

SIMONE ELISABETH BURGER

LOKALISATION DES ORPHAN CARRIERS SLC10A4 IM
ZENTRALEN UND PERIPHEREN NERVENSYSTEM
UND SEINE KOEXPRESSION MIT DEN VESIKULÄREN
NEUROTRANSMITTER TRANSPORTERN
VACHT UND VMAT2

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Geyer

**LOKALISATION DES *ORPHAN CARRIERS* SLC10A4 IM ZENTRALEN
UND PERIPHEREN NERVENSYSTEM UND SEINE KOEXPRESSION MIT
DEN VESIKULÄREN NEUROTRANSMITTER TRANSPORTERN
VACHT UND VMAT2**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

ingereicht von
Simone Elisabeth Burger
Tierärztin aus Oberwesel

Gießen 2010

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. J. Geyer

Dr. C. Rummel

Tag der Disputation: 13.12.2010

*In Liebe und Dankbarkeit
meinen Eltern Alfred und Marlies gewidmet*

Wie oft du auch den Fluss ansiehst, der träge
Dahinzieht, nie siehst du dasselbe Wasser
Nie kehrt es, das hinunterfließt, kein Tropfen von ihm
Zu seinem Ursprung zurück.
Beharre nicht auf der Welle
Die sich an deinem Fuß bricht, solange er
Im Wasser steht, werden sich
Neue Wellen an ihm brechen.

aus: Das Lied vom Fluss der Dinge, Bertolt Brecht

INHALTSVERZEICHNIS

Verzeichnis der Abbildungen	V
Verzeichnis der Tabelle	V
Abkürzungen	VI
Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren	X
Der genetische Code	X
Vorsätze im Dezimalsystem	X
1. EINLEITUNG	1
1.1 Neurotransmitter und Neurotransmitter Transporter	1
1.1.1 Transmitter als Botenstoffe im Organismus	1
1.1.2 Neurotransmitter Transporter der Plasmamembran	2
1.1.3 Vesikuläre Neurotransmitter Transporter	3
1.1.4 Speicherung und Freisetzung von Neurotransmittern aus synaptischen Vesikeln	5
1.2 Die vesikulären Transporter VACHT und VMAT2 im zentralen und peripheren Nervensystem	7
1.2.1 Der vesikuläre Acetylcholin Transporter VACHT im zentralen und peripheren Nervensystem	7
1.2.2 Der vesikuläre Monoamin Transporter VMAT2 im zentralen und peripheren Nervensystem	8
1.3 Das non-neuronale Acetylcholinsystem	10
1.3.1 Acetylcholin-Synthese in non-neuronalen Zellen	10
1.3.2 Zelluläre Funktionen des non-neuronalen Acetylcholins	11
1.4 Mastzellen	12
1.4.1 Morphologie, Entwicklung und physiologische Funktion von Mastzellen	12
1.4.2 Mediatoren	13
1.4.3 Mechanismen der Mastzelldegranulation	15
1.5 Die SLC10 Transporter Familie	16
1.5.1 Die Superfamilie der Solute Carrier (SLC)	16
1.5.2 Klassifizierung und Stammbaum der Solute Carrier Familie 10 (SLC10)	17
1.5.3 NTCP, ASBT und der enterohepatische Kreislauf der Gallensäuren	19
1.5.4 SOAT, der Transporter für sulfatierte Steroidhormone	20
1.5.5 SLC10A4, von Gallensäuretransportern zum Nervensystem	21
1.5.6 SLC10A3, SLC10A5 und SLC10A7, weitere <i>orphan carrier</i> der SLC10 Familie	22
1.6 Zielsetzung der Arbeit	23
2. MATERIAL	24
2.1 Materialien für die Molekularbiologie	24
2.1.1 Primer für Expressionsprofile (RT-PCR)	24
2.1.2 TaqMan Gene Expression Assays für quantitative Real Time PCR	24
2.1.3 TaqMan Gene Expression Master Mix	25
2.1.4 RNA, cDNA Panels	25
2.1.5 Puffer und Medien	26
2.1.6 Polymerasen, kommerziell erhältliche Kits und sonstige Materialien	26
2.2 Agarose-Gelelektrophoresen	26
2.2.1 Native Agarose-Gelelektrophorese (DNA)	26
2.2.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese (RNA)	27
2.2.3 Längenstandards	28

2.3	Zellkultur	28
2.3.1	Zelllinien	28
2.3.2	Zellkulturmedien	29
2.3.3	Antibiotika	30
2.3.4	Wachstumsfaktoren für die neuronale Differenzierung	31
2.4	Stabile und transiente Transfektion	31
2.4.1	Transfektionsreagenzien	31
2.4.2	Medien zur Transfektion	31
2.5	Immunfluoreszenz	32
2.5.1	Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz an eukaryotischen Zellen	32
2.5.2	Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz an histologischen Organschnitten	32
2.5.3	Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz an isolierten Mastzellen	33
2.6	Transmissionselektronenmikroskopie	34
2.7	Proteinanalyse	35
2.7.1	Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Proteine)	35
2.7.2	Puffer und Lösungen für Western Blot	36
2.7.3	Puffer und Lösungen zur Präparation von peritonealen Mastzellen aus der Ratte	37
2.7.4	Puffer und Lösungen für Immunpräzipitation	37
2.7.5	Puffer und Lösungen für Sucrose-Gradientenzentrifugation der Vesikelaufreinigung	38
2.7.6	Längenstandards	38
2.7.7	Filmentwicklung	38
2.7.8	Kommerziell erhältliche Kits	38
2.8	Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe	39
2.9	Versuchstiere	41
2.9.1	Versuchstiere für die Immunfluoreszenz an histologischen Organschnitten und für die Transmissionselektronenmikroskopie	41
2.9.2	Versuchstiere für die Präparation von peritonealen Mastzellen, Gehirn und Blase	41
2.9.3	Tierversuchsanzeigen	42
2.10	Chemische Substanzen	42
2.11	Geräte	45
2.12	Verbrauchsmaterial	47
3.	METHODEN	48
3.1	Allgemeine Methoden in der Molekularbiologie	48
3.1.1	DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung	48
3.1.2	Native Agarose-Gelelektrophorese	48
3.1.3	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	49
3.1.4	Plasmid-Präparationen im Midi-Maßstab	49
3.2	Isolierung und Aufarbeitung von RNA	50
3.2.1	Total-RNA Extraktion aus Geweben und Zellkulturen	51
3.2.2	Extraktion von Total-RNA aus Zellen	52
3.2.3	cDNA-Synthese aus Total-RNA	52
3.2.4	cDNA-Synthese aus Total-RNA aus peritonealen Mastzellen	53
3.2.5	cDNA Synthese aus Zelllysaten	54
3.3	Methoden der Polymerase Kettenreaktion (PCR)	55
3.3.1	Primerauswahl	56
3.3.2	RT-PCR	56
3.3.3	Touchdown-PCR	57
3.3.4	Nested PCR	57
3.3.5	Quantitative real-time PCR	58

3.4	Zellbiologische Methoden	60
3.4.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	60
3.4.2	Kryokonservierung	61
3.4.3	Auftauen und Rekultivierung	61
3.4.4	Neuronale Differenzierung von PC12 Zellen	61
3.4.5	Neuronale Differenzierung von SH-SY5Y Zellen	62
3.5	Transfektion eukaryotischer Zellen	62
3.5.1	Stabile Transfektion	63
3.5.2	Transiente Transfektion	64
3.6	Präparation peritonealer Mastzellen aus der Ratte	65
3.6.1	Präparationstechnik	65
3.6.2	Aufreinigung durch Gradientenzentrifugation	65
3.7	Immunfluoreszenz	66
3.7.1	Indirekte Immunfluoreszenz an transfizierten Zellen und neuronalen Zellen	68
3.7.2	Blockierung des Slc10a4-Antikörpers mit dem Immunisierungspeptid	68
3.7.3	Kolokalisationsstudien mit VACHT, VMAT2, Synaptophysin und Tyrosin Hydroxylase	69
3.7.4	Immunzytologie an isolierten Mastzellen	71
3.8	Transmissionselektronenmikroskopie	72
3.8.1	Präparation der Organe und Vorbereitung der Proben	73
3.8.2	Kunstharzeinbettung der Gewebe	74
3.8.3	Immunogoldmarkierung der Gewebeschnitte	75
3.8.4	Immunogoldmarkierung von Gehirnvesikeln	75
3.8.5	Mikroskopie	76
3.9	Präparation synaptischer Vesikel aus dem Gehirn der Ratte	76
3.9.1	Präparationstechnik und Vorbereitung der Proben	76
3.9.2	Aufreinigung und Fraktionierung der Gehirnvesikel	77
3.10	Proteinbiochemische Methoden	78
3.10.1	Präparation von Membranproteinen	78
3.10.2	Gesamtprotein Extraktion aus Rattengehirn und transfizierten HEK293 Zellen	79
3.10.3	Proteinkonzentrationsbestimmung	79
3.11	Western Blot	80
3.11.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	80
3.11.2	Blotting	81
3.11.3	Blockierung der Membran und Antikörperreaktion	82
3.11.4	Detektion	83
3.12	Immunpräzipitation	83
4.	ERGEBNISSE	86
4.1	Quantitative real-time PCR von SLC10A4 in humanen Gehirnregionen	86
4.2	Kolokalisation von Slc10a4, VACHT, VMAT2, Tyrosin Hydroxylase und Synaptophysin im zentralen Nervensystem	87
4.3	Kolokalisation von Slc10a4, VACHT und VMAT2 im peripheren Nervensystem	89
4.4	Lokalisation von Slc10a4 in synaptischen Gehirnvesikeln	92
4.5	Expression von Slc10a4 in der Harnblase der Ratte und der humanen Lunge	97
4.6	Lokalisation des Slc10a4 in sekretorischen Vesikeln von Mastzellen	100

4.7	Transiente und stabile Transfektion von Slc10a4 in HEK293 Zellen	103
4.7.1	Überprüfung der Spezifität des Slc10a4-Antikörpers mittels Immunfluoreszenz und Western Blot	103
4.7.2	Stabile Transfektion	105
4.8	Native Expression von Slc10a4 in neuronalen Zelllinien	106
4.8.1	Die Phäochromozytomzelllinie der Ratte PC12	107
4.8.2	Die humane Neuroblastom Zelllinie SH-SY5Y	110
5.	DISKUSSION	113
5.1	Slc10a4 – mehr als ein cholinerges Markerprotein	113
5.2	Die Koloalisation von Slc10a4 mit VAcHT und VMAT2 im peripheren Nervensystem	115
5.3	Slc10a4 ist in synaptischen Vesikeln lokalisiert	121
5.4	Die Expression von Slc10a4 in Epithelien von Harnblase und Lunge und seine mögliche Rolle im non-neuronalen Acetylcholinsystem	124
5.5	Die Expression von Slc10a4 in Mastzellen	125
5.6	Hypothesen und Ausblick	127
5.6.1	Slc10a4 als vesikuläres Transportprotein	127
5.6.2	Slc10a4 als Komponente der Vesikelexozytose	129
5.6.3	Slc10a4 als Sensorprotein für Protonen	130
5.6.4	Slc10a4 als Interaktionspartner von VAcHT und VMAT2	131
5.6.5	Ausblick	132
6.	ZUSAMMENFASSUNG	133
7.	SUMMARY	134
8.	LITERATURVERZEICHNIS	135
9.	DANKSAGUNGEN	147
10.	ERKLÄRUNG	149

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abb. 1.1: Modell eines synaptischen Vesikels mit bereits etablierten Vesikelproteinen	6
Abb. 1.2: Phylogenetischer Stammbaum der SLC10 Familie	18
Abb. 1.3: Der enterohepatische Kreislauf der Gallensäuren	20
Abb. 3.1: Schema des Temperatur- und Zeitverlaufs einer Touchdown-PCR	57
Abb. 3.2: Funktionsprinzip der quantitativen real-time PCR mit dem TaqMan System	59
Abb. 3.3: Prinzip der Doppelmarkierung mittels indirekter Immunfluoreszenz	67
Abb. 3.4: Schematischer Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops	73
Abb. 3.5: Aufbau eines Semi-Dry Elektroblots	81
Abb. 3.5: Prinzip der Immunpräzipitation mit Protein A-Sepharose	84
Abb. 4.1 : Relative Expression von SLC10A4, VACHT und TH in humanen Gehirnregionen	87
Abb. 4.2: Kolokalisation von Slc10a4, VACHT, VMAT2, TH und SYP im Rückenmark und der <i>Substantia nigra</i>	89
Abb. 4.3: Expression von Slc10a4 im peripheren Nervensystem und seine Kolokalisation mit VACHT und VMAT2	92
Abb. 4.4: Western Blot Analyse der verschiedenen Vesikelfractionen aus der Sucrose-Dichtegradienten Aufreinigung	94
Abb. 4.5: Immunpräzipitation isolierter Gehirnvesikel aus der Ratte	95
Abb. 4.6: Transmissionselektronenmikroskopie verschiedener Fraktionen der Vesikelpräparation	96
Abb. 4.7: Expression von Slc10a4 in der Harnblase der Ratte und seine Kolokalisation mit VACHT und VMAT2	98
Abb. 4.8: Untersuchung der Expression von Slc10a4, VMAT2 und VACHT in der Harnblase der Ratte mittels RT-PCR	99
Abb. 4.9: Expression von SLC10A4 in humanem Lungengewebe	100
Abb. 4.10: Expression von Slc10a4 in Mastzellen der Ratte	102
Abb. 4.11 Nachweis transient transfizierter Slc10a4 und Slc10a4-FLAG Proteine mittels Immunfluoreszenz und Western Blot	104
Abb. 4.12: Überprüfung der stabilen Transfektion von Slc10a4 in HEK293 Zellen auf RNA- und Proteinebene	106
Abb. 4.13: Native Expression von Slc10a4 in differenzierten und nicht-differenzierten PC12 Zellen	109
Abb. 4.14: Native Expression von Slc10a4 in differenzierten und undifferenzierten SH-SY5Y Zellen	111
Abb. 5.1: Zelluläre Struktur und Informationsflüsse in der Retina	117
Abb. 5.2: Schematische Darstellung der neuronalen Verschaltungen im enterischen Nervensystem und der Lokalisation von Slc10a4	120
Abb. 5.3: Schematische Darstellung der an der Vesikelexozytose beteiligten SNARE-Proteine	126
Abb. 5.4: Molekulares Modell eines repräsentativen synaptischen Vesikels	129
Abb. 5.5: Transmembrandomänenstruktur von Slc10a4 und NTCP und Detaildarstellung der zusätzlichen N-terminalen Domäne von Slc10a4	131

Verzeichnis der Tabelle

Tab. 1: Beispiele präformierter und neu synthetisierter Mediatoren	14
--	----

ABKÜRZUNGEN

%	Prozent
°C	Grad Celsius
ΔG	Freie Enthalpie
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
ACTB/Actb	Beta-Actin
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ASBT	Apical Sodium-dependent Bile acid Transporter
AT	Anlagerungstemperatur
ATP	Adenosintriphosphat
ATCC	American Type Culture Collection
b	Base
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMP-2	Bone Morphogenic Protein
bp	Basenpaare, base pair
BSA	Bovines Serum Albumin
BSEP	Bile salt export pump
BSS	Balanced salt solution
CarAT	Carnitin-Acetyl-Transferase
cDNA	complementary DNA
ChAT	Cholin-Acetyl-Transferase
CHO	Chinese Hamster Ovary
CHT-1	High affinity Choline Transporter
CO ₂	Kohlendioxid
C _T	Signal threshold cycle
CVF	Crude vesicle fraction
Da	Dalton
DAPI	4', 6'-Diamidine-2'-Phenylindol Dihydrochlorid
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
D-MEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Deoxyuridintriphosphat
E ₁ S	Estron-3-sulfat
EAAT	Excitatory Amino Acid Transporter
EB	Ethidiumbromid

ECL	Enhanced Chemiluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay analysis
EtOH	Ethanol
FAM	6-carboxyfluorescein
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanate
FKS	Fetales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FRT	Flp Recombinase Target
g	Gramm
<i>g</i>	Erdschwerebeschleunigung
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEK	Human Embryonic Kidney
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HGNC	HUGO Nomenclature Committee
HRP	Horseradish peroxidase
HUGO	Human Genome Organisation
IFN- γ	Gamma-Interferon
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IPAN	Intrinsic primary afferent neurons
IPL	Inner plexiform layer
KRH	Krebs-Ringer-HEPES
l	Liter
LB	Luria Bertani
LDCV	Large dense core vesicles
M	Molar (mol/l)
m	Meter
mAChR	Muskarinerge Acetylcholin Rezeptor
MCP	Monocyte chemotactic protein
MGB	Minor Groove Binder
MHC II	Major histocompatibility complex II
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
min	Minute
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MOPS	4-Morpholinepropanesulfonic acid
mRNA	messenger RNA
MRP	Multidrug Resistance-Associated Protein
MSR	Macrophage Scavenger Receptor
N ₂	Stickstoff
nAChR	Nikotinerger Acetylcholin Rezeptor
NaCl	Natriumchlorid
NEAA	Non Essential Amino Acids

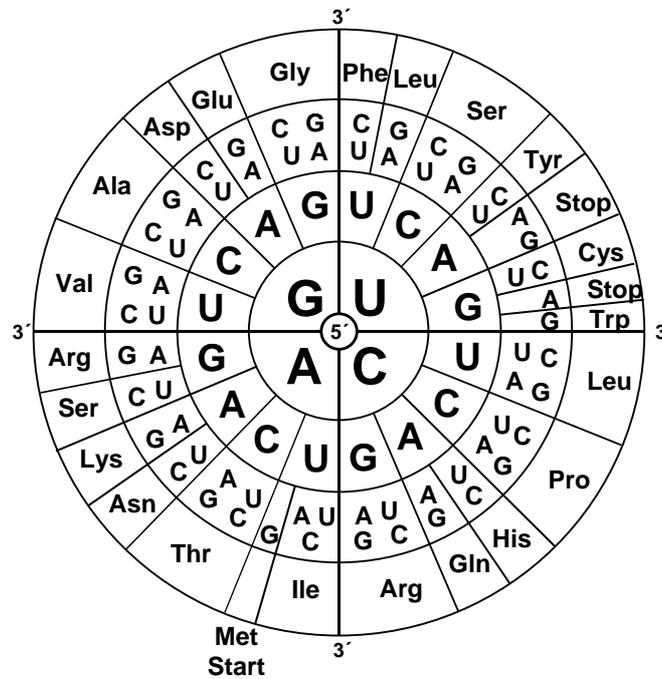
NGF	Nerve growth factor
NGS	Normal goat serum, Ziegenserum
NHS	Normal horse serum, Pferdeserum
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NPY	Neuropeptid Y
NTCP	Na ⁺ -Taurocholate Cotransporting Polypeptide
OCT	Organic cation transporter (SLC22)
OD	Optische Dichte
p	Plasmid
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PB	Phosphate Buffer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction/Polymerase Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration
PMAT	Plasmamembran-Monoamintransporter
PREGS	Pregnenolonsulfat
PTFE	Polytetrafluorethylen
qPCR	Quantitative PCR
RA	<i>All-trans</i> Retinsäure
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rpm	Rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s	Sekunde
SCF	Stem cell factor
SCG	Superior cervical ganglion (oberes Halsganglion)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SLC	Solute Carrier
SMP	Sulfooxymethylpyrene
SNAP23/25	Synaptosome associated protein
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
SOAT	Sodium-dependent Organic Anion Transporter
SSV	Small synaptic vesicles
SYP	Synaptophysin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF-β	Transforming growth factor
TGN	<i>trans</i> -Golgi Netzwerk
TH	Tyrosin Hydroxylase
T _m	Schmelztemperatur

TM	Trademark
TLCS	Taurolithocholat-3-sulfat
TMD	Transmembrandomäne
TNF- α	Tumornekrosefaktor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UDG	Uracil-DNA Glycosylase
UV	Ultraviolett
V	Volt
VAT	Vesikuläre Amin Transporter
VACHT	Vesikulärer Acetylcholin Transporter
VAMP	Vesicle-associated membrane proteins
VGAT	Vesikulärer GABA und Glyzin Transporter
VGLUT	Vesikulärer Glutamat Transporter
VIAAT	Vesicular inhibitory amino acid transporter
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
VMAT	Vesikulärer Monoamin Transporter
VNUT	Vesikulärer Nukleotid Transporter
ZNS	Zentrales Nervensystem

EIN- UND DREIBUCHSTABENCODE DER AMINOSÄUREN

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

DER GENETISCHE CODE



VORSÄTZE IM DEZIMALSYSTEM

Potenz	Vorsilbe	Kurzzeichen	Potenz	Vorsilbe	Kurzzeichen
10^{15}	Peta	P	10^{-15}	Femto	f
10^{12}	Tera	T	10^{-12}	Piko	p
10^9	Giga	G	10^{-9}	Nano	n
10^6	Mega	M	10^{-6}	Mikro	μ
10^3	Kilo	k	10^{-3}	Milli	m
10^2	Hekto	h	10^{-2}	Centi	c

1. EINLEITUNG

1.1 Neurotransmitter und Neurotransmitter Transporter

1.1.1 Transmitter als Botenstoffe im Organismus

Transmitter sind chemische Botenstoffe, die der Kommunikation der Zellen untereinander dienen. Sie gewährleisten die Aufrechterhaltung aller Körperfunktionen und dienen der Verarbeitung innerer und äußerer Reize. Im Nervensystem müssen Informationen schnell und gezielt übertragen werden. Die Reizweiterleitung erfolgt elektrisch durch die Übertragung von Aktionspotenzialen an einer Synapse. Die Neurotransmission stellt also den Transport von Informationen innerhalb der nervalen Strukturen dar. Als Neurotransmitter dienen chemische Stoffe, die nach einer elektrischen Stimulation Ca^{2+} -abhängig aus synaptischen Vesikeln eines präsynaptischen Neurons abgegeben werden und an spezifische Rezeptoren des postsynaptischen Neurons binden und so den elektrischen Stimulus an die Folgezelle weitergeben. Ihre Wirkung wird durch die schnelle Wiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt oder ihre enzymatische Spaltung beendet und kann durch spezifische Antagonisten am Rezeptor blockiert werden (Millhorn et al. 1989; López-Munoz und Alamo 2009). Bis heute ist bereits eine Vielzahl von Substanzen bekannt, die diesen Kriterien entsprechen. Aufgrund ihrer chemischen Struktur können sie in verschiedene Klassen eingeteilt werden. 1. Biogene Amine, zu denen die klassischen Neurotransmitter wie z. B. Acetylcholin, Serotonin und die Katecholamine Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin gehören, und 2. Aminosäuren bzw. deren Derivate, die entweder eine exzitatorische (aktivierende) Wirkung haben (z. B. Glutamat) oder inhibitorisch, also hemmend wirken (z. B. γ -Aminobuttersäure GABA oder Glycin). Diese Neurotransmitter werden im Axon gebildet und dort durch spezifische vesikuläre Transporter in Speichervesikeln gelagert. Sie vermitteln die schnelle synaptische Reizübertragung. Im Gegensatz dazu werden Neuropeptide, zu denen z. B. Substanz P, Neuropeptid Y oder das vasoaktive intestinale Peptid VIP gehören, im Perikaryon synthetisiert und am *trans*-Golgi Netzwerk in große Transportvesikel (*large granular vesicles*, bzw. *large dense core vesicles*) verpackt, die axonal zur Synapse transportiert werden. Neuropeptide fungieren als langsam wirkende Kotransmitter, die durch Bindung an postsynaptische Rezeptoren die Erregbarkeit der Zielzellen durch Depolarisation oder Hyperpolarisation verändern

(Bloom 1988; Salio et al. 2006). Eine dritte Gruppe enthält sogenannte „atypische Neurotransmitter“. Zu diesen gehören, unter anderem, gasförmige Stoffe wie z. B. Kohlenstoffmonoxid (CO) und vor allem Stickstoffmonoxid (NO). Diese unterscheiden sich von den „klassischen Neurotransmittern“ insofern, dass sie nicht in synaptischen Vesikeln gespeichert und durch Exozytose freigesetzt werden. Sie binden auch nicht an Rezeptoren in der postsynaptischen Membran, sondern diffundieren durch diese und aktivieren intrazelluläre enzymatische Strukturen. Auch das Spurenelement Zink und die D-Isoformen von Serin und Aspartat werden zu der Gruppe der atypischen Neurotransmitter gezählt. (Snyder und Ferris 2000; Baranano et al. 2001).

1.1.2 Neurotransmitter Transporter der Plasmamembran

Die Neurotransmitter Transporter der Plasmamembran von Neuronen und Gliazellen sind verantwortlich für die hoch-affine Wiederaufnahme von Neurotransmittern aus dem synaptischen Spalt. Die Aktivität dieser Membrantransporter ist vom chemischen Na^+ -Gradienten abhängig. Zusätzlich werden für den Transport Chlorid- oder Kaliumionen benötigt. Dadurch lässt sich die Superfamilie der Plasmamembrantransporter für Neurotransmitter in zwei Familien einteilen: Die Transporter für Monoamine (Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin und Serotonin) und inhibitorische Aminosäuren (GABA und Glycin) gehören zur SLC6-Genfamilie (*Solute Carrier Family 6*) und haben eine sehr homologe Struktur mit 12 Transmembrandomänen und zytoplasmatischem N- und C-Terminus (Masson et al. 1999; Torres et al. 2003). Im ZNS wird ein Großteil der Monoamine außerdem durch den Na^+/Cl^- unabhängigen Transporter OCT-3 in die Neurone und Gliazellen transportiert (Eisenhofer 2001). Auch wurde vor Kurzem ein weiterer Na^+ -unabhängiger Plasmamembrantransporter für monoaminerge Neurotransmitter im ZNS entdeckt, der Plasmamembran-Monoamintransporter PMAT (Engel et al. 2004).

Im Gegensatz dazu werden die exzitatorischen Aminosäuren Glutamat und Aspartat Na^+ -abhängig im Austausch gegen Kaliumionen transportiert. Bis heute sind fünf Na^+ -abhängige Glutamattransporter identifiziert und in der Familie der EAAT's (*Excitatory Amino Acid Transporters*) zusammengefasst. Für die entsprechenden Transporter wird eine 6 bis 10

Transmembrandomänen Struktur diskutiert und sie zeigen außerdem eine hohe Sequenzhomologie (Seal et al. 2000; Kanner et al. 2001).

Acetylcholin (ACh) wird in cholinergen Nervenendigungen aus Cholin und dem Acetyl Coenzym A durch die Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT) synthetisiert. Nach Abgabe von Acetylcholin in den synaptischen Spalt und der Bindung an postsynaptische Rezeptoren, kommt es zu einer hydrolytischen Spaltung in Cholin und Acetat durch die Acetylcholin-Esterase. Da Cholin für die Neusynthese von ACh innerhalb der Synapse nur in begrenztem Maße zur Verfügung steht, wird es aus dem synaptischen Spalt natrium- und chloridabhängig durch den *High affinity Choline Transporter* (CHT-1) zurück in die Präsynapse transportiert. Dieser hoch affine Plasmamembrantransporter ist in die SLC5-Familie eingruppiert (SLC5A7), besitzt 13 Transmembrandomänen und ist spezifisch in cholinergen Neuronen lokalisiert (Okuda und Haga 2003). Ein entscheidender Anteil der CHT-1 Population ist außerdem in präsynaptischen Vesikeln lokalisiert, die auch VAcHT und Synaptophysin enthalten (siehe 1.1.3) und Acetylcholin speichern. Diese Vesikel dienen dort als Reservepool für den Plasmamembrantransport und können so, je nach neuronaler Aktivität, die Acetylcholin Freisetzung und Synthese regulieren (Ferguson et al. 2003).

1.1.3 Vesikuläre Neurotransmitter Transporter

Neurotransmitter werden in Neuronen synthetisiert und bis zu ihrer Ca^{2+} -abhängigen Freisetzung in Vesikeln gespeichert. Die Speicherung von Neurotransmittern in synaptischen Vesikeln hat einige Vorteile. Die Neurotransmitter werden vor einem enzymatischen Abbau in der Synapse geschützt und auch bei gesteigerter Aktivität der Neuronen ist ein ausreichender Vorrat vorhanden. Darüber hinaus wird die Zelle vor eventuellen toxischen Eigenschaften der Neurotransmitter geschützt, sollten diese eine kritische zytoplasmatische Konzentration übersteigen. Ein vesikulärer Transport wurde für verschiedene Neurotransmitter beschrieben, wie z. B. Acetylcholin (Toll und Howard 1980), Monoamine (Njus et al. 1986), Glutamat (Disbrow et al. 1982; Shioi et al. 1989; Tabb et al. 1992), GABA (Fykse und Fonnum 1988), Glycin (Kish et al. 1989; Burger et al. 1991) und ATP (Luqmani 1981; Sawada et al. 2008).

Die vesikulären Amin Transporter (VAT's) sind in die Lipiddoppelschicht der Vesikelmembran eingebaut. Sie besitzen eine 12 Transmembrandomänen Struktur und sind aufgrund ihrer hohen Sequenzidentität gemeinsam in die *solute carrier family 18* (SLC18) eingruppiert. Sie transportieren Acetylcholin (VACHT, SLC18A3) oder Monoamine (VMAT1, SLC18A1 und VMAT2, SLC18A2) aus dem Zytoplasma in Speichervesikel neuronaler und endokriner Zellen. Dazu nutzen sie den elektrochemischen Protonengradienten, der durch die vesikuläre H⁺/ATPase aufgebaut wird, um ein positiv geladenes Amin im Austausch gegen zwei Protonen zu transportieren (Eiden et al. 2004). Der Transport von Acetylcholin durch den vesikulären Acetylcholin Transporter VACHT ist spezifisch durch Vesamicol hemmbar, während die Transportfunktion von VMAT1 und VMAT2 durch Tetrabenazin und Reserpin blockiert werden kann (Erickson et al. 1993; Erickson und Eiden 1993).

Die Aufnahme von Glutamat in sekretorische Vesikel wird von den vesikulären Glutamat Transportern (VGLUT) im Austausch gegen Protonen gewährleistet. Sie gehören zur SLC17 Familie, in der bis heute drei Formen des VGLUT beschrieben sind: VGLUT1 und VGLUT2, die in unterschiedlichen glutamatergen Neuronen des zentralen Nervensystems exprimiert sind und VGLUT3, der in verschiedenen cholinergen und monoaminergen Zelltypen zusammen mit VACHT und VMAT2 kolokalisiert ist (Varoqui et al. 2002; Reimer und Edwards 2004; Fei et al. 2008).

Inhibitorische Aminosäuren wie GABA und Glycin werden ebenfalls in sekretorischen Vesikeln gespeichert. Der Transporter VGAT (vesikulärer GABA und Glycin Transporter, auch VIAAT *vesicular inhibitory amino acid transporter*) besteht aus 10 Transmembrandomänen und ist als einziges Mitglied in die SLC32 *solute carrier family* eingruppiert. Der Transporter vermittelt durch eine 1:1 Stöchiometrie die Aufnahme von GABA und Glycin in sekretorische Vesikel im Austausch gegen Protonen (Gasnier 2004).

Die Speicherung von ATP in sekretorischen Vesikeln wird schon seit vielen Jahren diskutiert (Luqmani 1981; Winkler 1976; Njus 1978). Im Jahr 2008 wurde ein vesikulärer Nukleotid Transporter (VNUT) identifiziert, der ebenso wie die VGLUTs zur SLC17-Familie gehört. Er transportiert chloridabhängig ATP, GTP und ADP (Sawada et al. 2008).

1.1.4 Speicherung und Freisetzung von Neurotransmittern aus synaptischen Vesikeln

Die synaptische Transmission basiert auf einer kontrollierten Freisetzung und Wiederaufnahme von Neurotransmittern aus dem synaptischen Spalt und ihrer erneuten Speicherung in sekretorischen Vesikeln. Synaptische Vesikel sind die Speicherorganellen für Neurotransmitter innerhalb eines Neurons. Sie haben eine Größe von 40 – 80 nm und sind von einer Lipiddoppelschicht umgeben, in der Proteine verschiedenster Funktion eingelagert sind. Für den Prozess der Transmitterfreisetzung, welcher das Vesikel *trafficking*, das Andocken an die Plasmamembran und schließlich die Verschmelzung und Freisetzung des Vesikelinhaltes umfasst, ist die Zusammensetzung der Membranproteine der synaptischen Vesikel von entscheidender Bedeutung. In der Vesikelmembran befinden sich mehr als 80 verschiedene Proteine, die über 70 % der Oberfläche des Vesikels bedecken. Von diesen ist die Mehrzahl essenziell für die Exozytose, wie z. B. Synaptobrevin, Synaptophysin und Synaptotagmin. Darüber hinaus befinden sich etwa 10 Kopien der vesikulären Neurotransmitter Transporter in der Vesikelmembran, was einen Anteil von etwa 10 - 14 % an der Gesamtzahl der Proteine ausmacht. Überraschenderweise befinden sich aber nur ein bis zwei vesikuläre ATPasen in einem Vesikel, welche den Protonengradienten für den Neurotransmitter Transport aufbauen. Somit können für die Regulation der Speicherung von Neurotransmittern sowohl die Anzahl der entsprechenden vesikulären Neurotransmitter Transporter als auch die Anzahl bzw. das Vorhandensein der ATP-getriebenen Protonenpumpe von entscheidender Bedeutung sein (Takamori et al. 2006; Burré und Volkman 2007; Fei et al. 2008). Ein weiterer Regulationsmechanismus ist die Sortierung der vesikulären Neurotransmitter Transporter in verschiedene Vesikelpopulationen. Dieser Prozess wird durch spezifische Sorting-Signale, die zumeist im C-Terminus der verschiedenen Transporter lokalisiert sind, vermittelt. VMAT2 und VACHT besitzen beispielsweise ein Dileucin Motiv, welches die Sortierung der Proteine in synaptische Vesikel vermittelt (Li et al. 2005; Colgan et al. 2007). Darüber hinaus wird VMAT2 auch in *large dense core vesicles* (LDCV) exprimiert. LDCVs sind ca. 70 - 200 nm große Vesikel mit einem elektronendichten Kern, die im *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) gebildet und dann axonal in Richtung Synapse transportiert werden, wo sie aber in der Regel nicht in der aktiven Zone zu finden sind. Sie enthalten vor allem Neuropeptide aber auch Monoamine, die in langsamer Weise synaptisch aber auch somatodendritisch freigesetzt werden. Für die Expression von VMAT2 in LDCV ist ein zusätzliches Sorting-Signal notwendig, das sich ober-

halb des Dileucin Motivs im C-Terminus befindet (Waites et al. 2001). Neben den verschiedenen Sortierungssignalen gibt es für die Regulation der Transporterexpression auf den Vesikeln noch weitere entscheidende Faktoren, wie z. B. Glykosylierung oder Phosphorylierung (Krantz et al. 2000; Waites et al. 2001; Cruz-Muros et al. 2008).

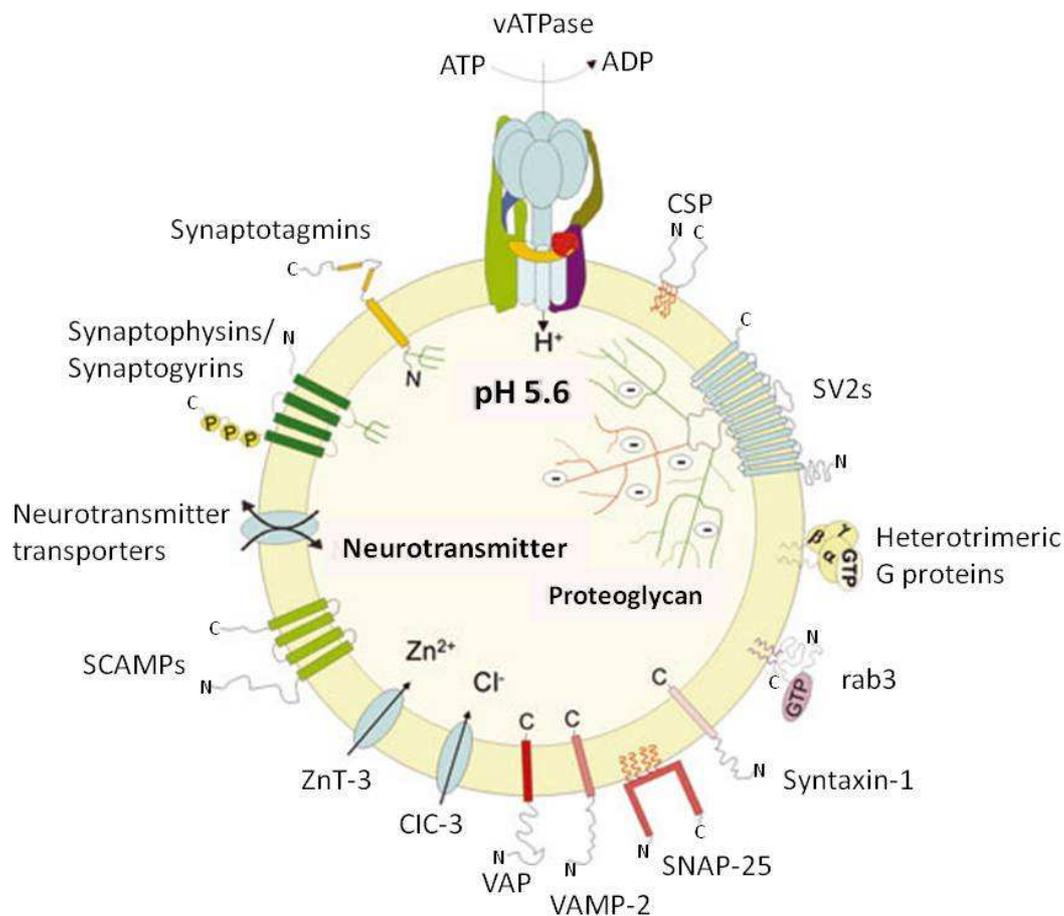


Abb. 1.1: Modell eines synaptischen Vesikels mit bereits etablierten Vesikelproteinen (aus Burré und Volkand 2007)

1.2 Die vesikulären Transporter VAcHT und VMAT2 im zentralen und peripheren Nervensystem

1.2.1 Der vesikuläre Acetylcholin Transporter VAcHT im zentralen und peripheren Nervensystem

Cholinerge Neuronen vermitteln motorische, vegetative und kognitive Prozesse im ganzen zentralen und peripheren Nervensystem. Schon seit vielen Jahren wird daher die Neuroanatomie cholinergischer Regionen anhand verschiedener Marker untersucht. Das Enzym ChAT, welches für die Synthese von Acetylcholin essenziell ist sowie der vesikuläre Acetylcholin Transporter VAcHT (SLC18A3) werden als Marker für cholinerge Neurone verwendet (Schäfer et al. 1994, 1998). Das Gen, welches für VAcHT kodiert, befindet sich im ersten Intron des ChAT-Gens, dem sogenannten „cholinergen Genlocus“, wodurch beide Proteine immer gleichzeitig translatiert werden (Eiden 1998). Anhand immunhistologischer Untersuchungen konnte die genaue Lokalisation cholinergischer Kerngebiete, Projektionen und Nervenfasern im zentralen und peripheren Nervensystem ermittelt werden (Schäfer et al. 1998a, 1998b). Ein besonderer Vorteil der Darstellung der VAcHT Expression ist, dass eine Anfärbung cholinergischer Nervenendigungen proportional zur Dichte synaptischer Vesikel Cluster in der aktiven Zone der Synapsen möglich ist. Dadurch konnten auch cholinerge Regionen, vor allem Projektionsgebiete identifiziert werden, die keine oder nur eine sehr schwache ChAT-Immunreaktivität zeigten, oder nur durch den Nachweis der enzymatischen Aktivität von ChAT abgeleitet werden konnte (Weihe und Eiden 2000).

Das cholinerge System der Säugetiere umfasst eine Vielzahl zentraler und peripherer Neurone. Im ZNS existieren drei Arten cholinergischer Zellgruppen, die ihre Projektionen in die Peripherie senden: Motoneurone, präganglionäre sympathische Neurone und präganglionäre parasympathische Neurone. Diese sind im Wesentlichen in sieben Projektionssystemen und drei intrinsischen Bereichen innerhalb des ZNS lokalisiert (Schäfer et al. 1998a). Das basale Vorderhirn enthält die Zellkörper der langen cholinergen Projektionen, die vom medialen Septumkern und dem diagonalen Band von Broca (*Stria diagonalis*) zum *Hippocampus*, vom horizontalen Schenkel der *Stria diagonalis* zum *Bulbus olfaktorius* und vom *Nucleus basalis Meynert* zum Cortex und der *Amygdala* projizieren. Im Zwischenhirn (Diencephalon) befinden sich cholinerge Zellgruppen in den *Nuclei habenulares*, die zusammen mit den Neuronen

aus dem basalen Vorderhirn zum *Nucleus interpeduncularis* in der *Formatio reticularis* projiziert. Die beiden cholinergen Kerngebiete des Hirnstammes, die zum *Thalamus* projizieren und die sensorischen Informationen im *Thalamus* modulieren, liegen im ventralen Tegmentum. Intrinsische cholinerge Interneurone vermitteln die wesentlichen Projektionen zwischen der Calleja Insel, dem *Striatum* und der *Amygdala*. Für alle genannten cholinergen Gehirnregionen und Projektionsfelder konnte 2008 in einer vergleichenden Studie mit den cholinergen Markern VAcHT und CHT-1 auch eine Expression von Slc10a4 nachgewiesen werden (Geyer et al. 2008).

Im peripheren Nervensystem befindet sich VAcHT in den postganglionären parasympathischen Neuronen und einer kleinen Population postganglionärer sympathischer Neurone, die bei einigen Spezies z. B. die Schweißdrüsen und die arterielle Mikrovaskulation der Skelettmuskulatur versorgen (Schäfer et al. 1998b). Im autonomen Darmnervensystem konnte eine ChAT- und VAcHT-Immunreaktivität in Neuronen und Synapsen der *Plexus myentericus* und *submucosus* sowie in Nervenfasern der glatten Darmmuskulatur nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte eine Koexpression von VAcHT mit Calretinin und Substanz P in allen cholinergen Neuronen und in geringerem Umfang mit NO-Synthase (NOS) und VIP in Interneuronen nachgewiesen werden. Auch ein geringer Anteil Serotonin-haltiger Neurone erwies sich als cholinerg (Sang und Young 1998; Harrington et al. 2010). Cholinerge Interneurone, sogenannte *starburst* Amakrinzellen der Retina, erwiesen sich ebenfalls positiv in der Expression von ChAT und VAcHT (Koulen 1997).

1.2.2 Der vesikuläre Monoamin Transporter VMAT2 im zentralen und peripheren Nervensystem

Im Säugerorganismus existieren zwei Isoformen des vesikulären Monoamintransporters. Obwohl sie eine hohe Sequenzidentität aufweisen, unterscheiden sie sich erheblich in ihrem Expressionsmuster und der Substratspezifität. Der vesikuläre Monoamin Transporter 1 (VMAT1) ist ausschließlich in neuroendokrinen Zellen, wie den chromaffinen Zellen der Nebenniere und enterochromaffinen Zellen des Verdauungstraktes lokalisiert. Zentrale, periphere und enterische Neurone exprimieren hingegen ausnahmslos VMAT2. Interessanterweise ist VMAT2 auch in einigen chromaffinen Zellen der Nebenniere lokalisiert, jedoch in

erheblich geringerer Menge als VMAT1. Histamin-haltige enterochromaffine Zellen des Magens hingegen enthalten nur VMAT2. Im zentralen Nervensystem findet sich VMAT2 in allen dopaminergen, adrenergen, noradrenergen, serotonergen und histaminergen Zellgruppen. Die dopaminergen Zellgruppen in der *Substantia nigra pars compacta* sowie im ventralen Tegmentum zeigen eine starke Immunreaktivität für VMAT2. Auch dopaminerge Zellen im *Hypothalamus* und im dorsalen Mittelhirn sind VMAT2-positiv. Noradrenerge Neurone des *Locus coeruleus*, Serotonin-haltige Zellgruppen der Raphekerne sowie histaminerge Neurone im posterioren *Hypothalamus* exprimieren VMAT2. Feine axonale Nervenfasern im Cortex und den Basalganglien sowie Dendriten in der *Substantia nigra*, des *Locus coeruleus* und der dorsalen Raphekerne zeigen eine schwache Expression von VMAT2 (Erickson et al. 1996).

Ebenso wie die chromaffinen Zellen der Nebenniere entstammen die Neurone des sympathischen Nervensystems der Neuralleiste und enthalten Noradrenalin als Neurotransmitter. Alle Neurone des Sympathikus enthalten daher VMAT2 als vesikulären Transporter. In der *Glandula submandibularis*, der Submucosa des Verdauungstraktes und den Innervationen der Blutgefäße finden sich feine Nervenfasergeflechte, die für die sympathische Innervation typische Varikositäten aufweisen. In den Plexus des autonomen Darmnervensystems zeigen sich VMAT2-positive Neurone, die von zahlreichen stark immunreaktiven Synapsen umgeben sind. Immunhistologische Untersuchungen des oberen Halsganglions (*superior cervical ganglion*, SCG) zeigten, dass ca. 70 % der Neurone VMAT2-positiv sind, wohingegen 98 % der Neurone eine TH Expression aufweisen. Doppelmarkierungen mit dem Neuropeptid Y, das ein wichtiger Kotransmitter in vasomotorischen sympathischen Neuronen ist, weisen darauf hin, dass VMAT2 in vasomotorischen, jedoch nicht in sekretomotorischen und pilomotorischen Neuronen des SCG exprimiert ist (Peter et al. 1995; Headley et al. 2007).

Die Immunreaktivität ist generell in den Zellkörpern, proximalen Dendriten und axonalen Fortsätzen höher als in der aktiven Zone der Synapsen. Ursächlich für diese Beobachtung ist die Expression von VMAT2 hauptsächlich in *large dense core vesicles* (LDCV), die im trans-Golgi Netzwerk gebildet und nach der Exozytose ihrer Neurotransmitter nicht endozytotisch recycelt werden (Fei et al. 2008).

1.3 Das non-neuronale Acetylcholinssystem

Bei Acetylcholin handelt es sich um eine Transmittersubstanz, welche bereits vor etwa 3 Milliarden Jahren in die Biologie von Bakterien, Algen, Protozoen und primitiven Pflanzen Einzug gehalten hat. Seit dieser Zeit spielt ACh eine wichtige Rolle in der Evolution der Lebewesen und hat sich zu einem der wichtigsten Neurotransmitter im Organismus der Säugetiere entwickelt. Aber Acetylcholin ist nicht nur essenziell für die Neurotransmission im Nervensystem, sondern wird auch in vielen nicht-neuronalen Zellen synthetisiert und dient hier der Interaktion mit externen Faktoren wie Hormonen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen, aber auch mit dem Nervensystem (Wessler et al. 1998; Wessler und Kirkpatrick 2008).

1.3.1 Acetylcholin-Synthese in non-neuronalen Zellen

Die Synthese-, Freisetzungs- und Rezeptormaschinerie für Acetylcholin (Enzyme für die Synthese, Membrantransporter, nikotinerge und muskarinerge Acetylcholinrezeptoren) wird von vielen nicht-neuronalen Zellen des Organismus gebildet. So wurde z. B. die Expression von ChAT und Carnitin-Acetyl-Transferase (CarAT), welche ebenfalls zur Synthese von Acetylcholin befähigt ist, sowohl auf mRNA-Ebene als auch mittels spezifischer Antikörper in nicht-neuronalen Zellen nachgewiesen. Ebenfalls konnte die Enzym Aktivität bzw. das Vorhandensein und die Freisetzung von ACh innerhalb dieser Zellen bewiesen werden (Klapproth et al. 1997; Wessler et al. 2003; Lips et al. 2007). Die Expression spezifischer Acetylcholinrezeptoren auf nicht-neuronalen Zellen wurde durch Bindungsstudien, funktionellen Experimenten mit Agonisten und Antagonisten, mittels Immunreaktivität, Knock-out Mäusen und mRNA-Detektion von zahlreichen Arbeitsgruppen untersucht (Referenzen in Wessler und Kirkpatrick 2008). Des weiteren sind z. B. Epithelzellen der Atemwege, des Verdauungstrakts, der Haut, des Urogenitaltrakts und des Auges, Endothelzellen, Immunzellen wie Leukozyten, Makrophagen und Mastzellen, mesotheliale und mesenchymale Zellen zur Acetylcholin-Synthese befähigt (Wessler und Kirkpatrick 2008).

1.3.2 Zelluläre Funktionen des non-neuronalen Acetylcholins

Acetylcholin, das von non-neuronalen Zellen freigesetzt wird, bindet an nikotinerge und muskarinerge Acetylcholinrezeptoren (nAChR und mAChR) der eigenen und benachbarten Zellen und vermittelt so auto- und parakrine Regulationsschleifen. Non-neuronales Acetylcholin greift somit über die Modulation klassischer und nicht-selektiver Ionenkanäle in die Signaltransduktion der Zellen ein. Darüber hinaus verändert ACh phänotypische Zellfunktionen, vor allem in Bronchialepithelzellen und Keratinozyten, wodurch es zur Lösung von Zell-Zell Kontakten, einem Verlust des Zellvolumens und Veränderungen des Zytoskeletts kommt (Grando et al. 2006; Kunz et al. 2002).

In Epithelzellen moduliert und reguliert non-neuronales Acetylcholin eine Vielzahl von Zellfunktionen wie z. B. Zellzyklus, Differenzierung, Proliferation, Apoptose, Migration, Zell-Zell Kontakte und Organisation des Zytoskeletts. In den Atemwegen stimuliert Acetylcholin beispielsweise die Proliferation von Bronchialepithelzellen über mAChR und nAChR, ebenso die ziliare Aktivität, die mukoziliare *Clearance* und die apikale Chlorid Sekretion (Wessler und Kirkpatrick 2001). Im Verdauungstrakt vermittelt das non-neuronale Acetylcholin eine Grundaktivität des Ionen- und Wassertransportes, auch wenn der Einfluss des neuronalen Acetylcholins durch Entfernung des *Plexus myentericus* unterbunden wird (Hirota und McKay 2006).

Desweiteren hat Acetylcholin einen großen Einfluss auf die Zellen des Immunsystems. Acetylcholin aus Bronchialepithelzellen reguliert durch nAChR und mAChR die Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Prostaglandinen, Leukotrienen und Chemokinen. Außerdem ist es in die Reifung von T-Zellen und die Bildung CD8⁺ zytolytischer T-Lymphozyten involviert. Diese Mechanismen werden im sogenannten „cholinergen anti-inflammatorischen Signalweg“ durch eine vagale Stimulation getriggert (Borovikova et al. 2000).

Darüber hinaus hat die lokale Freisetzung von Acetylcholin maßgeblichen Einfluss auf die physiologische Barrierefunktion, nicht nur im Intestinaltrakt, sondern auch in der Lunge und der Haut. Die Blockade von nAChR und mAChR erhöht die Permeabilität der Grenzepithelien durch eine Reduzierung der Zell-Zell Kontakte und eine Vergrößerung des Interzellularraums. Zusammen mit der Aktivierung von Immunzellen und der Stimulation der Sekretion und mukoziliaren *Clearance*, tragen diese Mechanismen maßgeblich zu einem lokalen Schutz der Grenzepithelien vor der Invasion durch Pathogene bei (Wessler und Kirkpatrick 2008).

1.4 Mastzellen

1.4.1 Morphologie, Entwicklung und physiologische Funktion von Mastzellen

Entdeckt wurden die Mastzellen im Jahr 1877 von dem Medizinstudenten und späteren Nobelpreisträger Paul Ehrlich bei seinen Arbeiten zu histologischen Färbetechniken. Er behandelte die Zellen mit Anilin und stellte dabei einen Farbumschlag von blau zu violett fest (Ehrlich 1878). Diese als Metachromasie bezeichnete Färbeseigenschaft der Mastzellen beruht auf dem hohen Gehalt an sulfatierten Glykosaminoglykanen in den zahlreichen, im Zytoplasma eingelagerten basophilen Granula, die mit dem Farbstoff reagieren. Bei der Betrachtung im Lichtmikroskop besitzt die Mastzelle eine runde oder spindelförmige Morphologie, gelegentlich mit kurzen dendritischen Ausläufern. Durch ihren großen runden Zellkern lassen sich Mastzellen von den funktionell und morphologisch sehr ähnlichen basophilen Granulozyten unterscheiden, die einen segmentierten Zellkern aufweisen (Metcalf et al. 1999).

Mastzellen entstammen pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks, von wo aus sie als unreife Vorläuferzellen in die Blutzirkulation abgegeben werden, von dort ins Bindegewebe oder Schleimhäute migrieren, proliferieren und dort zu Mastzellen differenzieren (Kitamura et al. 1993). Eine maßgebliche Rolle bei der Proliferation und Differenzierung der Mastzellen spielt sowohl der Tyrosinkinase-Rezeptor *Kit* (CD117) als auch dessen Ligand *stem cell factor* (SCF). Aber auch das Vorhandensein verschiedener Interleukine (IL-3, IL-4, IL-9, IL-10 und IL-13), die aufgrund ihrer stimulierenden Wirkung auf Mastzellen auch *mast cell growth factors* genannt werden sowie einiger pro-inflammatorischer Zytokine (IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α und TGF- β) beeinflussen die Rekrutierung, Proliferation, Aktivierung und Apoptose der Mastzellen (Hu et al. 2007).

Mastzellen kommen in nahezu allen durchbluteten Geweben des Organismus vor und sind aufgrund ihrer Fülle verschiedenster Mediatoren an den unterschiedlichsten physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen beteiligt. Ihre IgE-vermittelte Aktivierung spielt eine zentrale Rolle bei der Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp (Allergie Typ I nach Coombs und Gell) durch die Ausschüttung von Histamin, Serotonin, Prostaglandinen und Leukotrienen. Dieser Mechanismus liegt einer Vielzahl allergischer Erkrankungen zugrunde wie z. B. Rhinitis allergica, Asthma bronchiale, Urtikaria, allergische Gastroenteritis oder anaphylaktische Erkrankungen (Theoharides und Kalogeromitros 2006). Bei pathologischen

Fehlregulationen der Mastzellproliferation, -differenzierung oder -aktivierung kann es auch zu fibrotischen Prozessen, chronischen Entzündungsreaktionen und Tumorerkrankungen der betroffenen Gewebe kommen (Choi und Claman 1987; Metz et al. 2007; Theoharides und Conti 2004). Darüber hinaus dienen Mastzellen als gewebeständige Immunzellen auch der Antigenpräsentation mittels MHC II Molekülen (*major histocompatibility complex II*) und stimulieren über eine B-Zell-Aktivierung die Synthese von IgE-Antikörpern in Plasmazellen (Fokkens et al. 2000).

1.4.2 Mediatoren

Die vielfältigen physiologischen und pathophysiologischen Wirkungen der Mastzellen werden durch eine Fülle verschiedener Mediatoren vermittelt. Die sehr schnelle Reaktion der Mastzellen auf Antigene liegt darin begründet, dass die wichtigsten vasoaktiven, proinflammatorischen und nozizeptiven Mediatoren in großer Menge in den intrazellulären Granula der Mastzelle gespeichert sind und nach einer Aktivierung mittels Exozytose freigesetzt werden. Weitere proinflammatorische und Immunzellen-aktivierende Mediatoren werden nach einer Aktivierung der Mastzellen erst neu synthetisiert (Wedemeyer et al. 2000; Theoharides und Kaligeromitros 2006). Die Tabelle 1 gibt eine Übersicht über gespeicherte und neu synthetisierte Mediatoren der Mastzellen und ihre biologische Funktion.

Tab. 1: Beispiele präformierter und neu synthetisierter Mediatoren (Theoharides und Kalogeromitros 2006; Williams und Galli 2000)

Mediatoren	Pathophysiologische Wirkungen
Präformiert:	
Biogene Amine	
Histamin	Vasodilatation und <i>Plasma Leakage</i> , Angiogenese, Mitogenese, Schmerz
Serotonin	Vasokonstriktion, Schmerz
Chemokine	
IL-8, MCP-1, MCP-3, MCP-4	Chemotaxis und Gewebeeinfiltration von Leukozyten
Enzyme	
Arylsulfatasen	Lipid- und Proteoglykan Hydrolyse
Carboxypeptidase A	Peptid Abbau
Chymase	Gewebeschädigung, Schmerz, Angiotensin II Synthese
Kinogenasen	Synthese vasodilatatorischer Kinine, Schmerz
Phospholipasen	Arachidonsäure Bildung
Tryptase	Gewebeschädigung, Entzündung, Schmerz
Peptide	
Endorphine	Analgesie
Endothelin	Sepsis
Kinine (Bradykinin)	Entzündung, Schmerz, Vasodilatation
Substanz P	Entzündung, Schmerz
Vasotives intestinales Peptid (VIP)	Vasodilatation
Proteoglykane	
Heparin	Bindung und Stabilisierung von Histamin, Proteasen und Zytokinen, Angiogenese, Antikoagulation wie Heparin, jedoch weniger potent
Chondroitin Sulfat	
De novo synthetisiert:	
Zytokine	
Interleukine (IL)-1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 13, 16	Entzündung, Leukozyten-Migration, Schmerz
INF- γ ; MIF; TNF- α	Entzündung, Leukozyten-Proliferation und -Aktivierung
Phospholipid Metaboliten	
Leukotriene (LTB ₄ , LTC ₄)	Chemotaxis von Leukozyten, Vasokonstriktion, Schmerz
Plättchen-aktivierender Faktor (PAF)	Plättchen-Aktivierung, Vasodilatation
Prostaglandin D2	Bronchokonstriktion, Schmerz
Stickstoffmonoxid (NO)	Vasodilatation

1.4.3 Mechanismen der Mastzelldegranulation

Der endozytotische und exozytotische Stofftransport ermöglicht es der Zelle mit ihrer Umgebung zu kommunizieren. Beide Prozesse spielen eine große Rolle in der Biosynthese innerhalb der Zelle, wobei die Endozytose die Aufnahme unlöslicher Stoffe wie Cholesterin oder Eisenionen, und die Exozytose die Integration von Proteinen und Lipiden in die Plasmamembran ermöglicht. Darüber hinaus beeinflussen beide Prozesse auch die Zellregulation. Endozytose ermöglicht beispielsweise die Internalisierung spezifischer Rezeptoren und kann so die Zellantwort auf exogene Stimuli modulieren. Exozytose hingegen beeinflusst die Zellkommunikation durch die Freisetzung von Signalmolekülen wie z. B. Neurotransmitter, Hormone oder Wachstumsfaktoren. Alle eukaryotischen Zellen unterliegen einer konstitutiven Exozytose, durch welche die Plasmamembran erneuert, erweitert oder modifiziert wird. Spezialisierte sekretorische Zellen wie z. B. Neurone, endokrine, exokrine oder Immunzellen zeigen hingegen eine regulierte Exozytose, bei der die sekretorischen Granula nur auf einen spezifischen äußeren Reiz mit der Plasmamembran fusionieren und ihren Inhalt in den Extrazellularraum entlassen. Die Exozytose der sekretorischen Mastzellgranula erfolgt Ca^{2+} -getriggert und wird durch Synaptotagmine reguliert (Baram et al. 1998; Sagi-Eisenberg 2007). Zunächst werden die Vesikel entlang des Zytoskeletts zur Plasmamembran geleitet. Bei der Verschmelzung der Membranbestandteile von Vesikel und Plasmamembran spielen die sogenannten SNARE-Proteine (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor*) eine große Rolle. Bei der Annäherung der beiden Membranen bilden diese SNARE-Proteine aufgrund ihrer hohen Affinität zueinander den sehr stabilen sogenannten *core* Komplex. Dabei interagieren die vesikulären SNARE-Proteine (v-SNARE), welche zur Synaptobrevin-Familie gehören, mit den *target* t-SNARE-Proteinen Syntaxin und SNAP23 (*synaptosome associated protein*) der Plasmamembran (Söllner et al. 1993). Normal hydratisierte Membranen werden abhängig von ihren Lipidbestandteilen und ihren Membranproteinen in einem Abstand von 2 – 20 nm gehalten. Das Zusammenspiel der verschiedenen SNARE-Proteine und die Ausbildung des *core* Komplexes bringt die *Lipidbilayer* auf einen Abstand von 0,2 – 0,3 nm, wodurch die Membranfusion ermöglicht wird (Jena et al. 2003; Fasshauer 2003). Mastzellen und andere sekretorische Zellen sind in der Lage, auf einen Aktivierungsreiz hin schnell große Mengen ihres Vesikelinhaltes auszuschütten. Bei diesem Prozess der *compound exocytosis* verschmelzen mehrere Vesikel zu einem Kanal, was den

aktiven Bereich der Plasmamembran um bis zu 30 % erhöht und somit die Effizienz der Mediatorausschüttung enorm gesteigert wird (Picket und Edwardson 2006). Neben dieser sehr effizienten und schnellen Freisetzung großer Mengen Mediatoren sind Mastzellen aber auch in der Lage, auf bestimmte endogene oder exogene Stimuli hin sehr spezifisch nur bestimmte Mediatoren aus den Vesikeln zu entlassen. Durch einen Mechanismus, der als „*kiss and run*“ oder *transient fusion* bezeichnet wird, öffnet sich zwischen Vesikel und Plasmamembran nur eine Pore, ohne dass beide Membranen komplett verschmelzen. Der Vesikelinhalt kann so entweder teilweise oder komplett freigesetzt werden. Dieser Prozess ist von der intrazellulären Kalziumkonzentration abhängig und wird durch einen geringen Kalziumeinstrom vermittelt. Im Gegensatz dazu wird die vorher beschriebene totale Fusion durch eine hohe intrazelluläre Kalziumkonzentration getriggert (Alvarez de Toledo et al. 1993; Elhamdani et al. 2006).

1.5 Die SLC10 Transporter Familie

1.5.1 Die Superfamilie der Solute Carrier (SLC)

Das *Human Genome Organisation (HUGO) Nomenclature Committee (HGNC)* klassifiziert alle bekannten humanen Gene, vergibt die entsprechenden Gennamen und die jeweilige Abkürzung. Die Superfamilie der Solute Carrier umfasst derzeit 55 Genfamilien (SLC1 bis SLC47, SLCO1 bis SLCO6 (vormals SLC21) und UCP1-3) mit 362 mutmaßlich funktionellen Proteinkodierenden Genen, die in der HGNC-Datenbank aufgeführt sind (He et al. 2009; www.bioparadigms.org/slc/intro.asp). Die SLC-Mitglieder umfassen passive Transporter, ionengekoppelte Symporter und Antiporter, welche entweder in der Plasmamembran oder den Membranen der Zellkompartimente die Aufnahme und Abgabe zahlreicher Substanzen vermitteln. Ein neu klonierter Transporter wird einer SLC-Familie zugeordnet, wenn er mindestens 20 – 25 % Sequenzhomologie zu den bereits bekannten Mitgliedern dieser Familie aufweist (Hediger et al. 2004). Diese Arbeit befasst sich mit dem *orphan carrier* Protein SLC10A4, welches im Jahr 2004 der SLC10 Familie zugeordnet wurde.

1.5.2 Klassifizierung und Stammbaum der Solute Carrier Familie 10 (SLC10)

Die Solute Carrier Familie 10, auch bekannt unter dem Namen „*Sodium Bile Acid Cotransporter Family*“, umfasste bis zum Jahr 2004 nur die beiden Gründungsmitglieder und Namensgeber dieser Familie NTCP (*Na⁺/Taurocholate Cotransporting Polypeptide*, SLC10A1) und den *Apical Sodium-dependent Bile Acid Transporter* (ASBT, SLC10A2). Diese beiden Proteine sind Gallensäuretransporter in der Leber (NTCP) bzw. im Dünndarm (ASBT) und erhalten den enterohepatischen Kreislauf der Gallensäuren aufrecht. Im Jahr 2004 wurden am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Gießen vier weitere Mitglieder dieser Familie identifiziert und als SLC10A4, welcher Gegenstand dieser Arbeit ist, SLC10A5, SOAT (*Sodium-dependent organic anion transporter*, SLC10A6) sowie SLC10A7 identifiziert und kloniert. Innerhalb der SLC10-Familie zeigen ASBT und SOAT die höchste phylogenetische Verwandtschaft mit einer Sequenzidentität von 42 % auf Aminosäureebene, während SLC10A4 am nächsten mit NTCP verwandt ist (29,7 % Sequenzidentität). Darüber hinaus wurde das bereits im Jahr 1988 isolierte Protein SLC10A3 ebenfalls in diese Familie eingruppiert, da es zusammen mit SLC10A5 einem gemeinsamen Vorläufergen entspringt (Hagenbuch und Dawson 2004; Geyer et al. 2004, 2006, 2008; Fernandes et al. 2007; Godoy et al. 2007). Das Substratspektrum und die Affinitäten zu verschiedenen Substraten der drei bis jetzt am besten charakterisierten Transporter dieser Familie NTCP, ASBT und SOAT unterscheidet sich jedoch. Während NTCP und ASBT natriumabhängig Gallensäuren transportieren, ist SOAT ein Transporter für sulfatierte Steroidhormone und wird vor allem in geschlechtsspezifischen Organen wie Hoden, Plazenta und Brustdrüse exprimiert (Geyer et al. 2006, 2007). Über die physiologische Funktion der restlichen Mitglieder der SLC10 Familie ist allerdings bis heute noch wenig bekannt. Daher ist es Gegenstand dieser Arbeit, die genaue Lokalisation von SLC10A4/Slc10a4 im Organismus und seine subzelluläre Expression zu klären. Zur Unterscheidung der Gene und Genprodukte von Mensch und anderen Spezies, erfolgt die Nomenklatur in der vorliegenden Arbeit in Groß- (Mensch) und Kleinbuchstaben (andere Spezies).

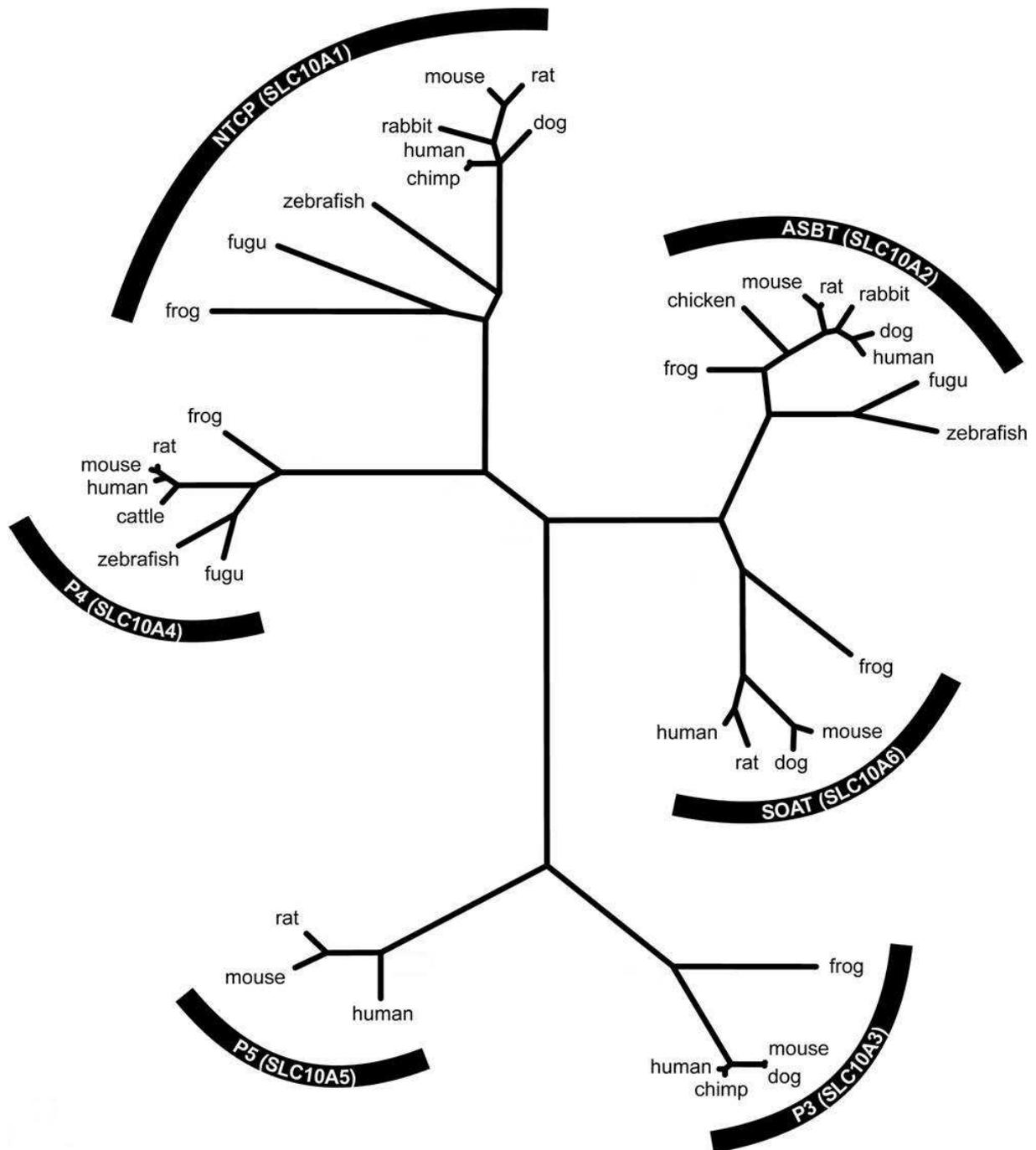


Abb. 1.2: Phylogenetischer Stammbaum der SLC10 Familie

Die SLC10 Familie besteht aus sechs Mitgliedern (SLC10A1 bis SLC10A6). NTCP, ASBT und SOAT sind bereits funktionell charakterisiert, während für die anderen Mitglieder SLC10A3, SLC10A4 und SLC10A5 noch keine Funktion bekannt ist. Gezeigt ist die Sequenzverwandtschaft von SLC10A1-SLC10A6 auf Proteinebene (modifiziert nach Geyer et al. 2006).

1.5.3 NTCP, ASBT und der enterohepatische Kreislauf der Gallensäuren

NTCP wurde im Jahr 1991 aus der Rattenleber kloniert. Das humane NTCP Protein besteht aus 349 Aminosäuren, das der Ratte aus 362 Aminosäuren. Beide zeigen eine Sequenzidentität von >70 % (Hagenbuch et al. 1990, 1991; Hagenbuch und Meier 1994). Der *Apical Sodium-dependent Bile Acid Transporter* ASBT wurde kurze Zeit später als zweites Mitglied der SLC10 Familie entdeckt. ASBT besteht aus 348 Aminosäuren und zeigt eine speziesübergreifende Sequenzidentität von >80 %. Seine Verwandtschaft zum NTCP ist allerdings mit einer Sequenzidentität von 35 % eher gering (Wong et al. 1994; Shneider et al. 1995).

Der natriumabhängige Gallensäuretransporter der Leber, NTCP, wird in der basolateralen (sinusoidalen) Membran der Hepatozyten exprimiert (Ananthanarayanan et al. 1994; Stieger et al. 1994; Kullak-Ublick et al. 1997). Hier extrahiert er sehr effizient Gallensäuren aus dem Portalblut in einem Kotransport mit zwei Na⁺-Ionen. So hält er die Plasmakonzentration von Gallensäuren in der systemischen Zirkulation niedrig und führt die Gallensäuren wieder der erneuten Ausscheidung mit dem Gallefluss zu. Aus den Hepatozyten werden die Gallensäuren durch BSEP (*bile salt excretory pump*) und MRP2 (*multi drug resistant protein*) in die Gallenkanalikuli gepumpt und gelangen nach der Speicherung in der Gallenblase mit dem Gallefluss in den Dünndarm. Hier dienen Gallensäuren der Emulgierung von Fettsäuren, Cholesterin und fettlöslichen Vitaminen (A, D, E und K). Die Gallensäuren bilden mit den wasserunlöslichen Nahrungsfetten wasserlösliche Mizellen, die in der Bürstensaummembran des Dünndarms absorbiert werden. Der größte Teil der Gallensäuren (ca. 95 %) wird dann hauptsächlich durch die Na⁺-abhängige Transportleistung des ASBT, der in der Bürstensaummembran des terminalen Ileum lokalisiert ist, recycelt und gelangt über das Portalblut zurück zur Leber. Diese Rezirkulation der Gallensäuren, die sehr effektiv ist und die energieintensive Neusynthese der Gallensäuren auf ein Minimum reduziert, wird als „enterohepatischer Kreislauf der Gallensäuren“ bezeichnet (Shneider 2001; Kullak-Ublick et al. 2004; Alrefai und Gill 2007).

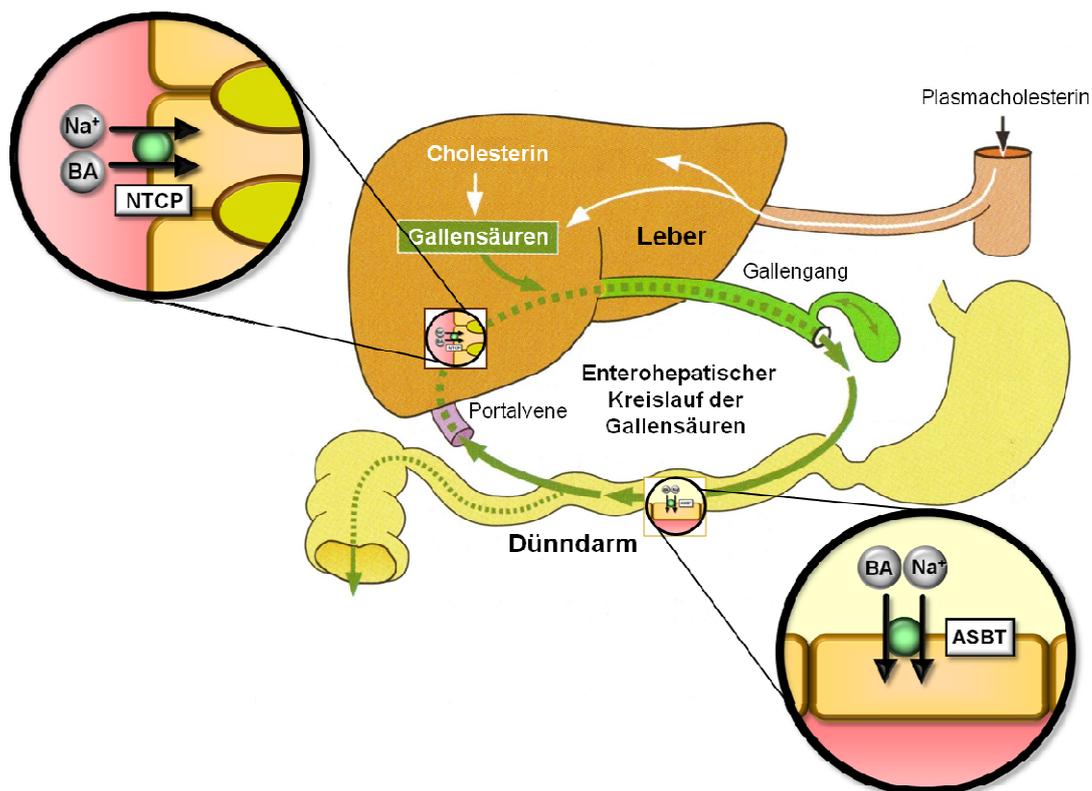


Abb. 1.3: Der enterohepatische Kreislauf der Gallensäuren

Gallensäuren werden in der Leber aus Cholesterin gebildet und über die Effluxtransporter BSEP und MRP2 in die Gallenkanalikuli abgegeben. Nach der Speicherung in der Gallenblase gelangen sie über den Gallengang in den Dünndarm, wo sie durch die Emulgation der Nahrungsfette und fettlöslichen Vitamine eine wichtige Rolle in der Fettverdauung spielen. Im terminalen Ileum wird ein Großteil der Gallensäuren durch den Na⁺-abhängigen ASBT rückresorbiert und über das Portalblut zurück zur Leber transportiert. In der basolateralen Membran der Hepatozyten ist der NTCP lokalisiert, der Na⁺-abhängig die Gallensäuren aus dem Portalblut extrahiert und einer erneuten Ausscheidung mit dem Gallefluss zuführt. Durch dieses sehr effektive Rezirkulationssystem der Gallensäuren wird der Cholesterinhaushalt des Körpers reguliert und der Energieverlust durch die Neusynthese von Gallensäuren in der Leber niedrig gehalten. BA = bile acid (Gallensäure)

1.5.4 SOAT, der Transporter für sulfatierte Steroidhormone

Von den im Jahr 2004 neu entdeckten Mitgliedern der SLC10 Familie ist der *sodium-dependent organic anion transporter* (SOAT, SLC10A6) der bis heute am besten charakterisierte Transporter. Die SOAT/Soat Transkripte wurden aus der Nebenniere von Mensch und Ratte sowie aus der Leber der Maus isoliert (Geyer et al. 2004, 2006, 2007). Expressionsanalysen mittels quantitativer real-time PCR zeigten die höchste Expression von SOAT im Hoden des Menschen. Eine relativ starke Expression zeigte sich auch in der humanen Plazenta, Pankreas und Brustdrüse (Geyer et al. 2007). Das SOAT Protein besteht aus 377 Aminosäuren und weist eine 7-Transmembrandomänen Topologie auf. Die höchste phylogenetische Verwandtschaft besteht zum ASBT (42 % Sequenzidentität) und zum NTCP (33 % Sequenz-

identität), wobei die deutlichsten Unterschiede im C- und N-Terminus zu finden sind, während die Transmembrandomänen eine relativ homologe Struktur aufweisen (Geyer et al. 2007). Obwohl SOAT strukturell eher mit dem ASBT vergleichbar ist, zeigt sich im Substratspektrum eine größere Ähnlichkeit zum NTCP. Während ASBT sehr spezifisch nur unkonjugierte Gallensäuren sowie deren Glycin- und Taurinkonjugate transportiert (Wong et al. 1994; Craddock et al. 1998; Kramer et al. 1999), dienen dem NTCP darüber hinaus sulfatierte Gallensäuren und Steroidsulfate sowie freie und konjugierte Jodthyronine als Substrate (Craddock et al. 1998; Friesema et al. 1999; Kramer et al. 1999; Visser et al. 2010). SOAT hingegen transportiert die Steroidsulfate Estronsulfat (E_1S), Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS), Pregnenolonsulfat (PREGS), die sulfatierte Gallensäure Tauroolithocholat-3-sulfat (TLCS) sowie 2- und 4-Sulfooxomethyl-pyren (SMP) (Geyer et al. 2007; Döring 2009).

1.5.5 SLC10A4, von Gallensäuretransportern zum Nervensystem

Das SLC10A4-Gen ist ebenfalls eines von den im Jahr 2004 neu entdeckten Mitgliedern der SLC10 Familie. Aufgrund der sehr spezifischen Funktion von NTCP und ASBT lag die Vermutung nahe, es könne sich um einen weiteren Gallensäuretransporter oder einen Transporter für sonstige organische Anionen handeln. Es war daher sehr überraschend, dass SLC10A4 die höchste Expression im Gehirn verschiedener Spezies zeigte (Geyer et al. 2006, Splinter et al. 2006). Darüber hinaus wurde eine starke Expression in Plazenta, Pankreas und kultivierten Cholangiozyten sowie eine moderate Expression in Leber und Niere festgestellt (Splinter et al. 2006). Das SLC10A4-Protein umfasst 437 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von 46,7 kDa. Es zeigt eine speziesübergreifende Sequenzidentität von 85 - 95 % und entsprechende Aminosäureidentitäten von 29,7 %, 29,1 % bzw. 28,7 % zu NTCP, ASBT und SOAT. Allerdings weist das Protein eine um etwa 60 Aminosäuren längere N-terminale Domäne auf, als die drei beschriebenen SLC10 Mitglieder NTCP, ASBT und SOAT. Bei Transportversuchen an transfizierten CHO- und HEK293 Zellen konnte allerdings weder eine Transportfunktion für die Gallensäure Taurocholat noch für die sulfokonjugierten Neurosteroid DHEAS (Dehydroepiandrosteronsulfat) und PREGS (Pregnenolonsulfat) gezeigt werden. Ebenso konnte keine Transportaktivität für Cholinchlorid in transfizierten HEK293 Zellen festgestellt werden (Splinter et al. 2006; Geyer et al. 2006, 2008). Allerdings zeigte sich durch

den Einsatz eines spezifischen Antikörpers, der gegen den C-Terminus des Rattenproteins gerichtet ist, sowohl in immunhistologischen Untersuchungen als auch im Western Blot eine spezifische Expression des SLC10A4-Proteins im Gehirn der Ratte. Eine genauere Untersuchung der Lokalisation von SLC10A4 anhand von Doppelmarkierungen mit den cholinergen Markern VACHT und CHT-1 zeigte ein charakteristisches Expressionsmuster in cholinergen Regionen des Rattengehirns (Fernandes 2007; Geyer et al. 2008).

1.5.6 SLC10A3, SLC10A5 und SLC10A7, weitere *orphan carrier* der SLC10 Familie

Bereits im Jahr 1988, noch vor der Entdeckung von NTCP und ASBT wurde SLC10A3 aus der humanen Plazenta isoliert. Das Protein besteht aus 477 Aminosäuren und zeigt eine Sequenzidentität von 33,9 % zum SLC10A5, mit dem es am nächsten verwandt ist. Die Aminosäureidentität zu NTCP und ASBT beträgt nur rund 20 %, woraufhin dieses Protein jedoch trotzdem in die SLC10 Familie eingruppiert wurde. Aufgrund seiner ubiquitären Gewebeexpression wird es als Protein mit *Housekeeping* Funktion angesehen (Alcalay und Toniolo 1988; Hagenbuch und Dawson 2004; Geyer et al. 2006).

Das SLC10A5-Transkript wurde 2007 aus der Leber von Mensch und Maus sowie aus dem Dünndarm der Ratte kloniert. Es besteht aus 438 (Mensch) bzw. 434 (Maus und Ratte) Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von 42 kDa. Die Sequenzidentität zu NTCP und ASBT beträgt rund 22 %. Die höchste Expression von SLC10A5/Slc10a5 findet sich in Leber und Niere von Mensch, Maus und Ratte sowie im Dünndarm der Ratte. Auch SLC10A5/Slc10a5 zeigte keine Transportaktivität für die bekannten Substrate der SLC10 Familie wie Taurocholat, Cholat, Estronsulfat oder DHEAS. Sein Expressionsmuster in Hepatozyten und im proximalen Tubulus der Niere deuten aber auf einen möglichen hepatischen und renalen Transport anderer, bis jetzt noch nicht identifizierter Substrate hin (Fernandes et al. 2007).

Ein weiteres *orphan carrier* Protein wurde 2007 im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Justus-Liebig Universität identifiziert und in die SLC10 Familie eingruppiert. Das SLC10A7-Protein weist bei Mensch, Ratte, Maus und Frosch eine sehr breite Gewebeexpression auf und zeigt eine hohe phylogenetische Verwandtschaft zu zahlreichen bakteriellen Proteinen (Sequenzidentität >20 %). Zu den anderen Mitgliedern der SLC10 Familie zeigt sich jedoch nur eine Sequenzidentität von 12 – 16 % und weist zudem noch essenzielle Unter-

schiede in der Membrantopologie und der Exonstruktur auf. Daher ist die Einordnung dieses Proteins in die SLC10 Familie sehr umstritten. Die Funktion des SLC10A7 ist bis heute noch nicht geklärt. Auch dieses Protein transportiert keines der bekannten Substrate der SLC10 Familie (Godoy et al. 2007).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Als im Jahr 2004 das *orphan carrier* Protein SLC10A4 als neues Mitglied der SLC10 Familie entdeckt wurde, vermutete man, dass ein phylogenetisch so naher Verwandter zu den beiden Gallensäuretransportern NTCP und ASBT ebenfalls ein Gallensäuretransporter sein sollte. So war es eine große Überraschung, als erste Expressionsanalysen ergaben, dass SLC10A4/Slc10a4 im Gehirn verschiedener Spezies (Maus, Ratte und Mensch) am höchsten exprimiert ist. Immunhistochemische Untersuchungen und Immunfluoreszenz–Doppelmarkierungen mit einem spezifischen Slc10a4-Antikörper zeigten, dass das Protein in cholinergen Gehirnregionen und cholinergen Neuronen des Darmnervensystems lokalisiert ist (Geyer et al. 2008). Jedoch wurde sowohl in dieser Studie als auch in den Studien anderer Gruppen (Jørgensen et al. 2006; Lein et al. 2007, Allen Brain Atlas www.mouse.brain-map.org) immunhistologische- und *in-situ* Hybridisierungssignale aber auch eine mRNA Hochregulation während der Gehirnentwicklung für Slc10a4 in der *Substantia nigra*, einer dopaminergen Gehirnregion, gezeigt. Das gab den ersten Hinweis darauf, dass Slc10a4 nicht exklusiv in cholinergen Neuronen exprimiert ist.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die regionale und subzelluläre Lokalisation von Slc10a4 im zentralen und peripheren Nervensystem zu ermitteln. Darüber hinaus sollte anhand vergleichender Analysen mit den vesikulären Transportern VACHT und VMAT2 eine mögliche Koexpression mit Slc10a4 in den verschiedenen Organen analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden ausführliche Immunfluoreszenzanalysen in ausgewählten Organen des zentralen und peripheren Nervensystems durchgeführt. Die subzelluläre Lokalisation sollte anhand verschiedener Methoden wie Vesikelaufreinigung, Immunpräzipitation und Elektronenmikroskopie geklärt werden. Da bis heute noch keine Funktion des Proteins bekannt ist, sollen anhand der gewonnen Erkenntnisse Arbeitshypothesen entwickelt werden, die bei der Aufklärung der Funktion von SLC10A4 behilflich sein können.

2. MATERIAL

Das Auffüllen der Ansätze, Puffer und Medien auf das entsprechende Volumen erfolgte, soweit nicht anders angegeben, mit bidestilliertem Wasser (ddH₂O). Nichtbenutzung von TM oder ® bedeutet nicht, dass die Produktbezeichnungen frei verfügbar sind.

2.1 Materialien für die Molekularbiologie

2.1.1 Primer für Expressionsprofile (RT-PCR)

Target	Bezeichnung	T _m (°C)	Sequenz (5' → 3')
GAPDH	G3PDH-F1	61,4	acgggaagctcactggcatg
	G3PDH-R4	61,4	ccaccaccctgttgctgtag
Slc10a4	m/r-P4-RT-F	63,0	ctgggtgtgatgccctctg
	m/r-P4-RT-R	64,0	cctctcgcttgtgcagtatctc
	rP4-RT-F1	63,0	tactcctgtgtggctgctgtc
	rP4-RT-R1	66,0	ggtggaaggtggaagaggtag
	rP4-RT-F2	66,0	gtttccctgtgctctctgctcg
	rP4-RT-R2	65,0	cggtgccataggagggtgtctg
	rP4-RT-R3	65,0	gactggaagagagcgtaaagcaac
VMAT1	m/r-VMAT1-F	62,0	cggattgggattctatcttctca
	m/r-VMAT1-R	61,0	gcactctcaggagacactttc
VMAT2	m/r-VMAT2-RT-F	64,0	cttctccagcagctatgccttc
	m/r-VMAT2-RT-R	66,0	gctgccactttcgggaacacatg
VACHT	m/r-VACHT-RT-F	63,0	ctgggtgctggatcatcgtgtg
	m/r-VACHT-RT-R	63,0	cgggatacttgtcggcgatc

Die Primer wurden von der Firma Metabion International AG (Martinsried) synthetisiert.

2.1.2 TaqMan Gene Expression Assays für quantitative Real Time PCR

SLC10A4 Human	HS00293728
Slc10a4 Ratte	Rn02350050
VACHT Human	HS00268179
VMAT2 Human	HS00161858

TH Human	HS00165941
ChAT Human	HS00758143
NPY Human	HS00173470
VIP Human	HS00175021
GAPDH Human	HS99999905
ACTB Human	HS99999903
Actb Ratte	Rn00667869

Komponenten: zwei unmarkierte Primer zur Amplifikation

FAM-markierte TaqMan MGB (Minor Groove Binder) Sonde

2.1.3 TaqMan Gene Expression Master Mix

Komponenten: AmpliTaq Gold DNA Polymerase

UDG (Uracil-DNA Glycosylase)

dNTPs mit dUTP (Deoxyuridintriphosphat)

Referenzfarbstoff ROX

optimierte Pufferkomponenten

2.1.4 RNA, cDNA Panels

cDNA Panel Human Adult Normal Tissue, Neural 2 [Cerebral cortex, Pons, Cerebellum Medulla oblongata]	BioChain, Hayward, USA
cDNA Panel Human Adult Normal Tissue, Neural 3 [Temporal Lobe, Hippocampus, Amygdala, Thalamus]	BioChain, Hayward, USA
cDNA Panel Human Adult Normal Tissue, Neural 4 [Cerebral cortex, Corpus callosum, Cerebral peduncles, Spinal Cord]	BioChain, Hayward, USA
Human Brain, Substantia nigra, Total RNA	BD Clontech, Mountain View, USA
Human Brain, Nucleus accumbens, Total RNA	BD Clontech, Mountain View, USA
Human Brain, Putamen, Total RNA	BD Clontech, Mountain View, USA

2.1.5 Puffer und Medien

LB-Medium (1 l)	Trypton	10 g
	NaCl	10 g
	Yeast-Extract	5 g
	→ pH 7,0 (NaOH), autoklavieren	
	→ vor Gebrauch Selektionsantibiotikum hinzufügen	

2.1.6 Polymerasen, kommerziell erhältliche Kits und sonstige Materialien

Hitzebeständige DNA-Polymerasen	
FastStart High Fidelity PCR System → Mix aus thermostabiler Taq DNA Polymerase und thermostabiler proofreading Polymerase (3' → 5' Exonuklease Aktivität)	Roche Diagnostics, Mannheim
FastStart Taq Polymerase, dNTP Pack → thermostabile Taq Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
Kommerziell erhältliche Kits und sonstige Materialien	
SuperScript III First Strand Synthesis System (cDNA Synthese)	Invitrogen, Karlsruhe
TriReagent (RNA-Isolierung)	Sigma, Taufkirchen
RNeasy Mini Kit (RNA-Isolierung)	Qiagen GmbH, Hilden
Full Spectrum RNA Complete Transcriptome RNA Amplification Kit	BioCat, Heidelberg
TaqMan Gene Expression Cells-to-C _T -Kit	Ambion, Foster City, USA
NucleoBond Xtra Midi Kit	Macherey Nagel, Düren
RNAlater [®] RNA Stabilization Solution	Applied Biosystems, Darmstadt
Wasser für die Molekularbiologie	Roth, Karlsruhe

2.2 Agarose-Gelelektrophoresen

2.2.1 Native Agarose-Gelelektrophorese (DNA)

6 x Ladepuffer (MBI Fermentas, St. Leon-Roth)	Tris-HCl (pH 7,6)	10 mM
	Bromphenolblau	0,03%
	Xylen Cyanol FF	0,03%
	Glycerin	60%
	EDTA	60 mM

10 x TAE Puffer (1l)	Tris	400 mM	484 g
	Essigsäure		114,2 ml
	0,25 M EDTA, pH 8,0	100mM	400 ml
	→ als 1 x verwenden		
EB-Färbelösung	Ethidiumbromid in H ₂ O	1µg/µl	
1,5 % Agarosegel	Agarose		1,5 g
	1 x TAE Puffer		100 ml

2.2.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese (RNA)

DEPC-ddH₂O	DEPC [1mg/ml]	0,1 %	1 ml
	ddH ₂ O		1 l
	→ über Nacht inkubieren		
	→ autoklavieren		
10 x MOPS Puffer (400 ml)	MOPS	200 mM	16,74 g
	Natriumacetat	100 mM	3,28 g
	20 mM EDTA	1 mM	20 ml
	DEPC-ddH ₂ O		380 ml
	→ pH 7,0 (NaOH)		
	→ lichtgeschützt lagern		
→ als 1 x verwenden			
Agarosegel	Agarose		1 g
	DEPC-ddH ₂ O		40 ml
	10 x MOPS Puffer		5 ml
	→ kochen bis Agarose gelöst ist		
	Formaldehyd	37%	7 ml
→ dazugeben und Gel gießen			
1,3 x Ladepuffer Roti-Load RNA (Roth, Karlsruhe)	Formamid	55 %	
	MOPS	22 mM	
	Natriumacetat	8,8 mM	
	EDTA	1 mM	
	Formaldehyd	6,8 %	
	Bromphenolblau	0,03 %	
	Ethidiumbromid	0,005 %	
	→ pH 7,0		

2.2.3 Längenstandards

Agarose-Gelelektrophorese		
Gene Ruler DNA Ladder Mix	100, 200, 300, 400, 500 , 600, 700, 800, 900, 1031 , 1200, 1500, 2000, 2500, 3000 , 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
peqGOLD High Range RTU RNA-Leiter	200, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 6000 bp	PeqLab, Erlangen

2.3 Zellkultur

2.3.1 Zelllinien

Flp-In T-REx 293 Zellen (Invitrogen, Karlsruhe)

Wirtszelllinie: human embryonic kidney cells 293 (HEK293)
ATCC-Nummer CRL-1573

Modifikation: stabile Integration einer *FRT site* in das Genom (*pFRT/lacZeo*)

Charakteristika: adhärent wachsend

Zeocin-resistent → Selektion auf integrierte *FRT site*

GripTite 293 MSR Zellen (Invitrogen, Karlsruhe)

Wirtszelllinie: human embryonic kidney cells 293 (HEK293-H)

Modifikation: konstitutive Expression *des human macrophage scavenger receptor type 1* (MSR 1, pCMV SPORT6 MSR.neo)

→ sehr hohe Adhärenz im Vergleich zu den Ausgangszellen

Charakteristika: adhärent wachsend

Geneticin-resistent → Selektion auf pCMV SPORT6 MSR.neo

PC12 Zellen (DSMZ, Braunschweig)

Ursprung: Phäochromozytom Tumorzelllinie der Ratte

DSMZ-Nummer: ACC 159

Charakteristika: kleine, runde, in Klumpen wachsende Zellen, auf Plastik wenig adhärent, differenzieren unter Einfluss von NGF (*Nerve Growth Factor*) zu neuronartigen Zellen

SH-SY5Y (DSMZ, Braunschweig)

Ursprung: Humanes Neuroblastom, klonale Sublinie aus der neuroepithelialen Zelllinie

SK-N-SH

DSMZ-Nummer: ACC 209

Charakteristika: kleine, runde oder längliche Zellkörper mit gelegentlich vorkommenden neuritenartigen Zellausläufern, differenzieren unter Einfluss von *all-trans* Retinsäure zu Zellen mit neuronaler Morphologie und Funktion

2.3.2 Zellkulturmedien

HEK293-Medium (500 ml)	D-MEM (high glucose)		217,5 ml
	F-12 (Ham)		217,5 ml
	FKS	10 %	50 ml
	L-Glutamin [200 mM]	4 mM	10 ml
	Pen/Strep [10000 Units/ml; 10000 µg/ml]	1 %	5 ml
GripTite MSR Medium (500 ml)	D-MEM (high glucose)		430 ml
	FKS	10 %	50 ml
	MEM Non-Essential Amino acids (NEAA)	0,1 mM	5 ml
	L-Glutamin [200 mM]	4 mM	10 ml
	Pen/Strep [10000 Units/ml; 10000 µg/ml]	1 %	5 ml

PC12-Medium (500 ml)	RPMI 1640		410 ml
	NHS	10 %	50 ml
	FKS	5 %	25 ml
	L-Glutamin [200 mM]	4 mM	10 ml
	Pen/Strep [10000 Units/ml; 10000 µg/ml]	1 %	5 ml
SH-SY5Y-Medium (500 ml)	D-MEM (high glucose)		385 ml
	FKS	20 %	100 ml
	L-Glutamin [200 mM]	4 mM	10 ml
	Pen/Strep [10000 Units/ml; 10000 µg/ml]	1 %	5 ml
HEPES-Puffer (1 l)	HEPES	18 mM	4,77 g
	NaCl	120 mM	7,07 g
	KCl	5 mM	0,4 g
	KH ₂ PO ₄	0,4 mM	0,06 g
	Na ₂ HPO ₄ • 7 H ₂ O	0,3 mM	0,08 g
	Glucose	6 mM	1 g
	Phenolrot	0,03 mM	0,01 g
	EDTA	1 mM	0,37 g
→ pH 7,3 (HCl / NaOH)			
Trypsinlösung (100 ml)	Trypsin	0,025 %	25 mg
	HEPES-Puffer		100 ml
Einfriermedium	Normalmedium	90 %	
	DMSO	10 %	
Beschichtungsmedium	Poly-L-Lysin	100 µg/ml	
Trypanblau (100 ml)	Trypanblau	4 %	4 g
	NaCl	0,9 %	0,9 g
Selektionsmedium (500 ml)	HEK293-Medium		500 ml
	Hygromycin B	150 µg/ml	75 mg

2.3.3 Antibiotika

Antibiotikum	Verwendungszweck	Endkonzentration	Hersteller
Zeocin	Selektion auf pFRT/ <i>lacZeo</i>	100 µg/ml	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Hygromycin B [50 mg/ml]	Selektion auf Insert	150 µg/ml	Roth, Karlsruhe
Geneticin Disulfat (G418)	Selektion auf pCMV SPORT6 MSR.neo	600 µg/ml	Roth, Karlsruhe

2.3.4 Wachstumsfaktoren für die neuronale Differenzierung

Wachstumsfaktor	Verwendungszweck	Endkonzentration	Hersteller
Nerve Growth Factor, NGF-2.5 S	Differenzierung von PC12 Zellen	50 ng/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bone Morphogenic Protein, BMP-2	Differenzierung von SH-SY5Y Zellen	10 ng/ml	BioCat, Heidelberg
Transforming Growth Factor, TGF β1	Differenzierung von SH-SY5Y Zellen	10 ng/ml	Invitrogen, Karlsruhe
Retinsäure, <i>all-trans</i> RA	Differenzierung von SH-SY5Y Zellen	1 μ M	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.4 Stabile und transiente Transfektion

2.4.1 Transfektionsreagenzien

Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Roti-Fect	Roth, Karlsruhe

2.4.2 Medien zur Transfektion

HEK293-Medium ohne Antibiotika (50 ml)	D-MEM (high glucose)		22 ml
	F-12 (Ham)		22 ml
	FKS	10 %	5 ml
	L-Glutamin [200 mM]	4 mM	1 ml
HEK293-Medium ohne Antibiotika und FKS (50 ml)	D-MEM (high glucose)		24,5 ml
	F-12 (Ham)		24,5 ml
	L-Glutamin [200 mM]	4 mM	1 ml
GripTite MSR-Medium ohne Antibiotika (50 ml)	D-MEM (high glucose)		43,5 ml
	FKS	10 %	5 ml
	MEM Non-Essential Amino acids (NEAA)	0,1 mM	0,5 ml
	L-Glutamin [200 mM]	4 mM	1 ml
GripTite MSR-Medium ohne Antibiotika und FKS (50 ml)	D-MEM (high glucose)		48,5 ml
	MEM Non-Essential Amino acids (NEAA)	0,1 mM	0,5 ml
	L-Glutamin [200 mM]	4 mM	1 ml

2.5 Immunfluoreszenz

2.5.1 Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz an eukaryotischen Zellen

10 x PBS (1l)	NaCl	1380 mM	80 g	
	KCl	27 mM	2 g	
	Na ₂ HPO ₄ • 7 H ₂ O	100 mM	26,8 g	
	KH ₂ PO ₄	18 mM	2,4 g	
	→ pH 7,4 (HCl), autoklavieren → als 1 x verwenden			
2 % PFA (50 ml)	Paraformaldehyd (PFA)	2 %	1 g	
	ddH ₂ O (50 – 60° C)		45 ml	
	10 x PBS		5 ml	
	→ 1-2 Tropfen NaOH zugeben → unter Rühren bei 50°C lösen → pH 6,8 – 7,2 (HCl)			
Puffer A (110 ml)	Glycin	20 mM	165,22 mg	
	1 x PBS		110 ml	
Puffer B (70 ml)	Puffer A		70 ml	
	BSA	1 %	700 mg	
Blockierlösung (70 ml)	Puffer B		67,2 ml	
	Serum der Spezies, in welcher der sekundäre AK generiert wurde	4 %	2,8 ml	
DAPI/Methanol 1:5000	DAPI [1 mg/ml in ddH ₂ O]		10 µl	
	Methanol		50 ml	
DAPI/PBS 1:5000	DAPI [1 mg/ml in ddH ₂ O]		10 µl	
	1 x PBS		50 ml	

2.5.2 Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz an histologischen Organschnitten

0,1 M Phosphatpuffer (2 l)	Stocklösung A: NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	0,2 M	720 ml
	Stocklösung B: Na ₂ HPO ₄ • 7 H ₂ O	0,2 M	280 ml
	ddH ₂ O		1 l
	→ pH 7,4		
Blockierlösung (10 ml)	0,1 M Phosphatpuffer		9 ml
	NHS	10 %	1 ml
	Triton X-100	0,3 %	30 µl

Antikörperlösung (10 ml)	0,1 M Phosphatpuffer		10 ml
	NHS	2 %	200 µl
	Triton X-100	0,1 %	10 µl
4 % PFA (2 l)	0,1 M Phosphatpuffer (50-60°C)		2 l
	PFA	4 %	80 g
	→ pH 7,4		
	→ auf 4°C abkühlen		
0,9 % NaCl (1l)	NaCl	154 mM	9 g
	ddH ₂ O		1 l
Sucroslösung (100 ml)	0,1 M Phosphatpuffer		100 ml
	Sucrose	20 %	20 g

2.5.3 Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz an isolierten Mastzellen

Inkubationsmedium für isolierte Mastzellen (100 ml)	D-MEM (high glucose)		90 ml
	FKS	10 %	10 ml
	Pen/Strep [10000 Units/ml; 10000 µg/ml]	1 %	1 ml
4 % PFA (50 ml)	Paraformaldehyd (PFA)	4 %	2 g
	ddH ₂ O (50 – 60° C)		45 ml
	10 x PBS		5 ml
	→ 1-2 Tropfen NaOH zugeben		
	→ unter Rühren bei 50°C lösen → pH 6,8 – 7,2 (HCl)		
Blockierlösung (50 ml)	Hank's BSS		45 ml
	Serum der Spezies, in welcher der sekundäre AK generiert wurde	10%	5 ml
	Saponin	0,1 %	50 mg
Antikörper- und Waschlösung (100 ml)	Hank's BSS		100 ml
	Saponin	0,1 %	100 mg
DAPI/PBS 1:5000	DAPI [1 mg/ml in ddH ₂ O]		10 µl
	1 x PBS		50 ml
Eindeckelmedium	Hank's BSS		2 ml
	Glycerol		1 ml

2.6 Transmissionselektronenmikroskopie

0,1 M Phosphatpuffer (5 l)	Stocklösung A: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,2 M	1800 ml
	Stocklösung B: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ddH ₂ O → pH 7,4	0,2 M	700 ml 2,5 l
0,1 M Cacodylatpuffer (100 ml)	Natriumcacodylat Trihydrat ddH ₂ O → mit 0,2 M HCl auf pH 7,4 einstellen	0,1 M	2,14 g 100 ml
Fixierlösung 1 (2 l)	0,1 M Phosphatpuffer (50-60°C)		2 l
	PFA → pH 7,4 → auf 4°C abkühlen	4 %	80 g
Fixierlösung 2 (1 l)	0,1 M Phosphatpuffer		1 l
	PFA Glutaraldehyd → pH 7,4 → auf 4°C abkühlen	4 % 0,1 %	40 g 1 g
Osmierung (10 ml)	0,1 M Cacodylatpuffer Osmiumtetroxid (OsO_4)	0,5 %	10 ml 50 µl
Uranylacetat 2% (10 ml)	ddH ₂ O		10 ml
	Uranylacetat	2 %	0,2 g
Uranylacetat 4 % (20 ml)	ddH ₂ O		20 ml
	Uranylacetat	4 %	0,8 g
Bleicitrat nach Rey- nolds	<u>Lösung 1:</u> ddH ₂ O Bleinitrat → 2 Tropfen HNO_3 dazugeben, um Hydrolyse des Bleinitrat zu verhindern		100 ml 6,25 g
	<u>Lösung 2:</u> ddH ₂ O Natriumcitrat → 1 Tropfen Lösung 1 dazu geben		100 ml 10,8 g
	<u>Bleicitrat nach Reynolds:</u> Lösung 1 Lösung 2 → gut schütteln → tropfenweise 0,8 ml 1 N NaOH zugeben, bis die Lösung klar wird		2,1 ml 2,1 ml

0,5 % Toluidin-Blau (50 ml)	Toluidinblau O	0,5 %	0,25 g
	Dinatriumtetraborat	0,5 %	0,25 g
	ddH ₂ O		50 ml
0,2 M Glycinpuffer (20 ml)	0,1 M Phosphatpuffer		20 ml
	Glycin	200 mM	0,3 g
Blockierlösung (20 ml)	0,1 M Phosphatpuffer		20 ml
	BSA	1 %	0,2 g
	NGS	3 %	600 µl
	→ durch Spritzenfilter filtrieren		
Antikörperlösung (5 ml)	0,1 M Phosphatpuffer		5 ml
	BSA	1 %	50 mg

2.7 Proteinanalyse

2.7.1 Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Proteine)

	Sammelgel (15 ml)	Trenngel (50 ml)
ddH ₂ O	10,2 ml	16,4 ml
30 % Acrylamid Mix	2,55 ml	20 ml
1,0 M Tris (pH 6,8)	1,9 ml	---
1,5 M Tris (pH 8,8)	---	12,5 ml
10 % SDS	150 µl	500 µl
10 % APS	150 µl	500 µl
TEMED	15 µl	20 µl

10 x Tris-Glycin-SDS Elektrophoresepuffer (1 l)	Tris	250 mM	30,3 g
	Glycin	1920 mM	144 g
	SDS	1 %	10 g
	→ als 1 x verwenden		
2 x Lämmli Puffer (10 ml) (Sigma-Aldrich, Steinheim)	SDS	4 %	0,4 g
	Glycerin	20 %	2 g
	β-Mercaptoethanol	10 %	1 ml
	Bromphenolblau	0,004 %	0,4 mg
	1 M Tris (pH 6,8)	0,125 M	1,25 ml

4 x Lämmli Puffer (10 ml)	SDS	8 %	0,8 g
	Glycerin	40 %	4 g
	β -Mercaptoethanol	20 %	2 ml
	Bromphenolblau	0,008 %	0,8 mg
	1 M Tris (pH 6,8)	0,25 M	2,5 ml

2.7.2 Puffer und Lösungen für Western Blot

Transferlösung (1 l)	1 x Tris-Glycin-SDS Elektrophoresepuffer		800 ml
	Ethanol	20 %	200 ml
10 x TBS	NaCl	1370 mM	12,1 g
	Tris	100 mM	121,2 g
	→ pH 8,0 (HCl)		
	→ als 1 x verwenden		
TBS-T (1 l)	1 x TBS		1 l
	Tween 20	0,05 %	500 μ l
Blockierlösung (50 ml)	TBS-T		50 ml
	ECL Membrane Blocking Agent (Amersham)	5 %	2,5 g
Coomassie- Färbelösung R250 (220 ml)	Coomassie Brilliant Blue R250	0,4 %	0,5 g
	Ethanol	50 %	100 ml
	Essigsäure	10 %	20 ml
	ddH ₂ O		100 ml
Coomassie- Färbelösung G250 (500 ml)	Coomassie Brilliant Blue G250	0,25 %	1,25 g
	Methanol	25 %	125 ml
	Essigsäure	10 %	50 ml
	ddH ₂ O		325 ml
Coomassie- Entfärbelösung (1 l)	Ethanol	30 %	300 ml
	Essigsäure	10 %	100 ml
	ddH ₂ O		600 ml

2.7.3 Puffer und Lösungen zur Präparation von peritonealen Mastzellen aus der Ratte

Krebs-Ringer-HEPES, KRH (1 l)	NaCl	130 mM	7,6 g
	KCl	4,75 mM	354 mg
	CaCl ₂ • 2 H ₂ O	2,54 mM	373,43 mg
	KH ₂ PO ₄	1,2 mM	163 mg
	MgSO ₄ • 7 H ₂ O	1,2 mM	295,78 mg
	D-Glucose-Monohydrat	11 mM	2,18 g
	HEPES	10 mM	2,38 g
	BSA	0,1 %	1 g
	ddH ₂ O		1 l
		→ pH 7,2 (NaOH)	
Gradienten-Puffer (100 ml)	NaCl	1,37 M	8 g
	KCl	27 mM	201 mg
	Na ₂ HPO ₄ • 7 H ₂ O	50 mM	1,34 g
	KH ₂ PO ₄	20 mM	272 mg
	D-Glucose-Monohydrat	56 mM	1,11 g
	BSA	1 %	1 g
	ddH ₂ O		100 ml
		→ pH 7,2 (NaOH)	
Inkubationsmedium (50 ml)	D-MEM (high glucose)		45 ml
	FKS	10 %	5 ml
	Pen/Strep [10000 Units/ml; 10000 µg/ml]	1 %	500 µl
		→ auf 37°C vorwärmen	

2.7.4 Puffer und Lösungen für Immunpräzipitation

Protein A-Sepharose (GE Healthcare)	Protein A-Sepharose Trockenpulver		200 mg
	ddH ₂ O		1 ml
	→ 2 Stunden bei RT quellen lassen		
PBS-EDTA 1 M (10 ml)	1 x PBS		10 ml
	EDTA	1 M	3,72 g
	→ pH 8,0 (NaOH)		
PBS-EGTA 1 M (10 ml)	1 x PBS		10 ml
	EGTA	1 M	3,8 g
	→ pH 8,0 (NaOH)		
PBS-EDTA/EGTA 1 mM (10 ml)	1 x PBS		8 ml
	PBS-EDTA 1 M	1 mM	1 ml
	PBS-EGTA 1 M	1 mM	1 ml

2.7.5 Puffer und Lösungen für Sucrose-Gradientenzentrifugation der Vesikelaufreinigung

Gradienten-Puffer (1 l)	ddH ₂ O		1 l
	HEPES-KOH	5 mM	1,192 g
	EDTA	1 mM	372,3 mg
	EGTA	1 mM	380,35 mg
	DTT	1 mM	154,2 mg
	→ pH 7,3 (KOH)		
Sucrose in Gradienten-Puffer 50 mM – 800 mM (je 10 ml)	Gradienten-Puffer		je 10 ml
	Sucrose	50 mM	171 mg
		bis	bis
		800 mM	2,736 g

2.7.6 Längenstandards

Protein-Polyacrylamid-Gelelektrophorese		
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	10, 17, 28, 36, 55, 72, 95, 130, 250 kDa	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Roti-Mark Western Marker mit Roti-Mark Western-HRP-Konjugat	10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 120 kDa	Roth, Karlsruhe

2.7.7 Filmentwicklung

Amersham Hyperfilm ECL
Hypam Schnellfixierer (1:25 in H₂O)
Rodinal B & W Film Developer (1:5 in H₂O)

GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Ilford, Cheshire, UK
Agfa, Leverkusen

2.7.8 Kommerziell erhältliche Kits

Amersham ECL Western Blotting Analysis System
BCA Protein Assay Kit
Rotilumin 1 & 2
Synaptic Vesicles Isolation Kit
ProteoExtract® Native Membrane Protein Extraction Kit
TriReagent® (Protein Extraktion)
ProteoJet® Mammalian Cell Lysis Reagent

GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Novagen, Darmstadt
Roth, Karlsruhe
Sigma, Taufkirchen

Calbiochem, Darmstadt
Sigma, Taufkirchen
MBI Fermentas, St. Leon-Roth

2.8 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Primärantikörper	Epitop	Spezies	Hersteller
Anti-Slc10a4	VGTDLLVLMETTQTSL (C-Terminus, Ratte)	Polyklonal, Kaninchen	Eurogentec, Seraing, Belgien (custom antibody)
Anti-hSLC10A4	DGNDNVTL FAPLLRDMYT LAPNASSLGP GTDLALAPAS SAGPGPGLSL (N-Terminus, Human)	Polyklonal, Kaninchen	Aviva, San Diego, USA
Anti-Tyrosin Hydroxylase (TH)		Monoklonal, Maus	Millipore, Schwalbach/Ts.
Anti-Synaptophysin (SYP)		Monoklonal, Maus	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Anti-Vesicular Acetylcholine Transporter (VACHT)	C-Terminus, Ratte	Polyklonal, Ziege	Millipore, Schwalbach/Ts.
Anti-VACHT	C-Terminus, Human	Polyklonal, Ziege	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-VACHT	C-Terminus, Ratte	Polyklonal, Ziege	Promega, Mannheim
Anti-Vesicular Monoamine Trans- porter-2 (VMAT2)	C-Terminus, Ratte	Polyklonal, Meer- schweinchen	Acris, Hiddenhausen
Anti-VMAT2	C-Terminus, Human	Polyklonal, Ziege	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-VMAT2	C-Terminus, Human	Polyklonal, Kaninchen	Millipore, Schwalbach/Ts.
Anti-Na⁺/K⁺-ATPase	Aminosäuren 646-652, Schaf	Monoklonal, Maus	Thermo Scientific, Schwerte
Anti-FLAG M2	DYKDDDDK	Monoklonal, Maus	Sigma, Taufkirchen

Sekundärantikörper			
Anti-Kaninchen IgG Cy3-konjugiert	Kaninchen IgG (H+L)	Polyklonal, Ziege	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen IgG Cy3-konjugiert	Kaninchen IgG (H+L)	Polyklonal, Esel	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen IgG FITC-konjugiert	Kaninchen IgG (H spezi- fisch)	Monoklonal, Maus	Sigma, Taufkirchen
Anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor 555	Kaninchen IgG (H+L)	Polyklonal, Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor 488	Kaninchen IgG (H+L)	Polyklonal, Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Ziege IgG Alexa Fluor 488	Ziege IgG (H+L)	Polyklonal, Esel	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Ziege IgG Alexa Fluor 350	Ziege IgG (H+L)	Polyklonal, Esel	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Meer- schweinchen IgG Alexa Fluor 488	Meerschweinchen IgG (H+L)	Polyklonal, Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Maus IgG Alexa Fluor 488	Maus IgG (H+L)	Polyklonal, Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Maus IgG Alexa Fluor 488	Maus IgG (H+L)	Polyklonal, Esel	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Maus IgG Cy3-konjugiert	Maus IgG (H+L)	Polyklonal, Ziege	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen IgG 15 nm Gold- konjugiert	Kaninchen IgG	Polyklonal, Ziege	British BioCell International, Cardiff, UK
ECL anti-Kaninchen HRP-gekoppelt	Kaninchen IgG	Esel	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
ECL anti-Ziege HRP-gekoppelt	Ziege IgG	Kaninchen	Zymed® Invitrogen, Karlsruhe
ECL anti-Maus HRP-gekoppelt	Maus IgG	Schaf	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

Fluoreszenzfarbstoffe		
DAPI	Färbung von Zellkernen	Roche Diagnostics, Mannheim
Hoechst 33258	Färbung von Zellkernen	Sigma, Taufkirchen

2.9 Versuchstiere

2.9.1 Versuchstiere für die Immunfluoreszenz an histologischen Organschnitten und für die Transmissionselektronenmikroskopie

Bei den insgesamt 13 verwendeten Versuchstieren handelte es sich um erwachsene Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von 200-300 g aus der Zucht des Instituts für Veterinär-Physiologie, FB 10 der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die Tiere wurden in Polykarbonat-Käfigen (Typ IV) bei konstanter Temperatur von 22,5°C, 12-stündigem Hell-Dunkel-Rhythmus und 50 % relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Trinkwasser und Standard-Nagerfutter (Altromin 1320; Altromin, Lage) standen *ad libitum* zur Verfügung.

2.9.2 Versuchstiere für die Präparation von peritonealen Mastzellen, Gehirn und Blase

Die Versuchstiere für die Präparation von Gehirnvesikeln, peritonealen Mastzellen und der Blase stammen aus institutseigener Zucht und wurden bis zum Versuch im Zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität gehalten. Es wurden insgesamt 28 erwachsene Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von 150-250 g verwendet. Die Tiere wurden in MacroDEX® Standardkäfigen (Ehret, Freiburg) bei $23 \pm 1^\circ\text{C}$ Raumtemperatur (RT), einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % und einem 12-stündigem Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Freier Zugang zu Trinkwasser und Standard-Nagerfutter (Altromin 1320) war gewährleistet.

2.9.3 Tierversuchsanzeigen

Vor dem Beginn der Studie wurden die durchzuführenden Tierversuche per Anzeige (Projektnummer V54 – 19 c 20/15 c GI 18/11 Nr. A 38/2008) auf Grundlage des Tierschutzgesetzes (TSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 21. Dezember 2006 (BGBl. I S. 3294) und der allgemeinen Verwaltungsvorschrift zur Durchführung des TSchG vom 09. Februar 2000 vom Regierungspräsidium Gießen per Bescheid vom 25.11.2008 genehmigt.

2.10 Chemische Substanzen

Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Blei(II)nitrat	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA, Bovines Serum Albumin Fraktion V	Roche, Mannheim
BSA, Cohn Fraktion V	Sigma, Taufkirchen
Calciumchlorid Dihydrat, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva, Heidelberg
DAPI, 4', 6'-Diamidine-2'-Phenylindol Dihydrochlorid	Roche, Mannheim
DEPC, Diethylpyrocarbonat	Roth, Karlsruhe
D-Glucose	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Dinatriumtetraborat-Decahydrat $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
D-MEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco, Karlsruhe; PAA, Pasching
DMSO, Dimethylsulfoxid	Roth, Karlsruhe
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure- Na_2	Roth, Karlsruhe
EGTA, Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)- tetraessigsäure	Roth, Karlsruhe
Eserserum	Sigma, Taufkirchen
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol (> 99,8 %), EtOH abs.	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
F-12 Nutrient Mixture (HAM) + Glutamin	Gibco, Karlsruhe; PAA, Pasching
FKS, fetales Kälberserum	Sigma, Taufkirchen

Fluoromount	Serva, Heidelberg
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formamid	Roth, Karlsruhe
Gentamicin	Sigma, Taufkirchen
Glutaraldehyd 25 % Lösung	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Fluka, Steinheim
Guanidinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hank's BSS	Gibco, Karlsruhe; PAA, Pasching
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Immersion liquid Typ N (Öl für Mikroskopie)	Leica, Wetzlar
Isofluran Baxter	Baxter, Unterschleißheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
Kaliumaspartat	Sigma, Steinheim
Kaliumchlorid, KCl	Merck, Darmstadt
Kaliumgluconat	Fluka, Buchs
Kaliumhydroxid, KOH	Merck, Darmstadt
Kalium-Natrium-Tartrat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Steinheim
Kaninchenserum	DAKO Cytomation, Hamburg
Lämmli Puffer (2 x Konzentrat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin (200 mM)	Gibco, Karlsruhe; PAA, Pasching
LR White Resin	Plano, Wetzlar
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
MEM Non Essential Amino acids (NEAA)	PAA, Cölbe
Membrane blocking agent	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Methanol	Roth, Karlsruhe
Molekularbiologisches Wasser	Roth, Karlsruhe
MOPS, 3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid	Sigma, Steinheim
Narcoren (Pentobarbital)	Merial, Hallbergmoos
Natriumacetat Trihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Serva, Heidelberg
Natriumcacodylat Trihydrat	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid, NaCl	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat, NaHCO_3	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid, NaOH	Roth, Karlsruhe
Natriummetaperjodat	Merck, Darmstadt
NHS, Normales Pferdeserum	Sigma, Taufkirchen
N-Methyl-D-glucamine	Merck, Darmstadt
Osmiumtetroxid, OsO_4 , 4 % Lösung	Serva, Heidelberg
Paraformaldehyd, PFA	Roth, Karlsruhe

Penicillin/Streptomycin (10000 Units/ml; 10000 µg/ml)	Gibco, Karlsruhe; PAA, Pasching
Percoll	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenolrot	Sigma, Deisenhofen
Poly-L-Lysin	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S Solution	Sigma, Steinheim
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma, Taufkirchen
Roti-Load RNA 1,3 x Ladepuffer	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640	Gibco, Karlsruhe; PAA, Pasching
Salpetersäure, HNO ₃	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, HCl	Roth, Karlsruhe
Saponin	Sigma, Taufkirchen
Sodium Dodecylsulfat (SDS)	Sigma, Taufkirchen
Stickstoff, flüssig, N ₂	Messer, Griesheim
Sucrose	Sigma, Steinheim
TEMED (N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin)	Serva, Heidelberg
Toluidinblau O	Merck, Darmstadt
Trinatriumcitrat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Fluka, Seelze
Trypsin	Gibco, Karlsruhe
Tween 20, Polyoxyethylen-sorbitanmonolaurat	Serva, Heidelberg
Uranylacetat•2 H ₂ O	Serva, Heidelberg
Ziegenserum, NGS	DAKO Cytomation, Hamburg
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

2.11 Geräte

7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Analysewaagen:	
AE 260 Delta Range	Mettler-Toledo, Gießen
C-30 Microbalance	Cahn Instruments, Cerritos, CA, USA
Precisa 3000C-6000D	DAK-Oerlikon, Zürich
Autoklav Sanoclav	Wolf, Geislingen
Autoklav Systec 3150 EL	Systec, Wettenberg
Benchmark Microplate Reader	Bio-Rad, München
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank	Heraeus, Hanau
CO ₂ -Inkubator	New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA
Kryostat HM 500 O	Microm, Walldorf
Electrophoresis Power Supply EPS600	Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Elektrophorese-Kammern	Werkstatt MZI, Gießen
14,5 x 6,5 cm	
35,5 x 11,0 cm	
Fluoreszenz Mikroskop DM5500B	Leica, Wetzlar
Software LAS AF 6000 mit 3D Deconvolution	
S/W Kamera DFC340FX	
Filter A4 UV	
(Ex: BP 360/40, BS: 400, Em: BP 470/40)	
Filter L5	
(Ex: BP 480/40, BS: 505, Em: BP 527/30)	
Filter Y3	
(Ex: BP 545/30, BS: 565, Em: 610/75)	
Objektiv N PLAN 5x/0.12	
Objektiv HCX PL FL 10x/0.25 PH1	
Objektiv HC PLAN APO 20x/0.70	
Objektiv HCX PL APO 40x/0.85 CORR, 0.11-0.23	
Objektiv HCX PL APO 63.0x1.32 OIL	
Fluoreszenz Mikroskop DM6000B	Leica, Wetzlar
S/W Kamera DFC350FX	
Software FW4000 V1.2 Fluorescence Workstation mit Deblur V2.3.2 Deconvolution und 3D-Reconstruction	
Fluoreszenz Mikroskop Olympus BX50	Olympus Optical, Hamburg
S/W Kamera Olympus Camedia C-3030	
Olympus Camedia Master 2.0 Software package	
Bildbearbeitungssoftware MetaMorph 5.05	
G24 Environmental Incubation shaker	New Brunswick Scientific, Edison, USA

Gelschlitten 12 x 18 cm 7,5 x 5 cm	Werkstatt MZI, Gießen
HI 221 Calibration Check Microprocessor pH Meter	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Image Master	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Kryo-Thermostat WK5	Colora Meßtechnik, Lorch/Württ.
Laminar Flow, Clean Air, Typ DLF-REL 6	Heraeus, Hanau
Laminar Flow, DanLAF VFR 1806	Claus Damm, Fredensborg DK
Laminar Flow, NU-437-500-E	Nuaire, Plymouth, MN, USA
Neubauer Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Operationsbesteck	diverse
PerfectBlue 'Semi Dry'-Blotter Sedec M 20 cm x 20 cm	PeqLab, Erlangen
PerfectBlue Doppelgelsystem Twin L, 20 cm x 20 cm	PeqLab, Erlangen
PerfectBlue Doppelgelsystem Twin S, 10 cm x 10 cm	PeqLab, Erlangen
Perkin-Elmer Gene Amp Cyclor Typ 2400	PerkinElmer, Weiterstadt
Pipetten (2, 10, 20, 100, 200, 1000, 5000 µl)	Gilson, Middleton, USA
Potter-Elvehjem PTFE Homogenisator, 45 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Potter-Elvehjem PTFE Homogenisator, 8 ml	Sigma-Aldrich, Steinheim
Spannungsgeber (0-200 mA, 1 kV, 150 W)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ultramikrotom OM U2	Werkstatt MZI, Gießen
Ultramikrotom Ultracut R	Reichert, Wien
Ultra-Turrax-Homogenisator T25	Leica, Wien
Taumler Heidolph Polymax 1040	IKA, Staufen
Thermocycler Primus 96 advanced gradient	Heidolph, Schwabach
Thermomixer comfort	PeqLab, Erlangen
Transmissionselektronenmikroskop LEO AB912	Eppendorf, Hamburg
Digitalkamera slow scan ccd	Zeiss, Oberkochen
Bildbearbeitungssoftware Esivision	ProScan, Lagerlechfeld
Vortex VF 2	Soft Imaging Systems, Münster
Wärmeschrank	Janke und Kunkel, Staufen
Wasserbad	Melag, Berlin
Zentrifugen:	Memmert, Schwalbach
Kühlzentrifuge 5471	Eppendorf, Hamburg
Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Sorvall Kühlzentrifuge RC5C mit Rotor SS34	Du Pont, Bad Homburg
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge L8-60M mit Rotor 50Ti, SW41 und TFT 45	Beckman Coulter, Krefeld

2.12 Verbrauchsmaterial

12,5 cm ² Kulturschalen	Becton Dickinson Falcon, Le Pont De Caix, France
12-well Platten	greiner bio one, Frickenhausen
24-well Platten	greiner bio one, Frickenhausen
25 cm ² Kulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht
6-well Platten	greiner bio one, Frickenhausen
75 cm ² Kulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht
96well ELISA-Platten	Nunc, Wiesbaden
Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane (0,45 µm)	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
CryoPure Gefäß	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen, Ø 12 mm	Roth, Karlsruhe
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalhandschuhe	Roth, Karlsruhe
Einmalspritzen (10 ml, 20 ml)	Braun, Melsungen
Einmalkanülen Steirican®	Braun, Melsungen
Einwegskalpell	megro, Wesel
Gel Blotting Paper	Schleicher und Schuell, Dassel
Ibidi µ-slide VI Zellkammer	Ibidi, Martinsried
Klonierringe	Werkstatt MZI, Gießen
MicroAmp Optical 96 well Reaction plate	Applied Biosystems, Singapur
Nickelgrids 100 mesh, mit 1,5% Formvar beschichtet	Plano, Wetzlar
Nitrilhandschuhe	Roth, Karlsruhe
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Parafilm	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten, Plastik	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten, Glas	MAGV, Rabenau
Pasteurpipetten Assistent	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim
PCR-tubes, 0,2 ml	ABgene, Epsom, UK
Petrischalen	Nerbe plus, Winsen/Luhe
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl, 5000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml, 15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
RNaseZap® Wipes	Applied Biosystems, Darmstadt
Rundbodenröhrchen, 14 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Schraubdeckelgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter 0,22 µm	Sarstedt, Nümbrecht
Ultramikrotom Glas 406 x 25.4 x 6 mm	Plano, Wetzlar
Uvetten	Eppendorf, Hamburg

3. METHODEN

3.1 Allgemeine Methoden in der Molekularbiologie

3.1.1 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

Für die Konzentrationsbestimmung gewonnener DNA und RNA wurde die optische Dichte der Nukleinsäuren im Photometer (Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}) bestimmt. Die Konzentration der Proben wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \frac{OD_{260} \times E \times \text{Verdünnungsfaktor}}{1000 \mu\text{l}}$$

E = Extinktionskoeffizient; $E_{DNA} = 50 \mu\text{g}$; $E_{RNA} = 40 \mu\text{g}$

Das Maß für die Reinheit der Probe ist der Quotient von OD_{260}/OD_{280} . Dieser Wert sollte für DNA zwischen 1,7 und 2,0 und für RNA über 1,8 liegen.

3.1.2 Native Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten wurden 1%ige Agarose-Gele verwendet. Dazu wurde 1 g Agarose in 100 ml 1 x TAE durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlung auf ca. 60°C wurde das Gel gegossen und nach Erhärten des Gels in eine mit 1 x TAE als Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt. Jeweils 10 μl DNA wurde mit 1 μl 6 x Ladepuffer (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) vermischt und auf das Gel aufgetragen, als DNA-Längenstandard diente *GeneRuler DNA Ladder Mix* (MBI Fermentas). Für die Auftrennung der DNA-Fragmente wurde eine Spannung von 5-10 V/cm angelegt und die Elektrophorese für 45 – 90 Min durchgeführt. Im Anschluss wurden die Gele 20 min in einer Ethidiumbromidlösung (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) gefärbt, 20 min gewässert und mit dem Image Master (Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) fotografiert.

3.1.3 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Die denaturierende Agarose-Gelelektrophorese dient der Überprüfung der Intaktheit von isolierter RNA. Da einzelsträngige RNA zur Bildung von Sekundärstrukturen neigt, welche die Laufeigenschaften im Gel beeinflussen, werden dem Gel denaturierende Agenzien (wie z.B. Formaldehyd) zugefügt.

Für das Gel wurde 1 g Agarose mit 40 ml DEPC-ddH₂O und 5 ml 10 x MOPS-Puffer gekocht, bis die Agarose gelöst war. Nach Zugabe von 7 ml Formaldehyd wurde das Gel gegossen, bei RT auspolymerisiert und dann in die mit 1 x MOPS-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt. Jeweils 1 µg RNA wurde mit 9 µl 1,3 x *Roti-Load RNA* (Roth) Ladepuffer gemischt, bei 68°C für 10 min denaturiert und nach Abkühlen auf Eis in die Probestaschen des Gels pipettiert. Als Längenstandard dienten 3 µl *peqGOLD High Range RTU RNA-Leiter* (Peqlab), gemischt mit 6 µl Ladepuffer *Roti-Load RNA* (Roth). Die Elektrophorese wurde zunächst für 15 min bei 30 mA (Einlauf) und anschließend für ca. 1 h bei 60 mA (Auftrennung der RNA) durchgeführt. Im Anschluss wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht im Image Master begutachtet und fotografiert.

Qualitativ gute, nicht degradierte RNA zeigt zwei spezifische Banden, welche der 18S-rRNA bei ca. 1800 bp und der 28S-rRNA bei ca. 5000 bp entsprechen. Degradierete RNA erzeugt einen Schmier auf dem angefärbten Agarosegel.

3.1.4 Plasmid-Präparationen im Midi-Maßstab

Die Präparation von Plasmiden im Midi-Maßstab erfolgte mit Hilfe des *NucleoBond Xtra Midi-Kits* (Macherey Nagel, Düren) mit einem optimierten Protokoll. Dafür wurden aus einer rekombinanten *E. coli*-Glyzerinkultur 50-100 ml LB-Ampicillin-Medium im Verhältnis 1:1000 angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden dann bei 4.300 x g in einem 50 ml Reaktionsgefäß pelletiert, der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 10 ml Puffer *RES* resuspendiert.

Die Zellyse erfolgte mit 10 ml *LYS*-Puffer während einer 5-minütigen Inkubation bei RT. Währenddessen wurden die *NucleoBond Xtra* Säulen, mit integriertem *NucleoBond Xtra* Filter, mit 12 ml *EQU*-Puffer equilibriert. Zur Neutralisierung wurden 10 ml *NEU*-Puffer zum

Bakterienlysat gegeben, durch Invertieren gründlich gemischt und auf die angefeuchteten Filter überführt. Anschließend wurde der Filter mit 5 ml *EQU*-Puffer gewaschen und dann verworfen. Die Säulen wurden dann zweimal mit 8 ml *WASH*-Puffer gewaschen. Danach konnte die gebundene Plasmid-DNA in 5 ml *ELU*-Puffer eluiert werden. Um die gewonnene Plasmid-DNA weiter zu entsalzen und zu konzentrieren wurde eine Isopropanolfällung durchgeführt. Zur Plasmid-DNA wurden 3,5 ml Isopropanol hinzugefügt, gut gemischt und 60 min bei 4.300 x *g* und 4°C zentrifugiert. Dadurch erfolgte die Präzipitation der Plasmid-DNA und es bildete sich ein gut sichtbares Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 2 ml 70%igem Ethanol vorsichtig gewaschen und bei 4.300 x *g* und 4°C 30 min zentrifugiert. Im Anschluss an die Zentrifugation wurde der Überstand vollständig entfernt, das Pellet getrocknet und anschließend in 200 µl ddH₂O gelöst. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte wie in 3.1.1 beschrieben.

3.2 Isolierung und Aufarbeitung von RNA

Eine weitere Besonderheit bei der Arbeit mit RNA, im Vergleich zum Umgang mit DNA, ist die hohe Empfindlichkeit der RNA gegenüber den ubiquitär vorhandenen, sehr stabilen RNasen. Diese führen zu einer Degradation der RNA und damit zu einem erheblichen Qualitätsverlust. Alle Materialien, die mit RNA in Kontakt kamen, wurden daher zunächst mit 70 % Ethanol und anschließend mit DEPC-Wasser gereinigt. Da RNasen sehr stabil sind, wurden alle hitzesterilisierbaren Geräte und Materialien hitzesterilisiert. Die Arbeitsfläche wurde vor Beginn der Arbeit gründlich mit DEPC-Wasser oder mit *RNase-Zap* Wipes abgewischt. Da RNasen bei 4°C eine verringerte Aktivität aufweisen, wurden, soweit möglich, alle Schritte der RNA-Extraktion auf Eis bzw. 4°C durchgeführt.

3.2.1 Total-RNA Extraktion aus Geweben und Zellkulturen

Die für die RNA Extraktion aus Gehirn, Blase und peritonealen Mastzellen verwendeten Ratten wurden entweder per CO₂ Inhalation oder per Genickbruch nach vorangegangener Isofluran Narkose getötet. Die Organe wurden entnommen und entweder in *RNAlater*[®] (Ambion) bis zur RNA Isolation gelagert oder frisch verwendet. Die Gewebe wurden in ca. 0,5 x 0,5 cm große Stücke geteilt und ausgewogen. Pro 50-100 mg Gewebe wurde 1 ml *TriReagent* (Sigma) hinzugefügt und mit Hilfe des Ultra-Turrax-Homogenisators für 3 x 20 s homogenisiert und zwischenzeitlich auf Eis gelagert. Unlösliche Gewebeanteile wurden durch eine Zentrifugation bei 12.000 x *g* und 4°C für 10 min abgetrennt. Der Überstand wurde in ein RNase freies 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei RT inkubiert.

Für die Gewinnung von RNA aus rSlc10a4-HEK293 und SH-SY5Y Zellen wurden jeweils ca. 5 x 10⁶ Zellen mit 1 ml Trypsin-EDTA aus der Zellschale abgelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, pelletiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde dann in 1 ml *TriReagent* durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren lysiert und 5 min bei RT inkubiert.

Im Anschluss wurde zu jedem Probenansatz 0,2 ml Chloroform pro ml *TriReagent* hinzugegeben, 15 s durch kräftiges Schütteln gut durchmischt und wieder 10 min bei RT inkubiert. Bei einer weiteren Zentrifugation bei 12.000 x *g* und 4°C für 15 min bildeten sich drei Phasen: eine rote, organische Phase, in der sich Proteine anreichern, eine Interphase mit hohem DNA- und eine obere wässrige Phase, mit hohem RNA-Gehalt. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig und möglichst vollständig, ohne Kontamination aus der Interphase, abgezogen und in ein neues RNase freies Reaktionsgefäß überführt. Der Rest, vor allem die organische Phase, wurde für die Protein-Extraktion im Kühlschrank aufbewahrt.

Zur wässrigen RNA-Phase wurden 0,5 ml Isopropanol pro ml *TriReagent* hinzugefügt, gut gemischt und 10 min bei RT stehen gelassen. Anschließend wurden die Proben bei 12.000 x *g* und 4°C für 10 min zentrifugiert. Bei diesem Zentrifugationsschritt wurde durch die Zugabe von Isopropanol die RNA am Boden des Reaktionsgefäßes präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 ml eiskaltem 75%igen Ethanol gewaschen und nochmals bei 12.000 x *g* und 4°C für 5 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde das RNA-Pellet mindestens 15 min auf Eis getrocknet, bis jegliche Ethanolreste verdunstet waren. Je nach Größe des Pellets wurde dieses in 10 – 20 µl molekularbiologischem DEPC-Wasser gelöst, die Konzentration, wie bei 3.1.1 beschrieben, bestimmt und bei -80°C gelagert oder direkt weiter verwendet.

3.2.2 Extraktion von Total-RNA aus Zellen

Für die Extraktion von Total-RNA aus Mastzellen und PC12 Zellen wurde das *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) verwendet. Dazu wurden jeweils ca. 10^6 Zellen ausgezählt, in ein RNase freies Reaktionsgefäß überführt und bei $300 \times g$ pelletiert. Das restliche Medium wurde abgezogen und das Pellet durch Schnippen von der Gefäßwand gelöst. Dann wurden $350 \mu\text{l}$ *RLT*-Puffer zu dem Zellpellet gegeben und dieses durch Vortexen und mehrfaches Aufziehen mit der Pipette resuspendiert. Anschließend wurden $350 \mu\text{l}$ 70%iger Ethanol zugegeben, gut gemischt, bis alle Zellen vollständig lysiert waren und auf Eis stehen gelassen. In der Zwischenzeit wurden entsprechend der Probenanzahl *RNeasy Spin columns* vorbereitet und beschriftet. Das Lysat wurde vollständig, aber höchstens $700 \mu\text{l}$ auf einmal, auf die Säulchen gegeben. Diese wurden dann bei $8.000 \times g$ und RT für 20 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und $700 \mu\text{l}$ *RW1*-Puffer auf die Säulchen aufgetragen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei $8.000 \times g$ und RT für 20 s. Anschließend wurden die Säulchen zweimal mit $500 \mu\text{l}$ *RPE*-Puffer gewaschen und die *RNeasy Spin Columns* nach einem letzten Zentrifugationsschritt bei $8.000 \times g$ für 2 min in $1,5 \text{ ml}$ Sammelgefäße platziert.

Die an die Säulchen gebundene RNA wurde mit $50 \mu\text{l}$ DEPC-ddH₂O durch 1-minütiges zentrifugieren bei $8.000 \times g$ eluiert. Das Eluat wurde im Anschluss noch einmal auf die Säulchen aufgetragen, um die gebundene RNA möglichst vollständig zu eluieren und eine höhere RNA-Konzentration zu erreichen. Die Konzentrationsbestimmung wurde, wie unter 3.1.1 beschrieben, durchgeführt und die RNA anschließend bei -80°C eingefroren oder direkt weiterverwendet.

3.2.3 cDNA-Synthese aus Total-RNA

Bei der cDNA-Synthese wird die RNA mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase (RT), in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die cDNA-Synthese erfolgte für alle Proben, außer den peritonealen Mastzellen, dem dazugehörigen Überstand aus der Dichtezentrifugation sowie Zelllysaten aus PC12 und SH-SY5Y Zellen, mit dem *SuperScript® III First Strand Synthesis System* (Invitrogen). Dafür wurden $3 \mu\text{g}$ RNA mit je $1 \mu\text{l}$ dNTP-Mix und Random Hexamer Primern gemischt und mit ddH₂O auf ein Gesamtvolu-

men von 10 µl aufgefüllt. Die Proben wurden 5 min im Wasserbad auf 65°C erhitzt, um die RNA zu linearisieren. Danach wurden diese sofort für mindestens 1 min auf Eis abgekühlt und in dieser Zeit der cDNA-Synthese Mix vorbereitet. Dazu wurden pro Probe

10 x RT Buffer	2 µl
25 mM MgCl	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNase OUT	1 µl
SuperScript®III RT	1 µl

gemischt und schließlich 10 µl cDNA-Synthese-Mix zu jedem RNA-Ansatz dazugegeben. Die cDNA Synthese wurde bei 25°C für 10 min gestartet. Dann erfolgte die Elongation bei 50°C für 50 min und die Deaktivierung bei 85°C für 5 min. Anschließend wurden die Proben herunter zentrifugiert, aliquotiert und bei -20°C eingefroren oder direkt verwendet.

3.2.4 cDNA-Synthese aus Total-RNA aus peritonealen Mastzellen

Aufgrund des geringen RNA Gehaltes der peritonealen Mastzellen und der daraus resultierenden erschwerten cDNA-Synthese, wurde das *Full Spectrum Complete Transcriptome RNA Amplification Kit* der Firma BioCat, Heidelberg verwendet. Das Funktionsprinzip dieses Kits besteht darin, dass *First Strand* cDNA in einer anschließenden *Second Strand* cDNA Synthese amplifiziert wird. Dadurch erhöht sich der Gehalt an cDNA, der aus einer geringen Menge RNA gewonnen werden kann.

Für jeden Probenansatz wurden 100 ng RNA in PCR tubes vorgelegt. Dazu kamen je 2 µl *Universal Primer Mix* und DEPC-ddH₂O bis zu einem Gesamtvolumen von 5 µl. Dieser Ansatz wurde für 4 min bei 70°C inkubiert und dann 5 min bei 25°C stehen gelassen. In der Zwischenzeit wurde der Master Mix für die Reverse Transkription vorbereitet. Dazu wurden pro Ansatz folgende Komponenten zusammen pipettiert:

DEPC-ddH ₂ O	1 µl
5 x RT Buffer	2µl
dNTP Mix	1 µl
DTT	0,5 µl
Reverse Transkriptase	0,5 µl

Anschließend wurde zu jeder Probe je 5 µl Master Mix hinzugefügt, dann zuerst bei 42°C für 50 min inkubiert und die Reaktion in einer 5-minütigen Inkubation bei 95°C gestoppt und die Proben im Anschluss auf Eis gelagert. Für die *Second Strand* cDNA Synthese wurde ein Master Mix mit folgenden Bestandteilen vorbereitet:

DEPC-ddH ₂ O	74 µl
10 x PCR Buffer	10 µl
dNTP Mix	2 µl
Full Spectrum PCR Primer	2 µl
PCR Polymerase	2 µl

Zu den Proben wurden dann jeweils 90 µl *Second Strand* Master Mix hinzugefügt und die cDNA im Anschluss im Thermocycler unter folgenden PCR-Bedingungen amplifiziert:

95°C	→ 4 min	
68°C	→ 5 min	
95°C	→ 25 s	
58°C	→ 1 min	
68°C	→ 1 min 30 s	
95°C	→ 25 s	} 11 Zyklen
68°C	→ 1 min 30 s	
68°C	→ 2 min	
8°C	→ ∞	

Die Proben wurden im Anschluss aliquotiert und bei -20°C eingefroren oder direkt verwendet.

3.2.5 cDNA Synthese aus Zelllysaten

Mit Hilfe des *TaqMan Gene Expression Cells-to-CT-Kit* (Ambion) kann cDNA aus Zellen direkt und ohne eine separate Isolierung von RNA gewonnen werden. Dazu wurden jeweils ca. 5×10^4 PC12 bzw. SH-SY5Y Zellen ausgezählt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, pelletiert, das Medium entfernt und anschließend mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in 5 µl eiskaltem PBS resuspendiert und mit

49,5 μ l *Lysis Solution* plus 0,5 μ l *DNase I* durch fünfmaliges Mischen und eine 5-minütige Inkubation bei RT lysiert. Das Zelllysate wurde zwischen allen Inkubationsschritten auf Eis gelagert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 5 μ l *Stop Solution* unter fünfmaligem Mischen und einer 2-minütigen Inkubation bei RT gestoppt. Während das Zelllysate auf Eis lagerte, wurde pro Probenansatz ein Master Mix aus den folgenden Komponenten zusammen pipettiert:

<i>2 x RT Buffer</i>	25 μ l
<i>20 x RT Enzyme Mix</i>	2,5 μ l
<i>Nuclease-free Water</i>	12,5 μ l

Jeweils 40 μ l Master Mix wurde in Nuklease-freie 1,5 ml Reaktionsgefäße vorgelegt und 10 μ l Zelllysate zupipettiert. Anschließend wurde die Reverse Transkription für 60 min bei 37°C durchgeführt. Eine 5-minütige Inkubation bei 95°C stoppte die Reaktion. Nach Abkühlung der Proben auf Eis wurden diese entweder sofort verwendet oder bei -20°C gelagert. Jeweils 5 μ l der Reversen Transkriptase Reaktion (cDNA) wurden für die quantitative real-time PCR verwendet (siehe 3.3.4).

3.3 Methoden der Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung spezifisch ausgewählter DNA-Abschnitte. Diese Reaktion wird durch das Enzym DNA-Polymerase katalysiert, die entlang eines DNA-Einzelstranges, welcher als Matrize dient, aus monomeren dNTP's einen komplementären Strang synthetisiert. Ausgangspunkt der Synthese sind genspezifische Primer. In sich wiederholenden Zyklen aus Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation wird der durch die Primer bestimmte Genabschnitt vervielfältigt. Dabei dienen die Produkte der vorangegangenen Zyklen als Ausgangsstoffe für den nächsten Zyklus und ermöglichen so eine exponentielle Vermehrung der DNA.

Die PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit vorwiegend zum Expressionsnachweis eingesetzt.

3.3.1 Primerauswahl

Die Primer wurden mit Hilfe des Programmes *Oligo 4.0* ausgewählt. Dabei wurden möglichst die folgenden Rahmenbedingungen beachtet:

- Die Primer tragen an ihrem 3'-Ende ein AC, AG, TC oder TG.
- Der (G+C)-Gehalt der Primer liegt zwischen 50 – 60 %.
- Um Primer-Dimere zu vermeiden, sind die 3'-Enden der Primer nicht untereinander und mit sich selbst komplementär.
- Um Sekundärstrukturen im Primer zu vermeiden ist der ΔG -Wert für eine Loopbildung >0 , d. h. diese Reaktion ist endergon.

Bei der Auswahl der Primer für die Expressionsprofile wurde außerdem besonders darauf geachtet, dass die Primer eine Länge von 20-25 Basen hatten und der zu amplifizierende Bereich eine Größe zwischen 300 und 1000 bp aufwies. Die Schmelztemperatur von Vorwärts- und Rückwärtsprimer sollte dabei nicht weiter als 2°C auseinander liegen. Für die Primer wurde eine BLAST-Analyse durchgeführt, um ihre Spezifität zu überprüfen.

3.3.2 RT-PCR

Als Ausgangsmaterial für die RT-PCR, die in der vorliegenden Arbeit für Expressionsnachweise verschiedener Zielgene eingesetzt wurde, dienten die in cDNA umgeschriebenen Proben (siehe 3.2.3 und 3.2.4). Die PCR wurde mit der *FastStart® Taq DNA Polymerase* (Roche) durchgeführt. Dazu wurde pro Probenansatz ein Master Mix, bestehend aus folgenden Komponenten vorbereitet:

DEPC-ddH ₂ O	31,5 µl
10 x Buffer	5 µl
dNTP Mix	1 µl
FastStart Taq Polymerase	0,5 µl

Zu diesem Ansatz wurde dann je 1 µl der entsprechenden Vorwärts- und Rückwärtsprimer hinzugefügt. Schließlich wurden je 2 µl cDNA mit 8 µl DEPC-ddH₂O verdünnt und 40 µl des Primer-Master Mixes hinzugefügt, um ein Gesamtreaktionsvolumen von 50 µl zu erreichen.

3.3.3 Touchdown-PCR

Die Amplifizierung wurde in einem PeqLab Thermocycler Primus 96 durchgeführt. Dafür wurde die Methode der Touchdown-PCR gewählt, um die Vorteile einer höheren Spezifität bei hoher Anlagerungstemperatur (AT) und einer größeren Ausbeute bei niedriger AT in einem Versuchsansatz zu kombinieren. Dafür wurde zunächst eine AT gewählt, die nahe am Schmelzpunkt der Primer liegt ($T_m - 2^\circ\text{C}$) und dann in den ersten 10 Zyklen um $0,5^\circ\text{C}$ pro Zyklus reduziert. In einem weiteren Amplifizierungsschritt wurden dann weitere 30 Zyklen bei einer konstanten AT ($T_m - 7^\circ\text{C}$) durchgeführt, wobei die in den ersten Zyklen gebildeten spezifischen Amplifikationsprodukte weiter vermehrt wurden.

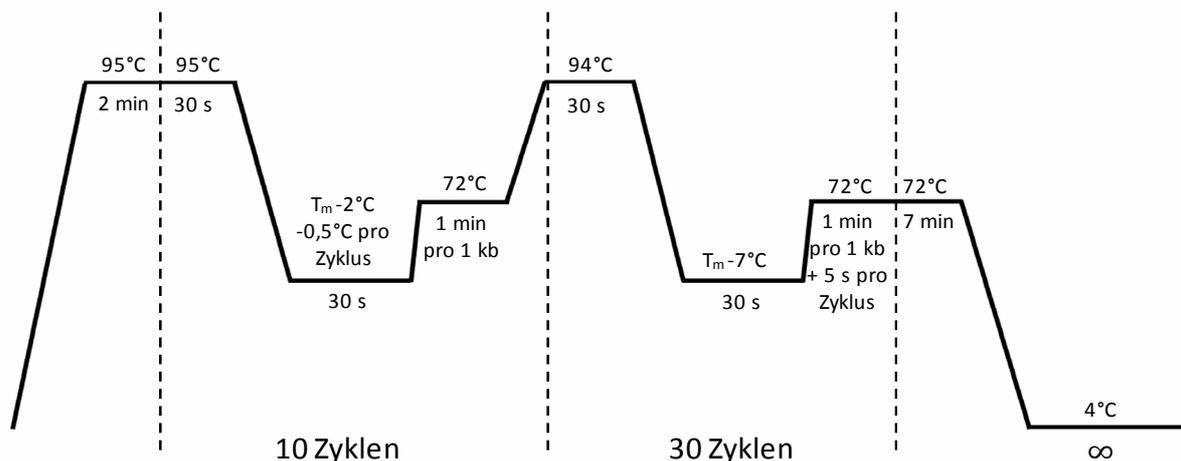


Abb. 3.1: Schema des Temperatur- und Zeitverlaufs einer Touchdown-PCR

3.3.4 Nested PCR

Die nested PCR ist eine hochsensitive PCR Methode, bei dem zwei PCR-Reaktionen nacheinander durchgeführt werden. Dabei dient ein Aliquot aus der ersten PCR als Template für die zweite PCR. Das Primerpaar der zweiten PCR bindet an Sequenzbereiche innerhalb des bei der ersten PCR gebildeten Ampifikats. Durch die gesteigerte Empfindlichkeit und Effizienz dieser Methode können auch geringste Mengen cDNA nachgewiesen werden. Dieses PCR-Verfahren wurde zum Expressionsnachweis des Slc10a4 in Mastzellen genutzt, da aus diesen nur geringe Mengen RNA, und damit auch cDNA, gewonnen werden konnten. Als Ausgangs-

produkt für die zweite PCR diente 1 µl PCR-Produkt aus einer vorangegangenen RT-PCR. Die Amplifizierung erfolgte mit einem Touchdown Protokoll.

Um DNA-Kontaminationen der Proben zu vermeiden wurde auf eine äußerst saubere und kontaminationsfreie Arbeitsweise geachtet. Dies beinhaltete die Verwendung neuer RNA- und DNA-freier Reaktionsgefäße sowie Pipettenspitzen. Alle Pipettierschritte wurden unter einer UV-Kammer mit zuvor UV-bestrahlten Pipetten durchgeführt. Um mögliche DNA-Kontaminationen zu erkennen, wurde bei allen Schritten eine Wasserkontrolle mitgeführt.

3.3.5 Quantitative real-time PCR

Die quantitative real-time PCR basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen RT-PCR, die allerdings eine zusätzliche Quantifizierung der gewonnenen DNA-Amplifikate ermöglicht. Sie wird eingesetzt, um das Expressionslevel eines Gens in verschiedenen Geweben oder die Relation eines Zielgens zu anderen Genen im gleichen Gewebe zu untersuchen. Die Quantifizierung erfolgt mittels Messung von Fluoreszenzsignalen, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Diese steigen proportional zu der Menge der amplifizierten Produkte. Der PCR Cycler erfasst die entstandenen Fluoreszenzsignale in jedem Zyklus und stellt diese in „Echtzeit“ graphisch dar (siehe Abb. 3.2).

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl das Expressionslevel von SLC10A4 in verschiedenen Gehirnregionen als auch die Auswirkungen der neuronalen Differenzierung von PC12 und SH-SY5Y Zellen auf die Expression von Slc10a4/SLC10A4 untersucht. Als Template wurden kommerzielle cDNA Panels (BioChain und BD Clontech) und selbst synthetisierte cDNA (siehe 3.2.3 und 3.2.5) verwendet. Der Ansatz für die quantitative PCR erfolgte in einer 96-well Platte. Dazu wurde zunächst für jede Probe ein Master Mix aus den folgenden Komponenten pipettiert:

ddH ₂ O	6,25 µl
<i>TaqMan Universal PCR Master Mix</i>	12,5 µl
<i>TaqMan Gene Expression Assay</i>	1,25 µl

Zu dem Master Mix wurden dann jeweils 5 µl cDNA hinzugefügt, um ein Gesamtvolumen von 25 µl zu erreichen. Als endogene Kontrollen dienten GAPDH oder β-Actin („housekeeper“) für die Analyse der cDNA. Die Untersuchung jeder Probe erfolgte in

Dreifachbestimmung. Die PCR-Reaktion wurde in einem ABI PRISM 7300 unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung	95°C	10 min	} 42 Zyklen
Denaturierung	95°C	15 s	
Primer-Anlagerung + Elongation	60°C	1 min	
Kühlung	4°C	∞	

Um die relative Expression der mRNA zu ermitteln, betrachtet man zunächst die *Signal Threshold Cycles* (C_T) der einzelnen Proben. Der C_T -Wert der endogenen Kontrolle wurde von dem C_T -Wert des jeweiligen Zielgens subtrahiert, was den ΔC_T -Wert ergab. Desweiteren wurde ein $\Delta\Delta C_T$ -Wert errechnet, indem der ΔC_T -Wert eines Kalibrators (dem am niedrigsten exprimierten Gen oder dem Gewebe mit der geringsten Expression) vom ΔC_T -Wert des Zielgens abgezogen wurde. Die relative Quantifizierung erfolgte dann nach einer Transformation über die Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Dieser Wert gibt die n-fache Expression des Zielgens im Vergleich zum Kalibrator an.

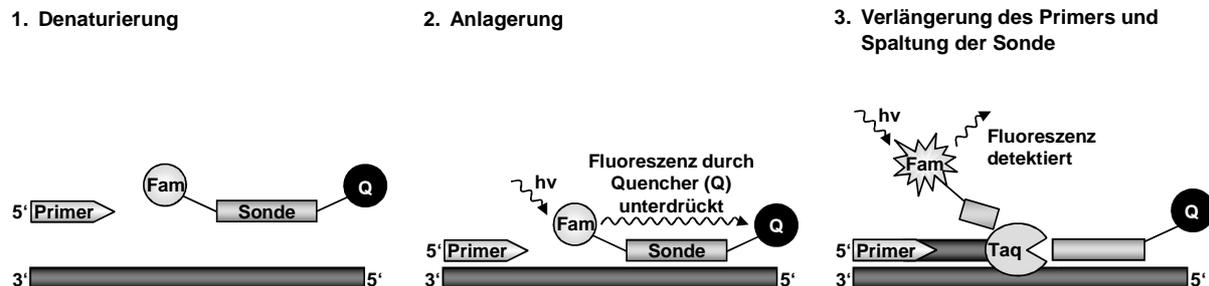


Abb. 3.2: Funktionsprinzip der quantitativen real-time PCR mit dem TaqMan System

Im ersten Schritt, der Denaturierung, erfolgt die Auftrennung des DNA-Stranges. Es folgt die Anlagerung von Primer und Sonde an die Zielsequenz. Durch die räumliche Nähe des Fluoreszenzfarbstoffes Fam zum Quencher (Q), welche beide Bestandteile der Sonde sind, wird die Aussendung der Fluoreszenzsignale unterdrückt. Durch die Verlängerung des Primers gelangt die Taq-Polymerase an das 5'-Ende der Sonde und baut durch ihre 5'→3'-Exonukleaseaktivität die Sonde ab. Dadurch entfernt sich der Farbstoff Fam vom Quencher und sendet nach Anregung ein Fluoreszenzsignal aus, welches detektiert und aufgezeichnet wird.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Das Arbeiten mit den verwendeten Zelllinien Flp-In T-REx 293, GripTite 293 MSR, PC12 und SH-SY5Y erfolgte unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar Flow Sicherheitswerkbank. Alle Materialien wurden vor ihrem Einsatz gereinigt bzw. desinfiziert, sterilisiert oder autoklaviert. Die Werkbank wurde nach der Arbeit mit UV-Licht bestrahlt, um eventuell vorhandene Mikroorganismen auf der Arbeitsfläche abzutöten.

Die Zellen wurden standardmäßig in ihrem entsprechenden Medium (siehe 2.3.2) unter 95 % Wasserdampfsättigung, 5 % CO₂ und 37°C kultiviert. Die Flp-In T-REx 293 Zelllinie wurde regelmäßig mit Zeocin selektioniert, die stabil transfizierte Zelllinie mit Hygromycin B und die GripTite 293 MSR Zellen mit Geneticin. Die neuronalen Zellen PC12 und SH-SY5Y wurden bis etwa zur 20. Passage verwendet. Die Zellen wurden in Kulturschalen unterschiedlicher Größe (25 – 75 cm²) bis zu einer Konfluenz von 80 - 90 % vermehrt und dann gesplittet. Dazu wurde das Medium aus der Kulturflasche entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit 0,5 - 1 ml Trypsin-EDTA für 1 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden mechanisch, durch Klopfen gegen die Kulturschale, vom Untergrund abgelöst. Zur Zellsuspension wurden 1-2 ml des entsprechenden Kulturmediums hinzugegeben, um die proteolytische Wirkung des Trypsins zu stoppen. Die Zellen wurden dann durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt und je nach Bedarf in einer 1:2 bis 1:10 Verdünnung in neue Kulturschalen überführt. Für die Durchführung von Versuchen wurden die Zellen, nach Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer, in 6-, 12- oder 24-well Schalen ausgesät. Für Immunfluoreszenzversuche wurden Deckgläschen in 24-well Schalen vorgelegt, diese vor dem Aussäen für 30 min mit Poly-L-Lysin beschichtet und die Zellen auf die noch feuchte Oberfläche gegeben. Dieses Vorgehen erhöhte die Adhärenz der Zellen auf der Glasoberfläche und verhinderte ein vorzeitiges Ablösen der Zellen beim Waschen.

3.4.2 Kryokonservierung

Um eine gewisse Vorratshaltung der Zelllinien zu gewährleisten, wurde ein Teil der Zellen nach dem Splitten eingefroren. Dazu wurden 900 µl der Zellsuspension in Kryovials überführt und mit 100 µl DMSO vermischt. Die Zellen wurden dann in einer Styroporschachtel für zunächst ca. 24 h bei -80°C eingefroren und dann zur Langzeitkonservierung in flüssigem N₂ gelagert.

3.4.3 Auftauen und Reaktivierung

Um die Zellen nach der Kryokonservierung wieder zu reaktivieren, wurden sie aus dem flüssigen N₂ entfernt und dann im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden 3 min bei 1.000 x g zu einem Pellet abzentrifugiert. Das DMSO-haltige Einfriermedium wurde entfernt, die Zellen in 1 ml frischem Medium resuspendiert und in eine 25 cm² Kulturschale mit 5 ml Medium überführt.

3.4.4 Neuronale Differenzierung von PC12 Zellen

Für die Untersuchung neuronaler Differenzierungsmechanismen sind PC12 Zellen ein weit verbreitetes Modell. Die kleinen, runden, oft in Klumpen wachsenden Zellen erlangen unter dem Einfluss des Wachstumsfaktors *Nerve Growth Factor* (NGF) die Eigenschaften sympathischer Neurone.

Für eine Differenzierung der PC12 Zellen wurden für Immunfluoreszenzversuche ca. 100.000 Zellen pro well in eine 24-well Schale mit Deckgläschen bzw. ca. 50.000 Zellen in eine 6-well Schale (cDNA Synthese mittels *TaqMan Gene Expression cells-to-ct* Kit, siehe 3.2.5) ausgesät und in ihrem Medium (siehe 2.3.2) für 24 h kultiviert. Am nächsten Tag wurde dem Medium 50 ng/ml NGF zugesetzt und die Zellen für weitere vier bis fünf Tage unter dem Einfluss des Wachstumsfaktors kultiviert. In dieser Zeit konnte ein Auswachsen neuriten-ähnlicher Zellausläufer beobachtet werden, was als Maßstab für den Grad der Differenzierung gewertet wurde. Als Kontrolle wurden Zellen ohne NGF-Zusatz im Medium über den gleichen Zeitraum weiter kultiviert.

3.4.5 Neuronale Differenzierung von SH-SY5Y Zellen

Die humane Neuroblastom Zelllinie SH-SY5Y wird ebenfalls als Modell für die Differenzierung neuronaler Zellen verwendet. Es ist beschrieben (Kohr et al. 2009), dass diese Zellen unter dem Einfluss von Retinsäure in Kombination mit dem *Transforming Growth Factor* TGF- β 1 oder dem *Bone Morphogenic Protein* BMP-2 entweder Eigenschaften einer eher dopaminergen (mit TGF- β 1) oder einer eher cholinergen (mit BMP-2) Zelllinie entwickeln.

Die Zellen wurden wie unter 3.4.4 beschrieben ausgesät, aber nach 24 h mit 1 μ M Retinsäure plus 10 ng/ml TGF- β 1 bzw. 10 ng/ml BMP-2 versetzt. Die Zellen wurden dann für weitere vier bis fünf Tage unter dem Einfluss dieser Wachstumsfaktoren kultiviert. Als Kontrolle dienten Zellen, die unter den gleichen Bedingungen, aber ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren kultiviert wurden.

3.5 Transfektion eukaryotischer Zellen

Eines der Ziele dieser Arbeit bestand darin, die Lokalisation des Slc10a4-Proteins im zentralen und peripheren Nervensystem zu bestimmen, dessen subzelluläre Expression zu klären und geeignete *in-vitro* Modelle für nachfolgende funktionelle Untersuchungen zu finden. Dazu gehörte die Untersuchung neuronaler Zelllinien, aber genauso auch die Überexpression des Proteins in Zellen, die für geplante Transportstudien geeignet sind. Um dies zu erreichen, muss die genetische Information des zu exprimierenden Proteins in die Zelle eingebracht und dort möglichst stabil ins zelleigene Genom integriert werden. Bei dieser Vorgehensweise spricht man von einer Transfektion von Wirtszellen.

Die Konstrukte für eine stabile oder transiente Transfektionen (Slc10a4-pcDNA5/FRT und Slc10a4-FLAG-pcDNA9), welche in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kamen, wurden im Rahmen einer früheren Promotion am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Justus-Liebig-Universität Gießen erstellt (Fernandes 2007).

3.5.1 Stabile Transfektion

Um das gewünschte Gen stabil in die Wirtszelle zu integrieren, wurde mit dem Flp-In System der Firma Invitrogen gearbeitet. Dieses System basiert auf einer Flp-In T-REx 293 Zelllinie, die eine stabil in das Genom der Zelle integrierte *FRT site* besitzt, welche die Erkennungssequenz für die Flp-Rekombinase darstellt. Für die stabile Transfektion wird ein Vektor genutzt, der ebenfalls eine *FRT site* besitzt. Das Expressionsplasmid wird dabei zusammen mit dem Vektor pOG44, welcher für die Flp-Rekombinase kodiert, in die Zelle transfiziert. Die synthetisierte Flp-Rekombinase vermittelt dann eine homologe Rekombination zwischen der *FRT site* im Genom der Zelle und der *FRT site* des Expressionsplasmids. Das führt zu einer stabilen Integration des gewünschten Gens in das Genom der Wirtszelle. Das Zeocin-Resistenzgen der Flp-In Zelllinie wird dabei inaktiviert und ein Hygromycin-Resistenzgen, welches sich ebenfalls auf dem Plasmid befindet, wird aktiviert. Dadurch können erfolgreich transfizierte Zellen unter Hygromycin-Medium selektioniert werden.

Für die stabile Transfektion des Slc10a4 der Ratte in die Flp-In T-REx 293 Zellen wurde ein Konstrukt verwendet, bei welchem das Slc10a4-Gen in einen pcDNA5/FRT Expressionsvektor (Invitrogen, Karlsruhe) inseriert wurde (Slc10a4-pcDNA5/FRT). Um dieses Konstrukt in die Zellen einzubringen, wurden zunächst Flp-In T-REx 293 Zellen in eine 6-well Schale ausgesät und in HEK293-Medium ohne Antibiotika bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % vermehrt. Für jeden Transfektionsansatz wurden 3 μl *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) pro μg Plasmid-DNA (d.h. 24 μl *Lipofectamine 2000* und 8 μg Plasmid-DNA) mit HEK293-Medium ohne Antibiotika und Serum zu einem Gesamtvolumen von 50 μl gemischt und 5 min bei RT stehen gelassen. Dann wurden 1 μg Slc10a4-pcDNA5/FRT mit 7 μg pOG44-Vektor gemischt, bis zu einem Gesamtvolumen von 50 μl mit HEK293-Medium ohne Antibiotika und FKS aufgefüllt, zu dem Transfektionsreagenz hinzugefügt und gut gemischt. Dieser Ansatz wurde 30 min bei RT inkubiert, um die Bildung von DNA-Liposomen-Komplexen zu ermöglichen, bevor diese tröpfchenweise auf die Zellen gegeben und unter vorsichtigem Schwenken der Platte gleichmäßig auf den Zellen verteilt wurde. Nach einer Kultivierung der Zellen im Brutschrank für 24 h wurde das Medium gewechselt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit 500 μl Trypsin-EDTA Lösung abgelöst und die Reaktion durch Zugabe von 1,5 ml Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde auf zwei Polylysin-beschichtete Petrischalen mit je 9 ml HEK293-Medium aufgeteilt. Nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten, wurde dem Medium das

Selektionsantibiotikum für das transfizierte Plasmid (Hygromycin B in einer Endkonzentration von 150 µg/ml) hinzugefügt. Dies führte zu einem Absterben derjenigen Zellen, bei denen die Transfektion nicht erfolgreich verlaufen war. Zellen hingegen, die das Plasmid in ihr Genom aufgenommen hatten, konnten durch die integrierte Hygromycinresistenz weiter wachsen. Nach etwa zwei bis drei Wochen wurden in den Petrischalen einzelne Kolonien sichtbar, die mithilfe von Klonierungsringsen gepickt und in 24-well Schalen überführt wurden. rSlc10a4-HEK293 Klone wurden vermehrt und mittels qPCR, Immunfluoreszenz und Western Blot auf die funktionelle Expression des Slc10a4-Proteins hin untersucht.

3.5.2 Transiente Transfektion

Das Verfahren der transienten Transfektion besteht darin, mithilfe von Transfektionsreagenzien einen Expressionsvektor kurzzeitig in eine Wirtszelle einzubringen und das „Fremdgen“ von der Translationsmaschinerie der Zelle in ein funktionelles Protein umsetzen zu lassen. Die verwendeten Transfektionsreagenzien *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) und *Roti-Fect* (Carl Roth) beruhen auf dem Prinzip der Lipofektion, bei der die DNA an der Oberfläche kationischer Lipidvesikel komplexiert und sehr effizient in die Wirtszelle aufgenommen wird. Die transienten Transfektionen wurden entweder in 24-well Schalen (Immunfluoreszenz) oder 6-well Schalen (Proteinextraktion) bei ca. 80 % Konfluenz der Zellen durchgeführt. Dabei wurden folgende Mengen der verschiedenen Transfektionsmedien verwendet:

Pro well	Lipofectamine 2000		Roti-Fect	
	24-well	6-well	24-well	6-well
DNA-Menge	1 µg	4 µg	1 µg	4 µg
Transfektionsreagenz	2 µl	10 µl	2,5 µl	12,5 µl
Verdünnungsvolumen für DNA und Transfektionsreagenz	50 µl	250 µl	30 µl	100 µl
Medium im well	500 µl	2 ml	250 µl	1,5 ml

Als Medium wurde HEK293-Medium ohne Antibiotika und Serum verwendet. Die Plasmid-DNA und auch das Transfektionsreagenz wurden mit Medium verdünnt und 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden beide Ansätze miteinander vermischt und noch einmal 30 min bei RT belassen, bevor der Transfektionsansatz tröpfchenweise auf die Zellen gegeben und durch Schwenken gleichmäßig verteilt wurde. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen für 4 – 16 h inkubiert, das Medium gewechselt und dann weitere 24 – 48 h kultiviert.

3.6 Präparation peritonealer Mastzellen aus der Ratte

3.6.1 Präparationstechnik

Für die Präparation peritonealer Mastzellen aus der Ratte wurden Tiere im Alter von 8 bis 12 Wochen mit einem Körpergewicht von 200 – 300 g verwendet. Die Tiere wurden in einem Exsikkator durch eine Berieselung mit Isofluran (Baxter) tief narkotisiert und nach Ausbleiben der Reflexe sofort mit Genickbruch getötet. Die Jugularvenen und die Carotisarterien wurden eröffnet, um das Tier zu entbluten. Dann wurde die Haut im Bereich zwischen Rippenbogen und Becken großzügig abpräpariert, um einen guten Blick auf die *Linea alba* und die Bauchmuskulatur zu erhalten. Die *Linea alba* wurde mit einer Pinzette angehoben, damit bei der folgenden Injektion von 15 ml eiskalter KRH-Lösung weder die Leber noch das Darmkonvolut verletzt wurden.

Die Bauchwand wurde dann für 90 s mit den Fingerspitzen gut durchmassiert und anschließend ca. 1 cm weit in der *Linea alba* eröffnet. Durch diese Öffnung wurde ein am Rundboden perforiertes Falcon-tube in der Bauchhöhle platziert, welches sich mit der mit Mastzellen angereicherten KRH-Lösung füllte. Die Flüssigkeit wurde mit einer 5 ml Pipette aufgenommen und in einem 50 ml Reaktionsgefäß auf Eis gestellt. Die Bauchhöhle wurde nochmal mit 5 ml eiskalter KRH-Lösung gut gewaschen, die Flüssigkeit möglichst vollständig abpipettiert und zu der ersten Präparationslösung hinzugefügt. Die aus dem Bauchraum gewonnene Zellsuspension wurde dann bei 4°C bei 1.000 x g 2 min zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde zweimal mit je 10 ml eiskalter KRH-Lösung gewaschen und nach dem letzten Zentrifugationsschritt in 3 ml KRH-Lösung resuspendiert.

3.6.2 Aufreinigung durch Gradientenzentrifugation

Am Tag der Mastzellen-Präparation wurde zuerst ein Percoll-Gradient vorbereitet. Dazu wurden in Sorvall-Zentrifugenröhrchen jeweils 9 ml Percoll mit 1 ml Gradientenpuffer gemischt, ausgewogen und mit Percoll auf das gleiche Gewicht eingestellt. Der kontinuierliche Percoll-Gradient wurde durch 20-minütiges Zentrifugieren in einem SS-34 Rotor bei 4°C

und 11.700 rpm ohne abschließenden Bremsvorgang gebildet. Bis zur Verwendung wurde der Gradient bei 4°C gelagert.

Der Auftrag der Zellsuspension aus der Bauchhöhle auf den Percoll-Gradienten erfolgte mit Plastikpasteurpipetten. Dazu wurden je 1,5 ml der Suspension vorsichtig auf den Gradienten geschichtet und im Anschluss 15 min bei 1.600 x *g* ohne Bremsvorgang bei 4°C zentrifugiert. Dabei bildete sich an der Flüssigkeitsgrenze zwischen KRH-Puffer und Percoll eine Interphase mit Lymphozyten, Makrophagen, Granulozyten und Erythrozyten, während sich die Mastzellen mit einer Reinheit von ca. 95 % in den unteren zwei Dritteln des Gradienten sammelten. Der Überstand (etwa ein Drittel des Gradienten) mitsamt der Interphase wurde mit einer Plastikpasteurpipette möglichst vollständig entnommen und als Kontrolle bei allen weiteren Experimenten mitgeführt. Die aufgereinigten Mastzellen wurden ebenfalls aus den Sorvall-Röhrchen entnommen und in einem 50 ml Reaktionsgefäß auf Eis gelagert. Dieses wurde mit KRH-Lösung bis 50 ml aufgefüllt und 5 min bei 1.000 x *g* zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit 50 ml KRH-Lösung gewaschen und dann in 2 ml KRH-Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und nochmals mit 15 ml KRH-Lösung gewaschen. Das nach dem letzten Zentrifugationsschritt resultierende Zellpellet wurde je nach Folgeexperiment entweder in Medium (für Immunfluoreszenz) oder KRH-Lösung (RNA-Isolation) resuspendiert und in geeignete Gefäße überführt.

3.7 Immunfluoreszenz

Die Grundlage der Immunfluoreszenz ist die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers (Primärantikörper), der mit hoher Affinität an das antigene Epitop des zu untersuchenden Proteins in Zellen oder Geweben bindet. Ist dieser Primärantikörper selbst mit einem Fluorophor gekoppelt, so bezeichnet man dies als direkte Immunfluoreszenz. Wird hingegen zur Detektion des Immunkomplexes in einem zweiten Schritt ein Fluorophor-gekoppelter Sekundärantikörper eingesetzt, spricht man von einer indirekten Immunfluoreszenz. Der Sekundärantikörper ist gegen die Spezies gerichtet, in welcher der Primärantikörper produziert wurde (z. B. Kaninchen) und kann somit für alle Primärantikörper aus dieser Spezies verwendet werden. Ein weiterer Vorteil der indirekten

Immunfluoreszenz besteht in der Möglichkeit, Doppelmarkierungen von zwei unterschiedlichen Epitopen in einer Probe vornehmen zu können.

Die natürliche Expression von Slc10a4 in Zellen und Geweben, sowie die funktionelle Expression des transfizierten Proteins in Flp-In T-REx 293 Zellen wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht, teils in Doppelmarkierungen zur Kolokalisation mit anderen Proteinen. Dazu wurden die unter 2.8 beschriebenen Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe verwendet.

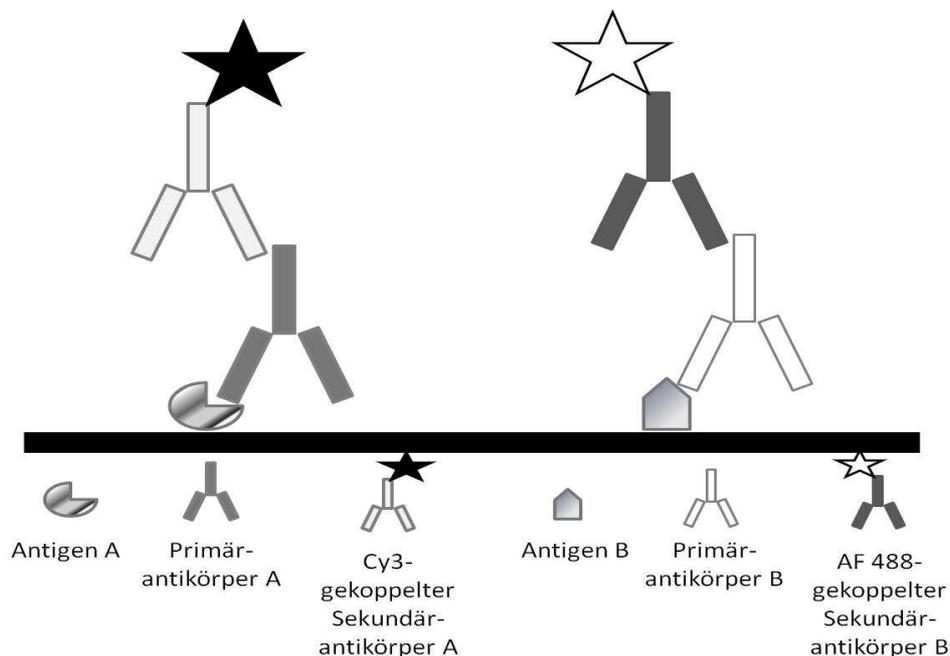


Abb. 3.3: Prinzip der Doppelmarkierung mittels indirekter Immunfluoreszenz

Im ersten Schritt binden die Primärantikörper A und B an ihre spezifischen Epitope an den Antigenen A und B. Die Visualisierung dieser Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgt mit dem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper A bzw. dem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper B durch Anregung der Fluorochrome im Fluoreszenzmikroskop. Eine Doppelmarkierung ist nur möglich, wenn die Primärantikörper in unterschiedlichen Spezies generiert wurden und die Sekundärantikörper mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind.

3.7.1 Indirekte Immunfluoreszenz an transfizierten Zellen und neuronalen Zellen

Die zu untersuchenden Zellen wurden in 24-well Schalen auf Polylysin-beschichteten Deckgläschen ausgesät, je nach Bedarf transfiziert bzw. differenziert und in dem entsprechenden Medium zwei bis fünf Tage kultiviert. rSlc10a4-HEK293 Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80 – 90 % untersucht, während bei PC12 und SH-SY5Y Zellen der Grad ihrer Differenzierung (siehe 3.4.4 und 3.4.5) für den Untersuchungszeitpunkt bestimmend war.

Zu Versuchsbeginn wurde das Medium von den Zellen entfernt und 5 min mit PBS bei RT gewaschen. Dann wurden die Zellen 15 min bei 4°C mit 2 % PFA fixiert, nach zwei weiteren 5-minütigen Waschschritten mit PBS die PFA-Reaktion durch die Inkubation mit einem 20 mM Glycinpuffer (Puffer A) gestoppt und die Zellen anschließend mit Triton X-100-haltigem Puffer A permeabilisiert. Die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte durch eine 30-minütige Inkubation mit Blockierlösung. Anschließend wurden die Zellen mit den Primärantikörpern, die in Blockierlösung gelöst waren, über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag folgte nach dreimaligem Waschen mit PBS (jeweils 5 min) die Inkubation mit den Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern für 1 h bei RT. Nach drei weiteren 5-minütigen Waschschritten erfolgte die Kernfärbung mit DAPI/Methanol Lösung in einer Verdünnung von 1:5000 für 5 min bei RT. Die Zellen wurden anschließend 5 min mit Methanol gewaschen, luftgetrocknet und mit *ProLong Gold Antifade* Eindeckelmedium (Invitrogen) auf Objektträgern eingedeckelt.

3.7.2 Blockierung des Slc10a4-Antikörpers mit dem Immunisierungspeptid

Als Nachweis der spezifischen Bindung des Slc10a4-Antikörpers wurden Blockierungen des Antikörpers mit dem Immunisierungspeptid durchgeführt. Dazu wurde ein 100-facher molarer Überschuss an Peptid gegenüber dem Antikörper in Antikörperlösung gelöst und zusammen mit dem Slc10a4-Antikörper für 2 h bei RT auf einem Drehrad präinkubiert. Durch die Präinkubation mit dem Immunisierungspeptid wurden die spezifischen Bindungsstellen der Antikörper durch das Immunisierungspeptid besetzt und konnten somit nicht mehr an das entsprechende Epitop im Gewebeschnitt binden.

3.7.3 Kolokalisationsstudien mit VAcHT, VMAT2, Synaptophysin und Tyrosin Hydroxylase

Für die Organentnahme wurden Ratten mit einem Körpergewicht von 200 – 300 g ausgewählt. Die Tiere wurden mit 0,1 ml/100 g Körpergewicht Pentobarbital (160 mg/ml Narcoren, Merial) durch eine intraperitoneale Injektion tief narkotisiert und transkardial perfundiert (Transcard-pump, Max-Planck Institut, Bad Nauheim). Dazu wurden zunächst mit einem Druck von 100 – 120 mmHg, was dem mittleren arteriellen Blutdruck der Ratte entspricht, durch eine Knopfkanüle ca. 500 ml 0,9%ige Kochsalzlösung in den Aortenbogen injiziert. Sobald die aus dem eröffneten rechten Ventrikel ausgespülte Flüssigkeit klar und somit das Blut aus dem Gefäßkreislauf größtmöglich entfernt war, wurde die Perfusionsflüssigkeit über einen Dreiwegehahn an der Pumpvorrichtung auf 4 % eiskaltes PFA umgestellt. Für die vollständige Perfusion der Ratte wurden ca. 300 ml PFA benötigt. Im Anschluss an die Perfusion wurden sofort die Organe entnommen, dann in 4 % PFA für 2 h bei 4°C nachfixiert und über Nacht zur Kryoprotektion in einer 20%igen Sucroselösung inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Gewebestücke in gepulvertem Trockeneis eingefroren.

Aus den Gewebestücken wurden am Kryostat (Microm HM-500-O) bei einer Kammertemperatur von -20°C Schnitte mit einer Dicke von 12 – 16 µm angefertigt und auf Polylysin-beschichtete Objektträger aufgefroren. Die Schnitte wurden entweder sofort verwendet oder bei -50°C aufbewahrt.

Zunächst mussten die Schnitte 3 x 5 min in ca. 150 ml 0,1 M Phosphatpuffer (PB) auf dem Schüttler rehydriert werden. Dann folgte die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit Blockierlösung für 1 h bei RT. Dazu wurden die Gewebeschnitte großzügig mit einem Wachsstift umrundet und 200 µl Blockierlösung direkt auf die Schnitte gegeben. Durch den Gehalt von 0,3 % Triton X-100 in der Blockierlösung wurde das Gewebe gleichzeitig permeabilisiert und die Epitope der nachzuweisenden Proteine für die spezifischen Antikörper besser zugänglich gemacht. Für den Nachweis des Slc10a4-Proteins in den verschiedenen Geweben und Kolokalisationsstudien mit weiteren Proteinen wurden folgende Antikörper verwendet:

Primärantikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller
Anti-Slc10a4	1:1000	Polyklonal, Kaninchen	Eurogentec, Seraing, Belgien (custom antibody)
Anti-Vesicular Acetylcholine Transporter (VAcHT)	1:1000	Polyklonal, Ziege	Millipore, Schwalbach/Ts.
Anti-VAcHT	1:500	Polyklonal, Ziege	Promega, Mannheim
Anti-VMAT2	1:500	Polyklonal, Ziege	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Tyrosin Hydroxylase (TH)	1:500	Monoklonal, Maus	Millipore, Schwalbach/Ts.
Anti-Synaptophysin (SYP)	1:500	Monoklonal, Maus	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA

Die primären Antikörper wurden in der Antikörperlösung gelöst und 200 µl auf die Gewebeschnitte aufgetragen. Die Inkubation erfolgte in einer Klimakammer bei 4°C für 48 h. Die Kammer war mit destilliertem Wasser angefeuchteten Tüchern ausgelegt, um eine übermäßige Verdunstung der Antikörperlösung und damit ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern.

Als Negativkontrollen wurden für jeden Versuch Gewebeschnitte ohne Primärantikörper inkubiert und eine Blockierung des Slc10a4-Antikörpers mit dem Immunisierungspeptid, wie in 3.7.2 beschrieben, durchgeführt.

Nach Abziehen der Antikörperlösung wurden die Schnitte in PB 3 x 5 min unter Schwenken gewaschen und anschließend mit den entsprechenden Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern für 2 h bei RT inkubiert. Folgende Sekundärantikörper wurden dafür verwendet:

Sekundärantikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller
Anti-Kaninchen IgG Cy3- konjugiert	1:800	Polyklonal, Esel	Dianova, Hamburg
Anti-Ziege IgG Alexa Fluor 488	1:800	Polyklonal, Esel	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Maus IgG Alexa Fluor 488	1:800	Polyklonal, Esel	Invitrogen, Karlsruhe
Fluoreszenzfarbstoff			
DAPI/PBS	1:1000		Roche Diagnostics, Mannheim

Anschließend erfolgte nach weiteren Waschschritten (3 x 5 min) die Kernfärbung mit DAPI/PBS in einer Verdünnung von 1:1000 für 10 min bei RT. Die Schnitte wurden nochmals 3 x 5 min gewaschen und anschließend mit je 3 Tropfen Fluoromount Eindeckelmedium (Serva) pro Objektträger mit Deckgläschen eingedeckelt, über Nacht bei RT getrocknet und bei 4°C aufbewahrt. Die Dokumentation der Immunfluoreszenzbilder erfolgte an den Fluoreszenzmikroskopen *Olympus BX50* mit einer S/W Kamera von Visitron und dem *Leica DM5500B* mit einer S/W Kamera *DFC340 FX*. Die Auswertung und Bildbearbeitung wurde mit dem Programm *MetaMorph 5.05 (Olympus BX50)* der Firma Universal Imaging Corporation, West Chester, bzw. mit der *LAS AF6000* Software mit *3D Deconvolution (Leica DM5500B)* von Leica Microsystems durchgeführt.

3.7.4 Immunzytologie an isolierten Mastzellen

Die aufgereinigte Mastzellfraktion aus dem Percoll-Dichtegradienten (siehe 3.6.2) wurde nach mehreren Waschschritten mit KRH-Lösung 5 min bei 1.000 x *g* zu einem Zellpellet abzentrifugiert. Der Puffer wurde möglichst vollständig entfernt und die Mastzellen in 1 ml auf 37°C vorgewärmtem Medium (siehe 2.7.3) resuspendiert. Es wurden jeweils 80 µl der Zellsuspension in jedes well einer ibidi µ-slide VI Zellkammer pipettiert. Die Zellen blieben zunächst für 1 h im Brutschrank, bevor weitere 70 µl Medium hinzugefügt und die Mastzellen nochmals 2 h im Brutschrank inkubiert wurden.

Während der 3-stündigen Inkubationszeit setzten sich die Mastzellen am Boden der Zellkammern ab. Da die Zellen nicht sehr stark an die Plastikoberfläche der ibidis anhafteten, mussten alle Wasch- und Inkubationsschritte sehr vorsichtig durchgeführt werden. Als erstes wurde das Medium von den Mastzellen entfernt, dann 2 x 5 min bei RT mit 150 µl/well Hank's BSS gewaschen und anschließend 5 min bei RT mit 100 µl/well 4 % PFA fixiert. Es folgten zwei weitere Waschschriffe mit Hank's BSS, bevor die unspezifischen Bindungsstellen mit 100 µl/well Blockierlösung für 30 min bei RT abgeblockt wurden. Nachdem die Blockierlösung aus den Zellkammern entfernt war, folgte die Antikörperinkubation mit dem Slc10a4-Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 und dem VMAT2 Antikörper (Santa Cruz, Heidelberg) in einer Verdünnung von 1:200 über Nacht bei 4°C. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die ohne Primärantikörper inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurden die Zellen 3 x 10 min

mit 150 µl/well Waschpuffer gewaschen und dann mit den Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert.

Für die Detektion der Slc10a4-Antikörper wurde ein Cy3 gekoppelter Esel anti-Kaninchen Antikörper in einer Verdünnung von 1:800 und für die Darstellung des VMAT2 Antikörpers ein Alexa Fluor 488 Esel anti-Ziege Antikörper, ebenfalls in der Verdünnung 1:800, verwendet. Die Mastzellen wurden 2 h bei RT mit den Sekundärantikörpern inkubiert und dann 3 x 10 min mit Hank's BSS gewaschen. Es folgte die Kernfärbung mit Hoechst 33258 1:1000 in Hank's BSS und ein weiterer Waschschrift mit Hank's BSS für 10 min. Anschließend wurden die Zellen in 50 µl einer Mischung von Hank's BSS und Glycerol eingedeckelt. Die Auswertung der Fluoreszenzbilder erfolgte am *Leica DM6000B* Fluoreszenzmikroskop und der Bildbearbeitungssoftware *FW4000 V1.2 Fluorescence Workstation, Deblur V2.3.2 Deconvolution*.

3.8 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie wird für Strukturanalysen von biologischen und anorganischen Proben eingesetzt, aber auch für Immunogoldmarkierungen auf Basis einer Antigen-Antikörper-Reaktion.

Das Transmissionselektronenmikroskop (TEM) ist ähnlich aufgebaut wie ein Lichtmikroskop. Die Auflösung eines Lichtmikroskops ist allerdings limitiert durch die Wellenlänge des Lichtes und liegt bei höchstens 200 nm. Um kleinere Strukturen abzubilden (derzeit bis ca. 0,2 nm), nutzt man die sehr kurze Wellenlänge eines Elektronenstrahls, der im Hochvakuum durch das Erhitzen eines Wolframdrahtes erzeugt und durch Anlegen einer Hochspannung (ca. 80 – 120 kV) zur Anode hin beschleunigt wird. Das Vakuum ist notwendig, um eine Streuung des Elektronenstrahls durch Gasmoleküle zu verhindern. Verschiedene Objektiv- und Blendensysteme formen den Strahl, fokussieren ihn, blenden Streustrahlung aus und sorgen für die hohe Endvergrößerung.

Ein Abbild der Probe, die für die Analyse im TEM sehr dünn sein muss (≤ 100 nm) entsteht dadurch, dass der Elektronenstrahl durch die unterschiedlich dichten Anteile der Probe unterschiedlich stark gestreut wird. Dabei ergeben die transmittierten (nichtgestreuten) Elektronen die hellen Bereiche des Bildes, während die dichteren Bestandteile der Probe die Elektronen ablenken und damit in der Abbildung dunkel erscheinen.

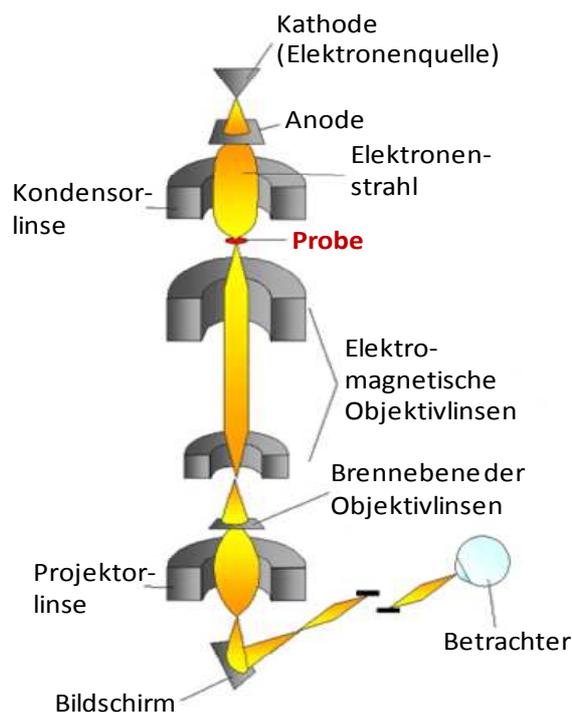


Abb. 3.4: Schematischer Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops
(aus: www.fzd.de, J. Raff, 2010)

3.8.1 Präparation der Organe und Vorbereitung der Proben

Zur Klärung der subzellulären Expression von Slc10a4 in verschiedenen Organen der Ratte und der ultrastrukturellen Darstellung der Bereiche, in denen bereits ein Immunfluoreszenzsignal für Slc10a4 gefunden wurde, erfolgte eine Analyse mittels Transmissionselektronenmikroskopie. Die zur Organentnahme verwendeten Tiere wurden, wie in 3.7.3 beschrieben, narkotisiert und transkardial perfundiert. Die Organe wurden entnommen, in ca. 0,5 x 0,5 cm kleine Stücke zerteilt und in einer Lösung aus 4 % PFA in PBS plus 0,1 % Glutaraldehyd über Nacht immersionsfixiert. Die Aldehydfixierung des Gewebes dient der Quervernetzung von Aminogruppen und damit einer erhöhten Stabilität des Gewebes und einer besseren Erhaltung der Zellorganellen. Am nächsten Tag folgte ein weiterer Fixierungsschritt in 4 % PFA in PBS plus 0,1 % Glutaraldehyd für 30 min bei RT auf dem Drehrad. Anschließend wurden die Proben 5 min mit PBS auf dem Drehrad gewaschen. Es folgte eine 30-minütige Nachfixierung mit 0,5 % Osmiumtetroxid, wodurch die ungesättigten Kohlenwasserstoffketten in Lipiden vernetzten und damit eine Stabilisierung der Lipidmembranen der Zellen und Steigerung der Elektronendichte (Kontrastierung) erzielt wurde.

Die Proben wurden dann 3 x 5 min in ddH₂O gewaschen und anschließend über Nacht bei 4°C in 2 % Uranylacetat auf dem Drehrad nachfixiert. Das Uranylacetat bindet an Phosphatgruppen von Membranen und DNA und sorgt aufgrund seiner hohen Ordnungszahl für eine erhöhte Elektronendichte und eine Kontrastierung des Materials.

3.8.2 Kunstharzeinbettung der Gewebe

Aufgrund der einfachen Handhabung und der guten Ergebnisse bei Immunmarkierungen wurde als Einbettmedium für die Gewebestücke das Acrylharz LR White (Plano, Wetzlar) verwendet. Die Proben wurde über eine ansteigende Alkoholreihe (30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 % Ethanol und 2 x 100 % wasserfreies Ethanol, jeweils 20 min bei 4°C auf dem Drehrad) entwässert. Die Einbettung in LR White erfolgte in vier Stufen mit vier unterschiedlich konzentrierten LR White-Ethanol Gemischen, um eine bessere Gewebepenetration zu erreichen. Zunächst wurden die Gewebe mit einem 1:2 Gemisch LR White:Ethanol über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Es folgte eine 11-stündige Inkubation bei 4°C mit einem 1:1 LR White-Ethanol Gemisch, das am Abend gegen ein 2:1 LR White-Ethanol Gemisch ausgetauscht und über Nacht bei 4°C weiter inkubiert wurde. Am nächsten Tag wurden die Proben 2 x mit reinem LR-White für jeweils 2 h bei RT inkubiert.

Die Gewebestückchen wurden dann in getrockneten Gelatinekapseln platziert und die Kapseln dann bis zum Rand mit LR White aufgefüllt. Die Auspolymerisierung des Acrylharzes erfolgte für 2 Tage unter Luftabschluss bei 55°C im Trockenschrank. Die ausgehärteten Proben wurden zur Vorbereitung für das Schneiden der Semi- und Ultradünnschnitte mit einer Rasierklinge trapezförmig zugetrimmt. Im Anschluss wurden mit dem Ultramikrotom (Reichert OM U2) Semidünnschnitte von etwa 400 nm Dicke angefertigt. Nach einer Toluidin-Blau Färbung wurden die Semidünnschnitte unter dem Lichtmikroskop überprüft. Zur optimalen Erfassung der gewünschten Zielstruktur im Ausschnitt wurde der Präparateblock nachgetrimmt. Von dieser Schnittfläche wurden dann Ultradünnschnitte angefertigt, im Wasserbad aufgefangen und auf ein Formvar-befilmtes Nickelgrid aufgezogen. Anhand der Interferenzfarbe der Schnitte konnte die Schnittdicke bestimmt werden (silbern ~70-80 nm). Die Grids wurden getrocknet und bis zur weiteren Bearbeitung in einer Gridbox aufbewahrt.

3.8.3 Immunogoldmarkierung der Gewebeschnitte

Die Inkubation ausgewählter Grids erfolgte, indem das Grid mit der Probenseite nach unten auf Tropfen des jeweiligen Inkubationspuffers aufgelegt wurde. Die Proben wurden zunächst 10 min mit ddH₂O rehydriert und dann 5 min mit 3 % Natriummetaperjodat zum Anätzen der Kunstharzoberfläche inkubiert. Es folgten vier 5-minütige Waschschriffe mit ddH₂O, gefolgt von einer Inkubation mit 0,2 M Glycinpuffer für 3 x 10 min. Unspezifische Antikörperbindungsstellen wurden für 30 min mit Blockierlösung abgeblockt. Dem folgte die Antikörperinkubation mit dem anti-Slc10a4-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in Antikörperlösung für 2 h. Anschließend wurden die Proben 6 x 5 min mit einer 1%igen BSA-PBS Lösung gewaschen und dann mit dem Ziege-anti-Kaninchen Sekundärantikörper, der mit 15 nm kolloidalem Gold gekoppelt war, in einer Verdünnung von 1:50 für 1 h bei RT inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Proben ohne den Primärantikörper prozessiert. Zum Schluss wurden die Proben jeweils 6 x 5 min zunächst mit BSA-PBS, dann mit PBS und schließlich mit ddH₂O gewaschen.

Zur Verstärkung des Kontrastes bei der Betrachtung im TEM wurden die goldmarkierten Grids zunächst 30 min bei RT unter Lichtausschluss mit 4 % Uranylacetat inkubiert, gut mit ddH₂O gewaschen (5 x 2 min) und dann 7 min mit Bleicitrat nach Reynolds kontrastiert. Anschließend wurden die Grids erneut 8 x 4 min mit ddH₂O gewaschen, getrocknet und bis zur Betrachtung im TEM in Gridboxen aufbewahrt.

3.8.4 Immunogoldmarkierung von Gehirnvesikeln

Zur Überprüfung der Reinheit der Vesikelpräparation und der einzelnen Fraktionen des Sucrose-Dichtegradienten sowie zur Untersuchung der Expression von Slc10a4 in Gehirnvesikeln der Ratte wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen verschiedener Fraktionen aus der Vesikelpräparation und dem Sucrosegradienten (siehe Kapitel 3.9) vorgenommen.

Formvar-beschichtete Nickelgrids wurden mit Kohlenstoff bedampft und unter Hochspannung beglimmt. Das diente der Stabilisierung des Formvarfilms und führte zu einer erhöhten Hydrophilie, sodass eine gute Adhäsion der Vesikel an dem Grid gewährleistet war.

Von jeder Vesikelfraktion wurden 10 µl auf das Grid pipettiert und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Grids 10 min auf einem Tropfen 4%igem PFA + 0,25 % Glutaraldehyd fixiert, 4 x 5 min mit ddH₂O gewaschen und 3 x 10 min in 0,2 M Glycinpuffer inkubiert. Es folgte die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit Blockierlösung für 30 min bei RT, bevor die Grids mit dem anti-Slc10a4-Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 in Blockierlösung für 1 h bei RT inkubiert wurden. Die Inkubation mit dem Gold-gekoppelten Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen IgG) in einer Verdünnung von 1:70 erfolgte für 1 h bei RT. Die Grids wurden anschließend jeweils 6 x 5 min mit BSA-PBS, dann in PBS und schließlich in ddH₂O gewaschen. Die Grids wurden getrocknet und in einer Gridbox aufbewahrt.

3.8.5 Mikroskopie

Die kontrastierten und goldmarkierten Gewebeproben wurden an dem Transmissionselektronenmikroskop LEO AB912 begutachtet. Die Bildaufnahme erfolgte mittels digitaler Kamera (slow scan ccd 1k x 1k, ProScan, Lagerlechfeld). Die Auswertung und Bearbeitung der Bilder erfolgte mit einer Bildbearbeitungssoftware (Esvision) der Firma Soft Imaging Systems, Münster.

3.9 Präparation synaptischer Vesikel aus dem Gehirn der Ratte

3.9.1 Präparationstechnik und Vorbereitung der Proben

Synaptische Vesikel wurden aus adulten Wistar Ratten mithilfe des *Synaptic Vesicle Isolation Kits* (Sigma) präpariert. Alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C nach einem modifizierten Protokoll durchgeführt.

Die Ratten wurden mittels CO₂ Inhalation getötet und die Gehirne unmittelbar nach Eintritt des Todes durch Eröffnung des Schädeldaches entnommen und sofort in eiskaltem Homogenisierungspuffer auf Eis gelagert. Die Gehirne von zwei bis fünf Tieren wurden gepoolt, ausgewogen, mit einer sterilen Schere zerkleinert und mit 10 ml Homogenisierungspuffer pro Gramm Gehirngewebe in einem 40 ml Glas Homogenisator mit einem PTFE Pistill homogeni-

siert. Es folgten zwei Zentrifugationsschritte bei $1.500 \times g$, um unlösliche Zellbestandteile nach der Homogenisierung zu entfernen. Der Überstand aus dieser Zentrifugation wurde dann bei $20.000 \times g$ in einer Sorvall Zentrifuge mit SS-34 Rotor für 20 min zentrifugiert, um intakte Synaptosomen zu pelletieren. Dieses Pellet wurde mit 10 ml Lysepuffer pro Gramm Gehirngewebe resuspendiert und im 40 ml Homogenisator erneut homogenisiert. Dabei wurden die Synaptosomen aufgebrochen und die darin enthaltenen synaptischen Vesikel freigesetzt. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei $20.000 \times g$, um die Synaptosomenmembranen zu pelletieren. Der Überstand aus dieser Zentrifugation (LS1 – Fraktion) wurde anschließend in der Beckman Ultrazentrifuge mit einem TFT 45.94 Rotor bei $70.000 \times g$ und 4°C für 45 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet (*crude vesicle fraction*) entweder in *Storage Buffer* (Western Blot) oder für die Anreicherung verschiedener Vesikelpopulationen in einem Sucrose-Dichtegradienten (siehe 3.9.2) in Gradientenpuffer resuspendiert.

3.9.2 Aufreinigung und Fraktionierung der Gehirnvesikel

Bei der Fraktionierung der verschiedenen Vesikelpopulationen im Sucrose-Dichtegradienten wurde nach den Angaben aus Ferguson et al. (2003) vorgegangen. Dazu wurden zunächst 12 verschiedene Sucrosekonzentrationen (50 mM – 800 mM) in Gradientenpuffer hergestellt und mit einer Plastikpasteurpipette vorsichtig in Ultrazentrifugenröhrchen geschichtet, beginnend mit der höchsten Konzentration. Als letztes wurden ca. 1,5 ml der *crude vesicle fraction* (die Menge konnte durch späteres austarieren mit der Vesikelsuspension geringfügig variieren) auf den Gradienten aufgetragen. Es folgte eine 3-stündige Zentrifugation in der Ultrazentrifuge bei $65.000 \times g$ im SW 41 Ti Rotor. Um den Gradienten nicht zu zerstören wurde die Zentrifuge ohne Bremse auslaufen gelassen.

Im Anschluss an die Ultrazentrifugation wurden die einzelnen Fraktionen, die durch leicht milchige Banden gut sichtbar waren, mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

3.10 Proteinbiochemische Methoden

3.10.1 Präparation von Membranproteinen

Die Extraktion von Membranproteinen aus den Plasmamembranen der stabil transfizierten rSlc10a4-HEK293 Zellen, den nativen SH-SY5Y Zellen und Rattengehirnen erfolgte mit dem *ProteoExtract Native Membrane Protein Extraction Kit* (Calbiochem).

Die rSlc10a4-HEK293 und SH-SY5Y Zellen wurden dazu in einer T₇₅-Zellkulturschale bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert. Das Medium wurde entfernt und die Zellen 2 x mit 5 ml eiskaltem Waschpuffer gewaschen. An den Rand der Zellschale wurden 30 µl *Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma) pipettiert, dann sofort mit 6 ml *Extraction Buffer I* gemischt und 10 min bei 4°C geschwenkt. Der Überstand (E1), in dem sich die löslichen zytosolischen Proteine befinden, wurde vom Zelloberflächen abgenommen, in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und entweder bis zur anschließenden Verwendung auf Eis oder längerfristig bei -80 °C gelagert. Auf die Zellen wurden 3 ml *Extraction Buffer II*, gemischt mit 10 µl *Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma), pipettiert und 30 min bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde der Überstand (E2), in welchem membranassoziierte Proteine angereichert sind, abgenommen, aliquotiert und entweder bei -80°C eingefroren oder sofort weiter verwendet. Wenn sich die Zellen während der Inkubation mit dem *Extraction Buffer II* ablösten, wurde der Zelloberflächen mit einem Zellschaber vollständig gelöst, in zwei 2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und auf dem Drehrad weiter inkubiert. Nach Pelletierung der Zellreste konnte der Überstand sauber abgezogen werden.

Die Rattengehirne wurden wie in 3.9.1 beschrieben entnommen, der Cortex und das Kleinhirn entfernt und 200 mg des Stammhirns abgewogen. Dieses wurde in etwa 2 mm³ große Stücke zerteilt und 3 x mit 2 ml eiskaltem Waschpuffer gewaschen. Das Gewebe wurde in einen 15 ml Glas Homogenisator überführt, 10 µl *Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma) sowie 2 ml *Extraction Buffer I* wurden hinzugefügt und mit etwa 10 Hüben mit einem PTFE Pistill homogenisiert. Das Homogenat wurde in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben und 10 min bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Unlösliches Material und Zelldebris wurden bei 16.000 x g und 4°C für 15 min sedimentiert. Der Überstand E1 wurde abgenommen, aliquotiert und eingefroren. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml *Extraction Buffer II* mit 5 µl *Protease Inhibitor Cocktail* resuspendiert und 30 min auf dem Drehrad im Kühlraum inku-

biert. Nach einer Zentrifugation bei 16.000 x g und 4°C für 15 min, wurde der Membranprotein-haltige Überstand E2 abgenommen, aliquotiert und entsprechend der weiteren Verwendung gelagert.

3.10.2 Gesamtprotein Extraktion aus Rattengehirn und transfizierten HEK293 Zellen

Auch für die Extraktion von Proteinen aus dem Rattengehirn wurde wie in 3.9.1 beschrieben Stammhirngewebe gewonnen, 200 mg ausgewogen und in einem 15 ml Glashomogenisator mit einem PTFE Pistill in 1 ml *ProteoJet Mammalian Cell Lysis Reagent* (MBI Fermentas) supplementiert mit 5 µl *Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma) homogenisiert und anschließend in ein vorgekühltes 2 ml Reaktionsgefäß überführt.

Die Extraktion der Proteine aus transient transfizierten MSR-Zellen erfolgte 48 h nach der Transfektion. Die Zellen wurden gewaschen, mit einem Zellschaber von der Oberfläche der 6-well Schale gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Nach Pelletieren der Zellen wurde das 20-fache Volumen des Zellpellets an *ProteoJet Mammlian Cell Lysis Reagent*, versetzt mit 1:100 *Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma), zugegeben und durch vortexen lysiert. Das Gewebekomogenat sowie das Zelllysat wurden 10 min bei RT im Eppendorf Thermo-mixer bei 1200 rpm inkubiert und anschließend für 15 min bei 16.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Lagerung der extrahierten Proteine erfolgte bei -80°C.

3.10.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Der Gehalt an gelösten Proteinen in den verschiedenen Präparationen wurde mit dem *BCA Protein Assay Kit* (Novagen) bestimmt. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass diese auch in Anwesenheit zahlreicher chemischer Verbindungen und Detergenzien durchgeführt werden kann. Der erste Schritt war das Anfertigen einer Standardreihe (0 – 1000 µg Protein) in dem Puffer, in welchem auch die Proteine gelöst waren. Damit konnte ein Einfluss der Inhaltsstoffe der Puffer auf die Konzentrationsmessung ausgeschlossen werden. In eine 96-well Mikrotiterplatte wurden je 25 µl des Standards (Dreifachbestimmung) oder der

Probe (Doppelbestimmung) vorgelegt. Anschließend wurden pro Probe 200 μl *BCA Solution* mit 4 μl 4 % *Cupric Sulfate* gemischt, auf die Proben gegeben und gut vermischt. Dieser Ansatz wurde dann für 30 min bei 37°C inkubiert und nach Abkühlen der Platte auf RT die Intensität der Farbentwicklung bei 570 nm im ELISA-Reader gemessen. Anhand der Extinktion der Standardreihe konnte im Anschluss der Gehalt an Protein in der Probe berechnet werden.

3.11 Western Blot

Bei der Western Blot Methode werden Proteine, die zuvor in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt wurden, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mithilfe von spezifischen Antikörpern anhand einer Chemilumineszenzreaktion auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

In der vorliegenden Arbeit wurden vergleichende Studien zur Proteinexpression von Slc10a4, vesikulären Transportern und neuronalen Markern in Gehirnesikeln der Ratte durchgeführt. Für die Western Blot Analysen wurden die verschiedenen Fraktionen aus der in 3.9 beschriebenen Vesikelreinigung, Zellsate und extrahierte Membranproteine verwendet.

3.11.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die elektrophoretische Auftrennung der Proben wurde das *PeqLab PerfectBlue* Doppelkammersystem verwendet. Zunächst wurde ein 12%iges Trenngel gegossen und unter Luftabschluss durch Überdecken mit Ethanol bei RT polymerisiert. Das Ethanol wurde abgegossen und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Während das Gel polymerisierte, wurden je 20 μg Protein aus Zell- oder Gewebelysaten im Verhältnis 2:1 mit 2 x Lämmli-Puffer (Sigma) bzw. 4:1 mit 4 x Lämmli-Puffer gemischt und für 5 min auf 100°C erhitzt. Die Proteine werden denaturiert, indem sich durch die hohe Temperatur die Wasserstoffbrücken in der Sekundär- und Tertiärstruktur lösen, während das β -Mercapto-Ethanol, welches im Lämmli-Puffer enthalten ist, die Disulfidbrücken spaltet. Die Pufferkammern wurden mit 1 x Tris-Glycin-SDS Elektrophoresepuffer gefüllt und die Proteine auf das Gel aufgetragen,

welche sich nach Anlegen einer Spannung von 120 – 160 V nach ihrer Größe im Gel auftrennen. Als Längenstandards wurden 5 μ l *PageRuler Prestained Protein Ladder Plus* (MBI Fermentas) und 5 μ l *RotiMark Western Marker* (Roth) verwendet.

3.11.2 Blotting

Nach Beendigung des Gellaufs wurde das Sammelgel abgetrennt, sechs Filterpapiere sowie die *Hybond ECL Nitrocellulose Membran* (GE Healthcare) auf die Größe des Trenngels zugeschnitten und 10 min in Transferlösung inkubiert. Für den Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran wurde ein *PerfectBlue „Semi-Dry“-Elektroblotter* (PeqLab) verwendet und der Blot, wie in Abb. 3.5 gezeigt, aufgebaut.

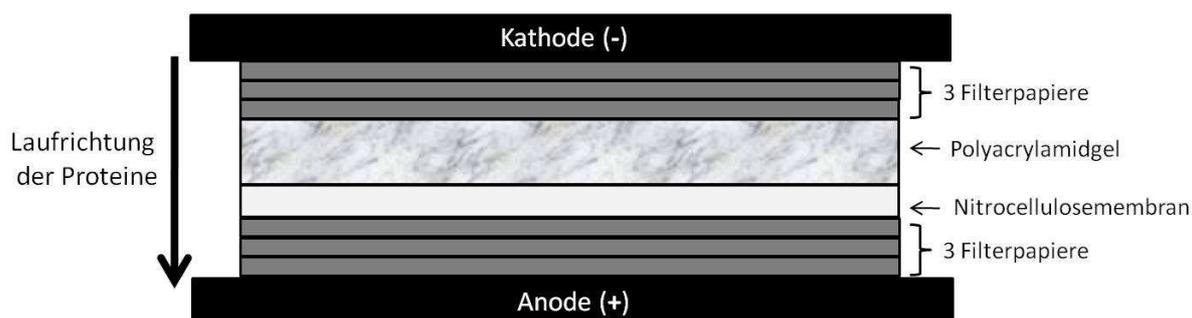


Abb. 3.5: Aufbau eines Semi-Dry Elektroblots

Eingeschlossene Luftblasen wurden durch vorsichtiges Ausrollen mit einem 50 ml Reaktionsgefäß aus dem Gelsandwich entfernt und überschüssiger Transferpuffer von der Bodenplatte des Elektroblotters aufgenommen. Anschließend wurde für 2 h ein elektrisches Feld mit einer Stromstärke von 1,5 mA/cm² Gelfläche angelegt. Dadurch wanderten die Proteine aus dem Gel aus und blieben an der Oberfläche der Nitrocellulosemembran haften. Nach Beendigung des Blots wurde der Proteintransfer durch Anfärben mit einer *Ponceau S Solution* (Sigma) kontrolliert. Der Farbstoff konnte durch Waschen der Membran mit TBS-T wieder entfernt werden. Das Gel wurde in einer Coomassie-Lösung nachgefärbt.

3.11.3 Blockierung der Membran und Antikörperreaktion

Die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran wurden durch eine 1-stündige Inkubation in 5%iger Blockierlösung abgesättigt. Danach folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C in 5%iger Blockierlösung. Dabei kamen folgende Primärantikörper zum Einsatz:

Primärantikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller
Anti-Slc10a4	1:1000	Polyklonal, Kaninchen	Eurogentec, Seraing, Belgien (custom antibody)
Anti-VACHT	1:500	Polyklonal, Ziege	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-VMAT2	1:500	Polyklonal, Ziege	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-VMAT2	1:1000	Polyklonal, Kaninchen	Millipore, Schwalbach/Ts.
Anti-Na⁺/K⁺-ATPase	1:1000	Monoklonal, Maus	Thermo Scientific, Schwerte
Anti-Synaptophysin (SYP)	1:1000	Monoklonal, Maus	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA

Am nächsten Tag wurde die Membran in TBS-T zuerst 3 x 5 min, dann 2 x 15 min gewaschen und anschließend für 1 h mit dem Sekundärantikörper in TBS-T bei RT inkubiert. Dafür kamen folgende HRP-gekoppelte Antikörper zum Einsatz:

Sekundärantikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller
ECL anti-Kaninchen HRP-gekoppelt	1:5000	Esel	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
ECL anti-Ziege HRP-gekoppelt	1:5000	Kaninchen	Zymed® Invitrogen, Karlsruhe
ECL anti-Maus HRP-gekoppelt	1:1000	Schaf	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

Zur Detektion des *RotiMark Western Marker* (Roth) wurde der Sekundärantikörperlösung noch das *RotiMark Western Konjugat* (Roth) in einer Verdünnung von 1:5000 zugesetzt. Im Anschluss an die Inkubation folgten wieder drei 5-minütige und zwei 15-minütige Waschschritte in TBS-T und die Detektion der immunmarkierten Proteine auf der Membran.

3.11.4 Detektion

Die Visualisierung der immunmarkierten Proteine erfolgte nach der Methode der Chemilumineszenz. Dazu wurden die Detektionsreagenzien *Rotilumin 1 & 2* (Roth) 1:1 gemischt und die Membran 2 min mit dem Gemisch überschichtet. Nach Entfernen der überschüssigen Flüssigkeit wurde die Membran in Folie eingeschweißt. Die Belichtung des *Amersham Hyperfilm ECL*-Films (GE Healthcare) auf der Membran erfolgte in einer Röntgenkassette in der Regel für 5 min in der Dunkelkammer. Das Luminol im Rotilumin wird von der Meerrettichperoxidase (*Horseradish peroxidase*, HRP) des Sekundärantikörpers oxidiert, welches dadurch angeregt wird und ein Lichtquant aussendet, welches auf dem *Amersham ECL*-Film detektiert wird.

Nach der Exposition wurde der Film ca. 3 min lang im *Rodinal B & W Developer* (Agfa) Entwicklerbad geschwenkt, die Reaktion durch 2%ige Essigsäure gestoppt und anschließend in *Hypam Schnellfixierer* (Ilford) fixiert. Nach Wässern und Trocknen des Films konnten die Banden begutachtet werden. Je nach Stärke der Signale wurde die Belichtungszeit angepasst.

3.12 Immunpräzipitation

Der Neurotransmitter Transporter VMAT2 und das vesikuläre Glykoprotein Synaptophysin sind Marker synaptischer Vesikel. Um zu überprüfen, ob Slc10a4 ebenfalls in synaptischen Vesikeln vorkommt, in denen auch VMAT2 und Synaptophysin exprimiert sind, wurde eine Immunpräzipitation an Gehirnvesikeln durchgeführt. Grundlage dieser Methode ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, wobei das Antigen aus einer Lösung (Vesikelpräparation) mithilfe seines spezifischen Antikörpers, der an Sepharose-Kügelchen gebunden ist, gefällt (präzipitiert) wird.

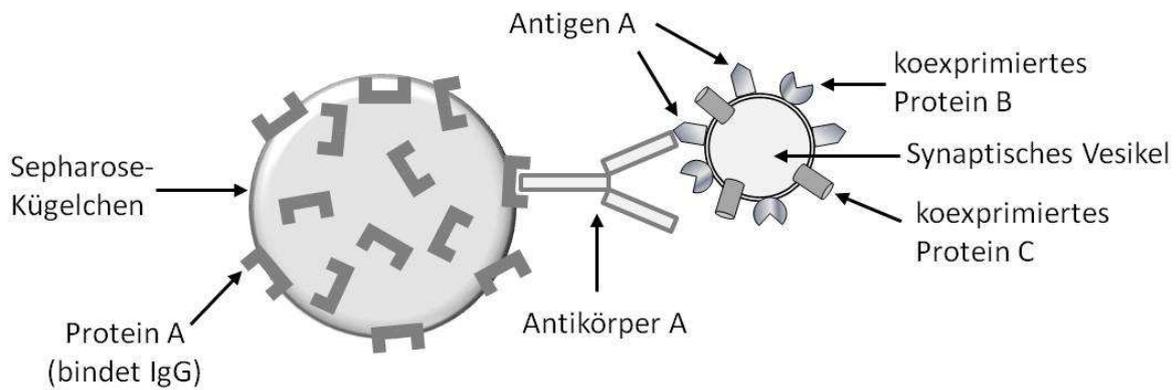


Abb. 3.5: Prinzip der Immunpräzipitation mit Protein A-Sepharose

Der spezifische Antikörper A mit welchem präzipitiert werden soll, wird an das Protein A der Sepharose Beads gekoppelt. Dieser bindet bei der Inkubation mit der Proteinlösung (Vesikelsuspension) an sein spezifisches Antigen A. Der Komplex aus Sepharose-Kügelchen, Antikörper und über das Antigen gebundenen Vesikeln können präzipitiert werden. Der Nachweis der mit dem Antigen kopräzipitierten Proteine des Vesikels erfolgt im Western Blot.

Für die Immunpräzipitationen wurden verschiedene Fraktionen aus der in Kapitel 3.9 beschriebenen Vesikelpräparation verwendet. 200 mg des Protein A-Sepharose Trockenpulvers (GE Healthcare) wurden in 1 ml ddH₂O gelöst und für 2 h bei RT gequollen. Nach mehreren Waschschritten mit PBS wurden die Sepharose-Beads in 2,4 ml 1 mM PBS-EDTA resuspendiert, was einer Suspension von 25 % Sepharose-Beads entspricht. Der Primärantikörper wurde mit der Sepharose gemischt und 4 h bei 4°C auf dem Drehrad an die Beads gekoppelt. Als Primärantikörper dienten Anti-Slc10a4 in einer Verdünnung von 1:10, bzw. Anti-Synaptophysin in einer Verdünnung von 1:166. Als Negativkontrolle wurden die Beads ohne den Primärantikörper inkubiert.

Nach der Kopplung wurden die Sepharose-Kügelchen gut gewaschen (3 x 5 min auf dem Drehrad), bei 9.000 x g für 1 min zentrifugiert und in 1 mM PBS-EDTA/EGTA resuspendiert. Anschließend wurden die Beads über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad mit der Vesikelsuspension inkubiert, wobei der gekoppelte Primärantikörper an das Slc10a4 bzw. Synaptophysin der Vesikel gebunden hat. Am nächsten Tag folgten drei 10-minütige Waschschrritte mit PBS-EDTA/EGTA, mit einer abschließenden Zentrifugation bei 9.000 x g für 1 min. Damit die Proben auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen werden konnten, mussten zunächst die Sepharose-Beads von den präzipitierten Vesikeln getrennt werden. Dazu wurde das Pellet in 4 x Lämmli-Puffer resuspendiert und auf 37°C für 15 min erhitzt, wodurch die nicht-kovalente Bindung zwischen Antigen und Antikörper gespalten und die Proteine denaturiert

wurden. Die Beads wurden 2 min bei 9.000 x *g* sedimentiert und der Überstand, der die präzipitierten Proteine enthielt, auf das Gel aufgetragen.

Nach dem Gellauf wurden die aufgetrennten Proteine, wie in Kapitel 3.11 beschrieben, auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Um die präzipitierten Proteine nachzuweisen, wurde die Membran mit dem jeweils korrespondierenden Primäantikörper inkubiert (z. B. Präzipitation mit dem anti-Slc10a4-Antikörper und Inkubation mit dem anti-Synaptophysin- bzw. anti-VMAT2-Antikörper). Die Negativkontrollen, welche ohne ersten Antikörper die Immunpräzipitation durchlaufen, wurden unter den gleichen Bedingungen mitgeführt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Quantitative real-time PCR von SLC10A4 in humanen Gehirnregionen

Erste Ergebnisse zur Lokalisation von Slc10a4 im zentralen Nervensystem der Ratte, die im Jahr 2008 veröffentlicht wurden (Geyer et al. 2008), zeigten in der quantitativen real-time PCR eine dominante Expression der SLC10A4/Slc10a4 mRNA im Gehirn von Ratte, Maus und Mensch.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand einer quantitativen real-time PCR in elf verschiedenen humanen Gehirnregionen die relative Expression von SLC10A4, dem vesikulären Acetylcholin Transporter (VACHT) und der Tyrosin Hydroxylase (TH) untersucht.

SLC10A4 zeigte in sämtlichen untersuchten Gehirnregionen ein ähnliches Expressionsmuster wie TH. Vor allem in der dopaminergen Region des Mittelhirns, der *Substantia nigra*, sowie striatalen Regionen wie dem *Putamen* oder dem *Nucleus accumbens*, welche viele dopaminerge Projektionen aus der *Substantia nigra* erhalten, ist SLC10A4 zusammen mit TH am stärksten exprimiert (Abb. 4.1).

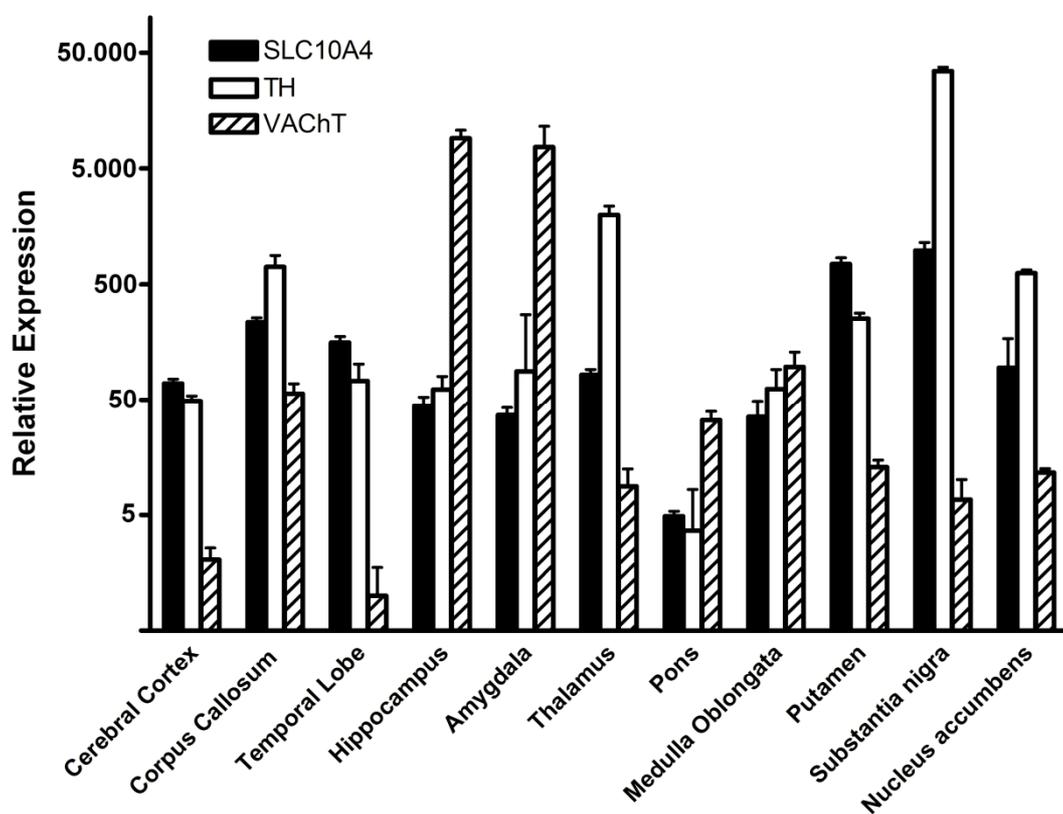


Abb. 4.1 : Relative Expression von SLC10A4, VACHT und TH in humanen Gehirnregionen

Die cDNA der verschiedenen Gehirnregionen wurde kommerziellen Panels entnommen (BD Clontech, BioChain) und mittels quantitativer real-time PCR untersucht. Die relative Expression wurde mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode berechnet. Als endogene Kontrolle diente GAPDH und als Kalibrator das Target mit der insgesamt niedrigsten Expression (VACHT im Temporallappen). Das Expressionsmuster von SLC10A4 entspricht im Wesentlichen dem von TH, mit hohen Expressionswerten vor allem in dopaminergen Gehirnregionen.

4.2 Kolokalisation von Slc10a4, VACHT, VMAT2, Tyrosin Hydroxylase und Synaptophysin im zentralen Nervensystem

Bereits 2008 wurde von Geyer et al. die Expression von Slc10a4 mit einem spezifisch gegen den C-Terminus des Slc10a4-Proteins der Ratte gerichteten Antikörpers im Rattengehirn untersucht. Sie zeigen das Protein in Zellkörpern, Synapsen und Nervenfasern cholinergischer Gehirnregionen. Diese Erkenntnisse wurden anhand von Doppelmarkierungen mit verschiedenen cholinergen Markern in der Immunfluoreszenz belegt.

Eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, die Verteilung des Slc10a4-Proteins in bestimmten Gehirnregionen, in Organen des zentralen und peripheren Nervensystems und die genaue subzelluläre Lokalisation des Proteins aufzuklären. Diese Studien wurden vergleichend mit dem cholinergen Marker VACHT, den monoaminergen Markern TH und dem vesikulären Monoamin Transporter (VMAT2) sowie dem synaptischen Vesikelmarker Synaptophysin (SYP) durchgeführt (siehe Kapitel 3.7).

Im Ventralhorn des Rückenmarks sind starke Fluoreszenzsignale für Slc10a4 und VACHT vor allem in den präsynaptischen C-Boutons an den Motoneuronen zu erkennen, aber auch eine schwächere Anfärbung der Zellkörper. In der Überlagerung sieht man deutlich die Kolokalisation beider Proteine (Abb. 4.2 A). Zusätzlich zu dieser schon bekannten Koexpression von Slc10a4 und VACHT im Rückenmark (Geyer et al. 2008), zeigte sich auch eine Doppelmarkierung innerhalb eines Axons mit Slc10a4 und VMAT2 im Ventralhorn des Rückenmarks (Abb. 4.2 B). Da VACHT und VMAT2 vesikuläre Neurotransmitter Transporter sind, wurde der synaptische Ursprung der Slc10a4-Signale durch eine Doppelmarkierung mit dem Marker für synaptische Vesikel Synaptophysin (SYP) belegt. Die Überlagerung beider Fluoreszenzsignale in den Synapsen an einem Motoneuron im Ventralhorn zeigen, dass beide Proteine hier koexprimiert sind (Abb. 4.2 C). Dies gab einen ersten Hinweis auf die Expression von Slc10a4 in synaptischen Vesikeln.

Zusätzlich zu den Untersuchungen im Ventralhorn des Rückenmarks wurden Doppelmarkierungen von Slc10a4 und den monoaminergen Markern TH und VMAT2 in der *Substantia nigra* durchgeführt. Eine deutliche Koexpression von Slc10a4 und TH findet sich in Zellkörpern dopaminerger Neurone (Abb. 4.2 D). Doppelmarkierungen mit VMAT2 zeigen beide Proteine außerdem in den Somata sowie den Innervationen bzw. Projektionen monoaminergener Neurone (Abb. 4.2 E)

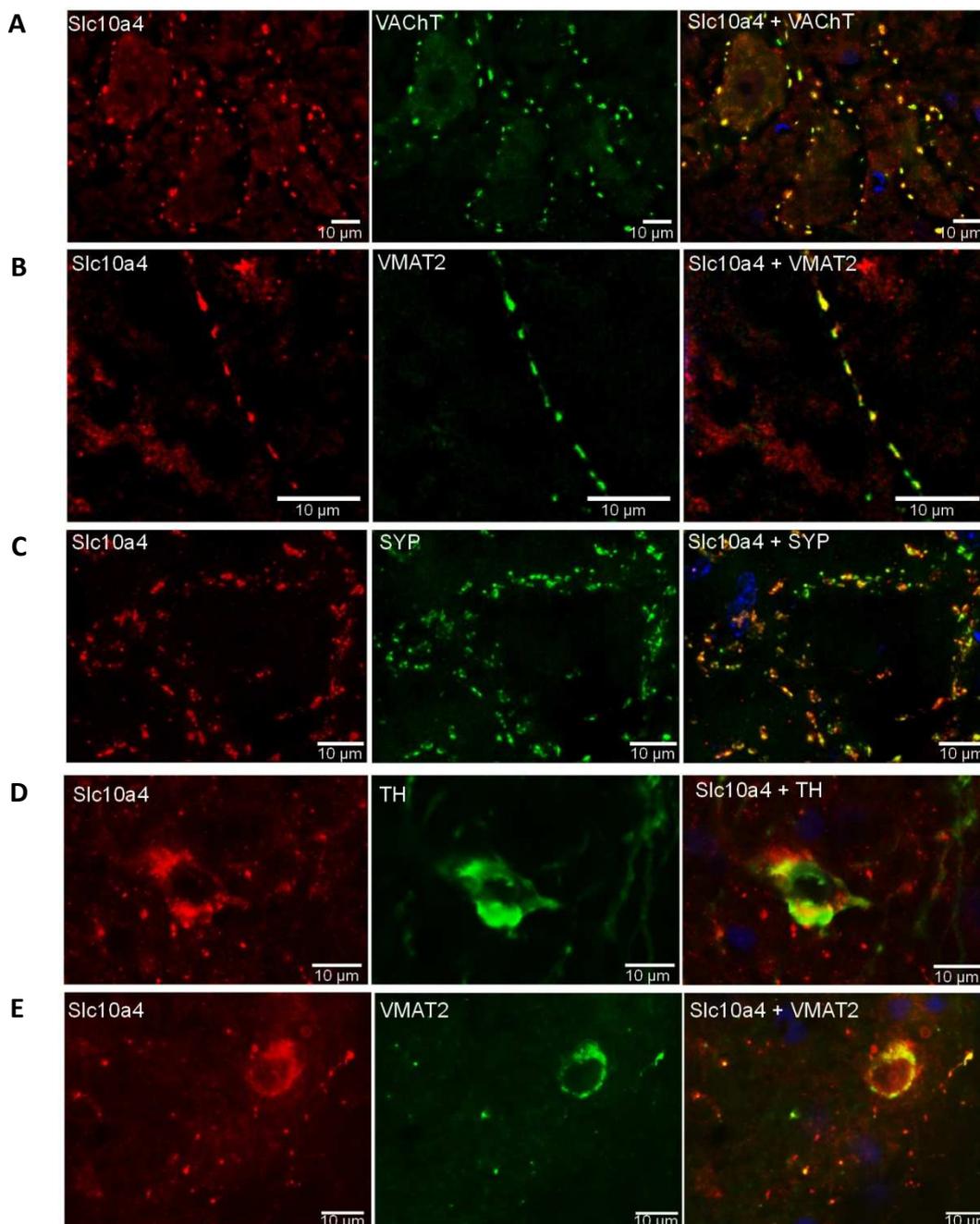


Abb. 4.2: Kolokalisation von Slc10a4, VAcHT, VMAT2, TH und SYP im Rückenmark und der *Substantia nigra*

Von Präparaten des cervicalen Rückenmarks und des Gehirns wurden am Kryostat Schnitte mit einer Dicke von 12 – 16 µm angefertigt. Im Anschluss wurden Doppelimmunmarkierungen mit den Antikörpern gegen Slc10a4 (Verdünnung 1:1000), VAcHT (1:1000), VMAT2 (1:500), TH (1:500) und SYP (1:500) an den Gewebeschnitten durchgeführt. Als Sekundäntikörper dienten ein Cy3-gekoppelter Esel-anti-Kaninchen und ein Alexa Fluor 488-gekoppelter Esel-anti-Ziege bzw. Esel-anti-Maus Antikörper (Verdünnung jeweils 1:800). Die Kernfärbung erfolgte mittels DAPI/PBS (Verdünnung 1:1000). Slc10a4 wird in den Abbildungen in rot, die ko-gefärbten Markerproteine VAcHT, VMAT2, SYP und TH werden jeweils in grün und die Zellkerne in blau dargestellt.

(A) In den Motoneuronen des Ventralhorns des Rückenmarks und den großen präsynaptischen C-Boutons ist Slc10a4 mit VAcHT kolokalisiert. Mit VMAT2 hingegen, zeigt Slc10a4 eher eine axonale Koexpression(B). Die Ko-Färbung mit SYP lässt auf eine Expression in synaptischen Vesikeln schließen(C). Auch in monoaminergen Neuronen und den Innervationen bzw. Projektionen der *Substantia nigra* ist das Protein zusammen mit TH (D) und VMAT2 (E) lokalisiert.

4.3 Kolokalisation von Slc10a4, VAcHT und VMAT2 im peripheren Nervensystem

Neben der ausgeprägten Expression von Slc10a4 im zentralen Nervensystem wurde vermutet, dass Slc10a4 auch im peripheren Nervensystem zu finden ist. Dies wurde anhand von Immunfluoreszenzanalysen überprüft. Gleichzeitig wurde die Koexpression mit VAcHT und VMAT2 auch im peripheren Nervensystem untersucht.

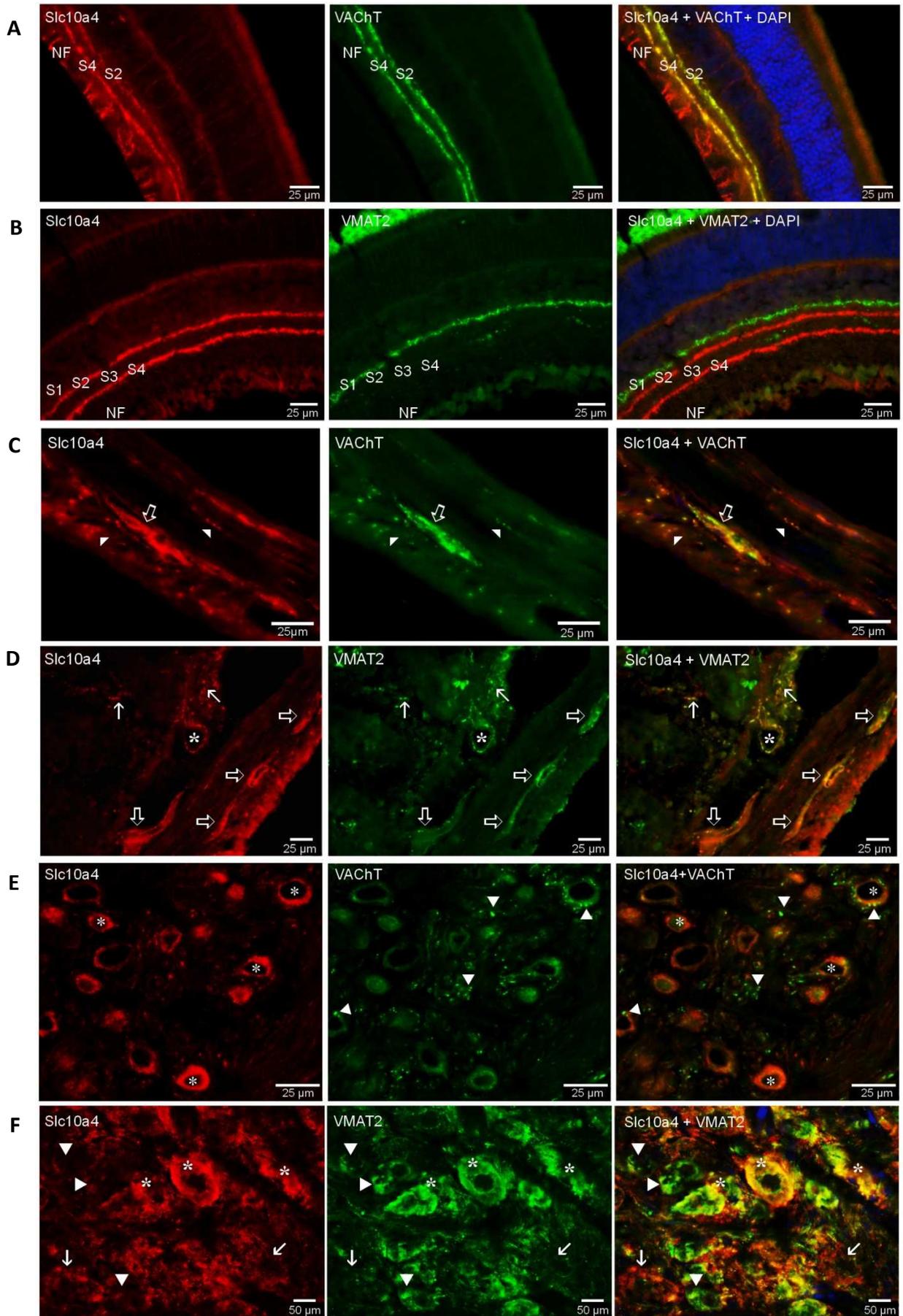
Die Retina ist aufgrund ihrer Embryonalentwicklung ein Teil des zentralen Nervensystems. Daher wurde das vergleichende Expressionsmuster von Slc10a4, VAcHT und VMAT2 zunächst in diesem Organ untersucht. Eine starke Expression von Slc10a4 zeigt sich vor allem im S2 und S4 Segment der inneren plexiformen Schicht (*inner plexiform layer, IPL*) und in Nervenfasern der Ganglienzellen (NF). Die IPL der Retina ist in fünf unterschiedliche Segmente unterteilt, je nach Ursprung der sich dort verzweigenden Innervationen. Die Segmente S2 und S4 erhalten vor allem Fasern aus cholinergen Amakrinzellen (*starburst amacrine cells*) und koexprimieren Slc10a4 und VAcHT, wie in der Überlagerung deutlich zu sehen ist (Abb. 4.3 A). Bei der Doppelimmunmarkierung mit VMAT2 fällt allerdings auf, dass Slc10a4 nicht mit VMAT2 kolokalisiert. Spezifische Fluoreszenzsignale für VMAT2 finden sich vor allem in dopaminergen Fasern des S1 Segments, in geringerem Ausmaß auch im S3 Segment der inneren plexiformen Schicht der Retina (Abb. 4.3 B).

In den Abb. 4.3 C und D ist jeweils ein Schnitt aus dem proximalen Duodenum dargestellt. Slc10a4 und VAcHT werden im *Plexus myentericus* (offener Pfeil) und in den Innervationen der glatten Muskulatur der Ring- und Längsmuskelschicht des Darms (Pfeilspitzen) koexpri-

miert (Abb. 4.3 C). In Abbildung 4.3 D ist außerdem ein Teil der Submucosa des Darms abgebildet. Hier erkennt man die Expression von Slc10a4 in der sympathischen Innervation eines Blutgefäßes (Sternchen) sowie in sekretorischen oder sensiblen Nervenfasern der Submucosa (Pfeil), wo dieses mit VMAT2 kolokalisiert. Auch in den autonomen Nervenplexus (*Plexus myentericus* und *Plexus submucosus*) sind Slc10a4 und VMAT2 gleichermaßen sowohl in den Zellkörpern als auch in Synapsen, welche die Neurone des Plexus kontaktieren, lokalisiert (offene Pfeile).

Im *Ganglion cervicale craniale (superior cervical ganglion, SCG)* werden die Fasern des Sympathikus auf das zweite Neuron umgeschaltet. Hier ist Slc10a4 vor allem in den Zellkörpern der Neurone exprimiert (Abb. 4.3 E und F), während VACHT in den sympathischen Fasern ein sehr starkes Signal zeigt und nur schwach in einzelnen Zellkörpern vorkommt (Abb. 4.3 E). In der Doppelmarkierung mit VMAT2 (Abb. 4.3 F) fällt allerdings auf, dass nur einige Zellkörper beide Proteine besitzen (Sternchen), während in anderen Neuronen nur Slc10a4 (Pfeil) oder VMAT2 (Pfeilspitze) lokalisiert ist.

An der motorischen Endplatte findet die Erregungsübertragung rein cholinerg statt. Das spiegelt sich auch in der Koexpression von Slc10a4 und VACHT im Synapsenendknöpfchen des motorischen Axons wider. Beide Proteine zeigen starke Fluoreszenzsignale in der neuromuskulären Endplatte, was in der Überlagerung deutlich zu sehen ist (Abb. 4.3 G).



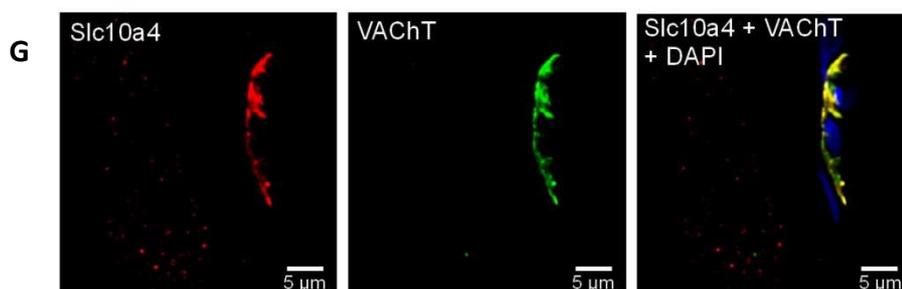


Abb. 4.3: Expression von Slc10a4 im peripheren Nervensystem und seine Kolokalisation mit VAcHT und VMAT2

Nach einer transkardialen Perfusion mit 4 % PFA wurden den Versuchstieren die verschiedenen Organe entnommen, nachfixiert und in pulverisiertem Trockeneis eingefroren. Dann wurden auf einem Kryostat (Microm HM-500-O) 12-16 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf Polylysin-beschichtete Objektträger aufgefroren. Für die Doppelmarkierung wurden die Antikörper gegen Slc10a4, VAcHT und VMAT2 in der gleichen Verdünnung wie in Abb. 4.2 beschrieben eingesetzt und mit den entsprechenden Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert. Slc10a4 wird in den Abbildungen in rot, die ko-gefärbten Markerproteine VAcHT und VMAT2 jeweils in grün dargestellt. Die Kernfärbung wurde mit DAPI/PBS durchgeführt und ist in blau dargestellt.

Auch im peripheren Nervensystem ist Slc10a4 in cholinergen Neuronen und Nervenfasern exprimiert, was sich in der Doppelimmunmarkierung des Proteins mit VAcHT zeigt. Jedoch kann eine ebenso klare Koexpression mit VMAT2 festgestellt werden. In der Retina ist Slc10a4 in den cholinergen Fasern der *starburst amacrine cells* im S2 und S4 Segmenten der inneren plexiformen Schicht ausschließlich mit VAcHT kolokalisiert (A), während VMAT2 vor allem in dopaminergen Fasern des S1 Segment vorkommt (B). Ausserdem finden sich starke Fluoreszenzsignale für Slc10a4 in den Nervenfasern der Ganglienzellen (A, B, NF). Allerdings findet sich im autonomen Nervensystem des Darms wieder eine Koexpression von Slc10a4 mit beiden Proteinen, mit VAcHT (C) vor allem im *Plexus myentericus* (offener Pfeil) und in Innervationen der glatten Muskulatur (Pfeilkopf) sowie mit VMAT2 (D) außer in den *Plexus myentericus* und *submucosus* (offene Pfeile) auch in Innervationen der Blutgefäße (Sternchen) und der Submucosa (Pfeil). Auch in den Neuronen des *Ganglion cervicale craniale* kommt Slc10a4 sowohl zusammen mit VAcHT in einer Zelle vor (E, Sternchen), als auch mit VMAT2 (F, Sternchen). Allerdings finden sich im SCG auch viele Neuronen, die entweder nur Slc10a4 (Pfeil) oder VMAT2 (Pfeilkopf) exprimieren. Die neuromuskuläre Endplatte ist wiederum rein cholinerg innerviert. Hier ist Slc10a4 zusammen mit VAcHT im Synapsenendknöpfchen lokalisiert (G).

4.4 Lokalisation von Slc10a4 in synaptischen Gehirnvesikeln

Die chemische Erregungsübertragung von einer Nervenzelle auf eine nachgeschaltete Zelle wird durch die Ausschüttung von Neurotransmittern wie zum Beispiel Acetylcholin, Dopamin oder Glutamat vermittelt. Diese Neurotransmitter werden in den synaptischen Endknöpfchen in Vesikeln gespeichert und bei einer Erregung der Synapse aus diesen durch eine Calcium-vermittelte Exozytose in den synaptischen Spalt abgegeben. Die Erregungsweiterleitung wird durch Bindung der Neurotransmitter an postsynaptische Rezeptoren vermittelt. Die verschiedenen synaptischen Vesikel haben einen Durchmesser von ca. 50 – 200 nm und enthalten unterschiedliche Neurotransmitter sowie ihre spezifischen vesikulären Transpor-

ter. Nach der exozytotischen Verschmelzung der Vesikel mit der Plasmamembran werden die Vesikelmembranen mit ihren spezifischen Protein-Bestandteilen aus der Plasmamembran recycelt und einer späteren Nutzung wieder zugeführt.

Aufgrund der deutlichen Koexpression von Slc10a4 mit den vesikulär exprimierten Proteinen VAcHT, VMAT2 und SYP lag die Vermutung nahe, dass auch Slc10a4 ein vesikulär exprimiertes Protein darstellt. Tatsächlich zeigen die Immunfluoreszenzaufnahmen eine eindeutig intrazelluläre Lokalisation von Slc10a4. Vor allem immunzytologische Untersuchungen neuronaler Zellen (siehe Kapitel 4.8) lassen auf eine vesikuläre Expression des Proteins schließen. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde eine Präparation synaptischer Vesikel aus dem Rattengehirn vorgenommen (siehe Kapitel 3.9) und nach Sucrose-Dichtegradientenaufreinigung anhand von Western Blot Analysen mit verschiedenen neuronalen Markern untersucht. In Abb. 4.4 ist eine Gegenüberstellung von 12 Vesikelfractionen aus der Sucrose-Aufreinigung dargestellt. Die Detektion mit einem Antikörper gegen die Na⁺/K⁺-ATPase (einem Plasmamembranmarker) zeigt, dass mit der Zentrifugation der *crude vesicle fraction* im Sucrose-Dichtegradienten eine Auftrennung verschieden großer Plasmamembranfragmente erfolgte. Ein Vergleich der Signale von Slc10a4 mit denen von VMAT2 und VAcHT zeigt, dass alle drei Proteine in den Fraktionen 4-7, VMAT2 und Slc10a4 darüber hinaus in der Fraktion 12 zu finden sind. Somit kommt das Slc10a4-Protein in den gleichen Vesikelpopulationen wie VAcHT und VMAT2 vor. Als Marker für synaptische Vesikel wurde schließlich Synaptophysin verwendet, welches die stärksten Signale ebenfalls in den Fraktionen 4 bis 7 zeigte.

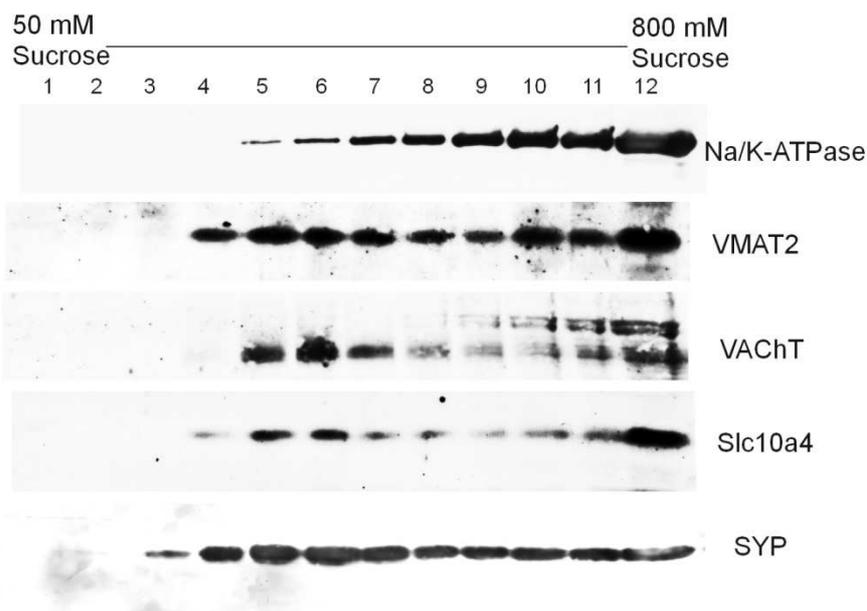


Abb. 4.4: Western Blot Analyse der verschiedenen Vesikelfractionen aus der Sucrose-Dichtegradienten Aufreinigung

In mehreren Versuchsansätzen wurde Rattengehirn homogenisiert und in verschiedenen Zentrifugationsschritten zu einer *crude vesicle fraction*, in welcher verschiedene Vesikelpopulationen und Plasmamembranfragmente aus Synaptosomenresten enthalten sind, aufgereinigt. Die *crude vesicle fraction* wurde auf einen Sucrose-Dichtegradienten aufgetragen und die Vesikel nach ihrer Größe sedimentiert. Diese 12 Vesikelfractionen wurden anschließend in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit verschiedenen Marker-Antikörpern detektiert. VMAT2, VAcHT und Slc10a4 zeigen die stärksten Signale in den Fraktionen 4 bis 7, wo auch SYP die deutlichsten Signale aufweist. Eine weitere starke Immunreaktion von Slc10a4 ist in der Fraktion 12 zu sehen, wo auch VMAT2 deutlich detektiert wurde. In dieser Fraktion sammeln sich größere Vesikel, wie z. B. *large dense core vesicles* und Plasmamembranstücke. Das zeigt auch die Detektion mit dem Na^+/K^+ -ATPase-Antikörper, welcher mit aufsteigender Dichte des Gradienten die entsprechend größeren Plasmamembranfragmente nachweist.

Als zusätzliche Kontrolle der Vesikelexpression von Slc10a4 wurde eine Immunpräzipitation isolierter Gehirnesikel durchgeführt (siehe Kapitel 3.12). Dazu wurden Protein A-Sepharose Beads mit dem Anti-Slc10a4 bzw. Anti-Synaptophysin Antikörper gekoppelt und dann mit den verschiedenen Fraktionen (LS1 bzw. Fraktion 4) aus der Vesikelpräparation inkubiert. Die Vesikel, die das entsprechende Protein enthielten, wurden in einer Antigen-Antikörper Reaktion an die Beads gebunden und präzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden im Western Blot mit den jeweils korrespondierenden Antikörpern, d. h. Slc10a4- bzw. Synaptophysin-Antikörper, inkubiert. Die Proteine aus der LS1-Fraktion der Vesikelpräparation, die mit anti-Synaptophysin präzipitiert wurden, zeigten eine deutliche Bande bei der Detektion mit dem Slc10a4-Antikörper. Im umgekehrten Fall zeigten die mit anti-Slc10a4 präzipitierten Vesikel eine Immunreaktivität im Western Blot mit dem Synaptophysin- und mit dem VMAT2-Antikörper. Dies bedeutet, dass Slc10a4 in den gleichen Vesikeln exprimiert ist, in welchen auch Synaptophysin oder VMAT2 vorkommen.

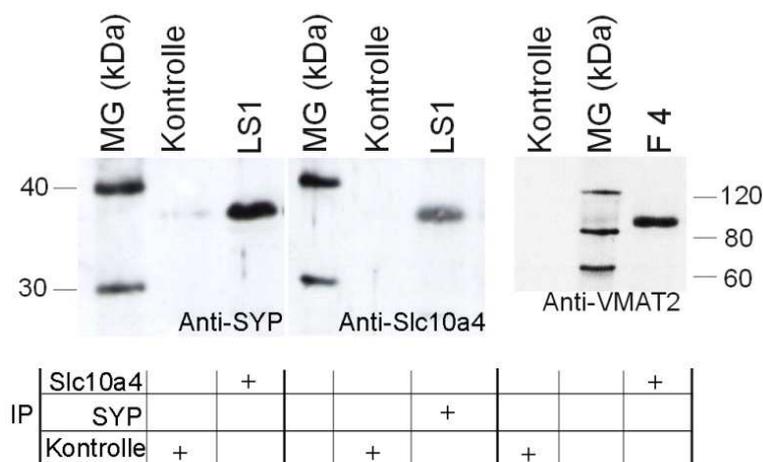


Abb. 4.5: Immunpräzipitation isolierter Gehirnvesikel aus der Ratte

Für die Immunpräzipitation wurde der Slc10a4- bzw. SYP-Antikörper an Protein A-Sepharose Beads gekoppelt und mit der LS1-Fraktion aus der Vesikelpräparation, bzw. der Fraktion 4 aus dem Sucrosegradienten inkubiert. Die an die Antikörper gekoppelten Vesikel wurden präzipitiert und die Proteine anschließend auf einem SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit anti-Slc10a4 (1:1000), anti-SYP (1:1000) bzw. anti-VMAT2 (1:1000) detektiert. Auf dem Blot ist zu erkennen, dass Vesikel die mit Synaptophysin-gekoppelten Beads präzipitiert wurden, ein positives Signal für Slc10a4 zeigen, während bei Slc10a4-präzipitierten Vesikeln sowohl für Synaptophysin als auch für VMAT2 eine deutliche Bande sichtbar ist.

Als weiterer Beweis für die vesikuläre Expression von Slc10a4 wurden transmissions-elektronenmikroskopische Untersuchungen an isolierten Gehirnvesikeln durchgeführt. Die *crude vesicle fraction* (CVF) sowie die Fraktionen 5 und 11 aus der Sucrose-Dichtezentrifugation wurden auf Formvar-beschichtete Nickelgrids aufgebracht, fixiert und mit dem Slc10a4-Antikörper Immunogoldmarkiert. In der *crude vesicle fraction* befinden sich synaptische Vesikel sowie größere Membranbestandteile aus den lysierten Synaptosomen. In der elektronenmikroskopischen Aufnahme (Abb. 4.6) lassen sich sowohl *small synaptic vesicles* (SSV, offene Pfeile), die Durchmesser von etwa 40 - 80 nm aufweisen, als auch *large dense core vesicles* (LDCV, Pfeile), mit Durchmessern von ca. 70 - 200 nm, unterscheiden. Bereits in der CVF sind Vesikel beider Art Immunogoldmarkiert. Die erfolgreiche Auftrennung der verschiedenen Vesikelpopulationen im Sucrosegradienten erkennt man an der Konzentrierung der SSV (offene Pfeile) in der Fraktion 5, die auch im Westernblot starke Banden für Slc10a4, VACHT, VMAT2 und Synaptophysin zeigte (siehe Abb. 4.3). Im elektronenmikroskopischen Bild erkennt man eine Konzentrierung der Goldpartikel an der äußeren Membran, was daran liegt, dass der spezifische Antikörper für Slc10a4 ein Epitop am C-terminalen Ende des Proteins, welches in den synaptischen Vesikeln an der Außenseite der Vesikelmembran lokalisiert ist, erkennt. Die Fraktion 11 enthält schließlich die Plasmamembranfragmente aus

Synaptosomen, viele LDCV (Pfeile), aber auch noch einige SSV (offener Pfeil). In der Vergrößerung lassen sich sowohl Markierungen an einem SSV (offener Pfeil) als auch an verschiedenen LDCV (Pfeile) erkennen. Auch in dieser Aufnahme ist eine Konzentrierung der Goldpartikel an der Außenseite der LDCV und des SSV deutlich sichtbar.

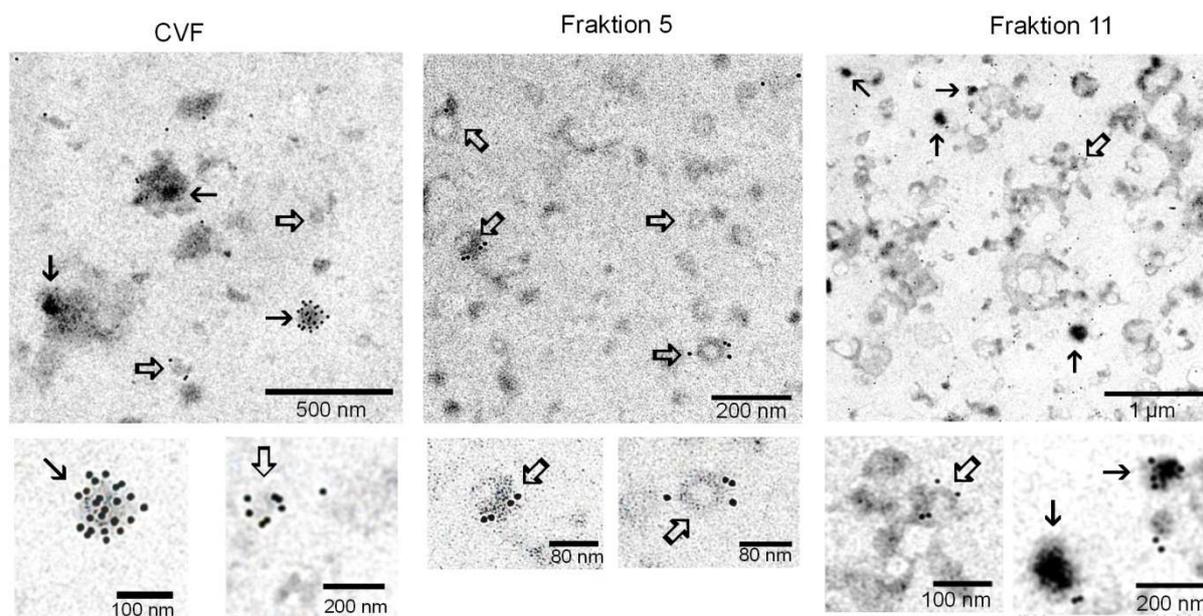


Abb. 4.6: Transmissionselektronenmikroskopie verschiedener Fraktionen der Vesikelpräparation

Je 10 µl der *crude vesicle fraction* (CVF) sowie der Fraktionen 5 und 11 aus der Sucrosegradientenzentrifugation wurden auf Formvar-beschichtete Nickelgrids aufgebracht. Die Vesikel wurden mit 4%igem PFA fixiert und mit dem Slc10a4-Antikörper (Verdünnung 1:500) inkubiert. Die Goldmarkierung erfolgte mit einem Ziege-anti-Kaninchen Antikörper (1:70). Die CVF besteht aus einer Mischung verschiedener synaptischer Vesikel und größeren Membranbestandteilen lysierter Synaptosomen. In der Aufnahme sind sowohl *large dense core vesicles* (LDCV, Pfeile), als auch *small synaptic vesicles* (SSV, offene Pfeile) sichtbar. In der Vergrößerung sind Immunogoldmarkierte Vesikel beider Arten dargestellt. Die Fraktion 5 besteht aus einer relativ homogenen Ansammlung von etwa 50 nm großen SSV. Auffällig ist, dass nicht alle Vesikel gleichermaßen mit Goldpartikeln markiert sind, sondern Slc10a4 vielmehr in einer bestimmten Population von synaptischen Vesikeln lokalisiert ist. In der Fraktion 11 sammeln sich größere Plasmamembrananteile und große Vesikel wie LDCV (Pfeile), auch Konglomerate kleiner Vesikel können in dieser Fraktion zu finden sein (offener Pfeil). In der Vergrößerung sind auf der rechten Seite LDCV mit einem Durchmesser von ca. 200 nm dargestellt, die an der Außenseite ihrer Membran eine Immunogoldmarkierung für Slc10a4 aufweisen (Pfeile). Die Vergrößerung links zeigt ein SSV, das ebenfalls Goldpartikel gebunden hat.

4.5 Expression von Slc10a4 in der Harnblase der Ratte und der humanen Lunge

Die Synthese und Ausschüttung von Acetylcholin ist nicht auf Neuronen beschränkt, sondern findet in einer Vielzahl nicht-neuronaler Zellen des Körpers statt, wie z. B. in Epithelzellen der Lunge, des Urogenitaltrakts oder der Haut, aber auch in Immunzellen wie Makrophagen oder Mastzellen (Kummer et al. 2008; Wessler und Kirkpatrick 2008). In einer Studie von Lips et al. aus 2007 konnte gezeigt werden, dass Acetylcholin (ACh) im Urothel der Maus und des Menschen durch die Carnitin Acetyltransferase gebildet wird und der Gehalt von ACh im Urothel vergleichbar ist mit dem in anderen Oberflächenepithelien. Allerdings wurde in dieser Studie die Expression von VAcHT weder auf RNA- noch auf Proteinebene nachgewiesen.

In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, wie es sich in der Harnblase der Ratte mit der Expression und der Lokalisation von Slc10a4 verhält, welches im peripheren Nervensystem meist mit VAcHT kolokalisiert. Um dies zu klären, wurde eine Immunhistologie an Gewebeschnitten der Blase von Ratten durchgeführt und Slc10a4 sowohl mit VAcHT als auch mit VMAT2 doppelmarkiert (siehe Kapitel 3.7.3). Slc10a4 zeigt eine sehr starke Expression in allen Schichten des Urothels der Ratte (Abb. 4.7, Sternchen), aber auch in den parasympathischen Innervationen der glatten Muskulatur (Abb. 4.7, Pfeile) und in den sympathischen Nervenfasern der Blutgefäße (Abb. 4.7 breite Pfeile) im subepithelialen Bereich der Blasenwand (Abb. 4.7 A, B). In den cholinergen Nervenfasern, welche die glatte Muskulatur innervieren, ist auch VAcHT lokalisiert, nicht jedoch im Urothel (Abb. 4.7 A). VMAT2 hingegen wird sowohl in den äußeren Zellschichten des Urothels als auch in den sympathischen Innervationen der subepithelialen Blutgefäße detektiert (Abb. 4.7 B).

Die Harnblase nimmt in der Untersuchung der Organe des peripheren Nervensystems eine besondere Stellung ein, da sie das parasympathische und sympathische Nervensystem sowie das non-neuronale Acetylcholinsystem in sich vereint. Das verdeutlicht auch die Betrachtung der Überlagerungsbilder der Abbildungen 4.7 A und B. Slc10a4 kolokalisiert sowohl mit VAcHT in den parasympathischen Innervationen der glatten Muskulatur (Pfeile Abb. 4.7 A), als auch mit VMAT2 in den sympathischen Nervenfasern um die subepithelialen Blutgefäße (breite Pfeile, Abb. 4.7 B). Darüber hinaus ist eine starke Koexpression von Slc10a4 und VMAT2 im Urothel zu erkennen (Sternchen, Abb. 4.7 B).

Als Negativkontrollen wurde eine 2-stündige Blockierung des Slc10a4-Antikörpers mit dem Immunisierungspeptid durchgeführt (Inset, Abb. 4.7 A), bzw. ohne den Primärantikörper inkubiert (Inset, Abb. 4.7 B).

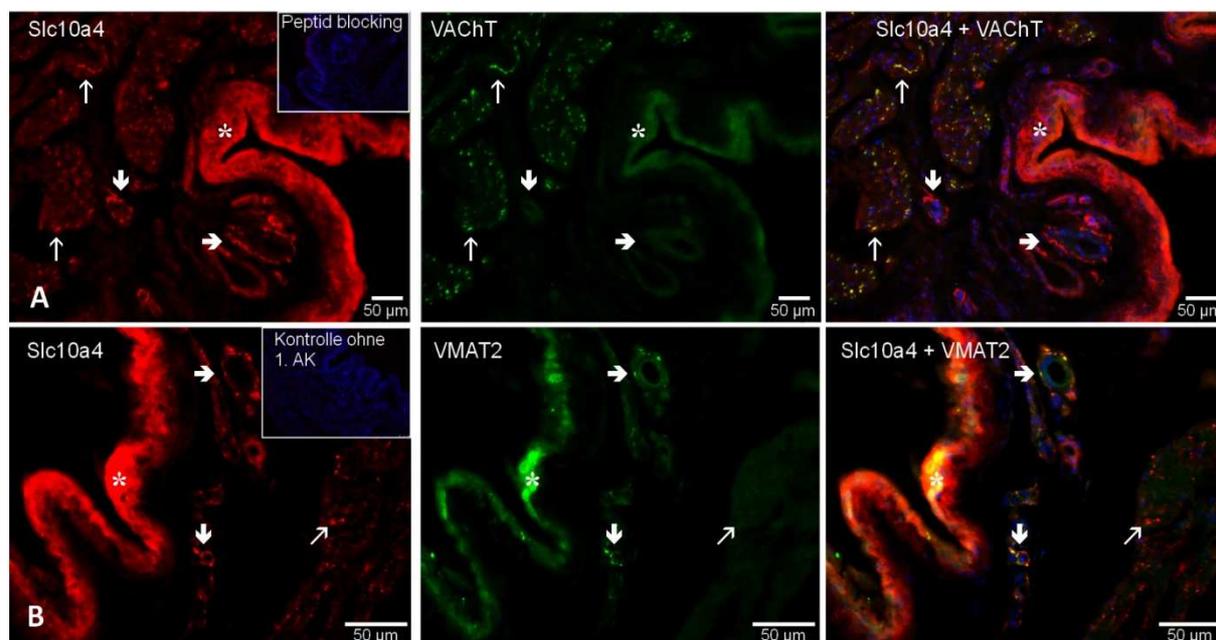


Abb. 4.7: Expression von Slc10a4 in der Harnblase der Ratte und seine Kolokalisation mit VACHT und VMAT2
 Immunfluoreszenzaufnahmen histologischer Schnitte einer Harnblase mit Doppelmarkierungen mit Antikörpern gegen Slc10a4, VACHT und VMAT2 jeweils in einer Verdünnung von 1:1000. Die Detektion erfolgte mit einem Cy3-konjugierten Esel-anti-Kaninchen Antikörper für Slc10a4 (in rot dargestellt) bzw. mit einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Esel-anti-Ziege Antikörper für VACHT und VMAT2 (in grün dargestellt), jeweils in einer Konzentration von 1:800. Die Kernfärbung wurde mit DAPI/PBS (1:1000) durchgeführt (in blau dargestellt). Slc10a4 kolokalisiert mit VACHT in den parasympathischen Innervationen der glatten Muskulatur der Blasenwand (A, Pfeile). Darüber hinaus zeigt sich auch eine starke Koexpression mit VMAT2 (B), vor allem im Urothel (Sternchen) und in den sympathischen Nervenfasern, welche die subepithelialen Blutgefäße innervieren (breite Pfeile).

Die Expression von Slc10a4, VACHT und VMAT2 in der Harnblase der Ratte wurde durch eine RT-PCR verifiziert. Dazu wurde aus der Gesamtblase, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und als Template in einer PCR eingesetzt. Als Positivkontrolle diente cDNA aus dem Gehirn der Ratte. GAPDH wurde als Kontrolle mitgeführt. Slc10a4-, VACHT- und VMAT2-Amplifikate konnten eindeutig sowohl im Gehirn (Positivkontrolle) als auch in der Harnblase in der erwarteten Größe nachgewiesen werden.

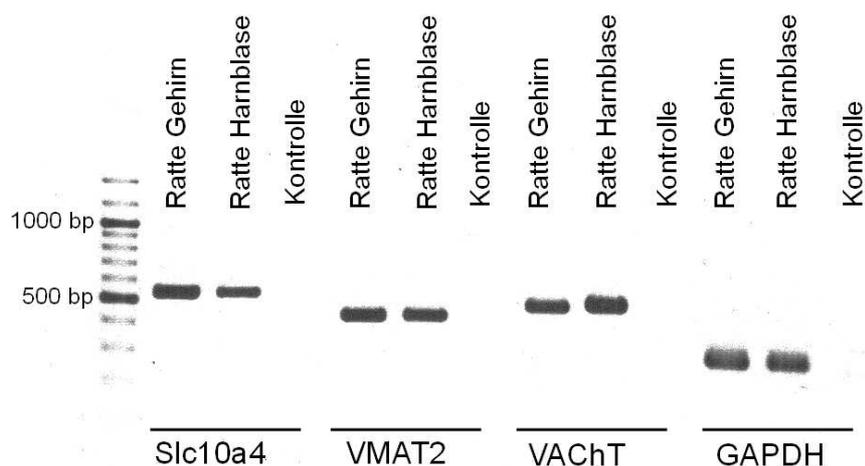


Abb. 4.8: Untersuchung der Expression von Slc10a4, VMAT2 und VACHT in der Harnblase der Ratte mittels RT-PCR

Die RNA wurde durch Extraktion mit TriReagent aus der Gesamtblase gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Die RT-PCR erfolgte mit genspezifischen Primern für Slc10a4, VMAT2 und VACHT wobei GAPDH als Kontrolle diente. Als Negativkontrolle wurde ddH₂O statt cDNA in der PCR eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromidfärbung visualisiert.

Zusätzlich zur Untersuchung der Expression von Slc10a4 im non-neuronalen Acetylcholinssystem der Harnblase, wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lips aus dem Labor für Experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen eine immunhistologische Untersuchung mit dem Slc10a4-Antiserum an humanem Lungengewebe durchgeführt (Abb. 4.9 A, B). Es zeigt sich, vergleichbar mit dem Verteilungsmuster von Slc10a4 in der Blase, ein starkes Fluoreszenzsignal im Bronchialepithel (Sternchen) sowie in den subepithelialen Nervenfasern (Pfeilkopf). Außerdem ist in dem Anschnitt eines parasympathischen Ganglions eine deutliche Immunreaktivität für Slc10a4 zu erkennen (Pfeil). Diese Erkenntnisse aus der Immunhistologie wurden anhand einer RT-PCR validiert. Dazu wurde aus humanem Bronchial- und Trachealepithel sowie einer bronchoalveolären Lavage (BAL) RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und in der PCR als template eingesetzt. Nach Auftrennung der PCR-Produkte in einem Agarosegel und Färbung mit Ethidiumbromid wurde in allen Proben eine spezifische Bande für SLC10A4 sichtbar. In der Negativkontrolle wurde die cDNA durch ddH₂O ersetzt (Abb. 4.9 C).

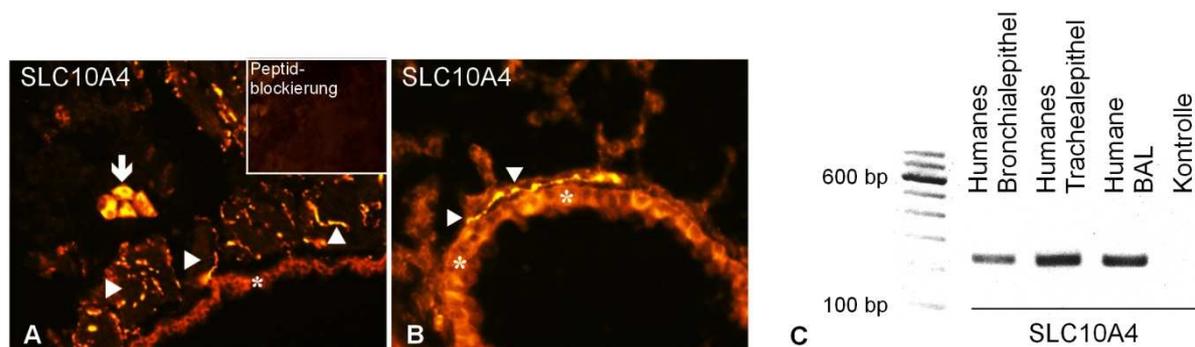


Abb. 4.9: Expression von SLC10A4 in humanem Lungengewebe

(A, B) Immunhistologie mit dem Slc10a4-Antiserum an humanem Lungengewebe. Slc10a4 ist im Bronchialepithel (Sternchen), den subepithelialen Nervenfasern (Pfeilköpfe) und in Neuronen des angeschnittenen parasympathischen Ganglions (Pfeil) lokalisiert. Die Spezifität des Antikörpers wurde durch eine Präinkubation mit dem Immunisierungspeptid überprüft (Inset).

(C) Die Expression von SLC10A4 in humanem Lungengewebe wurde anhand einer RT-PCR auch auf RNA-Ebene überprüft. Dazu wurde aus Bronchial- und Trachealepithel sowie einer bronchoalveolären Lavage (BAL) RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und diese als template in der PCR eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und die Banden mit Ethidiumbromid angefärbt. In jeder Probe zeigt sich eine spezifische Bande für SLC10A4 in der erwarteten Größe.

(In Kooperation mit Prof. Dr. Lips, Labor für experimentelle Unfallchirurgie, Justus-Liebig-Universität Gießen)

4.6 Lokalisation des Slc10a4 in sekretorischen Vesikeln von Mastzellen

Mastzellen spielen eine zentrale Rolle in der Immunabwehr. Sie sind Effektorzellen der IgE-vermittelten allergischen Sofortreaktion und von Entzündungsreaktionen. Aus ihren großen sekretorischen Vesikeln werden dabei vor allem Monoamine wie Histamin und Serotonin, aber auch spezifische Proteasen, Proteoglykane, Zytokine und Chemokine freigesetzt. Darüber hinaus sind Mastzellen Teil des non-neuronalen Acetylcholinsystems und exprimieren die Cholin-Acetyl-Transferase ebenso wie nikotinerge und muskarinerge Acetylcholinrezeptoren (Sudheer et al., 2006; Gwilt et al., 2007). Daraus ergab sich die Fragestellung, ob Slc10a4 auch in Mastzellen exprimiert ist. Um dies zu klären, wurden zunächst peritoneale Mastzellen aus der Ratte isoliert und über einen Percoll-Dichtegradienten aufgereinigt (siehe Kapitel 3.6). Die aufgereinigten Mastzellen (Reinheit ~ 95 %), wurden in μ -slide Zellkammern (Ibidi, Martinsried) ausgesät und zum Absetzen ca. 3 h im Inkubator belassen. Anschließend wurden die Zellen fixiert und sowohl mit dem Slc10a4-Antikörper als auch mit dem VMAT2-Antikörper doppelmarkiert.

Slc10a4 ist in den sekretorischen Vesikeln der isolierten peritonealen Mastzellen der Ratte lokalisiert. Besonders starke Fluoreszenzsignale zeigen sich vor allem in submembranär gele-

genen Vesikeln (Abb. 4.10 A in rot). Auch VMAT2 ist in sekretorischen Granula von Mastzellen enthalten (Abb. 4.10 A in grün). Das Fluoreszenzmuster unterscheidet sich jedoch stark von dem submembranären Verteilungsmuster von Slc10a4. In der Überlagerung sieht man deutlich, dass nur wenige Vesikel beide Proteine enthalten (Abb. 4.10 A, Inset, Pfeile).

Dieses vesikuläre Expressionsmuster von Slc10a4 findet sich auch in transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen von Gewebemastzellen, hier im Augenmuskel aufgenommen. Das goldmarkierte Protein findet sich in einigen speziellen Granula der Mastzelle, allerdings sind nicht alle Vesikel gleichermaßen markiert (Abb. 4.10 B, Pfeile).

Um die Expression von Slc10a4 in peritonealen Mastzellen auch auf RNA-Ebene nachzuweisen, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Die aufkonzentrierten Mastzellen sowie der Überstand aus dem Percoll-Dichtegradienten, der die weißen Blutkörperchen und übrigen Mastzellen enthielt, wurden für die Total-RNA-Gewinnung verwendet (siehe Kapitel 3.2). Die cDNA wurde mithilfe des *Full Spectrum Complete Transcriptome RNA Amplification Kit* der Firma BioCat, Heidelberg hergestellt. In einem ersten PCR-Durchlauf wurde Slc10a4 mit spezifischen, die Exongrenzen 2 und 3 übergreifenden Primern (rP4-RT-F: 5'-ctg gtg ttg atg ccc ctc tg-3' und rP4-RT-R: 5'-cct ctc gct tgt gca gta tct c-3', 560 bp), amplifiziert. Zur Erhöhung der Sensitivität und Spezifität der Amplifikation von Slc10a4 wurde eine nested-PCR mit den Primern (rP4-RT-F2: 5'-gtt tcc ctg tgc tct ctg ctc g-3' und rP4-RT-R3: 5'-gac tgg aag aga gcg taa agc aac-3', 310 bp), die innerhalb des Sequenzbereiches des Primerpaares der ersten Amplifizierung liegen, angeschlossen (siehe Kapitel 3.3.4). Nach dem Auftrag der PCR-Produkte auf ein Agarosegel und Färbung mit Ethidiumbromid, konnten spezifische Banden in der erwarteten Größe sowohl in der Mastzellfraktion als auch im Überstand detektiert werden (Abb. 4.10 C).

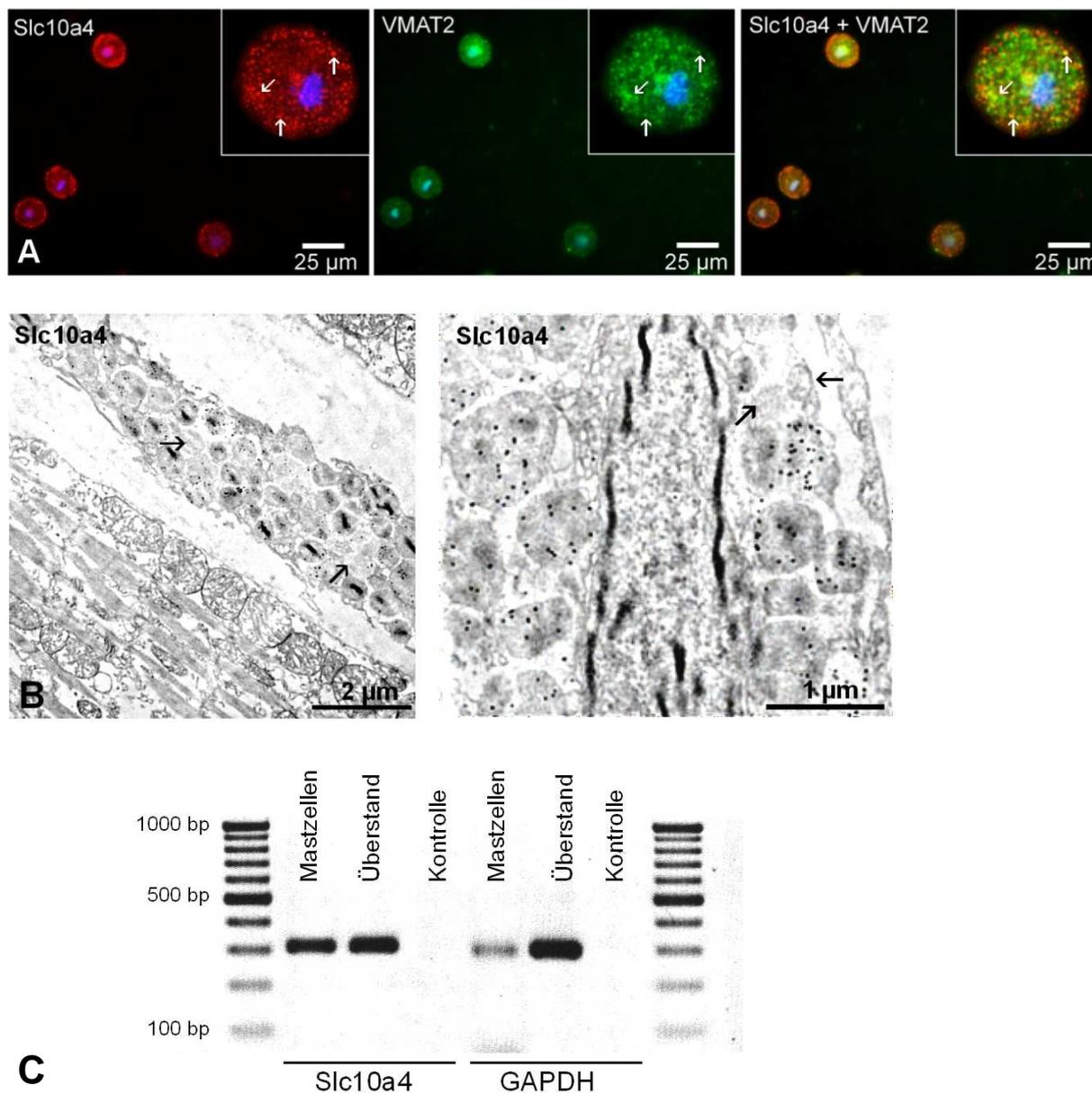


Abb. 4.10: Expression von Slc10a4 in Mastzellen der Ratte

(A) Peritoneale Mastzellen wurden, wie in Kapitel 3.6 beschrieben, aus der Ratte entnommen und über einen Percoll-Dichtegradienten bis zu einer Reinheit von ca. 95 % aufkonzentriert. Es folgte eine Doppelmarkierung der Mastzellen mit dem Slc10a4- und VMAT2-Antikörper (Verdünnung 1:500 bzw. 1:200) und anschließender Inkubation mit den entsprechenden Cy3- und AF 488-gekoppelten Sekundärantikörpern (jeweils 1:800). Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33258 (1:1000, in blau dargestellt). Die Fluoreszenzsignale für Slc10a4 (in rot dargestellt) lassen eine eindeutig vesikuläre Lokalisation des Proteins, mit einer Konzentration im submembranären Bereich der Mastzelle, erkennen. VMAT2 ist ebenfalls in sekretorischen Vesikeln der Mastzellen detektierbar. In der Überlagerung finden sich nur sehr wenige Vesikel, die beide Proteine beinhalten (Inset, Pfeile).

(B) Ultradünnschnitte eines Augenmuskels der Ratte wurden zunächst mit dem Slc10a4-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 inkubiert und dann mit einem goldgekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:50) markiert. In der Aufnahme mit dem Transmissionselektronenmikroskop ist eine zwischen die Muskelfasern des Augenmuskels eingelagerte Mastzelle gezeigt. In der Vergrößerung erkennt man die goldmarkierten Vesikel, die das Slc10a4-Protein enthalten. Jedoch sind nicht alle Vesikel gleichermaßen markiert, einige Granula enthalten kein Slc10a4 (Pfeile). (C) Für die Amplifizierung spezifischer PCR-Produkte für Slc10a4 wurde cDNA aus der Mastzellfraktion mit einer Reinheit von ca. 95 % und dem Überstand, der die weißen Blutkörperchen

und die restlichen 5 % Mastzellen enthielt, in der PCR eingesetzt. Um die Sensitivität und Spezifität der Amplifikation zu erhöhen wurde eine nested-PCR Strategie angewendet, bei der in einem zweiten PCR-Durchlauf Primer zum Einsatz kamen, welche innerhalb des Sequenzbereichs des ersten Primerpaares lagen. Als Matrize des zweiten PCR-Durchlaufs diente das PCR-Produkt der ersten Amplifikation. Die spezifischen PCR-Produkte für Slc10a4 in einer Größe von 310 bp konnten in den Mastzellen als auch im Überstand nachgewiesen werden. Als endogene Kontrolle diente GAPDH und als Negativkontrolle wurde ddH₂O statt cDNA in der PCR eingesetzt.

4.7 Transiente und stabile Transfektion von Slc10a4 in HEK293 Zellen

Für die spätere funktionelle Charakterisierung des Slc10a4-Proteins ist die Etablierung eines geeigneten *in vitro* Modelles unerlässlich. Dazu muss eine ausreichend hohe Überexpression des Proteins in der Zelle erreicht werden. Das Flp-In T-REx 293 Zellmodell (Invitrogen) eignet sich besonders für die geplanten Transportversuche, da durch die integrierte *FRT-site* das stabile Einbringen des Slc10a4-Gens in die Zelle sehr vereinfacht wird und die schnell wachsenden adhärennten Zellen das Protein in Folge dauerhaft überexprimieren (siehe Kapitel 3.5.1). Für die stabile Transfektion wurde das Ratten-Slc10a4-Konstrukt ohne *tag* gewählt.

4.7.1 Überprüfung der Spezifität des Slc10a4-Antikörpers mittels Immunfluoreszenz und Western Blot

Das Slc10a4-FLAG-Konstrukt wurde transient in die Zellen eingebracht und die Expression des Proteins in der Immunzytologie mit den Antikörpern sowohl gegen das C-terminale Epitop des Slc10a4 als auch gegen das FLAG-Epitop überprüft. Dadurch sollte die spezifische Bindung des Slc10a4-Antikörpers in diesem artifiziellen Zellsystem der HEK293 Zellen verifiziert werden. Die Spezifität des Slc10a4-Antikörpers in der Immunhistologie von Rattengewebe und im Western Blot wurde bereits in der Veröffentlichung von Geyer et al. 2008 hinreichend belegt.

Die Immunzytologie wurde, wie in Kapitel 3.7.1 beschrieben, an transient transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Der Antikörper, der gegen die Aminosäuren 422-437 des C-Terminus von Slc10a4 gerichtet ist, detektierte das FLAG-getagte Slc10a4-Protein (Abb. 4.10 A), ebenso wie der spezifisch gegen das FLAG-Epitop gerichtete Mausantikörper, mit dem die Zellen gleichzeitig inkubiert wurden (Abb. 4.10 B). In der Überlagerung ist zu erkennen, dass beide Antikörper das transient transfizierte Slc10a4-FLAG-Protein detektieren (Abb. 4.10 C).

Für die Western Blot Analyse wurde eine transiente Transfektion sowohl des Slc10a4- als auch des Slc10a4-FLAG-Konstruktes in MSR-Zellen durchgeführt und mit dem Slc10a4-Antikörper detektiert. Die transiente Transfektion der HEK293 Zellen erfolgte, wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben, für die Immunzytologie in 24-well Schalen auf Polylysin-beschichteten Deckgläschen und für Western Blot Analysen in 6-well Schalen. Die Versuche wurden jeweils 24 – 48 h nach der Transfektion durchgeführt

Für die Western Blot Versuche wurde 48 h nach der Transfektion eine Protein-Extraktion mit dem *ProteoJet Mammalian Cell Lysis Reagent* (MBI Fermentas), wie in 3.10.2 beschrieben, durchgeführt. Die extrahierten Proteine wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Slc10a4-Antikörper detektierte eine spezifische Bande bei 46 kDa, der berechneten Größe für das Slc10a4-Protein. Slc10a4-FLAG zeigte eine Bande bei 47 kDa, was dem berechneten Molekulargewicht plus 1 kDa (= FLAG-Tag) entspricht (Abb. 4.10 D). Als Negativkontrolle dienten MOCK-transfizierte Zellen, die kein Signal zeigten.

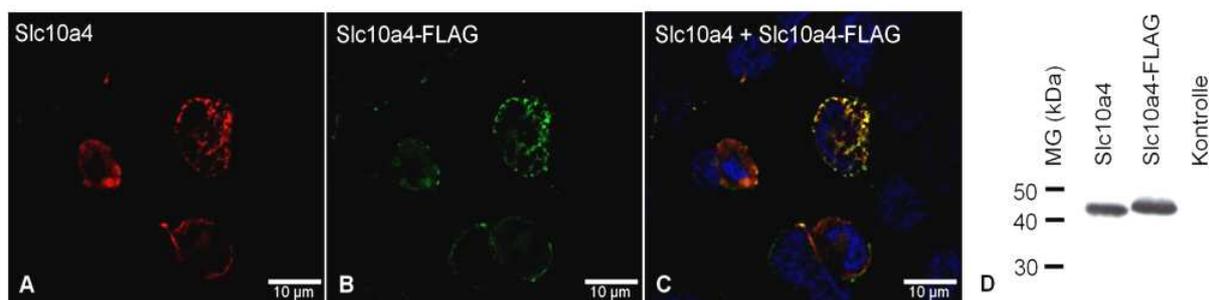


Abb. 4.11 Nachweis transient transfizierter Slc10a4 und Slc10a4-FLAG Proteine mittels Immunfluoreszenz und Western Blot

Das Slc10a4-FLAG-Konstrukt wurde transient in HEK293 Zellen transfiziert und 48 h kultiviert. In der Immunfluoreszenz wurden der spezifische Kaninchen Slc10a4-Antikörper (Verdünnung 1:1000), der gegen den C-Terminus des Proteins gerichtet ist, und ein monoklonaler Maus-anti-FLAG-Antikörper (1:40.000) eingesetzt, um das FLAG-getagte Protein zu detektieren. Für die Doppelmarkierung wurden als Sekundärantikörper ein Cy3-gekoppelter anti-Kaninchen (1: 800) und ein FITC-konjugierter anti-Maus Antikörper (1:200) verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI/Methanol (1:5000) angefärbt (in blau dargestellt).

(A) Der Slc10a4-Antikörper erkennt das transient in die HEK293 Zellen eingebrachte Slc10a4-FLAG-Protein. (B) Ebenso erhält man die gleichen Immunfluoreszenzsignale bei der Detektion mit dem spezifischen Maus-anti-FLAG Antikörper. (C) In der Überlagerung wird deutlich sichtbar, dass beide Antikörper die gleichen Strukturen innerhalb der Zelle erkennen. (D) Für die Western Blot Analyse wurden jeweils das Slc10a4- und das Slc10a4-FLAG-Konstrukt transient in HEK293 Zellen transfiziert. Die Proteine wurden mit dem *ProteoJet Mammalian Cell Lysis Reagent* (MBI Fermentas) extrahiert und über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit dem Slc10a4-Antikörper (1:1000) in einer Chemilumineszenzreaktion. Der Slc10a4-Antikörper detektiert das transient transfizierte Slc10a4-Protein in einer spezifischen Bande bei der errechneten Größe von 46 kDa. Außerdem erkennt der Antikörper auch das FLAG-getagte Slc10a4-Protein in einer Bande von 47 kDa, was einem zusätzlichen Molekulargewicht von 1 kDa für den FLAG-Tag entspricht. Als Kontrolle dienten mit Leer-Vektor transient transfizierte HEK293 Zellen.

4.7.2 Stabile Transfektion

Die stabile Transfektion des Ratten-Slc10a4 erfolgte wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben. Nach der Selektion der einzelnen Klone erfolgte die Überprüfung der Expression auf RNA-Ebene mittels qPCR sowie anhand von Western Blot und Immunfluoreszenz Analysen auf Proteinebene.

In der quantitativen real-time PCR wurde die cDNA von drei ausgewählten rSlc10a4-HEK293-Klonen eingesetzt, um die relative Expression im Vergleich zu nicht-transfizierten Flp-In TREx 293 Zellen zu ermitteln. Als endogene Kontrolle diente die GAPDH-Expression. Die Proben wurden in einer Dreifachbestimmung untersucht. Der Klon rSlc10a4-HEK293 1a1 zeigte die höchste relative Expression mit einer 1229-fachen Überexpression von Slc10a4 im Vergleich zu nicht-transfizierten Flp-In Zellen (Abb. 4.11 A). Dieser Klon wurde kultiviert, vermehrt und für alle weiteren Versuche verwendet. Im Western Blot konnte anschließend die Expression von Slc10a4 auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abb. 4.11 B). Die Proteine wurden mit dem *ProteoExtract® Native Membrane Protein Extraction Kit* (Calbiochem) extrahiert. Dabei konnten die membranassoziierten Proteine (E 2) von den löslichen Proteinen (E 1) getrennt werden. Jeweils 20 µg Protein eines jeden Proteinextraktes wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit dem Slc10a4-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 detektiert. Trotz des hohen Hintergrundes kann eine spezifische Bande für Slc10a4 in der E2 Fraktion, in der die Membranproteine konzentriert sind, bei 46 kDa gezeigt werden (Abb. 4.11 B). Die Immunfluoreszenz mit den rSlc10a4-HEK293 Zellen wurde, wie in Kapitel 3.7.1 beschrieben, durchgeführt. Hier erkennt man ein vesikuläres Verteilungsmuster von Slc10a4 innerhalb der Zelle. Das Protein befindet sich in intrazellulären Kompartimenten im Zellkörper und in langen Zellausläufern der rSlc10a4-HEK293 Zelle (Abb. 4.11 C).

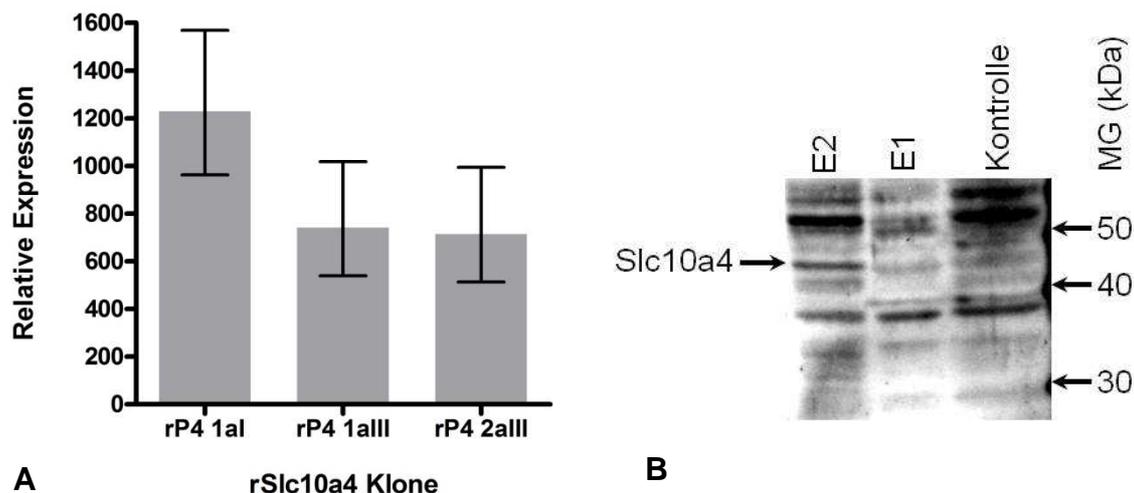
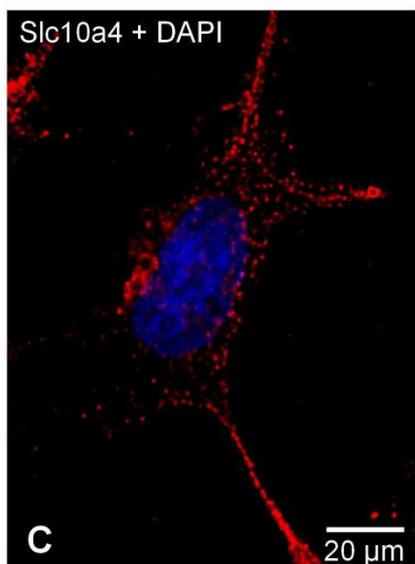


Abb. 4.12: Überprüfung der stabilen Transfektion von Slc10a4 in HEK293 Zellen auf RNA- und Proteinebene

(A) Mittels quantitativer real-time PCR wurde die Expression von Slc10a4 im Vergleich zu nicht-transfizierten Flp-In TRex 293 Zellen gemessen und nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ausgewertet. Der Klon (rP4 1al), der die höchste Überexpression von Slc10a4 zeigt, wurde zur weiteren Kultivierung ausgewählt.

(B) Die Expression des Proteins auf Proteinebene wurde anhand einer Western Blot Analyse untersucht. Die Proteine wurden mithilfe des *ProteoExtract® Native Membrane Protein Extraction Kit* (Calbiochem) extrahiert, wobei die membranständigen Proteine (E2) von den löslichen Proteinen (E1) getrennt und in einer eigenen Fraktion aufkonzentriert wurden. Im Western Blot zeigt sich nach der Inkubation mit dem Slc10a4-Antikörper (1:1000) eine spezifische Bande bei 46 kDa für Slc10a4 in der Membranfraktion E2. Als Negativkontrolle diente die E2 Fraktion nicht transfizierter Flp-In TRex 293 Zellen.

(C) In der Immunfluoreszenz zeigt das Protein in den rSlc10a4-HEK293 Zellen ein vesikuläres Verteilungsmuster sowohl im Zellkörper als auch in langen Zellausläufern.



4.8 Native Expression von Slc10a4 in neuronalen Zelllinien

Als Alternative zur stabilen Transfektion von Slc10a4 in HEK293 Zellen, die ein sehr artifizielles Expressionssystem darstellen, wurde das Vorkommen und die Lokalisation von Slc10a4 in neuronalen Zelllinien untersucht. Diese Zellen bieten dem Slc10a4-Protein eine Umgebung, welche auch sonst durch seine neuronale Expression vorhanden ist, so zum Beispiel synaptische Vesikel mit den entsprechenden Neurotransmittern, vesikuläre Transportproteine, Enzyme zur Herstellung der Neurotransmitter, Neuropeptide und andere Co-Faktoren, welche eventuell für die Funktion des Proteins von Bedeutung sind. All dies kann die Translation,

das Sorting und eventuell auch die Funktion von Slc10a4 beeinflussen. Daher war es zunächst wichtig herauszufinden, ob und in welchem Ausmaß Slc10a4 natürlicherweise in etablierten neuronalen Zelllinien exprimiert wird.

4.8.1 Die Phäochromozytomzelllinie der Ratte PC12

PC12 Zellen sind kleine, runde, oft in Klumpen wachsende Zellen, die unter dem Einfluss von *Nerve Growth Factor* (NGF) neuritenartige, lange Zellausläufer bilden. Sie erlangen unter der Differenzierung die Eigenschaften sympathischer Neurone und eine neuronale Morphologie (Fujita et al. 1989).

Zunächst wurde die Expression von Slc10a4 und anderen neuronalen Markern wie VMAT1 und VACHT auf RNA Ebene anhand einer RT-PCR untersucht. Als Positivkontrolle für Slc10a4 und VACHT diente cDNA aus dem Rattengehirn und als endogene Kontrolle wurde GAPDH verwendet. Die Amplifikation erfolgte mit spezifischen Primerpaaren für Slc10a4, VMAT1 und VACHT. Als Matrize wurde cDNA verwendet, die aus undifferenzierten PC12 Zellen gewonnen wurde (siehe Kapitel 3.2.2). Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und mit Ethidiumbromid gefärbt. Alle Zielgene zeigten eine spezifische Bande in der erwarteten Größe (Abb. 4.12 A), d. h. sie werden in den PC12 Zellen natürlicherweise exprimiert.

Um den Einfluss der Differenzierung von PC12 auf die Expression von Slc10a4 zu untersuchen, wurde zunächst eine quantitative real-time PCR durchgeführt. PC12 Zellen wurden ausgesät und für 4 Tage mit *nerve growth factor* (NGF) behandelt oder unbehandelt gelassen. Nach Ablauf dieser Zeit, in der die Zellen funktionell und morphologisch differenzierten, wurden jeweils 5×10^4 differenzierte und nicht-differenzierte Zellen ausgezählt und cDNA mithilfe des *TaqMan Gene Expression Cells-to-CT-Kit* (Ambion) isoliert (siehe 3.2.5). Diese diente als Matrize für die Untersuchung des Expressionslevels von Slc10a4 in den beiden unterschiedlich behandelten PC12 Zellpopulationen in der real-time PCR. Als Grundlage der Auswertung dienten die ΔC_T -Werte, da in diesem Versuch nicht die relative Expression gegenüber einer Vergleichsgröße berechnet, sondern nur ein Vergleich zwischen zwei Werten (differenziert und undifferenziert) angestrebt wurde. Allerdings zeigte sich kein Unterschied im Expressionslevel von Slc10a4 im Vergleich zwischen differenzierten und undifferenzierten

PC12 Zellen (Abb. 4.12 B). Auch die Berechnung der statistischen Signifikanz mittels t-Test ergab, dass die Differenzierung der PC12 Zellen mit NGF keinen signifikanten Unterschied in der Expression von Slc10a4 verursachte ($p = 0,87$). Die Untersuchung der Proteinexpression erfolgte in einer Immunfluoreszenz mit undifferenzierten im Vergleich zu differenzierten PC12 Zellen. Unter Einfluss von NGF verändern die Zellen ihre Morphologie sehr stark. Sie stellen das Zellwachstum ein und bilden lange, neuritenartige Zellausläufer. Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen sowohl mit dem Slc10a4-Antikörper (Anti-Slc10a4, Verdünnung 1:1000) als auch zusätzlich mit einem kommerziellen Antikörper, der gegen eine N-terminale Domäne des humanen SLC10A4 (Anti-hSLC10A4) gerichtet ist, in einer Verdünnung von 1:1000 über Nacht inkubiert. Dann folgte die Inkubation mit dem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (1:800). Beide Antikörper, Anti-Slc10a4 und Anti-hSLC10A4 zeigen das gleiche Expressionsmuster des Proteins. Es ist also davon auszugehen, dass beide Antikörper, die gegen die unterschiedlichen Domänen des Proteins gerichtet sind, spezifisch an das Protein binden. Man erkennt ein klares vesikuläres Verteilungsmuster von Slc10a4, sowohl in den Zellkörpern der undifferenzierten Zellen als auch in den langen Zellausläufern. Die Differenzierung der PC12 Zellen mit NGF hatte keine morphologisch sichtbaren Auswirkungen auf die Expression von Slc10a4 in behandelten und nicht-behandelten PC12 Zellen (Abb. 4.12 C).

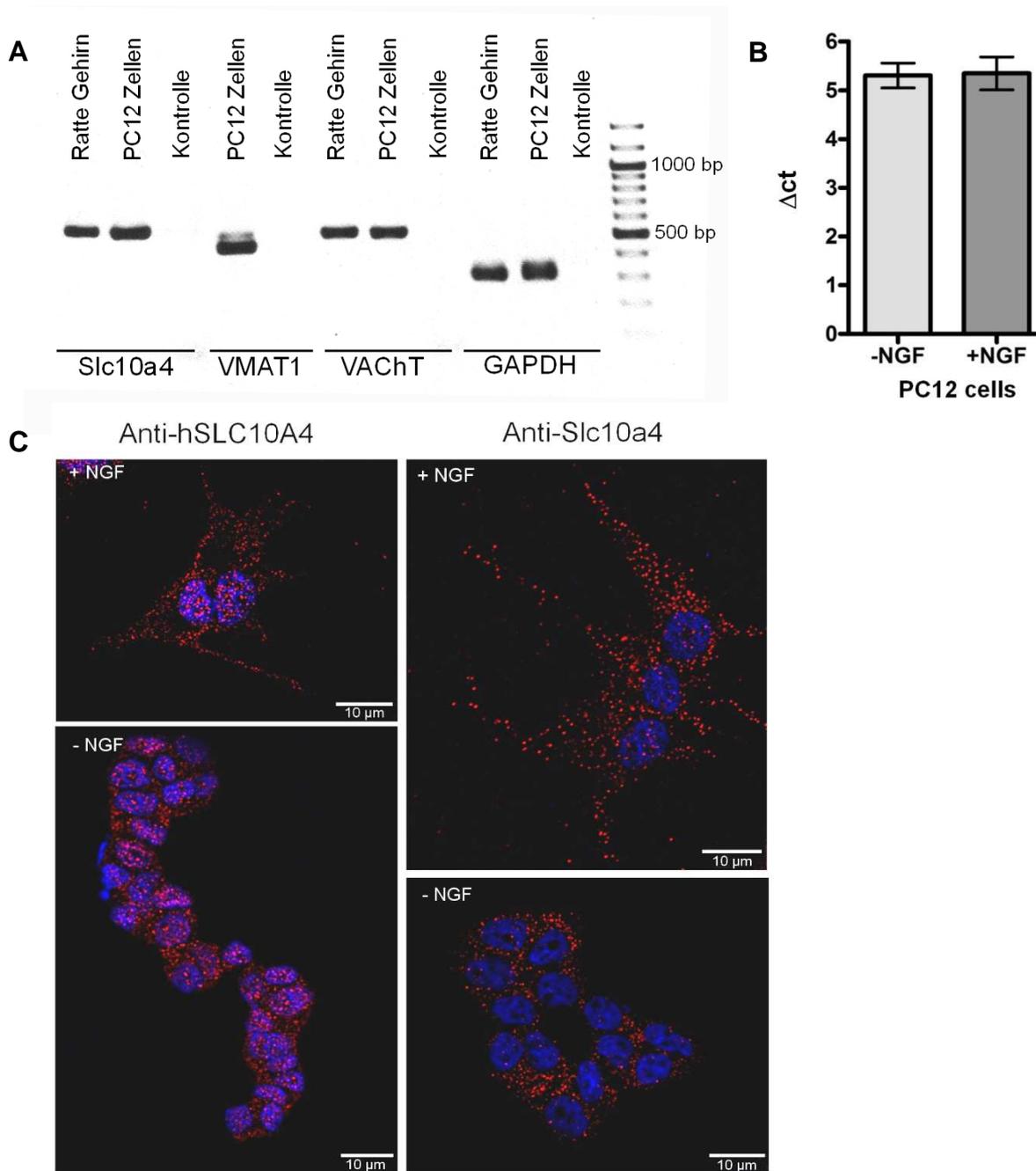


Abb. 4.13: Native Expression von Slc10a4 in differenzierten und nicht-differenzierten PC12 Zellen

(A) Eine Analyse der RNA-Expression in undifferenzierten PC12 Zellen erfolgte mit genspezifischen Primern für Slc10a4, VMAT1, VAcHT und GAPDH als endogene Kontrolle. Nach Auftrennung auf einem Agarosegel zeigte sich für Slc10a4 und die beiden neuronalen Marker sowie GAPDH eine deutliche Bande in der erwarteten Größe. Als vergleichende Positivkontrolle diente für Slc10a4 und VAcHT cDNA aus dem Rattengehirn. (B) Mittels real-time PCR wurde untersucht, ob die Differenzierung der PC12 Zellen mit dem *Nerve Growth Factor* NGF einen Einfluss auf die RNA-Expression von Slc10a4 hat. Wie an der Auswertung der Δct -Werte zu erkennen ist, zeigen sowohl differenzierte als auch undifferenzierte PC12 ein nahezu identisches Expressionslevel für Slc10a4. Nach Berechnung mittels t-Test konnte keine Signifikanz für die Expression von Slc10a4 unter Einfluss von NGF ermittelt werden ($p > 0,05$). (C) Die native Proteinexpression von Slc10a4 in NGF-behandelten und unbehandelten PC12 Zellen wurde in der Immunfluoreszenz mit zwei verschiedenen Antikörpern untersucht. Die Zellen wurden sowohl mit dem Slc10a4-Antikörper, der gegen den C-Terminus des Rattenproteins gerichtet ist, als auch mit einem kommerziellen anti-hSLC10A4, der eine Domäne im N-Terminus des humanen SLC10A4-Proteins erkennt, jeweils in einer Verdünnung von 1:1000 inkubiert. Beide Antikörper erkennen das identische vesikuläre Verteilungsmuster des Proteins in den Zellen. Ein Einfluss der Differenzierung der PC12 auf die Proteinexpression von Slc10a4 ist morphologisch nicht zu erkennen. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI/Methanol (1:5000) und ist in blau dargestellt.

4.8.2 Die humane Neuroblastom Zelllinie SH-SY5Y

Die SH-SY5Y Zelllinie ist der dritte Subklon der SK-N-SH Linie, die im Jahr 1970 aus einer Knochenmetastase eines Neuroblastoms eines 4-jährigen Mädchens gewonnen wurde (Biedler et al. 1973). Die undifferenzierten Zellen sind rund-oval, gelegentlich mit kurzen Zellausläufern und enthalten entsprechend ihrem neuronal-sympathischen Ursprungs Dopamin- β -Hydroxylase, Glutamat-Decarboxylase und Cholin-Acetyl-Transferase (Ross et al. 1983). Unter dem Einfluss von *all-trans* Retinsäure (RA) und weiterer neurotroper Wachstumsfaktoren, wie TGF- β 1 oder BMP-2, stellen diese Zellen die Proliferation ein, bilden lange neuritenartige Zellausläufer und differenzieren funktionell und morphologisch in neuronale Zellen. Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von SLC10A4 in differenzierten und undifferenzierten SH-SY5Y Zellen wurden in der Immunzytologie sowohl der C-terminale Slc10a4-Antikörper als auch der gegen den N-Terminus des humanen SLC10A4 gerichtete anti-hSLC10A4-Antikörper, jeweils in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Bereits in den undifferenzierten Zellen zeigt das Protein ein vesikuläres Verteilungsmuster in den Zellkörpern und den kurzen Ausläufern. Die Differenzierung mit Retinsäure (RA) und den Wachstumsfaktoren TGF- β 1 bzw. BMP-2 führte zu einer neuronalen Morphologie der Zellen, hatte aber keinen sichtbaren Einfluss auf das vesikuläre Expressionsmuster von SLC10A4 (Abb. 4.13 A). Um die Spezifität des Slc10a4-Antikörpers, der gegen den C-Terminus des Rattenproteins gerichtet ist, in den humanen SH-SY5Y Zellen zu überprüfen, wurde eine Blockierung des Antikörpers mit dem Immunisierungspeptid, wie in Kapitel 3.7.2 beschrieben, durchgeführt.

Weiterhin wurde eine Analyse der mRNA Expression von SLC10A4 in differenzierten und undifferenzierten Zellen durchgeführt, um den Einfluss der Wachstumsfaktoren auf SLC10A4 im Vergleich zu catecholaminergen (VMAT2, TH, NPY) und cholinergen (VACHT, ChAT, VIP) Markern in SH-SY5Y Zellen zu untersuchen. In der real-time PCR, mit der die relative Expression der verschiedenen Zielgene gemessen wurde, kam die cDNA aus differenzierten und unbehandelten SH-SY5Y Zellen zum Einsatz (siehe 3.2.1 und 3.2.5). Als endogene Kontrolle diente GAPDH und als Kalibrator wurde die Expression von TH in undifferenzierten SH-SY5Y Zellen herangezogen, die den niedrigsten Wert aller Zielgene aufwies. Darüber hinaus ist kein eindeutiger Einfluss der neurotrophen Wachstumsfaktoren auf die relative Expression der catecholaminergen und cholinergen Marker sowie SLC10A4 zu erkennen (Abb. 4.13 B).

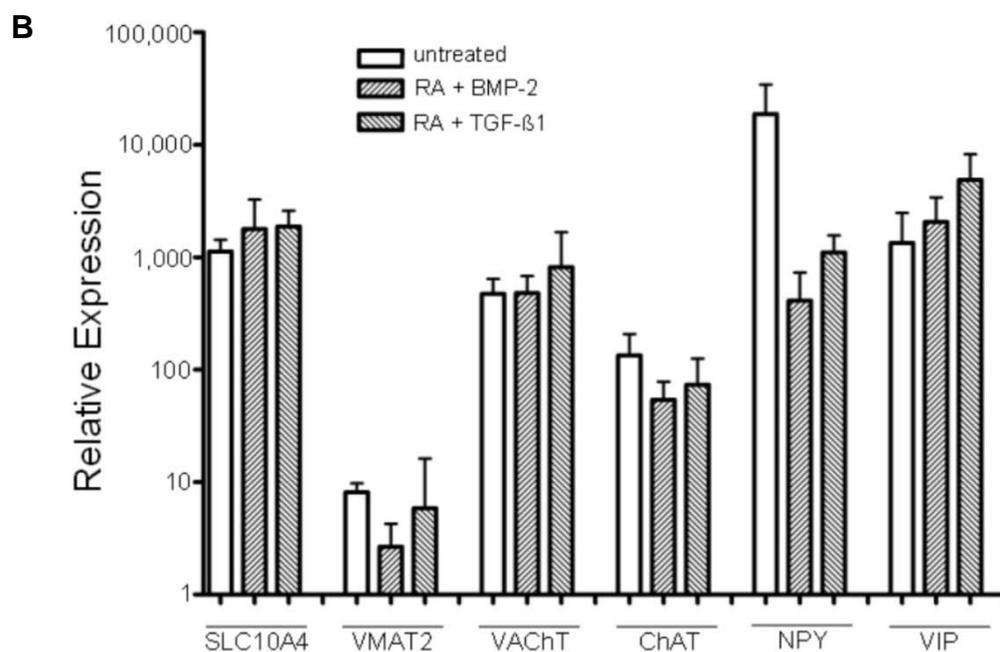
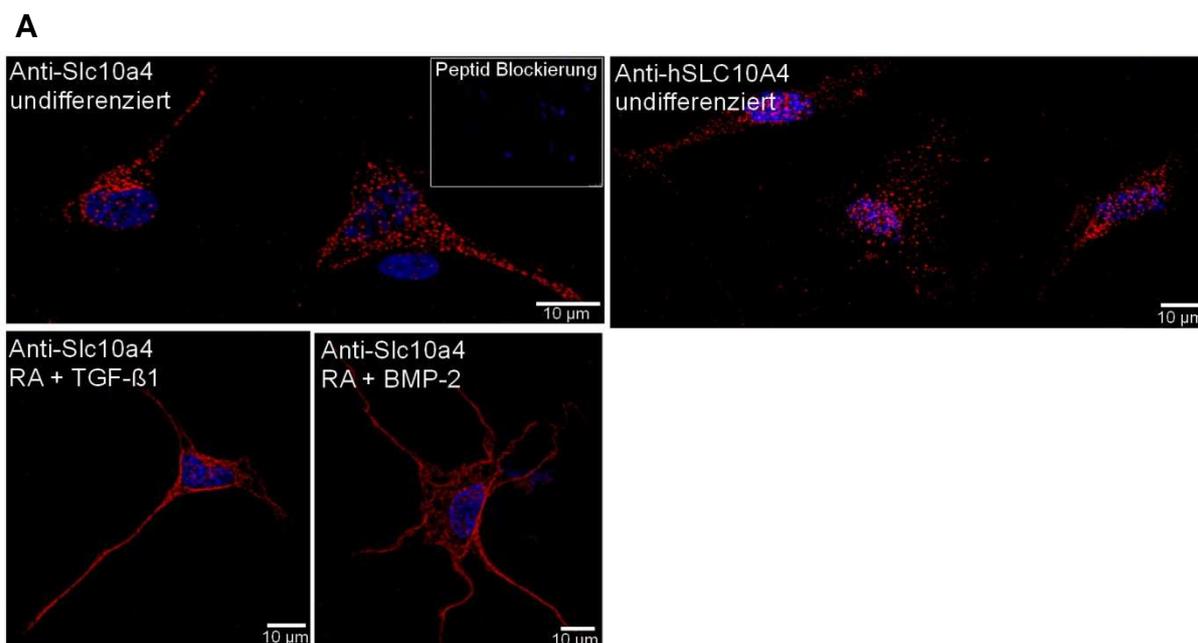


Abb. 4.14: Native Expression von SLC10A4 in differenzierten und undifferenzierten SH-SY5Y Zellen

(A) Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von SLC10A4 in SH-SY5Y Zellen, wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät und für 5 Tage mit Retinsäure (RA) plus den neurotrophen Wachstumsfaktoren TGF-β1 bzw. BMP-2 behandelt. Die undifferenzierten Zellen verblieben in Medium ohne Zusätze. In der Immunfluoreszenz kamen sowohl der Anti-Slc10a4 Antikörper als auch der humane anti-hSLC10A4-Antikörper zum Einsatz (Verdünnung jeweils 1:1000). Beide Antikörper zeigen ein vesikuläres Verteilungsmuster des Proteins in den Zellen. Die Differenzierung führte zwar zu einer deutlichen Veränderung der Morphologie der SH-SY5Y Zellen, hatte aber keinen sichtbaren Einfluss auf die Expression von SLC10A4, welches auch hier vesikulär lokalisiert ist. Die Zellkerne wurden mit DAPI/Methanol in einer Verdünnung von 1:5000 gefärbt (in blau dargestellt).

(B) In der real-time PCR wurde ebenfalls der Einfluss der Differenzierungsreagenzien auf die Expression von SLC10A4 und weiteren catecholaminergen (VMAT2, TH und NPY) sowie cholinergen (VAcH, ChAT und VIP) Markern untersucht. Ein Einfluss der Wachstumsfaktoren auf die Expressionslevel der catecholaminergen und cholinergen Marker ist nicht eindeutig erkennbar. Auch für SLC10A4 ist keine wesentliche Veränderung des Expressionslevels unter der Behandlung mit Differenzierungsreagenzien sichtbar.

5. DISKUSSION

5.1 Slc10a4 – mehr als ein cholinerges Markerprotein

Die Charakterisierung neu entdeckter Proteine ist ein spannender und abwechslungsreicher Prozess. Zu Beginn stehen die bioinformatischen Erkenntnisse aus BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)- und Stammbaumanalysen, die Aufschluss über Sequenzstruktur und Verwandtschaftsbeziehungen zu ähnlichen Proteinen geben. Nach der Klonierung und der Untersuchung des Expressionsprofils in den Geweben unterschiedlicher Spezies gewinnt man bereits einen ersten Eindruck über die biologische Relevanz. Aufgrund dieser ersten Ergebnisse werden dann Arbeitshypothesen entwickelt, die anhand verschiedenster Methoden evaluiert werden, um schließlich die physiologische Funktion eines neu entdeckten Proteins zu ergründen.

Nach diesem Schema wurde auch bei der Charakterisierung des SLC10A4/Slc10a4 vorgegangen. Das Expressionsprofil dieses Proteins zeigte die höchste Expression im Gehirn verschiedener Spezies. Weitere Untersuchungen anhand des spezifischen Slc10a4-Antiserums und Doppelmarkierungen mit verschiedenen neuronalen Marken ergaben eine überwiegende Lokalisation des Proteins in cholinergen Gehirnregionen (Geyer et al. 2008). Doch bereits im Rahmen einer Dissertation, die zu diesem Thema am Institut für Pharmakologie und Toxikologie angefertigt wurde, konnte ebenfalls das Vorkommen von Slc10a4 in der *Substantia nigra* und dem ventralen Tegmentum, beides dopaminerge Regionen, nachgewiesen werden. Hier konnte in Doppelmarkierungen eine Kolo­kalisierung in den Zellkörpern der *Substantia nigra* sowohl mit ChAT als auch mit Tyrosin Hydroxylase (TH) nachgewiesen werden (Fernandes 2007). Um einen genaueren Eindruck über die Verteilung des SLC10A4/Slc10a4-Proteins im zentralen Nervensystem zu erhalten, wurde daher zunächst die relative Expression im Vergleich zu dem cholinergen Marker VAcHT und dem dopaminergen Marker TH ermittelt. Dazu wurde in der quantitativen real-time PCR cDNA aus elf verschiedenen humanen Gehirnregionen eingesetzt und die relative Expression dieser drei Zielgene anhand der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode errechnet. Entgegen der Erwartungen aus den Ergebnissen der Immunfluoreszenz, zeigt der humane SLC10A4 nicht das gleiche Expressionsmuster wie VAcHT, sondern vielmehr eine ähnliche Verteilung wie TH mit den höchsten Expressionsleveln in dopaminergen Gehirnregionen wie der *Substantia nigra* und striatalen Projektionsgebieten wie

Putamen und *Nucleus accumbens* (Abb. 4.1). Die *in-situ* Hybridisierungsdaten aus dem *Allen Brain Atlas*, eine interaktive Bilddatenbank die ca. 20.000 Genexpressionsmuster beinhaltet, bestätigen sowohl die Expression des *Slc10a4* der Maus in cholinergen Gehirnregionen, zeigen aber auch eine starke Expression von *Slc10a4* in der *Substantia nigra* und dem ventralen Tegmentum (Lein et al. 2007; www.mouse.brain-map.org). Desweiteren zeigten Jørgensen und Mitarbeiter in einer Untersuchung von humanem embryonalem Hirngewebe eine signifikante Hochregulation von SLC10A4 in dopaminergen Neuronen des ventralen Mesenzephalons (Jørgensen et al. 2006). Neben anderen, bereits bekannten Markern für dopaminerge Neurone wie TH, VMAT2 oder DAT könnte SLC10A4 somit ein weiteres Markerprotein für dopaminerge Vorläuferneurone sein (Jørgensen et al. 2006). Diese klare mRNA Expression des *Slc10a4* in dopaminergen Neuronen konnte auch auf Proteinebene anhand einer immunhistologischen Untersuchung der *Substantia nigra* und des ventralen Tegmentum der Ratte nachgewiesen werden. In der Doppelmarkierung von *Slc10a4* und TH bzw. VMAT2 überlagern die Proteine eindeutig sowohl in dopaminergen Zellkörpern als auch in den umgebenden Nervenfasern bzw. Projektionen der *Substantia nigra* (Abb. 4.2 D, E). Des Weiteren sind Sonden für SLC10A4/*Slc10a4* auf den Affymetrix Arrays *Human Genome Gene Chip* HG-U133 und *Gene Chip Rat Genome 230 2.0* enthalten. Unter Nutzung dieser Microarrays wurden in der Vergangenheit bereits Expressionsprofile von SLC10A4/*Slc10a4* für verschiedene Organe, Zelltypen und Erkrankungen generiert, welche über die interaktive Plattform *NextBio* zugänglich sind. Eine Überprüfung der vorhandenen Daten der genannten Microarrays in der *NextBio* Datenbank ergab ebenfalls, dass SLC10A4/*Slc10a4* sehr stark in dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra* und des ventralen Tegmentum exprimiert wird, was die Ergebnisse aus der Immunhistologie unterstützt. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass die Expression von SLC10A4/*Slc10a4* bei Läsionen der dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra*, wie sie bei der Parkinson Erkrankung des Menschen aber auch in Maus-Modellen für die Parkinson Erkrankung vorkommen, drastisch herunter reguliert wird (Brochier et al. 2007; Zhou et al. 2009; www.nextbio.com).

Diese überraschenden Erkenntnisse über die Expression von SLC10A4/*Slc10a4* außerhalb des CholinSystems waren ausschlaggebend für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Koexpressionsstudien. Die Lokalisation von *Slc10a4* der Ratte im zentralen und peripheren Nervensystem wurde mit der Verteilung der dopaminergen Markern TH bzw. VMAT2 und der bekannten Kolo-kalisation mit VACHT verglichen. Neben der bekannten Expression des

Slc10a4-Proteins in cholinergen Gehirnregionen (Geyer et al. 2008) finden sich im Ventralhorn des Rückenmarks starke Fluoreszenzsignale für Slc10a4 und VAcHT, die in den großen Synapsen an den Motoneuronen deutlich kolokalisieren (Abb. 4.2 A). Darüber hinaus ist Slc10a4 im Ventralhorn des Rückenmarks ebenfalls mit VMAT2 koexprimiert. Hier zeigt sich allerdings eine eher axonale Anfärbung beider Proteine in der Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 4.2 B).

5.2 Die Kolokalisation von Slc10a4 mit VAcHT und VMAT2 im peripheren Nervensystem

Das im Gehirn und Rückenmark beobachtete Phänomen, dass Slc10a4 sowohl mit VAcHT, aber auch mit VMAT2 kolokalisiert ist, wurde auch in verschiedenen Organen der Peripherie nachgewiesen. Dazu wurden immunhistologische Doppelmarkierungen mit den Antikörpern gegen VAcHT, VMAT2 und Slc10a4 durchgeführt. Zunächst wurde dabei die Kolokalisation dieser drei Proteine in der Retina betrachtet, die durch ihren Ursprung in einer Ausstülpung des embryonalen Vorderhirns Teil des zentralen Nervensystems ist. Die Retina kleidet die Rückwand des Augapfels aus und besteht beim Menschen aus ca. 120 Millionen Nervenzellen. Eintreffende Lichtreize werden von den Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen) in elektrische Signale umgewandelt und über die Synapsen in der äußeren plexiformen Schicht durch die Ausschüttung von Glutamat auf die Bipolar- und Horizontalzellen übertragen. Die Menge an freigesetztem Glutamat hängt von der Lichtintensität ab und die Photorezeptoren passen die Freisetzungsrates des Neurotransmitters den sich ändernden Lichtverhältnissen an (Wässle und Brandstätter 2003).

Die Bipolarzellen reagieren, je nach exprimiertem Rezeptor, unterschiedlich auf das freigesetzte Glutamat. Bipolarzellen, welche ionotrope Glutamatrezeptoren besitzen, depolarisieren, während solche die metabotrope Rezeptoren aufweisen, hyperpolarisieren. Sie werden dementsprechend in ON- und OFF-Subtypen unterschieden, die entweder exzitatorisch oder inhibitorisch wirken (Ghosh et al. 2004). Die verarbeiteten elektrischen Signale werden vertikal über die Synapsen der inneren plexiformen Schicht (IPL) an Amakrin- und Ganglienzellen weitergegeben (Masland 2001). Alle Ganglienzellen erhalten Signale von Bipolarzellen, doch direkte synaptische Verbindungen sind selten. Amakrinzellen modulieren zuvor die Informa-

tionen der Bipolarzellen und kontrollieren die Reaktion der Ganglienzellen. Es existieren 29 verschiedene Typen von Amakrinzellen, die durch die Ausschüttung verschiedener Neurotransmitter und durch den Kontakt zu den unterschiedlichen prä- und postsynaptischen Partnern den Informationsfluss modulieren. Dabei übernehmen die verschiedenen Subtypen spezialisierte Aufgaben. Dopaminerge Amakrinzellen, deren Synapsen vor allem im S1 Segment des IPL liegen, passen beispielsweise die Ansprechbarkeit der Retina in der Dämmerung an. Dahingegen können die *starburst* Amakrinzellen sowohl exzitatorisch als auch inhibitorisch wirken, da sie sowohl Acetylcholin als auch GABA enthalten. Ihre Synapsen befinden sich in den S2 und S4 Segmenten der IPL und sind wichtig für die Richtungsselektivität (O'Malley et al. 1992; Masland 2001; Haverkamp et al. 2008; Zhou und Lee 2008).

Die Horizontalzellen modulieren die Information über die Lichtintensität durch eine laterale Verschaltung. Horizontalzellen verstärken das Kontrastsehen über ein inhibitorisches Feedback zu den vorangeschalteten Zapfen. Die Signale der Stäbchen werden durch einen gesonderten Subtyp von Horizontalzellen lateral verschaltet. Die Fortsätze der Ganglienzellen bilden schließlich den optischen Nerv, der die Signale aus der Netzhaut ins Gehirn weiterleitet (Masland 2001; Wässle und Brandstätter 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden in der immunhistologischen Untersuchung starke Fluoreszenzsignale von Slc10a4 in den S2 und S4 Segmenten der inneren plexiformen Schicht gefunden, in denen die Fasern der cholinergen Amakrinzellen verlaufen (Sawaguchi et al. 1999). Außerdem zeigt Slc10a4 eine starke Expression in den Nervenfasern der Ganglienzellen. In den Innervationen der inneren plexiformen Schicht zeigt Slc10a4 eine klare Kolokalisation mit VAcHT, welcher ebenfalls in den S2 und S4 Segmenten lokalisiert ist (Abb. 4.3 A). Dahingegen findet sich keine Überlagerung der Fluoreszenzsignale mit VMAT2, welcher vor allem in den dopaminergen Fasern des S1 Segments und in geringer Menge auch im S3 Segment exprimiert ist (Abb. 4.3 B). In diesem Teil des zentralen Nervensystems zeigt Slc10a4 also wieder eine exklusive Koexpression mit VAcHT und ist, im Gegensatz zu seinem Expressionsmuster in anderen dopaminergen Gehirnregionen wie z. B. der *Substantia nigra*, offensichtlich nicht in dopaminergen Verschaltungen der Retina lokalisiert.

Die cholinergen *starburst* Amakrinzellen vermitteln die Richtungsselektivität des eintreffenden Lichtes in der Retina. Sie formen einen symmetrischen dendritischen Baum, dessen Synapsen mit den *direction selective ganglion cells* (DSGCs) und untereinander in Kontakt stehen. Der Mechanismus der Richtungsselektivität beruht auf einer zentralen Erregung der

Amakrinzelle durch Glutamat, welches von der erregenden Bipolarzelle ausgeschüttet wird. Die asymmetrische und damit richtungsselektive Weiterleitung wird durch die GABAerge Inhibition benachbarter *starburst* Amakrinzellen vermittelt (Zhou und Lee 2008).

Die Rolle der cholinergen Transmission in den *starburst* Amakrinzellen ist bis heute unklar. Slc10a4 könnte für die Regulation der GABAergen Inhibition eine Rolle spielen. Die *Input* Synapsen der Amakrinzellen befinden sich auf der ganzen Länge des Dendriten, während *Output* Synapsen in einem umschriebenen distalen Bereich der Dendriten lokalisiert sind (Zhou und Lee 2008). In diesem Bereich findet sich auch eine Konzentrierung synaptischer Vesikel, in welchen vermutlich auch Slc10a4 exprimiert ist. Somit könnte Slc10a4 eine Funktion in der cholinergen Kommunikation zwischen den Synapsen benachbarter *starburst* Amakrinzellen haben. Die cholinerge Erregung der benachbarten Zelle könnte zu einem negativen Rückkopplungseffekt für die GABAerge Inhibition führen und somit die asymmetrische Reizweiterleitung verstärken. Außerdem findet sich eine starke Expression von Slc10a4 in den Nervenfasern von Ganglienzellen (vermutlich DSGCs) deren Dendriten ebenfalls mit *starburst* Amakrinzellen in Verbindung stehen.

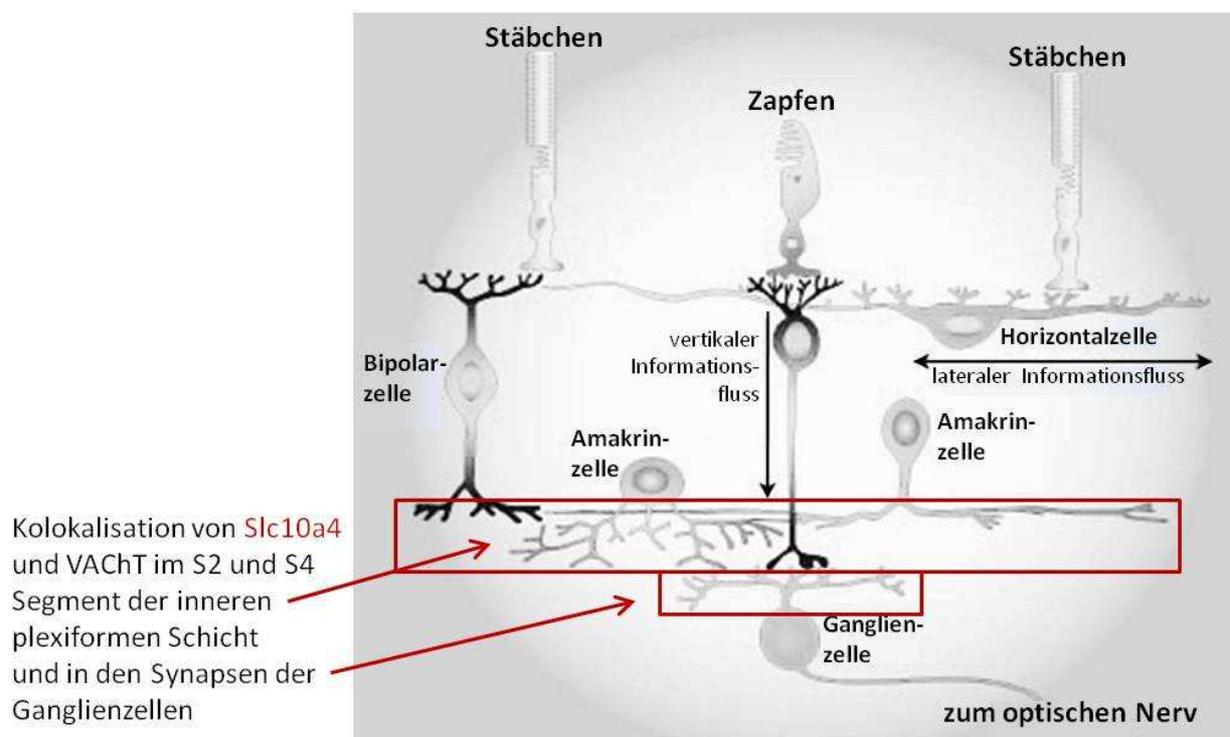


Abb. 5.1: Zelluläre Struktur und Informationsflüsse in der Retina

Stäbchen und Zapfen nehmen einfallende Lichtsignale auf und geben sie an die Bipolarzellen weiter. Bevor die Informationen an die Ganglienzellen gegeben werden, müssen sie von den Amakrinzellen modifiziert werden (vertikaler Informationsfluss). Horizontalzellen verstärken das Kontrastsehen durch eine inhibitorische Rückkopplung zu den Stäbchen und Zapfen (lateraler Informationsfluss).

Starke Fluoreszenzsignale für Slc10a4 finden sich im S2 und S4 Segment der inneren plexiformen Schicht, wo sie mit VAcHT-Signalen überlagern (siehe Abb. 4.3 B). Außerdem ist Slc10a4 in den Nervenfasern der Ganglienzellen (vermutlich Synapsen der DSGCs) lokalisiert.

(modifiziert aus: www.mitre.org)

Aufgrund der sowohl cholinergen als auch monoaminergen Lokalisation des Slc10a4 im zentralen Nervensystem, lag die Vermutung nahe, dass Slc10a4 auch in der sympathischen bzw. parasympathischen Regulation des peripheren Nervensystems eine Rolle spielt. Im *Ganglion cervicale superficiale* (SCG) erfolgt die Umschaltung des Sympathikus auf das postganglionäre Neuron für die obere Halsregion und den Kopf. Hier finden sich also sowohl cholinerge als auch monoaminerge Strukturen. Im SCG exprimieren 98 % aller Neurone TH, davon sind jedoch nur 70 % VMAT2-positiv. Dahingegen sind die Synapsen, welche die Neurone kontaktieren, cholinerg und exprimieren VAcHT (Headley et al. 2007). In der Literatur finden sich aber auch Belege dafür, dass die Neurone des SCG und andere periphere Neurone wie z. B. im intrinsischen kardialen Ganglion (*intrinsic cardiac ganglion*, ICG) sowohl cholinerge als auch monoaminerge Charakteristika aufweisen. Im ICG besitzen bis zu 50 % aller cholinergen Neuronen alle Enzyme der Noradrenalinsynthese, exprimieren aber keinen VMAT2 (Hoard et al. 2008). Auch im SCG befinden sich Neurone mit einem dualen cholinergen/monoaminergen Phänotyp und koexprimieren VAcHT und VMAT2 (Hasan und Smith 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Slc10a4 eine starke Expression in den Zellkörpern der sympathischen Neurone zeigt, während VAcHT vor allem in den Synapsen, welche die Neurone kontaktieren, starke Fluoreszenzsignale aufweist und nur in einzelnen Perikaryen exprimiert ist (Abb. 4.3 E). Ebenso zeigt sich nur in einzelnen Neuronen eine Koexpression von Slc10a4 und VMAT2, während andere Neurone nur eines der Proteine enthalten (Abb. 4.3 F). Im SCG ist Slc10a4, ebenso wie im zentralen Nervensystem, sowohl in cholinergen als auch in monoaminergen Strukturen zu finden und kann nicht exklusiv einer bestimmten Neuronenpopulation zugeordnet werden.

Dieses Expressionsmuster von Slc10a4 finden wir auch in anderen peripheren Organen, die einer sympathischen und parasympathischen Regulation unterliegen, z. B. die Harnblase. Die glatte Muskulatur der Harnblase wird parasympathisch cholinerg innerviert. Hier findet sich in den subepithelialen Nervenfasern der glatten Muskulatur sowohl VAcHT als auch Slc10a4 (Abb. 4.7, Pfeile). Die sympathischen Innervationen der subepithelialen Blutgefäße koexprimieren hingegen VMAT2 und Slc10a4 (Abb. 4. 7, breite Pfeile).

Ebenso stellt sich die Verteilung im Darm dar. Das Magen-Darmsystem unterliegt einer autonomen Regulation, die zwar von Sympathikus und Parasympathikus durch den *Nervus*

splanchnicus und *Nervus vagus* beeinflusst wird, jedoch anatomisch und physiologisch von diesen getrennt ist. Die Neurone des Darmnervensystems liegen in den Wänden des Gastrointestinaltraktes und sind zum Teil identisch mit den postganglionären parasympathischen Neuronen. Ihre kleinen Ganglien bilden den *Plexus myentericus* und den *Plexus submucosus*. Sie enthalten sensorische Neurone, welche die Dehnung und Kontraktion der Darmwand registrieren, motorische Neurone, welche die glatte Längs- und Ringmuskulatur erregen und Interneurone (IPAN, *intrinsic primary afferent neurons*), welche zwischen afferente und motorische Neurone geschaltet sind (Löscher 2002). Die Mehrzahl der Neurone im *Plexus myentericus* und *Plexus submucosus* sind cholinerg und exprimieren VACHT und den cholinergen Kofaktor VIP (Anlauf et al. 2003; Benarroch 2007). VMAT2-positive Neurone finden sich in geringerer Anzahl in den *Plexus myentericus* und *submucosus* des oberen Verdauungstraktes. Eine hohe Dichte monoaminergener Innervationen findet sich außerdem in perivaskulären und periganglionären Nervenfasern (De Giorgio et al. 1996). Im Menschen sind ein Teil der VMAT2-positiven Neurone sowie der Innervationen der Mukosa und der glatten Muskulatur dopaminerg und inhibieren die intestinale Motilität, während serotoninerge Neurone einen exzitatorischen Effekt auf die Motilität haben. Ein dualer cholinerg/monoaminerg Phänotyp der Neuronen kann im enterischen Nervensystem allerdings nicht beobachtet werden (Anlauf et al. 2003). Man findet jedoch oft cholinerge Synapsen an monoaminergen Neuronen, während cholinerge Neurone ebenfalls von monoaminergen Nervenfasern kontaktiert werden (Anlauf et al. 2003).

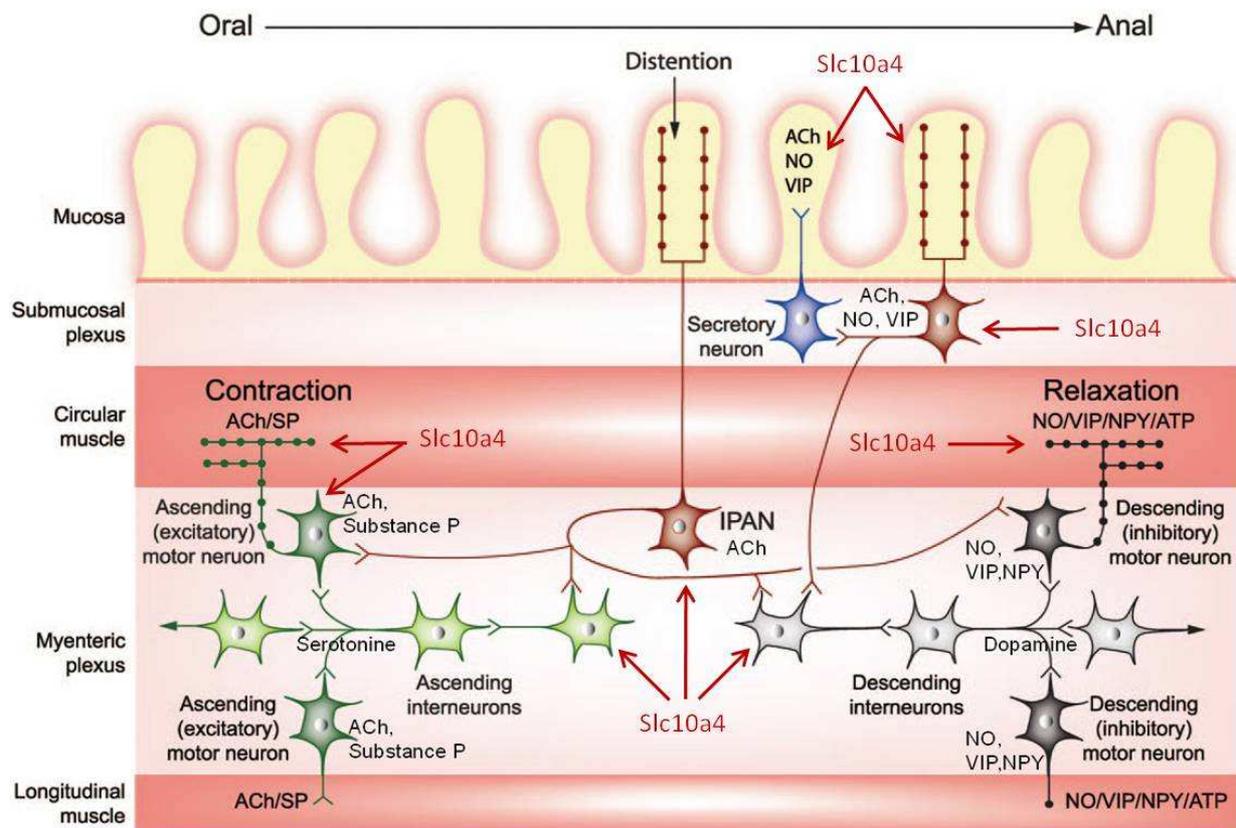


Abb. 5.2: Schematische Darstellung der neuronalen Verschaltungen im enterischen Nervensystem und der Lokalisation von Slc10a4

Die Steuerung der intestinalen Motilität wird durch ein exzitatorisches und ein inhibitorisches System vermittelt, dessen Neurone und Interneurone untereinander verschaltet sind. Afferente exzitatorische Neurone im *Plexus myentericus* vermitteln über Acetylcholin und Substanz P eine Kontraktion der Längs- und Ringmuskelschicht. Diese Neurone bekommen regulative Impulse der afferenten Interneurone, denen Serotonin als Neurotransmitter dient. Die Relaxation der glatten Muskulatur wird durch die efferenten inhibitorischen Neurone des *Plexus myentericus* und deren inhibitorische Interneurone vermittelt. Die efferenten Neurone enthalten NO, VIP und NPY, die Interneurone Dopamin als Neurotransmitter. Als übergeordnetes modulatorisches System dienen die IPAN, die Informationen über den Dehnungszustand der Darmwand erhalten und dementsprechend die Kontraktion und Relaxation regulieren.

(modifiziert nach Benarroch 2007)

Slc10a4 zeigt im enterischen Nervensystem, genau wie im sympathischen und parasympathischen Nervensystem, eine Kolo-kalisation mit VAcHT in cholinergen Neuronen und Nervenfasern der glatten Muskulatur (Abb. 4.3 C). Ebenso findet sich aber auch in monoaminergen Neuronen, perivaskulären und periganglionären Innervationen sowie in Nervenfasern innerhalb der Mukosa des Gastrointestinaltrakts eine deutliche Koexpression mit VMAT2 (Abb. 4.3 D).

Dahingegen ist Slc10a4 in rein cholinergen Strukturen des peripheren Nervensystems, wie der neuromuskulären Endplatte mit VAcHT kolo-kalisiert (Abb. 4.3 G).

Die Expression von Slc10a4 ist also nicht auf eine bestimmte Neuronenpopulation (cholinerg oder dopaminerg) beschränkt, sondern zeigt ein viel breiteres Expressionsmuster als bisher vermutet.

5.3 Slc10a4 ist in synaptischen Vesikeln lokalisiert

VACHT und VMAT2 sind Neurotransmitter Transporter, die in synaptischen Vesikeln lokalisiert sind (Eiden et al. 2004). Die Überlagerung der Fluoreszenzsignale dieser beiden vesikulären Transporter mit denen von Slc10a4 lassen auf eine ebenfalls vesikuläre Expression des Slc10a4-Proteins schließen. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde eine Doppelmarkierung mit dem Marker für synaptischen Vesikel, Synaptophysin (SYP) im Ventralhorn des Rückenmarks durchgeführt. Beide Proteine koloalisieren in den großen Synapsen, welche Motoneurone kontaktieren (Abb. 4.2 C). Synaptophysin ist ein vesikuläres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 38 kDa, welches bei der Exozytose von synaptischen Vesikeln eine Rolle spielt. Der genaue Funktionsmechanismus dieses Proteins ist bis jetzt noch nicht vollständig aufgeklärt. Es bildet einen Komplex mit dem SNARE-Protein Synaptobrevin und moduliert die Effizienz der Vesikelexozytose aufgrund dieser Komplexbildung. Es ist allerdings nicht essenziell für die Transmitterfreisetzung aus Synapsen, da Synaptophysin Knockout-Mäuse keine phänotypischen Veränderungen aufweisen (Mittler 2003). Immunzytologische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von Slc10a4 in Zelllinien neuronalen Ursprungs zeigten, dass sowohl PC12 als auch SH-SY5Y Zellen eine native Expression von Slc10a4 in intrazellulären Kompartimenten aufweisen. Dieses vesikuläre Expressionsmuster zeigt sich in den Zellkörpern und Zellausläufern beider Zelllinien sowohl bei der Detektion mit dem Slc10a4-Antiserum als auch mit einem kommerziellen humanen SLC10A4-Antikörper (Abb. 4.13 C, 4.14 A). Bei einer Doppelmarkierung von Slc10a4 und VACHT in PC12 Zellen findet sich eine Koloalisation beider Proteine in den intrazellulären Kompartimenten (Fernandes 2007). Auch für andere vesikuläre Proteine wie z. B. VMAT2, Synaptophysin oder CHT-1 wurde dieses vesikuläre Expressionsmuster in PC12 und SH-SY5Y Zellen gezeigt. Allerdings werden die vesikulären Transporter in unterschiedliche Vesikelpopulationen sortiert. VACHT ist vorwiegend in *synaptic-like microvesicles* (SMLV) lokalisiert, während

VMAT2 in *large dense core vesicles* (LDCV) vorkommt (Liu und Edwards 1997; Goodall et al. 1997; Ribeiro et al. 2007; Watabe und Nakaki 2008).

Die Lokalisation von Slc10a4 *in vivo* wurde im Rahmen dieser Arbeit anhand einer Vesikelaufreinigung aus dem Rattengehirn mithilfe eines Sucrosegradienten und anschließender Detektion im Western Blot im Vergleich zu den vesikulären Markern VAcHT, VMAT2 und SYP gezeigt (Abb. 4.4). In einer Immunpräzipitation wurde die Kolo­kalisierung von SYP bzw. VMAT2 mit Slc10a4 in den gleichen Vesikeln belegt. Dabei konnten die synaptischen Vesikelproteine SYP und VMAT2 mithilfe des Slc10a4-Antikörpers präzipitiert und anschließend im Western Blot detektiert werden. Ebenso wurden *vice versa* Slc10a4-haltige synaptische Vesikel mit dem SYP-Antikörper präzipitiert und mit dem Slc10a4-Antikörper nachgewiesen (Abb. 4.5). Schließlich konnte auch in der Transmissionselektronenmikroskopie anhand einer Goldmarkierung des Slc10a4-Proteins in aufgereinigten Vesikeln verschiedener Fraktionen die Lokalisation des Proteins in synaptischen Vesikeln bestätigt werden. Dabei erhärtet sich auch die Vermutung, dass Slc10a4 sowohl in den *small synaptic vesicles* (SSV) als auch in *large dense core vesicles* (LDCV) exprimiert wird (Abb. 4.6). Bereits im Western Blot-Vergleich der verschiedenen Fraktionen aus der Sucrosegradientenzentrifugation war eine deutliche Bande sowohl für VMAT2 als auch für Slc10a4 in der zwölften Fraktion erkennbar, in welcher sich auch die größeren und schwereren LDCV sammeln (Abb. 4.4). VAcHT wird aufgrund eines spezifischen Sorting-Signals ausschließlich in SSV exprimiert (Li et al. 2005; Colgan et al. 2007), während VMAT2 sowohl in SSV als auch LDCV sortiert werden kann (Waites et al. 2001). Der *high affinity choline transporter* CHT-1, der Cholin aus dem synaptischen Spalt zurück in die Synapse transportiert, liegt zu einem großen Teil ebenfalls in synaptischen Vesikeln vor. Dieser vesikuläre Anteil des CHT-1 gilt als Reservepool, der bei erhöhter Aktivität zusätzlich rekrutiert werden kann. Ferguson und Mitarbeiter zeigten 2003, dass CHT-1 in den gleichen Vesikelpopulationen zu finden ist, wie VAcHT, VMAT2 und SYP (Ferguson et al. 2003).

Die Proteomanalyse erbrachte in den letzten Jahren einen guten Einblick in die Zusammensetzung synaptischer Vesikel. Abhängig von der Methode der Vesikelaufreinigung und dem Proteinnachweis konnten je nach Studie bis zu 410 verschiedene Vesikel-assoziierte Proteine nachgewiesen werden. Mehr als 80 verschiedene integrale Membranproteine, deren Zusammensetzung und Verteilung je nach Vesikelpopulation unterschiedlich sein kann, wurden identifiziert. Die Mehrzahl dieser vesikulären Membranproteine ist bekannt und zählen

zu den etablierten Vesikelproteinen, welche hauptsächlich in den Exozytosemechanismus involviert sind, wie z. B. Synaptobrevin, Synaptophysin, Syntaxin 1, SNAP25. Einige Proteine, die für die Neurotransmitteraufnahme in die Vesikel verantwortlich sind, wie z. B. die vesikulären Transporter für Acetylcholin (VACHT) und Monoamine (VMAT2), aber auch der Zink Transporter ZnT-3 und einige Untereinheiten der vesikulären H^+ /ATPase (vATPase) konnten je nach Nachweismethode nur schwerlich oder gar nicht detektiert werden. Andererseits wurden einige nicht-charakterisierte Membranproteine isoliert, deren Funktion für die Physiologie der synaptischen Vesikel noch unklar ist. Ob Slc10a4 eines dieser unbekanntenen Membranproteine ist, wurde in den bisher publizierten Studien allerdings nicht untersucht. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ist es aber naheliegend, dass Slc10a4 eines der bisher uncharakterisierten Membranproteine in synaptischen Vesikeln darstellt. Die derzeit bekannten Proteine, welche für Exozytose und Neurotransmitter Transport maßgebend sind, liegen in mehreren Kopien, im Fall von Synaptobrevin bis zu 70-mal, in der Vesikelmembran vor. Ein durchschnittliches synaptisches Vesikel hat nach bisherigen Erkenntnissen einen Durchmesser von 41,6 nm und enthält etwa 80 integrale Membranproteine, die etwa 70 % der Vesikeloberfläche bedecken (Morciano et al. 2005; Takamori et al. 2006; Burré und Volkandt 2007). Damit sind synaptische Vesikel heute die am besten untersuchten Zellorganellen. Die Identifizierung von Slc10a4 als ein völlig neues Membranprotein synaptischer Vesikel, stellt in diesem Zusammenhang ein hochinteressantes Ergebnis dar. Die Aufklärung der physiologischen Funktion von Slc10a4 wird daher weiter dazu beitragen, die Vorgänge und Mechanismen der chemischen Neurotransmission besser zu verstehen.

5.4 Die Expression von Slc10a4 in Epithelien von Harnblase und Lunge und seine mögliche Rolle im non-neuronalen Acetylcholinsystem

Acetylcholin wird als der „klassische“ Neurotransmitter betrachtet, dessen nikotinerge und muskarinerge Rezeptoren (nAChR und mAChR) die chemische Erregungsweiterleitung an Neuronen, Ganglien, Interneuronen, der neuromuskulären Endplatte und zahlreichen Effektororganen der Peripherie vermitteln. Doch Acetylcholin hat darüber hinaus eine noch weitreichendere Bedeutung im Organismus. Die meisten lebenden Zellen haben die Möglichkeit Acetylcholin zu bilden. Nicht-neuronales Acetylcholin ist an umfassenden zellulären Mechanismen wie Proliferation, Differenzierung, Zell-zu-Zell Kontakten, Immunfunktionen, Sekretion und Absorption beteiligt. Acetylcholin und andere Komponenten des cholinergen Systems wurden in sehr primitiven Organismen, die zum Teil seit über 3 Milliarden Jahren die Erde bevölkern, entdeckt. Dazu zählen Bakterien wie *Lactobacillus plantarum*, Blaualgen, Turbellaria, Hefen, Pilze, Schwämme, Protozoen, Nematoden und Amphibien. Das non-neuronale Acetylcholinsystem ist also entwicklungsgeschichtlich gesehen ein sehr altes Transmittersystem. Mit der Entwicklung des Nervensystems vor etwa 500 – 400 Millionen Jahren, wurde das vorhandene Acetylcholin von den spezialisierten neuronalen Zellen als Neurotransmitter genutzt und weitere Komponenten für die effektivere Speicherung und Freisetzung, wie z. B. VACHT, entwickelt (Wessler et al. 1999; Wessler und Kirkpatrick 2008; Horiuchi et al. 2003). Darüber hinaus kommt im Säuger nicht-neuronales Acetylcholin unter anderem in Epithelzellen der Atemwege, des Urogenitaltrakts, des Darms und der Haut vor, aber auch in Endothel- und Immunzellen. Die Freisetzung von non-neuronalem Acetylcholin wird vermutlich durch Mitglieder der *organic cation transporter* (OCT) Familie vermittelt (Klapproth et al. 1997; Wessler et al. 2001). Die genaue intrazelluläre Verteilung des non-neuronalen Acetylcholins ist bis heute nicht genau bekannt, jedoch wird in den Epithelzellen der Harnblase und der Atemwege kein VACHT exprimiert (Lips et al. 2007; Kummer et al. 2008; Abb. 4.7 A). Sollte Acetylcholin in den non-neuronalen Zellen in intrazellulären Kompartimenten gespeichert werden, so könnte die Expression von Slc10a4 in diesen Zellen für den Speicherungs- oder Freisetzungsmechanismus von Acetylcholin eine Rolle spielen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Slc10a4 sehr stark in den Epithelien der Harnblase und der Lunge exprimiert ist (siehe Abb. 4.7). Bei Slc10a4 handelt es sich um ein entwicklungsgeschichtlich sehr altes Protein, welches ein homologes Gen mit einer Sequenz-

identität von 34 % bereits in *Ciona intestinalis* aufweist (GeneBank accession No.: XP_002127506). Somit könnte sich dieses Protein als Transporter für Acetylcholin im nicht-neuronalen Acetylcholinsystem etabliert haben. Allerdings konnte die subzelluläre Lokalisation von Slc10a4 im Urothel noch nicht aufgeklärt werden, sodass diese Hypothese noch weiterer Untersuchungen bedarf.

5.5 Die Expression von Slc10a4 in Mastzellen

Mastzellen spielen eine wichtige Rolle in der unspezifischen Abwehr des Immunsystems. Sie gehören zu den Leukozyten und reifen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark heran. Das charakteristische Merkmal der Mastzellen sind die großen intrazytoplasmatischen Granula (Ehrlich 1878). Bei einer Aktivierung der Mastzellen, die vor allem durch IgE-Rezeptoren vermittelt wird, werden die in den Granula enthaltenen Botenstoffe mittels Exozytose ins Interstitium freigesetzt. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Histamin, das eine Vasodilatation und erhöhte Permeabilität kleiner Blutgefäße verursacht, und Proteoglykane, überwiegend Heparin, welches die lokale Blutgerinnung hemmt. Es werden aber auch weitere Gewebeshormone und Entzündungsmediatoren wie Serinproteinasen, Zytokine, Leukotriene und Prostaglandine ausgeschüttet. Über die komplexe Rolle der Mastzellen bei Abwehrreaktionen hinaus, werden sie auch zum non-neuronalen Acetylcholinsystem gezählt, da sie das cholinerge Enzym ChAT sowie nikotinerge und muskarinerge Acetylcholinrezeptoren exprimieren (Sudheer et al. 2006; Gwilt et al. 2007).

Aber auch die sekretorischen Vesikel der Mastzellen, die ihre Inhaltsstoffe über ähnliche Exozytosemechanismen freisetzen wie synaptische Vesikel, machten diese Zellpopulation zu einem interessanten Ziel für die Untersuchung der Expression von Slc10a4. In non-neuronalen Zellen, die sekretorische Vesikel besitzen, finden sich Homologe der in synaptischen Vesikeln beschriebenen Exozytose-Proteine (siehe Kapitel 1.4.3). Die Vesikelexozytose basiert auf der Bildung eines Komplexes aus Proteinen der Vesikelmembran (vSNARE, Synaptobrevin) mit zwei Zielproteinen in der Plasmamembran (tSNAREs, Syntaxin 1 und SNAP23). Synaptotagmine regulieren durch eine transiente Interaktion mit SNAP23 die Exozytose (Shukla et al. 2001; Sagi-Eisenberg 2007). Die vSNARE Proteine VAMP1 und VAMP2 (*vesicle-associated membrane proteins*), auch bekannt als Synaptobrevin 1 und 2, sind in die Regula-

tion der Exozytose involviert, während VAMP3 maßgeblich das Vesikel-Recycling reguliert. Darüber hinaus sind noch weitere regulative oder modulatorische Proteine an der Vesikelexozytose beteiligt. In einer Studie von Paumet et al. wurde ein weiterer möglicher Interaktionspartner für die regulatorischen Proteine Syntaxin 4 und SNAP23 in Mastzellen identifiziert. VAMP8 gehört ebenfalls zu den *vesicle-associated membrane proteins* und ist in einer speziellen Vesikelpopulation exprimiert (Paumet et al. 2000).

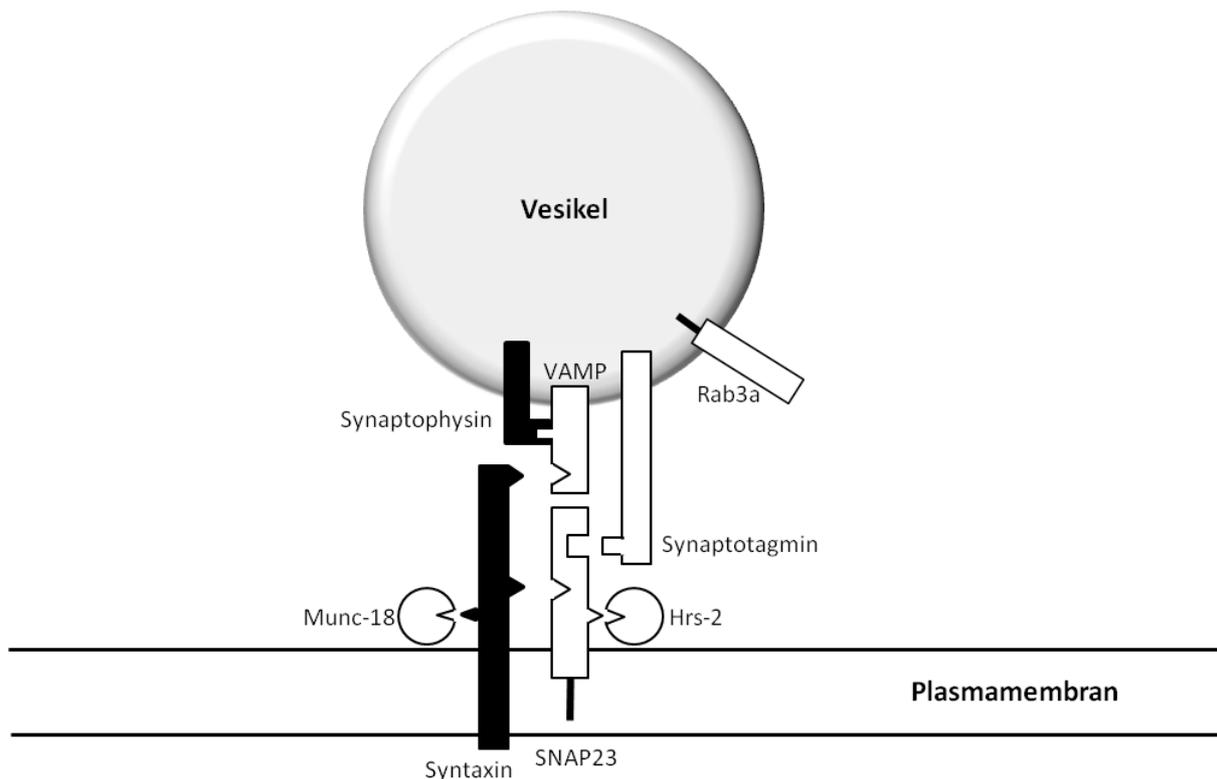


Abb. 5.3: Schematische Darstellung der an der Vesikelexozytose beteiligten SNARE-Proteine

Die vesikulären SNARE-Proteine Synaptobrevin (VAMP) und Synaptotagmin interagieren mit dem SNARE-Protein der Plasmamembran SNAP23 und formen den *core*-Komplex. Synaptophysin und Syntaxin regulieren die Bindung der SNARE-Proteine. Synaptotagmin und Rab3a regulieren die Exozytose auf der Vesikelseite, während Munc-18 und Hrs-2 regulatorisch in die Bindung der Vesikel an die Plasmamembran eingreifen (Chen et al. 1998; Abb. modifiziert nach Shukla et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde beschrieben, dass Slc10a4 in sekretorischen Granula von Mastzellen exprimiert ist. In der immunzytologischen Analyse der peritonealen Mastzellen der Ratte zeigte sich eine Konzentrierung der immunopositiven Vesikel im submembranären Bereich der Mastzellen. Die Doppelmarkierung mit einem VMAT2-Antikörper ergab, dass Slc10a4 nur vereinzelt mit VMAT2 kolokalisiert ist. Vielmehr scheint Slc10a4 in einer speziellen Vesikelpopulation exprimiert zu sein, was auch in der elektronenmikroskopischen Aufnahme deutlich wird (siehe Kapitel 4.6). Vergleichbar mit VAMP8 könnte auch Slc10a4 regu-

latorisch oder modulatorisch an der Vesikelexozytose beteiligt sein oder durch die Interaktion mit anderen an der Exozytose beteiligten Proteinen zur Fusion der Vesikel- und Plasmamembran beitragen.

5.6 Hypothesen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Slc10a4 ein vesikulär exprimiertes Membranprotein ist, welches sowohl im zentralen als auch peripheren Nervensystem mit VAcHT und VMAT2 kolokalisiert. Da die physiologische Bedeutung des Slc10a4 bis jetzt noch nicht aufgeklärt ist, wurden aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit einige Hypothesen zur möglichen Funktion dieses Proteins formuliert, welche in nachfolgenden Untersuchungen geklärt werden müssen.

5.6.1 Slc10a4 als vesikuläres Transportprotein

Neurotransmitter werden im Zytoplasma der Nervenzelle synthetisiert und in Vesikeln gespeichert. Die unterschiedlichen Neurotransmitter sowie Kotransmitter wie Neuropeptide, Acetat, Enkephaline oder ATP werden in unterschiedlichen Vesikeln kumuliert.

Slc10a4 gehört der *solute carrier family 10* (SLC10) an, deren bisher funktionell charakterisierten Mitglieder Na⁺-abhängig Gallensäuren oder sulfatierte Steroidhormone transportieren (siehe Kapitel 1.5). Aufgrund der hohen phylogenetischen Verwandtschaft zum NTCP mit einer Sequenzidentität von 29,7 %, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei Slc10a4 ebenfalls um einen Membrantransporter handelt.

Slc10a4 wird genau wie VAcHT in SSV, aber auch ebenso wie VMAT2, in LDCV exprimiert (siehe Kapitel 4.4). Eine mögliche Funktion des Proteins könnte ein Transport von Neurotransmittern oder Kotransmitter aus dem Zytosol ins Lumen des Vesikels sein. Die physiologische Bedeutung des Proteins könnte darin liegen, ein alternatives Transportsystem für Neurotransmitter in der Vesikelmembran darzustellen, um den physiologisch wichtigen Speicherungsprozess aufrecht zu erhalten, auch wenn beispielsweise die vesikulären Neurotransmitter Transporter nach der Exozytose nur ungenügend in die Vesikelmembran recycelt

wurden (Takamori et al. 2006). Diese Hypothese wird auch durch die Beobachtung gestützt, dass Slc10a4 sehr stark in den Epithelien von Harnblase sowie Lunge und somit im non-neuronalen Acetylcholin system exprimiert ist (siehe Kapitel 4.5). Dort könnte das Protein die Transportfunktion von VAcHT übernehmen, da es sich entwicklungs geschichtlich um das ältere Protein handelt (siehe Kapitel 5.4).

Die Hypothese zur alternativen Transportfunktion für Neurotransmitter wird durch aktuelle Ergebnisse aus einer Kollaboration mit Prof. Francisco Alvarez (Wright State University, Dayton, USA) gestützt. Hierbei wurden Synapsen von Motoneuronen charakterisiert, welche inhibitorische Interneurone des Vorderhorns des Rückenmarks (Renshaw Zellen) aktivieren. Diese Synapsen enthalten entweder Acetylcholin oder in großer Menge die exzitatorischen Aminosäuren Glutamat und Aspartat. In immunhistologischen Analysen dieser Synapsen wurde festgestellt, dass Slc10a4 und VAcHT in den die Renshaw Zellen kontaktierenden Synapsen exprimiert sind, die auch große Mengen Glutamat und Aspartat enthalten. Überraschenderweise konnte allerdings kein vesikulärer Transporter für exzitatorische Aminosäuren (VGLUT) in diesen Synapsen nachgewiesen werden. Eine Hypothese für die VGLUT-unabhängige Freisetzung von Glutamat und Aspartat ist, dass ein anderes Transportsystem wie z. B. Slc10a4 für die vesikuläre Speicherung und Ausschüttung der exzitatorischen Aminosäuren verantwortlich ist (Richards 2009).

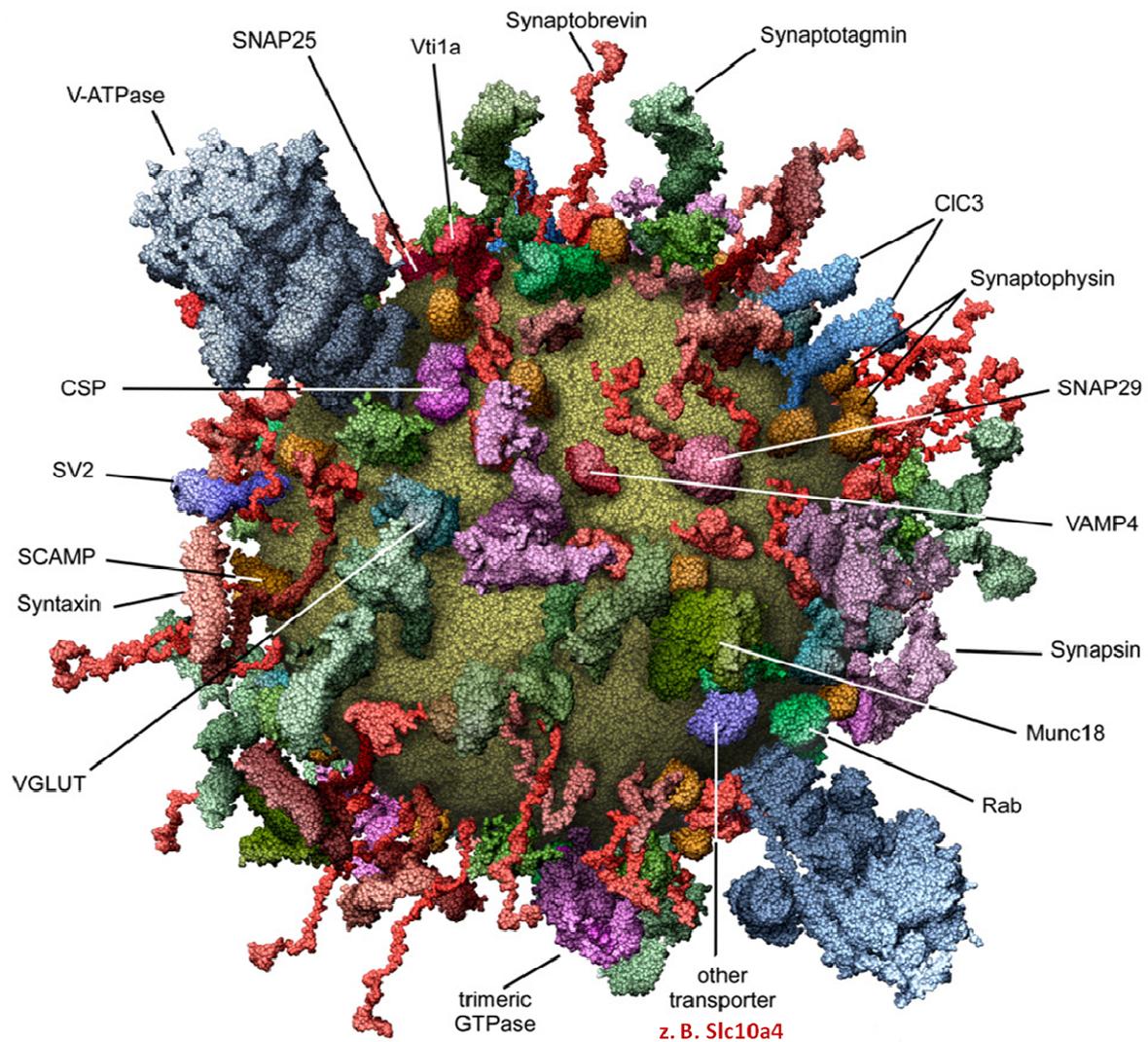


Abb. 5.4: Molekulares Modell eines repräsentativen synaptischen Vesikels

Außenansicht eines synaptischen Vesikels mit der errechneten durchschnittlichen Anzahl der einzelnen Proteine. Je nach Vesikelpopulation kann die Zusammensetzung und Verteilung der Proteine variieren. Dieses ist das Modell eines glutamatergen Vesikels mit dem vesikulären Glutamat Transporter VGLUT. Die Mehrzahl der vorhandenen Proteine gehören zum Exozytosemechanismus des Vesikels, gefolgt von den Proteinen, die den Neurotransmitter Transport vermitteln (aus Takamori et al. 2006).

5.6.2 Slc10a4 als Komponente der Vesikelexozytose

Synaptische Vesikel enthalten etwa 80 verschiedene Proteine in unterschiedlicher Verteilung, die für den Neurotransmitter Transport (z. B. VACHT, VMAT2, VGLUT, etc.), die Exozytose und das Recycling der Vesikel (z. B. SNAREs, Synapsins, Synaptophysins, etc.) oder die Modulation und Regulation (z. B. Rab's, vATPase, Ionen-Kanäle, etc.) zuständig sind (Takamori et al. 2006). Darüber hinaus wurden auch einige nicht-charakterisierte Memb-

ranproteine in den Vesikeln entdeckt. Ob es sich bei diesen Proteinen um zusätzliche vesikuläre Transporter oder neue Komponenten des Exozytosemechanismus handelt, ist ungeklärt. Da die Mehrzahl der in der Vesikelmembran exprimierten Proteine Bestandteile des Exozytosemechanismus sind, könnte Slc10a4 auch eine Rolle bei der Fusion der Vesikelmembran mit der Plasmamembran spielen. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass Slc10a4 in Mastzellen ein besonders starkes Fluoreszenzsignal in submembranär gelegenen Vesikeln zeigt (siehe Kapitel 4.6). Bei diesen Vesikeln könnte es sich um eine spezielle Vesikelpopulation handeln, die beispielsweise durch Kofaktoren aktiviert und zur Exozytose bereit gestellt werden.

5.6.3 Slc10a4 als Sensorprotein für Protonen

Ein markanter Unterschied zu dem nächsten Verwandten des Slc10a4 innerhalb der SLC10 Familie, NTCP ist, dass Slc10a4 eine um etwa 60 Aminosäuren längere N-terminale Domäne besitzt (Geyer et al. 2008). Diese ist, wenn von einer vesikulären Expression von Slc10a4 ausgegangen wird, in das Lumen des Vesikels gerichtet. Diese Domäne könnte hier, so eine weitere Hypothese, als Sensordomäne für die Protonen- oder Neurotransmitterkonzentration im Innern des Vesikels dienen. Das intravesikuläre Milieu liegt mit pH 5,6 im sauren Bereich und wird von dem einwärts gerichteten Protonenstrom der vesikulären H⁺/ATPase bestimmt (Burré und Volkand 2007). Es wäre denkbar, dass Slc10a4 den Protonen- oder Neurotransmittergehalt im Vesikellumen misst und aufgrund dessen die Aktivität der vesikulären Neurotransmitter Transporter oder der vesikulären H⁺/ATPase reguliert.

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass für andere Proteine aus der *solute carrier* Familie bereits eine solche Sensorfunktion beschrieben wurde. So wurde in der Familie der Na⁺/Glucose Kotransporter (SLC5), welche insgesamt 12 Mitglieder umfasst, eines der Proteine (SGLT3/SLC5A4) als Glukosesensor identifiziert. SGLT3 ist in cholinergen Neuronen der *Plexus myentericus* und *submucosus* exprimiert und kolokalisiert mit nikotinergen Acetylcholinrezeptoren im Skelettmuskel (Díez-Sampedro et al. 2003). Interessanterweise zeigt die SLC5 Familie die nächste phylogenetische Verwandtschaft zur Familie SLC10 (He et al. 2009).

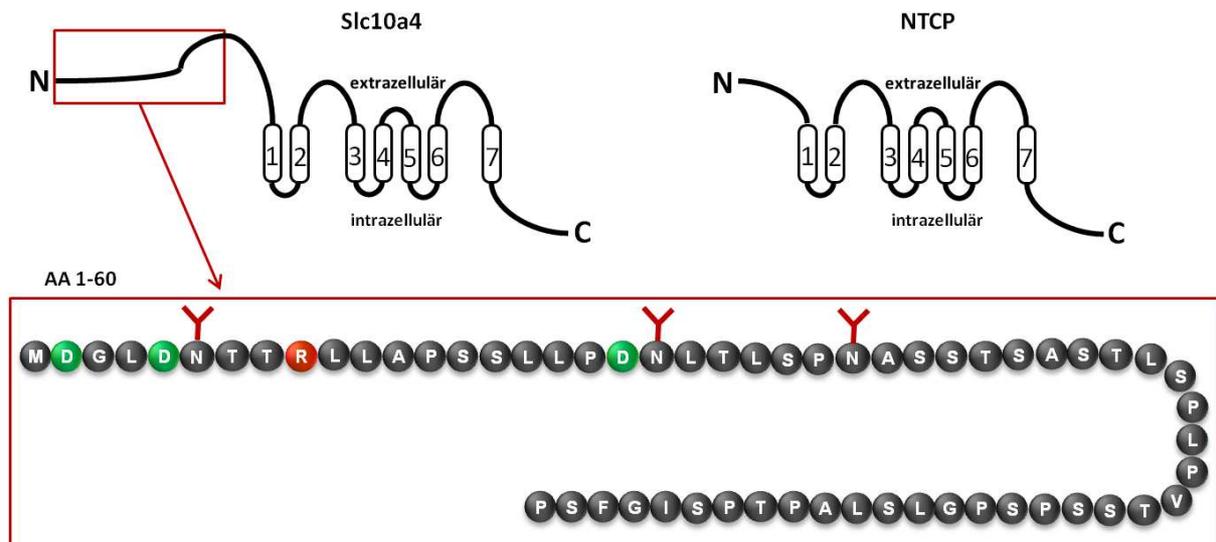


Abb. 5.5: Transmembrandomänenstruktur von Slc10a4 und NTCP und Detaildarstellung der zusätzlichen N-terminalen Domäne von Slc10a4

Slc10a4 zeigt ebenso wie sein nächster phylogenetischer Verwandter NTCP eine 7-TMD Struktur, weist jedoch am N-Terminus eine um 60 Aminosäuren verlängerte Domäne auf. Das Slc10a4-Gesamtprotein besitzt 32 negativ geladene Aminosäuren (Asp + Glu) und 20 positiv geladene Aminosäuren (Arg + Lys). Der isoelektrische Punkt (pI) des Gesamtproteins liegt bei 4,84. Die zusätzliche N-terminale Domäne des Slc10a4 besitzt drei negativ geladene Aminosäuren (D, in grün), eine positiv geladene Aminosäure (R, in rot) sowie drei N-Glycosylierungsstellen und ist mit einem isoelektrischen Punkt von pI 3,93 bei einem intravesikulären pH Wert von 5,6 negativ geladen. Diese Domäne könnte also zur Messung des intravesikulären pH Wertes H^+ -Protonen oder Neurotransmitter binden und somit als intravesikulärer Sensor für die Protonen- oder Neurotransmitterkonzentration fungieren.

5.6.4 Slc10a4 als Interaktionspartner von VACHT und VMAT2

Eine weitere hypothetische Funktion des Slc10a4 könnte darin bestehen, Protein-Protein Interaktionen mit anderen vesikulären Neurotransmitter Transportern einzugehen. So ist von NTCP, dem nächsten Verwandten des Slc10a4 bereits bekannt, dass das Protein sowohl Homodimere als auch Heterodimere mit SOAT bilden kann, wenn beide Proteine in der gleichen Zelle exprimiert werden (Dr. Stan de Graaf, Utrecht, NL, unveröffentlichte Ergebnisse).

Diese Hypothese wird derzeit in einer weiteren Dissertation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Justus-Liebig-Universität Gießen mit Hilfe von FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) –Analysen und Koexpressionsexperimenten untersucht. Kandidaten für eine solche Interaktion sind VACHT und VMAT2, mit welchen Slc10a4 sowohl im zentralen als auch peripheren Nervensystem eine enge Kollokalisierung zeigt (siehe Kapitel 4.3).

5.6.5 Ausblick

Alle Hypothesen, die auf Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit formuliert wurden, müssen in zukünftigen Untersuchungen weiter verfolgt werden. Dazu werden umfangreiche Transportversuche mit radioaktiv markierten Substanzen in unterschiedlichen methodischen Modellen durchgeführt. Dafür werden sowohl stabil transfizierte rSlc10a4-HEK293 Zellen als auch die in dieser Arbeit beschriebenen neuronalen Zellen herangezogen. Auch Transportmessungen und elektrophysiologische Experimente an Slc10a4 exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten könnten zur Aufklärung der Transportfunktion beitragen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Neurotransmitter Transporter spielen eine zentrale Rolle bei der Weiterleitung von Informationen über Synapsen im zentralen und peripheren Nervensystem. Sie sind essenziell für die Aufnahme der präsynaptisch freigesetzten Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt in das Zytoplasma von Neuronen und Gliazellen sowie die Speicherung in synaptischen Vesikeln. Im Zentrum dieser Arbeit steht Slc10a4, ein Mitglied der *Sodium Bile Acid Cotransporter Family* (SLC10), welches die höchste Expression im Gehirn verschiedener Spezies aufweist und dort vorwiegend in cholinergen Regionen lokalisiert ist. Aufgrund seiner Zugehörigkeit zu der SLC10 Familie und seinem spezifischen Expressionsmuster liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesem *orphan carrier* um einen neuen Neurotransmitter Transporter handelt. Da eine Transportfunktion von Slc10a4 aber bis jetzt noch nicht identifiziert werden konnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit die regionale und subzelluläre Expression dieses Proteins untersucht, um durch die genaue Kenntnis der Lokalisation Informationen über eine mögliche Funktion von Slc10a4 zu erlangen.

Über die Expression in cholinergen Gehirnregionen hinaus, zeigt Slc10a4 eine Expression in dopaminergen Gehirnregionen wie der *Substantia nigra* und dem ventralen Tegmentum, wo es mit den monoaminergen Markern Tyrosin Hydroxylase und dem vesikulären Monoamin Transporter VMAT2 kolokalisiert. In der Retina ist Slc10a4 in den synaptischen Verschaltungen der cholinergen Amakrinzellen der inneren plexiformen Schicht mit dem vesikulären Acetylcholintransporter VACHT koexprimiert. Darüber hinaus findet sich im Rückenmark eine deutliche Kolokalisation mit VACHT und Synaptophysin in den Synapsen, welche die Motoneuronen im Ventralhorn kontaktieren. Hier ist Slc10a4 auch in axonalen Strukturen mit VMAT2 koexprimiert. Diese duale Koexpression von Slc10a4 sowohl in cholinergen als auch monoaminergen Neuronen und Nervenfasern zeigt sich durchgehend in allen untersuchten peripheren Organen wie dem oberen Halsganglion, der Harnblase und dem Darm. Darüber hinaus findet sich eine starke Expression von Slc10a4 in der neuromuskulären Endplatte, dem Bronchialepithel und in sekretorischen Vesikeln von Mastzellen. Diese vesikuläre Expression von Slc10a4 zeigt sich auch in den neuronalen Zelllinien PC12 und SH-SY5Y sowie in isolierten Gehirnvesikeln der Ratte. Hier konnte die Expression in verschiedenen Vesikelpopulationen, wie *small synaptic vesicles* und *large dense core vesicles* gezeigt werden, wo Slc10a4 ebenfalls mit VACHT, Synaptophysin und VMAT2 koexprimiert wird.

7. SUMMARY

Neurotransmitter transporters play a key role for the signal transduction *via* synapses in the central and peripheral nervous system: they are involved in the rapid clearance of neurotransmitters from the synaptic cleft by reuptake into neurons and glial cells and are essential for their storage in synaptic vesicles. The present work reports on Slc10a4, a member of the Sodium Bile Acid Cotransporter Family (SLC10) that is highly expressed in cholinergic brain regions of different species. Due to the fact that Slc10a4 is a member of a transmembrane transporter family and based on its specialized neuronal expression pattern, Slc10a4 most likely represents a new neurotransmitter transporter candidate. However, until now a transport function of Slc10a4 could not be elucidated. Therefore the aim of the present study was to analyze the regional and subcellular distribution of Slc10a4 to clarify the exact localization of this protein. Based on this knowledge an impression of the particular function of Slc10a4 could be obtained.

Beyond the clear expression of Slc10a4 in cholinergic brain regions, Slc10a4 is also expressed in dopaminergic regions like the *substantia nigra* or the ventral tegmental area, where it is co-localized with the monoaminergic marker proteins tyrosine hydroxylase and the vesicular monoamine transporter VMAT2. In the retina, Slc10a4 is expressed in synapses of cholinergic starburst amacrine cells in the S2 and S4 segment of the inner plexiform layer, where the vesicular acetylcholine transporter VACHT is localized as well. Beyond that, Slc10a4 shows a clear co-localization with VACHT and synaptophysin in presynaptic terminals at the motoneurons of the ventral horn of the spinal cord, where it also shows a co-expression with VMAT2 in axonal projections. This dual co-expression pattern of Slc10a4 in cholinergic as well as monoaminergic neurons and nerve fibers is also present in all examined organs of the peripheral nervous system like the superior cervical ganglion, urinary bladder and the intestine. Furthermore Slc10a4 shows a strong expression in the neuromuscular endplate, bronchial epithelium and in secretory granules of mast cells. This vesicular expression pattern could also be found in neuronal cells lines as the rat pheochromocytoma PC12 cells and the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. In addition, Slc10a4 is localized in isolated rat brain vesicles, where it is present in small synaptic vesicles as well as large dense core vesicles together with VACHT, synaptophysin and VMAT2.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Alcalay M. and Toniolo D. 1988. CpG islands of the X chromosome are gene associated. *Nucleic Acids Res.* 16, 9527-9543.
- Alrefai W.A. and Gill R.K. 2007. Bile Acid Transporters: Structure, Function, Regulation and Pathophysiological Implications. *Pharm. Res.* 24, 1803-1823.
- Alvarez de T.G. and Fernandez J.M. 1990. Compound versus multigranular exocytosis in peritoneal mast cells. *J. Gen. Physiol* 95, 397-409.
- Alvarez de T.G., Fernandez-Chacon R., and Fernandez J.M. 1993. Release of secretory products during transient vesicle fusion. *Nature* 363, 554-558.
- Ananthanarayanan M., Ng O.C., Boyer J.L., and Suchy F.J. 1994. Characterization of cloned rat liver Na(+)-bile acid cotransporter using peptide and fusion protein antibodies. *Am. J. Physiol.* 267, G637-G643.
- Anlauf M., Schäfer M.K., Eiden L., and Weihe E. 2003. Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: cholinergic, VIPergic, and catecholaminergic phenotypes. *J. Comp. Neurol.* 459, 90-111.
- Baram D., Linial M., Mekori Y.A., and Sagi-Eisenberg R. 1998. Ca²⁺-dependent exocytosis in mast cells is stimulated by the Ca²⁺ sensor, synaptotagmin I. *J. Immunol.* 161, 5120-5123.
- Baram D., Mekori Y.A., and Sagi-Eisenberg R. 2001. Synaptotagmin regulates mast cell functions. *Immunol. Rev.* 179, 25-34.
- Baranano D.E., Ferris C.D., and Snyder S.H. 2001. Atypical neural messengers. *Trends Neurosci.* 24, 99-106.
- Benarroch E.E. 2007. Enteric nervous system: functional organization and neurologic implications. *Neurology* 69, 1953-1957.
- Biedler J.L., Helson L., and Spengler B.A. 1973. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* 33, 2643-2652.
- Bloom F.E. 1988. Neurotransmitters: past, present, and future directions. *FASEB J.* 2, 32-41.
- Borda T., Perez R.R., Joensen L., Gomez R.M., and Sterin-Borda L. 2002. Antibodies against cerebral M1 cholinergic muscarinic receptor from schizophrenic patients: molecular interaction. *J. Immunol.* 168, 3667-3674.
- Borovikova L.V., Ivanova S., Zhang M., Yang H., Botchkina G.I., Watkins L.R., Wang H., Abumrad N., Eaton J.W., and Tracey K.J. 2000. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405, 458-462.

- Brochier C., Gaillard M.C., Diguët E., Caudy N., Dossat C., Segurens B., Wincker P., Roze E., Caboche J., Hantraye P., Brouillet E., Elalouf J.M., and de C.M. 2008. Quantitative gene expression profiling of mouse brain regions reveals differential transcripts conserved in human and affected in disease models. *Physiol. Genomics* 33, 170-179.
- Burger P.M., Hell J., Mehl E., Krasel C., Lottspeich F., and Jahn R. 1991. GABA and glycine in synaptic vesicles: storage and transport characteristics. *Neuron* 7, 287-293.
- Burré J., Beckhaus T., Schagger H., Corvey C., Hofmann S., Karas M., Zimmermann H., and Volkandt W. 2006. Analysis of the synaptic vesicle proteome using three gel-based protein separation techniques. *Proteomics* 6, 6250-6262.
- Burré J., Beckhaus T., Corvey C., Karas M., Zimmermann H., and Volkandt W. 2006. Synaptic vesicle proteins under conditions of rest and activation: analysis by 2-D difference gel electrophoresis. *Electrophoresis* 27, 3488-3496.
- Burré J. and Volkandt W. 2007. The synaptic vesicle proteome. *J. Neurochem.* 101, 1448-1462.
- Chen H., Centola M., Altschul S.F., and Metzger H. 1998. Characterization of gene expression in resting and activated mast cells. *J. Exp. Med.* 188, 1657-1668.
- Choi K.L. and Claman H.N. 1987. Mast cells, fibroblasts, and fibrosis. New clues to the riddle of mast cells. *Immunol. Res.* 6, 145-152.
- Colgan L., Liu H., Huang S.Y., and Liu Y.J. 2007. Dileucine motif is sufficient for internalization and synaptic vesicle targeting of vesicular acetylcholine transporter. *Traffic* 8, 512-522.
- Craddock A.L., Love M.W., Daniel R.W., Kirby L.C., Walters H.C., Wong M.H., and Dawson P.A. 1998. Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am. J. Physiol.* 274, G157-G169.
- Cruz-Muros I., Afonso-Oramas D., Abreu P., Rodriguez M., Gonzalez M.C., and Gonzalez-Hernandez T. 2008. Deglycosylation and subcellular redistribution of VMAT2 in the mesostriatal system during normal aging. *Neurobiol. Aging* 29, 1702-1711.
- Dani J.A. and Bertrand D. 2007. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 699-729.
- de Giorgio R., Su D., Peter D., Edwards R.H., Brecha N.C., and Sternini C. 1996. Vesicular monoamine transporter 2 expression in enteric neurons and enterochromaffin-like cells of the rat. *Neurosci. Lett.* 217, 77-80.
- Diez-Sampedro A., Hirayama B.A., Osswald C., Gorboulev V., Baumgarten K., Volk C., Wright E.M., and Koepsell H. 2003. A glucose sensor hiding in a family of transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100, 11753-11758.
- Disbrow J.K., Gershten M.J., and Ruth J.A. 1982. Uptake of L-[3H] glutamic acid by crude and purified synaptic vesicles from rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108, 1221-1227.

Döring B. 2009. Molekulare und funktionelle Charakterisierung des humanen Natrium-dependent organic anion transporters (SOAT). Dissertationsschrift am Institut für Biochemie der Ernährung, Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Ehrlich P. 1878. I. Teil: Die chemische Auffassung der Färbung. II. Teil: Die Anilinfarben in chemischer, technologischer und histologischer Beziehung. *Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. Test (Hrsg.), Leipzig.*

Eiden L.E. 1998. The cholinergic gene locus. *J. Neurochem.* 70, 2227-2240.

Eiden L.E., Schäfer M.K., Weihe E., and Schütz B. 2004. The vesicular amine transporter family (SLC18): amine/proton antiporters required for vesicular accumulation and regulated exocytotic secretion of monoamines and acetylcholine. *Pflugers Arch.* 447, 636-640.

Eisenhofer G. 2001. The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines. *Pharmacol. Ther.* 91, 35-62.

Elhamdani A., Azizi F., and Artalejo C.R. 2006. Double patch clamp reveals that transient fusion (kiss-and-run) is a major mechanism of secretion in calf adrenal chromaffin cells: high calcium shifts the mechanism from kiss-and-run to complete fusion. *J. Neurosci.* 26, 3030-3036.

Engel K., Zhou M., and Wang J. 2004. Identification and characterization of a novel monoamine transporter in the human brain. *J. Biol. Chem.* 279, 50042-50049.

Erickson J.D., Eiden L.E., and Hoffman B.J. 1992. Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 89, 10993-10997.

Erickson J.D. and Eiden L.E. 1993. Functional identification and molecular cloning of a human brain vesicle monoamine transporter. *J. Neurochem.* 61, 2314-2317.

Erickson J.D., Schäfer M.K., Bonner T.I., Eiden L.E., and Weihe E. 1996. Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93, 5166-5171.

Fasshauer D. 2003. Structural insights into the SNARE mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1641, 87-97.

Fei H., Grygoruk A., Brooks E.S., Chen A., and Krantz D.E. 2008. Trafficking of vesicular neurotransmitter transporters. *Traffic* 9, 1425-1436.

Ferguson S.M., Savchenko V., Apparsundaram S., Zwick M., Wright J., Heilman C.J., Yi H., Levey A.I., and Blakely R.D. 2003. Vesicular localization and activity-dependent trafficking of presynaptic choline transporters. *J. Neurosci.* 23, 9697-9709.

Fernandes C.F., Godoy J.R., Döring B., Cavalcanti M.C., Bergmann M., Petzinger E., and Geyer J. 2007. The novel putative bile acid transporter SLC10A5 is highly expressed in liver and kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 361, 26-32.

Fernandes C.F. 2007. Molecular Characterization and Expression of Two New Members of the SLC10 Transporter Family: SLC10A4 and SLC10A5. Dissertationsschrift am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Fibiger H.C. 1991. Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: a review of recent evidence. *Trends Neurosci.* 14, 220-223.

Fokkens W.J., Vinke J.G., and KleinJan A. 2000. Local IgE production in the nasal mucosa: a review. *Am. J. Rhinol.* 14, 299-303.

Friesema E.C., Docter R., Moerings E.P., Stieger B., Hagenbuch B., Meier P.J., Krenning E.P., Hennemann G., and Visser T.J. 1999. Identification of thyroid hormone transporters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254, 497-501.

Fujita K., Lazarovici P., and Guroff G. 1989. Regulation of the differentiation of PC12 pheochromocytoma cells. *Environ. Health Perspect.* 80, 127-142.

Fykse E.M. and Fonnum F. 1988. Uptake of gamma-aminobutyric acid by a synaptic vesicle fraction isolated from rat brain. *J. Neurochem.* 50, 1237-1242.

Gasnier B. 2004. The SLC32 transporter, a key protein for the synaptic release of inhibitory amino acids. *Pflugers Arch.* 447, 756-759.

Geyer J., Godoy J.R., and Petzinger E. 2004. Identification of a sodium-dependent organic anion transporter from rat adrenal gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316, 300-306.

Geyer J., Wilke T., and Petzinger E. 2006. The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 372, 413-431.

Geyer J., Döring B., Meerkamp K., Ugele B., Bakhiya N., Fernandes C.F., Godoy J.R., Glatt H., and Petzinger E. 2007. Cloning and functional characterization of human sodium-dependent organic anion transporter (SLC10A6). *J. Biol. Chem.* 282, 19728-19741.

Geyer J., Fernandes C.F., Döring B., Burger S., Godoy J.R., Rafalzik S., Hübschle T., Gerstberger R., and Petzinger E. 2008. Cloning and molecular characterization of the orphan carrier protein Slc10a4: expression in cholinergic neurons of the rat central nervous system. *Neuroscience* 152, 990-1005.

Ghosh K.K., Bujan S., Haverkamp S., Feigenspan A., and Wässle H. 2004. Types of bipolar cells in the mouse retina. *J. Comp. Neurol.* 469, 70-82.

Godoy J.R., Fernandes C., Döring B., Beuerlein K., Petzinger E., and Geyer J. 2007. Molecular and phylogenetic characterization of a novel putative membrane transporter (SLC10A7), conserved in vertebrates and bacteria. *Eur. J. Cell Biol.* 86, 445-460.

Goodall A.R., Danks K., Walker J.H., Ball S.G., and Vaughan P.F. 1997. Occurrence of two types of secretory vesicles in the human neuroblastoma SH-SY5Y. *J. Neurochem.* 68, 1542-1552.

- Grando S.A., Pittelkow M.R., and Schallreuter K.U. 2006. Adrenergic and cholinergic control in the biology of epidermis: physiological and clinical significance. *J. Invest. Dermatol.* 126, 1948-1965.
- Gwilt C.R., Donnelly L.E., and Rogers D.F. 2007. The non-neuronal cholinergic system in the airways: an unappreciated regulatory role in pulmonary inflammation? *Pharmacol. Ther.* 115, 208-222.
- Hagenbuch B., Lubbert H., Stieger B., and Meier P.J. 1990. Expression of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* 265, 5357-5360.
- Hagenbuch B., Stieger B., Foguet M., Lübbert H., and Meier P.J. 1991. Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransport system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88, 10629-10633.
- Hagenbuch B. and Meier P.J. 1994. Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter. *J. Clin. Invest.* 93, 1326-1331.
- Hagenbuch B. and Dawson P. 2004. The sodium bile salt cotransport family SLC10. *Pflugers Arch.* 447, 566-570.
- Harrington A.M., Lee M., Ong S.Y., Yong E., Farmer P., Peck C.J., Chow C.W., Hutson J.M., and Southwell B.R. 2010. Immunoreactivity for high-affinity choline transporter colocalises with VAChT in human enteric nervous system. *Cell Tissue Res.* 341, 33-48.
- Hasan W. and Smith P.G. 2009. Modulation of rat parasympathetic cardiac ganglion phenotype and NGF synthesis by adrenergic nerves. *Auton. Neurosci.* 145, 17-26.
- Haverkamp S., Specht D., Majumdar S., Zaidi N.F., Brandstätter J.H., Wasco W., Wässle H., and Tom D.S. 2008. Type 4 OFF cone bipolar cells of the mouse retina express calsenilin and contact cones as well as rods. *J. Comp. Neurol.* 507, 1087-1101.
- He L., Vasiliou K., and Nebert D.W. 2009. Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. *Hum. Genomics* 3, 195-206.
- Headley D.B., Suhan N.M., and Horn J.P. 2007. Different subcellular distributions of the vesicular monoamine transporter, VMAT2, in subclasses of sympathetic neurons. *Brain Res.* 1129, 156-160.
- Hediger M.A., Romero M.F., Peng J.B., Rolfs A., Takanaga H., and Bruford E.A. 2004. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Pflugers Arch.* 447, 465-468.
- Hirota C.L. and McKay D.M. 2006. Cholinergic regulation of epithelial ion transport in the mammalian intestine. *Br. J. Pharmacol.* 149, 463-479.

- Hoard J.L., Hoover D.B., Mabe A.M., Blakely R.D., Feng N., and Paolucci N. 2008. Cholinergic neurons of mouse intrinsic cardiac ganglia contain noradrenergic enzymes, norepinephrine transporters, and the neurotrophin receptors tropomyosin-related kinase A and p75. *Neuroscience* 156, 129-142.
- Horiuchi Y., Kimura R., Kato N., Fujii T., Seki M., Endo T., Kato T., and Kawashima K. 2003. Evolutional study on acetylcholine expression. *Life Sci.* 72, 1745-1756.
- Hu Z.Q., Zhao W.H., and Shimamura T. 2007. Regulation of mast cell development by inflammatory factors. *Curr. Med. Chem.* 14, 3044-3050.
- Jena B.P., Cho S.J., Jeremic A., Stromer M.H., and Abu-Hamdah R. 2003. Structure and composition of the fusion pore. *Biophys. J.* 84, 1337-1343.
- Jørgensen J.R., Juliusson B., Henriksen K.F., Hansen C., Knudsen S., Petersen T.N., Blom N., Seiger A., and Wahlberg L.U. 2006. Identification of novel genes regulated in the developing human ventral mesencephalon. *Exp. Neurol.* 198, 427-437.
- Krnjevic K. 1984. Chemical Nature of Synaptic Transmission in Vertebrates. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS*.
- Kambayashi T., Allenspach E.J., Chang J.T., Zou T., Shoag J.E., Reiner S.L., Caton A.J., and Koretzky G.A. 2009. Inducible MHC class II expression by mast cells supports effector and regulatory T cell activation. *J. Immunol.* 182, 4686-4695.
- Kanner, Kavanaugh, and Bendahan 2001. Neurotransmitter Transporters: Molecular Mechanism and Regulation. *Biochemical Society Transactions*.
- Kirkpatrick C.J., Bittinger F., Unger R.E., Kriegsmann J., Kilbinger H., and Wessler I. 2001. The non-neuronal cholinergic system in the endothelium: evidence and possible pathobiological significance. *Jpn. J. Pharmacol.* 85, 24-28.
- Kish P.E., Fischer-Bovenkerk C., and Ueda T. 1989. Active transport of gamma-aminobutyric acid and glycine into synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 86, 3877-3881.
- Kitamura Y., Kasugai T., Arizono N., and Matsuda H. 1993. Development of mast cells and basophils: processes and regulation mechanisms. *Am. J. Med. Sci.* 306, 185-191.
- Klapproth H., Reinheimer T., Metzen J., Münch M., Bittinger F., Kirkpatrick C.J., Höhle K.D., Schemann M., Racké K., and Wessler I. 1997. Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 355, 515-523.
- Koulen P. 1997. Vesicular acetylcholine transporter (VAChT): a cellular marker in rat retinal development. *Neuroreport* 8, 2845-2848.
- Kramer W., Stengelin S., Baringhaus K.H., Enhnen A., Heuer H., Becker W., Corsiero D., Girbig F., Noll R., and Weyland C. 1999. Substrate specificity of the ileal and the hepatic Na(+)/bile acid cotransporters of the rabbit. I. Transport studies with membrane vesicles and cell lines expressing the cloned transporters. *J. Lipid Res.* 40, 1604-1617.

- Krantz D.E., Waites C., Oorschot V., Liu Y., Wilson R.I., Tan P.K., Klumperman J., and Edwards R.H. 2000. A phosphorylation site regulates sorting of the vesicular acetylcholine transporter to dense core vesicles. *J. Cell Biol.* 149, 379-396.
- Kullak-Ublick G.A., Hagenbuch B., Stieger B., Wolkoff A.W., and Meier P.J. 1994. Functional characterization of the basolateral rat liver organic anion transporting polypeptide. *Hepatology* 20, 411-416.
- Kullak-Ublick G.A., Stieger B., and Meier P.J. 2004. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* 126, 322-342.
- Kummer W., Lips K.S., and Pfeil U. 2008. The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochem. Cell Biol.* 130, 219-234.
- Kunz L., Thalhammer A., Berg F.D., Berg U., Duffy D.M., Stouffer R.L., Dissen G.A., Ojeda S.R., and Mayerhofer A. 2002. Ca²⁺-activated, large conductance K⁺ channel in the ovary: identification, characterization, and functional involvement in steroidogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 5566-5574.
- Lee, Choi Y., Jung E., Yin H., Kwon J., Kim J.E., Im H., Cho M., Kim J.H., and Lee 2010. Genomics-based screening of differentially expressed genes in the brains of mice exposed to silver nanoparticles via inhalation. *J. Nanopart. Res.*
- Lein E.S., Hawrylycz M.J., Ao N., et al. 2007. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445, 168-176.
- Li H., Waites C.L., Staal R.G., Dobryy Y., Park J., Sulzer D.L., and Edwards R.H. 2005. Sorting of vesicular monoamine transporter 2 to the regulated secretory pathway confers the somatodendritic exocytosis of monoamines. *Neuron* 48, 619-633.
- Lips K.S., Wunsch J., Zarghooni S., Bschiepfer T., Schukowski K., Weidner W., Wessler I., Schwantes U., Koepsell H., and Kummer W. 2007. Acetylcholine and molecular components of its synthesis and release machinery in the urothelium. *Eur. Urol.* 51, 1042-1053.
- Liu Y. and Edwards R.H. 1997. Differential localization of vesicular acetylcholine and monoamine transporters in PC12 cells but not CHO cells. *J. Cell Biol.* 139, 907-916.
- Lopez-Munoz F. and Alamo C. 2009. Historical evolution of the neurotransmission concept. *J. Neural Transm.* 116, 515-533.
- Löscher W. 2002. Pharmakologie des vegetativen (autonomen) Nervensystems. In: *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin.*
- Luqmani Y.A. 1981. Nucleotide uptake by isolated cholinergic synaptic vesicles: evidence for a carrier of adenosine 5'-triphosphate. *Neuroscience* 6, 1011-1021.
- Masland R.H. 2001. The fundamental plan of the retina. *Nat. Neurosci.* 4, 877-886.
- Masson J., Sagne C., Hamon M., and El Mestikawy S. 1999. Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacol. Rev.* 51, 439-464.

- Metcalf D.D., Baram D., and Mekori Y.A. 1997. Mast cells. *Physiol. Rev.* 77, 1033-1079.
- Metz M., Grimaldeston M.A., Nakae S., Piliponsky A.M., Tsai M., and Galli S.J. 2007. Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation. *Immunol. Rev.* 217, 304-328.
- Mikkelsen T., Brodie C., Finniss S., Berens M.E., Rennert J.L., Nelson K., Lemke N., Brown S.L., Hahn D., Neuteboom B., and Goodman S.L. 2009. Radiation sensitization of glioblastoma by cilengitide has unanticipated schedule-dependency. *Int. J. Cancer* 124, 2719-2727.
- Millhorn D.E., Bayliss D.A., Erickson J.T., Gallman E.A., Szymeczek C.L., Czyzyk-Krzeska M., and Dean J.B. 1989. Cellular and molecular mechanisms of chemical synaptic transmission. *Am. J. Physiol.* 257, L289-L310.
- Mittler D. 2003. Cholesterol und der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex. Dissertationsschrift am Institut für Anatomie der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität Berlin.
- Morales M.A., Holmberg K., Xu Z.Q., Cozzari C., Hartman B.K., Emson P., Goldstein M., Elfvin L.G., and Hökfelt T. 1995. Localization of choline acetyltransferase in rat peripheral sympathetic neurons and its coexistence with nitric oxide synthase and neuropeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 92, 11819-11823.
- Morciano M., Burré J., Corvey C., Karas M., Zimmermann H., and Volkandt W. 2005. Immunolocalization of two synaptic vesicle pools from synaptosomes: a proteomics analysis. *J. Neurochem.* 95, 1732-1745.
- Njus D. and Radda G.K. 1978. Bioenergetic processes in chromaffin granules a new perspective on some old problems. *Biochim. Biophys. Acta* 463, 219-244.
- Njus D., Kelley P.M., and Harnadek G.J. 1986. Bioenergetics of secretory vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 853, 237-265.
- O'Malley D.M., Sandell J.H., and Masland R.H. 1992. Co-release of acetylcholine and GABA by the starburst amacrine cells. *J. Neurosci.* 12, 1394-1408.
- Okuda T. and Haga T. 2000. Functional characterization of the human high-affinity choline transporter. *FEBS Lett.* 484, 92-97.
- Pankratov Y., Lalo U., Verkhratsky A., and North R.A. 2006. Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Arch.* 452, 589-597.
- Paumet F., Le M.J., Martin S., Galli T., David B., Blank U., and Roa M. 2000. Soluble NSF attachment protein receptors (SNAREs) in RBL-2H3 mast cells: functional role of syntaxin 4 in exocytosis and identification of a vesicle-associated membrane protein 8-containing secretory compartment. *J. Immunol.* 164, 5850-5857.
- Peter D., Liu Y., Sternini C., de G.R., Brecha N., and Edwards R.H. 1995. Differential expression of two vesicular monoamine transporters. *J. Neurosci.* 15, 6179-6188.

- Pickett J.A. and Edwardson J.M. 2006. Compound exocytosis: mechanisms and functional significance. *Traffic* 7, 109-116.
- Reimer R.J. and Edwards R.H. 2004. Organic anion transport is the primary function of the SLC17/type I phosphate transporter family. *Pflugers Arch.* 447, 629-635.
- Ribeiro F.M., Pinthong M., Black S.A., Gordon A.C., Prado V.F., Prado M.A., Rylett R.J., and Ferguson S.S. 2007. Regulated recycling and plasma membrane recruitment of the high-affinity choline transporter. *Eur. J. Neurosci.* 26, 3437-3448.
- Richards D.S. 2009. Characterization of Excitatory Amino Acid Neurotransmitters at Motoneuron Synapses contacting Renshaw cells. PhD theses at Wright State University School of Graduate Studies, Dayton, USA.
- Roghani A., Shirzadi A., Butcher L.L., and Edwards R.H. 1998. Distribution of the vesicular transporter for acetylcholine in the rat central nervous system. *Neuroscience* 82, 1195-1212.
- Ross R.A., Spengler B.A., and Biedler J.L. 1983. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 71, 741-747.
- Sagi-Eisenberg R. 2007. The mast cell: where endocytosis and regulated exocytosis meet. *Immunol. Rev.* 217, 292-303.
- Salio C., Lossi L., Ferrini F., and Merighi A. 2006. Neuropeptides as synaptic transmitters. *Cell Tissue Res.* 326, 583-598.
- Sang Q. and Young H.M. 1998. The identification and chemical coding of cholinergic neurons in the small and large intestine of the mouse. *Anat. Rec.* 251, 185-199.
- Sawada K., Echigo N., Juge N., Miyaji T., Otsuka M., Omote H., Yamamoto A., and Moriyama Y. 2008. Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 105, 5683-5686.
- Sawaguchi A., Idate Y., Ide S., Kawano J., Nagaike R., Oinuma T., and Sukanuma T. 1999. Multistratified expression of polysialic acid and its relationship to VAcHT-containing neurons in the inner plexiform layer of adult rat retina. *J. Histochem. Cytochem.* 47, 919-928.
- Schäfer M.K., Weihe E., Varoqui H., Eiden L.E., and Erickson J.D. 1994. Distribution of the vesicular acetylcholine transporter (VAcHT) in the central and peripheral nervous systems of the rat. *J. Mol. Neurosci.* 5, 1-26.
- Schäfer M.K., Eiden L.E., and Weihe E. 1998a. Cholinergic neurons and terminal fields revealed by immunohistochemistry for the vesicular acetylcholine transporter. I. Central nervous system. *Neuroscience* 84, 331-359.
- Schäfer M.K., Eiden L.E., and Weihe E. 1998b. Cholinergic neurons and terminal fields revealed by immunohistochemistry for the vesicular acetylcholine transporter. II. The peripheral nervous system. *Neuroscience* 84, 361-376.

Schneggenburger R. and Neher E. 2000. Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse. *Nature* 406, 889-893.

Seal R.P., Leighton B.H., and 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.

Shioi J., Naito S., and Ueda T. 1989. Glutamate uptake into synaptic vesicles of bovine cerebral cortex and electrochemical potential difference of proton across the membrane. *Biochem. J.* 258, 499-504.

Shneider B.L., Dawson P.A., Christie D.M., Hardikar W., Wong M.H., and Suchy F.J. 1995. Cloning and molecular characterization of the ontogeny of a rat ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J. Clin. Invest.* 95, 745-754.

Shneider B.L. 2001. Intestinal bile acid transport: biology, physiology, and pathophysiology. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 32, 407-417.

Shukla A., Berglund L., Nielsen L.P., Nielsen S., Hoffmann H.J., and Dahl R. 2001. Regulated exocytosis in immune function: are SNARE-proteins involved? *Respir. Med.* 95, 773-780.

Snyder S.H. and Ferris C.D. 2000. Novel neurotransmitters and their neuropsychiatric relevance. *Am. J. Psychiatry* 157, 1738-1751.

Söllner T., Bennett M.K., Whiteheart S.W., Scheller R.H., and Rothman J.E. 1993. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75, 409-418.

Splinter P.L., Lazaridis K.N., Dawson P.A., and LaRusso N.F. 2006. Cloning and expression of SLC10A4, a putative organic anion transport protein. *World J. Gastroenterol.* 12, 6797-6805.

Stieger B., Hagenbuch B., Landmann L., Höchli M., Schroeder A., and Meier P.J. 1994. In situ localization of the hepatocytic Na⁺/Taurocholate cotransporting polypeptide in rat liver. *Gastroenterology* 107, 1781-1787.

Sudheer P.S., Hall J.E., Donev R., Read G., Rowbottom A., and Williams P.E. 2006. Nicotinic acetylcholine receptors on basophils and mast cells. *Anaesthesia* 61, 1170-1174.

Tabb J.S., Kish P.E., Van Dyke R., and Ueda T. 1992. Glutamate transport into synaptic vesicles. Roles of membrane potential, pH gradient, and intravesicular pH. *J. Biol. Chem.* 267, 15412-15418.

Takamori S., Holt M., Stenius K., Lemke E.A., Grønborg M., Riedel D., Urlaub H., Schenck S., Brügger B., Ringler P., Müller S.A., Rammner B., Gräter F., Hub J.S., De Groot B.L., Mieskes G., Moriyama Y., Klingauf J., Grubmüller H., Heuser J., Wieland F., and Jahn R. 2006. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127, 831-846.

Theoharides T.C. and Conti P. 2004. Mast cells: the Jekyll and Hyde of tumor growth. *Trends Immunol.* 25, 235-241.

Theoharides T.C. and Kalogeromitros D. 2006. The critical role of mast cells in allergy and inflammation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1088, 78-99.

Toll L. and Howard B.D. 1980. Evidence that an ATPase and a protonmotive force function in the transport of acetylcholine into storage vesicles. *J. Biol. Chem.* 255, 1787-1789.

Torres G.E., Gainetdinov R.R., and Caron M.G. 2003. Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 13-25.

Varoqui H., Schäfer M.K., Zhu H., Weihe E., and Erickson J.D. 2002. Identification of the differentiation-associated Na⁺/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J. Neurosci.* 22, 142-155.

Visser W.E., Wong W.S., van Mullem A.A., Friesema E.C., Geyer J., and Visser T.J. 2010. Study of the transport of thyroid hormone by transporters of the SLC10 family. *Mol. Cell Endocrinol.* 315, 138-145.

Waites C.L., Mehta A., Tan P.K., Thomas G., Edwards R.H., and Krantz D.E. 2001. An acidic motif retains vesicular monoamine transporter 2 on large dense core vesicles. *J. Cell Biol.* 152, 1159-1168.

Watabe M. and Nakaki T. 2008. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone inhibits and redistributes vesicular monoamine transporter 2 via nitration in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Mol. Pharmacol.* 74, 933-940.

Wässle H. and Brandstätter J.H. 2003. Die synaptischen Verschaltungen in der Netzhaut. Max Planck Institut für Hirnforschung, Neuroanatomie.

Wedemeyer J., Tsai M., and Galli S.J. 2000. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 624-631.

Weihe E. and Eiden L.E. 2000. Chemical neuroanatomy of the vesicular amine transporters. *FASEB J.* 14, 2435-2449.

Wessler I., Kirkpatrick C.J., and Racké K. 1998. Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. *Pharmacol. Ther.* 77, 59-79.

Wessler I., Kirkpatrick C.J., and Racké K. 1999. The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26, 198-205.

Wessler I., Roth E., Deutsch C., Brockerhoff P., Bittinger F., Kirkpatrick C.J., and Kilbinger H. 2001. Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters. *Br. J. Pharmacol.* 134, 951-956.

Wessler I., Kilbinger H., Bittinger F., Unger R., and Kirkpatrick C.J. 2003. The non-neuronal cholinergic system in humans: expression, function and pathophysiology. *Life Sci.* 72, 2055-2061.

- Wessler I. and Kirkpatrick C.J. 2008. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br. J. Pharmacol.* 154, 1558-1571.
- Wessler I.K. and Kirkpatrick C.J. 2001. The Non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 14, 423-434.
- Williams C.M. and Galli S.J. 2000. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105, 847-859.
- Winkler H. 1976. The composition of adrenal chromaffin granules: an assessment of controversial results. *Neuroscience* 1, 65-80.
- Wong M.H., Oelkers P., Craddock A.L., and Dawson P.A. 1994. Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J. Biol. Chem.* 269, 1340-1347.
- Yoshida M., Inadome A., Maeda Y., Satoji Y., Masunaga K., Sugiyama Y., and Murakami S. 2006. Non-neuronal cholinergic system in human bladder urothelium. *Urology* 67, 425-430.
- Zheng Y., Cai X., Luo X., Hu Z., and Jing Z. 2008. Characterization of a new gene (SLC10) with a spliced leader from *Taenia solium*. *Vet. J.* 175, 96-101.
- Zhou Q., Li J., Wang H., Yin Y., and Zhou J. 2009. Identification of nigral dopaminergic neuron-enriched genes in adult rats. *Neurobiol. Aging*
- Zhou Z.J. and Lee S. 2008. Synaptic physiology of direction selectivity in the retina. *J. Physiol.* 586, 4371-4376.

9. DANKSAGUNGEN

Zum Schluss, aber nicht zuletzt, möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt dabei Prof. Dr. Joachim Geyer, der mir dieses interessante Thema zur Verfügung gestellt hat. Danke für die vielen konstruktiven Ideen, Diskussionen, Vorschläge, Pläne und Visionen und die einfach rundum gute Betreuung während meiner Doktorarbeit! Danke für die Begeisterung an der Wissenschaft, die er mir vermittelt hat. Vielen Dank auch für die Möglichkeit, zahlreiche Kongresse und Symposien zu besuchen und dort meine Ergebnisse zu präsentieren.

Ich danke Prof. Dr. Ernst Petzinger, der mich an seinem Institut aufgenommen und meine Arbeit immer unterstützt hat. Sein breites Wissen und fachliche Kompetenz ließen mich oftmals die Dinge aus einem anderen Blickwinkel betrachten. Seine tiermedizinischen und jagdlichen Anekdoten waren eine Bereicherung des wissenschaftlichen Alltags!

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger und sein Team am Institut für Veterinär-Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Möglichkeit, in seinen Laboren arbeiten zu können und die freundliche Unterstützung bei allen Fragen! Besonders möchte ich mich bei Doreen Marks, Daniela Ott und Bärbel Reuter für ihre praktische Hilfe bei der Durchführung der immunhistologischen Experimente bedanken!

Ich danke Dr. Martin Hardt, Sabine Agel und Anna Möbus von der Zentralen Biotechnischen Betriebseinheit der Universität Gießen für den Einblick in die Welt des Mikrokosmos, sprich für die Hilfe bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung meiner Proben!

Ein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Katrin S. Lips aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie bzw. dem Labor für experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Ko-Betreuung in der *International Giessen Graduate School for the Life Sciences*!

Ich danke Prof. Lips, Dr. Julia Wunsch und Christian Illig für die produktive Kooperation bei der Untersuchung des non-neuronalen Acetylcholinsystems!

Ein großer Dank geht auch an Dr. Knut Beuerlein und Petra Kronich vom Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie der Universität Gießen für die konstruktive Zusammenarbeit und die Hilfe bei der oft nervenaufreibenden Arbeit an den „Mastis“!

Ich möchte mich von Herzen bei all meinen Kollegen am Institut für Pharmakologie und Toxikologie bedanken! Zuallererst und in besonderem Maße danke ich Dr. Barbara Döring, meiner Zimmergenossin in „unserer“ 628. Mit ihr habe ich Freud und Leid meiner Zeit als Doktorandin geteilt, sie hatte immer ein offenes Ohr für Fragen und Probleme und stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite. Vielen, vielen Dank für die Einblicke in deine Arbeit und für die vielen Stunden, die du zur Korrektur meiner Arbeit sicherlich aufwenden musstest!

Außerdem möchte ich mich besonders bei Regina Leidolf für ihre Hilfe bei den nicht enden wollenden Vesikelpräparationen, Western Blots und Immunpräzipitationen bedanken. Vielen Dank an Klaus Schuh für die Arbeit in der Zellkultur und die Erledigung der vielen alltäglichen Aufgaben, die immer dann auffallen, wenn er nicht da ist. Ich danke Julia Aretz für das Korrekturlesen meiner Arbeit, Christoph Zimmermann für seine kompetente technische Unterstützung und Dorothee von Schnakenburg für ihre praktische Hilfe bei allen bürokratischen Angelegenheiten!

Ich danke allen Kollegen für die schöne und angenehme Zusammenarbeit, für die gegenseitige Hilfsbereitschaft, für die großen Runden am Mittagstisch und die nachmittäglichen Plauschs auf dem Flur, im Sozialraum oder wo man sich sonst so getroffen hat.

Meinen lieben Freunden Sascha, Katrin, Carmen, Uli, Oppis, Mudel und Torben, Tina und Goar, Diana und Ralf danke ich für die vielen schönen Stunden, die wir gemeinsam verbracht haben, die gemütlichen Spaziergänge und die oft stundenlangen Telefonate!

Mein größter Dank gilt meiner Familie, vor allem meinen Eltern Alfred und Marlies, die mich während meines Studiums und in der Zeit meiner Doktorarbeit immer unterstützt haben! Ohne ihre Liebe, Zuversicht und Hilfe wäre ich heute nicht da, wo ich angekommen bin. Sie haben mich gelehrt, schöne Zeiten zu genießen und in schweren Zeiten immer mit Optimismus in die Zukunft zu blicken!

Nicht zuletzt danke ich meinem Schatz Enrico für seine Liebe, seinen unerschütterlichen Glauben an die Zukunft und den Halt, den er mir gibt! Hier steht er zwar an letzter, in meinem Herzen aber immer an erster Stelle!

Diese Arbeit wurde von dem DFG-Projekt GE 1921/3-1 gefördert

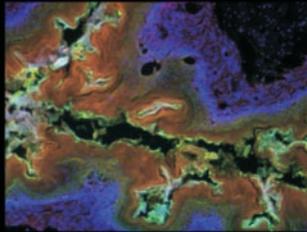
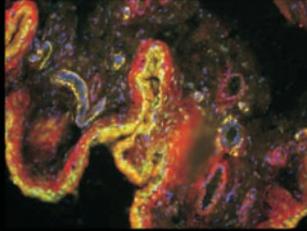
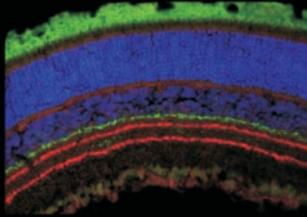
10. ERKLÄRUNG

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation

**„Lokalisation des *orphan carriers* SLC10A4 im zentralen und peripheren
Nervensystem und seine Koexpression mit den vesikulären
Neurotransmitter Transportern VACHT und VMAT2“**

selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Simone Elisabeth Burger



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5713-8



9 783835 957138