht transfizierte Zellen zeigten kein Fluoreszenzsignal (Abbildung 25 H).

Bei Zellen, die die Mutanten C176A und C185A (Abbildung 25 E und F) exprimierten, blieb ein Signal in der Plasmamembran aus. Stattdessen konnte eine diffuse Fluoreszenz innerhalb des Zytoplasmas beobachtet werden, wie sie bei Zellen auftrat, die zur Kontrolle nur das zytoplasmatische Protein GFP exprimierten (Abbildung 25 G). Diese Ergebnisse belegt, dass im Falle der beiden Mutanten keine Membranexpression stattfand und bestätigen damit die Befunde der Biotinylierungsexperimente von C.1.2.2.

Wie in den Abbildung 25 B, C und D zu erkennen ist, blieb die Fluoreszenz auch im Fall der drei Varianten CX₄S, CX₈S und CX₈A auf das Zytoplasma beschränkt. Die von der Fluoreszenz ausgesparten Zellkerne erschienen dabei als dunklere Bereiche innerhalb der Zellen. Deutlich sichtbar sind relativ intensive, punktförmige, zytoplasmatische Fluoreszenzsignale im Fall der Variante CX₈A (markiert durch Pfeile in Abbildung 25 C). Diese könnten von Lysosomen stammen, die größere Mengen des fehlgefalteten, NAT-Proteins phagozytiert haben. Möglicherweise handelt es sich dabei auch um Aggregate von CX₈A, das auf Grund seiner außerordentlichen Hydrophobizität innerhalb der Membranen des Golgi Apparates präzipitiert ist. Es sei daran erinnert, dass in dieser Variante in 8 Positionen die relativ hydrophile Aminosäure Cystein gegen das hydrophobe Alanin ausgetauscht wurde. Derartige punktförmige Fluoreszenzsignale konnten im Fall der hydrophileren Mutante CX₈S nicht beobachtet werden. Hier sind stattdessen relativ deutlich die membranären Strukturen des endoplasmatischen Retikulums erkennbar (Abbildung 25 D).

Durch diese Ergebnisse konnte, wie für C176A und C185A, auch im Fall der drei Varianten CX₄S, CX₈S und CX₈A ein Ausbleiben der Membranexpression nachgewiesen werden.

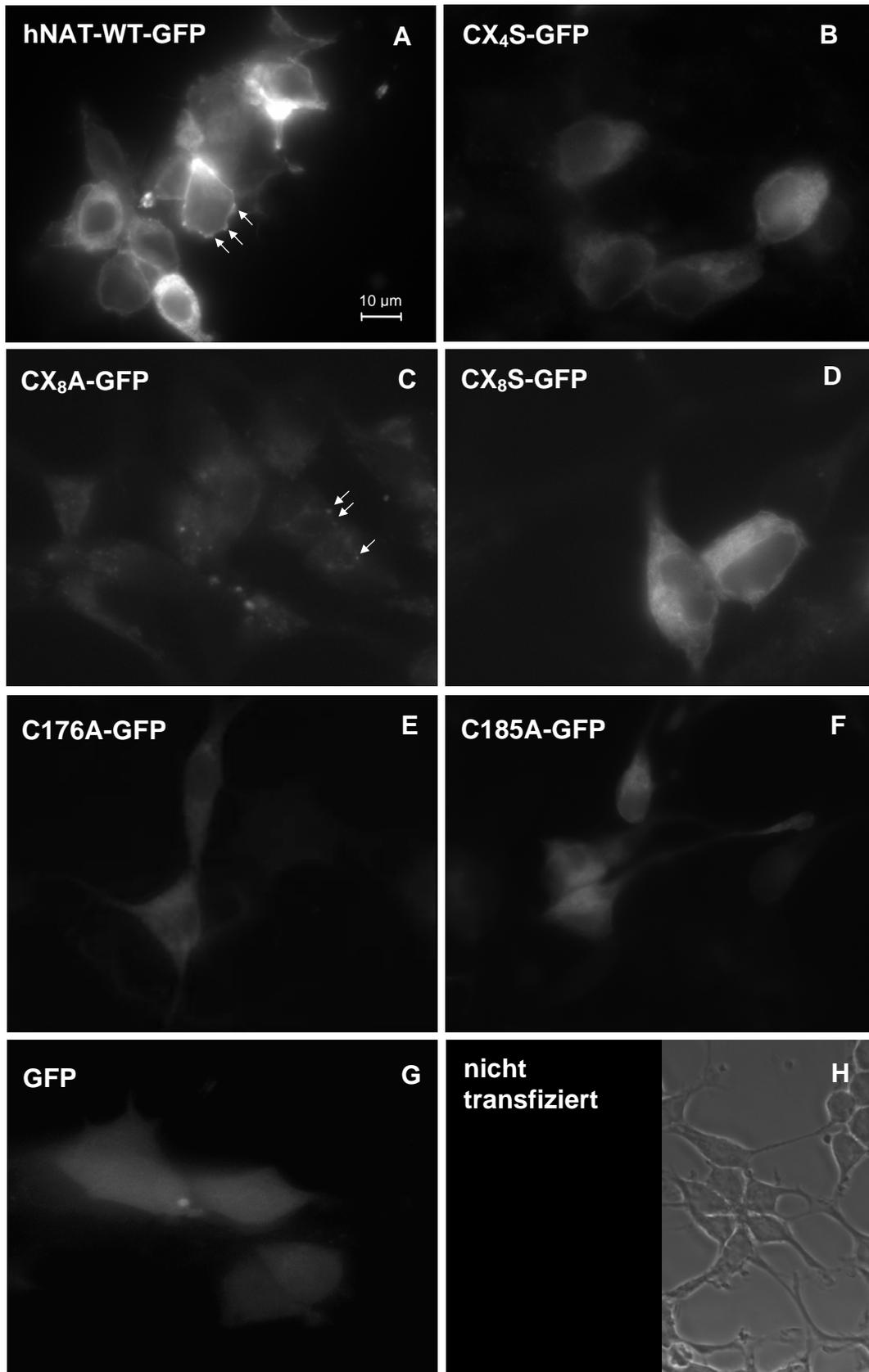


Abbildung 25: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transient transfizierter HEK293-Zellen zur Ermittlung der subzellulären Lokalisation GFP-markierter hNAT-Varianten (Legende siehe Seite 89 oben.)

Der hNAT-WT (A) und die Varianten CX₄S (B), CX₈A (C), CX₈S (D), C176A (E) und C185A (F) wurden N-terminal mit GFP gekoppelt und transient in HEK293-Zellen exprimiert. Zur Kontrolle dienten nur mit dem GFP-Vektor transfizierte (G) sowie nicht transfizierte Zellen (H [links: Fluoreszenzmodus; rechts: Durchlicht]). Vergrößerung: 60x (Öl); bei G und D plus Ovar (1,5x)

1.2.4 Konzentrationsabhängige Inhibition der [³H]Nisoxetin-Bindung der hNAT-Cys/Ala-Mutanten durch NEM

Auch wenn für die Inaktivierung des NAT-Substrattransports durch NEM ein indirekter Mechanismus verantwortlich gemacht werden konnte (C.1.1.5), bleibt dennoch die Möglichkeit bestehen, dass für die Inhibition der Nisoxetin-Bindung durch das Sulfhydrylreagenz die Alkylierung eines Cysteins innerhalb der Ligandbindungstasche des NAT verantwortlich ist.

Es sollte daher geprüft werden, ob die 8 funktionellen hNAT-Cys/Ala-Einzelaustausch-Mutanten (C44A, C86A, C131A, C339A, C351A, C460A, C520A) eine veränderte Sensitivität gegenüber einer Inhibition der [³H]Nisoxetin-Bindung durch NEM zeigen. Zu diesem Zweck wurden die hNAT-Cys/Ala-Mutanten und der hNAT-WT transient in HEK293-Zellen exprimiert und, wie unter C.1.1.1 beschrieben, die konzentrationsabhängige, irreversible (auswaschresistente) Hemmung der spezifischen [³H]Nisoxetin-Bindung (1 nM, 90 min, 4°C) bestimmt. Die ermittelten Daten wurden mit denen des hNAT-WT verglichen.

Keine der 8 hNAT-Cys/Ala-Mutanten erwies sich im Hinblick auf die spezifische [³H]Nisoxetin-Bindung als resistent gegen die inhibitorische Wirkung von NEM. Im Fall jeder Mutante war die beobachtete Hemmung, wie beim hNAT-WT, resistent gegen 25minütiges, intensives Waschen (Abbildung 26). Auch die Empfindlichkeit der Cys/Ala-Mutanten gegenüber NEM war nicht verändert, so zeigten die IC₅₀-Werte und die Hill-Koeffizienten, nach Auswertung mittels *one-way ANOVA* und anschließendem Dunnett's post-hoc Test, keinen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zum hNAT-WT (Tabelle 4).

Ebenfalls wurden die 8 hNAT-Cys/Ala-Mutanten in Bezug auf eine Hemmung der [³H]MPP⁺-Aufnahme durch NEM geprüft. Diese Versuche wurden durchgeführt, bevor der im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärte Mechanismus der Aufnahmehemmung durch NEM bekannt war (siehe C.1.1.5). Erwartungsgemäß

ließ sich die [^3H]MPP $^+$ -Aufnahme im Fall jeder hNAT-Cys/Ala-Mutante durch NEM hemmen (Ergebnisse nicht gezeigt).

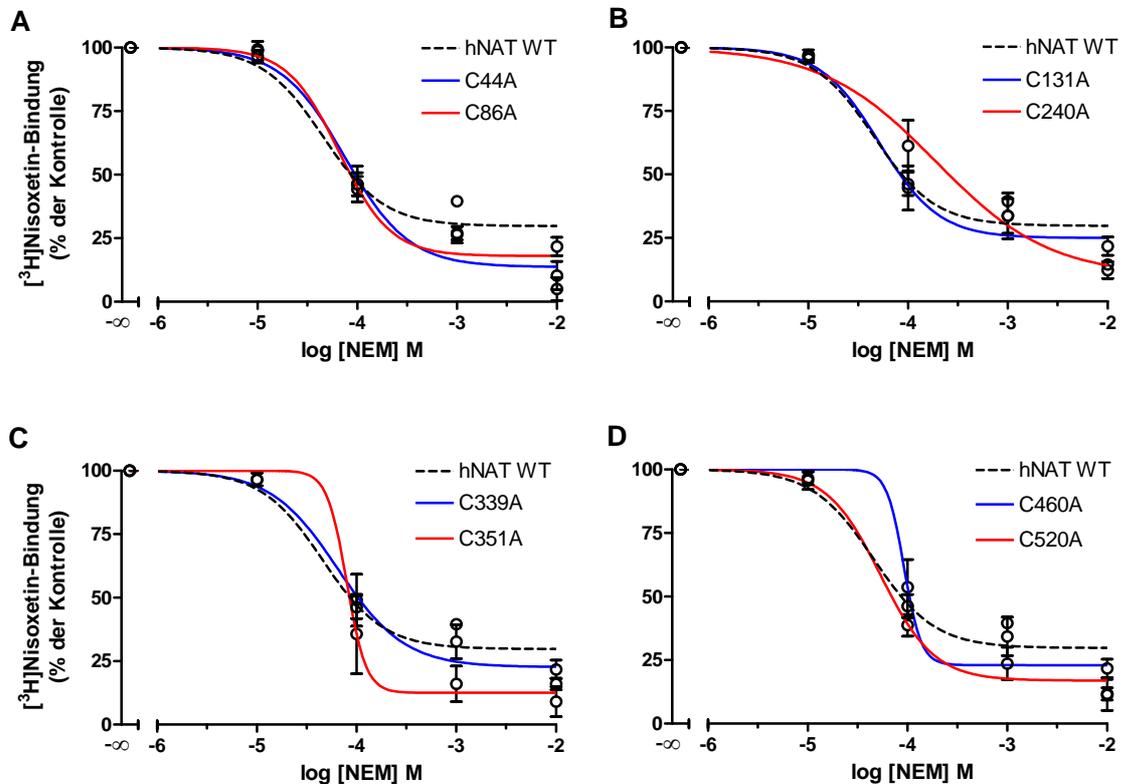


Abbildung 26: Konzentrationsabhängige Inhibition der [^3H]Nisoxetin-Bindung durch NEM an HEK293-Zellen, transient transfiziert mit cDNA von hNAT-WT oder hNAT-Cys/Ala-Mutanten

Zur Bestimmung der irreversiblen Hemmung der spezifischen (Desipramin [10 μM]-sensitiven) [^3H]Nisoxetin-Bindung (1 nM, 90 min, 4°C) wurden die Zellen 90 min mit ansteigenden NEM-Konzentrationen vorinkubiert (37°C) und anschließend 5 x 5 min gewaschen. Die Kurve des hNAT-WT (gestrichelte Linie) ist zur Orientierung jeweils (A – D) mit dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte $\pm s_x$ (n = 3 – 6) der spezifischen [^3H]Nisoxetin-Bindung als Prozent der nicht mit NEM behandelten Kontrolle.

Transporter	IC ₅₀ [µmol] ± s _x (n)	Hill Koeffizient ± s _x (n)
hNAT-WT	233 ± 83 (6)	-0,7 ± 0,1 (6)
C44A	142 ± 49 (3)	-1,2 ± 0,4 (3)
C86A	89 ± 19 (3)	-2,7 ± 1,2 (3)
C131A	69 ± 13 (3)	-1,4 ± 0,5 (3)
C240A	270 ± 13 (3)	-1,4 ± 0,6 (3)
C339A	205 ± 153 (3)	-1,3 ± 0,4 (3)
C351A	164 ± 57 (3)	-2,7 ± 0,8 (3)
C460A	258 ± 121 (3)	-1,7 ± 0,9 (3)
C520A	68 ± 2 (3)	-2,5 ± 1,3 (3)

Tabelle 4: IC₅₀-Werte und Hill-Koeffizienten für die Hemmung der spezifischen [³H]Nisoxetin-Bindung durch NEM an hNAT-WT und hNAT-Cys/Ala-Mutanten

Die Daten stammen aus den in Abbildung 26 veranschaulichten Experimenten und wurden auf signifikante Unterschiede im Vergleich zu hNAT-WT mittels *one-way ANOVA* gefolgt von einem Dunnett's post-hoc Test geprüft. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).

1.3 Funktionelle Bedeutung der Histidine des hNAT und ihre Interaktion mit NEM

Zur Bestimmung der funktionellen Bedeutung der Histidine des hNAT wurden alle 13 Histidine (His, H) (siehe Abbildung 2) durch gerichtete Mutagenese einzeln gegen Alanin ausgetauscht und die resultierenden hNAT-His/Ala-Mutanten (H178A, H199A, H220A, H222A, H228A, H280A, H296A, H370/372A, H441A, H589/599A, H613A) funktionell charakterisiert. Die Histidine in den Positionen 370 und 372 sowie 598 und 599 wurden auf Grund ihrer Nachbarschaft jeweils gemeinsam in einer Variante (H370/372A und H598/599A) mutiert.

Die His/Ala-Mutanten wurden zunächst nach transients Transfektion in HEK293-Zellen exprimiert und die kinetischen Parameter V_{\max} und K_m durch Sättigungsexperimente der [³H]MPP⁺-Aufnahme (1 min, 37°C) analog wie für die Cys/Ala-Mutanten beschrieben (C.1.2.1) bestimmt. Abbildung 27 verdeutlicht, dass alle hNAT-His/Ala-Mutanten eine sättigbare [³H]MPP⁺-Aufnahme zeigten. Die ermittelten V_{\max} und K_m -Werte sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Nach Prüfung durch *one-way ANOVA* ergab sich im Fall der Mutanten H220A, H296A, H370/372A und H598/599A eine im Vergleich zum hNAT-WT etwa 2fach und

damit statistisch signifikant erniedrigte V_{max} . Hoch signifikant, etwa um den Faktor 2,4, erniedrigt war diese bei H441A (Tabelle 5). In Bezug auf die Affinität zu MPP^+ zeigte nur die Mutante H178A einen Unterschied zum hNAT-WT, dies äußerte sich in einem statistisch signifikant erhöhten K_m -Wert für $[^3H]MPP^+$.

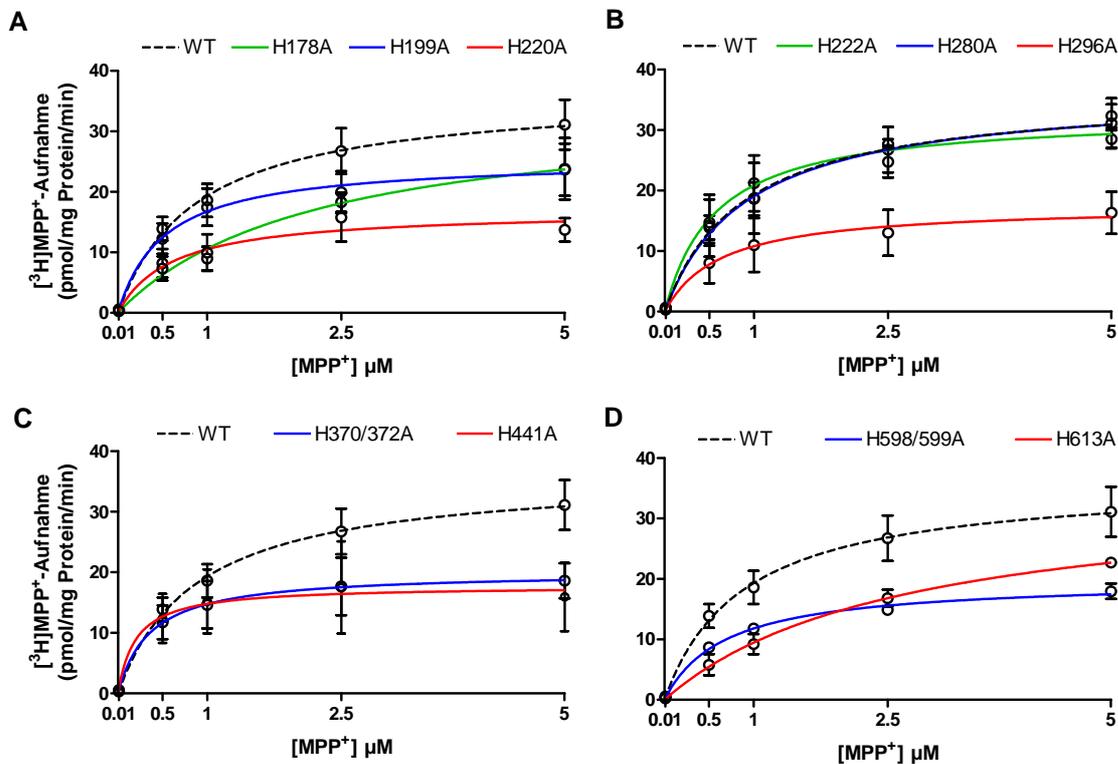


Abbildung 27: Sättigungskinetik der spezifischen $[^3H]MPP^+$ -Aufnahme von hNAT-WT und hNAT-His/Ala-Mutanten

Dargestellt sind die Sättigungshyperbeln der spezifischen (Nisoxetin $[10 \mu M]$ -sensitiven) $[^3H]MPP^+$ -Aufnahme ($37^\circ C$, 1 min) (in A – D). Die Kurve des hNAT-WT (gestrichelte Linie) ist zur Orientierung jeweils (A – D) mit dargestellt. Die Versuchsbedingungen entsprachen den in der Legende zu Abbildung 20 angegebenen.

Im Fall der His/Ala-Mutanten (H220A, H296A, H370/372A, H441A und H598/599A), die eine signifikant erniedrigte, maximale $[^3H]MPP^+$ -Aufnahmegeschwindigkeit zeigten, sowie bei H222A wurden durch Sättigungsexperimente zusätzlich die kinetischen Parameter B_{max} und K_D der $[^3H]$ Nisoxetin-Bindung ($4^\circ C$, 90 min) bestimmt (Abbildung 28). Eine Auflistung der durch *one-way ANOVA* auf statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zum hNAT-WT geprüften Werte ist in Tabelle 5 gegeben.

Insgesamt betrachtet zeichnete sich jede der diesbezüglich untersuchten His/Ala-Mutanten, mit Ausnahme von H222A, durch eine reduzierte B_{\max} aus. Statistisch signifikant erniedrigt war diese im Fall der Mutanten H220A (2,4fach) und H598/599A (2,9fach). Der K_D -Wert von [^3H]Nisoxetin war hier nicht beeinflusst. Hoch signifikant erniedrigt war die B_{\max} analog zur V_{\max} (siehe oben) bei Mutante H441A (3,7fach). Im Vergleich zum hNAT-WT war der K_D -Wert tendenziell erhöht. Eine statistisch signifikante bzw. hoch signifikante Erhöhung des K_D -Werts von [^3H]Nisoxetin wurde bei den Mutanten H296A (5,7fach) und H370/372A (8,6fach) beobachtet. Das Gesamtergebnis im Fall der Mutante H296A (signifikant erhöhter K_D von [^3H]Nisoxetin, tendenziell erniedrigte B_{\max} , keine signifikante Veränderung des K_m [NA, MPP $^+$], signifikant reduzierte V_{\max}) deckt sich mit Befunden von Paczkowski et al. (2007) an einer hNAT-Mutante mit einem Austausch des Histidins in Position 296 gegen Serin.

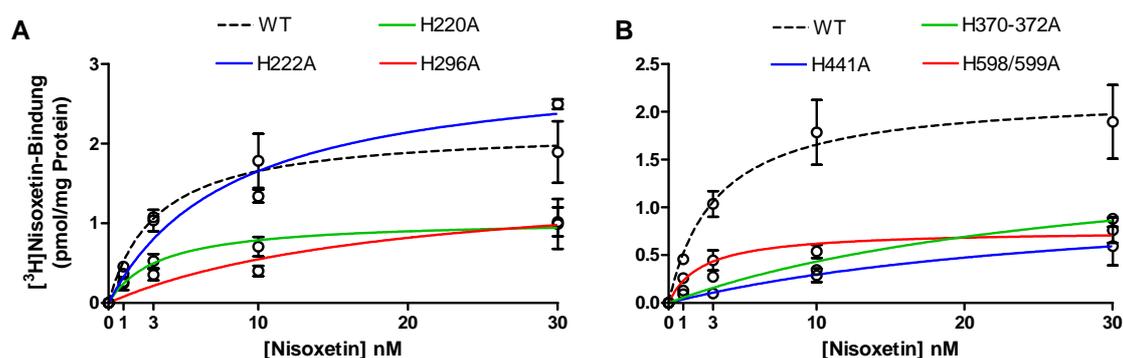


Abbildung 28: Sättigungskinetik der spezifischen [^3H]Nisoxetin-Bindung von hNAT-WT und hNAT-His/Ala-Mutanten mit erniedrigter [^3H]MPP $^+$ -Aufnahme

Dargestellt sind die Sättigungshyperbeln der spezifischen (Desipramin [10 μM]-sensitiven) [^3H]Nisoxetin-Bindung (4°C, 90 min). Die Kurve des hNAT-WT (gestrichelte Linie) ist zur Orientierung jeweils (in A und B) mit dargestellt. Die Versuchsbedingungen entsprachen den in der Legende zu Abbildung 21 angegebenen.

Transporter	$[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme		$[^3\text{H}]\text{Nisoxetin}$ -Bindung		
	K_m (μM) $\pm s_x$ (n)	V_{\max} (pmol/mg Protein/min)	K_D (nM) $\pm s_x$ (n = 3)	B_{\max} (pmol/mg Protein)	V_{\max}/B_{\max} (min^{-1})
hNAT-WT	$0,7 \pm 0,2$ (6)	$44,3 \pm 4,3$	$3,5 \pm 0,6$	$2,6 \pm 0,4$	13
H178A	$2,3 \pm 0,5$ (3) *	$35,0 \pm 7,4$	n. b.	n. b.	n. b.
H199A	$0,6 \pm 0,03$ (3)	$26,5 \pm 4,6$	n. b.	n. b.	n. b.
H220A	$1,1 \pm 0,4$ (4)	$22,7 \pm 3,9$ *	$3,6 \pm 1,5$	$1,1 \pm 0,4$ *	21
H222A	$0,8 \pm 0,5$ (3)	$34,1 \pm 2,0$	$8,5 \pm 0,6$	$3,0 \pm 0,5$	11
H228A	$0,4 \pm 0,2$ (3)	$37,1 \pm 8,7$	n. b.	n. b.	n. b.
H280A	$1,1 \pm 0,6$ (4)	$38,1 \pm 1,9$	n. b.	n. b.	n. b.
H296A	$1,2 \pm 0,6$ (3)	$22,2 \pm 6,4$ *	$19,9 \pm 2,3$ *	$1,7 \pm 0,3$	13
H370/372A	$0,4 \pm 1,3$ (3)	$20,2 \pm 3,6$ *	$30,1 \pm 11,8$ **	$1,7 \pm 0,6$	12
H441A	$0,2 \pm 0,07$ (4)	$18,6 \pm 5,0$ **	$11,0 \pm 2,4$	$0,7 \pm 0,1$ **	27
H598/599A	$0,7 \pm 0,1$ (3)	$20,0 \pm 1,5$ *	$5,1 \pm 4,1$	$0,9 \pm 0,3$ *	22
H613A	$1,3 \pm 0,6$ (3)	$35,7 \pm 7,9$	n. b.	n. b.	n. b.

Tabelle 5: Kinetische Parameter für $[^3\text{H}]\text{Nisoxetin}$ -Bindung und $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme von hNAT-WT und hNAT-Cys/Ala-Mutanten

Die Werte für B_{\max} und K_D sowie V_{\max} und K_m wurden durch nicht-lineare Regressionsanalyse der in den Abbildung 27 und Abbildung 28 gezeigten Daten ermittelt. Angegeben sind Mittelwerte $\pm s_x$ von $n = 3 - 4$ unabhängigen Experimenten, die mit Dreifachbestimmungen durchgeführt wurden. Die Daten wurden mittels *one-way ANOVA* und anschließend *Dunnett's post-hoc Test* (Mutante vs. hNAT-WT) analysiert. Vom hNAT-WT statistisch signifikant unterschiedliche Werte sind gekennzeichnet (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ vs. hNAT-WT, $n = 3 - 4$). (n. b., nicht bestimmt)

Interaktion der His/Ala-Mutanten mit NEM

Wie bereits erwähnt, kann NEM unter bestimmten Umständen, neben der Alkylierung von Cystein-Sulphydrylgruppen auch unspezifische Reaktionen mit dem Imidazolring des Histidins eingehen (Bednar 1990). Zur Aufklärung, ob die kovalente Interaktion eines Histidins des hNAT an der irreversiblen Inhibition der $[^3\text{H}]\text{Nisoxetin}$ -Bindung durch NEM beteiligt ist, wurden die zuvor beschriebenen hNAT-His/Ala-Mutanten bezüglich der konzentrationsabhängigen Hemmung der $[^3\text{H}]\text{Nisoxetin}$ -Bindung durch NEM untersucht. Die im Fall aller Mutanten

ermittelten IC_{50} -Werte wurden anschließend durch *one-way ANOVA* auf statistisch relevante Unterschiede zum hNAT-WT geprüft (Abbildung 29 und Tabelle 6).

Ein IC_{50} -Wert für die Hemmung der [3H]Nisoxetin-Bindung der Mutanten H296A und H370/372A durch NEM konnte nicht bestimmt werden, da sich auf Grund ihrer extrem niedrigen Affinität zu [3H]Nisoxetin (K_D siehe Tabelle 5) ein äußerst ungünstiges Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis ergab. Paczkowski et al. (2007) bestätigen diese Situation bei [3H]Nisoxetin-Bindungsversuchen mit der hNAT-Mutante H296S.

Wie Abbildung 29 veranschaulicht, zeigte die Mutante H222A ($IC_{50} = 1790 \mu M$) einen im Vergleich zum hNAT-WT ($IC_{50} = 233 \mu M$) etwa 8fach und damit statistisch hoch signifikant erhöhten IC_{50} -Wert. Die IC_{50} -Werte im Fall der übrigen getesteten Mutanten unterschieden sich nicht signifikant vom Wert für den hNAT-WT. Somit darf angenommen werden, dass die Alkylierung des funktionell nicht essentiellen Histidins in Position 222 (innerhalb der ES2) entscheidend für die Inhibition der Nisoxetin-Bindung durch NEM ist.

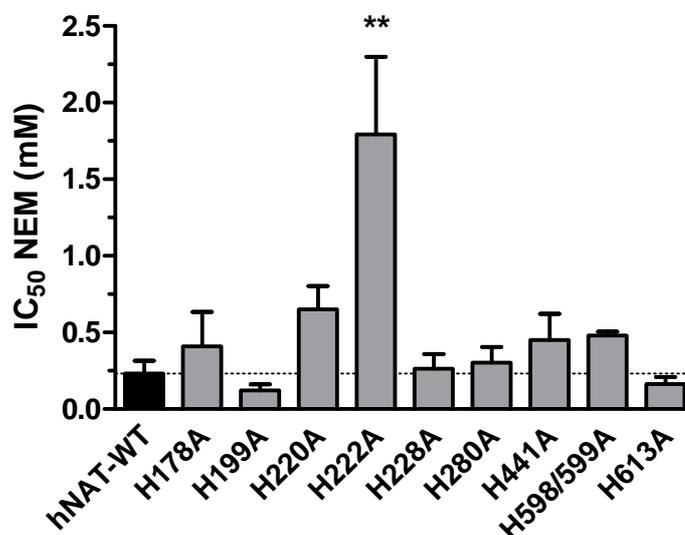


Abbildung 29: IC_{50} -Werte von NEM für die Hemmung der [3H]Nisoxetin-Bindung von hNAT-WT und hNAT-His/Ala-Mutanten

Effekt des Austausches der Histidine des hNAT gegen Alanin auf die NEM-Empfindlichkeit der [3H]Nisoxetin-Bindung. Die Bestimmung der IC_{50} -Werte erfolgte wie unter C.1.2.4 beschrieben. Weitere Details, siehe Legende zu Tabelle 6.

Transporter	IC ₅₀ [µmol] ± s _x (n)	Hill Koeffizient ± s _x (n)
hNAT-WT	233 ± 83 (6)	-0,7 ± 0,1 (6)
H178A	410 ± 220 (3)	-1,1 ± 0,5 (3)
H199A	122 ± 40 (4)	-1,6 ± 0,5 (4)
H220A	650 ± 153 (4)	-1,0 ± 0,2 (4)
H222A	1790 ± 50 (4) **	-1,6 ± 0,8 (4)
H228A	264 ± 95 (5)	-0,9 ± 0,2 (5)
H280A	303 ± 102 (4)	-0,5 ± 0,1 (4)
H441A	451 ± 171 (3)	-0,9 ± 0,2 (3)
H598/599A	481 ± 24 (3)	-0,6 ± 0,04 (3)
H613A	164 ± 47 (3)	-2,1 ± 1,4 (3)

Tabelle 6: IC₅₀-Werte und Hill-Koeffizienten für die Hemmung der spezifischen [³H]Nisoxetin-Bindung durch NEM an hNAT-WT und hNAT-His/Ala-Mutanten

Die Daten wurden auf signifikante Unterschiede im Vergleich zu hNAT-WT mittels *one-way ANOVA* gefolgt von einem Dunnett's post-hoc Test geprüft. Statistisch relevante Unterschiede sind gekennzeichnet (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ vs. hNAT-WT).

1.4 Versuche mit den β -Haloalkylaminen DSP4 und Xylamin

Wie in der Einleitung (A.1.3.2) bereits erwähnt, handelt es sich bei Xylamin und DSP4 um strukturelle sehr nahe verwandte Substrate und irreversible Inhibitoren des NAT. Die Stelle der kovalenten Interaktion ihres Aziridiniumions innerhalb der Ligandbindungstasche des NAT sollte durch die im Folgenden beschriebenen Versuche analysiert werden.

1.4.1 Zeitabhängigkeit der irreversiblen Inhibition der [³H]NA-Aufnahme durch DSP4 und Xylamin

Charakteristisch für irreversible Inhibitoren ist die Tatsache, dass ihre inhibitorische Potenz mit längerer Kontaktzeit zur Zielstruktur zunimmt. Abbildung 30 zeigt, dass mit längerer Vorinkubationszeit (10, 30 oder 90 min) mit DSP4 oder Xylamin niedrigere IC₅₀-Werte für eine auswaschresistente Hemmung der [³H]NA-Aufnahme in HEK293-hNAT-Zellen ermittelt wurden. DSP4 besaß nach 90 min mit einer IC₅₀ von etwa 2 µM eine ungefähr zweifach höhere Affinität als Xylamin. Für die nachfolgenden Experimente wurde daher DSP4 verwendet und jeweils eine Vorinkubationszeit von 90 min gewählt.

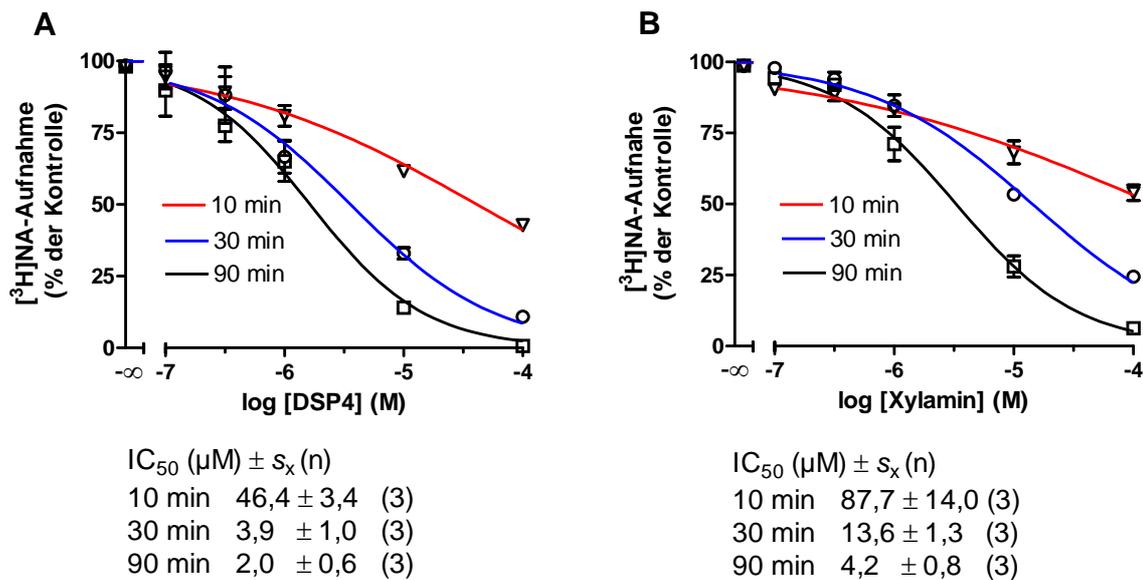


Abbildung 30: Einfluss der Vorinkubationszeit auf die konzentrationsabhängige, irreversible Inhibition der ^{3}H]NA-Aufnahme durch DSP4 (A) und Xylamin (B) in HEK293-hNAT-Zellen

Stabil transfizierte HEK293-hNAT-Zellen wurden 10, 30 oder 90 min lang mit ansteigenden Konzentrationen DSP4 (A) oder Xylamin (B) vorinkubiert (37°C). Nach intensivem Waschen (5 x 5 min) wurde die spezifische ^{3}H]NA-Aufnahme (10 nM, 10 min, 37°C) bestimmt. Dargestellt sind Dosis-Wirkungskurven, errechnet aus den Mittelwerten ± s_x (% der Kontrolle) der spezifischen ^{3}H]NA-Aufnahme von jeweils 3 separaten, mit Dreifachbestimmungen durchgeführten Experimenten.

1.4.2 Protektion der ^{3}H]NA-Aufnahme vor einer Inhibition durch DSP4

Von Noradrenalin und Kokain war bereits bekannt, dass sie den Ratten-NAT vor einer irreversiblen Inhibition durch Xylamin bzw. DSP4 schützen können (Cho et al. 1980; Koide et al. 1986). Es sollte nun geprüft werden, ob dies auch für den humanen NAT und die Substrate MPP⁺ und Ameszinium sowie den atypischen Nicht-Substrat-Inhibitor Bupropion gilt.

Die Versuche wurden, wie im Wesentlichen unter C.1.1.3 für die Protektionsversuche der ^{3}H]NA-Aufnahme beschrieben, durchgeführt. Die Protektor-Substanzen wurden in einer Konzentration von 30 μM eingesetzt; diese Konzentration entsprach mindestens 30 x ihrer IC₅₀ für die Hemmung der NA-Aufnahme am Ratten-NAT (Bönisch and Harder 1986). Während der zweiten Vorinkubation (90 min) war DSP4 ebenfalls in einer Konzentration von 30 μM

anwesend, dies entsprach etwa 15 x der IC_{50} nach 90 min Vorinkubation (siehe Abbildung 30). Nach gründlichem Auswaschen des ungebundenen DSP4s und der Protektoren erfolgte die Messung der [3H]NA-Aufnahme (10 nM, 10 min, 37°C). Alle getesteten Substanzen protekierten die [3H]NA-Aufnahme vor der irreversiblen Inhibition durch DSP4 (Abbildung 31).

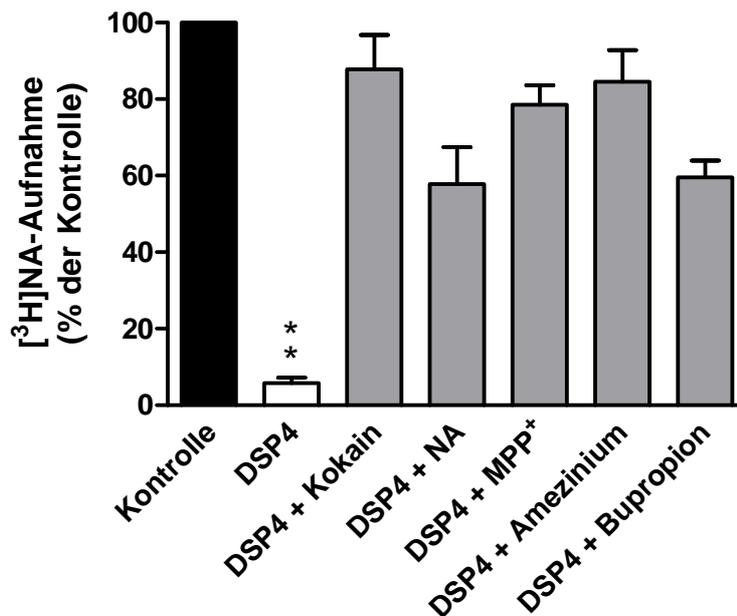


Abbildung 31: Protektionsversuch mit NAT-Substraten, Kokain und Bupropion vor einer Inhibition der [3H]NA-Aufnahme in HEK293-hNAT-Zellen durch DSP4

NAT-Substrate und Inhibitoren schützten die spezifische [3H]NA-Aufnahme vor einer irreversiblen Inhibition durch DSP4. Stabil transfizierte HEK293-hNAT-Zellen wurden 90 min mit 30 μ M DSP4 in An- und Abwesenheit von 30 μ M der Protektor-Substanz inkubiert (37°C). Anschließend wurden die Zellen 5 x 5 min gewaschen und die [3H]NA-Aufnahme (10 nM, 10 min, 37°C) bestimmt. Die Daten wurden mittels *one-way ANOVA* und anschließendem Dunnett's post-hoc Test analysiert (**, $p < 0,01$ vs. Kontrolle, $n = 4$). Gezeigt sind Mittelwerte $\pm s_x$ (% der Kontrolle) der spezifischen [3H]NA-Aufnahme.

1.4.3 Interaktion von DSP4 mit neuronalen und nicht-neuronalen Monoamintransportern

Die Affinität bzw. Selektivität von DSP4 zum hNAT im Vergleich zu den anderen neuronalen MATs hDAT und hSERT sowie zu den humanen, nicht-neuronalen MATs, den organischen Kationentransportern (OCTs) hOCT₁, hOCT₂ und hOCT₃, sollte durch die Konkurrenzexperimente bestimmt werden.

Ohne Vorinkubation wurden stabil transfizierte HEK293-Zellen, die entweder hNAT, hDAT, hSERT, hOCT₁, hOCT₂ oder hOCT₃ exprimierten, für 10 min simultan mit [³H]MPP⁺ (10 nM) und ansteigenden Konzentrationen DSP4 inkubiert und anschließend die spezifische [³H]MPP⁺-Aufnahme bestimmt. DSP4 bewirkte eine konzentrationsabhängige Hemmung der [³H]MPP⁺-Aufnahme bei allen getesteten MATs. Für die neuronalen MATs ergab sich die folgende Reihenfolge der Affinität: hNAT (IC₅₀: 5,6 µM) > hSERT (IC₅₀: 25 µM) > hDAT (IC₅₀: 230 µM) (Abbildung 32 A und Tabelle 7); DSP4 hemmt also mit hoher Präferenz den hNAT.

Zu den nicht-neuronalen MATs hOCT₁, hOCT₂ und hOCT₃ zeigte DSP4 in allen drei Fällen eine etwa gleich hohe Affinität (IC₅₀ = 0,8 µM, 1,7 µM und 0,6 µM). Die hier ermittelten IC₅₀-Werte waren etwa um den Faktor 3 - 9 niedriger als der entsprechende Wert für den hNAT (Abbildung 32 B und Tabelle 7). Die Hemmkurven aller untersuchten MATs waren durch Hill-Koeffizienten von etwa 1 charakterisiert (Abbildung 32 und Tabelle 7).

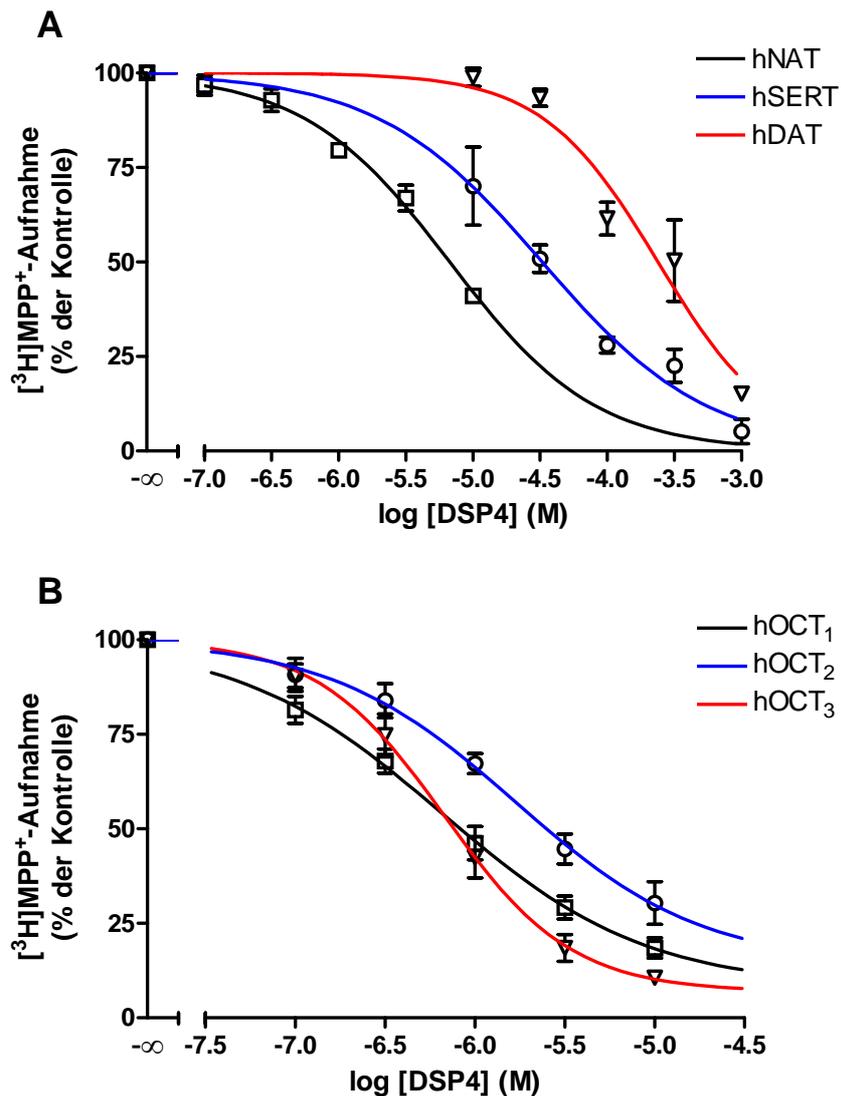


Abbildung 32: Konzentrationsabhängige Inhibition der $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme durch DSP4 bei neuronalen (A) und nicht-neuronalen (B) Monoamintransportern

Zur Bestimmung der Affinität von DSP4 zu hNAT, hDAT, hSERT, hOCT₁, hOCT₂ und hOCT₃ wurde die spezifische $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme (10 nM, 10 min, 37°C) in Anwesenheit von ansteigenden Konzentrationen DSP4 in, mit dem jeweiligen Transporter stabil transfizierten, HEK293-Zellen ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm s_x$ der spezifischen $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme als Prozent der jeweiligen DSP4-freien Kontrolle von 3 – 8 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Spezifische Aufnahme war definiert als durch 100 μM Kokain hemmbare Aufnahme im Fall von hNAT, hDAT und hSERT (A), bzw. durch 10 μM Decynium 22 im Fall der hOCTs (B).

Transporter	IC ₅₀ [μmol] ± s _x (n)	Hill Koeffizient ± s _x (n)
hNAT	5,6 ± 1,6 (4)	-1,0 ± 0,2 (4)
hDAT	229,7 ± 73,5 (4)	-1,4 ± 0,2 (4)
hSERT	25,4 ± 3,7 (3)	-0,6 ± 0,1 (3)
hOCT ₁	0,75 ± 0,23 (4)	-0,8 ± 0,1 (4)
hOCT ₂	1,73 ± 0,21 (3)	-0,9 ± 0,2 (3)
hOCT ₃	0,62 ± 0,01 (6)	-1,3 ± 0,1 (6)

Tabelle 7: IC₅₀-Werte und Hill-Koeffizienten für die Hemmung der spezifischen [³H]MPP⁺-Aufnahme durch DSP4 bei neuronalen und nicht-neuronalen Monoamintransportern

Die tabellierten IC₅₀-Werte und Hill-Koeffizienten sind arithmetische Mittelwerte ± s_x (n = 3 – 6) aus den in der Legende zu Abbildung 32 beschriebenen Einzelversuchen.

Durch Auswaschexperimente sollte ferner geprüft werden, inwiefern die Inhibition der hier untersuchten MATs durch DSP4 ebenfalls, wie beim NAT, irreversibler Natur ist. Stabil transfizierte HEK293-Zellen, die entweder hNAT, hDAT, hSERT, hOCT₁, hOCT₂ oder hOCT₃ exprimierten wurden dafür 90 min mit DSP4 vorinkubiert. Die DSP4-Konzentration entsprach dabei etwa jeweils 5 x der zuvor ermittelten IC₅₀ für den jeweiligen Transporter (siehe Tabelle 7). Die spezifische [³H]MPP⁺-Aufnahme wurde anschließend nach unterschiedlich langen Auswaschzeiten (30, 60 und 90 min) bestimmt.

Wie Abbildung 33 A veranschaulicht, verursachte DSP4 im Fall der drei neuronalen MATs hNAT, hDAT und hSERT eine auswaschresistente Inhibition der [³H]MPP⁺-Aufnahme. Die deutlichste Hemmung war beim hNAT zu beobachten, sie betrug nach 60 min Waschen 97,3 ± 0,7 % und nach 90 min 97,8 ± 0,6 %. Der hDAT war nach 60 min Waschen zu 83,7 ± 4,3 % inhibiert, weitere 30 min Waschen bewirkten praktisch keine Reduktion dieser Hemmung (83,7 ± 2,8 %). Auch der Betrag, um den der hSERT unter den angegebenen Versuchsbedingungen gehemmt werden konnte, blieb von 59,9 ± 2,7 % nach 60 min auf 61,1 ± 2,7 % nach 90 min Waschen praktisch konstant.

Die Hemmung der nicht-neuronalen Monoamintransporter hOCT₁, hOCT₂ und hOCT₃ durch DSP4 war hingegen reversibel (Abbildung 33 B). So erreichte der hOCT₁ nach 90 min Auswaschen wieder eine Transportleistung, die sich statistisch nicht signifikant von der einer DSP4-unbehandelten Kontrolle

unterschied. Im Fall des hOCT₂ ließ sich die Inhibition schon nach 30 min Auswaschen vollständig aufheben. Am hOCT₃ zeigte DSP4 die schlechteste Auswaschbarkeit unter den nicht-neuronalen MATs. Nach 90 min Waschen betrug hier die Hemmung der [³H]MPP⁺-Aufnahme noch 67,0 ± 2,3 %, doch veranschaulicht Abbildung 33 B, dass durch jeden zusätzlichen Waschschrift die Transportleistung nochmals statistisch signifikant gesteigert werden konnte. Insofern muss also auch beim hOCT₃, trotz mäßiger Auswaschbarkeit des DSP4s, von einer Reversibilität der Hemmung ausgegangen werden.

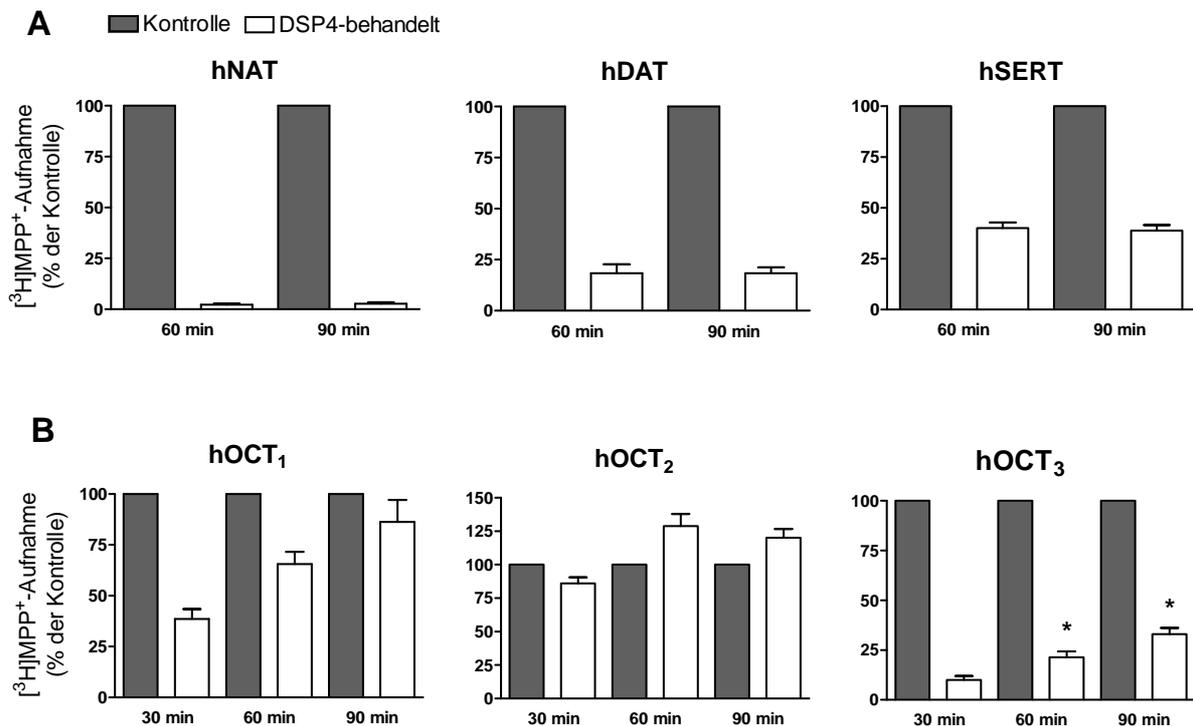


Abbildung 33: Irreversible Inhibition der [³H]MPP⁺-Aufnahme durch DSP4 im Fall der neuronalen MATs (A) und reversible Inhibition der nicht-neuronalen MATs (B)

HEK293-Zellen, die den jeweiligen MATs stabil exprimierten wurden für 90 min (37°C) mit DSP4 (~5 x IC₅₀ des jeweiligen Transporters) vorinkubiert [hNAT: 30 µM, hDAT: 600 µM, hSERT: 125 µM (A) und hOCT₁, hOCT₂, hOCT₃: 5 µM (B)]. Die spezifische [³H]MPP⁺-Aufnahme (10 nM, 10 min, 37°C) wurde nach unterschiedlichen Auswaschzeiten bestimmt. Im Fall der neuronalen MATs (A) war die Dauer dieser Auswaschzeiten 12 x 5 min und 18 x 5 min, bei den nicht-neuronalen MATs zusätzlich 6 x 5 min (B). Gezeigt sind Mittelwerte ± s_x (n = 3 – 5) der spezifischen [³H]MPP⁺-Aufnahme in Prozent der DSP4-unbehandelten Kontrolle. Die Daten für hOCT₃ wurden mittels Student's t-Test analysiert (*, p < 0,05 60 min vs. 30 min und 90 min vs. 60 min, n = 4).

1.4.4 Interaktion von DSP4 mit Cys/Ala-, His/Ala- und Asp-, Glu-hNAT-Mutanten

Als potentielle Reaktionspartner für das hochreaktive Aziridiniumion werden an erster Stelle die Thiole genannt (Dudley et al. 1990). Es wurde daher bis jetzt angenommen, dass für die irreversible Inhibition des NAT durch DSP4 die Alkylierung einer Cystein-Sulfhydrylgruppe des Transporters verantwortlich ist. Diese Hypothese sollte hier überprüft und ein gegebenenfalls für die irreversible Hemmung verantwortliches Cystein identifiziert werden. Die unter C.1.2.1 beschriebenen 8 funktionellen hNAT-Cys/Ala-Einzelaustausch-Mutanten wurden zu diesem Zweck bezüglich einer auswaschresistenten Hemmung des [³H]MPP⁺-Transports durch DSP4 untersucht.

HEK293-Zellen, die nach transienter Transfektion die Mutanten C44A, C86A, C131A, C240A, C339A, C351A, C460A, C520A oder hNAT-WT exprimierten, wurden 90 min mit 30 µM DSP4 vorinkubiert. Anschließend folgten 25minütiges Waschen und die Bestimmung der spezifischen [³H]MPP⁺-Aufnahme (10 nM, 10 min, 37°C). Abbildung 34 A zeigt, dass 30 µM DSP4, eine Konzentration, die etwa 5 x der IC₅₀ für den hNAT-WT entspricht, bei allen getesteten hNAT-Cys/Ala-Mutanten, wie beim hNAT-WT, eine irreversible, etwa 90%ige Inhibition des [³H]MPP⁺-Transports bewirkte. Die beiden hNAT-Mutanten C176A und C185A konnten auf Grund ihrer fehlenden Zelloberflächenexpression (C.1.2.1) hier nicht getestet werden. Durch die Bildung einer Disulfidbrücke besitzen sie jedoch keine freien Sulfhydrylgruppen und stellen somit keine potentiellen Reaktionspartner für ein Aziridiniumion dar.

Auch Amine gelten als mögliche Reaktionspartner für das Aziridiniumion (Dudley et al. 1990). Ob die Alkylierung des Imidazolrings eines Histidins für die irreversible Hemmung des NAT Ausschlag gebend ist, sollte anhand der unter C.1.3 beschriebenen hNAT-His/Ala-Mutanten H178A, H199A, H220A, H222A, H228A, H280A, H296A, H370/372A, H441A, H598/599A, H613A untersucht werden. Die Versuche wurden in gleicher Weise durchgeführt, wie zuvor für die Cys/Ala-Mutanten beschrieben, mit dem Ergebnis, dass auch im Fall aller hNAT-His/Ala-Mutanten 30 µM DSP4 nach 90 min Inkubation eine auswaschresistente, über 90%ige Inhibition der spezifischen [³H]MPP⁺-Aufnahme bewirkten (Abbildung 34 B).

Die Carboxylatgruppe der Aminosäuren Aspartat und Glutamat stellt ebenfalls einen potentiellen Reaktionspartner für ein Aziridiniumion dar (Spalding et al. 1994; Park et al. 2001). Aus diesem Grund wurden auch bestimmte dieser Aminosäuren des hNAT auf ihre Bedeutung für die Hemmung des Transports durch DSP4 untersucht. Die Versuche erfolgten in zwei Gruppen:

Zunächst wurden durch gerichtete Mutagenese jeweils einzeln die Aspartate und Glutamate des hNAT (Abbildung 2) gegen die entsprechende Aminosäure des hDAT ausgetauscht, falls es sich bei dieser nicht auch um eine saure Aminosäure handelte. Es resultierten die hNAT-Asp-Glu/ X_{DAT} -Mutanten D50V/D52N, E223Q, D336T, E371K, E377G, D499G und D546G/D547A. Die Aspartate in den Positionen 50 und 52 sowie 546 und 547 wurden auf Grund ihrer Nachbarschaft in der Primärstruktur jeweils gemeinsam in einer Variante (D50V/D52N und D546G/D547A) ausgetauscht.

In einer zweiten Versuchsserie wurden jeweils einzeln die sauren Aminosäuren, die nach Beuming et al. (2006) innerhalb der TM1, TM6 und TM8 liegen, mutiert. Das funktionell essentielle Asp75 aus TM1 (Bönisch et al. 1999) wurde nicht mutiert. Aspartat wurde dabei gegen Asparagin und Glutamat gegen Glutamin ausgetauscht. Es resultierten die hNAT-Asp-Glu/Asn-Gln-Mutanten D64N, E304Q, D310N, D418N, E425Q und D433N/D434N. Die Aspartate 433 und 434 wurden gemeinsam ausgetauscht. Nach dem Strukturmodell von Paczkowski et al. (2007) flankieren die besagten TMs den Substrattranslokationspfad des hNAT. Die Aminosäuren innerhalb dieser Helices könnten somit potentiell mit gebundenem/transportiertem DSP4 interagieren.

Wie die Abbildung 34 C und D veranschaulichen, zeigte keine der sieben Asp-Glu/ X_{DAT} -Mutanten sowie keine der sechs Asp-Glu/Asn-Gln-Mutanten eine im Vergleich zum hNAT-WT signifikant reduzierte Hemmbarkeit. Die Hemmung durch DSP4 (30 μM , 90 min) war im Fall jeder Mutante auswaschresistent und betrug zwischen 70-95 % der spezifischen [^3H]MPP $^+$ -Aufnahme einer unbehandelten Kontrolle.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Hemmwirkung von DSP4 offensichtlich nicht auf einer spezifischen Interaktion mit einem Cystein-, Histidin-, Aspartat-, oder Glutamat des hNAT beruht.

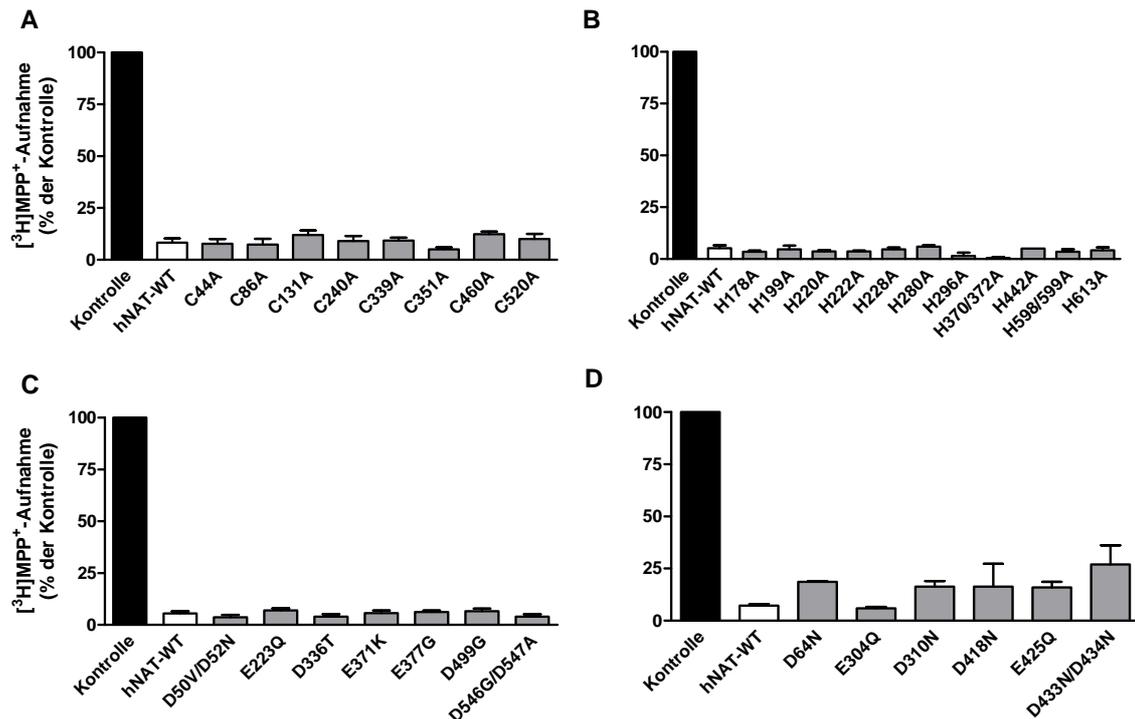


Abbildung 34: Inhibition der $[^3\text{H}]$ MPP⁺-Aufnahme durch DSP4 bei hNAT-Cys/Ala- (A), His/Ala- (B), Asp-Glu/X_{DAT}- (C) und Asp-Glu/Asn-Gln-Mutanten (D)

HEK293-Zellen wurden mit cDNA der hNAT-Cys/Ala-Mutanten (A), der hNAT-His/Ala-Mutanten (B) der hNAT-Asp-Glu/X_{DAT}-Mutanten (C) bzw. der hNAT-Asp-Glu/Asn-Gln-Mutanten (D) transient transfiziert. Nach einer Vorinkubation mit 30 μM DSP4 (90 min, 37°C) wurden die Zellen 5 x 5 min gewaschen und anschließend die spezifische $[^3\text{H}]$ MPP⁺-Aufnahme (10 nM, 10 min, 37°C) bestimmt. Gezeigt werden Mittelwerte \pm s_x (n = 3 – 4) der spezifischen $[^3\text{H}]$ MPP⁺-Aufnahme in Prozent der DSP4-unbehandelten Kontrolle.

1.4.5 Konzentrationsabhängige Inhibition des $[^3\text{H}]$ MPP⁺-Transports von chimären Noradrenalin-Dopamin-Transportern durch DSP4

Die strukturelle Domäne des NAT, die für die differentielle Selektivität des DSP4s verantwortlich ist, sollte mittels rekombinanter hNAT/hDAT-Chimären (Abbildung 35) ermittelt werden. Diese Transporter-Chimären stellen Konstrukte dar, bei denen homologe Segmente des hNAT und des hDAT gegeneinander ausgetauscht wurden. Es handelt sich also um artifizielle Transporter-Proteine, die sowohl Anteile des hNAT als auch des hDAT enthalten. Die hNAT/hDAT-Chimären waren ein Geschenk von Prof. Bruno Giros (Inserm, U513, Universität Paris, Créteil, Frankreich). Sie wurden unserer Arbeitsgruppe in Form ihrer

cDNAs, die in den Expressionsvektor pRC/CMV (Invitrogen) subkloniert waren, zur Verfügung gestellt. Die Chimären wurden konstruiert durch homologe Religation vierer Segmente, die nach dem Restriktionsverdau der cDNAs von hNAT und hDAT mit den Enzymen *Bgl*II, *Bst*EI und *Cla*I entstanden waren. Aus der Lage der Restriktionsenzymschnittstellen resultierten 4 „Kassetten“, die bezogen auf die Primärstruktur des hNAT-Proteins die Aminosäuren 1 – 129 (N-Term – IS1), 130 – 281 (IS1 – ES3), 282 – 431 (ES3 – IS4) und 432 – 617 (IS4 – C-Term) umfassten. Eine genaue Beschreibung der Herstellung dieser Transporter-Chimären sowie ihre funktionelle Charakterisierung wurden von Giros et al (1994) und Syringas et al. (2000) publiziert.

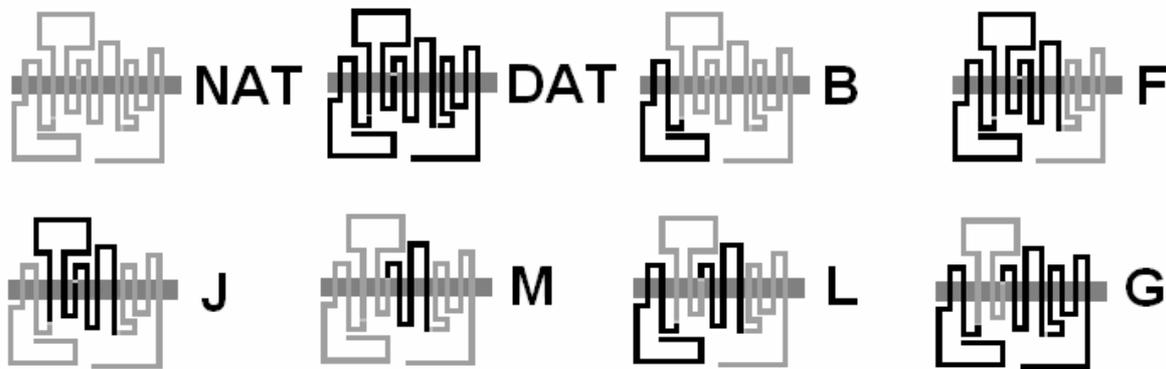


Abbildung 35: Schematische Darstellung des NAT (hellgraue Linie) und des DAT (schwarze Linie) und 6 funktioneller NAT/DAT-Chimären (B, F, J, M, L, G)

Die Transporter sind dargestellt mit 12 putativen TMs sowie intrazellulär lokalisierten COOH- und NH₂-Termini. Die Zellmembran wird durch die dunkelgraue Linie symbolisiert. Durch gerichteten Restriktionsverdau ihrer cDNAs konnten hNAT und hDAT jeweils in 4 „Kassetten“ unterteilt werden. Diese ließen sich anschließend systematisch zu 14 verschiedenen Transporter-Chimären rekombinieren. Nur die hier abgebildeten 6 Varianten waren funktionell (Giros et al. 1994) und wurden bezüglich ihrer konzentrationsabhängigen Hemmung durch DSP4 untersucht. Die Benennung der Chimären mit B, F, J, M, L und G wurde aus der Originalarbeit von Giros et al. (1994) übernommen.

Zur Ermittlung, welche strukturelle Domäne die hohe Affinität des DSP4s zum NAT bedingt, wurden die 6 funktionell aktiven hNAT/hDAT-Chimären B, F, J, M, L und G transient in HEK293-Zellen exprimiert und bezüglich der konzentrationsabhängigen Hemmung ihres [³H]MPP⁺-Transports (10 nM, 10 min, 37°C) durch DSP4 untersucht. Die Versuchsdurchführung war analog zu der für

die unter C.1.4.3 beschriebenen Experimente. Es zeigte sich, dass [³H]MPP⁺ ein von allen Chimären transportiertes Substrat darstellt (Abbildung 36). Zur Ermittlung der spezifischen [³H]MPP⁺-Aufnahme wurde die Aufnahme in Gegenwart von 100 μM (D)-Amphetamin bestimmt und von der gemessenen Gesamtaufnahme subtrahiert. Hier wurde (D)-Amphetamin eingesetzt, da es, anders als z.B. Kokain, zu allen getesteten Chimären sowie zum hNAT und hDAT etwa die gleiche Affinität ($K_i \sim 300$ nM) aufweist (Giros et al. 1994).

Wie die Dosis-Wirkungskurven in Abbildung 36 veranschaulichen, ließ sich die [³H]MPP⁺-Aufnahme jeder hNAT/hDAT-Chimäre konzentrationsabhängig durch DSP4 inhibieren. Auffällig war, dass sich die ermittelten IC₅₀-Werte aller Chimären statistisch nicht signifikant vom Wert für den hNAT unterschieden, während alle IC₅₀-Werte im Vergleich zum hDAT extrem signifikant kleiner waren (Tabelle 8). Mit Ausnahme von Chimäre B (IC₅₀ = 6,6 μM) waren die IC₅₀-Werte der übrigen rekombinanten Transporter gegenüber dem Wert des hNAT (IC₅₀ = 9,8 μM) tendenziell erhöht. Die niedrigste Affinität (höchste IC₅₀) besaß DSP4 von allen Chimären zu F (IC₅₀ = 20,6 μM) und G (IC₅₀ = 19,8 μM). Es resultierte ein etwa 3facher Unterschied zwischen den IC₅₀-Werten der Chimäre mit der höchsten Affinität B und denen mit der niedrigsten Affinität, F bzw. G (Tabelle 8). Ferner konnten aus den Hemmkurven der hNAT/hDAT-Chimären sowie der des hNAT (vgl. auch C.1.4.3) Hill-Koeffizienten ermittelt werden, die alle bei einem Wert von etwa -1 lagen. Im Fall des hDAT ergab sich in dieser Versuchsreihe ein deutlich größerer negativer Hill-Koeffizient mit einem Wert von etwa -2,4 (Tabelle 8).

Wie aus Abbildung 35 hervorgeht handelte es sich bei F und G um die Chimären, die den größten Anteil der hDAT-Sequenz enthielten. Die zu DSP4 hochaffine Chimäre B enthielt als einzige das Segment, das innerhalb des Bereiches von der ES3 bis zur IS4 die Sequenz des hNAT aufweist (Abbildung 35). Diese strukturelle Domäne kann somit als affinitätsbestimmend für DSP4 angesehen werden. Sie beinhaltet die TMs 6 – 8. TM6 enthält neben TM1 den höchsten Anteil hoch konservierter Aminosäuren unter den neuronalen MATs.

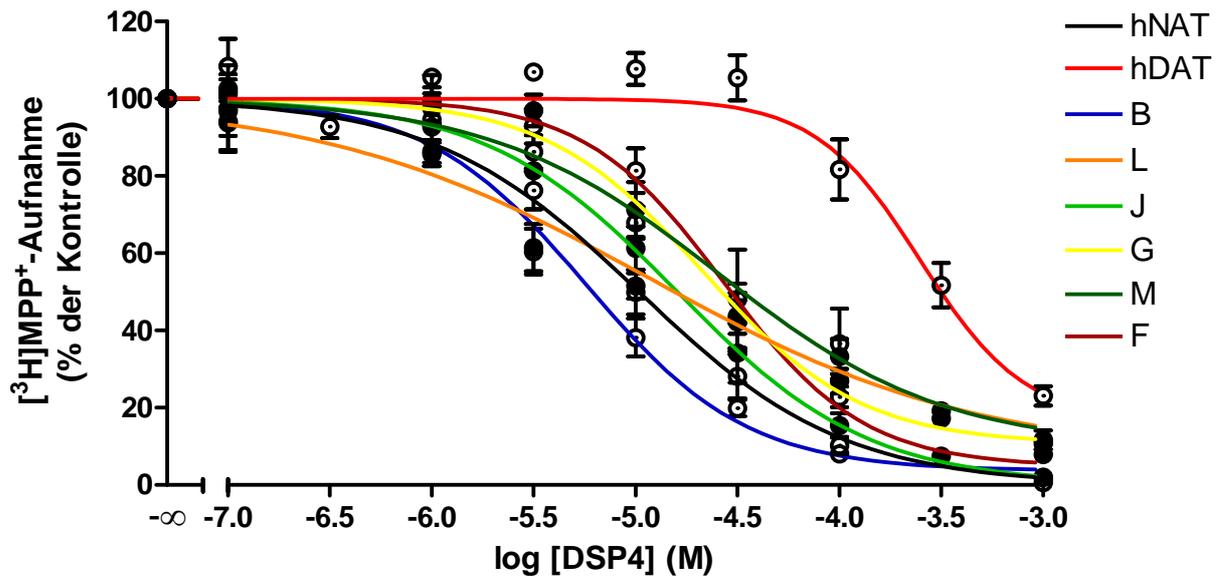


Abbildung 36: Konzentrationsabhängige Hemmung der $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme von hNAT/hDAT-Chimären sowie von hNAT und hDAT durch DSP4

HEK293-Zellen wurden transient transfiziert mit der cDNA von hNAT-WT, hDAT-WT oder Chimäre B, L, J, G, M oder F. Die Bestimmung der spezifischen $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme in Gegenwart ansteigender Konzentrationen von DSP4 erfolgte wie in der Legende zu Abbildung 32 beschrieben. Gezeigt sind Hemmkurven, welche durch nicht-lineare Regressionsanalyse aus Mittelwerten $\pm s_x$ der spezifischen $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme als Prozent einer jeweils DSP4-freien Kontrolle von 4–6 unabhängigen Experimenten, generiert wurden. Als spezifische Aufnahme wurde die durch 100 μM (D)-Amphetamin inhibierbare Aufnahme definiert.

Transporter	IC ₅₀ [μM] ± s _x (n)	Hill-Koeffizient ± s _x (n)
 NAT	9,80 ± 2,43 (8)	-1,2 ± 0,1 (8)
 DAT	261,23 ± 32,25 (3)	-2,4 ± 0,3 (3)
 B	6,55 ± 1,24 (5)	-1,5 ± 0,3 (4)
 F	20,64 ± 1,20 (5)	-1,2 ± 0,4 (5)
 G	19,76 ± 4,89 (6)	-1,4 ± 0,2 (6)
 J	16,28 ± 3,61 (5)	-1,0 ± 0,2 (5)
 L	12,59 ± 3,30 (5)	-0,8 ± 0,2 (5)
 M	15,00 ± 3,93 (4)	-1,0 ± 0,2 (4)

Tabelle 8: IC₅₀-Werte und Hill-Koeffizienten für die Hemmung der spezifischen [³H]MPP⁺-Aufnahme von hNAT, hDAT und hNAT/hDAT-Chimären durch DSP4

Die angegebenen Werte für die IC₅₀ von DSP4 und die Hill-Koeffizienten sind Mittelwerte aus jeweils n = 3 – 8 voneinander unabhängig durchgeführten Einzelversuchen. Die IC₅₀-Werte der hNAT/hDAT-Chimären wurden mittels *one-way ANOVA* und anschließend *Dunnett's post-hoc Test* mit den Werten für hNAT und hDAT verglichen. Keine Chimäre unterschied sich statistisch signifikant vom hNAT (p > 0,05 vs. hNAT), jedoch alle extrem signifikant vom hDAT (p < 0,001 vs. hDAT).

1.4.6 Selektive Zytotoxizität von DSP4 für NAT-exprimierende Zellen

Durch die im Folgenden beschriebenen Zytotoxizitätstests sollte untersucht werden inwiefern die Expression von Transportern mit hoher Affinität zu DSP4 für dessen zytotoxische Wirkung verantwortlich ist.

In Zytotoxizitätsversuchen, die auf der Bestimmung des zellulären ATPs vitaler Zellen beruhen (B.2.5.3.1), zeigte DSP4 nach 24 h Inkubation auch in nativen, nicht transfizierten HEK293-Zellen zytotoxische Effekte (Abbildung 37 A). Der dabei ermittelte EC_{50} -Wert von 179 μM war in guter Übereinstimmung mit der von Ghosh et al. (1988) publizierten, allgemein zytotoxischen Konzentration des DSP4s. Für HEK293-Zellen, die nach stabiler Transfektion den hNAT exprimierten, ergab sich eine zweiphasige Dosis-Wirkungskurve mit einer gegen DSP4 hochsensitiven Komponente, welche durch einen EC_{50} Wert von etwa 15 nM charakterisiert war. Die zweite, wenig sensitive Phase wies eine EC_{50} von etwa 236 μM auf. Dieser Wert war vergleichbar mit dem an nativen HEK293-Zellen beobachteten Wert von 179 μM (Abbildung 37 A). An SK-N-SH SY5Y-Zellen, die den hNAT nativ jedoch in geringerer Dichte exprimieren (Apparsundaram et al. 1998), war der frühe, toxische Effekt nanomolarer Konzentrationen DSP4 weniger stark ausgeprägt (EC_{50} I: 46 nM, EC_{50} II: 155 μM) (Abbildung 37 A).

Abbildung 37 B veranschaulicht, dass HEK293-Zellen, die nach stabiler Transfektion den hOCT₁, hOCT₂ oder hOCT₃ exprimierten, keine erhöhte Sensitivität gegen nanomolare Konzentrationen DSP4 zeigten. Die ermittelten EC_{50} -Werte lagen in allen drei Fällen bei etwa 106 μM und waren damit zumindest tendenziell gegenüber dem Wert für native HEK293-Zellen (EC_{50} : 179 μM) erniedrigt.

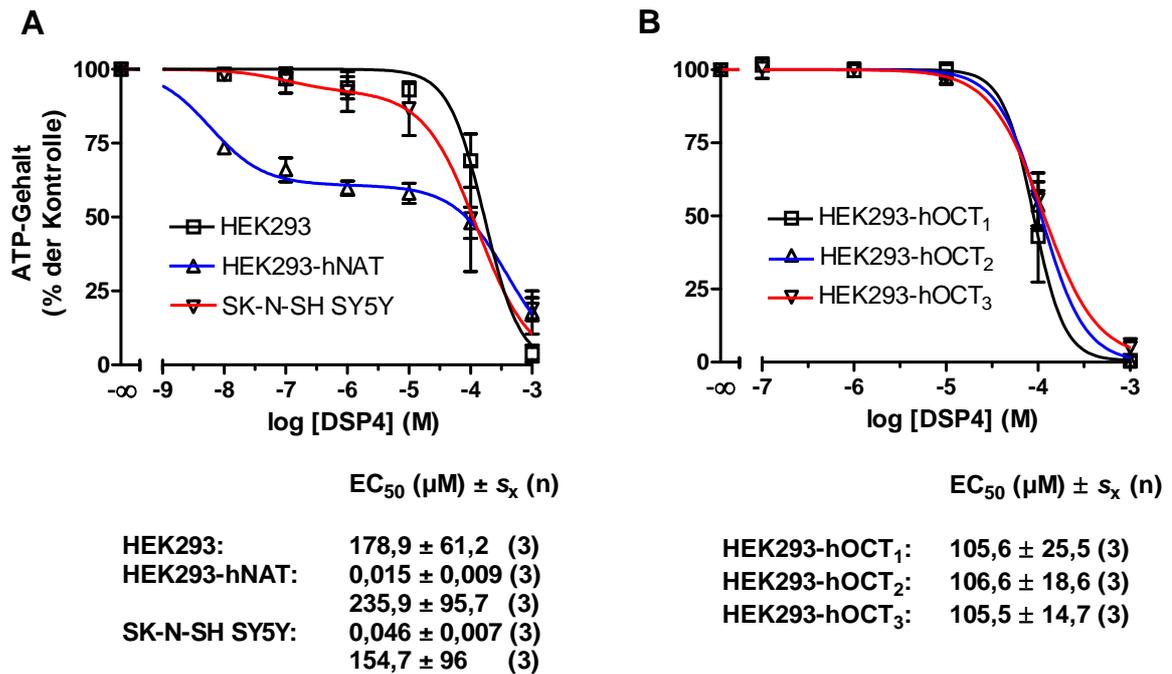


Abbildung 37: Konzentrationsabhängige Depletion des zellulären ATPs durch DSP4 in den Zelllinien: HEK293, HEK293-hNAT, SK-N-SH SY5Y (A) und HEK293-hOCT₁, -hOCT₂, -hOCT₃ (B)

Die Depletion des zellulären ATPs in den untersuchten Zelllinien wurde nach 24 h Inkubation (37°C, 5 % CO₂) mit ansteigenden Konzentrationen DSP4 bestimmt (wie in der Legende zu Abbildung 16 A beschrieben). Dargestellt sind die Mittelwerte ± s_x zellulären ATPs (% der Kontrolle) aus 3 separaten Experimenten, durchgeführt mit Vierfachbestimmungen.

Für Xylamin wird angenommen, dass es seine zytotoxische Wirkung unter anderem über eine Hemmung der mitochondrialen ATP-Synthese auf Ebene des NADPH und der Succinat-Dehydrogenase ausübt (Dudley et al. 1990). Um ausschließen zu können, dass die oben für DSP4 beschriebenen Effekte nicht lediglich auf einem induzierten Mehrverbrauch zellulären ATPs beruhen, wurden zusätzlich ATP-unabhängige, MTT-basierte Zytotoxizitätsversuche durchgeführt (B.2.5.3.2). Wie in Abbildung 38 dargestellt, waren die mit dieser alternativen Methode erzielten Ergebnisse praktisch mit denen der ATP-Versuche identisch. Der ermittelte EC₅₀-Wert von DSP4 an nativen HEK293-Zellen nach 24 h Inkubation lag bei etwa 140 µM, während sich für hNAT-exprimierende HEK293-Zellen auch hier eine biphasische Dosis-Wirkungskurve ergab. Das Ansprechen auf bereits nanomolare Konzentrationen DSP4 war charakterisiert durch einen

ersten EC₅₀-Wert von etwa 16 nM. Für die zweite, weniger sensitive Komponente ergab sich ein EC₅₀-Wert von etwa 165 µM (Abbildung 38).

Diese Ergebnisse belegen, dass die durch niedrige DSP4-Konzentrationen ausgelösten zytotoxischen Effekte von der Expression des NAT abhängig sind; sie sind damit auch ein deutlicher Hinweis für die zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Anreicherung von DSP4 durch den NAT.

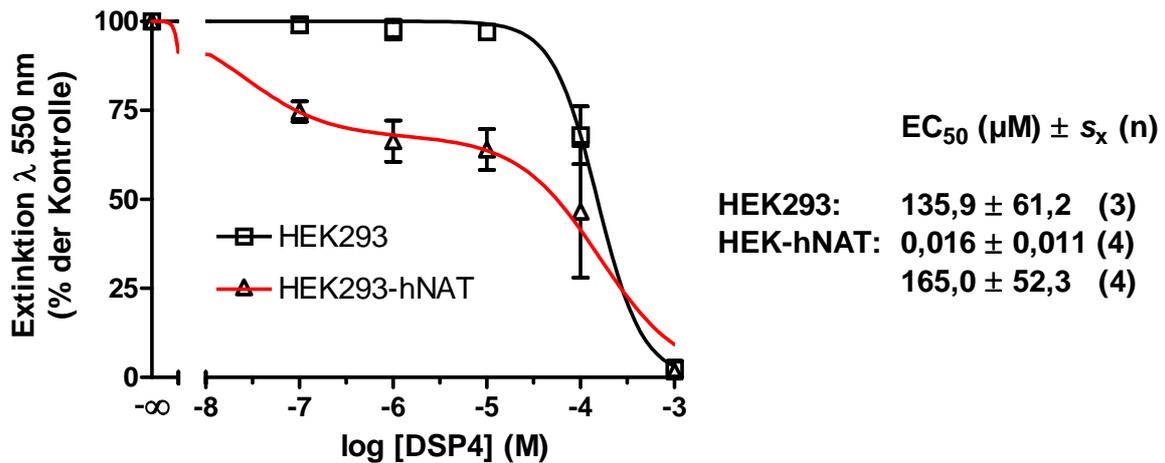


Abbildung 38: Konzentrationsabhängige Reduktion der mitochondrialen Funktion in HEK293- und HEK293-hNAT-Zellen durch DSP4

Gezeigt ist die Reduktion der MTT-Formazan-Bildung von HEK293- und HEK293-hNAT-Zellen nach 24 h Inkubation (37°C, 5 % CO₂) mit ansteigenden Konzentrationen von DSP4. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte ± s_x (% der Kontrolle) aus 3 - 4 separaten Experimenten, durchgeführt mit Vierfachbestimmungen.

2. Versuche zur Überexpression des hNAT in Sf9-Insektenzellen

Strukturuntersuchungen an Proteinen erfordern Präparate hoher Reinheit in relativ großer Menge. Eine wichtige Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Aufreinigung eines Proteins ist jedoch das Vorhandensein eines Expressionssystems, welches das Zielprotein in ausreichender Quantität darstellt. Ein häufig verwendetes, eukaryotisches Expressionssystem, das vor allem dazu geeignet ist posttranslational modifizierte Proteine in großer Menge zu gewinnen, basiert auf Sf9-Insektenzellen und deren Infektion mit rekombinanten Baculovirus-Expressionsvektoren. Baculoviren sind insektenpathogene Viren mit doppelsträngiger, zirkulär-geschlossener DNA. Mit Hilfe dieses Systems konnten

bereits verschiedene Transporterproteine, wie der hSERT (Rasmussen und Gether 2005) und der OCT₁ der Ratte (Keller et al. 2005) erfolgreich in einem für eine nachfolgende Aufreinigung ausreichenden Maßstab exprimiert werden. Da die bisher etablierten, eukaryotischen Expressionssysteme, in denen der hNAT funktionell exprimiert werden kann, wie HEK293- oder CHO-Zellen nur verhältnismäßig geringe Mengen des rekombinanten Proteins liefern, wurde die heterologe Expression des hNAT im Baculovirus-Expressionssystem angestrebt.

2.1 Erzeugung eines rekombinanten hNAT-Baculovirus

Als viraler Vektor diente die „BaculoDirect N-Term DNA“ (Invitrogen). Dabei handelt es sich um das mit *Bsu*36 I linearisierte Genom des *Autographa californica multiply embedded nuclear polyhedrosis virus* (AcMNPV), in dem das nicht-essentielle Polyhedrin-Gen mittels homologer Rekombination durch die cDNA der β -Galaktosidase und der HSV1 tk ersetzt worden ist.

Zunächst wurde die hNAT-cDNA-Sequenz, die im Plasmid pcDNA3 (Invitrogen) vorlag, in die *multiple cloning site* des Donor-Vektors pENTR3C (Invitrogen) unter Verwendung der Restriktionsenzyme *Bam*H I und *Eco*R I subkloniert. Da am 5'-Ende der hNAT-Sequenz innerhalb des Vektors pcDNA3 keine *Bam*H I-Schnittstelle vorlag, musste diese zunächst unter Verwendung des *sense*-Primers 5'-ATTAGGATCCATGCTTCTGGCGCGGATGAACCCG-3' (*Bam*H I-Schnittstelle ist unterstrichen) per PCR generiert werden. Der verwendete *antisense*-Primer ,5'-GGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCC-3', wurde so gewählt, dass die vorhandene *Eco*R I-Schnittstelle am 3'-Ende mitamplifiziert wurde (B.2.2.12). Nach der erfolgreichen Subklonierung befand sich die hNAT-Sequenz zwischen den im Donor-Vektor pENTR 3C enthaltenen Konsensussequenzen *att*L1 und *att*L2. Vermittelt über diese Erkennungsstellen konnte nun eine homologe Rekombination mittels Gateway[®]-Technologie (Invitrogen) zwischen pENTR 3C und der BaculoDirect N-Term DNA erfolgen (B.2.2.14.1). Dabei wurden die Gene der HSV1 tk sowie der β -Galaktosidase aus dem rekombinanten Baculovirusgenom gegen die hNAT-Sequenz des Donor-Vektors ausgetauscht. Die Transkription des hNAT-Gens stand danach unter der Kontrolle des starken viralen Polyhedrin-Promotors.

Die erfolgreiche Rekombination wurde per PCR überprüft. Ein Segment der vorausgesagten Größe von etwa 1200 bp konnte aus dem Produkt der Rekombinationsreaktion unter Verwendung des *sense*-Primers

5'-AAATGATAACCATCTCGC-3', der innerhalb des Virusgenoms bindet und des *antisense*-Primers 5'-CTTGAAAGAGGCCACGGTAT-3', welcher komplementär zu einer Sequenz des hNAT ist, amplifiziert werden (Abbildung 39). Damit war das Vorhandensein eines rekombinanten Baculovirusgenoms bewiesen, mit welchem Sf9-Insektenzellen zur Erzeugung eines Expressionsvirus transfiziert werden konnten.

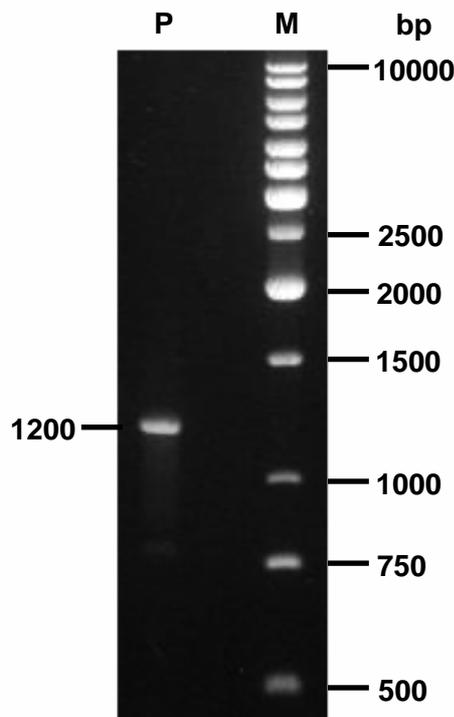


Abbildung 39: PCR-Nachweis der erfolgreichen Rekombination des Baculovirusgenoms mit der hNAT-cDNA

Dargestellt ist ein PCR-Produkt (linke Spur, P), aufgetrennt in einem Agarosegel (0,7 %), das aus dem rekombinanten Baculovirusgenom mit Hilfe eines *sense*-Primers, der innerhalb der Sequenz des viralen Polyhedrin-Promotors bindet und eines innerhalb der hNAT-Sequenz bindenden *antisense*-Primers amplifiziert wurde. Das PCR-Produkt besaß die erwartete Größe von ~1200 bp. Die rechte Spur (M) zeigt die Banden eines Größenmarkers (1 kb DNA Ladder, Life Technologies).

2.2 Expressionsversuche von rekombinatem hNAT in Sf9-Insektenzellen

Das rekombinante Baculovirusgenom wurde zunächst per Lipofektion in Sf9-Insektenzellen eingebracht, wodurch unter Ganciclovir-Negativ-Selektion nach 96 h verkapselter, rekombinanter Expressionsvirus ins Medium abgegeben wurde (B.2.2.14.2). Zur weiteren Virusamplifikation wurden native Sf9-Zellen mit Aliquoten dieses Mediums infiziert und die Viren 96 h p. i. geerntet. Aliquote dieser

so gewonnen Hoch-Titer-Virus-Lösung dienten nun zur Infektion von Zellen für Expressionsstudien. Die Zellen zeigten 24 h p. i. deutliche Zeichen einer Infektion, wie einen 25-50 %igen Anstieg des Zelldurchmessers. Etwa 72 h p. i. setzte die Lyse der infizierten Zellen ein. Zur Kontrolle der Expression von funktionellem hNAT-Protein wurde die Nisoxetin-sensitive [³H]MPP⁺-Aufnahme in Sf9-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Infektion mit dem rekombinanten Baculovirus bestimmt. Wie Abbildung 40 veranschaulicht, konnte praktisch keine [³H]MPP⁺-Aufnahme durch den hNAT ermittelt werden, was darauf hindeutet, dass der Transporter nicht in der Plasmamembran von Sf9-Zellen exprimiert wird.

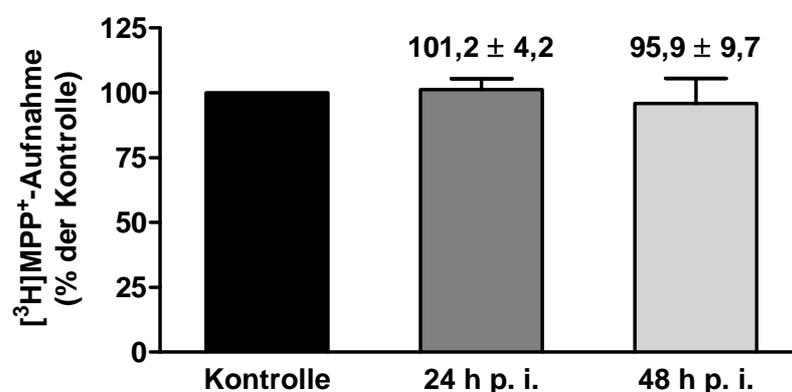


Abbildung 40: Ausbleiben einer Nisoxetin-empfindlichen [³H]MPP⁺-Aufnahme in Sf9-Insektenzellen nach einer Infektion mit rekombinanten hNAT-Baculovirus

Dargestellt ist die Nisoxetin (10 µM)-sensitive [³H]MPP⁺-Aufnahme (10 nM, 10 min, 27°C) in Sf9-Insektenzellen 24 h sowie 48 h nach einer Infektion mit rekombinanten hNAT-Baculovirus als Prozent einer nicht-infizierten Kontrolle. Gezeigt sind die Mittelwerte ± s_x von n = 3 unabhängigen Experimenten.

Per Western-Blot-Analyse konnte gezeigt werden, dass Sf9-Zellen, die mit rekombinanten Baculovirus (hNAT-BV) infiziert wurden, nur eine etwa 50 kDa große Variante des hNAT-Proteins exprimierten (Abbildung 41). Diese Größe entspricht dem apparenten Molekulargewicht der unglykosylierten Form des hNAT (Brüss et al. 1995). Eine Bande dieser Größe konnte nur im Zelllysate von infizierten Sf9-Zellen nachgewiesen werden. Dies ist ein Beleg dafür, dass die für eine Expression in der Plasmamembran notwendige N-Glykosylierung des hNAT-Proteins in Sf9-Zellen nicht erfolgte. Dieses System könnte somit nicht verwendet werden die Bindungsstelle des NAT mit DSP4 selektiv zu markieren und nach Aufreinigung durch z.B. MALDI-TOF-MS zu identifizieren.

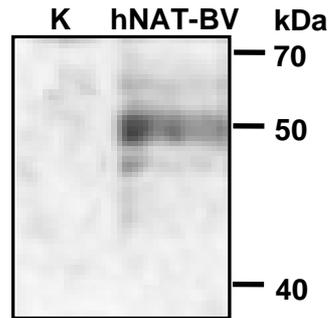


Abbildung 41: Western-Blot-Analyse der heterologen Expression von unglykosyliertem hNAT-Protein in Sf9-Insektenzellen

Gezeigt ist der Ausschnitt einer Western-Blot-Analyse eines SDS-Gels vom Lysat mit rekombinatem Baculovirus infizierter Sf9-Zellen (hNAT-BV) und einer nicht-infizierten Kontrolle (K). Der Nachweis des hNAT erfolgte mit einem NAT-spezifischen Antikörper (Santa Cruz). Zur Orientierung sind die Positionen von 3 Größenmarkerbanden (PageRuler, Fermentas) mit dargestellt.

3. Versuche zur 2D-gelelektrophoretischen Auftrennung des hNAT-Proteins

Die analytische Methode mit dem höchsten Auflösungsvermögen für komplexe Proteingemische ist die 2D-Gelelektrophorese (Klose 1975; O'Farrell 1975). Ziel war es den hNAT aus dem Material einer Membranpräparation von HEK293-hNAT-Zellen 2D-gelelektrophoretisch aufzutrennen und das Protein somit einer massenspektrometrischen Analyse durch MALDI-TOF-MS zugänglich zu machen.

3.1 Versuche zur Auftrennung des hNAT mittels 2D-IEF/SDS-PAGE

Es wurden zeitgleich und unter identischen Bedingungen zwei 2D-Gele angefertigt. Als Ausgangsmaterial dienten jeweils 80 µg Protein einer Membranpräparation von stabil transfizierten HEK293-hNAT-Zellen. Für die IEF wurden 10 cm lange Acrylamid-Gelstreifen mit einem pH-Gradienten von 3-10 verwendet (B.2.3.5.1) und die Fokussierbedingungen wie folgt gewählt:

1. Vorfokussierung	2000 V, 7 mA, 7 W	30 min
2. Probenauftrag	2000 V, 7 mA, 7 W	15 min
3. Fokussierung	2000 V, 7 mA, 7 W	120 min
4. Nachfokussierung	2500 V, 7 mA, 9 W	10 min

Die Entwicklung der zweiten Dimension erfolgte anschließend jeweils über ein 10%iges SDS-Gel (11 cm x 12 cm). Eines der Gele diente zur Western-Blot-

Analyse anhand der die Lokalisation des hNAT-Proteins im 2D-Gel erfolgen sollte. Das zweite Gel (Abbildung 42 A) wurde nach einem Protokoll, das mit einer nachfolgenden MALDI-TOF-MS-Analyse kompatibel war, silbergefärbt (Lauber et al. 2001). Nach Abgleich mit dem entwickelten Film des Western-Blots (Abbildung 42 B) wurden die entsprechenden, signal-positiven Protein-Spots aus dem silbergefärbten Gel extrahiert, nach Gharahdghi et al. (1999) entfärbt und per MALDI-TOF-MS (B.2.3.9) analysiert.

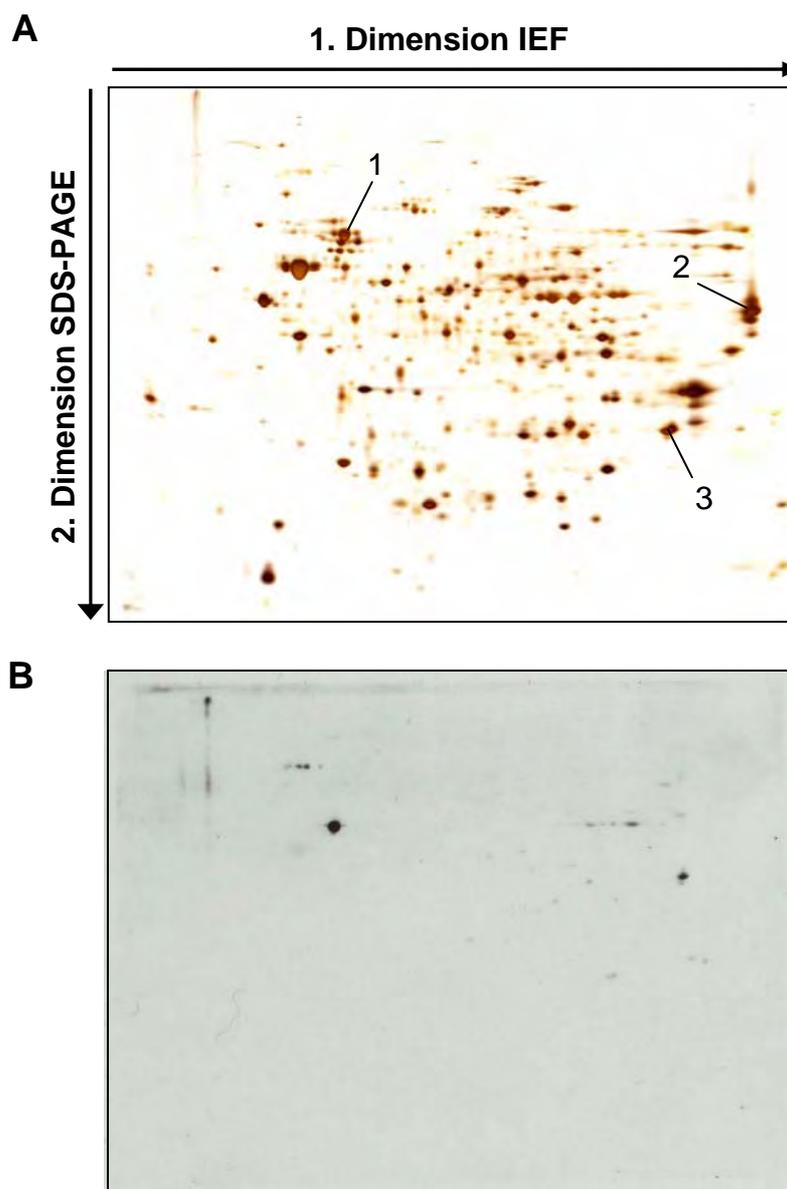


Abbildung 42: Silbergefärbtes 2D-IEF/SDS-Gel einer Membranpräparation von HEK293-hNAT-Zellen (A) und Western-Blot-Analyse mit einem hNAT-Antikörper (B)

Legende siehe Seite 118 oben.

Es wurden 80 µg Protein einer Membranpräparation von HEK293-hNAT-Zellen über ein 2D-IEF/SDS-Gel (A) getrennt. Die markierten 3 Protein-Spots (1, 2, 3) ergaben in der Western-Blot-Analyse (B) mit monoklonalem NAT-Antikörper (Fab Technologies) ein (unspezifisches) Signal und konnten per MALDI-TOF-MS identifiziert werden.

Die hohe Auflösung der Protein-Spots des in Abbildung 42 A gezeigten Gels veranschaulicht die gute Trennleistung der 2D-IEF/SDS-PAGE. Die Signale des Western Blots konnten 3 immunopositiven Protein-Spots zugeordnet werden. Jedoch keines dieser Proteine wurde per MALDI-TOF-MS (*peptide mass fingerprinting*) als hNAT identifiziert. Es wurden stattdessen mit signifikanten Scores (B.2.3.9) die in Tabelle 9 angegebenen Proteine erkannt. Diese hatten mit dem verwendeten NAT-Antikörper kreuzreagiert.

Aufgrund dieser Befunde muss die Methode der 2D-IEF/SDS-PAGE als ungeeignet zur Auftrennung des sehr hydrophoben NAT-Proteins angesehen werden.

Spot	Protein	MG (Da)	pI	Score	Sequenz-abdeckung
1	Hitzeschock-Protein 70 kDa	73920	5,87	138	26 %
2	Elongationsfaktor 1-alfa 1	50474	9,10	79	22 %
3	Porin-Isoform 1	30818	8,63	135	61 %

Tabelle 9: Durch MALDI-TOF-MS identifizierte, immunopositive Proteine aus Abbildung 42

Die angegebenen Werte für das Molekulargewicht (MG) und den pI sind aus der Primärstruktur des Proteins errechnet und entstammen der Datenbank des *ExpASY Proteomics Servers*. Die Sequenzabdeckung gibt an, welchen prozentualen Anteil die massenspektrometrisch detektierten, tryptischen Peptide an der Gesamtsequenz des identifizierten Proteins haben.

3.2 Entwicklung einer Elektrophoreseapparatur zur Auftrennung von Membranproteinen mittels kationisch rehydratisierter Gelstreifen

Wie in der Einleitung (A.2) bereits erwähnt, entziehen sich die meisten integralen Membranproteine einer Auftrennung durch die konventionelle 2D-PAGE. Die unter C.3.1 beschriebenen Versuche haben bestätigt, dass dies auch für den hNAT gilt. Ein spezielles 2D-Elektrophoreseverfahren zur Auftrennung von Membranproteinen ist die Benzyl dimethyl-*N*-hexadecylammoniumchlorid

(16-BAC)/SDS-PAGE (Macfarlane 1989). Das entsprechende Protokoll weist allerdings die in der Einleitung geschilderten Nachteile auf.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in einer Kooperation mit Herrn Dr. M. H. J. Ahrend aus dem Institut für Tierwissenschaften der Universität Bonn eine neue Technik entwickelt werden, die zusammen mit einer speziellen Apparatur erstmals eine leicht handhabbare 16-BAC-PAGE mit auf Trägerfolie gebundenen Gelstreifen ermöglicht.

Der Streifenhalter, sowie die Elektrodenblöcke der Apparatur (Abbildung 43) wurden nach genauen Vorgaben in der Institutswerkstatt gefertigt. Als Material diente Plexiglas[®] (Degussa), das mit einer Fräse des Typs FP4M (Deckel) bearbeitet wurde. Zur Adjustierung der Temperatur während eines elektrophoretischen Laufes konnte der Streifenhalter auf einer konventionellen Kühlplatte oder einer Multiphor II (Pharmacia LKB) platziert werden. Die technischen Zeichnungen der Apparatur befinden sich im Anhang (F.2) dieser Arbeit.

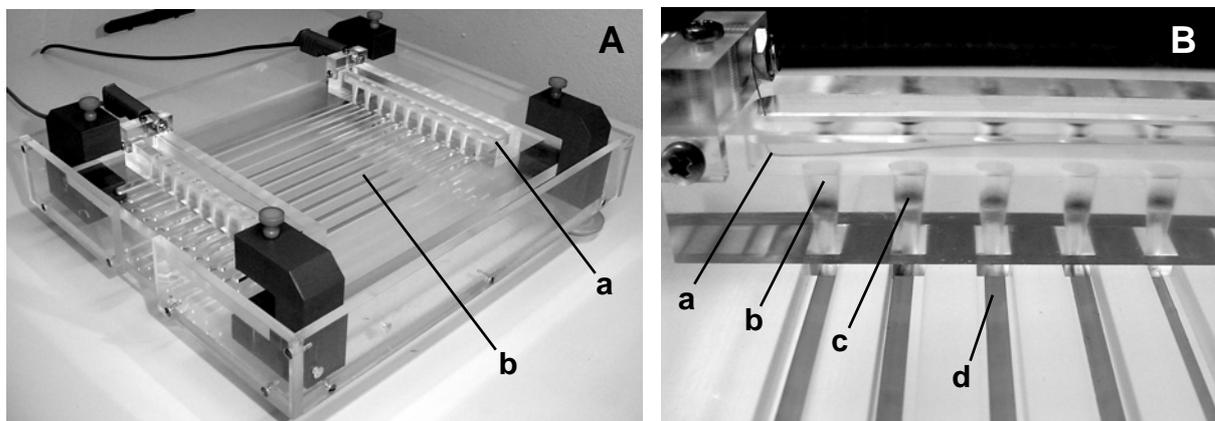


Abbildung 43: (A) Eine neue Elektrophoreseapparatur zur Trennung von Membranproteinen mittels Gelstreifen mit horizontalem Streifenhalter (b) und pufferbefüllten Elektrodenblöcken (a). (B) Elektrodenblock zur Probenapplikation mit Platinelektrode (a). Die Gelstopfen (b) in den Trichtern sind über kationisch rehydratisierten und mit Pyronin Y gefärbten Gelstreifen (d) platziert. Die Proteinproben (c) sind mit Methylengrün gefärbt.

Die Handhabung der Methode sei im Folgenden geschildert. Alle verwendeten Puffer und Lösungen sind mit ihrer Zusammensetzung unter B.1.7.3.3 angegeben. Das stark saure System der konventionellen, kationischen PAGE kann nach theoretischen Erwägungen nicht optimal arbeiten. Die Ursache ist der extrem niedrige pH-Wert des Laufpuffers (2,1) und die daraus resultierenden Ionenmobilitäten. Aus diesem Grund wurde das von Kramer (2006) entwickelte biphasische Puffersystem eingesetzt (Kramer 2006).

Die verwendeten Gelstreifen wurden, wie unter B.2.3.6 beschrieben, hergestellt. Sie mussten vor dem Gebrauch mit 16-BAC-Puffer rehydratisiert werden. Dazu wurde zunächst vorsichtig der Schutzfilm entfernt und die Streifen, mit der Gelseite nach oben, auf eine gereinigte Glasplatte gelegt. Ein mit Trenngelpuffer getränkter Papierelektrodenstreifen (GE) wurde über dem Trenngelanteil des Streifens platziert. Ein zweiter, mit Sammelgelpuffer getränkter Papierelektrodenstreifen sorgte - auf das Sammelgel gelegt - für dessen Rehydratation. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Streifen mit einer handelsüblichen Frischhaltefolie bedeckt. Nach 12 h Rehydratation wurden die Papierelektrodenstreifen entfernt, die Gelstreifen in den Streifenhalter (Abbildung 43 A) gelegt und zum Schutz vor Austrocknung während der Elektrophorese mit Mineralöl (Amersham Biosciences) überschichtet.

Auf eine saubere Glasplatte gestellt, wurden nun in die Trichter der Elektrodenblöcke (Abbildung 43 B) neutrale 50 µl Acrylamidgel-Stopfen (4 % T, 2 % C) polymerisiert. Nach dem Polymerisieren der Stopfen wurde der Kathodenblock vorsichtig über das 14 %-Ende des Trenngels gesetzt und mit 15 ml Kathodenpuffer befüllt. Der zur Probenapplikation dienende und mit 15 ml Anodenpuffer befüllte Anodenblock wurde am entgegengesetzten Ende der Streifen über dem Sammelgel platziert. Anschließend wurden die Proben (50 µg Protein einer Membranpräparation in 30 µl Probenpuffer) direkt auf die Gelstopfen, in die Trichter des Anodenblocks pipettiert. Nach dem Anschluss der Elektrodenblöcke an einen Stromversorger (Pharmacia LKB) betrug die Elektrophoresebedingungen 3 mA für 1 h und 6 mA für 7 h bei 20°C.

Der Verlauf der Elektrophorese konnte durch die methylgrüngefärbte Lauffront, die innerhalb der Streifen in Richtung Kathode wanderte, visualisiert werden. Sobald diese vollständig in die Gelstopfen des Kathodenblocks migriert war, wurde der Lauf gestoppt.

Die 16-BAC-Gelstreifen wurden anschließend analog zu IEF-Streifen, wie unter B.2.3.5.2 beschrieben, äquilibriert und entsprechend für die Entwicklung der zweiten Dimension eingesetzt. Das resultierende 2D 16-BAC/SDS-Gel konnte entweder mit Coomassie gefärbt (B.2.3.7) oder für eine Western-Blot-Analyse (B.2.3.8) eingesetzt werden.

3.2.1 Auftrennung integraler Membranproteine aus HEK293-Zellen mittels 2D 16-BAC-Gelstreifen/SDS-PAGE

Zum Nachweis der Tauglichkeit der vorgestellten Methode zur Auftrennung integraler Membranproteine wurden Proteine einer Membranpräparation von HEK293-Zellen aufgetrennt und anschließend wie unter B.2.3.9 beschrieben per MALDI-TOF-MS identifiziert. Insgesamt wurden dazu 50 µg Protein einer zur Abreicherung adhärenter, zytoplasmatischer Proteine carbonatbehandelten Membranpräparation (B.2.3.1) eingesetzt. Das resultierende 2D 16-BAC/SDS-Gel wurde mit Coomassie R250 gefärbt. Zur Kontrolle, ob ein quantitativer Proteintransfer vom Gelstreifen in das SDS-Gel erfolgte, wurde der Streifen im Anschluss an den Lauf der zweiten Dimension ebenfalls mit Coomassie gefärbt. Der Transfer konnte als quantitativ angesehen werden, da kein im Gelstreifen verbliebenes Protein sichtbar gemacht werden konnte (Ergebnis nicht gezeigt).

Von den 53 sichtbaren, diagonal ellipsoid angeordneten Spots des gefärbten Gels konnten 30 verschiedene Proteine eindeutig identifiziert werden (Abbildung 44). Darunter waren die in Tabelle 10 aufgeführten 12 Transmembranproteine sowie 2 membranassoziierte Proteine (DRIP5 und NUCB1 in Abbildung 44). Diese Ergebnisse belegen die Eignung der Methode zur 2D-gelelektrophoretischen Auftrennung integraler Membranproteine.

Bei der Proteinidentifizierung mit Hilfe der MASCOT MSDB-Datenbank (B.2.3.9) wurde die Suche auf *Mammalia* beschränkt mit einer Massentoleranz von 100 ppm sowie der Carbamylierung von Cystein als obligater und der Oxidation von Methionin als potentieller Modifikation.

Die Anzahl an Transmembrandomänen der identifizierten Proteine wurde aus der jeweiligen Primärstruktur unter Verwendung der im weltweiten Netz (<http://expasy.org/>) frei zugänglichen Programme HMMTOP 2.0 (Tusnady und

Simon 2001), TMHMM 2.0 (Krogh et al. 2001) und TMpred (Hofmann und Stoffel 1993) ermittelt.

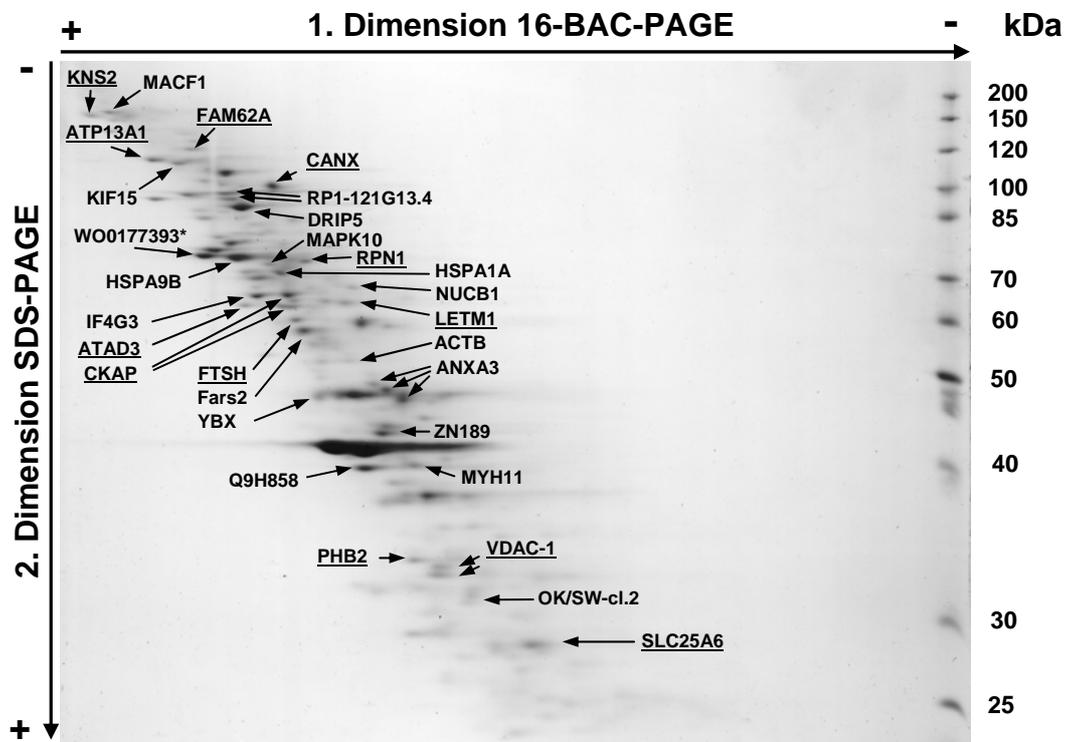


Abbildung 44: Coomassie-gefärbtes 2D 16-BAC/SDS-Gel (18 cm x 20 cm) von Proteinen einer Membranpräparation aus HEK293-Zellen

Für die erste Dimension wurden kationisch rehydratisierte Gelstreifen verwendet. Massenspektrometrisch identifizierte Proteine sind mit ihren Gennamen (<http://expasy.org/>) gekennzeichnet. Transmembranproteine (siehe auch Tabelle 10) sind unterstrichen.

*Sequenz 1 von Patent WO0177393, Genbank-Nr.: CAT 10522

Genname*	Proteinname*	Swiss-Prot Eintrags-Nr.	TMs	Anzahl Peptide	Sequenz-abdeckung
KTN1	Kinesin receptor	Q86UP2	1	23	17 %
FAM62A	Membrane bound C2 domain-containing protein	Q9BSJ8	2	15	19 %
ATP13A1	Probable cation-transporting ATPase 13A1	Q9HD20	6	12	14 %
LETM1	Leucine zipper-EF-hand-containing transmembrane protein 1	O95202	1	26	30 %
CANX	Calnexin	P27824	1	16	26 %
CKAP4	Cytoskeleton-associated protein 4	Q07065	1	20	36 %
ATAD3A	ATPase family AAA domain-containing protein 3A	Q9NVI7	3	41	50 %
RPN1	Ribophorin 1	P04843	1	19	48 %
FTSH	Putative ATPases	Q9NQ51	1	16	33 %
PHB2	Prohibitin-2	Q99623	1	17	52 %
VDAC 1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	P21796	1	10	53 %
SLC25A6	ADP/ATP translocase 3	P12236	3	13	41 %

*Bezeichnung gemäß SWISS-Prot (<http://expasy.org/>)

Tabelle 10: Mittels MALDI-TOF-MS identifizierte Transmembranproteine aus HEK293-Zellen

3.2.2 Auftrennung des hNAT-Proteins mittels 2D 16-BAC-Gelstreifen/SDS-PAGE

Es galt nun zu prüfen, ob sich auch das hoch hydrophobe hNAT-Protein über diese neue Elektrophoresemethode auftrennen ließ und anschließend einer Detektion zugänglich war. Dazu wurden 50 µg Protein einer Membranpräparation von stabil transfizierten HEK293-hNAT-Zellen mittels 2D 16-BAC/SDS-PAGE unter Verwendung von Gelstreifen (10 cm x 0,3 cm) für die erste Dimension aufgetrennt. Das resultierende Gel wurde anschließend einer Western-Blot-Analyse unterzogen.

Abbildung 45 zeigt, dass per Immunodetektion mit einem spezifischen NAT-Antikörper sowohl ein deutliches Signal für die unglykosylierte, etwa 50 kDa große Variante des hNAT, als auch für die etwa 70 kDa große, glykosylierte Form

erhalten wurde. Das Signal des glykosylierten hNAT war dennoch schwächer, als das seiner unglykosylierten Vorstufe. Der verwendete NAT-Antikörper ergab kein Signal im Fall von nicht transfizierten HEK293-Zellen (Ergebnis nicht gezeigt).

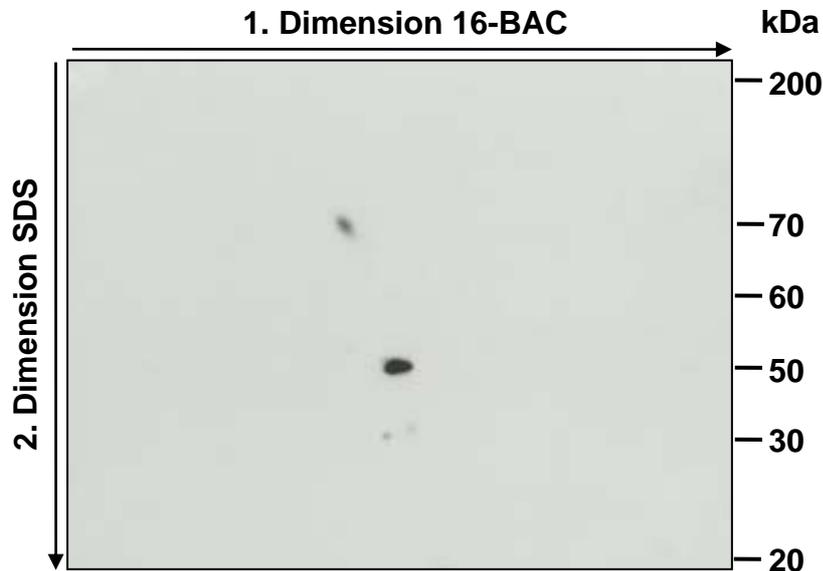


Abbildung 45: Western-Blot-Analyse eines 2D 16-BAC/SDS-Gels von HEK293-hNAT-Zellen

Die Immunodetektion erfolgte nach dem Elektrotransfer auf Nitrocellulosemembran mit einem spezifischen NAT-Antikörper (Santa Cruz). Zur Orientierung sind die Positionen von 6 Größenmarkerbanden (Fermentas) mit dargestellt. Zu erkennen ist ein deutliches Signal bei 50 kDa, das der unglykosylierten Form des hNAT-Proteins entspricht. Das zweite, etwas schwächere Signal entspricht mit 70 kDa der Größe des glykosylierten hNAT.

3.2.3 Nachweis der Reproduzierbarkeit der 2D 16-BAC-Gelstreifen/SDS-PAGE

Zum Nachweis der Reproduzierbarkeit der Methode wurden 4 separate 2D 16-BAC/SDS-Gele, ausgehend von jeweils der gleichen Proteinmenge (80 µg), unter identischen Bedingungen entwickelt und mit Coomassie R250 gefärbt (Abbildung 46). Nach dem Digitalisieren der Gele wurden diese bezüglich der Spotzahl, dem Anteil korrespondierender Spots (angegeben in Prozent der Durchschnittsspotzahl zweier miteinander verglichener Gele) und der Intensitätskorrelation korrespondierender Spots analysiert. Dazu wurde das Programm ImageMaster 2D Platinum (Amersham Biosciences) verwendet.

Eine hohe Reproduzierbarkeit der Methode konnte gezeigt werden, da die 4 Gele keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Spotzahl sowie der Anordnung der Spots aufwiesen (Tabelle 11). Für die Intensitäten korrespondierender Spots ergaben sich Korrelationskoeffizienten von etwa 0,9.

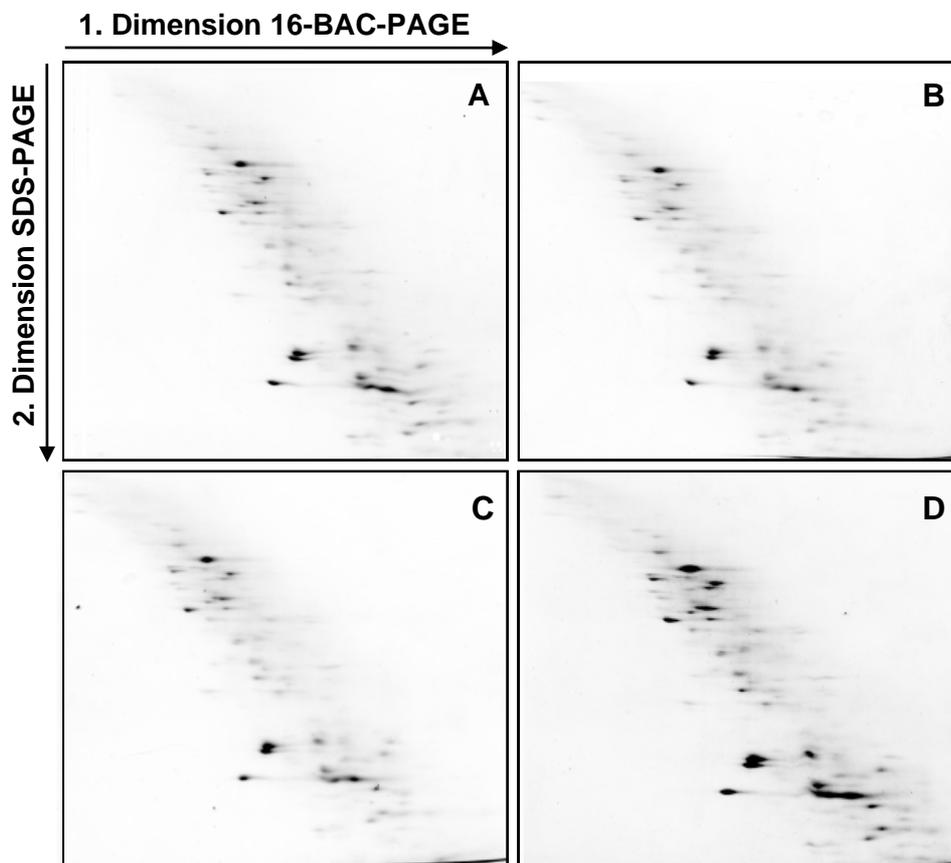


Abbildung 46: Nachweis der Reproduzierbarkeit der 2D 16-BAC/SDS-PAGE mit Gelstreifen

Gezeigt sind 4 unter identischen Bedingungen angefertigte 16-BAC/SDS-Gele (11 cm x 12 cm). Jedes Gel wurde mit 80 μg Protein einer Membranpräparation von HEK293-hNAT-Zellen beladen. Die 4 Gele (A-D) zeigten eine hohe Korrelation bezüglich Spotzahl und Anordnung.

Gel (A-D) (Anzahl der Spots)			
	Gel B (44)	Gel C (46)	Gel D (57)
Gel A (57)	0.960 ^a 78 % ^b 39 ^c	0.880 82 % 42	0.921 81 % 46
Gel B (44)	-	0.936 85 % 38	0.930 80 % 40
Gel C (46)	-	-	0.942 89 % 46

Tabelle 11: Ergebnisse der Reproduzierbarkeitsanalyse der 2D 16-BAC/SDS-PAGE

Die Auswertung der digitalisierten Gele aus Abbildung 46 erfolgte mit Hilfe des Programms ImageMaster 2D Platinum.

^a Korrelationskoeffizient der Intensitäten der Spots mit identischen Koordinaten zwischen zwei miteinander verglichenen Gelen

^b Anteil der Spots mit identischen Koordinaten zwischen zwei miteinander verglichenen Gelen in Prozent der Durchschnittspotzahl dieser zwei Gele

^c Anzahl der Spots mit identischen Koordinaten zwischen zwei miteinander verglichenen Gelen

D. Diskussion

1. Gewinnung von Strukturinformationen des hNAT mittels gerichteter Mutagenese und kovalent interagierender Inhibitoren

1.1 Unterschiedliche Mechanismen bei der Hemmung von Aufnahme und Bindung des hNAT durch NEM

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Gründe für die unterschiedlichen Effekte von NEM auf die Monoaminaufnahme und die Ligandbindung des NAT aufzuklären. Bereits in drei früheren Studien wird berichtet, dass die Monoaminaufnahme durch den SERT (Meyerson et al. 1987; Wölfel et al. 1989) und den NAT (Schömig et al. 1988) wesentlich empfindlicher gegenüber der hemmenden Wirkung von NEM ist als die Ligandbindung. Die von Schömig et al. (1988) durchgeführten Untersuchungen am NAT wurden jedoch mit Zellen durchgeführt, die zusätzlich den vesikulären Monoamintransporter exprimieren und Monoamine vesikulär speichern. Die Komplikation einer möglicherweise durch NEM induzierten Monoaminfreisetzung wurde bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten vermieden, da die NEM-Effekte auf den NAT an transfizierten HEK293-Zellen untersucht wurden. Mit Hilfe dieser Zellen konnte gezeigt werden, dass zur Hemmung der NA-Aufnahme ($IC_{50} = 31,5 \mu\text{M}$) wesentlich geringere NEM-Konzentrationen ausreichend sind als für eine Hemmung der Nisoxetin-Bindung ($IC_{50} = 270,0 \mu\text{M}$) benötigt werden. Dabei war die Inhibition der Bindung durch einen Hill Koeffizienten von -1 charakterisiert, während für die Aufnahmehemmung ein Wert von -3 ermittelt wurde. Der letztere Wert deutet auf eine höhere Kooperativität, bzw. die Beteiligung von mehr als einem Prozess hin.

Ferner konnte die Nisoxetin-Bindung durch verschiedene NAT-Substraten sowie Nicht-Substrat-Liganden vor einer Inhibierung durch NEM protektiert werden. Dieser Befund bestätigt Ergebnisse, die von Schömig et al. (1988) mit Hilfe von PC12-Zellen am NAT der Ratte erhoben wurden. Zusätzlich wurde nun gezeigt, dass die Inhibierung der NA-Aufnahme schneller verläuft als die der Nisoxetin-Bindung und dass weder NAT-Substrate (NA, MPP⁺, Ameszinium) noch Nicht-Substrat-Liganden (Kokain, Bupropion) vor einer Inhibierung der NA-Aufnahme durch NEM schützen.

All diese Beobachtungen zeigen, dass sich die Hemmung der NA-Aufnahme deutlich von der der Nisoxetin-Bindung unterscheidet. Die Tatsache, dass NAT-Liganden bei der irreversiblen Inhibition der NA-Aufnahme durch NEM keinen protektierenden Effekt zeigten, deutet klar darauf hin, dass keine direkte Inhibition des NAT-Proteins durch niedrige Konzentrationen von NEM stattfindet, sondern ein indirekter Mechanismus verantwortlich sein muss. Diese Annahme wurde auch in der oben zitierten Arbeit von Schömig et al. (1988) geäußert, nachdem gezeigt werden konnte, dass NEM die durch einen künstlich erzeugten Na^+ - und K^+ -Gradienten getriebene NA-Aufnahme in isolierte Membranvesikel von PC12-Zellen mit vergleichbarer Potenz hemmt wie die Desipramin-Bindung. Die Hemmung der NA-Aufnahme in intakte PC12-Zellen erfolgte im Vergleich schon bei wesentlich niedrigeren NEM-Konzentrationen. Es wurde daher vermutet, dass NEM die Na^+/K^+ -ATPase hemmt. Zu dieser Schlussfolgerung kamen auch Wölfel et al. (1989) nach Untersuchungen am SERT von Kaninchenthrombozyten und der Beobachtung, dass NEM, wie Ouabain, die intrazelluläre Na^+ -Konzentration erhöht und damit den Na^+ -Gradienten vermindert, was schließlich die Serotonin-Aufnahme reduziert.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Na^+/K^+ -ATPase-Inhibitoren Ouabain und Vanadat auf die [^3H]MPP $^+$ -Aufnahme durch den hNAT (in HEK293-hNAT-Zellen) sowie auf die $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme (in HEK293-Zellen) untersucht. Die $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in Zellen erfolgt über die Na^+/K^+ -ATPase (Smith 1977) und ist ein Maß für die Aktivität dieses Enzyms. Im Unterschied zur vollständigen Hemmung der Monoamin- und $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme durch NEM, verursachten sowohl Ouabain als auch Vanadat in beiden Fällen jedoch nur eine partielle Inhibierung. Dies könnte auf das Vorhandensein einer Ouabain-unempfindlichen Na^+/K^+ -ATPase zurückzuführen sein, wie sie in Nierengewebe exprimiert wird (Caruso-Neves et al. 2002) und die möglicherweise auch in der Nierenzelllinie HEK293 aktiv ist. Auch wenn die Aufnahme von $^{86}\text{Rb}^+$ zusätzlich über den in HEK293-Zellen exprimierten, sekundär aktiven $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ -Cotransporter (Isenring et al. 1998) erfolgen würde, wäre sie doch von der Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase abhängig (Gillen und Forbush 1999). Im Unterschied zu der nur unvollständigen Hemmung der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme durch Ouabain verlief die durch NEM, wie im Fall der Hemmung der NA-Aufnahme, schnell und fast vollständig. Ebenfalls, vergleichbar zur Hemmung der NA-Aufnahme, war die

NEM-bedingte Hemmung der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme durch einen niedrigen IC_{50} -Wert (11,7 μM) sowie einen Hill Koeffizienten von -3,2 charakterisiert.

Diese Befunde stellen eine direkte Inhibition der Na^+/K^+ -ATPase durch niedrige NEM-Konzentrationen in Frage, schließen jedoch eine partielle Inhibition nicht aus, da bereits früher gezeigt werden konnte, dass millimolare Konzentrationen von NEM das Enzym inaktivieren (Schoot et al. 1977).

Um aufzuklären, ob NEM die NA- und Rb^+ -Aufnahme durch eine Blockade der ATP-Synthese inhibiert, wurde die NEM-induzierte Reduktion des zellulären ATP bestimmt. Zum ersten Mal wurde nun gezeigt, dass NEM einen schnelle und fast vollständige Reduktion des zellulären ATP bewirkt. Die Kinetik dieses NEM-Effekts war vergleichbar mit der der Hemmung der NA- und Rb^+ -Aufnahme. Ferner ergab sich für diesen NEM-Effekt eine EC_{50} im niedrig mikromolaren Bereich (11,2 μM), die vergleichbar war mit der IC_{50} für die Hemmung der NA-Aufnahme und praktisch identisch mit der IC_{50} für die Hemmung der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme. Diese Befunde belegen eindeutig, dass NEM die ATP-Synthese inhibiert. Tatsächlich konnten, nach intensiver Literaturrecherche, frühere Artikel gefunden werden, welche in publizierten Arbeiten über NEM-Effekte an den MATs nicht erwähnt werden; in diesen wird berichtet, dass das lipophile NEM ein potenter Inhibitor der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung (Meijer et al. 1970; Le Quoc et al. 1979) und des mitochondrialen ADP/ATP-Transporters (Majima et al. 1993) ist.

Somit verursacht NEM durch die Depletion von intrazellulärem ATP einen Verlust der Aktivität sämtlicher ATPasen, was unmittelbar einhergeht mit dem Abbau des Na^+ - und K^+ -Gradienten sowie einer Depolarisation. Dies wiederum bewirkt die Hemmung der Aufnahme von $^{86}\text{Rb}^+$ und der von NA über den hNAT.

Demnach sollte dieser NEM-Effekt eine Inhibierung sämtlicher sekundär aktiver Transportprozesse verursachen und folglich auch für eine Inhibition des Amin-Transports durch andere MATs zutreffen. Tatsächlich konnte ebenfalls eine vollständige Hemmung der $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme in transfizierte HEK293-Zellen beobachtet werden, die entweder hDAT oder hSERT exprimierten (Ergebnisse nicht gezeigt).

Der ATP-depletierende Effekt des NEM war keineswegs eine Besonderheit, die nur bei HEK293-Zellen zu beobachten war, denn er ließ sich an insgesamt 7 verschiedenen Säuger-Zelllinien zeigen. Die dabei ermittelten, zum Teil deutlichen

Unterschiede hinsichtlich der Sensitivität gegenüber NEM können mit einer ungleichen Stoffwechselaktivität (ATP-Verbrauch) der Zelllinien erklärt werden. Insgesamt betrachtet erwiesen sich die getesteten Nagerzelllinien als empfindlicher gegenüber NEM als die Primatenzelllinien. Diese Tatsache könnte durch speziebedingte Unterschiede der NEM-Empfindlichkeit von an der ATP-Bereitstellung beteiligter Proteine begründet sein. Schließlich könnten auch Verschiedenheiten in der Permeabilität der Zell- bzw. Mitochondrienmembranen eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Empfindlichkeiten gegenüber der Substanz sein.

Der H^+/K^+ -ATPase-Inhibitor SCH28080 sollte in der vorliegenden Arbeit ursprünglich zur Bestimmung des auf die renale H^+/K^+ -ATPase zurückzuführenden Anteils der Oubain-unempfindlichen $^{86}Rb^+$ -Aufnahme in HEK293-Zellen eingesetzt werden. Schließlich konnte jedoch die hemmende Wirkung von SCH28080 auf die Rb^+ - und MPP^+ -Aufnahme ebenfalls dadurch erklärt werden, dass die Substanz eine partielle Depletion von zellulärem ATP in HEK293-Zellen verursacht. Diese Eigenschaft von SCH28080 konnte bisher nur an murinen IMCD-3-Zellen beobachtet werden und galt daher als selektiver Effekt an dieser Zelllinie (Codina et al. 2000).

1.2 Charakterisierung der kovalenten Interaktion von NEM mit dem hNAT

Zur Untersuchung der Auswirkung einer potentiellen Alkylierung nativer hNAT-Cysteine durch NEM wurde die Hemmung der Nisoxetin-Bindung analysiert. Bindungsstudien mit Hilfe von Radioliganden an Membranproteinen, wie dem hNAT, erfolgen unter Bedingungen, die kein ATP erfordern. Folglich kann der inhibierende Effekt des NEM auf die Nisoxetin-Bindung, im Unterschied zur Hemmung der NA-Aufnahme, nicht durch einen Mangel an ATP bedingt sein, sondern muss auf einer direkten Interaktion mit dem NAT-Protein beruhen.

Wie schon zuvor erwähnt, unterscheidet sich die Hemmung der Nisoxetin-Bindung des NAT durch NEM deutlich von der Hemmung der NA-Aufnahme. Im Unterschied zur Hemmung der NA-Aufnahme, erfolgte die der Nisoxetin-Bindung langsamer, war weniger empfindlich und verlief unvollständig. Selbst nach einer Inkubation mit 5 mM NEM zeigten sich etwa 25 – 30 % der Bindung resistent gegen eine Inhibition. Dies deutet darauf hin, dass zumindest ein Teil des Nisoxetins in einem Bereich gebunden haben muss, der sich von der NEM-

empfindlichen Stelle unterscheidet. Ferner war die NEM-bedingte, irreversible Inhibition der Nisoxetin-Bindung durch einen höheren IC_{50} -Wert charakterisiert als die Hemmung der NA-Aufnahme sowie einen Hill Koeffizienten von etwa -1. Die inhibitorische Potenz des NEM stieg durch eine Verlängerung der NEM-Exposition an. Dies äußerte sich anhand des deutlich höheren IC_{50} -Werts nach einer Exposition von 15 min (IC_{50} : 2040 μ M) als nach 90 min (IC_{50} : 270 μ M). Die Bindungshemmung war dabei gekennzeichnet durch eine deutliche Abnahme der Transporterdichte (Reduktion des B_{max} -Werts), während der K_D -Wert nicht signifikant durch NEM beeinflusst wurde. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit Befunden von Reith und Selmeçi (1992), die zeigten, dass NEM die [3 H]Mazindol- und [3 H]CFT-Bindung am DAT hemmt, indem es die B_{max} erniedrigt ohne eine Veränderung des K_D -Werts zu bewirken.

Auf den ersten Blick scheint die Vorstellung plausibel, dass NEM durch die Alkylierung eines Cysteins innerhalb der Ligandbindungstasche des NAT eine Hemmung der Nisoxetin-Bindung verursacht. Diese Annahme wird bestärkt durch die Tatsache, dass NAT-Substrate und Liganden vor einer Inaktivierung durch NEM protektieren. Jedoch wurde der protektierende Effekt von NA und Kokain bei niedriger Temperatur aufgehoben. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die Protektion offenbar auf einer durch die Ligandbindung initiierten Konformationsänderung beruht. NA und Kokain scheinen demnach die Zugänglichkeit einer NEM-empfindlichen Stelle zu verändern, deren Modifikation zu einer Inaktivierung des NAT führt. Eine ähnliche Situation wurde bei der Inhibierung des SERT durch MTSEA beobachtet: Serotonin und Kokain protektierten hier vor einer Inaktivierung bei 25°C, jedoch nicht bei 4°C (Androutsellis-Theotokis et al. 2001).

Die Theorie, dass NEM den NAT sowie die verwandten Monoamintransporter DAT und SERT durch die Alkylierung funktionell bedeutender Cysteine inhibiert, erscheint vorstellbar, da alle diese Transporter mehrere Sulfhydrylgruppen aufweisen. Für einige von ihnen konnte bereits gezeigt werden, dass sie zum Teil verschiedene Funktionen innerhalb der Transporterproteine erfüllen. Beispielsweise zwei innerhalb der Familie der MATs hoch konservierte Cysteine stabilisieren die Tertiärstruktur der Transporter durch Ausbildung einer Disulfidbrücke innerhalb der ES2 (Chen et al. 2007) (siehe unten). Eine Interaktion von Cystein 342 innerhalb der IS3 des DAT mit Peroxynitrit, welches von

Substanzen wie Methamphetamin oder 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) freigesetzt wird, soll für die dopaminerge Neurotoxizität dieser Stoffe mitverantwortlich sein (Park et al. 2002). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass der biologische Botenstoff Stickstoffmonoxid (NO) die Funktion des NAT über eine Nitrosierung des Cysteinrestes in Position 351 innerhalb der IS3 des NAT moduliert (Kaye et al. 2000).

1.3 Funktionelle Bedeutung der Cysteine des hNAT

Zur Aufklärung welche Bedeutung die einzelnen Cysteine des hNAT beim Substrattransport und der Ligandbindung besitzen, sowie zur Identifizierung, welches Cystein durch NEM möglicherweise alkyliert wird, wurden die 10 endogenen Cysteine des hNAT zunächst einzeln durch gerichtete Mutagenese gegen Alanin ausgetauscht. Mit den resultierenden Mutanten wurden Aufnahme- und Bindungsstudien durchgeführt. Zum ersten Mal wurde für den hNAT gezeigt, dass die Mutation eines der beiden Cysteine Cys176 und Cys185 innerhalb der großen extrazellulären Schleife einen vollständigen Verlust der Expression des Transporters in der Plasmamembran bewirkt. Eine drastische Reduktion der Zelloberflächenexpression, sobald eines der beiden entsprechenden Cysteine mutiert wurde, konnte bereits für den nahe verwandten DAT nachgewiesen werden (Wang et al. 1995; Chen et al. 2007). Auch im Fall des SERT bewirkte ein Austausch der analogen Cysteine, einzeln oder gemeinsam, einen erheblichen, jedoch nicht vollständigen Verlust des Amintransports und der Expression des Transporters in der Plasmamembran (Chen et al. 1997; Sur et al. 1997).

Dass die beiden Cysteine der großen extrazellulären Schleife tatsächlich eine Disulfidbrücke bilden, wurde jüngst für den DAT bewiesen (Chen et al. 2007). Generell bewirkt die Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke zwischen zwei weiter voneinander entfernten Cysteinen eine größere Stabilisierung der Proteinstruktur als im Fall zweier innerhalb der Sequenz nahe beieinander liegender (Gilbert 2001). Obwohl Cys176 und Cys185 innerhalb des NAT lediglich eine kurze Sequenz von 8 Aminosäuren überbrücken, scheint die resultierende Struktur doch von besonderer Bedeutung für die korrekte Faltung bzw. die Stabilität des Transporters zu sein. Unter Umständen ist die durch das Cystin gebildete Struktur eine Voraussetzung für die N-Glykosylierung des NAT, die in den Positionen Asn192, Asn198 sowie in direkter Nachbarschaft zu dieser Disulfidbrücke am Asn184 erfolgt (Nguyen und Amara 1996). Schließlich konnten

Chen et al. (1997) im Fall des SERT zeigen, dass die singuläre Mutation eines der konservierten Cysteine Cys200 und Cys209 innerhalb der ES2, eine drastische Reduktion der Zelloberflächenexpression des voll glykosylierten Transporters bewirkt. Bekanntermaßen verursacht eine verminderte oder aufgehobene N-Glykosylierung der MATs einen beträchtlichen Rückgang ihrer Expression in der Plasmamembran (Melikian et al. 1996; Nguyen and Amara 1996; Li et al. 2004; Mao et al. 2005).

Überdies existieren Befunde, die darauf hindeuten, dass die Disulfidbrücke innerhalb der ES2 des NAT möglicherweise eine Rolle bei der Ligandbindung spielt. Diese Annahme beruht auf der Feststellung, dass das Disulfidbrückenspaltende Dithioerythritol die Desipramin-Bindung des NAT hemmt (Bönisch et al. 1990).

Auf Grund der ausbleibenden Membranexpression der beiden Mutanten C176A und C185A konnte folglich in diesen beiden Fällen kein NEM-Effekt auf die Ligandbindung untersucht werden. Die Möglichkeit, dass NEM durch eine Interaktion mit einem dieser Cysteine eine Inhibition der Ligandbindung bewirkt, kann jedoch ausgeschlossen werden, da die beiden Cysteine, wie erwähnt, als Cystin vorliegen. NEM reagiert ausschließlich mit reduzierten Thiolgruppen und ist nicht in der Lage Disulfidbrücken zu spalten (van Iwaarden et al. 1992; Ferrer und Javitch 1998; Baty et al. 2002).

Es kamen somit nur noch die übrigen 8 Cysteine in Betracht für eine Hemmung der Ligandbindung nach einer Interaktion mit NEM verantwortlich zu sein. Nachdem diese vorerst alle einzeln gegen Alanin ausgetauscht wurden, zeigten die resultierenden hNAT-Mutanten (C44A, C86A, C131A, C240A, C339A, C351A, C460A und C520A) überraschenderweise keine signifikanten Unterschiede zum hNAT-WT hinsichtlich [³H]Amin-Aufnahme und [³H]Nisoxetin-Bindung. Dieses Ergebnis war zunächst unerwartet, da es anzeigte, dass keines der reduzierten Cysteine essentiell für die Amin-Aufnahme und die Ligandbindung des hNAT ist, obwohl gebundene NAT-Liganden vor einer Inaktivierung durch das Sulfhydrylreagenz NEM protektieren.

Eine ähnliche Situation ist im Fall der Laktose-Permease von *Escherichia coli* bekannt. Der individuelle Austausch der 8 nativen Cysteine gegen Serin oder Glycin zeigte hier keinen negativen Transporteffekt, dennoch war der Transporter in Substrat-protektierbarer Weise durch NEM inhibierbar (van Iwaarden et al.

1991; Frillingos et al. 1997). Es konnte schließlich ein einzelnes Cystein innerhalb TM5 identifiziert werden, welches nicht essentiell für die Funktion der Laktose-Permease ist, doch dessen Alkylierung durch NEM den Transporter inhibiert. Dieses Cystein befindet sich in der unmittelbaren Nachbarschaft zur Substratbindungsstelle und geht von dort eine hydrophoben Wechselwirkung mit dem Galaktosylrest des Substrates ein (Jung et al. 1994; Kaback et al. 2001).

Zur Überprüfung, ob die Inhibition der Nisoxetin-Bindung durch NEM auf die Alkylierung eines der 8 reduzierten hNAT-Cysteine zurückzuführen ist, wurde die konzentrationsabhängige Hemmung der [³H]Nisoxetin-Bindung durch NEM im Fall jeder Cys/Ala-Mutante bestimmt. Es zeigte sich, dass alle Mutanten etwa die gleiche Empfindlichkeit gegenüber NEM besaßen wie der hNAT-WT, was klar dafür spricht, dass den Cysteinen des hNAT keine Bedeutung bei der Ligandbindung zukommt. Diese Schlussfolgerung wird bestärkt durch Ergebnisse einer Studie von Sucic und Bryan-Lluka (2005), die während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit veröffentlicht wurde. In der besagten Studie wurde die Bedeutung der TM2 sowie der daran angrenzenden Region der IS1 des hNAT mit Hilfe der sogenannten *substituted-cysteine accessibility method* (SCAM) untersucht. Bei ihrer Suche nach einer für die SCAM-Analyse geeigneten „Ausgangsvarianten“ des NAT prüften sie, inwiefern die beiden Sulfhydrylreagentien und Methanthiosulfonate (MTS) MTSEA und MTSET eine Inhibition des hNAT-WT verursachen. Es konnte schließlich demonstriert werden, dass weder das hydrophile MTSET noch das lipophile MTSEA zu einer Hemmung der NA-Aufnahme durch den hNAT führt. Dieser Befund war überraschend, da vorausgegangene Arbeiten belegten, dass zumindest MTSEA eine partielle Inaktivierung sowohl des DAT als auch des SERT bewirkt und für die Interaktion definierte Cysteine identifiziert werden konnten, die den beim hNAT konservierten Cysteinen Cys86, Cys131 und Cys339 entsprechen (Chen et al. 1997; Ferrer and Javitch 1998; Reith et al. 2001).

Interessanterweise wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nach dem gemeinsamen Austausch aller hNAT-Cysteine (bis auf Cys176 und Cys185) gegen Alanin ein vollständiges Ausbleiben der Plasmamembranexpression der resultierenden Variante CX₈A beobachtet. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ließen stattdessen intrazelluläre Aggregate der hoch hydrophoben Variante CX₈A erkennen. Doch auch im Fall der Variante CX₈S, bei der die 8

Cysteine gegen das polare Serin substituiert wurden, blieb eine Membranexpression aus. Bereits der gemeinsame Austausch der beiden Cysteine Cys86 und Cys520 gegen Serin führte zu einer deutlichen Reduktion der Transporterzahl (etwa 80%ige Reduktion von B_{max}). Die zusätzliche Mutation von Cys460 gegen Serin verringerte die Membranexpression nochmals (Mutante CX₃S). Wurde außerdem Cys339 ausgetauscht (Mutante CX₄S), war schließlich keine Membranexpression mehr feststellbar.

Demnach ist es außerhalb der ES2 offensichtlich keine spezifische Funktion der Thiolgruppe, sondern eher eine bestimmte physikochemische Eigenschaft des Cysteins wie Größe, Polarität oder Hydrophobizität, die in den einzelnen Positionen konserviert sein muss.

Die Existenz einer weiteren essentiellen Disulfidbrücke innerhalb des hNAT-Proteins kann als sehr unwahrscheinlich angesehen werden, da nach aktuellen Modellvorstellungen (Abbildung 2) bis auf Cys86, Cys176 und Cys185 alle übrigen Cysteine innerhalb von TMs oder intrazellulär lokalisiert sind.

1.4 Interaktion von NEM mit einem Histidin der großen extrazellulären Schleife

Die Alkylierung eines Cysteins des hNAT durch NEM konnte, wie beschrieben, als Ursache für die Hemmung der Ligandbindung ausgeschlossen werden. Es existieren aber zahlreiche Belege dafür, dass NEM unter bestimmten Bedingungen (hohe Konzentration, $pH > 7$) nicht nur mit der Thiolgruppe von Cysteinen sondern auch „unspezifisch“ mit der Imidazolgruppe von Histidinen reagieren kann (Brewer and Riehm 1967; McKeown-Longo und Mosher 1984; van Iwaarden et al. 1992). Dies führte uns zu der Annahme, dass NEM eventuell ein funktionell bedeutendes Histidin innerhalb der Ligandbindungsstelle des hNAT alkyliert. Diese Vermutung wurde bekräftigt durch eine Studie am μ -Opioid-Rezeptor. Hier konnte die Alkylierung eines Histidins durch NEM für die Ligandprotektierbare Inaktivierung der Bindung verantwortlich gemacht werden (Shahrestanifar et al. 1996). Der Austausch des Histidins in Position 223 des μ -Opioid-Rezeptors gegen Serin verhinderte die Hemmung der [³H]Bremazocin-Bindung durch NEM und führte zu einem drastischen Verlust der Affinität zu Bremazocin. Auf diese Weise konnte die Bedeutung von His223 innerhalb der Ligandbindungsstelle des Rezeptors belegt werden.

Es wurden daher in der vorliegenden Arbeit alle 13 Histidine des hNAT gegen die inerte Aminosäure Alanin mutiert und die resultierenden His/Ala-Mutanten (H178A, H199A, H220A, H222A, H228A, H280A, H296A, H370/372A, H441A, H589/599A und H613A) bezüglich ihrer Empfindlichkeit der [³H]Nisoxetin-Bindung gegenüber NEM untersucht.

Die vorausgegangene funktionelle Charakterisierung der Mutanten deckte zunächst auf, dass kein Histidin des hNAT essentiell für die Expression des Transporters in der Plasmamembran oder seine Funktionalität ist. Obgleich die Substitution einiger Histidine eine signifikante Reduktion der Transporterzahl verursachte oder die Affinität zu MPP⁺ bzw. Nisoxetin negativ beeinflusste. So ist die signifikant erniedrigte B_{\max} der [³H]Nisoxetin-Bindung und V_{\max} der [³H]MPP⁺-Aufnahme im Fall der Doppelmutante H598/599A nachvollziehbar, da hier die Histidinaustausche innerhalb des funktionell bedeutsamen C-Terms erfolgten. Wenn auch die eigentliche Funktion des C-Terms des NAT von verschiedenen Autoren noch kontrovers diskutiert wird, so ist es doch hinreichend belegt, dass ihm eine essentielle Funktion bei der Plasmamembranexpression des Transporters zukommt (Pörzgen et al. 1998; Kitayama et al. 2001; Torres et al. 2001; Distelmaier et al. 2004).

His441 liegt nach dem von Beuming et al. (2006) auf der Basis der Kristallstruktur des bakteriellen LeuT (Yamashita et al. 2005) postulierten Topologiemodells innerhalb der neunten TM (TM9). Über die funktionelle Bedeutung dieser Region des NAT liegen noch keine fundierten Erkenntnisse vor. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass eine Mutation innerhalb der TM9 des hNAT beim Menschen mit orthostatischer Dysregulation einhergeht und die Membranexpression dieser natürlichen Variante (A457P) gegenüber dem WT deutlich reduziert ist (Hahn et al. 2003). Die hoch signifikant erniedrigte B_{\max} und V_{\max} im Fall der in dieser Arbeit untersuchten Mutante H441A belegen, dass dieses Histidin innerhalb der TM9 eine wichtige Rolle bei der Membranexpression spielt. Ferner war die Zahl der exprimierten Transporter im Fall der Mutante H220A reduziert. Dieses Histidin liegt innerhalb des C-terminalen Teils der ES2. Die Bedeutung dieser Region wird weiter unten diskutiert.

Im Gegensatz zu der erniedrigten Transporterzahl bei den zuvor beschriebenen, artifiziellen hNAT-Varianten, waren die Histidin-Austausche in den Positionen 296

und 370/372 mit einer signifikanten Reduktion der Affinität zu Nisoxetin verbunden. Die Membranexpression der Mutanten H296A und H370/372A blieb dabei unverändert.

Die Histidine 370 und 372 liegen innerhalb der extrazellulären Schleife 4 (ES4). Die ES4 gehört zu den Regionen mit der geringsten Sequenzhomologie unter den MATs (Beuming et al. 2006), was ihre Beteiligung an der hoch spezifischen Bindungsstelle des NAT z.B. für Desipramin oder Nisoxetin vorstellbar macht (Zhou et al. 2007). Bedeutend ist die Tatsache, dass das ES4-Motiv, das His370 und His372 enthält, bei NAT, DAT, SERT und LeuT etwa die gleiche Länge besitzt und wahrscheinlich in allen genannten Fällen die Struktur einer α -helikalen Schlaufe aufweist (Beuming et al. 2006). Anhand der Kristallstruktur des LeuT konnte gezeigt werden, dass diese Helixstruktur der ES4 gewissermaßen in eine extrazelluläre Kavität des Transporters („Mund“ des Transporters, siehe unten) hineinragt (Yamashita et al. 2005; Zhou et al. 2007) (Abbildung 47).

Interessanterweise ließ sich, nach Kristallographie des LeuT im Komplex mit Desipramin, von zwei unabhängigen Forschergruppen eine regelrechte TZA-Bindungstasche innerhalb des bakteriellen MAT-Homologons nachweisen (Singh et al. 2007; Zhou et al. 2007). Als verantwortlich für die Desipramin-Bindung konnten in beiden Fällen Aminosäuren der besagten ES4-Helix (A319 und F320) zusammen mit Aminosäuren aus TM1 und TM10 identifiziert werden. Zhou et al. (2007) postulierten daraufhin, dass die entdeckte Bindungstasche der auch beim NAT vorhandenen, spezifischen TZA-Bindungstasche entspricht. Angemerkt sei jedoch, dass noch einige funktionelle Unstimmigkeiten bezüglich der TZA-Bindung am LeuT im Vergleich zu der an den MATs bestehen. So stellten Singh et al. (2007) fest, dass das TZA Clomipramin den Leucin-Transport im Fall des LeuT nicht-kompetitiv und mit hoch mikromolarer Potenz inhibiert, während die Inhibition der MATs (SERT und NAT) durch TZA kompetitiv und mit nanomolarer Potenz erfolgt (Talvenheimo et al. 1979; Kimelberg und Pelton 1983). Die anhand des LeuT abgeleitete Modellvorstellung der TZA-Bindungstasche (Abbildung 47) sollte daher bis zur vollständigen Aufklärung nicht unkritisch auf die eukaryotischen MATs übertragen werden (Rudnick 2007).

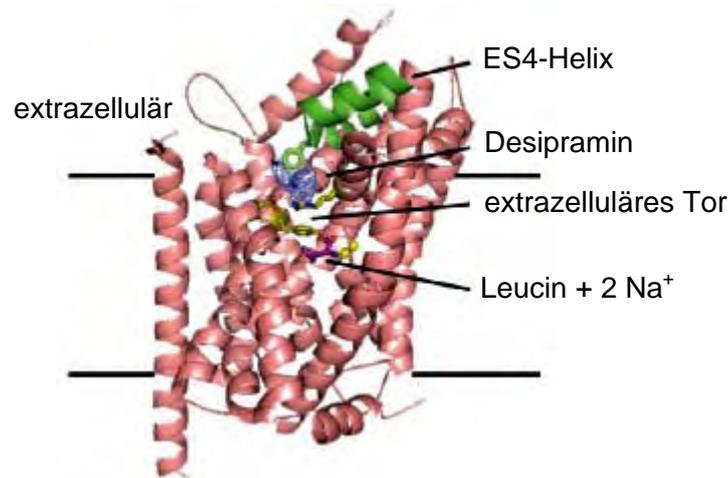


Abbildung 47: Struktur des LeuT-Desipramin-Komplexes nach Zhou et al. (2007)

Bändermodell des Transporterproteins; Blick aus der Membranebene; TM6 und TM11 sind der Übersicht wegen nicht mit abgebildet. Die helikale Schlaufe der ES4 ist in grün dargestellt. Das gebundene Desipramin versperrt gewissermaßen ein extrazelluläres Tor des Transporters und verhindert so den Substratdurchtritt.

Norregaard et al. (2003) konnten im Fall des DAT zeigen, dass die ES4 einschließlich der angrenzenden TMs (TM7 und TM8) sowohl durch Substrat als auch durch Kokain induzierten, konformativen Veränderungen unterliegt. Dennoch scheint die ES4 nicht direkt an der Substrattranslokation beteiligt zu sein (Mitchell et al. 2004), wodurch die unveränderte Affinität von H370/372A zum Substrat MPP^+ erklärt werden könnte.

Auf Grundlage der LeuT-Kristallstruktur und unter Berücksichtigung von Daten aus Mutagenesestudien konstruierten Paczkowski et al. (2007) kürzlich ein neues Strukturmodell des NAT. In diesem Modell ist die Mehrzahl der 12 TMs nicht perpendicular durch die Lipidbilayer angeordnet, sondern derart gewinkelt, dass unter Beteiligung von Elementen der ES2 und ES4 eine Pore mit einer weiten, mundartigen Struktur auf der extrazellulären Seite gebildet wird (Abbildung 48). Eine wassergefüllte Pore, die gewissermaßen den Substrattranslokationspfad darstellt, wird von TM1 und TM6 flankiert. So können Aminosäurereste, die den „Mund“ des Transporters auskleiden, wie His370 und His372, den Substrattransport und die Affinität zu Nisoxetin direkt beeinflussen (Paczkowski et al. 2007). His296 hingegen befindet sich nach dem Paczkowskischen Strukturmodell innerhalb der ES3 und damit außerhalb des „Mundes“ des

Von der LeuT-Kristallstruktur abgeleitete Strukturmodelle erlauben keine verlässliche Aussage über Form und Struktur der ES2 der MATs, da sie den Sequenzabschnitt mit der geringsten Homologie darstellt (Beuming et al. 2006). So enthält der LeuT in diesem Bereich insgesamt 22 Aminosäuren weniger als der hNAT. Trotz der äußerst geringen Sequenzhomologie innerhalb der ES2, ergab eine Sekundärstrukturanalyse, dass bei den humanen MATs innerhalb dieser Region ein Segment mit konservierter, α -helikaler Struktur existiert (Beuming et al. 2006). Am C-terminalen Ende dieser etwa 11 Aminosäuren langen Helix befindet sich das bei allen MATs hoch konservierte His222.

In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass dieses Histidin ohne Funktionseinbuße gegen Alanin ausgetauscht werden kann. Die resultierende Mutante H222A erwies sich jedoch im Vergleich zum hNAT-WT als deutlich unempfindlicher gegenüber NEM in Bezug auf die Hemmung der [^3H]Nisoxetin-Bindung. Dies äußerte sich in einer etwa 8fach höheren IC_{50} im Fall der Mutante. Alle übrigen getesteten His/Ala-Mutanten zeigten etwa die gleiche Empfindlichkeit gegenüber NEM wie der hNAT-WT. His222 scheint jedoch selber nicht an der Nisoxetin-Bindung beteiligt zu sein, denn nach Austausch gegen Alanin wurde keine statistisch signifikante Veränderung des K_D -Werts festgestellt.

Dieses Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass His222 für NEM zugänglich ist und dass seine Alkylierung durch NEM eine sterische Behinderung der Nisoxetin-Bindung darstellt.

Gemäß der zuvor beschriebenen Modellvorstellung sind Teile der ES2 an der Ausformung einer mundartigen Struktur des Transporters beteiligt, ohne dass über deren genaue Gestalt bis jetzt eine Aussage getroffen werden kann. Auf Grundlage dieses Modells lässt sich das vorliegende Ergebnis so interpretieren, dass der C-terminale Teil der beschriebenen ES2-Helix innerhalb des „Mundes“ des NAT lokalisiert ist. His222 befindet sich dabei in einer Position innerhalb der Wasser-gefüllten Pore (Abbildung 48), in der die kovalente Bindung von NEM den Zugang von Nisoxetin zu seiner eigentlichen Bindungsstelle erheblich erschwert. Die Bindung von Inhibitoren und Substraten bewirkt eine Konformationsänderung des NAT die His222 vor einer Interaktion mit NEM abschirmt, wie aus den Protektionsexperimenten der Bindungshemmung geschlossen werden kann (vgl. D.1.2).

Bemerkenswert ist ferner, dass das mit einer Aminosäure Abstand zu His222 gelegene His220 für eine vollständige Expression des hNAT in der Plasmamembran notwendig ist. Dies verdeutlicht die reduzierte B_{\max} der Mutante H220A. Auch dieses Histidin befindet sich innerhalb der beschriebenen ES2-Helix. Dem N-terminalen Teil der ES2 kommt offensichtlich eine gewisse Bedeutung für die Substratspezifität und -Translokation zu. Stephan et al. (1997) haben das schon im Fall des SERT zeigen können. Die erniedrigte Affinität zu MPP⁺ im Fall der Mutante H178A innerhalb des N-terminalen Teils der ES2 ließe sich mit dieser Annahme begründen.

1.5 Interaktion des noradrenergen Neurotoxins DSP4 mit Monoamintransportern

Die β -Haloalkylamine DSP4 und Xylamin gelten als selektive, noradrenerge Neurotoxine (Dudley et al. 1981; Waterman und Harding 2008). Als Ursache für ihre selektive Toxizität wurde ihre spezifische Aufnahme in noradrenerge Nervenendigungen durch den NAT erkannt (Ransom et al. 1985). Dementsprechend ist die Akkumulation von Xylamin und DSP4 Na⁺- und Cl⁻-abhängig und lässt sich durch Desipramin und Kokain hemmen (Fischer et al. 1983). Das eigentliche NAT-Substrat stellt dabei jeweils ein durch Zyklisierung in wässriger Lösung aus den Substanzen entstandenes Aziridiniumion dar (Ransom et al. 1982; Landa et al. 1987) (vgl. Einleitung, Abbildung 4). Verantwortlich für die Bildung dieses gegenüber Nukleophilen hochreaktiven Aziridiniumions ist eine intramolekulare SN₂-Reaktion des Chlorethylaminrests (Park et al. 2001). Kennzeichnend für DSP4 und Xylamin ist insbesondere die Tatsache, dass sie eine irreversible Inaktivierung des NAT verursachen (Howard et al. 1990). Diese Eigenschaft wird darauf zurückgeführt, dass das Aziridiniumion nach seiner Bindung oder während seiner Translokation die Alkylierung einer nukleophilen Gruppe innerhalb der Substrat/Ligand-Bindungstasche des Transporters bewirkt (Zieher und Jaim-Etcheverry 1980; Dudley et al. 1990). Bekräftigt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass die Substrate NA und Amphetamin sowie Kokain Protektoren vor der irreversiblen Inaktivierung des hNAT durch Xylamin darstellen (Cho et al. 1980).

In der vorliegenden Arbeit wurde jetzt gezeigt, dass neben NA und Kokain ebenfalls die NAT-Substrate Amezinium und MPP⁺ sowie der atypische Nicht-Substrat-Inhibitor Bupropion vor einer auswaschresistenten Hemmung der [³H]NA-

Aufnahme durch DSP4 schützen. Die Tatsache, dass all diese strukturell unterschiedlichen NAT-Liganden als Protektoren vor einer Inaktivierung des hNAT durch DSP4 fungieren, legt die Vermutung nahe, dass ihre Bindungsstellen zumindest teilweise mit denen von DSP4 übereinstimmen.

Dudley et al. (1981) beschreiben die NAT-Selektivität von Xylamin dadurch, dass für die Hemmung der Dopamin-Aufnahme in striatale Synaptosomen wesentlich höhere Konzentrationen des β -Haloalkylamins nötig sind als für die Hemmung der Noradrenalin-Aufnahme in Synaptosomen cortikalen Ursprungs. Im Rahmen der von uns durchgeführten Untersuchungen wurde nun erstmals unter identischen Bedingungen die IC_{50} der [3H]MPP⁺-Aufnahme von DSP4 an den drei neuronalen MATs hNAT, hDAT und hSERT sowie an den drei nicht-neuronalen Transportern hOCT₁, hOCT₂ und hOCT₃, nach deren stabiler Expression in einer humanen Zelllinie, ermittelt. Bezüglich der Affinität ergab sich für die neuronalen MATs die Reihenfolge: hNAT > hSERT > hDAT. Die nicht-neuronalen MATs besaßen etwa alle die gleiche Affinität zu DSP4, die etwa 2 - 6fach höher war als im Fall des hNAT.

Neu ist ebenfalls die Erkenntnis, dass die Inhibition des hSERT und des hDAT durch DSP4, wie die des hNAT, irreversibel ist. Die durch DSP4 alkylierte Aminosäure muss demnach im Fall der drei neuronalen MATs konserviert sein.

Dudley et al. (1990) berichten in ihrem Übersichtsartikel, ohne Angabe einer wissenschaftlichen Originalarbeit, dass es Hinweise dafür gibt, dass Xylamin ebenfalls eine kovalente Bindung zum *uptake-2-transporter* ausbildet. *Uptake-2-transporter* bzw. extraneuronaler Monoamintransporter (EMT) sind andere Bezeichnungen für den OCT₃ (Schömig et al. 2006). Ferner wurde von unserer Arbeitsgruppe beschrieben, dass der α -Adrenozeptor-Antagonist Phenoxybenzamin, der ebenfalls ein Haloalkylamin darstellt, eine irreversible Hemmung des OCT₂ und OCT₃ bewirkt (Hayer-Zillgen et al. 2002). Daher lag die Vermutung nahe, dass möglicherweise auch innerhalb der OCTs eine gegenüber dem Haloalkylamin DSP4 sensitive Gruppe existiert. Doch im Gegensatz zur irreversiblen Hemmung der neuronalen MATs, erwies sich die der OCTs als reversibel, da sich die DSP4-bedingte Inhibition der [3H]MPP⁺-Aufnahme durch intensives Waschen der Zellen wieder aufheben ließ.

Als wahrscheinlichster Reaktionspartner für das Aziridiniumion innerhalb des NAT-Proteins wurde bisher die Thiolgruppe eines Cysteins angesehen, dessen Alkylierung für die irreversible Inhibition des Transporters verantwortlich sein soll (Dudley et al. 1990). Es konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden, dass kein Cystein des hNAT an dessen Hemmung durch DSP4 beteiligt ist. Die Feststellung, dass sich keine hNAT-Cys/Ala-Mutante in Bezug auf die irreversible Inhibition durch DSP4 als resistent erwies, ließ diesen Schluss zu. In gleicher Weise konnten auch mit Hilfe der entsprechenden hNAT-Mutanten die insgesamt 13 Histidine des hNAT als Reaktionspartner des Aziridiniumions ausgeschlossen werden sowie die zwischen hNAT und hDAT nicht-konservierten Aspartate und Glutamate und, mit Ausnahme von Asp75, alle Aspartate und Glutamate der TM1, TM6 und TM8.

Vor allem nukleophile Aminosäurereste innerhalb des postulierten Translokationspfads kommen als Reaktionspartner für gebundenes bzw. transportiertes DSP4 in Frage. Nach dem bereits unter D.1.4 erläuterten hNAT-Strukturmodell von Paczkowski et al. (2007) wird der Translokationspfad von TM1 und TM6 unter Beteiligung von Elementen aus TM3 und TM8 flankiert. Daher wurden mit Ausnahme von Asp75 aus TM1 alle übrigen sauren Aminosäuren innerhalb der besagten TMs einzeln gegen die entsprechende Amid-Aminosäure ausgetauscht und auch diese Mutanten bezüglich einer irreversiblen Hemmung der [³H]MPP⁺-Aufnahme durch DSP4 getestet. Die TM3 enthält keine saure Aminosäure. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, ist Asp75 essentiell für die Funktion des hNAT (Bönisch et al. 1999), so dass funktionelle Experimente nach gerichteter Mutagenese dieser Aminosäure nicht zur Klärung der Bedeutung für die DSP4-Bindung herangezogen werden können. Die Versuchsserie belegte schließlich, dass keines der insgesamt sieben ausgetauschten Aspartate und Glutamate innerhalb von TM1, TM6 und TM8 für die kovalente Interaktion mit DSP4 verantwortlich ist.

Nach dem Ausschlussprinzip hat sich somit das bei NAT, DAT und SERT konservierte Asp75 als wahrscheinlichster Interaktionspartner für das DSP4-Aziridiniumion herauskristallisiert. Wie beim NAT ist die Carboxylatgruppe in dieser zentralen Position der TM1 auch beim DAT und SERT essentiell für die Funktion (siehe Einleitung). Kitayama et al. stellten schon 1992 die Hypothese auf,

dass das entsprechende Aspartat beim DAT für die koordinative Bindung des protoniertenamins der Substrate verantwortlich ist und aktuellste Molekulardesign-Studien bestätigen diese Anschauung (Indarte et al. 2008). Barker et al. (1999) demonstrierten später, dass dies ebenso für das homologe Aspartat des SERT gilt. Folglich ist die Vorstellung plausibel, dass das transportierte DSP4-Aziridiniumion im Moment seiner Wechselwirkung mit dem Aspartat der TM1 dessen Alkylierung bewirkt. Die essentielle Carboxylatgruppe wird dadurch irreversibel blockiert.

Bemerkenswerterweise ist das besagte Aspartat im Fall des LeuT nicht konserviert. In der entsprechenden Position befindet sich bei dem Aminosäuretransporter ein Glycin. Wie sich anhand der Kristallstruktur des LeuT zeigen ließ, ist dieses im Zentrum der Substrat-Bindungstasche lokalisiert (Yamashita et al. 2005). Die Variabilität dieser Aminosäure (Asp/Gly) innerhalb der TM1 könnte für die Differenzierung zwischen Monoamin- und Aminosäure-Substraten der entsprechenden Transporter mitverantwortlich sein (Torres et al. 2003b).

Mittels hNAT/hDAT-Chimären sollte die strukturelle Domäne des hNAT eingegrenzt werden, die für seine im Vergleich zum hDAT hohe Affinität zu DSP4 verantwortlich ist. Die verwendeten Chimären wurden von Giros et al. (1994) erzeugt und von ihnen bereits funktionell charakterisiert. Dabei konnte die Region, die TM6 – 8 (einschließlich ES3 + 4 und IS3) umfasst, als bedeutend für die spezifische Interaktion des NAT mit selektiven Inhibitoren, wie Desipramin, identifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit besaß DSP4 bezüglich der [³H]MPP⁺-Aufnahme die niedrigste IC₅₀ im Fall der Chimäre B. Diese Chimäre war die einzige, die innerhalb des oben genannten Bereiches die Sequenz des hNAT enthielt, somit ist die Annahme zulässig, dass diese Domäne ebenfalls affinitätsbestimmend für die Interaktion von DSP4 mit dem hNAT ist. Es sei daran erinnert, dass DSP4 eine höhere Affinität zum hSERT zeigte als zum hDAT. Tatsächlich weist der hNAT bei geringerer Gesamthomologie nur innerhalb des Bereiches von TM6 bis TM7 eine größere Sequenzhomologie zum hSERT auf als zum hDAT. Auch andere Arbeitsgruppen bestätigten bereits durch Studien mit NAT/DAT-Chimären, dass die Region um TM5 bis TM8 in die Substraterkennung und die spezifische Inhibitorbindung involviert ist (Buck und Amara 1994; 1995).

Alle übrigen getesteten Chimären zeigten eine im Vergleich zum hNAT etwa 1,5 – 2fach erniedrigte Affinität zu DSP4. Insgesamt betrachtet konnte somit bei keiner NAT/DAT-Chimäre eine drastische Affinitätsverringerung in Richtung des hDAT beobachtet werden. Dies ist anscheinend darauf zurückzuführen, dass an der räumlichen Ausbildung der DSP4-Bindungstasche mehrere Domänen des Transporters, die innerhalb der Primärstruktur weiter voneinander entfernt liegen, beteiligt sind. An dieser Stelle sei auf D.1.4 verwiesen, wo die vermutliche Beteiligung von ES2 und ES4 an der spezifischen Inhibitorbindung diskutiert wurde, sowie an das hNAT-Strukturmodell nach Paczkowski et al. (2007) bei dem der Substrattranslokationspfad von TM1 und TM6 eingefasst ist.

Die Expression des NAT als Voraussetzung für die selektive Toxizität von DSP4

Als Ursache für die selektive, noradrenerge Neurotoxizität des DSP4s wird seine spezifische Aufnahme durch den NAT und die anschließende Akkumulation in den betroffenen Neuronen angenommen (Marien und Cosi 1999). Die durchgeführten Zytotoxizitätstests belegten, dass HEK293-Zellen, die nach transienter Transfektion den hNAT exprimierten, bereits durch nanomolare Konzentrationen DSP4 geschädigt wurden. An nativen HEK293-Zellen hingegen zeigten erst mikromolare Konzentrationen toxische Effekte.

Der toxische Effekt, den DSP4 in nanomolaren Konzentrationen an hNAT-exprimierenden Zellen zeigte, schien abhängig zu sein von der Transporterzahl, da er weniger stark ausgeprägt war bei SK-N-SH SY5Y-Zellen, die den hNAT nativ aber nur in geringer Dichte exprimieren (Apparsundaram et al. 1998).

Interessanterweise konnte bei HEK293-Zellen, die nach stabiler Transfektion entweder hOCT₁, hOCT₂ oder hOCT₃ exprimierten, keine erhöhte DSP4-Empfindlichkeit, d.h. Zytotoxizität submikromolarer DSP4-Konzentrationen beobachtet werden. Zwei Ursachen sind für diese Situation denkbar:

1. DSP4 ist trotz hoher Affinität kein Substrat sondern ein Inhibitor der OCTs.
2. DSP4 ist ein OCT-Substrat, doch da diese Transporter lediglich das Membranpotential als Triebkraft für die Translokation nutzen, wird DSP4 durch die OCTs nicht in dem Ausmaß intrazellulär angereichert wie durch den Na⁺-Symporter NAT.

2. Insektenzellen als Expressionssystem für den hNAT

Bisher konnte noch von keiner erfolgreichen Aufreinigung eines voll funktionellen, neuronalen MAT im Milligramm-Maßstab, wie sie z.B. für eine Kristallographie notwendig wäre, berichtet werden. Durch ihre strukturellen Besonderheiten, die 12 TMs sowie eine für ihre Membranexpression essentielle Glykosylierung, zählen die Neurotransmittertransporter, unabhängig vom verwendeten Expressionssystem, zu den am schwächsten überexprimierten Membranproteinen überhaupt (Grisshammer und Tate 1995).

Das hocheffiziente und für die Expression heterologer Proteine am häufigsten eingesetzte Expressionssystem *Escherichia coli* (Uozumi 2001) birgt das Problem, dass die rekombinanten Proteine nicht posttranslational modifiziert werden. Glykosylierungen bleiben aus und Disulfidbrücken werden wegen der reduzierenden Bedingungen des Zytoplasmas nicht gebildet (Ritz und Beckwith 2001). Durch das Fehlen des eukaryotischen Faltungsapparates lagern sich besonders hydrophobe Fremdproteine als unlösliche *inclusion bodies* im Zytoplasma ab (Eifler et al. 2007). Aus diesem Grund schlugen in der Vergangenheit Versuche fehl den SERT in funktioneller Form in *Escherichia coli* zu exprimieren (Tate et al. 2003).

Hefezellen hingegen besitzen die Eigenschaft heterologe Proteine posttranslational zu modifizieren und liefern gleichzeitig bei einfacher Handhabbarkeit recht hohe Ausbeuten an rekombinantem Protein. So konnten *Pichia pastoris* und *Saccharomyces cerevisiae* bereits erfolgreich als Expressionssysteme für verschiedene, glykosylierte Transporterproteine mit 12 TMs, wie die *ATP-binding cassette* (ABC)-Transporter, genutzt werden (Chloupkova et al. 2007; Figler et al. 2000).

Auch zwei Vertreter von Säuger-Neurotransmittertransporter, nämlich der vesikuläre Monoamintransporter (VMAT) 1 der Ratte sowie der VMAT2 des Rinds, ließen sich aus Hefezellen mit hoher Ausbeute und korrekter Faltung gewinnen (Yelin und Schuldiner 2001). Doch erwiesen sich Hefezellen bisher als ungeeignet zur funktionellen Expression neuronaler MATs, wie am Beispiel des SERT von verschiedenen Gruppen gezeigt werden konnte (Tate et al. 2003).

Ein leistungsstarkes Expressionssystem, das komplexere Glykosylierungsmuster bewerkstelligt, basiert auf Ovarialzellen des Falters *Spodoptera frugiperda* (Sf9-Zellen) und deren Transfektion/Infektion mit rekombinanten Baculoviren. Durch Kultivierung der Insektenzellen in Fermentern ist mit diesem System

ebenfalls eine Massenproduktion des heterologen Proteins möglich. Verschiedene rekombinante Transporterproteine, wie z.B. der OCT₁ der Ratte, ließen sich bereits erfolgreich in einem für eine nachfolgende Aufreinigung ausreichenden Maßstab aus Sf9-Zellen gewinnen (Keller et al. 2005). Schließlich konnten auch für den humanen SERT und den der Ratte eine funktionelle Expression in Insektenzellen beschrieben werden (Rasmussen and Gether 2005; Tate und Blakely 1994). Aus diesem Grund wurde das System in der vorliegenden Arbeit auf seine Eignung zur Überexpression des hNAT getestet.

Nach der Infektion der Sf9-Zellen mit einem generierten, rekombinanten hNAT-Baculovirus, ließ sich jedoch keine zusätzliche [³H]MPP⁺-Aufnahme in die Zellen feststellen. Dieser Befund zeigte, dass der hNAT nicht funktionell in der Plasmamembran von Insektenzellen exprimiert wurde. Das Ergebnis der Western-Blot-Analyse verdeutlichte, dass es zwar zur Expression von rekombinatem hNAT-Protein in den infizierten Sf9-Zellen kam, jedoch keine Glykosylierung des reifenden Proteins stattfand. Dies geht aus der Tatsache hervor, dass nur eine etwa 50 kDa große Bande detektiert wurde, was dem apparenten Molekulargewicht des unglykosylierten Transporters entspricht (Brüss et al. 1995; Mao et al. 2005). Eine Bande der Größe von 70-80 kDa (Hahn et al. 2003) (vgl. auch C.1.2.2), die dem glykosylierten und in der Plasmamembran exprimierten hNAT entsprechen würde, blieb aus. Es ist bekannt, dass die Art der Glykosylierung eines Proteins in Sf9-Zellen nicht zwangsläufig mit der höherer Eukaryoten übereinstimmt (Kost et al. 2005). Die Bedeutung der N-Glykosylierung für die Expression des NAT in der Plasmamembran wurde bereits erörtert (siehe Seite 133).

Aus der oben zitierten Arbeit von Tate und Blakely (1994) geht hervor, dass eine N-Glykosylierung des SERT-Proteins in Sf9-Zellen durchaus stattfindet. Dies kann als ein Grund dafür angesehen werden, warum sich der SERT im Gegensatz zum NAT in funktioneller Form in Insektenzellen exprimieren lässt, die Transporterdichte ist jedoch gering.

Angemerkt sei, dass sich die Glykosylierungsmuster von SERT und NAT unterscheiden. Während der NAT insgesamt drei N-Glykosylierungsstellen auf der großen ES2 aufweist, sind es beim SERT nur zwei (Blakely et al. 1994). Zudem ist die N-Glykosylierung beim SERT, anderes als beim NAT, keine absolut

notwendige Voraussetzung für dessen funktionelle Expression in der Plasmamembran, wie Tate und Blakely (1994) ferner demonstrierten.

Eine weitere mögliche Erklärung liefert Anderson (2004), der zeigen konnte, dass sich auch der vesikuläre Glutamattransporter 1 nicht in funktioneller Form in Insektenzellen (*Sf9* und *High Five*) exprimieren ließ. Er stellte daraufhin die Hypothese auf, dass Insektenzellen per se nicht das optimale Expressionssystem für Membranproteine mit multiplen TMs darstellen. Ihr relativ geringer Anteil an endoplasmatischem Retikulum und Golgi Apparat in Kombination mit einer Baculovirus-initiierten Überexpression bewirke, dass die intrazellulären Membranen rasch mit den zahlreichen TMs der rekombinanten Transporterproteine überladen werden. Daraus resultiere dann eine fehlerhafte Faltung bis hin zur Aggregation der Transporterproteine.

Dass die Proteinfaltung tatsächlich einen limitierenden Faktor bei der Expression von heterologen MATs in *Sf9*-Zellen darstellt, bestätigten auch Lenhard und Reiländer (1997). Sie demonstrierten, dass die äußerst schwache Expression von heterologem hDAT in *Sf9*-Zellen um den Faktor 5 gesteigert werden konnte, wenn eine *Sf9*-Zelllinie verwendet wurde, die nach stabiler Transfektion das Chaperon *ninaA* überexprimiert. Bei *ninaA* handelt es sich um eine Peptidyl-Prolyl-cis/trans Isomerase. Diese Enzyme katalysieren die cis/trans-Umwandlung von Prolin-Imid-Peptidbindungen und erfüllen somit eine essentielle Rolle bei der Proteinfaltung (Gothel und Marahiel 1999).

Sf9-Zellen eignen sich demnach nicht zur Überexpression von funktionellem hNAT-Protein. Zukünftige Modifikationen des Baculovirusgenoms und die Generierung spezieller Insektenzelllinien könnten jedoch möglicherweise eine vollständige Glykosylierung und erfolgreiche Überexpression weiterer heterologer Neurotransmittertransporter in diesem System ermöglichen.

3. Strategien zur elektrophoretischen Auftrennung des hNAT

3.1 Anwendung der klassischen 2D-Gelelektrophorese

Da kein geeignetes Hochleistungsexpressionssystem zur Gewinnung größerer Mengen funktionellen hNAT-Proteins existiert, muss für dessen Strukturaufklärung auf Methoden zurückgegriffen werden, die, ausgehend von geringen Proteinmengen, anwendbar sind. Eine Möglichkeit zur Strukturuntersuchung von Proteinen bieten massenspektrometrische Methoden, wie z. B. MALDI-TOF-MS. Diese benötigen lediglich Proteinmengen im fmol-amol Bereich, erfordern jedoch Präparate hoher Reinheit (Flensburg et al. 2004). Die genaue Position der kovalenten Interaktion von DSP4 innerhalb des hNAT könnte z. B. durch massenspektrometrische Analyse der tryptischen Peptide des DSP4-markierten Transporters identifiziert werden. Auf diese Weise ließe sich eine funktionell bedeutende Aminosäure innerhalb der Substratbindungstasche des hNAT identifizieren.

Die klassische 2D-Gelelektrophorese (IEF/SDS-PAGE) ist, wie einleitend erwähnt, die Methode mit dem höchsten Auflösungsvermögen für komplexe Proteingemische (Herbert 1999; Zahedi et al. 2005). Sie wurde daher in dieser Arbeit bezüglich ihrer Eignung zur Auftrennung des hNAT-Proteins getestet.

Die zur Anfertigung des in Abbildung 42 dargestellten 2D-Gels eingesetzten 80 µg Gesamtprotein einer HEK293-hNAT-Zellmembranpräparation enthielten etwa 43 ng (~600 fmol) hNAT. Das ergibt sich aus dem Molekulargewicht des hNAT von 70 kDa (vgl. C.1.2.2) und der ermittelten Anzahl maximaler [³H]Nisoxetin-Bindungsstellen von $B_{\max} = 7,7$ pmol/mg Protein (vgl. C.1.1.4). Der Rechnung zugrunde gelegt ist ein stöchiometrisches Verhältnis der Nisoxetin-hNAT-Wechselwirkung von 1:1, welches aus einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ resultiert (Jayanthi et al. 1993).

Ein definierter Spot der Proteinmenge von 43 ng wäre durch Silberfärbung im Acrylamidgel leicht detektierbar, da bei dieser Methode die Nachweisgrenze im unteren ng-Bereich liegt (Nishihara und Champion 2002). Ebenfalls wäre die Quantität für eine Identifikation per Western-Blot-Analyse oder Massenspektrometrie ausreichend. Dass der hNAT dennoch nicht im 2D-Gel nachgewiesen werden konnte, ist in seiner Hydrophobizität begründet und der daraus resultierenden schlechten Löslichkeit während der IEF. Durch die

insgesamt 12 TMs, welche überwiegend aus hydrophoben Aminosäuren bestehen, besitzt das Protein eine außerordentlich schlechte Hydratisierbarkeit. Zu seiner vollständigen Extraktion aus der Lipidmembran werden daher starke Detergentien benötigt. Die IEF ist jedoch ausschließlich mit nicht-ionischen, bzw. zwitterionischen Detergentien, wie dem hier verwendeten CHAPS, kompatibel. Allerdings besitzen diese generell eine wesentlich geringere Solubilisationskraft für Membranproteine als geladene Detergentien, vor allem bei niedriger Ionenstärke des umgebenden Milieus (Wilkins et al. 1998; Luche et al. 2003; Bunai und Yamane 2005). So waren die drei per MALDI-TOF-MS identifizierten Proteine (Hitzeschock Protein 70 kDa, Elongationsfaktor 1-alfa 1, Porin-Isoform 1) des 2D-Gels, die während der Western-Blot-Analyse mit dem NAT-Antikörper kreuzreagiert hatten, alle zytoplasmatischen Ursprungs. Offensichtlich ließen sich diese während der vorausgegangenen Membranpräparation nicht vollständig abreichern.

Es ist ferner sehr wahrscheinlich, dass das hNAT-Protein während der IEF im Gelstreifen präzipitiert, nämlich sobald es sich seinem isoelektrischen Punkt und damit dem Moment der schlechtesten Löslichkeit nähert. Dieser Effekt wird regelmäßig bei hydrophoben Proteinen beobachtet (Coughenour et al. 2004) und resultiert in diffusen und unscharfen Spots, bzw. horizontalen „Schmiereffekten“ im SDS-Gel, welches für die zweite Dimension verwendet wird. Doch hauptsächlich wird durch das Ausfallen der Proteine ihre Transfereffizienz vom IEF-Gelstreifen in das SDS-Gel dramatisch reduziert (McDonough und Marban 2005).

Es kann festgehalten werden, dass die klassische 2D-Gelelektrophorese (IEF/SDS-PAGE), keine geeignete Methode zur Auftrennung des hNAT-Proteins darstellt.

3.2 Entwicklung einer neuen Elektrophoreseapparatur zur Auftrennung von Membranproteinen

Zur Auftrennung des hNAT-Proteins musste demnach eine Alternative zur 2D-IEF/SDS-PAGE gefunden werden. Wie einleitend beschrieben ist die von Macfarelane (1986) entwickelte 2D 16-BAC/SDS-PAGE eine geeignete Methode zur 2D-gelelektrophoretischen Auftrennung hydrophober Membranproteine. Da das Originalprotokoll u. a. relativ zeitaufwändig und umständlich in der

Handhabung ist, wurde zunächst eine Weiterentwicklung des Verfahrens durchgeführt, die die Nachteile der klassischen 16-BAC-PAGE überwindet.

Zur Evaluierung und zum Reproduzierbarkeitsnachweis der neu vorgestellten Methode wurden Proteine einer HEK293-Zellmembranpräparation aufgetrennt und per MALDI-TOF-MS analysiert. Es ist wichtig anzumerken, dass keines der 12 dabei identifizierten Transmembranproteine bisher in der Proteomkarte der menschlichen Niere (Sarto et al. 1997) innerhalb der *SWISS 2D-PAGE* Datenbank aufgeführt ist. Diese Datenbank ist Teil des *EXPASY Proteomics Servers* und im weltweiten Netz frei zugänglich (<http://expasy.org/>). Die Effizienz der 2D 16-BAC/SDS-PAGE bei der Analyse von Transmembranproteinen wird vor allem durch die Tatsache verdeutlicht, dass in der besagten, humanen Nieren-Proteomkarte, welche durch 2D IEF/SDS-PAGE erstellt wurde, nur ein einziges Transmembranprotein (Glutathion S-Transferase P) enthalten ist.

Besonders während der letzten vier Jahre hat daher die „klassische“ 2D 16-BAC/SDS-PAGE, vor allem in Kombination mit der massenspektrometrischen Identifikation der aufgetrennten Proteine, zunehmend an Bedeutung gewonnen. Verschiedene Arbeitsgruppen haben diese Technik bereits erfolgreich zur Analyse diverser Proteome eingesetzt. Der Anteil an Transmembranproteinen unter allen identifizierten Proteinen innerhalb der Studien, die mit Material eukaryotischen Ursprungs durchgeführt wurden, reichte in Abhängigkeit des analysierten Gewebes und der Art der Probenpräparation von 9 – 28 %. Einen Überblick über die Ergebnisse dieser Arbeiten liefert Tabelle 12. Unter Verwendung der in dieser Arbeit neu entwickelten Elektrophoreseapparatur in Kombination mit Gelstreifen, anstelle des herkömmlichen Protokolls nach Macfarlane (1986), betrug der Anteil an Transmembranproteinen unter allen identifizierten Proteinen einer HEK293-Zellmembranpräparation 40 %. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die hier vorgestellte Technik zur Trennung von Transmembranproteinen offenbar eine höhere Effizienz zeigt als die herkömmliche 2D 16BAC/SDS-PAGE.

Biologisches Material	Anteil identifizierter Membranproteine	Quelle
Gehirn (<i>mus musculus</i>)	11 % (12/106)	(Bierczynska-Krzysik et al. 2006)
Synaptische Vesikel (<i>rattus norvegicus</i>)	24 % (14/59)	(Burré et al. 2006)
Synaptische Vesikel (<i>rattus norvegicus</i>)	23 % (7/31)	(Coughenour et al. 2004)
Gehirn (<i>rattus norvegicus</i>)	15 % (3/20)	(Guillemin et al. 2005)
Mitochondrien aus Myocard (<i>bos taurus</i>)	20 % (6/30)	(Hunzinger et al. 2006)
Thrombozytenmembran (<i>homo sapiens</i>)	28 % (65/233)	(Moebius et al. 2005)
Synaptische Vesikel (<i>rattus norvegicus</i>)	9 % (7/81); 25 % (18/72)	(Morciano et al. 2005)
Gehirn (<i>rattus norvegicus</i>)	14 % (7/50); 27 % (12/45); 12 % (4/33)	(Schindler et al. 2006)

Tabelle 12: Effizienz der konventionellen 16-BAC/SDS-PAGE bei der Analyse integraler Membranproteine

Aufgelistet sind die Anteile an identifizierten Membranproteinen unter allen identifizierten Proteinen aus Untersuchungen eukaryotischer Proteome, durchgeführt von verschiedenen Arbeitsgruppen seit 2004. Die Identifizierung der Proteine erfolgte jeweils massenspektrometrisch. Mittlere Spalte: x % (Anzahl identifizierter Membranproteine vs. Anzahl aller identifizierten Proteine)

Die Tatsache, dass nur 30 der insgesamt 53 sichtbaren Protein-Spots des Gels aus Abbildung 44 identifiziert werden konnten, mag dadurch begründet sein, dass die meisten nicht-identifizierbaren Proteine besonders hydrophob waren, wie es z. B. Transmembranproteine sind. Da sich diese bekanntermaßen oft einer Analyse durch *peptide mass fingerprinting* entziehen (Bensalem et al. 2007), ist es als wahrscheinlich anzusehen, dass noch einige der nicht identifizierten Protein-Spots Transmembranproteine darstellten.

Schließlich konnte mit dieser Methode nun erstmals auch das hoch hydrophobe hNAT-Protein zweidimensional aufgetrennt werden, wie sich per Western-Blot-Analyse nachweisen ließ (siehe Abbildung 45).

Ferner bietet die neue Technik zahlreiche methodische Überlegenheiten gegenüber dem klassischen 2D 16-BAC/SDS-System. Diese seien im Folgenden ausführlich geschildert.

Ein entscheidender Vorteil ist, dass die zur Polymerisation acider 16-BAC-Gele notwendige Fenton-Reaktion vermieden wird (Macfarlane 1989). Die allgemein zur radikalisch katalysierten Quervernetzung und Copolymerisation von Acrylamid und *N-N'*-Methylenbisacrylamid verwendete Kombination aus TEMED und Ammoniumpersulfat (APS) versagt unter aciden Bedingungen. Im APS/TEMED-System katalysiert TEMED die Bildung eines freien Radikals aus dem Persulfat, welches seinerseits wiederum die Polymerisationsreaktion initiiert. Da hierbei das TEMED in deprotonierter Form vorliegen muss, wird eine Polymerisation bei niedrigem pH-Wert verhindert (Caglio und Righetti 1993). Ein katalytisches System, das auch unter aciden Bedingungen einsetzbar ist und daher konventionell zur Polymerisation von 16-BAC-Gelen verwendet wird, besteht aus Eisen(II)sulfat, Wasserstoffperoxid und Ascorbinsäure. Jedoch können die hoch reaktiven Hydroxylradikale, die bei der Eisen(II)-induzierten Dekomposition des Wasserstoffperoxids entstehen (Fenton-Reaktion), einen korrosiven Abbau von Proteinen bewirken (Kocha et al. 1997). Der Zusatz eines Reduktionsmittels, wie Ascorbinsäure, führt dabei zu einem Zyklus, der die Zerstörung des biologischen Materials forciert (Carr und Frei 1999). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass ein im Gel verbleibender, aktiver Anteil dieses katalytischen Systems eine Destruktion von Proteinen während ihres elektrophoretischen Laufes bewirkt. Als Konsequenz daraus wäre der Anteil massenspektrometrisch analysierbarer Proteine reduziert.

Die Anwendung dieses korrosiven katalytischen Systems wird bei dem neu entwickelten Verfahren umgangen, da die Polymerisation des Acrylamidgels für die Gelstreifen bei neutralem pH unter Verwendung des APS/TEMED-Systems erfolgt. Der acide Methoxyessigsäure/KOH-Puffer sowie das Detergenz 16-BAC werden erst anschließend, während des Vorgangs der Rehydratation in die vorgefertigten Gelstreifen eingebracht.

Auch der als Chaotrop eingesetzte Harnstoff diffundiert während der Rehydratation in die Gelmatrix und ist nicht schon bei der Polymerisation des Acrylamids anwesend. Auf diese Weise wird die Bildung harnstoffhaltiger Mizellen im Gel verhindert und die Carbamylierung von Proteinen durch Isocyanat muss nicht befürchtet werden (McCarthy et al. 2003).

Im Fall eines klassischen 16-BAC-Gels, das als erste Dimension eines 2D 16-BAC/SDS-Gels dienen soll, müssen die entsprechenden Bereiche, die

getrenntes Protein enthalten, zunächst ausfindig gemacht und anschließend in Form von schmalen Bahnen aus dem 16-BAC-Gel ausgeschnitten werden. Dies macht das vorausgehende Fixieren und Anfärben der Proteine (typischerweise mit Coomassie) erforderlich. Schließlich müssen die geschnittenen Gelbahnen vor dem Äquilibrieren mit dem SDS-haltigen Puffer für die zweite Dimension wieder entfärbt werden. Diese Notwendigkeit des Fixierens, Färbens, Entfärbens und Schneidens von Gelbahnen ist sehr zeitaufwändig und mit dem Verlust von Protein verbunden. Gerade der letztere Punkt muss beim Arbeiten mit schwach exprimierten Proteinen als besonders kritisch angesehen werden. Der Einsatz von auf Plastikfolie gebundener Gelstreifen macht all diese Schritte überflüssig.

Schließlich müssen die entfärbten und äquilibrierten Bahnen des 16-BAC-Gels auf die Oberkante eines SDS-Gels für die zweite Dimension aufgebracht werden. Durch die adhäsive und elastisch weiche Konsistenz der Gelbahnen, ist dieser Transfer relativ diffizil. Auf Plastikfolie gebundene Gelstreifen hingegen sind resistent gegen Tordieren und können mit Hilfe einer Pinzette bequem gehandhabt werden. Ein weiterer Vorteil liegt in der Tatsache, dass die Gelstreifen bei -20°C gelagert werden können, falls der Lauf für die zweite Dimension nicht unmittelbar erfolgt.

Eine spezielle Apparatur wurde für diese Methodik benötigt, da die existierenden Elektrophoresegeräte (z. B. PROTEAN IEF CELL, BIO-RAD; Ettan IPGphor, GE), die eine Applikation von Gelstreifen ermöglichen, ausschließlich für die IEF konzipiert sind. Optimiert für die niedrige Ionenstärke während der IEF liefern diese eine hohe Spannung (0 - 10 000 V), aber nur niedrigen Strom (0 - 3 mA). Für eine Elektrophorese mit 16-BAC-haltigen Gelstreifen und unter aciden Pufferbedingungen wird jedoch eine hohe Amperezahl benötigt.

Die oben genannten konventionellen Elektrophoreseapparate für Gelstreifen realisieren den Elektrodenkontakt zum Gel über angefeuchtete „Papierbrücken“. Diese würden unter der Wärmeentwicklung während der 16-BAC-PAGE rasch austrocknen. Im vorgestellten System gewährleisten puffergefüllte Elektrodenblöcke mit einem Fassungsvermögen von je 15 ml eine hohe Pufferkapazität, ähnlich den Elektrodenkammern einer herkömmlichen PAGE-Vorrichtung. Ein Austrocknen der Kontaktstellen zwischen Gelstreifen und

Elektrode ist unmöglich, da die Gelstopfen in den Trichtern der Elektrodenblöcke permanent mit Puffer gesättigt sind.

Schließlich besitzt die Probenapplikation über die verwendeten Gelstopfen gegenüber dem *cup loading* der oben zitierten Geräte den Vorteil einer sauberen Probenapplikation, da nicht solubilisiertes, bzw. präzipitiertes Protein durch die Stopfen von den Gelstreifen zurückgehalten wird.

All diese Punkte verdeutlichen, dass das im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Elektrophoresesystem ein geeignetes und verbessertes Verfahren zur 2D-Auftrennung von Membranproteinen darstellt, mit dessen Hilfe es möglich war, das hoch hydrophobe hNAT-Protein über ein 2D-Acrylamidgel aufzutrennen.

E. Zusammenfassung

Der Na⁺- und Cl⁻-abhängige und durch 12 Transmembrandomänen (TMs) gekennzeichnete Noradrenalintransporter (NAT) in der Plasmamembran noradrenerger Neurone ist für die rasche Wiederaufnahme des während der Neurotransmission in den synaptischen Spalt freigesetzten Noradrenalins (NA) verantwortlich. Viele klinisch bedeutsame Antidepressiva wie z.B. Desipramin sind Inhibitoren des NAT. Ebenso ist der NAT ein Angriffspunkt der Psychostimulantien Kokain und Amphetamin. Eine genaue Kenntnis der Struktur der Ligandbindungsstelle(n) des Transporters liegt bis zum heutigen Tag nicht vor. Für das genaue Verständnis seiner Funktionsweise sowie für die Entwicklung von potenten und nebenwirkungsärmeren Antidepressiva, die möglichst selektiv mit dem NAT interagieren, ist die exakte Kenntnis seiner Bindungsstelle(n) unerlässlich. Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es Informationen über diese zu gewinnen. Hierzu wurden kovalent mit dem NAT interagierende Substanzen eingesetzt.

Vorausgegangene Studien mit dem NAT-inhibierenden, Thiolgruppen-spezifischen Reagenz *N*-Ethylmaleimide (NEM) lieferten Hinweise, dass den Cysteinen des NAT eventuell eine funktionelle Bedeutung zukommt. Daher wurden die zehn Cysteine des humanen NAT (hNAT) zunächst einzeln durch gerichtete Mutagenese gegen Alanin ausgetauscht und die Mutanten funktionell charakterisiert. Im Fall der beiden inaktiven Cys/Ala-Mutanten C176A und C185A konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie und Oberflächenbiotinylierung ein Ausbleiben der Plasmamembranexpression nachgewiesen werden. Die beiden Cysteine innerhalb der zweiten extrazellulären Schleife (ES2) bilden höchstwahrscheinlich eine essentielle Disulfidbrücke. Der gemeinsame Austausch der übrigen acht reduzierten Cysteine gegen Alanin oder Serin hatte ebenfalls den Verlust der Plasmamembranexpression zur Folge.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der NA-Aufnahme in transfizierte HEK293-Zellen durch mikromolare Konzentrationen NEM auf einer rasch eintretenden ATP-Depletion beruht. Auch andere Zelllinien zeigten diesen Effekt. Hingegen war die weniger NEM-empfindliche Nisoxetin-Bindung durch NAT-Substrate und -Inhibitoren vor einer irreversiblen Hemmung protektierbar, was auf eine kovalente Interaktion von NEM innerhalb der Ligandbindungstasche

des NAT hindeutete. Doch mittels der Cys/Ala-Mutanten konnte die Alkylierung eines Cysteins als Ursache der Hemmung ausgeschlossen werden. Stattdessen wurde Histidin 222 innerhalb der ES2 als ein Interaktionspartner von NEM identifiziert, da NEM bei der Mutante H222A eine stark erniedrigte Potenz als Hemmer der Nisoxetin-Bindung zeigte.

Insgesamt wurden alle 13 Histidine des hNAT einzeln gegen Alanin mutiert und die Mutanten funktionell charakterisiert. So ließ sich zeigen, dass His296 und die Histidine in den Positionen 370 und 372 für die Nisoxetin-Bindung von Bedeutung sind, während für eine vollständige Membranexpression Histidin in den Positionen 220, 441, 598 und 599 erhalten sein muss.

Zu einer direkten Markierung und Analyse der Ligandbindungsstelle des NAT eignen sich die β -Haloalkylamine DSP4 und Xylamin. Diese selektiven noradrenergen Neurotoxine sind Substrate des NAT. Sie zyklisieren zu einem Aziridiniumion, das durch die Alkylierung einer nukleophilen Aminosäure innerhalb der Ligandbindungsstelle eine irreversible Inhibition des Transporters bewirkt, wie Auswasch- und Protektionsexperimente belegten.

Es konnte gezeigt werden, dass DSP4 neben dem NAT auch eine irreversible Inhibition des neuronalen Dopamintransporters (DAT) und des neuronalen Serotonintransporters (SERT) bewirkt. Die alkylierte Aminosäure ist also bei den neuronalen Monoamintransportern (MATs) konserviert. Die Inhibition der extraneuronalen MATs, d.h. der Organischen Kationentransporter (OCT₁, OCT₂, OCT₃) war hingegen reversibel. Es ergab sich folgende Reihenfolge der Affinität: OCT₁ \approx OCT₃ > OCT₂ > NAT > DAT > SERT. Nur NAT-exprimierende Zellen zeigten eine hohe Sensitivität gegen die zytotoxischen Effekte von DSP4.

Als potentielle Interaktionspartner des DSP4-Aziridiniumions kamen in erster Linie die nukleophilen Aminosäuren Cystein und Histidin in Betracht. Anhand der Cys/Ala- und His/Ala-Mutanten (s.o.) konnte jedoch demonstriert werden, dass DSP4 mit diesen Aminosäuren des hNAT nicht interagiert. Es wurden daher zusätzlich alle sauren Aminosäuren des hNAT, die potentielle Bindungspartner von DSP4 darstellten, ausgetauscht und die Varianten bezüglich einer irreversiblen Hemmung getestet. Auf diese Weise ließ sich die durch DSP4 alkylierte Aminosäure auf das funktionell essentielle Aspartat 75 innerhalb der ersten Transmembrandomäne eingrenzen, welches selbst nicht ohne

Funktionsverlust des Transporters ausgetauscht werden konnte. Nach aktuellen Modellvorstellungen ist dieses Aspartat für die koordinative Bindung des protonierten Amins der Substrate innerhalb der Ligandbindungsstelle der neuronalen MATs verantwortlich. Als affinitätsbestimmend für DSP4 konnte mittels NAT/DAT-Chimären der Bereich von TM6 - TM8 ermittelt werden.

Theoretisch besteht die Möglichkeit die Stelle der kovalenten Interaktion von DSP4 innerhalb eines definierten Segments des NAT durch massenspektrometrische Analyse der Peptide des Trypsin-Verdau des DSP4-markierten Transporters zu detektieren. Die Voraussetzung dafür ist eine Probe hoher Reinheit.

Bei der Suche nach einem hocheffizienten Expressionssystem, das sich eignet größere Mengen funktionellen hNAT-Proteins für eine nachfolgende Aufreinigung zu erzeugen, konnte gezeigt werden, dass Sf9-Insektenzellen nach deren Infektion mit einem rekombinanten hNAT-Baculovirus den hNAT nicht funktionell exprimieren. Die Ursache der ausbleibenden Membranexpression ist vermutlich das Resultat einer insuffizienten Glykosylierung des hNAT in Sf9-Zellen.

Schließlich konnte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Michael Ahrend (Institut für Tierwissenschaften der Universität Bonn) ein neuartiges 16-BAC/SDS-Elektrophoreseverfahren etabliert werden, das erstmals eine 2D-gelelektrophoretische Auftrennung von Membranproteinen mittels kationisch rehydratisierter Gelstreifen ermöglicht. Die neue Methode erwies sich als hoch reproduzierbar sowie leichter handhabbar und effizienter als herkömmliche Techniken, wie anhand einer Membranproteom-Analyse von HEK293-Zellen demonstriert werden konnte. Mit Hilfe dieses Verfahren war es möglich das hNAT-Protein über ein 2D-Acrylamidgel aus Plasmamembranen transfizierter HEK293-Zellen aufzutrennen. Dieses Verfahren, gekoppelt mit dem tryptischen Verdau des hNAT-Proteins und MALDI-TOF/MS könnte es eventuell ermöglichen, die kovalent mit DSP4 markierte Aminosäure der Ligandbindungsstelle des hNAT nachzuweisen.

F. Anhang

1. Mutagenese-Primer

Im Folgenden sind die Sequenzen aller verwendeten Mutagenese-Primer angegeben. Das mutierte Codon ist jeweils unterstrichen.

Cystein gegen Alanin (Cys/Ala-Mutanten)

Mutante	Orientierung	Primersequenz
C44A	sense	5'-GAGCGCAACGGCGTCCAGGCCCTGCTGGCGC-3'
	antisense	3'-GCGCCAGCAGGGCCTGGACGCCGTTGCGCTC-5'
C86A	sense	5'-GCGCTTCCCCTACCTCGCATACAAGAACGGCGGGCGGTGC-3'
	antisense	3'-GCACCGCCGCCGTTCTTGTATGCGAGGTAGGGGAAGCGC-5'
C131A	sense	5'-CACCGTTTGGAAAATCGCCCATTTCTCAAAGGCG-3'
	antisense	3'-CGCCTTTGAAGAATGGGGCGATTTTCAAACGGTG-5'
C176A	sense	5'-GCCCTGGACCGACGCTGGCCACACCTGGAAC-3'
	antisense	3'-GTTCCAGGTGTGGCCAGCGTCGGTCCAGGGC-5'
C185A	sense	5'-GAACAGCCCCAACGCTACCGACCCCCAAGCTC-3'
	antisense	3'-GAGCTTGGGGTCGGTAGCGTTGGGGCTGTTC-5'
C240A	sense	5'-GGCAGCTCTTGCTCGCTCTGATGGTCGTCGTCATCG-3'
	antisense	3'-CGATGACGACGACCATCAGAGCGAGCAAGAGCTGCC-5'
C339A	sense	5'-GACAACAACGCTTACAGGGATGCCCTGCTGACCAGC-3'
	antisense	3'-GCTGGTCAGCAGGGCATCCCTGTAAGCGTTGTTGTC-5'
C351A	sense	5'-GCTGACCAGCAGCATCAACGCTATCACCAGCTTCGTCTC-3'
	antisense	3'-GAGACGAAGCTGGTGATAGCGTTGATGCTGCTGGTCAGC-5'
C460A	sense	5'-CCTTCTCGCCCTGTTCCGAATAACCAAGGGTGG-3'
	antisense	3'-CCACCCTTGGTTATTGCGAACAGGGCGAGAAGG-5'
C520A	sense	5'-GGGTCTATACTGGAGACTGGCATGGAAGTTCGTCAGTCC-3'
	antisense	3'-GGACTGACGAACTCCATGCCAGTCTCCAGTATAGACCC-3'

Cystein gegen Serin (Cys/Ser-Mutanten)

Mutante	Orientierung	Primersequenz
C44A	sense	5'-GAGCGCAACGGCGTCCAGAGCCTGCTGGCGC-3'
	antisense	3'-GCGCCAGCAGGCTCTGGACGCCGTTGCGCTC-5'
C86A	sense	5'-GCGCTTCCCCTACCTCAGCTACAAGAACGGCGGGCGGTGC-3'
	antisense	3'-GCACCGCCGCCGTTCTTGTAGCTGAGGTAGGGGAAGCGC-5'
C131A	sense	5'-CACCGTTTGGAAAATCAGCCCATTTCTCAAAGGCG-3'
	antisense	3'-CGCCTTTGAAGAATGGGCTGATTTTCAAACGGTG-5'
C240A	sense	5'-GGCAGCTCTTGCTCTCTCTGATGGTCGTCGTCATCG-3'
	antisense	3'-CGATGACGACGACCATCAGAGAGAGCAAGAGCTGCC-5'
C339A	sense	5'-GACAACAACCTCTTACAGGGATGCCCTGCTGACCAGC-3'
	antisense	3'-GCTGGTCAGCAGGGCATCCCTGTAAGAGTTGTTGTC-5'
C351A	sense	5'-GCTGACCAGCAGCATCAACTCTATCACCAGCTTCGTCTC-3'
	antisense	3'-GAGACGAAGCTGGTGATAGAGTTGATGCTGCTGGTCAGC-5'
C460A	sense	5'-CCTTCTCGCCCTGTTCCAGCATAACCAAGGGTGG-3'
	antisense	3'-CCACCCTTGGTTATGCTGAACAGGGCGAGAAGG-5'
C520A	sense	5'-GGGTCTATACTGGAGACTGAGCTGGAAGTTCGTCAGTCC-3'
	antisense	3'-GGACTGACGAACTCCAGCTCAGTCTCCAGTATAGACCC-5'

Histidin gegen Alanin (His/Ala-Mutanten)

Mutante	Orientierung	Primersequenz
H178A	sense	5'-GACCGACTGTGGCGCCACCTGGAACAGCCCCAAC-3'
	antisense	3'-GTTGGGGCTGTTCCAGGTGGCGCCACAGTCGGTC-5'
H199A	sense	5'-CTCCGTGCTTGGCAACGCCACCAAGTACTCCAAGTACAAG-3'
	antisense	3'-CTTGTACTTGGAGTACTTGGTGGCGTTGCCAAGCACGGAG-5'
H220A	sense	5'-GAGCGTGGTGTCTTGGCCCTTCACGAGAGCAGCGGGATTTC-3'
	antisense	3'-GAATCCCGCTGCTCTCGTGAAGGGCCAGGACACCACGCTC-5'
H222A	sense	5'-GAGCGTGGTGTCTTGCACCTTGGCGAGAGCAGCGGGATTTC-3'
	antisense	3'-GAATCCCGCTGCTCTCGGCAAGGTGCAGGACACCACGCTC-5'
H228A	sense	5'-GCAGCGGGATTGCTGACATCGGCCTGCCCCAGTG-3'
	antisense	3'-CACTGGGGCAGGCCGATGTGAGCAATCCCGCTGC-5'
H280A	sense	5'-GTTCTGTCTCTGGTCCGCTGGCGTACGCTGCC-3'
	antisense	3'-GGCAGCGTGACGCCAGCGACCAGGAGCACGAAC-5'
H296A	sense	5'-CATCAATGCCTACCTGGCCATCGACTTCTACCGCTTG-3'
	antisense	3'-CAAGCGGTAGAAGTCGATGGCCAGGTAGGCATTGATG-5'
H370-372A	sense	5'-CCTTGGTTACATGGCCGCTGAAGCCAAGGTCAACATTGAGG-3'
	antisense	3'-CCTCAATGTTGACCTTGGCTTACGCGGCCATGTAACCAAGG-5'
H441A	sense	5'-CCAGGTCCTGAAGCGAGCCCGGAAACTCTTAC-3'
	antisense	3'-GTGAAGAGTTTCCGGGCTCGCTTCAGGACCTGG-5'
H598-599A	sense	5'-CGCCAGAGAACGAGGCCGCCCTGGTGGCTCAGAGGGAC-3'
	antisense	3'-GTCCTCTGAGCCACCAGGGCGGCCTCGTTCTCTGGCG-5'
H613A	sense	5'-CAGTCCAGTTGCAAGCCTGGCTGGCCATCTG-3'
	antisense	3'-CAGATGGCCAGCCAGGCTTGAACCTGGAACCTG-3'

Asparaginsäure und Glutaminsäure des hNAT gegen die entsprechende Aminosäure des hDAT (Asp-Glu/X_{DAT}-Mutanten)

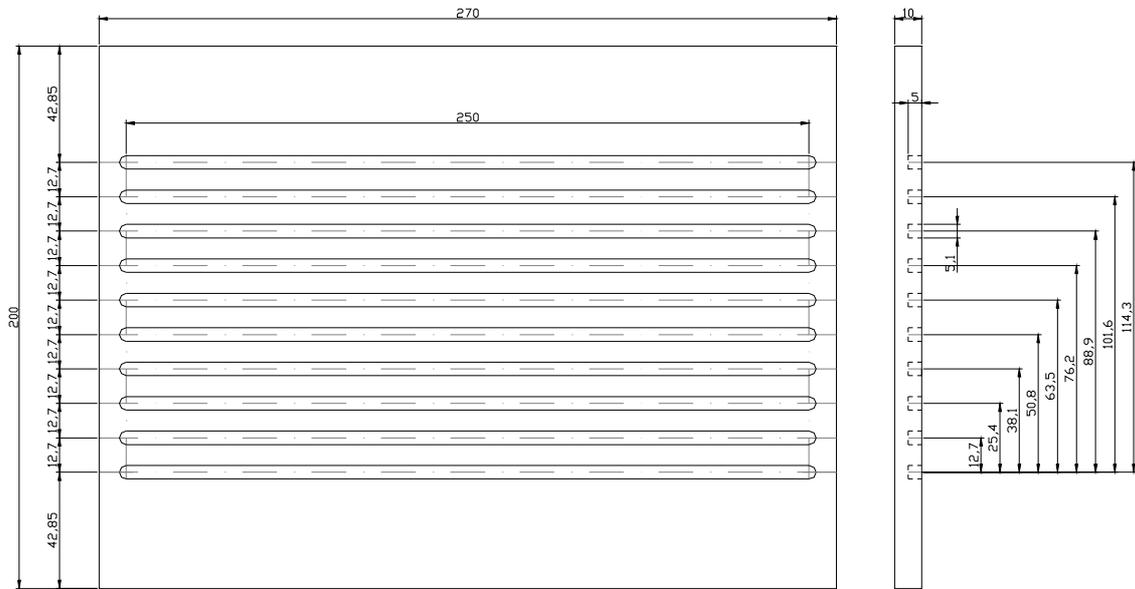
Mutante	Orientierung	Primersequenz
D50V/ D52N	sense	5'-GCTGGCGCCCCGCGTCCGGCAACGCGCAGCCCCGG-3'
	antisense	3'-CCGGGGCTGCGCGTTGCCGACGCGGGGCGCCAGC-5'
E223Q	sense	5'-GTCCTGCACCTTCACCAGAGCAGCGGGATTTC-3'
	antisense	3'-GAATCCCGCTGCTCTGGTGAAGGTGCAGGAC-5'
D336T	sense	5'-GTTACAACAAATTTACCAACAAGTGTACAGGGATG-3'
	antisense	3'-CATCCCTGTAACAGTTGTTGGTAAATTTGTTGTAAC-5'
E371K	sense	5'-CATGGCCATAAACACAAGGTCAACATTGAGG-3'
	antisense	3'-CCTCAATGTTGACCTTGTGTTTATGGCCATG-5'
E377G	sense	5'-CAAGGTCAACATTGGGGATGTGGCCACAG-3'
	antisense	3'-CTGTGGCCACATCCCCAATGTTGACCTTG-5'
D499G	sense	5'-GGTTTTATGGAGTGGGCAGGTTTACGCAACGAC-3'
	antisense	3'-GTCGTTGCTGAACCTGCCACTCCATAAAACC-5'
D546G/ D547A	sense	5'-GCCACTCACCTACGGCGCCTACATCTTCCCGCCCTG-3'
	antisense	3'-CAGGGCGGGAAGATGTAGGCGCCGTAGGTGAGTGCC-5'

Asparaginsäure und Glutaminsäure aus TM1 und TM6 des hNAT gegen Asparagin bzw. Glutamin (Asp/Asn-Glu/Gln-Mutanten)

Mutante	Orientierung	Primersequenz
D64N	sense	5'-GGGCAAGAAGATCA <u>AACTTCCTGCTGTCCG</u> TAG-3'
	antisense	3'-CTACGGACAGCAGGAAGTTGATCTTCTTGCCC-5'
E304Q	sense	5'-CTACCGCTTGAAAC <u>CAGGCCACGGTATGGATTG</u> -3'
	antisense	3'-CAATCCATACCGTGGCCTGTTTCAAGCGGTAG-5'
D310N	sense	5'-GGCCACGGTATGGATTA <u>AATGCCGCAACTCAG</u> -3'
	antisense	3'-CTGAGTTGCGGCATTAATCCATACCGTGGCC-5'
D418N	sense	5'-GCGCTGGGCCTTA <u>ACAGCTCAATGGGAGGCATG</u> -3'
	antisense	3'-CATGCCTCCCATTGAGCTGTTAAGGCCAGCGC-5'
E425Q	sense	5'-CAATGGGAGGCATGC <u>AGGCTGTCATCACGGCCTGG</u> -3'
	antisense	3'-CCAGGCCCGTGATGACAGCCTGCATGCCTCCCATTG-5'
D433N/ D434N	sense	5'-CACGGGCCTGGCAAATA <u>ACTTCCAGGTCCTGAAGCG</u> -3'
	antisense	3'-CGCTTCAGGACCTGGAAGTTATTGCCAGGCCCGTG-5'

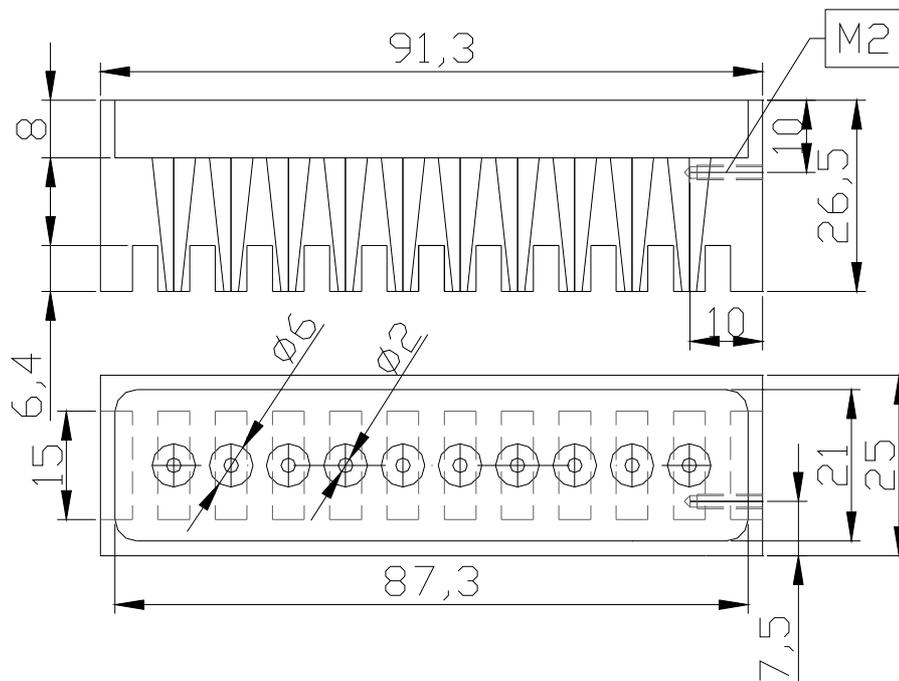
2. Technische Zeichnungen der Elektrophoreseapparatur für kationisch rehydratisierte Streifen

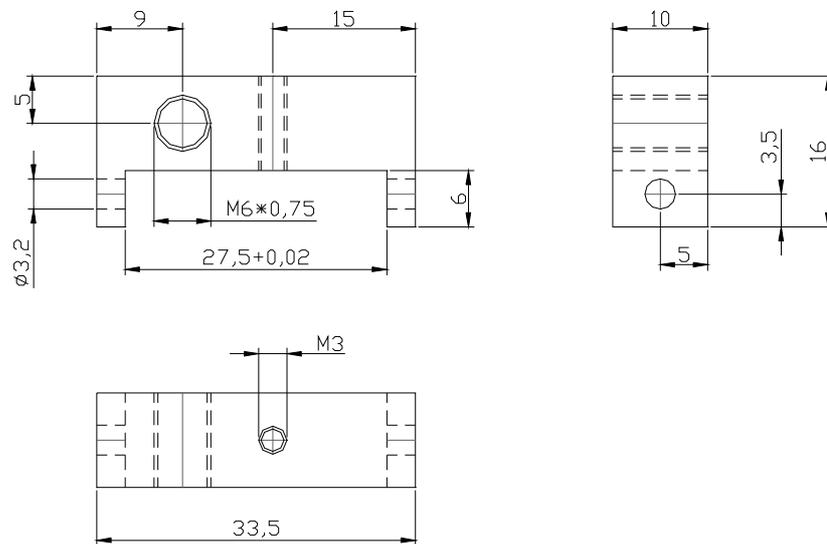
Streifenhalter



Plexiglasplatte 10mm

Elektrodenblock



Halterung der Platinelektrode mit Buchse für 4-mm-Federstecker

G. Literaturverzeichnis

- Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K (2005) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 9 Auflage, Elsevier GmbH, München
- Andersen SS (2004) Expression and purification of recombinant vesicular glutamate transporter VGLUT1 using PC12 cells and High Five insect cells. Biol Proced Online 6:105-112
- Androutsellis-Theotokis A, Ghassemi F, Rudnick G (2001) A conformationally sensitive residue on the cytoplasmic surface of serotonin transporter. J Biol Chem 276:45933-45938
- Androutsellis-Theotokis A, Rudnick G (2002) Accessibility and conformational coupling in serotonin transporter predicted internal domains. J Neurosci 22:8370-8378
- Apparsundaram S, Galli A, DeFelice LJ, Hartzell HC, Blakely RD (1998) 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
- Barker EL, Moore KR, Rakhshan F, Blakely RD (1999) Transmembrane domain I contributes to the permeation pathway for serotonin and ions in the serotonin transporter. J Neurosci 19:4705-4717
- Baty JW, Hampton MB, Winterbourn CC (2002) Detection of oxidant sensitive thiol proteins by fluorescence labeling and two-dimensional electrophoresis. Proteomics 2:1261-1266
- Bednar RA (1990) Reactivity and pH dependence of thiol conjugation to *N*-ethylmaleimide: detection of a conformational change in chalcone isomerase. Biochemistry 29:3684-3690
- Bensalem N, Masscheleyn S, Mozo J, Vallee B, Brouillard F, Trudel S, Ricquier D, Edelman A, Guerrera IC, Miroux B (2007) High sensitivity identification of membrane proteins by MALDI TOF-MASS spectrometry using polystyrene beads. J Proteome Res 6:1595-1602
- Bergmans HE, van Die IM, Hoekstra WP (1981) Transformation in Escherichia coli: stages in the process. J Bacteriol 146:564-570
- Beuming T, Shi L, Javitch JA, Weinstein H (2006) A comprehensive structure-based alignment of prokaryotic and eukaryotic neurotransmitter/Na⁺ symporters (NSS) aids in the use of the LeuT structure to probe NSS structure and function. Mol Pharmacol 70:1630-1642
- Bierczynska-Krzysik A, Kang SU, Silberring J, Lubec G (2006) Mass spectrometrical identification of brain proteins including highly insoluble and transmembrane proteins. Neurochem Int 49:245-255

- Bittner M, Kupferer P, Morris CF (1980) Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzoyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets. *Anal Biochem* 102:459-471
- Blakely RD, Bauman AL (2000) Biogenic amine transporters: regulation in flux. *Curr Opin Neurobiol* 10:328-336
- Blakely RD, De Felice LJ, Hartzell HC (1994) Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters. *J Exp Biol* 196:263-281
- Bönisch H, Brüss M (1994) The noradrenaline transporter of the neuronal plasma membrane. *Ann N Y Acad Sci* 733:193-202
- Bönisch H, Brüss M (2006) The norepinephrine transporter in physiology and disease. *Handb Exp Pharmacol* 485-524
- Bönisch H, Harder R (1986) Binding of 3H-desipramine to the neuronal noradrenaline carrier of rat pheochromocytoma cells (PC-12 cells). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 334:403-411
- Bönisch H, Fuchs G, Graefe KH (1986) Sodium-dependence of the saturability of carrier-mediated noradrenaline efflux from noradrenergic neurones in the rat vas deferens. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 332:131-134
- Bönisch H, Martiny-Baron G, Blum B, Michael-Hepp J (1990) Biochemical characterization and purification of the neuronal sodium-dependent noradrenaline transporter. *J Neural Transm Suppl* 32:413-419
- 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
- Braun RJ, Kinkl N, Beer M, Ueffing M (2007) Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. *Anal Bioanal Chem* 389:1033-1045
- Brewer CF, Riehm JP (1967) Evidence for possible non-specific reactions between *N*-ethylmaleimide and proteins. *Anal Biochem* 18:248-255
- 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
- Bryan-Lluka LJ, Bönisch H (1997) Lanthanides inhibit the human noradrenaline, 5-hydroxytryptamine and dopamine transporters. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 355:699-706

- 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 U S A* 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
- Bunai K, Yamane K (2005) Effectiveness and limitation of two-dimensional gel electrophoresis in bacterial membrane protein proteomics and perspectives. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 815:227-236
- Burré J, Beckhaus T, Schagger H, Corvey C, Hofmann S, Karas M, Zimmermann H, Volkandt W (2006) Analysis of the synaptic vesicle proteome using three gel-based protein separation techniques. *Proteomics* 6:6250-6262
- Caglio S, Righetti PG (1993) On the pH dependence of polymerization efficiency, as investigated by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 14:554-558
- Carr A, Frei B (1999) Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J* 13:1007-1024
- Caruso-Neves C, Coelho-Souza SA, Vives D, Goes G, Lara LS, Lopes AG (2002) Modulation of ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity in the renal proximal tubule by Mg²⁺, MgATP and furosemide. *Int J Biochem Cell Biol* 34:1586-1593
- Chen JG, Liu-Chen S, Rudnick G (1997) External cysteine residues in the serotonin transporter. *Biochemistry* 36:1479-1486
- Chen N, Trowbridge CG, Justice JB, Jr. (1998) Voltammetric studies on mechanisms of dopamine efflux in the presence of substrates and cocaine from cells expressing human norepinephrine transporter. *J Neurochem* 71:653-665
- Chen N, Vaughan RA, Reith ME (2001) The role of conserved tryptophan and acidic residues in the human dopamine transporter as characterized by site-directed mutagenesis. *J Neurochem* 77:1116-1127
- Chen NH, Reith ME, Quick MW (2004) Synaptic uptake and beyond: the sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflugers Arch* 447:519-531
- Chen R, Wei H, Hill ER, Chen L, Jiang L, Han DD, Gu HH (2007) Direct evidence that two cysteines in the dopamine transporter form a disulfide bond. *Mol Cell Biochem* 298:41-48
- Chloupkova M, Pickert A, Lee JY, Souza S, Trinh YT, Connelly SM, Dumont ME, Dean M, Urbatsch IL (2007) Expression of 25 human ABC transporters in the yeast *Pichia pastoris* and characterization of the purified ABCC3 ATPase activity. *Biochemistry* 46:7992-8003

- Cho AK, Ransom RW, Fischer JB, Kammerer RC (1980) The effects of xylamine, a nitrogen mustard on [³H]norepinephrine accumulation in rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 214:324-327
- Codina J, Cardwell J, Gitomer JJ, Cui Y, Kone BC, Dubose TD, Jr. (2000) Sch-28080 depletes intracellular ATP selectively in mIMCD-3 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 279:C1319-C1326
- Conti E, Franks NP, Brick P (1996) Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure* 4:287-298
- Coppen A (1967) The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry* 113:1237-1264
- Coughenour HD, Spaulding RS, Thompson CM (2004) The synaptic vesicle proteome: a comparative study in membrane protein identification. *Proteomics* 4:3141-3155
- Crouch SP, Kozlowski R, Slater KJ, Fletcher J (1993) The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods* 160:81-88
- 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
- Distelmaier F, Wiedemann P, Brüss M, Bönisch H (2004) Functional importance of the C-terminus of the human norepinephrine transporter. *J Neurochem* 91:537-546
- Dudley MW, Butcher LL, Kammerer RC, Cho AK (1981) The actions of xylamine on central noradrenergic neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 217:834-840
- Dudley MW, Howard BD, Cho AK (1990) The interaction of the beta-haloethyl benzylamines, xylamine, and DSP-4 with catecholaminergic neurons. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30:387-403
- Eifler N, Duckely M, Sumanovski LT, Egan TM, Oksche A, Konopka JB, Luthi A, Engel A, Werten PJ (2007) Functional expression of mammalian receptors and membrane channels in different cells. *J Struct Biol* 159:179-193
- Farhan H, Freissmuth M, Sitte HH (2006) Oligomerization of neurotransmitter transporters: a ticket from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane. *Handb Exp Pharmacol* 233-249
- Ferrer JV, Javitch JA (1998) Cocaine alters the accessibility of endogenous cysteines in putative extracellular and intracellular loops of the human dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9238-9243

- Figler RA, Omote H, Nakamoto RK, Al Shawi MK (2000) Use of chemical chaperones in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to enhance heterologous membrane protein expression: high-yield expression and purification of human P-glycoprotein. *Arch Biochem Biophys* 376:34-46
- Fischer JB, Waggaman LA, Ransom RW, Cho AK (1983) Xylamine, an irreversible inhibitor of norepinephrine uptake, is transported by this same uptake mechanism in cultured rat superior cervical ganglia. *J Pharmacol Exp Ther* 226:650-655
- Flensburg J, Haid D, Blomberg J, Bielawski J, Ivansson D (2004) Applications and performance of a MALDI-ToF mass spectrometer with quadratic field reflectron technology. *J Biochem Biophys Methods* 60:319-334
- Foley KF, Cozzi NV (2002) Inhibition of transport function and desipramine binding at the human noradrenaline transporter by *N*-ethylmaleimide and protection by substrate analogs. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 365:457-461
- Forrest LR, Tavoulari S, Zhang YW, Rudnick G, Honig B (2007) Identification of a chloride ion binding site in Na⁺/Cl⁻ dependent transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:12761-12766
- Frillingos S, Gonzalez A, Kaback HR (1997) Cysteine-scanning mutagenesis of helix IV and the adjoining loops in the lactose permease of *Escherichia coli*: Glu126 and Arg144 are essential. *off. Biochemistry* 36:14284-14290
- Fujiki Y, Hubbard AL, Fowler S, Lazarow PB (1982) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 93:97-102
- Galli A, Blakely RD, DeFelice LJ (1996) Norepinephrine transporters have channel modes of conduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8671-8676
- Gharahdaghi F, Weinberg CR, Meagher DA, Imai BS, Mische SM (1999) Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* 20:601-605
- Ghosh AK, Borchardt RT, Sinhababu AK (1988) Characterization of Norepinephrine Uptake in Murine Neuro-Blastoma Cells, Clone N-2A. *Biogenic Amines* 5:25-35
- Gilbert HF (2001) Peptide Bonds, Disulfide Bonds and Properties of Small Peptides. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. <http://www.els.net/> [doi:10.1038/npng.els.0001328]
- Gillen CM, Forbush B, III (1999) Functional interaction of the K-Cl cotransporter (KCC1) with the Na⁺/K⁺/Cl⁻ cotransporter in HEK-293 cells. *Am J Physiol* 276:C328-C336

- 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 dopamine-norepinephrine transporters. *J Biol Chem* 269:15985-15988
- Glusker JP (1991) Structural aspects of metal liganding to functional groups in proteins. *Adv Protein Chem* 42:1-76
- Gonzalez-Garcia C, Cena V, Klein DC (1987) Characterization of the alpha +-like Na⁺/K⁺-ATPase which mediates ouabain inhibition of adrenergic induction of N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87) activity: studies with isolated pinealocytes. *Mol Pharmacol* 32:792-797
- Görg A, Postel W, Gunther S (1988) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9:531-546
- Görg A, Weiss W, Dunn MJ (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4:3665-3685
- Gothel SF, Marahiel MA (1999) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell Mol Life Sci* 55:423-436
- Gottlieb M, Chavko M (1987) Silver staining of native and denatured eucaryotic DNA in agarose gels. *Anal Biochem* 165:33-37
- Grisshammer R, Tate CG (1995) Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. *Q Rev Biophys* 28:315-422
- Gu HH, Wall S, Rudnick G (1996) Ion coupling stoichiometry for the norepinephrine transporter in membrane vesicles from stably transfected cells. *J Biol Chem* 271:6911-6916
- 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
- Guillemin I, Becker M, Ociepka K, Friauf E, Nothwang HG (2005) A subcellular prefractionation protocol for minute amounts of mammalian cell cultures and tissue. *Proteomics* 5:35-45
- Hahn MK, 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) Effects of monovalent ions on the transport of noradrenaline across the plasma membrane of neuronal cells (PC-12 cells). *J Neurochem* 45:1154-1162
- Hartinger J, Stenius K, Hogemann D, Jahn R (1996) 16-BAC/SDS-PAGE: a two-dimensional gel electrophoresis system suitable for the separation of integral membrane proteins. *Anal Biochem* 240:126-133

- Hayer-Zillgen M, Brüss M, Bönisch H (2002) Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT₁, hOCT₂ and hOCT₃. *Br J Pharmacol* 136:829-836
- Helling S, Schmitt E, Joppich C, Schulenburg T, Mullner S, Felske-Müller S, Wiebringhaus T, Becker G, Linsenmann G, Sitek B, Lutter P, Meyer HE, Marcus K (2006) 2D differential membrane proteome analysis of scarce protein samples. *Proteomics* 6:4506-4513
- Herbert B (1999) Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 20:660-663
- Hersch SM, Yi H, Heilman CJ, Edwards RH, Levey AI (1997) Subcellular localization and molecular topology of the dopamine transporter in the striatum and substantia nigra. *J Comp Neurol* 388:211-227
- Hertting G, Axelrod J (1961) Fate of tritiated noradrenaline at the sympathetic nerve-endings. *Nature* 192:172-173
- Hofmann K, Stoffel W (1993) TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 347:166
- Howard BD, Cho AK, Zhang MB, Koide M, Lin S (1990) Covalent labeling of the cocaine-sensitive catecholamine transporter. *J Neurosci Res* 26:149-158
- Hunzinger C, Wozny W, Schwall GP, Poznanovic S, Stegmann W, Zengerling H, Schoepf R, Groebe K, Cahill MA, Osiewacz HD, Jagemann N, Bloch M, Dencher NA, Krause F, Schratzenholz A (2006) Comparative profiling of the mammalian mitochondrial proteome: multiple aconitase-2 isoforms including *N*-formylkynurenine modifications as part of a protein biomarker signature for reactive oxidative species. *J Proteome Res* 5:625-633
- Indarte M, Madura JD, Surratt CK (2008) Dopamine transporter comparative molecular modeling and binding site prediction using the LeuT(Aa) leucine transporter as a template. *Proteins* 70:1033-1046
- Isenring P, Jacoby SC, Payne JA, Forbush B, III (1998) Comparison of Na-K-Cl cotransporters. NKCC1, NKCC2, and the HEK cell Na-L-Cl cotransporter. *J Biol Chem* 273:11295-11301
- Jacobs MT, Zhang YW, Campbell SD, Rudnick G (2007) Ibogaine, a noncompetitive inhibitor of serotonin transport, acts by stabilizing the cytoplasm-facing state of the transporter. *J Biol Chem* 282:29441-29447
- Jayanthi LD, Prasad PD, Ramamoorthy S, Mahesh VB, Leibach FH, Ganapathy V (1993) Sodium- and chloride-dependent, cocaine-sensitive, high-affinity binding of nisoxetine to the human placental norepinephrine transporter. *Biochemistry* 32:12178-12185
- Junker JW, Schinkel AH (2004) Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2 and 3 (SLC22A1-3) *J Pharmacol Exp Ther* 308:2-9

- Jung H, Jung K, Kaback HR (1994) Cysteine 148 in the lactose permease of *Escherichia coli* is a component of a substrate binding site. 1. Site-directed mutagenesis studies. *Biochemistry* 33:12160-12165
- Kaback HR, Sahin-Toth M, Weinglass AB (2001) The kamikaze approach to membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:610-620
- Kaye DM, Gruskin S, Smith AI, Esler MD (2000) Nitric oxide mediated modulation of norepinephrine transport: identification of a potential target for S-nitrosylation. *Br J Pharmacol* 130:1060-1064
- Keller T, Efeber M, Gorboulev V, Reilander H, Koepsell H (2005) Purification and functional reconstitution of the rat organic cation transporter OCT1. *Biochemistry* 44:12253-12263
- Kimelberg HK, Pelton EW (1983) High-affinity uptake of [³H]norepinephrine by primary astrocyte cultures and its inhibition by tricyclic antidepressants. *J Neurochem* 40:1265-1270
- Kitayama S, Morita K, Dohi T (2001) Functional characterization of the splicing variants of human norepinephrine transporter. *Neurosci Lett* 312:108-112
- Kitayama S, Shimada S, Xu H, Markham L, Donovan DM, Uhl GR (1992) Dopamine transporter site-directed mutations differentially alter substrate transport and cocaine binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7782-7785
- Klose J (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26:231-243
- Kniazeff J, Loland CJ, Goldberg N, Quick M, Das S, Sitte HH, Javitch JA, Gether U (2005) Intramolecular cross-linking in a bacterial homolog of mammalian SLC6 neurotransmitter transporters suggests an evolutionary conserved role of transmembrane segments 7 and 8. *Neuropharmacology* 49:715-723
- Kocha T, Yamaguchi M, Ohtaki H, Fukuda T, Aoyagi T (1997) Hydrogen peroxide-mediated degradation of protein: different oxidation modes of copper- and iron-dependent hydroxyl radicals on the degradation of albumin. *Biochim Biophys Acta* 1337:319-326
- Koenderink JB, Swarts HG, Stronks HC, Hermsen HP, Willems PH, De Pont JJ (2001) Chimeras of X⁺, K⁺-ATPases. The M1-M6 region of Na⁺, K⁺-ATPase is required for Na⁺-activated ATPase activity, whereas the M7-M10 region of H⁺, K⁺-ATPase is involved in K⁺ de-occlusion. *J Biol Chem* 276:11705-11711
- Koide M, Cho AK, Howard BD (1986) Characterization of xylamine binding to proteins of PC12 pheochromocytoma cells. *J Neurochem* 47:1277-1285
- Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL (2005) Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol* 23:567-575

- Kramer ML (2006) A new multiphasic buffer system for benzyldimethyl-n-hexadecylammonium chloride polyacrylamide gel electrophoresis of proteins providing efficient stacking. *Electrophoresis* 27:347-356
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305:567-580
- Kübler W, Strasser RH (1994) Signal transduction in myocardial ischaemia. *Eur Heart J* 15:437-445
- Kuhar MJ, Minneman K, Muly EC (2006) Catecholamines. In: Siegel JG, Albers RW, Brady, ST, Price DL (eds) *Basic Neurochemistry - Molecular, Cellular, and Medical Aspects*. Elsevier, Amsterdam, pp 211-225
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Landa ME, Rubio MC, Jaim-Etcheverry G (1987) The aziridinium derivative of DSP4 (*N*-(2-chloroethyl)-*N*-ethyl-2-bromobenzylamine) accelerates the beating rate of isolated rat atria by enhancing the spontaneous release of noradrenaline. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 336:396-402
- Landy A (1989) Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* 58:913-949
- Langeloh A, Bönisch H, Trendelenburg U (1987) The mechanism of the 3H-noradrenaline releasing effect of various substrates of uptake1: multifactorial induction of outward transport. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 336:602-610
- Lauber WM, Carroll JA, Dufield DR, Kiesel JR, Radabaugh MR, Malone JP (2001) Mass spectrometry compatibility of two-dimensional gel protein stains. *Electrophoresis* 22:906-918
- Le Quoc K, Le Quoc D, Gaudemer Y (1979) Influence of the energetic state of mitochondria on the inhibition of oxidative phosphorylation by *N*-ethylmaleimide. *Biochim Biophys Acta* 546:356-364
- Lenhard T, Reilander H (1997) Engineering the folding pathway of insect cells: generation of a stably transformed insect cell line showing improved folding of a recombinant membrane protein. *Biochem Biophys Res Commun* 238:823-830
- Leonard BE (1997) The role of noradrenaline in depression: a review. *J Psychopharmacol* 11:S39-S47
- Li LB, Chen N, Ramamoorthy S, Chi L, Cui XN, Wang LC, Reith ME (2004) The role of N-glycosylation in function and surface trafficking of the human dopamine transporter. *J Biol Chem* 279:21012-21020

- Lin Z, Wang W, Kopajtic T, Revay RS, Uhl GR (1999) Dopamine transporter: transmembrane phenylalanine mutations can selectively influence dopamine uptake and cocaine analog recognition. *Mol Pharmacol* 56:434-447
- Lin Z, Wang W, Uhl GR (2000) Dopamine transporter tryptophan mutants highlight candidate dopamine- and cocaine-selective domains. *Mol Pharmacol* 58:1581-1592
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Luche S, Santoni V, Rabilloud T (2003) Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 3:249-253
- Luque CA, Rey JA (1999) Sibutramine: a serotonin-norepinephrine reuptake-inhibitor for the treatment of obesity. *Ann Pharmacother* 33:968-978
- Macfarlane DE (1989) Two dimensional benzyldimethyl-n-hexadecylammonium chloride/sodium dodecyl sulfate preparative polyacrylamide gel electrophoresis: a high capacity high resolution technique for the purification of proteins from complex mixtures. *Anal Biochem* 176:457-463
- Mager S, Min C, Henry DJ, Chavkin C, Hoffman BJ, Davidson N, Lester HA (1994) Conducting states of a mammalian serotonin transporter. *Neuron* 12:845-859
- Majima E, Koike H, Hong YM, Shinohara Y, Terada H (1993) Characterization of cysteine residues of mitochondrial ADP/ATP carrier with the SH-reagents eosin 5-maleimide and *N*-ethylmaleimide. *J Biol Chem* 268:22181-22187
- Mao W, Iwai C, Qin F, Liang CS (2005) Norepinephrine induces endoplasmic reticulum stress and downregulation of norepinephrine transporter density in PC12 cells via oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H2381-H2389
- Marien M, Cosi C (1999) Central noradrenergic neurotoxicity of DSP4 in mice. Studies on the neuroprotective potential of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, benzamide. *Ann N Y Acad Sci* 890:336-339
- Mattow J, Siejak F, Hagens K, Schmidt F, Koehler C, Treumann A, Schaible UE, Kaufmann SH (2007) An improved strategy for selective and efficient enrichment of integral plasma membrane proteins of mycobacteria. *Proteomics* 7:1687-1701
- McCarthy J, Hopwood F, Oxley D, Laver M, Castagna A, Righetti PG, Williams K, Herbert B (2003) Carbamylation of proteins in 2-D electrophoresis--myth or reality? *J Proteome Res* 2:239-242
- McDonough J, Marban E (2005) Optimization of IPG strip equilibration for the basic membrane protein mABC1. *Proteomics* 5:2892-2895

- McKeown-Longo PJ, Mosher DF (1984) Mechanism of formation of disulfide-bonded multimers of plasma fibronectin in cell layers of cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 259:12210-12215
- Meijer AJ, Groot GS, Tager JM (1970) Effect of sulphhydryl-blocking reagents on mitochondrial anion-exchange reactions involving phosphate. *FEBS Lett* 8:41-44
- 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
- Meyerson LR, Ieni JR, Wennogle LP (1987) Allosteric interaction between the site labeled by [³H]imipramine and the serotonin transporter in human platelets. *J Neurochem* 48:560-565
- Michael-Hepp J, Blum B, Bönisch H (1992) Characterization of the [³H]-desipramine binding site of the bovine adrenomedullary plasma membrane. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 346:203-207
- Mitchell SM, Lee E, Garcia ML, Stephan MM (2004) Structure and function of extracellular loop 4 of the serotonin transporter as revealed by cysteine-scanning mutagenesis. *J Biol Chem* 279:24089-24099
- Moebius J, Zahedi RP, Lewandrowski U, Berger C, Walter U, Sickmann A (2005) The human platelet membrane proteome reveals several new potential membrane proteins. *Mol Cell Proteomics* 4:1754-1761
- Morciano M, Burré J, Corvey C, Karas M, Zimmermann H, Volkandt W (2005) Immunoisolation of two synaptic vesicle pools from synaptosomes: a proteomics analysis. *J Neurochem* 95:1732-1745
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350
- 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
- Nishihara JC, Champion KM (2002) Quantitative evaluation of proteins in one- and two-dimensional polyacrylamide gels using a fluorescent stain. *Electrophoresis* 23:2203-2215
- Norregaard L, Frederiksen D, Nielsen EO, Gether U (1998) Delineation of an endogenous zinc-binding site in the human dopamine transporter. *EMBO J* 17:4266-4273

- Norregaard L, Visiers I, Loland CJ, Ballesteros J, Weinstein H, Gether U (2000) Structural probing of a microdomain in the dopamine transporter by engineering of artificial Zn²⁺ binding sites. *Biochemistry* 39:15836-15846
- Norregaard L, Loland CJ, Gether U (2003) Evidence for distinct sodium-, dopamine-, and cocaine-dependent conformational changes in transmembrane segments 7 and 8 of the dopamine transporter. *J Biol Chem* 278:30587-30596
- O'Farrell PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250:4007-4021
- Pacholczyk T, Blakely RD, Amara SG (1991) Expression cloning of a cocaine- and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter. *Nature* 350:350-354
- Paczkowski FA, Sharpe IA, Dutertre S, Lewis RJ (2007) α -Conotoxin and tricyclic antidepressant interactions at the norepinephrine transporter define a new transporter model. *J Biol Chem* 282:17837-17844
- Pappin DJ, Hojrup P, Bleasby AJ (1993) Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol* 3:327-332
- Park JD, Lee KJ, Kim DH (2001) A new inhibitor design strategy for carboxypeptidase A as exemplified by N-(2-chloroethyl)-N-methylphenylalanine. *Bioorg Med Chem* 9:237-243
- Park SU, Ferrer JV, Javitch JA, Kuhn DM (2002) Peroxynitrite inactivates the human dopamine transporter by modification of cysteine 342: potential mechanism of neurotoxicity in dopamine neurons. *J Neurosci* 22:4399-4405
- Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20:3551-3567
- Pörzgen P, Bönisch H, Brüss M (1996) Molecular cloning and organization of the coding region of the human norepinephrine transporter gene. *Biochem Biophys Res Commun* 227:642-643
- Pörzgen P, Bönisch H, Hammermann R, Brüss M (1998) The human noradrenaline transporter gene contains multiple polyadenylation sites and two alternatively spliced C-terminal exons. *Biochim Biophys Acta* 1398:365-370
- Rabilloud T (2003) Membrane proteins ride shotgun - A new mass spectrometry-based approach identifies and characterizes membrane proteins on a large scale. *Nature Biotechnology* 21:508-510
- Rais I, Karas M, Schagger H (2004) Two-dimensional electrophoresis for the isolation of integral membrane proteins and mass spectrometric identification. *Proteomics* 4:2567-2571

- Ransom RW, Kammerer RC, Cho AK (1982) Chemical transformations of xylamine (*N*-2'-chloroethyl-*N*-ethyl-2-methylbenzylamine) in solution. Pharmacological activity of the species derived from this irreversible norepinephrine uptake inhibitor. *Mol Pharmacol* 21:380-386
- Ransom RW, Waggaman LA, Cho AK (1985) Interaction of xylamine with peripheral sympathetic neurons. *Life Sci* 37:1177-1182
- Rasmussen SG, Gether U (2005) Purification and fluorescent labeling of the human serotonin transporter. *Biochemistry* 44:3494-3505
- Reith ME, Selmeçi G (1992) Radiolabeling of dopamine uptake sites in mouse striatum: comparison of binding sites for cocaine, mazindol, and GBR 12935. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 345:309-318
- Reith ME, Berfield JL, Wang LC, Ferrer JV, Javitch JA (2001) The uptake inhibitors cocaine and benztropine differentially alter the conformation of the human dopamine transporter. *J Biol Chem* 276:29012-29018
- Ritz D, Beckwith J (2001) Roles of thiol-redox pathways in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55:21-48
- Rost B (1999) Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Eng* 12:85-94
- Roubert C, Cox PJ, Brüss M, Hamon M, Bönisch H, Giros B (2001) Determination of residues in the norepinephrine transporter that are critical for tricyclic antidepressant affinity. *J Biol Chem* 276:8254-8260
- Rudnick G (2007) What is an antidepressant binding site doing in a bacterial transporter? *ACS Chem Biol* 2:606-609
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467
- Santoni V, Molloy M, Rabilloud T (2000) Membrane proteins and proteomics: Un amour impossible? *Electrophoresis* 21:1054-1070
- Sarto C, Marocchi A, Sanchez JC, Giannone D, Frutiger S, Golaz O, Wilkins MR, Doro G, Cappellano F, Hughes G, Hochstrasser DF, Mocarelli P (1997) Renal cell carcinoma and normal kidney protein expression. *Electrophoresis* 18:599-604
- Schindler J, Jung S, Niedner-Schatteburg G, Friauf E, Nothwang HG (2006) Enrichment of integral membrane proteins from small amounts of brain tissue. *J Neural Transm* 113:995-1013
- Schmid JA, Scholze P, Kudlacek O, Freissmuth M, Singer EA, Sitte HH (2001) Oligomerization of the human serotonin transporter and of the rat GABA transporter 1 visualized by fluorescence resonance energy transfer microscopy in living cells. *J Biol Chem* 276:3805-3810

- Schömig E, Michael-Hepp J, Bönisch H (1988) Inhibition of neuronal noradrenaline uptake (uptake₁) and desipramine binding by *N*-ethylmaleimide (NEM). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 337:633-636
- Schömig A, Haass M, Richardt G (1991) Catecholamine release and arrhythmias in acute myocardial ischaemia. *Eur Heart J* 12 Suppl F:38-47
- Schömig E, Lazar A, Grundemann D (2006) Extraneuronal monoamine transporter and organic cation transporters 1 and 2: a review of transport efficiency. *Handb Exp Pharmacol* 151-180
- Schoot BM, Schoots AF, De Pont JJ, Schuurmans Stekhoven FM, Bonting SL (1977) Studies on (Na⁺/K⁺) activated ATPase. XLI. Effects of *N*-ethylmaleimide on overall and partial reactions. *Biochim Biophys Acta* 483:181-192
- Schwartz JW, Blakely RD, DeFelice LJ (2003) Binding and transport in norepinephrine transporters. Real-time, spatially resolved analysis in single cells using a fluorescent substrate. *J Biol Chem* 278:9768-9777
- Schwartz JW, Novarino G, Piston DW, DeFelice LJ (2005) Substrate binding stoichiometry and kinetics of the norepinephrine transporter. *J Biol Chem* 280:19177-19184
- Shahrestanifar M, Wang WW, Howells RD (1996) Studies on inhibition of mu and delta opioid receptor binding by dithiothreitol and *N*-ethylmaleimide. His223 is critical for mu opioid receptor binding and inactivation by *N*-ethylmaleimide. *J Biol Chem* 271:5505-5512
- Simpson D, Plosker GL (2004) Atomoxetine: a review of its use in adults with attention deficit hyperactivity disorder. *Drugs* 64:205-222
- Singh SK, Yamashita A, Gouaux E (2007) Antidepressant binding site in a bacterial homologue of neurotransmitter transporters. *Nature* 448:952-956
- Sitte HH, Freissmuth M (2003) Oligomer formation by Na⁺-Cl⁻-coupled neurotransmitter transporters. *Eur J Pharmacol* 479:229-236
- Smith GL (1977) Increased ouabain-sensitive ⁸⁶Rubidium uptake after mitogenic stimulation of quiescent chicken embryo fibroblasts with purified multiplication-stimulating activity. *J Cell Biol* 73:761-767
- Sonders MS, Zhu SJ, Zahniser NR, Kavanaugh MP, Amara SG (1997) Multiple ionic conductances of the human dopamine transporter: the actions of dopamine and psychostimulants. *J Neurosci* 17:960-974
- Sonders MS, Quick M, Javitch JA (2005) How did the neurotransmitter cross the bilayer? A closer view. *Curr Opin Neurobiol* 15:296-304
- Spalding TA, Birdsall NJ, Curtis CA, Hulme EC (1994) Acetylcholine mustard labels the binding site aspartate in muscarinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* 269:4092-4097

- Stephan MM, Chen MA, Penado KM, Rudnick G (1997) An extracellular loop region of the serotonin transporter may be involved in the translocation mechanism. *Biochemistry* 36:1322-1328
- Strader CD, Sigal IS, Register RB, Candelore MR, Rands E, Dixon RA (1987) Identification of residues required for ligand binding to the beta-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:4384-4388
- Sucic S, Bryan-Lluka LJ (2005) Roles of transmembrane domain 2 and the first intracellular loop in human noradrenaline transporter function: pharmacological and SCAM analysis. *J Neurochem* 94:1620-1630
- Sucic S, Bryan-Lluka LJ (2007) Investigation of the functional roles of the MELAL and GQXXRXG motifs of the human noradrenaline transporter using cysteine mutants. *Eur J Pharmacol* 556:27-35
- Sucic S, Paczkowski FA, Runkel F, Bönisch H, Bryan-Lluka LJ (2002) Functional significance of a highly conserved glutamate residue of the human noradrenaline transporter. *J Neurochem* 81:344-354
- Sulzer D, Chen TK, Lau YY, Kristensen H, Rayport S, Ewing A (1995) Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. *J Neurosci* 15:4102-4108
- Sur C, Schloss P, Betz H (1997) The rat serotonin transporter: identification of cysteine residues important for substrate transport. *Biochem Biophys Res Commun* 241:68-72
- Syringas M, Janin F, Mezghanni S, Giros B, Costentin J, Bonnet JJ (2000) Structural domains of chimeric dopamine-noradrenaline human transporters involved in the Na⁺- and Cl⁻-dependence of dopamine transport. *Mol Pharmacol* 58:1404-1411
- Talvenheimo J, Nelson PJ, Rudnick G (1979) Mechanism of imipramine inhibition of platelet 5-hydroxytryptamine transport. *J Biol Chem* 254:4631-4635
- Tate CG, Blakely RD (1994) The effect of N-linked glycosylation on activity of the Na⁺- and Cl⁻-dependent serotonin transporter expressed using recombinant baculovirus in insect cells. *J Biol Chem* 269:26303-26310
- Tate CG, Haase J, Baker C, Boorsma M, Magnani F, Vallis Y, Williams DC (2003) Comparison of seven different heterologous protein expression systems for the production of the serotonin transporter. *Biochim Biophys Acta* 1610:141-153
- Tejani-Butt SM (1992) [³H]nisoxetine: a radioligand for quantitation of norepinephrine uptake sites by autoradiography or by homogenate binding. *J Pharmacol Exp Ther* 260:427-436

- Torres GE, Yao WD, Mohn AR, Quan H, Kim KM, Levey AI, Staudinger J, Caron MG (2001) Functional interaction between monoamine plasma membrane transporters and the synaptic PDZ domain-containing protein PICK1. *Neuron* 30:121-134
- Torres GE, Carneiro A, Seamans K, Fiorentini C, Sweeney A, Yao WD, Caron MG (2003a) Oligomerization and trafficking of the human dopamine transporter. Mutational analysis identifies critical domains important for the functional expression of the transporter. *J Biol Chem* 278:2731-2739
- Torres GE, Gainetdinov RR, Caron MG (2003b) Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat Rev Neurosci* 4:13-25
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354
- Trendelenburg U, Langeloh A, Bönisch H (1987) Mechanism of action of indirectly acting sympathomimetic amines. *Blood Vessels* 24:261-270
- Tusnady GE, Simon I (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* 17:849-850
- Uozumi N (2001) *Escherichia coli* as an expression system for K⁺ transport systems from plants. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C733-C739
- Vagin O, Munson K, Denevich S, Sachs G (2003) Inhibition kinetics of the gastric H,K-ATPase by K-competitive inhibitor SCH28080 as a tool for investigating the luminal ion pathway. *Ann N Y Acad Sci* 986:111-115
- van Iwaarden PR, Pastore JC, Konings WN, Kaback HR (1991) Construction of a functional lactose permease devoid of cysteine residues. *Biochemistry* 30:9595-9600
- van Iwaarden PR, Driessen AJ, Konings WN (1992) What we can learn from the effects of thiol reagents on transport proteins. *Biochim Biophys Acta* 1113:161-170
- Wang JB, Moriwaki A, Uhl GR (1995) Dopamine transporter cysteine mutants: second extracellular loop cysteines are required for transporter expression. *J Neurochem* 64:1416-1419
- Waterman SA, Harding CF (2008) Neurotoxic effects of DSP-4 on the central noradrenergic system in male zebra finches. *Behav Brain Res* 188:271-280
- Westermeier R (2001) *Electrophoresis in Practice*. Viley-VCH, Weinheim
- Wilkins MR, Gasteiger E, Sanchez JC, Bairoch A, Hochstrasser DF (1998) Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: the effects of protein hydrophobicity and copy number. *Electrophoresis* 19:1501-1505

- Wölfel R, Halbrugge T, Graefe KH (1989) Effects of *N*-ethylmaleimide on 5-hydroxytryptamine transport and sodium content in rabbit platelets. *Br J Pharmacol* 97:1308-1314
- Yamashita A, Singh SK, Kawate T, Jin Y, Gouaux E (2005) Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. *Nature* 437:215-223
- Yelin R, Schuldiner S (2001) Vesicular monoamine transporters heterologously expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* display high-affinity tetrabenazine binding. *Biochim Biophys Acta* 1510:426-441
- Zahedi RP, Meisinger C, Sickmann A (2005) Two-dimensional benzyldimethyl-n-hexadecylammonium chloride/SDS-PAGE for membrane proteomics. *Proteomics* 5:3581-3588
- Zahniser NR, Doolen S (2001) Chronic and acute regulation of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters: drugs, substrates, presynaptic receptors, and signaling systems. *Pharmacol Ther* 92:21-55
- Zhang YW, Rudnick G (2005) Cysteine-scanning mutagenesis of serotonin transporter intracellular loop 2 suggests an alpha-helical conformation. *J Biol Chem* 280:30807-30813
- Zhou Z, Zhen J, Karpowich NK, Goetz RM, Law CJ, Reith ME, Wang DN (2007) LeuT-desipramine structure reveals how antidepressants block neurotransmitter reuptake. *Science* 317:1390-1393
- Zhu MY, Ordway GA (1997) Down-regulation of norepinephrine transporters on PC12 cells by transporter inhibitors. *J Neurochem* 68:134-141
- 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* 70:1547-1555
- Zhu MY, Kyle PB, Hume AS, Ordway GA (2004) The persistent membrane retention of desipramine causes lasting inhibition of norepinephrine transporter function. *Neurochem Res* 29:419-427
- Zieher LM, Jaim-Etcheverry G (1980) Neurotoxicity of *N*-(2-chloroethyl)-*N*-ethyl-2-bromobenzylamine hydrochloride (DSP 4) on noradrenergic neurons is mimicked by its cyclic aziridinium derivative. *Eur J Pharmacol* 65:249-256
- Zomot E, Bendahan A, Quick M, Zhao Y, Javitch JA, Kanner BI (2007) Mechanism of chloride interaction with neurotransmitter:sodium symporters. *Nature* 449:726-730

Eigene Veröffentlichungen während der Promotion

Wenge B, Muck A, Brüss M, Bönisch H (2005) Irreversible inactivation of the human norepinephrine transporter and role of cysteines. *Journal of Neurochemistry* 94 (Suppl. 2):108 P.372 (Abstract)

Wenge B, Brüss M, Bönisch H (2006) Differential effects of *N*-ethylmaleimide (NEM) in inhibition of substrate uptake and ligand binding by the human norepinephrine transporter (hNET). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 372 (Suppl. 1):17 (Abstract)

Wenge B, Bönisch H, Schmitz B, Ahrend MHJ (2006) Separation of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis using cationic rehydrated strips. *From Proteomics to Lipidomics – Basics, Advances and Applications*: 51 P13 (Abstract)

Wenge B, Brüss M, Bönisch H (2006) Inhibition by *N*-ethylmaleimide of substrate uptake and ligand binding by the human norepinephrine transporter is due to different mechanisms. *Acta Pharmacological Sinoca* 27: 363 (Abstract)

Wenge B, Bönisch H (2007) Interference of the noradrenergic neurotoxin DSP4 with neuronal and non-neuronal monoamine transporters. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 375 (Suppl 1):14 (Abstract)

Wenge B, Ahrend MHJ, Schmitz B, Bönisch H (2007) Separation of the norepinephrine transporter by a novel two-dimensional electrophoresis method. *BioMedical Transporters 2007, 5th International Research Conference, Membrane Transporters in Disease and Drug Development*:80 P64 (Abstract)

Wenge B, Bönisch H (2007) Role of monoamine transporters for the selective neurotoxicity of DSP4. *6th Transport Colloquium in Rauschholzhausen* (Abstract)

Wenge B, Geyer J, Bönisch H (2008) Interactions of the anticholinergic drugs oxybutynin and trospium chloride with human organic cation transporters. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 377 (Suppl.1):11 (Abstract)

Wenge B, Bönisch H, Grabitzski J, Lochnit G, Schmitz B, Ahrend MHJ (2008) Separation of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis using cationic rehydrated strips. Electrophoresis 29:1511-1517

Wenge B, Bönisch H (2008) *N*-ethylmaleimide differentially inhibits substrate uptake by and ligand binding to the noradrenaline transporter. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (DOI 10.1007/s00210-008-0272-0)

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Heinz Bönisch für das Überlassen dieses vielseitigen und interessanten Themas und die stets hervorragende Betreuung. Das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Freiheiten während der wissenschaftlichen Arbeit habe ich sehr zu schätzen gewusst.

Herrn Prof. Dr. M. Göthert danke ich für die Möglichkeit eine Dissertation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie anzufertigen und für seine Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Mohr danke ich herzlich für die Übernahme der Betreuung dieser externen Doktorarbeit. Desgleichen danke ich Herrn Prof. Dr. Michael Wiese für die Übernahme des Koreferats.

Ebenfalls danke ich Frau Prof. Dr. Brigitte Schmitz für die freundliche Übernahme der Gutachtertätigkeit und die gute Zusammenarbeit bei der Publikation in *Electrophoresis*.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Michael Ahrend für die hervorragende und freundschaftliche Kooperation, die Unterstützung und die vielen Dinge, die ich von ihm lernte.

Für die ausgezeichnete und stets angenehme Zusammenarbeit danke ich allen Mitgliedern der eigenen Arbeitsgruppe, insbesondere: Natalie Lobes, Jutta Walstab, Gundula Hesse, Ralf Gilsbach, Christian Haberlandt, Sandra Combrink, Folkert Steinhagen und Michael Brüss.

Auch den Mitarbeitern der Feinmechanikwerkstatt, besonders Herrn Wilfried Ortmann, danke ich dafür, dass die vielen „Extrawünsche“, die bei der Entwicklung der Elektrophoreseapparatur aufkamen, so geduldig ertragen und erstklassig umgesetzt wurden.

Letztendlich möchte ich mich auch bei meinem Trainer und Lehrer Ulrich Pawlowski bedanken für das, was er mir mit auf den Weg gab.