

**Untersuchungen zur Interaktion zytoplasmatischer Proteine mit dem
Serotonintransporter**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich für Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Johann Wolfgang Goethe – Universität
in Frankfurt am Main

von
Urda Jess
aus Hamburg

Frankfurt 2000
(DF1)

Vom Fachbereich Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:

Gutachter:

Datum der Disputation:

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt habe und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Frankfurt, August 2000

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Heinrich Betz für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Labor anzufertigen sowie für seine vielen wertvollen Ratschläge zur Durchführung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Joachim Kirsch danke ich für den tatkräftigen Einsatz, den er bei den vielen Hilfestellungen und Diskussionen leistete und damit wesentliche Impulse bei der Durchführung der Arbeit gab; den einen oder anderen Espresso nicht zu vergessen.

Für die Einführung in das Thema und für seine freudige Diskussionsbereitschaft danke ich Herrn PD Dr. Patrick Schloss.

Den vielen Kollegen, insbesondere der Labore 202 und 205, Herrn Dr. Oussama El Far und Frau Dr. Dagmar Roth danke für die gute Zusammenarbeit, die vielen Hilfeleistungen und Diskussionen.

Frau Annette Trutzel, Frau Anja Niehuis, Frau Ina Bartnik, Frau Nicole Fürst, Frau Silke Fuchs, Frau Dagmar Magalei und Frau Christina Thum möchte ich besonders für die unterschiedlichsten technischen Zuarbeiten danken.

Herrn Prof. Dr. Heinrich Betz, Herrn Prof. Dr. Joachim Kirsch, Herrn PD Dr. Patrick Schloss und Frau Dr. Dagmar Roth danke ich für kritisches Lesen und Kommentieren dieser Arbeit.

Eine große Hilfe waren meine Eltern, denen für die mutmachenden Worte, die angebotene und geleistete Hilfe, nicht nur in bezug auf diese Arbeit, gedankt sei.

Walter danke ich herzlich für seinen fortwährenden Beistand, seine Geduld, die vielen aufmunternden Worte und die schönen "Pfalzfluchten", die zu dem Gelingen der Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Die plasmamembranständigen Neurotransmittertransporter	5
1.2	Der Neurotransmitter Serotonin	7
1.3	Der Serotonintransporter SERT	9
1.3.1	Der Transportmechanismus	10
1.3.2	Die Struktur des SERT	12
1.3.3	Die Regulation des Transportvorgangs	14
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	16
2.	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	Materialien	18
2.1.1	Chemikalien und Enzyme	18
2.1.2	Puffer und Lösungen:	19
2.1.3	Zelllinien, Bakterien- und Hefestämme	25
2.1.4	Antikörper	26
2.1.5	Oligonukleotide	27
2.2	Methoden	30
2.2.1	Zellbiologische Methoden	30
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	31
2.2.3	Biochemische Arbeitsmethoden	38
2.2.4	Immunologische Methoden	44
3.	ERGEBNISSE	47
3.1	Analyse der Funktion der SERT-Termini	47
3.1.1	Biochemischer Nachweis der rekombinanten Expression der Deletionsproteine	48

3.1.2	Untersuchungen zur Funktionalität der heterolog exprimierten Deletionskonstrukte	50
3.1.3	Immunzytochemischer Nachweis der Expression des SERT und der Deletionsmutanten	51
3.2	Identifizierung von zytoplasmatischen Interaktionspartnern des SERT	53
3.3	Verifizierung der Interaktion zwischen der PAF-AH und dem SERT-CT	60
3.3.1	Biochemischer Nachweis der Interaktion zwischen der PAF-AH und dem SERT-CT	62
3.3.2	Immunzytochemischer Nachweis für die Interaktion zwischen β PAF-AH und SERT-CT	64
3.3.3	Untersuchung der physiologischen Funktion der Bindung der PAF-AH- β -Untereinheit an den SERT	66
3.4	Analyse der Interaktion zwischen MacMARCKS und dem SERT-CT	69
3.4.1	Biochemischer Nachweis der Interaktion zwischen MacMARCKS und dem SERT-CT	71
3.4.2	Immunzytochemischer Nachweis einer möglichen Interaktion	76
3.5	Physiologische Relevanz der Interaktion zwischen MacMARCKS und dem SERT	77
3.5.1	Funktionelle Konsequenzen der Coexpression von MacMARCKS und SERT	78
4.	DISKUSSION	83
4.1	Funktionsanalysen der Termini	83
4.2	Identifizierung von neuen Bindungspartnern des SERT-CT	85
4.2.1	Die PAF-AH1b- β -Untereinheit als potentieller Bindungspartner des SERT	86
4.2.2	Nachweis der Interaktion und physiologische Relevanz zwischen dem SERT und der PAF-AH1b- β -Untereinheit	89
4.2.3	Modell der PAF-AH als Acetyl-Transferase	90
4.2.4	MacMARCKS als putativer Interaktionspartner	92
4.2.5	Nachweis einer Interaktion des SERT mit MacMARCKS	93
4.2.6	Physiologische Bedeutung der Interaktion des SERT und MacMARCKS	94
5.	ZUSAMMENFASSUNG	98
6.	ANHANG	103
7.	LITERATURVERZEICHNIS	121

1. Einleitung

Glück, Traurigkeit, Euphorie, Frustration, Wut, Angst oder Verzweiflung prägen wesentlich das Leben jedes Menschen. Die individuellen Reaktionsweisen auf verschiedene Situationen formen unseren Charakter. Die unterschiedlichsten emotionalen Antworten auf äußere Einflüsse werden durch besondere Schaltkreise im Gehirn gesteuert. Dies wird besonders an psychogenen Substanzen deutlich, die ein weites Spektrum von Medikamenten bis hin zu Rauschmitteln abdecken und Emotionen oder Sinneswahrnehmungen zu manipulieren vermögen. Denn die Wirkorte dieser oft als Psychopharmaka eingesetzten Substanzen sind die grundlegenden Bausteine dieser Schaltkreise, die Nervenzellen (Neurone). Visuelle oder sensorische Reize werden aus der Umwelt durch das periphere Nervensystem (PNS) aufgenommen und an das zentrale Nervensystem (ZNS), das aus Rückenmark und Gehirn besteht, weitergeleitet. Im Gehirn werden diese Reize koordiniert und in Form einfacher motorischer oder unterschiedlicher kognitiver bzw. motivational geprägter Verhaltensweisen wiedergegeben. Die Integration der Reize in komplexe Verhaltensweisen garantiert ein komplexes Netzwerk aus 100 Milliarden Neuronen im ZNS. In diesem Netzwerk sind die einzelnen Neurone zu funktionellen Gruppen angeordnet und präzise untereinander und mit Sinnes- und Erfolgsorganen verknüpft. Die Fähigkeit unseres Nervensystems vielschichtige Verhaltensreaktionen zu steuern, liegt in der Präzision und Effizienz der Verknüpfungen der Neurone, nicht aber in der Vielzahl verschiedener neuronaler Zelltypen, begründet.

Generell ist das Nervensystem aus nur zwei Zelltypen aufgebaut: der Glia und den Neuronen. Die Gliazellen kommen im ZNS 10 - 50 mal häufiger vor als Neurone und werden in mehrere Untergruppen verschiedener Struktur und Funktion unterteilt. Neben einigen weiteren, bisher nicht vollkommen geklärten Funktionen nehmen sie hauptsächlich Nähr- und Stützfunktionen wahr. Dagegen weisen alle Neurone, obwohl sie anatomisch recht unterschiedlich aussehen können, einen grundsätzlich ähnlichen Bauplan auf. So ist der Aufbau der Neurone durch einen besonderen Zellkörper (Perikaryon) und Fortsätze (Axone und Dendriten) charakterisiert, mit deren Hilfe Kontakte zu Nachbarzellen aufgenommen werden. Das Axon als verlängerter Hauptfortsatz mit einer Länge von 0.1

mm - 2 m, endet in einer Verdickung, der präsynaptischen Endigung, die wiederum Kontakte mit Perikaryen oder Dendriten anderer Nervenzellen oder verschiedenen Erfolgsorganen, wie z. B. Muskel- oder Sinneszellen, knüpft. Diese Verknüpfungsstellen sind die Synapsen, Orte der Zellkommunikation zwischen Neuronen oder Neuronen und ihren Effektorzellen.

Die Informationen, die von den Neuronen verarbeitet und übermittelt werden, treten im Nervensystem einheitlich in Form elektrischer Signale auf. Sie werden als sog. "Aktionspotentiale" wellenförmig am Axon entlang zur Synapse geleitet, um hier auf das nachfolgende Neuron übertragen zu werden. Je nach Übertragungstyp unterscheidet man zwei Typen von Synapsen, elektrische und chemische. Elektrische Synapsen leiten Aktionspotentiale über "gap junctions" (Nexen) direkt von einer Zelle auf die andere über. Die Reizleitung dieser Synapsen ist ungerichtet, d. h. zwei gekoppelte Zellen können sich gegenseitig erregen. Die elektrischen Übertragungen an diesen Synapsen sind schneller als die an den bisher bekannten chemischen Synapsen. Letztere sind durch einen komplexeren Aufbau gekennzeichnet, der sich in die präsynaptische Endigung, den synaptischen Spalt und die postsynaptische Membranspezialisierung gliedert (Abb. 1.1).

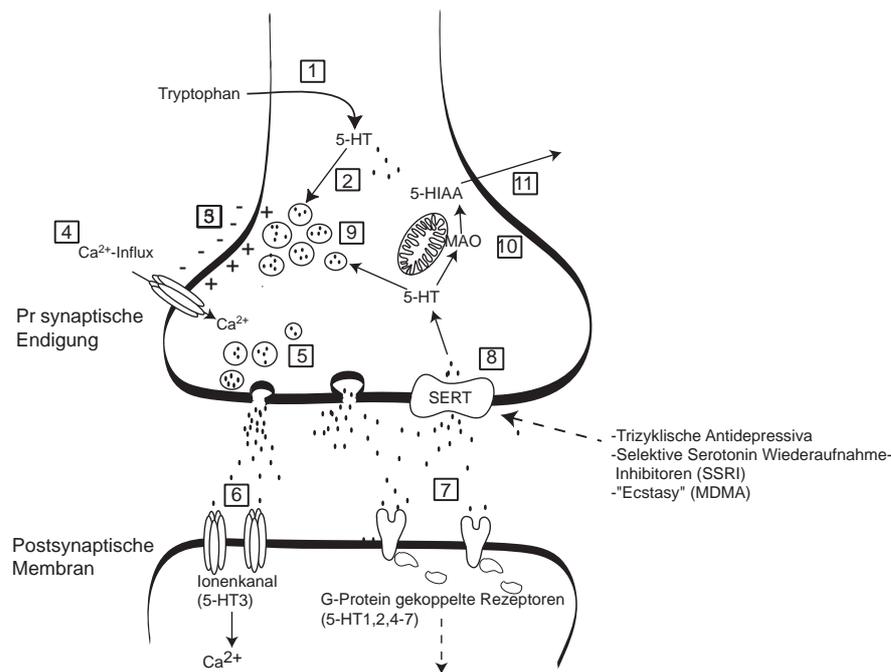


Abb. 1.1: Aufbau und Funktion einer chemischen Synapse. Beispielhaft wurde eine serotonerge Synapse dargestellt. Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) wird im Zytoplasma in zwei Reaktionsschritten aus Tryptophan synthetisiert, welches durch spezifische Transportproteine in die Zelle aufgenommen wird (1). Vesikuläre Transportproteine nehmen den Neurotransmitter in die synaptischen Vesikel auf (2). Eine Depolarisation (3) der präsynaptischen Membran bewirkt einen Ca^{2+} -Einstrom über spannungabhängige Ionenkanäle (4), was zur Fusion der synaptischen Vesikel mit der präsynaptischen Membran und damit zur Exozytose des Neurotransmitters führt (5). Die Transmitter diffundieren an die postsynaptische Membran und aktivieren dort ionotrope (z. B. 5-HT₃-Rezeptoren) (6) oder metabotrope Rezeptoren (z. B. 5-HT_{1,2,4-7}-Rezeptoren) (7), wodurch eine postsynaptische Antwort erzielt wird. Durch Wiederaufnahme in die präsynaptische Endigung über spezifische Transportproteine, z. B. den Serotonintransporter (SERT), werden die Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt entfernt (8). Oft sind Neurotransmittertransporter Wirkort für neuromodulatorische Substanzen, z. B. für Drogen oder Antidepressiva. Die Transmittermoleküle werden erneut über vesikuläre Transportproteine in die synaptischen Vesikel aufgenommen (9) und stehen wieder für eine Freisetzung zur Verfügung. Das zytoplasmatische 5-HT kann auch durch die Monoaminoxidase (MAO) zu Hydroxyindolacetat (HIAA) abgebaut werden (10), welches anschließend in den Extrazellulärraum transportiert wird (11).

Der synaptische Spalt ist mit extrazellulärer Flüssigkeit gefüllt, die nur geringe elektrische Leitfähigkeit besitzt. Für die Weiterleitung der Erregung über den synaptischen Spalt dienen daher spezielle chemische Botenstoffe, die Neurotransmitter. Die Neurotransmitter liegen in synaptischen Vesikeln angereichert in der präsynaptischen Endigung vor. An definierten Bereichen der präsynaptischen Membran, den sogenannten aktiven Zonen, können diese Vesikel an definierte Membranproteine binden. Erreicht ein Nervensignal die präsynaptische Endigung, bewirkt dies einen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die

präsynaptische Endigung durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle, die an der aktiven Zone angereichert sind. Die erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration löst eine Reihe von Reaktionen aus, in deren Folge es zu einer Fusion von Vesikel- und Plasmamembran kommt und damit zur exozytotischen Ausschüttung des Vesikelinhalts in den synaptischen Spalt. Die dabei u. a. freigesetzten Neurotransmitter diffundieren durch den synaptischen Spalt an die postsynaptische Membran, wo sie an spezifische Rezeptoren binden. Abhängig von der Art des Rezeptors wird das postsynaptische Neuron inhibiert oder aktiviert. Es werden prinzipiell zwei Arten von postsynaptischen Rezeptoren unterschieden, ionotrope und metabotrope Rezeptoren. Die Bindung eines Neurotransmitters an einen ionotropen Rezeptor bewirkt dessen Konformationsänderung zu einer Pore, wodurch ein kurzer Ionenfluß durch die Membran erfolgt. Abhängig von der Ionenselektivität der Pore kann die Postsynapse durch Bindung der Neurotransmitter Glycin oder γ -Aminobutyrat (GABA) gehemmt (inhibitorische Synapse), oder aber durch Bindung von Glutamat bzw. Acetylcholin (nACh) erregt (exzitatorische Synapse) werden. Inhibitorische Rezeptoren wirken für Cl^- -Ionen selektiv und hyperpolarisieren damit die postsynaptische Membran. Exzitatorische Rezeptoren wirken selektiv für Na^+ -Ionen und depolarisieren daher die postsynaptische Membran.

Die metabotropen Rezeptoren sind an heterotrimere G-Proteine gekoppelt, welche die Aktivierung der Ionenkanäle indirekt über verschiedene Signaltransduktionswege erzielen. Neurotransmitter, die an diese Rezeptoren binden, wie das Indolamin Serotonin oder die Katecholamine Dopamin und Noradrenalin, bewirken über eine Enzymkaskade die Aktivierung von Adenylat-Zyklase oder Phospholipase C, die wiederum ihrerseits Kinasen aktivieren und so die Depolarisation der postsynaptischen Membran hervorrufen. Einige Neurotransmitter, z. B. Serotonin, Acetylcholin, GABA oder Glutamat können beide Rezeptorsysteme nutzen.

Zur Beendigung der Neurotransmission werden die Transmitter aus dem synaptischen Spalt entfernt. Für den Neurotransmitter Acetylcholin geschieht dies durch Spaltung in Acetat und Cholin durch das Enzym Acetylcholinesterase. Cholin wird anschließend über ein hochaffines Transportsystem wieder in die Zelle aufgenommen (Okuda et al., 2000). Alle anderen klassischen Transmitter werden durch plasmamembranständige Transportproteine direkt in die präsynaptische Endigung oder in umliegende Gliazellen aufgenommen

(Übersichtsartikel Schloss et al., 1994; Nelson, 1998). In der Nervenendigung konzentrieren vesikuläre Transportproteine die Transmittermoleküle wieder in synaptischen Vesikeln, womit sie für eine erneute Freisetzung zur Verfügung stehen (Übersichtsartikel Edwards, 1992; Henry et al., 1994; Schuldiner, 1996; Lester et al., 1996 Gasnier, 2000;).

1.1 Die plasmamembranständigen Neurotransmittertransporter

Die Neurotransmitter werden gegen ihren Konzentrationsgradienten in das Zytoplasma aufgenommen. Die Energie für diese Anreicherung wird durch den Cotransport von Na^+ entlang seines elektrochemischen Gradienten zur Verfügung gestellt (Übersichtsartikel Lester et al., 1994). Das zytoplasmatische Na^+ wird durch die plasmamembranständige Na^+ - K^+ -ATPase wieder aus der Zelle entfernt. Unter bestimmten Bedingungen, z. B. bei Änderung des Membranpotentials und der damit einhergehenden notwendigen Neueinstellung des Ionengleichgewichts, kann der Transporter in entgegengesetzter Richtung den Neurotransmitter in den synaptischen Spalt freisetzen (Efflux) (Nicholls und Attwell, 1990; Attwell et al., 1993). Diese Art der Freisetzung von Neurotransmittern findet im Gegensatz zu dem oben beschriebenen exozytotischen Mechanismus Ca^{2+} -unabhängig statt.

Einige Neurotransmittertransporter werden nicht ausschließlich neuronal, sondern auch glial exprimiert. Während erstere für eine schnelle Signalbeendigung zuständig sind, scheinen die glialen Transporter die extrazelluläre Konzentration der Aminosäuren zu beeinflussen und dadurch an der Modulierung der neuronalen Erregbarkeit mit beteiligt zu sein. So konnte gezeigt werden, daß eine primär glial exprimierte Isoform des Glycintransporters (GLYT1) mit dem sog. N-methyl-D-Aspartat (NMDA)-Subtyp von Glutamatrezeptoren colokalisiert (Smith et al., 1992). Glycin wirkt als Co-Agonist von Glutamat (Kleckner und Dingledine, 1988) und erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit der NMDA-Rezeptoren. Die Transportaktivität des GLYT1 scheint die lokale Glycinkonzentration an der Synapse zu regulieren, so daß hierüber die Funktion des NMDA-Rezeptors moduliert werden kann (Bergeron et al., 1998). Inwieweit hierbei GLYT1 die Signaltransduktion durch Wiederaufnahme von Glycin beendet oder Glycin durch umgekehrten Transport in den synaptischen Spalt entläßt, ist ungeklärt.

Man unterscheidet heute aufgrund ihrer Ionenabhängigkeit und Molekularstruktur zwei plasmamembranständige Transporterfamilien, die exzitatorischen Aminosäuretransporter (EAAT) (Übersichtsartikel Nicholls und Attwell, 1990; Kanner, 1996) und die Na^+/Cl^- -abhängigen Transporter (Rudnick und Clark, 1993). Zur Gruppe der EAAT zählen vier Subtypen von Glutamattransportern (Storck et al., 1992; Pines et al., 1992; Kanai und Hediger, 1992; Fairman et al., 1995) sowie ein neuronaler Aminosäuretransporter (ASCT1), der für Alanin, Serin und Cystein selektiv ist (Arriza et al., 1993). Gestützt auf Hydropathieanalysen wurden 6 - 10 membranspannende α -Helices mit zytoplasmatischen Amino(N)- und Carboxy(C)-Termini vorhergesagt. Die chemische Modifikation substituierter Cysteine in verschiedenen Membrandomänen hat diese hypothetische Struktur kürzlich bewiesen (Seal et al. 2000). Die Glutamattransporter benötigen zum Substrattransport neben Na^+ -Cotransport auch K^+ für den Gegentransport.

Die Familie der Na^+/Cl^- -abhängigen Transporter umfaßt eine weit höhere Zahl von Membranproteinen. Die biochemische Reinigung des GABA-Transporters (GAT1) der Ratte zeigte ein Protein mit einem Molekulargewicht von 80 kD (Radian et al., 1986). Die Ansequenzierung des Proteins ermöglichte 1990 die Klonierung des ersten Neurotransmittertransporters (Guastella et al., 1990). Expressionsklonierung und die Amplifikation homologer Sequenzen durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) erlaubte die Isolierung weiterer cDNAs, die Neurotransmittertransporter für Noradrenalin (Pacholczyk et al., 1991), Serotonin (Mayser et al., 1991; Blakely et al., 1991; Ramamoorthy et al., 1993; Corey et al., 1994), Dopamin (Shimada et al., 1991; Kilty et al., 1991), Cholin (Okuda et al., 2000), Glycin (zwei Subtypen) (Liu et al., 1992; Guastella et al., 1992; Adams et al., 1995) sowie GABA (4 Subtypen) (Guastella et al., 1990; Liu et al., 1993) kodierten. Ein Vergleich der aus der cDNA hergeleiteten Aminosäuresequenzen zeigte signifikante Identitäten auf Aminosäureebene (30 - 65 %) und ordnete diese Neurotransmittertransporter einer gemeinsamen Genfamilie zu.

Die computergestützte Hydropathievorhersage legt eine gemeinsame Membrantopologie mit 12 Transmembransegmenten, zytoplasmatischen N- und C-Termini sowie einer großen extrazellulären Schleife zwischen der dritten und vierten Transmembrandomäne nahe (Abb. 1.2).

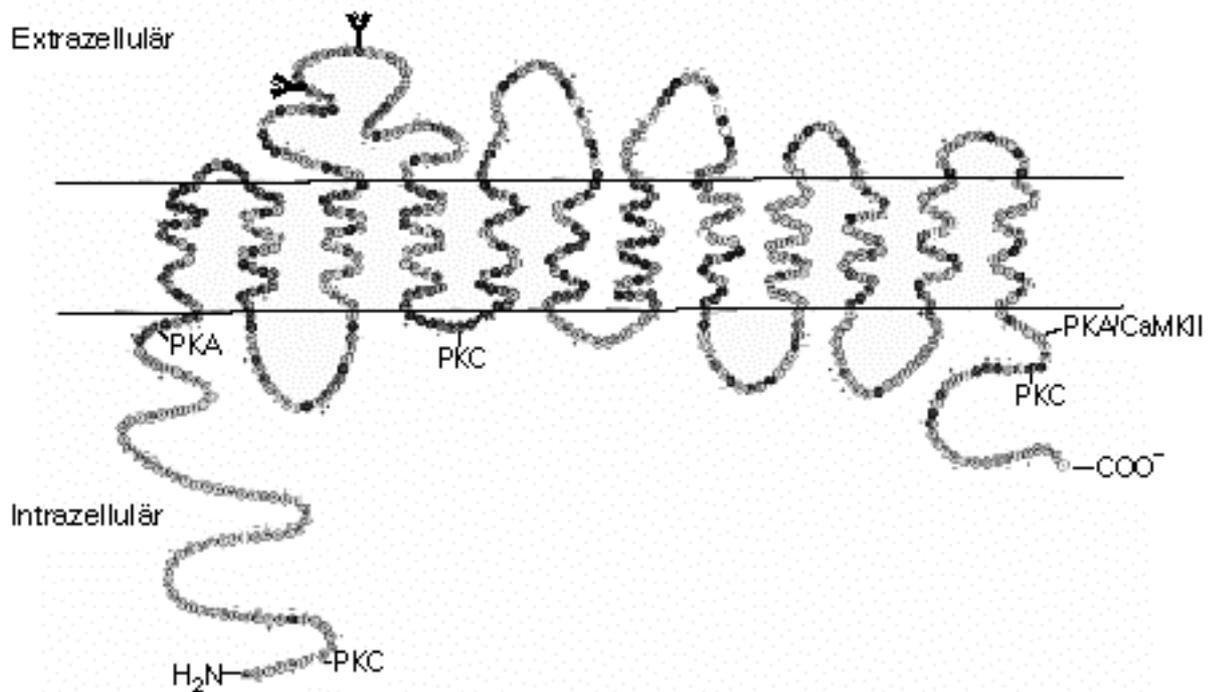


Abb. 1.2: Transmembrantopologie der Na^+/Cl^- -abhängigen Neurotransmittertransporter am Beispiel des Serotonintransporters SERT. Die große erste extrazelluläre Schleife trägt zwei konservierte Glykosylierungsstellen (Y). Potentielle Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C, A (PKC, PKA) oder für die Calmodulin(CaM)-abhängige Kinase (CaMKII) sind aufgezeigt. Die grau hinterlegten Buchstaben markieren in Monoamintransportern (Transportproteine für Serotonin, Dopamin oder Noradrenalin) konservierte Aminosäuren, während schwarz markierte Buchstaben unter den Na^+/Cl^- -abhängigen Neurotransmittertransportern konservierte Aminosäuren wiedergeben.

1.2 Der Neurotransmitter Serotonin

In den 30er und 40er Jahren wurde von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen aus Blutserum und der Mucosa des Gastrointestinaltraktes eine Substanz isoliert, die eine blutdrucksteigernde Wirkung bzw. eine starke Kontraktion der glatten Muskulatur bewirkte. Nach ihrer Wirkung wurde sie Serotonin, bzw. nach ihrer chemischen Struktur 5-

Hydroxytryptamin (5-HT), genannt. Später wurde das 5-HT auch in der Milz, der Lunge, der Leber, der Haut, in Mastzellen, Thrombozyten und als Neurotransmitter in Neuronen nachgewiesen (Übersichtsartikel Feldman und Quenter, 1984).

Im ZNS sind serotonerge Zellkörper in den Raphekernen des Mesenzephalons lokalisiert (Kerngruppen B1 - B8). Von hier aus projizieren die Axone in weite Regionen des Gehirns, wie in den Kortex, in den Hypothalamus, in das limbische System (Steinbusch, 1981; Steinbusch, 1984) und in das Rückenmark (Skagerberg und Björklund, 1985). Diese weite Verbreitung serotonerger Neurone könnte die Beteiligung des 5-HT-Systems an zahlreichen zentralnervösen Funktionen erklären. Ein weiteres Charakteristikum der serotonergen Neurone, die in den größeren Raphekernen entspringen, ist das Vorkommen von Co-Modulatoren (Peptidhormone) (Glazer und Basbaum, 1984; Wessendorf und Elde, 1987; Wu und Wessendorf, 1992), wobei auch in anderen Arealen die Coexistenz von 5-HT mit "klassischen" Neurotransmittern wie GABA (Belin et al., 1983), Dopamin (Schotland et al., 1995) und Glutamat (Lavdas et al., 1997) diskutiert wird. Gleichzeitig verfügen diese Neurone ausgeprägte, synaptoides vesikelhaltige Axonanschwellungen ("Varikositäten"), die ähnlich der präsynaptischen Endigung das 5-HT in den extrazellulären Raum freizusetzen vermögen (Kosofsky und Molliver, 1987). Die vielerorts stattfindende Freisetzung von 5-HT in den extrazellulären Raum oder den Liquor macht eine exakte Festlegung serotonerg modulierter Zielneurone oft nicht möglich. Möglicherweise ist die Funktion des 5-HT daher eher in Form einer weitreichenden, extrasynaptischen Umfeldbeeinflussung als "Neuromodulator" zu verstehen (Heinrich et al., 1991).

Seinem breiten Auftreten und seiner neuromodulatorischen Eigenschaft entsprechend übt 5-HT eine Vielzahl unterschiedlichster physiologischer Funktionen aus. Hierzu gehören u. a. die Regulation des Blutdrucks, der zirkadianen Rhythmik, der Körpertemperatur und der Schmerzempfindung (Schotland et al., 1995). Als mitogene Substanz soll 5-HT die periphere Synaptogenese und später die Prozessierung sensorischer Stimuli regulieren (Lauder, 1993; Lee et al., 1999).

1943 konnte die chemische Struktur des Halluzinogens Lysergsäurediethylamid (LSD) entschlüsselt werden (Feldman und Quenter, 1984). Da die Struktur zu der des 5-HT ähnlich war, wurde vermutet, daß LSD seine psychotropen Effekte durch Beeinflussung des

serotonergen Systems ausübt. Hierauf begründete sich auch die Hypothese, daß 5-HT eine neuropsychopharmakologische Substanz darstellt, und auch heute wird eine verminderte Aktivität serotonerger Neurone für die Pathogenese affektiver Erkrankungen postuliert (Coppen, 1967). Letztere kennzeichnen sich durch depressive Stimmungen (Briley et al., 1980), Schlafstörungen, abnorme endokrine Funktionen, Angstzuständen (Goldman, 1996; Lesch et al., 1996) und eine verminderte motorische Aktivität (Gainetdinov et al., 1999). Ein Großteil der Symptome kann bei erkrankten Patienten durch die Gabe klassischer trizyklischer Antidepressiva (TCA), wie z. B. Imipramin, oder von selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitoren (SSRI), wie Citalopram und Fluoxetin, aufgehoben oder gelindert werden (Übersichtsartikel Schloss und Williams, 1998; Schafer, 1999). Diese Substanzen wirken als kompetitive Inhibitoren des Serotonintransporters SERT. Durch die Blockade des Substrattransports wird eine Erhöhung der extrazellulären Serotonin-Konzentration erzielt, wodurch die verminderte Aktivität der serotonergen Neurone kompensiert wird. Auch psychotrope Drogen, wie z. B. Kokain, wirken nach diesem Prinzip (Ramamoorthy et al., 1993; Corey et al., 1994). So wird auch eine veränderte Transportaktivität des SERT für die Auslösung affektiver Erkrankungen verantwortlich gemacht. Neben Depressionen und Angstzuständen (Lesch et al., 1996) wird eine Beteiligung des SERT auch an neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Parkinson- und Alzheimer-Krankheit (Raisman et al., 1986; Li et al., 1997;) sowie bei Schizophrenie (Dean et al., 1995) postuliert.

1.3 Der Serotonintransporter SERT

Der SERT wurde bisher aus dem Gewebe des Menschen (Ramamoorthy et al., 1993), der Ratte (Mayser et al., 1991; Blakely et al., 1991; Hoffman et al., 1991), der Maus (Chang et al., 1996), des Rinds (Mortensen et al., 1999) und der Taufliege *Drosophila melanogaster* (Corey et al., 1994) kloniert. Der weiten Verbreitung des 5-HT entsprechend, wird der SERT auch im ZNS sowie in Blutplättchen, in den Endothelzellen der Lunge und des Verdauungstrakts (Hoffman et al., 1997), in der Haut, im Nebennierenmark (Schroeter et al., 1997) und in Synzytiotrophoblasten der Plazenta (Balkovetz et al., 1989) exprimiert. In frühen Stadien der Embryonalentwicklung wird der SERT auch in Neuralleistenzellen

detektiert (Hansson et al., 1999). Im PNS wird die SERT-mRNA sowohl in den sensorischen Ganglien als auch in deren Zielzellen, den Neuroepithelzellen, detektiert (Hansson et al., 1999). Da die Applikation von 5-HT-Wiederaufnahmeinhibitoren in frühen Stadien der Entwicklung kraniofaziale und kardiale Fehlbildungen induziert, wird eine Beteiligung des SERT an der Regulation der mitogenen Effekte des 5-HT postuliert (Lauder et al., 1988; Kirby und Waldo, 1995). Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, daß der SERT in der frühen Entwicklung des ZNS in glutamatergen Neuronen einiger Areale des Cortex transient exprimiert wird (D'Amato et al., 1987; Bruning und Liangos, 1997; Lebrand et al., 1998). Die hierdurch erzielte "ektopische" Aufnahme von 5-HT erwies sich für die korrekte Synaptogenese dieser glutamatergen Neurone als unabdingbar (Lebrand et al., 1996; Hansson et al., 1998; Upton et al., 1999).

1.3.1 Der Transportmechanismus

Heterologe Expression des SERT in HeLa-Zellen belegt, daß allein dieses Protein die schnelle Na^+ - und Cl^- -abhängige und selektive Akkumulation von 5-HT vermittelt (Ramamoorthy et al., 1993). Während Cl^- -Ionen durch Br^- und, in geringerem Maße, durch SCN^- oder NO_2^- ersetzt werden kann, wird extrazelluläres Na^+ für den 5-HT-Transport unbedingt benötigt (Sneddon, 1969; Rudnick, 1977; Nelson und Rudnick, 1982). Zusätzlich sollte für einen effektiven 5-HT-Transport intrazelluläres K^+ , das ebenfalls durch intrazelluläre Protonen ersetzt werden kann (Keyes und Rudnick, 1982), für den Gegentransport vorliegen (Nelson und Rudnick, 1979; Mager et al., 1994). Der Substrattransport wird als eine Abfolge alternierender Konformationsänderungen der Untereinheiten diskutiert. Dabei führt die Bindung von 5-HT mit Na^+ und Cl^- an die extrazellulär exponierten Bindungszentren zu einer Konformationsänderung des SERT mit anschließender Freisetzung der Substrate in das Zytoplasma. Anschließende Bindung von K^+ im Zellinneren bewirkt eine Rückkehr in den Ausgangszustand, um einen neuen Transportzyklus zu beginnen (Abb. 1.3) (Schloss und Williams, 1998).

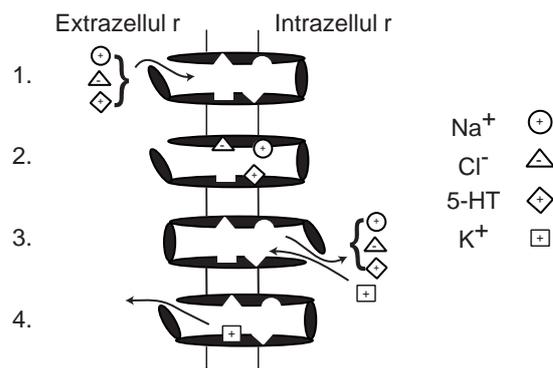


Abb. 1.3: Modell zum Mechanismus des 5-HT-Transports. Na⁺, Cl⁻ und 5-HT binden an extrazellulär zugängliche spezifische Bindungsstellen (1, 2). Die Translokation erfolgt durch Konformations-änderung, wobei die Substrate in das Zytoplasma freigesetzt werden (3). Intrazelluläres K⁺ besetzt dann eine spezifische Bindungsstelle und wird nach erneuter Konformationsänderung des Proteins in den Extrazellulärraum freigesetzt (4).

Für Transportprozesse unter hohen extrazellulären 5-HT-Konzentrationen (1 mM), wie sie in der Synapse auftreten können, wird dagegen eine 5-HT-permeable Kanalstruktur des SERT postuliert. Vermutlich bildet der oligomere SERT unter diesen Bedingungen eine Na⁺- und 5-HT-permeable Pore aus (Petersen und DeFelice, 1999).

Da 5-HT in einem protonierten Zustand vorliegt und die weiteren Ionen in einem äquimolaren Verhältnis transportiert werden, sollte ein elektroneutraler Transport stattfinden. Jedoch haben Mager et al. (Mager et al., 1994) an Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* neben einem substratabhängigen Strom auch in Substratabwesenheit einen von der Stromstärke abhängigen transienten Strom sowie einem Leckstrom gemessen. Es wird vermutet, daß der elektrogene Transport durch Na⁺-Ionen hervorgerufen wird, die den SERT passieren, ohne aktiv transportiert zu werden. Diese Situation weist eine gewisse Ähnlichkeit zu Ionenkanälen auf und deckt sich daher mit der Hypothese, daß der SERT unter hohen extrazellulären Substratkonzentrationen als Pore fungiert (Petersen und DeFelice, 1999; Galli et al., 1997). Selbiges wurde bereits für den Noradrenalintransporter (NET) und einen Glutamattransporter (EAAT4) aufgezeigt (Fairman et al., 1995; Galli et al., 1998), weshalb vermutet wird, daß diese Mechanismen unter den Neurotransmittertransportern konserviert sind (Lester et al., 1996; Sonders und Amara, 1996).

Neben seiner Wiederaufnahmeaktivität ist der SERT auch in der Lage, den Efflux von 5-HT zu katalysieren (Levi und Raiteri, 1993). Dieser Vorgang, der durch trizyklische Antidepressiva blockiert werden kann, wird durch internes Na^+ sowie durch Cl^- und externes K^+ stimuliert. Auch diverse psychotrope Substanzen wie Amphetamine, z. B. *p*-Chloroamphetamin (PCA) (Rudnick und Wall, 1992b) oder 3,4-Methylenedioxyamphetamin (MDMA, "Ecstasy") (Rudnick und Wall, 1992b), vollziehen ihre Wirkung durch eine Umkehr des Transportvorgangs (Nicholls und Attwell, 1990; Attwell et al., 1993; Jones et al., 1998). Als Liganden des SERT werden protonierte Amphetamine in die Zelle aufgenommen, wo sie nach intrazellulärer Freisetzung eines Protons hochgradig lipophil werden und direkt durch die Membran in das Extrazellulärmedium zurückdiffundieren. Der Eintritt des Amphetamins ist sowohl an den Cotransport von Na^+ und Cl^- als auch an den Gegentransport von K^+ gekoppelt. Die unidirektionale Nutzung des Transporters nur für den Influx führt zu einer Zunahme der verfügbaren intrazellulären 5-HT-Bindungsstellen. Zusammen mit dem reduzierten Ionengradienten kommt es zum Efflux von 5-HT (Rudnick und Wall, 1992a). Die Neurotoxizität der Amphetamine *in vivo* scheint auf der Auflösung des Ionengradienten und der Ansäuerung des Zytoplasmas zu beruhen.

1.3.2 Die Struktur des SERT

Als Mitglied der Proteinfamilie der Na^+/Cl^- -abhängigen Neurotransmittertransporter zeigt der neuronale SERT auf Aminosäureebene 40 - 50 % Sequenzidentität zu weiteren Mitgliedern dieser Gruppe. Die computerabgeleitete Membrantopologie der zwölf putativen Transmembransegmente und intrazellulären N- und C-Termini (vgl. Abb. 1.1) wurde für den SERT durch Biotinylierungsstudien bestätigt (Chen et al., 1998). Die konservierten N-Glykosylierungsstellen in der großen extrazellulären Schleife zwischen Transmembran-domäne drei und vier werden genutzt, wie die Affinität des Transporters zu Lektin zeigt (Radian et al., 1986; Biessen et al., 1990). Diese Modifikation ist für eine effiziente und stabile Expression des Transporters in der Plasmamembran, nicht jedoch für Ligandenbindung und Substrattransport notwendig (Tate und Blakely, 1994). Hinweise auf die funktionellen Domänen des SERT wurden durch verschiedene Mutageneseansätze gewonnen. So wurden die extrazellulären Domänen des SERT durch Sequenzen des NET,

der die höchste Homologie zum SERT aufweist, ersetzt. Dieser chimäre Transporter weist eine sehr niedrige Transportrate (5 - 10 % des Wildtyps), aber normale Bindungseigenschaften für 5-HT, Na⁺ und den Wiederaufnahmeinhibitoren Paroxetin und Desipramin auf (Stephan et al., 1997; Smicun et al., 1999). Vermutlich werden die transportabhängigen Konformationsänderungen von diesen Chimären nicht mehr ausgeführt. Die putativen extrazellulären Domänen sind demnach direkt an der Konformationsänderung beteiligt und nicht nur als passive Verbindungsstücke anzusehen.

Die Konstruktion einer Chimäre aus dem 5-HT-Transporter der Ratte und des Menschen, die unterschiedliche Affinitäten für trizyklische Antidepressiva und Amphetamine aufweisen, erlaubte die Lokalisierung der Ligandenbindungsstelle an die distale Region der Sequenz (Barker et al., 1994). Anschließende Mutagenesestudien identifizierten eine Aminosäure in der 11. Transmembrandomäne (S545A), die an der Imipraminbindung und der Kationenselektivität des Transporters beteiligt ist (Sur et al., 1997). Auch Aminosäurereste der 7. membranspannenden Domäne konnten eine Funktion bei der Na⁺-Bindung oder der Kopplung der Na⁺-Bindung an spätere Zyklen des Transportprozesses zugeordnet werden (Penado et al., 1998). Dagegen wurde der proximale Anteil des Transporters mit Substrat- und Kokainbindung sowie dem Translokationsmechanismus assoziiert. Mittels Aminosäureaustausch im dritten α -helikalen Segment und der anschließenden Modifikation dieser Aminosäuren durch [2-(Trimethylammonium)ethyl]methanthiosulfonat (MTSEA) wurde gezeigt, daß die Aminosäure I172 nahe der Substratbindungstasche positioniert ist, wo sie alternierend dem externen Medium und dem Zytoplasma exponiert vorliegt. Die Aminosäure I179, die nach Computeranalysen die gleiche Orientierung wie I172 aufweisen soll und von diesem durch zwei Helixumdrehungen getrennt ist, erscheint dagegen an dem Translokationsprozess beteiligt (Chen et al., 1997; Chen und Rudnick, 2000).

Wie bereits erwähnt, vermag der SERT sein Substrat sowohl durch Translokation, als auch als Kanal in die Zelle zu transportieren. Während der Translokationsprozess durch die Interkonversion eines Proteins von einem externen zu einem internen Substratbindungszustand vollzogen werden kann, stellt man sich den Aufbau einer Kanalpore als Zusammenlagerung mehrerer Proteinuntereinheiten vor, deren einzelne Transmembrandomänen die Pore formieren. Die Oligomerisierung des SERT wurde durch

mehrere Studien nachgewiesen. Zum einen wurde die inhibierende oder stimulierende Aktivität gemessen, die sich aus der Coexpression des SERT mit einer transportdefekten Mutante oder aus der Fusionierung der cDNA des Wildtyp-Proteins mit der transportdefekten Mutante zu einem Tandemprotein ergab (Chang et al., 1998). Zum anderen legten Coimmunpräzipitationsanalysen verschiedener Epitop-markierter Polypeptide eine Assoziation mehrerer Untereinheiten, wahrscheinlich in Form eines Tetramers, nahe (Kilic und Rudnick, 2000). Die chemische Inaktivierung eines Epitop-markierten Konstrukts durch MTSEA gab zudem Hinweise darauf, daß der SERT zumindest als Dimer aktiv ist, und daß diese Dimere in weitere hocholigomere Formen assemblieren (Kilic und Rudnick, 2000). Zu dieser Arbeit vorhergehenden Quervernetzungsstudien mit Sulfhydryl-spezifischen "Crosslinkern" belegten, daß die einzelnen Untereinheiten des SERT durch Sulfhydrylgruppen stabilisiert werden (Jess et al., 1996).

1.3.3 Die Regulation des Transportvorgangs

Verschiedene pharmakologische Studien zeigten, daß der SERT durch mehrere Signaltransduktionswege reguliert wird. Die Analyse der Primärstruktur des SERT zeigte mehrere konservierte Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C (PKC) und der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) sowie eine Phosphorylierungsstelle für die Ca²⁺-Calmodulin-abhängige Kinase (CaMKII) (Kreegipuu et al., 1999). Bis auf eine PKC-Phosphorylierungsstelle in der zweiten intrazellulären Schleife sind die phosphorylierten Aminosäuren in den zytoplasmatischen N- und C-Termini lokalisiert (vgl. Abb. 1.1). Damit übereinstimmend zeigten verschiedene pharmakologische Untersuchungen an einer Chorionkarzinom-Zelllinie der Plazenta (JAR-Zellen), an Thrombozyten und an heterologen Expressionssystemen, daß der 5-HT-Transport kurzfristig durch mehrere Signaltransduktionswege reguliert werden kann. Bereits 1989 zeigten Meyers et al. (Myers et al., 1989), daß die Phorbolster-induzierte Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) die maximale Transportrate (V_{max}) des SERT reduziert. Diese Effekte wurden später auch an weiteren Zellsystemen (Anderson und Horne, 1992; Ramamoorthy et al., 1993), wie auch für die Transporter der Neurotransmitter GABA, Glycin, Dopamin und Noradrenalin (Sato et al., 1995a; Sato et al., 1995b; Huff et al., 1997; Qian et al., 1997) beobachtet. Erst durch

Biotinylierungsstudien wurde aber die reduzierte Transportaktivität mit einer verminderten Oberflächenexpression des Transportproteins korreliert. So bewirkt die PKC-Aktivierung die Umverteilung des SERT von der Plasmamembran in plasmamembrannahe Endosomen (Corey et al., 1994a; Qian et al., 1997). Dieser durch PKC-Inhibitoren reversible Vorgang wird allgemein als Sequestrierung bezeichnet. Wie Phosphorylierungsstudien an dem in HEK-293 Zellen heterolog exprimierten SERT zeigten, wird das Transportprotein infolge der PKC-Aktivierung posttranslational modifiziert (Blakely et al., 1998); die phosphorylierten Aminosäuren sind jedoch bislang nicht charakterisiert. Interessanterweise vermochte die Mutation aller putativer Phosphorylierungsstellen des SERT und des GLYT1b deren Sequestrierung nicht zu verhindern (Sato et al., 1995a; Sakai et al., 1997). Inwieweit die mutierten SERT-Proteine noch phosphoryliert werden, ist noch unklar. Entsprechend erscheint es als fraglich, ob die Sequestrierung des SERT und die Phosphorylierung in einem direkten Zusammenhang stehen. Allerdings sprechen für einen direkten Zusammenhang zwischen diesen zwei Prozessen neuere Untersuchungen von Ramamoorthy et al. (Ramamoorthy und Blakely, 1999), die zeigten, daß sowohl Sequestrierung als auch Phosphorylierung des SERT durch extrazelluläres Substrat oder durch Wiederaufnahmeinhibitoren blockiert werden können. Eine solche phosphorylierungsabhängige Regulation der Transporter-Oberflächenexpression könnte der Feineinstellung der Transportrate in Abhängigkeit von extrazellulärem Substrat dienen, um so den Anforderungen fluktuierender Neurotransmitterkonzentrationen zu genügen. Aus den Studien von Ramamoorthy et al. wird weiterhin ersichtlich, daß die Konformation des SERT, die von der extrazellulären Substratkonzentration abhängig ist, für den Zugang interagierender Proteine wie z. B. der PKC oder Proteine des Sequestrierungsapparats, kritisch ist.

Ähnlich der PKC-vermittelten Regulation induzierten auch Calmodulin (CaM)-Inhibitoren bzw. CaMKII-Inhibitoren eine Abnahme der V_{max} des SERT (Jayanthi et al., 1994). Dieser Effekt wurde auf eine reduzierte Affinität des Transporters für 5-HT und nicht auf die Sequestrierung des SERT zurückgeführt. Einen Anstieg der V_{max} des SERT konnten dagegen Miller et al. durch die sekundären Botenstoffe Stickoxyd (NO) und zyklisches Guanosin-5'-monophosphat (cGMP) in Folge einer Aktivierung von A_3 -Adenosin-Rezeptoren berichten (Miller und Hoffman, 1994). Die Phosphorylierung des SERT durch

die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) oder durch die CaMKII wurde bisher nicht gezeigt. Dieser Nachweis wurde für die zyklische Adenosin-5'-monophosphat (cAMP)-abhängige Proteinkinase 2A (PKA 2A) erbracht (Blakely et al., 1998). Im Gegensatz zu der PKC-vermittelten Phosphorylierung resultiert jedoch aus der PKA-vermittelten Phosphorylierung keine Veränderung der Transportrate (Blakely et al., 1998). Die physiologische Bedeutung der Phosphorylierung ist daher unklar. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Regulation des SERT durch viele, möglicherweise ineinandergreifende, Signaltransduktionswege erzielt wird, womit der SERT komplexen Regulationsmechanismen unterliegt.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Der Serotonintransporter SERT katalysiert die schnelle Beendigung der serotonergen Neurotransmission durch die schnelle Wiederaufnahme des Serotonins aus dem synaptischen Spalt in die Präsynapse. Neben dieser präsynaptischen Lokalisierung liegt der SERT auch axonal in Varikositäten der serotonergen Neurone vor. Wie Untersuchungen an postsynaptisch lokalisierten Proteinen zeigten, sind interagierende Proteine für deren Lokalisation und Akkumulation verantwortlich. Die molekularen Grundlagen für eine differentielle Lokalisation des SERT sind jedoch bislang unbekannt.

Verschiedene pharmakologische Studien zur Regulation des SERT lassen vermuten, daß der Neurotransmittertransporter mit Proteinen verschiedener Signaltransduktionswege interagiert. So führt die Aktivierung der PKC- und Ca^{2+} /CaM-Regulationswege zu einer Verringerung der V_{max} , während ein Anstieg der maximalen Transportrate des SERT durch eine Zunahme der intrazellulären Stickoxyd (NO)-Konzentration erzielt wird. Für die PKC, PKA und CaMKII liegen Konsensus-Phosphorylierungsmotive in den zytoplasmatischen Termini des SERT vor. Eine Phosphorylierung des SERT als Folge der PKC- und PKA-Aktivierung wurde bereits in einem zellulären Kontext verifiziert, eine direkte Interaktion des SERT mit einem regulatorischen Protein wurde aber bislang nicht berichtet. Die PKC-vermittelte Phosphorylierung geht mit der Sequestrierung des SERT von der Plasmamembran in das Zytoplasma einher. Die dadurch verminderte Oberflächenverfügbarkeit des SERT erklärt die reduzierte maximale Transportrate bei

gleichbleibender Substrataffinität. Hieraus kann gefolgert werden, daß die Serotoninaufnahme durch den SERT komplexen Regulationsmechanismen unterliegt.

Zu Beginn dieser Arbeit waren keine interagierenden Proteine des SERT oder weiterer Neurotransmittertransporter bekannt, welche die Lokalisation oder Regulation des SERT beeinflussen könnten. In dieser Arbeit sollten daher unter Verwendung des Zwei-Hybrid-Systems interagierende Proteine des SERT identifiziert werden. Das Zwei-Hybrid-System erlaubt die Identifikation schwacher Interaktionen zwischen zytoplasmatischen Proteindomänen in Hefezellen, gekoppelt mit der Isolierung der cDNA des putativen Bindungspartners. Hier sollte mit einer terminalen zytoplasmatischen Domäne des SERT eine Zwei-Hybrid-cDNA-Bibliothek aus dem Hirn der neugeborenen Ratte durchsucht werden. Hieraus erhaltene cDNA-Sequenzen, die für putative Interaktionspartner kodierten, sollten mit verschiedenen Datenbanken verglichen werden, um den putativen Interaktionspartner zu identifizieren und schließlich funktionell zu charakterisieren. Da in Hefezellen nachgewiesene Wechselwirkungen oft keine physiologische Relevanz bedeuten (Nishimune et al., 1996), mußte die Spezifität der Interaktion durch unabhängige Experimente verifiziert werden. Dazu waren zum einen biochemische Bindungsstudien an pro-oder eukaryotisch heterolog exprimierten Proteinen notwendig, zum anderen konnte die konfokale Analyse der heterolog coexprimierten Proteine Aufschluß auf die Relevanz der Interaktion *in vivo* geben. In dieser Arbeit wird die Isolierung und Charakterisierung von Proteinen beschrieben, die mit dem zytoplasmatischen C-Terminus des SERT interagieren.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien:

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von folgenden Firmen im Reinheitsgrad p.A. erworben: Gibco-RBL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haen (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen).

Restriktionsenzyme mit den entsprechenden Puffern stammten meist von Boehringer Mannheim.

Weitere Substanzen:

ECL Western-Blotting System:	Amersham (Braunschweig)
Milchpulver:	Neuform (Lüneburg)
Rotizint ECO Plus:	Roth (Karlsruhe)
CO ₂ , Argon:	Messer Griesheim (Frankfurt)

Anderes Verbrauchsmaterial

Zentrifugationsröhrchen	Beckman (München)
Plastikreaktionsgefäße	Eppendorf (München)
Gewebekulturschalen	Falcon (Heidelberg)
Plastikwaren	Greiner (Nürtingen)
"12-; 24-; 96-well" Platten	Costar (Bodenheim)
Biomax, MX Filme	Kodak (Hempstead)
Nitrozellulosemembran (0,45 µm Porendurchmesser)	Schleicher & Schuell (Dassel)
GF/C Glasfaserfilter, "Whatman Filterpapier"	Whatman (Wiesloch)
Gelelektrophoresezubehör und Feuchtblot-	

Kammer	BioRad (München)
<u>Radiochemikalien</u>	
[³ H]Imipramin (20 Ci/mmol)	Amersham (Braunschweig)
[³ H]Citalopram (85.5 Ci/mmol)	New England Nuclear (Dreieich)
[³ H]5-Hydroxytryptamin-Creatinsulfat (13.9 Ci/mmol)	Amersham (Braunschweig)

Geräte

Szintillationszähler,	
Ultrazentrifugen TLA100 und LC70	Beckman (München)
konfokales Mikroskop, Sarastro 2000	Molecular Dynamics (Sunnyvale; USA)
invertiertes konfokales Mikroskop	Leica (Bensheim)
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss (Oberkochen)
invertiertes Fluoreszenzmikroskop	Leica (Bensheim)
Tischzentrifuge	Heraeus (Hanau)
Zentrifugen	DuPont (Bad Homburg)
Titertek MCC340	ICN (Meckenheim)

Lösungen und Medien

Zur Herstellung der Lösungen wurde mit dem Milli-Q-Water-System (Millipore) entionisiertes Wasser verwendet.

2.1.2 Puffer und Lösungen:

Aufschlußpuffer

- 5 mM ATP
- 5 mM MgCl₂
- 500 mM KCl
- Proteaseinhibitoren-Cocktail "Compete" mit EDTA (Boehringer-Mannheim)
- 5 mM DTT
- in 1 x PBS

Bindungspuffer

- 5 mM DTT
- Proteaseinhibitoren-Cocktail "Compete" mit EDTA (Boehringer-Mannheim)
- in 1 x PBS

Coomassielösung

- 0,1% (w/v) Coomasie R250
- 50 % (v/v) Methanol
- 10 % (v/v) Acetat

Entfärberlösung

10 % (v/v) Acetat
50 % (v/v) Ethanol

Weichmacher

5 % (v/v) Glycerin
10 % (v/v) Ethanol

Laemmli-H Elektrophoresepuffer

0,25 M Tris/HCl
1,92 M Glycin
1 % (w/v) SDS

Ponceau S

0,2 % (w/v) Ponceau S
3 % (w/v) Trichloressigsäure

10 x PBS

1,3 M NaCl
40 mM Na₂HPO₄
14 mM KH₂PO₄
26 mM KCl, pH 7,3

Nicht-reduzierender Probenpuffer

0,0625 M Tris/HCl, pH 6,75
2 % (w/v) SDS
10 % (v/v) Glycerol
0,001 % (w/v) Bromphenolblau

Reduzierender Probenpuffer

Wie oben mit 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol

Solubilisierungspuffer

10 mM Tris pH 7,5
100 mM NaCl

TB1

100 mM NaCl
2 mM KCl
1 mM CaCl₂
1 mM MgCl₂
10 mM HEPES/Tris, pH 7,5

10 x TBE

1 M Tris/HCl, pH 8,0
890 mM Borsäure
25 mM EDTA

TBB

1 % (w/v) BSA
0,5 % (w/v) Milchpulver
0,1 % (w/v) TWEEN 20,
in 1 x TBS

10 x TBS

50 mM Tris/HCl, pH 8,0
150 mM NaCl

10 x TE

100 mM Tris/HCl, pH 7,5
10 mM EDTA

TWB

0,1 % (w/v) TWEEN 20 in TBS

Lower Tris

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

Upper Tris

0,5 M Tris, pH 6,8
0,4 % (w/v) SDS

Lysispuffer

0,2 N NaOH
1 % (w/v) SDS

Neutralisationslösung

3 M KAc

2 M Eisessig

PCI

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (v/v/v) 25:24:1

5 x Probenpuffer

50 % (v/v) Glycerin

1 mM EDTA

0,01 % (w/v) Bromphenolblau

Xylencyanol, pH 7,0

TE/LiAc-Lösung

1 x TE

100 mM LiAc

PEG/LiAc-Lösung

40 % (w/v) PEG 4000

1 x TE

100 mM LiAc

4 % (w/v) Paraformaldehydlösung

Es wurden 4 g Paraformaldehyd eingewogen, in 50 ml 2 x PBS unter dem Abzug aufgekocht, und mit einigen Tropfen 2 N NaOH versetzt, bis eine klare Lösung erhalten wurde. Mit H₂O wurde alles auf 100 ml aufgefüllt, und noch ungelöste Anteile abfiltriert.

Z-Puffer

16,1 g/l Na₂HPO₄ x 7 H₂O

5,50 g NaH₂PO₄ x H₂O

0,75 g/l KCl

0,246 g MgSO₄ x 7 H₂O

pH 7,0

X-Gal Stocklösung

20 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) in N,N-Dimethylformamid (DMF)

Z-Puffer/X-Gal Gebrauchslösung

- 100 ml Z-Puffer
- 0,27 ml β -Mercaptoethanol
- 1,67 ml X-Gal Stocklösung

Hefe-Lysis Puffer

- 2 % (w/v) Triton-X100
- 1 % (w/v) SDS
- 100 mM NaCl
- 10 mM Tris, pH 8,0
- 1,0 mM EDTA

Nährmedien und Antibiotikallösungen für Bakterienkulturen

LB (Luria-Bertani)-Medium

- 1 % (w/v) Bacto Trypton (Difco)
- 0,5 % (w/v) Hefeextrakt (Difco)
- 1 % (w/v) NaCl

LB-Agar

- 1 l LB-Medium
- 1,5 % (w/v) Bacto-Agar (Difco)

Ampicillin

- 100 μ g/ml (Boehringer-Mannheim)

Kanamycinsulfat

- 50 μ g/ml (Boehringer-Mannheim)

Chloramphenicol

- 30 μ g/ml (Boehringer-Mannheim)

Nährmedien für Hefekulturen

YPD-Vollmedium

- 20 g Pepton (Difco)
- 10 g Hefeextrakt
- ad 950 ml H₂O, pH 5,8
- nach dem Autoklavieren 50 ml 40 % (w/v) Glukoselösung hinzugeben

YPD-Agar

wie YPD-Vollmedium unter Zugabe von 18 g/l Bacto-Agar (Difco) vor dem Autoklavieren

SD-Medium

6,7 g Hefestickstoffbase ohne Aminosäuren (Difco)

ad 750 ml H₂O, pH 5,8

nach dem Autoklavieren:

100 ml 10 x "Dropout"-Lösung

50 ml 40 % Glukoselösung

25 ml 1 M 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) (Sigma)

je nach Bedarf:

10 ml 100 x Stocklösung von Histidin, Leucin oder Tryptophan zugeben

ad 1 l mit H₂O

SD-Agar

wie SD-Medium unter Zugabe von 20 g/l Bacto-Agar

10 x Dropout-Lösung

200 mg/l L-Adenin

200 mg/l L-Arginin

300 mg/l L-Isoleucin

300 mg/l L-Lysin

200 mg/l L-Methionin

500 mg/l L-Phenylalanin

2000 mg/l L-Threonin

300 mg/l L-Tyrosin

200 mg/l L-Uracil

100 x Leucin

10 g/l L-Leucin

100 x Tryptophan

2 g/l L-Tryptophan

100 x Histidin

2 g/l L-Histidin

Protein-Größenmarker

"low und high molecular weight marker": Sigma (Deisenhofen)

DNA-Größenmarker

1 kb und 0,1 kb DNA-Leitermarker (Gibco BRL)

Medien und Lösungen für die Zellkultur

MEM⁺: Minimal Essential Medium (Gibco BRL) mit 2 mM L-Glutamin (Boehringer-Mannheim), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Boehringer-Mannheim) und 10 % (v/v) FCS (hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (PanSystem, Aidenbach))

PSA-Ca²⁺

150 mM NaCl

5 mM KCl

0,1 mM CaCl₂ x 2 H₂O

3 mM NaHCO₃

5 mM Glucose

2xBBS

50 mM BES-Puffer

280 mM NaCl

1,5 mM Na₂HPO₄ x 7 H₂O, pH 6,95 (!)

Trypsin-EDTA in PSA

Boehringer Mannheim (Mannheim)

2.1.3 Zelllinien, Bakterien- und Hefestämme

Bakterienstämme

XL1-blue (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)

Genotyp: *recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F'proAB lacI^dZ*
□M15 Tn10 (*Tet^r*)]

XL0LR (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)

Genotyp: □(*mcrA*)183, □(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173*recA1 endA1 gyrA96 thi1*
supE44 relA1 lac(F'proAB lacI^dZ□M15, Tn10 (*tet^r*))□^R, Su⁻

BL21 (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)

Genotyp: *E. coli* B F*dcm ompT hsdS*(r_B⁻m_B⁻)*gal*

Hefestamm

Y190: (Harper et al., 1993),

Genotyp: MAT α , *ura3-52*, *his3-200*, *lys2-801*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu 2-3, 112*, *gal4 α* , *gal80 α* , *cyh^r2*, *LYS2::GAL1_{UAS}-HIS3_{TATA}-HIS3*, *URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ*

Reportergen: HIS3, lacZ

Transformationsmarker: Trp1, Leu2, Cyh^r2

Eukaryotische Zelllinien:

HEK-293

“American Tissue Culture Collection“ (ATCC), CRL1537, humane, embryonale Nierenzelllinie

2.1.4 Antikörper

Primäre Antikörper

Anti α -SERT-968 (Ratte)

PD Dr. P.Schloss (Sur et al., 1996)

α -SERT (Ratte)

Chemicon (Hofheim,Ts.)

α -SERT (Maus)

Chemicon (Hofheim,Ts.)

α -Grün-fluoreszierendes Protein (GFP)
(Maus)

Chemicon (Hofheim,Ts.)

α -Maltose-bindendes-Protein (MBP)
(Maus)

(Schwalbach, Ts.)

α -Glutathion-S-Transferase (GST)
(Kaninchen)

Pharmacia (Freiburg)

Sekundäre Antikörper

α -Maus/ α -Kaninchen IgG

mit CY3 gekoppelt

Dianova (Hamburg)

α -Maus/ α -Kaninchen IgG mit

AlexaFluor594 gekoppelt

Molecular Probes (Leiden,Niederlande)

α -Kaninchen IgG mit

Meerrettich-Peroxidase gekoppelt

Promega (Madison, USA)

α -Maus IgG mit

Meerrettich-Peroxidase gekoppelt

Promega (Madison, USA)

2.1.5 Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')	Funktion
SERTs-N1	CCG CTC GAG CAG CAT GAA GAA GAT GGA TTT CCT CCT GTC CGT CAT TGG C	Oligonukleotid zur Generierung einer □N-SERT Mutante (sense)
SERTas-N1	AGG TTA ACA CTG TAT GGC TTC TAA TAA CAC GAA CCC	Oligonukleotid zur Generierung einer □N-SERT Mutante (antisense)
SERTas729	GAG GAG ATG AGG TAG TAG AGC GCC	Oligonukleotid zur Generierung des □N-SERT (antisense)
SERTs-C1	GCT CTA GAG ACC AGC AGC ATG GAG ACC ACA	Oligonukleotid zur Generierung einer □C-SERT Mutante (sense)
SERTs1587	ATC CCT GCT CAC ACT GAC GTC	Oligonukleotid zur Generierung des □C-SERT (sense)
SERTas-C1.1	GTT AAC ACT AAA GTG TCC CCG GAG TGC TGA T	Oligonukleotid zur Generierung einer □C-SERT Mutante (antisense)
SERTs160 NT	GGA TGG AGA CCA CAC CCT TG	Oligonukleotid zur PCR-Amplifikation des NT-SERT (sense)
SERTas 352 NT	CTA ATC CAT CTT CTT GCC CCA	Oligonukleotid zur PCR-Amplifikation des NT-SERT (antisense)
SERTs 1951 CT	GGA TCCA GCA CTC CGG GGA CA	Oligonukleotid zur PCR-Amplifikation des CT-SERT (sense)
SERTas2053CT	TTA CAC AGC ATT CAT GCG GAT	Oligonukleotid zur PCR-Amplifikation des CT-SERT (antisense)
SERTs160+	GCG AAT TCA TGG AGA CCA CAC CCT TGA TTT CTC AG	Oligonukleotid zur PCR-Amplifikation des CT-SERT (sense)
SERTas352+	GCG TCG ACT TAG CCC CAG GTC TCC CGCTCC CCT T	Oligonukleotid zur PCR-Amplifikation NT-SERT (antisense)
SERT 160s Hind	CCC AAA GCT TCG ATG GAG ACC ACA CCC TTA AAT TCT CAG	Oligonukleotid zur PCR-Amplifikation NT-SERT (sense)

SERT352as Xho	CCC CTC GAG TTA GCC CCA GGT CTC CCG CTC CCC TT	Oligonukleotid zur PCR- Amplifikation NT-SERT (antisense)
SERTs1951+	GCG AAT TAC TCA GCA CTC CGG GGA CAC TTA AG	PCR-Amplifikation NT- SERT (sense)
SERTas2053+	CGG TCG ACT TAC ACA GCA TTC ATG CGG ATG TC	Oligonukleotid zur Generierung des □C-SERT (antisense)
SERT1951sHind	CCA AAG CTT CGA TCA GCA CTC CGG GGA CAC TTA AG	Generierung der □N-SERT Deletionsmutante
SERT2053as Xho	CCC CTC GAG TTA CAC AGC ATT CAT GCG GAT GTC	Generierung der □C-SERT Deletionsmutante
dNSERTflag sense	CCG CTC GAG AGC AGC ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG CAA GGG GAG CGG GAG ACC TGG GGC AAG AAG ATG GAT TTC CCTC CTG	Oligonukleotid zur Klonierung eines flag-Epitop- markierten □N-SERT
dCSERTflag as	GTT AAC TTA CTT GTC ATC GTC GTC CTT GTA GTC ACT TTT AAT AAT GCG CTC CTT AAG TGT CCC CGG AGT	Oligonukleotid zur Klonierung von flag-Epitop- markierten □C-SERT (antisense)
Konto s	CAG CAT GGA GAC CAC ACC CTT GAA	SERT-spezifische Kontroll- oligonukleotide für PCR- Amplifikation (sense)
Konto as	TAG TTG GTC CAG TTG CCA GTG	SERT-spezifische Kontroll- oligonukleotide für PCR- Amplifikation (antisense)
MacMARCKS390 sense	CTT CAA GAG AAA TCG GAA GGA	internes MacMARCKS Sequenzieroligonukleotid
F52460s	GAG GGT GGG GGT GAT TCT TCA	interner MacMARCKS Sequenzierprimer (sense)
F52 333as	GGG GGT CTC CTT GGG GGC GAC	interner MacMARCKS Sequenzieroligonukleotid (antisense)
F52HA/HindIII/s	GCG AAG CTT GCA TAA TCA GGA ACA TCA TAC TTC TCA TTC TCA GCA CTG GCA GAT CCG CGG CCA CT	Oligonukleotid zur PCR- Amplifikation des MacMARCKS (sense)

F52HA/BamH1/as	GCG AAT CCC TAT AAG CTT GCA TAA TCA GGA ACA TCA TAC TTC TCA TTC TCA TTC TCA GCA CTG GCA GAT CCG GGG CCA CT	Oligonukleotid zur PCR- Amplifikation des MacMARCKS (antisense)
McMark5' flag sense	GAG ATC GAA TTC GGC ACG AGC	Oligonukleotid zur Generie- rung von Hämagglutinin A (HA)-Epitop markierten MacMARCKS (sense)
McMark5' flag anti	AGC CTT GGA GCT CTG CTT GTC ATC GTC GTC CTT GTA GTC GCT GCC CAT GAT GGG GGT CTG CTG	Oligonukleotid zur Generie- rung von Hämagglutinin A (HA)-Epitop markierten MacMARCKS (antisense)
rPAFR 215s	AAT GAGC TAT GTG CTG TGG GTC	PAF-Rezeptor-spezifischer RT-PCR Oligonukleotid (sense)
rPAFR 973 as	CAG TTG GTG CTC AGG AGG	PAF-Rezeptor-spezifischer RT-PCR Oligonukleotid (antisense)
T7 s	GCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA	sense Sequenzieroligonukleo- tid
T7as	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC	antisense Sequenzieroligo- nukleotid
T3 s	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	sense Sequenzieroligonukleo- tid
SeqCis 5	CCA CAG GTG TCCACT CCC CAG G	sense Sequenzieroligonukleo- tid für pCis-Vektoren
SeqCis 3	GCA GCT TAT AAT GCT TAC	antisense Sequenzieroligo- nukleotid für pCis-Vektor
EGFP-Seq.	CAT GGT CCT GCT GGA GTT CGT	Sequenzieroligonukleotid für pEGFP-Vektor

2.2 Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wurden, sofern nicht anders beschrieben, nach Sambrook et al. (Sambrook et al., 1989) durchgeführt.

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Haltung von Nierenzellkulturen

Menschliche embryonale Nierenzelllinien (HEK-293) wurden in 10 ml MEM-Kulturmedium (Minimum Essential Medium) unter Zusatz von 10 % (v/v) fötalem Kalbsserum, 1 % (w/v) Glutamin und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂/Luftgemisch in 10 cm Schalen kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit geringerer Zelldichte in neue Kulturschalen passagiert. Dafür wurden die adhärenen Zellen in 5 ml Ca²⁺-PSA gewaschen und anschließend mit 1 ml 1 %iger Trypsinlösung versetzt. Nach etwa 3-minütiger Inkubation bei RT wurden die abgelösten Zellen im Verhältnis 1:4 mit Kulturmedium verdünnt und je 1 ml dieser Zellsuspension zum erneuten Auswachsen in 10 ml auf 37 °C vorgewärmtes Kulturmedium gegeben.

2.2.1.2 Transfektion von Nierenzellkulturen

Zur heterologen Expression rekombinanter Proteine wurden die HEK-293 Zellen mit Plasmid-DNA nach der Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode (Chen und Okayama, 1987) wie folgt transfiziert: für die Zelltransfektion einer 10 cm Kulturschale wurden 625 µl 1 M CaCl₂ mit 1855 µl H₂O versetzt und 10 µg Plasmid-DNA hinzugegeben. Zur Ausbildung eines Präzipitats wurde diese Lösung nochmals mit 2,5 ml auf 37 °C vorgewärmtes 2 x BBS gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Dieser Ansatz wurde mit Kulturmedium auf 10 ml Endvolumen gebracht und auf die Zellen appliziert, die anschließend bei 37 °C und 3 % CO₂ über Nacht (ÜN) inkubiert wurden. Am folgenden Tag wurde das Transfektionsmedium entfernt und die Zellen, nachdem sie mit PSA-Ca²⁺ gewaschen waren, mit frischem Kulturmedium genährt. Die Zellen wurden zur Expression der Proteine für weitere 24 - 28 h bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert.

2.2.1.3 Membranpräparation

28 - 36 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 5 ml PBS pro 10 cm Schale gewaschen, anschließend in 2 ml PBS vom Schalenboden abgeschabt und in einem Potter-Homogenisator auf Eis homogenisiert. Zellkerne und größere Membranbruchstücke wurden bei 1.000 x g für 3 min bei 4 °C abzentrifugiert, der Überstand abgenommen, und hieraus die Membranfragmente durch Zentrifugation bei 20.000 x g für 15 min und 4 °C sedimentiert. Dieses Pellet wurde pro Kulturschale in 200 µl PBS, dem 8,6 % (w/v) Glycerin zugesetzt waren, resuspendiert und anschließend in 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Herstellung kompetenter Zellen

Elektrokompetente Zellen

Eine Bakterienkultur, die ÜN in LB-Medium angezogen wurde, wurde am folgenden Tag in 1 l desselbigen Mediums 1:50 verdünnt und erneut in einem Bakterienschüttler bei 37 °C inkubiert. Nach Erreichen der exponentiellen Phase ($OD_{600} = 0,6 - 0,7$) wurde die Zellsuspension auf Eis für 30 min abgekühlt und die Bakterien durch Zentrifugation bei 5.000 x g bei 4 °C für 15 min sedimentiert, danach durch kräftiges Schütteln in 500 ml eiskaltem, sterilem H₂O resuspendiert und wie zuvor zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 250 ml eiskaltem H₂O aufgenommen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Bakterienzellen in 50 ml 10 % (v/v) autoklaviertem, eisgekühltem Glycerin resuspendiert, erneut wie zuvor sedimentiert und letztlich in 5 ml der eisgekühlten Glycerinlösung aufgenommen. Die elektrokompetenten Bakterienzellen wurden in 50 µl Aliquots schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

2.2.2.2 Transformation kompetenter Bakterienzellen

Transformation elektrokompetenter Zellen

Plasmid-DNA wurde mittels Elektroporation mit einem "Gene Pulser" (BioRad) in die Bakterien eingebracht. Dazu wurde die gefrorene Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut,

mit maximal 2 µl Plasmid-DNA versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Eurogentech) transferiert. Nach erfolgter Elektroporation bei einer Spannung von 2,5 kV wurden die Bakterienzellen in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 30 - 45 min in einem Rotationsschüttler inkubiert. Nach Zentrifugation der Bakterien bei 5.000 x g für 2 min und anschließender Resuspension in 100 µl LB-Medium wurden die Bakterienzellen auf LB-Agar, dem das selektionierende Antibiotikum zugesetzt war, ausplattiert und etwa 20 h bei 37 °C inkubiert.

Transformation hitzekompetenter Zellen

Hitzekompetente Bakterienzellen wie der BL21-Stamm von *E. coli*, wurden nach dem Hitzeschock-Verfahren transformiert. Ein 100 µl gefrorenes Bakterienaliquot wurde auf Eis aufgetaut, in ein vorgekühltes 15 ml Polypropylene transferiert und mit 1,7 µl einer 1 : 10 in H₂O_{dd} verdünnten 14,2 M β-Mercaptoethanol-Lösung versetzt. Nach vorsichtiger Durchmischung wurde das Reaktionsgefäß für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann mit 50 ng Vektor-DNA versetzt, erneut vorsichtig durchmischt und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock erfolgte für 45 sec bei 42 °C. Nach einer Inkubation von 2 min auf Eis wurden die Bakterienzellen in 0,9 ml LB-Medium aufgenommen, für 1 h bei 37 °C in einem Rotationsschüttler inkubiert und danach auf LB-Agar-Platten, die mit dem selektionierenden Antibiotikum versetzt waren, ausgestrichen.

Glycerinstammkulturen von Bakterien

Zur längerfristigen Lagerung von Bakterien wurde ein Aliquot einer Übernachtskultur unter sterilen Bedingungen mit 98 % (v/v) Glycerin auf 30 % Endkonzentration (v/v) gebracht, sofort auf Eis gelegt und bei -70 °C gelagert.

2.2.2.3 Plasmidpräparation aus Bakterienzellen

Für die Isolation hochgereinigter Plasmid-DNA wurden DNA-Isolationskits der Fa. Qiagen (Hilden) bezogen. Die Aufreinigung basierte auf dem Prinzip der Anionenaustauscherchromatographie. Es wurde nach den Angaben des Herstellers

verfahren.

Plasmid-DNA Isolation durch alkalische Lyse

Zur Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA für Kontrollanalysen wurde das Verfahren der alkalischen Lyse eingesetzt. Aus 1 ml einer Übernachtskultur wurden die Bakterien durch Zentrifugation für 10 sec pelletiert. Das Pellet wurde in 150 µl des Überstandes aufgenommen, die Zellen durch Zugabe von 200 µl Lysispuffer lysiert und durch mehrmaliges Invertieren durchmischt. Nach der Zugabe von 150 µl Neutralisationslösung und erneuter Durchmischung wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 20.000 x g für 2 min sedimentiert. Aus dem Überstand wurde anschließend die Plasmid-DNA gefällt. Dazu wurde der Überstand mit 1 ml 100 % Ethanol versetzt, für 2 min inkubiert und die Plasmid-DNA durch weitere einminütige Zentrifugation bei 20.000 x g präzipitiert. Das Pellet, das die Plasmid-DNA und RNA enthielt, wurde in 80 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 30 µl H₂O aufgenommen. Für Restriktionsanalysen wurden die Ansätze mit 1 U RNase versetzt.

2.2.2.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration sowie der Kontaminationsgrad der Probe mit RNA und Proteinen, wurde mit 1:50 verdünntem DNA-Ansatz photometrisch in einem Beckman Photometer bestimmt. Das Vermessen der Extinktion in einer Quarzküvette bei $\lambda = 260$ nm erlaubt die Berechnung der Nukleinsäure-Konzentration in einer Probe. Dabei entspricht eine OD₂₆₀ von 1 etwa 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml Einzelstrang-DNA oder RNA. Das Verhältnis der Messung bei 260 nm und 280 nm (OD₂₆₀/OD₂₈₀) liefert einen guten Anhaltspunkt über den Reinheitsgrad der Probe. Liegt das Verhältnis unter 1,8 - 2,0, war die Probe mit Proteinanteilen kontaminiert.

2.2.2.5 Restriktionsfragmentanalyse

Für die Restriktion eines Plasmids wurden 1 µg DNA mit 0,5 - 1 U Restriktionsenzym und dem entsprechenden Puffer des Herstellers versetzt. Die Inkubation erfolgte für 30 - 60 min bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur und wurde durch Hitzeinaktivierung

beendet. Restriktion mit Hilfe zweier Enzyme, die verschiedene Puffer benötigen, wurden nacheinander durchgeführt, so daß die Pufferkonzentrationen aneinander angeglichen werden konnten. War dies nicht möglich, wurde die DNA zwischen den enzymatischen Spaltungen durch das "PCR-Purification-Kit" (Qiagen) aufgereinigt.

2.2.2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Restriktionsansätze wurden DNA-Fragmente zur weiteren Klonierung mit einem Skalpell aus dem Gel isoliert, in kleine Stücke geschnitten und in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, dessen Boden mit einer Kanüle perforiert und mit steriler Glaswolle bedeckt war. Die Gelstücke wurden hierin für 5 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren, die Gefäße in 1 ml Reaktionsgefäße eingesetzt und in diesen für 3 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Die in dem 1 ml Reaktionsgefäß angesammelte Flüssigkeit wurde verwahrt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt und aus den kombinierten Überständen die DNA durch eine Isopropanol-Fällung pelletiert, Vakuum-getrocknet und in dem benötigten Volumen H₂O aufgenommen. Alternativ wurde die Isolation der DNA-Fragmente mit Hilfe eines "Gel-Extraction-Kit" (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.2.7 Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren

Um die Religation linearisierten Vektors zu verhindern, wurde das für die Ligation benötigte 5'-Phosphat der doppelsträngigen DNA mit Hilfe der enzymatischen Reaktion der alkalische Phosphatase aus der Garnele (SAP) (USB) entfernt. Für die Dephosphorylierung wurden etwa 3 µg linearisierter Vektor (etwa 1 pmol freie Enden eines 3 kb Fragments) mit 1 U Enzym in dem vom Hersteller zur Verfügung gestellten Reaktionspuffer angesetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurde das Enzym durch eine anschließende 20minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert.

2.2.2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die hitzestabile DNA-Polymerase des Archaeobakteriums *Thermus aquaticus* (GIBCO BRL) verwendet (Innis et

al., 1990). In einem 0,5 ml Reaktionsgefäß wurden 100 ng Template-DNA, 1 x PCR-Puffer (GIBCO BRL), 0,2 mM jeden dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, je 10 pmol sense und antisense Oligonukleotid und 2,5 U der Taq-DNA-Polymerase in 100 µl Endvolumen vermischt, mit Mineralöl überdeckt, und die anschließenden Reaktionszyklen in einem "Thermo-Cycler" (Perkin Elmer) durchgeführt. Die Parameter der einzelnen Inkubationsschritte wurde dabei wie folgt gewählt:

Erste Denaturierung: 3 min, 94 °C

30 Zyklen der Kettenreaktion:

Denaturierung: 45 sec, 94 °C

Hybridisierung: 1 min, x °C

Elongation: 1,5 min, 72 °C

Nach diesen 30 Reaktionszyklen schloß sich ein letzter Elongationsschritt von 10 min bei 72 °C an.

Die Hybridisierungstemperatur ermittelte sich aus der Schmelztemperatur (T_m) der Primer, die aus der Formel:

$$T_m = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)$$

errechnet werden konnte. Die Schmelztemperatur repräsentiert die maximale Hybridisierungstemperatur.

Sämtliche Primer wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) nach Auftrag hergestellt.

2.2.2.9 PCR-Mutagenese

Punkt-Mutationen, Insertionen oder Deletionen wurden mit Hilfe der PCR-Technik generiert.

Bildung endständiger Mutationen:

Endständige Punktmutationen wurden durch PCR mit Mutagenese-Primern eingeführt, die entsprechende Änderungen der Nukleinsäuresequenz kodierten. Zur Einführung größerer Insertionen oder Deletionen wurden die Oligonukleotide so gewählt, daß in dessen 3'-

Bereich mindestens 25 Nukleotide der Template-cDNA komplementär waren, wohingegen der 5'-Bereich Insertionen wie Restriktionsschnittstellen, Kozak-Sequenz, Startkodon und evtl. Epitop trug. Der Antisense-Primer hierzu wurde so gewählt, daß er zu der Sequenz einer singulären Restriktionsschnittstelle des Templates komplementär war und so zur späteren Klonierung Insertionsstellen lieferte.

Für die PCR wurde die Hybridisierungstemperatur der Primer nur aus dem komplementären DNA-Fragment abgeleitet.

2.2.2.10 Klonierung von PCR-Fragmenten

Das PCR-Reaktionsprodukt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, das erwartete PCR-Fragment isoliert und mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die Menge des benötigten Enzyms wurde dabei aus der Anzahl der Schnittstellen des PCR-Produktes ermittelt. Abschließend wurden die geschnittenen PCR-Fragmente mit dem "PCR-Purification-Kit" (Qiagen) aufgereinigt und für die Ligation eingesetzt.

2.2.2.11 Ligation von Nukleinsäuren

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde durch die T4-DNA-Ligase (GIBCO BRL) bewerkstelligt. Dazu sollte die zu insertierende DNA dem Vektoranteil etwa 10fach überwiegen. Die DNA-Fragmente wurden mit 1 U Enzym, 1 mM ATP und 1 x Ligasepuffer des Herstellers in 10 µl Endvolumen versetzt und 1 - 12 h bei RT inkubiert.

2.2.2.12 Sequenzanalyse von DNA

Zur endgültigen Verifizierung einer Klonierung, bzw. zur Kontrolle eines inserierten DNA-Fragments, wurde die Nukleinsäure nach dem Didesoxyverfahren mit dem automatischen Sequenziergerät (Applied Biosystem 373A DNA Sequencer) analysiert. Die Sequenzierreaktion, die mit einem Sequenzier-Kit (DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit, Perkin Elmer) angesetzt wurde, sowie die anschließende Aufreinigung der Proben erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Sequenzen wurden mit dem Computerprogramm "MacVektor" oder "DNA-Star" analysiert.

2.2.2.13 Zwei-Hybrid-System

Das Zwei-Hybrid-System (Stratagene, Heidelberg) vermag Interaktionen zwischen zwei Proteinen in einem GAL4-defizienten Hefestamm zu identifizieren. Dieses System basiert auf der Unterteilung des Transkriptionsfaktors GAL4 in zwei räumlich voneinander getrennten funktionellen und strukturellen Domänen, die DNA-Bindungs- und die RNA-Polymerase II-Aktivierungsdomäne (Buratowski et al., 1988). Diese sind notwendig und ausreichend für Initiation der Transkription. Durch die Interaktion zweier "hybrider" Fusionsproteine, einerseits dem "Köder"-Protein, welches an die Bindungsdomäne fusioniert wird, andererseits einem unbekanntem Protein einer Bibliothek, dem sog. "Fisch" als Fusionsprotein der Aktivierungsdomäne, kann auch ein funktioneller Transkriptionskomplex gebildet werden. In diesem Falle wird die Transkription der Reportergene Histidin (HIS3) und β -Galaktosidase (lacZ) in der Hefe initiiert. Das Produkt des ersten Gens komplementiert die Histidinauxotrophie des eingesetzten Hefestamms. Die Aktivität des letzteren führt in einem kolorimetrischen Ansatz zur Blaufärbung der Hefezellen. Hier sollten aus einer hirnspezifischen cDNA-Bibliothek der neugeborenen Ratte (Stratagene) neue Interaktionspartner des SERT identifiziert werden.

Die Durchsuchung der cDNA-Bibliothek erfolgte, falls nicht anders vermerkt, gemäß den Vorschriften des Herstellers.

In vivo Exzision

Abweichend von dem Protokoll des Herstellers wurde das Gemisch aus Phagemiden (10^9) und 15 ml XL0LR-Zellen (OD = 1) in 10 mM $MgCl_2$ nach 15minütiger Inkubation bei 37 °C auf 60 LB^{Amp}-Agarplatten (\varnothing 15 cm) ausplattiert und bei 37 °C inkubiert. Von den halbkonfluent bewachsenen Agarplatten wurden die Zellen mit einem Schaber abgekratzt, in 500 ml LB Medium aufgenommen und die Plasmid-DNA präpariert.

Transformation der Hefezellen

Die Generierung kompetenter Hefezellen des Stammes Y190 und deren Transformation erfolgte nach dem Protokoll der Fa. Clontech (Palo Alto, USA).

Für die Durchsuchung der cDNA-Bibliothek wurden Hefezellen sequentiell transformiert. Dazu wurden 5 Hefekolonien, die mit dem "Köder-Vektor" transformiert worden waren, in

Selektionsmedium bei 30 °C hochgezogen und anschließend mit 0,5 mg der cDNA-Bibliothek lt. Protokoll transformiert. Die Transformationseffizienz der cDNA-Bibliothek betrug $2,3 \times 10^6$ und deckte damit die Komplexität der Bank doppelt ab.

Isolierung der Plasmid-DNA aus Hefezellen

Zur Isolierung des "Fisch-Vektors" wurden 5 ml einer gesättigten Hefekultur, die unter Selektionsbedingungen hochgezogen worden war, durch Zentrifugation bei 1.000 x g sedimentiert. Nach dem Dekantieren des Überstands wurden die Zellen in der verbliebenen Flüssigkeit resuspendiert und mit 0,2 ml Lysis-Puffer, 0,2 ml einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Lösung sowie 0,3 g säuregewaschenen Glaskügelchen versetzt. Durch zweiminütiges Vortexen wurden die Zellen in diesem Gemisch lysiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 20.000 x g für 3 min wurde die abgesetzte wässrige Phase abgenommen. Die hierin befindliche DNA wurde durch Ethanol-Fällung präzipitiert, nach einem weiteren Waschschrift getrocknet und in 20 µl H₂O aufgenommen. Um Kontaminationen genomischer DNA zu entfernen, mußten Teile des Ansatzes in *E. coli* retransformiert werden und hieraus wiederholt die Plasmid-DNA isoliert.

2.2.3 Biochemische Arbeitsmethoden

2.2.3.1 Radioligandenbindungsassays

Die Expression des SERT wurde durch Bindung von [³H]Imipramin und [³H]Citalopram an Membransuspensionen bestimmt. Dazu wurden 10 - 20 µg Membranprotein in einem Volumen von 200 µl TB1 mit [³H]Citalopram oder [³H]Imipramin inkubiert. Nach 30 min Inkubation bei RT, d. h. nach Erreichen des Bindungsäquilibrium (Schloss und Betz, 1995), wurden die Ansätze mit 4 ml eiskaltem TB1 verdünnt und unter Vakuum durch in 0,3 % (w/v) Polyethylenimin vorinkubierte GF/C Glasfaserfilter (Whatman) abgezogen. Die Filter wurden mit weiteren 4 ml TB1 gespült und die gebundene Radioaktivität in einem Beckman LS 60001IC Szintillationszähler bestimmt. Die spezifische Bindung wurde definiert als die Differenz zwischen der Bindung an Membranen aus SERT-exprimierenden Zellen und der Bindung an Kontrollmembranen, die mit insertlosem Vektor transfiziert worden waren.

2.2.3.2 Wiederaufnahme von [³H]5-HT

Falls nicht anders vermerkt, wurde eine HEK-293 Zelllinie, die den SERT stabil exprimierte (HEK-SERT) (Sur et al., 1998), in "24-well Platten" (d = 2 cm) ausplattiert. Waren die Zellen zu 30 % konfluent, wurden sie mit 100 ng/Vertiefung transfiziert und 36 h später Wiederaufnahmemessungen unterzogen. Die Messungen wurden generell in Quadruplikaten durchgeführt. Dazu wurde das Kulturmedium durch 0,2 ml TB1, der das [³H]5-HT enthielt, ersetzt und mit den Zellen bei RT inkubiert. Nach definierter Zeit wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit 0,2 ml TB1 gewaschen und in 0,4 ml 1 % (w/v) SDS aufgenommen. Die Radioaktivität wurde durch Messung in einem Beckman LS 60001IC Szintillationszähler bestimmt. Phorbolster- oder Staurosporinbehandlung der Zellen erfolgte in parallelen Ansätzen für 1 h bei 37 °C vor der Wiederaufnahmemessung. Die Sättigungsexperimente wurden durch nichtlineare Regression mit dem Programm Kaleidagraph nach der Formel $V = V_{\max}/(1+[km/S]^n)$ oder durch Eadie-Hofstee-Analyse ausgewertet.

2.2.3.3 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinkonzentration von Membranfraktionen oder Proteinextrakten wurden mittels dem "DC-Proteinassay" (BioRad) nach einer Methode ähnlich der von Lowry bestimmt (Lowry et al., 1951). Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zur Anfertigung einer Eichgeraden wurde analog die Absorption einer definierten Konzentration von BSA, das in dem jeweiligen Puffer vorlag, in einem Titertek MCC340 Elisa-Reader gemessen.

2.2.3.4 Expression von Glutathion-S-Transferase-Proteinen (GST-Proteinen) und Herstellung zytosolischer Zellextrakte

Die bakterielle Überexpression einer cDNA oder eines cDNA-Fragments erfolgte nach dessen Klonierung in den Vektor pGEX-4T1 (Pharmacia Biotech) und der Transformation in den proteasedefizienten *E. coli*-Stamm BL21.

Zur Überexpression der Proteine wurde eine gestättigte Bakterienkultur 1 : 50 verdünnt und bei 37 °C unter kräftigem Schütteln bis zu einer Dichte von $OD_{600} = 0,7 - 0,8$ hochgezogen.

Durch die Zugabe von 1 mM Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG) Endkonzentration wurde die Proteinexpression induziert. Die Bakterienzellen wurden für weitere 4 h bei 37 °C unter kräftigem Schütteln inkubiert und anschließend geerntet. Dazu wurden die Bakterienzellen bei 4.000 rpm für 10 min sedimentiert, das Pellet in Aufschlußpuffer aufgenommen und die Zellen bei 4 °C in einer "French Press" bei einem Druck von 500 psi aufgeschlossen. Das Lysat wurde mit 1 % (w/v) Triton-X100 (Endkonzentration) versetzt, für 30 min bei 4 °C inkubiert und Zelltrümmer durch Zentrifugation für 10 min bei 32.000 x g pelletiert. Nach einer anschließenden Hochgeschwindigkeitszentrifugation bei 100.000 x g und 4 °C wurde der Überstand filtriert (0,45 μ m Porengröße) und bei -70 °C verwahrt.

2.2.3.5 Affinitätschromatographische Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

GST-Fusionsproteine aus dem zytosolischen Bakterien-Extrakt wurden an einer Glutathion-Sepharose-4B-Matrix (Pharmacia) nach dem sog. "Batch-Verfahren" immobilisiert. Hierzu wurden 20 μ l einer 50 %igen Glutathion-Sepharose-Suspension, die nach den Angaben des Herstellers in PBS präequilibriert wurde, mit 2 ml des zytosolischen Extrakts (vgl. 2.2.3.4) für 1,5 h bei 4 °C auf einem 2 ml Reaktionsgefäß über Kopf rotiert. Nach dreimaligem Waschen in kaltem Bindungspuffer wurden die immobilisierten GST-Fusionsproteine für Bindungsstudien verwendet.

2.2.3.6 Expression von Maltose-bindenden Proteinen (MBP) und Herstellung zytosolischer Zellextrakte

Zur Herstellung von MBP-Fusionsproteinen wurden cDNAs in den offenen Leserahmen des bakteriellen Expressionsvektors pMAL-c2 (NEB) subkloniert. Die Expression der Fusionsproteine erfolgte in proteasedefizienten *E. coli* BL21 Zellen. Zur Expression der Proteine wurde eine ÜN-Kultur der Klone 1 : 10 in LB-Medium, dem 0,2 % Glucose hinzugefügt worden waren, verdünnt. Die Bakterienzellen wurden bis zum Erreichen einer Dichte von $OD_{600} = 0,5$ bei 37 °C in einem Bakterienschüttler inkubiert. Die Induktion der Proteinexpression wurde durch Zugabe von IPTG auf eine Endkonzentration von 0,3 mM erzielt. Nach weiterer Inkubation für 2 h erfolgte die Ernte und der Aufschluß der Bakterienzellen (vgl. 2.2.3.4).

2.2.3.7 Affinitätschromatographische Aufreinigung von MBP-Fusionsproteinen

Das zytosolische Extrakt von Bakterienzellen, die MBP-Fusionsproteine heterolog exprimierten, wurde an einer Amylose-Matrix (NEB) nach dem sog. "Batch-Verfahren" aufgereinigt. 20 µl der Amylose-Matrix wurde im 10fachen Matrixvolumen in Bindungspuffer equilibriert. Nach 3minütiger Zentrifugation bei 3.000 x g bei 4 °C wurde die Matrix sedimentiert und in 2 ml des zytosolischen Extraktes resuspendiert. Nach Rotation für 1 h bei 4 °C und anschließendem dreimaligem Waschen in kaltem Bindungspuffer wurden die immobilisierten MBP-Fusionsproteine für Bindungsstudien herangezogen.

2.2.3.8 Herstellung von Zellhomogenaten

Transfizierte HEK-293 Zellen in 10 cm Gewebekulturschalen wurden nach 36 h für Bindungsanalysen homogenisiert. Dazu wurden die konfluenten Zellen mit 5 ml 1 x PBS (RT) gewaschen und in 1 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer (1 x PBS, Proteaseinhibitorenmix mit EDTA (Boehringer Mannheim), 1 mM PMSF und 1 mM DTT) aufgenommen. Die Zellen wurden mit einem Handpotter auf Eis aufgebrochen und große Membranfragmente und Zellkerne durch Zentrifugation bei 1.000 x g für 3 min bei 4 °C sedimentiert.

Sollte ein kombiniertes Homogenat aus Plasmamembran und Zytoplasma gewonnen werden, so wurde der abgenommene Überstand mit 1 % Triton-X100 versetzt, sofort für 10 s gevortext und anschließend bei 4 °C für 1 h über Kopf rotiert. Die dabei solubilisierten Proteine, sowie die zytoplasmatischen Komponenten, wurden durch Ultrazentrifugation bei 100.000 x g für 45 min bei 4 °C von größeren Partikeln getrennt. Dieser Überstand wurde für die anschließenden Präzipitationsanalysen verwandt.

Sollte die Zytoplasma- und die Membranfraktion getrennt untersucht werden, wurden zuerst die Membrananteile durch Zentrifugation bei 20.000 x g für 15 min bei 4 °C sedimentiert. Die damit gewonnene zytoplasmatische Fraktion wurde abgenommen und auf Eis verwahrt, während die Proteine der Membranfraktion in 100 µl Homogenisierungspuffer aufgenommen und wie oben beschrieben solubilisiert wurden.

2.2.3.9 Herstellung von Hirnhomogenaten

Zur Extraktion von Proteinen aus dem Hirn adulter Ratten wurden tiefgefrorene Hirne in dem 5fachen Volumen des Frischgewichts mit eiskaltem Homogenisierungspuffer (vgl. 2.2.3.4) auf Eis in einem Potter-Homogenisator bei 800 U bis zur Homogenisierung des Gewebes zerkleinert. Durch anschließende Zentrifugation bei 1.000 x g für 3 min bei 4 °C wurden größere Zellfragmente sedimentiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Dieser wurde mit 1 % Triton-X100 (v/v) versetzt und für 1 h bei 4 °C über Kopf rotiert. Solubilisierte membranständige Proteine und zytoplasmatische Proteine wurden durch Ultrazentrifugation bei 100.000 x g für 1 h bei 4 °C von ungelösten Membranfragmenten getrennt. Dieses kombinierte Gewebehomogenat wurde bis zur Verwendung kontinuierlich auf Eis gehalten.

2.2.3.10 "Pull-Down" Bindungsstudien

Immobilisierte Fusionsproteine wurden mit den angegebenen Gewebe- oder Zellhomogenaten verschiedener Fraktionen ÜN bei 4 °C inkubiert. Durch Zentrifugation bei 2.500 x g für 3 min bei 4 °C wurde die Matrix mit gebundenen Proteinen vom Überstand, der verwahrt wurde, getrennt. Die Matrix wurde im 10fachen Volumen des Matrixvolumens in Bindungspuffer gewaschen und erneut bei 2.500 x g für 3 min pelletiert. Nach zweimaligem Wiederholen des Waschschriffs wurden die Matrix-gebundenen Proteine in 1 x SDS - Probenpuffer eluiert. Die Proteine der Eluate, der Überstände und Anteile des eingesetzten Homogenats wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und immunologisch oder durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht.

2.2.3.11 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Gelelektrophoretische Analysen erfolgten im diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli (Graff et al., 1989b) in Polyacrylamidgelen. Für das Trenngel wurde 0,25 x "Lower-Tris" mit 30 % (w/v) Acrylamid/0,8 % (w/v) N,N,-Methylen-bisacrylamidlösung zur erwünschten Acrylamid-Endkonzentration versetzt, mit H₂O auf das Endvolumen gebracht und zum Auslösen der Polymerisation mit 0,025 % (w/v) Ammoniumpersulfat mittels einer 10 %igen (w/v) Stammlösung sowie mit 0,002 - 0,003 % (v/v) TEMED versetzt. Zur Herstellung des 4,5 %igen Sammelgels wurde mit 0,25 x "Upper-Tris" und H₂O die 30 %

(w/v) Acrylamid/0,8% (w/v) N,N,-Methylen-bisacrylamidlösung auf 4.5 %ige Endkonzentration gebracht und zum Auslösen der Polymerisation 0,01 % (w/v) Endkonzentration Ammoniumpersulfat und 0,003 % (v/v) Endkonzentration TEMED hinzugegeben. Die Proben wurden in Probenpuffer mit oder ohne 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol aufgenommen. Um mögliche DNA-Rückstände aus Membranpräparationen zu entfernen, wurden diese für 10 min bei RT mit 1 U Benzonase (DNase (MERCK)) behandelt. Falls nicht anders vermerkt, wurden die Proben vor dem Auftrag für 3 min bei 95 °C zusätzlich denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x Laemmli-H Elektrophoresepuffer bis zum Auslaufen der Blaufront bei 25 mA für "Minigele" (7 x 10 cm) und bei 55 mA für "Midigele" (12 x 17 cm). Zur Größenbestimmung wurden 10 μ l Proteinmarker in einer Spur des Gels aufgetragen.

2.2.3.12 Färbung von SDS-Proteingelen

Zur direkten Visualisierung der aufgetrennten Proteine wurden die Proteingele für 30 min in Coomassielösung inkubiert und der ungebundene Farbstoff durch die anschließende mehrstündige Inkubation in Entfärberlösung herausgewaschen. Angefärbte Proteine traten hierdurch hervor. Die Gele wurden ÜN mit Weichmacherlösung versetzt und anschließend in einer Spannapparatur zwischen angefeuchteter Einweckfolie mittels Lufttrocknung konserviert.

2.2.3.13 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose (Western-Transfer)

Zur immunologischen Detektion wurden die separierten Proteine auf Nitrozellulosemembranen überführt (Kyhse-Andersen, 1984), wozu für die Midigele eine Horizontalblotkammer (BioRad, München) und für die Minigele eine Feuchtblotkammer (BioRad, München), die mit Transferpuffer (Lämmli-H Laufpuffer, 20 % (v/v) Methanol) aufgefüllt war, verwendet wurde. Der Transfer erfolgte bei konstanter Stromstärke von 1 mA/cm² Gel für 1 - 2 h und wurde durch Inkubation des Gels nach dem Transfer in Coomassielösung für 30 min und anschließender Entfärbung in Entfärberlösung kontrolliert. Die Nitrozellulosemembran wurde für 5 min in Ponceau S-Lösung getaucht und so die transferierten Proteine nach Spülen mit H₂O sichtbar gemacht. Die

Größenmarker wurden mit einem wasserfesten Stift nachgezogen.

2.2.4 Immunologische Methoden

2.2.4.1 Herstellung eines SERT-spezifischen Antikörpers

Das α -SERT Serum AS968 wurde durch Immunisierung von Kaninchen mit einem SERT-Peptid (S-PEP), welches mit bis-Diazobenzidin an das Hämocyjanin einer Meeresschnecke (keyhole limpet) als Hapten gekoppelt war, erhalten. Die Synthese von S-PEP, das die Aminosäuren 388 - 402 in der vierten putativen extrazellulären Schlaufe (siehe Abb. 1.2) des SERT beinhaltet, sowie die Immunisierung von Kaninchen wurde von der Firma EUROGENTECH (Seraing, Belgien) durchgeführt. Das Antiserum wurde durch Affinitätschromatographie weiter gereinigt, wozu 5 mg S-PEP durch den Quervernetzer EDAC entsprechend den Hinweisen des Herstellers an 2 ml EAH-Sepharose 4B (Pharmacia) gekoppelt wurden. Antiseren wurden an die Matrix (5 ml Serum an 2 ml S-PEP-Sepharose) für 2 h bei RT gebunden und spezifische IgG nach Waschen der Matrix mit 0,1 M Glycin/HCl, pH 2,5, eluiert. Die affinitätsgereinigten IgG wurden im folgenden als α -SERT-968 bezeichnet. Alle o.g. Arbeitsschritte wurden von PD Dr. P. Schloss durchgeführt.

2.2.4.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen nach Transfer auf Nitrozellulose (Western-Blot)

Die Nitrozellulosemembran wurde nach dem Transfer der Proteine für 10 min in TBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen durch 20minütige Inkubation in TBB abgesättigt. Die Detektion erfolgte mit dem primären Antikörper, der in TBB verdünnt wurde, für 1 h bei RT. Unspezifisch gebundener Antikörper wurde durch wiederholtes Waschen in TBS, TBW und TBS für je 10 min entfernt. Ein weiterer Inkubationsschritt erfolgte mit einem Meerrettichperoxidase-konjugierten Zweitantikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet war, in einer 1 : 10.000 Verdünnung in TBB für 45 min. Die anschließenden Waschschrte wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Die Detektion des Zweitantikörpers erfolgte anschließend durch eine Chemolumineszenz-Reaktion der Peroxidase, die mit Hilfe des ECL-Systems (Pierce) nach den Angaben des Herstellers

durchgeführt wurde.

2.2.4.3 Immunzytochemie

Die zelluläre Lokalisation von heterolog exprimierten Proteinen wurde in HEK-293 Zellen immunzytochemisch bestimmt. Dazu wurde eine 10 cm Gewebekulturschale mit konfluenten HEK-293 Zellen in einer Verdünnung von 1 : 96 in "24-well Schalen" (d = 2 cm), in die zuvor sterile Glasplättchen eingelegt worden waren, passagiert und für 48 h im Brutschrank unter Standardbedingungen (2.2.1.1) inkubiert. Die adhärennten Zellen wurden mit 250 ng Plasmid-DNA/well transfiziert (2.2.1.2.) und nach weiteren 48 h angefärbt.

2.2.4.3.1 Färbung nach Paraformaldehyd-Fixierung

Mit einem GFP-Konstrukt transfizierte Zellen wurden zum Erhalt der grünen Fluoreszenz mit Paraformaldehyd fixiert. Dazu wurden die transfizierten Zellen mit kaltem PBS gewaschen und für 7 min in 500 µl 4 % (w/v) Paraformaldehyd unter dem Abzug fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift in 1 ml kaltem PBS wurden die Deckgläschen in hierfür vorgesehene Halterungen transferiert und in eine Hybridisierungsküvette mit 50 mM NH₄Cl für 20 min überführt. Nach den folgenden drei Waschschriften in kaltem PBS wurden freie Bindungsstellen durch eine 30minütige Inkubation in 4 % BSA (w/v) in PBS blockiert. Zwischenzeitlich wurde eine feuchte Kammer aufgebaut, in die 25 µl des primären Antikörpers vorgelegt waren. Letzterer war zuvor mit 4 % (w/v) BSA und 0,13 % (w/v) Triton-X100 (1:1.000) in PBS wie angegeben verdünnt. Die Deckgläschen wurden vorsichtig abgetupft, auf die Antikörpersuspension appliziert und für 1 h bei RT inkubiert. Nach einem anschließenden dreimaligen Waschvorgang in kaltem PBS wurde die zelltragende Oberseite der Deckgläschen mit dem zweiten Antikörper nach dem vorherigen Schema im Dunkeln für 2 h bei RT inkubiert. Nach einigen letzten Waschschriften in PBS von mindestens 45 min wurden die fixierten Zellen in H₂O getaucht, abgetupft und mit Mowiol (Hoechst) auf Objektträger aufgezogen. Die Präparate wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.4.3.2 Färbung nach Methanol/Eisessig-Fixierung

Diese Fixierungsmethode war aufgrund der besseren Zellhaftung der oben beschriebenen

vorzuziehen und wurde so für die Fixierung von Zellen eingesetzt, die kein GFP-Protein exprimierten.

Die adhärennten Zellen wurden in 200 ml eines Methanol/Eisessig-Gemisches (95 % (v/v) Methanol, 5 % (v/v) Eisessig), das in einem Trockeneisbad gekühlt worden war, für 5 min fixiert, vollständig luftgetrocknet und für 20 min in Blockierungspuffer (4 % (w/v) BSA in PBS) inkubiert. Die Deckgläschen wurden 3 x 5 min in PBS gewaschen und in der Erstantikörper-Lösung (Primärantikörper in Blockierungspuffer) in einer feuchten Kammer für 1 h bei RT inkubiert (vgl. 2.2.3.3.1). Nach wiederholtem Waschen von 3 x 5 min in PBS wurde mit dem Zweitantikörper analog verfahren. Die abschließenden Schritte erfolgten wie bereits unter 2.2.3.3.1 beschrieben.

2.2.4.4 Konfokale Analyse gefärbter Zellen

Für die konfokale Mikroskopie von \square -SERT 968 gefärbten Zellen wurden optische Schnitte mit einem Sarastro 2000 Mikroskop (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) aufgenommen. Für die Auswertung von Doppelfärbungen wurde ein invertiertes DM IBRE Mikroskop (Leica, Bensheim) verwendet. Die Darstellung erfolgte mit einer Pixelgröße von $0,1 \mu\text{m}^2$. Der Abstand zwischen den einzelnen konfokalen Schnittebenen betrug $0,49 \mu\text{m}$. Die CY3-Fluorochrome wurden mit der 514 nm Linie eines Argon-Ionenlasers angeregt, während das Fluorochrom AlexaFluor594 und das verstärkt grün-fluoreszierende Protein (EGFP) bei 594 nM bzw. bei 488 nM angeregt wurden.

Um das statistische Rauschen der Sekundärelektronenvervielfacher zu eliminieren, wurden die Primärdaten Gauss-gefiltert (Korngröße $3 \times 3 \times 3$). Für die mathematischen Operationen und für die Darstellung wurde das Programm ImageSpace (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) auf einem Indigo 2 Rechner (Silicon Graphics) benutzt.

3. Ergebnisse

In der hier vorliegenden Arbeit sollten unter Verwendung des Zwei-Hybrid-Systems zytoplasmatische Proteine identifiziert werden, die mit dem Serotonintransporter SERT interagieren. Die von den isolierten cDNA-Klonen kodierten potentiellen Interaktionspartner sollten anschließend durch biochemische, immunzytochemische und pharmakologische Experimente charakterisiert und die *in vivo*-Relevanz ihrer Interaktion mit dem SERT überprüft werden. Bisher war die Bedeutung der Amino (N)- und Carboxy (C)-Termini des SERT als mögliche Interaktionsdomäne für Proteine, die z. B. den Substrattransport oder die Lokalisation des SERT regulieren, unbekannt. Daher wurden hier zunächst N- und C-terminale Deletionsmutanten des SERT (Δ N-SERT/ Δ C-SERT) generiert. Die trunkeierten Proteine wurden anschließend bezüglich ihrer oligomeren Struktur, ihrer Funktionalität und ihrer Lokalisation in HEK-293 Zellen analysiert.

3.1 Analyse der Funktion der SERT-Termini

In einem ersten Ansatz wurden die terminalen Aminosäuren mittels PCR deletiert. Da der N-Terminus des SERT zytoplasmatisch lokalisiert ist, sollte kein Signalpeptid für die Insertion des Transportproteins in die Plasmamembran benötigt werden (Spiess, 1995). Daher sollte die Deletion des N-Terminus die Insertion des SERT in die Plasmamembran nicht beeinflussen. Um die N-terminale Domäne zu deletieren, wurden die Basenpaare 410 - 729 der SERT-cDNA mittels PCR amplifiziert, welche für die Aminosäuren 84 - 190 kodieren. Dieses Fragment wurde mittels einer internen singulären HaeII-Schnittstelle an dem 3'-Ende und einer artifiziell angefügten XhoI-Restriktionsschnittstelle an dem 5'-Ende an das 3'-Fragment einer HaeII-geschnittenen SERT-cDNA, bzw. an den XhoI-geschnittenen eukaryotischen Expressionsvektor pCis (Gorman et al., 1989) ligiert. Ein am 5'-Ende zusätzlich eingefügtes Startkodon markierte den Translationsstart. Somit wurde eine SERT-Mutante generiert, die gegenüber dem Wildtypprotein am N-Terminus um 83 Aminosäuren verkürzt vorlag. Für die Konstruktion der C-terminalen Deletionsmutante wurde ein 384 Basenpaare großes cDNA-Fragment amplifiziert, welches für die Aminosäuren 476 - 604 kodierte. Dieses Fragment wurde über eine 3'-terminale singuläre

AatII-Restriktionsschnittstelle an die AatII-geschnittene SERT-cDNA ligiert. An dem 5'-Ende wurde ein Stopkodon und eine HpaI-Restriktionsschnittstelle artifiziell angefügt. Letztere erlaubte die Ligation in den eukaryotischen Expressionsvektor pCis, während das Stopkodon das Ende der translatierten Region markierte. Diese Δ C-SERT-cDNA war gegenüber der Wildtyp (wt)-SERT-cDNA um die C-terminalen 26 Aminosäuren (Aminosäuren 605 - 630) deletiert. Die an dem N-Terminus verbliebenen vier zytoplasmatischen Aminosäuren vor der ersten postulierten Transmembrandomäne bzw. die neun C-terminalen zytoplasmatischen Aminosäuren hinter der letzten postulierten Transmembrandomäne sollten für eine korrekte Insertion der angrenzenden Transmembrandomäne in die Plasmamembran genügen, da die zytoplasmatischen Aminosäuren aufgrund ihrer Ladung die hydrophoben ungeladenen Aminosäuren der Transmembrandomäne in der Plasmamembran theoretisch fixieren. Die Expression und Funktionalität dieser Mutanten wurde im folgenden verifiziert.

3.1.1 Biochemischer Nachweis der rekombinanten Expression der Deletionsproteine

Die Expression der rekombinanten Deletionsmutanten in dem eukaryotischen Expressionsvektor pCis (Gorman et al., 1989) wurden durch Western-Blot Analyse untersucht. Als positive Kontrolle diente der wt-SERT, der ebenfalls in dem pCis-Expressionsvektor vorlag (Schloss und Betz, 1995). Dazu wurden die verschiedenen Konstrukte mittels CaPO_4 -Präzipitation in HEK-293 Zellen transfiziert und 48 h später die Membranen präpariert. Da vorhergehende Studien eine cystein-abhängige Oligomerisierung des SERT vorgeschlagen hatten (Jess et al., 1996), wurden die Proteine unter nicht-reduzierenden Bedingungen auf einem 7,5 % SDS-Gel aufgetrennt und nach anschließendem Western-Transfer mit dem Δ -SERT-968 Antikörper (Sur et al., 1996) immundetektiert.

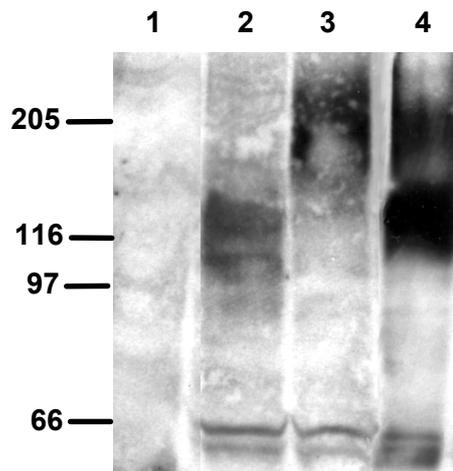


Abb. 3.1: Oligomerstruktur der Deletionsmutanten des SERT. Auf einem 7,5 % Polyacrylamidgel wurden Membranproteine aus HEK-293 Zellen, die den wt-SERT (Spur 4), Δ N-SERT (Spur 2) oder Δ C-SERT (Spur 3) heterolog exprimierten, unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach anschließendem Western-Transfer wurde der SERT mit einem spezifischen Δ -SERT-968-Antikörper nachgewiesen. In Spur 1 sind Membranen von Kontrollzellen aufgetragen. Die immunreaktiven Banden sind mit Pfeilköpfen markiert. Die Positionen der Markerproteine sind links in kDa angegeben.

Abbildung 3.1 zeigt, daß der Δ -SERT-968 Antikörper in Zellen, die den wt-SERT heterolog exprimierten, eine Doppelbande um 60 kDa erkannte (Spur 4, unterer Pfeilkopf). Diese repräsentiert die monomere Form des SERT (Sur et al., 1996; Kilic und Rudnick, 2000). Zwei weitere Banden höheren Molekulargewichts um 140 kDa (mittlerer Pfeilkopf) und etwa 200 kDa (oberer Pfeilkopf) stellen wahrscheinlich oligomere Formen des Membranproteins dar (Jess et al., 1996; Kilic und Rudnick, 2000). Die Unschärfe dieser Banden mag auf der komplexen Glykosylierung des Proteins beruhen (Tate und Blakely, 1994). Ähnlich dem wt-Protein fand sich für beide Mutanten auch die Doppelbande bei 60 kDa. Zudem wurde mit Δ C-SERT auch eine majoritäre immunreaktive Bande um 200 kDa erhalten (Spur 3). Diese Bande, welche möglicherweise eine tetramere Form des SERT repräsentiert (Jess et al., 1996; Kilic und Rudnick, 2000), trat jedoch nicht in mit Δ N-SERT (Spur 2) transfizierten Zellen auf. Als mögliche oligomere Form wurde hier nur eine Bande um 140 kDa gefunden. Diese Bande fehlte wieder in der Expression der C-terminalen Deletionsmutante. Das Fehlen dieser Immunsignale in Spur 1, welche die mit dem pRC-Vektor transfizierten Kontrollzellen widerspiegelt, zeigte die Spezifität des Antikörpers.

Das unterschiedliche Erscheinen von Banden höheren Molekulargewichts in den

Membranpräparationen der Zellen, die mit den mutierten cDNAs transfiziert worden waren, spricht für eine fehlerhafte Oligomerisierung der mutierten Proteine, die möglicherweise auf mangelhafter Faltung oder veränderten posttranslationalen Modifikationsreaktionen beruht.

3.1.2 Untersuchungen zur Funktionalität der heterolog exprimierten Deletionskonstrukte

Um zu untersuchen, wie die Termini die Funktion des SERT beeinflussen, wurden Serotonin-Aufnahmestudien an den N- und C-terminal deletierten Proteinen durchgeführt. Dazu wurden die Deletionskonstrukte parallel in HEK-293 Zellen, die zuvor in “24-well“-Kulturschalen ausgesät worden waren, nach der CaPO₄-Methode transfiziert und 48 h später die Aufnahme von [³H]5-HT gemessen. Da vorerst nur ein Hinweis auf die Funktionalität der Mutanten erhalten werden sollte, wurde von einer vollständigen Sättigungsanalyse abgesehen und lediglich die zeitliche Sättigung bei einer konstanten Substratkonzentration von 250 nM [³H]5-HT verfolgt.

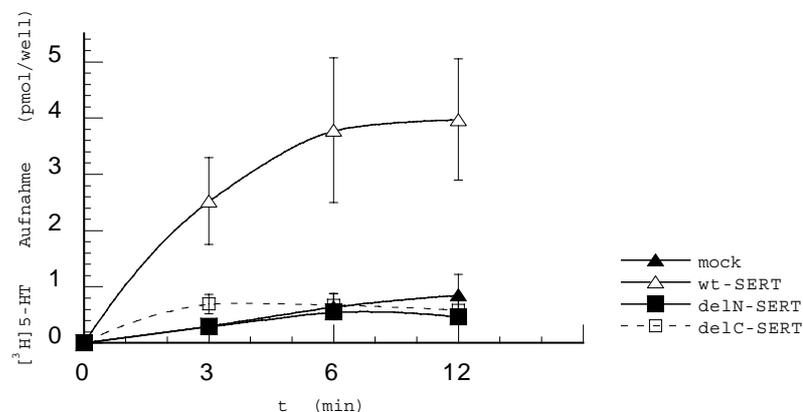


Abb. 3.2: [³H]5-HT Aufnahme in transient transfizierten HEK-293 Zellen. Die zeitliche Sättigung der [³H]5-HT-Aufnahme wurde in Zellen, die das Wildtyp-SERT-Protein (wt-SERT), □C-SERT (delC-SERT) oder □N-SERT (delN-SERT) heterolog exprimierten, in Gegenwart von 250 nM [³H]5-HT bestimmt. Die unspezifische Wiederaufnahme wurde in Kontrollzellen, die mit leerem Vektor transfiziert wurden (mock), ermittelt. Aus den Daten wird ersichtlich, daß die Deletionen der zytoplasmatischen Termini einen kompletten Transportverlust des SERT indizieren. Alle Werte ergaben sich aus drei Einzelmessungen, die jeweils in Quadruplikaten durchgeführt wurden.

Wie aus Abb. 3.2 ersichtlich ist, zeigten nur diejenigen Zellen [³H]5-HT-Aufnahme, die das wt-SERT-Protein exprimierten. In Gegenwart von 250 nM [³H]5-HT traten diese Zellen

nach 9 min in die Sättigungsphase ein. Die Zellen, die \square C-SERT bzw. \square N-SERT exprimierten, wiesen dagegen keine Transportaktivität auf. Während der wt-SERT zum Zeitpunkt des Eintritts in die Sättigungsphase eine Aufnahmekapazität von $3,97 \pm 1,07$ pmol/well aufwies, wurden für die \square C-SERT- bzw. \square N-SERT-exprimierenden Zellen eine Transportrate von $0,58 \pm 0,18$ pmol/well, bzw. $0,46 \pm 0,03$ pmol/well analysiert. Da bereits Kontrollzellen, die mit einem insertlosem eukaryotischen Expressionsvektor transfiziert worden waren, zu diesem Zeitpunkt $0,85 \pm 0,37$ pmol/well [3 H]5-HT aufgenommen hatten, ist das Substrat, das in die \square N- bzw. \square C-SERT-exprimierenden Zellen aufgenommen wurde, dem unspezifischen Transport zuzumessen. Hieraus läßt sich folgern, daß beide zytoplasmatischen Termini des SERT für dessen Transportfunktion benötigt werden.

3.1.3 Immunzytochemischer Nachweis der Expression des SERT und der Deletionsmutanten

Da der Funktionsverlust der Deletionsmutanten und deren verändertes gelelektrophoretisches Laufverhalten auf einer fehlerhaften posttranslationalen Modifikation beruhen könnte, wurde die zelluläre Lokalisation der heterolog exprimierten Deletionskonstrukte analysiert. Hieraus kann Aufschluß gewonnen werden, ob die Termini für die Insertion des SERT in die Plasmamembran notwendig sind. Erhöhte intrazelluläre Immunreaktivität wäre beispielsweise ein Hinweis darauf, daß das rekombinante Protein in Endosomen oder im Golgi-Apparat der Zelle vorliegt. HEK-293 Zellen wurden deshalb mit der cDNA des jeweiligen Deletionskonstrukts bzw. des wt-SERT transfiziert und nach 24 h für die immunzytochemische Analyse in Methanol fixiert. Das SERT-Protein bzw. die Mutanten wurden mit dem \square -SERT-968-Antikörper detektiert und unter Verwendung eines CY3-Fluorochrom-tragenden Antikörpers gegen den IgG-Anteil des primären Antikörpers sichtbar gemacht.

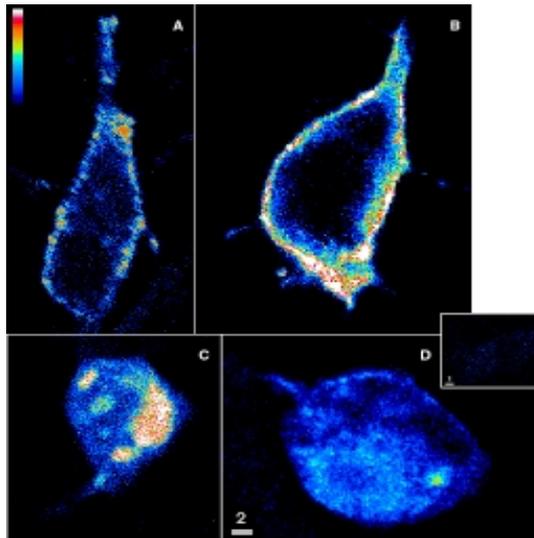


Abb. 3.3.: Immunzytochemische Färbungen der in HEK-293 heterolog exprimierten SERT-Konstrukte und des GlyT1b. Durch konfokale Mikroskopie wurden optische Schnitte durch transfizierte Zellen gelegt, die wt-SERT (A); GlyT1b (B); □N-SERT (C) und □C-SERT (D) heterolog exprimierten. Der Einsatz in D zeigt eine nicht-transfizierte Kontrollzelle, die das gleiche Färbeprotokoll wie die SERT-exprimierenden Zellen durchlaufen hat. Der Größenmaßstab in D gibt 2 µm wieder. Die Farbskala in A repräsentiert die Intensitäten der in Pseudofarben wiedergegebenen Immunfluoreszenzen (weiss = stärkste Immunfluoreszenz; blau = schwächste Immunfluoreszenz). Während in A und B eine eindeutige Membranfärbung nachweisbar ist, zeigen die Zellen in C und D eine erhöhte intrazelluläre Immunreaktivität und fehlende Membranfärbung. Die Immunreaktivität des SERT in A ist an einigen Membranarealen stärker konzentriert, während der GlyT1b (B) eher gleichmäßig an der Membran verteilt vorliegt.

Abb. 3.3. A zeigt eine membranständige Immunreaktivität des wt-SERT, die an einigen Bereichen der Plasmamembran verstärkt auftritt. Ein weiterer Vertreter dieser Proteinfamilie, der Glycintransporter GlyT1b, zeigte nach dessen heterologen Expression in HEK-293 Zellen dagegen eine gleichmäßige Verteilung an der Plasmamembran (Abb. 3.3 B). Diese ungleichmäßige Verteilung des SERT in der Plasmamembran könnte auf einer Lokalisation und Aggregation dieses Proteins in definierten Plasmamembranarealen hindeuten. Von anderen membranständigen Proteinen, wie dem Glycinrezeptor, wurde eine vergleichbare Akkumulation der Immunreaktivität an der Membran berichtet, die sich auf der Assoziation des Rezeptors mit Proteinen des Zytoskeletts begründet (Kirsch et al., 1993). Möglicherweise liegen für die Akkumulation der membranständigen SERT-Immunreaktivität ähnliche Mechanismen zugrunde. Solche Zellen, die mit den C- und N-terminalen Deletionskonstrukten transfiziert worden waren, erschienen abgerundet und apoptotisch (Abb. 3.3, C und D). Die Immunreaktivität dieser Zellen war intrazellulär

lokalisiert, z. T. angereichert in großen Aggregaten, die Endosomen oder Kompartimente des Golgi-Apparats repräsentieren könnten. Hieraus muß geschlossen werden, daß die endständigen Termini des SERT entweder für dessen korrekte Faltung und Oligomerisierung oder für den Transport und die Insertion des SERT in die Plasmamembran unabdingbar sind. Diese Prozesse werden durch interagierende Proteine, wie z. B. Chaperone, bewerkstelligt. Möglicherweise stellen die Termini die Interaktionsdomänen für solche Proteine dar.

3.2 Identifizierung von zytoplasmatischen Interaktionspartnern des SERT

Neben den oben dargestellten Befunden ließen weitere Beobachtungen vermuten, daß der SERT mit einer Vielzahl von Proteinen assoziiert vorliegt, z. B. um dessen Lokalisation und Transportfunktion zu regulieren. So ist der SERT nicht nur an der Plasmamembran der Präsynapse, sondern auch in Varikositäten von Axonen lokalisiert (Sur et al., 1996). In polarisierten Zellen, wie z. B. in MDCK Zellen, findet sich ausschließlich eine basolaterale Expression dieses Neurotransmittertransporters (Ahn et al., 1996), während der endogene SERT in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks nur dort an der Plasmamembran detektiert wird, wo Zell-Zell Kontakte ausgebildet wurden (Schroeter et al., 1997). Weiterhin zeigten pharmakologische und biochemische Studien, daß der Substrattransport des SERT durch die Assoziation mit verschiedenen Kinasen reguliert wird, wie unter Kapitel 1.3.3 beschrieben. Die Analyse der Primärstruktur des SERT mit Hilfe des Programms PhosphoBase (Kreegipuu et al., 1999) zeigte, daß die Konsensus-Phosphorylierungsmotive für die Proteinkinasen C und A sowie für die Calmodulin-abhängige Kinase (CaMKII) ausschließlich in den zytoplasmatischen Termini des SERT liegen (vgl. Abb.1.2). Eine Ausnahme stellt eine PKC-Phosphorylierungsstelle in der dritten intrazellulären Domäne dar. Die Interaktion der N- und C-Termini mit diesen Kinasen ist aufgrund der pharmakologischen Nachweise zur Regulation der SERT-Transportaktivität wahrscheinlich. Auch Phosphorylierungsstudien belegten die Modifikation des SERT, jedoch gelang die Coimmunpräzipitation mit Kinasen bislang nicht (Blakely et al., 1998; Ramamoorthy und Blakely, 1999). Neben den Phosphorylierungsstellen sind in den Termini keine weiteren

Proteininteraktionsdomänen aufzufinden. Um mögliche zytoplasmatische Interaktionspartner des SERT zu identifizieren, wurde im folgenden das GAL4-Zwei-Hybrid-System eingesetzt.

Als Köder wurde der zytoplasmatische 3 kDa umfassende C-Terminus des SERT (SERT-CT) gewählt. Der C-Terminus stellt nach dem N-Terminus die größte intrazelluläre Domäne des SERT dar. Wie in dem N-Terminus befinden sich hier Phosphorylierungsmotive für PKC und PKA. Weiterhin befindet sich hier das Konsensusmotiv für die Calmodulin-abhängige Kinase (CaMKII). Als ein wesentlicher Vorteil gegenüber dem N-Terminus erschien es, daß der C-Terminus, würde er als Fusionsprotein mit der Bindungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors der Hefe (GAL4BD) vorliegen, über einen freien endständigen Terminus verfügen würde. Diese Situation käme den physiologischen Gegebenheiten näher. Der unter physiologischen Bedingungen freie N-Terminus wäre dagegen fixiert und die membranangrenzenden Aminosäuren freiständig. Unter diesen Gegebenheiten erschien die Wahrscheinlichkeit höher, physiologisch relevante Interaktionspartner mit dem C-Terminus zu identifizieren. Für die folgenden Screeningexperimente wurde daher als Köder der C-Terminus C-terminal an die Bindungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors, der durch den Bindungsdomänenvektor pBD kodiert wurde, fusioniert (pBD-CT). Dazu wurden die Basenpaare, die für die 30 C-terminalen Aminosäuren kodierten, mittels PCR amplifiziert, einer Polynukleotidkinase-Behandlung unterzogen und in den SmaI-geschnittenen Hefeexpressionsvektor pBD ligiert. Das Fusionsprotein aus Bindungsdomäne und C-Terminus wurde anschließend auf seine mögliche intrinsische Fähigkeit, mit der GAL4-Aktivierungsdomäne (GAL4AD) zu interagieren, überprüft. Hierzu wurde der pBD-CT mit dem Vektor pAD, der für die Aktivierungsdomäne kodiert, in Hefezellen des Stamms Y190 cotransfiziert. Die Hefezellen wurden dann auf ihre Wachstumsfähigkeit auf Selektionsmedium (-Trp, -Leu, -His) und auf die Expression der β -Galaktosidase untersucht. Zur positiven Kontrolle des Systems wurde mit Kontrollvektoren, die die interagierenden Proteine p53 und das SV40-T-Antigen kodierten (Schmiege und Simmons, 1984), analog verfahren. Der Ausschluß unspezifischer Interaktionen erfolgte dagegen durch Coexpression des extrazellulären Matrixproteins Lamin C, welches nicht mit dem SV40-T-Antigen interagiert.

In Tabelle 3.1 ist ein repräsentatives Ergebnis aus einer Serie solcher Cotransformationsversuche (n = 3) dargestellt.

Expressionsvektor mit GAL4BD	Expressionsvektor mit GAL4AD	Wachstum auf – Trp/-Leu	Wachstum auf – Trp/-Leu/-His	β-Galaktosidase Aktivität
pBD	pAD	20	0	-
p53	pSV40	100	80	+
pLam	pSV40	150	20	-
pBD-CT	pAD	200	0	-

Tabelle 3.1: Kontrolltransformationen in Hefen des Stammes Y190. Verschiedene Kontrollvektoren, die entweder für die GAL4BD (pBD) oder für die GAL4AD (pAD) kodierten, wurden cotransformiert. Die Komplementationeffizienz wurde anschließend durch Vergleich des Wachstums auf normalen -Trp/-Leu-Medien und auf Selektionsmedium ohne Histidin (-Trp,-Leu) analysiert. Nur bei positiver Interaktion zwischen AD- und BD-Proteinen wird Wachstumsfähigkeit der Hefezellen auf Selektionsmedium und eine Induktion der Expression der β-Galaktosidase nachweisbar. Positive Resultate sind durch Blaufärbung über einen kolorimetrischen Nachweis der Enzymexpression ("+"-Zeichen) dargestellt, während fehlende Blaufärbung ("-"-Zeichen) eine mangelnde Interaktion indiziert. Die Anzahl der jeweils gewachsenen Hefeklone ist angegeben. Die Vektoren der GAL4BD (pBD) kodierten für Fusionsproteine aus der GAL4BD und dem Oncogen p53 (p53), dem extrazellulären Matrixprotein Lamin C (pLam) sowie dem SERT-CT-Konstrukt (pBD-CT). Der Kontrollvektor pSV40 exprimiert ein Fusionsprotein aus der GAL4AD und dem SV40-T-Antigen.

Hieraus wird ersichtlich, daß Hefen, die mit den insertlosen Expressionsvektoren der GAL4BD und GAL4AD transformiert worden waren, aufgrund mangelnder Interaktion im allgemeinen kein Wachstum auf Selektionsmedium zeigten. Einige Cotransformanten, welche die nicht-interagierenden Proteine Lamin C und das T-Antigen des SV40 coexprimierten, zeigten schwaches Wachstum unter Selektionsbedingungen (-Trp, -Leu, -His) bei hoher Cotransformationseffizienz (Wachstum auf -Trp, -Leu). Der kolorimetrische Nachweis der β-Galaktosidase-Expression dieser Hefezellen fiel jedoch negativ aus. Das Wachstum dieser Zellen beruhte also auf einer unvollständigen Histidinauxotrophie des Hefestammes. Die Coexpression der interagierenden Proteine p53 und SV40-Antigen (Positivkontrolle) vermittelte den Hefen Histidinautotrophie und eine deutlich nachweisbare Expression der β-Galaktosidase. Diejenigen Hefezellen, die mit dem "Köderprotein" pBD-CT und dem pAD cotransfiziert worden waren, zeigten trotz hoher Cotransformationseffizienz kein Wachstum unter Selektionsbedingungen. Damit war nachgewiesen, daß der

zytoplasmatische SERT-CT nicht mit der GAL4AD interagiert und als "Köder" zur Isolierung putativer Interaktionspartner geeignet war. Nachfolgend wurde mit dem pBD-CT-Vektor eine Zwei-Hybrid-cDNA-Bibliothek aus dem Hirn neugeborener Ratten nach Interaktionspartnern des SERT durchsucht (Abb. 3.4).

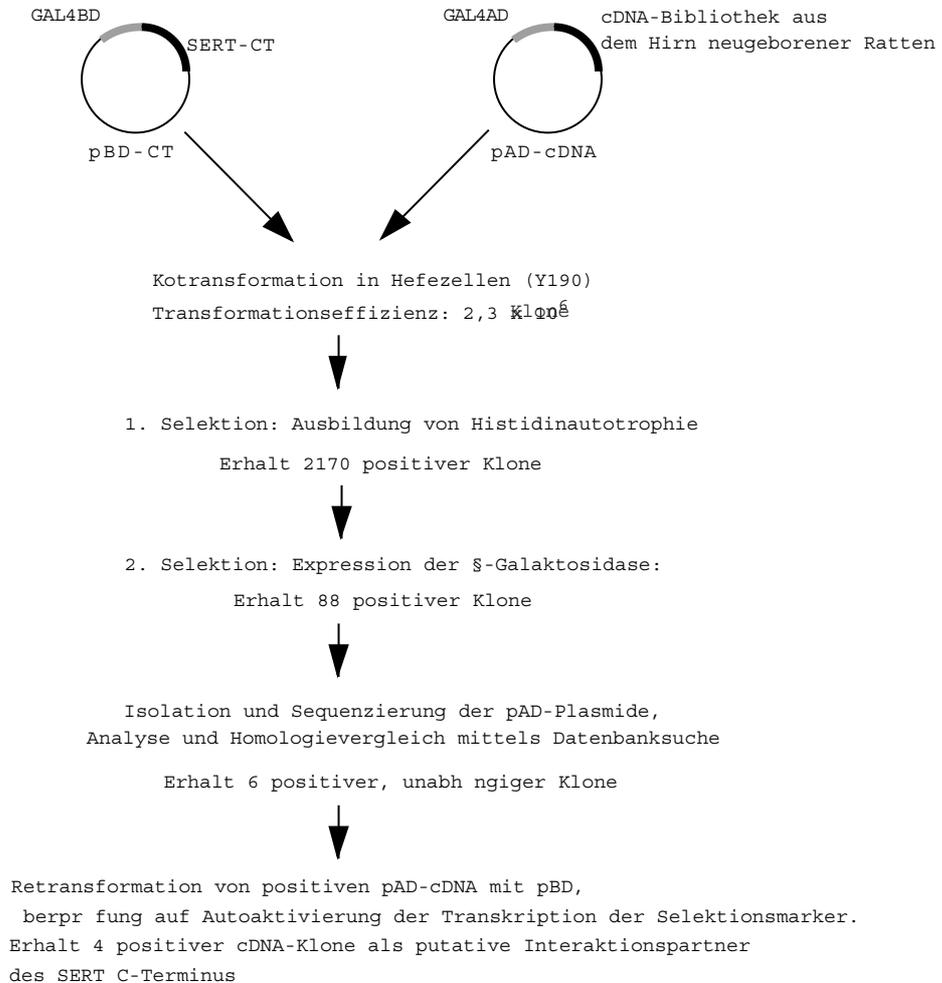


Abb. 3.4: Legende siehe folgende Seite

Abb. 3.4: Flußschema zum Einsatz des Zwei-Hybrid-Systems zur Identifizierung von neuen Interaktionspartnern für ein Köderprotein. Als Köder wurde der C-Terminus des SERT an die GAL4-BD fusioniert (pBD-CT). Der zweite Expressionsvektor trug die GAL4-AD, hinter welche Inserts einer cDNA-Bibliothek aus dem Hirn neugeborener Ratten kloniert worden waren. Diese Vektoren wurden in Hefezellen des Stammes Y190 mit einer Effizienz von $2,3 \times 10^6$ cotransfiziert. Putative Interaktionspartner wurden auf Histidinautotrophie und die Expression von β -Galaktosidase selektioniert. Von 2170 Klonen, die auf Histidinmangelmedium zu wachsen vermochten, exprimierten 88 auch die β -Galaktosidase. Aus 45 Klonen, die wiederholt eine Blaufärbung zeigten, wurden die pAD-Plasmide isoliert und deren cDNA sequenziert. Aus dem Leseraster der Aktivierungsdomäne wurde die Aminosäuresequenz abgeleitet. Homologievergleiche mit diversen Datenbanken identifizierten sechs cDNA-Klone, bei denen Nukleinsäuresequenz und Aminosäuresequenz mit dem ersten Leseraster des Homologen aus der Datenbank identisch waren. Die Fähigkeit dieser positiven Klone die Autoaktivierung der Markergene zu induzieren, wurde durch erneute Cotransfektion des Kandidatenklons mit dem insertlosen pBD untersucht. Blaufärbung oder starkes Wachstum der Klone, die mit dem pBD transformiert waren, enttarnten zwei falsch-positive Klone.

Hefen des Stammes Y190 wurden sequentiell mit dem Expressionsvektor pBD-CT und einer Zwei-Hybrid-cDNA Bibliothek aus der Poly(A)-mRNA aus dem Gehirn neugeborener Ratten (Stratagene) transformiert und auf Selektionsmedium (-Leu/-Trp/-His) ausplattiert. Die Transformationseffizienz der cDNA-Bibliothek wurde auf $2,25 \times 10^6$ Klone bestimmt, so daß die cDNA-Bibliothek, die eine Komplexität von 1×10^6 Klonen umfaßte, gut doppelt abgedeckt war. Nach drei Tagen wurden über die folgenden sechs Tage 2170 Klone isoliert, die potentielle Interaktionspartner des SERT-CT darstellten. Der kolorimetrische Ansatz erbrachte in 88 dieser Klone den Nachweis der β -Galaktosidase-Expression. Da Hefezellen unter Umständen mehrere Vektoren gleichzeitig aufnehmen, wurden diese Klone viermal auf Selektionsmedium vereinzelt. Aus 45 Klonen, die anschließend noch β -Galaktosidase Expression aufwiesen, wurde die Plasmid-DNA gewonnen, in *E. coli* retransformiert und hieraus der pAD-Vektor isoliert. Um die Vereinzlung der Klone doppelt zu verifizieren, wurden jeweils zwei bis vier der Bakterienkolonien herangezogen. Deren cDNA-Fragmente, die mit den Restriktionsenzymen EcoR1/Xho1 hinter die GAL4AD kloniert worden waren, wurden anschließend einer Restriktionsanalyse unterworfen. Die Fragmente übereinstimmender Vektoren wurden sequenziert und mit bereits bekannten, in Datenbanken vorliegenden Nuklein- bzw. Aminosäuresequenzen nach dem BLAST-Algorithmus (Altschul et al., 1997) verglichen. Ergaben sich hier keine Homologien, wurde die dbest-Datenbank nach exprimierten, aber unbekanntem cDNA-Sequenzen durchsucht. Entsprechend wurde mit der Aminosäuresequenz verfahren, die dem offenen Leseraster der Aktivierungsdomäne

abgeleitet wurde. Die Sequenzen aller Klone und deren Homologien sind im Anhang aufgeführt. Nur Klone, die signifikante Homologien auf Nuklein- bzw. Aminosäurebasis aufwiesen, wurden als tatsächliche Kandidatenproteine betrachtet. Nach dieser Analyse verblieben die in Tabelle 3.3 aufgelisteten sechs Klone als potentielle Interaktionspartner des SERT-CT.

Klon #	homologe Proteine	Homologie (%) AS (NS)	Proteindomänen
6/5.2	humanes periodisches Tryptophan Protein2 (hPWP2)	80 (72)	Leucin Zipper, repetitive WD-Sequenz
7/6.2	β -UE der PAF-AH 1b ("Platelet-activating-factor"-Acetylhydrolase)	100 (100)	repetitive WD-Sequenz
9/7.4	Smarce-ähnliches Protein	99 (94)	SWI/SNF verwandtes, Matrix assoziiertes, Aktin abh. Mitglied der Chromatin Unterfamilie E
16/8.8	Maus F52 = MacMARCKS (myristoyliertes alanin-reiches PKC Substrat)	96 (96)	<input type="checkbox"/> MARCKS Homologie Domäne <input type="checkbox"/> PKC Phosphorylierung <input type="checkbox"/> CaM- und Aktin-Bindung
21/7.5	m W07G4.3	45 (BLAST) (90 (dbest))	Serin/Threonin-Kinase Domäne
29/3.3	NADH-Cytochrom P450 Oxidoreduktase	94 (92)	

Tabelle 3.3: Zusammenfassende Darstellung der Klone, die auf Selektionsmedium β -Galaktosidaseaktivität exprimierten und deren Aminosäuresequenz (AS) im offenen Leseraster der GAL4AD vorlag. Die homologen Proteine, die aus BLAST oder dbest Datenbank-Vergleichen erhalten wurden, die zugehörigen Nukleinsäure (NS)- und Aminosäure (AS)- Homologiewerte sowie in den Homologen konservierte Protein-Domänen sind angegeben.

Diese Klone wurden anschließend hinsichtlich ihrer intrinsischen Fähigkeit, mit der Bindungsdomäne zu interagieren, untersucht. Hierdurch sollte durch Autoaktivierung die Transkription der Selektionsmarker initiiert werden. Ein solcher Befund bewahrheitete sich für die Klone 9/7.4 und 29/3.3, die nach der Cotransfektion mit dem pBD-Vektor deutliches Wachstum auf Selektionsmedium zeigten und so als autoaktivierend klassifiziert werden konnten. Die verbliebenen vier Klone kodierten Proteine mit den folgenden Merkmalen:

a) Der Klon 21/7.5 zeigte auf Aminosäureebene eine 45%ige Homologie zu dem C-terminalen Fragment einer regulatorischen Untereinheit einer Proteinkinase 2A aus *C. elegans*. Dieses 82 kDa Protein verfügt über ein Serin-Threonin-Kinase Motiv. Auf

Nukleinsäureebene konnte nur in der dbest-Datenbank eine 90 %ige Homologie zu einem *M. musculus* mRNA-Klon identifiziert werden.

b) Der Klon 6/5.2 war auf Aminosäureebene zu 80 % mit dem C-terminalen Fragment des humanen periodischen Tryptophan-Proteins ("human periodic tryptophane protein", hPWP) homolog (Laloti et al., 1996; Yamakawa et al., 1996). Dieses 92 kDa große humane Protein enthält sechs repetitive Tryptophan-Aspartat (WD)-Sequenzen und ein partielles Leuzin-Zipper-Motiv. Die WD-Domänen suggerieren eine Zugehörigkeit dieses Proteins zur β -Transducin-Familie (Garcia-Higuera et al., 1996). Die Funktion dieses in höheren Eukaryoten ubiquitär exprimierten Proteins ist bislang unklar (Laloti et al., 1996). Shafaatian et al. zeigten jedoch, daß das Hefehomolog PWP2 die Zellteilung und das Zellwachstum von *S. cerevisiae* mitkontrolliert (Shafaatian et al., 1996). Die Depletion dieses zytosolischen Proteins bewirkt die Ausbildung multipler Zellteilungsknospen mit Defekten in der Selektion der Knospungsstelle sowie in der Zytokinese. Diese Befunde lassen vermuten, daß diesem Säugerprotein eine Rolle bei der Sortierung und Abtrennung von Vesikeln zukommt.

c) Der Klon 7/6.2 kodierte für die 30 kDa- β -Untereinheit der "Platelet-activating-factor" (PAF)-Acetylhydrolase (PAF-AH) der Isoform 1b, eine ausschließlich intrazellulär auftretende Isoform der PAF-AH. Die PAF-AH stellen eine neue Unterfamilie der Phospholipasen dar, die entgegen anderen Phospholipasen ihr Substrat, den PAF, Ca^{2+} -unabhängig hydrolysieren. (Bal et al., 1997). Bis auf die 26 N-terminalen Aminosäuren war die gesamte kodierende Region des Proteins in dem isolierten Klon enthalten. Diese Untereinheit stellt den katalytischen Anteil einer trimeren Serin-Esterase dar und wird einer Unterfamilie der Phospholipasen A2 zugeordnet. Neben der katalytischen Serin-Esterase-Domäne verfügt die β -Untereinheit wie das hPWP über repetitive WD-Domänen. Da dieser Proteinkomplex weiterhin eine vergleichbare Quartärstruktur wie G-Proteine aufweist, wird die PAF-AH1b ebenfalls als ein Mitglied der β -Transducin-Familie diskutiert (Hattori et al., 1995b). Ihre Funktion beruht in der Katalyse und der damit einhergehenden Kontrolle der PAF-Konzentration, wodurch möglicherweise die neuronale Zellmigration und -differenzierung reguliert wird (Sapir et al., 1997; Shmueli et al., 1999).

d) Der Klon 16/8.8 enthielt die komplette kodierende Region sowie Teile der 5'-untranslatierten Sequenz des zur Familie der myristoylierten alanin-reichen C Kinase Substrate (MARCKS) zählenden MacMARCKS-Proteins (auch F52 oder MRP, "MARCKS-

related protein" genannt). Proteine dieser Familie sind in der Lage, sowohl Calmodulin (CaM) als auch Aktin zu binden und werden durch die Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert (Graff et al., 1989b; Li und Aderem, 1992; Hartwig et al., 1992). Da sich die Interaktionen von PKC, CaM und Aktin mit dem MARCKS-Homologen gegenseitig ausschließen, werden Mitglieder dieser Proteinfamilie als Überträger von Signalen der PKC- oder CaM-Signaltransduktionswege auf das Zytoskelett diskutiert (Aderem, 1992a). Weiterhin scheint MacMARCKS Vesikel-bewegungen an der Plasmamembran zu regulieren (Zhu et al., 1995; Yue und Li, 1998).

Alle weiteren Hefeklone, die für Proteine kodierte, welche nicht im offenen Leseraster der GAL4AD vorlagen, oder welche die Transkription autoaktivierend initiierten, wurden als falsch positive Klone angesehen und hier nicht weiter untersucht.

Die Interaktion der oben genannten potentiellen Bindungspartner des SERT-CT wurde im weiteren Verlauf durch biochemische, immunzytochemische und pharmakologische Untersuchungen näher verifiziert. In der vorliegenden Arbeit wurden die Klone 7/6.2 und 16/8.8, die für die β -Untereinheit der PAF-AH1b (β PAF-AH) bzw. für das MacMARCKS-Protein kodierte, auf ihre Interaktionsspezifität mit dem SERT untersucht. Die Auswahlkriterien für die weitere Untersuchung dieser Proteine sind in Kapiteln 3.3 und 3.4 dargestellt.

3.3 Verifizierung der Interaktion zwischen der PAF-AH und dem SERT-CT

Die intrazelluläre Isoform 1b der PAF-AH besteht aus zwei bis drei Untereinheiten, der regulatorischen α -Untereinheit und den katalytischen β - bzw. γ -Untereinheiten (Hattori et al., 1994a; Hattori et al., 1994b; Hattori et al., 1995b). Die β -Untereinheit wird im Gegensatz zur α -Untereinheit, die transient während der Embryonalentwicklung exprimiert wird, sowohl während des Embryonalstadiums als auch im Adulten exprimiert (Albrecht U et al., 1996; Manyá et al., 1998). Beide Untereinheiten sind jedoch Mitglied der Ca^{2+} -unabhängigen Phospholipase A2-Familie (Hattori et al., 1995b; Balsinde und Dennis, 1997), welche die Hydrolyse des PAF (1-O-Alcyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) (Demopoulos et al., 1979) zu lyso-PAF an der *sn*-2-Position katalysiert und hierdurch

deaktiviert (Abb. 3.5).

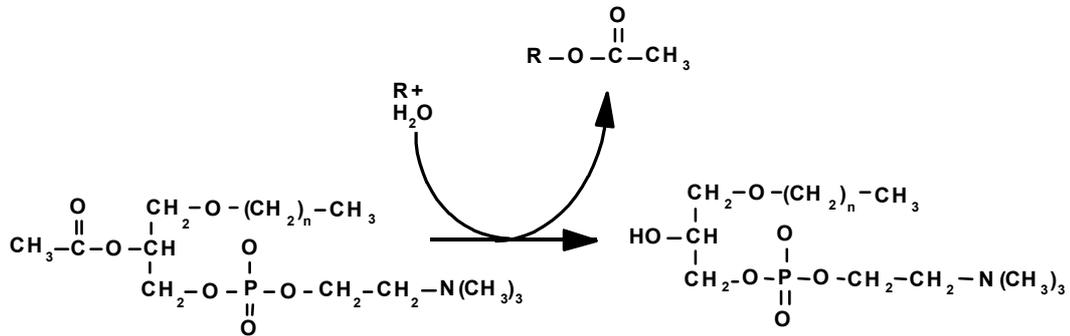


Abb. 3.5: Schema der durch die β -Untereinheit der PAF-AH1b katalysierten Reaktion. Der "Platelet-Activating-Factor" (PAF, 1-O-Alcyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) wird an der *sn*-2 Position zu dem inaktiven lyso-PAF hydrolysiert und die freigesetzte Acetylgruppe auf einen Empfänger (R) übertragen.

Man unterscheidet sezernierten extrazellulären und intrazellulären PAF. Als bioaktives Phosphocholin-Derivat fungiert extrazellulärer PAF neben seiner namensgebenden Rolle zur Aktivierung von Blutplättchen bei der Thrombozytenkoagulation auch als chemischer Botenstoff bei Entzündungsprozessen und bei der Vasokonstriktion (Hanahan, 1986). Im Gehirn induziert er als retrograder Botenstoff die Langzeitpotenzierung (Kato et al., 1994) und die Differenzierung von Neuronen (Kornecki und Ehrlich, 1988). Diese Effekte des extrazellulären PAF werden höchstwahrscheinlich über den G-Protein-gekoppelten PAF-Rezeptor vermittelt (Hwang, 1990; Honda et al., 1991; Shimizu et al., 1996). Dessen Stimulierung bewirkt die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und der Phospholipase A2 (PLA2) (Hwang, 1990; Nakashima et al., 1997; Centemeri et al., 1999;) mit einer resultierenden Entstehung von Diacylglycerol (DAG) und Inositolphosphaten. Der Wirkort bzw. die Wirkart des endogenen PAF ist jedoch bislang unklar. Null-Mutanten der PAF-AH β -Untereinheit, die an der Regulation der intrazellulären Konzentration des PAF beteiligt zu sein scheint (Albrecht U et al., 1996), weisen schwere Defekte in der Embryonalentwicklung sowie in der neuronalen Migration auf (Hirotsune et al., 1998). Da der Phänotyp dieser Mutanten sich von allen anderen bislang beschriebenen Modellen der neuronalen Migration unterscheidet, wird angenommen, daß die PAF-AH1b einen neuen Regulationsweg der neuronalen Migration darstellt (Übersichtsartikel de Rouvroit und Goffinet, 1998b).

Aufgrund gemeinsamer Funktionen der Substrate der PAF-AH und des SERT bei der Blutkoagulation, der Vasokonstriktion und als Mitogen erschien die in den Hefezellen identifizierte Interaktion von potentieller physiologischer Bedeutung und wurde deshalb näher biochemisch und immunzytochemisch charakterisiert.

3.3.1 Biochemischer Nachweis der Interaktion zwischen der PAF-AH und dem SERT-CT

Die Interaktion zwischen der β -Untereinheit der PAF-AH und dem SERT-CT wurde zuerst biochemisch durch Copräzipitation bestätigt. Eine cDNA, welche die vollständige β PAF-AH des Rindes kodierte und auf Aminosäureebene zu 100 % homolog zu der Sequenz der Ratte ist (Watanabe et al., 1998), wurde von Dr. O. Reiner (Weizman Institute of Science, Dept. of Molecular Genetics, Rehovot, Israel) erhalten. Dieser Klon erlaubte, die β PAF-AH als Fusionsprotein mit dem Grün-fluoreszierenden Protein (GFP) in HEK-293 Zellen zu exprimieren und als lösliches Protein zu isolieren. Analog wurde das GFP-Protein allein als Kontrollprotein exprimiert. Der SERT-CT wurde an einen GST-Anteil fusioniert (GST-CT), indem das Fragment, das für den SERT-CT kodierte, mittels Restriktionsverdau mit den Enzymen EcoR1 sowie Xho1 aus dem Hefeexpressionsvektor pBD-CT isoliert und anschließend in den analog geschnittenen bakteriellen Expressionsvektor pGEX-4T1 (Pharmacia) in das offene Leseraster der Glutathion-S-Transferase (GST) ligiert wurde. Dieses Konstrukt und analog der pGEX-4T1 wurden durch Hitzeschock in den proteasedefizienten *E. coli*-Stamm BL21 transformiert. Die Expression des GST-CT-Fusionsproteins bzw. des GST-Proteins als Kontrolle wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach weiteren 4 h Inkubationszeit wurden die Bakterien aufgeschlossen und die zytoplasmatischen Überstände gewonnen, welche anschließend mit Glutathion-Sepharosematrix inkubiert wurde. Durch die Epitop-spezifische Bindung zwischen dem GST-Anteil und dem Glutathionrest wurden die überexprimierten GST-Proteine an der Matrix immobilisiert und nach mehreren Waschschritten mit HEK-293-Zellextrakten, welche das β PAF-AH-Fusionsprotein bzw. das GFP exprimierten, inkubiert. Anschließend wurden die Überstände durch Zentrifugation von der Sepharosematrix getrennt, die Matrix mehreren Waschschritten unterzogen und die gekoppelten Proteine in Ladepuffer eluiert. Überstände und Eluate wurden mit den Extrakten der GFP- β PAF-AH- oder GFP-

exprimierenden HEK-293 Zellen gemeinsam gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Die GFP-βPAF-AH bzw. das GFP wurde anschließend mittels eines α -GFP Antikörpers (Clontech) immunologisch nachgewiesen (Abb. 3.6).

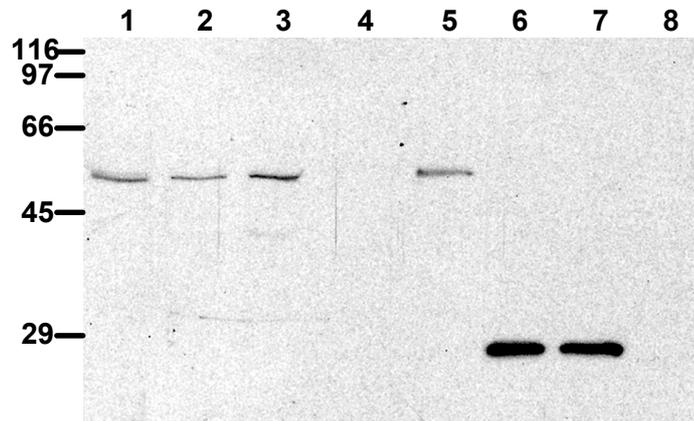


Abb. 3.6: Präzipitation der PAF-AH-β-Untereinheit als GFP-Fusionsprotein an GST-CT-SERT. Zytoplasmatische Extrakte von HEK-293 Zellen, die mit der GFP-βPAF-AH-cDNA transfiziert worden waren, wurden mit einem bakteriell exprimierten GST-CT Fusionsprotein, das an einer Glutathion-Sepharosematrix immobilisiert vorlag, inkubiert. Die gekoppelten Proteine wurden nach mehrmaligem Waschen in SDS-Probenpuffer aufgenommen, auf einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die GFP-Fusionsproteine nach Western-Transfer mittels einem α -GFP-Antikörper immunodetektiert. In Spur 1 wurde zytosolischer Extrakt aus HEK-293 Zellen, die das GFP-βPAF-AH exprimierten, aufgetragen, um die heterologe Expression der GFP-βPAF-AH zu verifizieren. Die Überstände (Spur 2, 3) und die Eluate (Spur 4, 5) der GST-Säule (Spur 2, 4) und der GST-CT-Säule (Spur 3, 5) wurden daneben gelelektrophoretisch aufgetrennt. Eine immunreaktive Bande um 57 kDa in Spur 1 zeigt die heterologe Expression des GFP-βPAF-AH-Fusionsproteins in den HEK-293 Zellen. Das Auftreten des Immunsignals in Spur 5, bei gleichzeitigem Fehlen in Spur 4, weist die Bindung der GFP-βPAF-AH an das GST-CT-Fusionsprotein nach. In den Spuren 6 - 8 wurde die Bindung des GFP-Proteins an den CT analysiert. In Spur 6 wurde der zytosolische Extrakt von HEK-293 Zellen, die mit der GFP-cDNA transfiziert waren, aufgetrennt, während in Spur 7 der Überstand und Spur 8 das Eluat der GST-CT-Säule geladen wurde. Da in Spur 8 kein Immunsignal auftrat, konnte geschlossen werden, daß die Interaktion zwischen GST-CT und GFP-βPAF-AH für die βPAF-AH spezifisch war.

In den Zellextrakten der HEK-293 Zellen, die mit der cDNA der GFP-βPAF-AH transfiziert worden waren, wurde ein Immunsignal um 57 kDa ersichtlich. Dies bestätigte die erfolgreiche heterologe Expression des Fusionsproteins, das sich aus dem 27 kDa GFP- und dem 30 kDa βPAF-AH-Anteil zusammensetzte. In dem Eluat der GST-CT Säule wurde diese Bande ebenfalls gefunden, während in dem Eluat des GST-Ansatzes kein Immunsignal ersichtlich war. Damit war eine spezifische Bindung der GFP-βPAF-AH an

das GST-CT-Protein nachgewiesen. Da das heterolog exprimierte GFP in einem parallelen Ansatz selbst nicht mit dem GST-CT interagiert, war die Spezifität der Interaktion zwischen der β PAF-AH und dem SERT-CT eindeutig belegt. Mit immunzytochemischen Methoden sollte nun gezeigt werden, daß diese Interaktion auch in intakten Zellen stattfinden kann.

3.3.2 Immunzytochemischer Nachweis für die Interaktion zwischen β PAF-AH und SERT-CT

Sollte die *in vitro* gezeigte Interaktion zwischen der β PAF-AH und dem SERT-CT physiologisch relevant sein, so ist zumindest eine teilweise zelluläre Colokalisation dieser Proteine Voraussetzung. In Zellen sollte dies durch eine Umlokalisierung der zytosolischen β PAF-AH an die Plasmamembran nach Coexpression mit dem membranständigen SERT sichtbar werden. Deshalb wurden die cDNA der GFP- β PAF-AH und des SERT in HEK-293 Zellen einzeln und gemeinsam heterolog exprimiert. Nach der Fixierung der Zellen wurde das Expressionsmuster beider Proteine mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Während das GFP-Fusionsprotein durch die Eigenfluoreszenz detektierbar war, wurde das Transportprotein mit einem α -SERT-Antikörper (Chemicon) markiert und dieser mit einem fluorochrom-tragenden AlexaFluor594-Antikörper (Molecular Probes) sichtbar gemacht. Da die SERT Immunreaktivität nach der Coexpression mit der GFP- β PAF-AH stark reduziert bzw. nicht nachweisbar war, wurde die SERT-cDNA im doppelten Überschuß zu der der GFP-PAF-AH transfiziert. Hiernach konnte die Immunreaktivität bzw. Fluoreszenz für beide Proteine nachgewiesen werden. Allerdings erschien die GFP-Fluoreszenz nach Coexpression deutlich schwächer als bei Einzelexpression. Um sicherzustellen, daß die Fusion mit dem GFP keinen Einfluß auf die intrazelluläre Lokalisation der β PAF-AH nimmt, wurde der potentielle Effekt des GFP in einer parallelen Versuchsreihe separat untersucht.

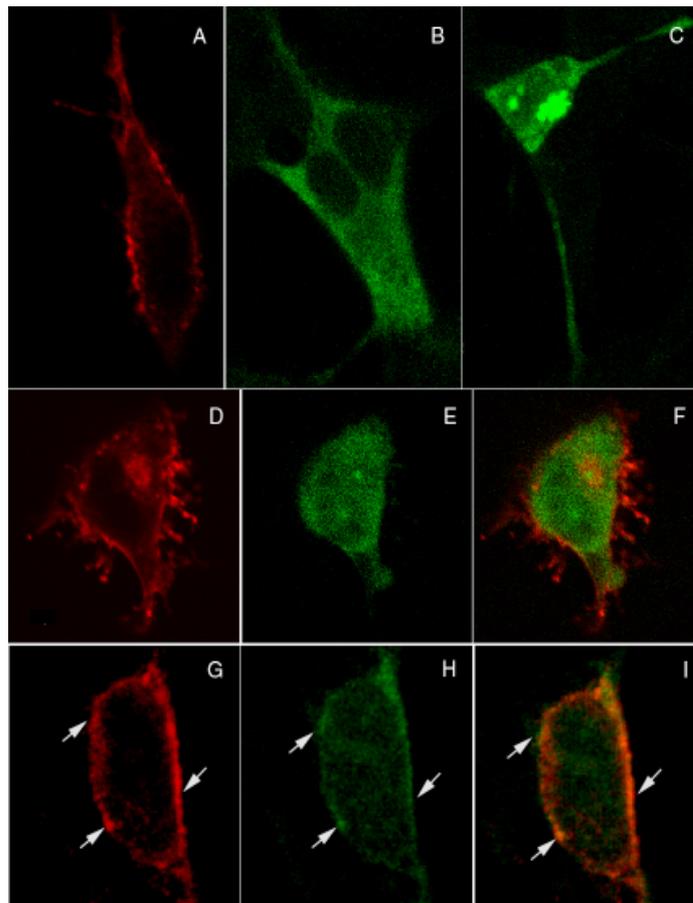


Abb. 3.7: Legende siehe folgende Seite

zu Abb. 3.7: Colokalisation des SERT mit der GFP- β PAF-AH in HEK-293 Zellen. Die Zellen wurden mit den cDNA, die für den SERT oder für GFP- β PAF-AH kodierten, transfiziert. Die subzelluläre Verteilung der Proteine wurde mittels spezifischer α -SERT-Antikörper oder anhand der intrinsischen GFP-Fluoreszenz bestimmt. Wie in A ersichtlich, ist der rekombinante SERT unregelmäßig an der Plasmamembran verteilt, wohingegen die Immunreaktivität der GFP- β PAF-AH gleichmäßig im Zytoplasma der Zelle vorliegt (B). Das GFP-Protein wurde ebenfalls zytoplasmatisch exprimiert, wobei es stellenweise auch zur Aggregatbildung kommt (C). Die Coexpression des SERT mit dem GFP (D - F) läßt keine Verlagerung der zytoplasmatischen Immunreaktivität des GFP (E) an plasmamembranständigen SERT (D) erkennen. Die in F gezeigte überlagerte Darstellung von D und E weist keine plasmamembranständige Colokalisation (Gelbfärbung, grün + rot = gelb) auf. Wurde die GFP- β PAF-AH-cDNA mit der SERT-cDNA cotransfiziert (G, H), konnte dagegen eine leichte Umverteilung der GFP-Fluoreszenz an die Plasmamembran beobachtet werden (H). Die Anreicherung der GFP-Fluoreszenz war in den Bereichen zu beobachten, in denen auch eine erhöhte SERT-Immunreaktivität auftrat (G). Aufgrund der schwachen GFP-Fluoreszenz werden die colokalisierten Fluoreszenzen in der überlagerten Darstellung (I) hellrot anstelle von gelb wiedergegeben. Die Areale, die eine verstärkte plasmamembran-nahe GFP-Fluoreszenz aufweisen, sind mit Pfeilen markiert

Abb. 3.7 zeigt optische Schnitte durch transfizierte HEK-293 Zellen. Der SERT,

repräsentiert durch die rote Immunfluoreszenz, war, wie bereits beschrieben (vgl. 3.1.2), in diskreten Arealen an der Plasmamembran der HEK-293 Zellen zu finden (3.7 A). Die grün dargestellte Immunfluoreszenz des GFP-βPAF-AH-Fusionsproteins lag dagegen nach Einzeltransfektion im Zytoplasma der transfizierten Zelle vor (3.7 B). Das GFP-Protein war ebenfalls gleichmäßig zytoplasmatisch lokalisiert (3.7 C). Teilweise waren größere intrazelluläre Aggregate des GFP zu beobachten.

Nach Cotransfektion der cDNA des Membranproteins und des zytoplasmatischen Fusionsproteins im Verhältnis 2:1 wurde die Immunfluoreszenz des SERT unverändert an der Plasmamembran gefunden (3.7 G). Dagegen war die grüne Fluoreszenz der GFP-βPAF-AH stellenweise vom Zytoplasma an die Plasmamembran verlagert, so daß hier Areale intensiverer GFP-Fluoreszenz auftraten (3.7 H). Diese Umverteilung der β-Untereinheit der PAF-AH an die Plasmamembran wurde besonders in Bereichen beobachtet, in denen SERT akkumulierte. Eine vergleichbare Umverteilung war mit dem cotransfizierten GFP-Protein nicht zu beobachten (3.7 D - F). Die veränderte Lokalisation der β-Untereinheit der PAF-AH scheint daher für den Interaktionspartner des SERT spezifisch. Daraus war zu schließen, daß die β-Untereinheit der PAF-AH auch in einem zellulären Kontext mit dem SERT interagieren kann.

3.3.3 Untersuchung der physiologischen Funktion der Bindung der PAF-AH-β-Untereinheit an den SERT

Die biochemisch und immunzytochemisch belegte Interaktion der β-Untereinheit der PAF-AH mit dem SERT-CT sollte im folgenden auf ihre physiologische Relevanz hin untersucht werden. Für die 30 kDa-β-Untereinheit lagen bislang keine Hinweise auf deren physiologische Bedeutung vor. Hier wurde zunächst untersucht, ob die Interaktion mit der β-Untereinheit die Transportkapazität des SERT modifizieren kann. Weiter war zu fragen, ob der PAF als Substrat der PAF-AH die SERT-Aktivität zu beeinflussen vermag. Zur Untersuchung dieser Fragen wurden Aufnahmestudien mit tritiiertem [³H]5-HT an HEK-293 Zellen unternommen, die mit der SERT-cDNA und der GFP-βPAF-AH-cDNA cotransfiziert wurden. Parallel dazu wurden die Zellen zur Kontrolle mit insertlosem Vektor oder mit einem GFP-kodierenden Vektor und der SERT-kodierenden cDNA cotransfiziert. Die Eigenfluoreszenz der Proteine erlaubte 48 h nach der Transfektion die

Transfektionseffizienz zu bestimmen. Sofern dieselbe $\geq 50\%$ betrug, wurden die Zellen für Aufnahmestudien herangezogen. Um einen regulativen Einfluß der β PAF-AH auf die Transportfunktion des SERT zu untersuchen, wurde im folgenden die Substrataufnahme der transfizierten Zelllinie zu mehreren Zeitpunkten bis zum Eintritt in die Sättigungsphase in Gegenwart von 250 nM [3 H]5-HT gemessen.

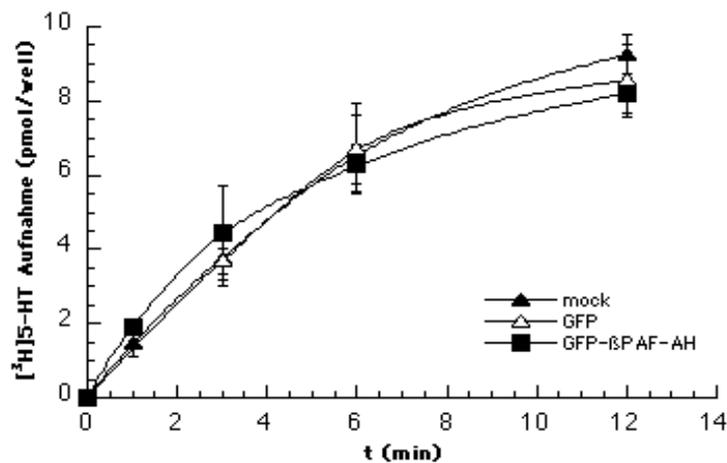


Abb. 3.8: Vergleich der Wiederaufnahmekapazität zwischen HEK-293 Zellen, die mit der SERT-cDNA und GFP-, GFP- β PAF-AH oder insertlosem Vektor (mock) cotransfiziert worden waren. 250 nM [3 H]5-HT wurde auf die HEK-293 Zellen appliziert, die das GFP- β PAF-AH-Fusionsprotein oder das GFP coexprimierten. Die [3 H]5-HT-Aufnahme wurde zu vier Zeitpunkten gemessen. Die Datenpunkte stellen die Mittelwerte mit deren Standardabweichungen aus drei unabhängigen, in Quadruplikaten durchgeführten Versuchen dar. Zu keinem Zeitpunkt lagen signifikante Unterschiede im Substrattransport in den Zellen, die mit leerem Vektor, oder dem GFP- oder dem GFP- β PAF-AH-kodierenden Vektor und der für dem SERT-kodierenden cDNA cotransfiziert worden waren, vor.

Wie aus Abb. 3.8 ersichtlich ist, verlaufen die Sättigungskurven der HEK-293 Zellen, die das GFP bzw. das GFP- β PAF-AH und den SERT coexprimierten, zu jedem aufgenommenen Zeitpunkt parallel. Ein Vergleich der Datenpunkte mit denen der mock-transfizierten Zellen zeigt auch, daß die Coexpression von GFP und SERT keinen Einfluß auf die Transportfunktion von SERT nimmt. Die Zelllinien erreichten nach 12 min die Sättigung bei durchschnittlich $8.67 \pm 0,29$ pmol/well ($n = 3$). Hieraus wurde gefolgert, daß die Interaktion von GFP- β PAF-AH keinen Einfluß auf die Transportfunktion des SERT in

HEK-293 Zellen hat.

Die zweite Fragestellung, nämlich ob der PAF als Substrat der β PAF-AH die Aktivität des SERT beeinflusst, wurde anschließend untersucht. Der PAF wird intrazellulär in Neuronen (Yue et al., 1990), Thrombozyten (Benveniste, 1974), Leukozyten (Henson, 1970) und in vaskulären Endothelzellen synthetisiert. Durch verschiedene Stimuli, z. B. bei der Anaphylaxie, wird er in das extrazelluläre Medium sekretiert (Pinckard, 1979). Durch Bindung an den G_q -Protein-gekoppelten PAF-Rezeptor (PAFR) aktiviert er Effektorzellen (Honda et al., 1991; Nakamura et al., 1991). Im folgenden sollte nun untersucht werden, ob der extrazelluläre PAF über den PAFR die Transportfunktion des SERT beeinflusst. Vorerst wurde dazu die Expression des Rezeptors in den HEK-293 Zellen mittels RT-PCR nachgewiesen.

Hierzu wurde aus den HEK-293 Zellen und einer HEK-293 Zelllinie, die den SERT stabil exprimiert (HEK-SERT Zelllinie) die cDNA isoliert und mit PAFR-spezifischen Primern eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Wie aus Abb. 3.9 ersichtlich ist, konnte in beiden Zelllinien ein Fragment der erwarteten Höhe von 750 bp amplifiziert werden. In Spur 4 wurde als positive Kontrolle der Reaktion mit SERT-spezifischen Primern ein entsprechend großes Fragment in der HEK-SERT Zelllinie nachgewiesen. Daher wurde angenommen, daß dieser Rezeptor in den HEK-Zellen exprimiert wird.

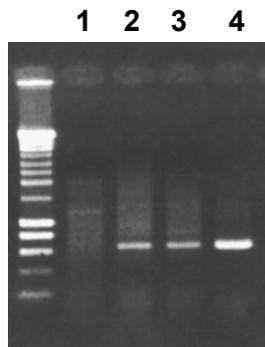


Abb. 3.9: RT-PCR mit PAF-Rezeptor-spezifischen Primern auf HEK-293 Zellen und der HEK-SERT Zelllinie. Das Amplifikat aus der HEK-293 Zelllinie (Spur 2) sowie der HEK-SERT Zelllinie (Spur 3) bei 750 bp entspricht dem erwarteten Rezeptor-mRNA-Fragment. Dagegen ist als positive Kontrolle der Reaktion der SERT in der HEK-SERT Zelllinie amplifiziert worden (Spur 4). Spur 1 zeigt einen Kontrollansatz ohne Template. Links ist ein 1 kb Marker als Größenstandard aufgetragen (Boehringer-Mannheim).

Um im folgenden nachzuweisen, ob die Transportfunktion des SERT durch die Aktivierung des PAFRs reguliert wird, wurden unter Variation der PAF-Konzentration und der Inkubationszeit die Aufnahme von 250 nM [³H]5-HT in die stabile Zelllinie bestimmt. Als negative Kontrolle wurde das inaktive lyso-PAF (Calbiochem) mit tritiierten Substrat koappliziert. Unter keiner der untersuchten Bedingungen ließ sich jedoch ein Einfluß des PAF auf die Aufnahmefunktion des SERT erkennen.

3.4 Analyse der Interaktion zwischen MacMARCKS und dem SERT-CT

Der Klon 16/8.8 umfaßt eine 1500 bp cDNA Insertion, die im Leseraster der Aktivierungsdomäne die gesamte 600 bp umfassende, kodierende Region der MacMARCKS-cDNA der Ratte abdeckte. Zusätzlich enthielt der Klon 76 bp der 5'-untranslatierten Region, die im offenen Leseraster jedoch kein Stopkodon enthielt. Das kalkulierte Molekulargewicht des MacMARCKS der Ratte beträgt 20,6 kDa. Tatsächlich zeigt das Protein jedoch ein anomales gelelektrophoretisches Laufverhalten und wird zwischen 45 und 50 kDa detektiert. Dieses Phänomen wurde auf die globuläre Struktur und die positive Ladung des Proteins zurückgeführt (Blackshear et al., 1992).

MacMARCKS wurde bereits aus dem Gewebe der Maus (Umekage und Kato, 1991; Lobach et al., 1993), des Kaninchens (Li und Aderem, 1992) und des Menschen (Harlan et al., 1991) kloniert. Durch den Vergleich der MacMARCKS-Sequenzen mit dem MARCKS-Protein werden drei stark konservierte Domänen deutlich (Abb. 3.10): die N-terminale Myristoylierungsdomäne (MD), die MARCKS-Homologie (MH)-Domäne um eine Intron-Splice Stelle mit noch unbekannter Funktion und eine Lysin-reiche Effektor-domäne (ED). Während die Myristoylierungsdomäne für die Verankerung des Proteins an der Plasmamembran notwendig ist (Myat et al., 1998), wird die ED durch die PKC phosphoryliert (Graff et al., 1989a; Thelen et al., 1991) oder vermag Ca^{2+} /Calmodulin (CaM) zu binden (Graff et al., 1989b). PKC-vermittelte Modifikationen und Ca^{2+} /CaM-Bindung schließen sich gegenseitig aus (Wang et al., 1989; Thelen et al., 1991; Arbuzova et al., 1998) und verhindern zugleich die Assoziation von MacMARCKS mit Aktinfilamenten oder mit dem Zytoskelettprotein Dynamitin (Hartwig et al., 1992; Yue und Li, 1998). Dynamitin ist eine Untereinheit von Dynaktin, das für die Verknüpfung von Dynein an Vesikelmembrane notwendig ist (Burckhardt et al., 1997; Ahamad et al., 1998). Neuere Untersuchungen zeigten, daß der membranständige MacMARCKS das Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bis-phosphat (PIP_2) an der Plasmamembran sequestriert, wodurch das Phospholipid von der Phospholipase C (PLC) räumlich getrennt wird (Glaser et al., 1996). Die PLC hydrolysiert das Lipid, wodurch der PLC-Signaltransduktionsweg aktiviert wird. Durch PKC-Phosphorylierung und Ca^{2+} /CaM-Bindung wird die Assoziation von MacMARCKS mit der Membran und dem Zytoskelett aufgehoben, was die Dissoziation des Proteins von der Membran zur Folge hat. Gleichzeitig wird PIP_2 freigesetzt und der PLC zugänglich gemacht. Es wird vermutet, daß diese zusammenhängenden Vorgänge letztendlich Vesikelbewegungen an der Plasmamembran regulieren (Zhu et al., 1995; Yue und Li, 1998).

Da der PKC-Signaltransduktionsweg auch die Oberflächenverfügbarkeit des SERT bestimmt (Qian et al., 1997), erschien MacMARCKS als ein interessanter putativer Interaktionspartner des SERT, der an dem Vorgang der PKC-vermittelten Sequestrierung des Neurotransmittertransporters beteiligt sein könnte. Die in den Hefezellen vorliegende Interaktion wurde daher ebenfalls durch biochemische Ansätze *in vitro* sowie immunzytochemisch *in vivo* analysiert.

	MD		MH	
1	MCAQFSKTAAKGEAAAEKPGEA	AVASSPSK	ANGQENGHVK	MARCKS, RATTE
1	MCSQSSK-APRGDVTAE- - -	EAA GASPAK	ANGQENGHVK	MACMARCKS, MENSCH
1	MCSQSSK-APRGDVTAE- - -	EAA GASPAK	ANGQENGHVK	MACMARCHS, KANINCHEN
1	MCSQSSK-APRGDVTAE- - -	EAA GASPAK	ANGQENGHVK	MACMARCKS, MAUS
1	MCSQSSK-APRGDVTAE- - -	EAA GASPAK	ANGQENGHVK	MACMARCKS, RATTE
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	
41	VNGDASPAAEPGAK EELQANG	SAPAADKEEPA	SGG- -AA	MARCKS, RATTE
36	SNGDLTPK- - - - -	- - - - -	GEGES	MACMARCKS, MENSCH
36	SNGDLTPK- - - - -	- - - - -	GEGES	MACMARCHS, KANINCHEN
36	SNGDLTPK- - - - -	- - - - -	GEGES	MACMARCKS, MAUS
36	SNGDLTPK- - - - -	- - - - -	GEGES	MACMARCKS, RATTE
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	
79	TPAADKDE- - AAAAPEPGAAT	ADKEEA- EAEPAEPGSPS		MARCKS, RATTE
49	PPVNGTDEAAGAT- - - - -	- - - - -	GDAI EPAPPS	MACMARCKS, MENSCH
49	PPVNGTDEAAGAT- - - - -	- - - - -	GDAI EPAPPS	MACMARCHS, KANINCHEN
49	PPVNGTDEAAGAT- - - - -	- - - - -	GDAI EPAPPS	MACMARCKS, MAUS
49	PPVNGADEAAGAT- - - - -	- - - - -	GDAI EPAPPS	MACMARCKS, RATTE
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	
116	AETEGA- - SASSTSSPKAEDGA	AP- SPSS	ETPKKKKK- F S	MARCKS, RATTE
72	QGAEKGEV- - - - -	- - - - -	ETPKKKKK- F S	MACMARCKS, MENSCH
72	QGAEKGEV- - - - -	- - - - -	ETPKKKKK- F S	MACMARCHS, KANINCHEN
72	QGAEKGEV- - - - -	- - - - -	ETPKKKKK- F S	MACMARCKS, MAUS
72	QGAEKGEV- - - - -	- - - - -	ETPKKKKK- F S	MACMARCKS, RATTE
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	
	ED			
153	FKKPFKLSGLSFKRNKKE	AGEGAEAE- - -	GATADGAKDEA	MARCKS, RATTE
94	FKKPFKLSGLSFKRNKKE	GGGDSSASSPT	EEEEQGEI GA	MACMARCKS, MENSCH
94	FKKPFKLSGLSFKRNKKE	GGGDSSASSPT	EEEEQGEI GA	MACMARCHS, KANINCHEN
94	FKKPFKLSGLSFKRNKKE	GGGDSSASSPT	EEEEQGEI GA	MACMARCKS, MAUS
94	FKKPFKLSGLSFKRNKKE	GGGDSSASSPT	EEEEQGEI SA	MACMARCKS, RATTE
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	
190	A- - AAAGGDAAAAPGEQAGGA	GAEGAEAGGESREAEAAEP		MARCKS, RATTE
134	CSDEGT AQEGKAAATPE	SQEPQAKGAEASAAS- - - -	EEE	MACMARCKS, MENSCH
134	CSDEGT AQEGKAAATPE	SQEPQAKGAEAGAACKGGDT	EEE	MACMARCHS, KANINCHEN
134	CSDEGT AQEGKAAATPE	SQEPQAKGAEASAASKE	GDTEEE	MACMARCKS, MAUS
134	CSDEGT AQEGKAAATPE	SQEPQAKGAEASAVSKGGDA	EEEE	MACMARCKS, RATTE
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	
227	EQPEQ- - - PEQPA- EEPRAE	EPSEAVGEKAE- - -	PAP	MARCKS, RATTE
169	AGPQAT- - - - -	- - - - -	- - - - -	MACMARCKS, MENSCH
174	AGP- PA- - - - -	- - - - -	- - - - -	MACMARCHS, KANINCHEN
174	AGPQAA- - - - -	- - - - -	- - - - -	MACMARCKS, MAUS
174	AGPQAA- - - - -	- - - - -	- - - - -	MACMARCKS, RATTE
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	
259	GATADDAPSAAGPE- - -	QEAPATDEPAA	SAAPSASPEP-	MARCKS, RATTE
175	- - - - -	- - - - -	- - - - -	MACMARCKS, MENSCH
179	- - - - -	- - - - -	- - - - -	MACMARCHS, KANINCHEN
180	- - - - -	- - - - -	- - - - -	MACMARCKS, MAUS
180	- - - - -	- - - - -	- - - - -	MACMARCKS, RATTE
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	
295	- - - QPECSPEAPPVVAE			MARCKS, RATTE
178	TPSGPESGPTPASAEQNE			MACMARCKS, MENSCH
182	TPSGPESGPTPASAEQNE			MACMARCHS, KANINCHEN
183	TPSGPESGPTPASAEQNE			MACMARCKS, MAUS
183	TPSGPESGPASAE- NE			MACMARCKS, RATTE
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	

Abb. 3.10: Homologievergleich der Aminosäuresequenzen von MARCKS und MacMARCKS verschiedener Spezies. Die konservierten Domänen sind rot umrandet dargestellt. N-terminal liegt die Myristoylierungsdomäne (MD), anschließend die MARCKS-Homologie-Domäne (MH) und am weitesten C-terminal die Effektor-domäne (ED), welche die Integration der verschiedenen Signaltransduktionswege und die Assoziation an das Zytoskelett vermittelt. Zwischen den MARCKS-Homologen und den Spezies konservierte Aminosäuren sind durch Punkte markiert.

3.4.1 Biochemischer Nachweis der Interaktion zwischen MacMARCKS und dem SERT-CT

Zusätzlich zur Interaktion in der Hefe sollte ein biochemischer Nachweis durch die Copräzipitation beider Proteine erbracht werden. Dazu wurde neben dem bakteriellen Fusionsprotein GST-CT (vgl. 3.3.1) ein Fusionsprotein aus dem Maltose-bindenden Protein (MBP) und dem SERT-CT (MBP-CT) nach gleichem Verfahren generiert. Parallel wurden Fusionsproteine mit MacMARCKS und dem GST bzw. MBP hergestellt, indem die kodierende Region und die 5'untranslatierte Region des MacMARCKS durch

Restriktionsverdau mit den Enzymen EcoR1 und Xho1 aus dem Klons 16/8.8 isoliert und anschließend im Leseraster der GST bzw. des MBP ligiert wurden. Dadurch wurde es möglich, eventuelle Interaktionen zwischen einem GST- und dem entsprechenden MBP-Fusionsprotein nachzuweisen. Die Expression der GST-Proteine wurde in dem proteasedefizienten *E. coli*-Stamm BL21 erzielt. Nach Lyse der Bakterien und anschließender Isolierung der zytosolischen Fraktion mittels differentieller Zentrifugation wurde jeweils eines der rekombinanten Proteine an einer entsprechenden Sepharosematrix immobilisiert und mit dem anderen Fusionsprotein im zytoplasmatischen Überstand der transformierten Bakterien für 4 h bei 4 °C inkubiert. Da das Bindungsverhalten von MacMARCKS Ca²⁺-bzw. Ca²⁺/CaM-abhängig sein könnte, erfolgte die Inkubation entweder in Gegenwart von 5 mM EGTA, 3 mM CaCl₂ oder 5 µg CaM in 3 mM CaCl₂ (O'Connor et al., 1999). Die Sepharosematrices wurden anschließend dreimal gewaschen und spezifisch gebundene Proteine in Ladepuffer eluiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembran wurden kopräzipitierte Proteine mit spezifischen Antikörpern oder durch Coomassie-Färbung detektiert.

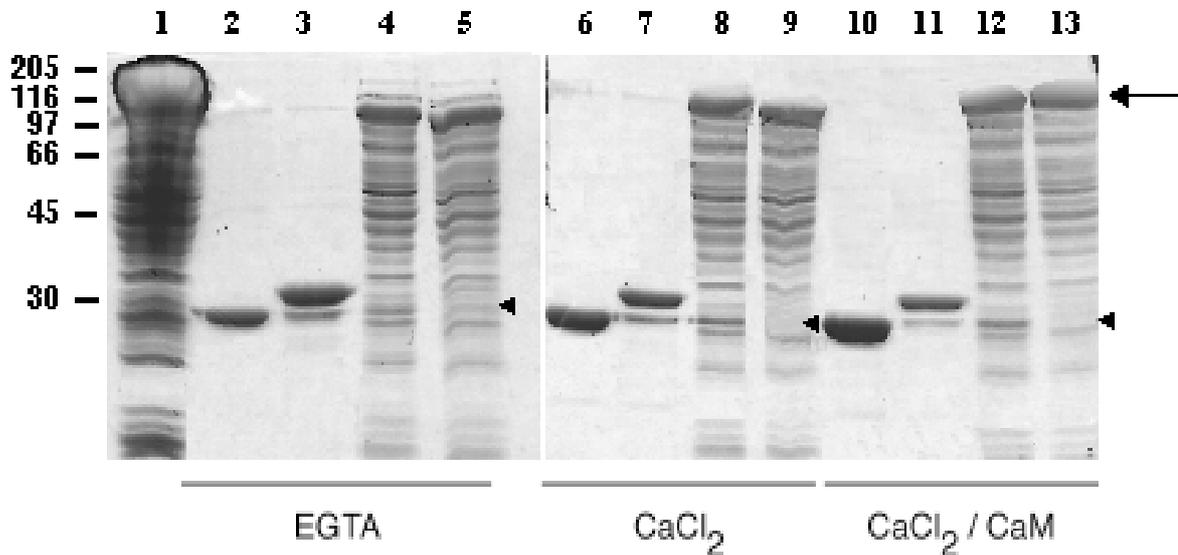


Abb. 3.11: Bindung von MBP-MacMARCKS an immobilisiertes GST bzw. GST-CT. Bakterienlysat von BL21 Zellen, die MBP-MacMARCKS überexprimierten (Spur 1), wurde mit immobilisiertem GST oder GST-CT in Anwesenheit von 5 mM EGTA (Spur 2 - 5), 3 mM CaCl₂ (Spur 6 - 9), oder 3 mM CaCl₂ mit 5 µg CaM (Spur 10 - 13) inkubiert, nach mehreren Waschschrritten durch 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie sichtbar gemacht. Die Spuren 2, 4, 6, 8 und 10 zeigen die GST-Eluate (Spur 2, 6, 10) und die Überstände (Spur 4, 8, 12). Vergleichend sind von der GST-CT-Säule Eluate (Spur 3, 7, 11) und Überstände (Spur 5, 9, 13) aufgetragen. MBP-MacMARCKS ist durch einen Pfeil markiert, während eine 30 kDa-Bande, die nicht in den Überständen der GST-CT-Säulen auftritt, jeweils durch einen Pfeilkopf gekennzeichnet ist.

In Abb. 3.11 ist beispielhaft das Ergebnis eines Bindungsexperiments dargestellt. Die immobilisierten GST- oder GST-CT-Proteine wurden mit löslichem MBP-MacMARCKS inkubiert, die nicht-gebundenen Proteine durch Zentrifugation und Waschen abgetrennt, und die gekoppelten Proteine in SDS-Ladepuffer eluiert. Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine in den verschiedenen Fraktionen wurden durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Spur 1 zeigt die eingesetzte Menge des MBP-MacMARCKS im zytosolischen Extrakt. Das Fusionsprotein läuft bei 97 kDa, wie man es aus dem gelelektrophoretischen Laufverhalten des MBP (47 kDa) und des MacMARCKS (45 - 50 kDa) erwarten würde.

Bindungsanalysen wurden in Gegenwart von 5 mM EGTA (Spuren 2 - 5), 3 mM CaCl₂

(Spuren 6 - 9) oder 5 µg CaM in 3 mM CaCl₂ (Spuren 10 - 13) durchgeführt. Unter keinen Bedingungen konnte in den Eluaten (Spuren 2, 3, 6, 7, 10, 11) eine spezifische MBP-MacMARCKS-Bindung festgestellt werden. Dagegen kann durch den Vergleich der Überstände (Spuren 4, 5, 8, 9, 12, 13) der Verlust einer Bande bei 28 kDa in den Überständen der GST-CT-Ansätze (Spuren 5, 9, 13) bemerkt werden (Pfeilköpfe). In den Eluaten der GST-CT-Ansätze migriert eine Bande bei dieser Höhe. Denkbar wäre, daß diese Bande das Abbauprodukt des MBP-MacMARCKS repräsentiert. So wurde kürzlich die Spaltung des MacMARCKS durch eine Zink-Metalloprotease in ein Fragment gezeigt, das nach der gelelektrophoretischen Auftrennung anstelle von 45 kDa bei 28 kDa migrierte (Corradin et al., 1999).

Ähnliche Befunde zeigten Präzipitationsstudien mit dem GST-CT aus Hirnhomogenaten adulter Ratten. An einer Sepharosematrix wurden GST- bzw. GST-CT-Proteine immobilisiert, bei 4 °C mit dem Hirnhomogenat inkubiert und anschließend die gekoppelten Proteine nach mehrfachem Waschen eluiert. Durch Western-Analyse der gelelektrophoretisch aufgetrennten Eluate wurde mit einem α -MacMARCKS-Antiserum (erhalten von A. Aderem, Rockefeller University, USA) ein Immunsignal um 28 kDa in den Eluaten der GST-CT-Säule detektiert (Daten nicht gezeigt). Diese Bande wurde durch einen α -GST-Antikörper nicht immundetektiert, weshalb sie kein proteolytisches Spaltprodukt des GST-CT-Proteins darstellt. Diese aus dem Hirnhomogenat der Ratte präzipitierte 28 kDa Bande könnte ebenfalls die gespaltene Form von MacMARCKS darstellen.

Mit eukaryotisch exprimiertem MacMARCKS wurden ähnliche Interaktionsstudien durchgeführt. Zur immunologischen Detektion wurde MacMARCKS C-terminal an ein GFP fusioniert, indem die kodierende Region des MacMARCKS mittels PCR amplifiziert und mit Restriktionsschnittstellen für die Enzyme BamHI und HindIII versehen wurde. Das geschnittene Fragment wurde anschließend in den analog geschnittenen pEGFP-N2 ligiert, so daß das durch diesen Vektor kodierte GFP C-terminal an das offene Leseraster der MacMARCKS-cDNA fusioniert wurde. Dieses MacMARCKS-GFP Konstrukt wurde in HEK-293 Zellen exprimiert und war in der kombinierten Zytoplasma- und Membranfraktion nach der gelelektrophoretischen Auftrennung und dem Transfer der Proteine auf Nitrozellulose mittels eines α -GFP Antikörpers (Chemicon) nachweisbar.

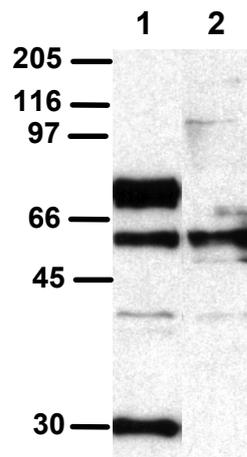


Abb. 3.12: Darstellung des heterolog exprimierten MacMARCKS-GFP. Mit MacMARCKS-GFP (Spur 1) oder mit insertlosem Vektor (Spur 2) transfizierte HEK-293 Zellen wurden auf 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem α -GFP Antikörper immundetektiert. Das Immunsignal bei etwa 75 kDa ist für MacMARCKS-GFP spezifisch.

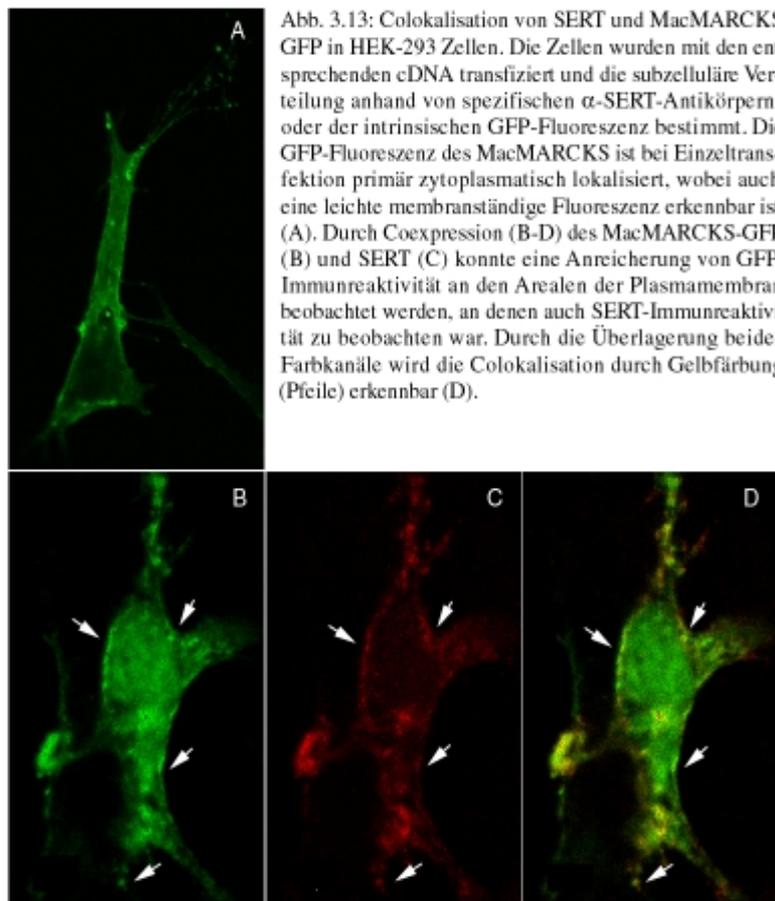
In Abb. 3. 12 treten zwei immunreaktive Banden um 75 kDa und um 30 kDa auf, die in mit insertlosem Kontrollvektor transfizierten Zellen (Spur 2) nicht erkennbar waren. Das Immunsignal um 75 kDa repräsentiert das Fusionsprotein und weist somit entsprechend dem bakteriellen Fusionsproteinen ein abberantes Laufverhalten auf. Statt bei 50 kDa, wie es von der deduzierten Aminosäuresequenz aus GFP (30 kDa) und MacMARCKS (20 kDa) erwartet würde, migriert das Fusionsprotein bei etwa 75 kDa (Spur 1). Die Bande um 30 kDa mag auf der Benutzung eines internen Translationsstarts, der durch den Expressionsvektor pEGFP-N2 vor dem GFP-Anteil kodiert wurde, oder auf Proteolyse beruhen. Eine weitere Bande um 55 kDa trat auch in nicht-transfizierten Zellen auf und ist somit unspezifisch.

Neben den Ca^{2+} /CaM-abhängigen Bindungsmustern der bakteriell exprimierten Fusionsproteine wurde mit dem eukaryotisch exprimierten MacMARCKS auch das Bindungsverhalten nach PKC-Phosphorylierung sowie des membranständigen oder zytosolischen Proteins untersucht. Eine spezifische Bindung des in HEK-293 Zellen exprimierten Fusionsproteins an den bakteriell überexprimierten GST-CT oder MBP-CT konnte auch hier nicht erhalten werden. Hieraus muß gefolgert werden, daß MacMARCKS unter den hier gewählten Bedingungen bzw. Methoden nicht an den SERT-CT bindet, bzw. daß die Interaktion von geringer Affinität und daher biochemisch schwer nachweisbar ist.

Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß ein Spaltprodukt von MacMARCKS mit dem SERT-CT interagiert. Weiterhin könnte auch die Phosphorylierung des SERT-CT für eine spezifische Interaktion mit MacMARCKS notwendig sein.

3.4.2 Immunzytochemischer Nachweis einer möglichen Interaktion

Wie für die β PAF-AH gezeigt, kann der Nachweis einer Interaktion auch durch eine immunzytochemische Analyse von Expressionsmustern der coexprimierten Proteine erbracht werden (vgl. 3.2.2). Das MacMARCKS-GFP-Fusionsprotein wurde deshalb mit dem SERT in HEK-293 Zellen coexprimiert, die Zellen in Paraformaldehyd fixiert, und der SERT immunologisch mit einem monoklonalen α -SERT-Antikörper (Chemicon) und dem Fluorochrom-AlexaFluor594-tragenden Zweitantikörper (Molecular Probes) detektiert. Das GFP-Fusionsprotein war aufgrund seiner Eigenfluoreszenz nachweisbar. Mit einem konfokalen Mikroskop definierte optische Schnitte durch die transfizierten HEK-293 Zellen erlaubte die Darstellung der Verteilungsmuster der rekombinanten Proteine (Abb. 3.13).



Das in grün dargestellte MacMARCKS-GFP war nach Einzeltransfektion im Zytosol der Zelle lokalisiert (Abb. 3.13 A). Eine leicht verstärkte Fluoreszenz deutet auf membranständiges MacMARCKS-GFP hin. Dagegen lag die SERT-Immunreaktivität ausschließlich in der Plasmamembran vor (vgl. Abb. 3.9 A). Nach der Cotransfektion der cDNA dieser potentiell interagierenden Proteine fand sich die Immunfluoreszenz beider Proteine an der Plasmamembran (Abb. 3.13 B-D), wobei eine vollständige Umverteilung der zytoplasmatischen GFP-Fluoreszenz nicht erreicht wurde. Durch die überlagerte Darstellung des roten und grünen Farbkanals (gelbe Fluoreszenz, Pfeile) wird erkennbar, daß die plasmamembranständigen Anreicherungen des MacMARCKS-GFP Fusionsproteins sich mit plasmamembranständigen Anreicherungen der SERT-Immunreaktivität decken (Abb. 3.13 D). Wenn auch keine quantitative Umlokalisierung ermittelt wurde, zeigten diese Versuche doch, daß die Expression des SERT zur Anreicherung von MacMARCKS-GFP an der Plasmamembran führen kann, womit die Interaktion dieser Proteine in einem zellulären Kontext nachgewiesen wurde.

3.5 Physiologische Relevanz der Interaktion zwischen MacMARCKS und dem SERT

Anschließend wurde eine mögliche Regulation der SERT-Aktivität durch MacMARCKS untersucht. Wie bereits unter 1.3.3 beschrieben, belegen Studien von Jayanthi et al. (Jayanthi et al., 1994) eine Regulation des SERT durch CaM-Signalkaskaden, während andere Autoren eine PKC-vermittelte Reduktion der Transportrate durch Sequestrierung des SERT beschrieben haben (Myers et al., 1989; Anderson und Horne, 1992; Ramamoorthy et al., 1993). Neuere Untersuchungen lassen weiterhin vermuten, daß Membranrearrangements, wie sie z. B. bei der Sequestrierung von Proteinen auftreten, durch die Familie der MARCKS-Proteine vermittelt werden (Lu et al., 1998).

3.5.1 Funktionelle Konsequenzen der Coexpression von MacMARCKS und SERT

Ähnlich wie bei der PAF-AH- β -Untereinheit (vgl. 3.3.3) wurde auch für MacMARCKS ein Einfluß auf die Aufnahmekinetiken des SERT untersucht. Wiederum wurden HEK-293 Zellen in "24-well"-Kulturschalen ausgesät und mit den cDNAs, die für den SERT, das MacMARCKS-GFP-Fusionsprotein bzw. als negative Kontrolle für das GFP kodierten, cotransfiziert. Als zusätzliche Negativkontrolle diente ein weiterer Ansatz, der mit insertlosem Vektor (mock) transfiziert wurde. Etwa 48 h nach der Transfektion wurde das Medium entfernt und durch Transportpuffer, dem 250 nM [3 H]5-HT zugesetzt waren, ersetzt. Nach 1, 3, 6 und 12 min wurde das Medium abgesaugt, die Zellen in Transportpuffer gewaschen und die aufgenommene Radioaktivität nach der Lyse der Zellen in einem Szintillationszähler bestimmt.

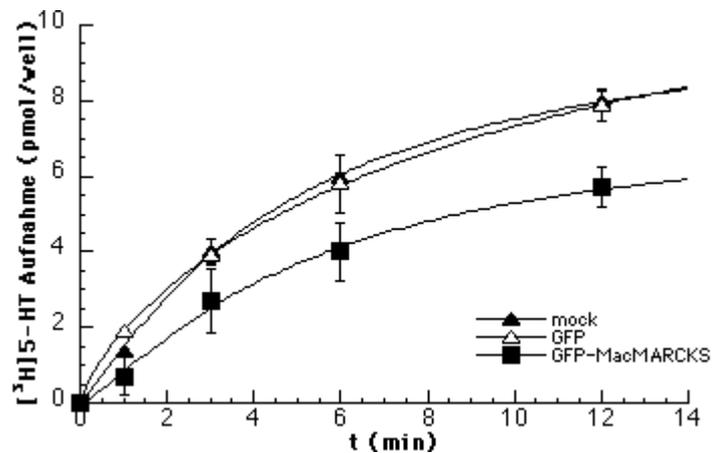
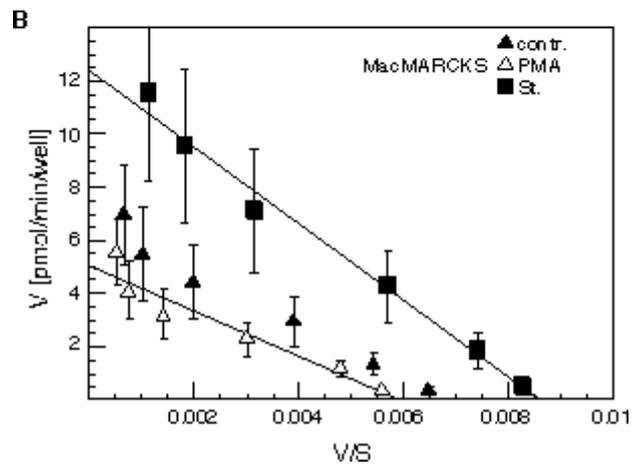
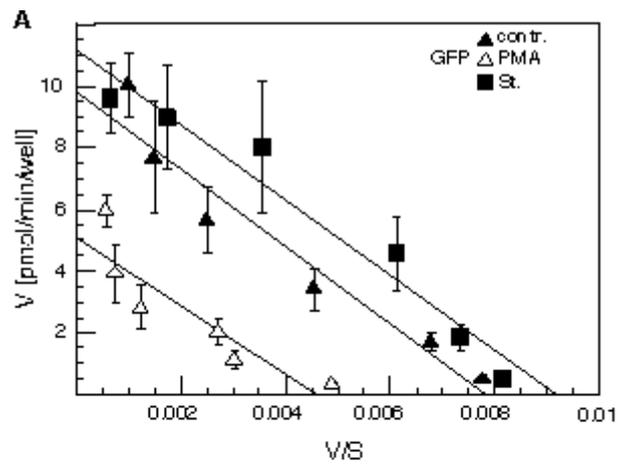


Abb. 3.14: Effekt der Coexpression des SERT mit MacMARCKS-GFP auf die Aufnahme von 250 nM [3 H]5-HT. HEK-293 Zellen wurden mit dem Vektor, der für den SERT kodiert, und entweder dem Vektor, der für MacMARCKS-GFP oder GFP allein kodiert, bzw. mit insertlosem Vektor (mock) cotransfiziert. Die Aufnahme von 250 nM [3 H]5-HT wurde zu vier Zeitpunkten analysiert. Die Datenpunkte stellen die Mittelwerte und deren Standardabweichungen aus drei unabhängigen, in Quadruplikaten durchgeführten Experimenten wieder. Aus der Figur wird ersichtlich, daß durch die Coexpression von MacMARCKS und SERT die Transportaktivität des Neurotransmittertransporters reduziert wird.

In Abb. 3.14 ist der zeitliche Verlauf der Substrataufnahme in Gegenwart von 250 nM [³H]5-HT dargestellt. Hieraus geht hervor, daß die Expression des MacMARCKS-GFP in HEK-293 Zellen nach 12 min die Transportrate des coexprimierten SERT um etwa 33 % reduzierte. Die GFP-exprimierenden Kontrollzellen zeigten nach 12 min eine Transportrate von $8,5 \pm 0,43$ pmol/well (n = 3) bzw. die mock-transfizierten Zellen $8,0 \pm 0,25$ pmol/well (n = 3). Dagegen zeigten die MacMARCKS-GFP exprimierenden Zellen zu diesem Zeitpunkt nur $5,6 \pm 0,6$ pmol/well (n = 3) Substrataufnahme.

Die Reduktion der maximalen Transportrate des SERT könnte auf einer reduzierten Translation oder auf einer verringerten maximalen Transportrate (V_{\max}) des SERT beruhen. Letztere könnte durch eine reduzierte Membranverfügbarkeit durch die Sequestrierung des Neurotransmittertransporters oder durch eine reduzierte Affinität des Transporters hervorgerufen werden. Eine reversible Sequestrierung des SERT in plasmamembrannahe Endosomen als Folge einer Phorbol-ester-vermittelten Aktivierung der PKC wurde bereits beschrieben (Myers et al., 1989; Anderson und Horne, 1992; Ramamoorthy et al., 1993). Ebenso zeigten Jayanthi et al. (Jayanthi et al., 1994), daß eine Inhibition der CaM-Signalkaskade die Substrataffinität und so die Funktion des SERT reduziert. Im folgenden sollte daher untersucht werden, ob die Überexpression von MacMARCKS die Sequestrierung des SERT induziert. Würde dies zutreffen, sollte die Behandlung der cotransfizierten Zellen mit dem Phorbol-ester Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), der die PKC aktiviert, die V_{\max} des SERT nicht im gleichen Maße wie in Kontrollzellen beeinflussen. Dagegen sollte die Behandlung der Zellen mit dem PKC-Inhibitor Staurosporin die V_{\max} erhöhen, so daß Werte erreicht werden sollten, die denen der Kontrollzellen vergleichbar wären.

Die HEK-SERT Zelllinie wurde parallel mit der GFP- oder der MacMARCKS-GFP-cDNA transfiziert. Ein invertiertes UV-Mikroskop (Axiomat) ermöglichte die Bestimmung der Transfektionseffizienz durch die Eigenfluoreszenz des GFP. Unter der Voraussetzung, daß mindestens 70 % der Zellen transfiziert waren, wurden diese Zellen für 30 min mit 100 nM PMA oder in Parallelversuchen mit 1 μ M Staurosporin behandelt. Anschließend wurden Kompetitionsstudien mit zunehmenden Konzentrationen von nicht markiertem Substrat durchgeführt. Durch Eadie-Hofstee-Analyse (Connors, 1987) wurden die V_{\max} - und K_m -Werte abgeleitet (Abb. 3.15).



C

	V_{max}		K_m	
	MacMARCKS-GFP	GFP	MacMARCKS-GFP	GFP
unbehandelt	6,9 ± 2,1	9,8 ± 1,48	1026 ± 86	1251 ± 300
PMA	5,1 ± 1,3	5,1 ± 1,1	884 ± 58	1103 ± 133
Staurosporin	12,4 ± 3,7	11,2 ± 1,8	1444 ± 249	1231 ± 298

Abb. 3.15: Legende siehe folgende Seite

D

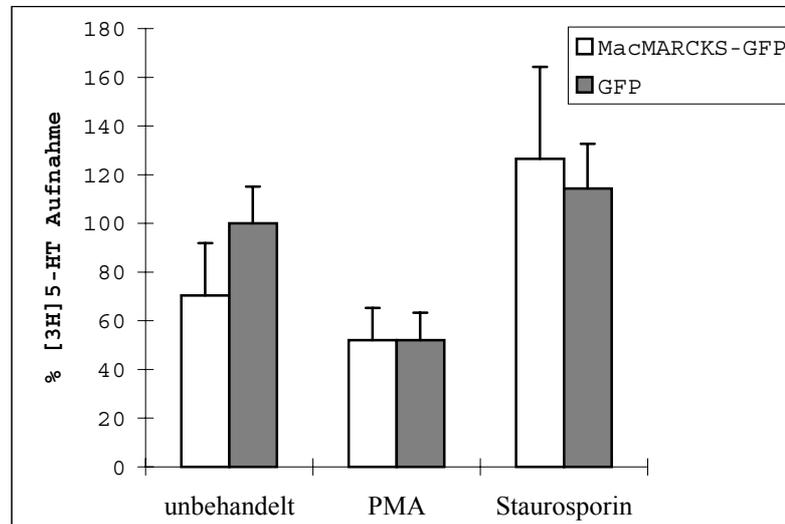


Abb. 3.15: Eadie-Hofstee-Analyse der Konzentrationsabhängigen Sättigungsanalyse von [³H]5-HT in die HEK-SERT Zelllinie bei Coexpression von GFP (A) oder MacMARCKS-GFP (B) nach 3 min. Die Zellen wurden vor der Aufnahmestudie mit 100 nM PMA (weißes Dreieck) oder 1 μM Staurosporin (ST., schwarzes Quadrat) behandelt. Unbehandelte Zellen sind mit einem schwarzen Dreieck markiert. Jeder Punkt stellt das Mittel und deren Standardabweichung von Quadruplikaten dreier unabhängiger Versuche dar. In C sind die hergeleiteten Werte der maximalen Transportkapazität (V_{max}) und der Michaelis-Menten-Konstanten (k_m) tabellarisch aufgeführt. Prozentuale Darstellung (D) verdeutlicht den Effekt von MacMARCKS, wobei der V_{max} -Wert der unbehandelten GFP-Kontrollzellen als 100 % angenommen wurde.

Die Herleitung der V_{max} und der K_m -Werte (Abb. 3.15 A, B) zeigt deren Verlagerung in Abhängigkeit des exprimierten Proteins und der Staurosporin- bzw. PMA-Behandlung der HEK-SERT Zellen. Die unbehandelten Kontrollzellen, die das GFP exprimierten, wiesen eine V_{max} von $9,8 \pm 1,5$ pmol/min/well auf. Die Zelllinie, die MacMARCKS-GFP exprimierte, verfügte dagegen nur über eine maximale Transportrate von $6,9 \pm 2,1$ pmol/min/well. Dies entspricht einer Verringerung der V_{max} um $29,6 \% \pm 18,6$ ($n = 3$) in den MacMARCKS-GFP-exprimierenden Zellen im Vergleich zur Kontrollzelllinie (Abb. 3.15 D). Durch die Behandlung der Kontrollzellen mit PMA wurden die V_{max} -Werte um $47,9 \% \pm 11,0$ ($n = 3$) reduziert. Dieser Effekt sollte auf der nachgewiesenen Sequestrierung des SERT als Folge dessen Phosphorylierung durch PKC beruhen. Im Gegensatz

dazu wurde die V_{\max} der Zellen, die MacMARCKS-GFP exprimierten, nur um $18,4 \% \pm 13,3 \%$ ($n = 3$) auf Werte reduziert, die denen der PMA-behandelten Kontrollzellen entsprachen. Die Behandlung eines parallelen Ansatzes mit Staurosporin induzierte dagegen in den GFP coexprimierenden Zellen eine Zunahme auf $114,3 \% \pm 18,3 \%$ ($n = 3$) im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollzelle, während die MacMARCKS-GFP exprimierenden Zellen einen Anstieg der maximalen Aufnahme auf $126,5 \%$ der unbehandelten Zellen verzeichneten. Dies bedeutete einen relativen Anstieg der V_{\max} in den MacMARCKS-coexprimierenden Zellen um $74 \% \pm 37,8 \%$ ($n = 3$) als Folge der PKC-Inhibition, wodurch beide Zelllinien identische V_{\max} -Werte aufwiesen. Somit ist anzunehmen, daß die Reduktion der V_{\max} zumindest teilweise auf einem PKC-vermittelten Effekt basiert, höchstwahrscheinlich durch die Sequestrierung des SERT.

Publizierte Daten zeigen, daß die V_{\max} -Reduktion des SERT nach PMA-Behandlung nicht auf eine Verringerung der Substrataffinität (K_m) zurückzuführen ist (Myers et al., 1989; Sakai et al., 1997; Qian et al., 1997). Das wurde auch hier für die Kontrollzelle gezeigt (vgl. Abb. 3.15 C). Die unbehandelten Kontrollzellen verfügen über eine K_m -Wert von 1251 ± 300 pmol ($n = 3$), während die MacMARCKS-GFP-cotransfizierten Zellen eine Substrataffinität von 1026 ± 86 pmol ($n = 3$) aufwiesen. Die Reduktion der V_{\max} des SERT in den MacMARCKS-GFP coexprimierenden Zellen sollte so ausschließlich auf eine Verringerung der oberflächenverfügbaren Bindungsstellen, nicht jedoch auf einen verringerten k_m -Wert zurückführbar sein. Da die MacMARCKS-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen geringer auf den PKC-Aktivator PMA reagierten und verstärkt auf den PKC-Inhibitor Staurosporin, ist anzunehmen, daß die MacMARCKS-vermittelte V_{\max} -Reduktion durch den PKC-Signaltransduktionsweg induziert wurde. Es wäre daher denkbar, daß diese V_{\max} -Reduktion durch die Sequestrierung des SERT hervorgerufen wird.

4. Diskussion

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, zytoplasmatisch assoziierte Proteine des Serotonintransporters SERT der Ratte mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems zu identifizieren. Die so identifizierten Interaktionen sollten anschließend durch biochemische, immunzytochemische und pharmakologische Methoden auf deren *in vivo* Relevanz näher untersucht werden.

4.1 Funktionsanalysen der Termini

Der Serotonintransporter SERT ist ein membranständiges Polypeptid, das die Neurotransmission durch die schnelle Wiederaufnahme des Transmitters Serotonin beendet. Als Mitglied der Na⁺/Cl⁻-abhängigen Neurotransmittertransporter weist er 12 Transmembrandomänen auf. Von den sieben zytoplasmatischen Domänen stellen die N- und C-terminalen Regionen mit 10 kDa bzw. 3 kDa Größe die majoritären intrazellulären Domänen dar. Hier befinden sich auch, mit einer Ausnahme in der zweiten intrazellulären Schlaufe, Phosphorylierungs-Konsensusmotive für PKC und PKA (vgl. Abb. 1.2).

Um die Funktionen der Termini deuten zu können, wurden zuerst Deletionskonstrukte des Aminoterminus (ΔN-SERT) und des Carboxyterminus (ΔC-SERT) generiert. Für die weiteren Untersuchungen wurden die mutierten Proteine heterolog in menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK-293) exprimiert. Wie bereits von Sur et al. beschrieben (Sur et al., 1998), vermittelt der heterolog exprimierte Wildtyp (wt)-SERT wie unter *in vivo*-Bedingungen eine spezifische Serotonin-Aufnahme in die Zelle. Auch vermögen SERT-spezifische Antagonisten, wie die Antidepressiva Imipramin und Citalopram, den Substrattransport des heterolog exprimierten Proteins kompetitiv zu hemmen. Offensichtlich ist also der rekombinante SERT auch in heterologen Zellsystemen korrekt gefaltet und voll funktionell aktiv.

Die Western-Analyse von Membranpräparationen, die den heterolog exprimierten wt-SERT enthielten, zeigten nach deren gelelektrophoretischer Auftrennung unter nicht-reduzierenden Bedingungen neben einer Bande, die die monomere Form des SERT

repräsentiert, auch zwei weitere Banden höheren Molekulargewichts. Dieser Befund wurde dahingehend interpretiert, daß der SERT unter nicht-reduzierenden Bedingungen als disulfidstabilisiertes di- bzw. tetrameres Protein vorliegt (Jess et al., 1996). Wurden jedoch die mutierten Proteine unter identischen nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt, ergab sich für die Mutanten ein vom wt-SERT abweichendes Laufverhalten. So bildete der Δ N-SERT keine putativ tetramere Struktur aus, wohingegen für den Δ C-SERT keine der dimeren Form entsprechenden Bande gefunden werden konnte. Aus diesen Daten wurde gefolgert, daß die Termini wahrscheinlich für die korrekte Faltung oder Oligomerisierung des SERT benötigt werden. Befunde von Tate et al. belegen, daß der SERT durch das Chaperon Calnexin gefaltet wird (Tate et al., 1999; High et al., 2000). Da auch Hefe-Zwei-Hybrid Daten eine Interaktion des SERT-NT mit Calnexin (Blakely, persönliche Mitteilung) zeigten, erscheint zumindest der N-Terminus für die Interaktion mit Calnexin und einer daraus resultierenden korrekten Faltung des SERT notwendig zu sein.

Da die Δ C-Mutante präferentiell die tetramere Form des SERT ausbildet, könnte der SERT-CT die Oligomerisierung des Neurotransmittertransporters regulieren. Das Fehlen des C-Terminus könnte die Konvertierung des SERT von einem Tetramer in ein Dimer verhindern, bzw. die tetramere Form stabilisieren. Das Vorhandensein zweier funktioneller oligomerer Zustände wurde für den strukturhomologen Glucosetransporter GLUT1 vorgeschlagen (Hebert und Carruthers, 1991; Hebert und Carruthers, 1992; Zottola et al., 1995). Auch pharmakologische Analysen an konkatemeren SERT-cDNA suggerieren funktionelle di- und tetramere Formen des Transportproteins mit jeweils unterschiedlichen Affinitäten für das Substrat (Chang et al., 1998). Auch mittels biochemischer Methoden wurden di- und tetramere Zustände des SERT nachgewiesen (Jess et al., 1996, Kilic et al., 2000). So kann zusammenfassend gefolgert werden, daß die Termini für die Faltung und Oligomerisierung des SERT benötigt werden.

Die Analyse der Transportfunktion zeigte, daß die Deletionsmutanten über keinerlei Aktivität verfügten. Dies konnte durch konfokale Analyse immunzytochemischer Färbungen transfizierter HEK-293 Zellen auf die Zytotoxizität der Deletionskonstrukte zurückgeführt werden. Während wt-SERT in Plasmamembranaggregaten angereichert war, waren Δ N- und Δ C-SERT primär zytoplasmatisch, möglicherweise in Kompartimenten des Golgi-Apparats oder in Endosomen, lokalisiert. Zudem erschienen die mit den

Deletionskonstrukten transfizierten Zellen apoptotisch. Dies läßt sich möglicherweise auf eine Aggregatbildung der Deletionsmutanten in intrazellulären Kompartimenten zurückführen, welche die endogene Proteinsynthese inhibiert. Das unterschiedliche gelelektrophoretische Laufverhalten der Deletionsmutanten läßt vermuten, daß die Mutantenproteine unterschiedliche Stadien der Proteinmodifikation oder -faltung durchlaufen und so den Zelltod zu verschiedenen Zeitpunkten induziert haben könnten.

Dem SERT vergleichbar zeigt auch der Noradrenalintransporter NET, der mit 47,8 % Identität über die höchste Homologie zum SERT verfügt, einen Funktionsverlust nach der Deletion der terminalen sieben Aminosäuren des C-Terminus (Liu et al., 1998). Gleiches wurde für den strukturhomologen Glukosetransporter GLUT4 gezeigt (Melvin et al., 1999). Es erscheint möglich, daß der Funktionsverlust auch in diesem Falle auf der mangelhaften Insertion der Proteine in die Plasmamembran beruht. Für den GAT, den NET und den GLUT4 sind die C-Termini für den gerichteten Transport des jeweiligen Proteins in polarisierten Epithelzellen verantwortlich (Oka et al., 1990; Mabweesh und Kanner, 1991; Muth und Caplan, 1998; Burton et al., 1998; Melvin et al., 1999). Weiterhin identifizierten Perego et al. (Perego et al., 1999) eine Interaktion der C-terminalen PDZ-Protein-Interaktionsdomäne des GAT3 mit einem Homolog von LIN-7A aus *C. elegans*, die für das Verbleiben des Proteins in der Plasmamembran notwendig ist. LIN-7A bildet zusammen mit LIN-10 und LIN-2 einen konservierten Proteinkomplex, der an fundamentalen Prozessen der Protein-Sortierung in epithelialen und neuronalen Zellen verantwortlich ist (Bredt, 1998; Butz et al., 1998; Kaech et al., 1998; Rongo et al., 1998). Obwohl andere Neurotransmittertransporter keine C-terminale PDZ-Domäne aufweisen, könnte auch hier der Verbleib der Proteine an der Plasmamembran durch Protein-Protein-Interaktionen bewerkstelligt werden.

4.2 Identifizierung von neuen Bindungspartnern des SERT-CT

Für den SERT waren bislang keine Interaktionspartner bekannt. Pharmakologische Untersuchungen ließen eine Regulation der Transportfunktion durch die PKC- und die CaM-Signaltransduktionskaskaden erkennen. Auch die Anreicherung des heterolog exprimierten SERT in distinkten Arealen der Plasmamembran von HEK-293 Zellen sowie

das Vorkommen des SERT in axonalen Varikositäten suggerierte, daß interagierende Proteine die Lokalisation des SERT bestimmen könnten. Daher sollten hier mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems Interaktionspartner des SERT identifiziert werden.

Die Durchsuchung einer Zwei-Hybrid-cDNA-Bibliothek aus dem Hirn neugeborener Ratten mit dem SERT-CT führte zur Isolierung von vier potentiellen Bindungspartnern. Von diesen wurden zwei auf ihre *in vivo*-Bedeutung überprüft. Neben den beiden im Detail untersuchten Klonen wurde weiterhin ein Homolog einer *C. elegans* Proteinkinase 2A gefunden. Der vierte putative Interaktionspartner repräsentierte ein Homolog des "humanen periodischen Tryptophan Proteins" (hPWP2). Von dem Hefe-Homolog PWP2 war dessen Beteiligung an der Regulation der Zellteilung und des Zellwachstums bekannt (Shafaatian et al., 1996). Da das Protein an Regionen konzentriert war, an denen Tochterzellen abgeschnürt werden, ist eine Funktion dieses Proteins an exozytotischen oder zytokinetischen Prozessen denkbar (Lalioi et al., 1996).

Als erster vielversprechender Interaktionspartner wurde die β -Untereinheit der Acetylhydrolase 1b für den "Platelet-activating-factor" (PAF), der PAF-AH, untersucht (Hattori et al., 1995b). Als zweites potentiell wichtiges Kandidatenprotein wurde MacMARCKS identifiziert und charakterisiert, ein Homologes der MARCKS-Familie (Umekage und Kato, 1991; Li und Aderem, 1992).

4.2.1 Die PAF-AH1b- β -Untereinheit als potentieller Bindungspartner des SERT

Die PAF-AH stellen eine Ca^{2+} -unabhängige Unterfamilie der Phospholipasen 2A (PLA2A) dar und können weder den zytosolischen noch den sekretierten PLA2s zugeordnet werden (Hattori et al., 1994a; Marletta, 1994; Tjoelker et al., 1995). Im Säuger kommen zwei Klassen, nämlich die extrazellulären (plasmatischen) oder intrazellulären (gewebespezifischen) Enzyme vor (Yanoshita et al., 1988; Stafforini et al., 1991), von denen wiederum jeweils mehrere Isoformen existieren (Hattori et al., 1993; Hattori et al., 1995a; Karpouza und Vakirtzi-Lemonias, 1997). Die PAF-AH inaktivieren das bioaktive, wasserlösliche Phosphocholin-Derivat PAF (1-O-Alcyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) durch die Hydrolyse des Acetylrestes an der *sn*-2 Position zu lyso-PAF (vgl. Abb. 3.5) (Hattori et al., 1994a; Hattori et al., 1995b). Wie auch die PAF-AH kann der

PAF intra- oder extrazellulär vorliegen. Der extrazelluläre PAF ist neben seiner namengebenden Funktion bei der Aktivierung und Koagulation von Blutplättchen (Demopoulos et al., 1979) auch an der Kontraktion der glatten Muskulatur beteiligt, steigert die vaskuläre Permeabilität und spielt bei diversen pathologischen Prozessen wie z. B. Entzündungen (Tavares de Lima et al., 1998) oder Asthma (Carraway et al., 1984) eine Rolle. Als retrograder Botenstoff induziert er die Ausbildung der Langzeit-Potenzierung im ZNS (Kato et al., 1994). Die Behandlung neuronaler Zellkulturen mit PAF bewirkt die Differenzierung der Neurone (Kornecki und Ehrlich, 1988; McNeil et al., 1999). Veränderungen in der Zellmorphologie, wie der Kollaps der Wachstumskegel, die Neuritenretraktion und die Ausbildung von Varikositäten, wurden auf das PAF-vermittelte Rearrangement von Mikrotubuli zurückgeführt (McNeil et al., 1999). Während exogener PAF über G_q-Protein-gekoppelte Rezeptoren wirkt (Honda et al., 1991), ist die Wirkart des endogenen Lipids unklar. Mutationen der intrazellulären PAF-AH1b, führen jedoch zu einer fehlgesteuerten neuronalen Migration (Reiner et al., 1993; Hirotsune et al., 1998), so daß dem endogenen Phospholipid regulatorische Funktionen beim Zellwachstum und bei der Zelldifferenzierung zugesprochen wurden.

Die hier isolierte Isoform 1b ist ein G-Protein ähnliches Heterotrimer (Ho et al., 1997). Sie ist aus der putativ regulatorischen 45 kDa α -, und den katalytischen 30 kDa β - und 29 kDa γ -Untereinheiten zusammengesetzt (Hattori et al., 1994a; Hattori et al., 1994b; Hattori et al., 1995b). Da die α -Untereinheit im Hirn nur im embryonalen und frühen postnatalen Stadium exprimiert wird, liegt die β -Untereinheit im Adulten wahrscheinlich als mit der γ -Untereinheit komplexiertes Homodimer vor (Albrecht U et al., 1996; Manyá et al., 1998). Die katalytischen Untereinheiten weisen den in der Familie der Serin-Esterasen konservierten aktiven Serinrest auf (Hattori et al., 1994a), während die putativ regulatorische α -Untereinheit über zu β -Transducin homologe WD-Konsensussequenzen verfügt (Reiner et al., 1993; Hattori et al., 1994b). Eine Mikrodeletion des α^{Lis} -Gens (Reiner et al., 1993), welches die α -Untereinheit kodiert, ist die Ursache der Miller-Dieker-Lissenzephalie ("glattes Hirn") (Miller, 1963; Dieker et al., 1969; Dobyns, 1987). Der Phänotyp dieser Krankheit, eine mangelhafte Ausbildung der charakteristischen kortikalen Lamina und einer Ansammlung von Neuronen an den Ventrikeln (Stewart, 1994), wurde auf eine verlangsamte Migration der kortikalen Neuronen zurückgeführt (Hirotsune et al.,

1998). Im Gegensatz zu den bisher bekannten Mausmutanten, wie *reeler* (Goffinet, 1984; de Rouvroit und Goffinet, 1998) und *scrambler* (Goldowitz et al., 1997; Gonzales et al., 1997), bei denen ebenfalls das Wachstum der Neuronen abnormal ist, wird die Migrationsrichtung der Neurone nicht verändert und wirkt sich in einer dosis-abhängigen Weise ausschließlich auf die betroffenen Neurone aus (Hirotsume et al., 1998). Da das mutierte α^{Lis} -Gen nicht mehr mit der β -Untereinheit koprizipitiert (Manya et al., 1999), könnten die MDL-Phänotypen auf eine Fehlregulation der PAF-Konzentration durch mangelnde Katalyse zurückgeführt werden.

Interessanterweise bewirken Eingriffe in das serotonerge System α^{Lis} -vergleichbare Phänotypen (De Vitry et al., 1986; Budnik et al., 1989; Hansson et al., 1999). Wird das den SERT oder das die 5-HT-katabolische Monoamin-Oxidase-A (MAOA) kodierende Gen (vgl. Abb. 1.1) deletiert, oder wird der SERT im frühen Embryonalstadium inhibiert, führt der erhöhte 5-HT-Spiegel zu Veränderungen serotonerger Strukturen des viszeralen und primären somatosensorischen (S1) Kortex (Lauder et al., 1988; Cases et al., 1995; Kirby und Waldo, 1995; Bengel et al., 1996; Cases et al., 1996; Persico, 2000) und zu kraniofacialen Abnormitäten (Shuey et al., 1992; Yavarone et al., 1993; Upton et al., 1999). Die kortikalen Veränderungen werden erkennbar durch die Auflösung charakteristischer Aggregate SERT-immunreaktiver Fasern, der sog. Faß-Struktur ("barrels"), zu einem kontinuierlichen Band. Dieser 5-HT-induzierte Phänotyp wird auf verstärktes tangenciales Wachstum dieser Neuronen zurückgeführt. Die Fasern in den Barrels sind eigentlich glutamaterg (Lebrand et al., 1996) und exprimieren den SERT nur transient von E13 bis P14 (Cases et al., 1996; D'Amato et al., 1987). In dieser Zeit, in der die thalamokortikalen afferenten Fasern aus den tiefen kortikalen Schichten heraus auswachsen und der Synaptogenese untergehen (Blue und Parnavelas, 1983), liegt 5-HT also als ein "geborgter Transmitter" vor. Für die Differenzierung dieser Neurone ist er jedoch essentiell (Lavdas et al., 1997). Auch das 5-HT moduliert somit die Morphologie der Neurone ähnlich dem PAF (Kornecki und Ehrlich, 1988; Laudé, 1993). Der SERT und die PAF-AH1b als Regulatoren der Konzentration dieser Effektorsubstanzen nehmen hierbei Schlüsselfunktionen ein. 5-HT und PAF werden außerdem beide als kausal an pathologischen Phänomenen wie Entzündungen oder Asthma beteiligte Wirkstoffe diskutiert (Carraway et al., 1984; Stafforini et al., 1999; Cazzola und Matera, 2000). Die

Ähnlichkeiten in der Funktion der Substrate 5-HT und PAF könnten eine gegenseitige Beeinflussung vermuten lassen. Die Interaktion der β -Untereinheit der PAF-AH1b mit dem SERT-CT bietet einen potentiellen Verknüpfungsmechanismus zwischen denjenigen Proteinen, welche die Konzentration dieser Effektoren regulieren.

Eine Grundvoraussetzung für die physiologische Interaktion von Proteinen ist deren Coexpression in den gleichen Geweben bzw. Zellpopulationen. Die mRNA der PAF-AH- β -Untereinheit wird im Hirn der adulten Maus ubiquitär exprimiert (Manya et al. 1998), wobei die stärkste Expression in kortikalen Strukturen wie dem cerebralen Kortex, den Purkinje-Zellen des Cerebellums und in der mitralen und granulären Zellschicht des Bulbus olfactorius gefunden wird (Albrecht U et al., 1996). Die SERT-mRNA im adulten Tier ist nur in den Zellkörpern der serotonergen Neurone nachweisbar, die in den medialen und dorsalen Raphekernen liegen (Lebrand et al., 1998). Während der Entwicklung wird der SERT transient auch in verschiedenen kortikalen Arealen des Telenzephalon, des Hippocampus und des Subiculum exprimiert (Fujimiuya et al., 1986; Lebrand et al., 1998). Weiterhin findet sich die SERT-mRNA im Dienzephalon in einigen Nuclei des Thalamus (medialer und lateraler ventroposteriorer Nucleus sowie ventraler posteromedialer Nucleus Thalami/Nucleus geniculatus mediale, laterale, dorsale [verstärkt an P0, z. T. bis P12]). Neben der herrschenden Colokalisation in den Raphekernen im Adulten liegt eine zeitlich begrenzte Colokalisation also auch in Arealen des Hippocampus (CA2+3), dem Subiculum sowie dem Isokortex vor. In früheren Stadien werden die SERT- und die β PAF-AH-Gene auch im dorsalen Wurzelganglion, den Neuroepithelzellen, den kranialen Ganglien, in den Neuralleistenzellen sowie allen davon abstammenden Geweben (autonome Ganglien, Nebennierenrinde, neuroepitheliales Gewebe, Haut, Darm, Lunge, Kiemenbogen und dem Stirn- und Nasenwulst) coexprimiert. Die in Hefezellen nachgewiesene Interaktion zwischen dem SERT und der β PAF-AH erscheint damit physiologisch sinnvoll und wurde deshalb näher untersucht.

4.2.2 Nachweis der Interaktion und physiologische Relevanz zwischen dem SERT und der PAF-AH1b- β -Untereinheit

Die im Zwei-Hybrid-System identifizierte Interaktion zwischen dem SERT-CT und der 30 kDa β -Untereinheit der PAF-AH1b wurde biochemisch durch Kopräzipitation bestätigt.

Auch im zellulären Kontext, d. h. in mit SERT und GFP- β PAF-AH kotransfizierten Zellen, wurde eine Umlokalisierung der GFP-markierten 30 kDa-Untereinheit vom Zytoplasma an die Plasmamembran beobachtet. Diese Daten zeigen, daß die in Hefezellen identifizierte Interaktion zwischen SERT und β PAF-AH auch in eukaryotischen Zellen vorliegt und somit physiologische Bedeutung haben sollte.

Aufschluß über die physiologische Relevanz der Interaktion zwischen SERT und β PAF-AH sollten Aufnahmestudien mit tritiiertem 5-HT bringen. Der Transport von [3 H]5-HT in HEK-293 Zellen, die das β PAF-AH-GFP-Fusionsprotein und den SERT transient coexprimierten, zeigte im Vergleich mit den Werten der Kontrollzelllinie, die mit der cDNA des GFP-Proteins transfiziert wurde, keine Veränderungen in der Transportfunktion. Dagegen war unter gleichen Bedingungen eine verringerte Transportaktivität des SERT mit dem zweiten untersuchten Protein, MacMARCKS, erkennbar. Daher nehmen wir an, daß die Interaktion mit der β -Untereinheit keinen direkten Einfluß auf die Funktion des SERT hat. Möglicherweise wird für die Transportregulation des SERT auch die Coexpression der regulatorischen \square^{Lis} -Untereinheit der PAF-AH1b benötigt.

Zeit- und dosisabhängige Untersuchungen in Gegenwart des exogen applizierten PAF ergaben keine veränderte 5-HT Aufnahmerate in der den SERT stabil exprimierenden HEK-Zelllinie. Eine eventuelle Rolle des endogenen Phospholipids bei der Regulation der Transportfunktion des SERT oder der β PAF-AH in der Regulation des SERT wurde hier nicht untersucht. Genauso wäre denkbar, daß die Substrate, 5-HT und PAF, durch die Interaktion des SERT und der β PAF-AH manipuliert würden. Diese Hypothese wird im folgenden näher dargestellt.

4.2.3 Modell der PAF-AH als Acetyl-Transferase

Die Grundlage der Hypothese, daß 5-HT- oder PAF-Wirkungen durch die Interaktion zwischen β PAF-AH und dem SERT modifiziert werden könnten, beruht auf der Vermutung, daß die β -Untereinheit neben der Acetylhydrolase- auch Acetyltransferaseaktivität besitzt. Aufgrund einer bestehenden Homologie der Serin-Esterasedomäne zu einer Acetyltransferase aus Hefe (Hattori et al., 1994a) erscheint eine solche Transferaseaktivität durchaus möglich. Auch wurden bereits diverse PAF-

Acetyltransferasen aufgereinigt (Lee et al., 1992; Lee et al., 1996; Balestrieri et al., 1997; Karasawa et al., 1999), welche in Abwesenheit von Substrat als Acetylhydrolasen fungieren (Karasawa et al., 1999). Möglicherweise könnte der hydrolysierte Acetylrest des PAF auf das Serotonin transferiert werden, womit N-Acetylserotonin (NAS) entstünde. Dieser Stoff wurde bereits als ein Zwischenprodukt der Melatoninsynthese in der Epiphyse, zugleich aber auch als ein potenter Inhibitor der Stickoxyd-Synthase (NOS) (Klemm et al., 1995) und der Sepiapterin-Reduktase (SR, auch Tetrahydrobiopterin-Reduktase genannt [$K_i = 0,12 \mu\text{M}$]) (Auerbach et al., 1997) beschrieben (Abb. 4.1).

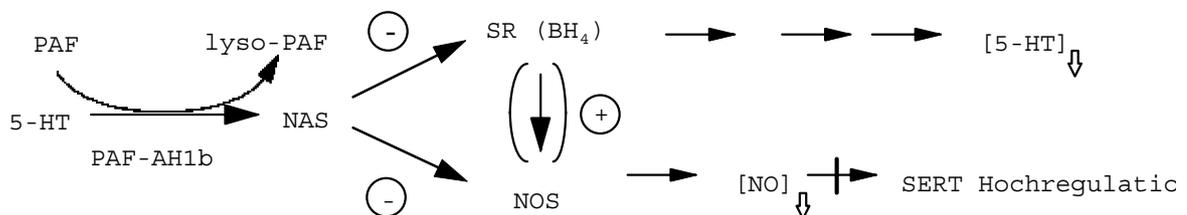


Abb. 4.1: Modell einer möglichen Beteiligung der PAF-AH1b- β -Untereinheit an der Regulation der intrazellulären 5-HT-Konzentration. Nach diesem Modell überträgt die β -Untereinheit einen Acetylrest des PAF auf das Serotonin (5-HT), womit N-Acetylserotonin (NAS) entsteht. NAS inhibiert die Sepiapterin-Reduktase (SR) und damit die Tetrahydrobiopterin(BH₄)-Synthese. BH₄ ist für die Serotoninsynthese limitierend, wodurch NAS indirekt die 5-HT-Synthese inhibiert. Zusätzlich inhibiert NAS die NO-Synthase (NOS). Die reduzierte NO-Konzentration verringert die 5-HT-Wiederaufnahmekapazität des SERT. NAS ist so ein effektiver Inhibitor der intrazellulären 5-HT-Konzentration. Die parallele Inhibition ist notwendig, da BH₄ auch die NOS aktiviert.

Die Sepiapterin-Reduktase katalysiert den letzten Schritt der Tetrahydrobiopterin (BH₄)-Synthese aus GTP (Nichol et al., 1983). Aufgrund der inhibitorischen Wirkung von NAS auf die Sepiapterin-Reduktase reguliert NAS den BH₄-Spiegel (Katoh et al., 1982). Im Gegensatz zu NAS stellt BH₄ einen allosterischen Aktivator der NOS dar (Lowenstein und Snyder, 1992; Marletta, 1994; Klemm et al., 1995). NAS inhibiert die NO-Synthase damit einerseits direkt durch die Hemmung der NOS und andererseits indirekt durch die Reduzierung der intrazellulären BH₄-Konzentration. Dies sollte sich wiederum auf die intrazelluläre 5-HT-Konzentration auswirken, da die 5-HT-Transportrate des SERT in Gegenwart von NO um 30 - 50 % ansteigt (Miller und Hoffman, 1994). Weiterhin

unterliegt auch der mögliche geschwindigkeitsbestimmende Schritt der 5-HT-Synthese, nämlich die Konversion von L-Tryptophan nach 5-Hydroxytryptophan, der BH₄-Kontrolle (Joh et al., 1957; Boadle-Biber, 1993). Dieser Schritt wird durch die L-Tryptophan-Monooxygenase (Hydroxylase) durchgeführt, die BH₄ als limitierenden Cofaktor benötigt. Eine Modulation des 5-HT-Spiegels könnte so durch kleine Veränderungen des BH₄-Pools erzielt werden. Da der intrazelluläre BH₄-Spiegel wiederum durch NAS reguliert wird, könnte die PAF-AH1b-katalysierte NAS-Synthese einen Rückkopplungsmechanismus bei der 5-HT-Synthese darstellen.

4.2.4 MacMARCKS als putativer Interaktionspartner

Bisher wurden zwei Homologe der Familie der MARCKS-Proteine identifiziert, das zuerst isolierte MARCKS (Albert et al., 1987; Seykora et al., 1991; Erusalimsky et al., 1991) und MacMARCKS (Umekage und Kato, 1991; Li und Aderem, 1992). MacMARCKS besitzt als Mitglied der MARCKS-Familie eine N-terminale Myristoylierungsdomäne (MD), eine MARCKS-Homologie-Domäne (MH2) unbestimmter Funktion und eine sog. Effektor-Domäne (ED) (vgl. Abb. 3.10) (Aderem, 1992a; Blackshear, 1993). Letztere verfügt über Konsensussequenzen für die PKC-Phosphorylierung (Albert et al., 1987; Li und Aderem, 1992) sowie für die gemeinsame Bindungsstelle von Calmodulin (CaM) und Aktin (Hartwig et al., 1992; Aderem, 1992b). Die Ca²⁺/CaM-Bindung und PKC-Phosphorylierung hemmen die Aktinbindung an MacMARCKS; außerdem vermag das phosphorylierte Protein kein Ca²⁺/CaM zu binden, noch kann der Ca²⁺/CaM komplexierte MacMARCKS phosphoryliert werden (Thelen et al., 1991; Hartwig et al., 1992; Hinrichsen und Blackshear, 1993; Verghese et al., 1994; Arbuzova et al., 1998). Der Myristoylrest und die basische ED vermitteln die Assoziation mit negativ geladenen Phospholipiden der Plasmamembran (Kim et al., 1994; Vergeres und Ramsden, 1998), wie Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) und Phosphatidylserin. Diese Membranbindung wird durch Ca²⁺/CaM-Bindung bzw. Phosphorylierung unterbrochen (Mc Laughlin und Aderem, 1995; Glaser et al., 1996; Myat et al., 1998; Michielin et al., 1998; Victor et al., 1999). Vermutlich übertragen MacMARCKS und MARCKS die PKC- und Ca²⁺/CaM-vermittelten Signale auf das Zytoskelett und induzieren so Vesikelsekretion in Neuronen (Chang et al., 1996; Ohmitsu et al., 1999) und Thrombozyten (Elzagallaai et al., 1998), die Zellmigration (Wu

et al., 1996; Myat et al., 1997) und das Membranrecycling (Allen und Aderem, 1995; Yue und Li, 1998).

4.2.5 Nachweis einer Interaktion des SERT mit MacMARCKS

Die in den Hefezellen identifizierte Interaktion zwischen dem SERT-CT und MacMARCKS sollte biochemisch durch einen Copräzipitations-Ansatz nachvollzogen werden. Allerdings konnte weder für prokaryotisch noch für eukaryotisch überexprimierte MacMARCKS-Fusionsproteine jeweils weder in An- noch in Abwesenheit von Ca^{2+} bzw. $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, oder nach Behandlung der Zellen mit Phorbol ester und der damit einhergehenden potentiellen Phosphorylierung von MacMARCKS, eine spezifische Bindung an den prokaryotisch exprimierten SERT-CT nachgewiesen werden. Es kann daher vermutet werden, daß es sich bei dieser genetisch nachgewiesenen Interaktion um eine niederaffine Bindung handelt. Alternativ könnten die Fremdanteile der heterolog exprimierten Fusionsproteine die Interaktion sterisch behindern.

Die konfokale Analyse immunzytochemischer Färbungen von HEK-293 Zellen, die das MacMARCKS-GFP Fusionsprotein und den SERT transient coexprimierten, zeigte eine Colokalisation beider Proteine. Eine Überlagerung der Immunfluoreszenzen fand sich verstärkt an Arealen der Plasmamembran, an denen SERT-Aggregate vorlagen. Da die Colokalisation nicht homogen, sondern vornehmlich in diesen Sub-Domänen auftrat, scheint die beobachtete Anreicherung von MacMARCKS-GFP an der Plasmamembran SERT-vermittelt zu sein. Ob solche Areale funktionelle definierte Membrandomänen darstellen ist derzeit unklar. Glaser et al. (Glaser et al., 1996) beobachteten jedoch an unilamellaren Phospholipid-Vesikeln, daß die MARCKS-ED Domänen ausbildete, in denen neben der ED saure Lipide, z. B. PIP_2 oder Phosphatidylserin (PS), und evtl. $\text{PKC}\alpha$ angereichert vorlagen (Yang und Glaser, 1996; Glaser et al., 1996). Die Ausbildung solcher Domänen beruht auf elektrostatischen Anziehungskräften ("myristoyl electrostatic switch") zwischen der basischen ED und den sauren Lipiden sowie auf hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Phenylalaninen der ED und der Membran (Mc Laughlin und Aderem, 1995; Vergeres und Ramsden, 1998). Durch die lokale Anreicherung des PIP_2 wird das Phospholipid von der Phospholipase C (PLC) separiert, wodurch die PLC-katalysierte Hydrolyse des Phospholipids inhibiert wird. Durch Phosphorylierung oder

CaM-Bindung der ED dissoziiert MacMARCKS von der Membran, wodurch PIP₂ freigesetzt und von der PLC zu IP₃ dem membrandestabilisierenden Lipid Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert wird. Es wäre denkbar, daß SERT durch die Interaktion mit MacMARCKS in diese PIP₂-angereicherten Domänen gelangt. PIP₂ könnte Einfluß auf die Transportfunktion des SERT nehmen oder die Sequestrierung des SERT unterstützen (vgl. 4.2.6). Eine PIP₂-abhängige Regulation von Proteinen wurde bereits für den Adenosin-Triphosphat-sensitiven K-Kanal (K_{ATP}) gezeigt, dessen ATP-Sensitivität durch membranständiges PIP₂ reduziert wird (Shyng und Nichols, 1998; Baukrowitz et al., 1998). Die an unilamellaren Vesikeln nachgewiesene PIP₂-Anreicherung konnte auch in einem zellulären Kontext, nämlich in polarisierten Nierenzellen (Madin-Darby Canine Kidney Cells, MDCK), aufgezeigt werden. Membranständiger MacMARCKS colokalisiert hier mit PIP₂ im basolateralen Kompartiment (Myat et al., 1998). Interessanterweise wird auch der heterolog überexprimierte SERT basolateral transportiert (Gu, 1996; Schroeter et al., 1997; Myat et al., 1998) und colokalisiert daher mit dem membranständigen MacMARCKS und mit PIP₂.

Eine Colokalisation des SERT mit dem Kandidatenprotein liegt vermutlich auch in Neuronen vor. Chang et al. (Chang et al., 1996) demonstrierten in Phäochromozyten der Nebenniere (PC12), daß MacMARCKS in punktförmiger Art in neuronalen Fortsätzen und Varikositäten (Chang et al., 1996; Lu et al., 1998) angereichert ist. Die Fraktionierung der Zellen validierte die Expression von MacMARCKS in Synaptosomen, in der kleinen Vesikelfraktion und auf Synaptophysin enthaltenden synaptischen Vesikeln. Gleichermaßen findet sich der SERT in Varikositäten von Axonen (Sur et al., 1996) und an der aktiven Zone der Präsynapse (Zhou et al., 1998).

4.2.6 Physiologische Bedeutung der Interaktion des SERT und MacMARCKS

Die heterologe Coexpression des SERT mit GFP-MacMARCKS hatte eine Reduktion der maximalen Transportkapazität (V_{max}) zur Folge. Die Reduktion der V_{max} durch die Aktivierung der PKC mittels Phorbol esterbehandlung zeigte in MacMARCKS-exprimierenden Ansätzen eine geringere Reduktion der V_{max} -Werte als in Kontrollansätzen. Die Präinkubation dieser Ansätze mit dem PKC-Inhibitor Staurosporin hatte im Vergleich

zu Kontrollzellen einen höheren Anstieg der V_{\max} -Werte zur Folge. Die Reduktion der SERT-Aufnahmerate in Gegenwart von MacMARCKS wurde folglich auf einen PKC-vermittelten Effekt zurückgeführt. Diese Befunde suggerieren, daß MacMARCKS die Wiederaufnahmekapazität des SERT durch die PKC-Signalkaskade moduliert.

Pharmakologische Untersuchungen an SERT (Myers et al., 1989; Anderson und Horne, 1992), GLYT1b (Sato et al., 1995a), DAT (Kitayama et al., 1994), GAT1 (Sato et al., 1995b) und NET (Apparsundaram et al., 1998) zeigten bereits die PKC-vermittelte Regulation dieser Transportproteine. Qian et al. (Qian et al., 1997) führten dies auf die Translokation der Neurotransmittertransporter von der Plasmamembran in frühe Endosomen zurück. Obwohl Ramamoorthy et al. (Ramamoorthy und Blakely, 1999) eine PMA-induzierte Phosphorylierung des humanen SERT zeigten, vermochten sie die PKC und den SERT bisher nicht zu coimmunpräzipitieren (Blakely, persönlich kommuniziert). Ebenso vermochte die Mutation aller putativen PKC-Phosphorylierungsstellen des SERT (Sakai et al., 1997) bzw. des GLYT1b (Sato et al., 1995a) keine Inhibition des PMA-Effekts zu erzielen. Die PKC-regulierte Oberflächenverfügbarkeit der Neurotransmittertransporter muß daher durch Proteine bzw. durch einen Proteinkomplex vermittelt werden, der u. a. MacMARCKS beinhalten könnte. Daß MacMARCKS die Sequestrierung des SERT induziert, erscheint insofern plausibel, als der phosphorylierte MacMARCKS ebenfalls in frühe Endosomen und synaptische Vesikel sequestriert wird, diese Sequestrierung aber durch die Substitution der Phosphorylierungsmotive inhibiert wird (Allen und Aderem, 1995; Chang et al., 1996;). Diese Hypothese wird durch die kürzlich berichteten Befunde durch Lu et al. (Lu et al., 1998) erhärtet, der eine Umverteilung des NET von der Plasmamembran in Vesikel infolge einer MARCKS-Phosphorylierung beschrieb.

Ein Modell für den regulativen Einfluß des MacMARCKS auf den SERT könnte demnach wie in Abb. 4.2 gezeigt, aussehen:

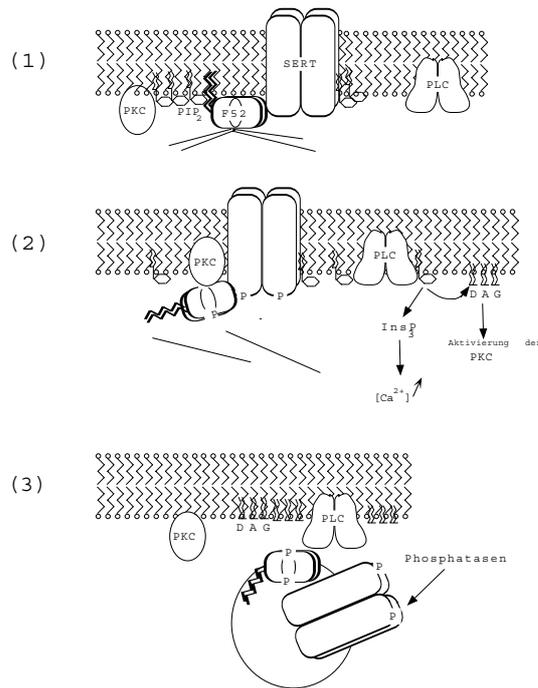


Abb. 4.2: Modell der MacMARCKS-induzierten Sequestrierung des SERT. **1:** MacMARCKS (F52) und SERT liegen an der Plasmamembran vor. F52 verknüpft Aktinfilamente und stabilisiert dadurch das submembranöse Zytoskelett. In der Membran bildet es PIP₂-angereicherte Domänen aus, in die SERT durch einen MacMARCKS-vermittelten Prozeß sortiert wird. Der SERT-CT bindet an PIP₂ und ist der Phosphorylierung unzugänglich. **2:** Durch ein externes Signal wird die PKC aktiviert und phosphoryliert MacMARCKS. Dieser desorbiert von der Membran, PIP₂ wird freigesetzt und der PLC zugänglich gemacht. Der explosiv ansteigende Diacylglycerol(DAG)-Spiegel bewirkt die Destabilisierung der Membran. Als Folge der Phosphorylierung von MacMARCKS verliert das Protein die Affinität zu den Aktinfilamenten. Durch fluidere submembranöse und membranöse Strukturen werden Vesikelbewegungen ermöglicht. Infolge des hydrolysierten PIP₂ desorbiert auch der SERT-CT von der Membran und kann so ebenfalls durch die PKC phosphoryliert werden. Mögliche Interaktionen mit dem Zytoskelett könnten aufgehoben werden. **3:** Sequestrierung von der Plasmamembran setzt ein. Die Dephosphorylierung durch Proteinphosphatasen versetzt MacMARCKS und den SERT in den Ausgangszustand.

MacMARCKS und SERT kolokalisieren im unphosphorylierten Zustand an der Plasmamembran. Die basische ED von MacMARCKS reichert das saure Lipid PIP₂ an, wodurch dieses der PLC nicht mehr zugänglich ist (Glaser et al., 1996). Gleichzeitig werden über die ED Aktinpolymere zu einer soliden Zytoskelettarchitektur verknüpft (1). Aktivierung der PKC führt zur Phosphorylierung von MacMARCKS und SERT. Durch die negative Ladung der Phosphatreste verliert MacMARCKS die Fähigkeit, PIP₂

anzureichern, so daß das Phospholipid freigesetzt und der PLC zugänglich wird. Diese hydrolysiert PIP₂ zu Diacylglycerol (DAG), welches membrandestabilisierend wirkt (Rand und Parsegian, 1986; Sanchez-Migallon et al., 1994; Glaser et al., 1996). MacMARCKS dissoziiert von der Plasmamembran und vom Zytoskelett. Die fluidere Membranstruktur ermöglicht nun Vesikelbewegungen, so daß SERT sequestriert werden kann (2). Sinkt der intrazelluläre Ca²⁺-Spiegel durch die Beendigung des extrazellulären Signals, dephosphorylieren Proteinphosphatasen 1 und 2A den MacMARCKS und SERT (3), woraufhin die Proteine mit der Plasmamembran reassoziieren. Diese Arbeitshypothese vermag die PKC-induzierte Regulation des SERT durch dessen Sequestrierung in Abwesenheit von Substrat plausibel zu erklären.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit zwei Interaktionspartner des SERT-CT identifiziert, deren mögliche Funktionen in der Regulation der intrazellulären 5-HT-Konzentration einerseits bzw. der Regulation der Transportfunktion des SERT durch dessen Sequestrierung andererseits liegen könnten.

5. Zusammenfassung

Untersuchungen zur Interaktion zytoplasmatischer Proteine mit dem Serotonintransporter

Der plasmamembranständige Serotonintransporter SERT terminiert die Neurotransmission an serotonergen Synapsen durch den schnellen Rücktransport des Neurotransmitters Serotonin (5-HT) in die Präsynapse. Neben seinem präsynaptischen Vorkommen wird der SERT auch axonal in Varikositäten immundetektiert. Der Substrattransport selbst unterliegt der Kontrolle des Ca^{2+} /CaM-, des Stickoxid (NO)- und des Proteinkinase C (PKC)-Signaltransduktionsweges. Letzterer bestimmt die Oberflächenverfügbarkeit des SERT durch dessen Sequestrierung. Die Regulation der Lokalisation und des Substrattransports des SERT sollte durch assoziierte Proteine erzielt werden. Da bislang jedoch keine interagierenden Proteine des SERT bekannt waren, sollten in dieser Arbeit mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems zytoplasmatische Interaktionspartner des SERT identifiziert werden.

Erste Untersuchungen an heterolog exprimierten Deletionsmutanten der Termini des SERT ergaben, daß diese zytoplasmatischen Domänen für die Funktion des Proteins unabdingbar sind. Im folgenden wurde daher mit dem Carboxyterminus des SERT eine hirnspezifische cDNA-Bibliothek der neugeborenen Ratte durchsucht. Es wurden vier cDNA-Klone isoliert, die für putative Interaktionspartner des SERT kodierten. Die Relevanz dieser genetisch nachgewiesenen Interaktionen wurde biochemisch mittels affinitätschromatographischer Studien untersucht, während immunzytochemische Analysen die Interaktionen durch die Umverteilung oder durch die Colokalisation der coexprimierten Proteine *in vivo* validierte. Pharmakologische Untersuchungen sollten darüberhinaus Aufschluß über den regulatorischen Einfluß der Interaktion auf die Transportfunktion des SERT geben. Nach diesen Aspekten wurden zwei der putativen Interaktionspartner näher untersucht.

Der erste untersuchte cDNA-Klon kodierte für die β -Untereinheit der intrazellulären Acetylhydrolase des "platelet-activating factor" (β PAF-AH). Affinitätschromatographisch wurde die Interaktion durch die Präzipitation der eukaryotisch überexprimierten β -

Untereinheit an einem bakteriell exprimierten Fusionsprotein des SERT-CT bestätigt. Die immunzytochemische Analyse zeigte nach der Coexpression der β -PAF-AH und dem SERT eine Umlokalisierung des zytoplasmatischen Proteins an Bereiche plasmamembranständiger SERT-Immunreaktivität. Durch Wiederaufnahmestudien wurde kein Effekt der β PAF-AH auf die Transportfunktion des SERT ermittelt, weshalb die funktionelle Bedeutung dieser Interaktion vorerst unklar bleibt.

Der zweite Klon kodierte für das Ratten-spezifische Homolog des myristoylierten Alaninreichen Proteinkinase C-Substrats (MacMARCKS). Der biochemische Nachweis einer Interaktion konnte hier nicht erbracht werden. Dagegen zeigte die immunzytochemische Analyse eine Colokalisation von MacMARCKS und SERT in diskreten Bereichen der Plasmamembran. Hinweise auf die physiologische Bedeutung konnten durch die pharmakologische Analyse gewonnen werden. So induzierte die Coexpression von MacMARCKS und SERT eine Abnahme der maximalen Transportrate (V_{\max}) um $29,6 \pm 18,6 \%$ ($n = 3$) im Vergleich zu GFP-exprimierenden Kontrollzellen. Die Stimulierung der PKC erzielte dagegen kaum eine weitere Reduktion der V_{\max} im Gegensatz zu den Kontrollzellen, während die Behandlung der Zellen mit einem PKC-Inhibitor zum Angleich der V_{\max} der Kontrollzellen und der MacMARCKS-exprimierenden Zellen führte. Daraus wurde gefolgert, daß MacMARCKS an der Regulation der Transportfunktion des SERT durch dessen Sequestrierung beteiligt ist.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit zwei Interaktionspartner des SERT-CT identifiziert, deren mögliche Funktionen in der Regulation der intrazellulären 5-HT-Konzentration einerseits bzw. der Regulation der Transportfunktion des SERT andererseits liegen könnten.

Abkürzungsverzeichnis

3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
5-HT	5-Hydroxytryptophan
A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
APS	Ammoniumpersulfat
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CaM	Calmodulin
CaMKII	Ca ²⁺ -Calmodulin-abhängige KinaseII
cDNA	komplementäre cDNA
Ci	Curie
cpm	counts per minute (Zerfälle pro Minute)
CT	C-Terminus
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DAG	Diazylglycerol
DAT	Dopamintransporter
DMF	N,N-dimethylformamide
Dnase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAAT4	exzitatorischer Aminosäuretransporter
ED	Effektordomäne
EDTA	Ehtylendiamintetraacetat
et al.	et. alteri
F52	Synonym für MacMARCKS
GABA	g-Aminobutyrat
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GLYT	Glycintransporter
GST	Glutathion-S-Transferase
HEK	human embryonic kidney cells (humane embryonale Nierenzellen)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
JAR	Chorionkarzinom-Zelllinie der Plazenta
MAOA	Monoaminoxidase A
MARCKS	Myristoyliertes Alanin-Reiches C-Kinase Substrat
MBP	Maltose-bindendes Protein
MD	Myristoylierungsdomäne
MDCK	Madin-Darbin-Canine Kidney Zellen
MDMA	3,4-Methylendioxyamphetamin

MH	MARCKS-Homologiedomäne
MTSEA	(Trimethylammonium)ethyl]methanthiosulfonat
nACh	nicotinischer Azetylcholinrezeptor
NAS	N-Acetylserotonin
NET	Noradrenalintransporter
NO	Stickoxyd
NOS	Stickoxyd-Synthetase
NS	Nukleinsäure
NT	N-Terminus
PAF	1-O-Alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholin
PAF-AH	PAF-Acetylhydrolase
PAFR	PAF-Rezeptor
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PC12	Phäochromozyten der Nebenniere
PCA	<i>p</i> -Chloroamphetamin
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase- Kettenreaktion)
PD	Privatdozent
PIP ₂	Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	cAMP-abhängige Proteinkinase
PLA	Phospholipase C
PLA2A	Phospholipasen 2A
PMA	Phorbol-12 Myristat 13-Acetat
PNS	peripheres Nervensystem
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	sodium dodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
SERT	Serotonintransporter
SERT-CT	C-Terminus des Serotonintransporters
SERT-NT	N-Terminus des Serotonintransporters
SR	Sepiapterin-Reduktase
βPAF-AH	β-Untereinheit der PAF-AH
Tab.	Tabelle
TE	Tris-HCl/EDTA-Lösung
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Units
ÜN	über Nacht
V _{max}	maximale Transportrate
Vol.	Volumen
(v/v)	volume to volume
(w/v)	weight to volume
WD	Tryptophan-Aspartat Domäne
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
ZNS	Zentrales Nervensystem

6. ANHANG

Zusammenstellung der cDNAs positiver Klone aus dem Zwei-Hybrid-System

Durch die Durchsuchung der Zwei-Hybrid-cDNA-Bibliothek wurden mehrere cDNAs isoliert, die für putative Interaktionspartner des SERT kodierten. Die Nukleinsäure- und die Aminosäuresequenz dieser ansequenzierten cDNAs sind im folgenden aufgelistet. Dabei wurde die Aminosäuresequenz aus dem Leseraster der Aktivierungsdomäne hergeleitet. Nicht eindeutig sequenzierte Nukleotide wurden mit N dargestellt, während uneindeutige Aminosäuren mit einem X markiert wurden. Stopkodons wurden auf Aminosäureebene durch einen „*“ oder einen „.“ gekennzeichnet. Die Homologien wurden unter Zuhilfenahme eines Suchprogramms ("Basic linear alignment search tool", BLAST (Altschul et al., 1997)) aus verschiedenen Datenbanken (GenBank, SwissProt, dbEST) ermittelt. In Klammern hinter der Angabe der prozentualen Homologie ist die Anzahl der homologen Nukleinsäuren (NS) oder Aminosäuren (AS) in Relation der gesamten Basenpaare bzw. Aminosäuren der homologen Sequenz wiedergegeben. Die identifizierten Sequenzen höchster Homologie sind aufgeführt. Deren "Accession"-Nummer ist jeweils am Satzende angegeben. Ebenso sind die Leseraster, soweit sie vom offenen Leseraster abweichen, und interne Translationsstarts erwähnt.

Klon 4/7.5

Nukleinsäuresequenz:

```
5'GAATTCGGCACGAGCTGTCCTGTAAAATGGCATTGGAAGCATACTTGTGTCCTTGGCTCACTCTCTGCACCATCCATA
GGGCAAGAGTGGGCTTTCACCTCTTTCAAATTGCTCTTTCTGTCTTTGCTCTCATTTTACAGTATTAATCAACCGAGGACAC
ACAGTGATCATATTAGAATTTAGAAAAGAGCAACCTCGCAGCAAAAATAATTTCTCTGTTGCTGCAATGGCAAAAACAAAA
ACGTAGACTGACTCTTCTGCATGTTTCCCATAGAGCAGAAAAGTGCTAACCATGTAGCCACTTCATGATGCAAGCAAAAA
GCATAGGCGACAAAAGTCCCCTGAGATGCCTTTGGGGCTCAGTCGGGACGCACTGTGCGGTCACGTGACTGCTGTGCAG
GAGTTGCAGCGGCTGCTCCAACTCCCTCCCTCGCCTTTTAAAGAACTTGCCAGAATGCATGGTTAACTTCCTTATCAAACT
CTGACCTCCCTTCTGTTCTTTTGTGCTTTCACAGACTAACACAGATTTCCAGAGAACTAACATTTTGAACCTTGTGTAAT
TCTCAAGTGACTTTCCCCCTACTAATGTTTACTCCCCTATGTGGCGTGTCTCTGANCGTCTACTTTAAACCATGGA
ACACAGGTGATTTGGACACTAAGCAGATCTGAGCAAACAAGCCTGTTTCAGAACAACTCNCCACGGTGACTACTCTGGA
AGCTAACAAAGATACTCTCTGTCTTTTTCTTTTTTAAAAATTTGTTTTAAC3'
```

Aminosäuresequenz:

```
GTSCPVKWHLKHTLCPLLTLAPSIGQEWAFSTFKLLFLSLLSFYSINQPRTHSDHIRI*
```

Die Nukleinsäuresequenz weist 89 % Homologie zur cDNA, die für das LIM-Proteins des Skelettmuskels der Maus (FHL1) (MMU77039) kodierte, auf. Auf Aminosäure-Ebene wurde bislang keine Homologie ermittelt.

Klon 6/2.6

Nukleinsäuresequenz:

```
5'GGCACGAGCTGAATGAACACAGGCCAGGAGAAGCAAAAAGAGCAGTGCAAACAATTGCACAACCTAAATGAAAAAAT
AACTGCACGGGTGAGGAGAGGAGACGTTACAGCTGCCATAGAATGCAGTTTGGCAATTTCCGGAAAAAAGCCAAACC
AAGTACAATCAACCACATGACCCAGCAACTTGAAATCCCTCTCCCCACCTCCCAATCTGAGCTCCTTCCTGTGACAT
GCCCCAGGCACGTGCAGCCATCACCAAGGTTCTGGTGTATACAGTTGGTGTGCAATTGTGTTCAAGATACTTGTATATGCA
GTGGTGTGAAGTCATTGTGGAGACCTTGTATTGAGAATTGGTGTGCACTACTGGGACCCCTGTGTATATATACAGTG
GTGTGCAATCATGGCTGAGACTGTTTTTGTATACAGTGGTGTGTGTTAGGCTGCGCAGGTGCATGGGGCTAAAGCCAGGCT
CTACGCGCAGCGGACAGACATCAGCCTGGTTTGTGGCTTCTGATCTGGGCTCTGTAACACAGCTCCTTTCTGAACACC
GTGTGCTGGGGAGCGAACAGACGTCCTGCGTCTGCCTCCTGCCATCCGGCCTCGTGGTTTTGTTGTGTTTTGTGTTTTGTT
TCCCTTATTTCTAACTCTTTTGGCAGGCAGAACGAAAAACCAGGGAAGGAAAGTAACCAGATCCTGGATGTTGACAGG
AANACGGATNANACTGTTGCTCTAGGAAATGAAGGGGAAAAAACGN3'
```

Aminosäuresequenz:

```
GTS.MNTGQEKPKQCKQLHN.IEKINCTGEERRRYSCHRMQFGNFRKKSQTKYNQPHDPAT.NPSPPPPQS.APSCVHAPGTCSH
HQGSGVYSWCAIVFKILVYAVV.SHCGDLVFRIGVQSSLPCLCIYTVVNCNHG.DCFCIQWCVLGCAGAWG.SQALRAAAGHQPG
LFGF.SGLCKHSSFLNVTVCWGANRRPASASCPGLVLLCFVFPYF.LLLAGRTKNQGRKVNQILDVDRXTDXTVALGNEGEK
T
```

Aus keiner Datenbank konnten signifikante Homologien hergeleitet werden.

Klon 6/5.2

Nukleinsäuresequenz:

5'GAATTCGGCACGAGAGCGATTCCGTTGCCGGGTGTAAGGAAGGGTGACATGAGCTCCAGACACTCAAACCTGAAATCA
GGGTGACTTCTCTACGCTTCTCTCCCACTGGGCGCTGCTGGCAGCCACCAGCACAGAGGGGCTCCTCATCTTCTCCCTGG
ACGCCAGATGCTCTTTGACCCATTCGAGCTGGACACCAGTGTGACCCCTGGACGGATCCGGGAAGCCCTCCGACAGAGG
GAGTTTACCCGGGCCATCCTTATGGCCTTCCGCTCAATGAGAAAAAACTGGCCCAGGANGCCCTGGAGGCTGTACCACA
GAATGAGATTGANGTGGTCAGCGCTTCTCTGCCTGAGCTGTATGTGGTGAAAGTGCTAGAGTCTTAGCCGCCTCCTTGA
AGAGTCTCGGCACCTGGAATTCTACCTTATATGGACACAGAAGTACTGATGTCNCATGGACAGCGCCTGAATCCAAGGC
GGGACAGTTGCTGCCTGTGGTCCAGTTCCTCAGAAAAGGCCTCAGCGGCATCTAGATNACATTTCCAAGCTCTGTGACTG
GAACCGCTATAACATCCAGTACGCGCTGGCGGTTTCCAAGCAGAAGGGTATGAAAACGCACCTCNAACTGTTGACCCGAAG
AGGACCAGATGCTCTGATGAGGACATCTGCNCTACTCCAAGTCCAAGAAAGAAAANGGATCTGGTNTTAACCCCTAN
TCTACCNCTGGCTGATTGAAATGAACCCGCTGCTCTGGGCCAGAAATC3'

Aminosäuresequenz:

GTRAIPLPGVRKGDMSRRHFKPEIRVTSRFSPTGRCWAATSTEGLLIFSLDAQMLFDPFELDTSVTPGRIREALRQREFTRAILM
AFRLNEKKLAQXALEAVPQNEIXVVSASLPelyVVKVLEFLAASFESRHLFEFYLIWTQKLLMSHGRLNPRRSDSCLWSSSR
KASSGI*

Der Klon zeigt auf Nukleinsäuresebene 82 % Identität (324/392) zur mRNA des humanen periodischen Tryptophanproteins 2 (PWP2) (U56085). Die Aminosäuresequenz weist ebenfalls eine 83 %ige Homologie (129/155) zu dem periodischen Tryptophanprotein 2 (PWP2) des Menschen (Q15269) auf.

Klon 6/6.7

Nukleinsäuresequenz:

5'GGCACGAAGTCGAANCGGNTGCAGCTGGCGCCGCGTCTGCCCCGCGTGCCCGGAGCGGATTCTGCCGGCCGCCCCCGG
AGCCCTGCTGANCCGGTTATCGCTTCCCTGCTGTGACCGACCAGCGTTGCAGANCTAACAATGCCGTTTGGTTGTGTGAC
TCNNGGTGACAAGAAGAACTATNACCAGCCNTCGGAAGTGACTGACAGATATGATTTGGGACAAGTCGTCNAGACCGAG
GGANTTTTGTGAAATCTCCGGGCCAAGGACAAGACAACAGGCAAGCTGCATACCTGCAAGAAATCCCCAAACGTNATG
GCCGCNAGGTTTCNGAAAGCAGCCCNNAACNAAATGGAATCCTGAAGATGGTNAAGCACCCCNACATCCTGCAGCTGGT
ANATTTTTTGTNACCCCNNAANAATACTTCTGACTGGCCACCGGGAAGGANGTTTTNACTGGATCCTGGAC
CAAGGCTACTCNGAACGANACACCAACAACCTNGTNCNGCANGTCCCTTNAAGCTGTNGNCTACTTGCACCTCTCTCCA
NATTGTTCCAGGAACCTCCAGCTANAAAACCTATTTTTACNACCGGCTNNAGAATCCNANATTGTCTCNTGATTCNCTG
GCTAACTANAAAACGTCTTNTCNAGGAACCTGTNGNACCCCGAATNCTTGCNCCGAATTTTTTGACGCACGTATGGACTTC
TTTGATTNTTGGCCCTGGGTCTCATTNTCTGCTTTTCNGCACCCCTCTNTAAGAGTAAAAAAA3'

Aminosäuresequenz aus dem zweiten Leseraster abgeleitet:

ARSRXGCSWRRVCPACPERILPAAPGALLXRLSLPACDRPALQXLTMPFGCVTXGDKKNYXQPSEVTDYDLGQVXVTEGXL*
NLPQGQDNRQAAYLQEIPQTXWPXGSESSPXXNWNPEGDGAPXHPAAGXFFCXPXXILHLSGLATGKXVFXWILDQGYYS
RXTNNLVXXVLXAVXYLHSLXIVPRNLQLXNLFXPAXESXIVS*FXWLTXKRLXEPVXPRXLAPNFLTHVWTSlixGPGSHF
XCFXHPLXKSKK

Auf Nukleinsäureebene zeigt der Klon 88 % Homologie (521/586) zu dem „Vesikel-assoziierten Calmodulin-bindenden-Protein“ (L22557). Nach Translation der Nukleinsäuresequenz im zweiten Leseraster wird das entsprechende Protein mit einer Homologie von 45 % (69/151) identifiziert (I56543). Die Homologie setzt nach dem internen Methionin (Startmethionin - fett markiert) ein.

Klon 6/8.2

Nukleinsäuresequenz:

5'GGCACGAGCTCATTAGAGTGACATCGTCTTTAAACCCCGCTGGCAATCCTGACGCACCGCCGTGATGCCANGGAAG
ACANGGCGACCTGGAAGTCCAACACTTCTTAAGATCATCCAACCTTTGGATGACTACCCAAAATGCTTCTNTTGTGGGAG
CAGACAATGTGGGCTCCAAGCAGATGCAGCAGATCCGCATGTCCCTCCNCGGAAAGCTGTGGTGTGATGGGCAAGAAC
ACCATGATGCGCAAGGCCATCCNNGGCCNCTGGANAACAACCCCNCTTGGAGAAAAGTGTGCCTCACATCCGGGGGAA
CGTGGGCTTTGTNTTACCNAGGAGGACCTCACGANATTAGGACATGCTGCTGGCCAATAAGGTGCCAGCTGTGCC
CGAGCCGGTGCCATNCCCCCTGTTAGGTCTCAGTACCTGCTCANAACACCCGCTGTTGGGGCCCCAAAAACCTCTTCTT
CCANCTTTGGGCATNCCACTAAAATCTCCNCANGTTCATTGAAATCCTCGANCGATGTTCANCTGATAAANAACCTGGAN
ACAANGTGGGAGCCNCGAACCCNCTGCTGAACATGTTAAATCTCCCTTCTCCTTCCGGCTGATCNTCCNANGTGT
TTNAANATTGCNNCATCTNCCCAAGTTCTGGACATCCANAACAGGCCTGCNCTCCCTTCTANAAGGTNTCTCCATNT
TGCCNCTCTGTCTCNATTGCTACCAATGTTNCTNCTCCTCTCATGGATAAAAGTTCTGCTT3'

Aminosäuresequenz:

GTSSLE*HRL*TPRGNP*RTAVMPXEDXATWKSNYFLKIIQLDDYPKCFXVGDNVGSKQMQQIRMSLXGKAVVLMGKNTM
MRKAIXGXLXNPNXLEKLLPHIRGNVGFVFTXEDLTXIRDMLLANKVPAAAPSRCHXPFRSQYLLXTPVWGPCKPLSSXLWA
SPLKSPXVPLKSSXDVLIXTGXXVGAXEPPAEHV*ISPFSLRLLXXXVFXXCXIXXPSSGHPXQACXSLXGXSXLPPLSPIATNV
XXXPLMDKRF

Der Klon weist 92 % Homologie (592/640) zu dem ribosomalen Phosphoprotein P0 auf (X15096).

Auch auf Aminosäureebene wird eine Homologie von 58 % (119/202) zu dem entsprechenden Protein gezeigt, wobei in der Aminosäuresequenz zwei Stopkodons vor der homologen Region auftreten (P19945).

Klon 7/3.3

Nukleinsäuresequenz:

5'GGCACGAGCAGCCGCGGATCACGGTCGCTAGTGCCTAGCAGAAGCGAAGGCGGAGATGGAGACCACGCTGTCGCGA
TCCCAGAACTGCTGAGCCACTGCTGTCCCTGACCCGCTCACACTTCTTTGCAAAAGCAAATTTGGAAGCAGTTGCTTGA
AGACAGTTGGTGTAGCGTCCAGAGAGTCAACGTCGGCACAATGAAGCACTTCTGAGGATGTTGATCCAGGTGTGCTTCT
ATTTCTACTGTAAATTTTGTGGCGTGCATGAAGTTGTGATGCGTAAGCTCACGGGAAGGTGTGAGCTGCAAAGGATTT
GCTACGGCACAAAACCGGAGCTTCCAGAACCATGAAAAATTGAAACGTCACCTGAGAGATTCAAAAAGCAAGCTGTTGCAG
ACATCAGTGAGTGTTCATCTGATGCTATCGAAAAGACTATTGATGACATCATGGAATTGAAAAAATTAACCCTGACATC
AATCCACAGTTGGGAATCTCTCCAGGCTTGCTTCTGCAAAATTGTTGGTTACAGAAAACCTATTGCAGATGTGGAAAAA
CTGCGCAGANAACCTACGATTCGACAACCCCAACATGAANAATGCTTCTGAANCTATGGGATTCCTGAAGCCCAACAC
TCCACTGGANTC3'

Aminosäuresequenz:

GTSSRGDHR.CVAEAKAEMETTLRSQNC.AHCCP.PAHTSFAKANLEAVA.RQLV.RPESQRRHNEALPEDVDPGVPLFLL.IFV
ALHEVCDA.AHGKV.AAKDLLRHQTRSFQNHEN.NVTERFKKQAVADISECSS.CYRKDYHHGIEKN.P.HQSTVGNLSPGLPSAN
CGLQKPHRCRCGKTAQXTYDSNPNXHEXCF.XYGIPEAQHSTGX

Auf cDNA-Ebene wurde keine signifikante Homologie identifiziert. NS 422-450 zeigten 93 % Identität zur mRNA des "Cystischen Fibrose Rezeptors (CFTR)" von *Squalus acanthias* (M83785). Aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz wurde in keinem Leseraster eine homologe Sequenz identifiziert.

Klon 7/6.4

Nukleinsäuresequenz:

5'GGCACGAGCCCGTACGGACCCTCTGCCTCTCACAATAGGTTTGTCTGGACTGCAAAGACAAAGAGCCGGACGTGCTGT
TTGTGGGAGACTCCATGGTACAGTTGATGCAGCAGTACGAGATATGGCGGGAGCTGTTTTCCCACTTCATGCTCTTAATT
TTGGAATTGGGGGAGACACAACACGACATGTTTTATGGAGACTAAAGAACGGAGAGCTGGAGAACATTAAGCCTAAGGT
CATTGTTGTCTGGGTANGAACAAACAACCATGAAAATACAGCAGAAAAAATATCANGTGAATTGAGGCTATCGTACAGC
TTATAAACACGAGGCAGCCACAGGCCAAGATCATTGTACTGGGTCTGTTACCTCGAGGTGAGAAGCCCAACCCTTAAGA
CAAAAGAATGCCAAGGTGAACCAGCTTCTCAAGGTTTCCCTGCCGAAGCTTGCCAATGTGCAGCTCCTGGATATAGATGG
GGGCTTCTGACTCGGACGGTGCCATCTCCTGCCACGACATGTTTATTCTTTCATCTCACANGAGGGGGCTATGCAA
GATCTGCAAACCCCTCCATGAACTGATCATGCATTGCTGGAGGAAACCCCAAGAGAACAGACCACNTTGCTTGACTGGCC
NTCAGTGTTTACAGCATCCNCTTCTCNGATCNGTTANACACTGGCCTACAGAATCCTTCTTAGGCCTTTGCTTGTACATGT
TCTGATCTGTTTTTTAAGGGGAGAGGGATTAATTGTNC3'

Aminosäuresequenz:

GTSPYGPSASHNRFVLDCKDKPDVLFVGDMSVQLMQQYEIWRELFSPHLALNFGIGDTRHVLWRLKNGELENIKPKVIVV
WVGTNNHENTAEVAGGIEAIVQLINTRQPQAKIIVLGLLPRGEKPNPLRQKNAKVNQLLKVSLPKLANVQLLDIDGGFVHSDG
AISHDMDFDLHLTGGGYAKICKPLHELMQLLEETPEEKQTIA*

Die cDNA wies 98 % Homologie (571/578) zu der α -Untereinheit (30kDa UE, α 2UE) der Platelet-activating-factor Acetylhydrolase, Isoform 1b der Ratte auf (AF016048.1). Auch auf Aminosäureebene wurde im ersten Leseraster eine Homologie von 99 % (204/202) zu dem entsprechenden Genprodukt der Ratte (2501859 (AF016048)) ermittelt.

Klon 9/7.4

Nukleinsäuresequenz:

5'GGCACGAGCGAAGGTCCCCGTGCCGGAGAGAAGGGGCCCCAGGAGGAGGAGCCAGTGAAGAAGCGAGGCTGGCCCAA
AGGCAAGAAAAGAAAAGAAGATTCTCCCAATGGGCCCAAGGCCCGGTACGGGCTATGTTTCGCTTCTGAACGAGAGGC
GGGAGCAGATTTCACCCGACATCCGGACCTTCCCTTCCCGGAGATCACCAAGATGTTGGGCGGGAGTGGAGCAAGCTG
CAGCCAGCAGAGAAGCAGCGGTACCTGGATGAGGCAGAGAAGGAGAAAACAGCAGTACTTGAAGGAGCTGTGGGCATACC
AGCAGTCAGAGGCTACAAGGTCTGCACCGAGAAGATCCAAGAAAAAAAATAAAAAAAGAGGACTCCAGCTCTGGGCT
CATGAACACCTCCTGAATGGACACAAGGGTGTGGACTGCGGCGATGGCTTTTCAACCTTGTATGTTCCCATCTCACTGA
AGANTTTTTGGACAAAACAAAGCACGCGANGCAGACTGCGGCGCTGCGGAAGATGAACGTGGCTTTCGAAGANCAGA
ACGCAGTGTGCAGCGCCACACTCAGANCATGAACAGCGCTCGTGAACCTTGGANCAANACTGGCGCTGGAGGAACGCC
ACGCTNCGCTGCACAGCAACTGCAGGCTGTGAGACAGCGCTCNCGGCTATTTNCCTCTGCGGTCGCGCACCAGGGG
AAACCCNACCTCGGAACCTGGACTTCTACTGGCGGCTTNCGGANCTCCAC3'

Aminosäuresequenz:

GTSEGPRAGEKGPQEEPEVKKRGWPKGKKRKKILPNGPKAPVTGYVRFNLERREQIRTRHPDLFPEITKMLGAEWSKLQPAEK
QRYLDEAEKEKQYKELWAYQQSEAYKVCTEKIQENKIKKEDSSGLMNTLLNGHKGVDCGDFSTFDVPIFTEXFLDQNK
RXADCACGR*TWLSKXRTQCCSATLRX*TALVNSGXXLLEERHAXAAQLQAVRQRSRLFXSLXPAPGPKXLGTWTSTG
ALXGXS

Die cDNA zeigt eine 94 %-ige Homologie (194/206) zu dem Gen, das für das Matrix-assoziierte Smarce1-
verwandte Protein (Smarce1) der Maus kodiert (AF067430). Auch auf Aminosäureebene verfügt der Klon
eine Homologie zu dem Smarce1-verwandten Protein der Maus (AAD15897). Die sich nur über 10 AS
(Aminosäure 150-AS 168) erstreckende Homologie beträgt 89 %. Weiterhin zeigt die Aminosäuresequenz zu
einem Sox-ähnlichen Transkriptionsfaktor des Menschen eine 89 %-ige Homologie (90/101) (AF072836).

Klon12/2.4

Nukleinsäuresequenz:

5'CGCACGANGGTTAACAAAGGCTGCATTTNCGCACACTTTTTATATCNGGACATTCNNTGTGTGAGATTTTCCACCNTTCT
GTCACTTGGTACGTTTANATACTTGGTGAGTGGGAAACCNTTCTCAGCAGCTCAGAAAATNAAATGCAAGCCCCAGTT
CNAGTTTTGTAAAATGAATGGAGCCNTGAATAAGAAAAGAAACAGCATATTCTCNACAAGATTAGGGTGGTGACATTTAA
GAATTAATATTGCTGTTAGAAATTATTATTAACATAAAAAGTNTGCNTGTNGATANTTATATAATTGTATATATACTTATCT
ACATACATGGTTGATTTTATTATCTTTTNCNTCTTTATNATTAGAGCCTTACNATAAAATTTATTTAGTTATTAACA
CTAAGTTTTTTANGAAAAAGAAGCAAATGTTTTATGTCCNTCTGTTAAAAATTANTATTTCTCCNCCCTCCCTACAGAAA
CACTCNTATTCTATATATCTTGGCCCTTTACCAAAAAACAACCCNAATNATGAAAGGTTTNTCCNGAACCATTACT
TNNTGTTTTTTTNTCCNAACTGATATAACTCTNAATTTTGAAAAATTTGTTNATTGCCCTCGCTTTTNTANATTAAGGA
AGAAATCTTNTTATTCTCTCGAAAATAATTCNCCNATAATTCNCTNCTTNNACTANTTTCNCCNCCCGTTTCTNN
CATATCTTNAACCTCCTGAACCNTGAATTTTAANCTGGAN3'

Aminosäuresequenz:

RTXVNGKCSIAHFLYXDIP*DFSTXLSLGTFFXYLVSGKPFSSSRKXNASPSSSFVK*MEP*IRKETAYSXQD*GGDI*ELILLEL
LLT*KXACXXLYNCIYIHYIHG*FYFLFXLYX*SLTINFILVIKTLSTFFXKKKQMFYVXLLKIXISPLPETLXFYISWPLYQKTT
XXMKGFXPXTITLXFFXSXTDITLNFENLXIALAFXXLKEEIXXILSKIIXX*FXXPXTXFXXXRFXHIFXPS*TXNFXLG

Beide Sequenzen weisen keine Homologie zu Eintragungen in den Datenbanken auf.

Klon 12/4.3

Nukleinsäuresequenz:

5' CNGGCACCNAAAAAACATTGGGCGGGGGTCCCGGTGGGGCCNAACAACCCGAACACCCGGTGGGGTGGAAAACTTTG
GAATGGAATGGGGGCACCTTTGAAACAACTCCCTGGGGGGTTTCCTCCCGGGTTTCCAAAGCCCGAACGTTGTTNCTTT
CCCCACCGAACTGGAATAANTTTCCCATTTTTTGGTTGGGGGCACCATTTNAAAAGGGTGGGCATTGAAAAACCCAAAG
GGCCNAAGAAAANGGTTTTAAANTTGAATTGGGGGCCATCCNNTAANAATCTTCCAAACCCCCCAAAAAAGTTTTTTGG
CCACTCCCCGCCTTTGGAACCTTNGTTGGGGTGGAACTCCCTCGAAAAAAATCCCTCCCTTGGCCCCGAATNTTTN
GGCCGAATTTGGAAACCTTCCCAAAAAGNCCTGTGTTGTTTCCNNCCGGGGAACNCCGGGGCCANGCCTTCCCNCCC
CCNAAAAAAATCCCTTGGTTTTTAATTCNNGNGGAANAAAAAAGNAANGGGCCGAAAAANAAAACCAANTTCCC
NNCCAAATCCCCCTTAACCTTTTTCCCGGTTTCCATTCCCGGGGAACCCAAANCCCGTTTTCCAGGGGTTT
GGGAAAAAATTCCTCGTTTTCCNGAAAAACAACCCCTTCCNCCTTCCCNAAAAATTTGTTTTTGTGGGAATTGGG
GAACAACCCACCTCTTTTTGAATTTTTTAACCCCATCCNTTATCCCNAAAACCNTTTTATCTTTGCCCAAT
TTTGAACACCCCTTNNAAAAGAAATTTTCANTTGGGGGGAANCTTCCCNAAATCTACCCNAAAATTTTGGGCTTGAA
TTTTTTTTTACCCTTCTTTTTTGGCCAANTNCCAATTCCAATTCNNGGTTTTCCCCANTTCTTNCACCN
TTCTTNCCTTTAACTTATCTTTNAAAAAAAATTTTTCCCTTNNCCCAAAAACCTGGGANNAACTTTTTNNNNNAA
AAAACCNNNNNNCCNNGGNGNAATTTCCCTTGCCTCTTTTTCCNTTNCNTTTTTAAATTTCCNAAAACNA
ACAACCTTCTCTTTTTGTTTTTNCCTCCNAAAAAACCNAANCNTCCCAAAAAAACCCTCCCAANCCCTTNC
CCAAAAACAATTTTTACCTTTTTTNCCTGGAAATTTTTTTNCCAACCTNAACCTNNATNGATTTTTCCC3'

Aminosäuresequenz:

XAPKKHWAGVPGPNKPNTRWGGKLNWNGMGAPLKQTPGLGGFLPGFQSPNVVXFPHRTGIXFPIFWLGPFXKGWALKNPRA
XEXGF.XELGAIX.XSSKPPKSFPGPLP.AFGTLVGVELPRKKFSPWPRIXGRILETFPKXPCLFSXRGTPGXPXPXKPLPLGF.
FXEXKKXXAEKXNXQXPNSPL.PFSPVFHSPRGTXPVPFVWGKNFLVFXKTFPFPFPXNLFVWELGNXPFPFLNFF.PH
SXSPKTXLFAAQF.TPPXKEFSXGGEXSPXFYPTFGL.IFFXTPPXPFFCPXXQFQXGFPPXLXTLXLXLLTYSXKKKIFPXXPKT
WXXLF

Dieser Klon weist keine Homologien zu bekannten Sequenzen der Datenbanken auf.

Klon12/8.8

Nukleinsäuresequenz:

5'GGCACGAGAGGAGGTGAAACACATGAACTCTGCTGGAGTCTGGCTGCACTGCGGAATTATGAGTACTATGCAAGCCG
CGTACCAGAGTCTGTCAAAAGTCACTCATCCCTGAAGGGGTCTCACTTACTTACCAGGGGCCTCGGTTCAAAGTAACA
TATCTTAGAACTGATTAACCTGATTGAACAATTAGAATCCACTGCAATTCATTGATCAATGATTTATTAGTAGGTAGG
GATAGAAGATGGAATTAAGAATTGCTTAGGTATATAACACAATTGTCATTTCTCTGCCTAAAAAATAAATAGC
CAAGTGGTAGCACTTATGACAGTCATGGCCATTCCAGTGGCTGAGCTAGGAGGGTTGCTTGAGCCAGGGCCCGANACT
AGCCTCTTACATAGCAAGACATAGCCNNAACAAAGAAGAAAAAACAATAAAGGAATTTACACTTGATCTTAGCCAA
AAGCCNANAAGCGATCAAAAAAGGAATTTAGTTTTACCAATTAGCTAACTAAACCTGTTTGTGTGATGTTGTTG
TTGGTTTTTTGAAACAAGGTTTCTCTGTGCAATCCTGGCTGTACTGAAATTTACTTANTAANAACCTGGCCTTNAACCTN
NTNATTC3'

Aminosäuresequenz:

REEVKHMNSAGVLAALRNYEYYASRVESVKSALIP*RGLTYLPRGLGSK*HILELIN*LNN*NSTCIHH*SMIY**VGIEDGIKEL
S*VYNTIVISPA*KKK*PSGSTYDSHGHS*ARRVA*AQGPXTSLHLIARHSPXTKKKNKGIYT*S*PKGXXAIKGI*FYQLA
N*TCFVVDVVVWFETRFLCAILAVLKFTX*

Diese Nukleinsäuresequenz ist 100 % (294/294) zu einer 3'(2'),5'-Bisphosphat-Nucleotidase der Ratte (AJ000347.1) homolog. Nach Translation im zweiten Leseraster zeigte der Klon eine 97 %ige Homologie (34/35) auf Aminosäureebene zu dem entsprechenden Protein (CAA04022.1).

Klon13/6.4

Nukleinsäuresequenz:

5'GGCACGAGATTTCGATGTTGTGCTTCCCACTCAAATGAATTTGCTAGCTCTATTCTTTTTGGAAGCTCCCCATGTTGAAC
TCAGTCCCTGCCCTTTTCACTCCACCAAAAAATGAGGTCACTAGACAGTCTATGGTGCTAGAAACCCACCATGGCTAGTG
ACCTAGACTCCATACTCCGAGCTTGCCCAAGACCACACCTAGATCGTGGGACCGTGTGCCCATGTGAACCTCCAC
ATTTCTGCTCATAATCTGCTTCCCTGCCTAGAAACCACAAAGCCAGGCTAAGGAAATCCACCAGTCTAGCACTGACCTC
TGCTTCTCGTGGAGTGTGTGCTTCACTCGTGTGGGTTTTAGAAAGAGATGAATGGGAAGACAGAGCTGTGCTCAATGAG
GGTAGAAGGGCGAGGCTGAACCTTCAATGGGCCGAACACAAACACAAAGCTAGAGGGTTCGAGCGGCCATGACGTTNTT
CTTCATGAAGTGGGCTTCTTCTTGTTCGGTTATTTTGTGGAATGACTTAATCAACATGTCCATGGCTTATCTGTGGG
TGCCATGGGTGACGATGTTTCGTTTTAAGCTTTTGCCTGTATTACAAGCACATNATNCTACTAAATTTTTCCCTT3'

Aminosäuresequenz:

GTRFDVSSHSNEFASSILLEAPPC*TQSLPFSFHPKMRSVDSLWC*KPTIA**PR*LHTLRAWPRPHLDGRGDRVPM*TSTFLCS*S
ASCLETTKPG*GNPPVLALTSARGVCSLVFGF*KEMNGKTELCSMRVEGRG*TSNGPNTNTKLEGGSSGHDVXLHEVGFLLLL
RLF*WNDLINMSMAYLWVPWVTMFVLSFCFLYYKHXXLLNIFPFGGXX

Die cDNA dieses Klon ist zu 85 % (426/500) dem Gen, das für das SCG10 Protein der Maus (L20263) kodierte, homolog. Auf Aminosäureebene werden jedoch in keinem Leseraster homologe Proteine identifiziert.

Klon14/2.6

Nukleinsäuresequenz :

5'GGCNCGAGTCAACCTAACCTAGGCATACTATTTATCTAGCCACATCAAGTCTTTCAGTCTACTCCATTCTATGATCAG
GATGAGCATCAAATTCAAAATACTCCCTATTCGGAGCCCTACGAGCCGTTGCCCAAACCATCTCTTACGAAAGTCACAATAG
CCATTATCCTCTTATCCGTCCTCCTAATAAGCGGCTCCTTCTCCCTACAAATACTTATCACTACACAAGAACATATCTGACT
ATTAATCCCCGCCTGACCAATAGCCATAATATGATACATTTCAACCCTAGCAGAAACAAATCGAGCTCCCTTCGACTTAAC
AGAAGGAGAATCAGAATTAGTCTCAGGCTTTAACGTCGAATACGCCGAGGACCATTCCGCTTATTCTCATAGCCGAGT
ACACCAACATTATTCTAATAAAACGCCCTAACATCAATTGTATCTAGGCCCTTATATCATATCAATTACCCTGAATTATA
CTCAACCAGCTTCATAACAGAAACACTACTTCTATCCACAACCTTCTATGAATCCGAGCATCCTACCCCGTTTTTCGATAT
GACCAACTAATGCACCTCCTATGAAAAAATTTCTCCCACTAACACTAGCATTCTGCATATGATACATTTCCCTGCCAATT
TCCTAGCAGGGAATCCACCTACACATAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAGCCCGGTCGACTCTAGAGCCTATAGTGA
GTCGTATTACTGCANANATCTATGAATCGTAAATCTGAAAAACCCGCAAGTTCCTTCACTGTGCTCGTGCACATCTCATT
CTT3'

Aminosäuresequenz:

GXSQPQRHTIYSSHIKSFSLHSMIRMSIKFKILPIRSPTRCPNHLRSHNSHYPLIRPPNKRLLLPTNTYHYTRTYLTINPRLTNS
HNMIHFNPSRNKSSSLRLNRRRIRISLRL.RRIRRRRTIRPILHSRVHQHYSNKRPNINCIPRPLISYQLP.IILNQLHNRNTTSIHNFPNM
PSILPPFSI.PTNAPPMKKFPPTNTSILHMIHFANFSPREFLHIKKKKKNSSPGRL.SL.VVLLXXSMNRKSEKPASSFTVLVHISFL

Dieser Klon kodiert für die mitochondriale NADH-Dehydrogenase der Ratte (M35826). Mit 652 identischen Aminosäuren von 663 Aminosäuren verfügt dieser Klon 98 %ige Homologie zu dem Gen. Die Aminosäuresequenz zeigt keine Homologie zu bekannten Sequenzen der Datenbanken.

Klon14/3.7

Nukleinsäuresequenz:

5'GGCCCCAGTCAATATGGCCCGCTCCGTGGATCTGGAGTTGAAAAAGGCCCTTCACAGAGCTTCAAGCCAAAGTTATTGAT
ACTCAACAGAAAGTTGAAGCTTGCAGACATACAGATTGAACAGCTAAACAGGACAAAAAAGCACGACACCTTACGGACA
CGGAGATCATGACACTGGTGGATGAGACTAACATGTATGAAGGTGTAGGAAGAATGTTTATTCTACAGTCCAAGGAAGTA
ATTCACAACCAGCTGTTAGAAAAACAGAAAATAGCAGAAGAAAAAATTAAGAGCTGGAGCANAAAAAGTCTACCTGG
AACGGAGTGTAAAGGAAGCTGAANACAACATCCGAGAAATGCTGATGGCTCGAAGGGCACAGTANGAGCTGCTGGGAAA
GTTCTTCTTTCTGATCCCTCTCATCCTGTGTCAAGACAGGGGTTGTGAGGGCACTGCCCTCCCTCTGCCCTGTGGCCCA
TCTCTGTACACCTGAGGCCCTCAGGTCCCAACTGAATGTCTGCCAACCACTGCCANGACCTCTTCTTCTGGGGCAA
GCCAGGANCTCTCAACAGANGGAAGAAATGGAAGGCANAAGGAAAAAAGTCCCAAGCCTGTCTAAGCATGTTGGTTAN
ACCANGTTANACCATTAATAAACTATGTCCCTCTATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCAACCCGGTCACTCTANAACCTAT
ANTGATCTTTTACTGCNANTCTATGAATCGTANATNTGNAACCCNAGTTCCTTCACTGTGCTCNTGCNCAACTCAT
TCT3'

Translation im zweiten Leseraster:

APVNMAASVDLELKKAFTELQAKVIDTQQKVKLADIQEQLNRTKKHAHLTDTEIMTLVDETNMYEGVGRMFILQSKVEIHNQ
LLEKQKIAEEKIKELEKXSYLERSVKEAEXNIREMLMARRAQXELGKFFLSDPSHPVSRQGLCRALPSLCPVAPSLCHPEALQ
VPTECLPTTAXDLFFPGASQXLSTXGRNGRXKEKLPQPVLSMLVXPXXTIKNYVPL.KKKKKKPTRSLXNLX.SFTAXSMNRXX
KKXPVPSTVLXXNSF

Dieser Klon kodiert für die Untereinheit 1 des Chaperons Prefoldin und weist 91 % Homologie (223/243) zur mRNA des menschlichen Gens auf (emb|Y17392|). Dieser Klon verfügt über ein internes Startkodon. Die Translation des Klon in dem ersten Leseraster ergibt eine Aminosäuresequenz, die keine Homologie zu einem bekannten Protein besitzt, während die Translation im zweiten Leseraster eine Homologie von 72 % (74/102) zu der Prefoldin-Untereinheit C1D7.01 identifiziert (PD062044).

Klon16/3.8

Nukleinsäuresequenz:

5'GGCACGAGAAAACCTGAACCAATGTCACCTCTACAGCTTTCTAGTGAGCCTATTAAGCTTATCACTCCTATGACAAAA
TGACGAAAATTACCTAAAATTTCTCAGTTATATTCTCCTCCGATCCATTATCCACCCCACTAATCATTCTAACAACCTGGCTC
CTCCCACTAATAATGCTCGCTAGCCAAAATCACATAAAAAAAGAAAATATAATGCATCAAAAACTTTACATCTCAATACT
ATTAGCCTCCAAATTTACTCATCATAACATTCTCCGCAACAGAACTAATTTATTTATATCCTGTTCGAAGCCACTCTAA
TCCCAACTAATTATCATTACACGATGAGGCNACAAAACAGAACGCTTAAATGCAGGAATTTATTTCTGTTTTATACAC
TAATTGGCTCCATCCCCTTAATTGCCCTCATTCAATCCAAAACCTCAATAGGAACACTCAACTTCTAATCCTCTCCCT
CACAACACACCCCTACCCTCAACATGATCCAACACCATTCTATGACTAGCATGTATAATAGCATTTATAATCAAAAATACC
ATTATACGGAGTCNATCTATGATTACAAAAGCCCCGTGGAAGCTCCAATTGCAGNTCTATAATTTAGCAGCAATTCCTC
TAAAGCTAGGGGGTGTGGGATATACGANTTTCTCCTACTTAGAACCCCTAACAAAATCTTTAGCCTACCATTCTCTCTCT
CTTATGAGGNGAATTATACTAGCTCCTATCTGCTCC3'

Aminosäuresequenz:

GTRKPEPMSPTAF**AY*AYHSYDKMTKIT*ISQLYSPPIHYPPH*SF*QLGSSH**CSLAKIT*KKKI*CIKNFTSQYLLASKFYSS*
HSPQQN*FYFISCSKPL*SQH*LSLHDEATKQNA*MQEFISCFIH*LAPSHS*LPSFQSKTQ*EHSTS*SSPSQHTPYPHDPTPFYD*
HV**HL*SKYHYTESIYDYQKPRGSSNCXSIIILAAILLKLGCGGIYXPHSRTLTKSLAYHSLLSYEXNYTSSICS

Der Klon zeigt auf Nukleinsäureebene 96 % (693/715) Homologie zu der sechsten Untereinheit der mitochondrialen Cytochrom Oxidase der Ratte (J01435). Auf Aminosäureebene wurde keine Homologie identifiziert.

Klon16/8.8

Nukleinsäuresequenz:

5'GGCACGAGCCAGCCGAACATATCCCCTGCGGCGCCAGCGCGGGGGCGGCTCCGGGGCGCCCCAGCAGACCCCATCATG
GGCAGCCAGAGCTCCAAGGCTCCCCGGGGCGACGTGACCGCCGAGGAGGCAGCGGGCGCTCCCGCGCAAGGCCAACG
GACAGGAGAATGGCCACGTGAAAAGCAATGGAGACTTAACCCCCAAGGGTGAAGGGGAGTCACCACCCGTGAACGGAGC
AGATGAGGCAGCTGGGGCTACTGGTATGCCATCGAGCCAGCGCCCCCTAGCCAGGAAGCTGAGGCCAAGGGGGAGGTC
GCCCCAAGGAGACCCCAAGAAGAAGAAGAAATTTCTTTTCAAGAAGCCTTTCAAATTGAGTGGCCTGTCTTCAAGAG
AAATCGGAAGGAGGGTGGGGGTGATTCTCAGCCTCTCACCAACAGAGGAAGAGCAAGAGCAGGGGGAAATCAGCGCC
TGCACTGATGAGGGCACTGCCAAGAAGGGAAAGGCTGCTGCCACCCCTGAGAGCCAAGAGCCCCAGGCCAAGGGGGCAG
AGCCAGTGTCTCTCAAGGGAGGAGACGCGGAAGAAGAGGCAGGGCCCCAGGCTGCAGAGCCATCCACTCCCTCGGG
CCCAGAGAGTGGCCCCGATCTGCCAGTGTGAGAAATGAGTAGCTGGGCGGGGCTGGTGGGTGATCTCTAAGCTGCAAAA
AACTGTGTCTCCTTGTGAGGTCACCATCTGGACCTTGTGCCCTGGCTGCCTTCTGTGCCAGAAAGGAAGGGGCTTGT
GCCCCGTCCCAGCCACGCTCCCTCTTCTCCCTCCTGTGGATTCTCCCATCAGCCATTTGGTCTTACTATTAGGCCAGTTGAA
NATGGTCCCTTACGGTTCCCAAGTTAGGTTAGTGATGTGAAATGCTCCTGCCTCTCTCCTTCCAAGCCCCATCCCCGTGA
AGGCAACTGCTGGGTTTCCAATTCTTTTCCAAGTTCGTTTTGTTTATCCTGTCTCAAGCCCTGAGCCAGAAGTGGGGCT
TACACTCCAAACCCCGAGCGTCCAGCCTTCCCTTGNATGAATTCTTAGTCTCTTGTGCTGTGCCCTGTGGCACCTGGGCTG
GGGAGGGCATTGCCCTGTCTGGGTTTTATAAATGNCTTACTCAAGTTCAAACCTCCAGCTTGNAAATCACCCNGTCT
CTGACTTGATAAGCAAGTATTANGCTTCAGGCGGAGGT3'

Aminosäuresequenz:

GTSPAELSPAAPARGGSGRPQQTPIMSGSSKAPRGDVTAEAAAGASPAKANGQENGHVKSNGDLTPKGESESPPVNGADEAA
GATGDAIEPAPPSQEAIEAKGEVAPKETPKKKKKFSFKPFKLSGLSFKRNRKEGGDSSASSPTEEEQEQGEISACSDGTAQEG
KAAATPESQEPQAKGAEASAVSKGGDAEEEAEPQAAEPSTPSGPESGPASASAENE.LGGGWWVISKLQKLCPCCEVTIWTLC
GCLPVPRKEGACCPVATPLPLPPVDSPIHLVLLGLXMPVYGSQVRLVM.NAPASLLPKPHPR.RQLLGFQFFSKFVLFILLK
PLSQKWGLHSQTPSVQPFYX.ILSLLCCALWHLGWGGHCPLGFYKXLTQVQTSSLXNHPXL.LDKQVLXFRRR

Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz sind identisch mit MacMARCKS der Maus (P35566)]. Beide Sequenzen wiesen 96 % Identität (483 NS/499 NS bzw. 188 AS/196 AS) zu speziessverwandten Sequenzen auf.

Klon 17/8.2

Nukleinsäuresequenz:

5'GGCACGAGAGTCAAGGTTTCATCTANTANGCCGGGAAAGGAANCCAGCACAGCCCCAGCTAAGANAAAGCCAATCCA
GCAGAAAAGCGANGCTGGNCTGCCAGCCAGCCTGCCTGCCTGCCTGCCTGCCTGGCTGTCTCTAGTGTCTGCCCTG
GAAACCTGCTCTCTCCGTCCTTTTATGGAATGGGAGACTGCCCTAGAAACCATCTTTACCCACAGTTCAGTCTCTTGATGC
GTCTTAGCCAAGATGTTTACTAAGGTACAGAGAGTTGTGGTATCACCCCTCAAGGANGCCTTGTGGGATGGGAACAAAC
ATTGCAGAGACCAAAGCCTGTGAGACTGGCCTAGTCTCTTTCCAGTTCCTGTGGTTATCTCATACTTCAGTTATCTGTC
CTGGTGTCCCTGACCTTGACCATTTAATTTTAAACCCTCANGACTTGAAGCACACTGGCCAGTCTGTGTANAANTGTGCT
GTGCTGTCTTCTGAACTAACCCACACACTCCGCTCTGTTTGTTCANGAACTTCATTGTTACGGGCTTACAGGACATAGATA
AATGCAGACAGCAGCTACATGATATCACGGTGCCTCTGGAAGTTTGAATACTTGATCAAGGTCGAAATCCCACTCTACAC
CAAAAAATGCTGGAGAAAGNTCTTGCTAAAAACAACAATTCAGGGGAAGATCACCCATGAANAATTTAAAGCTATGATTC
CGACTTCTAANTNTCCCAAAANTGGCCATC3'

Aminosäuresequenz:

GTRVKVHLXXRGKEXSTAPAKXKPIQKXGAGLPASLPACLPACLAVSSVCPWKPALSVPFMEWETALETIFTHSSVS.CVLAKE
MFTKVQRVVVSPKXGLVGEQTLQRPKPAETGLVLFSSSCGYLILQSLVLSLTLTILILTLXT.STLASPVXXCAVLSSELTHS
ALFVSNFIVTGLQDIDKCRQLHDITVPLEVNT.SRSKSHSTPKNAGEGSC.KQQFRGRSPMXNLK.FRLXXPKXGH

Der Klon weist weder auf Aminosäure- noch auf Nukleinsäureebene eine signifikante Homologie zu Sequenzen aus den Datenbanken auf.

Klon 18/8.8

Nukleinsäuresequenz:

5'GGCNCGAGTTGTTCTNCCCTGTGCACTCCGCNAGATGCANCTGNNACCGATGGAGATTAANCCCGAGATGCTGAACA
AAGTGTGGCCNAGCTGGGGGTCGCCGGGCGTGGCGCTTTGCCGACGTGCTNCGGCTGGAGGAGATACTCTGGGCTCA
NTGCCNTNCTGCCNCGCCCTGCTGTGCTGTTTCCCTCTCGGCCATGCNTGATAACTTCAGGAANANCAANTTGA
TGGAACTGACGGGACCNGAAGTNACCCCTNATACTTCNCTTCNTGANGCNCACNNCGGAACTCCTGTGGTANCCATT
GGGCTCGATCCCNCGTTTGGTCCNATCCCCACACNNCNTTGGNNTCGAGGATNGATCCNCCCTNATACCCTNTCTGTC
NGAAACGGATCNCNTTNTCCCNCTGAANACNTACCCTCACTNTTCCNAGNNGACCATGCCCTTNNNNGNANCCCATNA
CTCCNTTGGCCCTCCCNIGGNCNTTGGCCGGTCTNACCACNCCTTNTTTTCCCCCTNCCCNCTTTCTATACTCTGGNCC
GCTCCCNCTNACNCCCTNCCCGCCATTCTCTNCCCGGTNCCCTNCGCCCTCCTCAGNGNCTCTCTGCTGCTT
GGLTTCNCCNCGTCTCCCACTTCTCTTCCCNNNNCCCGGTNANGTCTNNTCCTCCNCTTNNCCNNTTTTCCGTTTTAT
TCTGGCGTTACTCCNCCCTTNTCCTCCCTNCCACTTCCCTCTCCCTTCNTCNGCTCCCCNTCCCTTTTNC3'

Aminosäuresequenz:

Translation im dritten Leseraster:

XELFXPVHSAXMXLXPMEIXPEMLNKVLAXLGVAGXWRFADVLRLEEDTLGSXPXAXALLLFLPSAHA**LQEXXX*WN*R
DXKXPLILFXFXTXAELLWXPLGSIPXLVXFPTXXWXSXDPLIPXLETDXFXPXXTYPHFXFDHALXXXPXTPLALPW
LPLTXXFXFLPXFLYSGPPPTXXPPFPLPRXPLALXLSLDFXXRPLSFPXXPVXSXPLXPFFRIFILALLXPXXPHFP
LPSSAPPSLF

Die Nukleinsäuresequenz weist 88 %ige Homologie (218/247) zu der cDNA der Ubiquitin-Carboxyl-Terminalen Hydrolase (PGP 9,5) auf (D10699). Translation im dritten Leseraster identifiziert eine 80%ige Homologie (42/52) zu dem korrespondierenden Protein ab dem fett markiertem Startmethionin (PD006115).

Klon 21/5.6

Nukleinsäuresequenz:

5'GAATTCGGCACGAGCGAGCTTTCATCCTGCAAGCTATAGGCTACCCACTTGAGGCCAATAGTATCTTCTAGGCCCTCAGA
AATGACTCGAGATGTTGTGACGGCAGAGGAGCANAATGGCCCTGAGGTGAGAACTGTTCCCTGTGAGTAGTCGGAAGG
TCAGACACAGCATGAGTATAATGGCTGAGACATGGTGGGACATCCAGAGAACCACACTGAGCCACTCACTGTCAGCAAGG
GTGGCCCCACGCCCTCCACCCCTCCCCCACTACTCCCCCTACGCCACCCCTGCAGCCTCATTCTCATCAGCCAAG
AGTGGGGACAGACTGATGATGACTGGAGACCTCTCACCTCCCTGGAGAGGGGGTGCAGGGGTTCTGGGATTTGTCTTCC
TGTAGGAGGAGACTGGACAGGTATTATAATGGTGCACCCCTAAACTCCGAGCTCGCACTCGGGATGTGCTGTCNAGGCA
GGAGGTTTACCANTCTGAGGGCAAGTTGANAAAAAANACCTCCCTANGACTTGTGCCTAAGTGCCANAANGGCTGAA
NTTGTCCATANGAAAAAANAACCTGGGGCCANGCCTCCCTGCGCCTGACTGCTGCANGTGGGCATGGAAGGCTCTGCC
CAANCACANGAGCAATGCTCCANTTCTCTCCANGGAAATGTTCTGCCANTGGNTGGGGAACNTGTGGCCCTTCTTCTCT
GAANCCTTNAACCNACCNNANGCTCAGNCAAGCCTGNNAGAAAAACNAATTTGAAGCCAANAGGCCAAAANGGACAGG
ATTGATNT3'

Aminosäuresequenz:

GTSELSSCKL*ATHLRPIVSSRPQK*LEMLSGDREXNGPEVRTVPL*VVGRSDTA*V*WLRHGGTSREPH*ATHCQQGWPHALHP
SPHNYSPLRPLQPHSHQPRVGTD***LETSHLPGEVGRGLGFVFL*EEHWTGIIMVHP*TPSSHSGCRVXAGGLPX*GQVXKKX
PPXDLCLSGXXG*XLLHXKXKLGPXLPAPDCCXWAWKALPQXXEQCSXSLXGNVPAXGWGTCGPSFSEXNXNXPXRQXKPR
KXNLKXPXGQD*

Zu diesem Klon wurde keine Homologie in den Datenbanken gefunden.

Klon 21/5.2

Nukleinsäuresequenz:

5'GGACCTCCAATTGCGTNGTGTTCGGGGGGAACAAATCCANCGGGCAAAGCACTAACGGGGCAAATTCCTCGCA
AGGGGCTGCAAAAAGTTTCTCNAGAAGGAGCGTCCGAGGGAACTTAACCTACACATGCCGTGCCAACAGGGAAGTGC
CCATCGACCAGCACCACCGCAACCAGTGCCAATTACTGCCGCCTCNAGAAAATGCCTCNAANTGGGGCATGANGCGGGGA
AGCGGTTACCCGAAGGAAAAAATGCCCTCCAACCCAGCCCAATCCCAGGGCCAGTTACGCCACTCCNAAACGGGGAT
CCCCCTCATTGGCCACCTGGCTACCTGTCNCGGCTACATCTCCCCTGCTTGTGCGCAACANAACCCTTACCCCCACGTCCC
GTTTATTGGGCAGCCANTGCATTGCCAGCCCCACAACATCCATTGGGGGCATCCNAAAAACATCTTGCCAAATTTGGCCG
CCGCTCCTCTTTCNAGCCGCCCGTCCAAATTTGGCCCCGCAACATCCCGTTTCTCCCCGGGATTCTTGCCNGATTTTC
CCGACCCANGTTTCCCTTGCTACGCCTCCCCTTGGGAACCCAACTTGTTCCTTGTCTCCACGCCGGCAATTGCTCCATTG
CCCCTTGACCTTTGCCCCCTTGTGTCANCAANCCGGGCTTACACCGCTCCCCATTTCCCGGAACGGGTCTTGN
WPRQHPRFFPGILAXFSRPFLLRLPLGTQLVSLPRRPIAPLAPLPLLLGXXPGLHRLPHFPRNGSLXSWNXSPFFSGTGLKN
ACTTCTCCAAACCCCTCTGCTGTTCCCTTCAAATNCNTTTTGCCTTTTCGGATTCTCCCCNTCCAAACCCCTCNGAA
AAATCCCCCTTTTCCCTTGGAAG3'

Aminosäuresequenz:

GPPNCVVLRGKFXRAKHRGKFLRRGCKKFLXEGASAGNLTTCRANRELSHRPAPPQVPITAASRKCLXXGHXAGKRFT
RKKCLPTPAQSQQLRHSXNGDPLHWPYGLSRLHLPCLLPNXTLTPSRLLGSXCIASTTSIGGIXKTSCQIWPASSFXPPVQ
WPRQHPRFFPGILAXFSRPFLLRLPLGTQLVSLPRRPIAPLAPLPLLLGXXPGLHRLPHFPRNGSLXSWNXSPFFSGTGLKN
SRXCPFXSSQXHFLQTPAVSLQXXFALSPPSKTLXKNPPFFLE

Die Nukleinsäuresequenz weist 91 % Homologie (146/159) zu dem „Ovalbumin-Upstream-
Transkriptionsfaktor“ des Huhns (COUP-TF) auf (X16155). Nach Translation wird eine Homologie zu einem
seven-up (svp)-verwandten, nucleären, Retinoidsäure-modeliertem Rezeptor des Zebrafisches mit einer
Homologie von 35 % (42/118) identifiziert (AAA99309.1)

Klon 21/7.4

Nukleinsäuresequenz:

5'NGNACGAAGTTTNTNNNNNNNTTNNGGTCTTTTTTCCGGAGCTGGGGACGAACCCAAGGCCNTGCGCTTCCCTAAG
TNAGCGTCTNCCACTGAGCTAAATCCCCAGCCCCNTAATTTTTGAAGTGTCTCTGANANGTAACACACAATCTTTAA
AGATCCCATAGGAGGACCTATTATCTAAAGGACATANGTTGGCTGGGCCACNATGTATAAAATAAAAGTCTTGAGTNNAAA
AACTCTGTCTTTATAGCAANAATATAAAAGTGTCCCGTAAATGCCTGCATTTATACTCAGACCTTTGGTGGAGCTATTTA
AGACATCCTGAGAACTTTAGGAGATGANACCTACTANGGTTTTCTGGGAANTNGGGGAAAAGCCGTNGGATTATTGCT
CANCCTTCTTCTGTCCTGANCTCTTGGCACTANATGGAGCTCCACGCACCNTGTGTNACTGTCTCCCTTTNAACCATGAAC
CANGACAAAGCTCTCNTTCTGTTTGTCTCTGGTAAGCATCTTGCCGTGCTGAGAAAGAAATAACACANCCGGCATTCT
TTCTTTTNTGAAANGANTGGATGGGACACTCATTCTGTTTCTGCTTCTCCCNNGAGATNGTNNCTTACATCTCNAAGC
CTNTTNTNAANGACACTACATCCCNTGGANACTTGCNACGCNACTGACTCCTCCCCCAANTTGCTTGCCNCNTA
TANCTNTTCTTGGGGTCTATTGCTATCCTTNAACNTAAATCTCCCCNAGGCTCCCNNTTTGAGGATTATCCN3'

Aminosäuresequenz:

GSFFPELGTNPRPCAS.VSVLPLS.IPSPX.FLKPLXXNTQSLKIP.EDLLSKGHXLAGPXCINKSLEXKNSVFIAXI.KCSP.MPAFILR
PLVELFKTS.EL.EMXPTXVFWEXGGKACXIIAXPSSVPXLLALXGAPRTXCXCLPXNHEPXQSSXSVCCSW.ASCRAEKEITXPA
FFLFXKXXDGTLLIFLLLPXDXXSYISXAXXXTLHPXGXLPTXTDSSPQXCLPYXXSWGPIAILXLKSPRLPF.GLS

Der Klon zeigt auf Nukleinsäureebene 90 % Homologie (70/77) zu dem LeukotrienB4-Rezeptor der Ratte
(AB025230.1). Auf Aminosäureebene wurde bislang keine Homologie identifiziert.

Klon 21/7.5

Nukleinsäuresequenz:

5'AGGGGAAATTCCTCAGTGTGAANAATACCAGCAGAAGATCATCCCCGGTGGTGAANAATGTTCTCATCCACTGACCGTGCCATGCGCGTCCGCCTCCTCCAGCAGATGGAGCAGTTCATCCAATACCTTGATGANCCGACAGTCAACACCCAGATCTCCCCACGTCACCTCATGGCTTTCTGGACACCAACCCTGCCATCCGGGAGCANACTGTCAAGTCCATGCTGCTCTGGCCCCAAAGCTGAGTGAGACCAACCTCAATGTGGAGCTGCTGAAGCACTTCGCAAGGCTGCAAGCCAAGGACGACCAAGGTTCCCATCCGCTGCAACACCACGGTCTGCTTGGGCAAAATCGGCTCCTACCTCAGTGTAGTACTAGACACAGGGTCTCACCTCTGCCTTACGCGGGCCACTAAGGACCCATTTGCACCATCCCGGGTTCGCGGGTGTCTGGGCTTCGCTGCTACACACAATCTCTACTCAATGGATGACTGTGCCATAANATCTGCCTGTGCTCTGCGGCCTTACTGTANACCCTGAAAAATCTGTGCGGGACAGGCTTTAAGACCATTCCGANCTTCGCAAAATTAGANTCTGTGTGCGGAGGATCCTACCCANTTGGCAGAAATACANAAGGACGTCCATGCACATCCAACCCTGNAACANGAAGAACTGCACCCACTGGGCAAGGCTGGGCTNTNACGGGGTGTCTCTNTCNCTCCAACCTGATCNAACACNCCNCNCTGTNCCTCTGAGGCGCTGTTNCCANAAAACATNCCCCANGGAACCT3'

Aminosäuresequenz:

GTXRLXPRIPALFPPLPSPKLPWPWFQTSQSPWAPRGVEFLSLARLFTFFSRSPAHIKSHWFFYHTFDKNKTFSRKMMVAEKETLTLNKCPCDKMPKRTKLLPQQTIVHQPHSLVSEGFVTKAMMKNSVVRGPPAAGAFKERPTKPTAFRKFYERRDSQSPLSMTRKEKLPXG*RLRTGLPSLPASVF*WAL*DDFPMXFCARSNPXCWNMXGQDLLSSALXSHKNA*TPNXXSLXSSILXSGXS*K

In der dbest-Datenbank wird ein cDNA-Klon der Maus identifiziert (A1508998), der Ähnlichkeit zu dem Klon WO7G4 aufweist und für eine Protein-Kinase verwandte Sequenz kodiert. Die Klone sind einander zu 90 % (446/493) homolog. Auf Aminosäureebene wird eine nicht näher charakterisierte Serin/Threonin Kinase-ähnliche Sequenz aus C.elegans mit 45 % Homologie (99/216) identifiziert (CAB01444).

Klon 22/8.3

Nukleinsäuresequenz:

5'GGCACGAGGGGTCGCGTCAGGCGCCACGTCCGACGCCAGAAGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCTCCACCTCCTCGAACGGAGATCTTCCGACTCTGANCTGAGGAGANCACTGGGTCTCGTANCCGCCCCGGCCGCGTCAGGGCCTCTGCTGTCCCGGCCGTTCTGCTGTCTCGGTGCCACCGCTCCCTCCGCCGGGCCGACGCTCCCGGCCCGATCCCGCGGAAACATTGTGGGTATTGTATCTGCTATTGGTTAGTGCCTGAAACTTCTAGTTGTCTCAAGGGCTATCACACCAACCGGTGATCATGAATCAGGCAGATAAAAAATCAAGAAATCCCCTCTTACCTTANCGATNAACCCCANAAANGGTCNATGAAAGATCACCCACAGCAGCAGCCAGGCATGTTGTCCTGTGACTGGAGGTATCTCAGTGTACAAAGGGAGCTGTTGGTGGCCACCATGGTGTGTGGCTTGGATTGGTGGAAAGATCTGGAAGTGACAAAAACAGCTGTTACAACCTGTGCCTTCCATGGGAATAAAGGCTGGTGAAGAAGTGTGCTGCTGTGGCTGGAAGTGTNACAACNGTTGGGTCTGCTGTTGTTAACAATGCTTATCAGGAAANAAAAACAATCTGATTGAAANAAGAATACCTTGCTCTCNCNCCATATGATNCCNTTGCATTGAACACTCATTACAAATANACCAATCACCTAAATGCTGTNTNAAATNTTGTGAATGGCTNCTCTAAACCANAAGAAACATTCTCNCNNTTTTTTAAAGTNCNCTCCTAATTC3'

Aminosäuresequenz:

GTRGRVRRRHVRSQKPPPPPPPPRTESLPTXPPEEXIIVSXPLAASGPLLSRPLLLSSVPPLPPPGRSSRPRSRGNIVGICICYWLVPESSCXSRATPTGDHESGR*KSRNPLLPXRXTXVXERSPTAAARHVVSCDWRYLQCYKGCWCWHHWCCGLDWWKDL ETKTAVTTVPSMGIRLVKRSVSAVAGSVTTVGSVVNKLPHYQEXKKQSD*XKNLTLXSHMXPLH*TLITNXPIHPKCCXKXCEWLL*TXRNILXXF*XXSLI

Die Sequenzen weisen keine Homologie zu cDNAs bzw. Polypeptiden aus den Datenbanken auf.

Nukleinsäuresequenz:

5'GGCCCGAGGTCACATTTGCCCCATGCTGGATCATCGGTTCTTCCAACATAACCAGGAGGAACAAAATTCTAACATGAGCCAGGCTGGCAAGGCCAGTTACTCCTAGAGCCCAACCTCCACTGCCACCCATCTGCCTCCCATGTTATTTCACTCTTCTGTTACAGCGCTCGGCCACCGCAGCCGAGTTCCTCCTGCCAGGTCTGAAGAAAAACAAAGACTGTGGAAGAAGAGGACAGGGCAGCANAGGTGACAGAGGACCAGGAAACGAGCATGTCCTGATTACCANAACCTAGAGATGGACAGAGATTTTCCAGACATCATGTAACCCATCAGAAAGCCCTGGGAACCCGACTTCATCGTGCCTCTGCAGCCTGAGGACTCCTGGCTCCATCATGTCCCTCTATGTCCTCTGCACCCAGGGTCTCTGGCTGCTTGAATACATTTCACTGTTTTCTTTTGAAGAAAGTGTACAAGCACATCTTGAATGGACCAGGTTCTTGACCCTTTCACATTTGAGCTTGTGGATGTCAAAGCTGGACCTGGGCA GTGACACCCGTGGTTCTCCTCCAGGCTCAGCATTCCAAGATGCCCTTCTCCGTCCCACTAGGATAACACAGATGTGATTTGGGCTGACCAATGAAGATTGGTTGCCACGTGTTATGTCTACTGGANCTCAGTGTGGTGGCCCGGCTGAGNTGCTCTGCTTCTGTGGATGTACNACTCTTCTGTNCNCCAACAGGGTATAACATGGATTTANTCTTNCNCTGAATCT3'

Aminosäuresequenz:

GPRSHLPHAGSSVPSNIPGGTKF*HEPRLARPVYS*SPNLHCHPSASHCYFTLSVHSARPPQPEFLLPRSEKPKTVEEEDRAAXVTEDQETSMS*FTXT*RWTEIFPDIM*PSSEALGPTSSCLSLRTPGSIMSLYVPLHPGSSGCLNTFHCFLKVVQAHLGMDQVLD PFTF*ACGCQSWTWA VTPVVPPLGLSIPKMPFVPLG*HRCVFWADQ*RLVATCYVLLXLSAGGPAEXLFCFVSDVXLSSVXQQGITWIXSSLN

Der Klon verfügt auf Aminosäureebene über keine signifikanten Homologien zu Sequenzen der Datenbanken.

Klon 24/7.6

Nukleinsäuresequenz:

5'GGCACGAGCGGACGCGGAGAAAAACGCTGTTGCGGAGAAAAACGCTGTTGCGGAGGAAAAACGCCGTTGCGGAGGAAA
ACGCCGTTGCGGATAAAAAACGCNACGAAAGAAGTTCTGGCTGAGGCAGCAAGCGTTCTGGAACCTGTAGGATTGCCGGA
AGAAGCAGAGCTGCCTGCCNAGATCATGGAGGAATTTATGAGGAACTCTCGGAAGAAAANACAAGCTGCTCTGTNGCCAG
CTTCAAGTNGTGAACCTTTACAGACTTTTCTGGCCAGGANGATAATACTGACCAGAACCCANATGCTCTGGCTTCTGAA
GATAAANTCNAAAAAGGCAACTGAAACTAANGAGCAGTGGAAGGAGCTGAANGCAACATACATGGATCATGTNGACG
TCNTCNAATGTNCCCTGTCTGAGGCCTGCCCCNNGTTNNANANGCACACNGGAAGTNCACCNAACTTCNCAANGCTTTT
GAACNACTTGANGCTNANAACNANTCCTTNNGTANAACACTGCATTNGCTCCNAAAACAATGGGTGCTGCCTCNAAAACCTT
GCCNAATCTGACAAANATTTCTGCTNAAGTCCNAGACCCCGAAGAACTCTGGAGAAGCTGATGTTCTCCCCCACAACCT
GAAACTTGAANCNCANCCGGACNGGAGCCGANAACTNCCCAAGAACCCNAACTNCTCCCCTGTGTCTTCCAATAAC
TGTCTCTNATCCCGCNACNANAATNTNTNNGGCCCCCTCCCCCTCTCTTTTATTAACAAAAAACTCCCCC
NNTCTC3'

Aminosäuresequenz:

GTSGRGEKRCCKEKRCCGGKRRCCGGKRRCCG*KRXERSSG*GSKRSGTCRIAGRSRAACXDHGGIYEELSEEXQAALXPASSXEL
LTDGSGPX*Y*PEPXCSTGF*RYXSTKGN*N*XAVEGAEXNIHGSCXRXXMPV*GLAPXXXTXEVHXTSQXF*TT*XXXXXL
XXKLHLXNNGCCLXNFAXSDKXFCXSPRRNSGELDCSPQLET*XXXRTGAXNXPRTXLLPCCVLPITVSLIPATXNXXGPP
PPSPFIKQKNSPPX

Die Nukleinsäuresequenz weist über 47 Nukleinsäuren eine Homologie von 82 % zu der „ZW10 Interactor Zwint“-mRNA des Menschen auf (AF067656). Translation im ersten Leseraster erlaubt die Identifizierung einer Homologie über 52 Aminosäuren von 52 % zu dem Transkriptionsfaktor Notch 4 von Drosophila (NP_004548.1).

Klon 24/8.4

Nukleinsäuresequenz:

5'GAATTCCTCAGTGCTGAAGAATACCAGCAGAAGATCATCCCCGTGGTGGTAAAGATGTTCTCATCCACTGACCGTGCCA
TGCGCGTCCGCTCCTCCAGCAGATGGAGCAGTTCNTCCAATACCTTGATGAGCCGACAGTCNNACCCANATCTCCCC
ACGTCACCTCATGGCTTTCTGGNTTTTTNCTGCCATCCGGGAGCAGACTGTCAAGTCCATGCTGCTCTTGGCCCCNAGCT
GANTGAGACCAACCTCNATGTGGNCTGCTGAANCACTTCNCAAGGCTTCAAGCCNANGACGACCAGGGTCCCATCCGC
TGCAACNCCACNGTCTGCTGGGCNAAATCGGCTCTACCNCNNTGCTAGTANCNNANACACATGGTCTCTCCTCCTGCC
TTCCNCCNGGCCACTAAGACCATTTGCNCCNCCNNGTTGCGGGTGTCTGNGCTTCGCNTGCTNCACACAATCTTCT
NCTCANTTGGATGANTGTGCCCTAAGATCCTGCCTGTGCTCTGCCGCCTTACCNGTNGACCCNNAATNTCTGTTCTGGNC
CAAGGCTTTAAGACCAATCTAANCCTTCTGTCCACATTTANANTCTGTGTCTGANGGATCTTCCCACCTGNCCGNAAT
NATAGAATGGANTTCTTNCNCCTTCCNCCCTTGAANNCTGTNTGTACNTGCACCCACTTNGCTTGCCTCNCTNTNN
CCCCN3'

Aminosäuresequenz:

XTRGNSSVLKNTSRSSPWVLRCSHPLTVPCASASSRWSSSNTLMSRQSPXSSPTSLMAFWXFXLPSGSRSSPCCSWPXS.
XRPTSMWXC.XTSQGXQAXDDQGPICNXTVCLGXIGSYXXASXXTWSSPPAFXPQH.GPFAPSXVAGVLXFACXTQSSXXLD
XCAPKILPVLRLTXXPXXSVLXQGF.DHSPSPHLSVXSGFFPTXPXX.NGXPPXLPXLVXCXYHPLXLASP

Zu diesem Klon wird in der dbest Datenbank eine Homologie von 86 % (349/405) zu dem cDNA-Klon RGIEU89 der Ratte identifiziert (EST349876/ AW918572.1). Die Aminosäuresequenz zeigt 47 % Homologie (48/102) zu dem Genprodukt CG1973 der Taufliege (AAF56933.1). Zu Klon 21/7.5 weist dieser Klon auf Aminosäure ebene interessanterweise eine Homologie von 37 % (38/102) auf.

Klon 25/3.4

Nukleinsäuresequenz:

5'AGNCGAATTCGGCAGGAGTCCAGAGCCGACCCCGAGCCCTGAGGCATTCCTCCGCTTCGGAACAACCTAGTCA
TTCATTGCTAACAGGAATCATGCGGGACCCTGTGAGTAGCCAGTACAGCTCCTTTCTTTTCTGGAGGATGCCATCCAG
AACTGGATCTGTGCGGAGCTGGAAGGCTGGGCTGTGAGATTCACCTACCTACAAGAGCAAGGAGAGCAACAGCATTGGC
AAAATGGGTGGGCAAGCAACCGGAGCTGAGCGGAAGAGCCCTGAAGGCGACCCCTCCTTGAGTATAGCACCTTCAACT
CTGGAGAGCCCTATTGCCAGCATCCGCTCGATCGACTGGACTTGTCTAAGTCGAGACCTCTCTCCCACCCGCCCA
TACCCTCTTGTCCCTCCCTTAAGTCCCTTCTCTCTCAGCCTTCCACTTAATCTTGTCTCTTCCCCTATTGTGCGGTGG
TGCTGATGAATCTGCCAATCGAATTGTATGTTGTATGTATGACTTATTTATCTATTTATTTATTTATTTATTTATTTA
TTTATTTATCTGCCAATCCGTTTCTCTCAAAAGCCCTTAGGCACNAAGTCCAGGGTTAATCAATGGAGTNCANATCA
TAGGACACCCCCCCACCTGAAAATATANCTAATCCCAAAAAATCACCTTCTCCAAGCTTCANAAAAATTTNATT
GTGCCAAATGGGANACANTTTTTCTGTTTGTGTGTGTACNTTTAAACTGCTTCNANATACTTNAACTCCCTATTTTCN
CNC3'

Aminosäuresequenz aus dem dritten Leseraster:

HEVQSRPPSP*GIPSVFGTTLVIHC*QGIMRDPVSSQYSSFLFWRMPIELDLSELEGLGLSDSPTYKSKESNSIGKMGQATGAER
KSPEGDPLLEYSTFNFWRAPIASIRSIDL DLL*

Die Nukleinsäuresequenz zeigte eine Homologie von 71 % (64/90) zu der AF1q-cDNA der Maus (U95498). Die Translation der Nukleinsäuresequenz im dritten Leseraster zeigt eine zu AF1q zu 71 % (64/90) homologe Sequenz. Das Startkodons der homologen Sequenz liegt hinter zwei Stopkodons. Der gesamte homologe Bereich ist fett markiert.

Klon 25/5.1

Nukleinsäuresequenz:

5'GGCACGAGGGAACAAAGGAAAGTCCGGGTGCCGAANATCGCCGAATTTACGGNCCCCAGTCTTGTCTGCCTGGCCCTT
GCCTTCCTCGCCTGCATTGTGTTCTCGGTGGTTTACAAAGCCTTACCTACGACCACAGCTGTCCTGAAGGATTTGTCTACA
AGCACAAAGCGCTGTATCCCGGCCCTCGCTGGACGCTTACTACTCATCCAGGACCCAGCTCCAGGAGCCGCTTCTACACAG
TCATCAGCCACTACAGCGTGGCCAAGCAGAGCACTGCCCGGCCATCGGGCCATGGCTGTCAGCAGCTGCTGTCATCCAC
GAGCCCAAGCCACCAAGACNCAGGGCCATTATAGGCCTGCCCCACCTGGGATGGGGGGTGTGGANAAAGGAATGCC
CCCGCTAGTTAAGCAAGGCTGGAGCTACAAGACAACACTGTACTGCTGGGGTACTGGGTGGGGCGGGGCANGATNGGG
CTGGGGAAAACCTCCCAAAAATTTGTGCCTGGANTTGTGAATCGATCTTCCCTTTGCTTTTCNTATTGTTGCTTC
GTACCCAAGTCANGCGCTGTTCAAANGCATGTTTCGTGTTGATTGTTCCCATGTTANATATTTTCAAAGCCCGCCTTATT
CTTTGTTANGGTTATTANANACANAAAAGGGAGCCNAAAAAAAATTAATAAANCAATGAAACGGCTCCNTTTTAAAANAC
AAACAAGGCANTAAAAACAACCTCCCTTGGGTTTCTTAATAAAAACCATGTTTCTGCTTGGGCTCCAATTTCTTTTGGAA
AGGTAGCTNTCCGTTTNCNTGNC3'

Aminosäuresequenz aus dem zweiten Leseraster abgeleitet:

ARGNKGKFRVPXIAEFTXPSLVCLALAFACIVFLVYKAFTYDHSCPEGFVYKHKRCIPASLDAYYSSQDPSSRSRYFTVISHYS
VAKQSTARAI GPWLSAAAVIHEPKPKTQGHYRPAPPGMGGCGXRNAPR

Die Nukleinsäuresequenz weist eine Homologie von 94 % (351/372) zu der cDNA von dem neuronenspezifischen Golgi-Apparat Protein p19 auf (U17259). Nur die Translation der Sequenz im zweiten offenen Leseraster erlaubt die Identifizierung einer Homologie von 95 % (109/114) zu dem P19 Protein der Maus (P47759).

Klon 25/6.6

Nukleinsäuresequenz:

5'GCACGANGCCCGCAGGCGCCGAGGAAAGAAAAACGAGCCCGGACGGTGCCCTANGCCGAGTGTGAGCGCGGCCAGG
ATGACNACTTCAGGCGCTCTGTTCCCGAGCCTGGTTCCTCGGGATCCTCTACCAAGTATTTGGTGGAGTTCCGG
GCAGGAAAAATGTCNNTAAAAGGAACTACGGTCACCCANATAAACGAAAGGGCTCGTGTNCATCCAGCAGACCGACG
ATTCCTTATTCACTTCTGTTGAAAAGACANGACCTCTGGGACCGTGGANGATGACTTGATTATCTTTCTGATGACTGTG
ANTTCAAGCGGGTGCCTCANTGCCCCANTGGGANGGTCTACCTNCTCNANTTTAAAGCAGGGTCCAANCGGCTGTTCTTCT
GGATGCANGACCCNANACTGACCNANATNANGACATTGCCGAAAAATNAACNAATTTNAACAACCCCCCCTGCTGG
GACTGGGAACCAATTGGAATNTNGCCCCAACCTTCCNCACTGGGCGGTGAAGGTNGGCTCCAATCTGTTGGGAACT
NAATCCACCACTTATNCNCTCNTCCGAACACCCGCTCCGAAGANTGGTTTGTCTTTGGGCTCCTTGGNCNNGCCTTGCCN
CTTCTGGGACATTGGTCCANACACTCTCTCCACTCCCGAACCATCGGANCNTCACCTCTANACTTCTCCCTCCG
CCCCANCCCTTNTNCCNANTTCTCNGGAAAACCCATCCCCCCCCCTCNGTTTGAACNCCNA3'

Aminosäuresequenz:

ARXPAGAEKRRARTVPLXRV*ARPG*XLQALCSRAWFPALGDPLPSIWSSGQEKCX*KELRSPXINGKGSXSSRPTIPLFTS
VGKTXPLGPWXT*LSFLMTVXSSGCLXAPXGXSTXSLKQGPXGSSGCXTXX*PXXXHCRKXNFXTPPLCLGHWEPIGXX
PPTFTGP*RXASNLFNGXIIHLXXXPNTRSEXLVCFGPPWXXLXSWDIGSXTLLSTPEPSXXHPLXTLPSAPXPXXXLXKTH
SPPSVLNX

Die Sequenzen zeigen keine signifikanten Homologien zu Sequenzen der Datenbanken.

Klon 26/2.3

Nukleinsäuresequenz:

5'GGCACGANGCGGCTCTANCCTCGGATCCCAGCCCTCTCCCGCCCCCTCCCTCCCCTAAACTCCCTCCACCTTGGTGCTT
CCAAACATCTGGATCACCTGGGCACCACGAGGGGTGAATTTCTATCACTAGCGCGCCTTTTACATTTTTTCCCGATCC
CCTGCTCACATCTGTAAAAGCCACTGGTTTTTCTACCACACCTTTGATAAGAAACAAAACGTTTTCTAGGAAGATGGTGGA
GAAAAAGAGACCTGACCTTAAACAAATGCCAGACAAGATGCCGAAGAGGACAAAACCTGCTGCCACAACAGACGATCC
AGGTGCACCAGCCTCATCCCTGGTTTTCTGAGGGCTTACAGTCAAAGCCATGATGAAAAACTCAGTCGTGCGGGTCTC
CAGCCGACGGGATTTAAAGAAAGGCCACCAAAACCACCGCATTCCGAAAATTTATGAGCGAAGAGATTCCAATCG
CCCTGAGCATGACTCGAAAGGAAAACAAAATGCCTGGAANGTAGAGATTGAGAACTGGACTACCATCATTACCTGCCTC
TGTTTTTGTGGGCTTTGTGAGATGACTTTCCTATGANTTTTTGCTCGCAAGGAATCCNNACTGCTGGAACATGGANGG
ACAAGATCTACTGTCTCCGCGCTCNTATCCATAAAAAATGCTTGAACCTCCNAACANANAGTCTCTGTTNTCCTCAATTCTC
NCCTCTGGTTTTNTCTGAAAAGC3'

Aminosäuresequenz:

GTXRLXPRIPALFPPLPSPKLPWPWFQTSQSPWAPRGVEFLSLARLFTFFSRSPAHICKSHWFFYHTFDKNKTFSRKMMVAEKETL
TLNKCPCDKMPKRTKLLPQQTIVHQPHSLVSEGFVTKAMMKNSVVRGPPAAGAFKERPTKPTAFRKFYERRDSQSPLSMTRKE
TKLPGX*RLRTGLPSLPASVF*WAL*DDFPMXFCARSNPXCWNMXGQDLLSSALXSHKNA*TPNXXSLXSSILXSGXS*K

Die dbest-Datenbank zeigt eine Homologie von 94 % (404/427) zu einem cDNA-Klon der Maus auf (AA268658). Die Aminosäuresequenz weist 33 % Homologie (15/45) zu einem „Regulator-of-G-Protein-Signalling 5“ (RGS5) auf (P49800).

Klon 26/4.1

Nukleinsäuresequenz:

5'GGCACGANAACCTGGGGGTGTNAAAGCCATACCCTTTCCACTGTGCCAAAATCATCTGCCACATGGGNAGATANGTTG
CATCAGCCTGANGCAAGCACCTTTCTTTCACAAGAAATCAATCTGTGGNCTCTCNCCAAAGCCATAGTACANATTGAN
GNGNCTTGACCTCCATGCCANANCTGANCTTTTCCATTTCAATATTTACTCTTGACTCCNGAAACTTGGCTCTGAAA
CAANTGGTTGTGANCCAGTGTCTGCTGCTTGGTTTTGTTTTCCNAAANTTCTAAGTGTGCCNAGGAAATACTTTTGT
AGCTCGGATNCTNTTCTTTTTTCTTTCCNAAATTTACTGATCACAACACTTGGCTTACCANCATANGCGGCCTTTGTGGC
TGANCAGTATTTTCAANTATGTNAAACCCCATATCCTTTACATGATANTTACTTAAAAGANNCTTCTTCTGCTTACTTACA
TTCATGGCTGCTTTTAAATTTCTTTTCAATGATNGTAAATTTGTGCCACTCTCCANACCTGTTTGACAAGGAACCNNAATTC
CCCCNANANANAAAAAACCTCCATATNGCTTGGGGANTNAACTATGGTTGGTNCACCTCCCCANGCCCCCTCAAGTT
CACAGGATTTAAATGTTTCTTTTCCNCCGCAAGGTTTAAATGTTACANTTCTTTCNCACTCCNTTGTACTTNAATTTNT
CCCCAGGCCCCNGNGTTTATTNCCCCNTCTAAAAACCNCNCCCNNAANTGCTNNNCNTCTTCCCTNAANAANTCC3'

Aminosäuresequenz:

GTXTGGVKAIPFPLCQNLPTWDXDFASA*XKHLFFHKKSICGLFXKAIVXI*XXLTSMPXXXLFPFQYYSLTPETWL*NXWFA
XPVICCLGFVFXF*VCXGNTFVSSDXXLFLSXFTDHKHLAYXHXRPWLXSFXYVKPPYPLHDXYLKXXLLAYLHSWLLN
FLSLXVNCATLXTCLTRNXNSPXXXKPPYXLGXPMVGVXPPPSPKFTGLNVFSXAKV*MLXFSFXLXCYIXSPRPPXFIXP
X*KPPXXXCXSSLXXS

Beide Sequenzen weisen keine Homologien zu publizierten Sequenzen der Datenbanken auf.

Klon 27/7.7

Nukleinsäuresequenz:

5'GGCACGAGTCGCATCTCTGCGAGCAGCCTCCGGGGCTACGTTCCATCCTATCAGTCTGAGACCAGCCCAGAAGAAAA
AACCAAAAATCCTTAATTATCTTCTTTTGTCTCGGTACCTACATTTGGGACCATCAAAAAAAAATTTATTACAGTAAACCGT
ANCCATGANGGAAATCGTGCACATCCAGGCCGGACAGTGTGGCAACCANATCGGTGCTAAGTTCTGGGAGGTGATAAGC
GATGAACACGGCATCGACCCACCGGCACCTACCACGGANACAGCGACTTGCAGCTGGACCGAATCTCTGTGTNCTACAA
TGAANCTACAGGTGGCAAGTATGTCCTCGAGCTATCTTAGTGGATCTAGAACCCGGGACTATGGACTCCGTTTCGCTCAGG
TCCTTTTGGCCAGATCTTCANACCCGGACAACCTTTGTTTTTGGTCAGTCTGGGGCAGGCAACAACCTGGGCTAAGGGTCNCTA
CNCANAAGGAGCTGANCTGGTTGACTCTGTCTTGGATGNTGTGCGGAANGAAGCGGAAACTGTINACTGCCTGCAAGCTTT
CANCTGACCACTCCCTGGGTGGAAGCACNGGCTCTGGCATGGGCACCTGCTCTCNCNANATTTCAAAAAATACCCCGACC
GCTCTTGAACACTTCACGTTGTGCCTNCCCAAGTNTTCTGANNCGTGTTGAACCTACANNCCCCTGTTCTGTCCTCCNNTTG
TTNAAANNANATAAACTCTGCTTGANNCAAGCCCTANAATTTCTTCTNCTNCTCCNCCCCCTCNGAACT3'

Aminosäuresequenz:

GTSRISLQPPGLRSILSV*DOPRRKKPKILNYLLLGTIYIGTIKKKNYYSKXP*XSCTSRPDSVATXSVLSSGR**AMNTASTPP
APTTXTATCSWTESLQXTMXLQVASMSELS*WI*NPGLWTFPAQVLLARSSXRITLFLVSLGQATTGLRVXTXKELXWLTLS
WMXCGXKRKLXLPASFXTTPWVEAXALAWAPALXXFQKIPRPLNTRCASPXSXXCLNLXXPVRPXLKXXKLCLXXSP
XISSXLXPPLXT

Der Klon zeigt 100 % Homologie (66/66) zu dem Gen des Klasse β -Tubulins (AB011679). Auf Aminosäureebene wurde in keinem Leseraster eine entsprechende Homologie identifiziert.

Klon 28/5.1

Nukleinsäuresequenz:

```
5'GGCACGAGACTGAGCAGGGCTTTCCTTGCCAGTGGATTGTGTAGAGTGTACAGCCAGTCTTGTCTTGTCCAACATG
GCATCTTCTGATATTCAGGTGAAAGAGCTGGAGAAGCGTGCTTCCGGCCAGGCTTTTGAGCTGATTCAGCCCTCGATCA
AAAGAATCTGTCCCGAGTTCCTCCCTTTCCCTCCNAAGAAGAAGGATCTTCCCTGGAGGAAATTCAGAAGAAATTAGN
AAGTGCAGAAGAAAGACGCAAGTCTCATGAAAAGCAGAAGTCTTGAAGCAGCTCGCTGAGAANCAGGAGCATGAAAAAG
AAGTGTCCANAAAGCCATTGAGGGAGAACAACTTCAGCAAAATGGCAGANGAGAACTGACCCNCNAAATGGAGG
CTAACAAAAGANAACGGGAGGCGCNAATGGCTGCCAAAAGTGGAGCGTTTGCAGAAAGAANGACAGCCGTTTAAAAAGTGC
GGAAGAACAAGAATCCNNAGACCCGCGGACGAAAACGAAGNTGACTAATTTTTCCGAAAAGTGAATTCCTCCACCC
TCCTAAATATCCNAAANTGTCTGGCCGTGTCTTTCTTTTNCCTGACAATATTCTAAAAGTATTTGACCTNTAGGTT
GATTCCAACGTGAAATTTTNTGGGNCCNGGGGAAACTGAAATNTTGCCTTTTAAAAATTTGNTCCACGTNCNNTT
TCNCTTGCNCTTNCNCCCGGCGNCCCGNTTCTNGGTTATNGGNANTT3'
```

Aminosäuresequenz:

```
HETEQQFPCQWIV*SVQPVSCLLSNMASSDIQVKELEKRASGQAFELILSPRSKESVPEFPLSPPKKKDLSEELIQQKLXSRRTQ
VS*KQKS*SSSLRXGSMKKKCSXKPLRENNNFSKMAXEKLTXMEANKXNGRRXWLPNWSVCERXTSRLKSAEEQRIPIXTRG
RKRX*LIFPKTEFSPLLNIXCLAVSFLXPPDNILKILTLXRLIPT*NFXXGXXGKLLXLPF*NFXFHVXFSPCXXXPGXPXLYXX
```

Der cDNA-Klon verfügt über 94 % Homologie (454/481) zur cDNA von Stathmin (Phosphoprotein P19) der Ratte (J04979). Nur die Translation der Nukleinsäuresequenz im dritten Leseraster identifiziert eine 57 %ige (80/138) Homologie zu dem entsprechenden Genprodukt (P13668).

Klon 28/5.3

Nukleinsäuresequenz:

```
5'GGCACGAGCAGCCGCGGATCACGGTCGCTAGTGCGTAGCAGAAGCGAAGGCGGAGATGGAGACCACGCTGTCCGG
ATCCCAGAAGTGTGAGCCACTGCTGTCCCTGACCCGCTCACACTTCTTTGCAAAGGCAAATTTGAAACAATTGCTTG
ANCTACCGTTNGTTTTGTCTCNGAACAGTGANCTAGGTGTCTNANGAGGANANGAACNTCTCTGTGTTATAAAAA
CGTTGTAGGAGCCCGTAGGTCATCTTGGAGGGTCGCTCGAGTNTTGAGCAGAAGACGGAAGGTGCTGAGAAAAAGCAG
AGATGGCTCGAGAATACAGAGAGAAGATCGAGATGGAGCTGAGGGACATCTGCAACGACGACTGTCTCTTTGGAAAA
GTTCTTGATCCCCAATGCTTCGCAGCCAGAAAGCAAAGTCTTCTATTTGAAAATGAAGGGTGACTACTACCGCTACTTGGC
TGANGTTGCTGCTGGTGATGACAAGAAAGGAATTGTGGACCAGTCNCNGCAAGCATACCAAGAAGCATTGAAATCANCA
AAAAGGANATGCTCCGACACACCCCATCANACTGGGTCTGGCCCTCNACTTCTCTGTGTTCTACTATGAAATCTGAATC
CCCAGANAAAGCCTGCTCTCTTTG3'
```

Aminosäuresequenz:

```
GTSSRDHGR*CVAEAKAEMETTLRSQNC*AHCCP*PAHTSFAKANLETIA*XTVXFVSEQ*X*VSXEXXNXLVAYKNVVG
RRSSWRVVSSEKTEGAEKKQQMAREYREKIEMLRDCNDVLSLEKFLIPNASQPESKVFYLLKMKGDYRYLAXVAAGD
DK
KGIVDQXQAYQEAFFEIXKXMLRHPTSPXWVWPSTSLCSTMKS*
```

Die cDNA zeigt 96 % Homologie (450/467) zu der 14-3-3 zeta Isoform der Ratte (U37252). Die homologe Region des entsprechenden Genprodukts befindet sich jedoch hinter den ersten Stopkodons. Der Beginn der homologen Sequenz ist fett markiert.

Klon 28/5.4

Nukleinsäuresequenz:

```
5'GAAGGGAGGATGGTGANTNTATAACTANNTATTTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCAAAAAAGAGATCGAATTC
GGCACGAGCAGCTGCCTTCCGTGAGGTCCGGGTGCAGTCCGTGGTGGTGGANTTCTGCTCACCCACGTGGAGGTCCTGTT
CAGCGATACCTTACCTCTGCTGGCCTGGACCCTGCAGGTGCTGCTCCTTCCANACCCAAGTCCCTTCCCGGGAGCAG
TCCCTCACTGCCTGTGACTGAAAGAAGCCAGCCAGCAACTCAGGGTCTGCTTGGAAACCCGAGCCGAGCCACG
ACTCCTAAGACTCCAGCCTCACCCGTGAAAGGAGGAAGNANAGANAGAGTGGAGAAACNAAGGAANCCTGGGGGTNTC
AGCTGAAAACATCTTTGCTCTGGGGCGGGCCANCATACCCGGAACCAACCGCTGCCATGGCTGANTGGCAGCCG
AACCCTCCNCAGCCTTACGGCAGCANACCCGACTGTCACTCTGANATCTGCCAAAAGTGANGANTCTGTGATCCCCA
NGCCANCGGGGCTGGCCTCCANAAGCTGCACCCGCTACNANAACCCACTCCACANCGATGCTTTCCCGTGGGTCCANC
ACCTGTGGCTCCTGCGAAAAGTGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCAN
CACTNGGCTGGGGCCACTCTTGTNTCCCTCCACCCGACCTCACCTGNNTANATAAAGTGATNAACTGGATTTCTNTCC
CCCTNTCTTGAAAGAATCCGGGANNTAATTNATTCCTTNTCTCTGCNANTCCCCCGGGACTGACTCTNCNCCNNA
CTCCNCC3'
```

Aminosäuresequenz:

GTSSCLPZGPGAVRGGGFLTHVEVLFSDTFTSAGLDPAGRCLLPNPSPLPGAVPPLACZHWKKPRHELRVVLEHRREPTTPKTP
ASPVERRKKKSGETRN LGVQLENILCSGAGPHIPRKKPLPWLMAAEPLPAFRQQPDTVTLNLPKVRSLSSQPRGWPPKLHRLQT
PLHTMLFPWVHTCWLLRKL VLLFFFLFLFLLLKSSHWLGPLSCPLHRTSPVIKZZLDFSPSPZKNPGLIYSFFPAIPPGLTLPL

Die cDNA verfügt über 90 %ige Homologie (84/93) zu dem Cosmid F25965 von Chromosom 19 (AC002398). Auf Proteinebene weist der Klon ebenfalls eine Homologie von 43 % (43/100) zu dem nicht näher charakterisierten Protein F25965_3 KIAA0712 des Menschen auf (PD144617)

Klon 29/3.3

Nukleinsäuresequenz:

5'GGCACGAGACCCGCAAAAGAGAGCAGCTTCGTGGAAAAGATGAAGAAAACGGGAAGGAACATTATCGTATTCTATGGC
TCCCAGACGGGAACCGCTGAGGAGTTTGCCAACCGGCTGTCCAAGGATGCCNCCGCTACGGGATGCGGGCATGTCGCC
AGACCCTGAANANTATGACTTGGCCGACCTGAGCAGCTGCCTGANATCGACAAGTCCCTGGTAGTCTTCTGCATGGCCA
CATACGGAGAGGGCGACCCACGGACAATGCGCAGGACTTCTATGACTGGCTGCAGGAGACTGACGTGGACCTCACTGGG
GTCAAGTTTGTGTATTGGTCTTGGGAACAANACCTATGAGCACTTCNATGCCATGGGCAAGTNTGTNGACCANCGGCTG
GAGCANCTTGGCGCCANCGCATCTTTGAATTGGGCCTTGGTGATGATGACCGAACTTGGAAANAAGATTCTCNCCTNG
ANGGACANTTCTGGCCACTGTNTNCGAATTCTTTGGGGTNGAACCCCTNGGGAAGATCTACATTCCTCCCTTTACTCNTTG
TCCCCAANACTNGACCCNCCCANGTNTNACCGGTINANATTGGCCTCTGAAAACTCCAAAACCANAAACCCCTTCNATCTN
ANATCCNTCTGGCTGTGTCCCCCCCCACNGAACTAACANGCCTGAACCGCTCTNTTNCCTGGATTTGAACCTCCNAC
TCCNATCGTTAATCTGGAATTTCTTTGNTNTTCCNCCANNACTCCNCTGTNCCCAATTNGGGAATCTT3'

Aminosäuresequenz:

GTRPVKESSFVEKMKKTGRNIIVFYGSQTGTAEFANRLSKDAXRYGMRGMSADPEXYDLADLSSLPXIDKSLVVFEMATYGE
GDPTDNAQDFYDWLQETDVLDTGVKFAVFGLGNXYEHFXAMGKXVDXRLEXLGAXRIFELGLGDDDRNLEXDFLXXXDXS
GHCXRILWGXTPEDLHSPFYLSPLXLDPPXXXRXWPLKTPKXTPSIXXPSWLLSPPPELTXPELXXLDLNSPTXRLIWNFF
XXSXXXSXCPXES

Der Klon kodiert für die NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase, zu der er auf Nukleinsäure-Ebene 94 % Homologie (490/517) aufweist (M12516). Auf Proteinebene verfügt die Sequenz 92 % Homologie (143/155) zu dem entsprechenden Genprodukt (M58937)

Klon 30/7.8

Nukleinsäuresequenz:

5'GGCACGAGCAACCACCTGACTACATCAACTCCTTGCTGGCCAGTGGANATCTGCAGCTCTCTGGAANTGCCACTGT
ACCTTCAGCACTGCCAGAAAGCCTTGGGAANGACAACCTTCNCGGNTATCCCTGANGGNNCCNATGGCGTGGANGANC
GTNTGTCTGTCNTCTGGGACAANGNTGTGGCCNCANGGGAANATNGATGAAAACCNNTTGTGGCTGTGACAANTNCCNA
CGCTGCCNAGATATTCAACCTGTNCCCNCNAAGGGGAGAANAACCTGTGGGTCTGACAGCGACCTTGTCATCTGGGATC
CANATGCCNTGAANATCTTCTGCCNAGAACCACAGTCGGTTCGCGGAATACAACATCTTTGAAAGGATGGAGCTGCGT
GNGGCGCTCTGGTGGTTATCTGCCNCGGCGAGATCTTGTCTGGAANATAGTAACCTGCACGTNACCCAANGGGCGGNCG
CTTCATTCCTGCAGCCATTCTCTGACTATGTNTATNANGCNCNTAAANCCNNGAGGAAAAATAGCGGACTGCNTNCTCC
CNNAAGCATGTTTATTGACNTGTTTGTATNACCCCCCCCCANGGGGGNGCCCCCTGGNTCTATCCAGGTCTCCCCCTCC
GCCNACCCNTTGAGGAACNCCNCTCCGGATTNTCTTCNGCCCCNTTGATAANGTTTCTNCCCCCACN3'

Aminosäuresequenz:

GTSNHT.LHQLLAGQWXSAAALWXCPLYLQHCPEXWEXQLXGYP.XXXWRGXXXVCXLGXCGXXGXXMKTXLWL.QXPTL
PRYSTCXXXRGEXLWVLTATLSSGIXMP.XSSLPRTTSLRNTTSLKGWSCVXRLWWSAXARSCWXIVTCTXPXGAXASFP
AHSMTXXXAXXPXGK.RTAXLPXACXIDXV.XTPPPGXPLXLSRSPLRXPX.GTPPPDXLPPLIXFSXP

Translation ab 148 bp ab internem ATG:

XPTVPSALPXKPLGXSTSVSXKGPMLKXNXXLSSGKXVWPQGXDENQFVAVTSTNAAKIFNLXPXKGENNCGF

Der Klon zeigt 85 %ige Homologie (438/505) zur cDNA eines Ulip-Homologs der Maus (X87817). Translation des Klons ab der EcoR1-Schnittstelle ergibt nur ein kurzes Peptid aus 8 Aminosäuren. Translation des Klons ab einem internen Startkodon bei 148 bp (fett markiert) identifiziert eine Aminosäuresequenz, die zu 51 % (43/84) dem menschlichen Dihydropyrimidinase-ähnlichen-Protein-3(DRP-3/Ulip) ähnlich ist.

Klon 31/3.6

Nukleinsäuresequenz:

7. Literaturverzeichnis

- Adams, R., Sato, K., Shimada, S., Tohyama, M., Püschel, A.W., und Betz, H. (1995). Gene Structure and Glial Expression of the Glycine Transporter GlyT1 in Embryonic and Adult Rodents. *J Neurosci* **15**, 2524-2532.
- Aderem, A. (1992a). The MARCKS Brothers: A Family of Protein Kinase C Substrates. *Cell* **71**, 713-716.
- Aderem, A. (1992b). Signal transduction and the actin cytoskeleton: the roles of MARCKS and profilin. *TIBS* **17**, 438-443.
- Ahamad, F.J., Echeverri, C.J., Vallee, R.B., und Baas, P.W. (1998). Cytoplasmic Dynein and Dynactin Are Required for the Transport of Microtubules into the Axon. *J Cell Biol* **140**, 391-401.
- Ahn, J., Mundigl, O., Muth, T.R., Rudnick, G., und Caplan, M.J. (1996). Polarized Expression of GABA Transporters in Madin-Darby Canine Kidney Cells and Cultured Hippocampal Neurons. *J Biol Chem* **271**, 6917-6924.
- Albert, K.A., Nairn, A.C., und Greengard, P. (1987). The 87k protein, a major specific substrate for protein kinase C: purification from bovine brain and characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 7046-7050.
- Albrecht U, , Radwan, A., Rätz, B., Hattori, M., Aoki, J., Arai, H., Inoue, K., und Eichele, G. (1996). Platelet-Acivating Factor Acetylhydrolase Expression and Activity Suggest a Link between Neuronal Migration and Platelet-Acivating Factor. *Dev Biol* **180**, 579-593.
- Allen, L.-A.H. und Aderem, A. (1995). Protein kinase C regulates MARCKS cycling between the plasma membrane and lysosomes in fibroblasts. *EMBO* **14**, 1109-1121.
- Altschul, S.F., Madden, T.M., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Anderson, G.M. und Horne, W.C. (1992). Activators of protein kinase C decrease serotonin transport in human platelets. *Biochim Biophys Acta* **1137**, 331-337.
- Apparsundaram, S., Galli, A., DeFelice, L.J., Hartzell, H.C., und Blakely, R.D. (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.
- Arbuzova, A., Murray, D., und McLaughlin, S. (1998). MARCKS, membranes, and calmodulin: kinetics of their interaction. *Biochim Biophys Acta* **1376**, 369-379.
- Arriza, J.L., Kavanaugh, M.P., Fairman, W.A., Wu, Y., Murdoch, G.H., North, R.A., und Amara, S.G. (1993). Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family. *J Biol Chem* **268**, 15329-15332.
- Attwell, D., Barbour, B., und Szatkowski, M. (1993). Nonvesicular Release of Neurotransmitter. *Neuron* **11**, 401-407.
- Auerbach, G., Herrmann, A., Gütlich, M., Fischer, M., Jacob, U., Bacher, A., und Huber, R. (1997). The 1.25 Å crystal structure of sepiapterin reductase reveals its binding mode to pterins and brain neurotransmitters. *EMBO* **16**, 7219-7230.

- Bal, N., Figueras, G., Vilaro, M.T., Sunol, C., und Artigas, F. (1997). Antidepressant drugs inhibit a glial 5-hydroxytryptamine transporter in rat brain. *Eur J Neurosci* **9**, 1728-1738.
- Balestrieri, M.L., Servillo, L., und Lee, T.-C. (1997). The Role of Platelet-activation Factor-dependent Transacetylase in the Biosynthesis of 1-Acyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine by Stimulated Endothelial Cells. *J Biol Chem* **272**, 17431-17437.
- Balkovetz, D.F., Tirupathi, C., Leibach, F.H., Mahesh, V.B., und Ganapathy, V. (1989). Evidence for an imipramine-sensitive serotonin transporter in human placental brush-border membranes. *J Biol Chem* **264**, 2195-2198.
- Balsinde, J. und Dennis, E.A. (1997). Function and Inhibition of Intracellular Calcium-independent Phospholipase A₂. *J Biol Chem* **272**, 16096-16072.
- Barker, E., Kimmel, H., und Blakely, R. (1994). Chimeric human and rat serotonin transporters reveal domains involved in recognition of transporter ligands. *Molecular Pharmacology* **46**, 799-807.
- Baukowitz, T., Schulte, U., Oliver, D., Herlitze, S., Krauter, T., Tucker, S.J., Ruppertsberg, J.P., und Fakler, B. (1998). PIP₂ and PIP as Determinants for ATP Inhibition of K_{ATP} Channels. *Science* **282**, 1141-1144.
- Belin, M.F., Nanopoulos, D., Didier, M., Aguera, M., Steinbusch, H., Verhofstad, A., Maetre, M., und Pujol, J.F. (1983). Immunohistochemical Evidence for the Presence of α -Aminobutyric Acid and Serotonin in One Nerve Cell. A Study of the Raphe Nuclei of the Rat Using Antibodies to Glutamate Decarboxylase and Serotonin. *Brain Res* **275**, 329-339.
- Bengel, D., Murphy, D.L., Andrews, A.M., Wichems, C.H., Feltner, D., Heils, A., Mossner, R., Westphal, H., und Lesch, K.-P. (1996). Targeted disruption of the murine serotonin transporter gene. *Soc Neurosci Abstr* **1**:508.(Abstract)
- Benveniste, J. (1974). Platelet-activating factor, a new mediator of anaphylaxis and immune complex deposition from rabbit and human basophils. *Nature* **249**, 581-582.
- Bergeron, R., Meyer, T.M., Coyle, J.T., und Greene, R.W. (1998). Modulation of N-methyl-D-Aspartate receptor function by glycine transport. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 15730-15734.
- Biessen, E., Horn, A., Robillard, G. (1990). Partial purification of the 5-hydroxytryptamine-reuptake system from human blood platelets using a citalopram-derived affinity resin. *Biochemistry* **29**, 3349-3354.
- Blackshear, P.J. (1993). The MARCKS family of cellular protein kinase substrates. *J Biol Chem* **268**, 1501-1504.
- Blackshear, P.J., Verghese, G.M., Johnson, J.D., Haupt, D.M., und Stumpo, D.J. (1992). Characteristics of the F52 Protein, a MARCKS Homologue. *J Biol Chem* **267**, 13540-13546.
- Blakely, R., Berson, H.E., Freneau, R.T., Caron, M.G., Peek, M., Bradley, H.K., und Prince, C.C. (1991). Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain. *Nature* **354**, 66-70.
- Blakely, R.D., Ramamoorthy, S., Schroeter, S., Qian, Y., Apparsundaram, S., Galli, A., und DeFelice, L.J. (1998). Regulated phosphorylation and trafficking of antidepressant-sensitive serotonin transporter proteins. *Biol Psychiatry* **44**, 196-178.
- Blue, M.E. und Parnavelas, J.G. (1983). The formation and maturation of synapses in the visual cortex of the rat. *J Exp Biol* **12**, 599-616.
- Boadle-Biber, M.C. (1993). Regulation of serotonin synthesis. *Prog Biophys Mol Biol* **60**, 1-15.

- Bredt, D.S. (1998). Sorting out genes that regulate epithelial and neuronal polarity. *Cell* **94**, 691-694.
- Briley, M.S., Langer, S.Z., Raisman, R., Sechter, D., and Zarifian, E. (1980). Tritiated Imipramine Binding Sites Are Decreased in Platelets of Untreated Depressed Patients. *Science* **209**, 303-305.
- Bruning, G. and Liangos, O. (1997). Transient expression of the serotonin transporter in the developing mouse thalamocortical system. *Acta Histochemica* **99**, 117-121.
- Budnik, V., Wu, C.F., and White, K. (1989). Altered branching of serotonin-containing neurons in *Drosophila* mutants unable to synthesize serotonin and dopamine. *J Neurosci* **9**, 2866-2877.
- Buratowski, S., Hahn, S., Sharp, P.A., and Guarente, L. (1988). Function of a yeast TATA element-binding protein in a mammalian transcription system. *Nature* **334**, 37-42.
- Burckhardt, J.K., Echeverri, C.J., Nilsson, T., and Vallee, R.B. (1997). Overexpression of the Dynamitin (p50) Subunit of the Dynactin Complex Disrupts Dynein-dependent Maintenance of Membrane Organelle Distribution. *J Cell Biol* **139**, 469-484.
- Burton, L.D., Kippenberger, A.G., Lingen, B., and Christie, D.L. (1998). A variant of the bovine noradrenaline transporter reveals the importance of the C-terminal region for correct targeting to the membrane and functional expression. *Biochem J* **330**, 909-914.
- Butz, S., Okamoto, M., and Sudhof, T.C. (1998). A tripartite protein complex with the potential to couple synaptic vesicle exocytosis to cell adhesion in brain. *Cell* **94**, 773-782.
- Carraway, R.E., Cochrane, D.E., Granier, C., Kitabgi, P., Leeman, E., and Singer, E.A. (1984). Parallel secretion of endogenous 5-hydroxytryptamine and histamine from mast cells stimulated by vasoactive peptides and compound 48 / 80. *Br J Pharmacol* **81**, 227-229.
- Cases, O., Seif, I., Grisby, J., Gaspar, P., Chen, K., Pournin, S., Müller, U., Aguet, M., Babinet, C., Shih, J-C., and De Maeyer, E. (1995). Aggressive Behavior and Altered Amounts of Brain Serotonin and Norepinephrine in Mice Lacking MAOA. *Science* **268**, 1763-1766.
- Cases, O., Vitalis, T., Seif, I., De Maeyer, E., Sotelo, C., and Gaspar, P. (1996). Lack of Barrels in the Somatosensory Cortex of Monoamine Oxidase A-Deficient Mice: Role of a Serotonin Excess during the Critical Period. *Neuron* **16**, 297-307.
- Cazzola, M. and Matera, M.G. (2000). 5-HT modifiers as a potential treatment of asthma. *TIPS* **21**, 13-16.
- Centemeri, C., Colli, S., Tosarello, D., Ciceri, P., and Nicosia, S. (1999). Heterogeneous Platelet-Activating Factor (PAF) Receptors and Calcium Increase in Platelets and Macrophages. *Biochem Pharmacol* **57**, 263-271.
- Chang, A.S., Chang, S.M., Starnes, D.M., Schroeter, S., Bauman, A.L., and Blakely, R.D. (1996). Cloning and expression of the mouse serotonin transporter. *Mol Brain Res* **43**, 185-192.
- Chang, A.S., Starnes, D.M., and Chang, S.M. (1998). Possible Existence of Quaternary Structure in the High-Affinity Serotonin Transport Complex. *BBRC* **249**, 416-421.
- Chang, S., Hemmings, H.C.Jr., and Aderem, A. (1996). Stimulus-dependent Phosphorylation of MacMARCKS, a Protein Kinase C Substrate, in Nerve Termini and PC12 Cells. *J Biol Chem* **271**, 1174-1178.
- Chen, C. and Okayama, H. (1987). High efficiency transforming of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol and Cell Biol* **7**, 2745-2752.

- Chen, J.-G. und Rudnick, G. (2000). Permeation and gating residues in serotonin transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 1044-1049.
- Chen, J.G., Liu-Chen, S., und Rudnick, G. (1998). Determination of External Loop Topology in the Serotonin Transporter by Site-directed Chemical Labeling. *J Biol Chem* **273**, 12675-12681.
- Chen, J.G., Sachpatzidis, A., und Rudnick, G. (1997). The third transmembrane domain of the serotonin transporter contains residues associated with substrate and cocaine binding. *J Biol Chem* **272**, 28321-28327.
- Connors, K. A. (1987). *Binding Constants: The Measurement of molecular Complex Stability*. John Wiley and Sons, New York.
- Coppen, A. (1967). The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry* **113/504**, 1237-1264.
- Corey, J.L., Davidson, N., Lester, H.A., Brecha, N., und Quick, M.W. (1994a). Protein Kinase C Modulates the Activity of a Cloned α -Aminobutyric Acid Transporter Expressed in *Xenopus* Oocytes via Regulated Subcellular Redistribution of the Transporter. *J Biol Chem* **269**, 14759-14767.
- Corey, J.L., Quick, M.W., Davidson, N., Guastella, H., und Lester, J. (1994). A cocaine-sensitive *Drosophila* serotonin transporter: Cloning, expression, and electrophysiological characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 1188-1192.
- Corradin, S., Ransijn, A., Corradin, G., Roggero, M.A., Schmitz, A.A.P., Schneider, P., Mauël, J., und Vergères, G. (1999). Marcks-related Protein (MRP) Is a Substrate for the *Leishmania major* Surface Protease Leishmanolysin (gp 63). *J Biol Chem* **274**, 25411-25418.
- D'Amato, R.J., Blue, M.E., Largent, B.L., Lynch, D.R., Ledbetter, D.J., Molliver, M.E., und Snyder, S.H. (1987). Ontogeny of the serotonergic projection to rat neocortex: Transient expression of a dense innervation to primary sensory areas. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 4322-4326.
- de Rouvroit, C.L. und Goffinet, A.M. (1998). The reeler mouse as a model of brain development. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **17**, 1-127.
- de Rouvroit, C.L. und Goffinet, A.M. (1998). A New View of Early Cortical Development. *Biochem Pharmacol* **56**, 1403-1409.
- De Vitry, F., Hamon, M., Catelon, J., Dubois, M., und Thibault, J. (1986). Serotonin initiates and autoamplifies its own synthesis during mouse central nervous system development. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 8629-8633.
- Dean, B., Opeskin, K., Pavey, G., Naylor, L., Hill, C., Keks, N., und Copolov, D.L. (1995). [3H]paroxetine binding is altered in the hippocampus but not the frontal cortex or caudate nucleus from subjects with schizophrenia. *J Neurochem* **64**, 1197-1202.
- Demopoulos, C.A., Pinckard, R.N., und Hanahan, D.J. (1979). Platelet-Activating Factor. *J Biol Chem* **254**, 9355-9358.
- Dieker, H., Edwards, R.H., ZuRhein, G., Chou, S.M., Hartman, H.A., und Opitz, J.M. (1969). The lissencephaly syndrome. *Birth Defects Original Article Series* **5**, 53-64.
- Dobyns, W.B. (1987). Developmental aspects of lissencephaly and the lissencephaly syndromes. *Birth Defects Original Article Series* **23**, 225-241.
- Edwards, R.H. (1992). The transport of neurotransmitters into synaptic vesicles. *Curr Biol* **2**, 586-594.

- Elzagallaai, A., Rosé, S.D., und Trifaró, J.-M. (1998). Platelet secretion induced by PKC activation is mediated through phosphorylation of MARCKS. *Soc Neurosci Abstr* #487.
- Erusalimsky, J.D., Brooks, S.F., Herget, T., Morris, C., und Rozengurt, E. (1991). Molecular cloning and characterization of the acidic 80-kd protein kinase C substrate from rat brain. Identification as a glycoprotein. *J Biol Chem* **266**, 7073-7080.
- Fairman, W.A., Vandenberg, R.J., Arriza, J.L., Kavanaugh, M.P., und Amara, S.G. (1995). An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* **375**, 599-603.
- Feldman, R.S. und Quenter, L.F. (1984). Serotonin. In *Fundamentals of Neuropsychopharmacology* (S. 207-258). Sinauer Association, Inc.
- Fujimiuya, M., Kimura, H., und Maeda, T. (1986). Postnatal Development of Serotonin Nerve Fibers in the Somatosensory Cortex of Mice Studied by Immunohistochemistry. *J Comp Neurol* **246**, 191-201.
- Gainetdinov, R.R., Wetsel, W., Jones, S.R., Levin, E.D., Jaber, M., und Caron, M.G. (1999). Role of Serotonin in the Paradoxical Calming Effect of Psychostimulants on Hyperactivity. *Science* **283**, 397-401.
- Galli, A., Blakely, R.D., und DeFelice, L.J. (1998). Patch-clamp and amperometric recordings from norepinephrine transporters: channel activity and voltage-dependent uptake. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 13260-13265.
- Galli, A., Petersen, C.I., deBlaquiere, M., Blakely, R.D., und DeFelice, L.J. (1997). Drosophila Serotonin Transporters Have Voltage-Dependent Uptake Coupled to a Serotonin-Gated Ion Channel. *J Neurosci* **17**, 3401-3411.
- Garcia-Higuera, I., Fenoglio, J., Li, Y., Panchenko, M.P., Reiner, O., Smith, T.F., und Neer, E.J. (1996). Folding of proteins with WD-repeats: comparison of six members of the WD-repeat superfamily to the G protein beta subunit. *Biochemistry* **44**, 13985-13994.
- Gasnier, B. (2000). The loading of neurotransmitters into synaptic vesicles. *Biochimie* **82**, 327-337.
- Glaser, M., Wanaski, S., Buser, C.A., Boguslavsky, V., Rashidzada, W., Morris, A., Rebecchi, M., Scarlata, S.F., Runnels, L.W., Prestwich, G.D., Chen, J., Aderem, A., Ahn, J., und McLaughlin, S. (1996). Myristoylated Alanine-rich C Kinase Substrate (MARCKS) Produces Reversible Inhibition of Phospholipase C by Sequestering Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate in Lateral Domains. *J Biol Chem* **271**, 26187-26193.
- Glazer, E.J. und Basbaum, A.I. (1984). Axons which take up [³H]serotonin are presynaptic to enkephalin immunoreactive neurons in cat dorsal horn. *Brain Res* **298**, 386-391.
- Goffinet, A.M. (1984). Events governing organization of postmigratory neurons: Studies on brain development in normal and reeler mice. *Brain Res Rev* **7**, 261-296.
- Goldman, D. (1996). High anxiety. *Science* **274**, 1483-1480.
- Goldowitz, D., Cushing, R.C., Laywell, E., D'Arcangelo, G., Sheldon, M., Sweet, H.O., Davisson, M., Steindler, D., und Curran, T. (1997). Cerebellar disorganization characteristic of reeler in scrambler mutant mice despite presence of reelin. *J Neurosci* **17**, 8769-8777.
- Gonzales, J.L., Russo, C.J., Goldowitz, D., Sweet, H.O., Davisson, M.T., und Walsh, C.A. (1997). Birthdate and cell marker analysis of scrambler: A novel mutation affecting cortical development with a reeler-like phenotype. *J Neurosci* **17**, 9204-9211.

- Gorman, C.M., Gies, D., McCray, G., und Huang, M. (1989). The human cytomegalovirus major immediate early promoter can be trans-activated by adenovirus early proteins. *Virology* **17**, 377-385.
- Graff, J.M., Gordon, J.I., und Blackshear, P.J. (1989a). Myristoylated and non-myristoylated forms of a protein are phosphorylated by protein kinase C. *Science* **246**, 503.
- Graff, J.M., Young, T.N., Johnson, J.D., und Blackshear, P.J. (1989b). Phosphorylation-regulated calmodulin binding to a prominent cellular substrate for protein kinase C. *J Biol Chem* **264**, 21818-21823.
- Gu, H.H. (1996). Cell-specific sorting of biogenic amine transporters expressed in epithelial cells. *J Biol Chem* **271**, 18100-18106.
- Guastella, J., Brecha, N., Weigman, C., Lester, H., und Davidson, N. (1992). Cloning, expression, and localization of a rat brain high-affinity glycine transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 7189-7193.
- Guastella, J., Nelson, N., Nelson, H., Czyzyk, L., Keynan, S., Miedel, M.C., Davidson, N., Lester, H.A., und Kanner, B.I. (1990). Cloning and Expression of a Rat Brain GABA Transporter. *Science* **249**, 1303-1306.
- Hanahan, D.J. (1986). Platelet activating factor: a biologically active phosphoglyceride. *Annu Rev Biochem* **55**, 483-509.
- Hansson, S.R., Cabrera-Vera, T.M., und Hoffman, B.J. (1998). Infraorbital nerve transection alters serotonin transporter expression in sensory pathways in early postnatal rat development. *Brain Res Dev Brain Res* **7**, 305-314.
- Hansson, S.R., Mezey, E., und Hoffman, B.J. (1999). Serotonin transporter messenger RNA expression in neural crest-derived structures and sensory pathways of the developing rat embryo. *Neuroscience* **89**, 243-265.
- Harlan, D.M., Graff, J.M., Stumpo, D.J., Eddy, R.L.Jr., Shows, T.B., Boyle, J.M., und Blackshear, P.J. (1991). The human myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) gene (MACS). Analysis of its gene product, promoter, and chromosomal localization. *J Biol Chem* **266**, 14399-14405.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., und Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-816.
- Hartwig, H.J., Thelen, M., Rosen, A., Jammey, P.A., Nairn, A.C., und Aderem, A. (1992). MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* **356**, 618-622.
- Hattori, K., Hattori, M., Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H., und Inoue, K. (1995a). Purification and characterization of platelet-activating factor acetylhydrolase II from bovine liver cytosol. *J Biol Chem* **270**, 22308-22313.
- Hattori, M., Adachi, H., Aoke, J., Tsujimoto, M., Arai, H., und Inoue, K. (1995b). Cloning and Expression of a cDNA Encoding the α -Subunit (30-kDa Subunit) of Bovine Brain Platelet-activation Factor Acetylhydrolase. *J Biol Chem* **270**, 31345-31352.
- Hattori, M., Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H., und Inoue, K. (1994a). The Catalytic Subunit of Bovine Brain Platelet-activating Factor Acetylhydrolase Is a Novel Type of Serine Esterase. *J Biol Chem* **269**, 23150-23155.
- Hattori, M., Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H., und Inoue, K. (1994b). Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* **370**, 216-218.

- Hattori, M., Arai, H., und Inoue, K. (1993). Purification and characterization of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* **268**, 18748-18753.
- Hebert, D.N. und Carruthers, A. (1991). Cholate-Solubilized Glucose Transporters Exist as a Mixture of Homodimers and Homotetramers. *Biochemistry* **30**, 4654-4658.
- Hebert, D.N. und Carruthers, A. (1992). Glucose Transporter Oligomeric Structure Determines Transporter Function. *J Biol Chem* **267**, 23829-23838.
- Heinrich, D.N., Hippus, H., und Pöldinger, W. (1991). *Serotonin - ein funktioneller Ansatz für die psychiatrische Diagnose und Therapie?* Springer, Heidelberg.
- Henry, J.P., Botton, D., Sagne, C., Lambert, M.F., Desnos, C., Blanchard, V., Raisman-Vozari, R., Krejci, E., Massoulie, J., und Gasnier, B. (1994). Biochemistry and molecular biology of the vesicular monoamine transporter from chromaffin granules. *J Exp Biol* **196**, 251-262.
- Henson, P.M. (1970). Release of vasoactive amines from rabbit platelets induced by sensitized mononuclear leukocytes and antigen. *J Exp Med* **131**, 287-306.
- High, S., Lecomte, F.J., Russell, S.J., Abell, B.M., und Oliver, J.D. (2000). Glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum: a tale of three chaperones? *FEBS Letters* **476**, 38-41.
- Hinrichsen, R.D. und Blackshear, P.J. (1993). Regulation of peptide-calmodulin complexes by protein kinase C in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 1585-1589.
- Hirotsune, S., Fleck, M.W., Gambello, M.J., Bix, G.J., Chen, A., Clark, G.D., Ledbetter, D.H., McBain, C.J., und Wynshaw-Boris, A. (1998). Graded reduction of PAFAH1b1 (Lis1) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Nature Genetics* **19**, 333-339.
- Ho, Y.S., Swenson, L., Derewenda, U., Serre, L., Wei, Y., Dauter, Z., Hattori, M., Adachi, T., Aoki, J., Arai, H., Inoue, K., und Derewenda, Z.S. (1997). Brain acetylhydrolase that inactivates platelet-activating factor is a G-protein-like trimer. *Nature* **385**, 89-93.
- Hoffman, B.J., Hansson, S.R., Hunyady, B., und Mezey, E. (1997). Localization of a serotonin transporter in epithelial and endocrine cells of the stomach and intestine. *Gastroenterology* **112**, A1155-A1150.
- Hoffman, B.J., Mezey, E., und Brownstein, M.J. (1991). Cloning of a Serotonin Transporter Affected by Antidepressants. *Science* **254**, 579-580.
- Honda, Z-I., Motonao, N., Miki, I., Minami, M., Watanabe, T., Seyama, Y., Okado, H., Toh, H., Ito, K., Miyamoto, T., und Shimizu, T. (1991). Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung. *Nature* **349**, 342-344.
- Huff, R.A., Vaughan, R.A., Kuhar, M.J., und Uhl, G.R. (1997). Phorbol Esters Increase Dopamine Transporter Phosphorylation and Decrease Transport V_{max} . *J Neurochem* **68**, 225-232.
- Hwang, S.-W. (1990). Specific receptors of platelet-activating factor, receptor heterogeneity and signal transduction mechanisms. *J Lipid Mediators* **2**, 123-158.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., und White, T.J. (1990). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego.
- Jayanthi, L., Ramamoorthy, S., Mahesh, V.M., Leibach, F.H., und Ganapathy, V. (1994). Calmodulin-dependent Regulation of the Catalytic Function of the Human Serotonin Transporter in Placental Choriocarcinoma Cells. *J Biol Chem* **269**, 14424-14429.

- Jess, U., Betz, H., und Schloss, P. (1996). The membrane-bound rat serotonin transporter, SERT1, is an oligomeric protein. *FEBS Letters*
- Joh, T.H., Shikimi, T., Pickel, V.M., und Reis, D.J. (1957). Brain tryptophan hydroxylase: purification of, production of antibodies to, and cellular and ultrastructural localization in serotonergic neurons of rat midbrain. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**, 3575-3579.
- Jones, S.R., Gainetdinov, R.R., Wightman, R.M., und Caron, M.G. (1998). Mechanisms of Amphetamine Action Revealed in Mice Lacking the Dopamine Transporter. *J Neurosci* **18**, 1979-1986.
- Kaech, S.M., Whitfield, C.W., und Kim, S.K. (1998). The LIN-2/LIN-7/LIN-10 complex mediates basolateral membrane localization of the *C. elegans* EGF receptor LET-23 in vulval epithelial cells. *Cell* **94**, 761-771.
- Kanai, Y. und Hediger, M.A. (1992). Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* **360**, 464-467.
- Kanner, B.I. (1996). Structure and Function in Glutamate Transporters. *Biochemical Society Transactions* **24** 843-846.
- Karasawa, K., Qin, X., und Lee, T.-C. (1999). Purification and Characterization from Rat Kidney Membranes of a Novel Platelet-activation Factor (PAF)-dependent Transacetylase That Catalyzes the Hydrolysis of PAF, Formation of PAF Analogs and C₂-ceramide. *J Biol Chem* **274**, 8655-8661.
- Karpouza, A.P. und Vakirtzi-Lemonias, C. (1997). The platelet-activating factor acetylhydrolase of mouse platelets. *Biochim Biophys Acta* **1323**, 12-22.
- Kato, K., Clark, G.D., Bazan, N.G., und Zorumski, C.F. (1994). Platelet-activating factor as a potential retrograde messenger in CA1 hippocampal long-term potentiation. *Nature* **367**, 175-179.
- Katoh, S., Sueoka, T., und Yamada, S. (1982). Direct inhibition of brain sepiapterin reductase by a catecholamine und an indoleamine. *BBRC* **105**, 75-81.
- Keyes, S. und Rudnick, G. (1982). Coupling of transmembrane proton gradients to platelet serotonin transport. *J Biol Chem* **257**, 1172-1176.
- Kilic, F. und Rudnick, G. (2000). Oligomerization of serotonin transporter und its functional consequences. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 3106-3111.
- Kim, J., Shishido, T., Jiang, X., Aderem, A., und McLaughlin, S. (1994). Phosphorylation, High Ionic Strength, und Calmodulin Reverse the Bindung of MARCKS to Phospholipid Vesicles. *J Biol Chem* **269**, 28214-28219.
- Kirby, M.L. und Waldo, K.L. (1995). Neural crest und cardiovascular patterning. *Circulation Res* **77**, 211-215.
- Kirsch, J., Wolters, I., Triller, A., und Betz, H. (1993). Gephyrin antisense oligonucleotides prevent glycine receptor clustering in spinal neurons. *Nature* **366**, 745-748.
- Kitayama, S., Dohi, T., und Uhl, G.R. (1994). Phorbol esters alter functions of the expressed dopamine transporter. *Eur J Pharmacol* **268**, 115-119.
- Kitly, J.E., Lorang, D., und Amara, S.G. (1991). Cloning und Expression of a Cocaine-Sensitive Rat Dopamine Transporter. *Science* **254**, 578-579.
- Kleckner, N.W. und Dingledine, R. (1988). Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* **241**, 835-837.

- Klemm, P., Hecker, M., Stockhausen, H., Wu, C.C., und Thiernemann, C. (1995). Inhibition by N-acetyl-5-hydroxytryptamine of nitric oxide synthase expression in cultured cells and in the anaesthetized rat. *Br J Pharmacol* **115**, 1175-1181.
- Kornecki, E. und Ehrlich, Y.H. (1988). Neuroregulatory and Neuropathological Actions of the Ether-Phospholipid Platelet-Activating Factor. *Science* **240**, 1792-1794.
- Kosofsky, B.E. und Molliver, M.E. (1987). The Serotonergic Innervation of Cerebral Cortex: Different Classes of Axon Terminals Arise From Dorsal and Median Raphe Nuclei. *Synapse* **1**, 153-168.
- Kreegipuu, A., Blom, N., und Brunak, S. (1999). PhosphoBase, a database of phosphorylation sites: release 2.0. *Nucleic Acids Res* **27**, 237-239.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels. *J Biochem Biophys Meth* **10**, 203-209.
- Lalioi, M., Chen, H., Rossier, C., Shafaatian, R., Reid, J.D., und Antonarakis, S.E. (1996). Cloning the cDNA of Human *PWP2*, Which Encodes a Protein with WD Repeats and maps to 21q22.3. *Genomics* **35**, 321-327.
- Lauder, J.M. (1993). Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *Trends Neurosci* **16**, 233-240.
- Lauder, J.M., Tamir, H., und Sadler, T.W. (1988). Serotonin and morphogenesis. I. Sites of serotonin uptake and -binding protein immunoreactivity in the midgestation mouse embryo. *Development* **102**, 709-720.
- Lavdas, A.A., Blue, M.E., Lincoln, J., und Parnavelas, J.G. (1997). Serotonin Promotes the Differentiation of Glutamate Neurons in Organotypic Slice Cultures of the Developing Cerebral Cortex. *J Neurosci* **17**, 7872-7880.
- Lebrand, C., Cases, O., Adelbrecht, C., Doye, A., Alvarez, C., El Mestikawy, S., Seif, I., und Gaspar, P. (1996). Transient Uptake and Storage of Serotonin in Developing Thalamic Neurons. *Neuron* **17**, 823-835.
- Lebrand, C., Cases, O., Wehrlé, R., Blakely, R., Edwards, E., und Gaspar, P. (1998). Transient Developmental Expression of Monoamine Transporters in the Rodent Forebrain. *J Comp Neurol* **401**, 506-524.
- Lee, S.L., Wang, W.W., Finlay, G.A., und Fanburg, B.L. (1999). Serotonin stimulates mitogen-activated protein kinase activity through the formation of superoxide anion. *Am J Physiol* **277**, L282-291.
- Lee, T.-C., Ou, M.-C., Shinozake, K., Malone, B., und Snyder, F. (1996). Biosynthesis of N-Acetylsphingosine by Platelet-activating Factor: Sphingosine CoA-independent Transacetylase in HL-60 Cells. *J Biol Chem* **271**, 209-217.
- Lee, T.-C., Uemura, Y., und Snyder, F. (1992). A Novel CoA-independent Transacetylase Produces the Ethanolamine Plasmalogen and Acyl Analogs of Platelet-activation Factor (PAF) with PAF as the Acetate Donor in HL-60 Cells. *J Biol Chem* **267**, 19992-20001.
- Lesch, K.P., Bengel, D., Heils, A., Sabol, S.Z., Greenberg, B.D., Petri, S., Benfamin, J., Müller, C.R., Hamer, D.H., und Murphy, D.L. (1996). Association of Anxiety-Related Traits with a Polymorphism in the Serotonin Transporter Gene Regulatory Region. *Science* **274**, 1527-1530.
- Lester, H.A., Cao, Y., Mager, S. (1996). Listening to Neurotransmitter Transporters. *Neuron* **17**, 807-810.
- Lester, H.A., Mager, S., Quick, M.W., und Corey, J.L. (1994). Permeation Properties of Neurotransmitter Transporters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **34**, 219-249.

- Levi, G. und Raiteri, M. (1993). Carrier-mediated release of neurotransmitters. *Trends Neurosci* **16**, 415-419.
- Li, J. und Aderem, A. (1992). MacMARCKS, a Novel Member of the MARCKS Family of Protein Kinase C Substrates. *Cell* **70**, 791-801.
- Li, T., Clives, H., Sham, P.C., Vallada, H., Birkett, J., Kirov, G., Lesch, K.P., Powell, J., Lovestone, S., und Collier, D. (1997). Allelic functional variation of serotonin transporter expression is a susceptibility factor for late onset Alzheimer's disease. *Neuroreport* **8**, 683-686.
- Liu, Q.-R., López-Corcuera, B., Mandiyan, S., Nelson, H., und Nelson, N. (1993). Molecular Characterization of Four Pharmacologically distinct \square -Aminobutyric Acid Transporters in Mouse Brain. *J Biol Chem* **268**, 2106-2112.
- Liu, Q., Nelson, H., Mandiyan, S., López-Corcuera, B., und Nelson, N. (1992). Cloning and Expression of a glycine transporter from mouse brain. *FEBS* **305**, 110-114.
- Liu, Y.H., Huang, F., Fei, J., Zhao, J.X., Gu, Q.B., Schwarz, W., und Guo, L.H. (1998). Val 70, Phe 72 and the last seven amino acid residues of the C-terminal are essential to the function of the norepinephrine transporter. *Cell Res* **8**, 311-315.
- Lobach, D.F., Rochelle, J.M., Watson, M.L., Seldin, M.F., und Blackshear, P.J. (1993). Nucleotide Sequence, Expression, and Chromosomal Mapping of *Mrp* and Mapping of Five Related Sequences. *Genomics* **17**, 194-204.
- Lowenstein, J. und Snyder, S.H. (1992). Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* **70**, 705-707.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., und Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
- Lu, D., Yang, H., Lenox, R.H., und Raizada, M.K. (1998). Regulation of Angiotensin II-induced Neuromodulation by MARCKS in Brain Neurons. *J Cell Biol* **142**, 217-227.
- Mabjeesh, N.J. und Kanner, B.I. (1991). Neither the Amino- nor Carboxyl-Termini Are Required for Function of the Sodium- and Chloride-coupled \square -Aminobutyric Acid Transporter from Rat Brain. *J Biol Chem* **267**, 2563-2568.
- Mager, S., Min, C., Henry, D.J., Chavkin, C., Hoffmann, B.J., Davidson, N., und Lester, H.A. (1994). Conducting States of a Mammalian Serotonin Transporter. *Neuron* **12**, 845-859.
- Manya, H., Aoki, J., Kato, H., Ishii, I., Hino, S., Arai, H., und Inoue, K. (1999). Biochemical characterization of various catalytic complexes of the brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* **274**, 31827-31832.
- Manya, H., Aoki, J., Watanabe, M., Adachi, T., Asou, H., Inoue, Y., Arai, H., und Inoue, K. (1998). Switching of platelet-activating factor acetylhydrolase catalytic subunits in developing rat brain. *J Biol Chem* **273**, 18567-18572.
- Marletta, M.A. (1994). Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* **78**, 927-930.
- Mayser, W., Betz, H., und Schloss, P. (1991). Isolation of cDNAs encoding a novel member of the neurotransmitter transporter gene family. *FEBS Letters* **295**, 203-6.
- Mc Laughlin, S. und Aderem, A. (1995). The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *TIBS* **20**, 272-276.

- McNeil, R.S., Swann, J.W., Brinkley, B.R., and Clark, G.D (1999). Neuronal cytoskeletal alterations evoked by a platelet-activating factor (PAF) analogue. *Cell Motil Cytoskeleton* **43**, 99-113.
- Melvin, D.R., Marsh, B.J., Walmsley, A.R., James, D.E., and Gould, G.W. (1999). Analysis of Amino And Carboxy Terminal GLUT4 Targeting Motifs in 3T3-L1 Adipocytes Using an Endosomal Ablation Technique. *Biochemistry* **38**, 1456-1462.
- Michielin, O., Ramsden, J.J., and Vergeres, G. (1998). Unmyristoylated MARCKS-related protein (MRP) binds to supported planar phosphatidylcholine membranes. *Biochim Biophys Acta* **1375**, 110-116.
- Miller, J.Q. (1963). Lissencephaly in 2 siblings. *Exp Neurology* **4**, 841-850.
- Miller, K.J. und Hoffman, B.J. (1994). Adenosine A₃ Receptors Regulate Serotonin Transport via Nitric Oxide and cGMP. *J Biol Chem* **269**, 27351-27356.
- Mortensen, O.V., Kristensen, A.S., Rudnick, G., and Wiborg, O. (1999). Molecular cloning, expression and characterization of a bovine serotonin transporter. *Brain Res Mol Brain Res* **71**, 120-126.
- Muth, T.R. und Caplan, M.J. (1998). Identification of sorting determinants in the C-terminal cytoplasmic tails of the gamma-aminobutyric acid transporters GAT-2 and GAT-3. *J Biol Chem* **273**, 25616-25627.
- Myat, M.M., Anderson, S., Allen, L.-A.H., und Aderem, A. (1997). MARCKS regulates membrane ruffling and cell spreading. *Curr Biol* **7**, 611-614.
- Myat, M.M., Chang, S., Rodriguez-Boulan, E., und Aderem, A. (1998). Identification of the basolateral targeting determinant of a peripheral membrane protein, MacMARCKS, in polarized cells. *Curr Biol* **8**, 677-683.
- Myers, C.L., Lazo, J.S., und Pitt, B.R. (1989). Translocation of protein kinase C is associated with inhibition of 5-HT uptake by cultured endothelial cells. *Am J Physiol* **257**, L253-L258.
- Nakamura, M., Honda, Z., Izumi, T., Sakanaka, C., Mutoh, H., Minami, M., Bito, H., Seyama, Y., Matsumoto, T., Noma, M., und Shimizu, T. (1991). Molecular cloning and expression of platelet-activating factor receptor from human leukocytes. *J Biol Chem* **266**, 20400-20405.
- Nakashima, L., Adachi, T., Ito, Y., Takano, T., Shimizu, T., und Nozawa, Y. (1997). Prolonged activation of phospholipase D in Chinese hamster ovary cells expressing platelet-activating-factor receptor lacking cytoplasmic C-terminal tail. *Biochem J* **327**, 239-244.
- Nelson, N. (1998). The Family of Na⁺/Cl⁻ Neurotransmitter Transporters. *J Neurochem* **71**, 1785-1803.
- Nelson, P. und Rudnick, G. (1982). The role of chloride ion in platelet serotonin transport. *J Biol Chem* **257**, 6151-6155.
- Nelson, P.J. und Rudnick, G. (1979). Coupling Between Platelet 5-Hydroxytryptamine und Potassium Transport. *J Biol Chem* **254**, 10084-10089.
- Nichol, C.A., Lee, C.L., Edelstein, M.P., Chao, J.Y., und Duch, D.S. (1983). Biosynthesis of tetrahydrobiopterin by *de novo* and salvage pathways in adrenal medulla extracts, mammalian cell cultures, and rat brain *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**, 1546-1550.
- Nicholls, D. und Attwell, D. (1990). The Release and Uptake of Excitatory Amino Acids. *TIPS* **11**, 462-468.
- Nishimune, A., Russel Nash, S., Nakanishi, S., und Henley, J.M. (1996). Detection of protein-protein interactions in the nervous system using the two-hybrid system. *Trends Neurosci* **19**, 261-266.

- O'Connor, V., El Far, O., Bofill-Cardona, E., Nonoff, C., Freissmuth, M., Karschin, A., Airas, J. M., Betz, H., Boehm, S. (1999). Calmodulin dependence of presynaptic metabotropic glutamate receptor signaling. *Science* **286**, 1180-1184
- Ohmitsu, M., Fukunaga, K., Yamamoto, H., and Miyamoto, E. (1999). Phosphorylation of myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate by mitogen-activated protein kinase in cultured rat hippocampal neurons following stimulation of glutamate receptors. *J Biol Chem* **274**, 408-417.
- Oka, Y., Asano, T., Shibasaki, Y., Lin, J.-L., Tsukuda, K., Katagiri, H., Akanuma, Y., and Takaku, F. (1990). C-terminal truncated glucose transporter is locked into an inward-facing form without transport activity. *Nature* **345**, 550-553.
- Okuda, T., Haga, T., Kanai, Y., Endou, H., Ishihara, T., and Katsura, I. (2000). Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nat Neurosci* **3**, 120-125.
- Pacholczyk, T., Blakely, R.D, and Amara, S.G. (1991). Expression Cloning of a Cocain- and Antidepressant-Sensitive Human Noradrenaline Transporter. *Nature* **350**, 350-354.
- Penado, K.M., Rudnick, G., and Stephan, M.M. (1998). Critical amino acid residues in transmembrane span 7 of the serotonin transporter identified by random mutagenesis. *J Biol Chem* **273**, 28098-28106.
- Perego, C., Vanoni, C., Villa, A., Longi, R., Kaech, S.M., Fröhli, E., Hajnal, A., Kim, S.K., and Pietrini, G. (1999). PDZ-mediated interactions retain the epithelial GABA transporter on the basolateral surface of polarized epithelial cells. *EMBO* **18**, 2384-2393.
- Persico A.M., Altamura C., Calia E., Puglisi-Allegra S., Ventura R., Lucchese F., Keller F. (2000). Serotonin depletion and barrel cortex development: impact of growth impairment vs. serotonin effects on thalamocortical endings. *Cereb Cortex* **10**, 181-191.
- Petersen, C.I. and DeFelice, L.J. (1999). Ionic interactions in the *Drosophila* serotonin transporter identify it as a serotonin channel. *Nat Neurosci* **2**, 605-610.
- Pinckard, R.N. (1979). Physicochemical and functional identity of rabbit platelet-activating factor (PAF) released in vivo during IgE anaphylaxis with PAF released in vitro from IgE sensitized basophils. *J Immunol* **123**, 1847-1857.
- Pines, G., Danbolt, N.C., Bforas, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Koepsell, H., Storm-Mathisen, J., Seeberg, E., and Kanner, B.I. (1992). Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* **360**, 464-476.
- Qian, Y., Galli, A., Rmamoorthy, S., Risso, S., De Felice, L.J., and Blakely, R.D. (1997). Protein Kinase C Activation Regulates Human Serotonin Transporters in HEK-293 Cells via Altered Cell Surface Expression. *J Neurosci* **17(1)**, 45-57.
- Radian, R., Bendahan, A., and Kanner, B.I. (1986). Purification and identification of the functional sodium- and chloride-coupled gamma-aminobutyric acid transport glycoprotein from rat brain. *J Biol Chem* **261**, 15437-15441.
- Raisman, R., Cash, R., and Agid, Y. (1986). Parkinson's disease: decreased density of ³H-Imipramine and ³H-Paroxetine binding sites in putamen. *Neurology* **36**, 556-560.
- Ramamoorthy, S., Bauman, A., Moore, K., Han, H., Yang-Feng, T., Ganapathy, V., and Blakely, R. (1993). Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: Molecular cloning, expression, and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 2542-2546.

- Ramamoorthy, S. und Blakely, R.D. (1999). Phosphorylation and Sequestration of Serotonin Transporters Differentially Modulated by Psychostimulants. *Science* **285**, 763-766.
- Ramamoorthy, S., Cool, D.R., Mahesh, V.B., Leibach, H., Melikian, H.E., Blakely, R.D., und Ganapathy, V. (1993). Regulation of the Human Serotonin Transporter. *J Biol Chem* **268**, 21626-21631.
- Rand, R.P. und Parsegian, V.A. (1986). Mimicry and mechanism in phospholipid models of membrane fusion. *Annu Rev Physiol* **48**, 201-212.
- Reiner, O., Carrozzo, R., Shen, Y., Wehnert, M., Faustinello, F., Dobyms, W.B., Caskey, C.T., und Ledbetter, D.H. (1993). Isolation of a Miller-Dieker lissencephalie gene containing G protein α -subunit-like repeats. *Nature* **364**, 717-721.
- Rongo, C., Whitfield, C.W., Rodal, A., Kim, S.K., und Kaplan, J.M. (1998). Lin-10 is a shared component of the polarized protein localization pathways in neurons and epithelia. *Cell* **94**, 751-759.
- Rudnick, G. (1977). Active transport of 5-hydroxytryptamine by plasma membrane vesicles isolated from human blood platelets. *J Biol Chem* **252**, 2170-2174.
- Rudnick, G. und Clark, J. (1993). From synapse to vesicle: the reuptake and storage of biogenic amine neurotransmitters. *Biochim Biophys Acta* **1144**, 249-263.
- Rudnick, G. und Wall, S.C. (1992a). The molecular mechanism of "ecstasy" [3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA)]: Serotonin transporters are targets for MDMA-induced serotonin release. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 1817-1821.
- Rudnick, G. und Wall, S.C. (1992b). p-Chloroamphetamine induces serotonin release through serotonin transporters. *Biochemistry* **32**, 6710-6718.
- Sakai, N., Sasaki, K., Nakashita, M., Honda, S., Ikegati, N., und Saito, N. (1997). Modulation of serotonin transporter activity by a protein kinase C activator and an inhibitor of type 1 and 2A serine / threonine phosphatases. *J Neurochem* **68**, 2618-2624.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanchez-Migallon, M.P., Aranda, F.J., und Gomez-Fernandez, J.C. (1994). Role of phosphatidylserine and diacylglycerol in the fusion of chromaffin granules with target membranes. *Arch Biochem Biophys* **314**, 205-216.
- Sapir, T., Elbaum, M., und Reiner, O. (1997). Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit. *EMBO* **16**, 6977-6984.
- Sato, K., Adams, R., Betz, H., und Schloss, P. (1995a). Modulation of a Recombinant Glycine Transporter (GLYT 1b) by Activation of Protein Kinase C. *J Neurochem* **65**, 1967-1973.
- Sato, K., Betz, H., und Schloss, P. (1995b). The recombinant GABA transporter GAT1 is downregulated upon activation of protein kinase C. *FEBS* **375**, 99-102.
- Schafer, W.R. (1999). How Do Antidepressants Work? Prospects for Genetic Analysis of Drug Mechanisms. *Cell* **98**, 551-554.
- Schloss, P. und Betz, H. (1995). Heterogeneity of antidepressant binding sites on the recombinant rat serotonin transporter SERT1. *Biochemistry* **39**, 12590-12595.

- Schloss, P., Püschel, A.W., und Betz, H. (1994). Neurotransmitter transporters: new members of known families. *Curr Biol* **6**, 595-599.
- Schloss, P. und Williams, D.C. (1998). The serotonin transporter: a primary target for antidepressant drugs. *J Psychopharmacol* **12**, 115-121.
- Schmiege, F.I. und Simmons, D.T. (1984). Intracellular location and kinetics of complex formation between simian virus 40 T antigen and cellular protein p53. *J Virol* **52**, 350-355.
- Schotland, J., Shupliakov, O., Wikström, M., Brodin, L., Srinivasan, M., You, Z.-b., Harrera-Marschitz, M., Zhang, W., Hökfelt, T., und Grillner, S. (1995). Control of lamprey locomotor neurons by colocalized monoamine transmitters. *Nature* **374**, 266-268.
- Schroeter, S., Levey, A.I., und Blakely, R.D. (1997). Polarized Expression of the Antidepressant-Sensitive Serotonin Transporter in Epinephrine-Synthesizing Chromaffin Cells of the Rat Adrenal Gland. *Mol Cell Neurosc* **9**, 170-184.
- Schuldiner, S. (1996). A molecular glimpse of vesicular monoamine transporters. *J Neurochem* **6**, 2076-2078.
- Seal, R.P., Leighton, B.H., und Amara, S.G. (2000). A model for the topology of excitatory amino acid transporters determined by the extracellular accessibility of substituted cysteines. *Neuron* **25**, 695-706.
- Seykora, J.T., Ravetch, J.V., und Aderem, A. (1991). Cloning and molecular characterization of the murine macrophage "68-kDa" protein kinase C substrate and its regulation by bacterial lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 2505-2509.
- Shafaatian, R., Payton, M.A., und Reid, J.D. (1996). PWP2, a member of the WD-repeat family of proteins, is an essential *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in cell separation. *Mol Gen Genet* **252**, 101-114.
- Shimada, S., Kitayama, S., Lin, C., Patel, A., Nanthakumar, E., Gregor, P., Kuhar, M., und Uhl, G. (1991). Cloning and Expression of a Cocaine-Sensitive Dopamine Transporter Complementary DNA. *Science* **254**, 576-578.
- Shimizu, T., Mutoh, H., und Kato, S. (1996). Platelet-activating factor receptor. Gene structure and tissue-specific regulation. *Adv Exp Med Biol* **416**, 79-84.
- Shmueli, O., Cahana, A., und Reiner, O. (1999). Platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase activity, LIS1 expression, and seizures. *J Neurosci Res* **57**, 176-184.
- Shuey, D.L., Sadler, T.W., und Lauder, J.M. (1992). Serotonin as a regulator of craniofacial morphogenesis: site specific malformations following exposure to serotonin uptake inhibitors. *Teratology* **46**, 367-378.
- Shyng, S.-L. und Nichols, C.G. (1998). Membrane Phospholipid Control of Nucleotide Sensitivity of K_{ATP} Channels. *Science* **282**, 1138-1141.
- Skagerberg, G. und Björklund, A. (1985). Topographic Principles in the Spinal Projections of Serotonergic and Non-Serotonergic Brainstem Neurons in the Rat. *Neuroscience* **15**, 445-480.
- Smicun, Y., Campbell, S.D., Chen, M.A., Gu, H., und Rudnick, G. (1999). The Role of External Loop Regions in Serotonin Transport. *J Biol Chem* **274**, 36058-36064.
- Smith, K.E., Borden, L.A., Hartig, P.R., Branchek, T., und Weinschenk, R.L. (1992). Cloning and Expression of a Glycine Transporter Reveals Colocalization with NMDA Receptors. *Neuron* **8**, 927-935.
- Sneddon, J.M. (1969). Sodium-dependent accumulation of 5-hydroxytryptamine by rat blood platelets. *Br J Pharmacol* **37**, 680-688.

- Sonders, M.S. und Amara, S.G. (1996). Channels in transporters. *Curr Opin Neurobiol* **6**, 294-302.
- Spieß, M. (1995). Heads or tails - what determines the orientation of proteins in the membrane. *FEBS Letters* **369**, 76-79.
- Spizz, G. und Blackshear, P.J. (1997). Identification and Characterization of Cathepsin B as the Cellular MARCKS Cleaving Enzyme. *J Biol Chem* **272**, 22833-22843.
- Stafforini, D.M., Numao, T., Tsodikov, A., Vaitkus, D., Fukuda, T., Watanabe, N., Fueki, N., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A., Makino, S., und Prescott, S.M. (1999). Deficiency of platelet-activating factor acetylhydrolase is a severity factor for asthma. *J Clin Invest* **103**, 989-997.
- Stafforini, D.M., Prescott, S.M., Zimmermann, G.A., und McIntyre, T.M. (1991). Platelet-activating factor acetylhydrolase activity in human tissues and blood cells. *Lipids* **26**, 979-985.
- Steinbusch, H.W.M. (1981). Distribution of Serotonin-Immunoreactivity in the Central Nervous System of the Rat - Cell Bodies and Terminals. *Neuroscience* **6**, 575-618.
- Steinbusch, H.W.M. (1984). Serotonin-immunoreactive neurons and their projections in the CNS. In *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Vol.3: Classical Transmitters and Transmitter Receptors in the CNS, Part III* (T. Björklund, T. Hökfelt, und M.J. Kuhar, Eds.) pp. 68-102. Elsevier Science
- Stephan, M.M., Chen, M.A., Penado, K.M., und Rudnick, G. (1997). An extracellular loop region of the serotonin transporter may be involved in the translocation mechanism. *Biochemistry* **36**, 1322-1328.
- Stewart, A.G. (1994). *Biological properties of platelet-activating factor.* , Academic Press, London.
- Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K., und Stoffel, W. (1992). Structure, expression, and functional analysis of a Na⁽⁺⁾-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 10955-10959.
- Sur, C., Betz, H., und Schloss, P. (1996). Immunocytochemical Detection of the Serotonin Transporter in Rat Brain. *Neuroscience* **73**, 217-231.
- Sur, C., Betz, H., und Schloss, P. (1997). A single serine residue controls the cation dependence of substrate transport by the rat serotonin transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 7639-7644.
- Sur, C., Betz, H., und Schloss, P. (1998). Distinct Effects of Imipramine on 5-Hydroxytryptamine Uptake Mediated by the Recombinant Rat Serotonin Transporter SERT1. *J Neurochem* **70**, 2545-2553.
- Tate, C. und Blakely, R.D. (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, C.G., Whiteley, E., und Betenbaugh, M.J. (1999). Molecular Chaperones Stimulate the Functional Expression of the Cocaine-sensitive Serotonin Transporter. *J Biol Chem* **274**, 17551-17558.
- Tavares de Lima, W., Steil, A.A., Russo, M., Starobinas, N., Teiceira, C.F., und Jancar, S. (1998). Lipid mediators, tumor necrosis factor and nitric oxide and their interactions in immune-complex-induced lung injury. *Eur J Neurosci* **358**, 69-75.
- Thelen, M., Rosen, A., Nairn, A.C., und Aderem, A. (1991). Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane. *Nature* **351**, 320-322.

- Tjoelker, L.W., Eberhardt, C., Unger, J., Trong, H.L., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M., Stafforini, D.M., Prescott, S.M., and Gray, P.W. (1995). Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is a secreted phospholipase A2 with a catalytic triad. *J Biol Chem* **270**, 25481-25487.
- Umekage, T. und Kato, K. (1991). Mouse brain cDNA encodes a novel protein with the protein kinase C phosphorylation site domain common to MARCKS. *FEBS* **286**, 147-151.
- Upton, A.L., Salichon, N., Lebrand, C., Ravary, A., Blakely, R., Seif, I., und Gaspar, P. (1999). Excess of Serotonin (5-HT) Alters the Segregation of Ipsilateral and Contralateral Retinal Projections in Monoamine Oxidase A Knock-Out Mice: Possible Role of 5-HT Uptake in Retinal Ganglion Cells During Development. *J Neurosci* **19**, 7007-7024.
- Vergeres, G. und Ramsden, J.J. (1998). Binding of MARCKS (myristoylated alanine-rich C kinase substrate)-related protein (MRP) to vesicular phospholipid membranes. *Biochem J* **330**, 5-11.
- Verghese, G.M., Johnson, J.D., Vasulka, C., Haupt, D.M., Stumpo, D.J., und Blackshear, P.J. (1994). Protein kinase C-mediated phosphorylation and calmodulin binding of recombinant myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) and MARCKS-related protein. *J Biol Chem* **269**, 9361-9367.
- Victor, K., Jacob, J., und Cafiso, D.S. (1999). Interactions controlling the membrane binding of basic protein domains: phenylalanine and the attachment of the myristoylated alanine-rich C-kinase substrate protein to interfaces. *Biochemistry* **38**, 12527-12536.
- Wang, J.K.T., Walaas, S.I., Sihra, T.S., Aderem, A., und Greengard, P. (1989). Phosphorylation and associated translocation of the 87-kDa protein, a major protein kinase C substrate, in isolated nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 2253-2256.
- Watanabe, M., Aoki, J., Manya, H., Arrai, H., und Inoue, K. (1998). Molecular cloning of cDNAs encoding α 1, α 2 and α subunits of rat brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *Biochim Biophys Acta* **1401**, 73-79.
- Wessendorf, M.W. und Elde, R. (1987). The Coexistence of Serotonin- and Substance P-Like Immunoreactivity in the Spinal Cord of the Rat as Shown by Immunofluorescent Double Labeling. *J Neurosci* **7**, 2352-2363.
- Wu, M., Chen, D.W., Sasaoka, T., und Tonegawa, S. (1996). Neural tube defects and abnormal brain development in F52-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 2110-2115.
- Wu, W. und Wessendorf, M.W. (1992). Organization of the Serotonergic Innervation of Spinal Neurons in Rats - I. Neuropeptide Coexistence in Varicosities Innervating some Spinothalamic Tract Neurons but not in those Innervating Postsynaptic Dorsal Column Neurons. *Neuroscience* **50**, 885-898.
- Yamakawa, K., Gao, D.Q., und Korenberg, J.R. (1996). A periodic tryptophan protein 2 gene homologue (PWP2H) in the candidate region of progressive myoclonus epilepsy on 21q22.3. *Cytogenet Cell Genet* **74**, 140-145.
- Yang, L. und Glaser, M. (1996). Formation of membrane domains during the activation of protein kinase C. *Biochemistry* **35**, 13966-13974.
- Yanoshita, R., Kudo, I., Ikizawa, K., Chang, H.W., Kobayashi, S., Ohno, M., Nojima, S., und Inoue, K. (1988). Hydrolysis of platelet activating factor and its methylated analogs by acetylhydrolases. *J Biochem* **103**, 815-819.
- Yavarone, M.S., Shuey, D.L., Tamir, H., Sadler, T.W., und Lauder, J.M. (1993). Serotonin and cardiac morphogenesis in the mouse embryo. *Teratology* **47**, 573-584.

Yue, L. und Li, J. (1998). Protein kinase C-regulated dynamitin-MacMARCKS interaction controls macrophage spreading and formation of tubular lysosomes. *Soc Neurosci Abstr* L109.

Yue, T-L., Lysoko, P., und Feuerstein, G. (1990). Production of Platelet-Activation Factor from Rat Cerebellar Granule Cells in Culture. *J Neurochem* **54**, 1809-1811.

Zhou, F.C., Tan-Cheng, J.H., Segu, L., Patel, T., und Wang, Y. (1998). Serotonin transporters are located on the axons beyond the synaptic junctions: anatomical and functional evidence. *Brain Res* **805**, 241-254.

Zhu, Z., Bao, Z., und Li, J. (1995). MacMARCKS mutation blocks macrophage phagocytosis of zymosan. *J Biol Chem* **270**, 17652-17655.

Zottola, R., Cloherty, E.K., Coderre, P.E., und Hansen, A. (1995). Glucose Transporter Function Is Controlled by Transporter Oligomeric Structure. *Biochemistry* **34**, 9737-9747.

Lebenslauf

Persönliche Daten:	geboren am:	02.06.1970 in Hamburg
Schulbildung:	08/1976 - 07/1980	Grundschule Ohlstedt/Hamburg
	09/1980 - 06/1989	Gymnasium Ohlstedt/Hamburg; Abschluß: allgemeine Hochschulreife
Studium:	10/1989 - 12/1995	Dipl.-Biologie an der Philipps-Universität Marburg; Schwerpunkt Genetik (Note: 1,2)
Auslandsaufenthalt:	03/1993 - 03/1994	Howard Hughes Medical Institute des Beckman Center for Molecular and Genetic Medicine/ Stanford University bei Prof. U. Francke als studentische Hilfskraft
Diplomarbeit:	01/1995 - 12/1995	Max-Planck Institut für Hirnforschung in Frankfurt bei Prof. Betz. Thema: Untersuchungen zur Quartärstruktur des Serotonintransporters
Promotion:	01/1996	in Biochemie am Max-Planck Institut für Hirnforschung bei Prof. Betz. Thema: Untersuchungen zur Interaktion zytoplasmatischer Proteine mit dem Serotonintransporter
	12/2000	Disputation