

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

**Funktionelle Bedeutung der Interaktion  
der „*Dual-specificity tyrosine-(Y)-  
phosphorylation regulated kinase 1A*“ mit  
dem humanen organischen Katio-  
nentransporter 3**

INAUGURAL – DISSERTATION  
zur  
Erlangung des doctor medicinae

Der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Vorgelegt von Anaya Cortez, Mario Salih  
aus Hamburg, Deutschland

2015

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ. Prof. Dr. Dr. h.c. Wilhelm Schmitz

1.Berichterstatter: Prof. Dr. Giuliano Ciarimboli

2.Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Hermann Schillers

Tag der mündlichen Prüfung: 28.05.2015

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Medizinische Klinik D, Experimentelle Nephrologie  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. Pavenstädt  
Referent: Prof. Dr. G. Ciarimboli  
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. H. Schillers

## ZUSAMMENFASSUNG

Mario Anaya Cortez

### **Funktionelle Bedeutung der Interaktion der Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A mit dem humanen organischen Kationentransporter 3**

Der humane organische Kationentransporter 3 (hOCT3) ist ein nahezu ubiquitär exprimiertes Transmembranprotein, das selektiv den Transport von positiv geladenen organischen Substraten durch die Plasmamembran vermittelt. Ein Beispiel ist die intrazelluläre Aufnahme von Neurotransmittern aus dem synaptischen Spalt. Ein Interaktionspartner von hOCT3 ist die *Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A* (DYRK1A), eine Kinase, die beim Down-Syndrom (DS) vermehrt exprimiert wird, und dabei vermutlich eine pathogenetische Funktion besitzt. Eines der Symptome des DS ist die mentale Retardierung, die auch durch Neurotransmitter-Imbalancen erklärt wird. In dieser Arbeit wurde neben der Bestätigung der Interaktion von hOCT3 und DYRK1A mittels Koimmunpräzipitation-Experimenten, auch deren funktionelle Auswirkung auf die Aufnahme des organischen Kations 4-(4-dimethylaminostyryl)-N-methylpyridinium ( $ASP^+$ ) in stabil mit hOCT3 transfizierten „*human embryonic kidney 293*“ (HEK293)-Zellen mittels Mikrofluorimetrie untersucht. Die Überexpression von DYRK1A verursachte eine signifikante Herunterregulation der hOCT3-vermittelten  $ASP^+$ -Aufnahme, die wiederum durch spezifische Hemmung von DYRK1A aufgehoben werden konnte. Darüber hinaus konnte eine Kollokalisierung von DYKR1A und hOCT3 sowohl in HEK293-Zellen als auch in anderen, die untersuchten Proteine endogen exprimierenden Zellsystemen gezeigt werden. Die Ergebnisse könnten neue Schlüsse auf den Pathomechanismus der Neurotransmitter-Imbalancen beim Down Syndrom und damit auch auf die Ursache für mentale Retardierung zulassen.

Tag der mündlichen Prüfung: 28.05.2015

## Erklärung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Disseration mit dem Titel:

Funktionelle Bedeutung der Interaktion der „Dual-specificity-tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated Kinase 1A mit dem humanen organischen Kationentransporter 3

---

In der/im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):

Medizinschen Klinik D, Experimentelle Nephrologie

---

---

unter der Anleitung von:

Prof. Dr. Giuliano Ciarimboli

---

1. selbstständig angefertigt
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Essen, 26.06.2015

Mario Salih Anaya Cortez

Ort, Datum

Name

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINFÜHRUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	DIE "MAJOR FACILITATOR SUPERFAMILY".....	1
1.2	DIE „SOLUTE CARRIER“ (SLC).....	2
1.2.1	Die „solute carrier 22“ (SLC22)-Familie.....	2
1.3	DER HUMANE ORGANISCHE KATIONENTRANSPORTER 3 (hOCT3).....	4
1.3.1	Funktion des hOCT3.....	4
1.3.2	Regulation von hOCT3.....	6
1.4	PROTEINKINASEN.....	7
1.4.1	Die CGMC-Gruppe.....	8
1.5	DYRK1A.....	8
1.5.1	Die DYRK-Familie.....	8
1.5.2	DYRK1A.....	9
1.5.3	Funktion von DYRK1A.....	10
1.5.4	Regulation von DYRK1A.....	12
1.5.5	Die Rolle von DYRK1A beim Down-Syndrom.....	13
1.6	ZIELE DIESER ARBEIT:.....	14
<b>2</b>	<b>MATERIALEN</b> .....	<b>14</b>
2.1	LÖSUNGEN UND PUFFER.....	14
2.2	ZELLINIEN.....	16
2.3	ZELLMEDIEN.....	16
2.4	BAKTERIEN.....	17
2.5	BAKTERIENMEDIEN.....	17
2.6	PLASMIDE.....	18
2.7	OLIGONUKLEOTIDE.....	19
2.8	MATERIALEN FÜR DNA-RESTRIKTION UND -LIGATION.....	20
2.9	MATERIALEN FÜR PCR UND RT-PCR.....	21
2.10	MATERIALEN FÜR DIE AGAROSE-GELELEKTROPHORESE.....	22
2.11	ANTIKÖRPER.....	22
2.12	MATERIALEN FÜR CO-IMMUNPRÄZIPITATIONEN.....	22
2.13	MATERIALEN FÜR DIE IMMUNFLUORESCENZ-FÄRBUNGEN.....	23
2.14	KITS.....	24
2.15	MATERIALEN FÜR WESTERN BLOTS.....	25
2.16	MATERIALEN FÜR TRANSFEKTIONEN.....	26
2.17	SONSTIGE MATERIALEN.....	26
<b>3</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>27</b>

3.1	KULTIVIERUNG VON HEK292-ZELLEN.....	27
3.1.1	<i>HEK293-Zellen</i> .....	27
3.1.2	<i>Kultivierung der HEK293-Zellen</i> .....	27
3.2	KULTIVIERUNG VON T <sub>CAM</sub> -2-ZELLEN.....	28
3.2.1	<i>T<sub>CAM</sub>-2-Zellen</i> .....	28
3.2.2	<i>Kultivierung von T<sub>CAM</sub>-2-Zellen</i> .....	28
3.3	TRANSFEKTION VON HEK293-ZELLEN .....	28
3.3.1	<i>Transfektion von HEK293-Zellen mit DYRK1A-Plasmid-DNA und hOCT3-GFP-Tag-DNA mittels Turbofect™</i> .....	28
3.3.2	<i>Transfektion von hOCT3-HEK293-Zellen mit DYRK1A-Plasmid-DNA und hOCT3-GFP-Tag-DNA mittels Lipofectamine™</i> .....	29
3.4	HERSTELLUNG VON ZELLYSATEN VON HEK293-ZELLEN FÜR WESTERN BLOTS.....	29
3.5	BAKTERIEN-METHODEN.....	29
3.5.1	<i>Kultivierung und Aufbewahrung von Bakterien</i> .....	29
3.5.2	<i>Herstellung kompetenter Escherichia coli-Bakterien</i> .....	30
3.5.3	<i>Transformation von Plasmid-DNA in E.coli</i> .....	30
3.5.4	<i>Plasmidpräparationen</i> .....	31
3.5.5	<i>Isolation von Plasmid-DNA aus E.coli als Minipräparation</i> .....	31
3.5.6	<i>Isolation von Plasmid-DNA aus E.Coli als Maxipräparation</i> .....	32
3.6	DNA-METHODEN .....	33
3.6.1	<i>PCR</i> .....	33
3.6.2	<i>Reverse Transkriptase-PCR</i> .....	34
3.6.3	<i>Restriktion von DNA</i> .....	36
3.6.4	<i>Ligation von DNA</i> .....	36
3.6.5	<i>Aufreinigung von DNA</i> .....	37
3.6.6	<i>Agarosegel-Elektrophorese von DNA</i> .....	37
3.6.7	<i>DNA-Isolierung aus Agarosegelen</i> .....	37
3.6.8	<i>Sequenzierung von DNA</i> .....	38
3.7	KOIMMUNPRÄZIPITATION-EXPERIMENTE.....	38
3.7.1	<i>Koimmunpräzipitation-Methode</i> .....	38
3.7.2	<i>Koimmunpräzipitation-Protokoll</i> .....	39
3.8	PROTEIN-ANALYSE.....	40
3.8.1	<i>Sodium Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i> .....	40
3.8.2	<i>Western Blots</i> .....	41
3.8.3	<i>Ponceau-S-Färbung</i> .....	41
3.8.4	<i>Immunchemische Detektion von Proteinen nach dem Western Blotting</i> .....	41
3.9	IMMUNFLUORESCENZ-FÄRBUNGEN .....	42
3.10	ASP <sup>+</sup> -MIKROFLUORIMETRIE-MESSUNGEN .....	44
3.11	BEHANDLUNG VON HEK293-ZELLEN MIT HARMIN .....	45

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>47</b>
4.1	TRANSFEKTION VON HOCT3-HEK293-ZELLEN MIT DYRK1A .....	47
4.2	BESTÄTIGUNG DER INTERAKTION VON HOCT3 UND DYRK1A.....	48
4.3	GEMEINSAME EXPRESSION VON DYRK1A UND ROCT3 IN RATTENHIRN.....	49
4.3.1	<i>Gemeinsame Expression von DYRK1A und rOCT3 in der Hypophyse.....</i>	<i>50</i>
4.3.2	<i>Gemeinsame Expression von DYRK1A und rOCT3 im Cerebellum.....</i>	<i>50</i>
4.4	NACHWEIS VON DYRK1A UND HOCT3 MIT RT-PCR IN TCAM2-ZELLEN .....	51
4.5	NACHWEIS VON HOCT3 IN HOCT3-HEK293-ZELLEN MIT HOCT2-ANTIKÖRPER .....	53
4.6	NACHWEIS VON ENDOGENEM HOCT3 UND DYRK1A IN TCAM2-ZELLEN .....	55
4.7	NACHWEIS VON HOCT3-GFP UND DYRK1A IN WILDTYP-HEK293-ZELLEN .....	58
4.8	HEMMUNG DER ASP <sup>+</sup> -AUFNAHME VON HOCT3-HEK293-ZELLEN DURCH DYRK1A- TRANSFEKTION.....	60
4.9	AUFHEBUNG DES ASP <sup>+</sup> -AUFNAHME-HEMMENDEN EFFEKTS VON DYRK1A DURCH HARMIN 62	
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>64</b>
5.1	INTERAKTION VON DYRK1A UND HOCT3.....	64
5.2	REGULATION VON HOCT3 DURCH DYRK1A .....	65
5.3	MÖGLICHE BEDEUTUNG DER INTERAKTION VON HOCT3 UND DYRK1A FÜR DAS DOWN SYNDROM .....	66
5.4	AUSBLICK .....	67
<b>6</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>88</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNGEN.....</b>	<b>89</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>I</b>
9.1	VEKTORKARTEN .....	I

# 1 Einführung

## 1.1 Die „*major facilitator superfamily*“

Durch Transportsysteme wird ein Milieu im Zellinneren gegenüber dem Zelläußeren geschaffen und erhalten. Auch in den Zellorganellen können durch Transportsysteme bestimmte Gradienten von Stoffen aufrechterhalten oder aufgehoben werden. Durch Transportsysteme werden unter anderem Nährstoffe, Ionen, Neurotransmitter oder Medikamente aufgenommen und ausgeschieden (124). Dem von der „*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*“ ratifizierten „*transporter classification system*“ folgend, können Transportproteine nach ihrem Funktionsmechanismus, Substrat und ihrer phylogenetischen Herkunft eingeteilt werden (151). Die „*major facilitator superfamily*“ (MFS) ist neben der primär aktive Transporter umfassenden, ATP-hydrolysierenden „*ATP binding cassette superfamily*“, eine der zwei größten Familien der Membrantransporter, die ubiquitär in Bakterien, Archaeen und Eukaryoten vorkommt und die ungefähr 25% aller bekannten Membrantransporter umfasst (118). Zur MFS-Superfamilie werden mehr als 15.000 verschiedene sequenzierte Transportproteine gerechnet (<http://www.membranetransport.org/>), die innerhalb der MFS-Superfamilie in 58 Familien unterteilt werden (<http://www.tcdb.org/>). Von Transportern der MFS-Familien werden Substrate wie einfache Zucker, Oligosaccharide, Peptide, Inositol, Medikamente, Aminosäuren, Nucleoside und eine große Anzahl von organischen und anorganischen Anionen und Kationen transportiert (135). Die MFS-Transporter können jeweils einem von drei unterschiedlichen kinetischen Transportmechanismen zugeordnet werden (106):

1. Uniporter, die nur ein Substrat transportieren und durch den Substratgradienten angetrieben werden
2. Symporter, die zwei oder mehr Substrate gleichzeitig in eine Richtung transportieren und sich dabei den Gradienten von einem der Substrate zu Nutze machen.

3. Antiporter, die zwei oder mehr Substrate in eine gegenläufige Richtung transportieren und dabei den Gradienten von einem der Substrate ausnutzen.

Da die Substrate von MFS-Transportern durch einen chemiosmotischen Gradienten transportiert werden, gehören sie somit zu den sekundär aktiven Transportern, die durch einen von primär aktiven Transportern erzeugten Gradienten Substrattransport vermitteln (135). Die meisten Angehörigen der MFS-Familien haben gemeinsam, dass sie 12 Transmembran- $\alpha$ -Helices aufweisen, wobei Ausnahmen mit 14, 6 oder auch 24 Transmembran- $\alpha$ -Helices existieren (139;152). Die N- und C-Termini sind in der Regel im Zytoplasma lokalisiert und die N- und C-terminalen Enden mit jeweils sechs Transmembrandomänen (TMD) weisen oftmals eine Sequenzhomologie auf (115).

## **1.2 Die „solute carrier“ (SLC)**

In humanen Zellen vorhandene Transporter können anhand ihrer Transportmechanismen in verschiedene Kategorien eingeteilt werden. Die „solute carrier“ (SLC) gehören zu der „major facilitator superfamily“ (MFS) und umfassen passive Transporter, Uniporter, Symporter, Antiporter, mitochondriale Transporter und vesikuläre Transporter (76). Nicht zu den SLC werden Aquaporine, Ionenkanäle, ATP-hydrolysierende Ionenpumpen und „ATP binding cassette“-Transporter gerechnet (76). Die SLC umfassen heute 395 Transporter-Gene, die nach dem „HUGO Gene Nomenclature Committee“ (HGNC, <http://www.genenames.org/>) eingeteilt werden (75). Die Transporter können einer von 52 Familien zugeordnet werden, wobei das Kriterium für eine Familienzugehörigkeit bei mindestens 20% übereinstimmender Aminosäuresequenz zu anderen Familienmitgliedern liegt (75). Jeder der zu den SLC gehörenden Familien wird nach dem SLC-Kürzel eine Nummer zugeordnet, gefolgt von einem Buchstaben für die Unterfamilie und einer zweiten Nummer für einen bestimmten Transporter (76).

### **1.2.1 Die „solute carrier 22“ (SLC22)-Familie**

Zu der SCL22-Familie gehören 23 Transportproteine, davon 13 funktionell charakterisiert, die in der Plasmamembran der Zelle lokalisiert sind (96). Alle Ange-

hörigen der SLC22-Familie verfügen über 12  $\alpha$ -helikale Transmembrandomänen (TMD), eine glykosylierte extrazelluläre Schleife zwischen TMD 1 und 2, die für die Homo-Oligomerisation von SLC22A2 verantwortlich ist und eine intrazelluläre Schleife zwischen TMD 6 und 7, die eine Rolle in der posttranskriptionalen Regulation spielt (22;98). Der SLC22-Familie gehören 3 Unterfamilien an, deren Mitglieder meist polyspezifisch im Substrattransport sind und die sich meist in ihrer Primärstruktur und ihren transportablen Substraten ähneln (97).

Tabelle 1: Wichtige Transporter der SLC22-Familie und ihre Funktion (zusammengestellt nach (96))

Transporter	Funktion
Organische Kationentransporter (OCT): hOCT1, hOCT2, hOCT3 (SLC22A1-3)	Erleichterte, bidirektionale Diffusion durch elektrochemischen Gradienten
Zwitterion-/Kationentransporter (OCTN, OCT): hOCTN1, hOCTN2, hOCT6 (SLC22A4, 5 bzw. 16)	H <sup>+</sup> /Organisches Kation-Antiport (hOCTN1), Organisches Kation-Uniport (hOCTN1, hOCTN2, hOCT6), Na <sup>+</sup> /L-Carnitin-Kotransport (hOCTN2, hOCT6)
Organische Anionentransporter (OAT): hOAT1-7 (SLC22A6-8, 10, 11, 20 bzw. 9)	Bidirektionaler Anionenaustausch
hOAT10 (SLC22A13), URAT1 (SLC22A12)	H <sup>+</sup> /Organisches Anion-Antiport (hOAT10), bidirektionaler Anionenaustausch (URAT1)

### **1.3 Der humane organische Kationentransporter 3 (hOCT3)**

Der humane organische Kationentransporter 3 (hOCT3) gehört zur Untergruppe der organischen Kationentransporter der SLC22-Familie (siehe 1.2.1). Nach Konvention des „*HUGO Gene Nomenclatur Committee*“ (HGNC, <http://www.genenames.org/>) wird er auch als SLC22A3 bezeichnet (siehe 1.2). Der hOCT3 wurde erstmals 1998 aus der Ratte und dem Menschen kloniert, nachdem der rOCT1 aus der Ratte bereits 1994 kloniert werden konnte (65;66). Kurz darauf folgte die erfolgreiche Klonierung aus der Maus (174). Der hOCT3 zeigt eine weite Verbreitung in verschiedenen Gewebearten mit der stärksten Expression in Nebenniere, Uterus, Prostata, Vagina, Leber, Lymphknoten, Magen und Plazenta. Daneben ist Expression auch in Hoden, Nebenhoden, Harnblase und Gehirn nachweisbar (131;177). Im Gehirn findet sich OCT3 ubiquitär in Neuronen und Glia-Zellen, allerdings ist die Expression im zerebralen Kortex, Kleinhirn und Hypothalamus besonders ausgeprägt (59;175;183).

#### **1.3.1 Funktion des hOCT3**

Endogene Substrate des hOCT3 umfassen die Katecholamine Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin, Serotonin und Histamin, sowie Histidyl-Proline-Diketopiperazine, Agmantin und Salsolinol (7;66;96;110). Auch das Neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) gehört zu seinen Substraten (91). Daneben konnten unter anderem die Medikamente Lidocain, Quinidin, Metformin, Etilefrin, Oxaliplatin und Lamuvidin als Substrate des hOCT3 identifiziert werden (123;131;187;189). Eine wichtige Funktion von hOCT3 ist die Aufnahme von Neurotransmittern aus dem synaptischen Spalt (66;183). Die präsynaptisch lokalisierten Noradrenalin-, Dopamin-, und 5-HT-Transporter, die für die Wiederaufnahme der in den synaptischen Spalt abgegebenen Neurotransmitter verantwortlich sind, werden auch als Uptake<sub>1</sub>-System bezeichnet (6;47). Nachdem ursprünglich in Myokardzellen ein alternativer Mechanismus zur Neurotransmitter-Wiederaufnahme entdeckt wurde, konnte dieser schließlich in Neuronen des zentralen Nervensystems (ZNS) als durch Cortison inhibierbarer Uptake<sub>2</sub>-Mechanismus beschrieben werden (84;147;180). Im Gegensatz zum

präsynaptisch lokalisierten Uptake<sub>1</sub>-System, das Na<sup>+</sup>- und Ca<sup>+2</sup>- abhängig ist und eine hohe Affinität und niedrige Kapazität für die Substrate zeigt, ist das Uptake<sub>2</sub>-System weder Na<sup>+</sup>- noch Ca<sup>+2</sup>-abhängig und hat eine niedrige Affinität sowie eine hohe Kapazität für Substrate und findet sich hauptsächlich in Glia-Zellen (47). Da hOCT3 in seiner erhöhten Expression im ZNS und in seiner Substratspezifität im Gegensatz zu hOCT1 und hOCT2 am ehesten den Anforderungen eines Uptake<sub>2</sub>-Systems entspricht, wurde der hOCT3 als molekulares Korrelat des Uptake<sub>2</sub>-Systems vorgeschlagen und identifiziert (87;98;180;183). Damit zusammenhängend wird hOCT3 auch als „*extraneuronal monoamine transporter*“ (EMT) bezeichnet (66). Der Anteil des Uptake<sub>2</sub>-Systems an der Beseitigung von Katecholaminen aus dem synaptischen Spalt wird mit 5% angegeben (48). Der Anteil an der Beseitigung von Katecholaminen aus den peripheren Geweben scheint mit spezieabhängigen 70 – 80% jedoch höher zu sein (46;49). Eine Hemmung des OCT3 konnte mit steigenden Serotonin-Konzentrationen in Hippocampus-Zellen von Mäusen in Verbindung gebracht werden (13;50). Veränderungen in den synaptischen Konzentrationen von Neurotransmittern wird eine Rolle bei Krankheiten wie der Depression zugeschrieben (77). Da der in Glia-Zellen durch die Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT) aus Noradrenalin gewonnene Metabolit Normetanephrin als ein potenter Inhibitor des Uptake<sub>2</sub>-Systems bekannt ist, wird dem Uptake<sub>2</sub>-System eine Rolle bei der Wirkung von Antidepressiva, von denen einige die synaptische Noradrenalin-Konzentration durch Hemmung des Uptake<sub>1</sub>-Systems erhöhen, zugeschrieben (62;170). Bei erhöhten Noradrenalin-Spiegeln wird das Uptake<sub>2</sub>-System durch entstehende Metaboliten gehemmt und trägt zur weiteren Erhöhung der synaptischen Noradrenalin-Konzentration bei (143). Ferner konnte gezeigt werden, dass verschiedene Antidepressiva den Transport von 4-(4-dimethylaminostyryl)-N-methylpyridinium (ASP<sup>+</sup>), einem Substrat der organischen Kationentransporter, durch Inhibitor von OCT3 vermindern können (158;190). Der Effekt von OCT3 auf die Monoamin-Homöostase und konsekutiv auf damit zusammenhängende kognitive Verhaltensänderungen, ließ sich bei mOCT3-defizienten Mäusen beobachten, wobei allerdings konträre Ergebnisse hinsichtlich der verminderten oder vermehrten Ängstlichkeit beobachtet wurden

(175;184). Neben seiner Rolle als EMT rückte hOCT3 auch durch seine starke Expression in zahlreichen Geweben wie zum Beispiel der Plazenta und Prostata in den Fokus des Interesses bei Pathologien dieser Organe. So wurden Mutationen im SLC22A3-Gen bei Jugendlichen und Erwachsenen mit Zwangsstörungen gefunden, ein SLC22A3-Gen-Cluster wurde als potentieller Risiko-Lokus für die koronare Herzkrankheit ausgemacht und auch beim Prostata-Karzinom wurden bestimmte „*single nucleotid polymorphisms*“ (SNP) des hOCT3 mit Risiko-Loki in Verbindung gebracht (45;107;169). Auch bei der Prä-Eklampsie, eine der Hauptursachen für perinatale Mortalität bei Frauen, mit den Symptomen niedriges intravaskuläres Blutvolumen, hoher Blutdruck und Proteinurie, spielt der hOCT3 als der einzige OCT, der in humaner Plazenta auf mRNA-Ebene nachgewiesen wurde, eine Rolle (31;73;157). Der bei der Prä-Eklampsie nachgewiesene erhöhte Katecholamin-Spiegel könnte durch eine ebenfalls nachgewiesene verminderte mRNA-Expression und damit auch Monoamin-Transport, erklärt werden (21). Durch eine verminderte hOCT3-Expression bei der Prä-Eklampsie und damit einhergehend einer erhöhten Katecholamin-Konzentration, könnte der erhöhte Blutdruck und ein verminderter Blutfluss zur Plazenta erklärt werden (21).

### 1.3.2 Regulation von hOCT3

Die Transportfunktion in und aus menschlichen Zellen bedarf einer Regulation, die sich auf ändernde Konzentrationen von Substanzen und metabolischen Situationen einstellen kann. Die schnelle und flexible Regulation des Transports in menschlichen Zellen ist wichtig und erwünscht und deshalb im Falle des hOCT3 mit seiner physiologischen Bedeutung von Relevanz (91). Auch ist die Regulation wichtig, um eventuelle Pathologien und mit ihnen verbundene Änderungen der Regulation zu verstehen und eventuell zu beheben. Bei der Regulation von OCTs ist bekannt, dass die einzelnen Regulationsmechanismen der jeweiligen OCTs in verschiedenen Spezies und Zelllinien unterschiedlich sein können (29;32;122). Ein gemeinsamer Regulationsmechanismus der hOCTs ist die Aktivierung durch Calmodulin (27;32;119). Bei Hemmung des  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Signalweges kommt es zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen, signifikanten Reduktion

der N-Methyl-4-phenylpyridine (MPP<sup>+</sup>)-Aufnahme in hOCT3-HEK293-Zellen (119). Auch die Inhibierung der Calmodulin-Kinase II (CamKII) resultiert in einer MPP<sup>+</sup>-Aufnahme-Hemmung (119). Die Proteinkinasen A, C und G scheinen keinen relevanten Einfluss auf den hOCT3-Transport zu haben (119). Nicht-selektive Phosphodiesterase-Inhibitoren wie 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX), Caffeine und Theophyllin, reduzierten die MPP<sup>+</sup>-Aufnahme stark, wobei Versuche mit spezifischen Inhibitoren einen inhibitorischen Effekt für die Phosphodiesterase 1 zeigten (119). Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitoren und Alkalische-Phosphatase-Inhibitoren senkten die MPP<sup>+</sup>-Aufnahme in hOCT3-HEK293-Zellen ebenfalls signifikant (119). Auch die p56lck-Tyrosinkinase zeigte mit der Reduktion der  $V_{\max}$  des MPP<sup>+</sup>-Transports des hOCT3 einen Effekt (120). Protein-Serin-Threonin-Phosphatase-Inhibitoren schienen die MPP<sup>+</sup>-Aufnahme nicht zu verändern (119). Die Inkubation der hOCT3-HEK293-Zellen mit der Phosphorsäureester hydrolysierenden alkalischen Phosphatase führte jedoch zu einer Erhöhung der MPP<sup>+</sup>-Aufnahme. Zusammenfassend deuten die bisherigen Erkenntnisse zur hOCT3-Regulation auf einen Phosphorylierung-/Dephosphorylierungsmechanismus hin, wobei hOCT3 im dephosphorylierten Zustand aktiv zu sein scheint (31;119).

#### **1.4 Proteinkinasen**

Ungefähr 1,7% der humanen Gene codieren Proteinkinasen, deren Anzahl im menschlichen Genom bei über 500 liegt (117). Proteinkinasen spielen in der Signaltransduktion von eukaryotischen Zellen eine entscheidende Rolle, indem sie in zentrale Prozesse wie Transkription, Zellzyklus, Zytoskelett-Arrangement, Zellbewegungen, Apoptose und Zelldifferenzierung, durch Übertragen einer Phosphatgruppe auf freie Hydroxygruppen von bestimmten Aminosäuren eingreifen (81;90;117). Die zu übertragende Phosphatgruppe stammt üblicherweise von ATP, die Empfänger der Substratgruppe sind in der Regel die Hydroxygruppen von Tyrosin, Serin und/oder Threonin (86;102). Proteinkinasen, die Phosphatgruppen auf Tyrosin und Serin-/Threonin übertragen, gehören der Kategorie der „*dual-specificity-kinase*“ an (4). Die Proteinkinasen gehören zu den größten Genfamilien in Eukaryoten und sind wegen ihrer zentralen Rolle in den

Signalwegen der Zelle und der damit verbundenen Relevanz bei Krankheiten intensiv erforscht worden (82;105;116). Neben der Erforschung von Krankheiten, die mit der Aktivität von Proteinkinasen assoziiert sind, stehen auch Agonisten und Antagonisten im Fokus des Interesses, da sie mitunter therapeutische Effekte bei mit Proteinkinasen verbundenen Krankheiten haben können (20;34). Ungefähr 20% aller Zielstrukturen von Medikamenten sind Proteinkinasen (80). Durch Erforschung von Signalwegen von Proteinkinasen und Proteinkinase-Inhibitoren gelang beispielsweise die Etablierung von Imatinib, einem Hemmstoff von bestimmten Tyrosinkinasen, in der Therapie der chronisch myeloischen Leukämie (CML), deren Pathogenese auf die Überfunktion einer bestimmten Tyrosinkinase zurückzuführen ist (23;61).

#### 1.4.1 Die CGMC-Gruppe

Die Proteinkinasen in Eukaryonten können einer Klassifizierung folgend in eine „*eukaryotic protein kinase superfamily*“ eingeordnet werden, die unter anderem die CMGC Gruppe beinhaltet (72;117). Die CMGC-Gruppe setzt sich unter anderem aus den namensgebenden „*cyclin-dependent kinase*“ (CDK), „*mitogen-activated kinase*“ (MAPK), „*glycogen synthase kinase*“ (GSK3) und den „*CDC-like kinases*“ (CLK) zusammen. Besonders die CDKs und MAPKs standen aufgrund ihrer Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus und der Tumorsuppressoren im Fokus (127;140). Zur CMGC-Gruppe gehört auch die „*dual-specificity tyrosine-regulated kinases*“ (DYRK)-Familie, die aufgrund von Homologien innerhalb der Kinase-Domäne wiederum in drei Unterfamilien aufgeteilt werden kann. Vielen Angehörigen der CMGC-Gruppe ist gemein, dass sie über hoch konservierte Motive verfügen und in allen Eukaryonten gefunden werden können (89).

### 1.5 DYRK1A

#### 1.5.1 Die DYRK-Familie

Die DYRK-Familie besteht aus Proteinen mit „*dual-specificity protein kinase*“-Funktion, wobei sich die Tyrosin-Phosphorylierung auf eine Autophosphorylierung zur Kinase-Aktivierung beschränkt (111). Die DYRK-Familie lässt sich als Angehörige der CMGC-Gruppe neben der in 1.4.1 beschriebenen phylogenetischen

schen Einteilung auch in die funktionellen Klassen I und II unterteilen (10). Die Entdeckung von Yak1p, die erste zur DYRK1-Familie gezählte Proteinkinase aus *Saccharomyces cerevisiae*, führte zur Vergrößerung der DYRK-Familie auf heute 29 Mitglieder (10;58) Die in Säugetieren vorkommende DYRK-Unterfamilie besteht aus fünf Mitgliedern: DYRK1A, DYRK1B, DYRK2, DYRK3 und DYRK 4, die sich eine konservierte Kinase-Domäne und eine weitere in der Nähe der Kinase konservierte „DYRK homology-box“-Sequenz teilen (18). DYRK1A und DYRK1B teilen sich daneben noch ein „nuclear localization signal“ (NLS) und ein PEST-Motiv in den N- und C-terminalen Regionen (18). Es existieren orthologe Gene von DYRK1A und DYRK1B im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und in *Drosophila*, wo sie als „minibrain kinase“ (mnb) bezeichnet werden (167).

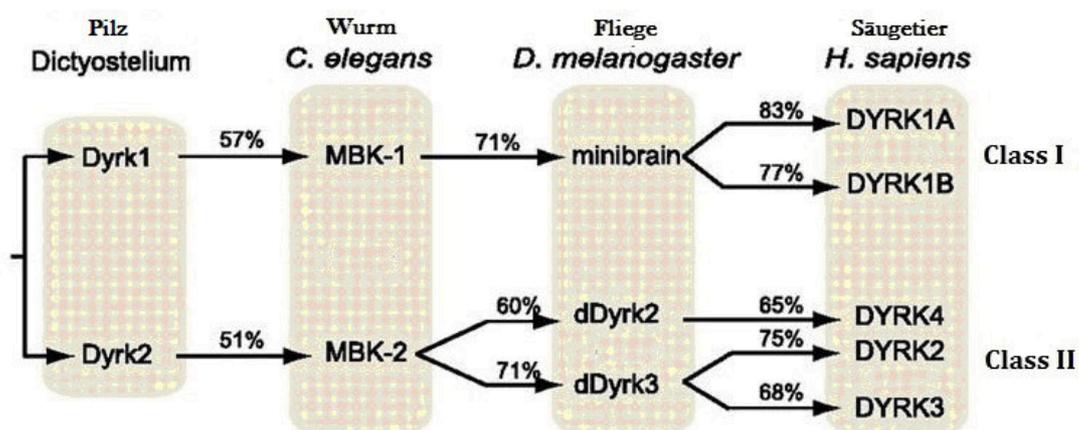


Abbildung 1: Die Einteilung wichtiger DYRK-Proteine in zwei Hauptgruppen: über den Pfeilen ist der Prozentsatz der Konservierung auf Proteinlevel der zu einander orthologen Proteine angegeben (modifiziert nach(10)).

### 1.5.2 DYRK1A

DYRK1A gehört der DYRK-Familie der Proteinkinasen an und ist wie die anderen Mitglieder eine „dual-specificity protein“-Kinase. DYRK1A autophosphoryliert sich an dem Tyrosinrest 321, der sich in einer Schleife der katalytischen Domäne befindet (92;111). Um die volle enzymatische Aktivität zu entfalten, ist diese Autophosphorylierung ein zentraler Schritt (78). DYRK1A phosphoryliert seine Substrate dann an Serin- oder Threoninresten. Neben der Kinasedomäne

verfügt DYRK1A über ein zweiteiliges „*nuclear localisation signal*“ (NLS), welches den nukleären Transport in den Zellkern vermittelt, eine PEST-Domäne für die Proteindegradation, einer aus 13 Histidinresten bestehenden repetitiven Sequenz, sowie über eine serin- und threoninreiche Region am C-terminalen Ende (18;92;137;146). DYRK1A besitzt 763 Aminosäuren und eine Proteinmasse von 86 kD (137;163). Das ungefähr 150 kb große DYRK1A-Gen liegt auf dem Chromosom 21 und wird im Gegensatz zu den übrigen Kinasen der DYRK-Familie ubiquitär, im Zellkern und Zytosol, exprimiert (10;56;163;164).

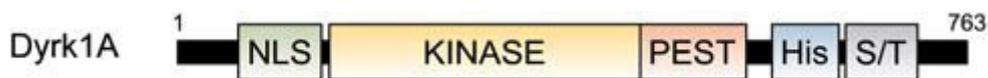


Abbildung 2: Schematische Struktur von DYRK1: NLS: „*Nuclear localisation signal*“, KINASE: Kinasedomäne, PEST: Prolin-, Glutamat-, Serin- und Threoninsequenz, His: 13 konsekutive Histidinreste, S/T: Serin- und threoninreiche Region (modifiziert nach (138))

### 1.5.3 Funktion von DYRK1A

DYRK1A wird in Neuronen stärker als in vielen anderen Geweben, in denen es als ubiquitäres Protein ebenfalls vorkommt, exprimiert und spielt daneben eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Neuronen (133). Mutationen des in *Drosophila* vorkommenden DYRK1A-Homologs „*minibrain kinase*“ führten zu verminderten Gehirnvolumina, speziell des Okzipitallappens (167). Mäuse mit einer DYRK1A-Haploinsuffizienz weisen ebenfalls ein vermindertes Hirnvolumen auf (54). Ein DYRK1A-Gen, das durch eine *de novo* balancierte Translokation verkürzt war, führte bei Patienten unter anderem zu Mikrozephalie, intrauterinem Wachstumsdefizit und mentaler Retardierung und bestätigt die Annahme, dass DYRK1A in der neuronalen Entwicklung spezieübergreifend eine wichtige Rolle spielt (126). Die Expression von DYRK1A scheint in der Entwicklung von Mäusen besonders während der embryonalen Gehirnentwicklung stärker zu sein, um dann während der postnatalen Entwicklung schwächer zu werden und schließlich im adulten Mäusegehirn auf niedrigem Niveau zu persistieren (70). DYRK1A wird stark in embryonal-neuroepithelialen Progenitorzellen exprimiert, was ebenfalls auf die Rolle von DYRK1A in der neuronalen Entwicklung hin-

weist (71). DYRK1A inhibiert unter anderem durch Phosphorylierung des „*sprouty2*“-Proteins, ein Modulator von Tyrosinkinase-Rezeptoren, die Degradation des „*epidermal growth factor receptor*“ (EGFR), der wiederum für die Selbsterneuerung von Stammzellen wichtig ist (53). Auch bei der Differenzierung von Neuronen spielt DYRK1A eine Rolle, indem es das NOTCH-Protein, welches eine zentrale Rolle bei der Zelldifferenzierung in Vertebraten spielt, phosphoryliert und dessen Aktivität vermindert (51). Wird das NOTCH-Protein in der Zellmembran einer Zelle während der Neurogenese exprimiert, so behält diese ihre Eigenschaften als Progenitorzelle, andernfalls differenziert sich die Zelle zu einem Neuron (113). Einige wichtige Substrate von DYRK1A sind beispielhaft in Tabelle 2 zusammengefasst.

Neben der Bedeutung von DYRK1A bei der neuronalen Zellentwicklung scheint DYRK1A ebenfalls in neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle zu spielen (179). In Neuronen des Hippocampus und des Neokortex von Patienten mit Morbus Alzheimer (AD) oder Pick-Krankheit, konnte eine erhöhte DYRK1A-Expression festgestellt werden (52). Auch mit Morbus Parkinson und der Huntington-Krankheit wird DYRK1A assoziiert (88;185). Die Substrate von DYRK1A umfassen Proteine, die zentrale Rollen in bestimmten neurodegenerativen oder neuronalen Krankheiten spielen (siehe Tabelle 2). AD ist durch die intrazelluläre Anlagerung von Amyloid-Plaques, bestehend aus dem  $\beta$ -Amyloid-Protein und Neurofibrillenbündeln, die wiederum aus Tau-Protein bestehen, gekennzeichnet. Der Amyloid- und Tau-Hypothese folgend sind letztgenannte Ablagerungen für die Krankheit ursächlich, weswegen diese Proteine im Fokus des wissenschaftlichen Interesses standen und stehen (74;160). So konnte für das Tau-Protein gezeigt werden, dass seine Phosphorylierung die Formation von Neurofibrillenbündeln fördert (11;171). DYRK1A phosphoryliert ebenso das „*amyloid precursor protein*“ (APP), aus dessen Spaltprodukten  $\beta$ -Amyloid-Plaques hervorgehen (42). Sowohl APP, Amyloid-Plaques als auch das Tau-Protein sind Substrate von DYRK1A, wobei DYRK1A durch Phosphorylierung die Formation des Tau-Proteins und des APP fördert (148;182). Daneben gibt es Hinweise auf einen möglichen Effekt von DYRK1A auf kardiale Hypertrophien und die Knochenhomöostase (103;108).

Tabelle 2: Wichtige Substrate von DYRK1A und ihre physiologische Rolle

Name	Funktion	Referenz
p53	Transkriptionsfaktor	(136)
$\alpha$ -synuclein	Hauptbestandteil von „ <i>Lewy-bodies</i> “ bei Morbus Parkinson	(94)
$\beta$ -amyloid	Aus APP entstehendes Peptid, Bestandteil von Amyloid-Plaques bei Morbus Alzheimer	(95)
APP (amyloid precursor protein)	Vorläuferprotein des $\beta$ -Amyloids	(148)
CREB (cAMP responsive element binding protein)	Transkriptionsfaktor	(185)
Tau	Zytoskelettprotein, Bedeutung bei Morbus Alzheimer	(182)
SPRY2 (sprouty2)	Negativer Modulator von Wachstumsfaktor-bedingten Tyrosinkinase-Signalwegen	(9)
NFAT (nuclear factor of activated T-cells)	Transkriptionsfaktor	(12;69)

#### 1.5.4 Regulation von DYRK1A

Durch die Möglichkeit DYRK1A zu inhibieren konnten wichtige Funktionen und Signalwege identifiziert werden (17;179). Daneben bietet die Inhibition von DYRK1A die Möglichkeit, bei einer pathologischen Überfunktion von DYRK1A durch Überexpression therapeutischen Nutzen zu erzielen. So könnte die spezifische Inhibierung der DYRK1A-induzierten Phosphorylierung des Tau-Proteins

und damit der Neurofibrillenbündel-Bildung bei Alzheimer eine Therapiemöglichkeit darstellen (28;55). DYRK1A-Inhibitoren umfassen synthetische Inhibitoren wie Pyrazolidin-3,5-dion, das DYRK1A mit einer  $IC_{50}$  von 0,6-2,5  $\mu$ M hemmt, INDY, ein Benzothiazol mit einer  $IC_{50}$  von 240 nM, sowie TG003, das ebenfalls ein Benzothiazol ist und eine  $IC_{50}$  von 19 nM besitzt (99;128;129;132). Neben den synthetischen Inhibitoren existieren pflanzliche Inhibitoren, von denen Epigallocatechingallat (EGCG) und Harmin zu den wichtigsten gehören (17). EGCG ist ein Polyphenol, das in grünem Tee vorkommt und DYRK1A spezifisch mit einer  $IC_{50}$  von 330 nm hemmt (14). EGCG weist jedoch neben Effekten auf multiple Signalwege eine schlechte Bioverfügbarkeit auf, welche die Verwertbarkeit in Tierexperimenten reduziert (93;104). Neben EGCG existiert Harmin, ein  $\beta$ -Carbolin, das eine spezifische DYRK1A-Hemmung mit einer  $IC_{50}$  von 33 nM aufweist (siehe 3.11.)

#### 1.5.5 Die Rolle von DYRK1A beim Down-Syndrom

Das Down-Syndrom (DS), auch Trisomie 21, ist ein häufiger genetischer Defekt, der eine Inzidenz von 1/700 aufweist und mit einer Duplikation des Chromosoms 21 einhergeht (109). Neben einer kompletten Duplikation des Chromosom 21 bewirkt eine seltene partielle Duplikation eines bestimmten Bereiches ebenfalls einen DS-Phänotyp, was zur Bezeichnung „*down syndrom critical region*“ (DSCR) mit der Lagebezeichnung 21q22. 1-22.3 führte (101;144). Neben der typischen sichelförmigen Hautfalte am Augeninneren können bei DS-Patienten über 20 Symptome beobachtet werden, unter ihnen angeborene Herzfehler, mentale Retardierung, frühes Erkranken an Morbus Alzheimer, Leukämien, gastrointestinale Malfomationen und angeborene Defekte am Immunsystem (100). Die Entdeckung der DSCR führte zur Identifizierung von mehr als 30 potentiell DS-Symptome verursachenden Genen, von denen eines das DYRK1A-Gen war (164). In Ts65-Mäusen, einem DS-Mausmodell, und in Gehirnen von DS-Patienten lässt sich eine Überexpression von DYRK1A-mRNA beobachten, wobei eine 1,5fache Erhöhung des DYRK1A-Proteinslevels bei DS-Patienten ebenfalls nachgewiesen werden konnte (44;68). DS-Mausmodelle weisen neben Lernschwierigkeiten und Verhaltensauffälligkeiten auch Veränderungen in

synaptischer Plastizität und Dendritenbildung in bestimmten Hirnregionen auf (145;150). Dies korreliert mit Beobachtungen bei DYRK1A-überexprimierenden Mausmodellen, die Entwicklungsverzögerungen, motorische Defizite und Verhaltensauffälligkeiten aufweisen (2;5). Diese Erkenntnisse führten zu Therapieversuchen von DYRK1A-überexprimierenden Mäusen mit EGCG, bei denen sich erhöhte Hirnvolumina und verbesserte kognitive Fähigkeiten zeigten, was sich später in einer Pilotstudie mit DS-Patienten bestätigte (40;67).

### 1.6 Ziele dieser Arbeit:

Die in einem „*Yeast-to-hybrid-System*“ gefundene Interaktion von hOCT3 und DYRK1A soll durch ein Pulldown-Assay bestätigt werden. Die Interaktion soll durch Immunfluoreszenz-Techniken näher charakterisiert werden. Daneben soll die Frage beantwortet werden, welche physiologischen und pathologischen Effekte eine Interaktion der beiden Proteine hat, wobei die besondere Rolle von DYRK1A beim Down-Syndrom berücksichtigt werden soll. Eine weitere Frage ist, ob eventuell Symptome, die durch eine übermäßige Expression von DYRK1A entstehen, durch die Interaktion von hOCT3 und DYRK1A erklärt werden können.

## 2 Materialien

### 2.1 Lösungen und Puffer

Tabelle 3: Lösungen und Puffer

Medium	Inhalt
TE – Puffer (10x)	Tris: 242,28 g/l (2,00 M) EDTA-Na: 18,61 g/l (0,05 M) Acetat: 60,05 g/l (1,00 M) pH 8
TBST (10X)	0,1 M Tris 1,5 M NaCl 0,5% Tween Filtriert, pH 8.0

Transfer – Puffer	Glycine 14,42 g/l Tris 3,34 g/l Methanol 100 ml/l 1 L bidest. Wasser
Elektrophorese-Puffer (10X)	Tris 30,3 g/l Glycine 187,7 g/l 100 ml SDS 10%
Phosphate buffered saline (PBS) (10x)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
TAE – Puffer (50x)	Tris: 242,28 g/l (2,00 M) EDTA-Na: 18,61 g/l (0,05 M) Acetat: 60,05 g/l (1,00 M) pH 8
Lysispuffer für HEK293-Zelllysate	1% (v/v) Triton X-100 150 mM NaCl 50 mM Tris 1 mM EDTA 1 mM EGTA 30% (v/v) Glycerin 10 mM NaV <sub>3</sub> Complete Mini-EDTA-free protease inhibitor cocktail, 1 Tablette pro 10 ml Puffer (Firma Roche Diagnostics, Basel, Schweiz)
Ringerlösung	145 mM NaCl 1,6 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mM Glucose

	1 mM MgCl <sub>2</sub> 1,3 mM Ca Gluconate
--	---

## 2.2 Zelllinien

Tabelle 4: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
HEK 293 WT	Freundlicherweise zu Verfügung gestellt von Prof. H.Koepsell, Würzburg
hOCT3-HEK 293	Freundlicherweise zu Verfügung gestellt von Prof. H.Koepsell, Würzburg
TCam2	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Münster

## 2.3 Zellmedien

Tabelle 5: Nährmedien für Zellkulturen

Zellmedium	Inhalt
HEK293-Medium	500 ml DMEM (Dulbecco's Minimal Eagle Medium) (Firma Thermo Fisher Scientific, Waltham USA)

	3,7g/l $\text{NAHCO}_3$ 1g/l D-Glucose 10% v/v FCS (Fetales Kalbsserum) 2mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin/Streptomycin
hOCT3-HEK293-Medium	HEK293-Medium +500 mg/L Geneticin (418)
Tcam2-Medium	500 ml RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium, Firma Sigma, St. Louis, USA) 1% Penicillin/Streptomycin 10% v/v FCS (Fetales Kalbsserum) 5 ml L-Glutamin 200 mM

## 2.4 Bakterien

Tabelle 6: Verwendete Bakterien

Organismus	Bakterienstamm	Herkunft
E.Coli	XL-1-Blue	Firma Stratagene, La Jolla, USA

## 2.5 Bakterienmedien

Tabelle 7: Verwendete Medien

Medium	Herkunft
LB Medium	Firma Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
LB Agar	Firma Carl Roth GmbH, Karlsruhe,

	Deutschland
2xYT Media	Firma Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
2xYT Agar	Firma Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

## 2.6 Plasmide

Tabelle 8: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
hOCT3-pEGFP-N3	Expressionsvektor mit hOCT3-GFP-Tag	Dr. Brast, Münster
PCDNA6.F9	Expressionsvektor für Fusionsproteine mit Flag-Tag	Firma Invitrogen, Carlsbad, USA. Modifiziert durch AG Benzing, Freiburg
PCDNA6.F9 mit DYRK1A-Insert	Expressionsvektor für Fusionsproteine mit Flag-Tag mit DYRK1-Insert	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von B.Lutz, Mainz
pcDNA3.1	Dem PCDNA6.F9-ähnlicher Expressionsvektor mit Leerplasmid für Kontrollen	Firma Invitrogen, Carlsbad, USA

## 2.7 Oligonukleotide

Tabelle 9: Verwendete Primer

Primer	Beschreibung	Sequenz (5'→ 3')
DYRK1A-HEK-F	Forward primer für DYRK1A mRNA-Amplifikation in Rattenhirn- und TCam2-Zellen	CAC CAC CAC CAT GGA CAA CAA GCC TTG GGT
DYRK1A-HEK-R	Reverse primer für DYRK1A mRNA-Amplifikation in Rattenhirn- und TCam2-Zellen	AGC TAT GCC AGT CTC TTG GCG GGG ATT GGA
DYRK1A-FLAG-F	Forward primer für Klonierung von DYRK1A in den pcDNA6.F9-Vektor	TTA CGC GTA TGC ATA CAG GAG GAG AGA
DYRK1A-FLAG-R	Reverse primer für Klonierung von DYRK1A in den pcDNA6.F9-Vektor	TAC GCC GGC GTC ATT CTA AAG GCA CCT
hOCT3-Real3-F	Forward primer für hOCT3 mRNA-Amplifikation in TCam2-Zellen	GAC AAG AGA AGC CCC CAA CCT GAT
hOCT3-Real3-R	Reverse primer für hOCT3 mRNA-Amplifikation in TCam2-Zellen	CAC TAA AGG AGA GCC AAA AAT GTC
rOCT3-F	Forward Primer für rOCT3 mRNA-Amplifikation in	CAC CTC TCG TCA AAT TAC TCA

	Rattenhirnzellen	G
rOCT3-R	Reverse-Primer für rOCT3 mRNA-Amplifikation in Rattenhirnzellen	GGG GCC TCA GAC ATT AGA AGT A
hGAPDH-F	Forward primer für die GAPDH mRNA-Amplifikation in TCam2-Zellen, die als Kontrolle bei RT-PCR-Versuchen diente	CAA GCT CAT TTC CTG GTA TGA C
hGAPDH-R	Reverse primer für die GAPDH mRNA-Amplifikation in TCam2-Zellen, die als Kontrolle bei RT-PCR-Versuchen diente	GTG TGG TGG GGG ACT GAG TGT GG
rGAPDH-F	Forward primer für die GAPDH mRNA-Amplifikation in Rattenhirnzellen, die als Kontrolle bei RT-PCR-Versuchen diente	CAT CAA CGA CCC CTT CAT TGA C
rGAPDH-R	Reverse primer für die GAPDH mRNA-Amplifikation Rattenhirnzellen, die als Kontrolle bei RT-PCR-Versuchen diente	ACT CCA CGA CAT ACT CAG CAC C

## 2.8 Materialien für DNA-Restriktion und -Ligation

Tabelle 10: Verwendete Materialien für die Klonierungen

Material	Herkunft
Taq DNA polymerase, recombinant	Firma Invitrogen, Carlsbad, USA
T4 DNA Ligase	Firma Invitrogen, Carlsbad, USA
MluI	Firma NEB, Ipswich, USA
NotI	Firma NEB, Ipswich, USA

## 2.9 Materialien für PCR und RT-PCR

Tabelle 11: Verwendete Materialien für die Polymerase-Kettenreaktion und die Reverse Transkriptase- Polymerase-Kettenreaktion

Material	Herkunft
Accuprime PFX DNA Polymerase	Firma Invitrogen, Carlsbad, USA
10X Accuprime PFX Reaction Mix	Firma Invitrogen, Carlsbad, USA
Superscript III Reverse Transcriptase	Firma Invitrogen, Carlsbad, USA
RNAlater RNA Stabilization Reagent	Firma Qiagen, Venlo, Niederlande
Lysispuffer für RNA-Isolierung	Firma Sigma Aldrich, St. Louis, USA
GenElute Filtration Column	Firma Sigma Aldrich, St. Louis, USA
GenElute Binding Column	Firma Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Wash Solution 1	Firma Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Wash Solution 2	Firma Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Elution Solution	Firma Sigma Aldrich, St. Louis, USA
HPLC-gereinigtes Wasser	Eigene Herstellung

## 2.10 Materialien für die Agarose-Gelelektrophorese

Tabelle 12: Materialien für die Agarose-Gelelektrophorese

Material	Herkunft
Agarosepulver	Firma Sigma Aldrich, St. Louis, USA
100 bp Ladder	Firma Fermentas, Vilnius, Litauen

## 2.11 Antikörper

Tabelle 13: Verwendete Antikörper

Antikörpername	Ursprung	Zielorganismus	Herkunft
DYRK1A-IgG-Antikörper (polyklonal)	Kaninchen	Mensch, Maus, Ratte	Firma Cell Signaling, Cambridge, UK
hOCT3-IgG-Antikörper (polyklonal)	Kaninchen	Mensch	Firma abcam, Cambridge, UK
hOCT2-IgG -Antikörper (monoklonal)	Maus	Mensch	Firma AbD serotec, Oxford, UK

## 2.12 Materialien für Co-Immunpräzipitationen

Tabelle 14: Material für die Co-Immunpräzipitation

Material	Herkunft
----------	----------

Anti-Flag™ M2 Magnetic Beads	Firma Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Lysispuffer für Pulldown-Assay	50 mM Tris HCL pH 7,4 150 mM NaCl, 1 mM EDTA 1% Triton X-100 10% Glycerol Eine Tablette Complete mini-EDTA-free protease inhibitor cocktail (Firma Roche Diagnostics, Basel, Schweiz) pro 7 ml Puffer) 1% phosphatase inhibitor cocktail II (Sigma) 100 U Benzonase/ml Puffer (Firma Novagen, Madison, USA)
Waschpuffer für Anti-Flag™ M2 Affinity Gel	50 mM Tris HCL pH 7,4 150 mM NaCl

### 2.13 Materialien für die Immunfluoreszenz-Färbungen

Tabelle 15: Materialien für die Immunfluoreszenz-Färbungen

Material	Herkunft/Inhalt
PBS 1X	Inhalt siehe 2.1

4% Paraformaldehyd	Demineralisiertes H <sub>2</sub> O Paraformaldehyd-Pulver 1X PBS NaOH (1 N) HCL (2 M)
0,1% Triton™ X-100	Firma Sigma Aldrich, St. Louis, USA
10% Bovine serum albumin (BSA) - Blocklösung	Firma Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Sekundäre Antikörper: Alexa Flour® 488 Goat Anti-mouse IgG Alexa Flour® 594 Goat Anti-rabbit IgG Alexa Flour® 647 Goat Anti-mouse IgG	Firma Invitrogen, Carlsbad, USA
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Firma Cell Signaling, Cambridge, UK
Alexa Fluor® 647 Mouse anti-GM130	Firma BD Pharmingen, New Jer- sey, USA

## 2.14 Kits

Tabelle 16: Kits

Kit	Herkunft
-----	----------

Gel DNA Recovery Kit	Firma Zymo Research, Irvine, USA
Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit	Firma Zymo Research, Irvine, USA
PureLink HighPure Plasmid Filter Purification Kit	Firma Invitrogen, Carlsbad, USA
DNA Clean and Concentrator Kit	Firma Zymo Research, Irvine, USA
DNA Gel Recovery Kit	Firma Zymo Research, Irvine, USA

## 2.15 Materialien für Western Blots

Tabelle 17: Materialien für Western Blot

Material	Herkunft
4 – 20% Proteingel	Firma Bio rad, Hercules, USA
Laufpuffer (siehe 2.1)	
Pageruler™ Plus Prestained Protein Ladder Marker	Firma Fermentas, Vilnius, Litauen
Nupage lithium dodecyl sulfate (LPS) Sample Buffer 4x	Firma Invitrogen, Carlsbad, USA
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran	Firma Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate	Firma Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

Block-Lösung	3% (v/v) Gelatine from cold water fish 45% (Firma Sigma Aldrich, St. Louis, USA) TBST
Ponceau-S	Ponceau S 0,2% (w/v) Trichloressigsäure 3,0% (w/v)
Zweitantikörper Polyclonal Goat Anti-Rabbit, Anti-Mouse Immunoglobulin HRP	Firma Dako, Glostrup, Dänemark

## 2.16 Materialien für Transfektionen

Tabelle 18: Materialien für Transfektionen

Material	Herkunft
ssDNA 10 mg/ml Hering Sperma	Firma Invitrogen, Carlsbad, USA
Lipofectamine™	Firma Invitrogen, Carlsbad, USA
Turbofect™	Firma Fisher Scientific, Waltham, USA

## 2.17 Sonstige Materialien

Material	Herkunft
Harmin	Firma abcam Biochemicals, Cambridge, UK
ASP <sup>+</sup>	Firma Invitrogen, Carlsbad, USA

## **3 Methoden**

### **3.1 Kultivierung von HEK292-Zellen**

#### 3.1.1 HEK293-Zellen

HEK293-Zellen sind humane embryonale Nierenzellen, die durch Transformation mit den Nukleotiden 1 – 4244 der humanen Adenovirus-5-DNA als permanente Zelllinie breite Verwendung in der Wissenschaft gefunden haben (63). Durch ihre gute Verwendbarkeit bei Transfektionen und ihrer relativ einfachen Kultivierung werden sie nach wie vor häufig verwendet, wobei die Originalpublikation der ersten HEK293-Zellproduktion mittlerweile über 2220 Mal zitiert wurde (161). In der vorliegenden Arbeit wurden neben HEK293-Wildtyp-Zellen auch HEK293-Zellen, die stabil mit hOCT3 transfiziert wurden, verwendet. Diese wurden freundlicherweise von Prof. H. Koepsell, Julian-Maximilians-Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt. Zur stabilen Transfektion wurde der pcDNA3.1(+)-Vektor mit hOCT3-DNA verwandt (siehe 2.6). Der Erfolg der Transfektion wird mit Zugabe von Geneticin zu dem betreffenden Medium zur Zellselektion sichergestellt.

#### 3.1.2 Kultivierung der HEK293-Zellen

1. Die HEK293-Zellen werden in 50 ml-Flaschen ausgesät.
2. Die Flaschen werden bei 37° C bei 92% Raumluft und 8% CO<sub>2</sub> für 7 Tage inkubiert. Durch den konstanten CO<sub>2</sub>-Anteil in der Luft, bleibt der pH-Wert des Mediums konstant. Bei einer Konfluenz der Zellen von 80% wird zur Vermeidung einer Kontaktinhibition eine Teilung der Zellkultur vorgenommen.
3. Die HEK293-Zellen in der 50 ml-Flasche werden unter Zuhilfenahme von Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-freiem PBS-Puffer separiert, wobei ein Teil in einer 50 ml-Flasche weiter kultiviert wird und ein anderer Teil auf 10 cm-Platten, 24-Well-Platten oder 92-Well-Platten zur weiteren Verwendung ausgesät wird

## **3.2 Kultivierung von TCam-2-Zellen**

### **3.2.1 TCam-2-Zellen**

TCam2-Zellen sind humane Hodenkrebszellen, die als Zelllinie aus dem Hodentumor eines 35-jährigen Patienten gewonnen wurden (125). Bei den TCam-2-Zellen handelt es sich um eine Zelllinie des Seminom-Typs, bei der immunhistochemisch Zellmarker des Seminoms nachgewiesen wurden (41).

### **3.2.2 Kultivierung von TCam-2-Zellen**

1. Die TCam-2-Zellen werden in 50 ml Flaschen ausgesät.
2. Die Flaschen werden bei 92%Raumluft und 8% CO<sub>2</sub> für 7 Tage inkubiert.
3. Die TCam-2-Zellen werden in der 50 ml-Flasche unter Zuhilfenahme von Trypsin und EDTA gesplittet und dann in einer 50 ml-Flasche weiter kultiviert. Ein anderer Teil wird auf 24-Well-Platten zur weiteren Verwendung ausgesät.

## **3.3 Transfektion von HEK293-Zellen**

### **3.3.1 Transfektion von HEK293-Zellen mit DYRK1A-Plasmid-DNA und hOCT3-GFP-Tag-DNA mittels Turbofect™**

Bei dieser Transfektion wird DNA mit Hilfe von Turbofect™, einer wässrigen Lösung aus kationischen Polymeren, in eukaryotische Zellen verbracht. Die zu transfizierende DNA bindet durch ihre negative Ladung mit den positiv geladenen Polymeren der Turbofect™-Lösung und formt stabile Komplexe, die leichter in die Zelle verbracht werden können. HEK293-Zellen wurden 24 h vor Transfizierung ausgesät und bei einer lichtmikroskopisch festgestellten Konfluenz von 80% nach dem Herstellerprotokoll transfiziert. Die Transfektion erfolgte wie in dem Herstellerprotokoll empfohlen mit der empfohlenen Menge von Plasmid-DNA von DYRK1A und hOCT3-GFP-Tag.

### 3.3.2 Transfektion von hOCT3-HEK293-Zellen mit DYRK1A-Plasmid-DNA und hOCT3-GFP-Tag-DNA mittels Lipofectamine™

Hierbei wurde die Transfektion von HEK293-Zellen für die 4-(4-dimethylaminostyryl)-N-methylpyridinium (ASP<sup>+</sup>)-Messungen, die Pulldown-Assays und die Immunfluoreszenz mit Lipofectamine™ durchgeführt. Die zu transfizierende DNA wird zu dem aus polykationischen Liposomen bestehenden Lipofectamine™ gegeben, die nach DNA-Aufnahme in die wässrige innere Phase mit der Zellwand fusioniert und die DNA freisetzt. Das Aussähen der HEK293-Zellen erfolgte 24 h vor geplanter Transfektion. Transfiziert wurde nach dem Herstellerprotokoll dann bei einer lichtmikroskopisch festgestellten Konfluenz von 70% und mit der empfohlenen Menge an Plasmid-DNA von DYRK1A und/oder hOCT3-GFP-Tag.

## 3.4 Herstellung von Zelllysaten von HEK293-Zellen für Western Blots

Die hOCT3-HEK293-Zellen wurden auf 10 cm-Schalen ausgesät und das Wachstum wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Nach Feststellung eines konfluierenden Wachstums der Zellen, das ungefähr 70-80% der 10 cm-Schalen bedeckte, wurde das Medium verworfen und die Zellen wurden mit 10 ml PBS vorsichtig gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von Lysispuffer. Dabei wurde für Western Blots 1 ml des HEK293-Zelllysate-Lysispuffers (siehe 2.1) verwendet. Im Anschluss wurden die lysierten Zellen aus der 10 cm-Schale in ein 1,5 ml Eppendorfer Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C mit 700 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein neues 1,5 ml Eppendorfer Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C für weitere Verwendung gelagert.

## 3.5 Bakterien-Methoden

### 3.5.1 Kultivierung und Aufbewahrung von Bakterien

*Escherichia coli*-Bakterien (E.coli) wurden in 2 ml LB-Medium als einzelne Kolonie von einer LB-Agar-Platte verbracht und zur Vermehrung bei 37°C inkubiert. Das Medium enthielt Ampicillin zur Selektion von Bakterien mit Plasmiden,

in denen ein Ampicillin-Resistenzgen enthalten ist. Die Bakterien wurden unter konstanter Schüttlung (250 rpm) 12 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Lagerung auf LB-Ampicillin-Platten bei 4°C. In dieser Form war die Aufbewahrung von bis zu 2 Monaten möglich. Für eine längerfristige Lagerung wurde eine Flüssigkultur 30%-ig mit Glycerin versetzt und bei -80°C aufbewahrt

### 3.5.2 Herstellung kompetenter Escherichia coli-Bakterien

Die Herstellung kompetenter E.coli-Bakterien ist nötig, um die Plasmid-DNA-Aufnahme in die Bakterienzelle zu erleichtern. Hierzu wird 1 ml einer Flüssigkultur von Bakterien in 50 ml LB-Medium bei 37°C unter Schütteln bei 250 rpm inkubiert. Das Wachstum der Bakterien kann mittels Messung der optischen Dichte (OD) überprüft werden. Bei einer Wellenlänge von 600 nm kann aus der Absorption des Lichtes auf die Phase des Bakterienwachstums geschlossen werden. Zur Bestimmung der optischen Dichte wurde 1 ml der Bakterienflüssigkeit in einer Plastikkuvette verwendet. Bei einer OD von 0,27-0,40 wird der Bakterienansatz 10 min auf Eis gekühlt und anschließend zentrifugiert (2100 x g, 4°C). Danach erfolgt die Suspension der Zellen in 10 ml gekühlter 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung mit einem pH von 7,5. Die CaCl<sub>2</sub>-Lösung bewirkt eine Verbindung mit negativ geladenen DNA-Anteilen und Lipopolysacchariden der äußeren Bakterienmembran. Die Ansätze werden dann 30 min auf Eis gekühlt und anschließend bei 1500 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Danach erfolgt die Verbringung der Bakterien in 10%ige Glycerin-CaCl<sub>2</sub>-Lösung zur Aufbewahrung bei -80°C (39).

### 3.5.3 Transformation von Plasmid-DNA in E.coli

Sämtliche bakterielle Transformationen wurden mittels Hitzeschock-Technik durchgeführt. Hierfür wurden 100 µl kompetenter Bakterien mit 500 ng Plasmid-DNA zusammen gegeben und anschließend 30 min auf Eis gekühlt. Danach erfolgte die Anwendung des Hitzeschocks für 2 min bei 42°C. Anschließend werden die Bakterien für 1 min auf Eis gekühlt und dann in 900 µl LB-Medium aufgenommen. Der 1 ml-Ansatz wird in einem nächsten Schritt bei 37°C und 250 rpm für 45 min in einem Schüttler inkubiert. Nach Zentrifugation des Ansatz-

zes (2100 x g für 4 min) wurden 900 µl Überstand verworfen und die Bakterien in dem Restmedium gelöst und dann auf LB-Ampicillin-Platten zur weiteren Kultivierung ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C.

#### 3.5.4 Plasmidpräparationen

Mit Hilfe der Techniken der Plasmidpräparation kann Plasmid-DNA aus E.coli-Bakterien isoliert und konzentriert werden. Je nach Menge der zu isolierenden DNA wird entweder die Minipräparation oder die Maxipräparation verwendet. Für die vorliegende Arbeit wurden beide Techniken eingesetzt. Als Präparationstechnik wird in den genutzten Kits die Technik der alkalischen Lyse verwendet, bei der die Bakterienzellen alkalisch lysiert, die RNA durch beigesezte RNAsen zersetzt und die chromosomale DNA im Gegensatz zur Plasmid-DNA ausgefällt wird (19).

#### 3.5.5 Isolation von Plasmid-DNA aus E.coli als Minipräparation

Zur Minipräparation von DNA wurde das „Zyppy<sup>tm</sup> Plasmid Miniprep Kit“ der Firma Zymo Research, Irvine, USA verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

1. Kultivierung von Bakterien in 2 ml LB-Ampicillin-Medium bei 37°C und 250 rpm im Schüttler über Nacht.
2. Entnahme von 600 µl aus dem Bakterienansatz und Mischung mit 100 µl 7x „Lysis Buffer“
3. Zugabe von 350 µl „Neutralization Buffer“, im Anschluss gründliche Durchmischung des Ansatzes mittels Vortexmischer
4. 4 min Zentrifugation bei 12500 x g
5. Entnahme des Überstandes und Überführung von 900 µl in die „Zymo-Spin<sup>tm</sup> II Column“
6. Erneute Zentrifugation bei 12500 x g für 30 Sekunden
7. Entnahme des Filtrates und Gabe von 200 µl „Endo-Wash Buffer“ auf die Säule

8. Erneute Zentrifugation bei 12500 x g über 30 Sekunden und Gabe von 400 µl Zyppy™ *Wash Buffer* und erneute Zentrifugation bei 12500 x g für 30 Sekunden
9. Gabe von 30 µl „Zyppy™ *Elution Buffer*“ und abschließende Zentrifugation bei 12500 x g über 30 Sekunden. Entnahme des Plasmid-DNA-Eluats und Aufbewahrung bei -80°C

### 3.5.6 Isolation von Plasmid-DNA aus E.Coli als Maxipräparation

Zur Maxipräparation wurde das „*PureLink HighPure Plasmid Filter Purification Kit*“ der Firma Invitrogen, Carlsbad, USA verwendet. Die Nutzung folgte den Herstellerangaben wie folgt:

1. Kultivierung von Bakterien in 100 ml LB-Ampicillin-Medium bei 37°C und 250 rpm im Schüttler über Nacht.
2. Zentrifugation des Bakterienansatzes bei 4000 x g für 10 min. Überführung des Pellets in 10 ml „*Resuspension Buffer*“ (R3)
3. Zugabe von 10 ml „*Lysis Buffer*“ (L7) und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur
4. Zugabe von 10 ml „*Precipitation Buffer*“ (N3) und Homogenisieren durch Schwenken
5. Zugabe von 30 ml „*Equilibration Buffer*“ (EQ1) in eine „*HiPure Filter Maxi Column*“ und anschließenden Überführung des Ansatzes in die Säule
6. Nach Durchfluss des Ansatzes durch die Säule, Verwerfen des Filters und Zugabe von 50 ml „*Wash Buffer*“ (W8)
7. Eluation der Plasmid-DNA mit 15 ml „*Elution Buffer*“ und 10,5 ml kaltem Isopropanol (E4)
8. Zentrifugation bei 16000 x g für 5 min und 4°C. Abnahme des Überstandes und Inkubation des Pellets bei Raumtemperatur. Anschließende Zugabe von 500 µl „*TE Buffer*“ (TE) und Suspension der isolierten Plasmid-DNA. Aufbewahrung bei -20°C

## 3.6 DNA-Methoden

### 3.6.1 PCR

Eine der meist verwendeten Standardtechniken der Molekularbiologie ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), mit deren Hilfe kleinste Mengen von DNA vervielfältigt werden können (155). DNA mit dem zu vervielfältigenden Abschnitt („*template*“) wird mit Hilfe von zwei Oligonukleotiden („*primer*“), die sich an spezifische Stellen der DNA anlagern, vervielfältigt. Die Template-DNA wird in einem ersten Schritt („*melting*“) bei Temperaturen von 94 - 98° C in zwei Einzelstränge aufgetrennt. An den zu ihrer Sequenz komplementären Bereich der Template-DNA können sich die Primer in einem zweiten Schritt („*annealing*“) bei niedrigeren Temperaturen von üblicherweise 50-65° C anlagern und verbinden. Danach wird mit der DNA-Polymerase, einem Enzym, das die Synthese eines DNA-Stranges katalysiert, der neue Einzelstrang, ausgehend vom 3'-Ende der Primer hergestellt („*elongation*“). Durch Wiederholung dieser drei Schritte kann die DNA dann exponentiell vervielfältigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Pfx-DNA-Polymerase verwendet, die über eine 3'-5'-Exonukleasefähigkeit und eine Korrekturlese-Fähigkeit verfügt. Damit können fehlerhaft inserierte Nukleotide erst erkannt und dann exzidiert werden. Für die Amplifizierung von DNA wurde der folgende PCR-Reaktionsansatz verwendet:

Tabelle 19: PCR-Reaktionsansatz

Name	Menge
Template-DNA (10pg-200ng)	≥1 µl
10X AccuPrime PFX Reaction Mix	5 µl
Accuprime PFX DNA Polymerase	1 µl
Primer (jeweils 10 pmol/µl)	1,5 µl

Danach wurde der Reaktionsansatz mit HPLC-gereinigtem Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Im Anschluss wurde der Schmelzpunkt der Primer nach folgender Formel berechnet:

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

Abhängig von  $T_{\text{annealing}}$  erfolgte dann die Programmdurchführung nach folgendem Schema:

Tabelle 20: PCR-Programm

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

### 3.6.2 Reverse Transkriptase-PCR

Mit Hilfe der Reverse Transkriptase-PCR ist es möglich, RNA in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben und dann mit der in 3.6.1 beschriebenen Technik zu vervielfältigen (16). Das Enzym Reverse Transkriptase (RT) ist in der Lage, anhand eines RNA-Einzelstranges einen Hybridstrang mit zu dem RNA-Strang komplementärer DNA zu synthetisieren. Danach folgen der Abbau des RNA-Einzelstranges und eine Vervollständigung zu doppelsträngiger DNA mittels DNA-Polymerase. Danach kann die cDNA als Template für die zu vervielfältigende Sequenz mittels PCR dienen und so unter anderem die Genexpression von Zellen untersucht werden. Für die Isolierung von RNA aus Gewebeproben wurde das betreffende Gewebe in eine der Herstellerangabe folgenden Menge von RNA-Stabilisierungsreagenz (siehe 2.9) gegeben und anschließend mit 500 µl Lysispuffer/20 mg Gewebe bei 19.000 rpm mit einem Homogenisator homo-

genisiert. Dann wird 500 µl des Lysats auf eine „*GenElute Filtration Column*“ pipettiert und 2 Min bei 14.100 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wird das Zentrifugat 1:1 mit 70% Ethanol verdünnt und 500 µl auf die „*GenElute Binding Column*“ gegeben. Nach 15 Sekunden Zentrifugation bei 14.100 rpm wird das Zentrifugat verworfen und derselbe Schritt mit dem verbleibenden Rest wiederholt. Nun werden konsekutiv 500 µl Waschlösung 1 und 2 auf die Säule gegeben und jeweils 15 Sekunden bei wiederum 14.100 rpm zentrifugiert. Nach nochmaligem Waschen mit Waschlösung 2 wird die RNA mit 50 µl Elutionslösung eluiert und für die spätere Verwendung zur Umschreibung in cDNA mit RT bei -80°C gelagert.

Zur anschließenden Umschreibung von RNA in cDNA kann ein „*One-step*“-Verfahren genutzt werden, bei dem die RT-Umschreibung und die PCR in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Dazu wird eine Kombinationslösung verwendet, die neben der RT auch noch eine Taq Polymerase und eine Polymerase mit Korrekturlese-Fähigkeit beinhaltet. Der Reaktionsansatz beinhaltet auch einen dNTP-Mix, Primer, Template-RNA und eine Pufferlösung. In einem Thermocycler wird anschließend bei hohen Temperaturen der erste Zyklus mit der RT begonnen. Anschließend erfolgt die Denaturierung bei niedrigeren Temperaturen. Währenddessen ist die RT inaktiv. Anschließend erfolgen im Thermocycler 40-50 Zyklen der PCR-Schritte „*Denaturation*“, „*Annealing*“ und „*Elongation*“ (siehe 3.6.1). Die dann synthetisierte DNA wird für die weitere Verwendung bei -80°C gelagert.

In dieser Arbeit wurde für die anschließende Umschreibung von RNA in cDNA hauptsächlich ein „*Two-step*“-Verfahren genutzt, bei dem die RT-Umschreibung und die PCR nicht in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß durchgeführt werden, sondern beide Schritte unabhängig voneinander durchgeführt werden. Die Template-RNA (10 pg–500 ng), jeweils 50-250 ng der Primer, ein dNTP-Mix (1 µl) und HPLC-gereinigtes Wasser bis zu einem 13 µl-Reaktionsansatz werden zueinander gegeben. In einem Thermocycler (HYBAID PCR Sprint, Firma Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wird das „*Annealing*“ und „*Extending*“ erst bei 50° für 60 min und dann die Inaktivierung der RT bei 70°C für 15 min durchgeführt. Anschließend erfolgt die PCR (siehe 3.6.1)

### 3.6.3 Restriktion von DNA

Um HEK293-Zellen mit DYRK1A transient transfizieren und für eine Koimmunpräzipitation verwenden zu können, sollte eine Klonierung des DYRK1A-Gens in den pCDNA6.F9-Vektor mit FLAG-Tag erfolgen. Um DNA an bestimmten Stellen zu schneiden, werden Restriktionsendonukleasen benötigt. Diese Enzyme können DNA an bestimmten DNA-Sequenzen, die oft in beiden DNA-Strängen gegenläufig gelesen identisch sind (palindromisch), erkennen und schneiden. Die Restriktionsendonukleasen erkennen jeweils spezifische DNA-Sequenzen von bis zu 8 Basenpaaren und schneiden die DNA dann. Restriktionsendonukleasen können in vier Gruppen eingeteilt werden, wobei unter anderem die Schnittstelle in Abhängigkeit von der erkannten Sequenz oder benötigte Kofaktoren über die Klassifizierung entscheiden (188). In der vorliegenden Arbeit wurden Restriktionsendonukleasen der Klasse II genutzt, die in der erkannten Sequenz die DNA schneiden. Die Anwendung der Restriktionsenzyme erfolgte nach Angaben der Hersteller. Ein Reaktionsansatz war 30 µl groß und beinhaltete 3 µl Reaktionspuffer, 1 U/µg DNA der Restriktionsenzyme Mlu I und Not I, 10% (v/v) BSA und bidestilliertes Wasser zur Auffüllung des Ansatzvolumens. Die Restriktion erfolgte bei 37°C für 4 h, die anschließende Inaktivierung der Restriktionsenzyme erfolgte bei 65°C für 20 min. Die Erfolgskontrolle der Restriktion wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (siehe 3.6.6)

### 3.6.4 Ligation von DNA

Um mit Restriktionsenzyme geschnittene DNA wieder zu verknüpfen, muss die DNA mit Hilfe des Enzyms T4-DNA-Ligase inkubiert werden. Dieses Enzym katalysiert die Verbindung von Phosphatresten und Desoxyribose der DNA und ist somit essentiell für die Ligation der geschnittenen DNA. Der linealisierte Vektor sollte für ideale Ligationsbedingungen mit dem in den Vektor zu integrierenden Insert im Verhältnis 1:3 stehen. In dieser Arbeit wurde 100 ng Vektor-DNA in den Ansätzen verwendet. Den Herstellerangaben folgend wurde der beiliegende Reaktionspuffer dem Reaktionsansatz auf 10% des Volumens hinzugefügt. 4 U der T4-DNA-Ligase wurden hinzu gegeben und der Reaktionsansatz für 2 h bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde eine weitere Inkubation für 2 h bei 16°C

durchgeführt. Die so synthetisierten Konstrukte konnten dann nach Transformation in Bakterien und Isolation per Mini- oder Maxipräparationstechnik (siehe 3.5.5 und 3.5.6) für transiente Transfektionen verwendet werden.

### 3.6.5 Aufreinigung von DNA

Mit Hilfe eines „*DNA Clean and Concentrator Kit*“ (Firma Zymo Research, Irvine, USA) kann eine Aufreinigung und Erhöhung der DNA-Konzentration eines PCR- oder Restriktions-Ansatzes erreicht werden. Überschüssige Primer, Nukleosidtriphosphate, Enzyme und Puffersubstanzen können durch DNA-Bindung an Säulen und konsekutives Waschen entfernt werden. Das Vorgehen erfolgte nach Herstellerangaben und die anschließende Aufbewahrung bei -20°C.

### 3.6.6 Agarosegel-Elektrophorese von DNA

DNA kann ihrer Größe entsprechend durch Gelelektrophorese aufgetrennt werden um ihre Größe anhand eines definierten Markers zu bestimmen (1). Negativ geladene Nukleinsäuren können durch einen elektrischen Strom durch ein Agarosegel bewegt werden, wobei größere Fragmente schlechter durch das Gel gelangen als kleinere. Die Konzentration der Agarose in den Gelen kann je nach Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente angepasst werden und variieren. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Agarosekonzentration von 1% gewählt.

### 3.6.7 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung von DNA (siehe 3.6.7) kann die DNA aus dem Gel ausgeschnitten und zurück gewonnen werden. In dieser Arbeit wurde das „*Gel DNA Recovery Kit*“ der Firma Zymo Research, Irvine, USA nach Herstellerangabe verwendet. Die DNA-Bande, die isoliert werden soll, wird mit Hilfe eines Messer ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß verbracht. Nach Volumen des ausgeschnittenen Agarosegels wurde das Dreifache an „*Agarose dissolving buffer*“ (ADB) hinzugefügt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz bei 55°C, bis zur vollständigen Auflösung des festen Agarosegels, inkubiert. Der flüssige Reaktionsansatz wurde dann auf die „*Zymo Spin / Column*“ gegeben und bei 12500 x g für 30 Sekunden zentrifugiert. Das Eluat

wurde verworfen und nach zweimaligem Waschen mit 200 µl Wash Buffer wurde 10 µl HPLC-gereinigtes Wasser auf die Säule gegeben. Es erfolgte dann eine letzte Zentrifugation mit 12500 x g für 30 Sekunden in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C

### 3.6.8 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der DNA ermöglicht die Aufschlüsselung der Nukleotidabfolge einer DNA-Sequenz. In dieser Arbeit wurde die Sequenzierung angewandt, um eine Erfolgskontrolle der Klonierungen durchzuführen. Die Sequenzierung bedient sich der PCR-Methode, verwendet jedoch fluoreszierende Nukleosidtriphosphate, die einen Abbruch der DNA-Strang-Verlängerung bewirken. Die somit entstehenden Fragmente unterschiedlicher Größe können dann in der Gelelektrophorese identifiziert werden (156). Der Reaktionsansatz zur DNA-Sequenzierung beinhaltete 2 µl des „5x Sequencing Buffers“, 1 µl „Big Dye-Reagenz“ mit den benötigten Nukleosidtriphosphaten und Enzymen, 1 µl des PCDNA6.F9-DYRK1A-Plasmids als „Template“, jeweils 1 µl der DYRK1A-FLAG-Primer R und F, sowie 5 µl bidestilliertes Wasser. Der Ansatz wurde im HYBAID PCR-Sprint-Cycler der Firma Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA im ersten Schritt bei 96°C für 30 Sekunden erhitzt. Anschließend erfolgte der nächste Schritt bei 50°C für weitere 30 Sekunden. Im dritten Schritt wurde dann für 4 min bei 60°C inkubiert. Nach 25 Zyklen wurden die PCR-Produkte zur Sequenzierung an die Abteilung für molekulare Diagnostik der Westfälischen Wilhelms-Universität verbracht.

## 3.7 Koimmunpräzipitation-Experimente

### 3.7.1 Koimmunpräzipitation-Methode

Eine Koimmunpräzipitation ist eine Methode zum Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion. Dabei wird eines der Proteine, das an der Interaktion beteiligt ist, mit einer Markierung („Tags“) versehen, die wiederum dafür sorgt, dass das markierte Protein an einen Liganden bindet und so von anderen Proteinen eines Zelllysates getrennt werden kann. Die Markierung des Zielproteins kann entweder nach Aufreinigung durch so genannte Affinitätstags, oder durch re-

kombinante Herstellung von Proteinen, die mit dem gewünschten Tag fusioniert wurden, erfolgen. In dieser Arbeit wurde mit den „*Anti-Flag<sup>TM</sup> M2 Magnetic Beads*“ eine andere Verbindung genutzt, die auf der Bindung von spezifischen IgG-Antikörpern mit einem „*Flag-Tag*“, bestehend aus den 8 Aminosäuren Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys, beruht. Das Protein, welches in einer Koimmunpräzipitation als Interaktionspartner bestätigt werden soll, wird rekombinant mit dem „*Flag-Tag*“ fusioniert. In der vorliegenden Arbeit wurde DYRK1A mit dem „*Flag-Tag*“ versehen und dann als „*Bait-Protein*“ bezeichnet. Nach Transfektion von hOCT3-HEK293-Zellen mit Flag-DYRK1A-Plasmid-DNA und anschließender Gewinnung des Zelllysates, wird dieses dann mit „*Anti-Flag<sup>TM</sup> M2 Magnetic Beads*“ inkubiert. DYRK1A mit „*Flag-Tag*“ wird von IgG-Anti-Flag-Antikörpern, die sich auf 50 µm großen „*Anti-Flag<sup>TM</sup> M2 Magnetic Beads*“ befinden und die über eine Hydrazinbindung an diesen superparamagnetischen und mit Eisen imprägnierten „*Agarosebeads*“ befestigt sind, spezifisch erkannt und gebunden (142). Das Bait-Protein DYRK1A kann nun mit seinen Interaktionspartnern, genannt „*Prey-Proteins*“, interagieren und eine Verbindung eingehen. Nachdem man die „*Agarosebeads*“ mit den verbundenen IgG-Antikörpern und dem „*Bait*“- und „*Prey*“-Proteinen vom Zelllysate per Zentrifugation getrennt hat, können die „*Prey-Proteins*“ per Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eluiert werden. Durch eine Western Blot-Analyse wird dann überprüft, ob hOCT3 ein „*Prey-Protein*“ ist. Als Negativkontrolle wurden mit dem Leervektor pcDNA3.1 (siehe 2.6) transfizierte hOCT3-HEK293-Zellen verwendet.

### 3.7.2 Koimmunpräzipitation-Protokoll

1. Gabe von 200 µl Lysispuffer (siehe 2.12) auf hOCT3-HEK293-Zellpellets (10 cm Schale, siehe 3.4) und 30 min auf Eis belassen
2. 50 µl „*Anti-Flag<sup>TM</sup> M2 Magnetic Beads*“ pro Ansatz in 1 ml-Eppi überführen, jeweils 3 Mal in Waschpuffer (siehe 2.6) waschen.
3. Lysierte Zellpellets 20 min bei 4°C und 16.000 x g zentrifugieren (Mikro 200R, Firma Hettich, Tuttlingen, Deutschland), dann 35 µl vom Überstand abnehmen und als Transfektionskontrolle bei -80°C lagern

4. Der verbleibende Überstand der zentrifugierten lysierten Zellpellets wird auf die „*Anti-Flag<sup>TM</sup> M2 Magnetic Beads*“ gegeben und bei 4°C über Nacht in einem Probenschüttler (Grant-bio PTR30, Firma Keison, Essex, UK) belassen
5. Der Überstand über den „*Anti-Flag<sup>TM</sup> M2 Magnetic Beads*“ wird abgenommen und bei -20°C gelagert
6. Der verbleibende „*Anti-Flag<sup>TM</sup> M2 Magnetic Beads*“ -Ansatz mit den Zelllysaten wird 3 Mal mit jeweils 1 ml Waschpuffer gewaschen. Dazwischen wird 1 min bei 12500 x g zentrifugiert
7. Anschließend werden die verbleibenden Ansätze bei -20°C gelagert

### **3.8 Protein-Analyse**

#### **3.8.1 Natrium Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Proteine können im denaturierten Zustand ihrer Größe nach in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt werden (178). Dazu wurden zu den Zelllysaten „*Nupage LPS Sample Buffer 4x*“ gegeben, welcher 20-25% der Probenmenge ausmachen sollte. Durch das im Probenpuffer enthaltene Natrium-Dodecylsulfat (SDS) wird eine konstante negative Ladungsverteilung der Proteine bewirkt, welche dann auch durch wechselseitige Abstoßung die Tertiärstruktur der Proteine auflöst und linearisiert. Durch die weiterhin im Probenpuffer befindlichen reduzierenden Thiole werden Disulfidbrücken gespalten. Das Erhitzen der Proben auf 95°C für 10 min bewirkt durch das Lösen von Wasserstoffbrücken eine Denaturierung, die für die korrekte Passage der Proben durch das Polyacrylamid-Gel wichtig ist. Für die Größenbestimmung der Proteine wurde neben den Proben der „*Pageruler<sup>TM</sup> Plus Prestained*“, ein Marker für die Größe der Proteine, auf das Polyacrylamid-Gel gegeben. Der Marker besteht aus Proteinen bekannter Größe, die eine Zuordnung der in den Proben befindlichen Proteine erlauben. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die negativ geladenen Proteine nun ihrer Größe entsprechend durch das Polyacrylamid-Gel. Die Gelelektrophorese wurde mit 30 mA für 60 min durchgeführt.

### 3.8.2 Western Blots

Die Western Blot-Methode ermöglicht den Transfer der Proteine in Polyacrylamid Gel auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran), an der die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen binden und auf der sie dann der immunchemischen Detektion durch Antikörper zugänglich gemacht werden können (24;168). Durch eine angelegte elektrische Spannung wandern die negativ geladenen Proteine von dem Polyacrylamid-Gel auf die PVDF-Membran. Der Transfer erfolgte im Mini Trans-Blot<sup>®</sup>-System der Firma Bio Rad, München. Hierzu wird das Tanksystem mit Transferpuffer (siehe 2.1) wie vorgeschrieben aufgefüllt und beladen. Passende Filterpapiere und mit 100% Methanol für 2 min aktivierte PVDF-Membran werden in die passende Schablone wie vom Hersteller vorgeschrieben eingespannt und in den mit Transferpuffer gefüllten Tank eingesetzt. Der Transfer erfolgte über Nacht mit 17 V bei 4°C.

### 3.8.3 Ponceau-S-Färbung

Die Ponceau-Färbung dient zur Kontrolle des Transfers der Proteine vom Polyacrylamid-Gel auf die PVDF-Membran. Letztere wird mit der zur Gruppe der Azo-Farbstoffe gehörenden Ponceau-S-Lösung für eine Minute in einem Gefäß bedeckt und geschwenkt. Die Ponceau-S-Lösung bindet an positiv geladenen Aminosäuren der Proteine und macht diese nach Abgießen der Ponceau-S-Lösung und mehrmaligem Waschen mit destilliertem Wasser sichtbar (153). Mit PBS kann die Membran komplett entfärbt werden und für die Immundetektion der Proteine wieder verwendet werden.

### 3.8.4 Immunchemische Detektion von Proteinen nach dem Western Blotting

Für die Immundetektion werden spezifische Erstantikörper für die Proteine verwendet. Diese werden wiederum von Zweitantikörpern, die gegen leichte und schwere Ketten der IgG-Antikörper von Menschen, Ratten, Mäusen oder Kaninchen gerichtet sind, gebunden und als Bande sichtbar gemacht. An die Zweitantikörper konjugiert findet sich das Enzym „*Horseradish peroxidase*“ (Meerrettichperoxidase), das als Substrat die Umwandlung von Luminol in 3-

Aminophthalat katalysiert und dabei Emission von Licht bewirkt. Zunächst musste ein Blocken der unspezifischen Bindungsstellen für Antikörper der Proteine auf der PVDF-Membran erfolgen. Dazu wurde die PVDF-Membran mit Blocklösung bedeckt und für 60 min auf einen Kippschüttler gestellt. Danach wurde die PVDF-Membran für 90 min mit den Erstantikörpern bei Raumtemperatur inkubiert. Die Erstantikörper DYRK1A-IgG-Antikörper und hOCT3-IgG-Antikörper (siehe 2.5) wurden im Verhältnis 1:100 für den DYRK1A-IgG-Antikörper und 1:500 für den hOCT3-IgG-Antikörper mit TBST verdünnt. Im Anschluss wurde die PVDF-Membran 3 Mal für 10 min in TBST gewaschen und dann mit dem Zweitantikörper für den jeweils passenden Zielorganismus in 1:5000-TBST-Verdünnung für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die PVDF-Membran wurde nochmals 3 Mal für 10 min in TBST gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von Entwicklungsreagenz nach Vorgabe des Herstellers für 10 min und die Detektion des Signals mit dem Lumi Imager F1 (Firma Roche Diagnostics, Basel, Schweiz).

### **3.9 Immunfluoreszenz-Färbungen**

Die Immunfluoreszenz-Färbung ist eine Unterform der Immunzytochemie, bei der Antigene in Zellen mit einem Antikörper und verschiedenen Markern sichtbar gemacht werden können. Bei der Immunfluoreszenz-Färbung werden die Antikörper mit Fluorochromen verbunden, die einstrahlendes Licht absorbieren und dann in Form von fluoreszierendem Licht emittieren und damit sichtbar machen (35). Zu den Fluorochromen gehört auch das „*green fluorescent protein*“ (GFP), welches nach seiner Entdeckung eines der meist genutzten Proteine in der Zellbiologie geworden ist (162;172). Unterschieden wird die direkte Immunfluoreszenz-Färbung, bei der ein gegen ein spezifisches Epitop gerichteter Antikörper mit einem fluoreszierenden Farbstoff eingesetzt wird, von der indirekten Immunfluoreszenz-Färbung, bei der ein Erstantikörper gegen ein Epitop gerichtet wird, der anschließend von einem Zweitantikörper, der mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt wurde, sichtbar gemacht wird.

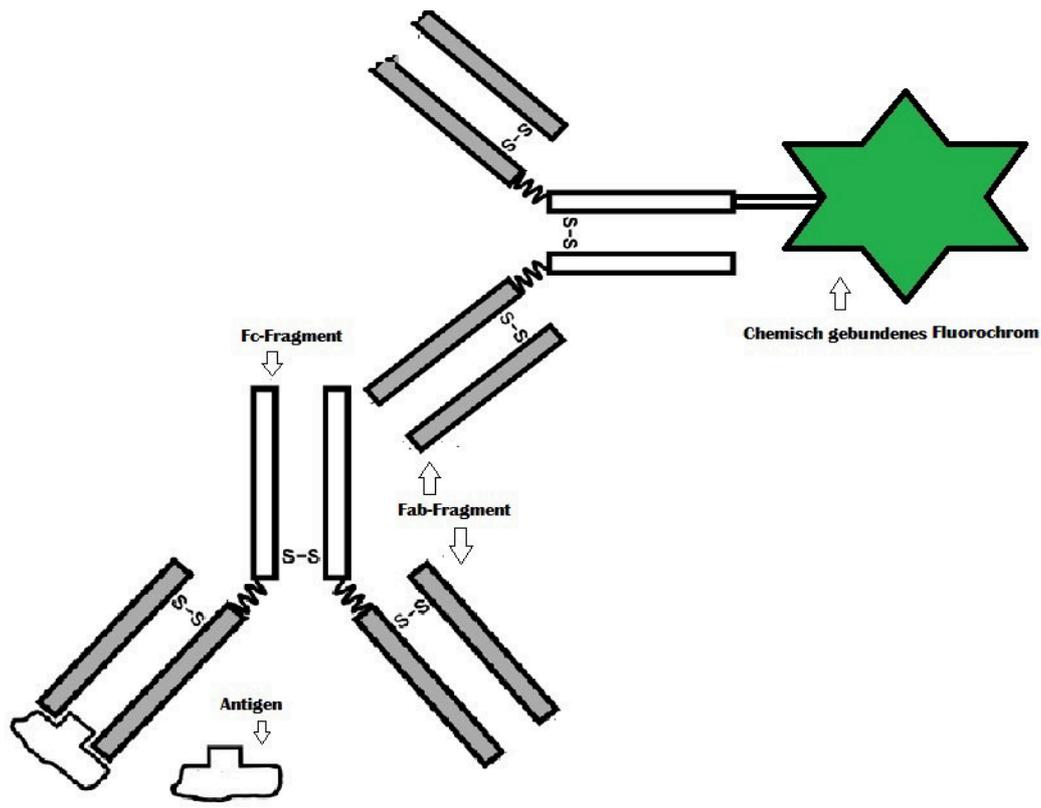


Abbildung 3: Prinzip der sekundären Immunfluoreszenz. Der Erstantikörper wird nach Bindung des Antigens seinerseits an seinem Organismusspezifischen Fc-Fragment durch den Zweitantikörper gebunden und über das Fluorochrom sichtbar (modifiziert nach (25))

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden HEK293-Zellen oder TCam-2-Zellen auf 24-Well-Platten ausgesät und, im Falle der HEK293-Zellen, nach 24 h mit DYRK1A-Plasmid-DNA und hOCT3-GFP-Tag-Plasmid-DNA transfiziert (siehe 3.3.1). Nach lichtmikroskopisch festgestelltem ausreichendem Zellwachstum wurden die Zellen nach Abgießen des Zellmediums 3 Mal jeweils 3 min in PBS gewaschen und im Anschluss in 4% PFA-Lösung fixiert und für 10 min bei Raumtemperatur belassen. Danach wurden die Zellen wiederum 3 Mal jeweils 3 min in PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen für 3 min mit 0,1% Triton X-100 für 3 min inkubiert und anschließend 3 Mal jeweils 3 min in PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen in 10%-BSA-Lösung für 60 min bei Raumtemperatur auf den Wippschüttler (WT17, Firma Biometra, Göttingen, Deutschland) gestellt. Anschließend wurden die Zellen mit den jeweiligen primä-

ren Antikörpern für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann 3 Mal jeweils 3 min in PBS gewaschen. Die Zweitantikörper wurden je nach Ursprungsorganismus des Erstantikörpers gewählt und 60 min bei Raumtemperatur zu den Zellen gegeben. Anschließend erfolgte die dreimalige Waschung für jeweils 5 min der Zellen in PBS und die Fixierung mit Cristal-Mount (Firma Sigma Aldrich, St. Louis, USA) auf Objektträgern.

Tabelle 21: Für Immunfluoreszenz-Färbungen verwendete Antikörper

Antikörper/ Färbestoff	Ursprungs- organismus	Anwendung bei	Konzentration	Hersteller
DYRK1A- IgG- Antikörper (polyklonal)	Kaninchen	HEK293-Zellen TCam-2-Zellen	1:25 in 1% BSA	Firma Cell Signaling, Cambridge, UK
hOCT2-IgG - Antikörper (monoklonal)	Maus	TCam-2-Zellen	1:100 in 1% BSA	Firma AbD serotec, Ox- ford, UK
Alexa Fluor® 647 Mouse anti-GM130	Maus	TCam-2-Zellen	1:100 in 1%BSA	Firma BD Pharmingen, New Jersey, USA
4',6- Diamidin-2- phenylindol (DAPI)		HEK293-Zellen TCam-2-Zellen	1:5000 in 1%BSA	Firma Cell- Signaling, Cambridge, UK

### 3.10 ASP<sup>+</sup>-Mikrofluorimetrie-Messungen

Zur Messung des Transports von hOCT3 wurde 4-(4-dimethylaminostyryl)-N-methylpyridinium (ASP<sup>+</sup>) eingesetzt, das ein fluoreszierendes Derivat von N-

Methyl-4-phenylpyridine (MPP<sup>+</sup>) ist (114). MPP<sup>+</sup> ist ein neurotoxisches Produkt der chemischen Synthese des Opiats Pethidin, welches unter anderem durch das „*dopamin neuronal uptake system*“ in Nervenzellen aufgenommen wird (85). ASP<sup>+</sup> kann als Substrat von Monoamin-Transportern experimentell eingesetzt werden und wurde auch als Substrat der organischen Kationentransporter (OCT) *in vivo* und *in vitro* mittels fluorometrischer Techniken verwendet (79;121;141). ASP<sup>+</sup> wird durch Licht mit 450 nm Wellenlänge maximal angeregt und hat ein Emissionsmaximum von 550 nm. Sobald ASP<sup>+</sup> in einen membran- gebundenen Zustand übergeht, ändert sich das Emissionsmaximum auf 590 nm, wodurch es möglich ist, den Transport des Substrates in das Zellinnere vom freien ASP<sup>+</sup> zu unterscheiden (33). Alle Experimente wurden mit dem Fluoreszenz-Reader Infinite M200 (Firma Tecan, Männedorf, Schweiz) durchgeführt, wobei mit dieser mikrofluorometrischen Methode der Transport von ASP<sup>+</sup> in hOCT3-HEK293-Zellen dynamisch in Echtzeit bestimmt wurde. Die hOCT3-Zellen wurden auf 96-Well-Platten kultiviert und 24 h nach dem Aussäen gegebenenfalls mit DYRK1A-Plasmid transfiziert (siehe 3.3.2) und mit Harmin behandelt (siehe 3.11). 24 h oder 48 h nach Transfektion und Harmin-Inkubation wurden die Messungen durchgeführt. Das Zellmedium wurde verworfen und die Zellen wurden vorsichtig 2 Mal mit 100 µl Ringer-Lösung (siehe 2.1) gewaschen und danach in 100 µl Ringerlösung belassen. Das ASP<sup>+</sup> wurde in gewünschter Konzentration in Ringer-Lösung zur späteren Befüllung der Fluoreszenz-Reader-Injektoren pipettiert. Die Injektoren des Fluoreszenz-Readers wurden auf 25 µl -Injektion pro Well mit entsprechend konzentrierter ASP<sup>+</sup>-Lösung eingestellt, um in den Wells eine ASP<sup>+</sup>-Konzentration von 1 µM zu erreichen. Es wurden 25 Messzyklen pro Well durchgeführt. Anhand der anfänglichen Steigung des Fluoreszenzsignales wurde die ASP<sup>+</sup>-Aufnahme in arbiträren Einheiten bestimmt.

### **3.11 Behandlung von HEK293-Zellen mit Harmin**

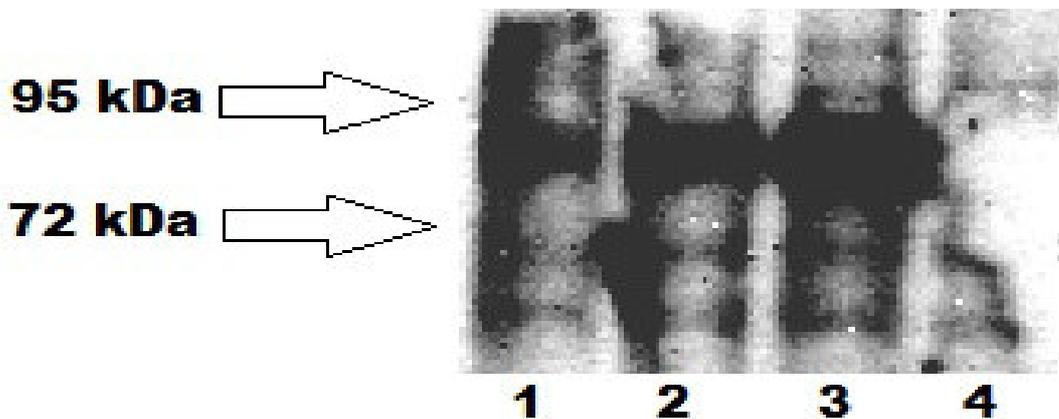
Harmin gehört zur Stoffgruppe der Harman-Alkaloide, die den β-Alkaloiden zugeordnet werden. Die β -Alkaloide sind heterozyklische Amine, die aus zyklischen Carbonatgruppen mit einer Aminogruppe bestehen (112). Einzelne Sub-

stanzen der  $\beta$ -Alkaloid-Gruppe sind durch ihre Wirkung sowohl als Agonisten als auch als inverse Agonisten an der Benzodiazepin-Bindungsstelle des GABA-A-Rezeptorkomplexes bekannt (173). Ferner können Substanzen der Harman-Alkaloidgruppe Parkinson-ähnliche Symptomatik mit essentiellen Tremor hervorrufen (112). Die  $\beta$ -Alkaloide werden durch den Körper endogen produziert und in größeren Mengen auch durch in der Nahrung befindliche tierische Proteine aufgenommen (15). Harmin ist als eine Substanz dieser Gruppe bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts als mögliches Medikament gegen Malaria und Morbus Parkinson, bei dem es zu einer Verbesserung des mentalen Status führen sollte, eingesetzt worden (37). Harmin findet sich unter anderem in der Liane *Banisteriopsis caapi* und der Steppenraute, *Peganum harmala* (37). Harmin ist als reversibler Inhibitor der Monoaminoxigenase A bekannt und wird für hallozinatorische Wirkung bei dem Konsum von Ayahuasca, einem von Heilern der indigenen Einwohner der Amazonas-Region verwendeten Saft, verantwortlich gemacht (64). Harmin wurde bei dieser Arbeit als potenter Inhibitor von DYRK1A eingesetzt, wobei Harmin bei DYRK1A eine  $IC_{50}$  von 33 nM in HEK293-Zellen aufwies; verglichen dazu wies Harmin bei DYRK1B als das dem DYRK1A strukturähnlichste Enzym eine  $IC_{50}$  von 166 nM auf (60). Bei anderen Isoformen wie DYRK2 und 3 wurde eine  $IC_{50}$  von 1,9  $\mu$ M, beziehungsweise 78,8  $\mu$ M festgestellt (15). Harmin inhibiert nicht nur die Substratphosphorylierung von DYRK1A, sondern auch die Autophosphorylierung an einem Tyr-Xaa-Tyr-Motiv von DYRK1A, was die Bildung von aktivem DYRK1A verhindert (159). Für die Inkubation der hOCT3-HEK293-Zellen in 96-Well-Platten wurde Harmin nach (60) bei Raumtemperatur unter konstanter Durchmischung in 100% Ethanol zur Erzeugung einer 10 mM Lösung gelöst. Mit 50% Ethanol (v/v) wurde dann eine 0,5 mM Stammlösung hergestellt. Diese wurde dann in HEK293-Medium weiter zur gewünschten Konzentration von 1  $\mu$ M verdünnt und zeitgleich mit der DYRK1A-Plasmid-Transfektion auf die 96-Well-Platten mit hOCT3-HEK293-Platten gegeben.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Transfektion von hOCT3-HEK293-Zellen mit DYRK1A

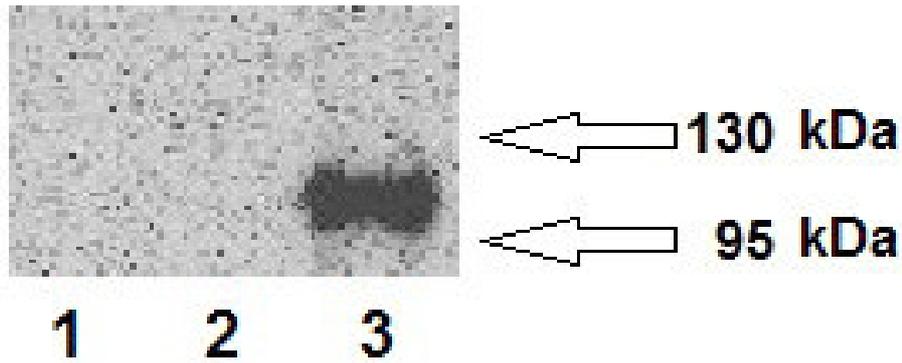
HEK293-Zellen, die stabil mit hOCT3 transfiziert wurden, sollten für weitere Untersuchungen transient mit DYRK1A transfiziert werden. Dafür wurden die hOCT3-HEK293-Zellen mit in den pCDNA6.F9-Vektor klonierter DYRK1A transfiziert. Um das Ausmaß der DYRK1A-Proteinexpression in den hOCT3-HEK293-Zellen abzuschätzen, wurden die Zellen 12, 24 und 48 h nach Transfektion lysiert. Dann wurde die Proteinexpression und somit der Transfektionserfolg mittels SDS-PAGE und Western Blot bestimmt.



**Abbildung 4: Western Blot-Analyse von hOCT3-HEK293-Zellen, die transient mit dem DYRK1A-pCDNA6.F9-Konstrukt transfiziert wurden:** 4 Zellansätze wurden im Western Blot mit DYRK1A-Antikörpern analysiert. In Spur 1 ist das Zelllysate von mit DYRK1A transfizierten hOCT3-HEK293-Zellen 12 h nach Transfektion, in Spur 2 24 h nach Transfektion und in Spur 3 48 h nach Transfektion aufgetragen. In Spur 4 ist das Lysat von mit pcDNA3.1-Kontrollvektor transfizierten hOCT3-HEK293-Zellen aufgetragen. Links die Molekularmasse von Proteinen in Kilodalton (kDa). Ersichtlich ist DYRK1A mit einer erwarteten Bande bei knapp unter 90 kDa. Das Signal der DYRK1A-Bande wird mit zunehmender Zeit stärker. In der Kontrolle kommt es hingegen nur zu unspezifischen Banden.

## 4.2 Bestätigung der Interaktion von hOCT3 und DYRK1A

Nachdem durch ein „*mating based Split Ubiquitin System*“ (mbSUS) eine Interaktion von hOCT3 und DYRK1A festgestellt wurde (3), war ein Ziel dieser Arbeit, die Interaktion mit einer anderen Methode als dem mbSUS zu bestätigen. Hierzu wurde ein Koimmunpräzipitation-Verfahren gewählt, bei dem ein „*Bait-Protein*“ mit „*Flag-Tag*“ mit einem „*Prey-Protein*“ interagiert und so nachgewiesen werden kann. Zuerst erfolgte die Transfektion von DYRK1A in die hOCT3-HEK293-Zellen unter Kontrolle des Transfektionserfolges (siehe 4.1). Nachdem dies sichergestellt war, wurden hOCT3-HEK293-Zellen ausgesät, kultiviert und anschließend mit dem DYRK1A-PCDNA6.F9-Vektorkonstrukt transfiziert. Als Kontrolle wurden HEK293-Zellen mit dem pcDNA3.1-Vektor transfiziert und als weitere Kontrolle wurden „*Anti-Flag<sup>TM</sup> M2 Magnetic Beads*“ ohne weitere Zellysate verwendet. Entsprechend dem Koimmunpräzipitation-Protokoll (siehe 3.7.2) wurden die HEK293-Zellen 24 h nach Aussaat lysiert. Danach wurde nach Bindung von Flag-Tag-DYRK1A an die „*Anti-Flag<sup>TM</sup> M2 Magnetic Beads*“ gemäß Protokoll untersucht, ob das „*Bait-Protein*“ DYRK1A mit dem „*Prey-Protein*“ hOCT3 interagiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot nachgewiesen werden kann.



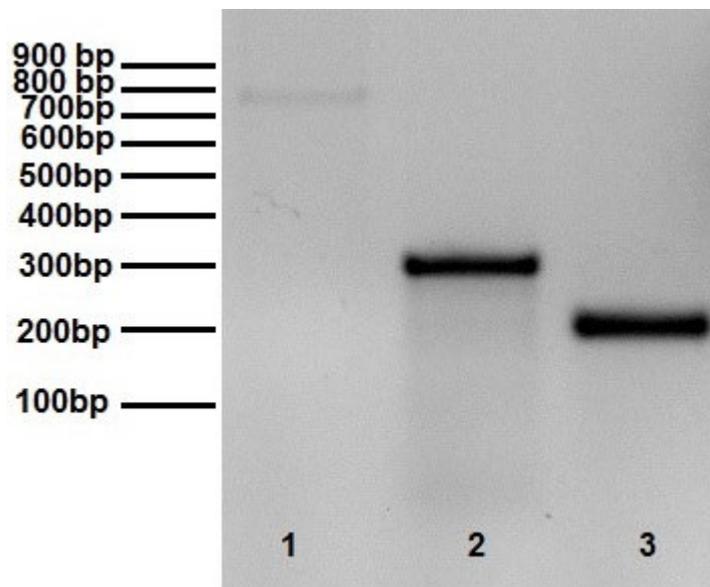
**Abbildung 5: Koimmunpräzipitation von Flag-Tag-DYRK1A und hOCT3 im Western Blot:** 3 Zellansätze wurden im Western Blot mit hOCT3-Antikörpern analysiert. In Spur 3 wurde das Lysat von PCDNA6.F9-DYRK1A-transfizierten hOCT3-HEK293-Zellen nach Koimmunpräzipitation aufgetragen. In Spur 2 wurde das Lysat von pcDNA3.1-transfizierten hOCT3-HEK293-Zellen als Kontrolle aufgetragen. Eine weitere Kontrolle erfolgte mit „*Anti-Flag<sup>TM</sup> M2 Magnetic Beads*“ ohne Zelllysate in Spur 1. Rechts ist die Molekularmasse von Proteinen in Kilodalton (kDa) dargestellt. In Spur 3 ist eine deutliche Bande oberhalb der 95 kDa-Bande zu sehen, die in den Negativkontrollen in Spur 1 und 2 nicht zu sehen ist.

#### **4.3 Gemeinsame Expression von DYRK1A und rOCT3 in Rattenhirn**

Durch die Bestätigung der Interaktion von hOCT3 und DYRK1A in der HEK293-Zellkultur, stellte sich die Frage nach der Interaktion in Zellen, in denen eine Expression von beiden Proteinen wahrscheinlich ist, um eine physiologische Interaktion der beiden Proteine nachzuweisen. Dafür wurde Gewebe des Cerebellum und der Hypophyse von Ratten gewählt, in denen die Expression untersucht werden sollte. Eine Gewebeprobe von 20mg wurde aus Cerebellum und Hypophyse der Ratte entnommen und in jeweils 500  $\mu$ l Lysispuffer homogenisiert. Anschließend wurde mittels RT-PCR die Expression der gesuchten Proteine auf mRNA-Ebene nachgewiesen (siehe 3.5.2).

#### 4.3.1 Gemeinsame Expression von DYRK1A und rOCT3 in der Hypophyse

Als Primer für den Nachweis von DYRK1A und rOCT3 in der Hypophyse der Ratte wurden die Primer DYRK1A HEK-F und DYRK1A HEK-R verwendet, die ein 299 bp-großes DNA-Fragment synthetisieren. Zum Nachweis von rOCT3-mRNA wurden die Primer rOCT3 Real F und rOCT3 Real R benutzt, die ein 726 bp-großes DNA-Fragment synthetisieren. Als Kontrolle diente der Nachweis von ubiquitär exprimierter Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-mRNA, die mittels der rGAPDH-F- und R-Primer bestimmt wurde.

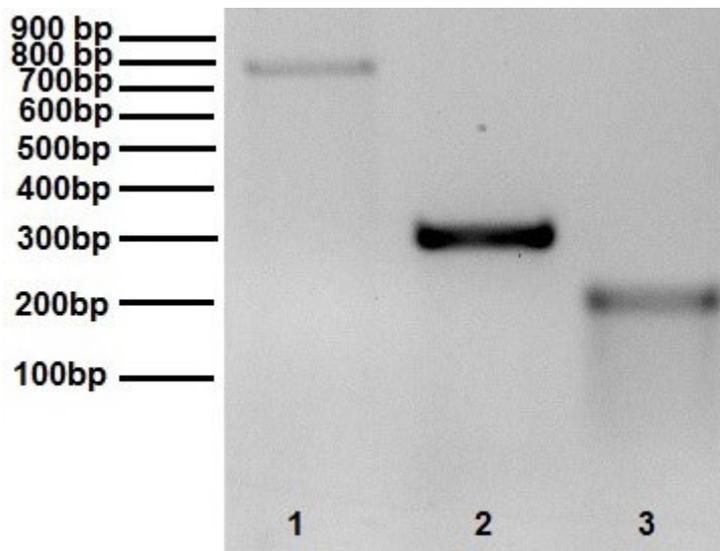


**Abbildung 6: Nachweis von DYRK1A und rOCT3 in der Hypophyse der Ratte mit Agarosegel-Elektrophorese:** In Spur 1 ist das 726 Basenpaar (bp)-große rOCT3-DNA-Fragment zwischen der 700 bp und 800 bp-Marke nachweisbar, in Spur 2 ist das 299 bp-große DYRK1A-Fragment deutlich nachweisbar. In Spur 3 wurde zu Kontrollzwecken das 197 bp-große rGAPDH-DNA-Fragment nachgewiesen.

#### 4.3.2 Gemeinsame Expression von DYRK1A und rOCT3 im Cerebellum

Neben der Hypophyse wurde eine weitere Koexpression der beiden Proteine auch im Cerebellum der Ratte vermutet, da eine starke Expression von

DYRK1A im Kleinhirn beschrieben worden ist (133). Die RT-PCR erfolgte mit den Primern DYRK1A HEK-F und DYRK1A HEK-R für DYRK1A, sowie rOCT3 Real F und rOCT3 Real R für rOCT3. Die Kontrolle erfolgte mit dem Nachweis der GAPDH mit den rGAPDH-F- und R-Primern (siehe auch 4.3.1).

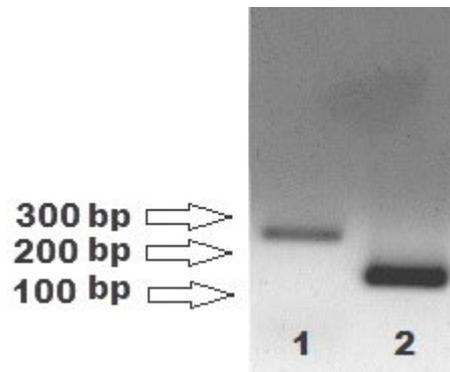


**Abbildung 7: Nachweis von DYRK1A und rOCT3 im Cerebellum der Ratte mit Agarosegel-Elektrophorese:** In Spur 1 ist das 726 bp-große rOCT3-DNA-Fragment knapp unter der 800 bp-Marke nachweisbar, in Spur 2 ist das 299 bp-große DYRK1A-Fragment deutlich nachweisbar. In Spur 3 wurde zu Kontrollzwecken das 197 bp-große rGAPDH-DNA-Fragment nachgewiesen.

#### **4.4 Nachweis von DYRK1A und hOCT3 mit RT-PCR in TCam2-Zellen**

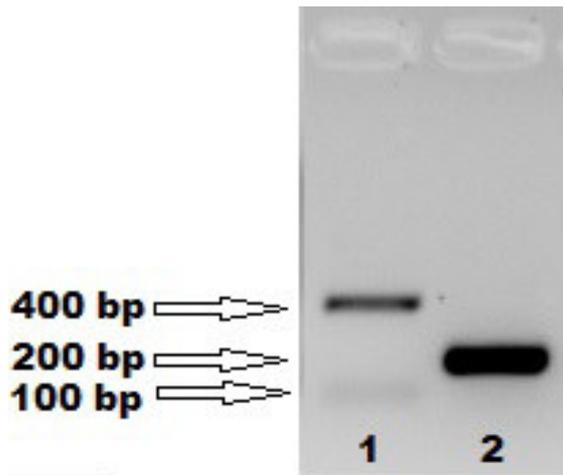
Ein Ziel dieser Arbeit war es, DYRK1A und hOCT3 in unterschiedlichen Zellen gemeinsam nachzuweisen. Unter anderem sollte der Nachweis der Expression der beiden Proteine in TCam2-Zellen erfolgen, die aus Hodenkrebszellen stammen (siehe 3.2.1). Mittels der RT-PCR und der passenden Primer sollte die endogene Expression der Proteine auf mRNA-Ebene gezeigt werden. Dies wurde mittels RT-PCR nachgewiesen (siehe 3.6.2), indem zuerst die mRNA der TCam2-Zellen isoliert und dann in cDNA umgeschrieben wurde. Die Vervielfältigung der gesuchten hOCT3- und DYRK1A-DNA erfolgte dann mittels PCR. Mit den Primern DYRK1A-HEK-F und DYRK1A-HEK-R (siehe 2.7) wurde aus dem

cDNA-Template der TCam2-Zellen ein 299 bp-großes Fragment hergestellt, welches dann durch Agarosegel-Elektrophorese nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 8: Nachweis von DYRK1A in TCam2-Zellen:** Links die Markerangaben in bp dargestellt. In Spur 1 ist das 299 bp-große DYRK1A-Fragment wie erwartet knapp unter der 300 bp-Markerbande zu finden. Daneben in Spur 2 zwischen der 100 bp- und 200 bp-Markerbande die GAPDH-Bande mit einer erwarteten Größe von 179 bp.

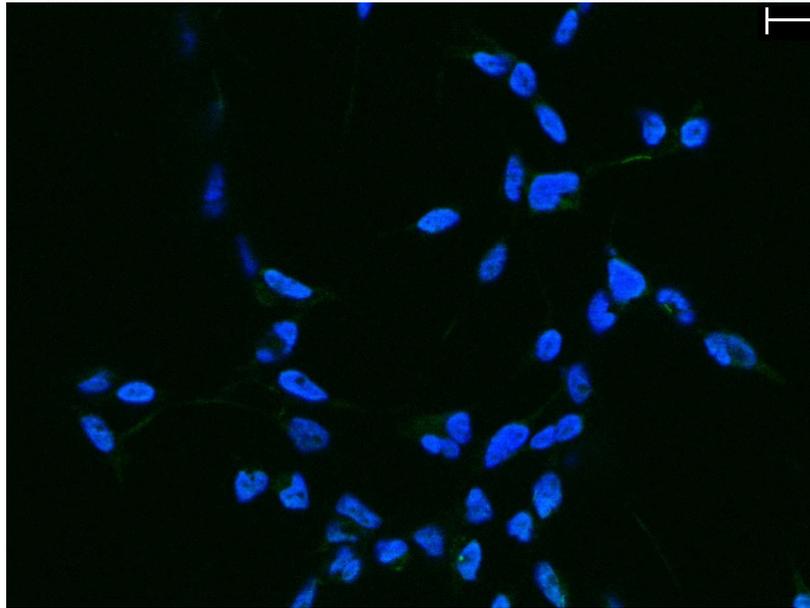
Für den Nachweis von hOCT3 wurden die Primer hOCT3-Real3-F und hOCT3-Real3-R eingesetzt, um ein 431 bp-großes Fragment aus den TCam2-Zellen zu gewinnen. Als Kontrolle wurden jeweils die hGAPDH-Real Primer verwendet, um ein 179 bp-großes Fragment der GAPDH nachzuweisen. Weder hOCT1 noch hOCT2 konnten in TCam2-Zellen auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden.



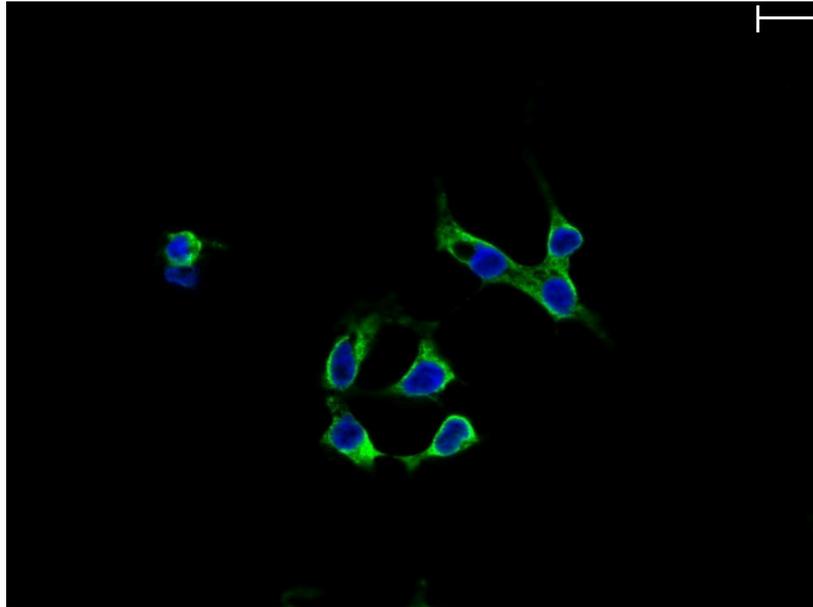
**Abbildung 9: Nachweis von hOCT3 in TCam2-Zellen:** Links die Markerangabe in bp dargestellt: In Spur 1 ist das 431 bp-große hOCT3-Fragment knapp über der 400 bp-Markerbande lokalisiert. Daneben in Spur 2 zwischen der 100 bp- und der 200 bp-Markerbande die GAPDH-Bande mit der erwarteten Größe von 179 bp.

#### **4.5 Nachweis von hOCT3 in hOCT3-HEK293-Zellen mit hOCT2-Antikörper**

Um DYRK1A und hOCT3 gemeinsam in Zellen per Immunfluoreszenz-Mikroskopie nachzuweisen, waren spezifische Antikörper notwendig, die aus verschiedenen Spezies sein mussten, damit sie mit passenden Zweitantikörpern voneinander zu unterscheiden waren (siehe 3.9). Da sowohl die in dieser Arbeit genutzten Antikörper für DYRK1A, als auch die Antikörper für hOCT3, aus dem Kaninchen stammen, war es nicht möglich, diese in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie gemeinsam einzusetzen (siehe 2.11). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Spezifität des hOCT2-Antikörpers sowohl in Wildtyp-HEK293-Zellen, als auch bei hOCT3-stabil exprimierenden Zellen per Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Es wurden sowohl Wildtyp-HEK293-Zellen, als auch hOCT3-HEK293-Zellen für diese Untersuchung verwendet. Die Zellen wurden auf 24-Well-Platten ausgesät und nach lichtmikroskopisch kontrolliertem ausreichendem Wachstum nach 48 h fixiert, mit hOCT2-Antikörper, DAPI und 488 Goat Anti-mouse-Zweitantikörper inkubiert und anschließend auf Objektträger verbracht und bei 4°C gelagert (siehe 3.9).



**Abbildung 10: Testung des hOCT2-Antikörpers bei Wildtyp-HEK293-Zellen:** Bei Inkubation von Wildtyp-HEK293-Zellen mit hOCT2-Antikörper lassen sich bis auf die Zellkerne, die in blau mittels DAPI dargestellt wurden, keine Signale mit der konfokalen Mikroskopie detektieren. Der Maßstab oben rechts: 20  $\mu\text{m}$ .

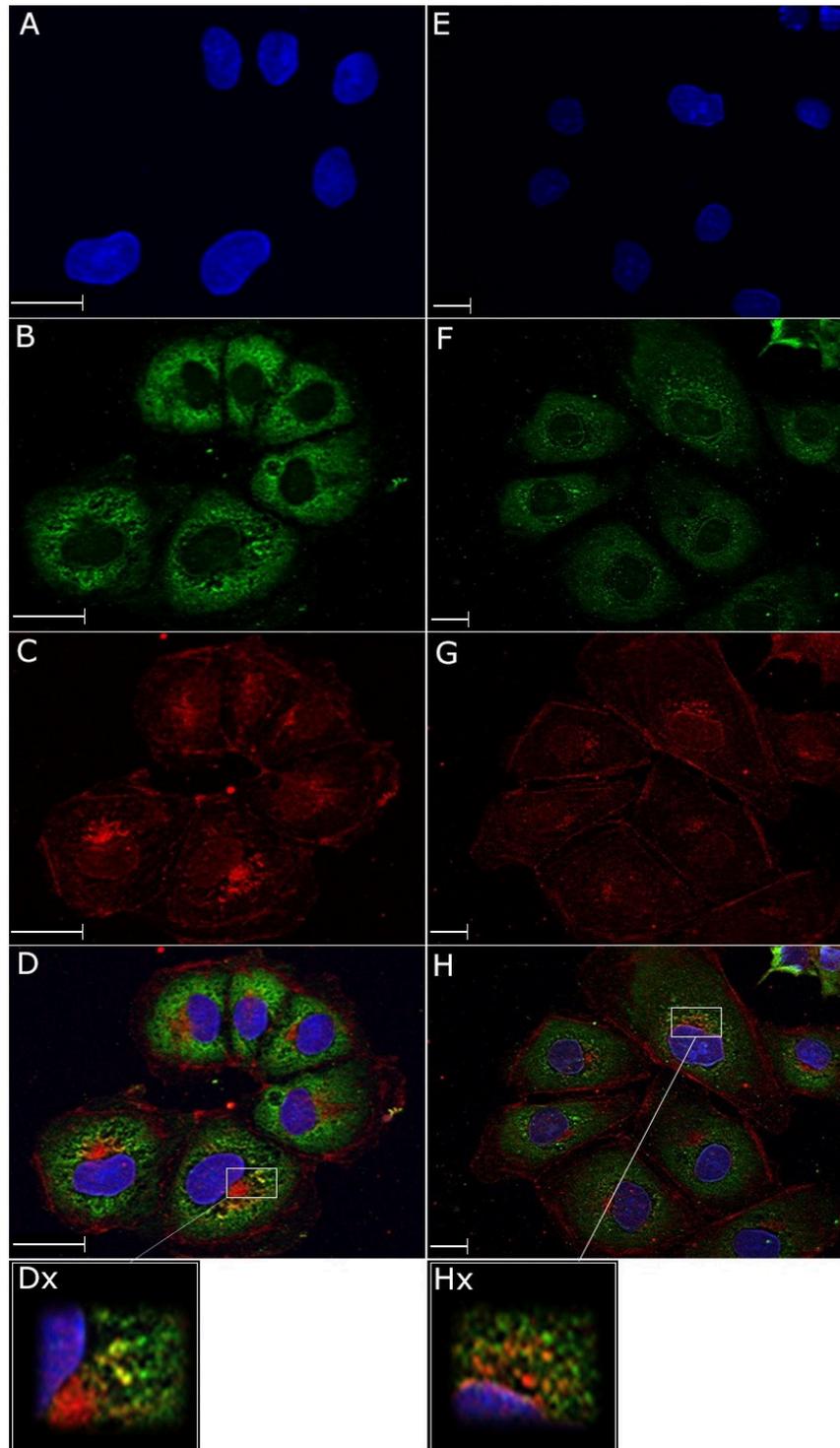


**Abbildung 11: Testung des hOCT2-Antikörpers bei hOCT3-HEK293-Zellen:** Bei Inkubation von stabil mit hOCT3 transfizierten HEK293-Zellen kann nach Inkubation mit hOCT2-Antikörper der in den Zellen exprimierte hOCT3 in der konfokalen Mikroskopie in grün sichtbar gemacht werden. Der Maßstab oben rechts: 20  $\mu\text{m}$ .

#### **4.6 Nachweis von endogenem hOCT3 und DYRK1A in TCam2-Zellen**

Nachdem die gemeinsame Expression von hOCT3 und DYRK1A in TCam2-Zellen mittels RT-PCR untersucht und festgestellt werden konnte (siehe 4.4), sollte dann die Visualisierung mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie erfolgen. Hiermit sollte zum einen eine eventuelle Kolo-kalisation der beiden Proteine nachgewiesen werden. Ein weiteres Ziel war es, die intrazelluläre Lokalisation und Verteilung von DYRK1A und hOCT3 in den TCam2-Zellen zu untersuchen. Die TCam2-Zellen wurden auf 24-Well-Platten mit Deckgläschen ausgesät und das Wachstum wurde nach 48h unter dem Lichtmikroskop überprüft. Dann wurden die Zellen fixiert und mit DYRK1A-Antikörper, hOCT2-Antikörper und DAPI inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit den Zweitantikörpern 488 Goat Anti-mouse IgG und 594 Goat Anti-rabbit IgG. Anschließend wurden die Zellen

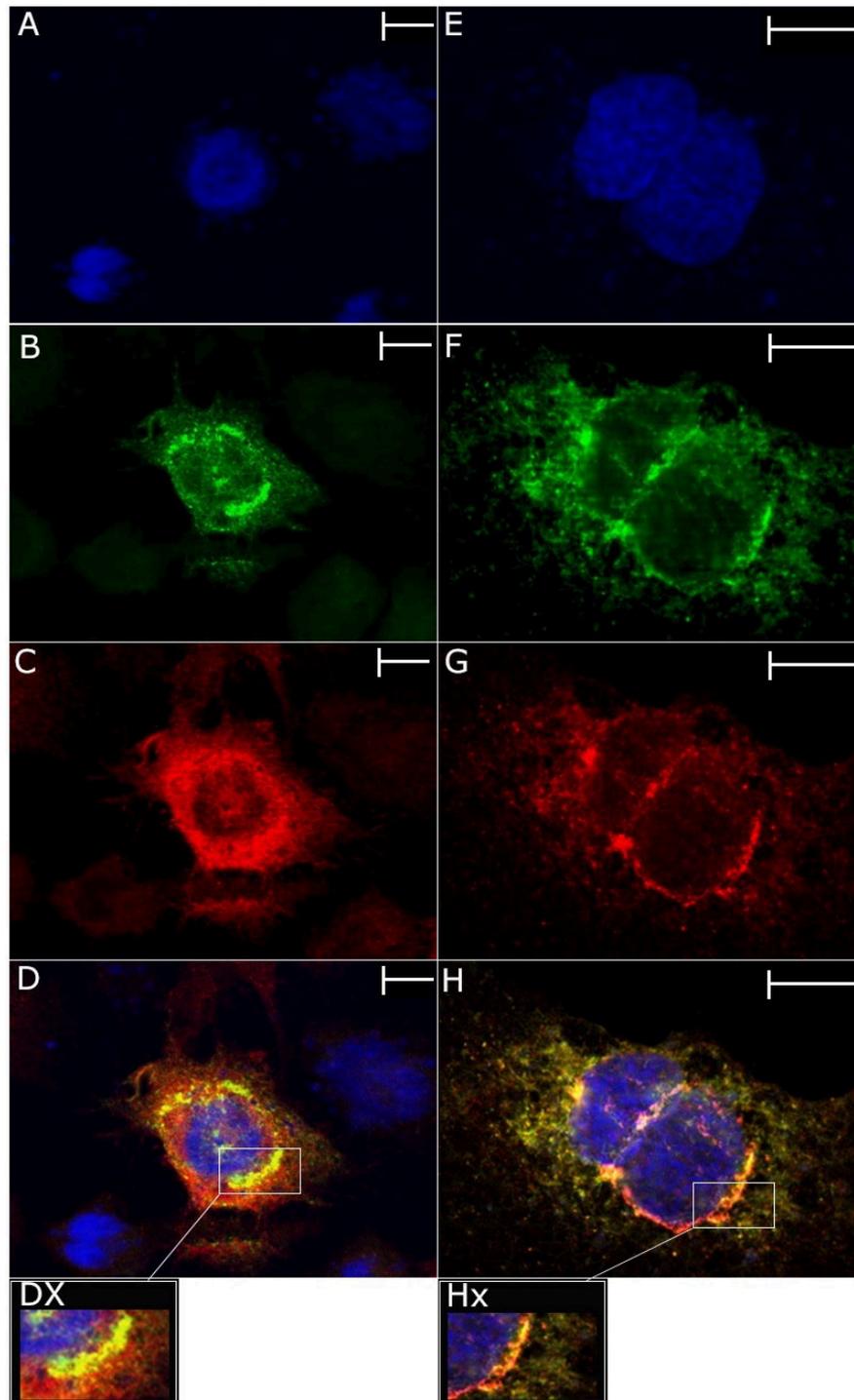
auf den Deckgläschen auf Objektträgern verbracht und bei 4°C gelagert (siehe 3.8).



**Abbildung 12: Kolokalisation von DYRK1A und hOCT3 in TCam2-Zellen:**  
 In A und E sind die Zellkerne blau. In B und F ist hOCT3 grün und in C und G ist DYRK1A rot. Bei den Fusionsbildern D und H zeigt sich eine Kolokalisation in gelb. Dx und Hx zeigen die Kolokalisation exemplarisch vergrößert. Maßstäbe unten links 5  $\mu\text{m}$ .

#### **4.7 Nachweis von hOCT3-GFP und DYRK1A in Wildtyp-HEK293-Zellen**

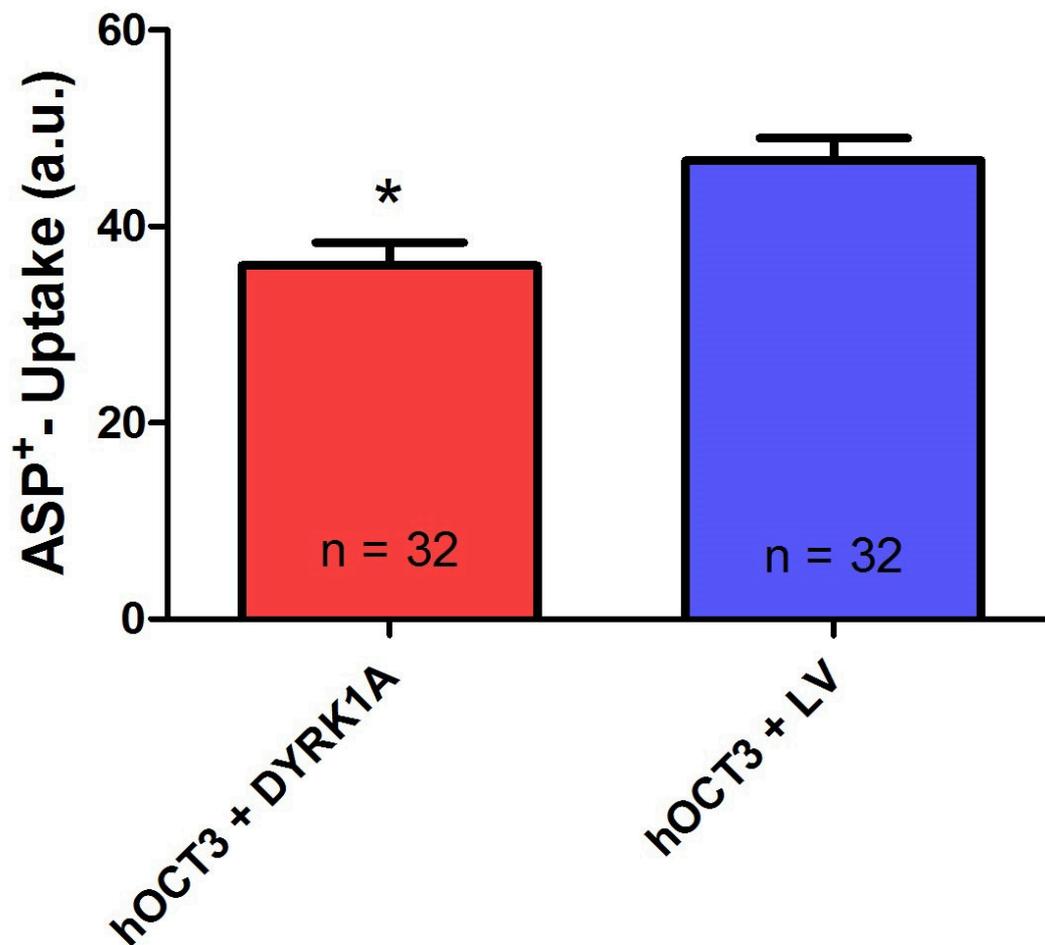
Die Interaktion von DYRK1A und hOCT3 konnte mittels Koimmunpräzipitationsexperimenten in hOCT3-HEK293-Zellen bestätigt werden. Danach sollte mit Fluoreszenz-Mikroskopie die Lokalisation der Proteine in mit DYRK1A- und hOCT3-transfizierten HEK293-Zellen untersucht werden. Die HEK293-Zellen wurden auf 24-Well-Platten mit Deckgläschen ausgesät und kultiviert. Nach 24h erfolgten eine lichtmikroskopische Kontrolle des Zellwachstums und die transiente Transfektion mit dem DYRK1A-PCDNA6.F9-Konstrukt, sowie mit dem GFP-hOCT3-Konstrukt. Nach 48 h wurden die Zellen fixiert und mit DYRK1A-Antikörper und DAPI inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper 594 Goat Anti-rabbit IgG. Anschließend wurden die Zellen auf den Deckgläschen auf Objektträgern verbracht und bei 4°C gelagert.



**Abbildung 13: Kolokalisation von DYRK1A- und hOCT3 in transient transfizierten HEK293-Zellen:** In A und E die Darstellung der Zellkerne in blau, in B und F hOCT3 in grün, in C und G DYRK1A in rot und in D und H die Fusionsbilder, in denen sich eine Kolokalisation in gelb zeigt. In DX und Hx vergrößerte Ausschnitte der Kolokalisation. Maßstäbe in A-D: 15  $\mu\text{m}$ ; in E-H: 10  $\mu\text{m}$ .

#### **4.8 Hemmung der ASP<sup>+</sup>-Aufnahme von hOCT3-HEK293-Zellen durch DYRK1A-Transfektion**

Durch die Bestätigung der Interaktion von DYRK1A und hOCT3 mittels Koimmunpräzipitation und der Darstellung der Kolo-kalisation der Proteine in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie, sollte dann der Einfluss von DYRK1A auf die Funktion von hOCT3 untersucht werden. Hierzu wurde mit der mikrofluorimetrischen Messung der ASP<sup>+</sup>-Aufnahme in hOCT3-HEK293-Zellen die Transportfunktion von hOCT3 untersucht. Um den Einfluss von DYRK1A auf die Transportfunktion zu verifizieren, wurden die hOCT3-HEK293-Zellen transient mit DYRK1A transfiziert und dann die ASP<sup>+</sup>-Aufnahme mit der von hOCT3-HEK293-Zellen, die mit dem Kontrollvektor pcDNA3.1 transfiziert wurden, verglichen. Für den Versuch wurden hOCT3-HEK293-Zellen kultiviert und in 96-Well-Platten ausgesät. 24 h nach Aussaat wurden die Zellen lichtmikroskopisch untersucht und dann mit dem DYRK1A-PCDNA6.F9-Konstrukt oder mit dem pcDNA3.1-Vektor transfiziert. Nach 48 h erfolgte dann die mikrofluorimetrische Messung mit dem Mikrofluoreszenz-Reader (siehe 3.10).

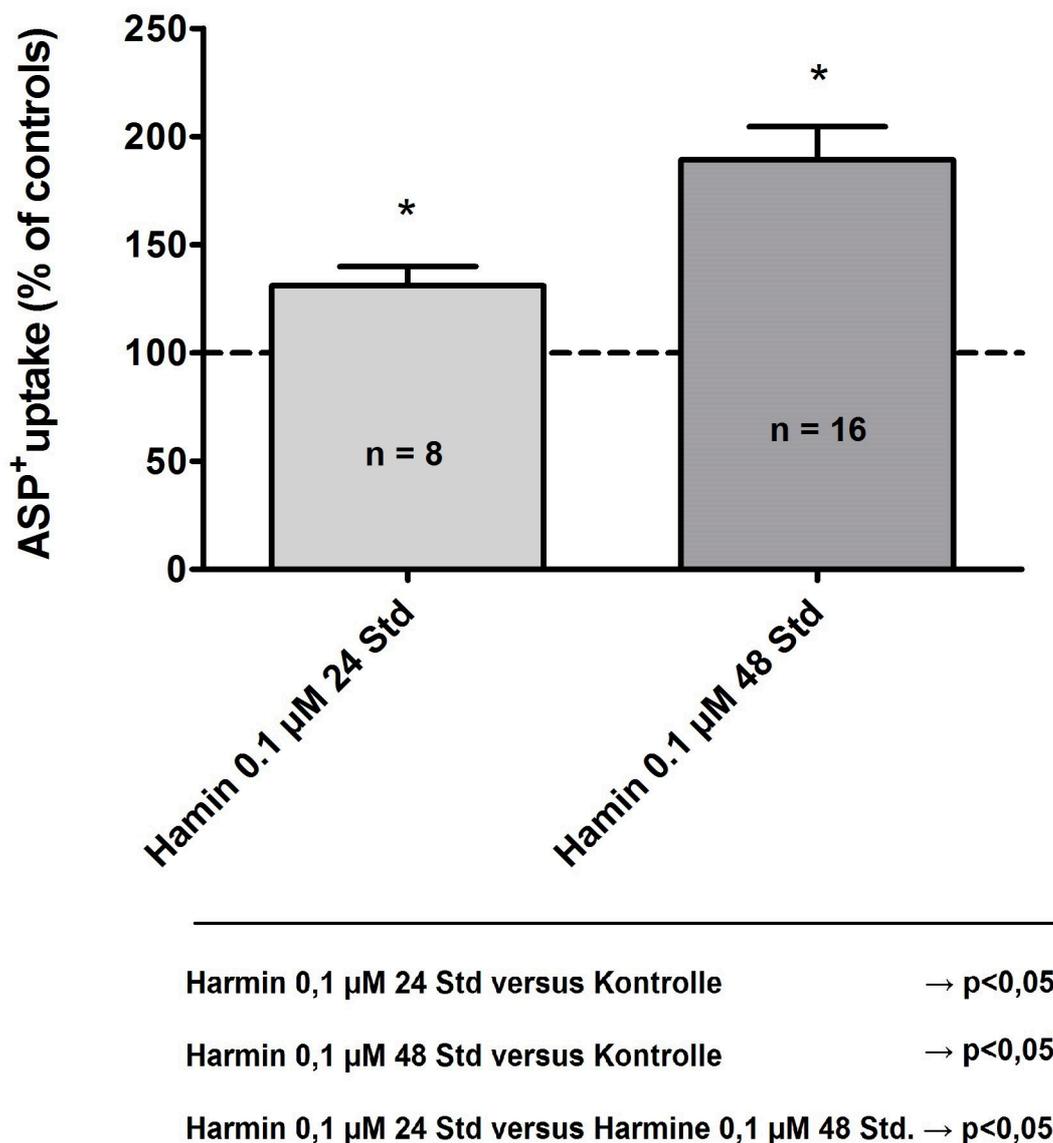


hOCT3 + DYRK1A versus hOCT3 + LV →  $p < 0,001$

**Abbildung 14: Effekt von DYRK1A-Überexpression auf die ASP<sup>+</sup>-Aufnahme von hOCT3-HEK293-Zellen:** Abgebildet ist die ASP<sup>+</sup>-Aufnahme von DYRK1A-transfizierten hOCT3-HEK293-Zellen links und von mit dem pcDNA3.1-Leervektor transfizierten hOCT3-HEK293-Zellen als Kontrolle rechts. Die ASP<sup>+</sup>-Aufnahme ist in willkürlichen Einheiten („*arbitrary units*“ (a.u.)) dargestellt. Unten dargestellt ist, dass die ASP<sup>+</sup>-Aufnahme bei DYRK1A-transfizierten hOCT3-HEK293-Zellen signifikant niedriger gegenüber der Kontrolle ist. Die ASP<sup>+</sup>-Aufnahme in DYRK1A-transfizierten Zellen beträgt  $36,02 \pm 2,4$ , die ASP<sup>+</sup>-Aufnahme der Kontrollen hingegen beträgt  $46,7 \pm 2,3$ .

#### **4.9 Aufhebung des ASP<sup>+</sup>-Aufnahme-hemmenden Effekts von DYRK1A durch Harmin**

Die signifikante Hemmung der ASP<sup>+</sup>-Aufnahme durch die Transfektion von DYRK1A-DNA in HEK293-Zellen warf die Frage nach einer Möglichkeit zur Umkehr dieses Effektes durch spezifische Inhibitoren auf. Dazu wurde der DYRK1A-spezifische Inhibitor Harmin gewählt. Neben der Frage nach der Umkehr des inhibitorischen Effektes von DYRK1A auf die ASP<sup>+</sup>-Aufnahme, war eine weitere Frage, ob Harmin nach längerer Inkubation mit den hOCT3-HEK293-Zellen eventuell einen größeren Effekt zeigt. Um den Effekt von Harmin auf DYRK1A transfizierte Zellen zu überprüfen, wurden hOCT3-HEK293-Zellen kultiviert und in 96-Well-Platten ausgesät. Nach 24h wurden die Zellen lichtmikroskopisch untersucht und dann mit dem DYRK1A-PCDNA6.F9-Konstrukt transient transfiziert. Gleichzeitig wurden die Zellen entweder einer 0,1 µM-Harmin-Konzentration in Ethanol ausgesetzt, oder es erfolgte analog zur Harmin-Gabe die Zugabe von nur Ethanol in den Wells der 96-Well-Platten. Nach 24 h und 48 h erfolgte die Messung der ASP<sup>+</sup>-Aufnahme von mit Harmin oder mit Ethanol inkubierten hOCT3-HEK293-Zellen.



**Abbildung 15: Effekt von Harmin auf die ASP<sup>+</sup>-Aufnahme von DYRK1A-transfizierten hOCT3-HEK293-Zellen:** Dargestellt ist die ASP<sup>+</sup>-Aufnahme von DYRK1A-transfizierten hOCT3-HEK293-Zellen, die 24 h, oder 48 h mit Harmin inkubiert wurden. 100% der ASP<sup>+</sup>-Aufnahme ist der Wert der Ethanolkontrollen. Ersichtlich ist, dass die Zellen, die 24 h mit Harmin inkubiert wurden, eine Erhöhung der ASP<sup>+</sup>-Aufnahme von  $+45,5 \pm 13,3$ , n = 8 zeigen. Nach 48 h zeigt sich eine weitere Erhöhung der ASP<sup>+</sup>-Aufnahme von  $+89,3 \pm 15,3$ , n = 16. Die jeweiligen Erhöhungen sind, wie unten im Bild angegeben, signifikant unterschiedlich von den entsprechenden Kontrollen und auch voneinander.

## 5 Diskussion

### 5.1 Interaktion von DYRK1A und hOCT3

DYRK1A ist ein Interaktionspartner von hOCT3, was nach dem ersten Befund in einem mbSUS (3) in dieser Arbeit durch Koimmunpräzipitation-Experimente bestätigt werden konnte. DYRK1A ist eine Proteinkinase, die ubiquitär vorkommt, jedoch in einigen Geweben deutlich stärker exprimiert wird als in anderen (43). Zu den Gewebetypen, in denen DYRK1A nach der embryonalen Hirnentwicklung besonders stark exprimiert wird, gehören das Gehirn, dort vor allem Cerebellum, Hypothalamus und Hirnrinde, und auch Herzmuskelzellen (133). Auch hOCT3 wird unter anderem in Hirnzellen, aber auch in Herzmuskelzellen exprimiert (131). Die Gemeinsamkeiten in der Expression konnten in dieser Arbeit durch den Nachweis von DYRK1A- und hOCT3-mRNA in der Hypophyse und dem Cerebellum der Ratte erbracht werden (siehe 4.3). Auch in Hodenzellen wird hOCT3 exprimiert, wobei die physiologische Relevanz noch nicht weiter untersucht wurde (131). Interessanterweise wird DYRK1A ebenfalls in Hodenzellen, unter anderem Spermienzellen, exprimiert, was eine weitere gemeinsame Expressionsverteilung von DYRK1A und hOCT3 darstellt (18;149). Die Lokalisation von DYRK1A wird vorwiegend als nukleär und perinukleär beschrieben, beispielsweise in HEK293- und COS7-Zellen (18). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie neben einer perinukleären und zytoplasmatischen, auch eine zellmembranöse Lokalisation von DYRK1A in TCam2-Zellen. In hOCT3-HEK293-Zellen ist die Verteilung von DYRK1A vorwiegend zytoplasmatisch. Die Verteilung von hOCT3 ist wiederum in TCam2-Zellen in den Ergebnissen dieser Arbeit vorwiegend zytoplasmatisch und nicht zellmembranös, was in Anbetracht der transmembranösen Transportfunktion von hOCT3 auffällig ist. TCam2-Zellen sind eine Hodenkrebszelllinie, die Charakteristika von Seminomen in Wachstum und Zellmarkern zeigt (41;125). Seminome gehören zu der Gruppe der Keimzelltumoren und stammen von embryonalen Keimzellen ab (134). Die Kolo­kalisierung von DYRK1A und hOCT3 in dieser Zellreihe und auch die intrazelluläre Lokalisation der Proteine lassen Fragen offen, die in weiteren Experimenten geklärt werden müs-

sen. So wird vermutet, dass DYRK1A eine Rolle in der Resistenz von Tumorzellen spielt, beispielsweise bei Gliomen, Melanomen, Speiseröhrenkrebs und Pankreaskarzinomen. DYRK1A trägt dazu bei, dass Zellkrebslinien eine erhöhte Resistenz gegenüber pro-apoptotischen Stimuli aufweist und dass Krebszellen aggressiv proliferieren und migrieren (8;83). Die Aufnahme von Zytostatika wie Cisplatin und Oxaliplatin durch organische Kationentransporter ist Gegenstand vieler Untersuchungen gewesen und ist von Relevanz für die Erforschung von Therapie- und Resistenzmechanismen, sowie für die Entwicklung neuer chemotherapeutischer Substanzen (30;166). hOCT3 kann Oxaliplatin, jedoch nicht Cisplatin, transportieren (186). Es stellt sich daher die Frage, ob die Interaktion von hOCT3 und DYRK1A zu Resistenzmechanismen beiträgt, zum Beispiel durch eine Veränderung der Transportfähigkeit des hOCT3 für Zytostatika wie Oxaliplatin.

## **5.2 Regulation von hOCT3 durch DYRK1A**

Eine Reihe von Regulatoren des hOCT3 wurden bisher identifiziert. Dazu gehören Calmodulin und  $Ca^{2+}$ -calmodulin-dependent protein kinase II, deren Hemmung zu einer reduzierten Aufnahme von MPP<sup>+</sup> führte (119). Daneben bewirkt die Inhibition der Phosphodiesterase I eine verminderte Aufnahme von MPP<sup>+</sup> durch hOCT3. Die Inkubation von Zellen mit Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitoren und Alkalische-Phosphatase-Inhibitoren reduzierten die MPP<sup>+</sup>-Aufnahme. Auch die p56lck tyrosine Kinase zeigte mit der Reduktion der  $V_{max}$  des MPP<sup>+</sup>-Transports einen Effekt. Für Inhibitoren der Serin/Threonin Phosphatase konnte bisher kein inhibitorischer Effekt auf den MPP<sup>+</sup>-Transport gezeigt werden. Zusammenfassend wurde auf einen regulatorischen Mechanismus des hOCT3 mittels Dephosphorylierung und Phosphorylierung geschlossen, wobei der hOCT3 in dephosphoryliertem Zustand aktiv zu sein scheint (31;119;120).

Die bisherigen Untersuchungen der Regulation von hOCT3 bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit dahingehend, als dass es bei DYRK1A-transfizierten HEK293-Zellen zu einer signifikanten Hemmung der ASP<sup>+</sup>-Aufnahme kam und

DYRK1A eine Kinase ist, die die Serin-/Threonin-Reste eines Proteins phosphoryliert. Trotz bisheriger Erkenntnisse, dass es bei Serin-/Threonin-Kinasehemmung zu keinem Effekt auf die MPP<sup>+</sup>-Aufnahme kam, wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit ein inhibitorischer Effekt der Serin-/Threonin-Kinase DYRK1A gezeigt. Eine spezifische Hemmung von DYRK1A mit Harmin konnte die Hemmung der ASP<sup>+</sup>-Aufnahme durch DYRK1A verhindern und zeigte eine im zeitlichen Verlauf steigende Zunahme der ASP<sup>+</sup>-Aufnahme nach 24 h und 48 h. Die Hemmung des hOCT3-Transports durch DYRK1A-vermittelte Phosphorylierung steht im Einklang zu den bisher gewonnenen Erkenntnissen, dass hOCT3 in dephosphoryliertem Zustand aktiv ist. Denkbar wäre aber auch eine Beeinflussung des hOCT3-Transports durch DYRK1A über einen indirekten Weg, beispielsweise die Phosphorylierung einer anderen Kinase mit anschließender hOCT3-Phosphorylierung. Da in dieser Arbeit per Immunfluoreszenzmikroskopie gezeigt werden konnte, dass die Interaktion von DYRK1A und hOCT3 in HEK293- und TCam2-Zellen lokalisiert stattfindet und diese Interaktion zu einer mit Harmin reversiblen ASP<sup>+</sup>-Aufnahmehemmung führte, wird jedoch ein direkter inhibitorischer Effekt von DYRK1A auf hOCT3 wahrscheinlich.

### **5.3 Mögliche Bedeutung der Interaktion von hOCT3 und DYRK1A für das Down Syndrom**

DYRK1A wird wegen seiner Lage auf der „*Down syndrom critical region*“ (DSCR) des Chromosoms 21 und seiner Funktion bei der neuronalen Entwicklung eine große Rolle bei der Pathogenese des Down Syndroms (DS) zugeschrieben. Beim DS sind über 20 verschiedene Symptome beschrieben, darunter angeborene Herzfehler, frühes Erkranken an Morbus Alzheimer, Leukämien, angeborene Defekte am Immunsystem und mentale Retardierung (100). Letztere hindert DS-Patienten an einer vollen Teilhabe am sozialen Leben und ist daher von großer Relevanz. Bei DS-Patienten wird ein durchschnittlicher Intelligenzquotient von 50 erreicht, wobei interindividuelle Varianzen im Bereich von 30 bis 70 auftreten (165;176). Neben der mentalen Retardation weisen DS-Patienten Dysfunktionen bei Lernprozessen und der Nutzung von Lang- und Kurzzeitgedächtnis auf (26;181). Als Ursache der mentalen Retardation bei DS-

Patienten werden Dysfunktionen und Veränderungen der Neurogenese, neuronalen Differenzierung, Myelinisierung, Dendritogenese und Synaptogenese vermutet (38;57). Eine weitere mögliche Erklärung für die kognitiven und mentalen Veränderungen bei DS-Patienten kann aus den Ergebnissen dieser Arbeit abgeleitet werden. Eine erhöhte DYRK1A-Expression durch die Trisomie 21 wurde in dieser Arbeit durch die transiente Transfizierung von HEK293-Zellen simuliert. Es zeigte sich eine signifikant verminderte Aufnahme von ASP<sup>+</sup> durch hOCT3, sowie eine Aufhebung des DYRK1A-Effektes durch die spezifische Hemmung mit Harmin. Da eine der wichtigen Funktionen von hOCT3 die Aufnahme von Katecholaminen aus dem synaptischen Spalt als „*extraneuronal monoamine transporter*“ (EMT) ist, könnte die Hemmung von hOCT3 in einer erhöhten Katecholaminkonzentration und einer veränderten Katecholamin-Homöostase resultieren (66;183). Katecholamine sind neben ihrer gut bekannten Funktion bei sympathischen „*fight-or-flight responses*“ auch in der funktionalen Integration von verschiedenen Hirnbereichen wie Thalamus und Kortex und damit auch bei Erregungen und Aufmerksamkeit involviert (36). Auch gibt es Hinweise, dass das Katecholamin Noradrenalin in der Neurogenese und neuronalen Differenzierung eine Rolle spielt (130;154). Durch die veränderten Konzentrationen von Katecholaminen aufgrund der Inhibition hOCT3/EMT könnte es zu pathologischen Veränderungen bei der Neurogenese und neuronalen Differenzierung bei DS-Patienten kommen, die dann zu den DS-Symptomen wie mentaler Retardation und Dysfunktionen bei kognitiven Prozessen wie Lernen beitragen.

#### **5.4 Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von hOCT3 und DYRK1A mit einem Koimmunpräzipitation-Verfahren bestätigt und auch mittels Immunfluoreszenz untersucht. Die Interaktion konnte als Kolo-kalisation in TCam2-Zellen und HEK293-Zellen gezeigt werden. Die funktionale Relevanz der Interaktion wurde mit mikrofluorimetrischer ASP<sup>+</sup>-Messungen bestätigt und mit Inhibierung von Harmin auch als reversibel erkannt. An diese Ergebnisse anknüpfende Fragen wären zum einen die molekulare Untersuchung der Interaktion von

DYRK1A und hOCT3. Mittels Phosphor-Protein-Staining könnte der potentielle Effekt der Phosphorylierung von DYRK1A untersucht werden. Des Weiteren könnten sich funktionelle Untersuchungen zur Rolle von hOCT3 und DYRK1A in TCam2-Zellen anschließen. Die Bedeutung der Interaktion bei DS-Patienten könnte durch weitere Untersuchungen zu anderen Inhibitoren von DYRK1A, Katecholamin-Homöostase und therapeutischen Effekten von Harmin weiter geführt werden.

## 6 Literatur

### Literaturverzeichnis

- (1) Adkins S, Burmeister M. Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations. *Anal Biochem* 1996 August 15;240(1):17-23.
- (2) Ahn KJ, Jeong HK, Choi HS, Ryoo SR, Kim YJ, Goo JS, Choi SY, Han JS, Ha I, Song WJ. DYRK1A BAC transgenic mice show altered synaptic plasticity with learning and memory defects. *Neurobiol Dis* 2006 June;22(3):463-72.
- (3) Albiker C. CD63 and Dyrk1A as regulators of human organic cation transporter 3 WWU-Münster 2010.
- (4) Ali N, Halfter U, Chua NH. Cloning and biochemical characterization of a plant protein kinase that phosphorylates serine, threonine, and tyrosine. *J Biol Chem* 1994 December 16;269(50):31626-9.
- (5) Altafaj X, Dierssen M, Baamonde C, Marti E, Visa J, Guimera J, Oset M, Gonzalez JR, Florez J, Fillat C, Estivill X. Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Hum Mol Genet* 2001 September 1;10(18):1915-23.
- (6) Amara SG, Kuhar MJ. Neurotransmitter transporters: recent progress. *Annu Rev Neurosci* 1993;16:73-93.
- (7) Amphoux A, Vialou V, Drescher E, Bruss M, Mannoury La CC, Rochat C, Millan MJ, Giros B, Bonisch H, Gautron S. Differential pharmacological in vitro properties of organic cation transporters and regional distribution in rat brain. *Neuropharmacology* 2006 June;50(8):941-52.
- (8) Anderson K, Chen Y, Chen Z, Dominique R, Glenn K, He Y, Janson C, Luk KC, Lukacs C, Polonskaia A, Qiao Q, Railkar A, Rossman P, Sun H, Xiang Q, Vilenchik M, Wovkulich P, Zhang X. Pyrido[2,3-d]pyrimidines: Discovery and preliminary SAR of a novel series of DYRK1B and DYRK1A inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2013 December 15;23(24):6610-5.
- (9) Aranda S, Alvarez M, Turro S, Laguna A, de la Luna S. Sprouty2-mediated inhibition of fibroblast growth factor signaling is modulated by

- the protein kinase DYRK1A. *Mol Cell Biol* 2008 October;28(19):5899-911.
- (10) Aranda S, Laguna A, de la Luna S. DYRK family of protein kinases: evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles. *FASEB J* 2011 February;25(2):449-62.
  - (11) Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 1992 March;42(3 Pt 1):631-9.
  - (12) Arron JR, Winslow MM, Polleri A, Chang CP, Wu H, Gao X, Neilson JR, Chen L, Heit JJ, Kim SK, Yamasaki N, Miyakawa T, Francke U, Graef IA, Crabtree GR. NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature* 2006 June 1;441(7093):595-600.
  - (13) Baganz NL, Horton RE, Calderon AS, Owens WA, Munn JL, Watts LT, Koldzic-Zivanovic N, Jeske NA, Koek W, Toney GM, Daws LC. Organic cation transporter 3: Keeping the brake on extracellular serotonin in serotonin-transporter-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 December 2;105(48):18976-81.
  - (14) Bain J, McLauchlan H, Elliott M, Cohen P. The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J* 2003 April 1;371(Pt 1):199-204.
  - (15) Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JS, Alessi DR, Cohen P. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* 2007 December 15;408(3):297-315.
  - (16) Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 1970 June 27;226(5252):1209-11.
  - (17) Becker W, Sippl W. Activation, regulation, and inhibition of DYRK1A. *FEBS J* 2011 January;278(2):246-56.
  - (18) Becker W, Weber Y, Wetzel K, Eirmbter K, Tejedor FJ, Joost HG. Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity of DYRK-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases. *J Biol Chem* 1998 October 2;273(40):25893-902.
  - (19) Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979 November 24;7(6):1513-23.

- (20) Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001 May 17;411(6835):355-65.
- (21) Bottalico B, Larsson I, Brodzki J, Hernandez-Andrade E, Casslen B, Marsal K, Hansson SR. 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* 2004 July;25(6):518-29.
- (22) Brast S, Grabner A, Sucic S, Sitte HH, Hermann E, Pavenstadt H, Schlatter E, Ciarimboli G. The cysteines of the extracellular loop are crucial for trafficking of human organic cation transporter 2 to the plasma membrane and are involved in oligomerization. *FASEB J* 2012 March;26(3):976-86.
- (23) Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Muller M, Druker BJ, Lydon NB. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res* 1996 January 1;56(1):100-4.
- (24) Burnette WN. "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* 1981 April;112(2):195-203.
- (25) Burry RW. Controls for immunocytochemistry: an update. *J Histochem Cytochem* 2011 January;59(1):6-12.
- (26) Carlesimo GA, Marotta L, Vicari S. Long-term memory in mental retardation: evidence for a specific impairment in subjects with Down's syndrome. *Neuropsychologia* 1997 January;35(1):71-9.
- (27) Cetinkaya I, Ciarimboli G, Yalcinkaya G, Mehrens T, Velic A, Hirsch JR, Gorboulev V, Koepsell H, Schlatter E. Regulation of human organic cation transporter hOCT2 by PKA, PI3K, and calmodulin-dependent kinases. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003 February;284(2):F293-F302.
- (28) Churcher I. Tau therapeutic strategies for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem* 2006;6(6):579-95.
- (29) Ciarimboli G. Organic cation transporters. *Xenobiotica* 2008 July;38(7-8):936-71.
- (30) Ciarimboli G. Membrane transporters as mediators of Cisplatin effects and side effects. *Scientifica (Cairo)* 2012;2012:473829.

- (31) Ciarimboli G, Schlatter E. Regulation of organic cation transport. *Pflugers Arch* 2005 February;449(5):423-41.
- (32) Ciarimboli G, Struwe K, Arndt P, Gorboulev V, Koepsell H, Schlatter E, Hirsch JR. Regulation of the human organic cation transporter hOCT1. *J Cell Physiol* 2004 December;201(3):420-8.
- (33) Ciarimboli G, Struwe K, Arndt P, Gorboulev V, Koepsell H, Schlatter E, Hirsch JR. Regulation of the human organic cation transporter hOCT1. *J Cell Physiol* 2004 December;201(3):420-8.
- (34) Cohen P. Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov* 2002 April;1(4):309-15.
- (35) Coons AH HJCRNJEB. The Demonstration of Pneumococcal Antigen in Tissues by the Use of Fluorescent Antibody. *The Journal of Immunology* 1942 November 1;45(3):159-70.
- (36) Coull JT, Buchel C, Friston KJ, Frith CD. Noradrenergically mediated plasticity in a human attentional neuronal network. *Neuroimage* 1999 December;10(6):705-15.
- (37) Coulthard CE, Levene HH, Pyman FL. The chemotherapy of derivatives of harmine and harmaline. I. *Biochem J* 1933;27(3):727-39.
- (38) Coyle JT, Oster-Granite ML, Gearhart JD. The neurobiologic consequences of Down syndrome. *Brain Res Bull* 1986 June;16(6):773-87.
- (39) Dagert M, Ehrlich SD. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 1979 May;6(1):23-8.
- (40) De la Torre R, De SS, Pons M, Duchon A, de Lagran MM, Farre M, Fito M, Benejam B, Langohr K, Rodriguez J, Pujadas M, Bizot JC, Cuenca A, Janel N, Caturara S, Covas MI, Blehaut H, Herault Y, Delabar JM, Dierssen M. Epigallocatechin-3-gallate, a DYRK1A inhibitor, rescues cognitive deficits in Down syndrome mouse models and in humans. *Mol Nutr Food Res* 2013 September 14.
- (41) de JJ, Stoop H, Gillis AJ, Hersmus R, van Gurp RJ, van de Geijn GJ, van DE, Beverloo HB, Schneider DT, Sherlock JK, Baeten J, Kitazawa S, van Zoelen EJ, van RK, Oosterhuis JW, Looijenga LH. Further characterization of the first seminoma cell line TCam-2. *Genes Chromosomes Cancer* 2008 March;47(3):185-96.

- (42) De SB, Vassar R, Golde T. The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 2010 February;6(2):99-107.
- (43) Dierssen M, de Lagran MM. DYRK1A (dual-specificity tyrosine-phosphorylated and -regulated kinase 1A): a gene with dosage effect during development and neurogenesis. *ScientificWorldJournal* 2006;6:1911-22.
- (44) Dowjat WK, Adayev T, Kuchna I, Nowicki K, Palmiello S, Hwang YW, Wegiel J. Trisomy-driven overexpression of DYRK1A kinase in the brain of subjects with Down syndrome. *Neurosci Lett* 2007 February 8;413(1):77-81.
- (45) Eeles RA, Kote-Jarai Z, Giles GG, Olama AA, Guy M, Jugurnauth SK, Mulholland S, Leongamornlert DA, Edwards SM, Morrison J, Field HI, Southey MC, Severi G, Donovan JL, Hamdy FC, Dearnaley DP, Muir KR, Smith C, Bagnato M, Ardern-Jones AT, Hall AL, O'Brien LT, Gehr-Swain BN, Wilkinson RA, Cox A et al. Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet* 2008 March;40(3):316-21.
- (46) Eisenhofer G. Plasma normetanephrine for examination of extraneuronal uptake and metabolism of noradrenaline in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1994 March;349(3):259-69.
- (47) Eisenhofer G. The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines. *Pharmacol Ther* 2001 July;91(1):35-62.
- (48) Eisenhofer G, Esler MD, Cox HS, Meredith IT, Jennings GL, Brush JE, Jr., Goldstein DS. Differences in the neuronal removal of circulating epinephrine and norepinephrine. *J Clin Endocrinol Metab* 1990 June;70(6):1710-20.
- (49) Eisenhofer G, Esler MD, Meredith IT, Ferrier C, Lambert G, Jennings G. Neuronal re-uptake of noradrenaline by sympathetic nerves in humans. *Clin Sci (Lond)* 1991 March;80(3):257-63.
- (50) Feng N, Mo B, Johnson PL, Orchinik M, Lowry CA, Renner KJ. Local inhibition of organic cation transporters increases extracellular serotonin in the medial hypothalamus. *Brain Res* 2005 November 23;1063(1):69-76.
- (51) Fernandez-Martinez J, Vela EM, Tora-Ponsioen M, Ocana OH, Nieto MA, Galceran J. Attenuation of Notch signalling by the Down-

- syndrome-associated kinase DYRK1A. *J Cell Sci* 2009 May 15;122(Pt 10):1574-83.
- (52) Ferrer I, Barrachina M, Puig B, Martinez de LM, Marti E, Avila J, Dierssen M. Constitutive Dyrk1A is abnormally expressed in Alzheimer disease, Down syndrome, Pick disease, and related transgenic models. *Neurobiol Dis* 2005 November;20(2):392-400.
- (53) Ferron SR, Pozo N, Laguna A, Aranda S, Porlan E, Moreno M, Fillat C, de la Luna S, Sanchez P, Arbones ML, Farinas I. Regulated segregation of kinase Dyrk1A during asymmetric neural stem cell division is critical for EGFR-mediated biased signaling. *Cell Stem Cell* 2010 September 3;7(3):367-79.
- (54) Fotaki V, Dierssen M, Alcantara S, Martinez S, Marti E, Casas C, Visa J, Soriano E, Estivill X, Arbones ML. Dyrk1A haploinsufficiency affects viability and causes developmental delay and abnormal brain morphology in mice. *Mol Cell Biol* 2002 September;22(18):6636-47.
- (55) Frost D, Meechoovet B, Wang T, Gately S, Giorgetti M, Shcherbakova I, Dunckley T. beta-carboline compounds, including harmine, inhibit DYRK1A and tau phosphorylation at multiple Alzheimer's disease-related sites. *PLoS One* 2011;6(5):e19264.
- (56) Galceran J, de GK, Tejedor FJ, Becker W. The MNB/DYRK1A protein kinase: genetic and biochemical properties. *J Neural Transm Suppl* 2003;(67):139-48.
- (57) Galdzicki Z, Siarey R, Pearce R, Stoll J, Rapoport SI. On the cause of mental retardation in Down syndrome: extrapolation from full and segmental trisomy 16 mouse models. *Brain Res Brain Res Rev* 2001 April;35(2):115-45.
- (58) Garrett S, Broach J. Loss of Ras activity in *Saccharomyces cerevisiae* is suppressed by disruptions of a new kinase gene, YAK1, whose product may act downstream of the cAMP-dependent protein kinase. *Genes Dev* 1989 September;3(9):1336-48.
- (59) Gasser PJ, Orchinik M, Raju I, Lowry CA. Distribution of organic cation transporter 3, a corticosterone-sensitive monoamine transporter, in the rat brain. *J Comp Neurol* 2009 February 1;512(4):529-55.
- (60) Gockler N, Jofre G, Papadopoulos C, Soppa U, Tejedor FJ, Becker W. Harmine specifically inhibits protein kinase DYRK1A and interferes with neurite formation. *FEBS J* 2009 November;276(21):6324-37.

- (61) Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 2003 October 9;349(15):1451-64.
- (62) Goldstein DS, Eisenhofer G, Kopin IJ. Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 2003 June;305(3):800-11.
- (63) Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977 July;36(1):59-74.
- (64) Grob CS, McKenna DJ, Callaway JC, Brito GS, Neves ES, Oberlaender G, Saide OL, Labigalini E, Tacla C, Miranda CT, Strassman RJ, Boone KB. Human psychopharmacology of hoasca, a plant hallucinogen used in ritual context in Brazil. *J Nerv Ment Dis* 1996 February;184(2):86-94.
- (65) Grundemann D, Gorboulev V, Gambaryan S, Veyhl M, Koepsell H. Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* 1994 December 8;372(6506):549-52.
- (66) Grundemann D, Schechinger B, Rappold GA, Schomig E. Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter. *Nat Neurosci* 1998 September;1(5):349-51.
- (67) Guedj F, Sebric C, Rivals I, Ledru A, Paly E, Bizot JC, Smith D, Rubin E, Gillet B, Arbones M, Delabar JM. Green tea polyphenols rescue of brain defects induced by overexpression of DYRK1A. *PLoS One* 2009;4(2):e4606.
- (68) Guimera J, Casas C, Estivill X, Pritchard M. Human minibrain homologue (MNBH/DYRK1): characterization, alternative splicing, differential tissue expression, and overexpression in Down syndrome. *Genomics* 1999 May 1;57(3):407-18.
- (69) Gwack Y, Sharma S, Nardone J, Tanasa B, Iuga A, Srikanth S, Okamura H, Bolton D, Feske S, Hogan PG, Rao A. A genome-wide *Drosophila* RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* 2006 June 1;441(7093):646-50.
- (70) Hammerle B, Elizalde C, Tejedor FJ. The spatio-temporal and subcellular expression of the candidate Down syndrome gene *Mnb/Dyrk1A* in the developing mouse brain suggests distinct sequential roles in neuronal development. *Eur J Neurosci* 2008 March;27(5):1061-74.

- (71) Hammerle B, Vera-Samper E, Speicher S, Arencibia R, Martinez S, Tejedor FJ. Mnb/Dyrk1A is transiently expressed and asymmetrically segregated in neural progenitor cells at the transition to neurogenic divisions. *Dev Biol* 2002 June 15;246(2):259-73.
- (72) Hanks SK, Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 1995 May;9(8):576-96.
- (73) Hansson SR, Bottalico B, Noskova V, Casslen B. Monoamine transporters in human endometrium and decidua. *Hum Reprod Update* 2009 March;15(2):249-60.
- (74) Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992 April 10;256(5054):184-5.
- (75) Hediger MA, Clemencon B, Burrier RE, Bruford EA. The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. *Mol Aspects Med* 2013 April;34(2-3):95-107.
- (76) Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins Introduction. *Pflugers Arch* 2004 February;447(5):465-8.
- (77) Heninger GR, Delgado PL, Charney DS. The revised monoamine theory of depression: a modulatory role for monoamines, based on new findings from monoamine depletion experiments in humans. *Pharmacopsychiatry* 1996 January;29(1):2-11.
- (78) Himpel S, Panzer P, Eirimbter K, Czajkowska H, Sayed M, Packman LC, Blundell T, Kentrup H, Grotzinger J, Joost HG, Becker W. Identification of the autophosphorylation sites and characterization of their effects in the protein kinase DYRK1A. *Biochem J* 2001 November 1;359(Pt 3):497-505.
- (79) Hohage H, Stachon A, Feidt C, Hirsch JR, Schlatter E. Regulation of organic cation transport in IHKE-1 and LLC-PK1 cells. Fluorometric studies with 4-(4-dimethylaminostyryl)-N-methylpyridinium. *J Pharmacol Exp Ther* 1998 July;286(1):305-10.
- (80) Hopkins AL, Groom CR. The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov* 2002 September;1(9):727-30.
- (81) Hunter T. A thousand and one protein kinases. *Cell* 1987 September 11;50(6):823-9.

- (82) Hunter T, Plowman GD. The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem Sci* 1997 January;22(1):18-22.
- (83) Ionescu A, Dufrasne F, Gelbcke M, Jabin I, Kiss R, Lamoral-Theys D. DYRK1A kinase inhibitors with emphasis on cancer. *Mini Rev Med Chem* 2012 November;12(13):1315-29.
- (84) Iversen LL. THE UPTAKE OF ADRENALINE BY THE RAT ISOLATED HEART. *Br J Pharmacol Chemother* 1965 April;24:387-94.
- (85) Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985 April;82(7):2173-7.
- (86) Johnson LN, Lewis RJ. Structural basis for control by phosphorylation. *Chem Rev* 2001 August;101(8):2209-42.
- (87) Jonker JW, Schinkel AH. Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *J Pharmacol Exp Ther* 2004 January;308(1):2-9.
- (88) Kang JE, Choi SA, Park JB, Chung KC. Regulation of the proapoptotic activity of huntingtin interacting protein 1 by Dyrk1 and caspase-3 in hippocampal neuroprogenitor cells. *J Neurosci Res* 2005 July 1;81(1):62-72.
- (89) Kannan N, Neuwald AF. Evolutionary constraints associated with functional specificity of the CMGC protein kinases MAPK, CDK, GSK, SRPK, DYRK, and CK2alpha. *Protein Sci* 2004 August;13(8):2059-77.
- (90) Karin M, Hunter T. Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol* 1995 July 1;5(7):747-57.
- (91) Kekuda R, Prasad PD, Wu X, Wang H, Fei YJ, Leibach FH, Ganapathy V. Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta. *J Biol Chem* 1998 June 26;273(26):15971-9.
- (92) Kentrup H, Becker W, Heukelbach J, Wilmes A, Schurmann A, Huppertz C, Kainulainen H, Joost HG. Dyrk, a dual specificity protein kinase with unique structural features whose activity is dependent on tyrosine residues between subdomains VII and VIII. *J Biol Chem* 1996 February 16;271(7):3488-95.

- (93) Khan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N, Mukhtar H. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res* 2006 March 1;66(5):2500-5.
- (94) Kim EJ, Sung JY, Lee HJ, Rhim H, Hasegawa M, Iwatsubo T, Min dS, Kim J, Paik SR, Chung KC. Dyrk1A phosphorylates alpha-synuclein and enhances intracellular inclusion formation. *J Biol Chem* 2006 November 3;281(44):33250-7.
- (95) Kimura R, Kamino K, Yamamoto M, Nuripa A, Kida T, Kazui H, Hashimoto R, Tanaka T, Kudo T, Yamagata H, Tabara Y, Miki T, Akatsu H, Kosaka K, Funakoshi E, Nishitomi K, Sakaguchi G, Kato A, Hattori H, Uema T, Takeda M. The DYRK1A gene, encoded in chromosome 21 Down syndrome critical region, bridges between beta-amyloid production and tau phosphorylation in Alzheimer disease. *Hum Mol Genet* 2007 January 1;16(1):15-23.
- (96) Koepsell H. The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. *Mol Aspects Med* 2013 April;34(2-3):413-35.
- (97) Koepsell H, Endou H. The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch* 2004 February;447(5):666-76.
- (98) Koepsell H, Lips K, Volk C. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res* 2007 July;24(7):1227-51.
- (99) Koo KA, Kim ND, Chon YS, Jung MS, Lee BJ, Kim JH, Song WJ. QSAR analysis of pyrazolidine-3,5-diones derivatives as Dyrk1A inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2009 April 15;19(8):2324-8.
- (100) Korenberg JR, Chen XN, Schipper R, Sun Z, Gonsky R, Gerwehr S, Carpenter N, Daumer C, Dignan P, Disteché C, . Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 May 24;91(11):4997-5001.
- (101) Korenberg JR, Kawashima H, Pulst SM, Ikeuchi T, Ogasawara N, Yamamoto K, Schonberg SA, West R, Allen L, Magenis E, . Molecular definition of a region of chromosome 21 that causes features of the Down syndrome phenotype. *Am J Hum Genet* 1990 August;47(2):236-46.
- (102) Krebs EG, Beavo JA. Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu Rev Biochem* 1979;48:923-59.

- (103) Kuhn C, Frank D, Will R, Jaschinski C, Frauen R, Katus HA, Frey N. DYRK1A is a novel negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 2009 June 19;284(25):17320-7.
- (104) Lambert JD, Sang S, Yang CS. Biotransformation of green tea polyphenols and the biological activities of those metabolites. *Mol Pharm* 2007 November;4(6):819-25.
- (105) Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001 February 15;409(6822):860-921.
- (106) Law CJ, Maloney PC, Wang DN. Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annu Rev Microbiol* 2008;62:289-305.
- (107) Lazar A, Walitza S, Jetter A, Gerlach M, Warnke A, Herpertz-Dahlmann B, Grundemann D, Grimberg G, Schulz E, Remschmidt H, Wewetzer C, Schomig E. Novel mutations of the extraneuronal monoamine transporter gene in children and adolescents with obsessive-compulsive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 2008 February;11(1):35-48.
- (108) Lee Y, Ha J, Kim HJ, Kim YS, Chang EJ, Song WJ, Kim HH. Negative feedback inhibition of NFATc1 by DYRK1A regulates bone homeostasis. *J Biol Chem* 2009 November 27;284(48):33343-51.
- (109) LEJEUNE J, GAUTIER M, TURPIN R. [Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children]. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1959 March 16;248(11):1721-2.
- (110) Lips KS, Volk C, Schmitt BM, Pfeil U, Arndt P, Miska D, Ermert L, Kummer W, Koepsell H. Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005 July;33(1):79-88.
- (111) Lochhead PA, Sibbet G, Morrice N, Cleghon V. Activation-loop autophosphorylation is mediated by a novel transitional intermediate form of DYRKs. *Cell* 2005 June 17;121(6):925-36.
- (112) Louis ED, Zheng W. Beta-carboline alkaloids and essential tremor: exploring the environmental determinants of one of the most prevalent neurological diseases. *ScientificWorldJournal* 2010;10:1783-94.

- (113) Louvi A, Artavanis-Tsakonas S. Notch signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci* 2006 February;7(2):93-102.
- (114) Magrassi L, Purves D, Lichtman JW. Fluorescent probes that stain living nerve terminals. *J Neurosci* 1987 April;7(4):1207-14.
- (115) Maiden MC, Davis EO, Baldwin SA, Moore DC, Henderson PJ. Mammalian and bacterial sugar transport proteins are homologous. *Nature* 1987 February 12;325(6105):641-3.
- (116) Manning G, Plowman GD, Hunter T, Sudarsanam S. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci* 2002 October;27(10):514-20.
- (117) Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 2002 December 6;298(5600):1912-34.
- (118) Marger MD, Saier MH, Jr. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci* 1993 January;18(1):13-20.
- (119) Martel F, Keating E, Calhau C, Grundemann D, Schomig E, Azevedo I. Regulation of human extraneuronal monoamine transporter (hEMT) expressed in HEK293 cells by intracellular second messenger systems. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001 December;364(6):487-95.
- (120) Massmann V, Edemir B, Schlatter E, Al-Monajjed R, Harrach S, Klassen P, Holle SK, Sindic A, Dobrivojevic M, Pavenstadt H, Ciarimboli G. The organic cation transporter 3 (OCT3) as molecular target of psychotropic drugs: transport characteristics and acute regulation of cloned murine OCT3. *Pflugers Arch* 2013 August 28.
- (121) Massmann V, Edemir B, Schlatter E, Al-Monajjed R, Harrach S, Klassen P, Holle SK, Sindic A, Dobrivojevic M, Pavenstadt H, Ciarimboli G. The organic cation transporter 3 (OCT3) as molecular target of psychotropic drugs: transport characteristics and acute regulation of cloned murine OCT3. *Pflugers Arch* 2013 August 28.
- (122) Mehrens T, Lelleck S, Cetinkaya I, Knollmann M, Hohage H, Gorboulev V, Boknik P, Koepsell H, Schlatter E. The affinity of the organic cation transporter rOCT1 is increased by protein kinase C-dependent phosphorylation. *J Am Soc Nephrol* 2000 July;11(7):1216-24.
- (123) Minuesa G, Volk C, Molina-Arcas M, Gorboulev V, Erkizia I, Arndt P, Clotet B, Pastor-Anglada M, Koepsell H, Martinez-Picado J. Transport

of lamivudine [(-)-beta-L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine] and high-affinity interaction of nucleoside reverse transcriptase inhibitors with human organic cation transporters 1, 2, and 3. *J Pharmacol Exp Ther* 2009 April;329(1):252-61.

- (124) Mitchell P. Translocations Through Natural Membranes. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc.; 1967. p. 33-87.
- (125) Mizuno Y, Gotoh A, Kamidono S, Kitazawa S. [Establishment and characterization of a new human testicular germ cell tumor cell line (TCam-2)]. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1993 July;84(7):1211-8.
- (126) Moller RS, Kubart S, Hoeltzenbein M, Heye B, Vogel I, Hansen CP, Menzel C, Ullmann R, Tommerup N, Ropers HH, Tumer Z, Kalscheuer VM. Truncation of the Down syndrome candidate gene DYRK1A in two unrelated patients with microcephaly. *Am J Hum Genet* 2008 May;82(5):1165-70.
- (127) Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997;13:261-91.
- (128) Mott BT, Tanega C, Shen M, Maloney DJ, Shinn P, Leister W, Marugan JJ, Inglese J, Austin CP, Misteli T, Auld DS, Thomas CJ. Evaluation of substituted 6-arylquinazolin-4-amines as potent and selective inhibitors of cdc2-like kinases (Cdk). *Bioorg Med Chem Lett* 2009 December 1;19(23):6700-5.
- (129) Muraki M, Ohkawara B, Hosoya T, Onogi H, Koizumi J, Koizumi T, Sumi K, Yomoda J, Murray MV, Kimura H, Furuichi K, Shibuya H, Krainer AR, Suzuki M, Hagiwara M. Manipulation of alternative splicing by a newly developed inhibitor of Cdk. *J Biol Chem* 2004 June 4;279(23):24246-54.
- (130) Murrin LC, Sanders JD, Bylund DB. Comparison of the maturation of the adrenergic and serotonergic neurotransmitter systems in the brain: implications for differential drug effects on juveniles and adults. *Biochem Pharmacol* 2007 April 15;73(8):1225-36.
- (131) Nies AT, Koepsell H, Winter S, Burk O, Klein K, Kerb R, Zanger UM, Keppler D, Schwab M, Schaeffeler E. Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver. *Hepatology* 2009 October;50(4):1227-40.
- (132) Ogawa Y, Nonaka Y, Goto T, Ohnishi E, Hiramatsu T, Kii I, Yoshida M, Ikura T, Onogi H, Shibuya H, Hosoya T, Ito N, Hagiwara M.

Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A. *Nat Commun* 2010;1:86.

- (133) Okui M, Ide T, Morita K, Funakoshi E, Ito F, Ogita K, Yoneda Y, Kudoh J, Shimizu N. High-level expression of the Mnb/Dyrk1A gene in brain and heart during rat early development. *Genomics* 1999 December 1;62(2):165-71.
- (134) Oosterhuis JW, Looijenga LH. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer* 2005 March;5(3):210-22.
- (135) Pao SS, Paulsen IT, Saier MH, Jr. Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998 March;62(1):1-34.
- (136) Park J, Oh Y, Yoo L, Jung MS, Song WJ, Lee SH, Seo H, Chung KC. Dyrk1A phosphorylates p53 and inhibits proliferation of embryonic neuronal cells. *J Biol Chem* 2010 October 8;285(41):31895-906.
- (137) Park J, Song WJ, Chung KC. Function and regulation of Dyrk1A: towards understanding Down syndrome. *Cell Mol Life Sci* 2009 October;66(20):3235-40.
- (138) Park J, Song WJ, Chung KC. Function and regulation of Dyrk1A: towards understanding Down syndrome. *Cell Mol Life Sci* 2009 October;66(20):3235-40.
- (139) Paulsen IT, Brown MH, Skurray RA. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev* 1996 December;60(4):575-608.
- (140) Pearson G, Robinson F, Beers GT, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001 April;22(2):153-83.
- (141) Pietruck F, Ullrich KJ. Transport interactions of different organic cations during their excretion by the intact rat kidney. *Kidney Int* 1995 June;47(6):1647-57.
- (142) Prickett KS, Amberg DC, Hopp TP. A calcium-dependent antibody for identification and purification of recombinant proteins. *Biotechniques* 1989 June;7(6):580-9.
- (143) Rahman Z, Ring RH, Young K, Platt B, Lin Q, Schechter LE, Rosenzweig-Lipson S, Beyer CE. Inhibition of uptake 2 (or extraneuronal monoamine transporter) by normetanephrine potentiates the neurochemical effects of venlafaxine. *Brain Res* 2008 April 8;1203:68-78.

- (144) Rahmani Z, Blouin JL, Creau-Goldberg N, Watkins PC, Mattei JF, Poissonnier M, Prieur M, Chettouh Z, Nicole A, Aurias A, . Critical role of the D21S55 region on chromosome 21 in the pathogenesis of Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 August;86(15):5958-62.
- (145) Reeves RH, Irving NG, Moran TH, Wohn A, Kitt C, Sisodia SS, Schmidt C, Bronson RT, Davisson MT. A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat Genet* 1995 October;11(2):177-84.
- (146) Rogers S, Wells R, Rechsteiner M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 1986 October 17;234(4774):364-8.
- (147) Russ H, Staust K, Martel F, Gliese M, Schomig E. The extraneuronal transporter for monoamine transmitters exists in cells derived from human central nervous system glia. *Eur J Neurosci* 1996 June;8(6):1256-64.
- (148) Ryoo SR, Cho HJ, Lee HW, Jeong HK, Radnaabazar C, Kim YS, Kim MJ, Son MY, Seo H, Chung SH, Song WJ. Dual-specificity tyrosine(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A-mediated phosphorylation of amyloid precursor protein: evidence for a functional link between Down syndrome and Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2008 March;104(5):1333-44.
- (149) Sacher F, Moller C, Bone W, Gottwald U, Fritsch M. The expression of the testis-specific Dyrk4 kinase is highly restricted to step 8 spermatids but is not required for male fertility in mice. *Mol Cell Endocrinol* 2007 March 15;267(1-2):80-8.
- (150) Sago H, Carlson EJ, Smith DJ, Kilbridge J, Rubin EM, Mobley WC, Epstein CJ, Huang TT. Ts1Cje, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 May 26;95(11):6256-61.
- (151) Saier MH, Jr. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000 June;64(2):354-411.
- (152) Saier MH, Jr. Tracing pathways of transport protein evolution. *Mol Microbiol* 2003 June;48(5):1145-56.
- (153) Salinovich O, Montelaro RC. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 1986 August 1;156(2):341-7.

- (154) Sanders JD, Happe HK, Bylund DB, Murrin LC. Differential effects of neonatal norepinephrine lesions on immediate early gene expression in developing and adult rat brain. *Neuroscience* 2008 December 10;157(4):821-32.
- (155) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977 December;74(12):5463-7.
- (156) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977 December;74(12):5463-7.
- (157) Sata R, Ohtani H, Tsujimoto M, Murakami H, Koyabu N, Nakamura T, Uchiumi T, Kuwano M, Nagata H, Tsukimori K, Nakano H, Sawada Y. Functional analysis of organic cation transporter 3 expressed in human placenta. *J Pharmacol Exp Ther* 2005 November;315(2):888-95.
- (158) Schomig E, Lazar A, Grundemann D. Extraneuronal monoamine transporter and organic cation transporters 1 and 2: a review of transport efficiency. *Handb Exp Pharmacol* 2006;(175):151-80.
- (159) Seifert A, Allan LA, Clarke PR. DYRK1A phosphorylates caspase 9 at an inhibitory site and is potently inhibited in human cells by harmine. *FEBS J* 2008 December;275(24):6268-80.
- (160) Selkoe DJ, Podlisny MB. Deciphering the genetic basis of Alzheimer's disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002;3:67-99.
- (161) Shaw G, Morse S, Ararat M, Graham FL. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J* 2002 June;16(8):869-71.
- (162) SHIMOMURA O, JOHNSON FH, SAIGA Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 1962 June;59:223-39.
- (163) Shindoh N, Kudoh J, Maeda H, Yamaki A, Minoshima S, Shimizu Y, Shimizu N. Cloning of a human homolog of the *Drosophila* minibrain/rat Dyrk gene from "the Down syndrome critical region" of chromosome 21. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 August 5;225(1):92-9.
- (164) Smith DJ, Stevens ME, Sudanagunta SP, Bronson RT, Makhinson M, Watabe AM, O'Dell TJ, Fung J, Weier HU, Cheng JF, Rubin EM. Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates minibrain in learning defects associated with Down syndrome. *Nat Genet* 1997 May;16(1):28-36.

- (165) Stoll C, Alembik Y, Dott B, Roth MP. Epidemiology of Down syndrome in 118,265 consecutive births. *Am J Med Genet Suppl* 1990;7:79-83.
- (166) Stordal B, Pavlakis N, Davey R. Oxaliplatin for the treatment of cisplatin-resistant cancer: a systematic review. *Cancer Treat Rev* 2007 June;33(4):347-57.
- (167) Tejedor F, Zhu XR, Kaltenbach E, Ackermann A, Baumann A, Canal I, Heisenberg M, Fischbach KF, Pongs O. minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in *Drosophila*. *Neuron* 1995 February;14(2):287-301.
- (168) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979 September;76(9):4350-4.
- (169) Tregouet DA, König IR, Erdmann J, Munteanu A, Braund PS, Hall AS, Grosshennig A, Linsel-Nitschke P, Perret C, DeSuremain M, Meitinger T, Wright BJ, Preuss M, Balmforth AJ, Ball SG, Meisinger C, Germain C, Evans A, Arveiler D, Luc G, Ruidavets JB, Morrison C, van der Harst P, Schreiber S, Neureuther K et al. Genome-wide haplotype association study identifies the SLC22A3-LPAL2-LPA gene cluster as a risk locus for coronary artery disease. *Nat Genet* 2009 March;41(3):283-5.
- (170) Trendelenburg U. The TIPS lecture: functional aspects of the neuronal uptake of noradrenaline. *Trends Pharmacol Sci* 1991 September;12(9):334-7.
- (171) Trinczek B, Biernat J, Baumann K, Mandelkow EM, Mandelkow E. Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. *Mol Biol Cell* 1995 December;6(12):1887-902.
- (172) Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 1998;67:509-44.
- (173) Venault P, Chapouthier G. From the behavioral pharmacology of beta-carbolines to seizures, anxiety, and memory. *ScientificWorldJournal* 2007;7:204-23.
- (174) Verhaagh S, Schweifer N, Barlow DP, Zwart R. Cloning of the mouse and human solute carrier 22a3 (*Slc22a3*/SLC22A3) identifies a conserved cluster of three organic cation transporters on mouse chromosome 17 and human 6q26-q27. *Genomics* 1999 January 15;55(2):209-18.

- (175) Vialou V, Balasse L, Callebert J, Launay JM, Giros B, Gautron S. Altered aminergic neurotransmission in the brain of organic cation transporter 3-deficient mice. *J Neurochem* 2008 August;106(3):1471-82.
- (176) Vicari S. Memory development and intellectual disabilities. *Acta Paediatr Suppl* 2004 May;93(445):60-3.
- (177) Wang T, Li J, Chen F, Zhao Y, He X, Wan D, Gu J. Choline transporters in human lung adenocarcinoma: expression and functional implications. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2007 September;39(9):668-74.
- (178) Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 1969 August 25;244(16):4406-12.
- (179) Wegiel J, Gong CX, Hwang YW. The role of DYRK1A in neurodegenerative diseases. *FEBS J* 2011 January;278(2):236-45.
- (180) Wilson VG, Grohmann M, Trendelenburg U. The uptake and O-methylation of 3H-(+/-)-isoprenaline in rat cerebral cortex slices. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1988 April;337(4):397-405.
- (181) Wishart JG. Cognitive abilities in children with Down syndrome: developmental instability and motivational deficits. *Prog Clin Biol Res* 1995;393:57-91.
- (182) Woods YL, Cohen P, Becker W, Jakes R, Goedert M, Wang X, Proud CG. The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2Bepsilon at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212: potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase. *Biochem J* 2001 May 1;355(Pt 3):609-15.
- (183) Wu X, Kekuda R, Huang W, Fei YJ, Leibach FH, Chen J, Conway SJ, Ganapathy V. Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monoamine transporter (uptake2) and evidence for the expression of the transporter in the brain. *J Biol Chem* 1998 December 4;273(49):32776-86.
- (184) Wulsch T, Grimberg G, Schmitt A, Painsipp E, Wetzstein H, Breitenkamp AF, Grundemann D, Schomig E, Lesch KP, Gerlach M, Reif A. Decreased anxiety in mice lacking the organic cation transporter 3. *J Neural Transm* 2009 June;116(6):689-97.
- (185) Yang EJ, Ahn YS, Chung KC. Protein kinase Dyrk1 activates cAMP response element-binding protein during neuronal differentiation in

hippocampal progenitor cells. *J Biol Chem* 2001 October 26;276(43):39819-24.

- (186) Yokoo S, Masuda S, Yonezawa A, Terada T, Katsura T, Inui K. Significance of organic cation transporter 3 (SLC22A3) expression for the cytotoxic effect of oxaliplatin in colorectal cancer. *Drug Metab Dispos* 2008 November;36(11):2299-306.
- (187) Yonezawa A, Masuda S, Yokoo S, Katsura T, Inui K. 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* 2006 November;319(2):879-86.
- (188) Yuan R. Structure and mechanism of multifunctional restriction endonucleases. *Annu Rev Biochem* 1981;50:285-319.
- (189) Zhang S, Lovejoy KS, Shima JE, Lagpacan LL, Shu Y, Lapuk A, Chen Y, Komori T, Gray JW, Chen X, Lippard SJ, Giacomini KM. Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity. *Cancer Res* 2006 September 1;66(17):8847-57.
- (190) Zhu HJ, Appel DI, Grundemann D, Richelson E, Markowitz JS. Evaluation of organic cation transporter 3 (SLC22A3) inhibition as a potential mechanism of antidepressant action. *Pharmacol Res* 2012 April;65(4):491-6.

## **7 Curriculum Vitae**

## 8 Danksagungen

Ich danke Prof. Giuliano Ciarimboli, meinem Doktorvater, Berater, Unterstützer und Antreiber für die gute Betreuung, das entgegengebrachte Vertrauen und den guten Kaffee.

Ich danke Prof. Eberhard Schlatter für die Möglichkeit, in der experimentellen Nephrologie promovieren zu können, für die stets unterstützenden Worte und die Möglichkeit, mein Foto in die Ahnengalerie des Labors hängen zu dürfen.

Ich danke Sabine Brast, meiner Betreuerin, die mir die ersten Schritte in der großen Welt des Labors erleichterte, die mir stets Zuversicht und Optimismus vermittelte und die auch abseits des Labors ein Vorbild ist.

Ich danke Rita Schröter, meiner Co-Doktormutter, die nicht nur einen großen Anteil an den erfolgreich verlaufenden Experimenten hatte, sondern auch durch Hilfe, Ratschläge und Antreiben diese Arbeit möglich gemacht hat.

Ich danke Kristina Wensing, für die Hilfe und Unterstützung bei Experimenten, Saliha Harrach für die geduldigen Erklärungen, Bayram Edemir für die Schokolade und die technische Unterstützung, Ute Neugebauer, ohne die so viele RNAs durch meine Hände das Zeitliche gesegnet hätten, Astrid Dirks, für die vielen stets gut kultivierten Zellen und die Aufmunterungen, Dominik Kentrup für die technische Unterstützung im Labor und allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern, die das Labor zu dem machen, was es ist.

Ich danke meinem Freund Till Wolfram, für die Unterstützung bei computer-technischen Fragen und Anliegen

Ich danke meinen Freunden Abdallah Abu Taha und Maryam Rezaei, für die Unterstützung bei molekularen Techniken und die guten Ratschläge.

Ich danke meiner Frau Hayrunnisa, für ihre Liebe und Unterstützung in allen Lebenslagen und dass sie an meiner Seite ist.

Ich danke meiner Mutter, ohne die nichts möglich wäre und der ich so Vieles verdanke.

## 9 Anhang

### 9.1 Vektorkarten

Invitrogen pcDNA6.F9, modifiziert durch die Arbeitsgruppe Benzing, Freiburg:  
Eine *Mlu*I Site, Flag- und His-Tag wurden hinzugefügt.

