

INHALTSVERZEICHNIS

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

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

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

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