

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik D, Experimentelle Nephrologie
Direktor: Univ.-Prof Dr. H. Pavenstädt

Aufschlüsselung des Proteoms von organischen
Kationentransportern:
Identifizierung und funktionelle Implikationen des *lysosomal
associated protein transmembrane 4 alpha* (LAPTM4A) als
neuen Interaktionspartner des humanen organischen
Kationentransporters 2 (hOCT2)

Inaugural – Dissertation
zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Universität Graz

vorgelegt von:

Alexander Grabner

Münster in Westfalen, 2008

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	- 1 -
2	EINLEITUNG.....	- 3 -
2.1	ORGANISCHE KATIONEN.....	- 3 -
2.2	TRANSPORTSYSTEME UND TRANSPORT ORGANISCHER KATIONEN	- 4 -
2.3	NIERE	- 7 -
2.4	ORGANISCHER KATIONENTRANSPORT IM PROXIMALEN TUBULUS.....	- 9 -
2.5	DIE ELEKTROGENEN ORGANISCHEN KATIONENTRANSPORTER OCT1 OCT2 UND OCT3.....	- 10 -
2.6	REGULATION DES ORGANISCHEN KATIONENTRANSPORTERS HOCT2.....	- 13 -
2.7	ZIEL	- 15 -
3	MATERIAL	- 16 -
3.1	ORGANISMEN.....	- 16 -
3.2	PLASMIDE UND OLIGONUCLEOTIDE	- 16 -
3.3	ANTIKÖRPER.....	- 18 -
3.3.1	Primäre Antikörper.....	- 18 -
3.3.2	Sekundäre Antikörper.....	- 19 -
3.4	KULTURMEDIEN.....	- 20 -
3.4.1	Kulturmedien für Bakterien.....	- 20 -
3.4.2	Kulturmedien für Hefen.....	- 20 -
3.4.3	Medien für Zellkulturen.....	- 22 -
3.5	LÖSUNGEN UND PUFFER	- 22 -
3.6	VERBRAUCHSMATERIAL	- 23 -
3.6.1	Verwendete Kits	- 23 -
3.6.2	Material zur Behandlung von Nukleinsäuren.....	- 24 -
3.6.3	Material für SDS-PAGE und Westernblot.....	- 24 -
3.6.4	Material für Transformation und Transfektion	- 25 -
4	METHODEN	- 26 -
4.1	ARBEITEN MIT DEM MATING BASED SPLIT UBIQUITIN SYSTEM (mBSUS).....	- 28 -
4.1.1	Grundlagen zum mBSUS	- 28 -
4.1.2	Herstellung der Konstrukte für die Protein-Proteininteraktionsanalysen.....	- 31 -
4.1.3	Herstellung von Hefezellen, die kompetent für die Aufnahme von DNA sind (kompetenten Hefezellen).....	- 32 -
4.1.4	Transformation kompetenter Hefezellen	- 33 -
4.1.5	Überprüfung der in vivo Klonierung.....	- 34 -
4.1.6	Mating.....	- 37 -
4.1.7	Protein-Proteininteraktion.....	- 37 -
4.1.8	Transformation der Human Kidney NubG-X cDNA Library und Interaktionscreen.....	- 39 -
4.1.9	Plasmid-DNA-Isolation aus <i>S. cerevisiae</i>	- 41 -
4.2	ARBEITEN MIT BAKTERIEN	- 41 -
4.2.1	Kultivierung von Bakterien	- 41 -
4.2.2	Bestimmung der optischen Dichte.....	- 42 -
4.2.3	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen mit der $CaCl_2$ Methode.....	- 42 -
4.2.4	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. Coli</i>	- 42 -
4.2.5	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. Coli</i> Minipräparation	- 43 -
4.2.6	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. Coli</i> Maxipräparation	- 44 -
4.3	ARBEITEN MIT NUKLEINSÄUREN	- 44 -
4.3.1	Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	- 44 -
4.3.2	Restriktion von DNA.....	- 47 -
4.3.3	Ligation von DNA	- 48 -
4.3.4	Aufreinigung von DNA mit dem DNA Clean and Concentrator Kit.....	- 49 -
4.3.5	Aufreinigung mit dem DNA Gel Recovery Kit.....	- 49 -
4.3.6	Sequenzierung von DNA.....	- 50 -
4.3.7	Elektrophoretische Trennung von DNA in Agarosegelen	- 51 -
4.3.8	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA.....	- 51 -
4.4	ARBEITEN MIT ZELLEN	- 52 -
4.4.1	Zelllinien	- 52 -
4.4.2	Zellkultur.....	- 53 -
4.4.3	Transfektion von HEK 293 Zellen.....	- 53 -
4.4.4	Herstellung von Zelllysaten.....	- 54 -

4.5	ARBEITEN MIT PROTEINEN.....	- 56 -
4.5.1	<i>Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	- 56 -
4.5.2	<i>Westernblot Analyse</i>	- 57 -
4.5.3	<i>Reversible Färbung der transferierten Proteine mit Ponceau S</i>	- 57 -
4.5.4	<i>Immundetektion von Proteinen nach dem Western Blotting</i>	- 58 -
4.5.5	<i>Pulldown Assay (in vitro Bindungsanalyse)</i>	- 59 -
4.6	FLUORESCENZMIKROSKOPIE	- 60 -
4.6.1	<i>Indirekte Immunfluoreszenz</i>	- 60 -
4.6.2	<i>Arbeiten mit autofluoreszierenden Proteinen</i>	- 61 -
4.7	FUNKTIONSMESSUNGEN.....	- 63 -
4.7.1	<i>Mikrofluorimetrische Messung des ASP⁺ Uptakes</i>	- 63 -
5	ERGEBNISSE	- 64 -
5.1	ERGEBNISSE DES MBSUS.....	- 64 -
5.1.1	<i>Interaktionsscreen</i>	- 65 -
5.2	AUSWAHL DES ZU UNTERSUCHENDEN INTERAKTIONSPARTNERS	- 67 -
5.3	<i>LYSOSOMAL ASSOCIATED PROTEIN TRANSMEMBRANE 4 ALPHA</i>	- 67 -
5.3.1	<i>Überprüfung der Interaktion im mbsUS</i>	- 67 -
5.3.2	<i>Expression von LPTM4A auf DNA Ebene</i>	- 69 -
5.3.3	<i>Expression von LPTM4A auf Protein Ebene und Nachweis im Westernblot</i>	- 70 -
5.3.4	<i>Nachweis von LPTM4A in der Immunfluoreszenz</i>	- 72 -
5.4	FLUORESCENZMIKROSKOPIE VON HOCT2-GFP UND LPTM4A	- 73 -
5.4.1	<i>Kolokalisation von hOCT2-GFP und LPTM4A-6.F9</i>	- 74 -
5.4.2	<i>Kolokalisation von hOCT2-GFP und LPTM4A-DsRed</i>	- 75 -
5.5	NACHWEIS DER INTERAKTION VON LPTM4A UND HOCT2 MITTELS <i>PULLDOWN ASSAYS</i>	- 77 -
5.5.1	<i>Bindung von LPTM4A an die Metal Affinity Beads</i>	- 77 -
5.5.2	<i>Nachweis von hOCT2 im Westernblot</i>	- 78 -
5.5.3	<i>Bestätigung der Interaktion von LPTM4A und hOCT2 mittels Pulldown Assays</i>	- 79 -
5.6	HEMMUNG DES ASP ⁺ UPTAKES IN DER MIKROFLUOMETRIE IN LPTM4A TRANSFIZIERTEN ZELLEN	- 80 -
6	DISKUSSION	- 83 -
6.1	IDENTIFIZIERUNG VON LPTM4A ALS INTERAKTIONSPARTNER DES HOCT2.....	- 83 -
6.2	FUNKTIONELLE ASPEKTE DER INTERAKTION ZWISCHEN LPTM4A UND HOCT2.....	- 85 -
6.3	AUSBLICK.....	- 86 -
7	ANHANG	- 104 -

1 Zusammenfassung

Der humane organische Kationentransporter 2 (hOCT2) ist ein transmembranäres Protein mit hoher renaler Expression, welches in den polyspezifischen Transport von endogenen und exogenen organischen Kationen (Monoaminsubstrate beziehungsweise Medikamente) involviert ist. In der Niere ist der hOCT2 an der basolateralen Membran von Zellen des proximalen Tubulus lokalisiert, wo er für den ersten Schritt der Ausscheidung von organischen Kationen verantwortlich ist. Es ist bereits bekannt, dass hOCT2 über mehrere verschiedene Signalwege reguliert werden kann. Daher ist die Identifizierung von Proteinen, die direkt mit dem hOCT2 interagieren von großer Bedeutung, um die Mechanismen der Funktion und Regulation des hOCT2 aufzuklären. Für die Identifizierung von neuen Interaktionspartnern wurde ein *mating based Split Ubiquitin Yeast-Two-Hybrid (Y-T-H) System* etabliert, welches im Gegensatz zu klassischen *Y-T-H* Techniken die Detektion von Interaktionen direkt in der Plasmamembran erlaubt. Mit Hilfe dieses Systems wurde das *lysosomal associated protein transmembrane 4 alpha* (LAPTM4A) als Interaktionspartner von hOCT2 identifiziert. Bei LAPTM4A handelt es sich um ein transmembranäres Protein welches mit Lysosomen und späten Endosomen assoziiert ist. Das Protein besitzt selbst Transportfähigkeit und ist am Transport einer Reihe von Substanzen, die auch als Substrate von organischen Kationentransportern bekannt sind, beteiligt und ist für die Kompartimentierung von amphiphilen Lösungen in der Zelle zuständig. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass LAPTM4A die Zellsensibilität gegenüber Medikamenten verändert (Ethidiumbromid, Östradiol). Die Interaktion von hOCT2 und LAPTM4A konnte in dieser Arbeit mit Hilfe eines *Pulldown Assays* bestätigt werden. Dafür wurde „His-getagtes“ LAPTM4A an *Talon Sepharose Beads* gekoppelt und mit einem Lysat von hOCT2 stabil exprimierenden HEK 293 Zellen inkubiert. Im anschließenden Westernblot konnte hOCT2 in den Eluaten nachgewiesen werden. Die Interaktion von hOCT2 und LAPTM4A hat auch eine funktionelle Relevanz. Die Transfektion von HEK 293 hOCT2 Zellen mit LAPTM4A führte zu einer signifikant verminderten Aufnahme des fluoreszierenden organischen Kations 4-4-Dimethylamino-Styryl-N-Methylpyridinium (ASP⁺) im Vergleich zu untransfizierten Zellen (-23±3% n=31),

während die Transfektion eines Leervektors keinen statistisch signifikanten Effekt auf die ASP⁺-Aufnahme hat (+4±4% n=24 verglichen mit Kontrollzellen). Diese Ergebnisse sprechen für einen negativen Effekt von LPTM4A auf den hOCT2. Da mit Hilfe von PCR gezeigt werden konnte, dass LPTM4A auf mRNA Ebene in Zellen des humanen proximalen Tubulus exprimiert wird, könnte die Interaktion von LPTM4A und hOCT2 auch *in vivo* eine wichtige regulatorische Bedeutung für den Transporter haben. Weitere Untersuchungen werden notwendig sein um die funktionelle Bedeutung und die Spezifität dieser Interaktion zu klären.

2 Einleitung

2.1 Organische Kationen

Kationen sind Substanzen, die eine positive Nettoladung tragen. Bei organischen Kationen handelt es sich um organische Moleküle exogenen oder endogenen Ursprungs, die bei physiologischem pH positiv geladen sind.

Zur Gruppe der organischen Kationen gehören eine Reihe von Substanzen, die in der Physiologie des menschlichen Körpers eine wichtige Rolle spielen. So etwa Hormone wie Noradrenalin oder Dopamin, die entscheidend den Zellmetabolismus beeinflussen (Busch et al. 1998), Cholin oder N-Methyl-Nikotinamid, die in der neuronalen Übertragung als Transmitter fungieren (Ullrich 1997) als auch Stoffwechselprodukte wie Kreatinin, die vom Körper metabolisiert und schließlich ausgeschieden werden (Urakami et al. 2004).

Exogene organische Kationen gehören zu einer Vielzahl unterschiedlicher Stoffklassen. Neben Vitaminen und Xenobiotika sind es vor Allem Medikamente verschiedenster Kategorien wie Antibiotika, Zytostatika, Antiarrhythmika, β -Rezeptorblocker, Sedativa Opiate und Antihistaminika. 40% der verschriebenen Medikamente sind kationischer Natur (Neuhoff et al. 2003).

Aufgrund ihrer Ladung kann ein Großteil dieser Stoffe die Zellmembran nicht frei passieren. Um dennoch eine Absorption, Gewebeverteilung und Ausscheidung dieser Substanzen zu gewährleisten, existiert eine Vielzahl von Transportsystemen, die sich vor Allem in metabolisch hochaktiven Organen wie Darm, Niere, Leber und Gehirn befinden.

2.2 Transportsysteme und Transport organischer Kationen

Transportsysteme spielen eine essentielle Rolle für vitale und metabolische Prozesse, sei es die Aufnahme von Substanzen über die Zellmembran, die zytoplasmatische Verteilung von zellulären Produkten oder die Aufarbeitung oder Ausscheidung von Abfallstoffen und toxischen Verbindungen.

Am Transport organischer Kationen ist eine Vielzahl von Transportern beteiligt. In den letzten Jahren wurden diverse unterschiedliche experimentelle Ansätze herangezogen um diese Transportsysteme zu charakterisieren. Neben Versuchen und Messungen an Tieren *in vivo*, an isolierten Organen, an Gewebsschnitten, perfundierten Tubuli und Plasmamembranvesikeln (Eisenhofer 2001; Koepsell et al. 2003), waren es vor Allem molekularbiologische Methoden, wie die Expressionsklonierung, die entscheidend zur molekularen Identifizierung von Transportern beigetragen haben. Mit ihrer Hilfe konnten im Laufe der Jahre unterschiedlichste Transporter kloniert und beschrieben werden, unter denen sich auch Transportsysteme für organische Kationen befinden (Gorboulev et al. 1997).

Die Transporter für organische Kationen wurden zum Einen als oligospezifische und zum Anderen als polyspezifische Kationentransporter klassifiziert (Koepsell et al. 2003). Oligospezifische Kationentransporter können nur ein bestimmtes Substrat, beziehungsweise solche Substanzen, die mit dem Substrat eng verwandt sind, transportieren. Polyspezifische Transporter hingegen akzeptieren Substrate unterschiedlicher molekularer Strukturen (Dresser et al. 2001).

Zu den oligospezifischen Transportern zählen Na⁺-Kotransporter für Neurotransmitter (Apparsundaram et al. 2001b) und Choline (Apparsundaram et al. 2001a), sowie hochaffine Transporter für Thiamine (Koepsell et al. 2003).

Bei den polyspezifischen Transportern kann wiederum zwischen solchen differenziert werden, die nur organische Kationen transportieren, wie zum Beispiel die organischen Kationentransporter (*organic cation transporters*, OCTs) und jenen, die normalerweise andere Substanzen transportieren, jedoch auch organische Kationen als Substrate akzeptieren. So beispielsweise Anionentransporter, die auch gewisse organische Kationen transportieren können (van Montfoort et al. 1999).

Mit Hilfe von genomischen Analysen konnten in 141 Spezies mehr als 40000 Proteine als potentielle Transportproteine identifiziert werden, die in 134 Familien klassifiziert wurden (Ren and Paulsen 2005).

Dabei wurden diese Transporter je nach Art der Transportprozesse, ihrer Energieabhängigkeit, molekularen Phylogenese sowie der Substratspezifität in 5 Klassen kategorisiert: Kanäle, Porter, primär aktive Transporter, Gruppen-Translokatoren und elektrische Carrier (Saier, Jr. 1999). Jede Transporterkategorie ist des Weiteren in Superfamilien, Familien und Subfamilien eingeteilt. Porter, zu denen auch die Gruppe der organischen Kationentransporter gehört, funktionieren unabhängig von direkter Energiezufuhr und können den Transport entlang des chemi-osmotischen Gradienten uniport (ein Substrat wird durch erleichterte Diffusion transportiert), antiport (zwei oder mehrere Substrate werden in die entgegengesetzte Richtung transportiert) oder symport (zwei oder mehrere Substrate werden in dieselbe Richtung transportiert) katalysieren. Nach Angaben der *Human Genome Organization* (HUGO) werden Transporter aufgrund ihrer Aminosäuresequenz in 43 *Solute Carrier Families* (SLC) eingeteilt (Hediger et al. 2004). Als Uniporter gehören die organischen Kationentransporter zur Familie SLC22A. Die Transporter dieser Familie werden wiederum zur *Major Facilitator Superfamily* (MFS) Übergruppierung gezählt (Burckhardt and Wolff 2000). Zur SLC22A Familie gehören neben den elektrogenen Kationentransportern (OCT1-3) auch die elektroneutralen Kationentransporter (OCTN1-3) und eine Reihe von Transportern, die in den Transport von organischen Anionen involviert sind (OAT1-5) sowie Urat Transporter (URAT1) (Koepsell and Endou 2004).

Sämtliche Transporter, die in der SLC22A Familie kategorisiert wurden, weisen eine ähnliche Struktur auf. Die organischen Kationentransporter bestehen aus 550-560 Aminosäuren und sind mit Ausnahme der Splice Varianten durch 12 transmembranäre α -Helices gekennzeichnet (Abbildung 1). C- und N- Termini befinden sich innerhalb der Zelle, ebenso eine intrazelluläre Schleife zwischen der 6. und 7. Domäne (Koepsell et al. 1998). Außerdem befindet sich zwischen der 1. und 2. transmembranären Domäne eine größere extrazelluläre Schleife, die mehrere Glykosylierungsstellen aufweist.

Durch Untersuchungen am organischen Kationentransporter 2 des Kaninchens (rbOCT2) konnte gezeigt werden, dass diese Glykosylierungen eine wichtige Rolle für die Funktion der Transporter haben. Die Glykosylierung an Position 112 spielt

eine essentielle Rolle beim Trafficking des Transporters zur Plasmamembran, während jene an der Position 96 die Kinetik des Transportes beeinflusst (Pelis et al. 2006).

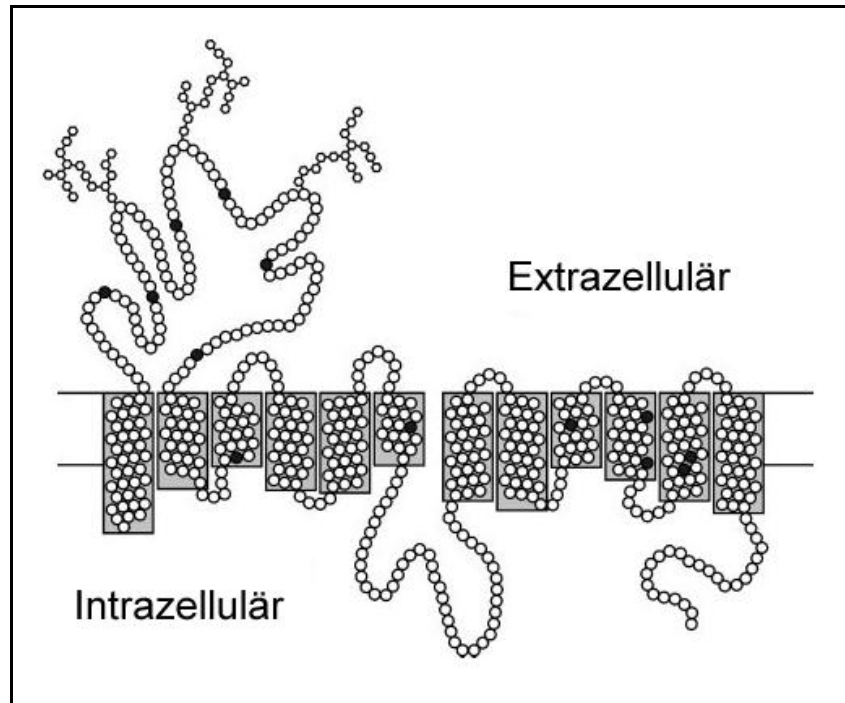


Abbildung 1: Vorgeschlagene Sekundärstruktur des humanen organischen Kationentransporters 2 [verändert nach (Pelis et al. 2006)].

Dargestellt ist die angenommene Sekundärstruktur mit den charakteristischen 12 transmembranären Domänen, die intra- sowie die extrazelluläre Schleife mit den drei Glykosylierungen, sowie der intrazelluläre C-Terminus. Die schwarzen Punkte kennzeichnen Cysteinresiduen.

Die organischen Kationentransporter gehören zur Gruppe der polyspezifischen Transporter, sind elektrogen, Na^+ - und pH unabhängig und können bidirektional transportieren (Busch et al. 1996; Gorboulev et al. 1997; Arndt et al. 2001). Die einzelnen Isoformen der OCTs weisen eine speziesabhängige, spezifische Organverteilung auf. So wird beispielsweise die Isoform 1 beim Menschen überwiegend in der Leber exprimiert (Koepsell 1998), während sie bei der Ratte hepatisch und auch renal lokalisiert ist (Grundemann et al. 1994). Beim Menschen hingegen ist die Hauptisoform in der Niere der hOCT2.

2.3 Niere

Als Organ erfüllt die Niere eine Vielzahl von Aufgaben. Der Wasserhaushalt, sowie die Elektrolythomöostase werden durch vektorielle Sekretions- und Resorptionsprozesse kontrolliert und reguliert und somit der Salz- und Mineralhaushalt den Bedürfnissen des Gesamtorganismus angepasst. Das Säure-Basen Gleichgewicht wird durch Ausscheidung von Protonen (H^+) und Wiederaufnahme von filtriertem Bikarbonat (HCO_3^-) aufrechterhalten. Mit dem Urin werden zahlreiche Stoffwechselendprodukte, sowie Medikamente, Xenobiotika und Toxine, entweder in unveränderter Form oder nach Metabolisierung in der Leber, ausgeschieden. Vor Allem der Stickstoffmetabolismus wird durch die Ausscheidung von Harnstoff, dem Hauptendprodukt des Stickstoff- und Proteinstoffwechsels, reguliert.

Des Weiteren ist die Niere durch Gluconeogenese und Proteinolyse direkt am Stoffwechsel beteiligt. Schließlich weist das Organ auch endokrine Funktionen auf. In der Niere produzierte und lokal wirksame Enzyme und Hormone wie Renin greifen direkt in die Regulation des arteriellen Blutdruckes ein, während Prostaglandine, an erster Stelle PGE β , die Nierenmarkdurchblutung sowie die glomeruläre Filtration fördern und Kinine die NaCl Resorption im distalen Nephron beeinflussen können. Ferner produziert die Niere auch systemisch zirkulierende Hormone. Zum Einen steigert das in der Nierenrinde produzierte Peptidhormon Erythropoetin die Blutbildung (Erythropoese) im Knochenmark, zum Anderen spielt das durch Hydroxylierung wirksam gemachte Vitamin D $_3$ -Hormon 1,25-Dihydroxycholecalciferol eine wichtige Rolle in der Ca $^{2+}$ Resorption des Dünndarms.

Die kleinste funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron (Abbildung 2). Es besteht aus mehreren Abschnitten und setzt sich zusammen aus dem Glomerulus, der das Blut filtriert und den Primärharn bildet und den nachgeschalteten Kanälchen. Der proximale Tubulus besteht aus einer *Pars convoluta* und einer *Pars recta* und dient der Resorption von Wasser und Substanzen, die im Körper verbleiben sollen. Der Intermediärtubulus besteht aus den Abschnitten der Henle Schleife, verdünnt den Harn und dient dem Aufbau eines osmotischen Konzentrationsgradienten. Im distalen Tubulus und dem darauf folgenden Sammelrohr erfolgt die Feinregulation der auszuscheidenden bzw. der zu retinierenden Substanzen, sowie die Harnkonzentrierung.

Für den Transport organischer Kationen ist in erster Linie der proximale Tubulus von Bedeutung. Er lässt sich in 3 Segmente einteilen. Die Segmente S1 und S2 sind Teil der *Pars convoluta* und bestehen aus einem einschichtigen Epithel, dessen Zellen hochprismatisch bis kubisch und relativ groß sind. Luminal befindet sich ein charakteristischer Bürstensaum, während die basolaterale Seite Einfaltungen (basolaterales Labyrinth) aufweist, die in engem Kontakt mit zahlreichen Mitochondrien im Zellinneren stehen. Das S3 Segment ist der *Pars recta* zugeordnet und besteht aus Epithelzellen, die verhältnismäßig niedriger sind, deren Mikrovilli jedoch länger sind und in größerer Anzahl vorkommen.

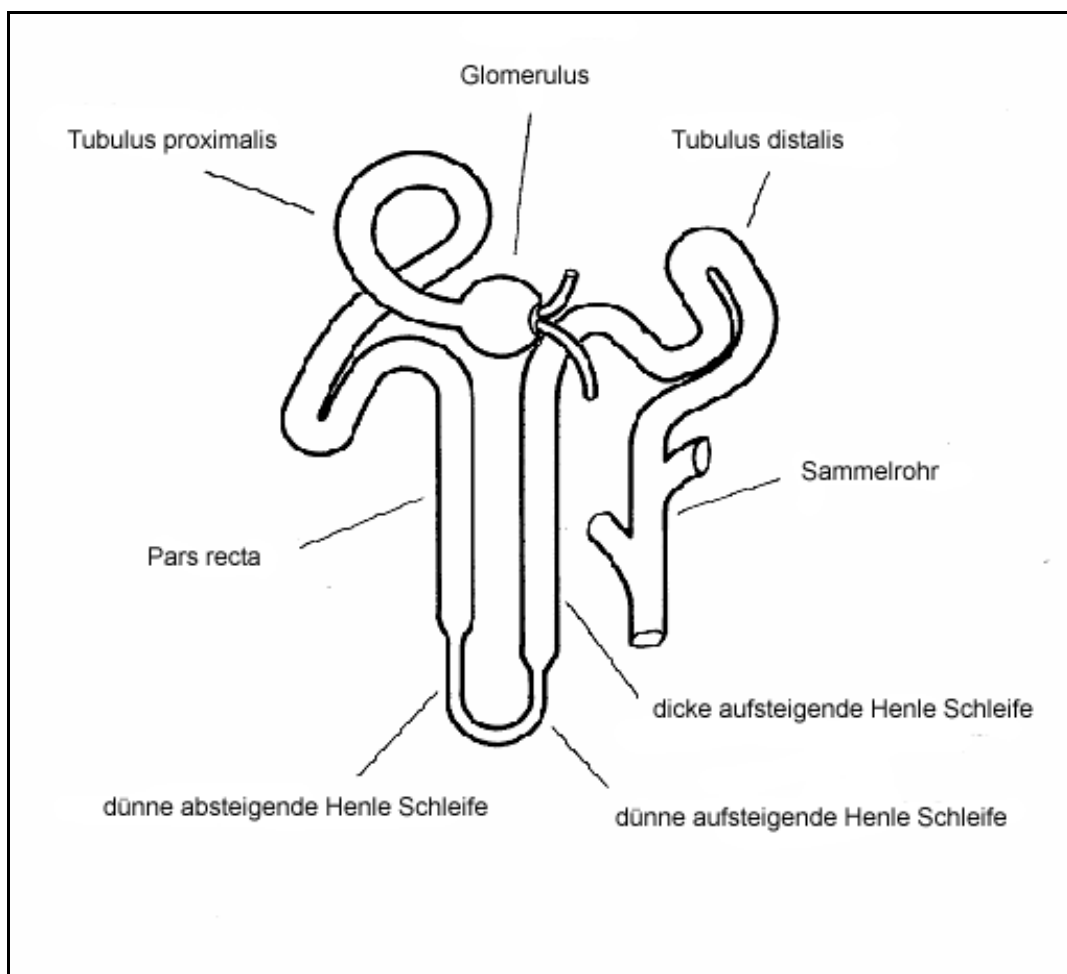


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Nephrons

Dargestellt sind die Bestandteile eines Nephrons. Dem Glomerulum folgt der proximale Tubulus, die Henle-Schleife, der distale Tubulus und das Sammelrohr, das schließlich über die Papille und die Nierenkelche in das Nierenbecken führt.

2.4 Organischer Kationentransport im proximalen Tubulus

Um die Aufnahme und Ausscheidung von organischen Kationen zu gewährleisten, bedienen sich die Zellen des proximalen Tubulus verschiedener Transportsysteme. Wie aus Abbildung 3 ersichtlich werden elektrogene und elektroneutrale Kationentransporter, sowie eine Reihe anderer Transportsysteme dafür benötigt. In zahlreichen Arbeiten wurden diese Transportmechanismen identifiziert und im Detail beschrieben (Koepsell et al. 2003; Wright and Dantzer 2004; Ciarimboli and Schlatter 2005; Koepsell et al. 2007).

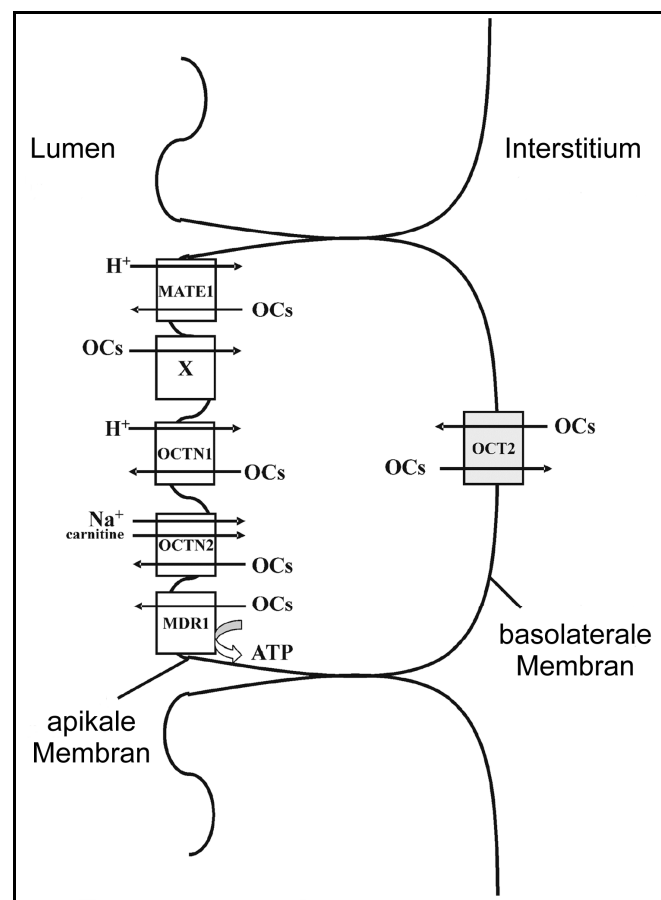


Abbildung 3: Transportsysteme für organische Kationen im humanen proximalen Tubulus [verändert nach (Ciarimboli 2008) und (Ciarimboli and Schlatter 2005)].

Dargestellt sind die basolateralen und apikalen Transportmechanismen für organische Kationen (OCs). Basolateral sorgt der hOCT2 in Abhängigkeit vom elektrochemischen Gradienten für eine Aufnahme bzw. Ausscheidung von organischen Kationen in die Zelle. Apikal sind mehrere Transporter an der Ausscheidung von organischen Kationen beteiligt, so zum Beispiel MATE1, OCTN1, OCTN2 und das P-Glycoprotein (MDR1). X kennzeichnet ein vorgeschlagenes, aber noch nicht molekular charakterisiertes Transportsystem, das für die Reabsorption von organischen Kationen aus dem tubulären Lumen in die Zelle des proximalen Tubulus verantwortlich sein kann.

Der erste Schritt in der Ausscheidung von organischen Kationen ist ihre Aufnahme aus dem Blut über die basolaterale Membran in die Zellen des proximalen Tubulus. In der humanen Niere wird dieser Transport hauptsächlich durch den OCT2 vermittelt. An der Sekretion aus den Zellen in das tubuläre Lumen der Niere sind mehrere Transporter beteiligt. MDR1 (*Multi Drug Resistance 1*) auch bekannt als P-Glycoprotein ist ATP- (Adenosin 5'-triphosphat) abhängig und dient wahrscheinlich dem Efflux großer hydrophober organischer Kationen (Koepsell et al. 2003). Des Weiteren sind es mehrere Antiporter, die H⁺ gegen ein organisches Kation austauschen, die an der luminalen Ausscheidung von organischen Kationen beteiligt sind. Neben dem elektroneutralen Transporter OCTN1 und dem Carnitin Transporter OCTN2 handelt es sich dabei um den *Mammalian Proton Cation Antiporter* MATE1. In Abhängigkeit vom elektrochemischen Gradienten können organische Kationen auch vom tubulären Lumen ins Interstitium reabsorbiert werden. Für diesen Prozess wurde von Koepsell et al. ein polyspezifisches organisches Kationentransportersystem vorgeschlagen, das die Aufnahme über die luminalen Membran in die Zelle des proximalen Tubulus vermittelt (Koepsell et al. 2003; Ciarimboli and Schlatter 2005). Die Ausscheidung über die basolaterale Membran erfolgt schließlich durch den organischen Kationentransporter 2.

2.5 Die elektrogenen organischen Kationentransporter OCT1 OCT2 und OCT3

Als erstes Transportprotein dieser Familie wurde 1994 der OCT1 der Ratte isoliert und kloniert (Grundemann et al. 1994). Mittlerweile sind die Isoformen 1, 2 und 3 von Maus, Ratte und Mensch, sowie der OCT1 vom Kaninchen und der OCT2 von Kaninchen und Schwein kloniert worden. hOCT1 und hOCT2 wurden dabei durch Screening einer humanen cDNA Bank gegen rOCT1 identifiziert (Gorboulev et al. 1997). Die Homologie der Transporterisoformen untereinander beziehungsweise zwischen den Spezies ist unterschiedlich. Der Homologie-Grad der Aminosäuresequenz zwischen verschiedenen Arten beträgt für OCT1 zwischen 78-95%, für OCT2 zwischen 81-91% und für OCT3 zwischen 87-93% (Koepsell et al. 2003). Innerhalb einer Spezies wurde die Ähnlichkeit zwischen den einzelnen Isoformen folgendermaßen angegeben: 67-70% zwischen OCT1 und OCT2, 47-57%

zwischen OCT1 und OCT3 und 49-51% zwischen OCT2 und OCT3 (Koepsell et al. 2003).

Die Gewebeverteilung organischer Kationentransporter ist nicht nur von der jeweiligen Isoform abhängig, sondern auch speziesspezifisch. Beim Menschen ist die Isoform 1 vorrangig in der Leber lokalisiert (Zhang et al. 1998), während rOCT1 und mOCT1 überwiegend in der Niere (Grundemann et al. 1994; Gorboulev et al. 1997), aber auch in der Haut, im Dünndarm und der Milz (Slitt et al. 2002) exprimiert werden. Zusätzlich sind sie auf mRNA Ebene in geringer Menge auch in Organen wie Hirn und Milchdrüsen zu finden (Koepsell 1998). Darüber hinaus konnte hOCT1 im Bronchialsystem in der luminalen Membran epithelialer Zellen (Lips et al. 2005) sowie gemeinsam mit hOCT3 in der Plazenta nachgewiesen werden (Wessler et al. 2001), wobei hOCT1 in beiden Geweben am Transport von Acetylcholin beteiligt zu sein scheint. hOCT2 ist gemeinsam mit hOCT1 am Chromosom 6q26 lokalisiert (Koehler et al. 1997). Hauptexpressionsort für hOCT2 ist die basolaterale Membran proximaler Tubuluszellen. Des Weiteren konnte mit Hilfe von RT-PCR Analysen die Transkription von hOCT2 in der Milz, im Dünndarm, in der Plazenta und im Gehirn gezeigt werden (Motohashi et al. 2002). In Neuronen des zerebralen Kortex vermittelt hOCT2 die Aufnahme neuronaler Transmitter wie Dopamin, Noradrenalin, Serotonin und Histamin (Busch et al. 1998). Mit Hilfe von Tandemmassenspektrometrie wurden kürzlich die dopaminergen Neuromodulatoren Histidyl-Prolin Diketopiperazin (Cyclo(his-pro)) und Salsolinol als endogene Substrate des hOCT2 entdeckt. Salsolinol weist eine spezifische Toxizität gegenüber hOCT2 exprimierenden Zellen auf, während Cyclo (his-pro) diese Toxizität inhibiert. hOCT2 spielt somit durch die Regulation von Salsolinol und Cyclo (his-pro) eine wichtige Rolle für die Zellintegrität neuronaler Strukturen und könnte in Folge dessen auch an neurologischen Dysfunktionen wie Morbus Parkinson beteiligt sein (Taubert et al. 2007).

Eine Splice Variante von hOCT2 mit einer Größe von 1169 bp (hOCT2-A) wurde in mehreren Organen wie Gehirn, Leber, Dickdarm, Muskel, Knochenmark, Hoden, Plazenta und Niere gefunden (Urakami et al. 2002). Das 483 Aminosäuren große Protein weist 9 transmembranäre Domänen auf und ist mit dem hOCT2 zu 81% identisch. hOCT2-A scheint ebenfalls an der renalen Clearance exogener und endogener Kationen beteiligt zu sein (Urakami et al. 2002).

hOCT3 wird auch als extraneuronaler Monoamin Transporter (EMT) bezeichnet und wurde erstmals aus Caki-Zellen, einer humanen Nierenkarzinom-Zelllinie, kloniert

(Grundemann et al. 1998b). hOCT3 wurde in Leber, Herz und im Kortex des Gehirns nachgewiesen. Im Gehirn vermittelt der Transporter die Aufnahme von Substanzen wie Tyramin, Noradrenalin und Adrenalin. hOCT3 fungiert dabei als Transporter zweiter Instanz und inaktiviert somit monoamine Neurotransmitter, die der neuronalen Wiederaufnahme entgangen sind (Grundemann et al. 1998b). Dadurch wird die unkontrollierte Streuung eines Signals unterbunden. In der Plazenta ist hOCT3 am Transport vasoaktiver Monoamine beteiligt (Sata et al. 2005). Eine defekte Genexpression oder das Fehlen von organischen Kationentransportern könnte hier für die erhöhte Monoaminkonzentration bei Patienten mit Präeklampsie verantwortlich sein (Bottalico et al. 2004).

Neben dem Transport von endogenen Substanzen spielen die organischen Kationentransporter auch eine wichtige Rolle bei der Aufnahme und dem Transport von Pharmaka. Für den hOCT2 konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass er an der Aufnahme einer Reihe von unterschiedlichen Medikamenten beteiligt ist. Neben Zytostatika wie Cisplatin (Yonezawa et al. 2006) oder Oxaliplatin sind es beispielsweise Antihistaminika wie Ranitidin oder Famotidin (Bourdet et al. 2005), antivirale Substanzen wie Adefovir (Uwai et al. 2007), Antidiabetika wie Metformin (Kimura et al. 2005) und β -Blocker (Dudley et al. 2000). Vom hOCT1 ist mittlerweile bekannt, dass er eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Imatinib hat (Thomas et al. 2004). Als Tyrosinkinaseinhibitor wird Imatinib in der Therapie der chronisch myeloischen Leukämie eingesetzt. Es ist bekannt, dass Patienten eine individuelle Empfindlichkeit gegenüber Pharmaka aufweisen. Für OCTs sind eine Reihe von Polymorphismen beschrieben worden, die eine Rolle für dieses variable Ansprechen gegenüber Medikamenten spielen könnten (Shu et al. 2003; Leabman et al. 2003a; Leabman et al. 2003b; Shu et al. 2004). In der Tat, mehrere Studien zeigen, dass für die organischen Kationentransporter Polymorphismen existieren, die direkt die Aufnahme von Substraten beeinflussen (Schinkel and Jonker 2002; Fujita et al. 2006; Kang et al. 2007; Shu et al. 2007). Die genetische Variante A270S des hOCT2 weist beispielsweise eine veränderte Aufnahme von Paraquat im Vergleich zur Wildtypvariante auf (Chen et al. 2007). Des Weiteren konnte anhand von Aufnahmehemmversuchen mit Metformin gezeigt werden, dass vom hOCT1 Polymorphismen existieren wie zum Beispiel die Deletionsvariante hOCT1-420del, die mit einer Allelfrequenz von 20% in der weißen amerikanischen Bevölkerung auftritt und mit einer verminderten Transportrate einhergeht (Shu et al. 2007).

2.6 Regulation des organischen Kationentransporters hOCT2

Um an rapide wechselnde Bedingungen und alternierende Substratmengen in den verschiedenen Organen angepasst zu werden, können Transporter reguliert werden. Neben einer schnellen Regulation erfordern Situationen, in denen dem Körper substantielle Veränderungen wie Entwicklung oder Erkrankung widerfahren, eine langfristige Adaptation, die durch veränderte Genexpression zustande kommt (Ciarimboli 2008).

Eine Regulation dieser Transporter kann auch wichtige Pharmakologische Implikationen haben, da die Exposition des Körpers auf Pharmaka, Umwelttoxine und Xenobiotika beeinflusst werden kann (Berkhin and Humphreys 2001).

Eine rasche Regulation des hOCT2 Transportes kann über verschiedene Signalwege erfolgen. In zahlreichen Studien wurden diese Signalkaskaden und ihre Effekte auf die organischen Kationentransporter untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Regulation über einen bestimmten Pathway unterschiedliche Effekte auf die OCTs verschiedener Spezies hat. Zum Beispiel sorgt eine Stimulation der Proteinkinase A (PKA) mittels Forskolin für eine erhöhte Transportrate des rOCT1 (Mehrens et al. 2000) und rbOCT2 (Soodvilai et al. 2007), während hOCT1 (Ciarimboli et al. 2004) und hOCT2 (Biermann et al. 2006) durch die PKA inhibiert werden. Ein ähnlicher Effekt konnte bei einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) mittels 1,2-Dioctanoyl-sn-glycerol (DOG) registriert werden. Während rOCT1 durch eine PKC induzierte direkte Phosphorylierung eine gesteigerte Affinität für Substrate und somit eine erhöhte Transportrate aufweist (Mehrens et al. 2000), reagiert der hOCT2 darauf mit einem geringeren Transport (Biermann et al. 2006).

Hinzu kommt, dass auch innerhalb einer Spezies die verschiedenen Isoformen unterschiedlich reguliert werden können. hOCT2 wird signifikant von cGMP inhibiert (Schlatter et al. 2002), während die Transportrate des hOCT1 nicht von cGMP verändert wird (Ciarimboli et al. 2004). Neben Änderungen der Affinität kann auch das Trafficking beeinflusst werden. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung über Calmodulin zu einer vermehrten Transportrate von hOCT1 (Ciarimboli et al. 2004), hOCT2 (Cetinkaya et al. 2003) und hOCT3 (Martel et al. 2001) führt. Abbildung 4 fasst die bisher bekannten Regulationsmechanismen des hOCT2 zusammen.

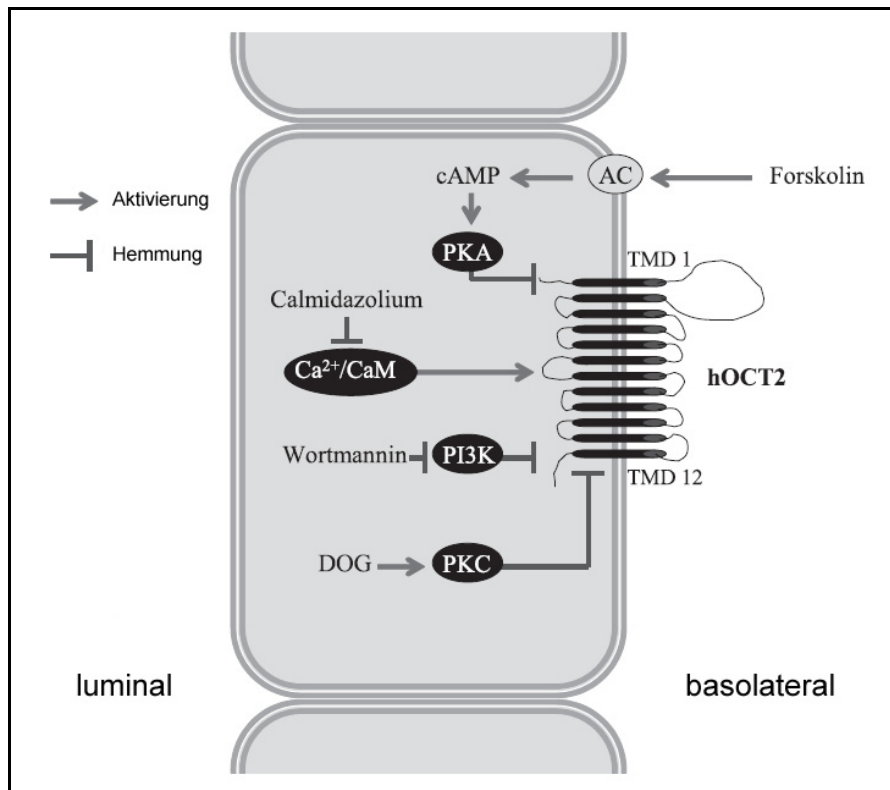


Abbildung 4: vorgeschlagenes Schema der hOCT2 Regulation [verändert nach (Biermann et al. 2006)]

hOCT2 wird über mehrere Mechanismen reguliert. Eine Aktivierung der PKA führt zu einer Hemmung, dasselbe gilt für eine Aktivierung der PKC. Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) kann den Transport ebenfalls hemmen. Calmodulin erhöht die Transportrate des hOCT2. TMD: Transmembranäre Domäne; AC: Adenylatcyclase

Da die Transporter der Familie SLC22 eine ähnliche Struktur aufweisen und gezeigt werden konnte, dass PKA und PKC mehrere Transporter der Familie regulieren, wurde versucht potentielle Bindungsdomänen für Kinasen zu finden. Für den rOCT1 konnte beispielsweise mit Hilfe von Mutationsstudien gezeigt werden, dass die Serine an Position 286, 292 und 328 als PKC Phosphorylierungsstellen dienen (Ciarimboli et al. 2005a) und eine Phosphorylierung dieser Serine die Transportrate direkt beeinflusst. Abbildung 5 fasst die bisher bekannten Bindungsdomänen für PKA, PKC und Tyrosinkinasen zusammen. Es ist vorgeschlagen worden, dass sich sämtliche Phosphorylierungsstellen in unmittelbarer Nähe zur Bindungstasche des Transporters befinden (Ciarimboli et al. 2005a).

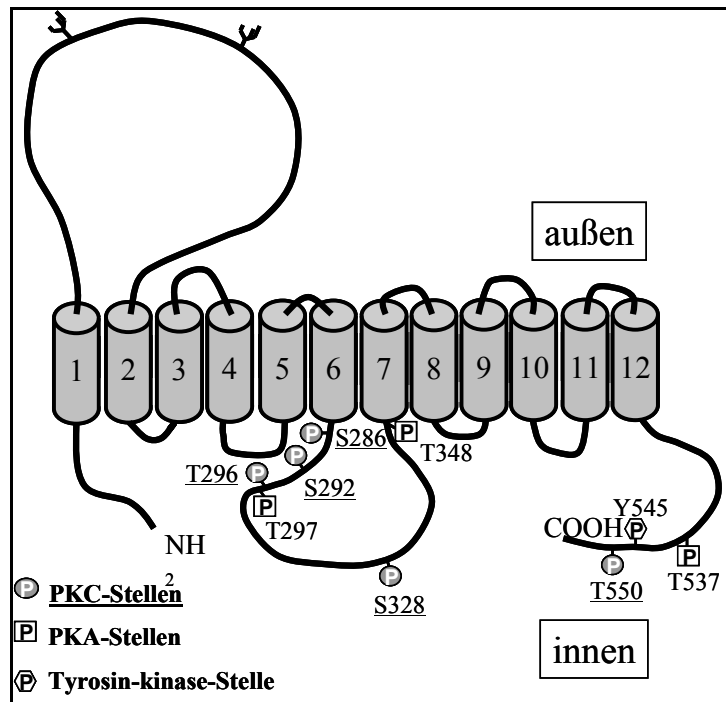


Abbildung 5: Vorgeschlagene Struktur des rOCT1 samt Bindungsstellen [verändert nach (Ciarimboli and Schlatter 2005)]

Dargestellt ist ein Schema des rOCT1 mit den potentiellen Phosphorylierungsstellen für die PKA, PKC und eine Tyrosinkinase. In der extrazellulären Schleife werden auch die N-Glykosylierungsstellen gezeigt.

2.7 Ziel

Regulatorische Mechanismen, die die Aufnahme von Substanzen über organische Kationentransporter beeinflussen, sind bisher unzureichend untersucht. Vor Allem auf Proteomebene des Transporters, welche sich als Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau von Proteinen, die mit dem hOCT2 interagieren, definieren lässt, gibt es wenige Daten. Da der Transport jedoch einer straffen Kontrolle obliegt, existieren mit Sicherheit Systeme über die bisher bekannten Mechanismen hinaus, die durch Änderungen der Affinität, alternierendes Trafficking oder Turnover Veränderungen, die Transportrate eines Transporters regulieren. Polymorphismen von Proteinen, die mit den OCTs assoziiert sind, können darüber hinaus zu einer individuellen Empfindlichkeit gegenüber Pharmaka beitragen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, neue Interaktionspartner des hOCT2 zu finden, zu bestätigen und die funktionelle Relevanz dieser Interaktion zu untersuchen.

3 Material

3.1 Organismen

Tab. 1: Verwendete Organismen

Organismus	Stamm	Referenz
<i>E. Coli</i>	XL-1-Blue	Stratagene
<i>S. cerevisiae</i>	THY.AP4 THY.AP5	(Grefen et al. 2007)
Zelllinien	HEK 293 WT HEK 293 HOCT2 HEK 293 HOCT2-GFP	Siehe 4.4.1

3.2 Plasmide und Oligonucleotide

Tab. 2: Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
pPR3-N Prey Vector mit CDNA Bank human Kidney NubG	Enthält die CDNA Bank der humanen Niere als N _{ub} Fusion	Dual Systems
pMetYCgate Bait Vector	Expressionsvektor für C _{ub} Fusionsproteine	(Grefen et al. 2007)
PNXgate32 Prey Vector	Expressionsvektor für N _{ub} Fusionsproteine	(Grefen et al. 2007)
NUB WT-X gate Vector	Expressionsvektor für N _{ub} Wildtyp-Fusionsproteine	(Grefen et al. 2007)

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
PCDNA6.F9	Expressionsvektor für His- und Flag-Fusionsproteine	PCDNA6 (invitrogen) was modified by AG Benzing (Freiburg); a MluI site was added; so was a Flag <i>tag</i> and a His <i>tag</i>
pDsRed2-N1	Expressionsvektor für DsRed-Fusionsproteine	Clontech
pEGFP-N3	Expressionsvektor für GFP-Fusionsproteine	Clontech

Tab. 3: Verwendete Oligonucleotide

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
Screen For	5'-GTC GAA AAT TCA AGA GAA GG-3'	Forward Sequenzierprimer für pPR3-N Prey Vector
Screen Rev	3'-AAG CGT GAC ATA ACT AAT TAC-5'	Reverse Sequenzierprimer für pPR3-N Prey Vector
T7 Primer	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	Standard Forward Sequenzierprimer (hier für PCDNA6.F9)
PCDNA6.F9 Rev	3'-ACA GAT GGC TGG CAA CTA GAA-5'	Reverse Sequenzierprimer für PCDNA6.F9
HOCT2-GFP-For	5'-CTC AGA <u>TCT CGA</u> <u>GCT</u> ATG CCC ACC ACC GTG GAC GAT-3'	Forward Primer zur Amplifikation des HOCT2 Gens für pEGFP-N3, <u>Xho I</u>
HOCT2-GFP-Rev	3'-CGG GAT <u>GGA TCC</u> GTT CAA TGG AAT GTC TAG TTT-5'	Reverse Primer zur Amplifikation des HOCT2 Gens für pEGFP-N3, <u>BamH I</u>

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
LAPT6.F9-For	5'-GAA TCC <u>ACG CGT</u> ATG GTG TCC ATG AGT TTC AAG-3'	Forward Primer zur Amplifikation des LAPTM4A Gens für PCDNA6.F9, <u>Mlu I</u>
LAPT6.F9-Rev	3'-AC TCG <u>AGC GGC</u> <u>CGC</u> TCA GGC AGG TAA GTA AGG AG-5'	Reverse Primer zur Amplifikation des LAPTM4A Gens für PCDNA6.F9, <u>Not I</u>
LAPT-Red-For	5'-GAG CTC AAG CTT <u>GAA TTC</u> ATG GTG TCC ATG AGT TTC AAG-3'	Forward Primer zur Amplifikation des LAPTM4A Gens für pDsRed2-N1, <u>Hind III</u>
LAPT-Red-Rev	3'- TGG ATC CCG GGC <u>GGC GGC CGC</u> GGC AGG TAA GTA AGG AGG TG-5'	Reverse Primer zur Amplifikation des LAPTM4A Gens für pDsRed2-N1, <u>Sma I</u>

3.3 Antikörper

3.3.1 Primäre Antikörper

Tab. 4: Primärantikörper

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
polyklonal-anti-rOCT2	Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen rOCT2	Alpha Diagnostics
monoklonal-anti-hOCT2	Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen hOCT2	Koepsell et al.

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
monoklonal-anti-6-fach-His	Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen den 6-fach His- <i>tag</i>	R & D Systems
Monoklonal-anti-Flag	Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen den Flag- <i>tag</i>	Sigma

3.3.2 Sekundäre Antikörper

Tab. 5: Sekundärantikörper

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
Polyclonal Goat anti Mouse	Horseradish Peroxidase gekoppelter Antikörper gegen Maus IgG aus der Ziege	Dako
Polyclonal Goat anti Rabbit	Horseradish Peroxidase gekoppelter Antikörper gegen Kaninchen IgG aus der Ziege	Dako
Alexa Fluor 594 Goat anti Mouse	Fluoreszenz gekoppelter Antikörper gegen Maus IgG aus der Ziege	Invitrogen

3.4 Kulturmedien

3.4.1 Kulturmedien für Bakterien

Die verwendeten Medien wurden nach Angaben der Hersteller eingesetzt.

Standard I Medium: Standard I 25 g
Ad 1000 ml Aqua dest.; autoklaviert

Standard I Agarplatten: Standard I 25 g
Agarose 15 g
Ad 1000 ml Aqua dest.; autoklaviert

Antibiotika: Die Zugabe der Antibiotika erfolgte nach der Abkühlung des autoklavierten Mediums. In dieser Arbeit wurden die Antibiotika Ampicillin und Kanamycin verwendet.

Ampicillin: Stammlösung: 10 mg/ml; Arbeitskonzentration: 100 µg/ml

Kanamycin: Stammlösung: 10 mg/ml; Arbeitskonzentration: 35 µg/ml

3.4.2 Kulturmedien für Hefen

YPD Medium:
Hefeextrakt 10 g
Pepton 20 g
Dextrose 20 g
Ad 1000 ml Aqua dest.
Autoklaviert

YPD Platten:
Hefeextrakt 10 g
Pepton 20 g
Dextrose 20 g
Agarose 15 g
Ad 1000 ml Aqua dest.
Autoklaviert

SD Medium:

2% Glukose (w/v)
0,17% Yeast Nitrogen Base (w/v)
0,5% Ammoniumsulfat (w/v)
pH 6-6,3 mit NaOH
Ad 1000 ml Aqua dest.
Autoklaviert

SD Platten:

2% Glukose (w/v)
0,17% Yeast Nitrogen Base (w/v)
0,5% Ammoniumsulfat (w/v)
pH 6-6,3 mit NaOH
1,5% Agarose (w/v)
Ad 1000 ml Aqua dest.
Autoklaviert

-L-Medium:

SD Medium plus
ATHLUM minus drop out (1,5 g/l)
A Adenin Sulfat (0,02 g/l)
U Uracil (0,02 g/l)
T L-Tryptophan (0,02 g/l)
H L-Histidin HCl (0,02 g/l)
Met L-Methionin (0,02 g/l)
Ad 1000 ml Aqua dest.
Autoklaviert

-L-Platten:

SD Medium plus
ATHLUM minus drop out (1,5 g/l)
A Adenin Sulfat (0,02 g/l)
U Uracil (0,02g/l)
T L-Tryptophan (0,02 g/l)
H L-Histidin HCl (0,02 g/l)
Met L-Methionin (0,02 g/l)
1,5% Agarose (w/v)
Ad 1000 ml Aqua dest.
Autoklaviert

-T-Medium:

SD Medium plus
ATHLUM minus drop out (1,5 g/l)
A Adenin Sulfat (0,02 g/l)
U Uracil (0,02 g/l)
L L-Leucin (0,1 g/l)
H L-Histidin HCl (0,02 g/l)
Met L-Methionin (0,02 g/l)
Ad 1000 ml Aqua dest.
Autoklaviert

-T-Platten:

SD Medium plus
ATHLUM minus drop out (1,5 g/l)
A Adenin Sulfat (0,02 g/l)
U Uracil (0,02 g/l)
L L-Leucin (0,1 g/l)
H L-Histidin HCl (0,02 g/l)
Met L-Methionin (0,02 g/l)
1,5% Agarose (w/v)
Ad 1000 ml Aqua dest.
Autoklaviert

3.4.3 Medien für Zellkulturen

HEK 293 Zellen:

DMEM: Dulbecco's Minimal Eagle Medium

FCS: Fetales Kälberserum

L-Glut: L-Glutamin

Pen/Strep: Penicillin/Streptomycin

G418: Geneticin

Tab. 6: HEK 293 Medien

Wildtypzellen	HOCT2-Zellen	HOCT2-GFP-Zellen
DMEM 500 ml	DMEM 500 ml	DMEM 500 ml
FCS 10% (v/v)	FCS 10% (v/v)	FCS 10% (v/v)
Pen/Strep 100 U/ml	Pen/Strep 100 U/ml	Pen/Strep 100 U/ml
L-Glut 1 mM	L-Glut 1 mM	L-Glut 1 mM
-	G418 500 mg/l	G418 500 mg/l

3.5 Lösungen und Puffer

In der folgenden Auflistung ist die Zusammensetzung der verwendeten Stammlösungen und Puffer angegeben. Lösungen und Puffer spezieller Methoden werden an der entsprechenden Stelle im Methodenteil aufgeführt.

TBST (10 fach) 0,1 M Tris
 1,5 M NaCl
 0,5% Tween
 Filtrieren pH 8,0
 Aqua bidest. ad 1 l

PBS (10 fach)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 2 mM KH ₂ PO ₄ 10 mM Na ₂ HPO ₄ Aqua bidest. ad 1 l
Transferpuffer	Glycin 28,84 g Tris 6,68 g Methanol 200 ml Aqua bidest. ad 2 l
TE (10 fach)	100 mM Tris Cl 10 mM EDTA pH 7,5

3.6 Verbrauchsmaterial

3.6.1 Verwendete Kits

Tab. 7: eingesetzte Kits

Bezeichnung	Referenz
Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research
Zyppy Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research
DNA Clean & Concentrator Kit	Zymo Research
PureLink HiPure Plasmid Filter Purification Kit	Invitrogen
Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research
Plasma Membrane Protein Extraction Kit	Biovision

3.6.2 Material zur Behandlung von Nukleinsäuren

Tab. 8: Klonierungsmaterial

Bezeichnung	Referenz
Accuprime PFX DNA Polymerase	Invitrogen
T4DNA Ligase	Invitrogen
Restriktionsenzyme	
BamH I	NEB
EcoR I	NEB
Hind III	NEB
Mlu I	NEB
Not I	NEB
Sma I	NEB
Xho I	NEB

3.6.3 Material für SDS-PAGE und Westernblot

Tab. 9: verwendete Materialien für Elektrophorese und Westernblot

Bezeichnung	Referenz
4-20% Precise Protein Gel	Thermo Scientific
BUpH™ Tris-Hepes-SDS-Running Buffer	Thermo Scientific
Super Signal Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific
Pageruler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas
Nupage LPS Sample Buffer 4x	Invitrogen
PVDF-Membran	Roche
Gelatine from cold water fish 45%	Sigma

3.6.4 Material für Transformation und Transfektion

Tab. 10: Transformations- und Transfektionsreagenzien

Bezeichnung	Referenz
Turbofect	Fermentas
ssDNA 10 mg/ml Herring Sperm	Invitrogen
Lithiumacetat 1 M pH 7,5	
Polyethylenglykol: PEG 50% 3350	
CaCl ₂ 100 mM pH 7,5	
TE (1 fach)	

4 Methoden

Um neue Interaktionspartner des hOCT2 zu identifizieren, diese Interaktion zu bestätigen und deren funktionelle Relevanz aufzuzeigen wurden in dieser Arbeit eine Reihe verschiedener Methodiken verwendet. Zuerst sollte im Hefesystem mit einem mbSUS Interaktionsscreen nach neuen potentiellen Protein-Proteininteraktionspartnern gesucht werden. Um diesen Screen auszuwerten erfolgte eine Zwischenklonierung der Plasmide in Bakterien. Sämtliche Arbeiten mit Nukleinsäuren sowie Klonierungen von Plasmidkonstrukten wurden ebenfalls in Bakterien, mit dem Bakterienstamm XL-1-Blue durchgeführt. Für die Bestätigung der Interaktion wurde auf Proteinebene mit diversen HEK 293 Zelllinien gearbeitet. Die Präparation der Zellen erfolgte in einem ersten Schritt durch Transfektion von Plasmid-DNA. Transfizierte Zellen wurden nun für mehrere Techniken verwendet. Zum Einen wurde ein *Pulldown Assay* mit Hilfe von Westernblots durchgeführt, zum Anderen wurden die Zellen für die Immunfluoreszenz behandelt und schließlich wurden noch funktionelle mikrofluorimetrische Messungen mit vitalen transfizierten Zellen durchgeführt. Abbildung 6 zeigt einen kurzen Überblick über die Reihenfolge der angewendeten Methoden.

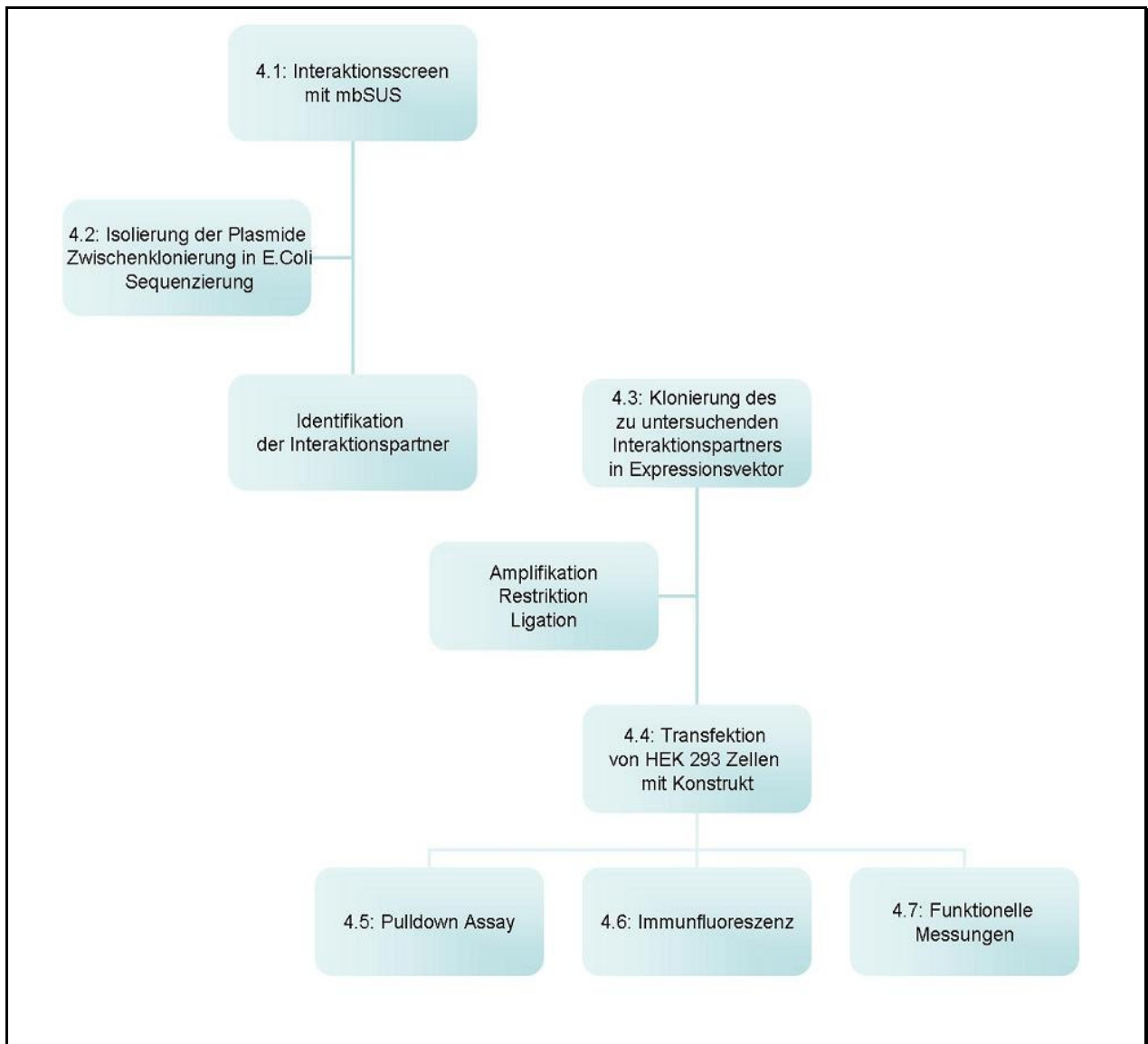


Abbildung 6: Flowchart der verwendeten Methodiken

Dargestellt ist ein Algorithmus, der die Reihenfolge der benutzten Methoden wiedergibt. Die Zahl vor der jeweiligen Methode entspricht der Kapitelnummer in dieser Arbeit.

4.1 Arbeiten mit dem *mating based Split Ubiquitin System* (mbSUS)

4.1.1 Grundlagen zum mbSUS

Bei der *Yeast-Two-Hybrid* (Hefe-Zwei-Hybrid) handelt es sich um eine Technik zur Aufklärung von Protein-Proteininteraktionen. Mit dieser Technik kann *in vivo* überprüft werden, ob ein bekanntes Protein bezeichnet als *bait* Protein (Köderprotein) mit einem anderen Protein, *prey* Protein (Beuteprotein) innerhalb von Hefezellen interagiert. Bei den verwendeten Hefezellen handelt es sich in der Regel um die Bäckerhefe *Sacharomyces cerevisiae*.

Im sogenannten Screeningverfahren ist es möglich das bekannte *bait* Protein mit vielen unbekanntem Proteinen in den Hefezellen zu exprimieren um mögliche Interaktionspartner zu identifizieren. Im üblichen *Yeast-Two-Hybrid* System findet diese Interaktion im Zellkern statt. Die beteiligten Proteine sind dabei mit sogenannten Sensorproteinen fusioniert, die bei einer Interaktion der Proteine zu einer messbaren Reaktion führen. Für die Untersuchung von membranständigen oder membran assoziierten Proteinen ist die übliche *Yeast-Two-Hybrid* Technik nicht besonders gut geeignet, da sich zum Einen viele Membranproteine gar nicht erst in den Zellkern transportieren lassen und zum Anderen das nukleäre Milieu zu einer veränderten Faltung der Proteine führt. Um diesen Einschränkungen zu entgehen, haben wir für die Untersuchung des membranständigen hOCT2 ein modifiziertes *Yeast-Two-Hybrid* System gewählt.

Im *mating based Split Ubiquitin System* (mbSUS) wird das *bait* Protein in der Plasmamembran exprimiert und kann so in seiner physiologischen Umgebung mit anderen Proteinen interagieren.

Für dieses System wurde das bekannte Ubiquitinprotein (76 Aminosäuren) in zwei Hälften „gesplittet“ (Johnsson and Varshavsky 1994): eine N-terminale Hälfte (N_{UB} , Aminosäuren 1-34) und eine C-terminale Hälfte (C_{UB} , Aminosäuren 35-76). Diese „Ubiquitinhälften“ werden im mbSUS an die zu untersuchenden Proteine fusioniert. Das C-terminale C_{UB} Fragment an das *bait* Protein und das N-terminale N_{UB} Fragment an das gesuchte *prey* Protein. Interagieren die Proteine innerhalb der

Plasmamembran miteinander, führt die räumliche Nähe der beiden Ubiquitinhälften zu einer Reassoziaton des Ubiquitinmoleküls. Um eine spontane Reassoziaton der Ubiquitinfragmente, die zu falsch-positiven Signalen führen würde, zu vermeiden, wurde in der N-terminalen Ubiquitinhälfte ein Aminosäureaustausch vorgenommen. Dazu wurde das Isoleucin an Position 13 durch ein Glycin ersetzt. Das mutierte N_{UB} Fragment wird nun als N_{UBG} bezeichnet.

Das Ubiquitinsignal wird von ubiquitinspezifischen Proteasen (USP) erkannt. Um ein messbares Signal der Interaktion zu erhalten wurde zusätzlich an das *bait* C_{UB} Konstrukt ein Transkriptionsfaktor fusioniert. Kommt es zur Interaktion, wird der Transkriptionsfaktor von den USPs abgespalten und wandert in den Zellkern um Reportergene zu aktivieren (Stagljar et al. 1998). Die Aktivierung der Reportergene hat eine messbare Wirkung, wie zum Beispiel das Wachstum der Hefezellen auf Aminosäure-auxotrophen Medien. Eine Übersicht der mbSUS Methode ist in Abbildung 7 dargestellt.

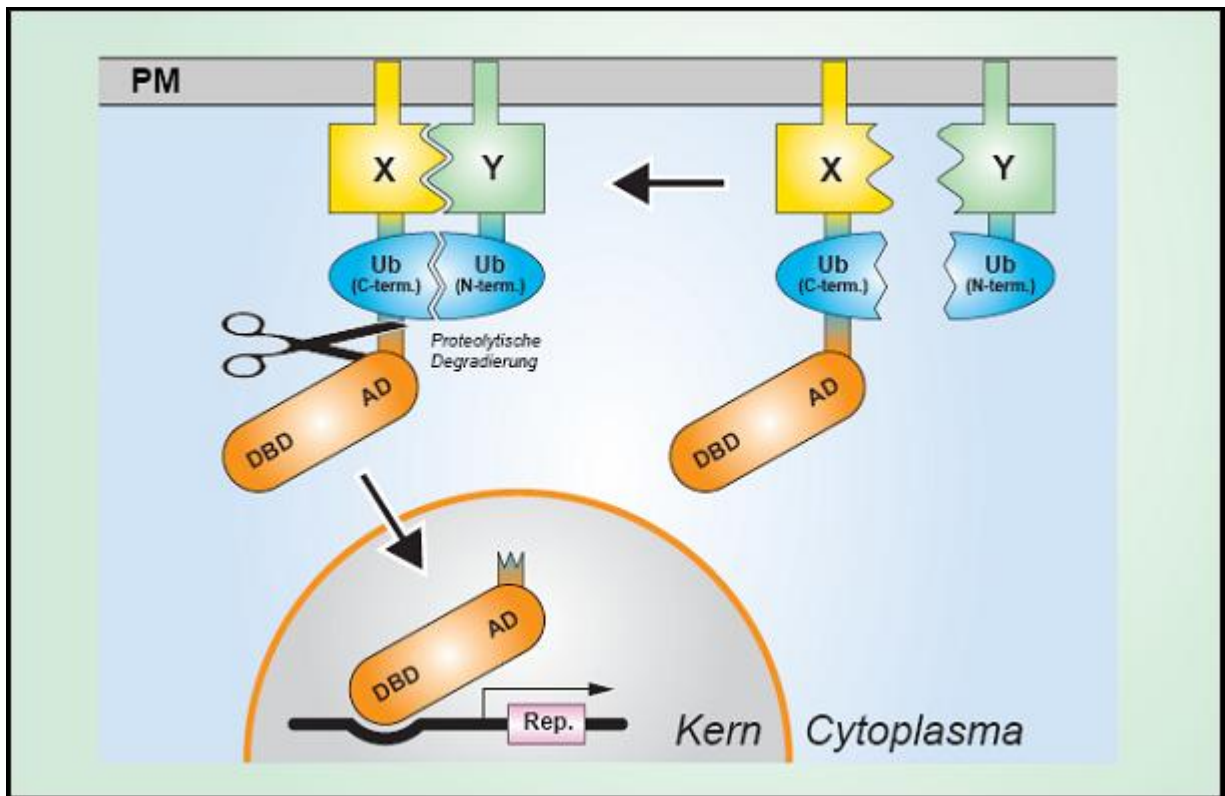


Abbildung 7: Übersicht über das *mating based Split Ubiquitin System*

Das als X gekennzeichnete *prey* Protein (in diesem Fall der hOCT2) ist an die C-terminale Hälfte des Ubiquitins (Ub C-term.) und den Transkriptionsfaktor gekoppelt und ist in der Plasmamembran (PM) lokalisiert. Y kennzeichnet ein unbekanntes *bait* Protein, welches an die N-terminale Hälfte des Ubiquitins (Ub N-term.) fusioniert ist. Findet nun eine Protein-Proteininteraktion zwischen X und Y statt, kommt es zu einer Reassoziierung der beiden Ubiquitinhälften und Ubiquitinspezifische Proteasen spalten den Transkriptionsfaktor ab. Dieser wandert in den Zellkern und bindet mit seiner DNA Bindungs Domäne (DBD) an die DNA und aktiviert mit der Aktivierungsdomäne (AD) spezifische Reportergene (Rep.) Die Aktivierung der Reportergene führt schließlich zum Wachstum der Hefezellen auf Aminosäure-auxotrophen Medien.

In dem von uns verwendeten mbSUS wurde das Reportermolekül durch den Transkriptionsfaktor PLV (protA-LexA-VP16 peptide) ersetzt. Dieser wird bei einer Protein-Proteininteraktion abgespalten, wandert in den Zellkern und aktiviert über den LexA Promotor die Reportergene für Histidin (*His3*), für Adenin (*Ade2*) und β -Galaktosidase (*LacZ*). Die verwendeten Hefezellen sind selber nicht in der Lage diese Aminosäuren zu synthetisieren. Nur im Fall einer Interaktion der beteiligten Proteine erfolgt die Aktivierung der Reportergene und damit die Fähigkeit der Hefe Adenin und Histidin zu synthetisieren. Dadurch kann eine Protein-Proteininteraktion durch Wachstum auf Nährmedium ohne Histidin und Adenin nachgewiesen werden. (Grefen et al. 2007). Zusätzlich kann als Zeichen der Interaktion ein β -Galaktosidase

Assay durchgeführt werden. Eine Aktivierung des Reportergenes *LacZ* ermöglicht der Hefe die Synthese des Enzyms β -Galaktosidase. Werden die Hefezellen mit X-Gal-Lösung (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) beschichtet, kann die β -Galaktosidase das Substrat X-Gal spalten und es wird ein blauer Indigofarbstoff freigesetzt. Die Hefekolonien erscheinen blau.

4.1.2 Herstellung der Konstrukte für die Protein-Proteininteraktionsanalysen

Für die Herstellung des C_{UB} Konstruktes wurde der Vektor pMetYC gate verwendet, der die C-terminale Hälfte des Ubiquitins, den Transkriptionsfaktor und das Gen für die Synthese von Leucin (Leu) enthält. Alle pMetYC gate Konstrukte wurden in Leucin defizienten Hefezellen (THY.AP4) exprimiert und in Medien ohne Leucin (-L Medium) selektiert. Der Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *Pst* I und *Hind* III geschnitten, durch Gelelektrophorese aufgetrennt und die Vektorbande mit einem Gelelektrophoresekit aufgereinigt. Der linearisierte Vektor wurde so für die später beschriebene *in vivo* Klonierung eingesetzt.

Für die Herstellung der N_{UB} Konstrukte wurden die Vektoren PNX gate 32 und PXN gate 21 verwendet, die die N-terminale Hälfte des Ubiquitins (N_{UB}G aminoternimal vom *prey* Protein im Vektor 32 und N_{UB}G carboxyterminal vom *prey* Protein im Vektor 21) sowie das Gen für die Biosynthese von Tryptophan enthalten. Alle *prey* Konstrukte wurden in Tryptophan defizienten Hefezellen (THY.AP5) exprimiert und in Medien ohne Tryptophan (-T Medium) selektiert. Für die *in vivo* Klonierung wurde der Vektor mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Sma* I geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt und gelelektrophoretisch aufgereinigt.

Für die Herstellung eines C_{UB} fusionierten hOCT2 Konstruktes wurde hOCT2 mittels den in Abbildung 8 dargestellten B1 und B2 *primern* amplifiziert.

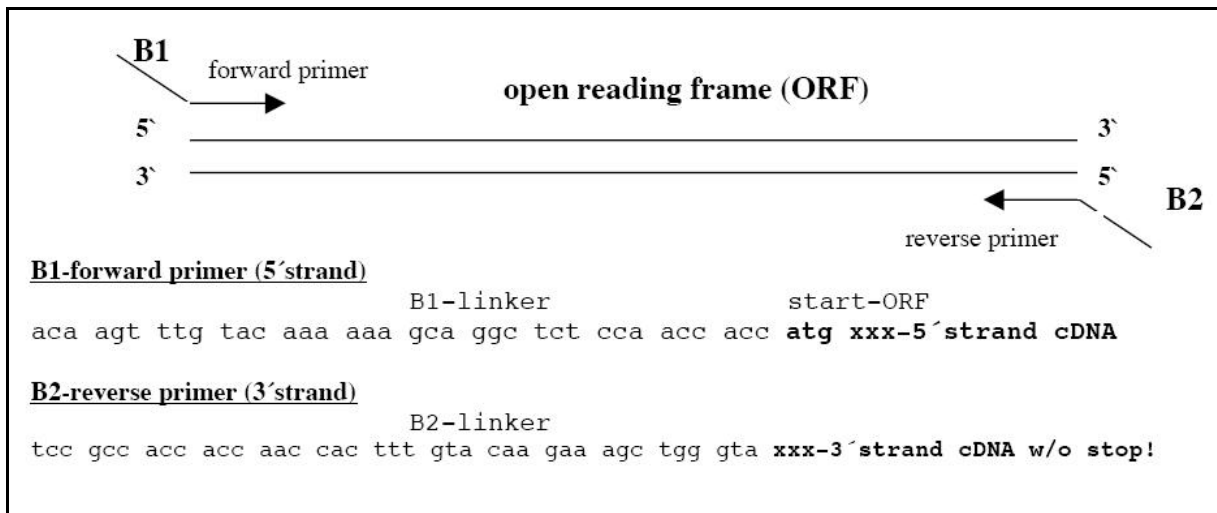


Abbildung 8: Primerdesign für die *in vivo* Klonierung (Obrdlik et al. 2004)

Vektoren und *inserts* wurden nun in *Sacharomyces cerevisiae* transformiert (4.1.4). Über *in vivo cloning* rekombinierte die Hefe den linearisierten Vektor und das PCR-Produkt.

4.1.3 Herstellung von Hefezellen, die kompetent für die Aufnahme von DNA sind (kompetenten Hefezellen)

Die Herstellung kompetenter Hefezellen erfolgte nach einem von Obrdlik (Obrdlik et al. 2004) veränderten Protokoll nach Gietz und Woods. (Gietz et al. 1995). Hierfür wurde jeweils eine Hefekolonie der Hefestämme THY.AP4 und THY.AP5 in 5ml YPD Medium angeimpft und über Nacht bei 30° C und 200 rpm angezogen. Diese Vorkultur wurde dann in 50 ml YPD Medium überimpft. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 wurden die Zellen für 3 min bei 1100xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 12,5 ml Aqua bidest. resuspendiert und ein weiteres Mal für 3 min und 1100xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,5 ml Lithiumacetat (0,1 M, pH 7,5) aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt (1min, 12500xg) wurden die Zellen in 0,4 ml Lithiumacetat (0,1 M, pH 7,5) aufgenommen. Nach einer 30 minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur können die Zellen für eine Transformation verwendet werden.

4.1.4 Transformation kompetenter Hefezellen

Unter bestimmten Bedingungen können die kompetenten Hefezellen Fremd-DNA aufnehmen (Transformierung). Dazu wurde die von Gietz (Gietz and Woods 2002) beschriebene Methode gewählt. Es ist bekannt, dass die Aufnahme von Fremd-DNA in Anwesenheit einzelsträngiger DNA Moleküle als so genannte Trägermoleküle wesentlich effizienter abläuft. Als einzelsträngige DNA wurde Heringssperma-DNA (ssDNA, Carrier DNA) verwendet. Diese wurde zunächst in 2 Zyklen erhitzt (100° C) und direkt im Eisbad wieder gekühlt um zusammengelagerte DNA Stränge zu trennen. Die Transformationsansätze wurden dann wie in Tabelle 11 pipettiert.

Tab. 11: Transformationsansatz für Hefezellen

Substanz	Angabe in µl für 1 Probe
50% PEG	70,0
1 M Lithiumacetat	10,5
Carrier DNA (10 mg/ml)	11,5
Kompetente Hefezellen	15,0
Linearisierter Vektor	3-5 µl (50-200 ng)
Volumen	100,0

Jedem Transformationsansatz wurden 50-100 ng *insert* DNA zugegeben. Der Ansatz wurde gut gemischt und bei 30° C für 30 min inkubiert. Darauf erfolgte ein Hitzesschock bei 43° C für 15 min, währenddessen die Hefezellen die DNA aufnehmen. Der Ansatz wurde dann bei 700xg für 10 min zentrifugiert und das Pellet in 100 µl Aqua bidest. resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 700xg für 5 min wurde das Zellpellet in 150 µl Selektionsmedium aufgenommen und 100µl der Suspension wurden auf Agar-Platten ausplattiert und für 2-3 Tage bei 30° inkubiert. Das Selektionsmedium wird der entsprechenden DNA angepasst. Im Fall des mbSUS werden alle Vektoren für die Konstruktin von N_{ub} fusionierten Proteinen in einem Medium ohne Tryptophan (-T Medium) und alle Vektoren für die C_{ub} fusionierten Proteine in ein Medium ohne Leucin (-L Medium) angeimpft. Hefezellen, die Plasmid DNA Moleküle aufgenommen haben, sind in der Lage die entsprechenden Aminosäuren zu synthetisieren und können somit im

Selektionsmedium wachsen. So werden nur die Hefen, die ein Plasmid aufgenommen haben, angereichert.

4.1.5 Überprüfung der *in vivo* Klonierung

Bei dieser Form der Klonierung wird die *insert* DNA durch homologe Rekombination (innerhalb der Hefezellen) in die Vektoren eingebaut. Die Vektoren wurden dazu mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten. Die *insert* DNAs wurden mit den in Abb. 8 dargestellten B1 und B2 *primern* amplifiziert, um kompatible Enden für die Rekombination in den jeweiligen Vektoren zu erhalten (Kap. 4.1.2).

C_{UB} Fusionen wurden in den Hefestamm THY.AP4 transformiert. THY.AP4 Hefezellen sind nicht in der Lage die Aminosäuren Adenin, Histidin, Leucin, Tryptophan und Uracil zu synthetisieren. Nur Hefezellen, die C_{UB} Plasmide aufgenommen haben, können im Selektionsmedium ohne Leucin wachsen, da das C_{UB} Plasmide ein Gen für die Expression von Leucin enthält. Um die Hefezellen anzureichern, die ein Plasmid aufgenommen haben, wurden also die C_{UB} Fusionen auf Medien angezogen, die alle Aminosäuren außer Leucin enthalten.

Der Hefestamm THY.AP5 wurde für die Transformation von N_{UB} Fusionen verwendet. THY.AP5 enthält Mutationen für die Aminosäuren Adenin, Histidin, Leucin und Tryptophan. Eine Selektion fand hier mit einem Medium statt, dem alle Aminosäuren außer Tryptophan zugesetzt wurden (-T Medium), da die Hefe nur durch die Transformation mit dem N_{UB} Konstrukt Tryptophan herstellen kann.

Über die Selektion auf den -L und -T Medien können die Hefezellen isoliert werden, die ein Plasmid aufgenommen haben. Nach der *in vivo* Klonierung ist es nun in einem nächsten Schritt entscheidend, die Hefezellen anzureichern, die ein Plasmid aufgenommen haben, in das auch das gewünschte *insert* eingebaut wurde. In dem mbSUS wird eine negative Selektion mit Geneticin (G418) durchgeführt. Die Vektoren für C_{UB} Fusionen und N_{UB} Fusionen (pMetYC gate, pXN gate 21 und pNX gate 32) enthalten eine Antibiotikaresistenz gegen G418 im Bereich ihrer Klonierungsstelle. Werden die Vektoren restriktionsgeschnitten und findet eine erfolgreiche *in vivo* Klonierung statt, wird an dieser Stelle die *insert* DNA eingebaut. Somit verlieren die Hefen das Resistenzgen für G418 und können in Gegenwart von G418 nicht mehr wachsen.

5-10 unabhängige Hefeklone wurden von der Platte gepickt und in 100 μ l destilliertem Wasser aufgenommen. Je 40 μ l dieser Suspension wurden in zwei Zentrifugenröhrchen mit je 5ml Selektionsmedium (Alle N_{ub} Fusionen in –T, alle C_{ub} Fusionen in –L Medium) angeimpft und über Nacht angezogen. Eine der beiden Übernachtskulturen wurde mit G418 (200 μ g/ml) versetzt. Eine erfolgreiche *in vivo* Klonierung war gegeben, wenn die Hefen in Medium mit G418 nicht gewachsen waren. Fand diese negative Selektion statt, wurde 1 ml der Hefekultur 30%ig mit Glycerin versetzt und bei -80° C als Stammkultur eingefroren. Abbildung 9 fasst die einzelnen Schritte der *in vivo* Klonierung zusammen.

in vivo cloning of B1-ORF-B2 into mbSUS vectors

EXAMPLE: CubPLV fusions in pMetYCgate vectors

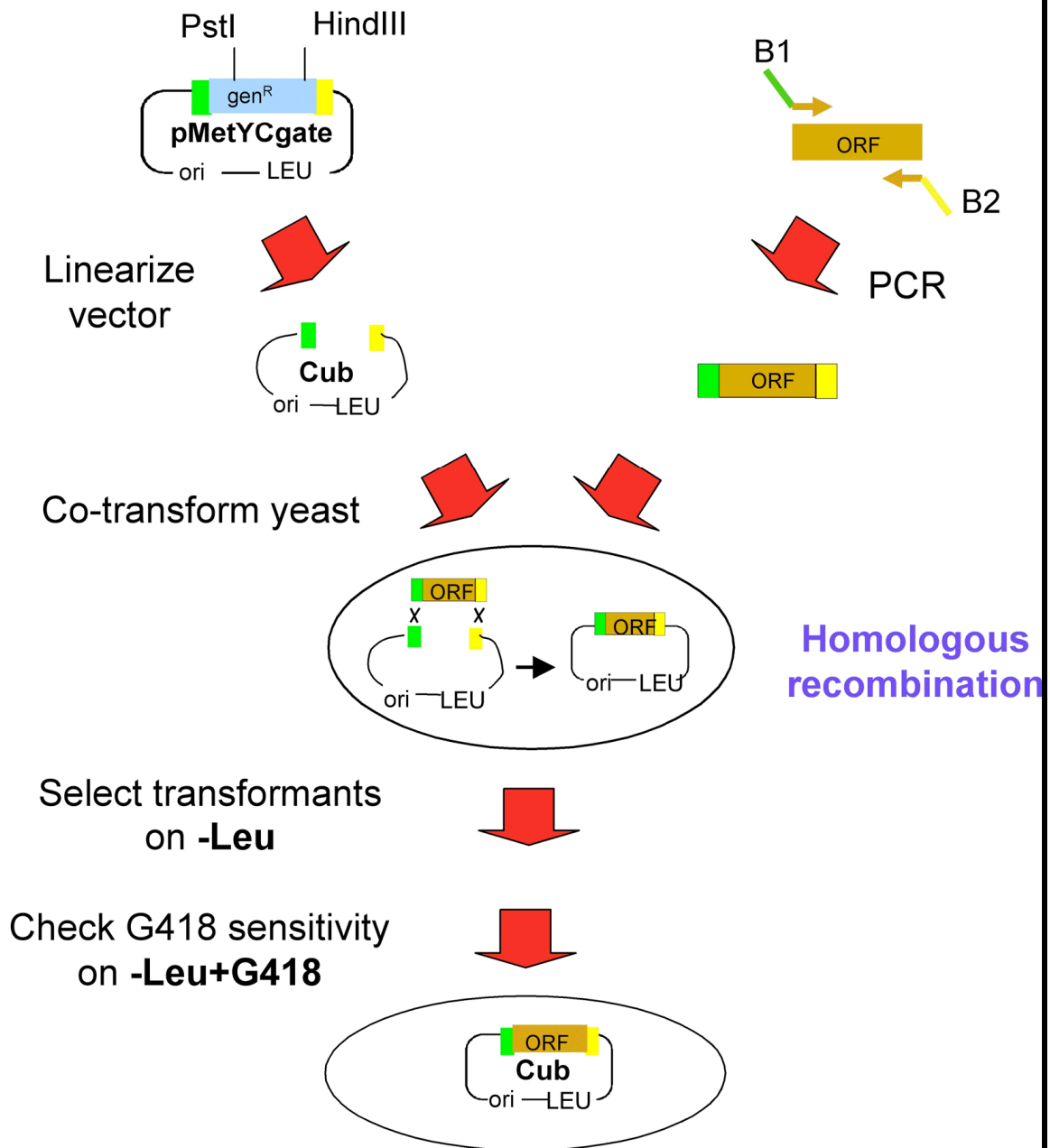


Abbildung 9: *In vivo* cloning in mbSUS Vektoren. Die Abbildung zeigt die Konstruktion der C_{UB} Fusionen. N_{UB} Fusionen wurden analog dazu mit linearisiertem PNx gate 32 bzw. PNx gate 21 Vektor hergestellt. Gen^R entspricht der Geneticinresistenz (G418), Leu entspricht Leucin (Obdrlik et al. 2004)

4.1.6 Mating

Das *mating* Verfahren dient der Paarung von Hefezellen. Hierzu werden die Paarungstypen α (THY.AP4) und a (THY.AP5) gekreuzt. In unserem Fall sollen die hOCT2 C_{UB} exprimierenden THY.AP4 Hefezellen in diesem Schritt mit N_{UB} Konstrukt enthaltenden THY.AP5 Hefezellen fusioniert werden mit dem Ziel, Hefezellen zu erhalten, die C_{UB} als auch N_{UB} Plasmide enthalten. Dazu wurden jeweils 1 ml erfolgreich selektierter Hefezellen pelletiert und in 200 μ l YPD Medium resuspendiert. Für das *mating* wurden jeweils 15 μ l dieser Suspensionen vermengt und folgende Kreuzungen durchgeführt: Als Negativkontrolle hOCT2 C_{UB} mit PNX gate 32 als N_{UB} Leervektor und PNX gate 21 ebenfalls als N_{UB} Leervektor. Für die Positivkontrolle wurden pNUBWT-X gate, der in Verbindung mit C_{UB} fusionierten Proteinen immer zu einem vollständigen Ubiquitinmolekül führt, da der Aminosäureaustausch Isoleucin zu Glycin fehlt. Aus den drei gemischten Suspensionen wurden je 4 μ l auf eine YPD-Platte getropft. Während einer Inkubationszeit von 6 bis 8 Stunden bei 30° C können sich die Hefezellen vereinigen. Um diploide Hefezellen zu selektieren, die sowohl C_{ub} als auch N_{ub} Plasmide enthalten, erfolgte ein Überimpfen der gewachsenen Kolonien auf Wachstumsplatten, die weder Leucin noch Tryptophan enthalten. Nur Hefezellen mit beiden Plasmiden sind in der Lage auf diesen Platten zu wachsen. Die Inkubationszeit beträgt 2-3 Tage bei 30° C.

4.1.7 Protein-Proteininteraktion

Interagiert das C_{ub} fusionierte hOCT2 Protein mit einem N_{ub} fusionierten Protein, entsteht ein Ubiquitinmolekül welches von Ubiquitinspezifischen Proteasen erkannt wird. Nach proteolytischer Degradation wird der angehängte Transkriptionsfaktor abgespalten, wandert in den Zellkern und aktiviert die Reportergene für Histidin Adenin und β -Galaktosidase. Um diese Interaktion nachzuweisen, wurden die nach dem *mating* erhaltenen Hefezellen auf Medien überimpft, die weder Leucin, Tryptophan noch Histidin und Adenin enthalten. Nach 3-7 Tagen konnte ein Wachstum der Hefen als Zeichen einer Interaktion dokumentiert werden. Die Übersicht in Abbildung 10 fasst die Arbeitsschritte zusammen.

flow chart of interaction tests / screens

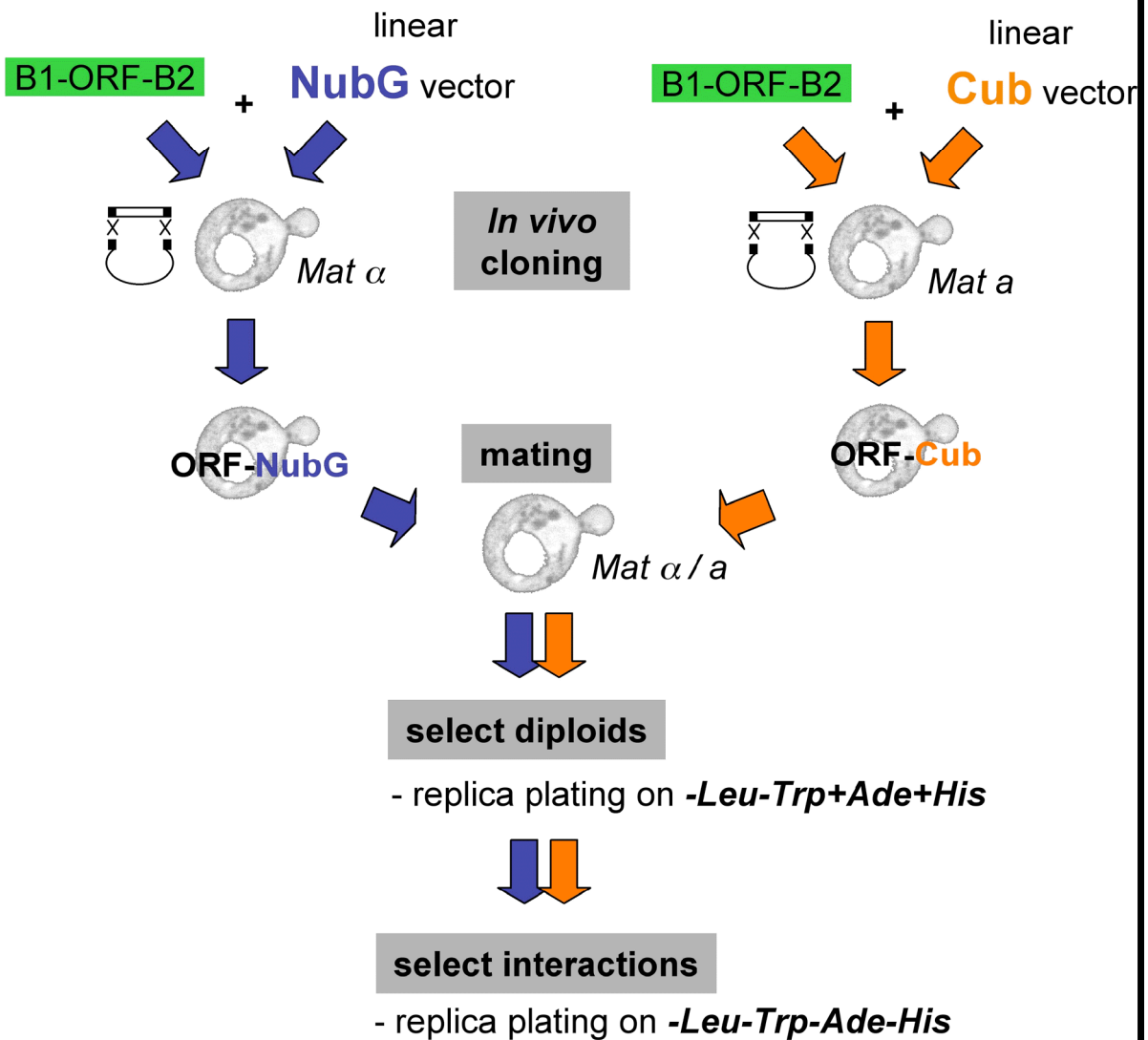


Abbildung 10: Mating und Interaktionstest: Mat α entspricht dem Hefestamm THY.AP5, Mat a dem Stamm THY.AP4. Leu, Trp, Ade und His entsprechen Leucin, Tryptophan, Adenin und Histidin. (Obrdlik et al. 2004)

4.1.8 Transformation der Human Kidney NubG-X cDNA Library und Interaktionsscreen

Für den Interaktionsscreen sollten die das hOCT2 C_{ub} Konstrukt enthaltenden Hefezellen gegen eine cDNA Bank der humanen Niere getestet werden, um Proteine zu finden, die mit dem hOCT2 interagieren. Die dafür benutzte cDNA Bank enthält das gesamte genetische Material der humanen Niere. Jeder cDNA-Strang liegt an N_{UB}G fusioniert vor. Diese cDNA-Bank wurde von der Firma Dual Systems erworben, die eine Variabilität von 2×10^6 unterschiedlichen Konstrukten innerhalb der Bank garantiert. Der Screen wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden in einem ersten Schritt die von uns hergestellten Hefezellen mit dem hOCT2 C_{ub} Plasmid als kompetente Zellen vorbereitet um in einem weiteren Schritt N_{UB} fusionierte cDNAs in diese Zellen zu transformieren, mit dem Ziel Hefezellen zu erhalten, die beide Plasmide exprimieren. Um hOCT2 C_{ub} kompetente Hefezellen herzustellen wurde der ausgewählte hOCT2 C_{ub} Hefeklon in 10 ml –L Medium angeimpft und für 8 Stunden bei 30° C und 180 rpm inkubiert, anschließend wurde diese Vorkultur in 100 ml –L Medium überimpft und bei 30° C und 180 rpm über Nacht weiter angezogen. Um die Hefezellzahl zu bestimmen und das Wachstum zu verfolgen wurde 1 ml dieser Kultur bei OD₆₀₀ gemessen. 30 OD Einheiten der Kultur wurden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 700xg für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 ml YPD Medium aufgenommen und bei 30° C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Die hOCT2 C_{ub} Hefezellen sind nun in einem optimalen Wachstumszustand um transformiert zu werden. Um diese Zellen für die Aufnahme von DNA optimal vorzubereiten, also kompetent zu machen, wurden die Zellen in 4 Fraktionen von 50 ml in entsprechende Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und bei 700xg für 5 min zentrifugiert. Die Pellets wurden mit 30 ml Aqua bidest. gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (700xg für 5 min) wurde jedes Pellet in 1ml LiAc/TE Master Mix (Tab. 12) aufgenommen und je in ein 1,5 ml Zentrifugationsgefäß überführt, nochmals zentrifugiert (700xg für 5 min) und je Pellet in 600 µl LiAc/TE Master Mix resuspendiert. Die Zellen konnten nun für die Transformation verwendet werden. Der Transformationsansatz und die vorgeschlagene Menge cDNA wurden nach dem Protokoll der Fa. Dual Systems eingesetzt. So wurden den in 4 Zentrifugenröhrchen (50 ml) vorliegenden kompetenten Hefezellen je 7 µl cDNA-Bank zugegeben, dieses entspricht 7 µg DNA

und ist der Hefezellzahl angepasst. Als Träger-DNA wurde jedem Ansatz 100 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml), die durch zwei Erhitzen-Auftau-Zyklen einzelsträngig gemacht wurde, zugeführt, außerdem wurde in jeden Ansatz 2,5 ml des in Tab. 13 aufgeführten PEG-LiAc Master Mixes pipettiert.

Die Ansätze wurden gut gemischt und für 45 min bei 30° C inkubiert. Darauf wurden jedem Röhrchen 160 µl DMSO beigemischt und jeder Ansatz nochmals bei 42° C für 20 min stehen gelassen. In dieser Inkubationszeit sollen die hOCT2 C_{ub} Hefezellen die N_{UB}G fusionierten cDNAs aufnehmen. Anschließend wurden die Zellen bei 700xg für 5 min pelletiert, in 3 ml YPD Medium resuspendiert und zu einem Ansatz gepoolt. Eine folgende Inkubation für 90 min bei 30° C, 180 rpm diente der Regeneration der Zellen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 700xg für 5 min wurden die Zellen in 4,8 ml 0.9% NaCl aufgenommen. Um Wachstum der verschiedenen Hefekonstrukte zu ermöglichen wurde der Ansatz auf 16 Schalen (15 cm Durchmesser) aufgeteilt. Bei dem Medium in den Schalen handelte es sich um sog. SD-Medium, ein Minimalmedium, dem außer Uracil alle Aminosäuren fehlen. Auf diesem Medium können nur Hefezellen wachsen, die sowohl beide Plasmide aufgenommen haben und zudem deren Proteine interagieren und entsprechende Reportergene aktivieren. Je 300 µl des Transformationsansatzes wurden pro Schale ausplattiert. Diese Screenplatten wurden mit Parafilm versiegelt und für 4-6 Tage bei 30° C inkubiert. Nach 3-4 Tagen konnte ein Wachstum der Transformanten dokumentiert werden.

Tab. 12: Zusammensetzung des LiAc/TE Master Mixes

LiAc/TE Master Mix	
Reagenz	Für 10 ml
1M Lithiumacetat	1,1 ml
10x TE pH 7,5	1,1 ml
Aqua bidest.	7,8 ml

Tab. 13: Zusammensetzung des PEG-LiAc Master Mixes

PEG/LiAc Master Mix	
Reagenz	Für 15 ml
1M Lithiumacetat	1,5 ml
10 TE pH 7,5	1,5 ml
50% PEG 3350	12 ml

4.1.9 Plasmid-DNA-Isolation aus *S. cerevisiae*

Zur Isolierung der Plasmide aus den Hefezellen wurde ein Hefe-Plasmid-Isolierungskit (Zymoprep I™ Yeast Plasmid Minipreparation Kit) der Firma Zymo Research verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Protokollangaben des Herstellers. Zum Aufschluss der Hefezellen wurde eine Hefekolonie von der Screenplatte in 150 µl „Solution 1-enzyme mixture“, suspensiert und für 30-45 min im Wasserbad bei 37° C inkubiert. 150 µl „Solution 2“ und „Solution 3“ wurden hinzugefügt und dazwischen wurde für jeweils 15 sek gevortext. Nach einer Zentrifugation (12500xg 2 min) wurde der plasmidhaltige Überstand abgenommen, zur Fällung der DNA mit 400 µl Isopropanol vermennt und wiederum gevortext. Daraufhin wurde die Suspension für 8 min bei 12500xg zentrifugiert und der Überstand abgenommen und verworfen. Nach einer weiteren Zentrifugation über 1 min wurde der restliche Überstand entfernt und das Plasmid Pellet in 35 µl TE Puffer aufgenommen.

4.2 Arbeiten mit Bakterien

4.2.1 Kultivierung von Bakterien

Bakterien wurden in LB Medium kultiviert. Um Plasmidhaltige Bakterien zu selektieren, wurde dem Medium ein entsprechendes Antibiotikum zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte schließlich in einem Luftschüttler bei 37° C und 200 rpm. Zur kurzfristigen Stammhaltung wurden Flüssigkulturen auf LB Agarplatten mit

entsprechenden Antibiotika ausgestrichen. Die Bakterien konnten so für 3-4 Wochen bei 4° C gelagert werden. Um eine Bakterienkultur längerfristig zu halten, wurde ein Aliquot einer Flüssigkultur, welche sich in der exponentiellen Wachstumsphase befand, 30%ig mit Glycerin versetzt und bei -80° C gelagert. Vorkulturen, die für weitere Arbeiten benutzt wurden, wurden entweder von einer Einzelkolonie einer Agarplatte oder aus einem Aliquot einer glycerinhaltigen Stammkultur angeimpft.

4.2.2 Bestimmung der optischen Dichte

Um das Wachstum von Bakterien in Flüssigkultur zu verfolgen fand eine Messung der optischen Dichte statt. Dies erfolgte in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀). Für die Messung wurden übliche Einmalküvetten einer Schichtdicke von 1 cm verwendet.

4.2.3 Herstellung kompetenter *Escherichia coli* Zellen mit der CaCl₂ Methode

50 ml LB Medium wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37° C und 200 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,27-0,4 angezogen. Diese Kultur wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, 10 min auf Eis gekühlt und für 10 min bei 2100xg und 4° C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in 10 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung (pH 7,5) resuspendiert und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation über 5 min bei 1500xg und 4° C wurden die Zellen in 2 ml CaCl₂, welches 10%ig mit Glycerin versetzt wurde, aufgenommen, in 100 µl Aliquote aufgeteilt und bei -80° C eingefroren (Morrison 1977).

4.2.4 Transformation von Plasmid-DNA in *E. Coli*

Die Transformation von DNA in kompetent gemachte Bakterien erfolgte nach der Methode von Lederberg und Cohen (Lederberg and Cohen 1974) (Cohen et al. 1972). Für die Transformation wurden 100 µl kompetent gemachter XL-1-Blue *E. coli*-Zellen mit ca. 500 ng Plasmid DNA vermengt. Nach 30 minütiger Inkubation auf

Eis erfolgte für 2 min bei 42° C der Hitzeschock, währenddessen die Bakterien Fremd-DNA aufnehmen sollen. Nach einer Inkubation für 1 min auf Eis wurden die Zellen in 900 µl LB Medium aufgenommen und bei 37° C und 200 rpm für 45 min angezogen. Nach einer Zentrifugation bei 2100xg für 4 min wurden 900 µl Überstand abgenommen und das Zellpellet im restlichen Medium resuspendiert. Die Zellen wurden auf LB Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37° C kultiviert.

4.2.5 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. Coli* Minipräparation

Die Isolation von Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Zyppy™ Plasmid Miniprep Kits der Firma Zymo Research nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Aufarbeitung basiert auf der Methode der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (Birnboim and Doly 1979). Nach alkalischer Lyse kann Plasmid-DNA wieder renaturieren während chromosomale DNA nicht vollständig renaturiert und mit den übrigen Bestandteilen des Zellextraktes (RNA, denaturierte Proteine, Zelltrümmer) durch Zentrifugation von der Plasmid-DNA getrennt werden kann.

Eine Bakterienkolonie wurde von der Agarplatte „gepickt“ und über Nacht in 2 ml LB Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37° C im Schüttler angezogen. 600 µl dieser Übernachtskultur wurden mit 100 µl „7x Lysis Buffer“ versetzt und geschwenkt, die Bakterien wurden aufgeschlossen. Daraufhin wurden 350 µl „Neutralization Buffer“ hinzugefügt, das ganze geschwenkt und gevortext. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 12500xg über 4 min wurde der plasmidhaltige Überstand (~ 900 µl) abgenommen und in eine „Zymo-Spin™ II Säule“ überführt. Diese Säule dient dem Sammeln und der Reinigung von Plasmid-DNA. Nach einer Zentrifugation bei 12500xg für 30 sek wurde der Durchfluss entfernt und 200 µl „Endo-Wash Buffer“ auf die Säule gegeben. Nach einer wiederholten Zentrifugation bei 12500xg für 30 sek, wurde die Säule mit 400 µl „Zyppy™ Wash Buffer“ gewaschen und abermals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde mit 30 µl „Zyppy™ Elution Buffer“, wie zuvor zentrifugiert und in ein Zentrifugenröhrchen eluiert. Die Plasmid-DNA wurde schließlich bei -20° C gelagert.

4.2.6 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. Coli* Maxipräparation

Für die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* im Rahmen einer Maxipräparation wurde das PureLink HighPure Plasmid Filter Purification Kit der Firma Invitrogen nach Angaben des Herstellers verwendet.

Eine Bakterienkolonie wurde in 100 ml LB Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37° C und 200 rpm inkubiert. Die Übernachtskultur wurde bei 4000xg für 10 min zentrifugiert und das Pellet in 10 ml „Resuspension Buffer (R3)“ resuspendiert. Die Suspension wurde nun mit 10 ml „Lysis Buffer (L7)“ versetzt und 5 mal geschwenkt. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min wurden 10 ml „Precipitation Buffer (N3)“ hinzugefügt. Die Lösung wurde nun durch mehrmaliges Schwenken homogenisiert und in eine „HiPure Filter Maxi Säule“, die zuvor mit 30 ml „Equilibration Buffer (EQ1)“ equilibriert worden war, überführt. Nach Durchfluss der Suspension wurde der erste Filter, der die Zellreste und ausgefallene chromosomale DNA von der Plasmid DNA trennt, verworfen und die Plasmid-DNA mit 50 ml „Wash Buffer (W8)“ gereinigt. Schließlich wurde die gereinigte DNA mit 15 ml „Elution Buffer (E4)“ eluiert. Um die Plasmid-DNA zu präzipitieren wurden dem Eluat 10,5 ml eiskaltes Isopropanol zugefügt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 16000xg für 30 min bei 4° C wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet in 5 ml Ethanol (70%) resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 16000xg für 5 min bei 4° C wurde der Überstand abermals abgenommen und das Pellet für 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die gereinigte präzipitierte DNA wurde schließlich in 500 µl TE Buffer (TE) aufgenommen und konnte so bei -20° C gelagert werden.

4.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren

4.3.1 Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um eine Methode, die der Amplifikation von DNA dient. Die DNA wird als Matrize (*template* DNA) von zwei spezifischen Oligonukleotiden

(*primer*), die sich an den beiden Enden der DNA anlagern können, mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase abgelesen und amplifiziert. (Saiki et al. 1988)

Das Grundprinzip beruht darauf, dass die *template* DNA durch Erhitzen denaturiert und als Einzelstrang vorliegt. Die *primer* können nun mit den komplementären Bereichen eines Einzelstranges hybridisieren (*annealing*). Die DNA-Polymerase verlängert die Primer vom 3'-Ende und es entsteht eine doppelsträngige DNA, die der *template* DNA exakt gleicht. Durch mehrfache Wiederholungen (25-35x) der Schritte Denaturierung, Hybridisierung und Synthese erfolgt eine exponentielle Vervielfältigung der DNA.

Die in dieser Arbeit verwendeten *primer* waren in der Regel zwischen 25 und 40 Basenpaare lang und wurden von der Firma MWG-Biotech AG bezogen. Um eine optimale Amplifikation zu gewährleisten, wurden die Primer so entworfen, dass beide Oligonukleotide eine ähnliche Schmelztemperatur (T^M) aufweisen.

Für die Amplifikation wurde eine *Pfx*-DNA-Polymerase aus *Thermococcus kodakaraensis* verwendet. Diese ist gekennzeichnet durch eine proofreading 3'-5' Exonucleaseaktivität und weist somit im Vergleich zur herkömmlichen *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* eine geringere Fehlerrate auf, da falsch eingebaute Nukleotide durch die Exonuklease ausgetauscht werden können. Die *Pfx*-DNA-Polymerase besitzt eine Syntheserate von 1-2 kb/min und hat ein Aktivitätsoptimum bei 72° C.

Die PCRs wurden folgendermaßen (Tab. 14) angesetzt und in einem programmierbaren Heizblock unter nachfolgenden Bedingungen (Tab. 15) durchgeführt.

Tab. 14: PCR Reaktionsmix

Bestandteile	Menge
10X AccuPrime <i>PFX</i> Reaction Mix	5µl
<i>primer</i> Mix (je 10µM)	1,5µl
<i>template</i> DNA (10pg-200ng)	≥1µl
AccuPrime <i>PFX</i> DNA Polymerase (1u/µl)	0,4-1µl
Wasser HPLC rein	Auf 50µl

Tab. 15: Programm zur Durchführung der PCR

Stufe	Temperatur	Dauer	Zyklen
I	98° C	5 min	1
II	98° C $T_{\text{Annealing}}$ 72° C	1 min 1 min 1,5 min/kb	35
III	72° C	10 min	1

Die Annealingtemperatur ist abhängig von den Schmelzpunkten der *primer* und kann wie folgt berechnet werden:

$$T_{\text{Annealing}} = (T^{\text{M}}[\text{primer 1}] + T^{\text{M}}[\text{primer 2}])/2 - 5^{\circ} \text{ C}$$

Nach erfolgter PCR wurde die DNA gelelektrophoretisch analysiert und bei Bedarf mit den unter 4.3.4. und 4.3.5 aufgeführten Methoden aufgereinigt.

Tab. 16: Übersicht der verwendeten *primer* und *templates* in der PCR

Konstrukt	<i>primer</i> 3' → 5'	<i>template</i>	Elongations Dauer	<i>annealing</i> Temperatur
HOCT2 für pEGFP-N3*	Forward: HOCT2-GFP-For CTC AGA TCT CGA GCT ATG CCC ACC ACC GTG GAC GAT Reverse: HOCT2-GFP-Rev CGG GAT GGA TCC GTT CAA TGG AAT GTC TAG TTT	HOCT2- PCDNA3.1. Plasmid°	2 min	56° C
LAPTM4A für pDsRed2- N1	Forward: LAPT-Red-For GAG CTC AAG CTT GAA TTC ATG GTG TCC ATG AGT TTC AAG Reverse: LAPT-Red-Rev TGG ATC CCG GGC GGC GGC CGC GGC AGG TAA GTA AGG AGG TG	cDNA humane Proximale Tubuli*	1 min	56° C

* wurde von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt

° wurde von Professor Koepsell vom Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt

Konstrukt	<i>primer</i> 3' → 5'	<i>template</i>	Elongations Dauer	<i>annealing</i> Temperatur
LAPTM4A für PCDNA6.F9	Forward: LAPT6.F9-For GAA TCC ACG CGT ATG GTG TCC ATG AGT TTC AAG Reverse: LAPT6.F9-Rev AC TCG AGC GGC CGC TCA GGC AGG TAA GTA AGG AG	cDNA humane Proximale Tubuli*	1 min	56° C

* wurde von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt

° wurde von Professor Koepsell vom Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt

4.3.2 Restriktion von DNA

Zur sequenzspezifischen Spaltung von DNA wurden Restriktionsenzyme verwendet. Diese Restriktionsendonukleasen der Klasse 2 erkennen spezifische meist palindromische DNA Basen-Sequenzen von 4, 6 oder 8 Basenpaaren und spalten die DNA innerhalb dieser Sequenzen.

Alle Restriktionsenzyme wurden nach Angaben des Herstellers verwendet und mit den entsprechenden Reaktionspuffern eingesetzt. Die Restriktion erfolgte üblicherweise in Ansätzen zwischen 10-30 µl für 4 Stunden bei einer vom Hersteller angegebenen Temperatur (meist 37° C). Die zu spaltende DNA wurde dafür mit dem Reaktionspuffer (1/10 vom Endvolumen) und der Restriktionsendonuklease (1 U Enzym/µg DNA) versetzt und mit Aqua bidest. bis zum gewünschten Volumen aufgefüllt. Für eine erforderliche Inaktivierung des Enzyms, wurde der Ansatz für 20 min bei 65° C inkubiert.

Nach erfolgter Restriktion wurde die DNA gelelektrophoretisch analysiert und bei Bedarf mit den unter 4.3.4 und 4.3.5 aufgeführten Methoden aufgereinigt.

Tab. 17: Übersicht der verwendeten Konstrukte und Restriktionsenzyme

Konstrukt	Vektor	insert	Restriktions Enzyme	Bedingungen
HOCT2-GFP*	pEGFP-N3	HOCT2 für pEGFP-N3	<i>Xho</i> I <i>Bam</i> H I	37° C 4h BSA 10% (v/v) 65° C 20min Buffer 3
LAPT-DsRed	pDsRed2-N1	LAPTM4A für DsRed2-N1	<i>Hind</i> III <i>Sma</i> I	37° C 4h 65° C 20min Buffer 2 25° C 4h 65° C 20min Buffer 4
LAPT-6.F9	PCDNA6.F9	LAPTM4A für PCDNA6.F9	<i>Mlu</i> I <i>Not</i> I	37° C 4h BSA 10% (v/v) 65° C 20min Buffer 3

* wurde von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt

Alle Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs bezogen und mit den vom Hersteller angegebenen Reaktionspuffern eingesetzt.

4.3.3 Ligation von DNA

Zur Ligation von linearisierter Vektor-DNA und restringierten DNA-Fragmenten wurde T4-DNA-Ligase eingesetzt. T4-DNA-Ligase ist ein Enzym, das DNA Stränge verknüpft, indem es in Anwesenheit von ATP eine Phosphodiesterbindung zwischen dem 5'-PO₄-Ende (Phosphatrest) und dem 3'-OH-Ende (Desoxyribose) von Nukleinsäuren katalysiert.

Für eine optimale Effizienz der Ligation wurde das *insert* im Verhältnis zum Vektor im dreifachen molaren Überschuss eingesetzt. Die Menge an eingesetztem Vektor betrug 50-90 ng. Der Ansatz erfolgte üblicherweise in 10-20 µl Ansätzen, wobei die zu ligierende DNA mit dem vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffer (1/10 Endvolumen) und 3 U T4-DNA-Ligase versetzt und mit Aqua bidest. bis zum gewünschten Endvolumen aufgefüllt wurde. Die Inkubation erfolgte bei der Ligation von „blunt end“ DNA („blunt end“ DNA wird so in der Mitte einer symmetrischen

Sequenz geschnitten, dass beide Enden gleich lang sind. Man spricht von stumpfen Enden) über Nacht bei 16° C. „sticky ends“ DNA („sticky ends“ DNA wird versetzt geschnitten, so dass ein 5'- oder 3'-Ende überhängt. Man spricht von einem überhängenden oder einem klebrigen Ende) wurde für 2 Stunden bei 25° C und nachfolgend 2 Stunden bei 16° C inkubiert.

4.3.4 Aufreinigung von DNA mit dem DNA Clean and Concentrator Kit

(Zymo Research, nach Angaben des Herstellers)

Die Aufreinigung von DNA dient der Erhöhung der Konzentration sowie der Reinigung der DNA. Im Falle einer PCR werden *primer*, dNTPs und die Polymerase entfernt, nach einer Restriktion erfolgt die Entfernung der Enzyme sowie des Puffers. Die DNA wurde in ein 1,5 ml Zentrifugationsgefäß überführt und mit 2 Volumenanteilen „DNA Binding Buffer“ versetzt. Die Suspension wurde in eine „Zymo-Spin™ Säule“ überführt und bei 12500xg für 30 sek zentrifugiert. Nachdem der Durchfluss verworfen worden war, wurde die DNA zweimal mit 200 µl „Wash Buffer“ durch Zentrifugation bei 12500xg für 30 sek gewaschen. Die gereinigte DNA wurde schließlich mit 10 µl Wasser (HPLC gereinigt) durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 12500xg für 30 sek in ein 1,5ml Zentrifugationsgefäß eluiert. Die gereinigte DNA kann so in nachfolgende Reaktionen eingesetzt oder bei -20° C gelagert werden.

4.3.5 Aufreinigung mit dem DNA Gel Recovery Kit

(Zymo Research, nach Angaben des Herstellers)

Linearisierte und elektrophoretisch aufgetrennte DNA wurde aus dem Agarosegel mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Zentrifugationsgefäß überführt. Jedem Volumenanteil Agarose wurden 3 Teile „ADB Buffer™“ zugefügt. Das Gelstückchen wurde für 5-10 min bei 55° C inkubiert, bis das Gel komplett gelöst war. Die gelöste Agarose wurde in eine „Zymo Spin I™ Säule“ überführt und bei 12500xg für 30 sek zentrifugiert. Nachdem der Durchfluss verworfen worden war,

wurde die DNA zweimal mit 200 µl „Wash Buffer“ durch Zentrifugation bei 12500xg für 30 sek gewaschen. Die gereinigte DNA wurde schließlich mit 10 µl Wasser (HPLC gereinigt) durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 12500xg für 30 sek in ein 1,5 ml Zentrifugationsgefäß eluiert. Die gereinigte DNA kann so wiederum in nachfolgende Reaktionen eingesetzt oder bei -20° C gelagert werden.

4.3.6 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Didesoxynukleotidtriphosphaten nach der Methode von Sanger (Sanger and Coulson 1975).

Die Sequenzier-PCR wurde wie in Tab. 18 pipettiert und unter nachfolgenden Bedingungen (Tab. 19) in einem programmierbaren Heizblock durchgeführt.

Tab. 18: Sequenzier-PCR Reaktionsmix

Bestandteile	Menge
Aqua bidest.	5µl
5xSequenzier-Buffer	2µl
Big Dye 3.1	1µl
<i>template</i> : Plasmid-DNA	1µl
<i>primer</i> (100 pm)	1µl
Gesamt	10µl

Tab. 19: Programm zur Durchführung der Sequenzier-PCR

Temperatur	Dauer	Zyklen
96° C	30 s	
50° C	30 s	
60° C	4 min	25

Die Sequenzierung mit anschließender Gelelektrophorese wurde vom Zentrallabor des Universitätsklinikums Münster durchgeführt und erfolgte in einem Hitachi Applied Biosystems DNA Analyser.

4.3.7 Elektrophoretische Trennung von DNA in Agarosegelen

Um DNA Fragmente sichtbar zu machen und nach erfolgter PCR, Restriktion oder Ligation zu analysieren und gegebenenfalls aufzureinigen, wurden Agarosegelelektrophoresen durchgeführt. Nukleinsäuren wandern aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatgruppen in einem elektrischen Feld Richtung Anode und werden so im Agarosegel getrennt. Das Grundprinzip beruht darauf, dass die Agarose durch die Siebstruktur ihrer Poren kleineren DNA Fragmenten einen geringeren Widerstand bietet. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist somit indirekt proportional zur Molekülgröße und zur Agarosekonzentration des Gels.

Zur Herstellung von Agarosegelen wurden 70 bzw. 150 ml 1 x TAE-Puffer 0,5-2% (w/v) mit Agarose versetzt, durch Aufkochen gelöst, mit Ethidiumbromid vermischt und in eine Gelkammer gegossen.

Um die Lauffront zu markieren und die Dichte zu erhöhen wurden die Proben mit 1/6 Gel-Lade-Puffer versetzt. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE-Puffer verwendet. Die Elektrophorese wurde schließlich bei einer angelegten Spannung von 90-120 Volt durchgeführt. Die Nukleinsäurebanden konnten durch die Interkalation des Ethidiumbromids mit Hilfe eines UV Transilluminators dargestellt werden. Um die Größe von DNA Fragmenten abzuschätzen, wurden DNA Längenstandards in Form eines Markers mit aufgetragen und dementsprechend aufgetrennt.

TAE-Puffer (50 fach): Tris: 242,28 g/l (2.00 mol/l)
 EDTA-Na: 18.61 g/l (0.05 mol/l)
 Acetat: 60.05 g/l (1.00 mol/l)
 pH 8

4.3.8 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration einer DNA Lösung kann mittels Ultraviolettabsorptionsspektroskopie bestimmt werden. Das Prinzip beruht darauf, dass die Absorption von ultraviolettem Licht durch DNA direkt proportional zur Menge der DNA ist. Die Absorptionsmessung erfolgte in einer Küvette bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Mit dem OD_{260} Wert kann die Konzentration der DNA bestimmt werden,

wobei eine OD_{260} von 1 einer DNA Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ entspricht. Das Verhältnis von OD_{260} zu OD_{280} gibt die Reinheit der DNA wieder. Bei proteinfreien Nukleinsäurelösungen liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2,0. Bei Kontamination mit Proteinen oder RNA liegt der Wert unter 1,8.

Zur Messung wurde die DNA-Lösung 1:100 mit Aqua dest. verdünnt. Die Messung erfolgte in einem Bio Rad SmartSpect™ 3000.

4.4 Arbeiten mit Zellen

4.4.1 Zelllinien

Für diese Arbeit wurden HEK 293 Zellen verwendet. HEK 293 Zellen stammen aus menschlichen embryonalen Nierenrindenzellen, wachsen epitheloid, ohne Bürstensaum mit einer apikalen *zona occludens* und weisen Charakteristika distaler Tubuluszellen auf (Simmons 1990;Lenz et al. 1999) . Des Weiteren sind sie mit dem humanen Adenovirus 5 transformiert (Graham et al. 1977). HEK 293 Zellen sind als Expressionssystem für klonierte Proteine etabliert, wobei zahlreiche Studien unter anderem auch über organische Kationentransporter darauf verweisen (Breidert et al. 1998;Grundemann et al. 1998a;Urakami et al. 2002). Neben HEK 293 WT (Wildtyp) Zellen wurden 2 stabil transfizierte Zelllinien verwendet. HEK 293 hOCT2 Zellen wurden uns freundlicherweise von Professor Koepsell vom Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt. HEK 293 hOCT2-GFP Zellen, welche permanent eine Fusion aus hOCT2 und *Green Fluorescent Protein* (Tsien 1998) stabil exprimieren, wurden mir von der Arbeitsgruppe zur Nutzung überlassen.

4.4.2 Zellkultur

Die Kultivierung und Stammhaltung der Zellen erfolgte in 50 ml Zellkulturflaschen.

Als Nährmedium wurde Dulbecco's MEM (Modifiziertes Eagle Medium) mit 3,7 g/l NaHCO₃, und 1 g/l D-Glucose verwendet. Dem Medium wurden des Weiteren zugesetzt:

- L-Glutamin 2 mM
- Penicillin 100000 E/l
- Streptomycin 100000 µg/l
- Fötale Rinderserum 10 % (v/v)
- G418 500 mg/l (Zugabe erfolgte nur bei stabil transfizierten Zelllinien)
(Mycoplasmen getestet)

Die Zellen wurden bei 37° C in einer Atmosphäre von 92% Raumluft und 8% CO₂ in Kultur gehalten. Nach 7 Tagen erfolgte eine Passagierung der Zellen. Dafür wurde der konfluente Monolayer mit einem Ca²⁺- und Mg²⁺- freiem PBS Puffer abgelöst. Ein Teil der Zellen wurde in eine neue Kulturflasche überführt, der Rest je nach Gebrauch ausgesät. Dies erfolgte in 10cm Schalen, 96-Well Platten sowie auf mit Kollagen beschichteten Deckgläschen in 24-Well Platten.

4.4.3 Transfektion von HEK 293 Zellen

(Turbofect™ in vitro Transfection Reagent, Fermentas, nach Angaben des Herstellers)

Die Transfektion von HEK 293 Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte 24 Stunden nachdem die Zellen ausgesät wurden, wobei die Konfluenz adhärenter Zellen am Tag der Transfektion 50-70% betrug.

Für die Transfektion von Zellen eines Wells einer 24-Well Platte wurde folgendes Protokoll verwendet.

- 1 µg DNA wurde in 100 µl serumfreien DMEM verdünnt.
- 2 µl Turbofect wurden der verdünnten DNA zugegeben und durch 2-3 maliges Pipettieren gemischt.
- Nach einer Inkubationszeit von 20 min wurde der DNA/Turbofect Mix tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert.

Die Transfektion von 96-Well Platten bzw. von 10cm Schalen erfolgte analog hierzu, wobei die Mengen der einzelnen Reagenzien der Tabelle 20 zu entnehmen sind.

Tab. 20: Transfektionsansätze

Gefäß	DNA (µg)	Medium (µl)	Turbofect (µl)
96-Well	0,2	20	0,4
24-Well	1	100	2
10 cm Schale	14	1200	42

Bei 10 cm Schalen erfolgte 4-8 Stunden nach der Transfektion ein Medienwechsel.

4.4.4 Herstellung von Zelllysaten

Für Westernblotanalysen und *Pulldown Assays* wurden HEK 293 Zellen mit 2 verschiedenen Methoden lysiert. Zum Einen wurden Gesamtzelllysate hergestellt, zum Anderen wurden die Membranproteine mit einem entsprechenden Kit extrahiert.

Isolation von Membranproteinen

(Plasma Membrane Protein Extraction Kit, Biovision, nach Angaben des Herstellers)

5-10 x 10⁷ Zellen (10 cm Petrischale) wurden mit ca. 10 ml PBS der Firma Biochrom AG bei Raumtemperatur vorsichtig gewaschen. Die adhärennten Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst und in 1 ml eiskaltem PBS aufgenommen. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 700xg für 5 min bei 4° C wurde das Zellpellet in 1 ml „Homogenize Buffer“ resuspendiert. Zur Zelllyse wurde die Suspension 30 mal mit einer 1 ml Insulinspritze durch eine Kanüle mit einem Durchmesser von 0,45 mm

aufgezogen. Sämtliche Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Nachdem die Lyse der Zellen im Lichtmikroskop überprüft wurde, wurden die Zellen in ein 1,5ml Zentrifugationsgefäß überführt und bei 700xg für 10 min bei 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und abermals zentrifugiert (10000xg für 30 min bei 4° C). Der Überstand enthält die zytosolische Fraktion, das Pellet die gesamten zellulären Membranproteine. Zur kurzfristigen Lagerung wurden die Pellets bei -80° C eingefroren.

Zur weiteren Analyse wurden die pelletierten Membranproteine in 100µl PBS + 0,5% Triton X aufgenommen.

Herstellung von Gesamtzelllysaten

Die Zellen einer 10cm Petrischale wurden einmal vorsichtig mit 10 ml PBS gewaschen und mittels Zellschaber in 1 ml eiskalten Lysispuffer aufgenommen.

Lysispuffer:	Triton X-100	1% (v/v)
	NaCl	150 mM
	Tris	50 mM
	EDTA	1 mM
	EGTA	1 mM
	Glycerin	30% (v/v)
	NaV ₃	10 mM

Zusätzlich wurde eine Minitablette Compete Proteinase Inhibitor Cocktail in 10ml Lysispuffer gelöst.

Die Zellen wurden darauf in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und durch Sonizieren mit einem Ultraschallstab der Firma Bandolin Sonoplus bei 70 W und 20 kHz für 30 sek lysiert. Zur Überprüfung der Lyse wurden die Zellen im Lichtmikroskop kontrolliert, wobei ein fehlender leuchtender Halo um die Nuklei eine vollständige Zelllyse indizierte. Nun wurde die Suspension in ein 1,5 ml Zentrifugationsgefäß überführt und bei 700xg für 10 min bei 4° C pelletiert. Der Überstand, der die Gesamtproteine enthält, wurde abgenommen, aliquotiert und für weitere Arbeiten bei -80° C eingefroren.

4.5 Arbeiten mit Proteinen

4.5.1 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine analytische Methode der Biochemie, die unter denaturierenden Bedingungen der Trennung von Stoffgemischen dient (Laemmli 1970). Des Weiteren kann damit die molekulare Masse von Proteinen bestimmt werden. Das Prinzip beruht auf einer Wanderung von Proteinen im elektrischen Feld zur entgegengesetzt geladenen Elektrode. Um eine konstante Ladungsverteilung zu gewährleisten, werden die Proteine mit einem anionischen Detergenz, in diesem Fall SDS, versetzt. Durch die Bindung von SDS erhält das Protein eine stark negative Ladung, welche zur Masse des Proteins proportional ist. Die ursprüngliche Ladung des nativen Proteins ist wesentlich kleiner und kann somit vernachlässigt werden. Die Wanderungstrecke der Proteine ist dabei indirekt proportional zum Logarithmus der molekularen Masse.

Die Zugabe von SDS bewirkt ferner eine Unterbrechung von Wasserstoffbrücken, wodurch Sekundär- und Tertiärstrukturen aufgebrochen werden. Mögliche Disulfidbrücken können durch Reduktion mittels β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) gespalten werden.

Als Trennmedium dient bei der SDS-PAGE ein Gel auf Polyacrylamidbasis. Zusätzlich zu den Proben wird ein Marker auf dieses Gel geladen. Dieser besteht aus Proteinen bekannter Größe und ermöglicht dadurch eine ungefähre Bestimmung der Größe der Proteine in den eigentlichen Proben.

Für die SDS-PAGE wurden käuflich erwerbbar 4-20% „Precise Protein Gele“ der Firma Thermo Scientific verwendet. Die Proteinproben wurden zum Denaturieren 25%ig mit „Nupage LPS Sample Buffer“ (4x) der Firma Invitrogen versetzt und für 5-10 min bei 95° C gekocht. Die Elektrophorese erfolgte schließlich 1 h bei 30 mA, wobei als Laufpuffer der „BUPH™ Tris-Hepes-SDS-Running Buffer“ der Firma Thermo Scientific eingesetzt wurde.

4.5.2 Westernblot Analyse

Unter Westernblot versteht man die Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran und die anschließende Detektion der Proteine mittels Antikörper. Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden elektrophoretisch auf eine PVDF- (Polyvinylidendifluorid) Membran übertragen, bleiben an dieser haften und können immunologisch über spezifische Antikörper nachgewiesen werden (Burnette 1981).

Für den Transfer der getrennten Proteine aus der SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran wurde ein Tank-Blot System verwendet. Hierfür wurden entsprechende Filterpapiere sowie die Membran auf Größe des Gels zugeschnitten. Die Membran wurde vor Verwendung durch 2 minütiges Inkubieren in Methanol (100%) aktiviert. Gel, Membran und Filterpapiere wurden gut befeuchtet in die Kompressionskassette des Tank-Blot Systems gegeben und die Kassette in die Tankkammer eingelegt. Die Kammer wurde schließlich mit Transferpuffer gefüllt. Die Übertragung der Proteine erfolgte über Nacht bei einer angelegten Spannung von 15 V und 4° C.

Transferpuffer: Glycin 28,84g
 Tris 6,68g
 Methanol 200ml
 Aqua bidest. ad 2l

4.5.3 Reversible Färbung der transferierten Proteine mit Ponceau S

Ein erfolgreicher Proteintransfer im Westernblot auf die PVDF-Membran kann mittels Ponceau Färbung nachgewiesen werden (Salinovich and Montelaro 1986). Hierfür wurde die Membran nach dem Blotting in eine Schale überführt und für eine Minute in Ponceau S Lösung geschwenkt. Nach Entfernung der Färbelösung wurde die Membran in Aqua dest. gewaschen und so lange entfärbt, bis den einzelnen Proteinen entsprechende rote Banden sichtbar wurden. Eine komplette Entfärbung der Membran erfolgte schließlich mit PBS.

Ponceau S Färbelösung

Ponceau S 0,2% (w/v)

Trichloressigsäure 3,0% (w/v)

4.5.4 Immundetektion von Proteinen nach dem Western Blotting

Proteine auf der PVDF-Membran können mit spezifischen Primärantikörpern und enzymgekoppelten Sekundärantikörpern nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgt dabei über den Substratumsatz der konjugierten Enzyme. Horseradish Peroxidase ist ein Enzym, das die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form bewirkt und somit eine Chemilumineszenzreaktion katalysiert.

Alle folgenden Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, die Inkubationen erfolgten dabei auf einem Kippschüttler.

Die PVDF-Membran wurde zunächst für 45 min in Blockierungslösung geschwenkt um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde die Membran für 90 min mit dem verdünnten Primärantikörper inkubiert. Als Verdünnungslösung für die Antikörper wurde TBST verwendet. Nach 3 Waschschritten für 10 min mit TBST erfolgte eine einstündige Inkubation der Membran mit dem verdünnten Sekundärantikörper. Nach einem weiteren dreimaligen Waschschriff für 10 min in TBST wurde die Membran mit Entwicklerlösung behandelt und die Luminenszenz mit einem Lumi-Imager F1 der Firma Roche detektiert.

Verwendete Lösungen

10x TBST	0,1M Tris 1,5M NaCl 0,5% Tween Filtrieren pH 8,0 Aqua bidest ad 1l
Blockierungslösung	TBST Gelatine 3% (v/v)

4.5.5 Pulldown Assay (in vitro Bindungsanalyse)

Um die Interaktion von Proteinen aus dem *mating based Split Ubiquitin System* mit dem hOCT2 in einer unabhängigen Methode zu bestätigen wurde ein *His-Pulldown Assay* durchgeführt. Bei dieser Methode wird eines der beiden Interaktionspartner als His-Fusionsprotein in HEK 293 Zellen exprimiert. Dieses Protein kann über den His-Anteil (*tag*) über die Affinität zu einem 2 fach positiv geladenen Kobaltion an Talon Sepharose Partikel (*beads*) binden. Diese Bindung entsteht dadurch, dass die Imidazolgruppen der Histidine mit den 2 fach positiv geladenen Kobaltionen der *beads* eine koordinative Bindung eingehen (Abbildung 11).

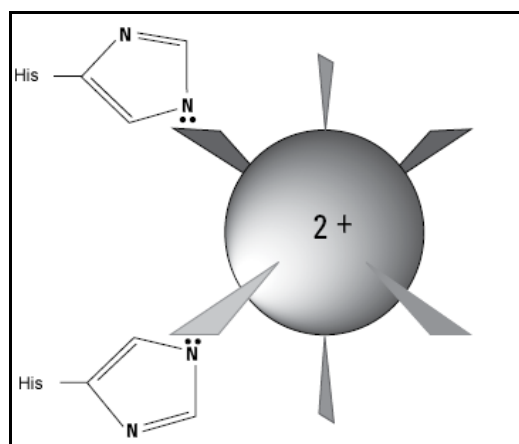


Abbildung 11: Bindung der Imidazolgruppen an das Kobaltion [verändert nach Clontech Talon Metal Affinity Resin User Manual].

Die Abbildung zeigt wie 2 Imidazolgruppen des 6-fach Histidin-tags mit dem Kobaltion der *Talon Metal Beads* eine Bindung eingehen.

Diese Bindung kann aufgehoben und die gebundenen Proteine eluiert werden indem man eine hohe Konzentration von Imidazol hinzugibt. Das Imidazol konkurriert mit dem gebundenen Histidin um die Kobaltionen. Des Weiteren kommt es zu einer Protonierung am Histidin, es entsteht eine positiv geladene Ammoniumgruppe, die von den Metallionen der *beads* abgestoßen wird.

Inkubiert man das His-Fusionsprotein mit einem Zellextrakt, der einen überexprimierten Interaktionspartner erhält, so kann dieses Protein an das

Fusionsprotein binden. Diese Bindung kann durch eine Westernblot Analyse nachgewiesen werden.

Für den *Pulldown Assay* wurden HEK 293-WT Zellen und HEK 293-hOCT2 Zellen in 10 cm Schalen ausgesät. Nach 24h wurden die WT Zellen wie unter 4.4.3 beschrieben mit dem LAPTM4A-6.F9 Konstrukt transfiziert.

Zelllysate von LAPTM4A-6.F9 transfizierten Zellen und hOCT2 Zellen wurden wie unter 4.4.4 beschrieben hergestellt.

50 µl des LAPTM4A-6.F9 Lysates (4-7 µg/µl) sowie 50 µl eines hOCT2 Lysates wurden mit je 100 µl *Talon Metal Affinity Beads*, die zuvor dreimal mit Waschpuffer gewaschen und 1:1 darin aufgenommen worden waren, vermischt und für 2 h bei 4° C im Überkopfschüttler inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 1 ml Waschpuffer wurden jene *Talon Sepharose Beads*, die mit LAPTM4A-6.F9 inkubiert worden waren, mit 200 µl hOCT2 Lysat vermischt und bei 4° C im Überkopfschüttler inkubiert. Nach 2 h erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 1 ml Waschpuffer. Nach einem Zentrifugationsschrift bei 650xg für 3 min wurde der Überstand abgenommen und verworfen und die Proteine an den *beads* mit 50 µl Elutionspuffer eluiert. Nach einer Inkubation auf Eis von 5 min wurden die *beads* kurz abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die beiden Eluate wie in 4.5.2 beschrieben weiter verwendet.

4.6 Fluoreszenzmikroskopie

4.6.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Bei der indirekten Immunfluoreszenz handelt es sich um eine Methode, mit der ein gesuchtes Antigen mittels Antikörper sichtbar gemacht wird. Spezifische unkonjugierte Primärantikörper binden dabei an das gesuchte Antigen. Um diese Anlagerung zu lokalisieren wird ein Farbstoff gekoppelter Sekundärantikörper verwendet, der gegen ein Epitop des Primärantikörpers gerichtet ist. Die spezifischen Antigen-Antikörperkomplexe können nun durch UV-induzierte Anregung des Farbstoffes nachgewiesen und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes sichtbar

gemacht werden. Als Primäres Antigen wurde der Flag-*tag* des Vektors PCDNA 6.F9 verwendet.

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden HEK 293 WT sowie HEK 293 hOCT2-GFP Zellen verwendet. Die Zellen wurden auf mit Kollagen beschichteten Deckgläschen in 24 Well Platten ausgesät und nach 24 h mit dem LPTM4A-6.F9 Konstrukt wie unter 4.4.3 beschrieben transfiziert. Nach 2 Tagen wurden der Zellrasen einmal kurz in PBS gewaschen und für 3 min bei -20° C mit Ethanol (absolut) fixiert. Nach einem weiteren kurzen Waschschrift wurden die Zellen für 10 min in PBS rehydriert. Mit Triton X 0,1% wurden die Zellen für 3 min permeabilisiert, um ein Eindringen der Antikörper zu ermöglichen. Nach 3 weiteren Waschschriften für 5 min mit PBS wurden die Zellen in Gelatine (5% in PBS) für 1 h inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren. Die Zellen wurden daraufhin mit dem Primärantikörper, der 1:500 in 0,5% Gelatine verdünnt wurde, für 45 min behandelt. Nach drei 5 minütigen Waschschriften wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper, der 1:1000 in 0,5% Gelatine verdünnt wurde, ebenfalls für 45 min inkubiert. Nachdem die Zellen zum Abschluss dreimal für 5 min in PBS gewaschen worden waren wurden sie kurz mit Aqua dest. behandelt und mit „Crystal Mount Aqueous Mounting Medium“ auf einem Objektträger eingebettet. Die Präparate wurden schließlich mit einem konfokalen Mikroskop der Firma Axio Zeiss begutachtet.

Primärantikörper: mouse Anti-Flag M2 Monoclonal Antibody (Sigma)

Sekundärantikörper: Alexa 594 Anti mouse

4.6.2 Arbeiten mit autofluoreszierenden Proteinen

Im Rahmen der molekularen Bildgebung (*molecular imaging*) besteht die Möglichkeit ausgewählte Proteine mit Hilfe von autofluoreszierenden Proteinen zu markieren und *in vivo* darzustellen. Auch Wechselwirkungen und räumliche Beziehungen zwischen verschiedenen Proteinen können untersucht werden, indem diese Proteine mit unterschiedlichen autofluoreszierenden Proteinen fusioniert werden. Für diese Arbeit wurden die beiden Proteine GFP (*green fluorescent protein*) (Shimomura O. et al. 1962) und DsRed (*Discosoma striata red*) (Matz et al. 1999) eingesetzt (Abbildung

12). GFP gehört zur Hauptgruppe jener fluoreszierenden Proteine die als Erstes entdeckt und aus der luminisierenden Qualle *Aequoria victoria* isoliert wurden. Das in dieser Arbeit verwendete eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) wird bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und hat ein Emissionsmaximum bei 507nm.

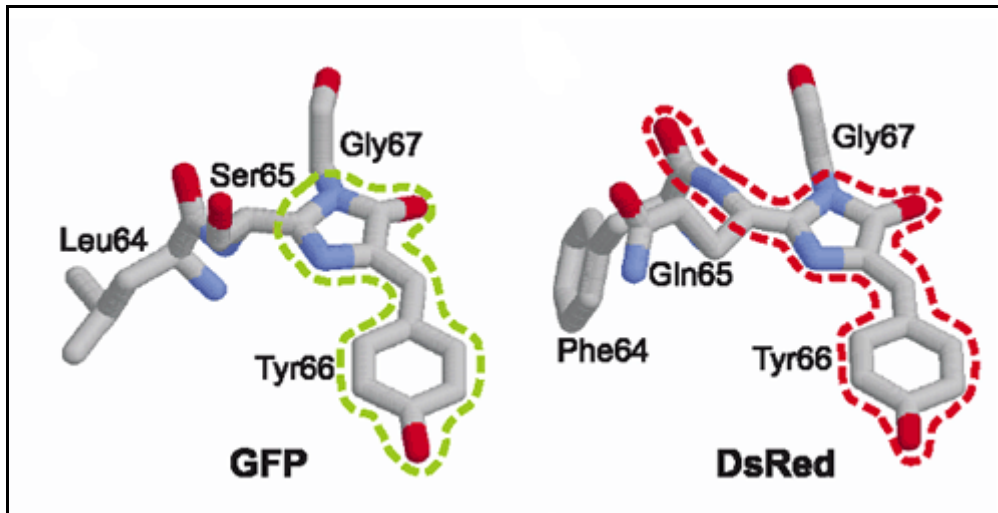


Abbildung 12: Struktur der Fluorophore GFP und DsRed [verändert nach (Verkhusha and Lukyanov 2004)] Die beiden Chromophore weisen eine ähnliche Struktur auf.

Das rot fluoreszierende Protein DsRed stammt aus einer nicht-biolumineszierenden Qualle namens *Discosoma striata*. Verwendet wurde die Mutante DsRed2, die im Vergleich zu DsRed eine schnellere Reifung des Chromophores sowie eine geringere Neigung zur Ausbildung von toxischen Oligomeren aufweist. DsRed2 hat ein Exzitansmaximum bei 558 nm und emittiert bei 583 nm.

Um Fusionsproteine herzustellen wurden die beiden Fluorophore in Form eines Vektors (pEGFP-N3 und pDsRed2-N1) von der Firma Clontech bezogen.

Die Fusionskonstrukte hOCT2-GFP und LAPTM4A-DsRed wurden wie unter 4.3.1 bis 4.3.4 beschrieben hergestellt.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden HEK-293 WT Zellen und HEK-293 hOCT2-GFP Zellen auf mit Kollagen beschichteten Deckgläschen in 24 Well Platten verwendet. 24 h nach dem Aussäen wurden die Zellen wie unter 4.4.3 beschrieben mit dem Plasmid LAPTM4A-DsRed transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 100% Ethanol für 3 min bei -20° C fixiert. Nach einem weiteren kurzen Waschriff mit PBS wurden die Zellen für 10 min mit PBS rehydriert. Die Zellen wurden schließlich einmal kurz in Aqua dest. gewaschen und mit „Crystal Mount Aqueous Mounting Medium“ auf einem Objektträger eingebettet.

Die Präparate wurden schließlich mit einem konfokalen Mikroskop der Firma Axio Zeiss begutachtet.

4.7 Funktionsmessungen

4.7.1 Mikrofluorimetrische Messung des ASP⁺ Uptakes

Die Substanz ASP⁺ [4-(4-Dimethylaminostyryl)-N-Methylpyridium], die ursprünglich zur Färbung von Mitochondrien und Nervenendigungen verwendet wurde (Magrassi et al. 1987), wurde in sämtlichen Messungen als Substrat des hOCT2 eingesetzt. ASP⁺ besitzt polychromatische Fluoreszenzeigenschaften und weist in flüssiger Lösung ein Anregungsmaximum von 450 nm und ein Emissionsmaximum von 580 nm. Bei Membrangebundenem ASP⁺ verschiebt sich das Emissionsmaximum auf 550 nm, in Mitochondrien und in Zellkernen beträgt es 580 nm. Der Pyridinring ist am Stickstoff methyliert und trägt daher eine positive Ladung (Abbildung 13). ASP⁺ als kleines organisches Kation ist somit ein ideales Substrat für den hOCT2.

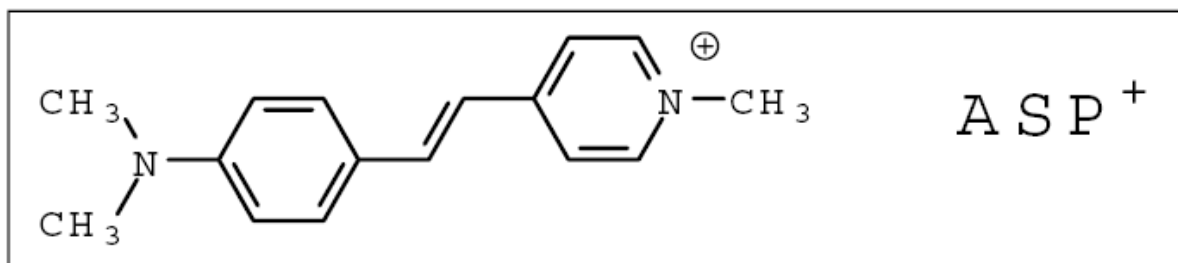


Abbildung 13: Strukturformel von ASP⁺

Sämtliche Messungen wurden mit einem Fluoreszenz-Reader (Tecan Infinite M200) durchgeführt.

Für die Mikrofluorimetrie wurden HEK 293 hOCT2 Zellen in 96-Wellplatten ausgesät und bei Bedarf 24h später wie in 4.4.3 beschrieben mit LAPT-6.F9 bzw. PCDNA 3.1. transfiziert. 48 h nach Transfektion erfolgten die Transportmessungen. Dafür wurde das Medium der Zellen abgenommen und durch 100 µl Ringerlösung, die einen pH von 7,4 aufwies und auf 37° C erwärmt wurde, ersetzt. Für die Zugabe des ASP⁺s durch Injektoren des Fluoreszenz-Readers wurde die Substanz in Ringerlösung so verdünnt, dass die Endkonzentration an ASP⁺ 1 µM pro Well betrug. Nach Zugabe

des ASP⁺ erfolgte eine Messung der Fluoreszenz gegen die Zeit. Die initiale Steigung des Fluoreszenzsignales in den ersten 10-30 Sekunden gibt die quantitative ASP⁺-Transportrate durch den hOCT2 wieder.

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnisse des mbSUS

Der humane Kationentransporter 2 ist ein Transportprotein, welches hauptsächlich in der Niere, in Zellen des proximalen Tubulus exprimiert wird. Basolateral lokalisiert ist er für die Aufnahme von organischen Kationen, wie z.B: Serotonin, Cholin oder Kreatinin zuständig. Wie in Kap 2.1 beschrieben, besitzt das Protein 12 transmembranäre Domänen. Potentielle Regulationsstellen innerhalb des Proteins wurden wie beispielsweise Serine an den Positionen 286, 292 und 328 beschrieben (Ciarimboli and Schlatter 2005), die sich in der inneren Schleife befinden. Insgesamt ist jedoch über die Regulation des Transporters in der humanen Niere wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es Proteine zu finden, die mit dem hOCT2 interagieren und durch diese Interaktion eine Rolle für die Regulation des Transporters spielen. Als grundlegende Methode zur Identifizierung neuer Interaktionsproteine sollte eine *Yeast-Two-Hybrid* Technik verwendet werden, die eine Interaktion von Proteinen *in vivo* in Hefezellen untersucht. Nach Identifizierung der Interaktionsproteine sollte ein Protein nach physiologischer Relevanz ausgewählt werden. Durch *Pulldown in vitro* Versuche sollte diese Interaktion in den nächsten Schritten bestätigt werden und mit Immunfluoreszenztechniken sollte versucht werden, die Proteine in einer humanen Nierenzelllinie zu lokalisieren. Eine funktionelle Bedeutung dieser Interaktion sollte mittels mikrofluorimetrischer Messungen untersucht werden. Schließlich sollte auch versucht werden, die identifizierten Proteine auf mRNA Ebene im proximalen Tubulus nachzuweisen, um der potentiellen Interaktion und Regulation eine physiologische Bedeutung zusprechen zu können.

5.1.1 Interaktionsscreen

Da es sich beim hOCT2 um ein Plasmamembranprotein handelt, führten wir einen Interaktionsscreen im Rahmen des *mating based Split Ubiquitin Systems* durch. Der entscheidende Vorteil dieses Systems ist, dass es in der Plasmamembran von Hefezellen stattfindet. Somit kann *in vivo* unter beinahe physiologischen Bedingungen nach unbekanntem Proteinen, die mit dem hOCT2 interagieren, gesucht werden. Da der hOCT2 beim Menschen vor Allem in den Zellen des proximalen Tubulus exprimiert wird (Gorboulev et al. 1997), wurde der Interaktionsscreen mit der cDNA Bank einer humanen Niere durchgeführt.

Für den Interaktionsscreen wurde der hOCT2 innerhalb des in Kap. 4.1.2 beschriebenen mbSUS, an die C-terminale Hälfte eines Ubiquitins gekoppelt. Dafür wurde cDNA von hOCT2 mit dem geschnittenen Vektor pMETYC gate in dem Hefestamm THY.AP4 *in vivo* kloniert (hOCT2 C_{ub}). Nachdem dieses *bait* Konstrukt hergestellt worden war, wurde es auf seine Richtigkeit überprüft und in Vorversuchen im Rahmen des *matings* getestet. Um eine Autotranskription auszuschließen, wurde das hOCT2 C_{ub} Konstrukt mit den beiden N_{ub} Leervektoren PNX gate 32 und PNX gate 21 „gematet“. Da die Leervektoren für kein Protein kodieren, kann es zwischen den beiden Ubiquitinhälften zu keiner Interaktion kommen und die Hefezellen können auf den Minimalmedien nicht wachsen. Neben den Negativkontrollen erfolgte auch eine Positivkontrolle mit dem Vektor pNUBWT-X gate um sicherzustellen, dass die hOCT2 C_{ub} Fusion auch exprimiert wird und zu einer Interaktion fähig ist. Mit diesem Vektor, der die N-terminal Hälfte des Ubiquitins ohne Aminosäureaustausch enthält (Kap. 4.1.6), kommt es zu einer Reassoziierung des Ubiquitins und zum Wachstum der Hefen auf den Minimalmedien. Diese Vorversuche wurden bereits im Vorfeld von der Arbeitsgruppe durchgeführt und waren wie erwartet ausgefallen.

Für den Interaktionsscreen wurde wie in 4.1.8 beschrieben der Hefestamm THY.AP4, der bereits das hOCT2-C_{ub} Konstrukt enthielt, mit der cDNA Bank der humanen Niere transformiert. Die transformierten Hefezellen wurden auf Minimalmedien ausgestrichen und bereits nach 4 Tagen konnte ein Wachstum dokumentiert werden. Nach Berechnung der Transformationseffizienz (nach dem Protokoll der Firma Dual Systems), die bei $1,6 \times 10^6$ in dem vorgegebenen Rahmen lag, konnte dann die Auswertung der Hefekolonien erfolgen.

So wurden im weiteren Verlauf schließlich 283 unabhängige Hefeklone untersucht, mit dem Ziel, die interagierenden Proteine zu identifizieren. Dazu mussten die Plasmide, die für die Proteine kodieren, aus den Hefezellen isoliert werden (4.1.9), in Bakterienzellen vermehrt werden (4.2.4), um zum Schluß die Plasmid-DNA mit einem spezifischen *primer* (*screen for*) zu sequenzieren (Kap. 4.3.6) und durch Datenbankabgleich die gefundene DNA zu identifizieren. Tabelle 21 zeigt einen Auszug der gefundenen Interaktionspartner, eine vollständige Liste befindet sich im Anhang unter Tabelle 23.

Tab. 21: Identifizierte Interaktionspartner aus dem mbSUS, aufgelistet nach Anzahl der Interaktionen.

Anzahl der gefundenen Klone	Protein
15	<i>lysosomal associated oritein transmembrane 4 alpha</i> (LAPTM4A)
9	<i>stress associated endoplasmic reticulum protein 1</i> (SERP1)
6	<i>protein disulfide isomerase family A member 6</i> (PDIA6)
4	<i>PDZK1 interacting protein 1</i> (MAP17)
3	CD63
3	Osteopontin
3	<i>chemokine ligand 2</i> (CCL2)
2	CD9
1	<i>cleft lip and palate associated protein transmembrane 1</i> (CLPTM1)

5.2 Auswahl des zu untersuchenden Interaktionspartners

Da die potentiellen Interaktionspartner aus der erworbenen cDNA Bank der humanen Niere stammen und im Rahmen ihrer Synthese willkürlich an die N-terminale Hälfte des Ubiquitins geknüpft werden, wurde in einem ersten Schritt die Vollständigkeit der sequenzierten cDNA des interagierenden Proteins überprüft. Des Weiteren besteht aber auch die Möglichkeit, dass die gefundene cDNA zwar der Sequenz eines bekannten Proteins entspricht, aber aufgrund von einer Leserasterverschiebung (*frame shift*) für ein anderes Protein kodiert. Um *frame shifts* auszuschließen wurde der Übergang vom Vektor auf die cDNA des interagierenden Proteins auf sein richtiges Leseraster untersucht.

So wurden die in Tab. 21 gefundenen Proteine auf ihre Vollständigkeit und Richtigkeit überprüft.

Nach ergiebiger Literaturrecherche, mit dem Ziel, interagierende Proteine zu finden, die in Regulationsprozesse des hOCT2 involviert sein könnten, haben wir für die weitere Charakterisierung den Interaktionspartner *lysosomal associated protein transmembrane 4 alpha* (LAPTM4A) ausgewählt. Bei LAPTM4A handelt es sich um ein lysosomal assoziiertes Protein, welches einerseits selbst Transportaktivität aufweist, andererseits an der Kompartimentierung einer Reihe von Substanzen unter anderem auch organischer Kationen innerhalb der Zelle beteiligt ist.

5.3 *Lysosomal associated protein transmembrane 4 alpha*

5.3.1 Überprüfung der Interaktion im mbSUS

Nachdem LAPTM4A im Interaktionsscreen identifiziert und als N_{ub} fusioniertes Plasmid isoliert worden war, wurde ein wiederholter Interaktionsversuch im Rahmen des mbSUS durchgeführt. Dafür wurde das isolierte Plasmid, welches das LAPTM4A-N_{ub} Konstrukt enthält, in den Hefestamm THY.AP5 transformiert. Um eine Interaktion mit dem hOCT2 C_{ub} Konstrukt, das in den Hefestamm THY.AP4 transformiert worden war, nachzuweisen, wurde ein *mating* (Kap. 4.1.6) zwischen den beiden Hefestämmen durchgeführt. Um falsch positive und negative Ergebnisse

auszuschließen wurden folgende Kontrollen gemacht. Als Positivkontrolle diente eine Interaktion von pNUBWT-X gate mit hOCT2-C_{ub} (Ab. 22, Nummer 4). Die Wildtypvariante der N-terminalen Ubiquitinhälfte (NUBWT-X) interagiert unabhängig von den zu untersuchenden Proteinen immer mit der C-terminalen Hälfte und führt zu einem Wachstum der Hefekolonie, wenn die C-terminal Hälfte an hOCT2 fusioniert richtig exprimiert wird. Als Negativkontrolle wurden Hefezellen, die den leeren Vektor PNX gate 32 und Zellen, mit dem hOCT2-C_{ub} „gematet“. Die N_{ub}G Variante wird zwar synthetisiert, kann aber aufgrund der fehlenden Interaktion zweier gesuchter Proteine nicht mit der C-terminalen Hälfte des Ubiquitins interagieren. Ein Wachstum der Hefe bleibt somit aus. Schließlich wurden als konstruktunabhängige Kontrolle pNUBWT-X gate und pMetYC gate im Rahmen des *matings* untersucht. Die Wildtypform der N-terminalen Ubiquitinhälfte interagiert auch mit dem Leervektor, der nur für die C-terminale Hälfte des Ubiquitins kodiert. Abbildung 14 zeigt die Interaktion von LAPTM4A und hOCT2 samt erforderlicher Kontrollen nach erfolgreichem *mating* mit dem *mating based Split Ubiquitin System*. Neben LAPTM4A wurden als potentielle Interaktionspartner auch CD63 und *dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A* (DYRK1A) mit dem *mating* Verfahren untersucht. Während CD63 zu einer Interaktion führt, bleibt das Wachstum bei DYRK1A aufgrund der fehlenden Interaktion aus.



Abbildung 14.: *Mating* von LAPTM4A und hOCT2

1: N_{ub} CD63 + hOCT2 C_{ub}

2: N_{ub}-Dyrk1a + hOCT2 C_{ub}

3: N_{ub} LAPTM4A + hOCT2 C_{ub}

4: pNUBWT-X gate + hOCT2 C_{ub}

5: pNUBWT-X gate + pMetYC gate

6: PNXgate 32 + hOCT2 C_{ub}

Die Hefekolonie 3 zeigt die Interaktion von LAPTM4A und hOCT2 an. 4 und 5 sind Positivkontrollen, 6 die Negativkontrolle. 1 repräsentiert die Interaktion des hOCT2 mit dem Protein CD63. 2 zeigt die fehlende Interaktion mit dem Protein DYRK1A.

5.3.2 Expression von LAPTM4A auf DNA Ebene

Um zu überprüfen, ob die Interaktion mit dem hOCT2 von physiologischer Bedeutung ist, wurde eine Expression von LAPTM4A im proximalen Tubulus auf mRNA Ebene untersucht. Dafür wurden humane proximale Tubuli gesammelt und die mRNA daraus isoliert. Mit Hilfe von reverser Transkriptase wurde diese mRNA in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA fungierte als *template* für eine PCR Amplifikation mit den *primern* LAPT.6F9-For und LAPT.6F9-Rev, die spezifisch LAPTM4A in den Tubuli nachweisen sollten. Zusätzlich wurde mit diesen *primern* die endogene Expression von LAPTM4A in HEK 293 Zellen untersucht. Wie aus Abbildung 15 ersichtlich konnte gezeigt werden, dass LAPTM4A auf mRNA Ebene sowohl in humanen proximalen Tubuli (Spur 2) als auch in HEK 293 Zellen (Spur 1) mit einer erwarteten Größe von 700 bp vorkommt.

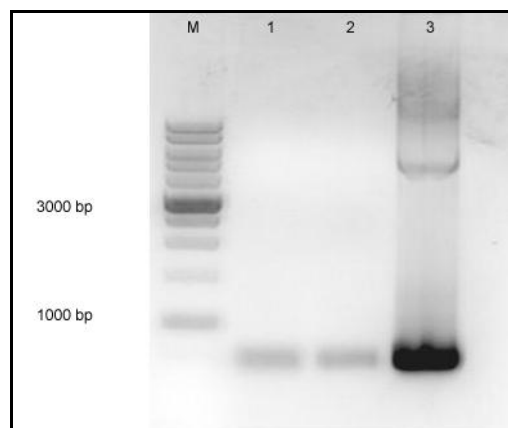


Abbildung 15: Nachweis von LAPTM4A

M kennzeichnet den 1kb Marker; Spur 1 zeigt die Amplifikation von LAPTM4A aus cDNA von HEK 293 hOCT2 Zellen; Spur 2 repräsentiert das amplifizierte PCR Produkt von LAPTM4A aus der cDNA von humanen proximalen Tubuli; Spur 3 ist die Positivkontrolle (Isolierter und sequenzierter LAPTM4A Klon aus dem mbSUS) In allen Spuren wird LAPTM4A mit einer erwarteten Größe von ca. 700 Basenpaaren (bp) dargestellt.

5.3.3 Expression von LAPTM4A auf Protein Ebene und Nachweis im Westernblot

Um die im mbSUS gefundene Interaktion mit Hilfe eines *Pulldown Assays* zu bestätigen, musste LAPTM4A als ein „His-getagtes“ Fusionsprotein in HEK 293 Zellen exprimiert werden. Dies gelang durch eine Klonierung von LAPTM4A-DNA in den Expressionsvektor pCDNA6.F9. Dieser enthält einen Promotor für die eukaryontische Expression von Proteinen z.B: in HEK 293 Zellen. Für die Klonierung wurde das wie in 5.3.1 beschrieben amplifizierte PCR Produkt von LAPTM4A aufgereinigt, mit den Restriktionsenzymen *Mlu* I und *Not* I verdaut und in den Vektor pCDNA6.F9 ligiert. Dieser Vektor enthält vor der *Multiple Cloning Site* eine 6-fach His-*tag* und eine Flag-*tag* Sequenz. Nachdem das LAPTM4A-6.F9 Konstrukt mittels Sequenzierung auf seine vollständige Richtigkeit überprüft worden war (4.3.6), wurde die Plasmid-DNA wie in 4.2.6 beschrieben isoliert.

Zur Expression des Proteins wurden HEK 293 WT Zellen mit dem LAPTM4A-6.F9 Konstrukt transfiziert. Um die Synthese des Proteins nachzuweisen wurden Westernblot Assays und immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt.

Für Westernblot Analysen wurden HEK 293 WT Zellen in 10 cm Petrischalen ausgesät und nach 24 h mit dem LAPTM4A-6.F9 Konstrukt transfiziert. 4-6 Stunden nach Transfektion erfolgte ein Medienwechsel, da das verwendete Transfektionsreagenz gegenüber HEK 293 Zellen eine hohe Zelltoxizität aufweist. Nach 3-5 Tagen wurden die Zellen wie in 4.4.4 beschrieben homogenisiert und die Lysate in der SDS-PAGE analysiert. In der anschließenden Westernblot Analyse erfolgte eine Detektion und Identifizierung von LAPTM4A mit Hilfe eines Primärantikörpers, der gegen den 6-fach His-*tag* gerichtet ist. Um unspezifische Bindungsstellen des Anti-His Antikörpers auszuschließen wurden die Proben zusammen mit einem HEK 293 WT Lysat in der SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Größenbestimmung der Proteine wurde ein Marker aufgetragen. In Abbildung 16 und 17 sind die Banden mit der erwarteten Größe von ca. 28 kDa deutlich zu sehen. Somit konnte gezeigt werden, dass HEK 293 WT Zellen nach Transfektion das „His-getaggte“ Protein LAPTM4A erfolgreich exprimieren.

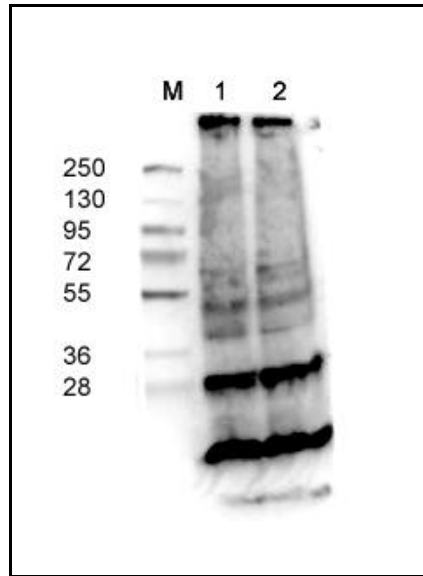


Abbildung 16: Westernblot Analyse von HEK 293 WT LAPT M4A-6.F9 transfizierten Zellen

Zwei Aliquots einer Proteinextraktion aus LAPT M4A transfizierten HEK 293 WT Zellen wurden in der SDS-PAGE getrennt und auf PVDF-Membran transferiert. Die Proteine wurden mit α -His Antikörper und HRP-gekoppeltem Sekundäntikörper detektiert. LAPT M4A ist mit einer Größe von 28 kDa deutlich zu sehen. Des Weiteren kann eine Abbaubande des Proteins bei ca. 14 kDa ausgemacht werden; M: Marker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder; Spur 1: LAPT M4A Lysat; Spur 2: LAPT M4A Lysat; Die molekulare Masse von Standardproteinen ist in kDa angegeben.

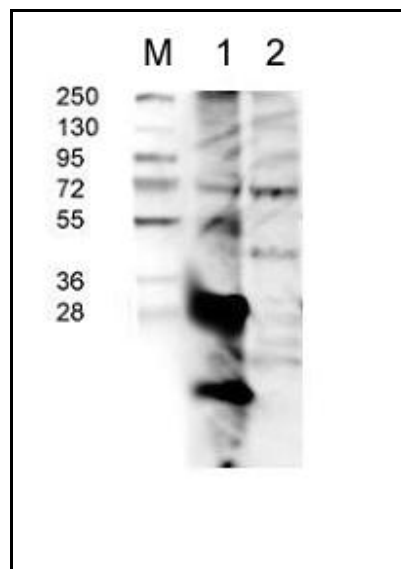


Abbildung 17: Westernblot Analyse von HEK 293 WT und HEK 293 WT LAPT M4A-6.F9 transfizierten Zellen.

Um auszuschließen, dass der α -His Antikörper unspezifische Banden verursacht, wurde neben dem LAPT M4A Zelllysate (Spur 1) ein HEK 293 WT Zellhomogenisat (Spur 2) aufgetragen. Während im LAPT M4A Zelllysate das Protein deutlich bei 28 kDa zu sehen ist, kann im WT Zelllysate keine Bande erkannt werden. In der LAPT M4A Spur ist wiederum die Abbaubande des Proteins bei ca. 14 kDa zu sehen. Marker: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder

5.3.4 Nachweis von LAPTM4A in der Immunfluoreszenz

Nachdem gezeigt werden konnte, dass HEK 293 WT Zellen nach Transfektion das Protein LAPTM4A synthetisieren, wurde versucht die Expression des Proteins zu visualisieren und die Verteilung innerhalb einer Zelle mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen darzustellen.

Dafür wurden HEK 293 WT Zellen auf mit Kollagen beschichteten Deckgläschen ausgesät und nach 24 h mit dem LAPTM4-A6.F9 Konstrukt transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen wie in 4.6.1 beschrieben fixiert, mit einem Anti-Flag Antikörper inkubiert und mit Hilfe des rotfluoreszierenden Sekundärantikörpers Alexa 594 sichtbar gemacht. Das Bild 1 aus Abbildung 18 zeigt die erfolgreiche Visualisierung des Proteins LAPTM4A, während die Behandlung von WT Zellen mit denselben Antikörpern zu keiner unspezifischen Färbung führt (Abbildung 18, Bild 2). Für die genaue Lokalisierung des Proteins innerhalb einer Zelle wurden konfokale Aufnahmen gemacht. Die Bilder 1 und 3 der Abbildung 19 zeigen die schon beschriebene Lokalisierung von LAPTM4A in perinukleären und submembranösen vesikulären Strukturen (Cabrita et al. 1999).

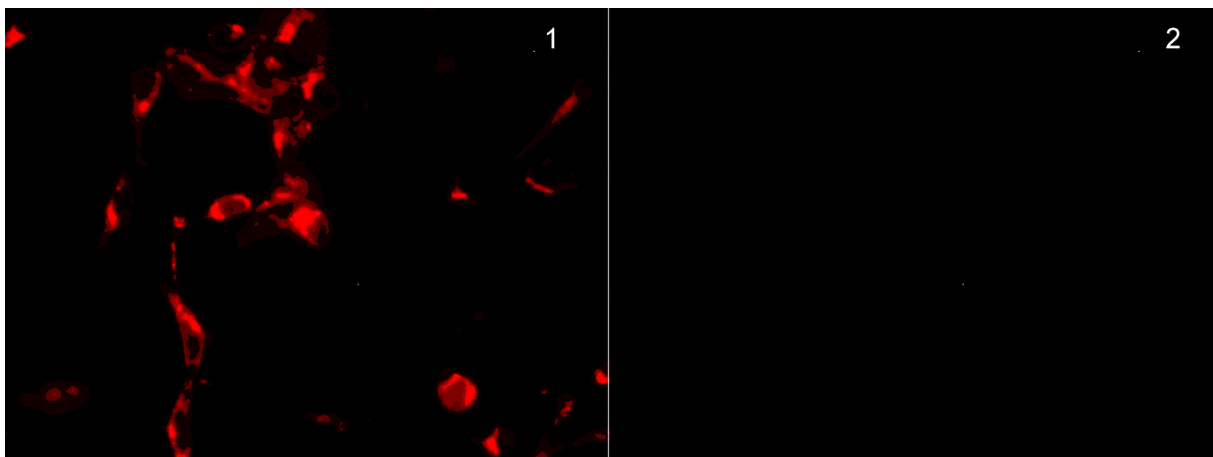


Abbildung 18: Nachweis von LAPTM4A mit indirekter Immunfluoreszenz (Übersicht)

Nach Transfektion des Vektors LAPTM4A-6.F9 in HEK 293 WT Zellen erfolgte eine erfolgreiche Visualisierung des LAPTM4A Proteins (Bild 1) während in untransfizierten HEK 293 WT Zellen (Bild 2) keine Färbung zu sehen ist. Als Primärantikörper diente ein α -Flag Antikörper, als Sekundärantikörper der fluoreszenzgekoppelte Antikörper Alexa 594.

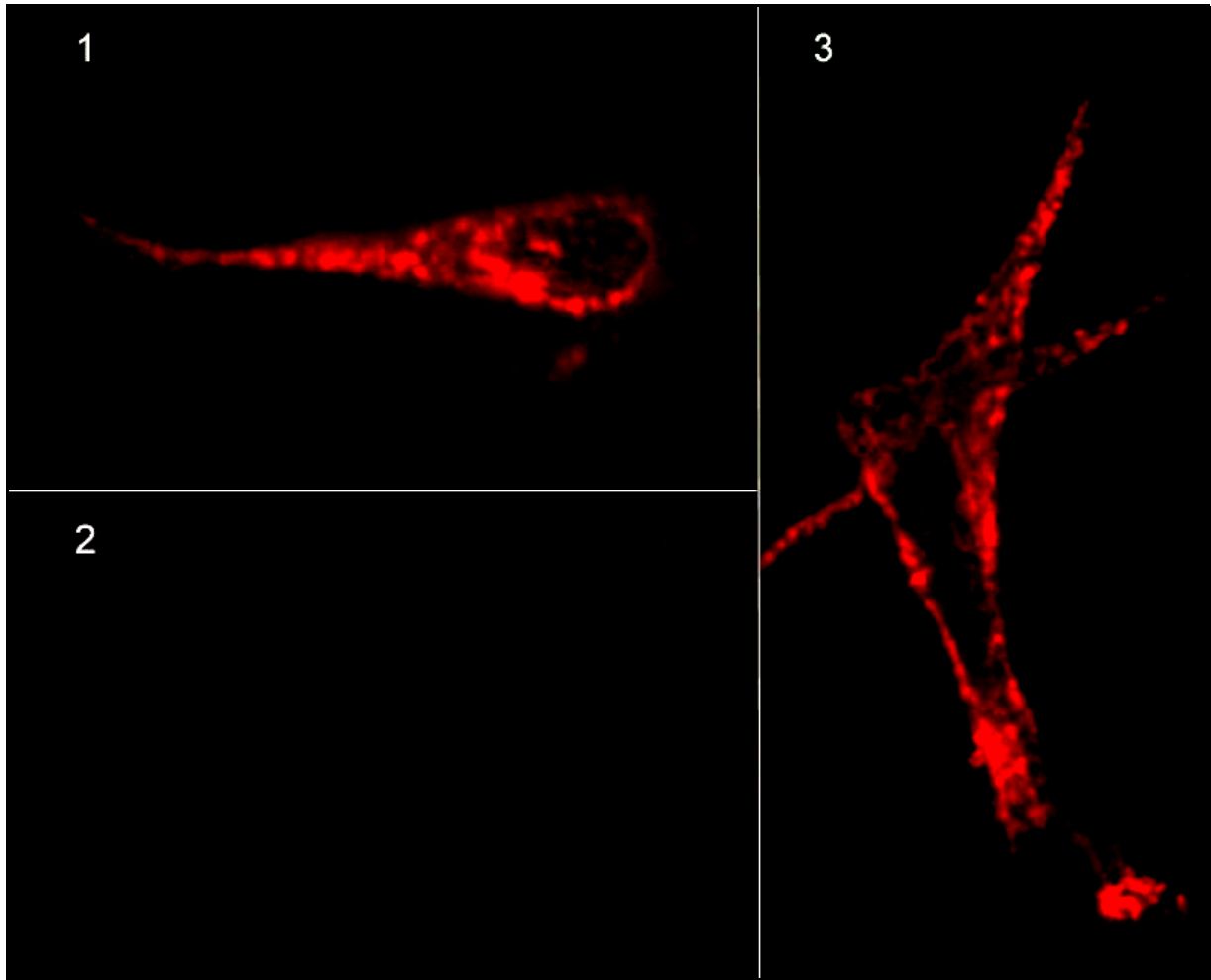


Abbildung 19: Konfokale Aufnahme von LPTM4A-6.F9 transfizierten HEK 293 WT Zellen

Die Bilder 1 und 3 zeigen die submembranäre Lokalisation von LPTM4A in einer LPTM4A-6.F9 transfizierten HEK 293 WT Zelle. Bild 2 zeigt untransfizierte HEK 293 WT Zellen und dient als Negativkontrolle. Als Primärantikörper diente wiederum ein α -Flag Antikörper, als Sekundärantikörper der fluoreszenzgekoppelte Antikörper Alexa 594.

5.4 Fluoreszenzmikroskopie von hOCT2-GFP und LPTM4A

Nachdem LPTM4A immunhistochemisch in HEK 293 WT Zellen erfolgreich dargestellt worden war, wurde das Protein LPTM4A in HEK 293 hOCT2-GFP Zellen exprimiert. Diese Zelllinie ist stabil transfiziert und exprimiert den organischen Kationentransporter 2, der am C-terminalen Ende das *Green Fluorescent Protein* als *tag* enthält. Abbildung 20 zeigt untransfizierte hOCT2-GFP Zellen, die für mikroskopische Aufnahmen wie in 4.6.2 beschrieben behandelt und fixiert wurden.

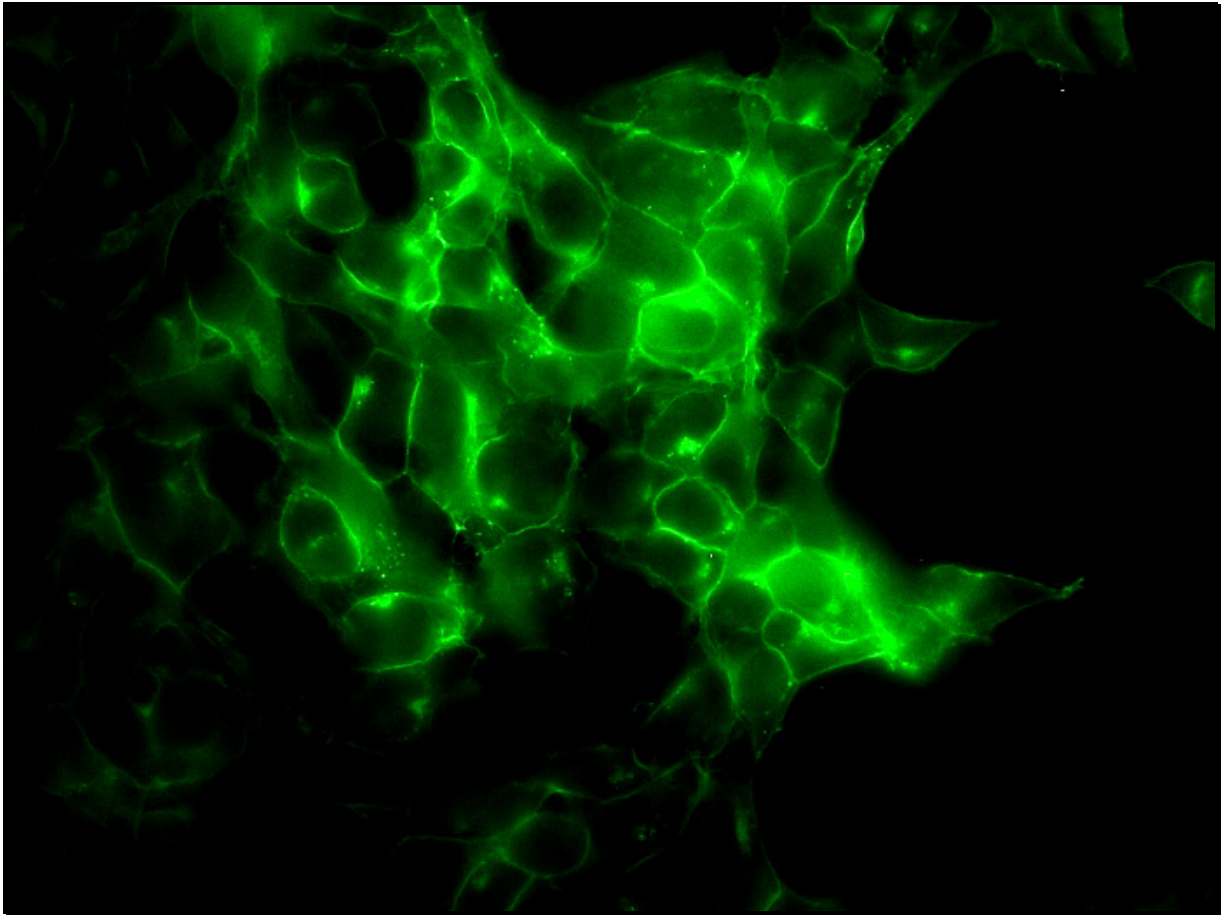


Abbildung 20: Direkte Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von HEK 293 hOCT2-GFP Zellen
Mit Hilfe des C-terminalen GFP-tags wurde der Transporter hOCT2 in der Zellmembran nachgewiesen.

5.4.1 Kolokalisation von hOCT2-GFP und LAPTM4A-6.F9

Um das räumliche Verhalten und eine eventuelle Kolokalisation der beiden Proteine *in vivo* zu untersuchen, wurden HEK 293 hOCT2-GFP Zellen auf mit Kollagen beschichteten Deckgläschen ausgesät, mit dem LAPTM4A-6.F9 Konstrukt transfiziert und nach 48 h wie in 4.6.2 beschrieben mit den entsprechenden Antikörpern behandelt und fixiert. In der Plasmamembran gut zu erkennen ist der durch seinen GFP-tag grün leuchtende hOCT2, während das Protein LAPTM4A mit Hilfe von Antikörpern wiederum rot gefärbt wurde. Wie aus Abbildung 21 ersichtlich, kommt es in submembranären vesikulären Strukturen zu einer räumlichen Nähe beziehungsweise einer Kolokalisation der beiden Proteine, die gelb erscheint.

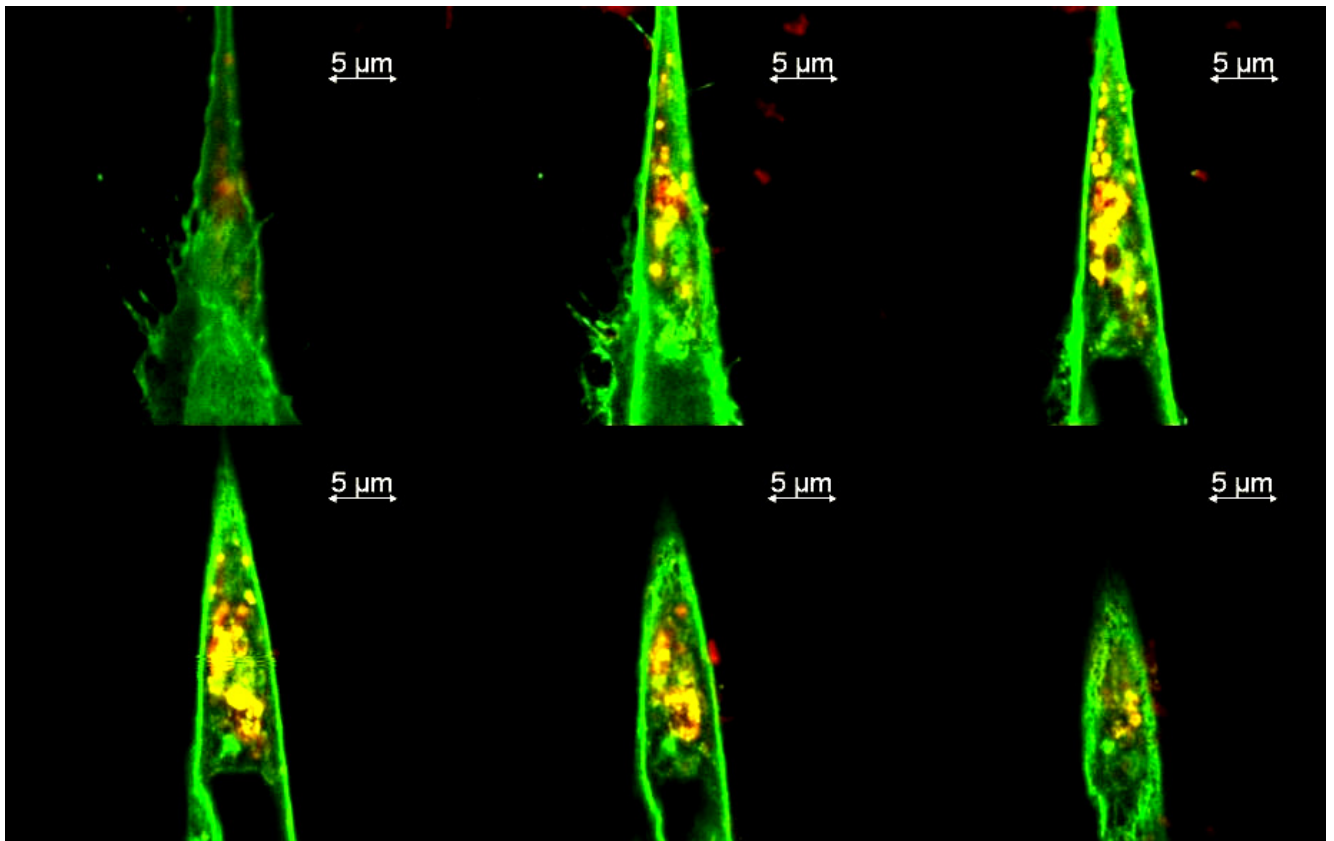


Abbildung 21: Schnitte durch eine HEK 293 hOCT2-GFP LAPT4A-6.F9 transfizierte Zelle

Die Abbildung zeigt eine konfokal mikroskopierte Aufnahme einer Zelle. Dargestellt sind mehrere Schnittebenen durch die gleiche Zelle. hOCT2 erscheint grün, LAPT4A rot. Eine Kolokalisation der beiden Proteine wird als Überlagerung der beiden Farben in gelb dargestellt. Der Nachweis von LAPT4A erfolgte mit einem α -Flag Antikörper und dem rotfluoreszierenden Sekundärantikörper Alexa 594).

5.4.2 Kolokalisation von hOCT2-GFP und LAPT4A-DsRed

Für eine antikörperunabhängige Darstellung der beiden Proteine wurde in einem weiteren Schritt LAPT4A C-terminal mit einem rot fluoreszierenden *tag* versehen und in den Vektor pDsRed2-N1 kloniert. Für die Expression beider Proteine wurden wie in 4.6.2 beschrieben hOCT2-GFP Zellen ausgesät, nach 24 h mit dem LAPT4A-DsRed Konstrukt transfiziert und nach 96 h mit Ethanol fixiert und auf einem Objektträger eingebettet. Wie aus Abbildung 22 ersichtlich kommt es intrazellulär zu einer massiven Expression des DsRed Fusionproteins. Die massive Expression von rot fluoreszierendem Protein führt über eine bekannte Oligo- bzw. Tetramerisierung zu einer massiven Zellschädigung. Die dargestellten Zellen aus Abbildung 22 weisen bereits eine sehr eingeschränkte Vitalität auf. Jedoch die in

5.4.1. beschriebenen submembranären vesikulären Strukturen, die eine Kolokalisation der beiden Proteine hOCT2 und LAPTM4A darstellen, können auch in diesen Präparaten ausgemacht werden. Somit konnte auch ohne Antikörper eine räumliche Beziehung der beiden Proteine gezeigt werden.

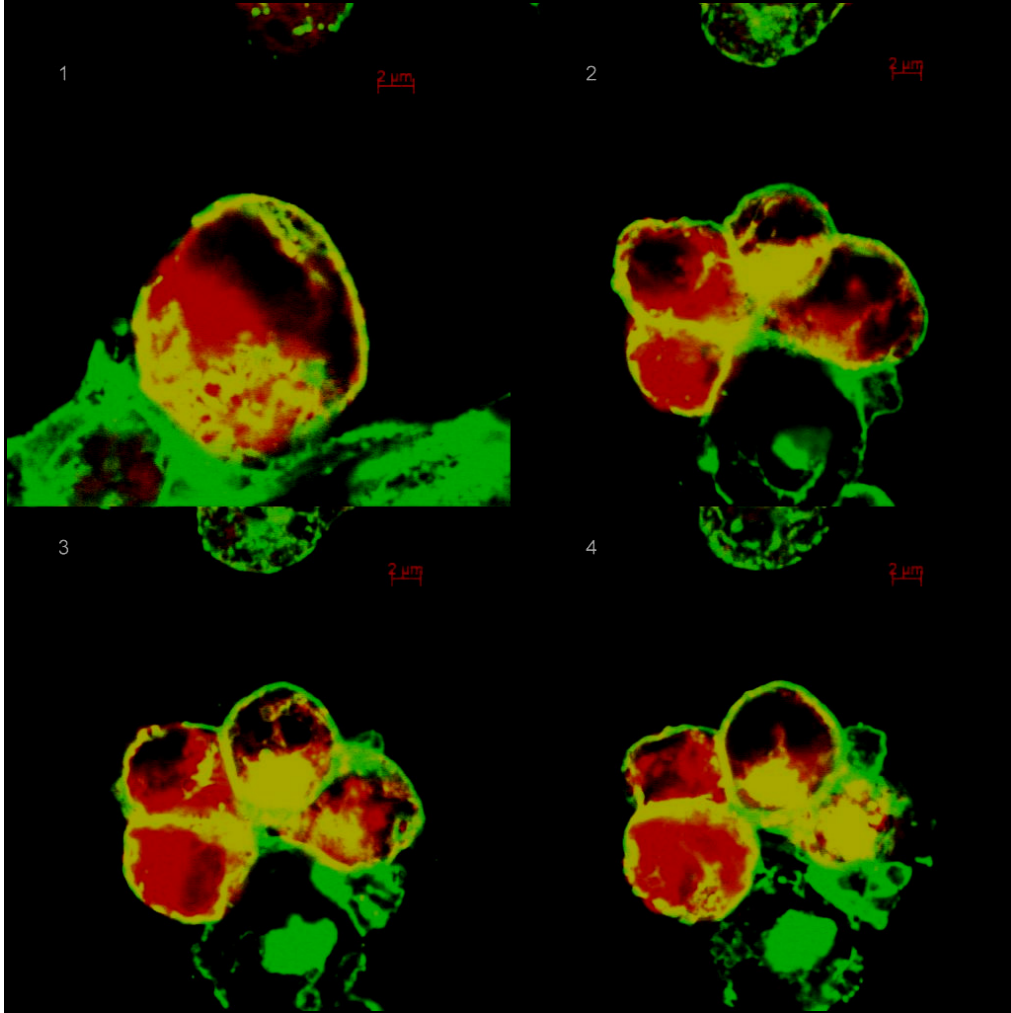


Abbildung 22: Schnittaufnahmen durch hOCT2-GFP LAPTM4A-DsRed transfizierte Zellen

Bild 1 zeigt den Schnitt durch eine einzelne Zelle. hOCT2 ist in grün, LAPTM4A in rot dargestellt. Die Bilder 2 bis 4 zeigen mehrere Schnittebenen durch die gleichen Zellen. Alle Bilder weisen einen submembranären Saum auf, der teilweise kontinuierlich teilweise vesikelartig erscheint und durch die gelbe Anfärbung eine Kolokalisation der beiden Proteine darstellt.

5.5 Nachweis der Interaktion von LAPTM4A und hOCT2 mittels *Pulldown Assays*

Um die Interaktion der beiden Proteine unabhängig vom *mating based Split Ubiquitin System* zu bestätigen wurde ein *Pulldown Assay* mit *Talon Sepharose Metal Beads* durchgeführt.

5.5.1 Bindung von LAPTM4A an die *Metal Affinity Beads*

In einem ersten Schritt sollte untersucht werden, ob LAPTM4A mit Hilfe des 6-fach His tags an die *Metal Affinity Beads* binden kann. Dafür wurden HEK 293 WT Zellen mit dem LAPTM4A-6F9 Konstrukt transfiziert und ein Gesamtzelllysat dieser Zellen hergestellt. Dieses Zellhomogenisat wurde nun mit der *Talon Sepharose Metal Resin* inkubiert. Wie in 4.5.5 beschrieben wurden die gebundenen Proteine durch einen Waschschrift gereinigt und schließlich mit Hilfe einer erhöhten Imidazolkonzentration eluiert. Mit SDS-PAGE und anschließendem Westernblot konnte eine erfolgreiche Bindung und Aufreinigung von LAPTM4A über die *beads* gezeigt werden. Um unspezifische Bindungen des α -His Antikörpers auszuschließen wurde ein HEK 293 WT Gesamtzelllysat ebenso mit der *Metal Affinity Resin* behandelt. Spur 2 aus Abbildung 23 zeigt die erfolgte Bindung und Elution von LAPTM4A. Im Gegensatz dazu konnten im Wildtyp Eluat (Spur 1) keine Proteine mit dem α -His Antikörper detektiert werden.

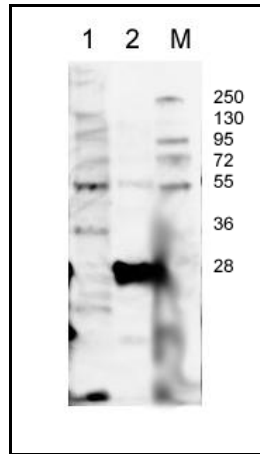


Abbildung 23: Reinigung von LAPT M4A über *Talon Metal Sepharose Beads*

M kennzeichnet den Marker; Spur 1 zeigt ein Wildtyp Eluat; Spur 2 das LAPT M4A Eluat;

LAPT M4A konnte erfolgreich an die *beads* gebunden und wieder eluiert werden, während es im Gesamtlysat von Wildtypzellen zu keiner Bindung und Elution von Proteinen gekommen ist. Der Proteinnachweis erfolgte mit einem α -His Antikörper. LAPT M4A erscheint an der erwarteten Größe von 28 kDa; Marker: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder

5.5.2 Nachweis von hOCT2 im Westernblot

Für den Nachweis von hOCT2 im Westernblot wurden hOCT2 stabil transfizierte Zellen folgendermaßen behandelt. Zum Einen wurde ein Gesamtzelllysat hergestellt (4.4.4), zum Anderen wurde die gesamte Membran Fraktion der Zellen isoliert. (4.4.4). Nach erfolgter SDS-PAGE konnte der Transporter im Westernblot mit einem polyklonalen rOCT2 Antikörper detektiert werden. hOCT2 erscheint wie aus Spur 1 der Abbildung 24 ersichtlich in Form von 2 Banden, die der glykosylierten (72 kDa) und der nicht glykosylierten (55 kDa) Variante des Transporters entsprechen.

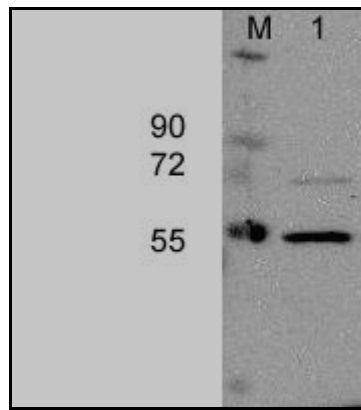


Abbildung 24: Nachweis von hOCT2 im Westernblot

Dargestellt ist die Westernblot Analyse der Membran Fraktion von hOCT2 Zellen (Spur 1). hOCT2 Zellen wurden mit Hilfe eines Membranisolationskits lysiert (4.4.4) und die Proteine in der SDS-PAGE aufgetragen. Der Transporter wird in Form von zwei Banden als nicht-glykosylierte Form bei ca. 55 kDa und als glykosylierte Form bei ca. 72 kDa dargestellt; Marker: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder

5.5.3 Bestätigung der Interaktion von LAPTM4A und hOCT2 mittels *Pulldown* Assays

Um den *Pulldown Assay* durchzuführen wurde das Protein LAPTM4A wie in 4.5.5 und 5.5.1 beschrieben an die *beads* gekoppelt. Nach 2 Stunden Inkubation wurde der Ansatz gewaschen und mit der isolierten Membranfraktion von hOCT2 Zellen inkubiert. Der Transporter ging eine Bindung mit LAPTM4A ein und konnte somit über das Protein LAPTM4A ebenfalls an die *Talon Sepharose Beads* gekoppelt werden. Nach einem reinigenden Waschschrift wurden beide Proteine (LAPTM4A und hOCT2) von den *beads* getrennt. Dies geschah durch eine Elution mit einem imidazolhaltigen Waschpuffer. Der Nachweis der Interaktion erfolgte schließlich mit SDS-PAGE und Western Blotting. Abbildung 25 zeigt das Ergebnis nach Westernblot Analyse mit einem gegen den hOCT2 gerichteten Primärantikörper. Um auszuschließen, dass hOCT2 allein über eine unspezifische Kopplung an die *beads* bindet, wurde in einer Negativkontrolle die isolierte Membranfraktion von hOCT2 Zellen wie oben beschrieben mit den *beads* inkubiert, gewaschen und ebenfalls eluiert und im Rahmen eines Westernblot Assays analysiert (Spur 2).

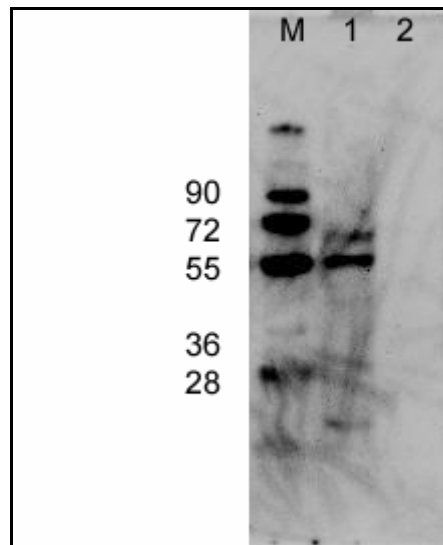


Abbildung 25: Bindung von hOCT2 an LAPT4A im *Pulldown* Ansatz

LAPT4A wurde mit der *Metal Affinity Resin* inkubiert, gewaschen und mit dem hOCT2 behandelt. Eine Analyse der Interaktion erfolgte nach Elution und anschließender SDS-PAGE sowie Immunoblot mit spezifischen Antikörpern. Spur 1 zeigt die erfolgreiche Interaktion von LAPT4A und hOCT2. Spur 2 zeigt die Negativkontrolle. hOCT2 alleine vermag nicht über die *beads* aufgereinigt und im Westernblot Assay dargestellt zu werden.

Mit dem *Pulldown Assay* konnte somit *in vitro* die spezifische Interaktion von hOCT2 und LAPT4A, die bereits *in vivo* im Rahmen des mbSUS identifiziert worden war nachgewiesen und in einer zweiten unabhängigen Methode bestätigt werden.

5.6 Hemmung des ASP⁺ Uptakes in der Mikrofluorimetrie in LAPT4A transfizierten Zellen

Nachdem die Bindung zwischen hOCT2 und LAPT4A bestätigt werden konnte, wurde die Funktionalität dieser Interaktion überprüft. Mit Hilfe von ASP⁺ Aufnahme Messungen in der Mikrofluorimetrie sollte der regulatorische Effekt von LAPT4A auf den Transporter nachgewiesen werden. Dafür wurden Funktionsmessungen wie in 4.7.1 beschrieben durchgeführt. Um auszuschließen, dass die Transfektion eines Plasmides bereits einen Effekt auf die Transportrate hOCT2 exprimierender Zellen hat, wurde als Kontrolle der Leervektor PCDNA3.1. transfiziert. Abbildung 26 zeigt das Ergebnis der mikrofluorimetrischen Messungen. In mehreren Versuchen konnte gezeigt werden, dass LAPT4A einen negativen Effekt auf die ASP⁺ Aufnahme durch den hOCT2 hat.

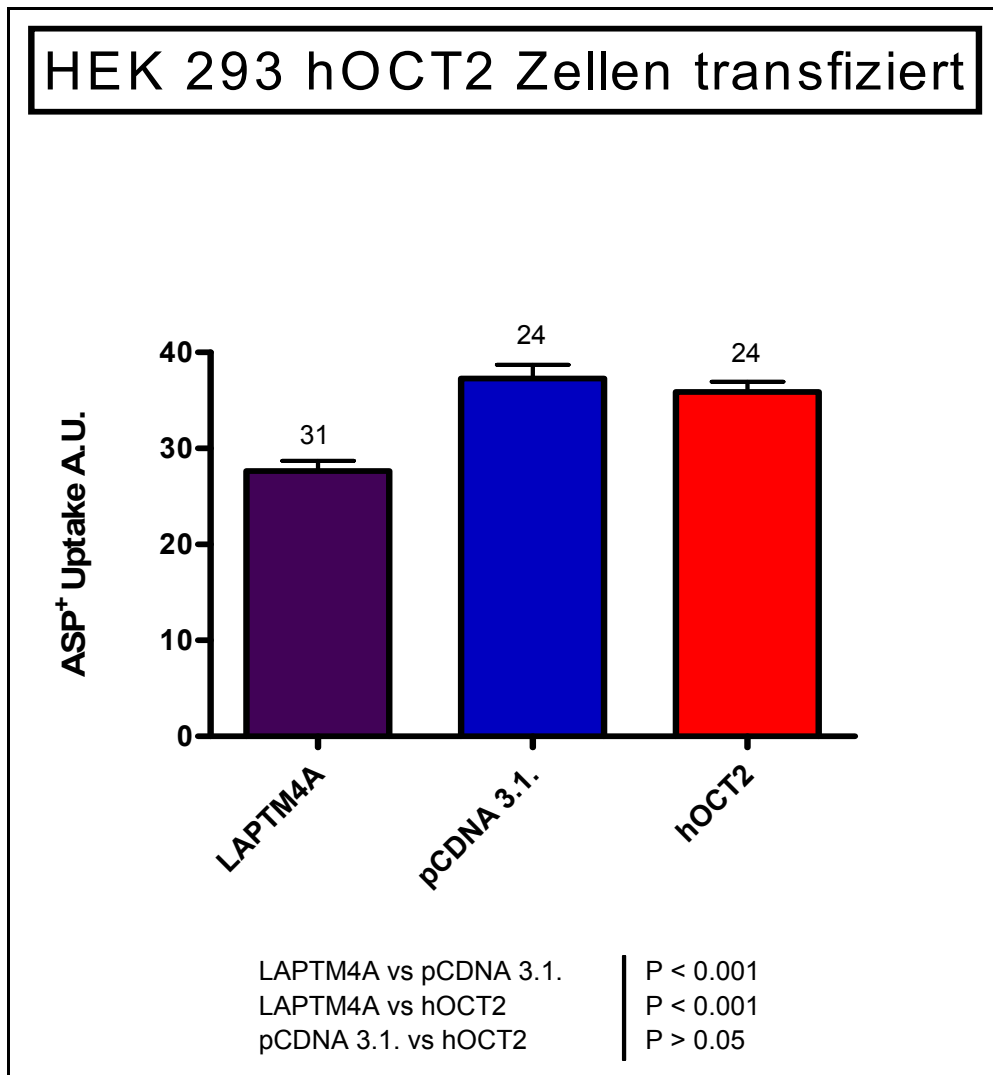


Abbildung 26: Effekt von LAPT4A auf die ASP⁺ Aufnahme in HEK 293 hOCT2 Zellen

Dargestellt ist die Transportrate in *Arbitrary Units* von untransfizierten Zellen (rot), pCDNA3.1. transfizierten Zellen (blau) und LAPT4A transfizierten Zellen (violett). Die Überexpression von LAPT4A führt zu einer signifikant verminderten Aufnahme des Kations ASP⁺ im Vergleich zur Kontrolle, während die Transfektion eines Leervektors keinen Effekt auf die Transportrate hat.

Wird der Effekt von LAPT4A quantifiziert, so zeigt sich eine Hemmung des Transportes von $23 \pm 3\%$ (n = 31) in LAPT4A transfizierten Zellen. Abbildung 27 zeigt die Hemmung des Transportes in Prozent im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle.

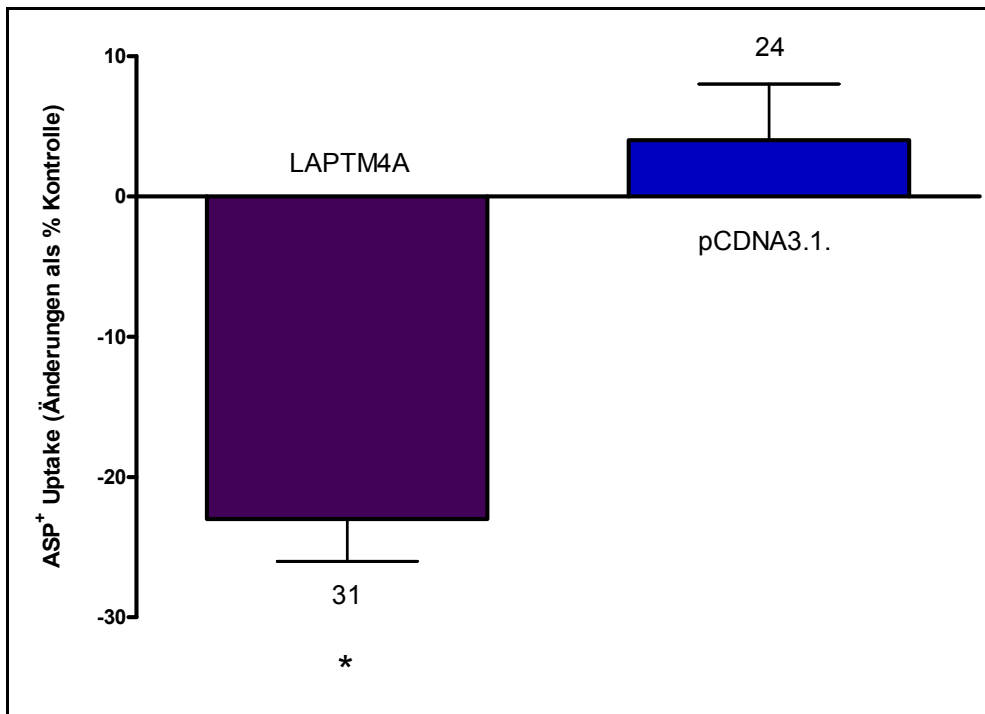


Abbildung 27: Hemmung der ASP⁺ Aufnahme durch LAPT4A (Dargestellt in Prozent der Kontrolle)

Dargestellt ist die prozentuale Hemmung des Transporters durch die Überexpression von LAPT4A (23±3%). Die Transfektion mit dem Leervektor PCDNA3.1. führt zu keiner signifikanten Änderung der Transportrate (4±4%) im Vergleich zu unbehandelten HEK 293 hOCT2 Zellen.

6 Diskussion

6.1 Identifizierung von LAPTM4A als Interaktionspartner des hOCT2

Im Rahmen des Interaktionsscreens wurde eine Vielzahl verschiedener potentieller Interaktionspartner des humanen organischen Kationentransporters 2, unter anderem das *lysosomal associated protein transmembrane 4 alpha* (LAPTM4A) gefunden. LAPTM4A gehört gemeinsam mit LAPTM4B und LAPTM5 zur Gruppe der lysosomal assoziierten Proteine. Das Protein ist intrazellulär lokalisiert, weist 4 transmembranäre Domänen auf und ist somit auch ein Mitglied der Familie der Tetraspanine (Hogue et al. 1996). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass LAPTM4A Transportaktivität besitzt. Als Bestandteil der Membran von Lysosomen und späten Endosomen ist es an der intrazellulären Kompartimentierung einer Reihe von Substanzen wie Nukleoside und Nukleosidanaloga, Antibiotika, Anthrazykline, Ionophore und Steroidhormone beteiligt (Hogue et al. 1999). An einem Modell mit *Sacharomyces cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass LAPTM4A einen direkten Einfluss auf die Zellsensibilität gegenüber Xenobiotika hat. In Abhängigkeit vom Substrat führt eine LAPTM4A Überexpression entweder zu einer Hyposensibilität oder zu einer Hypersensibilität (Hogue et al. 1999). Tabelle 22 zeigt eine Zusammenfassung der Sensibilität gegenüber mehreren Substanzen.

Tab. 22: Effekt von LAPTM4A auf die Sensibilität von Hefezellen gegenüber Xenobiotika

Resistenz	8-Aza-Adenin Erythromycin Nicardipin Progesteron	Doxorubicin Monensin Nigericin b-Estradiol	Rhodamine 123 Valinomycin CCCP Daunorubicin
Hypersensibilität	5-F-Uracil Ethidiumbromid	5-F-Uridin Trifluoperazin	TPP Bromid Camptothecin

Einige dieser aufgelisteten Substanzen sind organische Kationen. Ethidiumbromid zum Beispiel wird auch als Substrat organischer Kationentransporter diskutiert. hOCT2 und LAPTM4A könnten somit für die transmembranäre Aufnahme, sowie die weitere intrazelluläre Verteilung von Ethidiumbromid verantwortlich sein. Vorstellbar ist eine Protein-Proteininteraktion, die im Sinne eines Proteoms den Transport von gemeinsamen Substraten wie Ethidiumbromid reguliert.

Tetraspanine, so zum Beispiel CD63 sind an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt, unter denen sich auch die Klathrin-vermittelte Endozytose befindet (Pols and Klumperman 2008). CD63 ist beispielsweise in der Lage die H^+/K^+ ATPase in den gastrischen Zellen des Magens über Klathrin und die Adaptorproteine AP2 und AP3 aus der Plasmamembran zu entfernen und in späte Endosomen und Lysosomen zu transportieren (Caplan et al. 2007). LAPTM4A besitzt ebenso wie CD63 die entsprechenden Domänen um an Adaptorproteinkomplexe zu binden und eine lysosomale Degradation einzuleiten (Hogue et al. 2002). Von CD63 ist aber auch eine direkte Interaktion mit Proteinen wie den Membrantyp 1 Metalloproteinasen bekannt, die zu einer lysosomalen Proteolyse des Interaktionspartners führen (Takino et al. 2003). Es ist durchaus vorstellbar, dass LAPTM4A mit dem hOCT2 interagiert und der Transport insofern reguliert wird, dass der Transporter entweder direkt, oder mittels AP-Moleküle aus der Plasmamembran entfernt und lysosomal degradiert wird. Eine ähnliche Funktion wurde bereits bei LAPTM5 festgestellt. Das lysosomal assoziierte Protein mit 5 transmembranären Domänen scheint in der Regulation der Immunantwort eine wichtige Rolle zu spielen. In T-Zellen wird der T-Zellantigen Rezeptor mittels CD3 zeta vermittelter Endozytose von LAPTM5 degradiert und somit negativ beeinflusst und spezifisch reguliert (Ouchida et al. 2008). Ob die Interaktion von LAPTM4A und hOCT2 ebenso spezifisch ist, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Eine Interaktion von LAPTM4A könnte nämlich nicht nur auf den hOCT2 beschränkt sein, sondern einen allgemeiner Pathway einer lysosomalen Degradation von Membranproteinen darstellen.

Da in direkter und indirekter Immunfluoreszenz keine membranäre Kolo-kalisation von LAPTM4A und hOCT2 festgestellt werden konnte, wäre es durchaus möglich, dass der organische Kationentransporter direkt nach der Synthese aus dem Golgi-Apparat ohne Erreichen der Plasmamembran von LAPTM4A gebunden und lysosomal verdaut wird.

6.2 Funktionelle Aspekte der Interaktion zwischen LAPT4A und hOCT2

Während die physiologischen Aufgaben von hOCT2 großteils noch unbekannt sind, ist seine Funktion als Transporter von diversen Medikamenten sehr gut dokumentiert. hOCT2 spielt beispielsweise durch die Aufnahme von Cisplatin oder Oxaliplatin in die Zellen des proximalen Tubulus eine Schlüsselrolle in der Nephrotoxizität dieser Chemotherapeutika (Ciarimboli et al. 2005b). Des Weiteren beeinflusst der Transporter auch die Plasmakonzentrationen von Antidiabetika wie zum Beispiel Metformin (Kimura et al. 2005). Regulatorische Mechanismen, die den Transport direkt beeinflussen, haben somit eine wichtige klinische und therapeutische Relevanz. Genetische Polymorphismen beispielsweise könnten zu einer vermehrten oder verminderten Expression, beziehungsweise zu einer fehlenden Interaktion von LAPT4A mit dem hOCT2 führen. Eine Überfunktion von LAPT4A in Zellen des proximalen Tubulus könnte einerseits protektiv wirken und die Niere vor einer Cisplatin induzierten Toxizität schützen, andererseits könnte dadurch die renale Ausscheidung von Metformin vermindert sein. Umgekehrt würde ein Fehlen oder ein Defekt von LAPT4A zu einem vermehrten Uptake von Metformin oder Cisplatin in die Zellen des proximalen Tubulus führen. Im Falle des Biguanides Metformin könnte dadurch die benötigte therapeutische Plasmakonzentration unterschritten werden, während die gesteigerte Aufnahme von Cisplatin zu einer massiven Schädigung der Niere führen könnte.

Organische Kationentransporter können aber auch in der Pathophysiologie von Bedeutung sein. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass OCTs von Karzinomzellen des Dickdarms exprimiert werden (Zhang et al. 2006), wobei die Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber Chemotherapeutika wie Cisplatin oder Oxaliplatin in direkter Relation zur Expression dieser Transporter steht (Kitada et al. 2008). Auch von lysosomal assoziierten Proteinen wie zum Beispiel LAPT4B ist ein direkter Zusammenhang mit Tumoren bekannt. LAPT4B wird in Karzinomen der Leber, der Lunge, der Ovarien, der Speiseröhre, des Magens und des Dickdarms überexprimiert (Liu et al. 2003;Deng et al. 2005;Liu et al. 2007;Cheng et al. 2008), wobei die Expression des Proteins ein indirekter Marker für die jeweilige Prognose beziehungsweise für die Progression des Tumors zu sein scheint (Yang et al. 2008). Es wäre durchaus möglich, dass eine Überexpression von lysosomalen Proteinen

wie LAPTM4B oder LAPTM4A in Karzinomzellen zu einer Inhibierung der organischen Kationentransporter führt und somit die Zellen vor einer Aufnahme von antitumoralen Pharmaka wie Cisplatin oder Oxaliplatin schützt.

Neben Karzinomen sind es des Weiteren neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson, die von organischen Kationentransportern beeinflusst werden können. Wie bereits erwähnt ist hOCT2 an der Regulation des dopaminergen Haushaltes insofern beteiligt, als dass er für den Transport und das Gleichgewicht von Salsolinol und Cyclo (His-Pro) in neuronalen Zellen der *Substantia nigra* verantwortlich ist (Taubert et al. 2007). Es ist durchaus vorstellbar, dass LAPTM4A durch die Hemmung des hOCT2 dieses Gleichgewicht stört und somit zu einer Veränderung der Zellintegrität führt, die schließlich zu einem selektiven Zelluntergang dopaminergener Neurone, wie sie typischerweise bei Morbus Parkinson auftritt, führt. Bereits von anderen lysosomal assoziierten Proteinen wie LAMP 1 oder LAMP 2 ist eine Bedeutung an der Pathogenese neuronaler Dysfunktionen bekannt. Das *lysosomal associated membrane protein 1* (LAMP 1) ist beispielsweise im frontalen Kortex von Patienten mit Morbus Alzheimer überexprimiert (Barrachina et al. 2006). Auch LAPTM4A scheint an der Entstehung von senilen Plaques aus Amyloid Precursor Proteinen beteiligt zu sein (Mucke et al. 2006). LAPTM4A könnte somit alleine, oder über die Regulation von organischen Kationentransportern eine wichtige Rolle in der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson spielen.

6.3 Ausblick

In dieser Arbeit konnte LAPTM4A als neuer Interaktionspartner des hOCT2 identifiziert werden. Diese Interaktion konnte im Rahmen eines mbSUS Screens gefunden und mit Hilfe eines *Pulldown Assays* bestätigt werden. Auch die Funktionalität dieser Interaktion konnte gezeigt werden. Die Auswertung der Ergebnisse lässt aber noch viele interessante Fragen offen, die in weiteren Experimenten geklärt werden müssen. Der nächste Schritt wäre beispielsweise eine funktionelle Aufschlüsselung der Interaktion. Mit Hilfe von quantitativen Westernblot Analysen oder direkter Immunfluoreszenz könnte untersucht werden, ob die Interaktion mit LAPTM4A zu einer lysosomalen Degradation des Transporters führt.

Mit Hilfe von weiteren Interaktionstests im Rahmen des mbSUS oder eines *Pulldown Assays* könnten auch die Interaktionsdomänen der beiden Proteine identifiziert werden. Ferner könnte die Interaktion *in vivo* mit Hilfe von FRET (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer) bestätigt, sowie die Frage nach der Spezifität der Interaktion geklärt werden. Schließlich können auch noch weitere potentielle Interaktionspartner des hOCT2 aus dem mbSUS Interaktionscreen auf ihre Relevanz und Funktionalität untersucht werden.

Referenzen

Apparsundaram, S., S. M. Ferguson, and R. D. Blakely. 2001a, Molecular cloning and characterization of a murine hemicholinium-3-sensitive choline transporter. *Biochem. Soc. Trans.* 29: 711-716.

Apparsundaram, S., U. Sung, R. D. Price, and R. D. Blakely. 2001b, Trafficking-dependent and -independent pathways of neurotransmitter transporter regulation differentially involving p38 mitogen-activated protein kinase revealed in studies of insulin modulation of norepinephrine transport in SK-N-SH cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299: 666-677.

Arndt, P., C. Volk, V. Gorboulev, T. Budiman, C. Popp, I. Ulzheimer-Teuber, A. Akhoundova, S. Koppatz, E. Bamberg, G. Nagel, and H. Koepsell. 2001, Interaction of cations, anions, and weak base quinine with rat renal cation transporter rOCT2 compared with rOCT1. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 281: F454-F468.

Barrachina, M., T. Maes, C. Buesa, and I. Ferrer. 2006, Lysosome-associated membrane protein 1 (LAMP-1) in Alzheimer's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 32: 505-516.

Berkhin, E. B. and M. H. Humphreys. 2001, Regulation of renal tubular secretion of organic compounds. *Kidney Int.* 59: 17-30.

Biermann, J., D. Lang, V. Gorboulev, H. Koepsell, A. Sindic, R. Schroter, A. Zvirbliene, H. Pavenstadt, E. Schlatter, and G. Ciarimboli. 2006, Characterization of regulatory mechanisms and states of human organic cation transporter 2. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 290: C1521-C1531.

Birnboim, H. C. and J. Doly. 1979, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.

Bottalico, B., I. Larsson, J. Brodzski, E. Hernandez-Andrade, B. Casslen, K. Marsal, and S. R. Hansson. 2004, Norepinephrine transporter (NET), serotonin transporter (SERT), vesicular monoamine transporter (VMAT2) and organic cation transporters (OCT1, 2 and EMT) in human placenta from pre-eclamptic and normotensive pregnancies. *Placenta* 25: 518-529.

Bourdet, D. L., J. B. Pritchard, and D. R. Thakker. 2005, Differential substrate and inhibitory activities of ranitidine and famotidine toward human organic cation transporter 1 (hOCT1; SLC22A1), hOCT2 (SLC22A2), and hOCT3 (SLC22A3). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315: 1288-1297.

Breidert, T., F. Spitzenberger, D. Grundemann, and E. Schomig. 1998, Catecholamine transport by the organic cation transporter type 1 (OCT1). *Br. J. Pharmacol.* 125: 218-224.

Burckhardt, G. and N. A. Wolff. 2000, Structure of renal organic anion and cation transporters. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 278: F853-F866.

Burnette, W. N. 1981, "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112: 195-203.

Busch, A. E., U. Karch, D. Miska, V. Gorboulev, A. Akhondova, C. Volk, P. Arndt, J. C. Ulzheimer, M. S. Sonders, C. Baumann, S. Waldegger, F. Lang, and H. Koepsell. 1998, Human neurons express the polyspecific cation transporter hOCT2, which translocates monoamine neurotransmitters, amantadine, and memantine. *Mol. Pharmacol.* 54: 342-352.

Busch, A. E., S. Quester, J. C. Ulzheimer, S. Waldegger, V. Gorboulev, P. Arndt, F. Lang, and H. Koepsell. 1996, Electrogenic properties and substrate specificity of the polyspecific rat cation transporter rOCT1. *J. Biol. Chem.* 271: 32599-32604.

Cabrita, M. A., T. C. Hobman, D. L. Hogue, K. M. King, and C. E. Cass. 1999, Mouse transporter protein, a membrane protein that regulates cellular multidrug resistance, is localized to lysosomes. *Cancer Res.* 59: 4890-4897.

Caplan, M. J., E. J. Kamsteeg, and A. Duffield. 2007, Tetraspan proteins: regulators of renal structure and function. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 16: 353-358.

Cetinkaya, I., G. Ciarimboli, G. Yalcinkaya, T. Mehrens, A. Velic, J. R. Hirsch, V. Gorboulev, H. Koepsell, and E. Schlatter. 2003, Regulation of human organic cation transporter hOCT2 by PKA, PI3K, and calmodulin-dependent kinases. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 284: F293-F302.

Chen, Y., S. Zhang, M. Sorani, and K. M. Giacomini. 2007, Transport of paraquat by human organic cation transporters and multidrug and toxic compound extrusion family. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 322: 695-700.

Cheng, X. J., W. Xu, Q. Y. Zhang, and R. L. Zhou. 2008, Relationship between LAPT4B gene polymorphism and susceptibility of colorectal and esophageal cancers. *Ann. Oncol.* 19: 527-532.

Ciarimboli, G. 2008, Organic cation transporters. *Xenobiotica* 38: 936-971.

Ciarimboli, G., H. Koepsell, M. Iordanova, V. Gorboulev, B. Durner, D. Lang, B. Edemir, R. Schroter, L. T. Van, and E. Schlatter. 2005a, Individual PKC-phosphorylation sites in organic cation transporter 1 determine substrate selectivity and transport regulation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16: 1562-1570.

Ciarimboli, G., T. Ludwig, D. Lang, H. Pavenstadt, H. Koepsell, H. J. Piechota, J. Haier, U. Jaehde, J. Zisowsky, and E. Schlatter. 2005b, Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *Am. J. Pathol.* 167: 1477-1484.

Ciarimboli, G. and E. Schlatter. 2005, Regulation of organic cation transport. *Pflugers Arch.* 449: 423-441.

Ciarimboli, G., K. Struwe, P. Arndt, V. Gorboulev, H. Koepsell, E. Schlatter, and J. R. Hirsch. 2004, Regulation of the human organic cation transporter hOCT1. *J. Cell Physiol* 201: 420-428.

Cohen, S. N., A. C. Chang, and L. Hsu. 1972, Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 69: 2110-2114.

Deng, L. J., Q. Y. Zhang, B. Liu, and R. L. Zhou. 2005, [Relationship between LAPT4B gene polymorphism and susceptibility of lung cancer]. *Beijing Da. Xue. Xue. Bao.* 37: 302-305.

Dresser, M. J., M. K. Leabman, and K. M. Giacomini. 2001, Transporters involved in the elimination of drugs in the kidney: organic anion transporters and organic cation transporters. *J. Pharm. Sci.* 90: 397-421.

Dudley, A. J., K. Bleasby, and C. D. Brown. 2000, The organic cation transporter OCT2 mediates the uptake of beta-adrenoceptor antagonists across the apical membrane of renal LLC-PK(1) cell monolayers. *Br. J. Pharmacol.* 131: 71-79.

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

Fujita, T., T. J. Urban, M. K. Leabman, K. Fujita, and K. M. Giacomini. 2006, Transport of drugs in the kidney by the human organic cation transporter, OCT2 and its genetic variants. *J. Pharm. Sci.* 95: 25-36.

Gietz, R. D., R. H. Schiestl, A. R. Willems, and R. A. Woods. 1995, Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11: 355-360.

Gietz, R. D. and R. A. Woods. 2002, Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* 350: 87-96.

Gorboulev, V., J. C. Ulzheimer, A. Akhoundova, I. Ulzheimer-Teuber, U. Karbach, S. Quester, C. Baumann, F. Lang, A. E. Busch, and H. Koepsell. 1997, Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA Cell Biol.* 16: 871-881.

Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell, and R. Nairn. 1977, Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36: 59-74.

Grefen, C., S. Lalonde, and P. Obrdlik. 2007, Split-ubiquitin system for identifying protein-protein interactions in membrane and full-length proteins. *Curr. Protoc. Neurosci.* Chapter 5: Unit.

Grundemann, D., V. Gorboulev, S. Gambaryan, M. Veyhl, and H. Koepsell. 1994, Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* 372: 549-552.

Grundemann, D., S. Koster, N. Kiefer, T. Breidert, M. Engelhardt, F. Spitzenberger, N. Obermuller, and E. Schomig. 1998a, Transport of monoamine transmitters by the organic cation transporter type 2, OCT2. *J. Biol. Chem.* 273: 30915-30920.

Grundemann, D., B. Schechinger, G. A. Rappold, and E. Schomig. 1998b, Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter. *Nat. Neurosci.* 1: 349-351.

Hediger, M. A., M. F. Romero, J. B. Peng, A. Rolfs, H. Takanaga, and E. A. Bruford. 2004, The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction. *Pflugers Arch.* 447: 465-468.

Hogue, D. L., M. J. Ellison, J. D. Young, and C. E. Cass. 1996, Identification of a novel membrane transporter associated with intracellular membranes by phenotypic complementation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271: 9801-9808.

Hogue, D. L., L. Kerby, and V. Ling. 1999, A mammalian lysosomal membrane protein confers multidrug resistance upon expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274: 12877-12882.

Hogue, D. L., C. Nash, V. Ling, and T. C. Hobman. 2002, Lysosome-associated protein transmembrane 4 alpha (LAPTM4 alpha) requires two tandemly arranged tyrosine-based signals for sorting to lysosomes. *Biochem. J.* 365: 721-730.

Johnsson, N. and A. Varshavsky. 1994, Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91: 10340-10344.

Kang, H. J., I. S. Song, H. J. Shin, W. Y. Kim, C. H. Lee, J. C. Shim, H. H. Zhou, S. S. Lee, and J. G. Shin. 2007, Identification and functional characterization of genetic

variants of human organic cation transporters in a Korean population. *Drug Metab Dispos.* 35: 667-675.

Kimura, N., M. Okuda, and K. Inui. 2005, Metformin transport by renal basolateral organic cation transporter hOCT2. *Pharm. Res.* 22: 255-259.

Kitada, N., K. Takara, T. Minegaki, C. Itoh, M. Tsujimoto, T. Sakaeda, and T. Yokoyama. 2008, Factors affecting sensitivity to antitumor platinum derivatives of human colorectal tumor cell lines. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 62: 577-584.

Koehler, M. R., B. Wissinger, V. Gorboulev, H. Koepsell, and M. Schmid. 1997, The two human organic cation transporter genes SLC22A1 and SLC22A2 are located on chromosome 6q26. *Cytogenet. Cell Genet.* 79: 198-200.

Koepsell, H. 1998, Organic cation transporters in intestine, kidney, liver, and brain. *Annu. Rev. Physiol* 60: 243-266.

Koepsell, H., A. Busch, V. Gorboulev, and P. Arndt. 1998, Structure and Function of Renal Organic Cation Transporters. *News Physiol Sci.* 13: 11-16.

Koepsell, H. and H. Endou. 2004, The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch.* 447: 666-676.

Koepsell, H., K. Lips, and C. Volk. 2007, Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm. Res.* 24: 1227-1251.

Koepsell, H., B. M. Schmitt, and V. Gorboulev. 2003, Organic cation transporters. *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.* 150: 36-90.

Laemmli, U. K. 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Leabman, M. K., C. C. Huang, J. DeYoung, E. J. Carlson, T. R. Taylor, C. M. De La, S. J. Johns, D. Stryke, M. Kawamoto, T. J. Urban, D. L. Kroetz, T. E. Ferrin, A. G. Clark, N. Risch, I. Herskowitz, and K. M. Giacomini. 2003a, Natural variation in human membrane transporter genes reveals evolutionary and functional constraints. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100: 5896-5901.

Leabman, M. K., C. C. Huang, D. Stryke, S. J. Johns, M. Kawamoto, T. E. Ferrin, J. DeYoung, T. R. Taylor, C. M. De La, I. Herskowitz, and K. M. Giacomini. 2003b, PharmGKB update: I. Genetic variants of the organic cation transporter 2 (OCT2, SLC22A2). *Pharmacol. Rev.* 55: 399.

Lederberg, E. M. and S. N. Cohen. 1974, Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 119: 1072-1074.

Lenz, W., M. Herten, R. Gerzer, and C. Drummer. 1999, Regulation of natriuretic peptide (urodilatin) release in a human kidney cell line. *Kidney Int.* 55: 91-99.

Lips, K. S., C. Volk, B. M. Schmitt, U. Pfeil, P. Arndt, D. Miska, L. Ermert, W. Kummer, and H. Koepsell. 2005, Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 33: 79-88.

Liu, X., R. Zhou, Q. Zhang, Y. Zhang, G. Shao, Y. Jin, S. Zhang, M. Lin, J. Rui, and D. Ye. 2003, [Identification and characterization of LAPTM4B encoded by a human hepatocellular carcinoma-associated novel gene]. *Beijing Da. Xue. Xue. Bao.* 35: 340-347.

Liu, Y., Q. Y. Zhang, N. Qian, and R. L. Zhou. 2007, Relationship between LAPTM4B gene polymorphism and susceptibility of gastric cancer. *Ann. Oncol.* 18: 311-316.

Magrassi, L., D. Purves, and J. W. Lichtman. 1987, Fluorescent probes that stain living nerve terminals. *J. Neurosci.* 7: 1207-1214.

Martel, F., E. Keating, C. Calhau, D. Grundemann, E. Schomig, and I. Azevedo. 2001, Regulation of human extraneuronal monoamine transporter (hEMT) expressed in HEK293 cells by intracellular second messenger systems. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 364: 487-495.

Matz, M. V., A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zaraisky, M. L. Markelov, and S. A. Lukyanov. 1999, Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol.* 17: 969-973.

Mehrens, T., S. Lelleck, I. Cetinkaya, M. Knollmann, H. Hohage, V. Gorboulev, P. Boknik, H. Koepsell, and E. Schlatter. 2000, The affinity of the organic cation transporter rOCT1 is increased by protein kinase C-dependent phosphorylation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11: 1216-1224.

Morrison, D. A. 1977, Transformation in *Escherichia coli*: cryogenic preservation of competent cells. *J. Bacteriol.* 132: 349-351.

Motohashi, H., Y. Sakurai, H. Saito, S. Masuda, Y. Urakami, M. Goto, A. Fukatsu, O. Ogawa, and K. Inui. 2002, Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13: 866-874.

Mucke, H., Norman P, and Whelan C. Patent Alert. *Current Opinion in Investigational Drugs* 7[9], 781-788. 2006.

Ref Type: Abstract

Neuhoff, S., A. L. Ungell, I. Zamora, and P. Artursson. 2003, pH-dependent bidirectional transport of weakly basic drugs across Caco-2 monolayers: implications for drug-drug interactions. *Pharm. Res.* 20: 1141-1148.

Obrdlik, P., M. El-Bakkoury, T. Hamacher, C. Cappellaro, C. Vilarino, C. Fleischer, H. Ellerbrok, R. Kamuzinzi, V. Ledent, D. Blaudez, D. Sanders, J. L. Revuelta, E. Boles, B. Andre, and W. B. Frommer. 2004, K⁺ channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101: 12242-12247.

Ouchida, R., S. Yamasaki, M. Hikida, K. Masuda, K. Kawamura, A. Wada, S. Mochizuki, M. Tagawa, A. Sakamoto, M. Hatano, T. Tokuhisa, H. Koseki, T. Saito, T. Kurosaki, and J. Y. Wang. 2008, A lysosomal protein negatively regulates surface T cell antigen receptor expression by promoting CD3zeta-chain degradation. *Immunity.* 29: 33-43.

Pelis, R. M., W. M. Suhre, and S. H. Wright. 2006, Functional influence of N-glycosylation in OCT2-mediated tetraethylammonium transport. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 290: F1118-F1126.

Pols, M. S. and J. Klumperman. 2008, Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp. Cell Res.*

Ren, Q. and I. T. Paulsen. 2005, Comparative analyses of fundamental differences in membrane transport capabilities in prokaryotes and eukaryotes. *PLoS. Comput. Biol.* 1: e27.

Saier, M. H., Jr. 1999, A functional-phylogenetic system for the classification of transport proteins. *J. Cell Biochem. Suppl* 32-33: 84-94.

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1988, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.

Salinovich, O. and R. C. Montelaro. 1986, Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 156: 341-347.

Sanger, F. and A. R. Coulson. 1975, A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94: 441-448.

Sata, R., H. Ohtani, M. Tsujimoto, H. Murakami, N. Koyabu, T. Nakamura, T. Uchiumi, M. Kuwano, H. Nagata, K. Tsukimori, H. Nakano, and Y. Sawada. 2005, Functional analysis of organic cation transporter 3 expressed in human placenta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315: 888-895.

Schinkel, A. H. and J. W. Jonker. 2002, Polymorphisms affecting function of the human organic cation transporter hOCT1 (SLC22A1): what are the consequences? *Pharmacogenetics* 12: 589-590.

Schlatter, E., V. Monnich, I. Cetinkaya, T. Mehrens, G. Ciarimboli, J. R. Hirsch, C. Popp, and H. Koepsell. 2002, The organic cation transporters rOCT1 and hOCT2 are inhibited by cGMP. *J. Membr. Biol.* 189: 237-244.

Shimomura O., F. H. JOHNSON, and Y. SAIGA. 1962, Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell Comp Physiol* 59: 223-239.

Shu, Y., M. K. Leabman, B. Feng, L. M. Mangravite, C. C. Huang, D. Stryke, M. Kawamoto, S. J. Johns, J. DeYoung, E. Carlson, T. E. Ferrin, I. Herskowitz, and K. M. Giacomini. 2003, Evolutionary conservation predicts function of variants of the human organic cation transporter, OCT1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100: 5902-5907.

Shu, Y., M. K. Leabman, B. Feng, L. M. Mangravite, C. C. Huang, D. Stryke, M. Kawamoto, S. J. Johns, J. DeYoung, E. Carlson, T. E. Ferrin, I. Herskowitz, and K. M. Giacomini. 2004, PharmGKB update: III. Genetic variants of SLC22A1, solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1. *Pharmacol. Rev.* 56: 161.

Shu, Y., S. A. Sheardown, C. Brown, R. P. Owen, S. Zhang, R. A. Castro, A. G. Ianculescu, L. Yue, J. C. Lo, E. G. Burchard, C. M. Brett, and K. M. Giacomini. 2007, Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J. Clin. Invest* 117: 1422-1431.

Simmons, N. L. 1990, A cultured human renal epithelioid cell line responsive to vasoactive intestinal peptide. *Exp. Physiol* 75: 309-319.

Slitt, A. L., N. J. Cherrington, D. P. Hartley, T. M. Leazer, and C. D. Klaassen. 2002, Tissue distribution and renal developmental changes in rat organic cation transporter mRNA levels. *Drug Metab Dispos.* 30: 212-219.

Soodvilai, S., A. Chatsudthipong, and V. Chatsudthipong. 2007, Role of MAPK and PKA in regulation of rbOCT2-mediated renal organic cation transport. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 293: F21-F27.

Stagljar, I., C. Korostensky, N. Johnsson, and H. S. te. 1998, A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95: 5187-5192.

Takino, T., H. Miyamori, N. Kawaguchi, T. Uekita, M. Seiki, and H. Sato. 2003, Tetraspanin CD63 promotes targeting and lysosomal proteolysis of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304: 160-166.

Taubert, D., G. Grimberg, W. Stenzel, and E. Schomig. 2007, Identification of the endogenous key substrates of the human organic cation transporter OCT2 and their implication in function of dopaminergic neurons. *PLoS. ONE.* 2: e385.

Thomas, J., L. Wang, R. E. Clark, and M. Pirmohamed. 2004, Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood* 104: 3739-3745.

Tsien, R. Y. 1998, The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 509-544.

Ullrich, K. J. 1997, Renal transporters for organic anions and organic cations. Structural requirements for substrates. *J. Membr. Biol.* 158: 95-107.

Urakami, Y., M. Akazawa, H. Saito, M. Okuda, and K. Inui. 2002, cDNA cloning, functional characterization, and tissue distribution of an alternatively spliced variant of organic cation transporter hOCT2 predominantly expressed in the human kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13: 1703-1710.

Urakami, Y., N. Kimura, M. Okuda, and K. Inui. 2004, Creatinine transport by basolateral organic cation transporter hOCT2 in the human kidney. *Pharm. Res.* 21: 976-981.

Uwai, Y., H. Ida, Y. Tsuji, T. Katsura, and K. Inui. 2007, Renal transport of adefovir, cidofovir, and tenofovir by SLC22A family members (hOAT1, hOAT3, and hOCT2). *Pharm. Res.* 24: 811-815.

van Montfoort, J. E., B. Hagenbuch, K. E. Fattinger, M. Muller, G. M. Groothuis, D. K. Meijer, and P. J. Meier. 1999, Polyspecific organic anion transporting polypeptides mediate hepatic uptake of amphipathic type II organic cations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291: 147-152.

Verkhusha, V. V. and K. A. Lukyanov. 2004, The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins. *Nat. Biotechnol.* 22: 289-296.

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

Wright, S. H. and W. H. Dantzer. 2004, Molecular and cellular physiology of renal organic cation and anion transport. *Physiol Rev.* 84: 987-1049.

Yang, Y., H. Yang, M. A. McNutt, F. Xiong, X. Nie, L. Li, and R. Zhou. 2008, LAPTM4B overexpression is an independent prognostic marker in ovarian carcinoma. *Oncol. Rep.* 20: 1077-1083.

Yonezawa, A., S. Masuda, S. Yokoo, T. Katsura, and K. Inui. 2006, Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and multidrug and toxin extrusion family). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319: 879-886.

Zhang, L., M. E. Schaner, and K. M. Giacomini. 1998, Functional characterization of an organic cation transporter (hOCT1) in a transiently transfected human cell line (HeLa). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286: 354-361.

Zhang, S., K. S. Lovejoy, J. E. Shima, L. L. Lagpacan, Y. Shu, A. Lapuk, Y. Chen, T. Komori, J. W. Gray, X. Chen, S. J. Lippard, and K. M. Giacomini. 2006, Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity. *Cancer Res.* 66: 8847-8857.

7 Anhang

Tab. 23: Komplette Übersicht der Interaktionspartner aus dem mbSUS Screen

Klon 1	Ubiquitin
Klon 2	Signal peptidase complex subunit 1 [SPC1]
Klon 3	---
Klon 4	Homo sapiens FXYD domain containing ion transport regulator 2(FXYD2), transcript variant a[49%] [variant b42%]
Klon 5	---
Klon 6	Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (HNRNPA1)
Klon 7	Cleft lip and palate associated transmembrane protein 1 (CLPTM1)
Klon 8	Transmembrane protein 161A(TMEM161A)
Klon 9	---
Klon 10	Dolichylphosphatemannosyltransferase polypeptide 2,regulatory subunit(DPM2)
Klon 11	GrpE-like 1, mitochondrial (E. coli) (GRPEL1)
Klon 12	Thioredoxin domain containing 14 (TXNDC14)
Klon 13	---
Klon 15	HCV F-transactivated protein 1 (LOC401152)
Klon 16	---
Klon 17	---
Klon 18	Signal peptidase complex subunit 1

	homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (SPCS1)
Klon 19	Endomucin
Klon 20	---
Klon 21	---
Klon 22	---
Klon 23	Cytochrome b5 type A (microsomal) (CYB5A), transcript variant 1
Klon 24	---
Klon 25	Protein disulfide isomerase family A, member 6 (PDIA6)
Klon 26	---
Klon 27	Protein disulfide isomerase family A, member 6 (PDIA6)
Klon 28	Hypothetical protein FLJ31196 (FLJ31196)
Klon 29	---
Klon 30	Lysosomal associated protein transmembrane 4 alpha (LAPTM4A)
Klon 31	---
Klon 32	---
Klon 33	Ubiquitin C
Klon 34	---
Klon 35	---
Klon 36	Homo sapiens major histocompatibility complex, class II, DM alpha (HLA-DMA)
Klon 37	Chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)
Klon 38	---
Klon 39	Lysosomal associated protein transmembrane 4 beta (LAPTM4B)
Klon 40	---
Klon 41	Homo sapiens tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-

	monooxygenase activation protein, theta polypeptide (YWHAQ)
Klon 42	---
Klon 46	---
Klon 47	Cysteine/histidine-rich 1 (CYHR1)
Klon 49	---
Klon 50	---
Klon 51	Transmembrane protein 147 (TMEM147)
Klon 52	---
Klon 53	LAPTM4A
Klon 54	Homo sapiens chromosome 6 open reading frame 129 (C6orf129)
Klon 55	Homo sapiens CD9 molecule (CD9)
Klon 56	---
Klon 57	---
Klon 58	LAPTM4A
Klon 59	---
Klon 60	secreted phosphoprotein 1(osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1) (SPP1), transcript variant 2
Klon 61	Ubiquitin C
Klon 62	mitochondrion, complete genome
Klon 63	---
Klon 64	---
Klon 65	---
Klon 66	Protein disulfide isomerase family A, member 6 (PDIA6)
Klon 67	---
Klon 68	---
Klon 69	---
Klon 70	SERP1

Klon 71	---
Klon 72	Ubiquitin C
Klon 73	Cornichon homolog 4 (Drosophila) (CNIH4)
Klon 74	LAPTM4A
Klon 75	---
Klon 78	---
Klon 79	Brain protein I3 (BRI3)
Klon 80	---
Klon 81	Transmembrane protein 165 (TMEM165)
Klon 82	---
Klon 83	Ubiquitin C
Klon 84	CD63
Klon 85	Homo sapiens LGLL338 (LOC646962)
Klon 86	LAPTM4A
Klon 87	---
Klon 88	---
Klon 89	---
Klon 90	LAPTM4B
Klon 91	BCS1-like (yeast) (BCS1L)
Klon 92	Ubiquitin C
Klon 93	Small nucleolar RNA, H/ACA box 12 (SNORA12) on chromosome 10
Klon 94	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2 (SLC2A2)
Klon 95	---
Klon 96	Chromosome 4 genomic contig, alternate assembly
Klon 97	LAPTM4A
Klon 98	PDIA6
Klon 99	LAPTM4A

Klon 100	---
Klon 101	Homo sapiens signal peptidase complex subunit 1 homolog
Klon 102	Homo sapiens chromosome 3 genomic contig
Klon 103	Alpha tubulin (K-ALPHA-1)
Klon 104	Homo sapiens stress-associated endoplasmic reticulum protein 1(SERP1)
Klon 105	LAPTM4A
Klon 106	Homo sapiens coiled-coil domain containing 56 (CCDC56)
Klon 107	SERP1
Klon 108	Homo sapiens ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 1 polypeptide (ATP1A1)
Klon 109	Homo sapiens lysosomal associated multispinning membrane protein 5 (LAPTM5)
Klon 110	Homo sapiens fission 1(mitochondrial outer membrane) homolog
Klon 111	Homo sapiens NEFA-interacting nuclear protein NIP30 (NIP30)
Klon 112	Homo sapiens PDZK1 interacting protein 1 (PDZK1IP1)
Klon 113	Chromosome 8 genomic contig, alternate assembly
Klon 114	--
Klon 115	LAPTM4A
Klon 116	Homo sapiens mitochondrion, complete genome
Klon 117	---
Klon 118	Homo sapiens GNAS complex locus

	(GNAS)
Klon 119	Homo sapiens cytochrome b5 type A (microsomal) (CYB5A)
Klon 120	Zinc finger, DHHC-type containing 4 (ZDHHC4)
Klon 121	PDZK1 interacting protein 1 (PDZK1IP1)
Klon 122	---
Klon 123	CD9 molecule (CD9)
Klon 124	Transmembrane protein 134 (TMEM134)
Klon 125	Transmembrane protein 41B (TMEM41B)
Klon 126	---
Klon 127	---
Klon 128	PDZK1 interacting protein 1 (PDZK1IP1)
Klon 129	Actin, beta (ACTB)
Klon 130	---
Klon 131	Ubiquitin C
Klon 132	Ubiquitin C
Klon 133	---
Klon 134	Chromosome 6 open reading frame 113 (C6orf113)
Klon 135	Vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1 (VKORC1)
Klon 136	Insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5)
Klon 137	---
Klon 138	Chromosome 6 open reading frame 129 (C6orf129)
Klon 139	---
Klon 140	Chromosome 6 open reading frame 129 (C6orf129)
Klon 141	---

Klon 142	---
Klon 143	---
Klon 144	---
Klon 145	---
Klon 146	---
Klon 147	---
Klon 148	---
Klon 149	---
Klon 150	---
Klon 151	Homo sapiens eukaryotic translation elongation factor 1 gamma (EEF1G)
Klon 152	---
Klon 153	---
Klon 154	---
Klon 155	---
Klon 156	---
Klon 157	---
Klon 158	---
Klon 159	---
Klon 160	---
Klon 161	---
Klon 162	---
Klon 163	---
Klon 164	---
Klon 165	---
Klon 166	---
Klon 167	---
Klon 168	---
Klon 169	---
Klon 170	---
Klon 171	---

Klon 172	---
Klon 173	---
Klon 174	---
Klon 175	---
Klon 176	---
Klon 177	---
Klon 178	---
Klon 179	---
Klon 180	---
Klon 181	---
Klon 182	---
Klon 183	---
Klon 184	---
Klon 185	---
Klon 186	---
Klon 187	---
Klon 188	---
Klon 189	Signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced (STAT6)
Klon 190	SERP1
Klon 191	CD63
Klon 192	LAPTM4A
Klon 193	Transmembrane protein 176B (TMEM176B)
Klon 194	Emopamil binding protein (sterol isomerase) (EBP)
Klon 195	Ubiquitin C
Klon 196	LAPTM4A
Klon 197	---
Klon 198	Chromosome 17 genomic contig,

	alternate assembly
Klon 199	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit C2 (subunit 9) (ATP5G2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1
Klon 200	---
Klon 201	---
Klon 202	---
Klon 203	Homo sapiens RAD21 homolog (S. pombe) (RAD21)
Klon 204	LAPTM4A
Klon 207	SERP1
Klon 209	PREDICTED: Homo sapiens similar to HSPC323 (LOC284422)
Klon 210	SERP1
Klon 211	Homo sapiens frizzled homolog 5(Drosophila) (FZD5)
Klon 212	Homo sapiens secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I
Klon 213	Homo sapiens fission 1 (mitochondrial outer membrane) homolog
Klon 214	Homo sapiens fission 1 (mitochondrial outer membrane) homolog
Klon 215	Homo sapiens chromosome 6 open reading frame 113 (C6orf113)
Klon 216	Homo sapiens HCV F-transactivated protein 1 (LOC401152
Klon 217	CD63
Klon 218	Homo sapiens Fas apoptotic inhibitory molecule 2 (FAIM2)
Klon 219	---

Klon 220	Laptm4a
Klon 221	Homo sapiens signal peptidase complex subunit 1 homolog
Klon 222	Homo sapiens transmembrane protein 134 (TMEM134)
Klon 223	Homo sapiens chromosome 20 open reading frame 30
Klon 224	Homo sapiens ADP-ribosylation-like factor 6 interacting protein 5 (ARL6IP5)
Klon 225	PDIA6
Klon 226	Actin beta
Klon 227	Homo sapiens dual specificity phosphatase 9 (DUSP9)
Klon 228	---
Klon 229	---
Klon 230	PDIA6
Klon 231	Homo sapiens paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta (PILRB)
Klon 232	Homo sapiens chromosome 12 genomic contig
Klon 233	LAPTM4A
Klon 234	LAPTM4A
Klon 236	Ubiquitin C
Klon 237	Homo sapiens secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I
Klon 238	SERP1
Klon 239	Ubiquitin C
Klon 240	Homo sapiens ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex
Klon 241	---
Klon 242	Homo sapiens CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 6

	(CMTM6)
Klon 243	SERP1
Klon 244	Homo sapiens major histocompatibility complex, class II, DM alpha (HLA-DMA)
Klon 245	Homo sapiens putative NFkB activating protein
Klon 246	---
Klon 247	Homo sapiens ribophorin II (RPN2)
Klon 248	Syntaxin 8 (STX8)
Klon 249	---
Klon 250	---
Klon 251	---
Klon 252	Homo sapiens solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1 (SLC40A1)
Klon 253	---
Klon 254	CD63
Klon 255	Homo sapiens PRP8 pre-mRNA processing factor 8 homolog (S. cerevisiae) (PRPF8)
Klon 256	Homo sapiens signal peptidase complex subunit 1 homolog (S. cerevisiae) (SPCS1)
Klon 257	Actin beta
Klon 258	Homo sapiens fission 1 (mitochondrial outer membrane) homolog (S. cerevisiae) (FIS1)
Klon 259	Homo sapiens mitochondrion, complete genome
Klon 260	Homo sapiens signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced (STAT6)

Klon 261	Homo sapiens mitochondrion, complete genome
Klon 262	Homo sapiens transmembrane protein 176B (TMEM176B)
Klon 263	Homo sapiens mitochondrion, complete genome
Klon 264	LAPTM4A
Klon 265	keratinocyte associated protein 2 (KRTCAP2)
Klon 266	Homo sapiens chromosome 6 open reading frame 49 (C6orf49)
Klon 267	Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (2H9) (HNRPH3)
Klon 268	Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (2H9) (HNRPH3)
Klon 269	SPCS1
Klon 270	LAPTM4A
Klon 271	Homo sapiens HCV F-transactivated protein 1 (LOC401152)
Klon 272	CCL2
Klon 273	Homo sapiens PDZK1 interacting protein 1
Klon 274	Homo sapiens fission 1
Klon 275	Homo sapiens translocation associated membrane protein 1 (TRAM1)
Klon 276	Homo sapiens three prime repair exonuclease 1 (TREX1), transcript variant 4
Klon 277	Homo sapiens signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced
Klon 278	SERP1

Klon 279	Homo sapiens chromosome 16 genomic contig, alternate assembly
Klon 280	PDIA6
Klon 281	Homo sapiens HCV F-transactivated protein 1 (LOC401152)
Klon 282	CCL2
Klon 283	Homo sapiens mitochondrion, complete genome

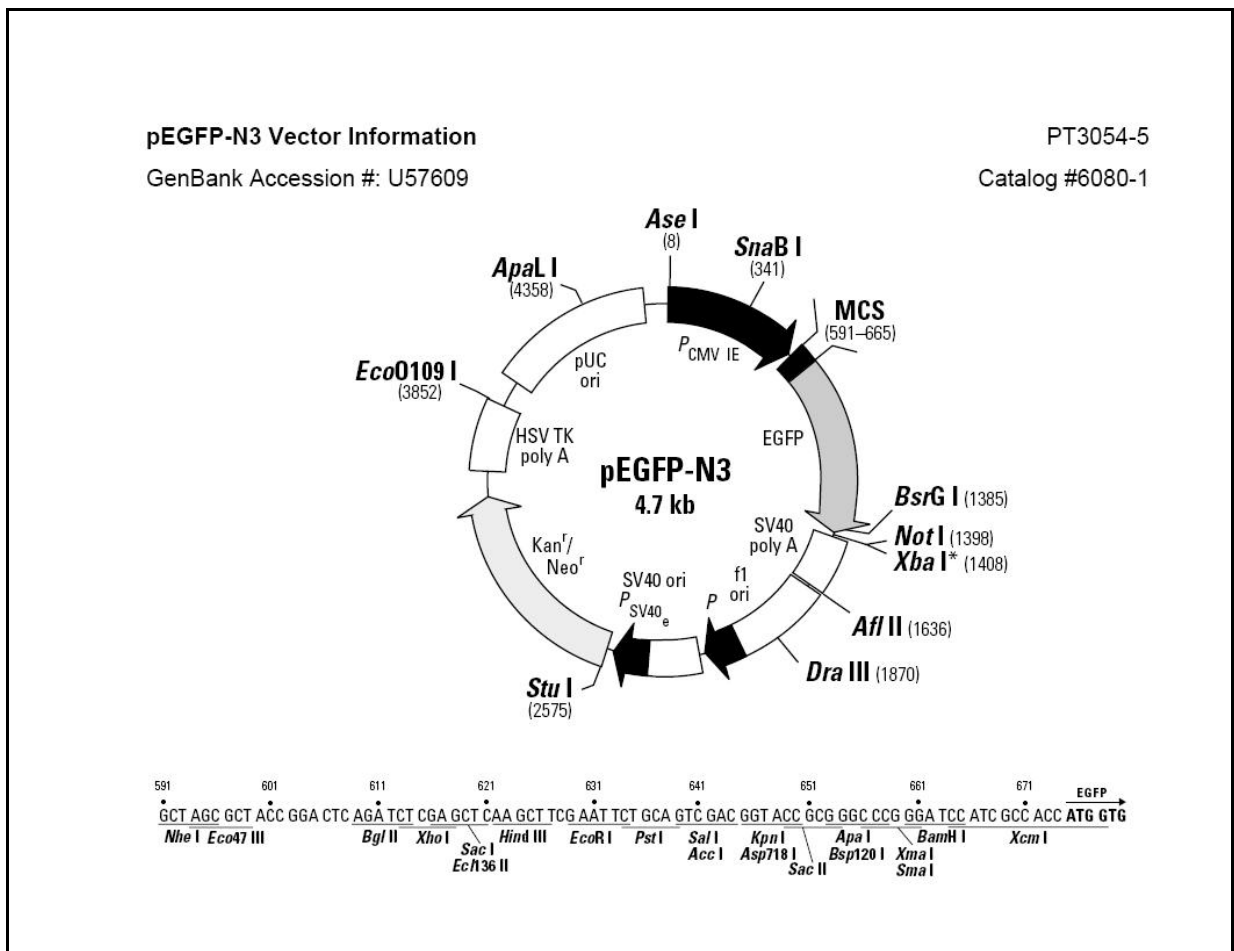


Abbildung 28: Vektorkarte peGFP-N3 (Firma Clontech)

pDsRed2-N1 Vector Information

PT3604-5
Cat. No. 632406

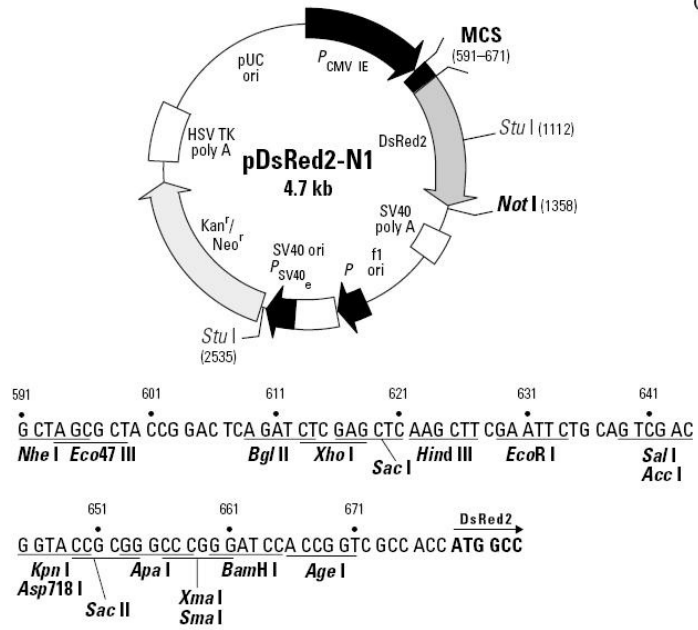


Abbildung 29: Vektorkarte pDsRed-N1 (Firma Clontech)

Danksagung

Herrn PD Dr. Giuliano Ciarimboli danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen und für die Betreuung der Arbeit.

Herrn Prof. Herwig Holzer danke ich für die Übernahme des Gutachtens und die Betreuung an der medizinischen Universität Graz.

Herrn Prof. Eberhard Schlatter danke ich für die Bereitstellung des Themas, des Arbeitsplatzes, sowie für die Möglichkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter in seinem Labor tätig zu sein.

Ein besonderes Dankeschön geht an Sabine Brast für die Betreuung, die zahlreichen Hilfestellungen sowie für das Korrekturlesen.

Allen Mitarbeitern der Experimentellen Nephrologie, zu denen Astrid Dirks, Ute Neugebauer, Rita Schröter, Bayram Edemir, Dominik Kentrup, Jens Klockers und Stefan Reuter zählen, danke ich zum Einen für die Durchführung der Zellkultur und zum Anderen für die vielen Tipps und hilfreichen Anregungen. Ein besonderer Dank für die Mitarbeit geht dabei an Julia Humberg.

Ein weiterer Dank geht an die Mitarbeiter der molekularen Nephrologie für die kompetente Beratung und freundliche Hilfestellung.

Danken möchte ich auch meinen Co-doktoranden Sven Buchholz und Christian Albiker für die freundliche Unterstützung innerhalb und ausserhalb des Labors.

Anna Dietrich danke ich, dass sie mich bei dem Vorhaben, diese Arbeit in Münster durchzuführen, unterstützt hat.

Schließlich geht noch ein besonderer Dank an meine Eltern, ohne die mein gesamtes Studium, sowie diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.