

Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie

**Klonierung und Charakterisierung
des Peptidtransporter-Gens *Pept2*
der Maus**

Isabel Rubio-Aliaga

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. Alfons Gierl

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Hannelore Daniel

2. Univ.-Prof. Dr. Rudolf Balling

3. Priv.-Doz. Dr. Ralf Einspanier

Die Dissertation wurde am 09.10.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 04.12.2000 angenommen.

A mis padres
(Meinen Eltern)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Die Peptidtransporter bilden eine konservierte Familie elektrogener Carrierproteine mit zentraler Bedeutung für die Homöostase von Amino-Stickstoff	8
1.2	Die Mitglieder der POT-Familie auf genomischer Ebene	14
1.3	Einsatz von neuen Tiermodellen (Knockout-Mäuse) zur Aufklärung der physiologischen Bedeutung von Transportproteinen	15
1.4	Ziele der Arbeit	18
2	Materialien und Methoden	20
2.1	Materialien	20
2.1.1	Versuchstiere	20
2.1.2	Zellen	20
2.1.3	Radioaktiv-markierte Testverbindungen	20
2.1.4	Geräte	20
2.1.5	Chemikalien, molekularbiologische Reagentien und Zellkulturbedarf	21
2.2	Methoden	21
2.2.1	PCR, Polymerase-Kettenreaktion	21
2.2.2	RT-PCR, Reverse-Transkription-PCR	22
2.2.3	RACE, „Rapid Amplification of cDNA ends“	22
2.2.4	Klonierung der PCR- und RACE-Produkte	24
2.2.5	Expression des PEPT2-Proteins in <i>Xenopus laevis</i> Oocyten	24
2.2.6	Homologie-Screening	26
2.2.7	PAC-DNA-Isolierung	28
2.2.8	Subklonierung von PAC-DNA-Fragmenten	29
2.2.9	Western-Blot	30
2.2.10	Southern-Blot	30
2.2.11	Northern-Blot	31
2.2.12	Radiation Hybrid Mapping	31
2.2.13	Promotor-Analyse	32
2.2.14	Herstellung einer Knockout-Maus	37
2.2.15	DNA-Sequenzierung	44
2.2.16	Sequenzanalysen	44
2.2.17	Datenanalysen	44

3	Ergebnisse	46
3.1	Molekulare Identifizierung der renalen Peptidtransporter-cDNA aus der Maus	46
3.1.1	Isolierung der murinen PEPT2-cDNA	46
3.1.2	Molekulare Charakterisierung	47
3.1.3	Funktionelle Charakterisierung	53
3.2	Identifizierung des murinen <i>Pept2</i> -Gens	56
3.2.1	Isolierung des renalen Peptidtransporter-Gens	56
3.2.2	Organisation des murinen Peptidtransporter-Gens <i>Pept2</i>	59
3.2.3	Identifizierung der Promotorregion des murinen <i>Pept2</i> -Gens	68
3.3	Vorarbeiten für die Herstellung einer <i>Pept2</i> -Knockout-Maus (<i>Pept2</i> ^{-/-})	71
3.3.1	Herstellung des Targeting-Konstrukts	72
3.3.2	Homologe Rekombination von pPEPT2tg1 in ES-Zellen	74
3.3.3	Injektion der rekombinanten ES-Klone in Blastocysten und Transfer	77
3.3.4	Prüfung der Keimbahntransmission	78
4	Diskussion	80
5	Zusammenfassung	92
	Anhang	94
I	Literaturverzeichnis	94
II	Abkürzungsverzeichnis	100
III	Plasmide, Primer und Linker	102
IV	Danksagung	105
V	Lebenslauf	106

Abstract

Transporters for di- and tripeptides are found in prokaryotes and eukaryotes. In mammals two different transport systems have been identified. PEPT1 is mainly expressed in the small intestine and is responsible for the absorption of di- and tripeptides. PEPT2 shows a widespread expression within the organism. In kidney it mainly mediates the reabsorption of di- and tripeptides, but its role in other tissues such as brain or mammary gland has not yet been determined. Therefore, the aim of this work was to set the molecular basis for further studies on the physiological role of PEPT2 in particular by employing mice with targeted disruption of the *Pept2* gene.

First, the mouse PEPT2-cDNA was cloned by RACE. It is 3987 bp long and the coding region yields a protein of 729 amino acids identical to the other mammalian PEPT2 transporters. By Western Blot the apparent molecular weight of PEPT2 was around 100 kDa, suggesting that the protein is highly glycosylated. The PEPT2-mRNA was detected by Northern Blot in kidney, brain, mammary gland and lung. The functional characterization of the murine PEPT2 was performed in *Xenopus laevis* oocytes after injection of the corresponding PEPT2-cRNA. The carrier was found to transport di-, tripeptides and selected peptidomimetics in an electrogenic mode with a pronounced pH-dependency. Next, the *Pept2* gene was isolated from a genomic DNA library from mouse. The *Pept2* gene is 34-kb long and organized in 22 exons. Radiation hybrid analysis revealed the *Pept2* gene to be localized on central mouse chromosome 16. Two major transcription start sites were identified by 5'-RACE, 35 and 235-bp upstream of the translation start. Moreover, the minimal promoter of the *Pept2* gene was identified by reporter analysis and could be located between 432 and 286-bp upstream of the translation start and was found not to contain a TATA-box. Furthermore, a number of potential sites for transacting factors were identified in the upstream region of the *Pept2* gene. These will be the basis of further studies on the regulation of the *Pept2* gene. Based on the isolated *Pept2* gene sequence it was possible to initiate the construction of a targeting vector for the generation of a *Pept2* knock-out mice strain. The targeting vector was transfected by electroporation into mouse embryonic stem cells. After injection of homologous recombinant cells into blastocytes, those were transferred into pseudopregnant mice. One of the chimeric mice born showed germline transmission leading to heterozygote *Pept2* knock-out mice that will allow now to establish a *Pept2*^{-/-}-mouse strain for studies on the physiological role of the peptide transporter PEPT2 in mammalian organisms.

Abstract

Transporter für Di- und Tripeptide wurden in Eukaryonten und Prokaryonten identifiziert. Im Säuger wurden bisher zwei verschiedene Transportsysteme nachgewiesen. PEPT1 ist in Dünndarmepithelzellen lokalisiert und vermittelt die intestinale Resorption von Di- und Tripeptiden. PEPT2 zeigt eine verbreitete Expression im Organismus. In der Niere ist der Transporter für die Reabsorption von Di- und Tripeptiden verantwortlich. Seine physiologische Rolle in anderen Geweben, u.a. im Gehirn oder der Brustdrüse, ist bisher jedoch nicht identifiziert. Es war daher das Ziel dieser Arbeit, die Grundlagen darzulegen für die Herstellung einer Mauslinie, in der das *Pept2*-Gen gezielt inaktiviert ist. Damit kann die physiologische Funktion im intakten Säugerorganismus studiert werden.

Die PEPT2-cDNA der Maus wurde mittels RACE-Technik kloniert. Sie ist 3987-bp lang und kodiert für ein 729 Aminosäuren großes Protein. Durch Western-Blot-Analyse wurde eine apparente molare Masse von ca. 100 kDa für PEPT2 bestimmt, was darauf hinweist, daß es sich um ein glykosyliertes Protein handelt. Die PEPT2-mRNA wurde durch Northern-Blot-Analyse in Niere, Gehirn, Brustdrüse und Lunge der Maus identifiziert. Die funktionellen Charakteristika von PEPT2 wurden nach heterologer Expression in *Xenopus laevis* Oocyten untersucht. Der Transportvorgang zeigt ausgeprägte pH-Abhängigkeit und ist erklärt durch einen elektrogenen H⁺/Symport für Di-, Tripeptide sowie bestimmte Peptidomimetika. Ausgehend von der cDNA-Sequenz wurde das *Pept2*-Gen der Maus isoliert. Es handelt sich um ein 34-kb langes Gen mit 22 Exons. Mittels „Radiation Hybrid Mapping“ konnte das murine *Pept2*-Gen auf Chromosom 16 lokalisiert werden. Es besitzt zwei Haupt-Transkriptionsstarts, 35 bzw. 235 bp strangaufwärts des Startcodons. Durch Promotor-Analyse konnte der Kernpromotor des murinen *Pept2*-Gens zwischen 432 und 286 bp strangaufwärts des Translationsstarts eingegrenzt werden. Es handelt sich um einen TATA-Box-defizienten Promotor. Außerdem wurden strangaufwärts des Transkriptionsstarts des *Pept2*-Gens mehrere mögliche *cis*-aktive Elemente identifiziert, die Grundlage für weiterführende Studien über die Regulation der *Pept2*-Genexpression sein werden. Nach Aufklärung der *Pept2*-Genstruktur wurden die Grundlagen für die Erzeugung einer *Pept2*-Knockout-Maus gelegt. Dazu wurde das Targeting-Konstrukt erzeugt und in murine embryonale Stammzellen eingebracht. Die rekombinanten Zellklone wurden in Blastocysten zur Erzeugung von chimären Mäusen injiziert. Eine chimäre Maus zeigte Keimbahntransmission und diente somit der Genese der ersten *Pept2*^{+/-}-Tiere. Gegenwärtig wird eine homozygote Linie (*Pept2*^{-/-}) von Mäusen etabliert, die für die Phänotypisierung und Aufklärung der physiologischen Rolle von PEPT2 im Organismus dienen soll.

1 Einleitung

1.1 Die Peptidtransporter bilden eine konservierte Familie elektrogener Carrierproteine mit zentraler Bedeutung für die Homöostase von Amino-Stickstoff

Sowohl Studien mit hydrolyse-resistenten Peptiden, als auch klinische Befunde an Cystinurie- und Hartnup-Patienten, lieferten Mitte der 70er Jahre erste Hinweise auf die Anwesenheit eines aktiven Transportsystems für Di- und Tripeptide in der Bürstensaummembran von Dünndarmepithelzellen (Matthews DM *et al.* 1976). Später wurde ein vergleichbares Transportsystem auch in der Bürstensaummembran von Tubulusepithelzellen der Niere nachgewiesen (Ganapathy V *et al.* 1982). Erst 1994 konnte der intestinale Peptidtransporter (PEPT1) durch Expressionsklonierung von zwei Arbeitsgruppen aus einer Kaninchen-cDNA-Bank kloniert werden (Fei YJ *et al.* 1994, Boll M *et al.* 1994). PEPT1 repräsentiert ein Protein mit 12 Transmembrandomänen und seine Sequenz zeigte keine Ähnlichkeit zu bis dahin bereits klonierten Membranproteine aus Säugetieren. 1996 wurde der renale Peptidtransporter, PEPT2, ebenfalls mittels Expressionsklonierung aus einer Kaninchen-cDNA-Bank kloniert (Boll *et al.* 1996). Der Vergleich der Aminosäuresequenzen ergab eine 47%-ige Identität der beiden Proteine.

Die **physiologische Bedeutung** der Peptidtransporter, soweit bis heute bekannt, liegt in der Bereitstellung und Konservierung von Amino-Stickstoff im Organismus. Abbildung 1.1 zeigt schematisch deren Funktion auf Ebene des Dünndarms und der Niere.

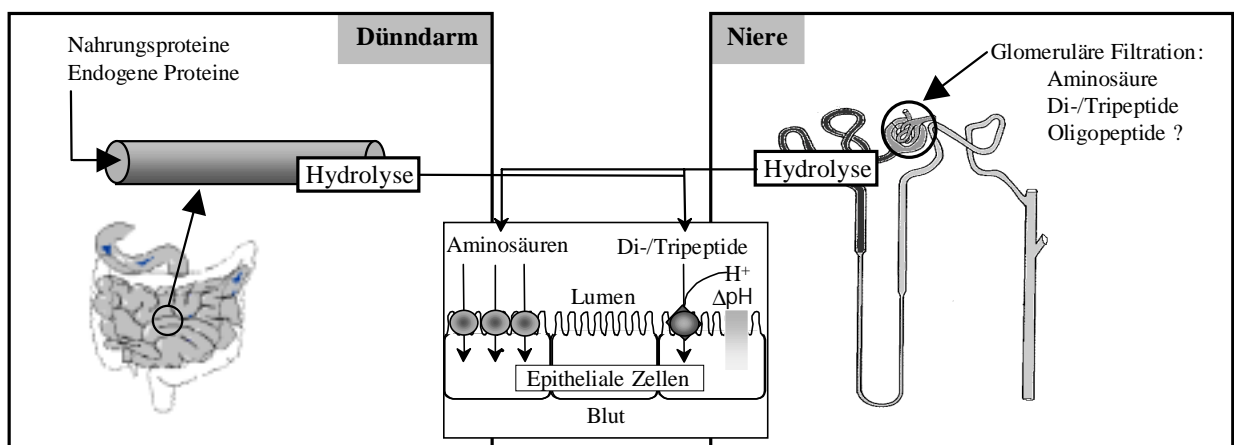


Abbildung 1.1 Physiologische Bedeutung der Peptidtransporter in dem Organismus.

In das Lumen des Dünndarms gelangen große Mengen an Nahrungsproteinen und endogenen Proteinen. Unter Wirkung von pankreatischen und bürstensaummembranassoziierten Proteasen und Peptidasen entstehen als Abbauprodukte freie Aminosäuren und kurzkettinge

Peptide. Die Aminosäuren werden durch Aminosäuretransporter in die Enterozyten aufgenommen; der Peptidtransporter PEPT1 ist für die Aufnahme von Di- und Tripeptiden verantwortlich. In den Enterozyten werden die Di- und Tripeptide von cytoplasmatischen Peptidasen hydrolysiert, so daß der überwiegende Teil der aufgenommenen Peptide als freie Aminosäuren ins Blut gelangt. Jedoch ist auch gezeigt worden, daß 50% der resorbierten Aminosäuren im Plasma als Peptide zu finden sind, von denen ca. 25-50% als Di- und Tripeptide vorliegen sollen (Gardner MLG 1994, Schlagheck TG & Webb KE 1984, Seal CJ & Parker DS 1991). Di- und Tripeptide gelangen nach glomerulärer Filtration auch in den proximalen Tubulus der Niere, wo der Peptidtransporter PEPT2 für deren Reabsorption in die Epithelzellen verantwortlich ist (Leibach FH & Ganapathy V, 1996).

Die Peptidtransporter besitzen darüber hinaus eine **pharmakologische und klinische Bedeutung**. Peptidomimetika, wie z.B. β -Laktamantibiotika, werden von den Peptidtransportern transportiert. Somit sind sie sowohl für die intestinale Resorption als auch für die Rückresorption dieser Medikamente verantwortlich und beeinflussen daher auch ihre Pharmakokinetik. Auch Ernährungslösungen für die enterale- und parenterale Ernährung werden Dipeptide im Ersatz für freie Aminosäuren zugesetzt um die Effizienz der Resorption von Amino-Stickstoff zu erhöhen sowie stabilere Lösungen bei gleichzeitig geringerem osmotischen Wert zu erhalten. Peptidtransporter besitzen somit auch eine klinische Bedeutung (Übersichtsartikel: Grimble GK 1994, Leibach FH & Ganapathy V 1996).

Die Konservierung von Amino-Stickstoff im Organismus ist jedoch wahrscheinlich nicht die einzige physiologische Bedeutung der Peptidtransporter. Die **Lokalisation** von PEPT1 beschränkt sich auf den Dünndarm (Ogihara H *et al.* 1996), das S1-Segment des proximalen Tubuli der Niere (Shen H *et al.* 1999) und das Pankreasgewebe. Hier wird er in Lysosomen von Azinuszellen und im Nukleus glatter Muskelzellen der Blutgefäße sowie in Schwann'schen Zellen nachgewiesen (Bockman DE *et al.* 1997). Die Expression in Niere und Dünndarm entspricht der primären physiologischen Bedeutung in der Amino-Stickstoff-Homöostase, die Funktion von PEPT1 im Pankreas ist bisher ungeklärt.

Der Peptidtransporter PEPT2 ist im Organismus noch weiter verbreitet. Mittels RT-PCR konnte die PEPT2-mRNA in Niere, Gehirn, Lunge, Brustdrüse sowie anderen extrarenalen Geweben nachgewiesen werden (Döring F *et al.* 1998a). Die genaue Lokalisation von PEPT2 in diesen Geweben ist jedoch nur für Gehirn und Niere bekannt. Immunhistochemische Studien zeigen, daß sich das PEPT2-Protein im S3-Segment des proximalen Tubulus der

Niere befindet (Shen H *et al.* 1999). Mittels *in situ*-Hybridisierung wurde gezeigt, daß die PEPT2-mRNA im Gehirn in Astrozyten, Ependymialzellen und Epithelialzellen des Plexus Chorioideus vorkommt (Berger UV & Hediger MA, 1999). Diese verbreitete und spezifische Verteilung weist darauf hin, daß die Konservierung von Amino-Stickstoff im Organismus wahrscheinlich nicht die einzige physiologische Bedeutung des Peptidtransporters PEPT2 ist. Seine Aufgabe in den extrarenalen Geweben muß jedoch noch untersucht werden.

Die Transporteigenschaften der Peptidtransporter konnten sowohl mit klassischen physiologischen und proteinchemischen Methoden als auch durch heterologe Expressionsstudien aufgeklärt werden. Die **Substratspezifität** der Peptidtransporter ist sowohl durch Fluxstudien als auch durch elektrophysiologische Studien näher untersucht worden. Die Transporter haben die Fähigkeit, Di- und Tripeptide als Substrate zu erkennen. Ausgehend von 20 proteinogenen Aminosäuren, ergeben sich 400 verschiedene Dipeptide und 8000 verschiedene Tripeptide, die als Substrate dienen. Damit haben die Peptidtransporter eine breite Substratspezifität, jedoch erfolgt die Substraterkennung stereospezifisch. Beide Transporter bevorzugen Peptide, die L-Aminosäuren enthalten, D-Aminosäuren verringern die Affinität von Dipeptiden, wobei sich dies in geringerem Maße in der N-, als in der C-terminalen Position auswirkt (Daniel H *et al.* 1992). Aminosäuren und Tetrapeptide zeigen keine Hemmung der Dipeptid-Aufnahme (Daniel *et al.* 1992, Fei *et al.* 1994, Boll *et al.* 1996). Die Anzahl der Substrate erhöht sich weiter dadurch, daß Peptidmimetika ebenfalls von den Peptidtransportern als Substrate erkannt werden. β -Laktam-Antibiotika, ACE-Inhibitoren (wahrscheinlich nur vom intestinalen Peptidtransporter), Peptidase-Inhibitoren und δ -Aminolävulinsäure werden unter anderem von den Peptidtransportern transportiert (Daniel H & Hergert M, 1997, Leibach FH & Ganapathy V, 1996, Döring F *et al.* 1998a). Jedoch fällt diese Substratspezifität noch breiter aus, denn eine Peptidbindung ist nicht nötig, damit ein Molekül als Substrat vom Peptidtransporter PEPT1 erkannt wird. Die Strukturanforderung wird durch zwei ionische Gruppen, eine Amino- und Carboxylgruppe, separiert durch mindestens vier Methylgruppen (Döring F *et al.* 1998b) erfüllt. Ob diese minimale Anforderungen auch bei PEPT2 gültig sind, muß noch geprüft werden. Die nachgewiesene breite Substratspezifität der Peptidtransporter kann unter anderem dazu verwendet werden, die orale Verfügbarkeit von Pharmaka in Form von Propharmaka zu ermöglichen. Zum Beispiel wird das antiviral wirkende Acyclovir oral nicht resorbiert. Wird es jedoch in Form eines „prodrugs“, als Valacyclovir angeboten, kann es effektiv in den Organismus aufgenommen werden. *In vitro* Studien haben gezeigt, daß Valacyclovir

gleichermaßen von PEPT1 und PEPT2 transportiert wird, obwohl auch dieses Substrat keine Peptidbindung enthält (Han H *et al.* 1998, Ganapathy ME *et al.* 1998).

In ihrer **Substrataffinität** unterscheiden sich die beiden Peptidtransporter signifikant. Detaillierte Studien an BSMV (Bürstensaummembranvesikeln) zeigten, daß der intestinale Peptidtransporter PEPT1 ein System niedriger Affinität und der renale Peptidtransporter PEPT2 ein System mit hoher Affinität ist. Die apparenten Michaelis-Menten-Konstanten (K_m) betragen etwa 10-250 μ M für PEPT2 in Abhängigkeit von der Substratstruktur, während sie für PEPT1 für die gleichen Substrate meist über 1 mM liegt (Daniel H & Herget M 1997). Dies trifft für die meisten physiologischen Substrate zu. Ausnahmen bilden u.a. bestimmte Penicilline, für die PEPT1 eine höhere Affinität aufweisen als PEPT2 (Ganapathy ME *et al.* 1995). Außerdem zeigt der Peptidtransporter PEPT1 eine sehr hohe Affinität für einige Substrate, wie zum Beispiel einige Dipeptide mit Alanin in der C-terminaler Position (Brandsch M *et al.* 1999).

1983 wurde nachgewiesen, daß **die treibende Kraft** des Peptidtransporters ein zelleinwärts gerichteter pH-Gradient ist. Dieser Gradient entsteht u.a. durch die Aktivität des Na^+/H^+ -Antiporters in der apikalen Membran, der im Austausch mit Natrium Protonen aus der Zelle exportiert. Folglich ist die Konzentration an Protonen im extrazellulären Raum höher als in der Zelle. Daher werden die Protonen entlang ihres chemischen bzw. elektrischen Gradienten zusammen mit Peptiden effizient in die Zelle transportiert (Ganapathy V & Leibach FH, 1983). Die Besonderheit dieser Entdeckung war, daß bis zu diesem Zeitpunkt solche Protonen/Substrat-Symporter nur bei Bakterien, einzelligen Eukaryoten und Pflanzen bekannt waren. Die Peptidtransporter waren daher die ersten protonengekoppelten Transportsysteme, die in Säugetieren entdeckt wurden. Heutzutage ist bekannt, daß dieser protonengekoppelte Transport auch bei anderen Carriersystemen in Säugetieren vorkommt, so beim Monocarboxylat-Transporter MCT1 (Garcia CK *et al.* 1994), dem Peptid/Histidin-Transporter PHT1 (Yamashita *et al.* 1997) und dem divalenten Metalionentransporter DMT1 (Gunshin H *et al.* 1997, Fleming MD *et al.* 1997). Diese Transportsysteme sind u.a. für die Aufnahme von Lactat, Pyruvat und anderen Monocarboxylaten (MCT1), Histidin, Di- und Tripeptiden (PHT1) sowie divalenten Kationen, wie Eisen, Zink u.a. (DMT1) verantwortlich.

Der pH-Gradient als treibende Kraft für den Peptidtransport in Säugetieren scheint ein Zeichen ihrer **evolutionären Konservierung** zu sein. Aminosäuresequenzvergleiche mit dem

isolierten Peptidtransporter PEPT1 aus dem Kaninchen weisen auf eine Ähnlichkeit mit dem protonengekoppelten Nitrattransporter Ch11 von *Arabidopsis thaliana* und dem Peptidtransporter Ptr2 von *Saccharomyces cerevisiae* hin. Außerdem weisen sie konservierte Aminosäureregionen auf, die auch bei den isolierten Oligopeptidtransportern DtpT von *Lactococcus lactis* und YHIP von *Escherichia coli* zu finden sind. Paulsen IT & Skurray RA (1994) fassten diese Proteine in der POT-Familie, der protonengekoppelten Oligopeptidtransporter-Familie, zusammen. Inzwischen sind weitere Mitglieder dieser Familie aus Bakterien, Hefen, Pflanzen, Invertebraten und Säugetieren kloniert worden. In Tabelle 1.1 sind diese Transporter zusammengestellt.

Organismus und Transporter	Publikation	Nachweis des protonengekoppelten Transports	Substratspezifität
<i>H. sapiens</i> hPEPT1	Liang <i>et al.</i> 1995	Ja	Di-, Tripeptide, Peptidomimetika
<i>O. caniculus</i> rbPEPT1	Fei YJ <i>et al.</i> 1994 Boll M <i>et al.</i> 1994	Ja	Di-, Tripeptide, Peptidomimetika
<i>R. norvegicus</i> rPEPT1	Saito H <i>et al.</i> 1995	Ja	Di-, Tripeptide, Peptidomimetika
<i>H. sapiens</i> hPEPT2	Liu W <i>et al.</i> 1995	Ja	Di-, Tripeptide, Peptidomimetika
<i>O. caniculus</i> rbPEPT2	Boll M <i>et al.</i> 1996	Ja	Di-, Tripeptide, Peptidomimetika
<i>R. norvegicus</i> rPEPT2	Saito H <i>et al.</i> 1996	Ja	Di-, Tripeptide, Peptidomimetika
<i>C. elegans</i> CPTA	Fei YJ <i>et al.</i> 1998b	Ja	Di- und Tripeptide
<i>C. elegans</i> CPTB	Fei YJ <i>et al.</i> 1998b	Ja	Di- und Tripeptide
<i>D. melanogaster</i> OPT1	Roman G <i>et al.</i> 1998	Ja	Di- und Tripeptide
<i>A. thaliana</i> Ch11	Tsay YF <i>et al.</i> 1993	Ja	Chlorat und Nitrat
<i>A. thaliana</i> AtPtr2A	Steiner HY <i>et al.</i> 1994	Ja	Di- und Tripeptide
<i>A. thaliana</i> AtPtr2B	Song W <i>et al.</i> 1996	Ja	Di- und Tripeptide
<i>C. albicans</i> CaPtr2	Basrai MA <i>et al.</i> 1995	Ja	Peptide*
<i>S. cerevisiae</i> Ptr2	Perry JR <i>et al.</i> 1994	Ja	Di- und Tripeptide
<i>E. coli</i> YHIP	Blattner FR <i>et al.</i> 1997	keine Daten	keine Daten
<i>L. lactis</i> DtpT1	Hagting A <i>et al.</i> 1994	Ja	Di- und Tripeptide
<i>E. coli</i> YJDL	Blattner FR <i>et al.</i> 1997	keine Daten	keine Daten

Tabelle 1.1 Mitglieder der POT-Familie, protonengekoppelte Oligopeptidtransporter-Familie. *: Die Substratspezifität ist nur unvollständig untersucht worden. Jedoch ist CaPtr2 zumindest für die Aufnahme von Di- und Tripeptiden verantwortlich.

Mit wenigen Ausnahmen transportieren die aufgeführten Transporter Di- und Tripeptide und benutzen einen zelleinwärts gerichteten pH-Gradienten als treibende Kraft. Außerdem enthalten sie Aminosäurebereiche, die im Laufe der Evolution konserviert erhalten wurden und daher möglicherweise auch für die Funktion von besonderer Bedeutung sind. Der erste konservierte Bereich, PTR2_1 genannt, umfaßt Teile der zweiten und die gesamte dritte Transmembrandomäne (PROSITE-Zugangsnummer PS01022). Der zweite, PTR2_2 genannt, befindet sich in der fünften Transmembrandomäne (PROSITE-Zugangsnummer PS01023) (Steiner HY *et al.* 1995). Vor kurzem ist eine dritte Konsensus-Sequenz vorgeschlagen worden, die die cytoplasmatische Hälfte der vierten Transmembrandomäne umfaßt (Ptr2_3: LGTGGIKPXV, Fei YJ *et al.* 1998a). Eine weitere Studie zeigt, daß die N-terminale Hälfte im Laufe der Evolution stärker konserviert wurde, als die C-terminale Hälfte (Hagting A *et al.* 1997). Der Stammbau der POT-Familie ist in Abbildung 1.2 dargestellt (Roman G *et al.* 1998).

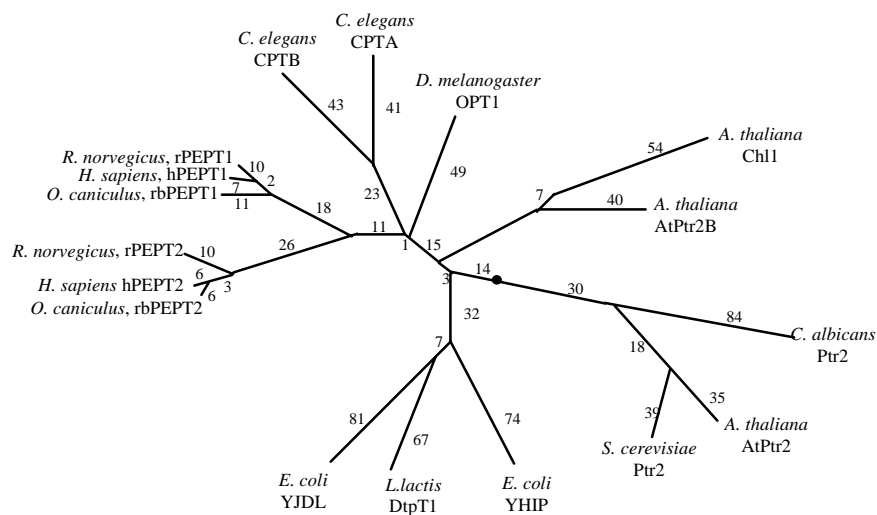


Abbildung 1.2 Stammbaum der POT-Familie. Basierend auf Roman G *et al.* 1998.

In erster Linie sind diese Proteine für die Konservierung von Amino-Stickstoff in den Organismen verantwortlich. Jedoch sind auch andere Funktionen nicht auszuschließen. In *Drosophila melanogaster* findet sich OPT1 im Darm, im Rektum, im Fortpflanzungstrakt der weiblichen Insekten, im sich entwickelnden Embryo, im Fettkörper und in Neuronen. Im Darm und Rektum ist OPT1 für die Resorption von Di- und Tripeptiden verantwortlich, vergleichbar mit der Rolle von PEPT1 und PEPT2 in Dünndarm und Niere in Säugetieren. Im Fortpflanzungstrakt der weiblichen Insekten könnte OPT1 für die Aufnahme der Hydrolyseprodukte nach der Paarung verantwortlich sein. Im sich entwickelnden Embryo befindet sich OPT1 in den Geweben, die den Embryo mit Aminosäuren für die Bildung von

Proteinen versorgen. Die Funktion im Fettkörper, ein Organ vergleichbar zur Leber in Säugetieren, oder in Neuronen muß noch geklärt werden (Roman G *et al.* 1998). In *Caenorhabditis elegans* wurde mittels semi-quantitativer RT-PCR gezeigt, daß die Expression von CPTA, das Ortholog zu PEPT2 ausgehend von der embryonalen Entwicklung bis zum adulten Wurm steigt (Fei YJ *et al.* 1998b). Sowohl dessen physiologische Funktion als auch dessen Expression in den verschiedenen Geweben muß aber noch untersucht werden. In *Arabidopsis thaliana* befindet sich AtPtr2A in der Wurzel der Pflanze (Steiner HY *et al.* 1994). AtPtr2B hat dagegen ein breiteres Expressionsmuster. Durch Northern-Blot Analyse konnte er in Wurzeln, jungen und reifen Blättern, Blüten, im Stamm und in Samen nachgewiesen werden (Song W *et al.* 1996). Aber auch hier muß die Rolle der Peptidtransporter in diesen Geweben noch geklärt werden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Peptidtransporter der Säugetiere Mitglieder der POT-Familie sind, die im Laufe der Evolution sowohl molekular als auch funktionell in bemerkenswertem Umfang konserviert worden sind. Die Proteine dieser Familie bestehen aus 12 Transmembrandomänen und besitzen diverse konservierte Aminosäurebereiche. In erster Linie scheinen sie für die Homöostase von Amino-Stickstoff in den Organismen verantwortlich zu sein. Jedoch muß noch untersucht werden, ob ihre Rolle in extraintestinalen und -renalen Geweben nicht in anderen, spezifischeren Aufgaben liegt.

1.2 Die Mitglieder der POT-Familie auf genomischer Ebene

Bei den Mitgliedern der POT-Familie ist auf der Ebene der genomischen Organisation bis dato nicht viel bekannt. Die **Exon/Intron-Struktur** von Peptidtransportern ist bisher lediglich bei einigen Invertebraten bestimmt worden. OPT1 aus *Drosophila melanogaster* besitzt danach 4 Exons, von denen durch alternatives Spleißen mit zwei unterschiedlichen ersten Exons zwei verschiedene OPT1-mRNA's gebildet werden, mit einer langen und einer kurzen OPT1 Variante (Roman G *et al.* 1998). CPTA aus *Caenorhabditis elegans* weist 17, CPTB 14 Exons auf (Fei YJ *et al.* 1998b).

Die **chromosomale Lokalisation** der Peptidtransporter dagegen ist auch beim Menschen bekannt. *Pept1* befindet sich auf Chromosom 13q33-q34 (Liang R *et al.* 1995) und das *Pept2*-Gen befindet sich auf dem Chromosom 3q13.3-q21 (Ramamoorthy S *et al.* 1995). Bei *Drosophila melanogaster* befindet sich OPT1 auf dem Chromosom X (Roman G *et al.* 1998),

und die Peptidtransporter aus *Caenorhabditis elegans*, CPTA auf Chromosom IV und CPTB auf Chromosom X (Fei YJ *et al.* 1998b).

Informationen über die **Promotorregion** liegen bisher nur bei *Pept1* aus der Ratte vor (Shiraga T *et al.* 1999). Der Transkriptionstart des *Pept1*-Gens der Ratte befindet sich 80 bp strangaufwärts des Translationstarts. Der Kernpromotor besteht aus einer TATA-Box und einer GC-Box, die sich ca. 40 bp entfernt vom Transkriptionsstart nachweisen lassen. Ältere Studien lieferten Hinweise, daß PEPT1 durch die Nahrungsaufnahme reguliert werden kann (Review: Ferraris RP & Diamond JM, 1989). In der Arbeit von Shigara *et al.* wird diese Regulation auf genomischer Ebene untersucht. Die Autoren zeigen, daß bestimmte Dipeptide und Aminosäuren die Expression von PEPT1 stimulieren können. Außerdem wird ein Sequenzbereich, der für die Regulation der Expression durch Aminosäuren verantwortlich sein könnte, vorgeschlagen. Diese erste Befunde müssen aber noch bestätigt und durch weitere Studien ergänzt werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß über die Gene der Peptidtransporter in Säugetieren außerordentlich wenig bekannt ist. Besonders die Untersuchung der Promotorregionen von *Pept1* und *Pept2* wäre hinsichtlich der Regulation der Expression dieser Gene von besonderem Interesse. Die Expression von *Pept1* wird offenbar über die Nahrungsaufnahme reguliert, über die von *Pept2* liegen bisher keine Informationen vor.

1.3 Einsatz von neuen Tiermodellen (Knockout-Mäuse) zur Aufklärung der physiologischen Bedeutung von Transportproteinen

Abwesenheit oder veränderte Expression eines Gens in einem Organismus gibt häufig Aufschluß über dessen Funktion und physiologische Bedeutung. Diese Veränderung der Expression einschließlich des völligen Fehlens des Proteins kommt beim Menschen als vererbte Krankheiten vor oder tritt bei Tieren häufig auch als spontane Mutation auf. Als Beispiel für solche Defekte in Transportproteinen sollen hier die Untereinheiten eines Aminosäuretransportsystems für die Aufnahme von Cystin und dibasischen Aminosäuren erwähnt werden (rBAT und SLC7A9). Cystinurie ist eine vererbte Krankheit, bei der es zu einer erhöhten renalen Ausscheidung von Cystin und dibasischen Aminosäuren kommt. Die schlechte Löslichkeit von Cystin bedingt häufig die Bildung von Nierensteinen, die Okklusion der Harnleiter, Infektionen und schließlich renale Insuffizienz. Die Cystinurie wird vom

klinischen Erscheinungsbild in drei Typen eingeteilt. Heterozygote Träger des Typ I zeigen eine normale Aminosäureausscheidung während die des Typ II und III eine erhöhte Ausscheidungsrate von Aminosäuren zeigen. Typ I macht ca. 60 % der Cystinurie-Fälle aus (Palacín M *et al.* 1998). 1992 wurde durch Expressionsklonierung die cDNA eines Proteins isoliert, das für die Aufnahme von Cystin und dibasischen Aminosäuren verantwortlich ist, rBAT (SLC3A1) (Bertrán J *et al.* 1992). Nur Cystinurie-Patienten des Typ I wiesen Mutationen im rBAT-Gen auf (Palacín M *et al.* 1998). Demzufolge ist eine Veränderung der Expression des rBAT-Gens nur für einen Teil der Cystinurie-Fälle verantwortlich. Durch positionelle Kartierung konnte demonstriert werden, daß der Gendefekt bei Typ III- und wahrscheinlich auch Typ II-Cystinurie zu einem anderen Locus als den rBAT-Genlocus gehört, nämlich auf 19q13.1 und nicht 2p16.3-21 liegt. Kürzlich wurde ein zweites Protein isoliert, SLC7A9, dessen DNA sich in diesem Genlocus befindet. Mutationen in diesem Gen verursachen nicht die Typ I-Cystinurie (International Cystinuria Consortium 1999).

Die OMIM-Datenbank (OMIM: On-line Mendelian Inheritance in Men, www.ncbi.nlm.nih.gov/omim) sammelt alle verfügbaren positionellen Kartierungsdaten von vererbten menschlichen Krankheiten. Wie oben erwähnt, ist die chromosomale Lokalisation des menschlichen *Pept2*-Gens bekannt, nämlich auf Chromosom 3q13.3-q21 (Ramamoorthy S *et al.* 1995). Nach der OMIM-Datenbank ist bis dato zu dieser Region keine menschliche Krankheit gekoppelt worden.

In der Natur kommen auch bei Mäusen spontane Mutationen vor. Diese Mutanten zeigen zum Teil einen auffälligen und häufig zu einer menschlichen Krankheit vergleichbaren Phänotyp (Erickson RP 1996). In gleicher Weise wie die OMIM-Datenbank, gibt es am Jackson Laboratory (Maine, USA) eine Datenbank, in der alle existierenden positionellen Kartierungsdaten spontaner Mutationen bei Mäusen gesammelt werden („Combined Mouse/Human Phenotype: Integrated MLC/OMIM Search“, www.jax.org). Gerade solche Mutanten, deren Phänotypen menschlichen Erbkrankheiten ähneln, werden genutzt, um nähere Aufschlüsse über die Art des Gendefektes und seine phänotypische Ausprägung zu erlangen. Die chromosomale Lokalisation des *Pept2*-Gens ist bei der Maus noch nicht bekannt. Jedoch weist die humane Chromosomregion 3q13.3-q21 nach der „Davis Human/Mouse Homology Relationship“-Datenbank (www.ncbi.nih.gov) eine konservierte Syntanie mit dem murinen Chromosom 16 auf. Nach der MLC-Datenbank (MLC: „Mouse Locus Catalog“) ist jedoch bisher für Chromosom 16 keine spontane Mutante kartiert worden.

Jedoch bedeutet das Fehlen einer Kopplung von PEPT2 zu vererbaren Krankheiten oder spontanen Mutanten der Maus oder anderer Säuger nicht, daß ein Defekt im *Pept2*-Gen nicht auch zu einem signifikanten Phänotyp führen kann. Eine Alternative zu spontanen Mutationen sind zielgerichtete herbeigeführte Mutationen, um die Auswirkung eines Gendefektes untersuchen zu können. Hierzu werden bevorzugt Mäuse verwendet. Die Maus dient hier als Modellorganismus, u.a. wegen der geringen Größe, dem kurzen Fortpflanzungszyklus, der umfangreichen Erfahrungen mit diesem Organismus und der Vergleichbarkeit der Phänotypen bei Maus und Mensch (Erickson RP 1996). Seit Ende der 80-iger Jahre ist es möglich, ein bestimmtes Gen in einer Maus zu inaktivieren, d.h. durch induzierte Mutation, eine sogenannte Knockout-Maus zu erzeugen. Das Gen wird dazu in embryonalen murinen Stammzellen (ES-Zellen) durch homologe Rekombination inaktiviert. Die ES-Zellen stammen aus dem Frühstadium der Entwicklung des Organismus und können so kultiviert werden, daß sie ihre Totipotenz behalten. Die veränderten ES-Zellen werden in einen sich entwickelnden Embryonen (Blastozyste) injiziert. Diese Blastocysten werden in eine scheinchwangere Maus transferiert, wo sie zu einem vollständigen Organismus heranreifen können. 1987 konnten Thomas KR & Capecchi MR erstmals ein Gen (das Hypoxanthin-Phospho-Ribosyl-Transferase-Gen, HPRT-Gen) auf diese Weise inaktivieren, indem sie durch homologe Rekombination in ES-Zellen ein bestimmtes Fragment des Gens durch eine mutierte Variante ersetzen (Thomas KR & Capecchi MR, 1987). Seitdem sind viele Knockout-Mäuse hergestellt worden, um die Funktion von Genen bzw. ihrer Genprodukte im Organismus aufzuklären. Dies ist bisher aber für Peptidtransporter-Gene nicht gelungen. Nur für Aminosäuretransportproteine sind entsprechende Knockout-Modelle etabliert worden. Neben einem Transporter für kationische Aminosäuren wurden zwei Glutamat-Transporter, einerseits EAAT2 (Tanaka K *et al.* 1997), andererseits EAAT3 (Peghini P *et al.* 1997) ausgeschaltet. Der EAAT2-Transporter wird nur in Gliazellen exprimiert. Die *EAAT2*^{-/-}-Mäuse zeigten Epilepsie als Ausdruck eines neurodegenerativen Prozesses im Hippocampus und eine höhere Empfindlichkeit zu akuten Gehirnverletzungen. Der EAAT3-Transporter wird in Neuronen, Niere und Dünndarm exprimiert. *EAAT3*^{-/-}-Mäuse zeigten keinen ausgeprägten Phänotyp, mit Ausnahme von einer leicht eingeschränkten Bewegungsfähigkeit. Demzufolge scheint EAAT2 wichtiger für die Entfernung von Glutamat aus dem synaptischen Spalt zu sein als EAAT3. Aufgrund der Expression von EAAT3 in der Niere zeigten die *EAAT3*^{-/-}-Mäuse auch eine erhöhte Ausscheidung an anionischen Aminosäuren, vermutlich aufgrund eines Defektes der Rückresorption. Eine entsprechende gestörte Ausscheidung von

Glutamat und Aspartat ist auch bei drei Patienten beschrieben worden (OMIM Nr. 222730). Es handelte sich hierbei um eine autosomal rezessive Erkrankung. Neben der erhöhten renalen Aminosäuren-Ausscheidung, zeigten die Patienten auch eine geistige Retardierung. Noch steht der Nachweis von Mutationen im *EAAT3*-Gen dieser Patienten aus (Palacín M *et al.* 1998).

Neben der reinen Ausschaltung des Gens in einem Modellorganismus kann durch bestimmte Konstrukte auch gleichzeitig seine zelluläre Lokalisation untersucht werden. Durch homologe Rekombination wird dazu ein bestimmtes Fragment des Gens durch ein mutiertes Fragment ersetzt, wobei im mutierten Fragment das β -Galactosidase-Gen unter der Kontrolle des Promotors eingefügt wird (Le Mouellic H *et al.* 1990, Mansour SL *et al.* 1990). Dies erlaubt bei einer Knockout-Maus nicht nur das Gen zu inaktivieren, sondern über den kolorimetrischen Nachweis der β -Galactosidase-Aktivität zu prüfen, in welchen Geweben es exprimiert wird.

1.4 Ziele der Arbeit

Zwar wird die primäre Funktion der Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2 in Säugetieren in der Beteiligung an der Homöostase von Amino-Stickstoff gesehen, doch gibt es auch Hinweise auf weitere physiologische Aufgaben. Knockout-Mäuse bieten sich als Modell zum Studium der Funktion der Peptidtransporter-Gene bzw. -proteine durch gezielte Inaktivierung an. Dies gilt vor allem für PEPT2, der in einer Reihe extrarenaler Gewebe exprimiert wird. Seine genomische Organisation einschließlich der Identifizierung der Promotorregion, sowie das Studium der Promotoraktivität würden darüber hinaus einen ersten Einblick in die Regulation der Expression geben.

Erstes Ziel dieser Arbeit war die Klonierung der PEPT2-cDNA aus der Niere der Maus. Die isolierte cDNA sollte molekular und funktionell charakterisiert werden, um untersuchen zu können, ob die Funktionen von PEPT2 auch in der Maus konserviert vorliegen. Wie oben bereits erwähnt, ist die genomische Struktur der Peptidtransporter-Gene aus Säugetieren noch nicht bekannt. Daher war das zweite Ziel dieser Arbeit die Isolierung des murinen *Pept2*-Gens, die Analyse dessen genomischer Organisation, sowie seine chromosomale Lokalisation in der Maus. Anschließend sollte die Promotorregion des *Pept2*-Gens identifiziert werden, um durch weitere Studien die Regulation der Expression untersuchen zu können. Darüber hinaus

sollten die Grundlagen für die Herstellung einer *PEPT2*-Knockout-Maus gelegt werden. Dafür sollten Genkonstrukte erzeugt werden, die sowohl zur Herstellung einer konventionellen Knockout-Maus dienen, als auch durch Integration des β -*Galactosidase*-Gen zum Studium der in vivo Expression im Organismus genutzt werden kann.

Die Einzelvorhaben lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Klonierung der murinen *PEPT2*-cDNA und deren molekulare und funktionelle Charakterisierung.
- Isolierung des murinen *Pept2*-Gens einschließlich Studium der genomischen Organisation, chromosomalen Lokalisation und Identifikation der Promotorregion.
- Vorarbeiten zur Erzeugung einer konventionellen Knockout-Maus mit inaktiviertem *Pept2*-Gen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Versuchstiere

Für die Entnahme von Gewebeproben und für Erzeugung des Knockouts wurden Mäuse des Inzuchtstammes *Mus musculus* C57Bl/6 und des Auszuchtstammes CD-1 verwendet. Weibliche *Xenopus laevis* Frösche (Südafrikanische Krallenfrösche) wurden für die Entnahme von Oozyten benutzt.

2.1.2 Zellen

Für die Promotoranalyse wurden die epithelialen Zelllinien LLC-PK₁ und HeLa verwendet (www.atcc.org). Für die homologe Rekombination des Targeting-Konstrukts wurden TBV2 ES-Zellen und Feederzellen benutzt, die von Dr. V. Blanquet (Institut für Säugetiergenetik, GSF-Neuherberg, Deutschland) etabliert wurden.

2.1.3 Radioaktiv-markierte Testverbindungen

Die radioaktiv-markierten Dipeptide ³H-D-Phe-Ala (1 mCi/ml) und ³H-D-Phe-Gln (1.14 mCi/ml) wurden von Zeneca (Northwich, UK) und die radioaktiv-markierten Nukleotide [α -³²P]-dCTP (3000 Ci/mmol) und [α -³⁵S]-dATP (1000 Ci/mmol) wurden von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) und ICN (Costa Mesa, USA) bezogen.

2.1.4 Geräte

Folgende Geräte wurden neben den laborüblichen verwendet: Personal Cyclor (Biometra, Göttingen, Deutschland), PCR Sprinter und PCR Express (Hybaid, Middlesex, UK), Mikroinjektor (Nanojet, Drummond, Birmingham, USA), β -Szintillationszähler LS 6500 Beckman (Palo Alto, USA), Hybridisierungsofen Shake 'n' Stack (Hybaid, Middlesex), Phospho-Imager Cyclone (Packard, Mariden, USA), automatischer DNA-Sequenzierer ALFExpressIITM (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), Fluoroskan Ascent (Labsystems, Helsinki, Finnland), Luminometer MicroBetaTriLux (EG&G Wallace, Turku, Finnland), Zentrifuge BR4 (Jouan, Saint-Herblain, Frankreich), Zentrifuge Hettich Universal 30F (Tuttlingen, Deutschland), Gene Pulser II Electroporation System (BioRad, Hercules, USA), Microflow Laminar flow Station und Microflow Biological Safety Cabinet (Nunc, Wiesbaden, Deutschland), Mikroskop Leica Wild 37 (Wetzlar, Deutschland), Steril-cult 200 Incubator (Forma Scientific, Marjetton, USA), Injektionsanlage: Mikroskop Leitz DMIRB

(Leica Wetzlar, Deutschland), Cell Tram Air und Cell Tram Oil (Eppendorf, Hamburg, Deutschland).

2.1.5 Chemikalien, Molekulabiologische Reagentien und Zellkulturbedarf

Die benutzten Chemikalien (pro analysis Qualität) wurden überwiegend von Sigma (Deisenhofen), Bachem (Bubendorf, Schweiz), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Enzyme wurden von MBI Fermentas (Vilna, Lituanien), New England Biolabs (Beverly, USA), Gibco BRL (Eggstein, Deutschland), Boehringer Mannheim (Deutschland) und AGS (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Oligonukleotide wurden von Eurogentec (Seraing, Belgien) und MWG (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Des Weiteren wurde verwendet: Marathon-Ready™ cDNA aus muriner Niere (Clontech, Palo Alto, USA), TA Cloning Kit, TOPO™ TA Cloning Kit und Zero Background/Kan Cloning Kit (Invitrogen, San Diego, USA), *in-vitro*-Transkriptions-Kit (mMessage mMachinTM, Ambion, Austin, USA), Nitrozellulosefilter (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), QIAquick Gel Extraction Kit (QUIAGEN, Hilden, Deutschland), Megaprime DNA labelling System Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), MicroSpin™ S-300HR Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), Röntgenfilm (X-OMAT MS, Kodak, Rochester, USA), Rapid-hyb Puffer (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), Nylonmembran Hybond N⁺ (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), T7Sequenase v2.0 Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), Thermo Sequenase Cy™ 5 Dye Terminator Kits (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Die benutzten Medien und zusätzlichen Reagentien in der Zellkultur wurden von Gibco BRL (Eggstein, Deutschland) bezogen. Außerdem wurde benötigt: Liposom Lipofectin (Gibco Life Technologies, Gaithersburg, USA), Dendrimer SuperFect (Quiagen, Hilden, Deutschland), Great EscApe™ SEAP Fluorescence Detection Kit (CLONTECH, Palo Alto, USA), Luciferase Assay System (Promega, Madison, USA). Die Petrischalen, Kulturplatten, und -flaschen wurden von Nunc (Wiesbaden, Deutschland) und Renner (Dannstadt, Deutschland) bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 PCR, Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht es, anhand genomischer DNA oder cDNA, das gesuchte DNA-Fragment mittels spezifischer Oligonukleotide zu amplifizieren (Mullis *et al.* 1987). Genomische DNA wurde nach der von Davis *et al.* (1986) beschriebenen Methode

isoliert. Je 10 ng genomische DNA wurden in der PCR-Reaktion eingesetzt. 50 µl Reaktionsansatz enthielten Reaktionspuffer B (60 mM Tris-SO₄, 15 mM (NH₄)₂ SO₄, 2 mM MgCl₂), 100 µM dNTP, 5 µM Sense- und Antisense-Primer und 1 U ELONGase™ Enzyme Mix (GIBCO BRL, Life Technologies, Eggstein, Deutschland). Die PCR-Fragmente wurden auf einem 1-2 %-igen Agarosegel nach Größe getrennt (Sambrook J *et al.* 1989).

2.2.2 RT-PCR, Reverse-Transkription-PCR

Gesamt-RNA wurde mit der Guanidiniumsäure/Thiocyanat/Phenol/Chloroform Methode isoliert (Chomczynski P *et al.* 1987). 5 µg RNA wurden 5 min bei 70°C denaturiert. Zu der RNA wurden in 20 µl Reaktionsvolumen neben dem Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 6 mM MgCl₂, 40 mM KCl, 5 mM DTT, 50 µg/µl BSA) je 500 µM dNTPs, 0.5 µM Antisense Primer, 40 U RNase Inhibitor (MBI Fermentas, Vilna, Litauen) und 20 U M-MULV Reverse Transkriptase (AGS, Heidelberg, Deutschland) gegeben. Die Proben wurden bei 25°C 10 min vorinkubiert und die reverse Transkription wurde bei 37°C 1 h durchgeführt. 5 µl des RT-Ansatzes wurden in die PCR-Reaktion eingesetzt. 50 µl Reaktionsansatz enthielten Reaktionspuffer (10 mM Tris pH 8.3, 50 mM KCl), 2.5 mM MgCl₂, 100 µM dNTP, je 5 µM Sense- und Antisense-Primer und 1 U Taq Polymerase (AGS, Heidelberg, Deutschland). Die Proben wurden mit Mineralöl überschichtet. Die Reaktion enthielt folgenden Schritte: Denaturierung der DNA, Amplifikation und Endsynthese. Nach Denaturierung der DNA, Amplifikation und Endsynthese wurden die PCR-Fragmente auf einem 1 %-igen Agarosegel nach Größe getrennt.

2.2.3 RACE, „Rapid Amplification of cDNA ends“

RACE ist eine PCR-Methode, die die Erweiterung des 5'- oder 3'- Endes einer spezifischen cDNA ermöglicht, mit mRNA als Ausgangsmaterial. Sie erlaubt auch die gesuchte cDNA vollständig zu amplifizieren, wenn man 5'-RACE und 3'-RACE kombiniert, indem bei beiden Produkten eine überlappende Region entsteht (siehe Abb. 2.1).

Als erster Schritt wird von der isolierten mRNA des Gewebes, in dem das untersuchte Gen exprimiert wird, der Erststrang durch reverse Transkription mit M-MULV synthetisiert (Abb. 2.1). Danach wird mit einer T4-DNA-Polymerase der Zweitstrang hergestellt und anschließend mit einer T4-DNA-Ligase Adaptoren an die Enden geknüpft. Solche ‚cDNA-Bibliotheken‘ sind kommerziell verfügbar. Um die PEPT2-cDNA aus der Maus zu isolieren,

wurde die Marathon-Ready™ cDNA benutzt, die von mRNA aus muriner Niere hergestellt wurde (Clontech, Palo Alto, USA).

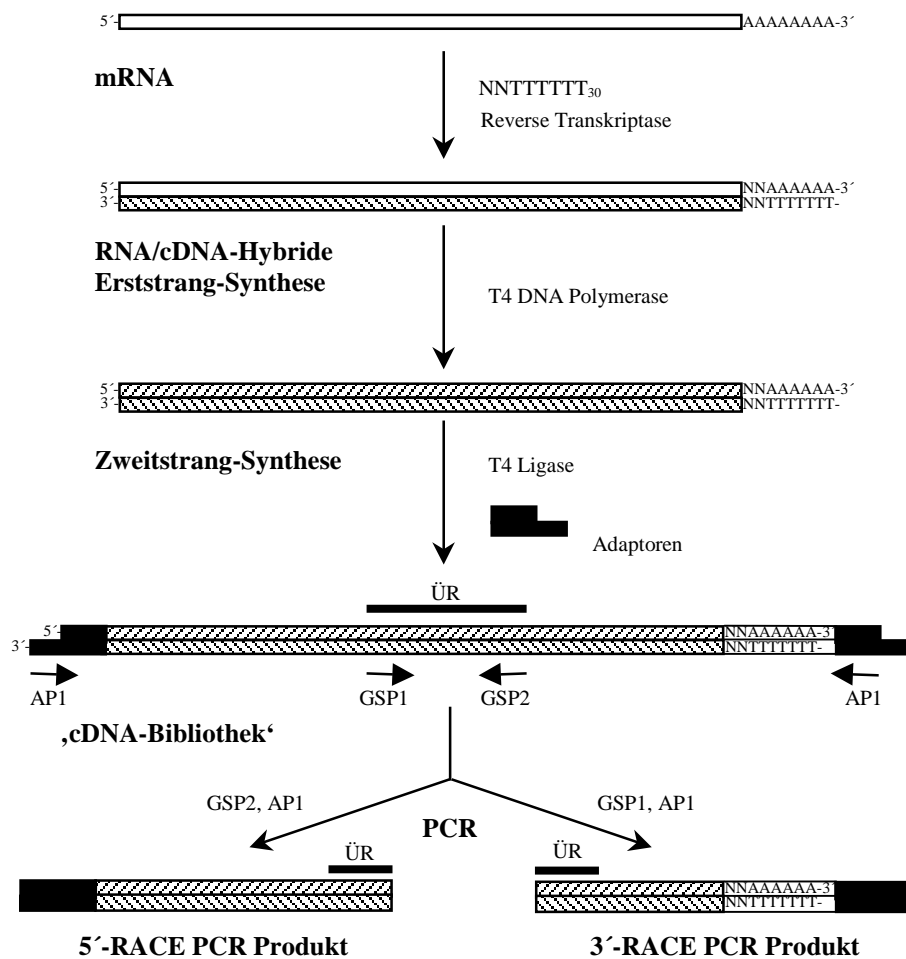


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der RACE-Methode. ÜR: Überlappende Region. AP1: Adaptoren Primer 1. GSP: Gen spezifische Primer. ‚cDNA-Bibliothek‘: linearisierte cDNA-Bibliothek mit Adaptoren an den Enden verknüpft.

Mit den Primerpaaren AP1-M2B1806 und M2F1229-AP1 (Sequenzen siehe Anhang III) wurden jeweils 5'RACE und 3'RACE-Läufe durchgeführt. Der Adaptor-Primer AP1 wurde im Marathon-Ready™ Kit mitgeliefert. Die murinen PEPT2-spezifischen Primer wurden nach folgenden Charakteristika ausgewählt: a) nach üblichen Eigenschaften von Oligonukleotiden: 20-30 Basenpaare, 50-70% GC-Gehalt, mit maximal 2 A- oder T-Nukleotiden am 5'- oder 3'-Ende und um Selbstbindung zu vermeiden, keine länger als 3 Nukleotide umfassenden komplementären Sequenzbereiche und b) zusätzliche Bedingung: $T_m \geq 70^\circ\text{C}$ (berechnet für 1 M Salzkonzentration) um die sogenannte „Touchdown-PCR“ durchführen zu können (Don RH *et al.* 1991). „Touchdown-PCR“ erlaubt ‚unechte‘ Amplifikationsprodukte zu vermeiden, indem man die Temperatur während der Anheftung der Oligonukleotide an die DNA-Moleküle („annealing temperature“) mit steigender Zyklenzahl absenkt. Dieses Verfahren erhöht die Wahrscheinlichkeit, echte PCR-Produkte zu amplifizieren.

Die 50 µl-RACE Reaktionen enthielten 5 µl Marathon-Ready™ cDNA aus muriner Niere (0.1 ng/µl in Tricine-EDTA Puffer, Clontech, Palo Alto, USA), Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5mM MgCl₂ und 0.001% Gelatine), 100 µM dNTPs, je 5 µM Sense- und Antisense-Primer und 1 U Advantage™ Klen Taq Polymerase Mix (Clontech, Palo Alto, USA). „Touchdown PCR“ wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Denaturierung 94°C 2 min, (94°C 1 min, 72°C 5 min) × 5 Zyklen, (94°C 1 min, 70°C 5 min) × 5 Zyklen, (94°C 1 min, 68°C 5 min) × 25, 30 oder 35 Zyklen und 68°C 10 min als Endsynthese.

2.2.4 Klonierung der PCR- und RACE-Produkte

Die PCR- und RACE-Produkte wurden mit dem TA Cloning Kit (Invitrogen, San Diego, USA) in die Plasmide pCR2.1 oder pCRII, oder mit dem TOPO™ TA Cloning Kit in das Plasmid pCRII-TOPO kloniert (Plasmide: siehe Anhang III). Die Klonierung wurde aufgrund der Nebenaktivität bestimmter Taq-Polymerasen, die an den 3'-Enden der PCR-Produkte überhängende dATPs anfügen, durchgeführt. Dies ermöglicht die Ligation mit dem linearisierten Plasmid (im Kit mitgeliefert), das an dessen 5'-Enden die komplementären dTTPs überhängend aufweist. Vorteil des TOPO™ TA Cloning Kit ist, daß die Ligation in nur 5 min mittels einer Topoisomerase I durchgeführt werden kann. Die Ligation und die Transformation in kompetente TOP10F'-*E. coli*-Bakterien wurden nach Anweisung der Hersteller durchgeführt (siehe TA- und TOPO™ TA-Cloning Kit Manual, www.invitrogen.com).

2.2.5 Expression des PEPT2-Proteins in *Xenopus laevis* Oocyten

Funktionelle Charakteristika von elektrogenen Membrantransportproteinen können ausgezeichnet in den *Xenopus laevis* Oocyten als Expressionssystem untersucht werden (Gurdon *et al.* 1971).

a) Oocytenbehandlung und -injektion von PEPT2-cRNA

Synthese der cRNA

Nach der Sequenzierung des PEPT2-cDNA-Klons wurde festgestellt, daß das 3'-RACE-Produkt eine Mutation enthielt, die ein Stopcodon generierte und somit zu der Prozessierung eines kleineres PEPT2-Proteins geführt hätte. Deswegen wurde für die funktionelle Charakterisierung des murinen PEPT2-Proteins der Offene Leserahmen durch RT-PCR aus renaler RNA der Maus, mit dem Senseprimer M2F-51 und dem Antisenseprimer M2B2216

(Sequenzen siehe Anhang III) amplifiziert. Für einen direkten Funktionsvergleich wurde die bereits isolierte Kaninchen-cDNA (Boll *et al.* 1996) benutzt. Die PEPT2-cRNA von Maus und Kaninchen wurde mittels eines *in-vitro*-Transkriptions-Kits (mMessage mMachinTM, Ambion, Austin, USA) nach dem Protokoll des Herstellers synthetisiert.

Oocytenbehandlung und Injektion

Die Oocyten wurden aus dem Bauchraum des anästhetisierten Frosches entnommen, mit ORII-Lösung (82.5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES/Tris, pH 7.4) gewaschen und nachfolgend mit Kollagenase A (Boehringer Mannheim) über Nacht behandelt (10 ml Oocyten in 10 ml ORII-Lösung mit 1 mg/ml Kollagenase). Danach wurden die Oocyten mehrmals mit ORII-Lösung zur Entfernung der Kollagenase gewaschen und zuletzt mehrfach mit modifizierter BARTH-Lösung (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.82 mM MgSO₄, 0.41 mM CaCl₂, 0.33 mM Ca(NO₃)₂, 2.4 mM NaHCO₃, 20 mg/l Gentamycin, 10 mM HEPES/Tris, pH 7.4) gewaschen. Funktionsfähige Oocyten der Wachstumsstadien V und VI wurden aussortiert und über Nacht bei 18°C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde mit einem Mikroinjektor (Nanojet, Drummond, Birmingham, USA) entweder 30 nl Wasser (Kontrolle) oder 30 nl cRNA-Lösung mit 10 ng Maus- oder Kaninchen-PEPT2-cRNA injiziert. Bis zum Fluxexperiment (3 Tage nach der Injektion) wurden die Oocyten in modifizierter BARTH-Lösung bei 18°C aufbewahrt.

b) Fluxstudien

Zur funktionellen Charakterisierung der Peptidtransporter PEPT2 wurden zunächst die optimalen Bedingungen für die Aufnahmemessungen ermittelt, u.a. die Abhängigkeit der Expressionshöhe von der Anzahl der Inkubationstage und Menge (ng) der injizierten cRNA. Die funktionelle Charakterisierung wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt. 8 Oocyten pro Ansatz wurden 2 min in Inkubationspuffer vorinkubiert (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM Hepes/Tris für pH >6.5 oder 5 mM Mes/Tris für pH ≤ 6.5) und durch Inkubationspuffer mit 1 nM ³H-D-Phe-Ala (1 mCi/ml, Zeneca, Northwich, GB) oder 1.1 nM ³H-D-Phe-Gln (1.14 mCi/ml, Zeneca, Northwich, GB) ersetzt und 30 min bei RT inkubiert. Durch Absaugen der Lösung und dreimaliges Waschen der Oocyten mit jeweils 4 ml eiskalter modifizierter BARTH-Lösung wurde die Inkubation gestoppt. Jede Oocyte wurde einzeln in ein Szintillationsgefäß überführt und mit 150 µl 10 %-igem SDS 1-2 h solubilisiert. Nach Zusatz von je 4 ml Szintillationsflüssigkeit wurde die enthaltene Radioaktivität mit einem β-Szintillationszähler (LS 6500, Beckman, Palo Alto, USA)

gemessen. Die Aufnahmeraten der Peptide in mit Wasser injizierten Oocyten wurde von denen mit cRNA injizierten Oocyten abgezogen. Für Hemmstudien wurden die Oocyten mit dem radioaktive Substrat in Ab- oder Anwesenheit von 1 mM der potentiellen Effektoren inkubiert.

c) Zwei-Elektroden-Spannungsklemmtechnik („Two electrode voltage clamp“)

Die elektrophysiologischen Messungen wurden mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmtechnik durchgeführt. Diese Methode erlaubt es, den Strom, der zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials der Oocyte (Haltestrom) notwendig ist, zu registrieren. Ein elektrogener Substrattransport führt aufgrund eines positiven Einwärtsstromes zu einem erhöhten Haltestrom für das Membranpotential und kann somit direkt registriert werden. Die Messungen wurden mit Wasser- und mit cRNA-injizierten Oocyten 3 Tage nach Injektion durchgeführt. In die Oocyte wurde dazu eine Potentialelektrode und eine Stromelektrode eingestochen und danach mit modifizierter BARTH-Lösung (pH 6.0) perfundiert. Das Membranpotential entspricht dem Unterschied der Spannungswerte zwischen der Potentialelektrode (Cytoplasma der Oocyte) und der Referenzelektrode, letztere liegt im Inkubationsmedium (extrazellulärer Raum). Die Stromelektrode erlaubte es, einen Strom einzuspeisen, der ein konstantes Membranpotential der Oocytenmembran aufrechterhalten kann. Nach Erreichen eines konstanten Membranpotentials bzw. konstanten Haltestroms (bei -60 mV) wurde der Inkubationspuffer gegen modifizierte BARTH-Lösung, die das zu testende Substrat enthielt, ausgetauscht. Die Perfusion wurde durchgeführt, bis ein konstanter neuer Haltestrom erreicht wurde. Danach wurde das Substrat mit modifizierter BARTH-Lösung ausgewaschen.

Strom-Spannungskurven wurden erfaßt, indem das Membranpotential im Bereich von -160 mV bis $+90$ mV in 0.2 Sekundenabständen und in 10 mV Schritten auf die entsprechenden Potentiale klemmt. Das Membranpotential wurde jeweils 100 ms auf den induzierten Potentialen gehalten und der notwendige Haltestrom wurde während der letzten 30 ms registriert. Die Daten wurden nach Subtraktion der Kontrollwerte als Stromfluß für ein gegebenes Membranpotential aufgetragen.

2.2.6 Homologie-Screening

Mit der Homologie-Screening-Methode können gesuchte DNA-Klone identifiziert werden, wenn mindestens ein Teil der Sequenz bekannt ist. Entsprechende DNA-Bibliotheken sind in transformierten *E. coli*-Bakterien verfügbar. Man kann einen Replikafilter von Agarplatten

erstellen oder die Klone auf einem „high-density“ Filter auftragen und danach mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde, deren Sequenz homolog zur gesuchten cDNA ist, hybridisieren. Die so identifizierten *E. coli*-Kolonien dienen der Isolierung der DNA und ihrer Analyse.

a) Herstellen der Replikafilter von *E. coli*-Agarplatten

Die *E. coli*-Kolonien wurden über Nacht bei 37°C auf Agarplatten inkubiert (Sambrook *et al.* 1989). Nach einstündiger Lagerung bei 4°C wurden Nitrozellulosefilter (Amersham Pharmacia Biotec, Uppsala, Schweden) 2 min auf die Agarplatte gelegt. Die Replikafilter wurden 2×2 min mit 750 µl 0.5 M NaOH inkubiert und die DNA dadurch fixiert. Nachfolgend wurden die Filter 2×2 min mit 750 µl Tris-HCl pH 7.5 neutralisiert und bei Raumtemperatur getrocknet.

b) Herstellen der „high density“-Filter

Die Bank muriner genomischer DNA wurde auf 10 „high density“ Filter vom RZPD (Ressourcen Zentrum der Deutschen Human Genom Projekt) geliefert (siehe 3.2.1b). Die *E. coli*-Kolonien werden in 384-well Agarplatten kultiviert. Ein Roboter erlaubt es dann, die Kolonien von den Agarplatten auf eine 22×22 cm große positiv geladene Nylonmembran zu transferieren. Diese „high-density“ Filter wurden wie oben beschrieben fixiert, neutralisiert und getrocknet. Die Kolonien sind in 48×48 Boxen auf dem Filter verteilt und jede Box enthält 5×5 *E. coli*-Kolonien. Alle unabhängigen Kolonien sind zwei Mal auf den Filter transferiert worden, um die Identifikation positiver Klone zu erleichtern, indem sie in einem bestimmten Muster in der 5×5 Box angeordnet wurden. In Abbildung 2.2 sind die 12 verschiedenen Muster dargestellt.

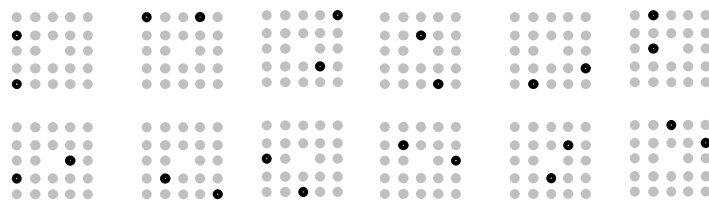


Abbildung 2.2 Muster der doppelten Auftragung der *E. coli*-Kolonien auf einem „high density“ Filter. Jede Gruppe von *E. coli*-Kolonien repräsentiert ein 5×5 Box. •:doppelt transferierte Kolonien. In der Mitte der Box wurden keine Kolonie aufgetragen. Abbildung nach RZPD (www.rzpd.de).

c) [α -³²P]-dCTP-Markierung einer DNA-Sonde

2 μ g Plasmid-DNA wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen 1 h bei 37°C verdaut. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden in einem 0.8-1 %-igen Agarosegel nach Größe getrennt. Das als Sonde ausgewählte DNA-Fragment wurde aus der Agarose eluiert (QIAquick Gel Extraction Kit, QUIAGEN, Hilden, Deutschland). 50 ng DNA und 50 μ Ci [α -³²P]-dCTP (1000 Ci/mmol) wurden für die Synthese einer radioaktiv markierten Sonde eingesetzt. Die Markierungsreaktion wurde mit dem Megaprime DNA labelling System Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Freies [α -³²P]-dCTP wurde mit einer MicroSpinTM S-300HR Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) abgetrennt. Die spezifische Aktivität der Sonde wurde mit einem β -Szintillationszähler gemessen.

d) Hybridisierung

Die Replikafilter und die Southern Blots (siehe 2.2.10) wurden nach einstündiger Prähybridisierung bei 65°C mit Church Puffer (7 % w/v SDS, 0.5 M Natriumphosphatpuffer pH 7.2, 1 mM EDTA, 5 mg/ml BSA) über Nacht bei 65°C mit 1×10^6 cpm/ml DNA-Sonde in Church Puffer hybridisiert. Die Filter wurden 20 min mit Waschpuffer A (200 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.2, 0.1% w/v SDS) und 20 min mit Waschpuffer B (100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.2, 0.1% w/v SDS) bei 65°C behandelt und danach in eine Polypropylenfolie eingepackt und 4 - 24 h bei -70°C auf einem Röntgenfilm (X-OMAT MS, Kodak, Rochester, USA) exponiert.

Die „high-density“ Filter, wie auch die Northern Blots (siehe 2.2.11) wurden 30 min bei 65°C mit „Rapid-hyb“ Puffer (Amersham Pharmacia, Biotech, Uppsala, Schweden) prähybridisiert. Danach wurden die Filter mit 1×10^6 cpm/ml DNA-Sonde in „Rapid-hyb“ Puffer 2 h bei 65°C hybridisiert. Die Filter wurden 20 min bei RT mit Waschpuffer A ($2 \times$ SSC, 0.1 % w/v SDS) und 2×15 min bei 65°C mit Waschpuffer B ($0.5 \times$ SSC, 0.1 % w/v SDS) behandelt. Die Filter wurden auf einer Phosphoimager-Platte 30 min bis 1 h exponiert und im Phosphoimager (Cyclone, Packard, Mariden, USA) gescannt.

2.2.7 PAC-DNA-Isolierung

Isolierung von kleinen Mengen an PAC-DNA (Miniprep)

Eine „PAC-DNA-Miniprep“ wurde genutzt, um Southern Blots durchzuführen. Die Lösungen vom „FlexiPrep Kit“ (Amersham Pharmacia, Biotech, Uppsala, Schweden) wurden nach folgendem modifiziertem Protokoll verwendet: Die gelieferten Klone (Tabelle 3.2) in DH10B-

Bakterien wurden auf LB-Agar-Platten (LB-Medium: 1% (w/v) Bacto-tryptone, 0.5 % (w/v) Bacto-Hefe-Extract, 1 % (w/v) NaCl, pH 7.0) mit 30 µg/ml Kanamycin ausgestrichen und bei 37°C über Nacht kultiviert. Einzelne Kolonien wurden in 10 ml LB-Medium mit 30 µg/ml Kanamycin über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden 10 min bei 6000 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und 300 µl Lösung I zugegeben. Nach leichtem Mischen wurde 600 µl Lösung II zugegeben und nach erneutem Mischen 450 µl Lösung III hinzupipettiert. Anschließend wurde die Lösung 10 min bei 20000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 0.7 Volumenanteile Isopropanol zugegeben. Nach Mischen und 20 minütiger Inkubation bei RT wurden die Proben 15 min bei 20000 g zentrifugiert und mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde in 40 µl sterilem Wasser gelöst.

Isolierung von größeren Mengen an PAC-DNA (Maxiprep)

Vom Klon RCPIP711F17603Q3 (Klon Nummer 8) wurden größere Mengen an PAC-DNA isoliert, um das *Pept2*-Gen charakterisieren zu können (siehe 3.2.2). Der Klon in DH10B-Bakterien wurde auf LB-Agar-Platten mit 30 µg/ml Kanamycin ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Eine einzelne Kolonie wurde in 5 ml LB-Medium mit 30 µg/ml Kanamycin 5 h bei 37°C kultiviert. 100 µl dieser Kultur wurden in 50 ml frisches LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C angezogen. Am nächsten Morgen wurden 25 ml der Vorkultur in 800 ml frisches LB-Medium überführt und bis zu einer optischen Dichte $OD_{590} = 0.1$ bei 37°C kultiviert (ca. 3 Stunden). Die Bakterien wurden mit IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert und weitere 4 h bei 37°C inkubiert. Die PAC-DNA wurde mit dem Maxiprep QUIAGEN kit (Hilden, Deutschland) nach Anweisungen des Herstellers präpariert. Die einzige Abänderung der Methode bestand darin, daß die Elution mit zuvor auf 70°C erhitztem Elutionspuffer durchgeführt wurde.

2.2.8 Subklonierung von PAC-DNA-Fragmenten

Die PAC-DNA des Klons Nr. 8 enthält ein ca. 200 kb langes Insert. Demzufolge mußten Fragmente subkloniert werden, um die DNA sequenzieren zu können. Dazu wurden 2 µg PAC-DNA mit 10 U des jeweiligen Restriktionsenzym 1 h bei 37°C inkubiert. Nach 10 minütiger Inaktivierung des Restriktionsenzym bei 65°C wurde die DNA nach Zugabe von 3 Volumenanteilen 100 %-igem Ethanol und 0.1 Volumenanteilen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) bei -20°C über Nacht gefällt. Die Proben wurden 20 min bei 20000 g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes und Waschen mit 70 %-igem Ethanol wurde das Pellet

luftgetrocknet und in sterilem Wasser aufgenommen. Die Ligation und die Transformation wurden mit Hilfe des Zero BackgroundTM /Kan Cloning Kits (Invitrogen, San Diego, USA) nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. In der Ligation wurden 100 ng verdaute PAC-DNA-Fragmente und 10 ng linearisiertes pZErOTM-Plasmid eingesetzt. 10 % des Ligationsansatzes wurde zur Transformation in TOP10-Bakterien (Invitrogen, San Diego, USA) eingesetzt. Die gesuchten Klone wurden durch Homologie-Screening identifiziert (siehe 2.2.6).

2.2.9 Western-Blot

Je 60 µg Protein wurden auf einem 10 %-iges SDS-Gel aufgetragen und nach Größe getrennt. Die Proteine wurden durch Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran, mit Hilfe des „Semi-dry-Blotters“ von BioRad (California, USA) entsprechend den Anweisungen des Herstellers übertragen. Die auf der Nitrozellulosemembran gebundenen Proteine wurden mit Ponceau S (0.2% w/v Ponceau S in 3% w/v Sulfosalicylsäure und 0.1% Essigsäure) reversibel gefärbt vor allem um die Markerproteine zu markieren und um die Effizienz des Transfers zu beurteilen. Die Membran wurde mit Wasser entfärbt und 1 h bei RT mit 2-5 g Magermilchpulver in 50 ml PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ und 1.8 mM KH₂PO₄) blockiert. Die Blockierungslösung wurde durch Waschen (3×5 min) mit PBS entfernt und die Membran 1 h mit einem polyklonalen anti-PEPT2/CT Antikörper inkubiert (Döring *et al.* 1998c). Ungebundene Antikörper wurden durch (3×5 min) Waschen mit PBS entfernt. Nachfolgend wurde die Membran 1h mit anti-Kaninchen IgG-Antikörper (gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase) bei RT inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen mit PBS (3×10 min) entfernt, und die Membran wurde anschließend mit 3-Amino-9-Ethylcarbazol gefärbt (Färbelösung: 0.04% w/v 3-Amino-9-Ethylcarbazol, 5% Dimethylformamid, 50 mM Acetatpuffer pH 5.0 und 0.015% Wasserstoffperoxid). Nach 1-10 min Inkubation im Dunkeln wurde die Farbentwicklung mit Wasser gestoppt und der Blot getrocknet.

2.2.10 Southern-Blot

DNA-Moleküle können auf eine Nylonmembran transferiert und nachfolgend mit einer markierten DNA-Sonde detektiert werden (Southern E 1975). 10 µg genomische DNA, 100 ng PAC-DNA oder 10 ng Plasmid-DNA wurden auf einem 0.8-1 %-igen Agarosegel durch Elektrophorese nach Größe getrennt. Um einzelsträngige DNA zu gewinnen, wurde das Gel 30 min mit Denaturierungslösung (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) behandelt. Daran anschließend

wurde das Gel 45 min mit Neutralisierungslösung (1.5 M NaCl, 1 M Tris-HCl pH 7.4) gewaschen und in 10×SSC (20×SSC: 3 M NaCl, 0.34 M Natriumcitrat, pH 7.5) 15 min vorinkubiert. Mit der Kapillarkraft-Methode wurde über Nacht die DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N⁺, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) transferiert (Sambrook *et al.* 1989). Die Membran wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert, um die gesuchten DNA- Fragmente zu detektieren (siehe 2.2.6).

2.2.11 Northern-Blot

Auch RNA-Moleküle können auf eine Nylonmembran transferiert werden und mit einer markierten DNA- oder RNA-Sonde detektiert werden. 5 µg Gesamt-RNA, versetzt mit 3 Volumen Ladungspuffer (500 µl Formamid, 70 µl 14.3 × MOPS und 180 µl Formaldehyd 37 %) und 0.9 Volumenanteilen Probenpuffer (40 % Sucrose, 0.25 % Bromphenolblau und 1/100 (V/V) Ethidiumbromid 10 mg/ml) wurden auf einem 1 %-igen RNA-Gel (0.6 g Agarose, 32.5 ml steriles Wasser, 4 ml 10×MOPS, 3.3 ml 37 % Formaldehyd) im elektrischen Feld nach Größe getrennt. Als Laufpuffer wurde 1 × MOPS benutzt (10×MOPS: 0.2 M 3-(N-morpholinopropansulfonsäure, 0.05 M Natriumacetat, 0.01 M EDTA). Nach der Elektrophorese wurde das Gel 30 min mit Denaturierungspuffer (50 mM NaOH, 10 mM NaCl) und 30 min mit Neutralisierungspuffer (100 mM Tris pH 7.5) behandelt. Vor dem Transfer wurde das Gel 30 min in 10 × SSC equilibriert. Mit der Kapillarkraft-Methode wurde über Nacht die RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N⁺, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) transferiert (Sambrook *et al.* 1989). Nach UV-Fixierung der transferierten RNA-Moleküle wurde die Membran mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisiert. Dazu wurde das Ultrahyb System (Ambion, Austin, USA) nach Anweisung des Herstellers benutzt, um die gesuchten RNA-Moleküle zu detektieren (siehe 2.2.6).

2.2.12 Radiation Hybrid Mapping

„RH Mapping“ ist eine Methode zur chromosomalen Lokalisation eines bekannten Gens. Voraussetzung dafür ist die Verfügbarkeit eines „RH Panels“ mit der Lokalisation verschiedener Marker und der Zugang zu den RH-Daten über eine entsprechende Datenbank. Für das murine Genom ist das „T31 Mouse RH Panel“ (McCarthy LC *et al.* 1997) von Research Genetics (Huntsville, USA) verfügbar. Das „T31 Mouse RH Panel“ wurde hergestellt, indem die genomische DNA embryonaler Stammzellen, isoliert aus einer 129/aa-Maus, durch Röntgenstrahlung fragmentiert wurde. Die so behandelten Zellen wurden mit der

A23-Zelllinie, isoliert aus Hamster, fusioniert. Die fusionierten Zellen wurden mit Hilfe des Markers Thymidinkinase (tk) selektioniert, da die A23-Zellen tk-defizient sind. Sowohl die Zellen, die nur das Genom des Hamster enthalten als auch die Zellen mit dem fragmentierten murinen Genom sind im selektiven Medium nicht lebensfähig. Demzufolge besitzen die lebensfähigen DNA-Hybride, das heißt, sie enthalten das Genom des Hamster, in das Fragmente des murinen Genoms integriert sind. Das „T31 Mouse Radiation Hybrid Panel“ besteht aus 100 unabhängigen DNA-Hybriden.

Am Jackson Laboratory (Maine, USA) ist die „Mouse RH Database“ via Internet verfügbar (www.jax.org). Diese Datenbank enthält alle bekannten „RH Mapping“ Daten, überwiegend von verschiedenen Mikrosatelliten, aber auch von ESTs („Expressed Sequence Tags“) und Genen. Alle hier beschriebenen Studien wurden mit dem oben genannten RH-Panel durchgeführt. Mikrosatelliten sind kleine Sequenzabschnitte, ungefähr 10 bp lang, die reich an A- T- oder G- C-Nukleotiden, sie werden genutzt, um Kopplungsstudien durchzuführen.

„RH Mapping“ wird mit PCR-Reaktionen durchgeführt. Mit dem Panel wurde auch als Kontrolle genomische DNA aus 129/aa-Mäusen und A23-Zelllinien mitgeliefert. Als erster Schritt wurden mit Hilfe der Kontroll-DNA verschiedene PCR-Reaktionen durchgeführt, um die Oligonukleotide und die Bedingungen zu bestimmen, mit denen selektiv ein Fragment des murinen *Pept2*-Gens amplifiziert werden konnte. Unter diesen Bedingungen wurde die PCR mit 25 ng der 100 DNA Hybride durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden an das Jackson Laboratory geschickt und mit der Datenbank verglichen. Durch statistische Analysen kann die Lokalisation des untersuchten Gens im Vergleich zu Markern und somit dessen chromosomale Lokalisation bestimmt werden.

2.2.13 Promotor-Analyse

Für die Promotor-Analysen wurde der Great EscAPe™ SEAP Fluorescence Detection Kit verwendet (CLONTECH, Palo Alto, USA). In diesem Kit wird als Reporter-Molekül die sezernierte Form der Alkalischen Phosphatase aus menschlicher Plazenta genutzt (Berger J *et al.* 1988). Die Identifizierung der Promotorregion wurde in zwei unterschiedlichen Zelllinien mit verschiedenen Fragmente des 5′-Endes des murinen *Pept2*-Gens durchgeführt. Diese Fragmente wurden in den pSEAP-Vektor kloniert und damit LLC-PK₁- und HeLa-Zellen transfiziert.

a) Kultivierung der LLC-PK₁- und HeLa-Zelllinien

Die LLC-PK₁-Zelllinie ist nach Beschreibung der ATCC (American Type Culture Collection) eine renale epitheliale Zelllinie. Sie wurde von der Niere eines 3-4 Wochen alten männlichen Schweines kultiviert (Hull *et al.* 1976). Diese Zelllinie exprimiert endogen den Peptidtransporter PEPT2. Aufnahmestudien zeigen, daß die Aktivität der Peptidtransporter erst nach 9 Tagen postklonfluenz meßbar wird, wobei die funktionellen Charakteristika typisch für PEPT2 sind (Wenzel U *et al.* 1998).

Die HeLa-Zelllinie ist eine humane epitheliale Zelllinie. Sie wurde aus einem Adenokarzinom aus Cervix einer 31 Jahre alten amerikanischen Frau isoliert (www.atcc.org). Es gibt bis jetzt keinen Nachweis, daß der Peptidtransporter PEPT2 in dieser Zelllinie exprimiert wird. Dennoch wurde diese Zelllinie gewählt, weil sie einen sehr guten Transfektionswirt darstellt.

Medium zur Kultivierung der Zellen

Zur Kultivierung der LLC-PK₁-Zellen wurde folgendes Medium eingesetzt: Zu 500 ml Eagle Medium (DModEM) wurden 5 ml nicht-essentielle Aminosäuren (100fach konzentriert), 5 ml 100 mM Natriumpyruvat, 5 ml 1 M HEPES, 5 ml 200 mM Glutamin, 5 ml 1000 IU/ml Penicillin-Streptomycin und 58 ml FKS (fötales Kälberserum) zugegeben. Alle Produkte wurden von Gibco BRL (Eggstein, Deutschland) geliefert.

Zur Kultivierung der HeLa-Zellen wurde folgendes Medium benutzt: Zu 500 ml Eagle Medium (DModEM) wurden 5 ml 100 mM Natriumpyruvat, 5 ml 1 M HEPES, 5 ml 200 mM Glutamin, 5 ml 1000 IU/ml Penicillin-Streptomycin und 58 ml FKS zugegeben. Auch hier stammten alle Produkte von Gibco BRL (Eggstein, Deutschland).

Einfriermedium: Für beide Zelllinien wurden entsprechende Medium jedoch ohne Glutamin und Penicillin-Streptomycin, aber mit Zusatz von 15 % FKS und 10 % DMSO zur Gefrierlagerung verwendet.

Behandlung der Zellen

Zellen aus einem im Stickstoff-Tank gelagerten Cryo-Vial wurden bei 37°C aufgetaut und in 5 ml Medium überführt, 5 min bei 350 g zentrifugiert und nach Abnahme des Überstandes in 5 ml Medium resuspendiert und in eine 25 cm²-Flasche überführt. Nach 2 Tagen wurde das Medium gewechselt bzw., wenn die Zellen 80-90% konfluent waren, in eine neue Flasche überführt. Zur Passage der Zellen wurde das Medium abgesaugt und 1 ml Trypsin (0.05% Trypsinlösung, 0.02% EDTA in PBS) zugegeben. Nach einer Einwirkzeit von 3-5 min bei 37°C zur Vereinzelung der Zellen wurde 6 ml Medium zugegeben und die Zellzahl bestimmt.

Dazu wurden 20 µl Zellen mit 80 µl Trypanblaufärbung (zur Markierung der toten Zellen) gemischt und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (Durchschnittszahl in den 4 Quadranten der Kammer $\times 10^4 =$ Zellen/ml). Nach der Zellzahlbestimmung wurden 1.5×10^6 LLC-PK₁-Zellen oder HeLa-Zellen in eine 75 cm²-Flasche überführt. Das Medium wurde im Zyklus von 2 Tagen gewechselt oder die Zellen wurden nach Bedarf passagiert. Nach Beendigung der Versuche bzw. um die Zellen in niedrigen Passagen zu halten, wurden sie eingefroren. Dafür wurde eine 75 cm²-Flasche bei 80-90% Konfluenz mit 2 ml Trypsinlösung behandelt. Nach Vereinzeln wurden 4 ml Einfriermedium zugegeben und je 1 ml der Zellsuspension in Cryovials verteilt. Die Zellen wurden über Nacht langsam in einem Cryo-Einfriergefäß (Merck, Darmstadt, Deutschland) bei -80°C eingefroren und anschließend in einem Stickstoff-Tank aufbewahrt.

b) Klonierung der Reporterkonstrukte

Es wurden 7 Klone für die Promotoranalyse hergestellt. 7 Fragmente aus dem 5'-Ende des *Pept2*-Gens wurden in den pSEAP-Enhancer-Vektor (siehe Anhang III) kloniert. Der pSEAP-Enhancer-Vektor enthält die kodierende Region des Reportergens ohne Promotor. Nur wenn ein Fragment, das Promotoraktivität besitzt, strangaufwärts dieser Region ligiert wurde, kommt es zur Transkription und Sekretion der Alkalischen Phosphatase. Nachfolgend wird die Klonierung der einzelnen Konstrukte beschrieben:

1. *Klon Pept2*^{-2767/+234}: Der Subklon SacI4.6-pCRII (siehe Abb. 3.24) wurde mit *HindIII* und *EcoRI* verdaut. Der pSEAP-Enhancer-Vektor wurde mit *HindIII* und *EcoRI* verdaut. Das entstandene 3002 bp große genomische Fragment wurde in den pSEAP-Enhancer-Vektor kloniert.
2. *Klon Pept2*^{-2767/-286}: Der Subklon SacI4.6-pCRII (siehe Abb. 3.24) wurde mit *KpnI* und *ClaI* verdaut. Der pSEAP-Enhancer-Vektor wurde mit *KpnI* und *Bsp119I*, dem Isoschizomer von *BstBI*, verdaut. Dieses Restriktionsenzym erzeugt kompatible kohäsive Enden mit denen beim *ClaI*-Verdau im Insert erzeugten Enden. Das entstandene 2485 bp große genomische Fragment wurde aus SacI4.6-pCRII in den pSEAP-Enhancer-Vektor kloniert.
3. *Klon Pept2*^{-2157/-286}: Es wurde eine PCR mit SacI4.6-pCRII-DNA und den Oligonukleotiden PROM-2157 und PROMBPClaI (siehe Anhang III) durchgeführt. PROM-2157 enthält eine *XhoI*-Schnittstelle und PROMBPClaI eine *EcoRI*-Schnittstelle. Der pSEAP-Enhancer-Vektor wurde mit *XhoI* und *EcoRI* verdaut. Das entstandene 1799 bp lange PCR-Fragment wurde in den linearisierten pSEAP-Enhancer-Vektor kloniert.

4. *Klon Pept2^{-926/286}*: Es wurde eine PCR durchgeführt mit SacI4.6-pCRII-DNA und den Oligonukleotiden PROM-927 und PROMBP_{Cl}I (siehe Anhang III). PROM-927 enthält eine *XhoI*-Schnittstelle. Der pSEAP-Enhancer-Vektor wurde mit *XhoI* und *EcoRI* verdaut. Das entstandene 567 bp lange Fragment wurde in den pSEAP-Enhancer-Vektor kloniert.
 5. *Klon Pept2^{-552/-286}*: Der Subklon SacI4.6-pCRII wurde mit *NsiI* verdaut. Das Fragment zwischen den *NsiI*-Schnittstellen 551 bp strangaufwärts und 1194 bp strangabwärts des Translationsstarts wurde in das pCRII-Plasmid kloniert. Dieser Klon wurde mit *XbaI* (Schnittstelle in pCRII) und *Cl**aI* verdaut, um das 264 bp lange Fragment zwischen der *NsiI*-Schnittstelle 551 bp strangaufwärts des Translationsstartes und der *Cl**aI*-Schnittstelle in den pSEAP-Enhancer-Vektor zu klonieren. Der pSEAP-Enhancer-Vektor wurde mit *NheI* und *Bsp119I* verdaut. *NheI* erzeugt kompatible kohäsive Enden mit denen beim *XbaI*-Verdau erzeugten Enden.
 6. *Klon Pept2^{-286/+234}*: Der Subklon SacI4.6-pCRII wurde mit *Cl**aI* und *EcoRI* verdaut. Der pSEAP-Enhancer-Vektor wurde mit *Bsp119I* und *EcoRI* verdaut. Das entstandene 520 bp lange PCR-Fragment wurde in den linearisierten pSEAP-Enhancer-Vektor kloniert.
 7. *Klon Pept2^{-432/-286}*: Ausgehend vom Klon *Pept2^{-552/-286}* wurde mit Hilfe des „ExoIII/S1 deletion kit“ (Fermentas, Vilna, Lituania) das Reporterkonstrukt *Pept2^{-432/-286}* hergestellt. Nach Verdau des Klons *Pept2^{-552/-286}* mit *KpnI* und *XhoI* wurde das linearisierte Plasmid mit ExoIII bei 25°C 45 s inkubiert und anschließend mit S1 30 min bei RT inkubiert. Nach Hitze-Inaktivierung der Enzyme wurde das entstandene Plasmid religiert.
- Die Sequenzen der aufgelisteten Reporterkonstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft.

c) Transfektion der Zelllinien

Die Transfektion der Zelllinien wurde mit den gelieferten Reporter-Gen-Vektoren pSEAP-Basic und pSEAP-Control (siehe Anhang III) etabliert. Nach Prüfung verschiedener Transfektionstechniken wurde für die LLC-PK₁-Zelllinie das Liposom Lipofectin (Gibco Life Technologies, Gaithersburg, USA) und für die HeLa-Zelllinie Dendrimmer SuperFect (Quiagen, Hilden, Deutschland) ausgewählt.

Transfektion der LLC-PK1-Zelllinie: 18 Stunden vor der Transfektion wurden die Zellen in einer Konzentration von 7.5×10^4 Zellen/well zu einer 24-well Platte passagiert. Zu 150 µl Medium ohne Serum, Antibiotika und ohne Glutamin wurden 10 µl Lipofectin zugegeben und 45 min bei RT inkubiert. Nachfolgend wurden 1.5 µg DNA des Reporterkonstrukts und 0.1 µg pGL3-Control-DNA zugegeben. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde die Transfektionlösung auf die Zellen gegeben. Zuvor wurden die Zellen mit Medium ohne

Serum, Antibiotika und ohne Glutamin gewaschen. Nach 5 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen mit Medium ohne Serum, Antibiotika und ohne Glutamin gewaschen und Kulturmedium zugegeben. Die Zellen wurden erneut bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Höhe der Expression der sezernierten Alkalischen Phosphatase anhand eines Aktivitätsnachweises ermittelt.

Transfektion der HeLa-Zelllinie: 24 Stunden vor der Transfektion wurden die Zellen in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen/well zu einer 12-well Platte passagiert. In 75 µl Medium ohne Serum, Antibiotika und ohne Glutamin und mit 1.5 µg DNA des Reporterkonstrukts und 0.1 µg pGL3-Control-DNA wurden 3 µl SuperFect zugegeben, geschüttelt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 400 µl Kulturmedium zugegeben und der Ansatz nach Durchmischen auf die Zellen gegeben. Zuvor wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Nach 3 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen mit PBS gewaschen und Kulturmedium zugegeben. Die Zellen wurden erneut bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 48 Stunden wurde die Höhe der Expression der sezernierten Alkalischen Phosphatase anhand eines Aktivitätsnachweises ermittelt.

d) Aktivitätsnachweis der sezernierten Alkalischen Phosphatase

110 µl Zellüberstand wurden abgenommen und zentrifugiert, um gegebenenfalls vorhandene Zellreste abzutrennen. 25 µl des Überstands wurden zur Bestimmung der Aktivität der sezernierten Alkalischen Phosphatase eingesetzt. Dazu wurde der Great EscAPE™ SEAP Fluorescence Detection Kit entsprechend den Anweisungen des Herstellers genutzt (CLONTECH, Palo Alto, USA). Zur Messung der SEAP-Aktivität wurde MUP (4-methylumbelliferyl Phosphat) als Fluoreszenzsubstrat verwendet. Die aus der Hydrolyse von MUP entstandene Fluoreszenzzunahme ($\lambda_{\text{Excitation}} = 390 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emission}} = 460 \text{ nm}$) wurde in 5 minütigen Abständen über eine Zeitdauer von einer Stunde im Fluoroskan Ascent (Labsystems, Helsinki, Finnland) gemessen. Die Promotoraktivität der Reporterkonstrukte wurde als Steigung der Fluoreszenzwerte \pm SEM nach Normalisierung dargestellt.

e) Nachweis der Luciferase-Aktivität

Zur Kontrolle der Effizienz der Transfektion wurde pGL3-Control-DNA (siehe Anhang III), cotransfiziert. Nach Abnahme des Zellüberstands zur Messung der SEAP-Aktivität wurde die Luciferase-Aktivität mit Hilfe des Luciferase Assay Systems (Promega, Madison, USA) gemessen. Die Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 20 µl Lysislösung (in 24-well Platten) oder 30 µl Lysislösung (in 12-well Platten) inkubiert. Nach

30 min Inkubation wurde das Zelllysate zentrifugiert, um gegebenenfalls vorhandene Zellreste abzutrennen. Zu 20 µl Zelllysate wurden 50 µl Luciferasesubstrat (D-Luciferin: 4,5-Dihydro-2-[6-hydroxy-2-benzothiazol]-4-thiazol-carboxilat) zugegeben und nach 10 s wurde über 15 s die emittierte Lumineszenz mit dem MicroBetaTriLux (EG&G Wallace, Turku, Finnland) gemessen. Die SEAP-Aktivitätswerte wurden mit den gemessenen Luciferase-Aktivitätswerten normalisiert.

2.2.14 Herstellung einer Knockout-Maus

Die Herstellung einer Knockout-Maus umfaßt prinzipiell 4 Schritte, die unter 3.3 aufgeführt sind. Nachfolgend werden die Methoden für die einzelnen Schritte beschrieben.

a) Targeting-Konstrukt

Herstellung des Targeting-Konstrukts pPEPT2tg1

Die Herstellung des pPEPT2tg1-Targeting-Konstrukts erfolgte durch folgende Schritte:

1) Mit dem Klon SacI4.6-pCRII wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden M2F-737 und M2B-11BamHI (Sequenzen siehe Anhang III) durchgeführt. Das entstandene 740 bp lange PCR Produkt wurde in den „T-tailed pBluescriptII“-Vektor kloniert. Um den Vektor herzustellen wurde pBluescriptII KS (siehe Anhang III) mit *SmaI* verdaut und mit 2 mM dTTP und 1 U Taq-Polymerase 2 h bei 70°C inkubiert (Marchuk D *et al.* 1991). Nach Ligation und Transformation wurden die positiven Klone durch PCR-Screening identifiziert: Einzelne *E.coli*-Kolonien wurden in 10 µl sterilem Wasser (in einem PCR-Gefäß) gelöst und 2 µl auf eine Masterplatte überführt. Die restlichen 8 µl wurden in einer PCR-Reaktion eingesetzt. In diesem Fall wurden die Oligonukleotide T3 und T7 (siehe Anhang III) benutzt, um zu überprüfen, ob die Plasmide ein Insert enthalten. Die vermeintlich positiven Klone wurden von der Masterplatte gepickt und über Nacht in LB-Medium bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Plasmid-DNA isoliert und durch Restriktionsverdau überprüft. 8 der 48 überprüften Plasmide enthielten ein Insert, die sich später als positive Klone herausstellten. Die Orientierung des Inserts wurde stets durch *EcoRI*- und *PstI*-Verdaue überprüft. Mit einem Klon (pPCRtg) wurde weitergearbeitet. In ihm lag die *BglIII* Schnittstelle auf der Seite des M13R-Primers (siehe Abb. 3.26). Der Klon wurde durch Sequenzierung überprüft.

2) Das β-Galactosidase-Gen wurde durch Verdau mit *BamHI* aus pGT4.5A (siehe Anhang III) isoliert und in pPCRtg ligiert. Das Plasmid pGT4.5A wurde im Labor von Dr. A. Joyner (Mount Sinai Research Institute, Toronto, Canada) hergestellt. Durch PCR-Screening mit den Primern T3 und T7 wurde nach vermeintlich positiven Klonen gesucht. Die Orientierung des

β -Galactosidase-Inserts wurde durch Verdau mit *Clal* überprüft. Der Klon pPCRLacZtg enthielt das β -Galactosidase-Gene in korrekter Orientierung.

3) Der 5'-Arm des Targeting-Konstrukts wurde verlängert, indem der Klon SacI4.6-pCRII mit *HindIII* und *BglIII* verdaut wurde und das Fragment in pPCRLacZtg ligiert wurde. Nach PCR-Screening wurden die positiven Klone durch Verdau mit *Sall* überprüft. Der positive Klon wurde als p5APCRLacZtg bezeichnet.

4) Parallel zu den Schritten 1-3 wurden in dem pKSloxPNT-Vektor (siehe Anhang III) zwei Schnittstellen entfernt und ein Linker ligiert. Dieser Vektor enthält das Tymidinkinase-Gen des Herpes Simplex Virus und das „gefloخته“ Neomycinphosphotransferase-Gen. Er wurde bei Dr. W. Wurst (Institut für Säugetiergenetik, GSF-Neuherberg) hergestellt. Die *KpnI*- und *BamHI*-Schnittstellen wurden entfernt. Dazu wurde der Vektor mit *EcoRI* verdaut und nach Gel-Extraktion (QIAquick Gel Extraction Kit, QUIAGEN, Hilden, Deutschland) ligiert. Zwei Oligonukleotide wurden verwendet, um einen Linker in den Vektor zu ligieren, der die Schnittstellen *NotI*, *BamHI* und *XhoI* enthielt. 20 μ g der Oligonukleotide ISNBXK und ISNBXKc wurden in Anwesenheit von OPA (One for All Puffer, Amersham Pharmacia Biotec, Uppsala, Schweden) 10 min bei 70°C inkubiert. Danach wurde die Temperatur langsam bis unter 35°C abgesenkt. Die entstandenen Linker wurden mit dem Oligonukleotid Removal Kit (QUIAGEN, Hilden, Deutschland) gereinigt. Die Linker wurden in einen Verhältnis von 100:1 in den mit *Sall* und *KpnI* verdauten PKSloxPNT(KB)⁻ ligiert. Nachfolgend wurde durch Verdau mit *EcoRI* der 3'-Arm zum Targeting-Vektors hinzugefügt. Der 1.8 kb lange Bereich von der *EcoRI*- bis zu *SacI*-Schnittstelle im Intron 1 wurde von SacI4.6-pCRII durch Verdau mit *EcoRI* (in pCRII-Vektor) entfernt und in PKSloxPNT(NBXh)⁺ ligiert. 24 Klone wurden durch Verdau mit *EcoRI* und *HindIII* überprüft. Der Klon p3Atg enthielt die *SacI*-Schnittstelle in Intron 1 auf der Seite der HSVtk-Kassette.

5) Abschließend wurden p5APCRLacZtg und p3Atg mit *NotI* und *XhoI* verdaut und ligiert. Das entstandene pPEPT2tg1-Plasmid wurde durch Restriktionsanalyse mit *EcoRI*, *NotI/XhoI*, *NotI*, *XhoI*, *HindIII*, *Sall* und *BamHI* überprüft.

Herstellung des Targeting-Konstrukts, pPEPT2tg2

Das Konstrukt pPEPT2tg2 wurde ausgehend von pPEPT2tg1 hergestellt. Dazu wurde dessen 5'-Arm verlängert. 1 μ g des pZerOH23-Subklons (siehe Abb. 3.14) und 300 ng von pPEPT2tg1 wurden mit *BglIII* und *HindIII* verdaut, und in einem Verhältnis von 1:3 30 min bei 16°C ligiert. Die vermeintlich positiven Kolonien wurden durch Homologie-Screening

von Replikafiltern (siehe 2.2.6a) durch Hybridisierung mit der 3A-Sonde (siehe Abb. 3.27) identifiziert. Das entstandene pPEPT2tg2-Konstrukt wurde durch Restriktionsanalyse mit *EcoRI*, *NotI/XhoI*, *NotI*, *XhoI*, *HindIII*, *Sall* und *BamHI* überprüft.

Vorbereitung des Targeting-Konstrukts für die Elektroporation

Die Vorbereitung der DNA für die Elektroporation erfolgte mittels des MaxiPrep Kit (QUIAGEN, Hilden, Deutschland), um eine hohe Menge und Konzentration an DNA zu erhalten ($\geq 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). Um die homologe Rekombination zu ermöglichen, sollte die DNA linearisiert werden. Sowohl pPEPT2tg1 als auch pPEPT2tg2 wurden durch Verdau mit *XhoI* linearisiert. Der Verdau erfolgte über Nacht mit hoch konzentriertem *XhoI* (50 U/ μl , Boehringer Mannheim, Deutschland). Das Enzym wurde 15 min bei 70°C inaktiviert und die Effizienz des Verdau durch Gelelektrophorese überprüft.

b) Homologe Rekombination des Targeting-Konstrukts in ES-Zellen

Kultivierung der ES-Zellen in nicht differenziertem Stadium

Die benutzte ES-Zelllinie trägt die Bezeichnung TBV2. Diese Zelllinie wurde aus embryonalen Stammzellen einer 129/Sv-Maus isoliert. Die Zelllinie wurde bei Dr. V. Blanquet (Institut für Säugetiergenetik, GSF-Neuherberg, Deutschland) etabliert. Die Zellen dürfen nicht ausdifferenzieren, da sie dadurch ihre Totipotenz verlieren würden (siehe Einleitung). Um die Differenzierung zu vermeiden, wurden die Zellen mit LIF-haltigem Medium (LIF: Leukemia Inhibitory Factor, 10^7 U/ml, GIBCO, Eggstein, Deutschland) kultiviert. Zusätzlich wurden sie auf sogenannten Feederzellen kultiviert. Die Feederzellen wurden aus primären embryonalen Fibroblasten von Dr. V. Blanquet gewonnen, von S. Bourier (Institut für Säugetiergenetik, GSF-Neuherberg, Deutschland) kultiviert und mit Mitomycin C (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS) behandelt (2.5 h bei 37°C und 5% CO₂) um weitere Zellteilungen zu unterbinden. Die so vorbehandelten Zellen wurden auf Platten passagiert und innerhalb von 4 Tagen benutzt.

ES-Medium

Das sogenannten ES-Medium besteht aus: 500 ml „Dulbeccos Modified Eagle Medium high glucose with Na-Pyruvate“, 5 ml 100 \times Glutamin, 1 ml β -Mercaptoethanol, 75 ml ES-geeignetes FKS und 90 μl LIF. Alle Produkte wurden von Gibco BRL (Eggstein, Deutschland) bezogen.

Vorbereitung der ES-Zellen für die Transfektion

1 Cryovial mit Zellen (gelagert in einem Stickstoff-Tank) wurde bei 37°C aufgetaut und zu 10 ml ES-Medium ohne LIF überführt. Nach 5 min Zentrifugation bei 350 g und Abnahme des Überstands wurden die Zellen in 5 ml ES-Medium resuspendiert und auf eine 6 cm Petri-Schalen mit Feederzellen überführt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen mit PBS gewaschen (PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺, Gibco BRL, Eggstein, Deutschland) und 15 min bei 37°C mit 1.5 ml Trypsinlösung (2.5 g/l Trypsin in EDTA, BRL, Eggstein, Deutschland) behandelt. Nach dem Vereinzeln der Zellen wurden 10 ml ES-Medium ohne LIF zugesetzt und 5 min bei 350 g zentrifugiert. Die Zellen wurden in ES-Medium resuspendiert und auf eine 10 cm Petri-Schale mit Feederzellen überführt. Nach 2 Tagen wurden die Zellen auf 5-6 Platten überführt und nach weiteren 2 Tagen auf 8 - 12 gelatinisierte Petri-Schalen (10 cm) überführt. Die Gelatinisierung der Petri-Schalen erfolgte mit 0.1 % Gelatinelösung: Gelatine (BDH Lab. Supply, Poole, England) in H₂O (Ampuwa, Fresenius, Bad Homburg, Deutschland).

Transfektion der ES-Zellen

Die Transfektion der ES-Zellen erfolgte durch Elektroporation. 24 h nach ihrer Überführung auf gelatinisierte Petri-Schalen, wurden die Zellen transfiziert. Dazu wurden sie mit 3 ml Trypsinlösung behandelt und nach 15-minütiger Inkubation bei 37°C und Zugabe von 3 ml Medium in ein 50 ml Gefäß überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 350 g wurden die Zellen in 10 ml kaltem PBS resuspendiert. Die Zellen wurden gekühlt gelagert und ihre Zellzahl ermittelt. Zur Elektroporation wurden pro Küvette (1 ml Küvetten, BioRad, Hercules, USA) 7×10^6 Zellen eingesetzt. Die benötigten Zellen wurden 5 min bei 350 g zentrifugiert und in 800 µl kaltem PBS auf eine Dichte von 7×10^6 Zellen resuspendiert, auf die Küvetten verteilt und auf Eis aufbewahrt. 40 µg des linearisierten Targeting-Konstrukts (in weniger als 100 µl) wurden pro Küvetten zugesetzt. Die Zellen wurden danach mit 0.24 kV und 500 µF in einem Gene-Pulser (BioRad, Hercules, USA) elektroporiert. Nach der Elektroporation wurden die Küvetten 15 - 20 min auf Eis aufbewahrt und zuletzt die Zellen auf 2 Petri-Schalen (pro Küvette) überführt und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Dabei handelte es sich um mit G418-resistenten Feederzellen beschichtete Petri-Schalen. Am nächsten Morgen wurde das Medium gewechselt.

Selektion der positiven ES-Klone

2 Tage nach der Elektroporation erfolgte die Selektion rekombinanter Klone. Jeden Tag wurde das Medium gewechselt. Die Selektion erfolgte durch Zugabe von 200 µg/ml G418-Sulfat (Gibco BRL, Eggstein, Deutschland) und 2 µM Gancyclovir (Cytovene, Syntex, USA) zum Medium. Die Selektion wurde 6 bis 8 Tage durchgeführt.

Vermehrung der überlebenden ES-Klone

6 bis 8 Tage nach Beginn der Selektion wurden die überlebenden ES-Kolonien einzeln auf 96-well Platten überführt. Die ES-Klone wurden unter einem Mikroskop in einer sterilen Werkbank mit einer Mikropipette entnommen und auf eine 96-well Platte mit 40 µl Trypsinlösung überführt. Nach 15-minütiger Inkubation wurden die Zellen vereinzelt, 110 µl Medium zugegeben und auf eine 96-well Platte mit Feederzellen überführt. Jeden Tag wurde das Medium gewechselt und die vereinzelt Klone jeden zweiten Tag in einem Verhältnis 1:2 bis 1:4 passagiert. Dazu wurden die Zellen mit 150 µl PBS gewaschen und nach Zusatz von 40 µl Trypsinlösung bei 37°C 15 min inkubiert und nach dem Vereinzeln erneut mit 150 µl ES-Medium auf eine neue 96-well Platte überführt. Die Zellklone wurden solange passagiert, bis von jedem einzelnen ES-Klon 2 Kopien in 96-well Platten mit Feederzellen (Masterplatten) und 2 Kopien in gelatinisierten 96-well Platten vorlagen. Die Masterplatten wurden bei -80°C eingefroren. Nach Inkubation mit 40 µl Trypsinlösung wurden 60 µl kaltes ES-Medium und 100 µl kaltes Einfriermedium (10 ml: 5 ml FKS, 3 ml ES-Medium, 2 ml DMSO) zugesetzt und die Platte in einer Styroporbox bei -80°C langsam eingefroren.

Untersuchung der selektionierten Klone durch Southern-Blot-Analyse

Von den beiden Kopien jedes Klones auf gelatinisierten 96-well Platten wurde DNA für die Southern-Blot-Analyse isoliert (Ramírez-Solis R *et al.* 1993). Nach Konfluenz der Zellen (in der Regel 4 bis 5 Tage nach der Passage) wurden sie zweimal mit 150 µl PBS gewaschen und über Nacht bei 50°C in feuchter Luft mit 50 µl Lysispuffer inkubiert (Lysepuffer: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA pH 8, 10 mM NaCl, 0.5% Sarcosyl und frisch zugeben 0.1 % w/V Proteinase K (Boehringer Mannheim, Deutschland)). Am nächsten Tag wurden die Proben 1 min bei 800 g zentrifugiert und 100 µl kaltes Ethanol mit 75 mM NaCl zugegeben. Die Platten wurden bei -20°C aufbewahrt oder direkt weiter analysiert. Nach 1-4 h Fällung bei RT wurden die Platten 1 min bei 800 g zentrifugiert und 3 mal mit 150 µl 70 %-igen Ethanol gewaschen. Die DNA wurde 10 - 15 min bei 37°C getrocknet und mit 25 µl sterilem Wasser bei 4° C über Nacht geschüttelt. Die DNA wurde mit hoch konzentriertem *BamHI*

oder *EcoRI* (Gibco BRL, Eggstein, Deutschland) (siehe 3.3.2) mit folgendem Mix über Nacht bei 37°C inkubiert: 1 × Enzympuffer, 4 mM Spermidine (Sigma, Deisenhofen und Bachem, Bubendorf, Schweiz), 100 µg/ml RNase (Boehringer Mannheim, Deutschland) und je 50 U Restriktionsenzym. Am nächsten Morgen wurden die Proben auf ein 0.8%-iges Gel zur Southern-Blot-Analyse aufgetragen (siehe 2.2.10). Die Filter wurden mit der 5Atg- oder P2g-2°Intron-Sonde hybridisiert.

Weitervermehrung der positiven Klone

Die Masterplatten, auf denen sich die positiven Klone befanden, wurden bei 37°C aufgetaut und die positiven ES-Klone auf eine 96 well-Platte mit Feederzellen überführt. Die Klone wurden schrittweise durch Passagieren auf 24-well-, 6-well-Platten, 6-cm-Petri-Schalen und zuletzt zu 10-cm-Petri-Schalen vermehrt. Die erhaltenen Zellklon-kultur wurden in Cryovials eingefroren (6-8 Cryovials/10 cm Petri-Schale).

c) Injektion der homolog-rekombinanten ES-Klone in Blastocysten

Folgende Schritte wurden im Rahmen der Service-Einrichtung für die Herstellung von Transgenen und Knockout-Mäusen am Institut für Säugetiergenetik an der GSF-Neuherberg (Leiter: Prof. Dr. Rudi Balling) von mehreren technischen Angestellten durchgeführt. Eigene Leistungen umfaßten die regelmäßige Teilnahme am Wochenenddienst für die Superovulationauslösung der Spender-Mäuse, Anpaarung und Überprüfung des Vaginalpfropfes, Entnahme und Vorbereitung der Blastocysten und Vorbereitung der ES-Zellen für die Injektion (siehe unten).

Präparation der Blastocysten

Weibliche C57BL/6 Spender-Mäuse wurden mit den Hormonen PMSG (pregnant Mare's Serum Gonadotropin, Inergonan, Intervet) und HCG (human chorionic Gonadotropin, Ovogest, Intervet) im Abstand von 2 Tagen intraperitoneal injiziert um eine sogenannte Superovulation auszulösen. Nachfolgend wurden die Mäuse verpaart und jeden Tag auf das Vorhandensein eines Vaginalpfropfes untersucht. Dieser gilt als Nachweis für eine erfolgte Begattung. 3.5 Tage nach der Befruchtung wurden die Mäuse durch zervikale Translokation getötet und die Uteri entnommen. Diese wurden mit Hapes-gepuffertem M2 Medium (Hogan *et al.* 1994) gespült und die gewonnenen Blastocysten in neues M2-Medium überführt und bis zur Injektion bei 37°C inkubiert.

Vorbereitung der ES-Zellen für die Injektion

Je ein Cryovial der rekombinanten ES-Zellen wurde 4 Tage vor der Injektion aufgetaut und auf eine 6 cm Petri-Schale überführt. Zwei Tage später wurden die Zellen auf eine gelatinisierte 6 cm Petri-Schale mit einer Passage von 1:4 überführt. Am Tag der Injektion wurden die Zellen mit 1.5 ml Trypsinlösung bei 37°C 15 min behandelt und nach Vereinzelnung 3.5 ml ES-Medium zugegeben und auf eine 6-cm-Petri-Schale überführt. Die Zellen wurden bis zur Injektion auf Eis aufbewahrt.

Injektion der rekombinanten ES-Zellen in Blastocysten

10-15 rekombinante ES-Zellen wurden mit Hilfe einer Mikromanipulation-Injektionsanlage in einen Blastocysten injiziert. Die verschiedenen Injektionen (siehe 3.3.3) wurden von B. Klaedtke, D. Buchner oder H. Welzel durchgeführt.

Embryotransfer

Die injizierten Blastocysten wurden in scheinchwangere CD-1 Weibchen transferiert. Bis zu 20 Blastocysten wurden in jeden Uterus eingeführt. Die Transfers wurden nach Betäubung der Maus von D. Buchner, H. Welzel oder H. Krause vorgenommen. Zur Bereitstellung der scheinchwangeren CD-1 Weibchen wurden männliche vasktomierte CD-1 Männchen mit CD-1 Weibchen verpaart und der Vaginalpfropf kontrolliert.

Genetische Charakterisierung der entstandenen chimären Mäuse

Die verwendete TBV2-ES-Zelllinie stammt von einer männlichen Maus mit brauner Fellfarbe (129/Sv, ‚agouti‘) und die Blastocysten wurden von einer weiblichen Maus mit schwarzer Fellfarbe (C57BL/6) entnommen. Demzufolge kann das Ausmaß des Chimärismus an der Fellfarbe der Nachkommen abgeschätzt werden.

d) Prüfung der Keimbahntransmission

Die männlichen Mäuse werden im Alter von 8-9 Wochen geschlechtsreif, die weiblichen Mäuse im Alter von 10 Wochen. Wenn die chimären Mäuse geschlechtsreif sind, wird die Prüfung der Keimbahntransmission vorgenommen. Die chimären Mäuse werden mit C57BL/6 Mäusen angepaart, um zu überprüfen, inwieweit die rekombinanten ES-Zellen genetisch zur Bildung der Keimzellen beigetragen haben. Nur so kann das Null-Allel an die Nachkommen weitergegeben werden und zur Genese heterozygoter *Pept2*^{+/-} Tiere führen.

2.2.15 DNA-Sequenzierung

Alle DNA-Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruch-Methode durchgeführt (Sanger F *et al.* 1977). Zwei verschiedene Verfahren wurden gewählt. Bei die Sequenzierung der PEPT2-cDNA wurden die DNA-Fragmente mit [α -³⁵S]-dATP (1000 Ci/mmol, ICN Biomedicals, Costa Mesa, USA) mittels des T7Sequenase v2.0 Kits (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) radioaktiv markiert. Die DNA-Fragmente wurden durch Exposition des getrockneten Polyacrylamidgels auf einem Röntgenfilm (X-OMAT AR, Kodak, Rochester, USA) sichtbar gemacht (Sambrook J *et al.* 1989). Bei allen anderen Sequenzierungen wurden die DNA-Fragmente mit dem 5'-Cyanin-Fluoreszenzfarbstoff mittels des Thermo Sequenase CyTM 5 Dye Terminator Kits (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) markiert und mit einem automatischen DNA Sequenzierer (ALFExpressIITM, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) detektiert.

2.2.16 Sequenzanalysen

Das Program DNASIS (Hitachi Software Engineering Europe, Ardon, Frankreich) wurde für die Vorhersage der offenen Leserahmen, der Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme, der Ableitung der Aminosäuresequenz, die Hydrophobizitätsanalyse und die Sequenzvergleiche auf DNA- und Proteinebene verwendet.

Erkennungsstellen für proteinmodifizierende Enzyme wurden mit Hilfe von PROSITE bestimmt (<http://www.expasy.ch>). Homologiesuche und -vergleiche mit anderen bekannten Sequenzen wurden mit dem BLAST-Programm durchgeführt (www.ncbi.nih.gov/BLAST). Die *Pept2*-Gen-Sequenz wurde mit den „Repeat WebGen Program“ (www.itba.mi.cnr.it) zur Identifizierung repetitiver Sequenzen analysiert. Der vermeintliche Transkriptionsstart und die Promotorregion wurden mit Hilfe des „NNPP“-Programms identifiziert (www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html). Die Erkennungsstellen für Transkriptionsfaktoren wurden mittels TFSEARCH (pdap1.trc.rwcp.or.jp/research/db/TFSEARCH.html) gesucht.

2.2.17 Datenanalysen

Die Analyse der Daten aus Transportstudien erfolgte mit Graph-Pad Prism (Graph-Pad, Los Angeles, USA). Alle Transportstudien mit *Xenopus laevis* Oocyten wurden mindestens zweimal durchgeführt. Pro Meßpunkt wurden jeweils 6-8 Oocyten verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM (Standard error of mean, Standardabweichung des Mittelwertes) angegeben. Die Daten der Promotor-Analyse wurden mit Graph-Pad Prism (Graph-Pad, Los

Angeles, USA) ausgewertet. Jeder Meßpunkt wurde im Duplikat erhoben und die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Molekulare Identifizierung der renalen Peptidtransporter-cDNA aus der Maus

3.1.1 Isolierung der murinen PEPT2-cDNA

Mitte der 90er Jahren wurden die Peptidtransporter PEPT2 von Mensch (Liu W *et al.* 1995), Kaninchen (Boll M *et al.* 1996) und Ratte (Saito H *et al.* 1996) kloniert. Wie bereits erwähnt, wurden die Peptidtransporter im Laufe der Evolution sowohl hinsichtlich ihrer funktionellen Eigenschaften, als auch ihrer Struktur weitgehend konserviert. Die Offenen Leserahmen der drei Säugetier-Peptidtransporter des PEPT2-Typs weisen eine knapp 83%ige Identität ihrer Nukleotidsequenz auf. Daher konnte die RACE-Methode genutzt werden, um die PEPT2-cDNA der Maus zu isolieren. Im Gegensatz zur klassischen „Homologie-Screening“-Methode bietet die RACE-Technik eine schnelle Alternative um homologe cDNAs zu isolieren. Die einzige Voraussetzung, um diese Methode anwenden zu können, ist die Kenntnis der Sequenz eines kleinen Bereiches der cDNA, die isoliert werden soll. Folglich wurde, als erster Schritt der Klonierung der vollständigen cDNA, mittels RT-PCR ein Fragment der murinen PEPT2-cDNA aus Gesamt-RNA mit spezifischen PEPT2-Oligonukleotiden des Kaninchens (Rb2F1169-Rb2B1899, Sequenzen siehe Anhang III) amplifiziert. Gesamt-RNA wurde aus Mäuse-Nieren isoliert. Die PCR-Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 94°C 2 min, 35 ×(94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 2 min) und 10 min bei 72°C (siehe 2.2.2). Das amplifizierte 730 bp lange PCR-Produkt wurde in den pCR2.1-Vektor kloniert und sequenziert (siehe 2.2.4). Wie erwartet, zeigte die Sequenz eine hohe Homologie zu den bekannten PEPT2-cDNA-Sequenzen aus der Niere des Kaninchens, des Menschen und der Ratte. Basierend auf dieser Sequenz wurden zwei spezifische murine Oligonukleotide (M2F1229, M2B1806, Sequenzen siehe Anhang III) ausgewählt, um 3'- und 5'-RACE mit Marathon-Ready™-cDNA aus der murinen Niere (Clontech, Palo Alto, USA) durchzuführen. Unter den beschriebenen Bedingungen (siehe Methoden 2.2.3) konnte nach 25 PCR-Zyklen ein ca. 2kb langes Fragment bei der 5'-RACE Reaktion detektiert werden (Abbildung 3.1). Das 3'-RACE-Produkt, ein ca. 2.5kb langes Fragment, konnte erst nach 30 Zyklen nachgewiesen werden. Beide PCR-Produkte wurden in pCR2.1 kloniert.

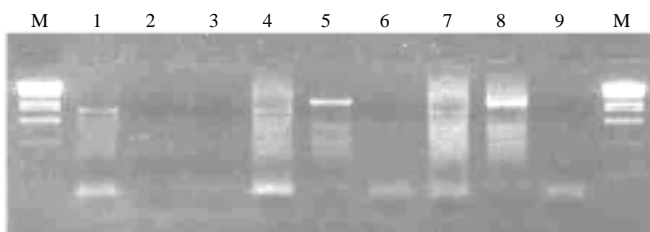


Abbildung 3.1 PCR-Produkte der 5'- und 3'-RACE Reaktionen. 5µl jeder PCR-Reaktion wurden auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen und bei konstanten 100 V getrennt. Die DNA wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht. M: Größenmarker, 1-3: Produkte 25 Zyklen, 4-6: 30 Zyklen und 7-9: 35 Zyklen.

3.1.2 Molekulare Charakterisierung

a) Nukleotidsequenz der murinen PEPT-2 cDNA

Die cDNA des renalen Peptidtransporters der Maus (mPEPT2) wurde vollständig sequenziert. Die Nukleotidsequenz wurde in der GenBank (NCBI: National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA) unter der Zugangsnummer AF111811 hinterlegt. Die murine PEPT2-cDNA hat eine Länge von 3987 bp (Abb. 3.2).

```

1  cagcgagcag cccctctctt ttcctatagc ttcaagttct gctctaaggc aggcagccac tgaactgac
71  acccacaggg ttaaacctat ttgctgtagc tatccctcct cccctagtc ccccttttca ctgtaggctg
141 gcagcagctcc tagctgccta ctgaagccaa atgcttgagg agagagagag taaggagcca gccatgaatc
211 ctttccagaa aaatgagctc aaggaaacgc caactccgaa gctcttcggc tctagctacc cactcagcat
281 tcttttcacc tgtctctact gaagagatgc tgcctggacc tccaagccct ccaaagaagt cgcttccatt
351 gtgggtgaacg aattctgcga gcgattttcc tattatggca tgaagctgt gttgaccttg tatttccgtg
421 acttctctga ctggaatgaa gacacgtcca catctgtcta ccatgccttc agcagcctc gctatttcac
491 ccccatcttg ggagcagcga ttgctgacct ctggctggga aaattcaaga caatcacta tctgtccctg
561 gtgtatgtcc ttggccatgt attcaagtct ttgggtgcca taccaactac gggaggaaaa atgctacata
631 caatcttatac attgggtggc ctgagctctca tagctctggg aacaggaggt atcaaaccct gtgtggcagc
701 ttttggcgga gaccagtttg aagaggaaca tgcagaggca cggactagat acttctcgtt cttctacctc
771 tccatcaatg cagggagctt gatttctact ttcatcacac caatgctaag aggggagtga aagtgttttg
841 gcgaagactg ctatgcattg gcttttggga ttcaggatt gctcatggtg ctggcacttg ttgtgtttgc
911 aatgggaagc aagatgtaca gaaaaccgcc tcctgaaggg aacatagtgg ctcaagttac caatgtata
981 tggtttgcta tctgcaaccg cttcaggaac cgttctgagg acattccaaa gcgacaacat tggctagact
1051 gggcagcaga aaaataccca aagcacctca ttatggacgt gaaggcactg accaggatac tgttccctta
1121 tatcccaactg cccatgtttc tctcctctttt ggccaacacg ggctcacggt ccactctgca agctaacaaa
1191 atggatggcg atttgggatt ttttgtactt cagccggatc agatgcaggt gctaaatccc tttctggtcc
1261 ttgtcttcat cccattgttt gaccttgtca tttatcggct gatctccaag tggggagtta acttctcgtc
1331 actcaggaaa atggctgttg gtatgatcct agcgtgcttg gcatttgcag ttgcagcgtg ttagagata
1401 aaaatacaatg gaatgatcca tcctcagcca gaaagcagaa gacattttct ccaagtctga aacttggcag
1471 atgggtgaaat agaggtgaca gtgcagggaa acagaaataa tcctctcttg gtggagtcca tcagctcttt
1541 tcagaacaca acacactatt cgaaactacg cctggagaca aaaagccaag acttacattt ccatctgaag
1611 tacaacaact tgtctgtcca caatgagtac tctgtagagg agaagaactg ttaccagttg gtggttcatg
1681 agaatggaga aagtctctcc agtatgcttg taaaggacac agaatcaaa ccagccaatg ggatgacagc
1751 catcaggttt attaacactt tgcataaaga catgaatatt tccttggatg ccaatgctcc tctcagcgtg
1821 ggcaagact atggagtgtc tgagtacaga actgtgcaaa gaggaaaagta tctcgcagtg cattgtgaaa
1891 cggaagaca tgtcttttct ctcaatttag gtcaactaga ctttggtaga acatatttgt ttgtgatcac
1961 taatacacc aaccggggtc tcacggcctg gaagggcagaa gacattccag ccaataaact atccattgca
2031 tggcagctac cacagtatgt cctggttaca gcagcagagg tcatgttttc tgtcacagga cttgaatttt
2101 ottattctca ggcaccatct agcatgaaat ctgtgctcca ggcagcctgg ctgttgaccg ttgcagttgg
2171 gaattattat gtgctgatcg tggcacagtt cagtggcctg gtgcagtggt ctgaattcgt tttgttttcc
2241 gtctctctgc tgggtgtctg cctgactctc tccgtcatgg gctactacta tttcctctga aagtccaggg
2311 gtatccatga ggcaacagaa aagcagattc ctcacatcca ggggaatatg atcaacctag aaaccaagaa
2381 tacaaggctc tgatgactca ctggatggag actgaccctt ggctctgata tcagccatcg cttatcttca
2451 agcaacaatt ttttcccccc tctggccagg tttagagaag agacagcatt tatctgagtg gattgcctcc
2521 attttctacc acaatagagg caatttttag acaaggtttt caggtatatac tttaacaag gatccaagac
2591 tccgtgtcct acaggtatg gataaactca gtaaatatta ggcaatgtct ctcaagctgg cccagtatct
2661 ccaatgccc aggaaagtac aatgtgtagt agagataagt ctcatggcat gctaagtttg gaggactcct
2731 ttatcaggtg tttggaacct atagctctac ttgttgatat gttggtttag ggccaatga cagaatactg
2801 gtatttcaat tttctttatc agtaataata ctttgctatt catgaggatg tcaaaaatgt tacatacgtt
2871 atgacctaat ccagaggcta gctcgtcagc tagaaagttt aatatgattt ttagatggcc gactatagaa
2941 tgggaatttta tgtacacatg gaagatacct ctttctgatt accacactgg tttatctact tatccaaaaa
3011 ccccttctcg gtactgacag atcctggaaa ccataattaa agacagtaag gaaagtcatg gggacacagg
3081 aatgcatata aactattcat tctctgttac tctaacgaac tctctgttc cgggctggg
3151 ctgtgctcct ccgtgaacat ctgtctatga aactaactat agctttgcaa ccagccttt tcaagtgttc
3221 tgggacagct tgggtattatt attatatctt actttgctta ttacagcaaa tcttcagtaa caaatgttt
3291 tttctaacc aacttctttt aattttttt tctatttagc ttctttgttg tgtattttta tttttccgt
3361 aattttgtt tacatttctc cctttggctc tagaataacg cctgcttat ggaaggggaa taatactaac
3431 atcctgggtt taaagctcta aattgtaata ttcagcaaat ggacaaggac ctgcatgaga aacttattaa
3501 aatctgtggg ggtgggtgga gcaggtggag tttttgtgtg tgtgaaaaaa aaagagggga gttgagaaac
3571 attatctcac atgtaataca tgggtcaggg aacagacttg ggaatattag gactatgtca tgtgttctca
3641 ggagaaaacg ttcacggccc ctgtatgaaa gacctcattt ctgttcttt tactacacg ttcocctca
3711 tagccatggt gatcgccatc tgttaataat gtaatatggt cttagataa tctgctgcag tccctcaagc
3781 tttaaatact taagtattca actactaaga ttttagaaag cataaacgag gtcgcaacac tatctccaac
3851 ccccagacaa ctgctaagaa cctgtccaac tccttttgaa gatgttcatt ttaagaagc tttacgtcaa
3921 agctatttgg tgaattttgt tttaaagggc gttaaagactg atctgtgaat aaagttttat gtacagt

```

Abbildung 3.2 Nukleotidsequenz der murinen PEPT2-cDNA. Das mögliche Startcodon (ATG) der Nukleotidpositionen 204-206 und das Stopcodon (TGA) der Nukleotidpositionen 2394-2396 sind fett gedruckt und unterstrichen. Das mögliche Startcodon (ATG) bei Nukleotidpositionen 171-173 ist kursiv gedruckt und unterstrichen.

Der Offene Leserahmen wurde mit dem Programm DNASIS bestimmt. Zwei mögliche Startcodons an Nukleotidpositionen 171-173 und 204-206 wurden identifiziert. Der proteinkodierende Bereich schließt mit dem Stopcodon TGA in Position 2394-2396.

b) Initiation der Translation von PEPT2 der Säugetiere

Die renalen Peptidtransporter von Kaninchen, Mensch und Ratte sind 729 Aminosäuren lang (Boll M *et al.* 1996, Liu W *et al.* 1995, Saito H *et al.* 1996). Für die murine Nukleotidsequenz ergibt sich ein in der Länge identisches Protein auf der Grundlage des Startcodons an Position 204 - 206. Die Sequenz von PEPT2 der Ratte weist jedoch an der gleichen Nukleotidposition wie die murine PEPT2-Sequenz ein mögliches alternatives Startcodon auf, welches bei Nutzung zu einem 740 Aminosäuren langen Protein führen würde. Um zu überprüfen, ob dies ebenfalls bei PEPT2 aus Kaninchen und Mensch der Fall sei, bei denen der Sequenzbereich bislang unbekannt war, wurde Gesamt-RNA aus der Niere von Ratte, Kaninchen und Mensch isoliert und mit ihnen RT-PCR-Reaktionen durchgeführt. Als Senseprimer wurde M2F-58 ausgewählt und als Antisenseprimer diente Rb2B290 (Sequenzen siehe Anhang III). Die 330bp langen PCR-Produkte wurden in pCR2.1 kloniert und sequenziert. Abbildung 3.3A zeigt die 5'-Enden dieser Sequenzen.

A)

Maus	TAAGCCAA ATG CTTGAGGAGAGAGAGAGTAAGGAGCCAGCC ATGA
Ratte	TAAGCCAA ATG CTTGAGGAGAGAGAGAGTAAGGAGCCAGCC ATGA
Kaninchen	ATG CTTGAGGAGAGAGAGAGAGAGTAAGGAGCCAGCC ATGA
Mensch	ATG CTTGAGGAGAGAGAGAGAGAGTAAGGAGCCAGCC ATGA

B)

Position:	-3	-1	+4
Prozent A	61	15	23
Prozent C	2	55	16
Prozent G	36	21	46
Prozent T	1	11	15

-3 -1 +4
(GCC)GC^ACC**ATGG**

Abbildung 3.3 Initiation der Translation von PEPT2 aus Säugetieren. A) RT-PCR-Produkt-Sequenzen der 5'-Enden von PEPT2 aus Säugetieren. Die identifizierten Startcodons sind fett gedruckt. Die zusätzlichen Nukleotide in der Sequenz des humanen PEPT2 sind kursiv und fett gedruckt. Die relevanten Nukleotide nach Kozak-Kriterien (gezeigt in B) sind unterstrichen. B) Kozak-Kriterien für die Initiation der Translation (Kozak M 1987).

Abbildung 3.3 zeigt, daß die putativen alternativen Startcodons ebenfalls in den cDNAs von Kaninchen und Mensch vorhanden sind. In beiden Fällen würde die Initiation der Translation bei Nutzung dieser Startcodons jedoch zu einer Verschiebung des Offenen Leserahmens führen, da in der Kaninchen-cDNA 4 Nukleotide fehlen und in der menschliche cDNA 2 Basenpaare zusätzlich vorhanden sind. Eine Konsensus-Sequenz für die Initiation der Translation gilt als allgemein gültig (Abbildung 3.3B links). Kozak leitete aus dem Vergleich der Initiation der Translation von 699 mRNA-Molekülen von Wirbeltieren, die Wahrscheinlichkeit ab, in der die Nukleotide (A, C, G, T) an den jeweiligen Positionen der

Konsensus-Sequenz auftreten (Abbildung 3.3B rechts). Auf der Grundlage dieser statistischen Kriterien, erfüllt das murine Startcodon an Position 204-206 besser diese Kozak-Bedingungen als jenes in Position 171-173. Das PEPT2-Protein der Maus besitzt daher mit größter Wahrscheinlichkeit ebenfalls nur 729 Aminosäuren.

c) Aminosäuresequenz des renalen Peptidtransporterproteins aus der Maus

Abbildung 3.4 zeigt den Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der PEPT2-Proteine verschiedener Säugetiere.

1	MNPFQKNESK	ETLFSVPVSTE	EMLPGPPSP	KKSTPKLFGS	SYPLSIAFIV	VNEFCERFSY	YGMKAVLTLY
	MNPFQKNESK	ETLFSVPVSTE	EMLP R PPSP	KK S PKIFGS	SYPV S IAFIV	VNEFCERFSY	YGMKAVLTLY
	MNPFQKNESK	ETLFSVPVSTE	ET P RLSSPA	KK T PKICGS	NYPLSIAFIV	VNEFCERFSY	YGMKAVLTLY
	MNPFQKNESK	ETLFSVPV S I	EV P PPSP	KK P SPTICGS	NYPLSIAFIV	VNEFCERFSY	YGMKAVL L Y
71	FLYFLHWNE	TSTSVYHAFS	SLCYFTPILG	AAIADSWLKG	FKTIIYLSLV	YVLGHVFKSL	GAIPILGGKM
	FLYFLHWNE	TSTSVYHAFS	SLCYFTPILG	AAIADSWLKG	FKTIIYLSLV	YVLGHVFKSL	GAIPILGGKM
	FLYFLHWNE	TSTSVYHAFS	SLCYFTPILG	AAIADSWLKG	FKTIIYLSLV	N VLGHV I KSL	S AF P ILGG K V
	FLYFLHWNE	TSTSIYHAFS	SLCYFTPILG	AAIADSWLKG	FKTIIYLSLV	YVLGHV I KSL	GALPILGG Q V
					Ptr2_1		
141	LHTILSLVGL	SLIALGTGGI	KPCVAAFVGD	QFEEHAEAR	TRYFSVFYLS	INAGSLISTF	ITPMLRGDVK
	LHTILSLVGL	SLIALGTGGI	KPCVAAFVGD	QFEEHAEAR	TRYFSV F YLA	INAGSLISTF	ITPMLRGDVK
	VHTVLSLVGL	CLIALGTGGI	KPCVAAFVGD	QFEE K HAEER	TRYFS G FYLA	INAGSLISTF	ITPMLRGD V Q
	VHTVLSLIGL	SLIALGTGGI	KPCVAAFVGD	QFEE K HAEER	TRYFSVFYLS	INAGSLISTF	ITPMLRGD V Q
		Ptr2_3			Ptr2_2		
211	CFGEDCYALA	FGVPGLLMVL	ALVVFAMGSK	MYRKPPEGN	IVAQVTKCIW	FAICNRFNR	SEDIPKRQHW
	CFG Q DCYALA	FGV P GLLMVL	ALVVFAMGSK	MYRKPPEGN	IVAQV I KCIW	FALCNRFNR	S GD L PKRQHW
	CFGEDCYALA	FGV P GLLMVI	ALVVFAMGSK	M YR K PPPEGN	IVAQV V KCIW	FAIS N RF K NR	SEDIPKRQHW
	CFGEDCYALA	FGV P GLLMVI	ALVVFAMGSK	I Y N KPPPEGN	IVAQV F KCIW	FAIS N RF K NR	S GD I PKR H DW
281	LDWAAEKYKP	HLIMDVKALT	RILFLYIPLP	MFWALDQQG	SRWTLQANKM	DGDLGFFVLQ	PDQMQLNPF
	LDWAAEKYKP	HL I ADVKALT	R V L FLYIPLP	MFWALDQQG	SRWTLQANKM	N GD L GFFVLQ	PDQMQLNPF
	LDWAAEKYKP	Q LIMDVK T L	R V L FLYIPLP	MFWALDQQG	SRWTLQ A TKM	N GN L GFFVLQ	PDQMQLN P L
	LDWAAEKYKP	Q LIMDVKALT	R V L FLYIPLP	MFWALDQQG	SRWTLQ A I R M	N R N L G FFVLQ	PDQMQLN P L
351	LVLVFIPLFD	LVIYRLISKC	GVNFSSLRKM	AVGMILACLA	FAVAALVEIK	INGMIHPQPA	SQEIFLQVLN
	LVL I FIP L FD	LVIYRLISKC	R IN F SSLRKM	AVGMILACLA	FAVAAL V E T K	INGMIHPQPA	SQEIFLQVLN
	LVL I FIP L FD	LVIYRLISKC	G IN F T S LRKM	AVGM V LACLA	F AAA A T V E I K	I N E M A P P Q P G	SQE I L L QVLN
	LVL I FIP L FD	F VIYRL V SKC	G IN F SSLRKM	AVGMILACLA	FAVAAR V E I K	I N E M A P A Q P G	P QE V F L QVLN
421	LADGIEVTV	QGNRNPLLV	ESISSFQNTT	HYSKLRLETK	SQDLHFHLKY	NNLSVHNEYS	VEEKNCYQLV
	LAD G D V K V TV	L GS R N S LLV	E S V S S FQNTT	H YS K L H L E A K	SQDLHFHLKY	N SL S V H N D H S	V E E K N C Y Q L L
	LAD D E V K L TV	L G N N N S L L A	D S I K S FQ K T P	H YS K I H L N T K	SQD F Y F H L K Y	H N L S I Y T E H S	V E E R N W Y S L I
	LAD D E V K V TV	V G N E N N S L L I	E S I K S FQ K T P	H YS K L H L K T K	SQD F H F H L K Y	H N L S L Y T E H S	V Q E K N W Y S L V
491	VHENGESLSS	MLVKDTGIKP	ANGMTAIRFI	NTLHKDMNIS	LDANAPLSVG	KDYGVSEYRT	VQRGKYPAVH
	I H Q D G E S I S S	MLVKDTGIKP	ANG M A I R F I	NTLHKD L NIS	L D T D A P L S V G	KDYGV S A Y R T	V L R G K Y P A V H
	I R E D G S I S S	I M V K D M E N E T	T Y G M T A I R F I	NTL Q E N V N I S	L G T D I S L N V G	E N Y G V S A Y R T	V Q R G E Y P A V H
	I R E D G N S I S S	M M V K D T E S R T	T N G M T T V R F V	NTLHKD V NIS	L S T D T S L N V G	E D Y G V S A Y R T	V Q R G E Y P A V H
561	CETEDNVFSL	NLGQLDFGTT	YLFVITNITN	RGLQAWKAED	IPANKLSIAW	QLPQYVLVTA	AEVMSVTGL
	CETED K VFSL	D L G Q L DFGTT	YLFVITN I T S	Q G L QAWKAED	IPV N KLSIAW	QLPQYVLVTA	AEVMSVTGL
	C K T E D K D F S L	N L G L L DF G A S	YLFVITN S T K	Q G L QAW K M E D	IPANK V SI A W	QLPQ Y ALVTA	G E V M F S V T G L
	C R T E D K N F S L	N L G L L DF G A A	YLFVITN N T N	Q G L QAW K I E D	IPANK M S I R W	QLPQ Y ALVTA	G E V M F S V T G L
631	EFSYSQAPSS	MKSVLQAAWL	LTVAVGNIIV	LIVAQFSGLV	QWAEFVLFSC	LLLVVCLIFS	VMGYYYVPLK
	EFSYSQAPSS	MKSVLQAAWL	LTVAVGNIIV	L V V A Q F S G L V	QWAEFVLFSC	LLLVVCLIFS	V M A Y Y V P L K
	EFSYSQAPSS	MKSVLQAAWL	LTVAIGNIIV	L V V A Q F S G L V	QWAEFVLFSC	LLLVVCLIFS	I M G Y Y V P I K
	EFSYSQAPSS	MKSVLQAAWL	L T I A V G N I I V	L V V A Q F S G L V	QWAE F I L F S C	LLL V I C L I F S	I M G Y Y V P V K
701	SEGIHEATEK	QIPHIOGNMI	NLETKNTRL	729 Maus			
	SE D T R E A T D K	QIP A V Q GNMI	NLETKNTRL	Ratte			
	SE D I Q G P E D K	QIPH M QGNMI	NLE T K K T K L	Kaninchen			
	T E D M R G P A D K	HIPHIQGNMI	K L E T K K T K L	Mensch			

Abbildung 3.4. Vergleich der Aminosäuresequenzen des murinen Peptidtransporters PEPT2 mit dem aus Ratte, Mensch und Kaninchen. Die Translation der Nukleotidsequenzen und der Homologievergleich wurde mit dem Programm DNASIS durchgeführt. Die sich zur murinen Sequenz unterscheidenden Aminosäuren sind fett gedruckt. Die mit Ptr2_1-3 bezeichneten grau unterlegten Bereiche zeigen die konservierten Motive in der POT-Familie der Peptidtransporter.

Der Vergleich der renalen Peptidtransporter verschiedener Säugetiere weist eine hohe Identität auf. Die Sequenz des murinen PEPT2 ist 92% identisch zu der der Ratte. Im Vergleich zu Mensch und Kaninchen ergeben sich Identitäten von 79.8% und 79.4%. Wie in Abbildung 3.4 erkennbar, enthält auch das murine PEPT2-Protein als Mitglied der POT-Familie die während der Evolution offenbar hoch konservierten Motive Ptr2_1-3 (siehe Einleitung).

d) Membrantopologie des murinen PEPT2-Proteins

Als charakteristische Eigenschaft eines Transporters weist auch PEPT2 transmembranärer Domänen auf, die über hydrophile Bereiche verbunden sind. Die transmembranären Domänen erlauben die Verankerung des Proteins in der Membran. Diese bestehen vorwiegend aus hydrophoben Aminosäureresten und weisen für einen Membrandurchgang etwa 15-20 Aminosäuren auf.

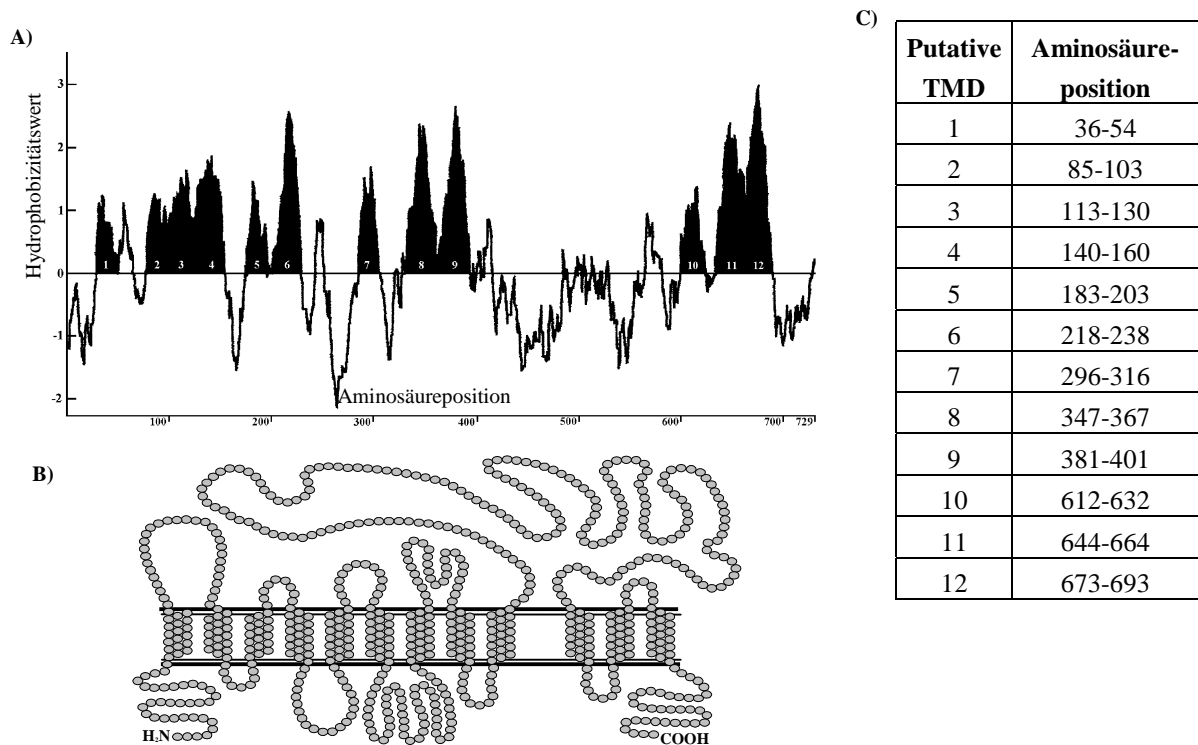


Abbildung 3.5 Vorhergesagte Membranintegration des murinen Peptidtransporterproteins PEPT2. A) Hydrophobizitätsplot: Die putativen Transmembrandomänen wurden mit einem Fenster (Durchschnittswert der Länge der Transmembrandomänen) von 18 Aminosäuren berechnet. Die Hydrophobizitätswerte der Aminosäuren (Y-Achse) sind gegen die Aminosäurepositionen (X-Achse) aufgetragen. Die 12 putativen Transmembrandomänen sind schwarz unterlegt. B) Vereinfachtes schematisches Modell der Topologie des murinen PEPT2-Proteins in der Zellmembran. C) Aminosäurepositionen der putativen Transmembrandomänen. TMD: Transmembrandomäne.

Diese Bereiche wurden mit dem DNASIS-Programm auf der Grundlage des Algorithmus nach Kyte & Doolittle (1982) berechnet (Abb. 3.5A). Danach besteht PEPT2, wie seine Säugetier-Orthologe, aus 12 Transmembrandomänen, mit einer großen extrazellulären

Schleife zwischen Transmembrandomäne 9 und 10. Ein vereinfachtes schematisches Modell des PEPT2-Proteins in seiner Membranverankerung zeigt Abbildung 3.5B.

e) Motive für mögliche co- und posttranslationale Modifikationen

Die meisten Proteine werden während oder nach der Synthese enzymatisch modifiziert. Dies dient u.a. dazu, ihre räumliche Struktur zu ändern, ihre Stabilität zu modifizieren, ihre zelluläre Lokalisation zu determinieren oder ihren Aktivitätszustand zu ändern. Diese co- oder posttranslationalen Modifikationen werden von modifizierenden Enzymen durchgeführt, die bestimmte Aminosäurebereiche des zu modifizierenden Proteins erkennen. Diese Motive sind unter anderem in der Proteindatenbank SWISSPROT abgelegt und können mit Hilfe des Programms PROSITE zur Identifizierung dieser Motive im Protein der Wahl genutzt werden. Tabelle 1 zeigt die putativen Erkennungsstellen für enzymatische Modifikationen in den Peptidtransportern (PEPT2) der Säugetiere. Es sind ausschließlich die möglichen extrazellulären N-Glykosylierungsstellen, intrazellulären Phosphorylierungsstellen und extrazellulären Zell-Zell-Bindungsstellen aufgelistet.

N-Glykosylierung		PKC Phosphorylierung		Zell-Zell-Bindungsstelle	
Position	ErkS	Position	ErkS	Position	ErkS
528-531	NISL	376-378	SLR	206-208	RGD
587-590	NITN	640-642	SMK		

Tabelle 3.1. Putative Erkennungsstellen für posttranslationale Modifikationen des murinen Peptidtransporters PEPT2. ErkS:Erkennungsstelle (Motiv der Aminosäurereste).

PEPT2 zeigt 2 putative Peptidbereiche für eine durch N-Glycosyltransferasen vermittelte Übertragung von Oligosacchariden auf die Amidfunktion eines Asparaginrestes. Beide Motive befinden sich in der großen extrazellulären Schleife zwischen den Transmembrandomänen 9 und 10. Die Funktion dieser Kohlenhydratketten in Membranproteinen ist nicht vollständig geklärt; man glaubt jedoch, daß durch die Glykosylierung während der Synthese das Protein für seine zelluläre Lokalisation adressiert wird. Enzyme der Familie der Proteinkinase C könnten die Serinreste in zwei Peptidmotiven von PEPT2 phosphorylieren, was zu einer Änderung der Aktivität des Proteins genutzt werden könnte. Die erste Erkennungsstelle befindet sich in der intrazellulären Schleife zwischen den Transmembrandomänen 8 und 9 und die zweite in der intrazellulären Schleife zwischen den Transmembrandomänen 10 und 11. Die PEPT2-Proteine enthalten auch eine Erkennungsstelle für eine Zell-Zell-Interaktion in der extrazellulären Schleife zwischen den Transmembrandomänen 5 und 6.

f) Immunologischer Nachweis von PEPT2 in renalen BSMV der Maus

Zum Nachweis der Lokalisation des murinen PEPT2-Proteins in der apikalen Membran renaler Tubulusepithelzellen wurden BSMV (Bürstensaummembranvesikel) von Ratten- und Mäuse-Niere hergestellt und das Protein im Western-Blot mit einem PEPT2-spezifischen Antikörper nachgewiesen. BSMV von Nieren aus Mäusen und Ratten wurden nach der Mg^{2+} /EGTA-Methode gewonnen (Daniel *et al.* 1991). Jeweils 60 μ g Protein wurden für den Western-Blot auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen (siehe 2.2.9).

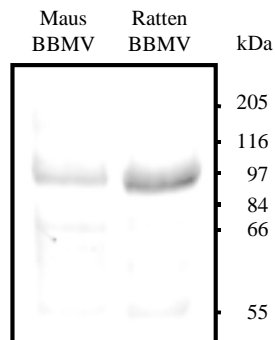


Abbildung 3.6 Nachweis des PEPT2-Proteins in BSMV von Ratte und Maus. BSMV: Bürstensaummembranvesikel. kDa: kDalton.

In Abbildung 3.6 kann man eine schwache Bande in den murinen BSMV beobachten, die auf der gleichen Höhe läuft, wie das PEPT2-Protein aus BSMV der Ratte. Das PEPT2-Protein hat ein apparentes Molekulargewicht von etwa 100 kDa. Diese Molmasse entspricht der aus *in vitro*-Translationsexperimenten (Boll *et al.* 1996) und derjenigen in Photoaffinitätsmarkierungs-Studien (Boll *et al.* 1995) an BSMV von Ratten ermittelten.

g) Lokalisation des Peptidtransporters PEPT2 in der Maus

Mittels RT-PCR konnte die PEPT2-mRNA im Kaninchen in Niere und anderen extrarenalen Geweben nachgewiesen werden (Döring F *et al.* 1998a).

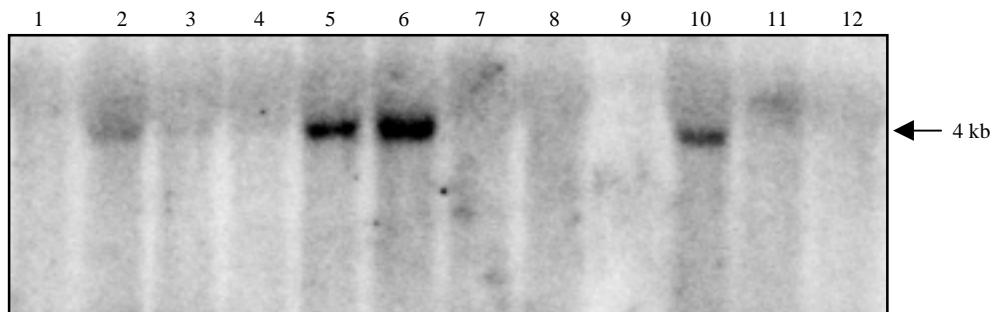


Abbildung 3.7 Northern Blot mit Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben der Maus. 5 μ g RNA, isoliert aus verschiedenen Geweben der Maus, wurden in einem 1 %igen RNA-Gel bei konstanten 60 V 4 h getrennt. Die RNA-Moleküle wurden auf einen Filter übertragen und mit einer cDNA-Sonde hybridisiert und mittels Phosphoimager detektiert. Die cDNA-Sonde umfaßte den Bereich von 341 bis 697 strangaufwärts des Translationsstartes der isolierten PEPT2-cDNA. Aufgetragene RNA aus 1: Skelettmuskel, 2: Brustdrüse, 3: Dünndarm, 4: Milz, 5: Gehirn, 6: Niere, 7: Kolon, 8: Uterus, 9: Herz, 10: Lunge, 11: Magen, 12: Leber.

Zur Analyse der Expression von PEPT2-mRNA in verschiedenen Geweben der Maus wurde ein Northern-Blot (siehe 2.2.11) durchgeführt. Wie in Abbildung 3.7 dargestellt, beschränkt sich die Expression nicht nur auf die Niere. Die PEPT2-mRNA konnte auch im Gehirn, in der Lunge und mit schwächerem Signal in der Brustdrüse detektiert werden.

3.1.3 Funktionelle Charakterisierung von PEPT2

An die Klonierung schloß sich die funktionelle Charakterisierung der PEPT2-cDNA, bzw. des daraus gebildeten Proteins an. Dazu wurden *Xenopus laevis* Oocyten als Expressionssystem benutzt (Gurdon *et al.* 1971). Mittels *in vitro* Transkription wurde die cRNA von der PEPT2-cDNA der Maus synthetisiert und in Oocyten injiziert. Die Oocyten besitzen die Fähigkeit, exogen zugeführte mRNA effizient zu translatieren, das gebildete Protein meist korrekt zu prozessieren und in das richtige subzelluläre Kompartiment zu integrieren. Außerdem besitzen sie gegenüber anderen Expressionssystemen vorteilhafte Eigenschaften, wie ihre außergewöhnliche Größe (1-2 mm Durchmesser), ihre relativ einfache Handhabbarkeit und ihre hohe Expressionsrate. Die Charakterisierung der Transporteigenschaften von PEPT2 erfolgte durch Fluxstudien mit radioaktiv-markierten Dipeptiden und durch elektrophysiologische Messungen (siehe jeweils 2.2.5 b und c). Zum Vergleich wurde auch cRNA der zuvor isolierten Kaninchen-cDNA in Oocyten injiziert (Boll *et al.* 1996).

a) Fluxstudien

pH-Abhängigkeit der Dipeptid-Aufnahme

Die treibende Kraft der Peptidtransporter ist ein zelleinwärts gerichteter pH-Gradient, $pH_{\text{außen}} < pH_{\text{innen}}$ (Ganapathy *et al.* 1983). Um die pH-Abhängigkeit zu untersuchen, wurde die Aufnahme des Substrats, $^3\text{H-D-Phe-Gln}$, bei pH-Werten zwischen 5 und 8 gemessen. Sowohl der murine PEPT2 als auch PEPT2 aus dem Kaninchen zeigten eine deutliche Abhängigkeit vom $pH_{\text{außen}}$, mit einem Optimum bei $pH \leq 6.0$ (Abb. 3.8).

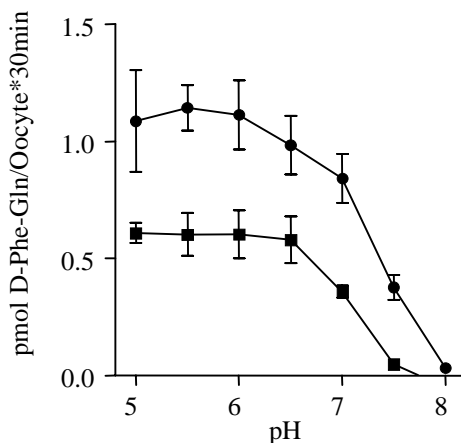


Abbildung 3.8 pH-Abhängigkeit der Substrataufnahme von PEPT2 in Oocyten. 30nl Wasser (Werte abgezogen), 30 nl (10 ng) PEPT2-cRNA aus dem Kaninchen (●) oder 30 nl (10 ng) murine PEPT2-cRNA (■) wurden in Oocyten injiziert. 3 Tage nach der Injektion wurden die Oocyten 30 min mit $^3\text{H-D-Phe-Gln}$ bei pH-Werten von 5.0 bis 8.0 inkubiert. Die Aufnahmewerte stellen die Mittelwerte \pm SEM von 6 - 8 Oocyten pro Meßpunkt dar und sind repräsentativ für zwei gleichartige Experimente.

Substrataffinität

Wie in der Einleitung erwähnt, unterscheiden sich der renale (PEPT2) und der intestinale (PEPT1) Peptidtransporter in ihrer Substrataffinität, wobei das renale System höhere Affinitäten aufweist. Zur Ermittlung der Substrataffinität des murinen PEPT2 wurde bei pH 6.0 die Aufnahme von D-Phe-Ala als Funktion der Substratkonzentration gemessen.

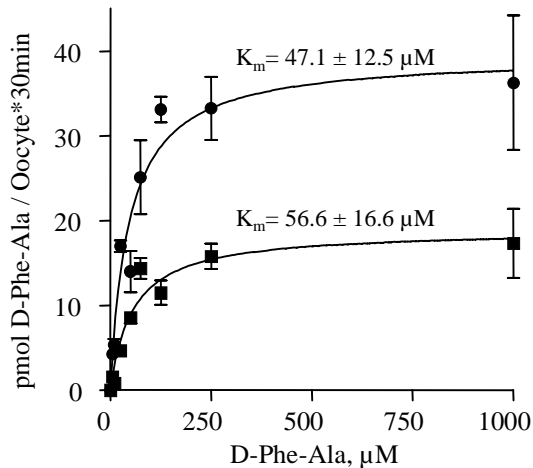


Abbildung 3.9 Abhängigkeit der Aufnahme von D-Phe-Ala in PEPT2-exprimierende Oocyten als Funktion der Substratkonzentration. 30 nl Wasser (Werte abgezogen), 30 nl (10 ng) PEPT2-cRNA aus dem Kaninchen (●) oder 30 nl (10 ng) murine PEPT2-cRNA (■) wurden in Oocyten injiziert. 3 Tage nach der Injektion wurden die Oocyten 30 min mit ³H-D-Phe-Gln bei Substratkonzentrationen von 5 – 1000 µM inkubiert. Die Aufnahmewerte stellen die Mittelwerte ± SEM von 6 - 8 Oocyten pro Meßpunkt dar und sind repräsentativ für zwei gleichartige Fluxstudien.

Das Dipeptid D-Phe-Ala wies zu beiden PEPT2-Transportern einen K_m -Wert von ca. 50 µM auf.

Substratspezifität

Die Substratspezifität des renalen Peptidtransporters wurde in PEPT2-exprimierenden Oocyten in der Ab- oder Anwesenheit von potentiellen Inhibitoren bzw. Substraten (Abbildung 3.10) ermittelt.

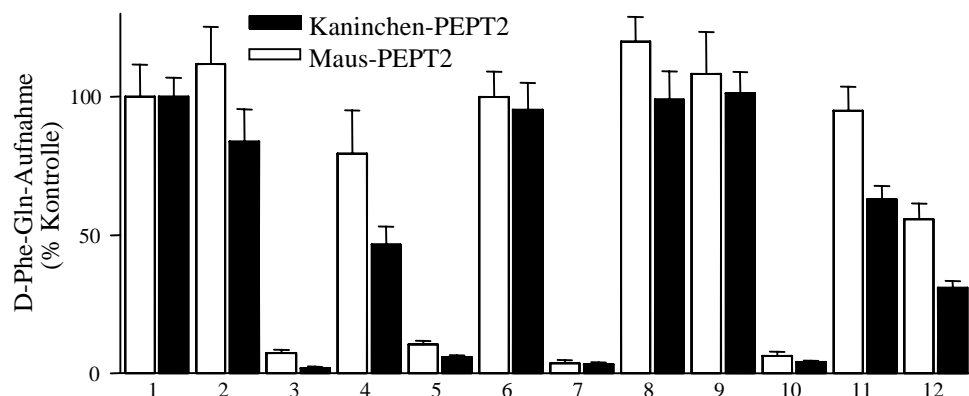


Abbildung 3.10 Substratspezifität der Peptidtransporter aus Maus und Kaninchen in PEPT2-exprimierenden Oocyten. 3 Tage nach der Injektion wurden die Oocyten 30 min mit 1.1 µM ³H-D-Phe-Gln in An- und Abwesenheit von 1 mM der Inhibitoren inkubiert. Die Aufnahmewerte stellen die Mittelwerte ± SEM von 6-8 Oocyten pro Meßpunkt dar. 1: Kontrolle, 2: L-Ala, 3: L-Ala-L-Ala, 4: L-Ala-D-Ala, 5: D-Ala-L-Ala, 6: D-Ala-D-Ala, 7: Ala-Ala-Ala, 8: Gly-Gly-Gly-Gly, 9: Penicillin G, 10: Cefadroxil, 11: Ampicilin 12: δ-Aminolävulinsäure.

Der Peptidtransporter hat die Fähigkeit, sowohl Di- als auch Tripeptide zu transportieren, wobei jedoch die Stereospezifität eine Rolle spielt (Daniel H *et al.* 1992). Mit Dipeptiden aus L- α -Aminosäuren wurde die Aufnahme von D-Phe-Gln stärker gehemmt, als mit denen, die D-Isomere in N- oder C-terminaler Position enthielten. Dipeptide mit D-Isomeren in N-terminaler Position hemmten die Aufnahme stärker als die mit einem D-Isomer in C-terminaler Position. Dipeptide, die ausschließlich D-Aminosäuren enthielten, konnten die Aufnahme von D-Phe-Gln nicht hemmen. Aminosäuren und Tetrapeptide hemmten die Aufnahme des Substrats ebenfalls nicht deutlich. Andererseits hemmen Tripeptide und ausgewählte Aminocephalosporin-Antibiotika, wie Cefadroxil, oder auch δ -Aminolävulinsäure die Aufnahme des markierten Peptids beträchtlich. Besitzen die β -Laktam Antibiotika keine α -Aminogruppe führen sie nicht zur Hemmung der Substrataufnahme, d.h., sie interagieren nicht mit der Substratbindungsstelle von PEPT2.

b) Elektrophysiologische Messungen

Die treibende Kraft der Peptidtransporter liefert sowohl der zelleinwärts gerichteter pH-Gradient, als auch das Membranpotential. Durch den Cotransport von Protonen besitzt der Transportschritt elektrogene Eigenschaften (siehe Einleitung). Für die elektrophysiologischen Messungen wurden vier Dipeptide genutzt, die vermutlich besonders im Gehirn eine wichtige Rolle spielen.

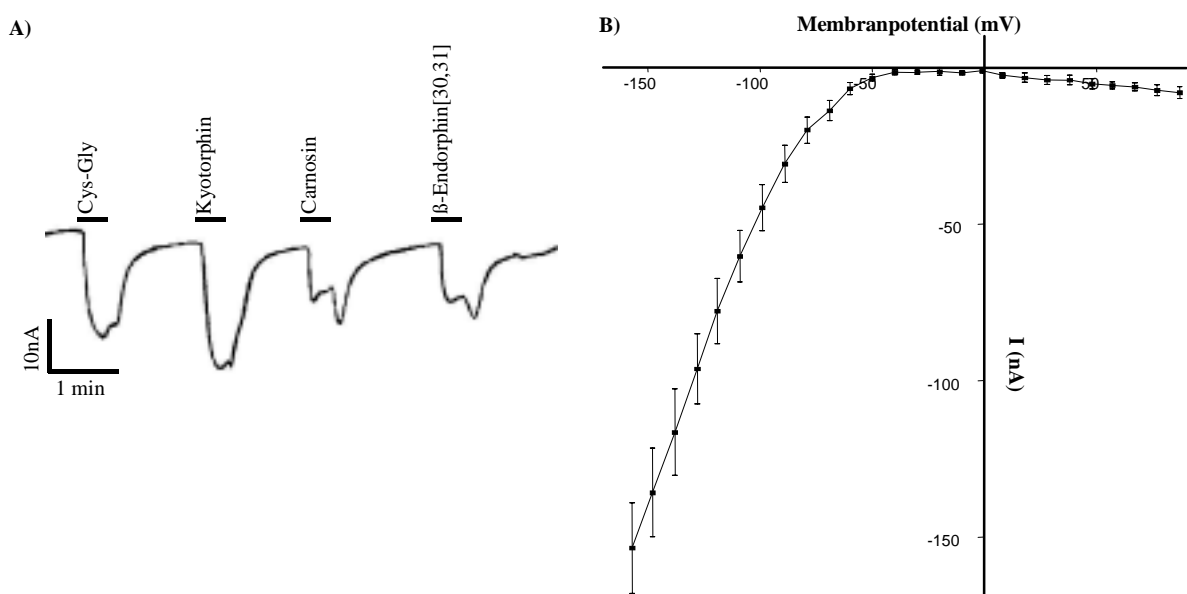


Abbildung 3.11 Elektrophysiologische Messungen an PEPT2-exprimierenden Oocyten. A) Substratinduzierte Einwärtsströme in PEPT2-cRNA injizierte Oocyten bei -60 mV in Anwesenheit von Cys-Gln, Kytorphin, Carnosin und β -Endorphin[30,31]. Die horizontalen Striche zeigen den Zeitraum währenddessen das Substrat angeboten wurde. B) Stromspannungskurve von mit Gly-Gln perfundierten PEPT2-exprimierenden Oocyten.

Cys-Gly, ein Vorläufer des antioxidativen Peptids Glutathion (Dringen R *et al.* 1999), Kyotorphin (Tyr-Arg), ein Neuropeptid mit analgetischer Wirkung (Arima T *et al.* 1997), Carnosin (β -Ala-His), welches sich in hohen Konzentrationen im Gehirn nachweisen läßt, über dessen Wirkung jedoch nichts bekannt ist (Bonfanti L *et al.* 1999) und zuletzt Gly-Gln als Fragment des β -Endorphins [30-31], das als Antagonist der β -Endorphin- [1-31]-Freisetzung z. B. durch Hypoxia und Hypercapnia gilt (Unal *et al.* 1994). Alle Substrate induzierten einen positiven Einwärtsstrom in PEPT2-exprimierenden Oocyten (siehe Abbildung 3.11a). Abbildung 3.11b zeigt zusätzlich für Gly-Gln, daß die Höhe des Einwärtsstrom abhängig vom angelegten Membranpotential ist.

Der murine Peptidtransporter PEPT2 zeigt damit sehr ähnliche funktionelle Eigenschaften, wie die verwandten Transporter aus dem Kaninchen oder dem Menschen, sowohl hinsichtlich der pH-Abhängigkeit, Substrat-Affinität als auch der Substrat-Spezifität und Elektrogenität.

3.2 Identifizierung des murinen *Pept2*-Gens

3.2.1 Isolierung des renalen Peptidtransporter-Gens

Anhand der murinen PEPT2-cDNA konnte das Peptidtransporter-Gen *Pept2* aus einer genomischen DNA-Bank durch Homologie-Screening isoliert werden (siehe Methoden 2.2.6). Für das Screening wurde eine spezifische DNA-Sonde synthetisiert.

a) Synthese der DNA-Sonde P2g-2°Intron

Aus muriner Lunge wurde genomische DNA isoliert und mit dem Senseprimer M2F-51 und dem Antisenseprimer Rb2B290 (Sequenzen siehe Anhang III) mittels PCR amplifiziert: 94°C 2 min, 35 \times (94°C 1 min, 60°C 1 min, 68°C 5 min), und 10 min bei 68°C (siehe 2.2.1). Das entstandene ca. 3.0 kb lange PCR-Produkt wurde in pCR2.1 kloniert. Die Exon-Intron-Übergänge wurden sequenziert. Das PCR-Produkt enthielt Teile des ersten und dritten Exons, das komplette zweite Exon und ebenfalls das ca. 2.3 kb lange erste Intron sowie das ca. 0.5 kb lange zweite Intron (siehe 3.2.2a). Nach Verdau mit *EcoRI* entstand unter anderem ein ca. 0.6 kb langes Fragment, das von der *EcoRI*-Erkennungsstelle im zweiten Exon zur der *EcoRI*-Erkennungsstelle in pCR2.1 reichte. Folglich enthielt dieses Fragment Teile des zweiten und dritten Exons und das zweite Intron. Dieses DNA-Fragment wurde als Sonde zum screenen der genomischen DNA-Bank genutzt (Sonde: P2g-2°Intron).

b) Isolierung des *Pept2*-Gens aus einer genomischen DNA-Bank der Maus

Für die Isolierung des *Pept2*-Gens wurde die „RPCI21 Mouse PAC“ Bank genutzt. Diese genomische DNA-Bank (Nr. 711) wurde vom RZPD (Ressourcen Zentrum des Deutschen Humanen Genom Projekts am Max Plank-Institut für Molekulare Genetik in Berlin) zur Verfügung gestellt. Die „RPCI21 Mouse PAC“-Library wurde am Roswell Park Cancer Institute (USA) von Kazutoyo Osoegawa und Pieter de Jong hergestellt. Genomische DNA wurde dazu aus der Milz einer weiblichen 129/SvevTACfBr Maus isoliert. Die DNA wurde mit *MboI* partiell verdaut und in die *BamHI*-Schnittstelle des PAC-Vektors pPAC4 (siehe Anhang III) ligiert. Die „RPCI21 Mouse PAC“-Bank enthält 251352 Klone mit einer mittleren Insert-Größe von ca. 150 kb. Demzufolge repräsentiert die Bank ca. zwölfmal das komplette Genom der Maus. Jeder Klon ist auf den gelieferten Filtern mit zwei Kopien vorhanden, um die Auswertung des Screenings zu erleichtern. Die Klone sind auf 10 „high density filter“ verteilt.

Nach der Hybridisierung der 10 Filter mit der DNA-Sonde P2g-2°Intron (2.2.6d) konnten mit dem Phosphoimager verschiedene markierte Kolonien nachgewiesen werden. Die vermeintlich positiven Kolonien konnten als zwei Kopien eines Klones in der 5×5 Box (siehe 2.2.6b) nach der Bestimmung der X/Y-Koordinaten auf dem Filter nach Anweisungen des Lieferanten identifiziert werden. Neun dieser positiven Kolonien wurden daher vom RZPD als *E. coli*-Kolonien in Agar eingebettet bezogen. Diese Klone sind mit ihrer internationalen Bezeichnung in Tabelle 3.2 aufgelistet.

Klon-Nummer	Klons Bezeichnung
1	RCPIP711K20600Q3
2	RCPIP711D05322Q3
3	RCPIP711H0192Q3
4	RCPIP711B04197Q3
5	RCPIP711A23303Q3
6	RCPIP711F22317Q3
7	RCPIP711K17351Q3
8	RCPIP711F17603Q3
9	RCPIP711E15603Q3

Tabelle 3.2 Liste der vermutlich positiven Klone, die zumindest einen Teil des *Pept2*-Gens enthalten. Die internationale Bezeichnung des Klones besteht aus den Zeichen zur Identifikation der Bank, in diesem Fall RCPIP711, gefolgt von der Nummer des Klons.

Die erhaltenen Kolonien wurden auf Agar-Platten (LB-Medium mit 30 µg/ml Kanamycin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Um zu prüfen, daß die positive Klone keine Mischung von mehreren Klonen darstellten, wurde eine Masterplatte hergestellt. Diese

enthielt 9 unabhängige Kolonien ausgehend von den 9 positiven Kolonien. Die Masterplatte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und ein Replikafilter wurde von ihr angefertigt (siehe 2.2.6a). Der Replikafilter wurde über Nacht mit der DNA-Sonde P2g-2°Intron hybridisiert und im Phosphoimager ausgewertet. Sieben der neun Kolonien waren positiv (Abb. 3.12), das heißt, diese 7 PAC-DNA-Klone enthielten mindestens das zweite Intron des murinen *Pept2*-Gens.

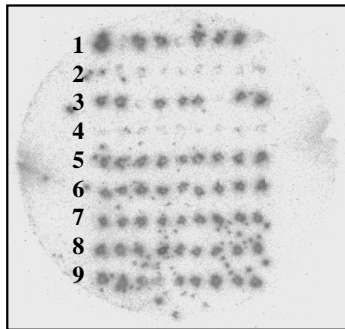


Abbildung 3.12 Identifikation der PAC-DNA-Kolonien mit dem *Pept2*-Gen. Detektion der Hybridisierung des Replikafilters der Masterplatte mit der DNA-Sonde P2g-2°Intron mittels Phosphoimager.

Um zu bestätigen, daß diese sieben Klone mindestens zum Teil das *Pept2*-Gen enthielten, wurde eine Southern-Blot-Analyse durchgeführt. Dazu wurde die PAC-DNA aus diesen Kolonien isoliert und mit *Bam*HI verdaut. Der enthaltene Filter wurde mit der DNA-Sonde P2g-2°Intron hybridisiert und im Phosphoimager ausgewertet. Wie Abbildung 3.13 zeigt, wurde eine Bande bei ungefähr 20 kb in allen Klonen mit Ausnahme von Klon Nummer 5, bei der sie etwas kleiner erschien, sichtbar. Dies sprach dafür, daß alle Klone tatsächlich wenigstens ein größeres Fragment des murinen Peptidtransporter-Gens *Pept2* enthielten.

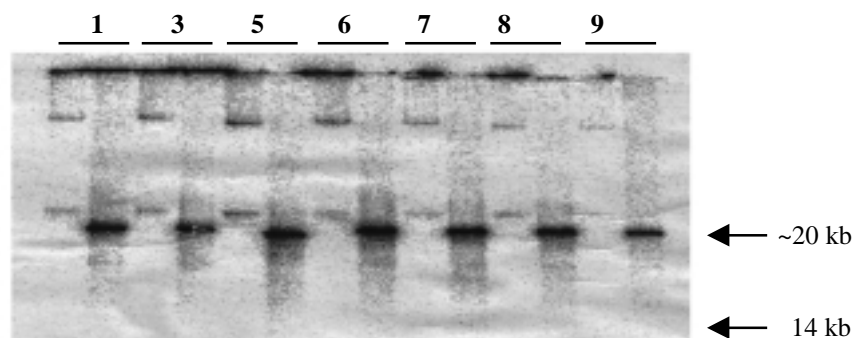


Abbildung 3.13 Southern-Blot zum Nachweis positiver Klone mit Fragmenten des Peptidtransporter-Gens *Pept2*. 100 ng PAC-DNA wurden 3 h bei 37°C mit 10 U *Bam*HI inkubiert und die entstandenen DNA-Fragmente in einem 0.8 %-igen Agarosegel bei konstanten 70V getrennt. Die DNA-Fragmente wurden auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert, mit der DNA-Sonde P2g-2°Intron hybridisiert und mittels Phosphoimager detektiert. 1-9: in Tabelle 3.2 aufgeführte Klone, bei denen stets unverdaute und verdaute DNA nebeneinander aufgetragen wurde.

Da mit Ausnahme von Klon 5 für diese Region des *Pept2*-Gens keine Unterschiede zu beobachten waren, wurde Klon Nummer 8 (RCPIP711F17603Q3) für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

3.2.2. Organisation des murinen Peptidtransporter-Gens *Pept2*

a) Aufklärung der genomischen Struktur

Im ersten Schritt wurde ein Southern-Blot durchgeführt, um die Größe des *Pept2*-Gens abzuschätzen. Dazu wurden je 100 ng PAC-DNA mit 9 verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und der Filter mit einer DNA-Sonde hybridisiert, die die gesamte PEPT2-cDNA enthielt. Wie Abbildung 3.14 zeigt, ließen sich für *NotI* und *XhoI* keine Erkennungsstellen im untersuchten *Pept2*-Gen nachweisen. Die beim Verdau mit *Sall*, *KpnI* und *ApaI* entstandenen DNA-Fragmente konnten schwer zur Abschätzung der *Pept2*-Gen-Größe herangezogen werden, da sie zu groß waren. Die Addition der Größe der entstandenen DNA-Fragmente nach Verdau mit *XbaI* ergab eine Gengröße von etwa 29 kb, die nach *HindIII*-Verdau 33 kb und die nach *EcoRI*-Verdau 35 kb. Somit ist das murine *Pept2*-Gen, unter der Annahme, daß der PAC-DNA Klon das ganze *Pept2*-Gen enthält, ca. 35 kb groß.

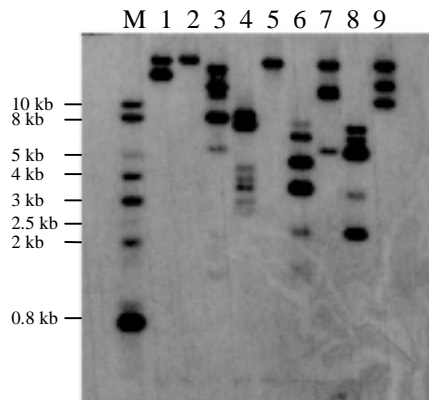


Abbildung 3.14. Southern-Blot-Analyse der PAC-DNA mit dem *Pept2*-Gen nach Screening mit einer „full length“ PEPT2-cDNA als Sonde. 100 ng PAC-DNA wurden 3 h bei 37°C mit 10 U verschiedener Restriktionsenzyme inkubiert und die entstandenen DNA-Fragmente in einem 0.8 %-igen Agarosegel bei konstanten 70V getrennt. Die DNA-Fragmente wurden auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert und mit einer DNA-Sonde hybridisiert, die der gesamten murinen PEPT2-cDNA entspricht. M: DNA-Größenmarker, 1-9: PAC-DNA verdaut mit folgenden Restriktionsenzymen, 1: *Sall*, 2: *NotI*, 3: *BamHI*, 4: *HindIII*, 5: *XhoI*, 6: *EcoRI*, 7: *ApaI*, 8: *XbaI*, 9: *KpnI*.

Zur Aufklärung der Struktur des *Pept2*-Gens wurden PCR-Reaktionen mit PAC-DNA und spezifischen PEPT2-cDNA-Oligonukleotiden der Maus (Sequenzen siehe Anhang III) durchgeführt. Dabei wurde davon ausgegangen, daß die ausgewählten Oligonukleotide keinen Exon-Intron-Übergang enthielten. Die PCR-Reaktionen wurden mit PAC-DNA unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 94°C 2 min, 35 × (94°C 1 min, 60°C 1 min, 68°C 5-15 min), und 10 min bei 68°C. Tabelle 3.3 zeigt die verwendeten Oligonukleotide und die Größe der entstandenen PCR-Produkte.

Alle PCR-Fragmente enthielten mindestens ein Intron mit Ausnahme der Region zwischen M2F2057 und M2B3628, die zum größten Teil dem nicht translatierten 3'-Ende entspricht. Die Addition der Größe der PCR-Fragmente deutet darauf hin, daß das *Pept2*-Gen mindestens 30 kb lang ist, was mit den Daten aus dem in Abb. 3.14 gezeigten Southern-Blot übereinstimmt.

Oligonukleotide	cDNA-Fragment Größe (kb)	PCR-Fragmenten Größe (kb)
M2F-51/Rb2B290	0.35	3.2
M2F290/M2B446	0.15	6.5
M2F446/M2B740	0.30	~ 10
M2F740/M2B955	0.21	0.8
M2F955/M2B1207	0.25	4.0
M2F1207/M2F1816	0.60	4.0
M2F1816/M2B2057	0.24	1.0
M2F2057/M2B3628	1.57	1.57

Tabelle 3.3. PCR mit genomischer DNA und spezifischen PEPT2-cDNA Oligonukleotiden der Maus. Die PCR-Reaktionen wurden mit jeweils 10 ng PAC-DNA unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 94°C 2 min, 35 × (94°C 1 min, 60°C 1 min, 68°C 5-15 min), und 10 min bei 68°C. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Anhang III aufgeführt. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden auf ein 0.8 %-iges Agarosegel aufgetragen und bei konstanten 100 V getrennt. Die Größe der PCR-Fragmente wurde mit Hilfe des DNA-Größenmarkers geschätzt.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in pCRII-TOPO kloniert, mit Ausnahme des PCR-Produktes M2F-51/Rb2B290, das in pCR2.1 kloniert wurde (siehe 3.2.1a). Besondere Schwierigkeiten bereitete die Klonierung der PCR-Produkte, die mit den Oligonukleotid-Paaren M2F446/M2B740 und M2F955/M2B1207 amplifiziert wurden. In beiden Fällen war die Menge an PCR-Produkt zu gering und die Hintergrundfärbung zu hoch. Daher wurden andere PCR-Reaktionen durchgeführt, um geeignete Produkte zur Klonierung zu gewinnen. Bei M2F446/M2B740 wurde der Antisense-Primer gewechselt und durch einen Primer (M2gH14B213, Sequenzen siehe Anhang III), der im Intron lag, ersetzt. Das so erhaltene PCR-Fragment war ca. 10 kb lang und konnte in pCRII-TOPO kloniert werden. Das PCR-Produkt M2F955/M2B1207 wurde durch zwei getrennte PCR-Reaktionen, mit den Oligonukleotid-Paaren M2F955/M2B1113 und M2F1092/M2B1207 (Sequenzen siehe Anhang III) synthetisiert. Das erste PCR-Produkt war 2 kb lang, das zweite besaß 1.9 kb. Die drei PCR-Reaktionen wurden unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

Die PCR-Produkte wurden zur Feststellung der Intron-Exon-Übergänge sequenziert. Außerdem wurden sie mit *EcoRI* geschnitten, um die entstandenen Fragmente als Sonden verwenden zu können (siehe 2.2.6c). Es wurden 9 Southern Blots mit PAC-DNA durchgeführt, die mit den oben genannten Restriktionsenzymen verdaut und mit den 9 verschiedenen PCR-Produkt-Sonden hybridisiert wurde (siehe Abbildung 3.15). Dadurch sollte die Zuordnung der genomischen Fragmente zu den jeweiligen cDNA-Regionen erfolgen.

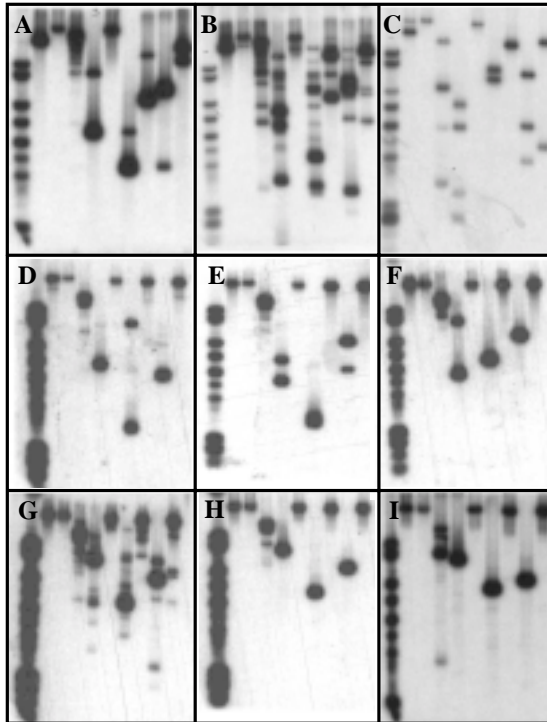


Abbildung 3.15 Southern Blot der *Pept2*-Gen enthaltenden PAC-DNA im Screening mit 9 verschiedenen genomischen PCR-Fragmenten. Je 100 ng PAC-DNA wurden 3 h bei 37°C mit 10 U der verschiedenen Enzymen inkubiert und die entstandenen DNA-Fragmente auf einem 0.8 %-igen Agarosegel bei konstanten 70 V getrennt. Die DNA-Fragmente wurden auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Reihenfolge der aufgetragenen DNA von links nach rechts: DNA-Größenmarker, PAC-DNA mit folgenden Restriktionsenzymen verdaut: *Sall*, *NotI*, *BamHI*, *HindIII*, *XhoI*, *EcoRI*, *ApaI*, *XbaI*, *KpnI*. Zur Hybridisierung der Filter wurden als Sonden die verschiedenen genomischen PCR-Fragmente des murinen *Pept2* verwendet. Die PCR-Fragmente wurden mit folgenden Oligonukleotid-Primern amplifiziert: A: M2F-51/Rb2B290, B: M2F290/ M2B446, C: M2F446/ 2BH14213, D: M2F740/ M2B955, E: M2F955/ M2B1113, F: M2F1092/ M2B1207, G: M2F1207/ M2B1816, H: M2F1816/ M2B2057, I: M2F2057/ M2B3628.

Parallel zu diesen Studien wurden präparative Verdauungen durchgeführt, bei denen die PAC-DNA mit *HindIII* und *KpnI* geschnitten und in pZErO subkloniert wurde (siehe 2.2.8). Die Subklone mit Teilen des *Pept2*-Gens wurden identifiziert, indem Replikafilter der *E.coli*-Kolonien mit spezifischen DNA-Sonden, meist aus gesamter PEPT2-cDNA hergestellt, hybridisiert wurden. Ausgewählte Subklone wurden sequenziert.

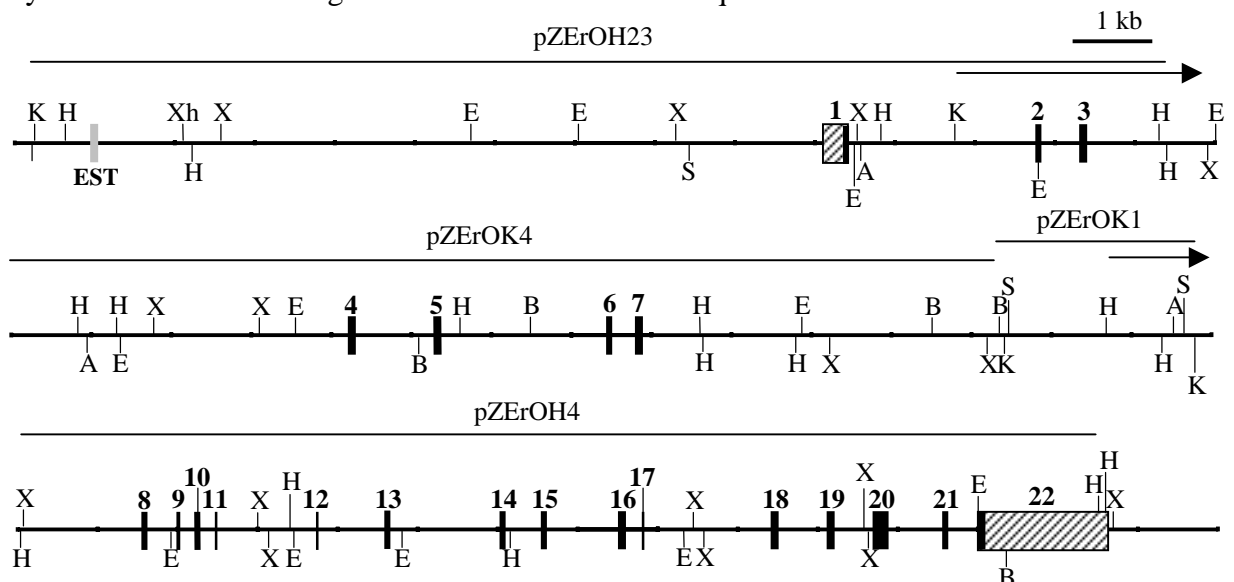


Abbildung 3.16 Genomische Organisation und Restriktionskarte des murinen *Pept2*-Gens. Die 22 Exons sind als Boxen dargestellt und im Fettdruck numeriert. Schraffierte Boxen kennzeichnen die nicht-translatierten Exonbereiche. Nach Sequenzvergleich in der Gen-Datenbank wurde festgestellt, daß der EST-Klon AV051741 sich strangaufwärts des *Pept2*-Gens befindet (graue Box). pZErOH23, pZErOK4, pZErOK1 und pZErOH4 sind die ausgewählten und sequenzierten PAC-DNA-Subklone. Eingezeichnete Schnittstellen der Restriktionsenzyme: A: *ApaI*, B: *BamHI*, E: *EcoRI*, H: *HindIII*, K: *KpnI*, S: *Sall*, X: *XbaI*, Xh: *XhoI*.

Die Sequenz und die oben beschriebenen Southern-Blots erlaubten die genomische Organisation aufzuklären und eine Restriktionskarte des murinen *Pept2*-Gens zu erstellen (siehe Abbildung 3.16). Das murine *Pept2*-Gen besteht demnach aus 22 Exons und spannt sich über eine Region von 34 kb, wenn die 5'- und 3'-Enden des Gens nicht einbezogen werden. Die Größe der Introns schwankt von 89 bp bis zu 9 kb. Die Exons sind zwischen 33 und 149 bp lang mit Ausnahme des ≥ 140 bp großen ersten Exons (siehe 3.3.2d) und des letzten Exons, das das nicht-translatierte 3' Ende enthält (1977 bp).

b) Exon-Intron-Übergänge

Abbildung 3.17 zeigt die Nukleotidpositionen auf cDNA-Ebene, die den Exon-Intron-Übergängen des murinen *Pept2*-Gens entsprechen.

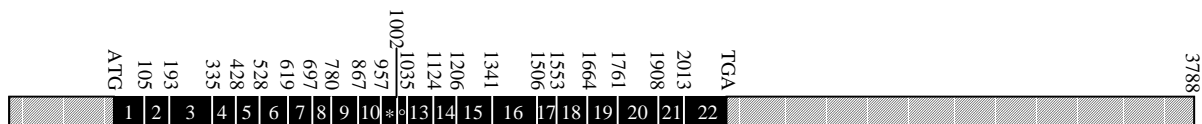


Abbildung 3.17 Nukleotidpositionen der Exon-Intron-Übergänge des murinen *Pept2*-Gens auf cDNA-Ebene. Die Nukleotidpositionen sind basierend auf dem Startcodon der murinen PEPT2-cDNA angegeben. Grau schraffierte Bereiche kennzeichnen die nicht translatierten Exonbereiche. ATG: Startcodon, *: Exon 11, °: Exon 12.

Die Anwesenheit von Introns in eukaryotischen Genen wurde gleichzeitig von verschiedenen Arbeitsgruppen 1977 entdeckt (Knippers R *et al.* 1990). Nach der Transkription werden die Introns als nicht-kodierende Regionen der hnRNA entfernt. Dieser Prozeß wird Spleißen der RNA genannt und wird durch RNA-Protein-Komplexe die „small nuclear ribonucleoprotein particles“ (snRNP) katalysiert. Diese Komplexe erkennen spezifische Sequenzen sowohl in den Intron- als auch den Exon-Regionen.

Exon	Länge (bp)	3'-Ende Akzeptor		5'-Ende Donator	
		Intron (C/T)AG (74/21)100100	Exon G(G/T) 47(32/38)	Exon (A/C)AG (42/41)6075	Intron GT(A/G) 100100(55/30)
1	470			gtcaactccg	gtgagtcccaa
2	88	cgttgaatag	aagctcttcg	ggcatgaaag	gtaactctgt
3	142	ctccaccag	ctgtgtttgac	gaaaattcaa	gtaaggacaa
4	93	ttcttcacag	gacaatcatc	tgctacatac	gtgagtaaaa
5	99	tcctttcag	aatcttatca	agaggaacat	gtaagggtct
6	92	ctcattgcag	gcagaggcac	atgctaagag	gttaggattc
7	78	ttttcctcag	gggatgtgaa	ctggcacttg	gtgagtggag
8	82	tcaattgcag	ttgtgtttgc	atgtatatgg	gtaagttcat
9	86	tctgccctag	tttgctatct	aaaataccca	gtaagtggaa
10	91	ctccccgcag	aagcacctca	ggaccaacag	gtaatagtgg

Exon	Länge	3'-Ende Akzeptor		5'-Ende Donator	
		Intron	Exon	Exon	Intron
11	46	tttgc cc tag	ggctc ac ggt	tggcgatt tg	gtgag tt gaa
12	33	gatg ttt cag	ggatt ttt tg	tcagatg cag	gtaggag att
13	89	ggtg ttg cag	gtg ct aaatc	ttaact tctc	gtaag tg cac
14	82	ccctc ca tag	gtcact cag g	aaaaata aaat	gtgag tt tag
15	134	tctc tt a cag	ggaat gat cc	ctc ttt cag	gtgag gt atg
16	166	catc ct a cag	aacaca ac ac	cagtatg ctg	gtaag tt tagg
17	52	tctc tt a cag	gtaa ag gaca	cagccat cag	gtt tg ggtgc
18	114	tcc ca ta ag	gtt at ta ac	aaagag g aaa	gtaag ag cct
19	97	ctt gt ca cag	gtat ct gca	gatcact aat	gtaag ta gct
20	149	tcc ct g cag	atc ac ca acc	ttatt ct cag	gtaag at tt
21	105	tc ct tt ct ag	gc ac cat ct a	cctg gt g cag	gta tg aat ct
22	1977	tcc ct g cag	tgg gt g aa t		

Tabelle 3.4. Sequenzen der Exon-Intron-Übergänge des murinen *Pept2*-Gens. Die zweite Zeile zeigt jeweils die Konsensussequenzen der Exon-Intron-Übergänge und die Häufigkeit der Anwesenheit jedes Nukleotids in jeder Position (Knippers R *et al.* 1990). Übergänge, die mit der Konsezussequenz übereinstimmen, sind fett gedruckt.

c) Beziehung zwischen Exon-Verteilung und der Protein-Sekundärstruktur

Die Organisation von Genen anderer Membranproteine mit 12 Transmembrandomänen zeigte, daß die Exon-Intron-Übergänge häufig in Beziehung zu den Übergängen zwischen hydrophilen und hydrophoben Proteinbereichen stehen (Bell GI *et al.* 1990, Turk E *et al.* 1994). Die Exons des murinen *Pept2*-Gen entsprechen teilweise in einer Art modularen Aufbau den 12 vorhergesagten Transmembrandomänen (siehe 3.1.2d) sowie den extrazellulären und intrazellulären Schleifen (Abbildung 3.18).

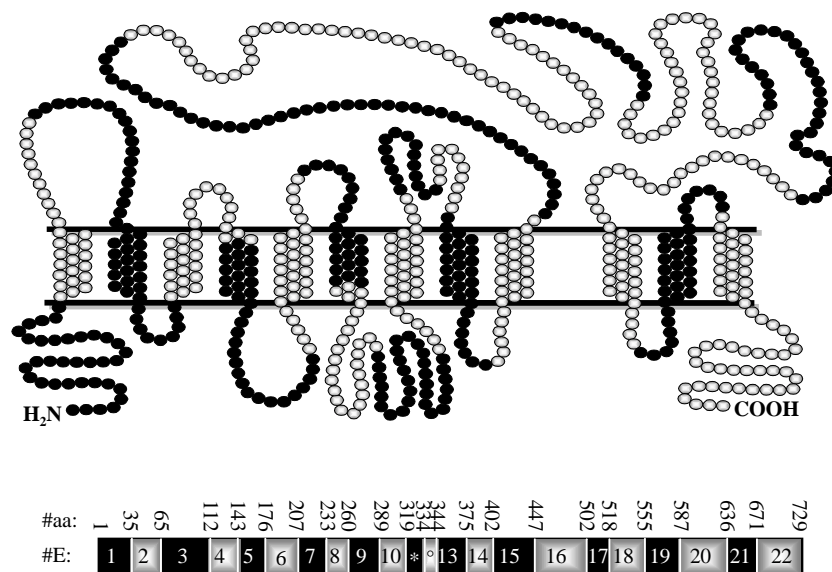


Abbildung 3.18 Zuordnung der Exons zu einzelnen Proteindomänen im murinen *Pept2*-Gen. Oben: Schematische Darstellung der Topologie des PEPT2-Proteins in der Membran. Die Aminosäurereste sind in unterschiedlicher Färbung dargestellt, um die Bereiche der verschiedenen Exons zu kennzeichnen. Unten: Aminosäurepositionen der Exon-Intron-Übergänge. #aa: Aminosäureposition, #E: Exonnummerierung, *: Exon 11, °: Exon 12.

d) Identifikation des Transkriptionsstarts

Der isolierte PEPT2-cDNA-Klon aus muriner Niere erwies sich als 3987 bp lang (siehe 3.1.2a). Entsprechend der Sequenz wäre der Transkriptionsstart des murinen *Pept2*-Gens 203 bp strangaufwärts des Startcodons. Die 5'-nicht-translatierte Region kann kaum länger sein, da, wie in Abbildung 3.7 gezeigt, durch Northern-Blot-Analyse mit Gesamt-RNA aus muriner Niere erkennbar ist, daß die vollständige PEPT2-mRNA eine Größe von ca. 4 kb hat.

Zur Feststellung des Transkriptionsstarts wurde 5'-RACE durchgeführt. Mit Gesamt-RNA, isoliert aus muriner Niere wurde, mit dem Oligonukleotid M2B740 der Erststrang synthetisiert (Sequenz siehe Anhang III). Nachfolgend wurden zwei verschiedene PCR-Reaktionen mit dem entstandenen Erststrang durchgeführt. In beiden Reaktionen wurde der Adaptor-Primer AAP als Sense-Primer eingesetzt. Als Antisense-Primer dienten die Oligonukleotide Rb2B290 bzw. M2B446 (Sequenzen siehe Anhang III). Unter den beschriebenen Bedingungen (siehe Methoden 2.2.3) konnten nach 35 Zyklen mehrere Banden mit unterschiedlicher Intensität beobachtet werden. Um die spezifischen Produkte zu detektieren wurde ein Southern Blot durchgeführt. In beiden Fällen (siehe Abbildung 3.19) konnten zwei Banden detektiert werden, mit einer Länge von jeweils 330 und 530 bp (PCR-Reaktion mit Rb2B290) bzw. 470 und 670 bp (PCR-Reaktion mit M2B446).

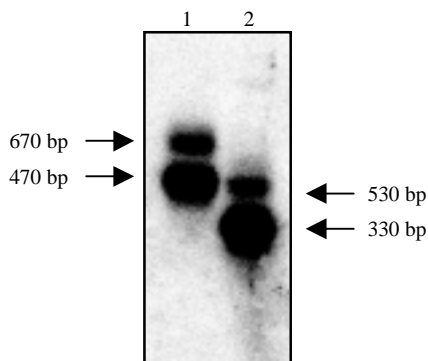


Abbildung 3.19 Southern Blot von den 5'-RACE Produkten zur Bestimmung des Transkriptionsstarts. 3 µl der PCR-Reaktion wurden auf ein 2 %-iges Agarosegel aufgetragen und bei konstanten 70 V getrennt. Die DNA-Fragmente wurden auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert, mit dem PCR Produkt, amplifiziert mit M2F-51 und M2B290, als Sonde hybridisiert und mittels Phosphoimager detektiert. 1: 5'-RACE mit M2B446 und AAP, 2: 5'-RACE mit Rb290 und AAP.

Die PCR-Produkte wurden in pCRII-TOPO kloniert und in TOP10F'-*E. coli*-Bakterien transformiert (siehe 2.2.4). 300 *E. coli*-Kolonien wurden durch PCR-Screening und Hybridisierung von Replikafilter untersucht (siehe 2.2.14a und 2.2.6). Ausgewählte Klone wurden sequenziert. Nach diesen Sequenzen besitzt das *Pept2*-Gen zwei Haupt-Transkriptionsstarts, 35 und 235 bp strangaufwärts des Startcodons (siehe Abbildung 3.20).


```

      ttac ttccccatgc cttacctttg gcacaatcag cgtgcagccc ctctcttttc -181
ctatagcttc aagttctgct ctaaggcagg cagccactga aactgacacc cacagggtta -121
aacctatctg ctgtagctat ccctcctccc cctagtcccc cttttcactg taggctggca -61
gcagtcctag ctgcctactg aagccaaatg cttgaggaga gagagagtaa ggagccagcc atg 3

```

Abbildung 3.20 Sequenz der 5' nicht-translatierten Region der murinen PEPT2-cDNA. Das Startcodon ist unterstrichen und beide Haupt-Transkriptionsstarts sind fett und kursiv gedruckt.

e) Nachweis repetitiver Sequenzen

Die proteinkodierenden DNA-Abschnitte der meisten Gene finden sich im haploiden Genom als Einzelkopie-Abschnitte. Dagegen findet man in Genom fast aller untersuchten Eukaryoten zwischen und in den Einzelkopien verstreut sogenannte mittelrepetitive DNA-Abschnitte. Diese können in „lange, verteilte Wiederholungssequenzen“ (LINE: long interspersed repeat sequences) und „kurze, verteilte Wiederholungssequenzen“ (SINE: short interspersed repeat sequences) unterteilt werden. Die LINE-Sequenzen sind in der Regel über 6 kb lang und man findet davon einige zehntausend Exemplare im Säugetier-Genom. Die SINE-Sequenzen sind üblicherweise ca. 500 bp lang und lassen sich ungefähr 10^5 Mal im Genom nachweisen. Es gibt mehrere Klassen dieser repetitiven DNA-Abschnitte mit ähnlichen aber nicht identischen Nukleotidsequenzen (Jagadeeswaran P *et al.* 1981, Singer EM 1982).

Die vorliegenden Studien dienten u.a. als Vorarbeiten für die Herstellung einer *Pept2* Knockout-Maus. Bei der Konstruktion des notwendigen Targeting-Vektors für die Transfektion in ES-Zellen muß darauf geachtet werden, daß der Vektor keine repetitiven Sequenzen enthält. Deren Anwesenheit würde u.a. zur einer stark erhöhten Rate an heterologer Rekombination führen und die Suche nach einem positiven ES-Zellklon stark erschweren (siehe 3.3).

Die Sequenz des *Pept2*-Gens wurde daher mit dem BLAST-Programm (www.ncbi.nih.gov/BLAST/) auf Ähnlichkeiten mit hinterlegten Sequenzen der Gen-Bank untersucht. Außerdem wurde nach repetitiven Sequenzen mit dem Repeat WebGen Programm (www.itba.mi.cnr.it) gesucht. 8.5 kb strangaufwärts des ersten Exons von *Pept2* ließ sich eine mittelrepetitive sogenannte LTR-like DNA-Sequenz nachweisen. Diese ist 500 bp lang und etwa 500 mal im murinen Genom vorhanden (Wirth T *et al.* 1983). B1-repetitive Elemente, ungefähr 100 bp lang (Moshier JA *et al.* 1987), konnten 3 mal im ersten Intron, 2 mal im dritten Intron und einmal im siebten Intron identifiziert werden. Eine „intracisternal A-Particle“ Sequenz (Ymer S *et al.* 1986) befindet sich 5 kb strangaufwärts von Exon 8. Ein MT-repeat („Mouse Transcript repeat“, Bastien L *et al.* 1987) befindet sich im siebten Intron 1 kb strangaufwärts von Exon 8. Außerdem wurde ein sogenanntes Srf-3 Pseudogen (Huxley C *et al.* 1988) von ca. 600 bp Länge in Intron 3 etwa 2 kb strangabwärts des dritten Exons nachgewiesen.

f) Chromosomale Lokalisation

Das diploide murine Genom ist in 40 Chromosomen aufgeteilt, zweimal 19 Autosome und die beiden Geschlechtschromosomen. Die Lokalisation bekannter Gene auf einem Chromosom erfolgt vorwiegend mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH-Technik) oder der „Radiation Hybrid Mapping“ Methode. In dieser Arbeit wurde die zweite Methode zur chromosomalen Lokalisation des murinen *Pept2*-Gens eingesetzt. Die Verfügbarkeit des „T31 Mouse Radiation Hybrid Panel“ und der murinen „Mouse RH Database“ bieten die Vorteile dieser PCR-Methode (siehe 2.2.12).

Für das sogenannte „RH mapping“ des murinen *Pept2*-Gens wurden die Oligonukleotidpaare M2gF1527A/M2B1661 und M2gF955A/M2gB1030A für ihre spätere Verwendung unter folgenden Bedingungen 94°C 4 min, 35 Zyklen × (94°C 30 s, 60°C 30 s und 72°C 30 s) geprüft. Abbildung 3.21 zeigt die PCR-Produkte mit entsprechender Kontroll-DNA.

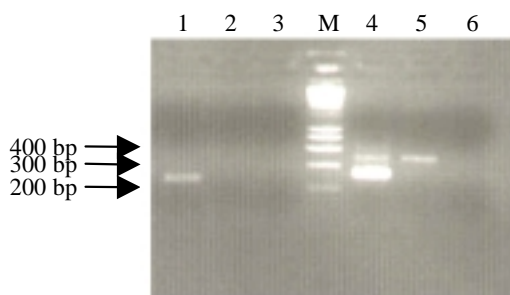


Abbildung 3.21 PCR-Reaktionen mit genomischer DNA aus 129/aa- und A23-Zelllinien. 15 µl jeder PCR Reaktion wurden auf ein 2 %-iges Agarosegel bei konstanten 80 V getrennt. Die DNA wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht. M: Größenmarker. PCR-Reaktionen mit 1,4: genomische DNA, isoliert aus 129/aa Zellen, 2,5: genomischer DNA, isoliert aus A23 Hamster-Zellen, und 3,6: Wasser als Negativ-Kontrolle. PCR-Reaktionen mit dem Oligonukleotidpaar 1-3: M2gF1527A/M2B1661, 4-6: M2gF955A/M2gB1030A.

Durch das Oligonukleotidpaar M2gF1527A/M2B1661 wurde ein deutlich sichtbares Fragment von 290 bp und eine schwächere Bande mit ungefähr 350 bp amplifiziert. Letztere konnte auch mit genomischer DNA aus Hamsterzellen amplifiziert werden. Das Oligonukleotidpaar M2gF955A/M2gB1030A ergab eine einzige Bande bei 280 bp, die nicht in der PCR-Reaktion mit genomischer DNA aus Hamsterzellen nachweisbar war. Damit konnte die spezifische Amplifizierung eines murinen Fragmentes erreicht werden. Die Oligonukleotidpaare erschienen daher geeignet, um in zwei unabhängigen PCR-Reaktionen mit den 100 Hybrid-DNA's des T31 RH Panels unter den oben genannten Bedingungen eingesetzt zu werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.5 dargestellt. Die so erhobenen Befunde wurden zur weitere Analyse an das Jackson Laboratory (www.jax.org) geschickt. Beide Versuchsergebnisse ließen vermuten, daß das *Pept2*-Gen auf Chromosom 16 lokalisiert ist. Das Oligonukleotidpaar M2gF955A/M2gB1030A zeigte dabei konsistent eine bessere Kopplung mit einem bestimmten Locus. Daher wurden mit diesem Primer-Paar die Bedingungen zum Beispiel durch Reduktion der Zyklen auf 28 die PCR-Reaktionen optimiert, um eine genauere Lokalisation herbeizuführen. Die Befunde aus diesen

PCR-Reaktionen mit den 100 Hybrid-DNA's sind in Tabelle 3.5 in Spalte B aufgeführt. Aufgrund statistischer Analyse liegt das murine *Pept2*-Gen auf Chromosom 16 zwischen den Markern D16Mit4 und D16Mit59. In Abbildung 3.22 ist die Lokalisation des *Pept2*-Gens auf Chromosom 16 dargestellt.

Hybrid-DNA N°	A	B	Hybrid-DNA N°	A	B	Hybrid-DNA N°	A	B	Hybrid-DNA N°	A	B	Hybrid-DNA N°	A	B
1	1	0	21	1	1	41	1	1	61	0	0	81	0	0
2	2	0	22	1	1	42	0	0	62	0	0	82	0	0
3	2	0	23	0	0	43	0	0	63	0	0	83	0	0
4	0	0	24	1	1	44	0	0	64	0	0	84	0	2
5	1	1	25	0	2	45	0	0	65	0	0	85	0	0
6	1	0	26	0	0	46	0	0	66	1	1	86	0	0
7	2	0	27	0	1	47	0	0	67	0	0	87	0	0
8	0	0	28	0	0	48	0	0	68	1	0	88	1	1
9	1	1	29	0	0	49	0	0	69	0	0	89	2	0
10	2	0	30	0	0	50	0	0	70	0	0	90	0	0
11	1	1	31	0	0	51	0	0	71	0	0	91	0	0
12	0	0	32	0	0	52	1	1	72	0	0	92	1	1
13	0	1	33	0	0	53	0	0	73	1	1	93	0	0
14	1	1	34	1	1	54	0	0	74	0	0	94	0	0
15	0	0	35	1	1	55	0	0	75	0	0	95	1	0
16	0	0	36	2	2	56	0	1	76	0	0	96	0	0
17	0	0	37	1	1	57	0	0	77	1	1	97	0	0
18	1	0	38	1	1	58	1	2	78	0	0	98	1	1
19	2	2	39	0	2	59	0	0	79	0	0	99	1	1
20	1	0	40	0	1	60	1	1	80	0	1	100	1	0

Tabelle 3.5 Chromosomale Lokalisation des murinen *Pept2*-Gens durch „Radiation Hybrid Mapping“. Ergebnisse der PCR-Reaktionen mit je 25 ng Hybrid-DNA. Die Ergebnisse sind dargestellt als: 0: kein Fragment amplifiziert, 1: Fragment der richtigen Größe amplifiziert, 2: nicht eindeutiges Ergebnis, entweder wegen sehr schwachem Signal oder zu hoher Hintergrundfärbung. Je zwei unabhängige Versuche wurden mit zwei verschiedenen Oligonukleotidpaaren durchgeführt, A: M2gF1527A/M2B1661 und B: M2gF955A/M2gB1030A. Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens zwei gleichartige PCR-Reaktionen

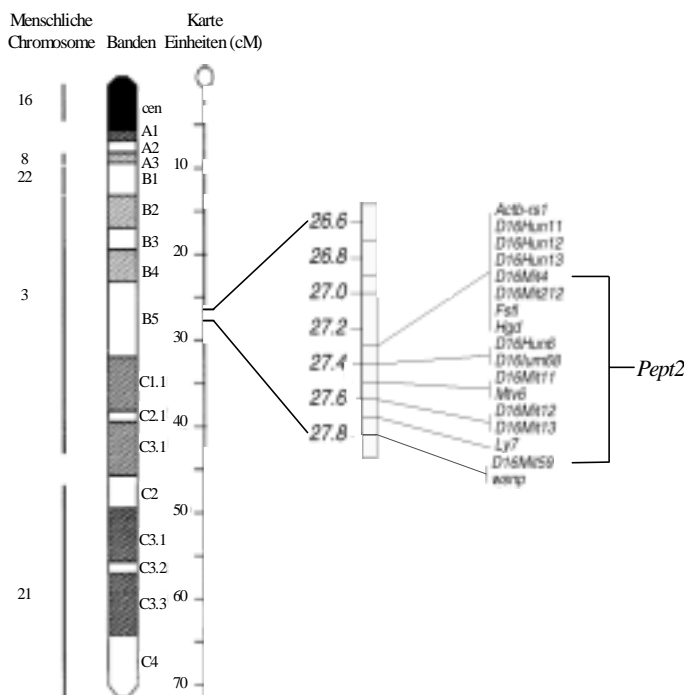


Abbildung 3.22 Lokalisation des murinen Peptidtransporter-Gens *Pept2* auf Chromosom 16. Das murine *Pept2*-Gen kann zwischen den Markern D16Mit4 und D16Mit59 lokalisiert werden. Die Marker befinden sich zwischen den Karten-Einheiten (in cM) 27.2 und 27.8, die sich in der Chromosom-Bande B5 befinden. Links eingezeichnet sind die Regionen, die eine konservierte Syntänie mit humanen Chromosomen aufweisen. Die Abbildung basiert auf Informationen von Moore *et al.* 1999 und Cabin & Reeves 1998.

3.2.3 Identifizierung der Promotorregion des murinen *Pept2*-Gens

Bei Säugetieren ist die Regulation des Peptidtransporters *Pept2* auf genomischer Ebene bisher nicht untersucht worden. Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Promotorregion des *Pept2*-Gens zu identifizieren und zu charakterisieren. Dies kann als Anfangspunkt für weitere Untersuchungen zur physiologischen Regulation der Genexpression verstanden werden. Die Identifizierung der Promoterregion wird überwiegend durch funktionelle Reporter-Analyse erreicht. Einem Reporter-Gen werden hierfür verschiedene DNA-Fragmente der möglichen Promotorregion vorgeschaltet. Wenn das Fragment Promotoraktivität entfaltet, wird das vom Reporter-Gen kodierende Protein synthetisiert. Die Anwesenheit des Reporterproteins - meist ein Enzym - und somit die Effektivität des Fragments als Promotor zu fungieren, kann durch Nachweis der enzymatischen Aktivität erfolgen. Diese Untersuchungen werden in eukaryotischen Zellen durchgeführt.

In dieser Arbeit wurde als Reporter-Gen eine modifizierte Alkalische Phosphatase aus der Plazenta benutzt. Dem Gen fehlt der Bereich, der für die Transmembrandomänen kodiert und somit entsteht eine sezernierte Form der Alkalischen Phosphatase, die zusätzlich resistent gegen Hitze- und L-Homoarginin ist (Cullen *et al.* 1992). Dies ermöglicht u.a. die Aktivität der Alkalischen Phosphatase direkt im Zellüberstand zu messen. Außerdem kann die Aktivität der endogenen Alkalischen Phosphatase vollständig durch Erhitzen der Proben auf 65°C und Zusatz des Inhibitors L-Homoarginin gehemmt werden. Die Reporter-Analysen wurden mit Hilfe des Great EscAPe™ SEAP Fluorescence Detection Kits durchgeführt (CLONTECH, Palo Alto, USA). Die HeLa- und LLC-PK₁-Zelllinien wurden als eukaryotisches Expressionssystem benutzt (siehe 2.2.13).

Wie in 3.2.2d erwähnt, liegen die Haupt-Transkriptionsstarts 35 und 235 bp strangaufwärts des Translationsstartes. Daher findet sich höchstwahrscheinlich in der Nähe dieser Region auch der Promotor des murinen *Pept2*-Gens.

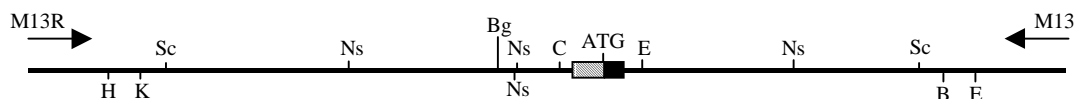


Abbildung 3.23 Subklon SacI4.6-pCRII aus dem 5'-Bereich des murinen *Pept2*-Gens. Restriktionskarte des Klons SacI4.6-pCRII, subkloniert aus dem PAC-Klon RCPIP711F17603Q3 in pCRII (siehe Anhang III). ■: Exon 1; ▣: nicht-translatiertes 5'Ende. ATG: Translationsstart. M13: Universaler Primer; M13R: komplementärer universaler Primer. Schnittstellen: B: *Bam*HI, Bg: *Bgl*II, C: *Cla*I, E: *Eco*RI, H: *Hind*III, K: *Kpn*I, Ns: *Nsi*I, Sc: *Sac*I.

Der Subklon (SacI4.6-pCRII) umfaßt eine Region von 2.7 kb vor Exon 1 bis 1.8 kb nach Exon 1 (siehe Abb. 3.23). Mit diesem Klon war es daher möglich, sowohl die Promotoranalyse durchzuführen, als auch den „Targeting Vektor“ zu konstruieren, um das *Pept2*-Gen auszuschalten (siehe 3.3.1).

Für die Promotoranalyse wurden 7 verschiedene Fragmente des *Pept2*-Gens in den pSEAP-Enhancer-Vektor kloniert (siehe Anhang III). Die Klonierungsstrategie ist in 2.2.13b beschrieben. Alle 7 Fragmente stammen aus dem 5'-Bereich des *Pept2*-Gens und somit der möglichen Promotorregion. Nach Transfektion von 5 der 7 Reporterkonstrukte konnte eine Aktivitätszunahme der sezernierten Alkalischen Phosphatase in den Zellüberständen gemessen werden. Die höchste Aktivität wurde nach der Transfektion des Reporterkonstruktes *Pept2*^{-552/-286} gemessen. Das kleinste Fragment das Promotoraktivität zeigte, ist dasjenige, das den Bereich zwischen 432 und 286 bp strangaufwärts des Translationsstarts enthält. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 3.24 dargestellt.

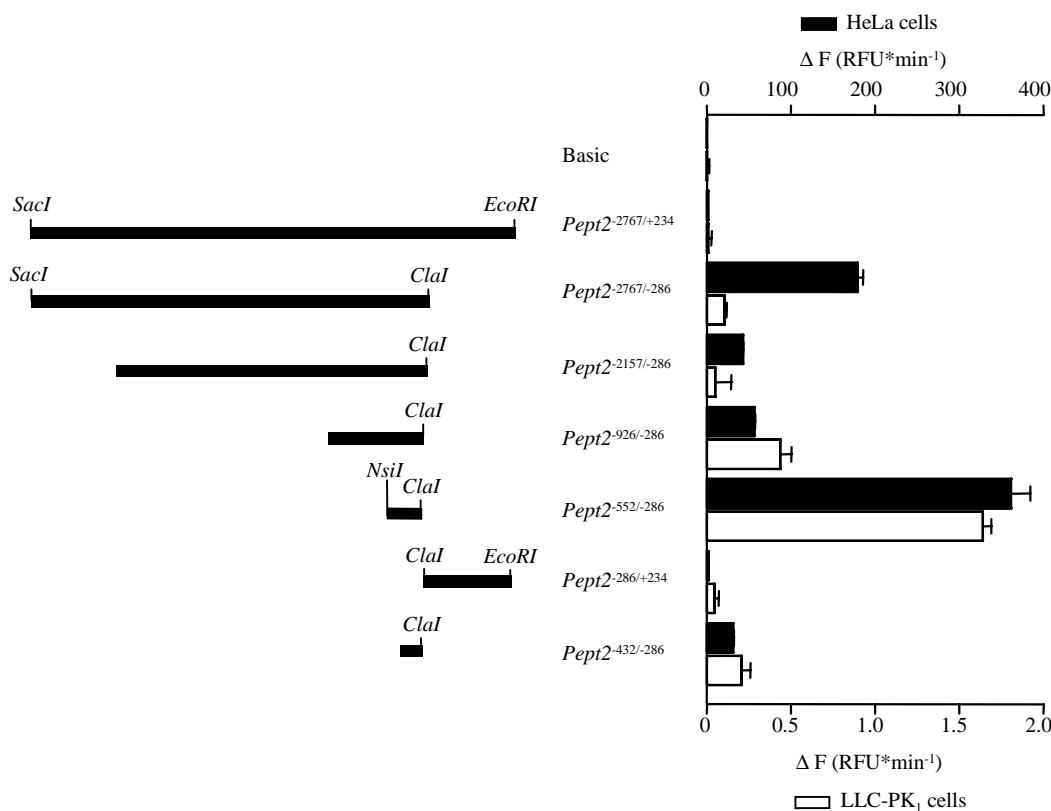


Abbildung 3.24 Promotor-Analyse des murinen *Pept2*-Gens mit den LLC-PK₁- und HeLa-Zelllinien. Links sind die vorgeschalteten Fragmente dargestellt und rechts die Ergebnisse der Transfektionsstudien in LLC-PK₁- und HeLa-Zelllinien. Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte ± SEM der Steigung der normalisierten Fluoreszenzzunahme über 60 min als Maß der Enzymaktivität.

Es ist daher zu vermuten, daß sich der Kernpromotor in diesem 146 bp langen Fragment zwischen 432 und 286 bp strangaufwärts des Translationsstartes befindet. Der Kernpromotor ist die DNA-Region, an die sich der Komplex der Initiation der Transkription anlagert. In diesem Bereich befindet sich im *Pept2*-Gen keine TATA-Box. Jedoch kann in dieser Region ein GC-Box identifiziert werden, ein *cis*-Element, welches häufig sowohl in Promotorregionen von TATA-Box-defizienten Promotoren, als auch in Promotoren mit einer TATA-Box nachweisbar ist (Thiesen HJ & Bach C 1990, Bucher P 1990).

Die niedrigere Aktivität des Reporterkonstruktes *Pept2*^{-432/-286} im Vergleich zur Aktivität von *Pept2*^{-552/-286} könnte damit erklärt werden, daß im letzteren Konstrukt eine CAAT-Box und zwei GC-Boxen zusätzlich vorhanden sind (siehe Abbildung 3.24). Die CAAT-Box ist ein *cis*-Element, das häufiger bei TATA-Box defizienten Promotoren auftaucht, als bei denjenigen mit einer TATA-Box.

c) *cis*-Elemente

Die unterschiedliche Promotoraktivität der verschiedenen Fragmente weist auf die Anwesenheit von Erkennungssequenzen, sowohl für positive als auch negative *trans*-Elemente der Promotorregion hin. Zu ihrer Identifizierung in der Sequenz stehen unterschiedliche Softwareprogramme zur Verfügung, die die untersuchte Sequenz mit entsprechenden Sequenzen in der Datenbank von TRANSFAC vergleicht. Diese Datenbank enthält alle bekannten DNA-Erkennungsstellen unterschiedlichster Transkriptionsfaktoren (Heinemeyer T *et al.* 1998). Das 2767 bp lange DNA-Fragment zwischen der Schnittstelle *SacI* und dem Translationsstart wurde mit dem Programm MatInspector nach putativen Erkennungsstellen für Transkriptionsfaktoren untersucht (www.gsf.de/ieg/groups/biodv_ser). Mehr als 800 Erkennungssequenzen wurden identifiziert. Dies bedeutet jedoch nicht, daß alle eine Rolle in der Regulation der Expression des *Pept2*-Gens spielen. In Abbildung 3.24 sind als Beispiele für *cis*-Elemente u.a. ein CAAT-Enhancer-Element (CEBP/B: engl: CAAT-enhancer binding protein), ein Glucocorticoid-Response-Element (GRE-C), ein Element für den Interferon regulierenden Faktor 2 (IRF-2) und den Repressor E4BP4 eingezeichnet.

```

catttct acaataaatt gaaaaattta ctccatgctg -2731
tcataacaca gaagccacaa atatcctttt tttttttgtc attgatggtt gattctgata ttcagattct -2661
tctattattt ctattgtcct tttttatctc tgaaggggtt aataactaatt ctatgtcaaa gatgtttttt -2591
cttatgtatc tcttggactt gtacccttct gtttcaggcc gacctaccag aaacaagagt ataagcaagc -2521
atcttaatat gctattgtcct taggtgatcc tttagctcag agaagctgaa tttacctaag E4BP4 gaatgcttca -2451
gatttcttat atctctgata ttatttgact ctgtgaaata AP-1 atgctgttat tgtattgccca ttatccagag -2381
ataaacctca ggctttgggc atgaccttag AP-1 ttggtagagt gcttgcttag cactcacaaa accctgaact -2311
gagttcagtc tccagcacta cataaacttg aaacgagttg cccgctcatt cctggactcc cagcgtcag -2241
caatgctgaa ggtagaagtc ggaggatcag agacattcaa ggccatcctt ggctaagtag gaagatcagc -2171
aagaccttgt cttgcaaaaa gacagatttc atagaaattg gtttgaaaac caaagttcac gctctggagc -2101
ctggcaaccg gggacctctg gctgtgcata tgggtgctac ttcactctgt cttctgaagt aaacaccgtc -2031
tagaagttca agccaagggc aaagggaaaacc IRF-2 ggtaacttaa taagtcgaca ctacgctcgt gcctctacta -1961
ggtaacctga ccagaaagt ctgcctattt tagattcagt atttaactga AP-1 gtttaggtcag gaaaggcaat -1891
atctcctaaa agaacaacta cagattaatc AP-1 attaatgctc caggcagaag taaaacggga ttattctttg -1821
ggtaaagggt ggtggaagag aaaatagatg aaaactcaaa tagaacctga gagaacctgg tcaaagtcca -1751
agttaaagt taggggggga aaggttcatt tgttgaaaag tcattcaaac ggataatgta cgaattttgc -1681
aagaaaataag gccatagagt tttctatcct gttcccccta cttctcattt tactattttc ttagttaaca -1611
tagaaaataa tgcattttta aaaaatttca tatatgtatg aattttaatt tgctcatatt cttcccccta -1541
cattgtcctc ttttcttctg tcttcttctc cagtttctcc tcttgcatte gccaatgaaa tcactcatct AP-1 -1471
tgacattgcc tgacttggtg ggttagtgct caggggtgaa cccaagggtg cagaaaatgt GRE-C cctttgtagc -1401
ctttggcaat atctccccct tctttttgtg cttctcttac ctctttggat tagcaaaagt aacacaccaa -1331
ggggagaaaag aaggaaatgc aaggagactg tgttcattca gaccgctgga cgcgcatggt tggaaatgtc -1261
acagtgaaaag ccaatgcttt tacatcagtg atatatagta ctacactttc aattttatat acattcaatt -1191
caatgtaggg tataatgtat ctattgtcac aatgtgtatt ccaattgctt gtctgacaag ggactgagta -1121
tagtattcta gcgtcggaat aaaatccact gaaagttaag aacatttaat gcttgcaata atacctagaa -1051
agcaactggt tcataatttt ttgcacatgt taaattttat ttcttaatga atgaatgaac tgatttttga -981
agagataaat tgaaaataca gaaagegact ttagcaaggg ccattaccaa ctcttctttt ccctgtcatt -911
ttctttaacc ttgtattttt tacttacagg attttctagc tgaatgctat gatgttgaaa acctaagccc -841
ggatcattct tattctcaga ttctgtctg tgatgacttt cttcttctgt cacagcattt tgacttctca -771
gcctccccgc gtttccact ctgtggcttc catacctgca cgactgactg ctgataacctg tctctgcttt -701
tcctatctgt ttctgcatag tgaaaattcc CEBP/B agatctgcca ctttactggc cctgtgattt ttagataagt -631
ttctgattt cttggaacaa taattgtggt ataataaaga tagcagtaa atgtatgaaa accaaaggta -561
tgcatgcata catatatgaa taacgc AP-1 catat acattaacat ggcacataat aaagtgc CAAT-Box cccaaa GC-Box taatggc GC-Box caga -491
tattattaat ctgaaatcag cttctctgtg ttacactggt gtattcttcc cgccccacc GC-Box cccacatgcc -421
attagaaatc agattcagga cctgcagggc ataatgttct accactgagc tgtatgccta gccaaagatgc -351
tgcatctctg agtactatct agtctcatt tgcagaggtta tttttctcaa acagataacc ctaatcgatt -281
ctctagcact gtttcttctc atctcgtgac ttgtgacgtg ttgtttttac ttccccatgc cttacctttg -211
gcacaatcag cgtgcagccc ctctcttttc ctatagcttc aagttctgct ctaaggcagg cagccactga CAAT-Box -141
aactgacacc cacaggggtaaacctatttg ctgtagctat ccctcctccc GC-Box cctagtcccc cttttcactg -71
taggctggca gcagtcctag ctgcctactg aagccaaatg cttgaggaga gagagagtaa ggagccagcc atg 3

```

Abbildung 3.25 Mögliche *cis*-aktive Elemente in der Promotorregion des murinen *Pept2*-Gens. *Pept2*-Gen-Sequenzabschnitt vom Translationsstart bis 2767 bp strangaufwärts. Der Translationsstart ist fett gedruckt. Mögliche Erkennungselemente für CEBP/B, AP1, GRE-C, IRF-2 und E4BP4 sind unterstrichen. **■**: Haupttranskriptionsstart.

3.3 Vorarbeiten für die Herstellung einer *Pept2*-Knockout-Maus (*Pept2*^{-/-})

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, die Vorarbeiten für die Herstellung einer *Pept2*-Knockout-Maus zu leisten. Wie in der Einleitung erwähnt, sollen mit diesem Vorhaben neue Einblicke in die Funktion des Peptidtransporter-Gens bzw. des PEPT2-Proteins in den Stoffwechsel ermöglicht werden. Die Entwicklung einer Knockout-Maus umfaßt 5 Schritte: a) Herstellung des Targeting-Konstrukts, b) Homologe Rekombination des Targeting-Konstrukts in murine ES-

Zellen (Embryonale Stammzellen), c) Injektion der rekombinanten ES-Zellen in Blastocysten und ihr Transfer in eine scheinchwangere Maus, d) genetische Charakterisierung der entstandenen chimären Mäuse einschließlich der Prüfung der Keimbahntransmission und e) Kreuzung der Tiere zur Erzeugung heterozygoter und homozygoter Knockout-Mäuse. Bei erfolgreicher Etablierung dieser Mäuselinien kann anschließend die Charakterisierung des Phänotyps vorgenommen werden. In der vorliegenden Arbeit werden die abgeschlossenen Schritte a, b und c zur Herstellung einer konventionellen Knockout-Maus beschrieben sowie der derzeitige Stand des Schritts d und e vorgestellt.

3.3.1 Herstellung des Targeting-Konstrukts

Das Targeting-Konstrukt pPEPT2tg1 zur Erzeugung einer konventionellen Knockout (*Pept2*^{-/-}) Maus besteht aus folgenden Elementen: a) einem 2.7 kb langen homologen Fragment strangaufwärts des Exons 1 und einem 1.8 kb langen homologen Fragment von Intron 1 zur Ermöglichung der homologen Rekombination des Konstrukts, b) einem nach dem Translationsstart in den Offenen Leserahmen ligiertes β -Galactosidase-Gen. Dies erlaubt es, spezifisch die Expression des *Pept2*-Gens auszuschalten, indem der kodierende Bereich von Exon 1 durch das β -Galactosidase-Gen ersetzt wird. Außerdem erlaubt dieser Ansatz das β -Galactosidase-Gen unter der Kontrolle des *Pept2*-Promotors als Reporter-Gen zu nutzen. c) Darüber hinaus wurde eine sogenannte „geflochte“ Neomycin-Resistenz-Kassette zwischen dem Reporter-Gen und Intron 1 sowie strangabwärts des homologen Bereiches eine Thymidin-Kinase-Kassette eingebracht. Sie erlauben es, eine positive und negative Selektion durchzuführen, um die homolog-rekombinanten Klone zu identifizieren (siehe 3.3.1). Die Flankierung der Neomycin-Resistenz-Kassette mit den sogenannten loxP-Sequenzen erlaubt die Entfernung dieser Kassette in der Knockout-Maus durch Kreuzung mit eine Cre-Rekombinase-exprimierenden Maus. Die Cre-Rekombinase besitzt die Fähigkeit, spezifisch die Bereiche zwischen den loxP-Sequenzen aus dem Genom zu eliminieren.

Um das *Pept2*-Targeting-Konstrukt herzustellen (siehe Abbildung 2.26), wurde im ersten Schritt mit dem Klon SacI4.6-pCRII eine PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden M2F-737 und M2B-11BamHI (Sequenzen siehe Anhang III) durchgeführt. Das entstandene 740 bp PCR-Produkt wurde in den T-tailed pBluescriptII-Vektor kloniert. Das Oligonukleotid M2B-11BamHI enthält hinter dem äquivalenten Translationsstart des *Pept2*-Gens ein Basenpaaraustausch der zur Erzeugung einer *BamHI*-Schnittstelle führt. Dies erlaubte im nächsten Schritt das β -Galactosidase-Gen in den korrekten Leserahmen zu klonieren. Als nächster Schritt wurde der

strangaufwärts gelegene Arm des Targeting-Konstrukts verlängert. Dieser entspricht dem Bereich vom Translationsstart bis zur *SacI*-Schnittstelle 2.7 kb strangaufwärts (Abb. 3.23). Parallel dazu wurden im pKSloxPNT-Vektor (siehe Anhang III) zwei Restriktionsschnittstellen entfernt und ein Linker eingefügt (siehe 2.2.14). Der pKSloxPNT-Vektor wurde freundlicherweise von Dr. W Wurst (GSF-Neuherberg, Institut für Säugetiergenetik) zur Verfügung gestellt. Nachfolgend wurde der strangabwärts gelegene Arm des Targeting-Vektors kloniert. Dieser enthält einen 1.8 kb großen Bereich von der *EcoRI*- bis zur *SacI*-Schnittstelle im Intron 1 (Abb. 3.23). Zuletzt wurde der strangaufwärts gelegene Arm mit dem β -Galactosidase-Gen in den strangabwärts gelegenen Arm des Vektors pKSloxPNT kloniert. Das pPEPT2tg1-Konstrukt ist somit insgesamt 15.5 kb lang.

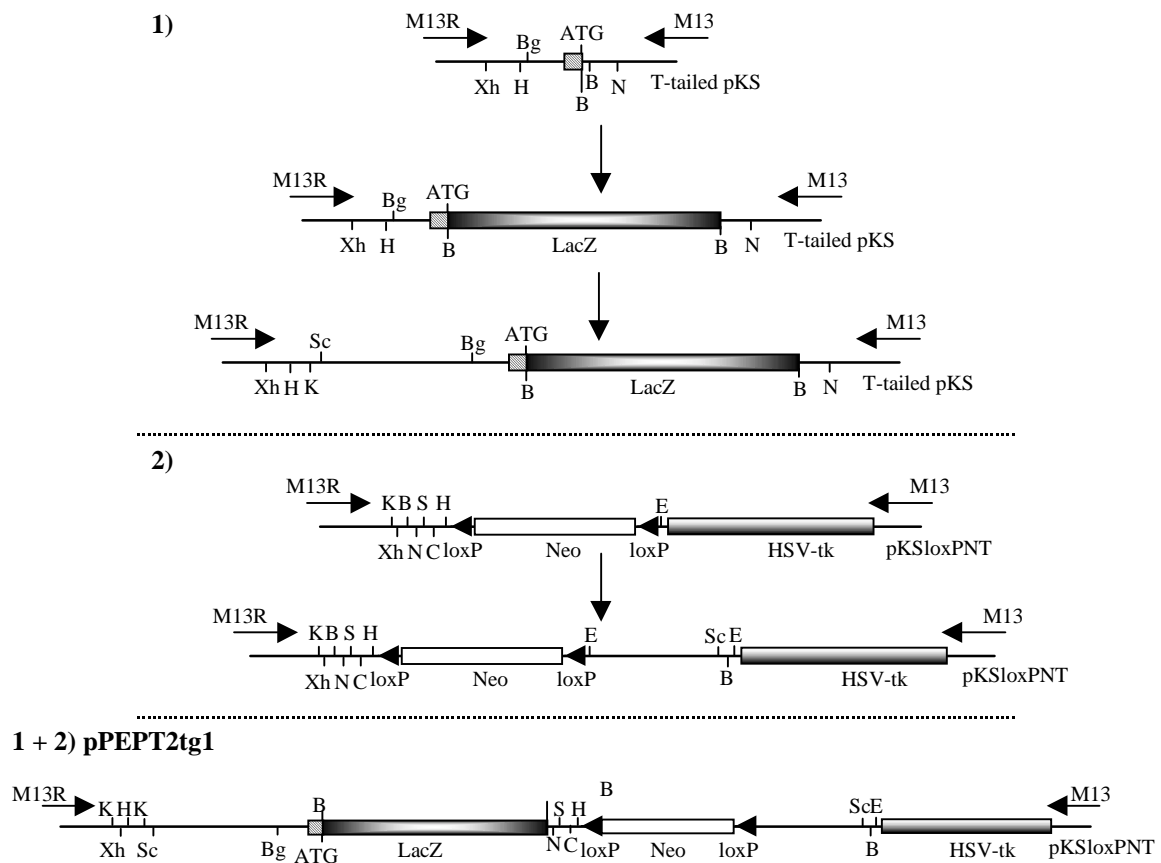


Abbildung 3.26 Konstruktion des Targeting-Vektors. 1) Klonierung des strangaufwärts gelegenen Arms und des β -Galactosidase-Gens in T-tailed pKS. 2) Klonierung des strangabwärts gelegenen Arms des Targeting-Konstrukts in pKSloxPNT, der das HSV-tk-Gen und das „geflochte“ Neo-Gen enthält. 1+2) Herstellung des pPEPT2tg1-Vektors. \square : nicht translatiertes 5'-Ende des *Pept2*-Gens. LacZ: β -Galactosidase-Gen, Neo: Neomycin-Resistenz-Gen, HSV-tk: Herpes Simplex Virus Tymidinkinase-Gen. M13: universaler Primer, M13R: komplementärer universaler Primer. Vektoren (siehe Anhang III): pBluescriptII (pKS) und pKSloxPNT. Schnittstellen: B: *BamHI*, Bg: *BglII*, C: *Clai*, E: *EcoRI*, H: *HindIII*, K: *KpnI*, N: *NotI*, S: *Sall*, Sc: *SacI*, Xh: *XhoI*.

3.3.2 Homologe Rekombination von pPEPT2tg1 in ES-Zellen

Die homologe Rekombination des Targeting-Konstrukts in das murine Genom erfolgt nach Transfektion von ES-Zellen generell mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit. Diese sinkt besonders dann dramatisch ab, wenn das Targeting-Konstrukt repetitive Sequenzen enthält. Die homologen flankierenden Bereiche des pPEPT2tg1-Konstrukts wurden deshalb so ausgewählt, daß sie keine repetitiven Sequenzen enthalten (siehe 3.2.2e).

Wie Abbildung 3.27 zeigt, wird nicht erwartet, daß bei der homologen Rekombination des pPEPT2tg1 in den *Pept2*-Genlocus die Tymidinkinase-Kassette integriert wird, da diese nicht von homologen Bereichen flankiert ist. Bei heterologen Rekombinationen wird jedoch das Targeting-Konstrukt in andere Orte des Genoms integriert, dann jedoch meist inklusive der Tymidinkinase-Kassette. Für die Selektion dieser ES-Zellklone wird einerseits dem Medium Gancyclovir zugesetzt (negative Selektion), während die homolog-rekombinanten Klone durch Zusatz des Neomycinanalogs (G418-Sulfat) zum Medium selektioniert werden. Nur die ES-Klone mit der Neomycin-Resistenz-Kassette sind dadurch überlebensfähig (positive Selektion).

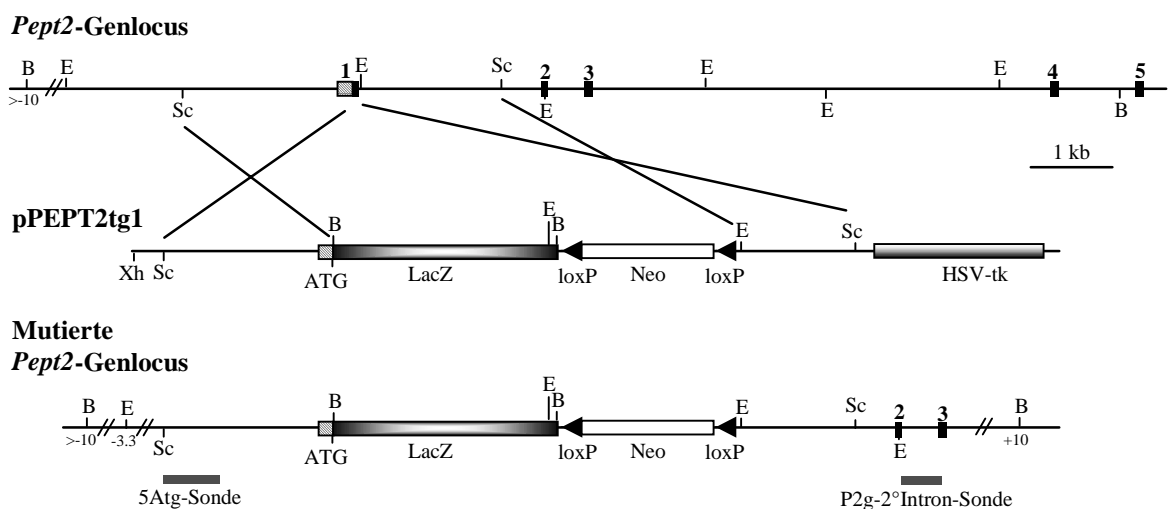


Abbildung 3.27 Erwartete homologe Rekombination des pPEPT2tg1 in den *Pept2*-Genlocus. Schematische Darstellung der Targeting-Strategie, durch die der kodierende Bereich des Exons 1 nach homologer Rekombination durch das Targeting-Konstrukt ersetzt wird. Der so veränderte *Pept2*-Genlocus enthält demzufolge das β -Galactosidase-Gen unter der Kontrolle des *Pept2*-Promotors. Die Sonden P2g-2°Intron und 5Atg sind dargestellt. □ nicht-translatierter Abschnitt des Exon 1, ■: Exon. LacZ: β -Galactosidase-Gen, Neo: Neomycinphosphotransferase-Gen, HSV-tk: Herpes Simplex Virus Tymidinkinase-Gen. Schnittstellen: B: *Bam*HI, E: *Eco*RI, Sc: *Sac*I, Xh: *Xho*I.

Um die homologe Rekombination zu ermöglichen, wurde das pPEPT2tg1 mit *Xho*I linearisiert und durch Elektroporation in die ES-Zellen eingebracht (siehe 2.2.14). Es wurden 3 Elektroporationen mit pPEPT2tg1 und eine mit pPEPT2tg2 (siehe 2.2.14a) durchgeführt, die in Tabelle 3.6 aufgeführt sind. Alle Zellklone wurden mit Gancyclovir und G418-Sulfat behandelt

und durch Southern-Blot analysiert (siehe 2.2.14.b). Die beiden ersten Elektroporationen erwiesen sich als nicht erfolgreich. Daher wurde ein veränderter Targeting-Vektor (pPEPT2tg2) hergestellt. Bei diesem Konstrukt wurde der strangaufwärts gelegene Arm um ca. 5 kb verlängert, wodurch die homologe Rekombination verbessert werden sollte. Nach Transfektion mit pPEPT2tg2 und Selektion konnten lediglich 11 vitale Zellklone erhalten werden, die aber auch keine homologe Rekombination erkennen ließen. Daher wurde erneut das Konstrukt pPEPT2tg1 eingesetzt. Bei dieser dritten Elektroporation mit pPEPT2tg1 wurde für die Isolation der Plasmid-DNA das Volumen der Übernachtskultur von 300 auf 100 ml reduziert, um die Belastung der Zellen mit möglichen enthaltenen Endotoxinen zu minimieren. Dies sollte auch zu einer notwendigen Reduktion der langen Elektroporationszeiten beitragen, die unter Umständen ebenfalls für die negativen Resultate verantwortlich waren (siehe Tabelle 3.6).

Elektroporation Nr.	Targeting-Konstrukt	Küvetten	Elektroporationszeit (ms)	Anzahl der analysierten ES-Klone	Anzahl der positiven Klone
1	pPEPT2tg1	1	7.3	434	0
		2	8.9		
2	pPEPT2tg1	1	10.3	611	0
		2	10.1		
		3	10.3		
		4	10.2		
3	pPEPT2tg2	1	7.3	11	0
		2	7.9		
4	pPEPT2tg1	1	6.7	222	4
		2	7.3		

Tabelle 3.6. Durchgeführte Elektroporationen mit den Targeting-Konstrukten in den ES-Zellen.

Die erhaltenen positiven ES-Klone wurden durch Southern-Blot und PCR-Reaktionen analysiert, um die erfolgten homologen Rekombinanten zu prüfen (siehe 2.2.14b). Dazu wurde genomische DNA der einzelnen ES-Klone isoliert und mit *BamHI* verdaut. Die verdaute DNA wurde auf einem 0.8 %-iges Agarosegel 4 h bei 80 V getrennt und auf einen Filter transferiert (siehe 2.2.10) und mit der P2g-2°Intron-Sonde hybridisiert. Der Wildtyp-*Pept2*-Genlocus ergab eine Bande größer als 20 kb, während der mutierte *Pept2*-Genlocus eine Bande bei ca. 12 kb aufwies. In sechs ES-Klonen aus der vierten Elektroporation konnte auf einem Allel der mutierte *Pept2*-Genlocus nachgewiesen werden. Die Klone wurden entsprechend als 1.1 B.7, 1.1 B.9, 1.1 D.3, 7.1 A.7, 7.1 B.1 und 8.1 A.1 bezeichnet. In Abbildung 3.28a sind sowohl die zwei Banden der Klone 7.1 B.1 und 8.1 A.1 zu sehen, als auch die DNA-Fragmente der Klone, bei denen keine Rekombination im *Pept2*-Genlocus stattfand. Da die P2g-2°Intron-Sonde außerhalb der

Targeting-Konstrukt-Region bindet, werden mit ihr nur Integrationen im *Pept2*-Locus identifiziert. Mit Ausnahme des ES-Klons 7.1 B.1 wurden die anderen vermeintlich positiven Klone weitgehend mittels Southern-Blots mit *EcoRI*-verdauter genomischer DNA und der 5Atg-Sonde analysiert. Hierbei erbrachte das Wildtyp-*Pept2*-Gen eine Bande von ca. 3.5 kb und der mutierte *Pept2*-Genlocus eine Bande bei ca. 6.5 kb. Alle oben genannten 5 Klone zeigten einheitlich diese beiden Banden (siehe Abb. 3.28b). Da die 5Atg-Sonde innerhalb der Targeting-Konstrukt-Region bindet, identifiziert man mit ihr sowohl homologe als auch heterologe Rekombinationen.

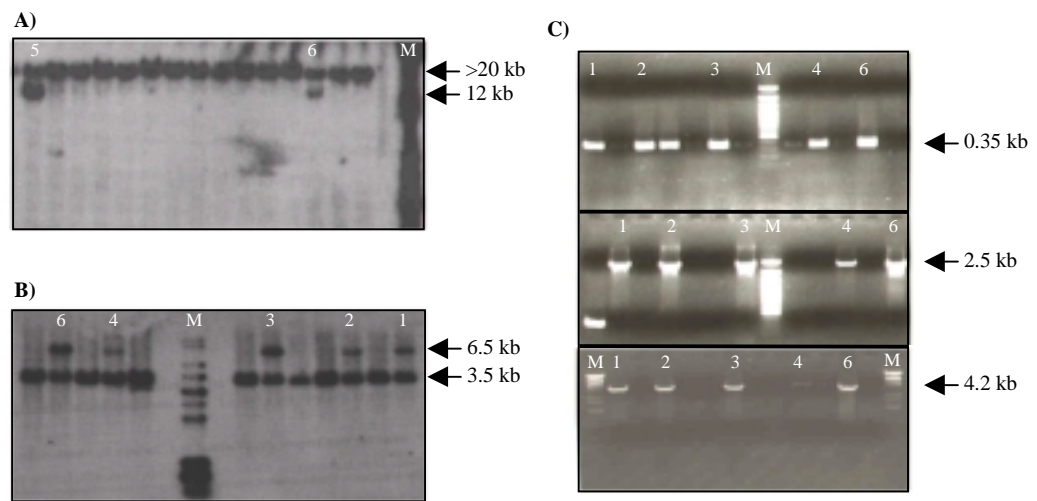


Abbildung 3.28 Screening der ES-Klone durch Southern Blot und PCR. A) Southern-Blot nach *BamHI*-Verdau und Hybridisierung mit der P2g-2°Intron-Sonde. B) Southern-Blot nach *EcoRI*-Verdau und Hybridisierung mit der 5Atg-Sonde. C) PCR-Reaktionen mit folgenden Oligonukleotiden, von oben nach unten: LacZ.1-F/LacZ.1-R, Neo.2R/M2B154 und M2gF5UTR-3270/LacZ.1-R. M: DNA-Marker. ES-Klone: 1: 1.1 B.7, 2: 1.1 B.9, 3: 1.1 D.3, 4: 7.1 A.7, 5: 7.1 B.1 und 6: 8.1 A.1.

Die Klone wurden ebenfalls mittels PCR-Reaktionen (siehe Abb. 3.28c) zum Beispiel für die LacZ-Kassette mit den Oligonukleotiden LacZ.1-F und LacZ.1-R (Sequenzen siehe Anhang III) geprüft. Die PCR-Reaktionen mit allen 5 ES-Klonen ergaben das erwartete 350 bp Fragment. Wie Abbildung 3.27c zeigt, konnte auch in einem als negativ identifizierten Klon ein Fragment von 350 bp nachgewiesen werden, was dafür spricht, daß in diesem Klon die LacZ-Kasste heterolog ins Genom integriert wurde. Durch PCR-Reaktionen mit Neo.2R und M2B154 (Sequenzen siehe Anhang III) konnte die Anwesenheit der Neo-Kassette in korrekter Position überprüft werden. Wieder ergaben alle 5 ES-Klone das erwartete 2.5 kb Fragment. Abschließend wurde die Anwesenheit der LacZ-Kassette in der richtigen Position mit den Oligonukleotiden LacZ.1-R und M2gF5UTR-3270 überprüft (Sequenzen siehe Anhang III). Mit Ausnahme des ES-Klons 7.1A.7 ergab der PCR-Nachweis mit den anderen 4 Klonen das erwartete 4.2 kb

Fragment. Bei ES-Klon 7.1A.7 wurde ein größeres Fragment beobachtet, was auf eine falsche Integration des strangaufwärts gelegenen Arms hinweist.

Aus den Elektroporationen und umfangreicher Überprüfung der homologen Rekombination standen damit die 4 ES-Klone 1.1 B.7, 1.1 B.9, 1.1 D.3 und 8.1 A.1 mit je einem Allel des mutierten *Pept2*-Genlocus zur Verfügung. Diese ES-Klone wurden für die Injektion in Blastocysten weiter kultiviert.

3.3.3 Injektion der rekombinanten ES-Klone in Blastocysten und Transfer

In Tabelle 3.7 sind die durchgeführten Injektionen der rekombinanten *Pept2*-ES-Klone in Blastocysten aufgelistet und deren Transfer in scheinchwangere Tiere.

ES-Klon	Anzahl der vorgenommenen Injektionen	Anzahl der Transfers	Anzahl der schwangeren Mäuse	Geborene Mäuse	Geborene Chimären-Mäuse
1.1 D.3	3	7	5	32	10
8.1 A.1	3	4	2	10	6
1.1 B.7	3	5	4	24	7
Gesamt				66	23

Tabelle 3.7 Injektion der rekombinanten ES-Klone in Blastocysten und der nach Transfer geborenen chimären Tiere. Die Tabelle zeigt die Anzahl der Injektionen der verschiedenen rekombinanten ES-Klone. Die Anzahl der Transfers hängt von der Menge an injizierten Blastocysten ab.

Die Anzahl der möglichen Transfers hängt von der Anzahl der injizierten Blastocysten ab, die an dem entsprechenden Tag verfügbar waren. Hieraus ergibt sich die unterschiedliche Anzahl der Transfers bei den verschiedenen rekombinanten ES-Klonen, obwohl die Anzahl der vorgenommenen Injektionen gleich ist. Die rekombinanten ES-Klone werden in Blastocysten injiziert und in scheinchwangere Mäuse (Stamm CD-1) transferiert. Die Schwangerschaft der Maus nach erfolgreichem Transfer kann anhand der Körpergewichtsentwicklung geprüft werden. Die Schwangerschaft der Maus dauert in der Regel ca. 21 Tage. Da die drei verwendeten TBV2-ES-Zelllinien von einer männlichen Maus mit brauner Fellfarbe (129/Sv, ‚agouti‘) stammen und die Blastocysten von einer weiblichen Maus mit schwarzer Fellfarbe (C57BL/6) entnommen wurden, kann das Ausmaß des Chimärismus an der Fellfarbe abgeschätzt werden. Wie in Tabelle 3.7 dargestellt, wurden durch die 9 Injektionen 23 Chimären gewonnen, was 35 % der geborenen Mäuse entspricht. Es wurden 14 männliche Mäuse mit einem Chimärismus zwischen 5 und 100 %, und 9 weibliche Mäuse mit einem Chimärismus zwischen 20 und 90 % gewonnen.

3.3.4 Prüfung der Keimbahntransmission

Die nachfolgende Tabelle (3.8) listet die vorgenommenen Paarungen der chimären Mäuse mit C57BL/6 Mäusen auf.

Chimäre No.	ES-Klon	Geschlecht / % Chimärismus	Datum der Anpaarung	Geburt	Keimbahn- transmission
1*	1.1 D.3	m / 60	26.1.00 1.3.00	- -	
2	1.1 D.3	m / 70	4.4.00	28.4.00 5.6.00 21.7.00	- - -
3	1.1 D.3	m / 20	4.4.00	29.4.00 21.5.00 13.6.00 – gestorben 3.7.00 26.7.00	- - - - -
4	1.1 D.3	m / 20	4.4.00	28.4.00 21.5.00 10.7.00	- - -
5*	1.1 D.3	m / 20	24.7.00	1.8.00 – gestorben	
6	1.1 D.3	m / 90	4.7.00		
7	1.1 D.3	m / 40	24.7.00		
8	1.1 D.3	w / 90	4.4.00	28.5.00 19.6.00 31.7.00	- - -
9	1.1 D.3	w / 40	4.4.00	1.5.00	-
10	1.1 D.3	w / 20	4.4.00	1.5.00 22.5.00 12.6.00	- - -
11	8.1 A.1	m / 100	4.7.00	24.7.00	ja
12	8.1 A.1	w / 90	26.4.00	26.5.00 29.6.00	- -
13	8.1 A.1	w / 90	26.4.00	27.6.00 23.7.00	- -
14	8.1 A.1	w / 80	26.4.00	7.6.00 – Fehlgeburt 10.7.00 – gefressen	
15 [§]	8.1 A.1	m / 100	26.4.00	-	
16	8.1 A.1	m / 40	26.4.00	19.5.00 10.6.00 23.7.00	- - -
17 [§]	1.1 B.7	m / 70	-		
18 [†]	1.1 B.7	m / 5	-		
19	1.1 B.7	w / 40	27.6.00		
20 [†]	1.1 B.7	m / 40	-		
21	1.1 B.7	w / 80	27.6.00		
22	1.1 B.7	w / 70	27.6.00		
23	1.1 B.7	m / 80	7.6.00	1.7.00 / 5	-

Tabelle 3.8 Prüfung der Keimbahntransmission. Die Tabelle zeigt die Paarungen der verschiedenen Chimären mit C57BL/6 Mäusen. Gezeigt wird das Geschlecht der Chimären und deren Prozentsatz an Chimärismus. *gestorbene Chimären, §getötete Chimären: Nummer 15 wegen schlechtem Gesundheitszustand und Nummer 17 wegen Aggressivität. †durch Tier 17 getötete Chimären.

Die Paarung der männlichen Chimäre Nr. 11 führte zur Keimbahntransmission. Am 24.7.00 wurden 10 Nachkommen geboren, von denen 8 Mäuse eine braune Fellfarbe aufweisen.

Demzufolge haben die rekombinanten ES-Zellen bei der Chimäre Nr. 11 genetisch zur Bildung der Keimzellen beigetragen.

Daher wurde bei den 8 braunen Nachkommen geprüft, inwieweit das Null-Allel an sie weitergegeben wurde, d.h. welche der Nachkommen heterozygote *Pept2*^{+/-}-Tiere sind. Zur Genotypisierung wurde genomische DNA aus der Schwanzspitze der Tiere isoliert und eine unter 3.2.2 beschriebene Southern-Blot-Analyse durchgeführt.

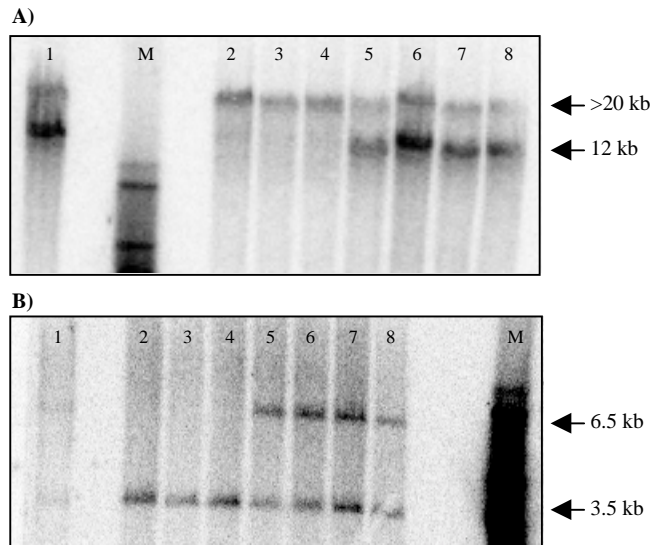


Abbildung 3.29 Genotypisierung der heterozygoten *Pept2*-Tiere durch Southern-Blot-Analyse. **A)** Southern Blot nach *Bam*HI-Verdau und Hybridisierung mit der P2g-2°Intron-Sonde. **B)** Southern Blot nach *Eco*RI-Verdau und Hybridisierung mit der 5Atg-Sonde. M: DNA-Marker, 1-8: genomische DNA isoliert aus den 8 braunen Nachkommen von Chimäre 11.

Wie Abbildung 3.29 zeigt, sind 5 der Tiere heterozygote *Pept2*^{+/-}-Mäuse. Damit stehen 4 männliche heterozygote Mäuse und eine weibliche heterozygote Maus für die Generierung einer homozygoten *Pept2*-Linie zur Verfügung.

4 Diskussion

Die Anwesenheit sekundär aktiver Transportsysteme für Di- und Tripeptide in der Bürstensaummembran von Dünndarmepithelzellen und Tubulusepithelzellen der Niere wurde bereits vor mehr als 20 Jahren nachgewiesen. Als Besonderheit erwies sich, daß es sich dabei um protonengekoppelte Systeme handelt, die bis dahin nur in Pflanzen und einzelligen Eukaryoten beschrieben waren. Der zelleinwärts gerichtete pH-Gradient als treibende Kraft der Peptidaufnahme kann als Zeichen evolutionärer Konservierung dieser Klasse von Transportern angesehen werden. Folglich ist es nicht erstaunlich, daß die ca. 20 Jahre später in Säugetieren durch Expressionsklonierung und in Pflanzen und Hefen durch funktionelle Komplementation isolierten cDNAs dieser Transportsysteme große Ähnlichkeiten in den abgeleiteten Aminosäuresequenzen aufweisen. Die Peptidtransportproteine werden daher auch in der POT-Familie protonengekoppelter Oligopeptidtransporter zusammengefaßt. Mitglieder der POT-Familie sind sowohl in Bakterien, Hefen, diversen Invertebraten und Säugetieren identifiziert worden. In dieser Arbeit wurde ein neues Mitglied dieser Familie, der renale Peptidtransporter (PEPT2) der Maus identifiziert, kloniert und charakterisiert.

Basierend auf der hohen Homologie der Nukleotidsequenzen bereits klonierter renaler Peptidtransporter aus Säugetieren wurde mit Hilfe der RACE-Technik die PEPT2-cDNA aus der Niere der Maus kloniert. Die murine PEPT2-cDNA hat eine Länge von 3987 bp. Zwei mögliche Startcodons konnten identifiziert werden, wobei ausgehend von Nukleotidposition 171-173 ein 740 Aminosäuren großes Protein resultieren würde, während das Startcodon in Nukleotidposition 204-206 zu einem Protein von 729 Aminosäuren führen würde. Letzteres wird in den PEPT2-Proteinen aus Mensch (Liu W *et al.* 1995), Kaninchen (Boll M *et al.* 1996) und Ratte (Saito H *et al.* 1996) als Startcodon genutzt. Allerdings weist die Sequenz von PEPT2 der Ratte, des Kaninchens und des Menschen ebenfalls das andere mögliche erste Startcodon auf, was entsprechend auch hier zu einem längeren Protein führen würde. Mittels RT-PCR konnte jedoch gezeigt werden, daß dieses putative Startcodon bei Kaninchen und Mensch zu einer Verschiebung des Leserahmens führen würde. Darüber hinaus erfüllt das murine Startcodon an Position 204-206 besser die Kozak-Kriterien für die Initiation der Translation in Säugetieren (Kozak M 1987). Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß das PEPT2-Protein der Maus ebenfalls nur 729 Aminosäuren aufweist und die Initiation der Translation an Nukleotidposition 204-206 beginnt.

Der Vergleich der Primärstruktur des PEPT2-Proteins der Maus mit seinen Orthologen aus anderen Säugetierespezies dokumentiert deren hohe Identität. So ist die murine Aminosäuresequenz zu 92% identisch zu der aus der Ratte und zu fast 80% identisch mit der aus Mensch und Kaninchen. Das murine PEPT2-Protein weist als Mitglied der POT-Familie die während der Evolution hochkonservierten Motive Ptr2_1 und Ptr2_2 (Steiner HY *et al.* 1995) und das erst kürzlich vorgeschlagene Ptr2_3-Motiv auf (Fei YJ *et al.* 1998a). Die mögliche Membrantopologie des murinen PEPT2-Proteins konnte mittels des Algorithmus nach Kyte and Doolittle (1982) berechnet werden. Wie seine Säugetier-Orthologen enthält das murine PEPT2-Protein 12 Transmembrandomänen sowie eine große extrazelluläre Schleife zwischen Transmembrandomäne 9 und 10 und einen zytoplasmatisch lokalisierten N- und C-Terminus.

Das PEPT2-Protein besitzt in seiner Sequenz kanonische Motive für mögliche co- und posttranslationale Modifikationen. In den vier bekannten PEPT2-Proteinen von Säugern werden zwei Peptidmotive (Positionen 376-378 und 640-642) vorgefunden, die als Erkennungssequenzen serinmodifizierender Enzyme der Familie der Proteinkinase C dienen könnten. Diese Modifikation führt normalerweise zu einer Veränderung der Aktivität des Proteins. Untersuchungen in LLC-PK₁ Zellen, die PEPT2 endogen exprimieren (Wenzel U *et al.* 1998), lassen vermuten, daß die Substrataffinität von PEPT2 negativ durch PKC-Phosphorylierung reguliert wird (Wenzel U *et al.* 1999). Deshalb wäre es denkbar, daß beide oder zumindest eines der Peptidmotive durch reversible Phosphorylierung zur Aktivitätsänderung des Peptidtransporters genutzt wird.

In den vier Transportern der PEPT2-Klasse aus Säugetieren finden sich ferner zwei Peptidbereiche (Positionen 528-531 und 587-590) in denen vermutlich die post-translationale Glykosylierung terminaler Asparaginreste erfolgt. Untersuchungen der Proteinmasse des PEPT2-Proteins weisen auf eine recht starke Glykosylierung hin. Durch Western Blot-Analyse mit einem gegen PEPT2 gerichteten Antikörper konnte das PEPT2-Protein in Bürstensaummembranvesikeln aus der Niere der Maus und Ratte nachgewiesen werden. Das PEPT2-Protein hat in beiden Spezies ein apparentes Molekulargewicht von etwa 100 kDa. Durch frühere *in vitro* Translationsexperimente wurde die Molmasse des PEPT2-Proteins aus dem Kaninchen mit 105 kDa bestimmt (Boll *et al.* 1996). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß das nicht-glykosylierte PEPT2-Protein eine Molmasse von ungefähr 80 kDa hat und durch Modifikation einen Kohlenhydratanteil von etwa 20-25 kDa angefügt wird.

Die murine PEPT2-mRNA konnte mittels Northern-Blot-Analyse in der Niere, dem Gehirn, der Lunge und der Brustdrüse nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis stimmt mit Befunden aus dem Kaninchen überein, wo mittels RT-PCR die PEPT2-mRNA in den gleichen Geweben mit starke Signalen nachgewiesen wurde (Döring *et al.* 1998a). Zusätzliche schwächere Signale wurden in Pankreas, Skelettmuskel, Milz und Kolon detektiert. Da die RT-PCR allgemein eine höhere Nachweisempfindlichkeit als die Northern-Blot-Analyse besitzt, ließ sich die PEPT2-mRNA in diesen Geweben der Maus durch Northern-Blot nicht nachweisen. Durch *in situ* Hybridisierung oder Immunohistochemie soll jedoch die zelluläre Lokalisation von PEPT2 zukünftig auch in diesen Geweben, vor allem zur Klärung seiner physiologischen Funktion, vorgenommen werden.

Die Klonierung der PEPT2-cDNA der Maus erlaubte auch die funktionelle Charakterisierung durch Fluxstudien und elektrophysiologische Messungen nach heterologer Expression in *Xenopus laevis* Oocyten. Der murine Peptidtransporter PEPT2 zeigte dabei vergleichbare Eigenschaften, wie PEPT2 aus dem Kaninchen (Boll *et al.* 1996). Als protonengekoppeltes System weist es ein Transportoptimum bei einem extrazellulären pH von 5.5 bis 6 auf. Als Mitglied der PEPT2-Subklasse stellt es ein hochaffines System mit einer apparenten Michaelis-Menten-Konstante von ca. 50 μM für das Dipeptid D-Phe-Ala dar. Seine Substratspezifität ist recht breit, beschränkt sich aber auf Di- und Tripeptide, wobei eine Enantioselektivität der Substraterkennung zu erkennen ist. Dipeptide mit L- α -Aminosäuren zeigen gegenüber solchen mit D-Aminosäuren generell eine höhere Affinität, wobei die Position der D-Aminosäure im Peptid ebenfalls die Transportkonstante beeinflusst. Neben Di- und Tripeptiden werden auch ausgewählte Lactamantibiotika sowie δ -Aminolävulinsäure als Substrate akzeptiert.

Bei der PEPT2-vermittelten Substrataufnahme handelt es sich um einen elektrogenen Transportprozess, wie anhand der substratinduzierten Ströme unter „voltage clamp“-Bedingungen in Oocyten gezeigt werden konnte. Die vier potentiellen Neuropeptide Cys-Gly, Tyr-Arg, β -Ala-His und Gly-Gln zeigten einheitlich einen positiven Einwärtsstrom in PEPT2-exprimierenden Oocyten bei einem Membranpotential von -60 mV. Die Strom-Spannungskurven der vier Substrate zeigen einen PEPT2-Phänotyp (Boll *et al.* 1996) mit niedrigen Einwärtsströmen bei niedrigen bzw. positiven Membranpotentialen und hohen Einwärtsströmen bei hyperpolarisierten Potentialen. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist

noch nicht bekannt, ob sich die physiologische Rolle der Peptidtransporter in den extrarenalen Geweben ausschließlich auf die nutritive Funktion zur Bereitstellung von Amino-Stickstoff beschränkt. So könnte die Aufnahme z. B. Von Cys-Gly durch PEPT2 im Gehirn auf eine neuroprotektive Funktion des Transporters hindeuten, da Cys-Gly als Vorläufer des antioxidativen Peptids Glutathion fungiert (Dringen *et al.* 1999).

Basierend auf den hier dargestellten funktionellen und molekularen Charakteristika kann der murine Peptidtransporter PEPT2 als typischer Vertreter der PEPT2-Subklasse der POT-Familie bezeichnet werden, der die konservierten Bereiche Ptr2_1-3 in der Aminosäuresequenz aufweist.

Im Gegensatz zur Funktion ist über die Genstruktur der Peptidtransporter in Säugetieren bisher außerordentlich wenig bekannt. Als experimentelle Grundlage dieser Arbeit wurde die Klonierung, die genomische Organisation, chromosomale Lokalisation und eine erste Promotoranalyse des murinen *Pept2*-Gens durchgeführt. Das murine *Pept2*-Gen konnte aus einer genomischen DNA-Bank durch Homologie-Screening isoliert werden. Es wurden 7 Klone identifiziert, die das *Pept2*-Gen enthielten. Aus einem dieser Klone wurden Subklone generiert und durch PCR, Southern-Blot-Analyse und Sequenzierung wurde die genomische Organisation des murinen *Pept2*-Gens aufgeklärt. Das Gen hat eine Länge von 34 kb und besteht aus 22 Exons und 21 Introns. Die meisten Exons sind ca. 100 bp lang, mit Ausnahme des ersten und letzten Exons, die deutlich länger sind. Das letzte Exon enthält den 1591 bp langen nicht-translatierten 3'-Bereich. Die Länge der Introns ist sehr variabel. Das kleinste Intron weist 90 bp, das größte 9.5 kb auf. Die Exon-Intron Übergänge weisen alle die bekannten Spleiß-Konsensus-Sequenzen auf. Erst vor wenigen Monaten wurde die genomische Organisation des intestinalen Peptidtransporter *Pept1* der Maus aufgeklärt (Fei YJ *et al.* 2000). Es zeigt eine ähnliche genomische Organisation wie das *Pept2*-Gen mit 38 kb Länge, 23 Exons und 22 Introns.

Das *Pept2*-Gen wurde vollständig sequenziert. Die Sequenz wurde nach Ähnlichkeiten mit hinterlegten Sequenzen der Gen-Bank untersucht. Einen Sequenzbereich 9 kb strangaufwärts des Translationsstarts zeigte eine hohe Identität ($\geq 97\%$) zu den drei EST-Klonen AV266955, AV051741 und AW048865 aus der Maus. Zu welchem Gen diese Klone gehören ist bisher nicht bekannt. Jedoch liefert dieser Befund einen Hinweis darauf, daß sich 9 kb strangaufwärts des murinen *Pept2*-Gens ein Nachbar-Gen befindet. Zusätzlich wurde die

Sequenz des *Pept2*-Gens auf das Vorkommen repetitiver Sequenzen hin untersucht. Wie bei vielen eukaryotischen Genen sind repetitive Sequenzen über das gesamte *Pept2*-Gen verteilt. Sie haben einen Anteil von 22 % an der Gensequenz.

Wie bereits erwähnt, ließ sich bei einigen Membranproteinen eine Beziehung zwischen den Exon-Intron-Übergängen im Gen und den Übergängen zwischen hydrophilen und hydrophoben Bereichen im Protein nachweisen (Bell GI *et al.* 1990, Turk E *et al.* 1994). So wurden z. B. im *SGLT1*-Gen Ähnlichkeiten zwischen den Exon-Intron-Übergängen und den Übergängen zwischen hydrophilen und hydrophoben Proteinbereichen der N-terminalen und C-terminalen Hälfte festgestellt (Turk E *et al.* 1994). Entsprechende Ähnlichkeiten wurden auch in der Klasse der GLUT-Transporter vorgefunden (Baldwin SA 1993). Aufgrund dieses scheinbaren Musters wurde postuliert, daß diese Transportproteine von einem 6 Transmembrandomänen enthaltenden Ursprungsprotein durch Genduplikation entstanden sind. Basierend auf Hydrophobizität-Analysen verschiedener Mitglieder der POT-Familie wurde dieses Modell von Fei *et al.* (1998a) auch auf die Peptidtransporter übertragen, wobei nach Ansicht der Autoren das Ursprungsprotein identisch, mit dem der MFS-Familie (engl.: **m**ajor **f**acilitator **s**uperfamily) sein könnte. Nach Aufklärung der genomischen Organisation des *Pept2*-Gens in dieser Arbeit konnte nur eine partielle Beziehung zwischen den Exon-Intron-Übergängen und der Sekundärstruktur von PEPT2 festgestellt werden. Ähnlichkeiten zwischen der N- und C-terminalen Hälfte, die auf eine Duplikation hindeuten würden, ließen sich nicht erkennen. Durch eine kürzlich erfolgte Analyse von Sequenz und Phylognese konnte keine Ähnlichkeit in der Struktur der POT-Familie und der MFS-Familie nachgewiesen werden (Saier MH *et al.* 1999). Es ist also davon auszugehen, daß die POT-Familie sich von einem anderen Ursprungsprotein aus entwickelt hat und wahrscheinlich nicht durch ein Duplikationsereignis aus einem Protein mit 6 Transmembrandomänen entstanden ist.

Durch „Radiation Hybrid Mapping“ gelang es das murine *Pept2*-Gen auf Chromosom 16 zwischen den Markern D16Mit4 und D16Mit59 zu lokalisieren. Die Distanz zwischen den Markern D16Mit4 und D16Mit59 entspricht ungefähr 40 cR (1cR \approx 30 kb), also ungefähr 1.2 Mb. Bisher sind bei den in Abbildung 3.22 gezeigten Markern nur die RH-Daten für D16Mit4 und D16Mit59 bekannt. Die spezifischere Lokalisation von PEPT2 könnte durch RH-Mapping mit den eingezeichneten Markern durchgeführt und durch statistische Analyse mit den Daten von *Pept2* vergleichend bestimmt werden. Doch schien es für den Zweck dieser

Arbeit ausreichend; zu wissen, daß sich das murine *Pept2*-Gen auf Chromosom 16 zwischen D16Mit4 und D16Mit59 befindet. Diese Region weist eine konservierte Syntanie mit dem menschlichen Chromosom 3 auf. Dies spiegelt sich auch in der Lokalisation des menschlichen *Pept2*-Gens auf Chromosom 3q13.3-q21 wieder (Ramamoorthy S *et al.* 1995).

Im Gegensatz zum murinen *Pept1*-Gen (Fei YJ *et al.* 2000) besitzt das *Pept2*-Gen mehr als einen Transkriptionsstart. Mittels 5'RACE-Technik wurde festgestellt daß zwei vermeintliche Transkriptionsstarts 35 und 235 bp strangaufwärts des Startcodons liegen. Folglich wurde in diesem Bereich nach der Promotorregion gesucht. Durch Promotoranalyse konnte der Kernpromotor des murinen *Pept2*-Gens in einem 146 bp Fragment zwischen 432 und 286 bp strangaufwärts des Translationsstarts lokalisiert werden. In diesem Bereich ließ sich jedoch keine TATA-Box nachweisen.

Aufgrund ihrer Kernpromotor-Elemente werden eukaryotische Gene in eine Gruppe mit TATA-Box und eine mit TATA-Box-defizientem Promotor eingeteilt. Letztere besitzen im Kernpromotor ein sogenanntes Inr-Element (engl.: initiator). Anders als bei der TATA-Box gibt es bei den Inr-Elementen keine stringente Konsensus-Sequenz. Inr-Elemente werden in Familien basierend auf Sequenzhomologien der identifizierten Promotorregion unterteilt (Weis L & Reinberg D 1992). Die TdT-Inr-Familie zum Beispiel besitzt in der Nähe des Transkriptionsstarts folgendes Motiv: 5'-PyPyCAPyPyPyPyPy-3'. Dieses Motiv wurde erstmals bei TATA-Box-enthaltenden Promotorregionen identifiziert (Corden *et al.* 1980): Doch zeigte sich, daß bei Promotoren der TdT-Inr-Familie diese Konsensus-Sequenz ausreicht, um die Transkription des Gens zu steuern (Smale ST & Baltimore D, 1989). Das Fragment 432 und 286 bp strangaufwärts des *Pept2*-Translationsstarts enthält einen Bereich (CTCATTTGC, 318 und 326 bp) mit partieller Homologie zum TdT-Inr-Element strangaufwärts des Translationsstarts (siehe Abbildung 3.25). Eine Abweichung vom Motiv findet sich nur in der vorletzten Purin-Base. Bei den TdT-Inr-Elementen dient das Adenin als Transkriptionsstart. Jedoch wurden bei dem *Pept2*-Gen die Haupt-Transkriptionsstarts 89 und 289 bp strangabwärts dieser Base identifiziert.

Die Inr-Elemente lassen sich in zwei Kategorien einteilen, nämlich a) in die GC-reichen Promotoren mit mehreren Transkriptionsstarts, die in einem großen Bereich verteilt sind und b) in die TATA-Box-defizienten Promotoren ohne GC-reiche Domänen. In die erste Kategorie fallen die meisten „house keeping“-Gene und in die zweite Kategorie induzierbare Gene

(Smale ST & Baltimore D, 1989). Strangaufwärts des Translationsstarts liegen 3 GC-Boxen, d.h., daß das murine *Pept2*-Gen nicht über einen besonders GC-reichen Promotorbereich verfügt. Viele induzierbare Gene mit einem Inr-Element enthalten ebenfalls normalerweise mehrere Transkriptionsstarts. Dies ist auch im murinen *Pept2*-Gen der Fall. Der Promotor des murinen *Pept2*-Gens könnte somit zu einer neuen Subfamilie der Inr-Familie gehören, vergleichbar zur MED-1 Familie. Diese Gene besitzen TATA-Box-defiziente Promotoren mit mehreren Transkriptionsstarts in einem definierten Sequenzbereich und einem gemeinsamen Motiv (MED-1 in engl.: **m**ultiple start site **e**lement **d**ownstream) strangabwärts des Transkriptionsstarts (Ince TA & Scotto KW, 1995).

Andere Elemente des Kernpromotors, d.h. die DNA-Region an die sich der Komplex der Initiation der Transkription anlagert, sind die bereits erwähnte GC-Box und die CAAT-Box. Im murinen *Pept2*-Gen befindet sich in der Nähe beider Haupt-Transkriptionsstarts mindestens eine GC-Box und eine CAAT-Box (siehe Abb. 3.25). Das Reporterkonstrukt *Pept2*^{-552/-286} enthält wie auch *Pept2*^{-432/-286} das putative Inr-Element, zusätzlich jedoch noch eine CAAT-Box und 2 GC-Boxen. Diese *cis*-Elemente sind höchstwahrscheinlich dafür verantwortlich, daß das längere *Pept2*^{-552/-286}-Konstrukt eine ca. 11-fach höhere Promotoraktivität zeigt, als das Konstrukt *Pept2*^{-432/-286}.

Im Gegensatz zum *Pept1*-Gen gibt es bisher für den renalen Peptidtransporter keinen Hinweis auf eine Regulation der Genexpression. Der Peptidtransporter PEPT1 wird im Darmepithel u.a. durch die Nahrungsaufnahme reguliert (Review: Ferraris RP & Diamond JM 1989). Shigara *et al.* (1999) zeigten durch Aufnahmeexperimente und Northern-Blot-Analyse, daß bestimmte Aminosäuren und Dipeptide die Expression des *Pept1*-Gens in der Ratte stimulieren können. Außerdem identifizierten sie eine AARE-Erkennungssequenz, die für die Regulation der Expression durch Aminosäuren verantwortlich sein könnte. Dieses AARE-Motiv wurde bis dahin nur im Gen der Asparaginsynthetase nachgewiesen, deren Expression durch ein erhöhtes Angebot verschiedener Aminosäuren und durch Hungern induziert wird (Guerrini L *et al.* 1993). An die Erkennungssequenz AARE (5'-CATGATG-3') heftet sich ein noch nicht identifizierter Transkriptionsfaktor an, der die Induktion auslöst. Daher wurde von Shigara *et al.* der Sequenzbereich 5'-CATGGTG-3' als mögliches AARE-Element vorgeschlagen. Diese Sequenz wurde kürzlich auch in der Promotorregion des murinen *Pept1*-Gens identifiziert (Fei YJ *et al.* 2000). Das AARE-Motiv des *Pept1*-Gens unterscheidet sich nur in einer Base von dem Motiv im Asparaginsynthetasegen. In der Promotorregion des

Pept2-Gens konnte ebenfalls ein ähnliches AARE-Element (5'-CATGCTG-3'; 2731 bp strangaufwärts des Translationsstarts identifiziert werden (siehe Abbildung 3.25). Auch diese Sequenz weist einen Unterschied zum AARE-Element der Asparaginsynthetase an gleicher Nukleotidposition wie bei dem *Pept1*-Gen auf. Gezielte Mutationen in der AARE-Sequenz des Asparaginsynthetasegen verhinderten zwar die Anheftung des *trans*-Elementes (Guerrini L *et al.* 1993), doch ist bisher nicht untersucht worden, ob eine Veränderung im fünften Nukleotid der AARE-Sequenz auch zur Hemmung der Anlagerung des *trans*-Elementes führt. In den Peptidtransporter-Genen der PEPT2-Klasse muß zukünftig daher geprüft werden, ob freie Aminosäuren die Genexpression steuern und ob dieses veränderte *cis*-Element an der Expressionskontrolle beteiligt ist.

Die hier experimentell im Reporter-Assay nachgewiesenen unterschiedlichen Promotoraktivitäten der verschiedenen Reporterkonstrukte des *Pept2*-Gens weisen auf eine Beteiligung identifizierter Erkennungssequenzen für positive und negative *cis*-aktive Elemente der Promotorregion hin (siehe Abbildung 3.24). Die Sequenz der Promotorregion wurde mit bekannten Erkennungssequenzen der TRANSFAC-Datenbank verglichen, wobei mehr als 800 *cis*-Elemente identifiziert wurden. Inwieweit die vorgefundenen *cis*-aktiven Elemente an der Regulation der Expression des murinen *Pept2*-Gens beteiligt sind, läßt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht sagen. Zu untersuchen bleibt ebenso, ob spezifische Transkriptionsfaktoren für die differentielle Expression des *Pept2*-Gens in verschiedenen Geweben verantwortlich sind und in welchem Umfang externe Faktoren (freie Aminosäuren, Dipeptide, Hormone) die Expression der Peptidtransporter beeinflussen können und welche *trans*-Elemente dafür verantwortlich sind. Kürzlich wurde die Regulation der Expression des Peptidtransporters *Ptr2* aus *Saccharomyces cerevisiae* durch erhöhtes Angebot spezifischer Dipeptide demonstriert (Turner GC *et al.* 2000), wobei die Expression von *Ptr2* zunächst durch den Transkriptionsfaktor *Cup9* gehemmt wird. Das Protein *Ubr1*, eine Untereinheit des Ubiquitinkonjugase-Komplexes, ist für den Abbau von *Cup9* verantwortlich. Binden bestimmte Dipeptide an das *Ubr1*-Protein, wird der Abbau von *Cup9* erhöht und durch den Wegfall der Repression die Expression von *Ptr2* gesteigert. D.h., in Hefe wird die Expression von *Ptr2* durch Dipeptide unter Beteiligung des Ubiquitin-Proteasom-Systems stimuliert. Im Säuger lassen sich mehrere Homologe zu *Cup9* und *Ubr1* nachweisen, doch ist bisher kein Erkennungsmotiv für die DNA-Bindung solcher *Cup9*-Homologe bekannt. Es erscheint daher außerordentlich interessant zu prüfen, inwieweit die Expression von *Pept2* ebenfalls durch Dipeptide in ähnlicher Weise reguliert werden kann. Durch Reporter-Analyse kann dann die

Region eingegrenzt werden, die daran beteiligt ist, wobei Protein-DNA-Interaktions-Studien, wie z.B. „Band-Shift“-Analysen besonders hilfreich sein könnten.

Die Identifikation, Klonierung und Sequenzierung der Promotorregion des murinen *Pept2*-Gens bietet die Grundlage sowohl für weitere Untersuchungen zur Bedeutung der In-Elemente, als auch zur Identifizierung von *cis*-aktiven Elementen, die möglicherweise an der Regulation der Expression des *Pept2*-Gens beteiligt sind. Kürzlich ist es uns gelungen, die Promotorregion des menschlichen *Pept2*-Gens zu identifizieren, so daß auch Vergleiche beider Regionen tiefere Einblicke in die Regulation des renalen Peptidtransporter-Gens geben können.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Studien bestand in der Erzeugung eines Modellorganismus bei dem durch gezielte Inaktivierung des *Pept2*-Gens die physiologischen Rolle dieses Transportproteins *in vivo* anhand der Analyse des Phänotyps untersucht werden kann. Dazu wurde basierend auf der Sequenz des *Pept2*-Gens ein Genkonstrukt erzeugt, das sowohl für die Erzeugung einer konventionellen Knockout-Maus als auch zur *in vivo*-Expressionsanalyse des *Pept2*-Gens genutzt werden kann. Letzteres wurde durch die Integration des β -Galactosidase-Gens in das Targeting-Konstrukt ermöglicht. Durch Transfektion wurde das Genkonstrukt homolog in embryonale Stammzellen - isoliert aus der ICM (in engl.: inner cell mass) eines männlichen Blastocysten - rekombiniert. Die rekombinanten ES-Zellen wurden danach in Blastocysten injiziert und in scheinchwangere Mäuse transferiert. Da die ES-Zellen aus männlichen Blastocysten stammen, entstehen dabei bevorzugt männliche chimäre Mäuse. Nach Injektion der *Pept2*^{+/-}-ES-Zellen konnten dementsprechend 14 männliche und 9 weibliche chimäre Mäuse erhalten werden. Die Chimären werden zur Zeit zur Prüfung auf Keimbahntransmission des mutierten *Pept2*-Genlocus angepaart. Wie Tabelle 3.8 dokumentiert, hat dieser Studienteil bisher bei einer hochprozentigen männlichen Chimäre zur Keimbahntransmission geführt. Durch Genotypisierung wurde nachgewiesen, daß zur Zeit 5 *Pept2*^{+/-}-Mäuse zur Verfügung stehen, die nun durch Kreuzung zu einer homozygoten Linie von *Pept2*^{-/-}-Mäusen herangezogen werden können. Nach Erlangen der Geschlechtsreife dieser Tiere werden 3 männliche heterozygote Tiere mit weiblichen Cre-Mäusen angepaart. Die dabei entstehenden *Pept2*^{+/-}-Mäuse besitzen nicht mehr die „gefloxte“ Neomycin-Resistenz-Kassette. Der Vorteil dieses Vorgehens liegt in der Abwesenheit des Neomycin-Resistenz-Gens, das einen Einfluß auf den Phänotyp haben kann (Rajewsky *et al.* 1996). Darüber hinaus werden männliche und weibliche *Pept2*^{+/-}-Maus zur Erzeugung erster

homozygoter *Pept2*-Tiere angepaart. Sowohl heterozygote, wie auch homozygote Tiere werden danach in vielfältiger Hinsicht phänotypisiert werden, um neue Hinweise auf die physiologischen Funktionen des Peptidtransporters PEPT2 im intakten Organismus zu gewinnen. Außerdem werden die Chimären zur Erzeugung einer zweiten unabhängigen homozygoten Linie weiter gepaart.

In der Niere liegt nach bisherigem Kenntnisstand die physiologische Bedeutung des PEPT2-Proteins in der Konservierung von Aminosäurenstickstoff im Organismus in Form von Di- und Tripeptiden durch Reabsorption aus dem glomerulären Filtrat. Die Ausschaltung des Gens von PEPT2 in der Maus sollte daher zu einer erhöhten Ausscheidung von Di- und Tripeptiden mit dem Urin führen, da die Expression von PEPT2 auf die Epithelzellen des proximalen Tubulusapparates beschränkt ist. Da jedoch der Peptidtransporter PEPT1 im distalen Tubulus der Niere nachgewiesen werden konnte, wäre eine Kompensation des Reabsorptionsdefektes nach Ausschaltung von PEPT2 durch PEPT1 möglich. Die *Pept2*-Knockout-Maus könnte somit wichtige Erkenntnisse zur relativen Beteiligung der beiden Peptidtransporter in der renalen Konservierung von Aminosäurenstickstoff im Organismus liefern. Da PEPT1 und PEPT2 charakteristische Unterschiede in Substrat-Spezifität und –affinität aufweisen, sind auch qualitative Unterschiede in Art und Umfang der Resorptionsprozesse zu erwarten. Dies gilt ebenso für die Fähigkeit der beiden Proteine zum Transport von pharmakologisch bedeutenden Substraten. So werden z. B. ACE-Inhibitoren nicht von PEPT2 transportiert (Boll M *et al.* 1994, Boll M *et al.* 1996) während sie von PEPT1 effektiv aufgenommen werden. Starke Unterschiede in Affinität und maximaler Transportrate für andere Peptidmimetika wie die β -Lactamantibiotika zwischen PEPT1 und PEPT2 lassen vermuten, daß die Ausschaltung von PEPT2 auch Hinweise auf die pharmakologische Bedeutung der Transportproteine im Stoffwechsel liefern wird. Studien zur Pharmakokinetik dieser Medikamente im Knockout-Modell sind daher ebenso wichtig wie die Analyse der nutritiven Funktion von PEPT2.

Wie bereits erwähnt, beschränkt sich die Expression von PEPT2 nicht nur auf Epithelzellen des proximalen Tubulus der Niere. Auch in Astrozyten, in Epidemialzellen und in Epithelzellen des Plexus Chorioideus konnte die mRNA von PEPT2 lokalisiert werden (Berger UV & Hediger MA, 1999). Die Astrozyten füllen die Räume zwischen den Nervenzellen, anderen Gliaelementen und den Gefäßen aus. Berger und Hediger schlugen daher vor, daß die Bedeutung von PEPT2 auch im ZNS in der Aufnahme extrazellulär

entstandener Di- und Tripeptide liegen könnte und ihm damit auch in diesen Zellen primär eine nutritive Rolle zukommen würde. Die Ausschaltung des *Pept2*-Gens würde somit zu einer erhöhten Konzentration von Di- und Tripeptiden führen, was unter anderem zu Störungen der Homöostase der Aminosäuren und der daraus abgeleiteten Neurotransmitter führen könnte. So führt die Ausschaltung von EAAT2, einem Glutamatttransporter in Astrozyten, in *EAAT2*^{-/-}-Mäuse zu einer ausgeprägten neurodegenerativen Schädigung aufgrund zu hoher Konzentrationen an Glutamat im synaptischen Spalt, da dies nicht ausreichend durch Aufnahme in Astrozyten entfernt werden kann (Tanaka *et al.* 1997). Dies demonstrierte, daß EAAT2 in Astrozyten und nicht EAAT3, der in Neuronen exprimiert wird, primär verantwortlich für die Elimination von Glutamat ist. Vergleichbar mit der Expression der beiden Glutamatttransporter im Gehirn, befindet sich neben PEPT2 im Gehirn ein zweites Peptidtransportersystem, der Peptid-/Histidintransporter PHT1 (Yamashita T *et al.* 1997). Die mRNA dieses Transporters konnte in Neuronen und Gliazellen nachgewiesen werden. Ob PEPT2 und PHT1 sich in ihrer Funktion im Gehirn ergänzen und welche Funktion PEPT2 im Choroidplexus zukommt, bleibt durch Ausschaltung des *Pept2*-Gens zu klären.

Für die anderen PEPT2-exprimierenden Geweben, wie z.B. Lunge und Brustdrüse ist bisher nicht bekannt, welche Zelltypen das Protein exprimieren. Die *Pept2*-Knockout-Maus wird daher auch hinsichtlich der Lokalisation von PEPT2 in diesen Geweben wichtige Hinweise liefern, da bei ihr anstelle des PEPT2-Proteins die einfach nachweisbare β -Galactosidase exprimiert wird. Entsprechend des Funktionsverlustes von PEPT2 können letztlich auch wichtige Befunde zur Bedeutung des Transportproteins in der laktierenden Brustdrüse ebenso wie im Lungenepithel erhalten werden.

Die Ausschaltung von PEPT2 im Mäuseorganismus birgt wegen seiner recht breiten Expression in einer Vielzahl von Geweben auch das Problem einer recht schwierigen Erfassung und Interpretation des zu erwartenden Phänotyps. Deshalb wird zur Zeit an der Herstellung einer konditionalen *Pept2*-Knockout-Maus gearbeitet. Im Unterschied zur konventionalen Knockout-Maus, wird dabei das Gen erst nach Anpaarung mit einer sogenannten Cre-Maus inaktiviert. Das Genkonstrukt enthält dafür zwei sogenannte loxP-Sequenzen, die eine definierte Region des Gens flankieren. Cre-Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase, je nach verwendetem Promotor in definierten Zelltypen und/oder zu bestimmten Zeitpunkten. Durch Kreuzung der konditionalen Knockout-Maus mit verschiedenen Cre-Mäusestämmen, ist somit eine gezielte Inaktivierung des Gens möglich.

Dadurch kann der Effekt der PEPT2-Inaktivierung in ausgewählten Organen, wie z.B. in Niere oder Gehirn, gezielt untersucht werden.

Anhand der vorgestellten genomischen Organisation des *Pept2*-Gens und der Analyse repetitiver Sequenzen konnte ein Targeting-Konstrukt für den konditionalen Knockout entwickelt werden, bei dem die Exons 4 und 5 des *Pept2*-Gens entfernt wurden. Dies entspricht auf Proteinebene den Transmembrandomänen 3 und 4, Regionen, die einen Teil des Ptr2_1- und das vollständige Ptr2_3-Motiv enthalten. Die Deletion dieser Bereiche wird daher mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit zur vollständigen Inaktivierung des PEPT2-Proteins führen. Zur Zeit wird das Genkonstrukt in embryonale Stammzellen transfiziert. Vom konditionalen Knockout des *Pept2*-Gens wird erwartet, daß es zell- und zeitspezifisch ausgeschaltet werden kann und somit in bisher nicht möglicher Fokussierung zur Aufklärung der Funktion von PEPT2 in einzelnen Organen eines intakten Organismus beitragen kann.

5 Zusammenfassung

Auf der Grundlage von Vorarbeiten ist es gelungen, die PEPT2-cDNA der Maus ausgehend von RNA der Niere zu klonieren. Die murine PEPT2-cDNA hat eine Länge von 3987 bp, wobei der offene Leserahmen für ein 729 Aminosäuren langes Protein kodiert. Die Aminosäuresequenz weist eine hohe Identität (80-92%) zu seinen Säugetier-Orthologen auf. Das in *Xenopus laevis* Oocyten exprimierte Transportprotein zeigt PEPT2-typische funktionelle Charakteristika mit hoher Substrataffinität, breiter enantioselektiver Substratspezifität und einen elektrogenen protonengekoppelten Transportmechanismus. Durch Northern-Blot-Analyse konnte die murine PEPT2-mRNA in Niere, Gehirn, Lunge und Brustdrüse detektiert werden. Das PEPT2-Protein konnte in renalen Bürstensaummembranen der Maus immunologisch mit einer apparenten molaren Masse von ca. 100 kDa nachgewiesen werden.

Anhand der murinen PEPT2-cDNA-Sequenz konnte das *Pept2*-Gen aus einer genomischen DNA-Bank isoliert werden. Es weist eine Länge von ca. 34 kb auf und ist in 22 Exons und 21 Introns unterteilt. Mittels „Radiation Hybrid Mapping“ konnte das murine *Pept2*-Gen auf Chromosom 16 lokalisiert werden. Diese Region weist eine konservierte Syntanie mit dem menschlichen Chromosom 3 auf, auf dem das humane *Pept2*-Gen lokalisiert wurde. Die murine Form von *Pept2* besitzt zwei Haupt-Transkriptionsstarts 35 bzw. 235 bp strangaufwärts des Startcodons. Durch Promotor-Analyse konnte der Kernpromotor des murinen *Pept2*-Gens auf einen Bereich zwischen 432 und 286 bp strangaufwärts des Translationsstarts eingegrenzt werden. In diesem Bereich ließ sich keine für viele Promotoren charakteristische TATA-Box nachweisen. Allerdings wurden für Kernpromotoren typische *cis*-aktive Elemente identifiziert, so 2 CAAT- und 3 GC-Boxen. Die identifizierte 2700 bp strangaufwärts des Translationsstarts gelegene Promotorsequenz, in der sich mehrere mögliche *cis*-aktive Elemente befinden, bietet die Grundlage für umfangreiche Studien der Regulation des *Pept2*-Gens.

Nach Entschlüsselung des *Pept2*-Genstrukturs bestand weiterhin das Ziel, die Grundlagen zur Erzeugung einer *Pept2*-Knockout-Maus zu legen. Herstellung und erfolgreiche Transfektion eines Genkonstruktes in murine embryonale Stammzellen erlaubten es, die rekombinanten Zellen in Blastocysten zur Erzeugung von chimären Mäusen zu injizieren. Eine Chimäre führte zur Keimbahntransmission des mutierten *Pept2*-Genlocus und somit zur Genese der ersten *Pept2*^{+/-} Tieren.

Zur Klärung der physiologischen und pharmakologischen Funktion des Peptidtransporters PEPT2 in den verschiedenen Geweben, die dieses Protein exprimieren, stellen Knockout-Mäuse ein geeignetes Modell dar. Da bisher die funktionellen und molekularen Eigenschaften des murinen PEPT2 nicht bekannt waren, liefert diese Arbeit mit Klonierung und Charakterisierung - sowohl auf mRNA und genomischer Ebene, als auch hinsichtlich der Funktion - einen wichtigen Beitrag zum Verständnis dieser Klasse von integralen Membranproteinen im Säugetier.

Anhang

I Literaturverzeichnis

Arima T, Kitamura Y, Nishiya T, Taniguchi T, Takagi H, Nomura Y: Effects of kyotorphin (L-tyrosyl-L-arginine) ON[3H]NG-nitro-L-arginine binding to neuronal nitric oxide synthase in rat brain. *Neurochem Int* 30, 605-611, **1997**

Baldwin SA: Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins. *Biochim Biophys Acta* 1154, 17-49, **1993**

Basrai MA, Lubkowitz MA, Perry JR, Miller D, Krainer E, Naider F, Becker JM: Cloning of a *Candida albicans* peptide transport gene. *Microbiology* 141, 1147-1156, **1995**

Bastien L, Bourgaux P: The MT family of mouse DNA is made of short interspersed repeated elements. *Gene* 57, 81-88, **1987**

Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, Fukumoto H, Seino S: Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care*, 13,198-208, **1990**

Berger J, Hauber J, Hauber R, geiger R, Cullen BR: Secreted placental alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells. *Gene* 66, 1-10, **1988**

Berger UV, Hediger MA: Distribution of peptide transporter PEPT2 mRNA in the rat nervous system. *Anat Embryol (Berl)* 199, 439-449, **1999**

Bertrán J, Werner A, Stange G, Markovich D, Biber J, Testar X, Zorzano A, Palacín M, Murer H: Expression cloning of a cDNA from rabbit kidney cortex that induces a single transport system for cystine and dibasic and neutral amino acids. *Proc Natl Acad Sci* 89, 5601-5605, **1992**

Blattner FR, Plunkett G 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y: The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453-1474, **1997**

Bockman DE, Ganapathy V, Oblak TG, Leibach FH: Localization of peptide transporter in nuclei and lysosomes of the pancreas. *Int J Pancreatol* 22, 221-225, **1997**

Boll M, Herget M, Wagener M, Weber WM, Markovich D, Biber J, Clauss W, Murer H, Daniel H: Expression cloning and functional characterization of the kidney cortex high-affinity proton coupled peptide transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 284-289, **1996**

Boll M, Daniel H: Target size analysis of the peptide/H(+)-symporter in kidney brush-border membranes. *Biochem. Biophys. Acta* 1233, 145-152, **1995**

Boll M, Markovich D, Weber WM, Korte H, Daniel H, Murer H: Expression cloning of a cDNA from rabbit small intestine related to proton-coupled transport of peptides, beta-lactam antibiotics and ACE-inhibitors. *Pflugers Arch* 429,146-149, **1994**

Bonfanti L, Peretto P, De Marchis S, Fasolo A: Carnosine-related dipeptides in the mammalian brain. *Prog Neurobiol* 59. 333-353, **1999**

Brandsch M, Knutter I, Thuncke F, Hartrodt B, Born I, Borner V, Hirche F, Fischer G, Neubert K: Decisive structural determinants for the interaction of proline derivatives with the intestinal H+/peptide symporter. *Eur J Biochem*, 266, 502-508, **1999**

Bucher P: Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J. Mol. Biol.* 212, 563-578, **1990**

Cabin DE, Reeves RH: Encyclopedia of the mouse genome VII. Mouse chromosome 16. *Mamm Genome*, 8 Spec, S307-19, **1998**

- Chomczynski P**, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159, **1987**
- Corden J**, Wasylyk B, Buchwalder A, Sassone-Corsi P, Kendiger C, Chambon P: Promoter sequences of eukaryotic protein-coding genes. *Science* 209, 1405-1414, **1980**
- Cullen BR**, Malim MH: Secreted placental alkaline phosphatase as a eukaryotic reporter gene. *Meth Enzymol* 216, 362-368, **1992**
- Daniel H**, Herget M: Cellular and molecular mechanisms of renal peptide transport. *Am J Physiol* 273, F1-8, **1997**
- Daniel H**, Morse EL, Adibi SA: Determinants of substrate affinity for the oligopeptide/H⁺ symporter in renal brush border membrane. *J Biol Chem* 267, 9565-9573, **1992**
- Daniel H**, Morse EL, Adibi SA: The high and low affinity transport systems for dipeptides in kidney brush border membrane respond differently to alterations in pH gradient and membrane potential. *J Biol Chem* 266, 19917-19924, **1991**
- Davis LG**, Dibner MD, Battey JF: *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier Science Publishing, New York, USA, **1986**
- Don RH**, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick, JS: 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acid Res* 19, 4008, **1991**
- Döring F**, Walter J, Will J, Focking M, Boll M, Amasheh S, Clauss W, Daniel H: Delta-aminolevulinic acid transport by intestinal and renal peptide transporters and its physiological and clinical implications. *J Clin Invest* 101, 2761-2767, **1998a**
- Döring F**, Will J, Amasheh S, Clauss W, Ahlbrecht H, Daniel H: Minimal molecular determinants of substrates for recognition by the intestinal peptide transporter. *J Biol Chem* 273, 23211-23218, **1998b**
- Döring F**, Michel T, Rösel A, Nickolaus M, Daniel H: Expression of the mammalian renal peptide transporter PEPT2 in the yeast *Pichia pastoris* and applications of the yeast system for functional analysis. *Mol Membr Biol* 15, 79-88, **1998c**
- Dringen R**, Pfeiffer B, Hamprecht B: Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *J Neurosci* 19, 562-569, **1999**
- Erickson RP**: Mouse models of human genetic disease: which mouse is more like a man? *BioEssays* 18, 993-998, **1996**
- Fei YJ**, Sugawara M, Liu JC, Li HW, Ganapathy V, Ganapathy ME, Leibach FH: cDNA structure, genomic organization, and promoter analysis of the mouse intestinal peptide transporter PEPT1. *Biochim Biophys Acta* 1492, 145-154, **2000**
- Fei YJ**, Ganapathy V, Leibach FH: Molecular and structural features of the proton-coupled oligopeptide transporter superfamily. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 58, 239-261, **1998a**
- Fei YJ**, Fujita T, Lapp DF, Ganapathy V, Leibach FH: Two oligopeptide transporters from *Caenorhabditis elegans*: molecular cloning and functional expression. *Biochem J* 332, 565-572, **1998b**
- Fei YJ**, Kanai Y, Nussberger S, Ganapathy V, Leibach FH, Romero MF, Singh SK, Boron WF, Hediger MA: Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature* 368, 563-566, **1994**
- Ferraris RP**, Diamond JM: Specific regulation of intestinal nutrient transporters by dietary substrates. *Annu Rev Physiol* 51, 125-141, **1989**
- Fleming MD**, Trenor CC 3rd, Su MA, Foerzler D, Beier DR, Dietrich WF, Andrews NC: Microcytic anaemia mice have a mutation in *Nramp2*, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet* 16, 383-386, **1997**

- Ganapathy ME**, Huang W, Wang H, Ganapathy V, Leibach FH: Valacyclovir: a substrate for the intestinal and renal peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Biochem Biophys Res Commun* 246, 470-475, **1998**
- Ganapathy ME**, Brandsch M, Prasad PD, Ganapathy V, Leibach FH: Differential recognition of beta-lactam antibiotics by intestinal and renal peptide transporters, PEPT 1 and PEPT 2. *J Biol Chem*, 270, 25672-25677, **1995**
- Ganapathy V**, Leibach FH: Role of pH gradient and membrane potential in dipeptide transport in intestinal and renal brush border membrane vesicles. Studies with glycyl-L-proline and L-carnosine. *J Biol Chem* 258, 14189-14192, **1983**
- Ganapathy V**, Leibach FH: Peptide transporter in rabbit kidney. Studies with L-carnosine. *Biochim Biophys Acta* 691, 362-366, **1982**
- Garcia CK**, Goldstein JL, Pathak RK, Anderson RG, Brown MS. Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate, and other monocarboxylates: implications for the Cori cycle. *Cell* 76, 865-873, **1994**
- Gardner MLG**: Absorption of intact proteins and peptides. In *Physiology of the gastrointestinal tract*, ed. LR Johnson, 1795-1820, Raven, New York, **1994**
- Grimble GK**: The significance of peptides in clinical nutrition. *Annu Rev Nutr* 14, 419-447, **1994**
- Guerrini L**, Gong SS, Mangasarian K, Basilico C. Cis- and trans-acting elements involved in amino acid regulation of asparagine synthetase gene expression. *Mol Cell Biol* 13, 3202-3212, **1993**
- Gurdon JB**, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G: use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233, 177-182, **1971**
- Gunshin H**, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA: Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388, 482-488, **1997**
- Hagting A**, v d Velde J, Poolman B, Konings WN: Membrane topology of the di- and tripeptide transport protein of *Lactococcus lactis*. *Biochemistry* 3622, 6777-6785, **1997**
- Hagting A**, Kunji ER, Leenhouts KJ, Poolman B, Konings WN: The di- and tripeptide transport protein of *Lactococcus lactis*. A new type of bacterial peptide transporter. *J Biol Chem* 269, 11391-11399, **1994**
- Han H**, de Vrueh RL, Rhie JK, Covitz KM, Smith PL, Lee CP, Oh DM, Sadee W, Amidon GL: 5'-Amino acid esters of antiviral nucleosides, acyclovir, and AZT are absorbed by the intestinal PEPT1 peptide transporter. *Pharm Res* 15, 1154-1159, **1998**
- Heinemeyer T**, Wingender E, Reuter I, Hermjakob H, Kel AE, Kel, OV, Ignatieva EV, Ananko EA, Podkolodnaya OA, Kolpakov FA, Podkolodny NL, Kolchanov NA: Databases on Transcriptional Regulation: TRANSFAC, TRRD, and COMPEL. *Nucleic Acids Res.* 26, 364-370, **1998**
- Hogan B**, Beddington R, Constantini, F, Lacy E: *Manipulating the Mouse Embryo. A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, USA, 2. Auflage, **1994**
- Hull RN**, Cherry WR, Weaver GW: The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK. *In Vitro* 12, 670-677, **1976**
- Huxley C**, Williams, T, Fried M: One of the tightly clustered genes of the mouse surfeit locus is a highly expressed member of a multigene family whose other members are predominantly processed pseudogenes. *Mol Cell Biol* 8, 3898-3905, **1988**
- Ince TA**, Scotto KW. A conserved downstream element defines a new class of RNA Polymerase II Promoters. *J Biol Chem* 270, 30249-30252, **1995**

- International Cystinuria Consortium:** Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, encoding a subunit (b⁰⁺AT) of rBAT. *Nature Genet* 23, 52-57, **1999**
- Jagadeeswaran P,** Forget BG, Weissman SM: Short interspersed repetitive DNA elements in eucaryotes: transposable DNA elements generated by reverse transcription of RNA Pol III? *Cell* 26, 141-142, **1981**
- Knippers R,** Philippsen P, Schäfer KP, Fanning E: *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, Deutschland, 5. Auflage, **1990**
- Kozak M:** An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acid Res* 15, 8125-8148, **1987**
- Kyte J,** Doolittle RF: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157, 105-132, **1982**
- Le Mouellic H,** Lallemand Y, Brulet P: Targeted replacement of the homeobox gene Hox-3.1 by the Escherichia coli lacZ in mouse chimeric embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4712-4716, **1990**
- Leibach FH,** Ganapathy V: Peptide transporters in the intestine and the kidney. *Annu Rev Nutr* 16, 99-119, **1996**
- Liang R,** Fei YJ, Prasad PD, Ramamoorthy S, Han H, Yang-Feng TL, Hediger MA, Ganapathy V, Leibach FH: Human intestinal H⁺/peptide cotransporter. Cloning, functional expression, and chromosomal localization. *J Biol Chem* 270, 6456-6463, **1995**
- Liu W,** Liang R, Ramamoorthy S, Fei Y-J, Ganapathy ME, Hediger MA, Ganapathy V, Leibach FH: Molecular cloning of PEPT2, a new member of the H⁺/peptide cotransporter family, from human kidney. *Biochim Biophys Acta* 1235, 461-466, **1995**
- Mansour SL,** Thomas KR, Deng CX, Capecchi MR: Introduction of a lacZ reporter gene into the mouse int-2 locus by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7688-7692, **1990**
- Marchuk D,** Drumm M, Saulino A, Collins FS: Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res* 19, 1154, **1991**
- Matthews DM,** Path FRC, Adibi SA: Peptide absorption. *Gastroenterology* 71, 151-161, **1976**
- McCarthy LC,** Terrett J, Davis ME, Knights CJ, Smith AL, Critcher R, Schmitt K, Hudson J, Spurr NK, Goodfellow PN: A first-generation whole genome-radiation hybrid map spanning the mouse genome. *Genome Res* 7:1153-61, **1997**
- Moore CS,** Lee JS, Birren B, Stetten G, Baxter LL, Reeves RH: Integration of cytogenetic with recombinational and physical maps of mouse chromosome 16. *Genomics*, 59(1), 1-5, **1999**
- Moshier JA,** Deutch AH, Huang RC: Structure and in vitro transcription of a mouse B1 cluster containing a unique B1 dimer. *Gene* 58,19-27, **1987**
- Mullis KB,** Faloona FA: Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350, **1987**
- Ogihara H,** Saito H, Shin BC, Terado T, Takenoshita S, Nagamachi Y, Inui K, Takata K: Immuno-localization of H⁺/peptide cotransporter in rat digestive tract. *Biochem Biophys Res Commun* 220, 848-852, **1996**
- Palacín M,** Estévez R, Bertrán J, Zorzano A: Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol Rev* 78, 969-1054, **1998**
- Paulsen IT,** Skurray RA: The POT family of transport proteins. *Trends Biochem Sci* 19, 404, **1994**
- Peghini P,** Janzen J, Stoffel W: Glutamate transporter EAAC-1-deficient mice develop dicarboxylic aminoaciduria and behavioral abnormalities but no neurodegeneration. *EMBO J* 16, 3822-3832, **1997**

- Perry JR**, Basrai MA, Steiner HY, Naider F, Becker JM: Isolation and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* peptide transport gene. *Mol Cell Biol* 14, 104-115, **1994**
- Rajewsky K**, Gu H, Kuhn R, Betz UA, Muller W, Roes J, Schwenk F: Conditional gene targeting. *J Clin Invest* 98, 600-603, **1996**
- Ramamoorthy S**, Liu W, Ma YY, Yang-Feng TL, Ganapathy V, Leibach FH: Proton/peptide cotransporter (PEPT 2) from human kidney: functional characterization and chromosomal localization. *Biochim Biophys Acta*, 1240(1),1-4, **1995**
- Ramirez-Solis R**, Davis AC, Bradley A: Gene targeting in embryonic stem cells. *Methods Enzymol*, 225, 855-878, **1993**
- Roman G**, Meller V, Wu KH, Davis RL: The *opt1* gene of *Drosophila melanogaster* encodes a proton-dependent dipeptide transporter. *Am J Physiol* 275, C857-C869, **1998**
- Saier MH Jr**, Eng BH, Fard S, Garg J, Haggerty DA, Hutchinson WJ, Jack DL, Lai EC, Liu HJ, Nusinew DP, Omar AM, Pao SS, Paulsen IT, Quan JA, Sliwinski M, Tseng TT, Wachi S, Young GB. Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. *Biochim Biophys Acta* 1422, 1-56, **1999**
- Saito H**, Terada T, Okuda M, Sasaki S, Inui K-I: Molecular cloning and tissue distribution of rat peptide transporter PEPT2. *Biochim Biophys Acta* 1280, 173-177, **1996**
- Saito H**, Okuda M, Terada T, Sasaki S, Inui K: Cloning and characterization of a rat H⁺/peptide cotransporter mediating absorption of beta-lactam antibiotics in the intestine and kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 275, 1631-1637, **1995**
- Sambrook J**, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, New York, USA, 2. Auflage, **1989**
- Sanger F**, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467, **1977**
- Schlagheck TG**, Webb KE: Characterization of peptides from the gastrointestinal tract of calves. *Fed Proc* 43, 671-677, **1984**
- Seal CJ**, Parker DS: Isolation and characterization of circulating low molecular weight peptides in steer, sheep and rat portal and peripheral blood. *Comp Biochem Physiol B* 99, 679-685, **1991**
- Shen H**, Smith DE, Yang T, Huang YG, Schnermann JB, Brosius FC 3rd: Localization of PEPT1 and PEPT2 proton-coupled oligopeptide transporter mRNA and protein in rat kidney. *Am J Physiol* 276, F658-665, **1999**
- Shiraga T**, Miyamoto K, Tanaka H, Yamamoto H, Taketani Y, Morita K, Tamai I, Tsuji A, Takeda E: Cellular and molecular mechanisms of dietary regulation on rat intestinal H⁺/Peptide transporter PepT1. *Gastroenterology* 116, 354-362, **1999**
- Singer MF**: SINEs and LINEs; highly repeated short and long interspersed sequences in mammalian genomes. *Cell* 28, 433-434, **1982**
- Smale ST**, Baltimore D. The „Initiator“ as a transcription control element. *Cell* 57, 103-113, **1989**
- Song W**, Steiner HY, Zhang L, Naider F, Stacey G, Becker JM: Cloning of a second *Arabidopsis* peptide transport gene. *Plant Physiol* 110, 171-178, **1996**
- Southern E**: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 98, 503-517, **1975**
- Steiner HY**, Naider F, Becker JM: The PTR family: a new group of peptide transporters. *Mol Microbiol* 16, 825-834, **1995**

Steiner HY, Song W, Zhang L, Naider F, Becker JM, Stacey G: An Arabidopsis peptide transporter is a member of a new class of membrane transport proteins. *Plant Cell* 6, 1289-1299, **1994**

Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K: Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276, 1699-1702, **1997**

Thiesen HJ, Bach C: Target detection assay (TDA): a versatile procedure to determine DNA binding sites as demonstrated on SP1 protein. *Nucleic Acids Res.* 18, 3202-3209, **1990**

Thomas KR, Capecchi MR: Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 51, 503-512, **1987**

Tsay YF, Schroeder JI, Feldmann KA, Crawford NM: The herbicide sensitivity gene CHL1 of Arabidopsis encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* 72, 705-713, **1993**

Turk E, Martin MG, Wright EM: Structure of the human Na⁺/Glucose Cotransporter Gene SGLT1. *J Biol Chem* 269, 15204-15209, **1994**

Turner GC, Fangyong D, Varshavsky A. Peptides accelerate their uptake by activating a ubiquitin-dependent proteolytic pathway. *Nature* 405, 579-583, **2000**

Unal CB, Owen MD, Millington WR: Beta-endorphin-induced cardiorespiratory depression is inhibited by glycyl-L-glutamine, a dipeptide derived from beta-endorphin processing. *J Pharmacol Exp* 271, 952-958, **1994**

Weis L, Reinberg D. Transcription by RNA polymerase II: initiator-directed formation of transcription competent complexes. *FASEB J* 6, 3300-3309, **1992**

Wenzel U, Diehl D, Herget M, Kuntz S, Daniel H: Regulation of the high-affinity H⁺/peptide cotransporter in renal LLC-PK1 cells. *J Cell Physiol* 178, 341-348, **1999**

Wenzel U, Diehl D, Herget M, Daniel H: Endogenous expression of the renal high-affinity H⁺-peptide cotransporter in LLC-PK1 cells. *Am J Physiol* 275:C1573-9, **1998**

Wirth T, Gloeggler K, Baumruker T, Schmidt M, Horak I: Family of middle repetitive DNA sequences in the mouse genome with structural features of solitary retroviral long terminal repeats. *Proc Natl Acad Sci USA* 80, 3327-3330, **1983**

Yamashita T, Shimada S, Guo W, Sato K, Kohmura E, Hayakawa T, Takagi T, Tohyama M: Cloning and functional expression of a brain peptide/histidine transporter. *J Biol Chem* 272, 10205-10211, **1997**

Ymer S, Tucker WQ, Campbell HD, Young IG: Nucleotide sequence of the intracisternal A-particle g inserted 5' to the interleukin-3 gene of the leukemia WEHI-3B. *Nucleic Acid Res* 14, 5901-5918, **1986**

II Abkürzungsverzeichnis

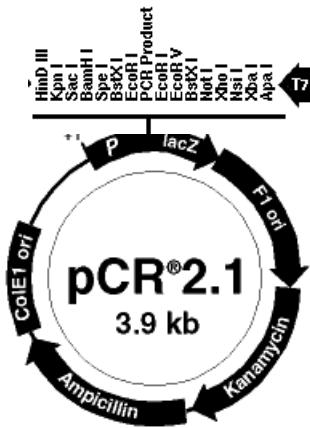
Aminosäuren:		hPEPT	Peptidtransporter aus dem Menschen
A	Ala Alanin	HSVtk	Herpes Simplex Virus Tymidin-kinase-Gen
C	Cys Cystein	IPTG	Isopropylthio- β -D-galactosid
D	Asp Asparaginsäure	kb	Kilo Basen: 10^3 bp
E	Glu Glutaminsäure	LacZ	β -Galactosidase-Gen
F	Phe Phenylalanin	LIF	engl.: Leukemia Inhibitory Factor
G	Gly Glycin	LINE	lange, verteilte Wiederholungssequenzen
H	His Histidin	LLC-PK ₁	renale epitheliale Zelllinie aus Schwein
I	Ile Isoleucin	LTR	engl.: long terminal repeat
K	Lys Lysin	Mb	Mega Basen: 10^6 bp
L	Leu Leucin	M-MULV	Moloney Murine Leukemia Virus
M	Met Methionin	MCT1	Monocarboxylat-Transporter
N	Asn Asparagin	MLC	engl.: Mouse Locus Catalog
P	Pro Prolin	mPEPT	muriner Peptidtransporter
Q	Gln Glutamin	MUP	4-methylumbelliferyl Phosphat
R	Arg Arginin	mRNA	engl.: messenger RNA
S	Ser Serin	Neo	Neomycinphosphotransferase-Gen
T	Thr Threonin	OMIM	engl.: On-line Mendelian Inheritance in Men
V	Val Valin	OPT1	Oligopeptidtransporter aus <i>Drosophila melanogaster</i>
W	Trp Tryptophan	PAC	engl.: P1-artificial chromosome
Y	Tyr Tyrosin	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
AP1	Adaptoren-Primer	PEPT1	intestinaler Peptidtransporter aus Säugetieren
AtPtr2A/B	Oligopeptidtransporter aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	PEPT2	renaler Peptidtransporter aus Säugetieren
Basen der Nukleinsäuren:		PHT1	Peptid/Histidin-Transporter
A	Adenin	PKC	Proteinkinase C
C	Cytosin	POT	protonengekoppelte Oligopeptidtransporter
G	Guanin	Ptr2	Peptidtransporter aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
T	Thymin	Ptr2_1-3	Konservierte Aminosäurebereiche der POT-Familie
bp	Basenpaare	RACE	engl.: rapid amplification of cDNA ends
BSMV	Bürstensaummembranvesikel	rBAT	Untereinheit des Systems für die Aufnahme von Cystin und dibasischen Aminosäuren
CaPtr2	Oligopeptidtransporter aus <i>Candida albicans</i>	rbPEPT	Peptidtransporter aus Kaninchen
cDNA	komplementäre DNA	RH	engl.: Radiation Hybrid
Chl1	Nitrattransporter aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	RNA	Ribonukleinsäure
cM	centi Morgan	rPEPT	Peptidtransporter aus Ratte
cpm	Zerfälle pro Minute: Messeinheit für Radioaktivitätsstrahlung engl.: counts per minute	RT	Reverse Transkription
CPTA/B	Peptidtransporter aus <i>Caenorhabditis elegans</i>	RZPD	Ressourcen Zentrum des Deutschen Human Genom Projekts
cR	centi Rays	SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
DNA	Desoxyribonukleinsäure	SINE	kurze, verteilte Wiederholungssequenzen
DMSO	Dimethylsulfoxid	SLC3A1	siehe rBAT
DMT1	divalenter Metalionentransporter		
DtpT	Oligopeptidtransporter aus <i>Lactococcus lactis</i>		
EAAC1	siehe EAAT3		
EAAT2/3	Glutamat-Transporter		
ES-Zellen	embryonale Stammzellen		
FKS	Fötale Kälberserum		
G418	Neomycinanalog		
GLT1	siehe EAAT2		
HeLa	humane epitheliale Zelllinie aus Zervix		
hnRNA	heteronukleäre RNA		

SLC7A9	Untereinheit des Systems für die Aufnahme von Cystin und dibasischen Aminosäuren
TBV2	murine embryonale Zelllinie
YHIP	Transporter aus <i>Escherichia coli</i>
YJDL	Transporter aus <i>Escherichia coli</i>
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid

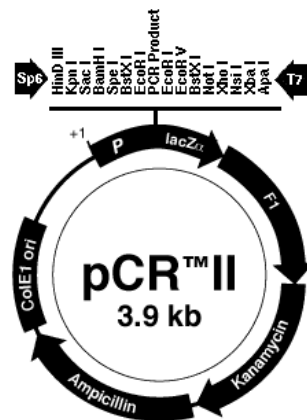
III Plasmide, Primer und Linker

A) Plasmide

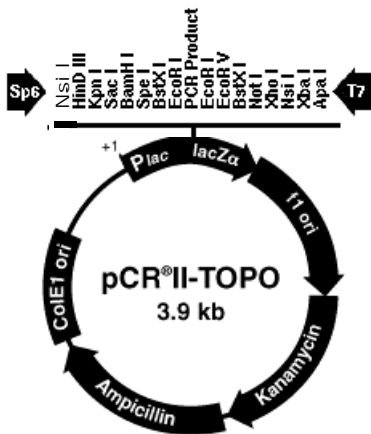
pCR2.1 (Invitrogen, San Diego, USA)



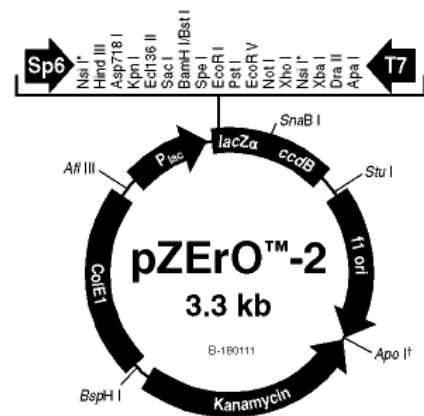
pCRII (Invitrogen, San Diego, USA)



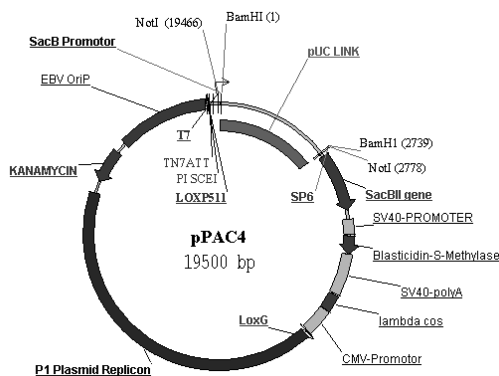
pCRII-TOPO (Invitrogen, San Diego, USA)



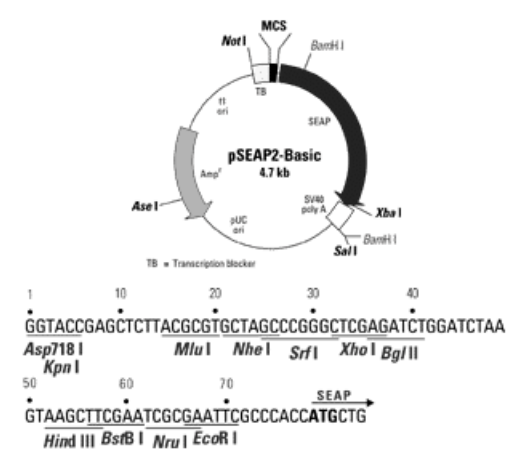
pZeRO-2 (Invitrogen, San Diego, USA)



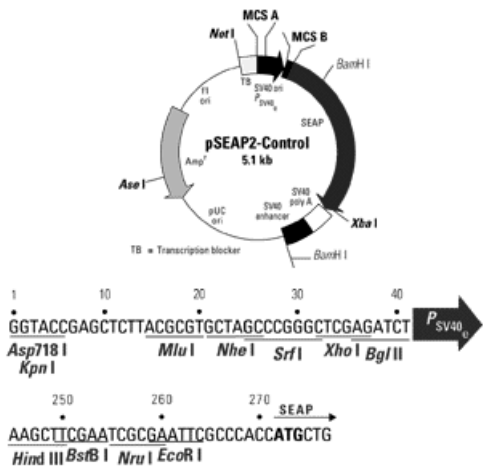
pPAC4



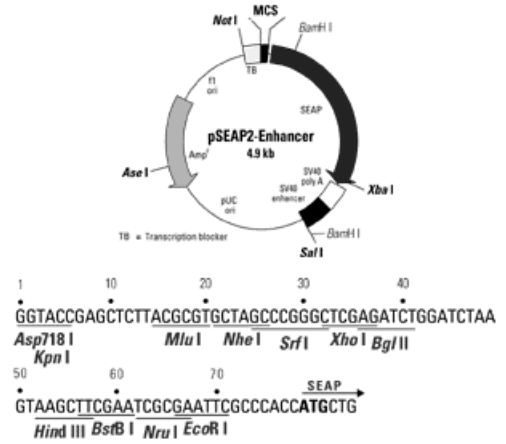
pSEAP-Basic (CLONTECH, Palo Alto, USA)



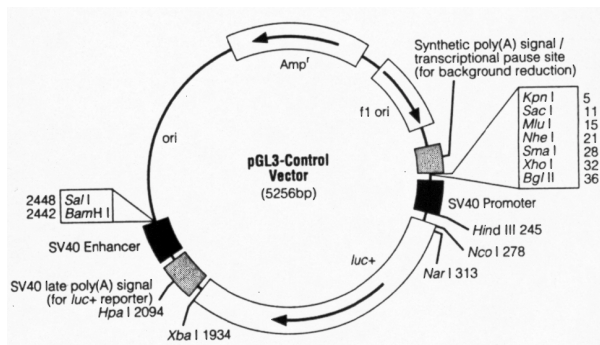
pSEAP-Control (CLONTECH, Palo Alto, USA)



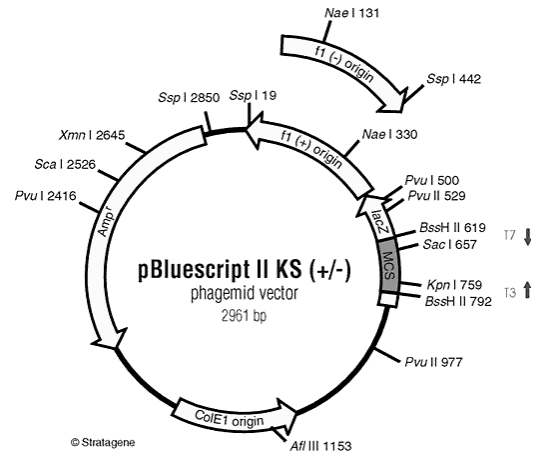
pSEAP-Enhancer (CLONTECH, Palo Alto, USA)



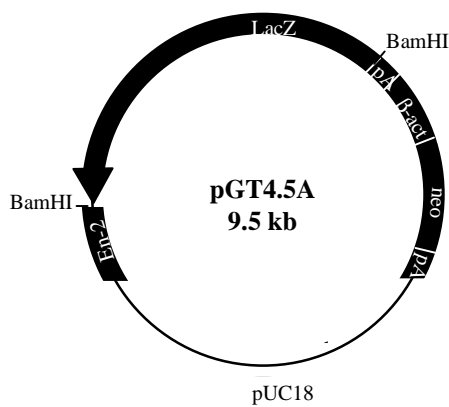
pGL3-Control (Promega, Madison, USA)



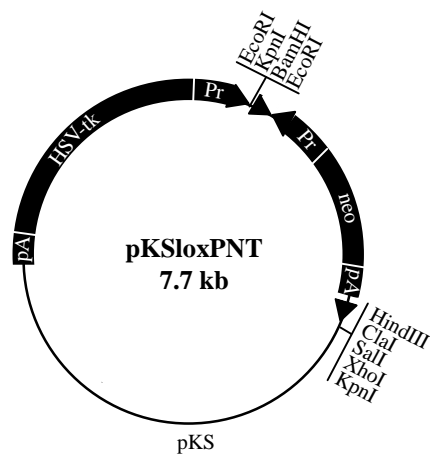
pBluescript II KS (Stratagene, La Jolla, USA)



pGT4.5A (hergestellt im Labor von Dr. A Joyner, Mount Sinai Research Institute, Toronto, Canada)



pKSloxPNT (hergestellt im Labor von Dr. W. Wurst, Institut für Säugetiergenetik, GSF-Neuherberg, Deutschland)



B) Primer

Sense Primer

Name	Ursprung	Sequenz
M2F-58	PEPT2-cDNA aus Maus	5'-AGTCCTAGCTGCCTACTGAAGCCA-3'
M2F-51	PEPT2-cDNA aus Maus	5'-GCTGCCTACTGAAGCCAAATGCTTG-3'
M2F290	PEPT2-cDNA aus Maus	5'-AGAGGCTGCTGAAGGCATGGT-3'
M2F446	PEPT2-cDNA aus Maus	5'-CAGAGCTATGAGACTCAGGC-3'
M2F740	PEPT2-cDNA aus Maus	5'-CTGAAGGGAACATAGTGGCTC-3'
M2F955	PEPT2-cDNA aus Maus	5'-GGTGGACTCTGCAAGCTAAC-3'
M2F1092	PEPT2-cDNA aus Maus	5'-TCGGCTGATCTCCAAGTGCGG-3'
M2F1207	PEPT2-cDNA aus Maus	5'-GGAATGATCCATCCTCAGCC-3'
M2F1229	PEPT2-cDNA aus Maus	5'-CCATCCTCAGCCAGCTTCCCAAGAG-3'
M2F1816	PEPT2-cDNA aus Maus	5'-CTATCCATTGCATGGCAGC-3'
M2F2057	PEPT2-cDNA aus Maus	5'-GCCTGATCTTCTCCGTCATG-3'
Rb2F1169	PEPT2-cDNA aus Kaninchen	5'-CTAGCATGCCTGGCATTTCAG-3'
M2F-737	PEPT2-Gen aus Maus	5'-CCATACCTGCACGACTGACT-3'
PROM-927	PEPT2-Gen aus Maus + RS	5'-TCTCGAGAAAACCTAAGCCCGGATC-3'
PROM-2157	PEPT2-Gen aus Maus + RS	5'-TCTCGAGCTCTGGCTGTGCATATGGGTG-3'
M2gF955A	PEPT2-Gen aus Maus	5'-GGAGTTACCATGGCAGTTCT-3'
M2gF1527A	PEPT2-Gen aus Maus	5'-GTACTAGCAGGACAGTTACAG-3'
AP1	Adaptoren Primer Marathon-Ready™ (CLONTECH)	5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
LacZ.1-F	β-Galactosidasegen	5'-CAGGATATGTGGCGGATGAG-3'
M2gF5UTR-3270	PEPT2-Gen aus Maus	5'-GTTCTGCTCCATTGATTGTC-3'

Antisense Primer

Name	Ursprung	Sequenz
M2B-11BamHI	PEPT2-cDNA aus Maus + Mut.	5'-AGGATCCATGGCTGGCTCCT-3'
M2B154	PEPT2-cDNA aus Maus	5'-GGCGATGCTGAGTGGGTAGCTAGAGCCG-3'
M2B446	PEPT2-cDNA aus Maus	5'-GCCTGAGTCTCATAGCTCTG-3'
M2B740	PEPT2-cDNA aus Maus	5'-GAGCCACTATGTTCCCTTCAG-3'
M2B955	PEPT2-cDNA aus Maus	5'-GTTAGCTTGCAGAGTCCACC-3'
M2B1113	PEPT2-cDNA aus Maus	5'-TCCGCACTTGGAGATCAGCCG-3'
M2B1207	PEPT2-cDNA aus Maus	5'-GGCTGAGGATGGATCATTCC-3'
M2B1661	PEPT2-cDNA aus Maus	5'-CCTCTTGCACAGTTCTGTAC-3'
M2B1806	PEPT2-cDNA aus Maus	5'-TCTGCCTTCCAGGCCTGAAGACCCC-3'
M2B1816	PEPT2-cDNA aus Maus	5'-GCTGCCATGCAATGGATAG-3'
M2B2057	PEPT2-cDNA aus Maus	5'-CATGACGGAGAAGATCAGGC-3'
M2B2216	PEPT2-cDNA aus Maus	5'-AGCGATGGCTGATATCAGAGCCAGG-3'
M2B3628	PEPT2-cDNA aus Maus	5'-GAGATAGTGTGCGACCTCG-3'
Rb2B290	PEPT2-cDNA aus Kaninchen	5'-AGAGGCTGCTGAAGGCATGGT-3'
Rb2B1899	PEPT2-cDNA aus Kaninchen	5'-CCTGTGACAGAGAACATGACC-3'
PROMBPClaI	PEPT2-Gen aus Maus + RS	5'-GAATTCGTGCTAGAGAATCGATTAGGG-3'
M2gH14B213	PEPT2-Gen aus Maus	5'-CTATGTAGCCTAGGCTGGACT-3'
M2gB1030A	PEPT2-Gen aus Maus	5'-TCATTAGATCAAGAGTGGG-3'
LacZ.1-R	β-Galactosidasegen	5'-GTTCAACCACCGCACGATAG-3'

Plasmid Primer

Name	Ursprung	Sequenz
T3	T3 Promotor	5'-AATTAACCTCACTAAAGGG-3'
T7	T7 Promotor	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

C) Linker

Name	Sequenz
ISNBXK	5'-TCGACGCGGCCGCGGATCCTCGAGGTAC-3'
ISNBXKc	5'-CTCGAGGATCCGCGGCCGCG-3'

IV Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bedanken bei:

Frau Prof. H. Daniel für die Ermöglichung und Betreuung dieser Arbeit, erst an der Universität Gießen und zur Zeit an der Technischen Universität München, Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie. Es hat sehr viel Spaß gemacht unter einer so dynamischen Chefin die Welt der Peptidtransporter zu untersuchen.

Herrn Prof. R. Balling, der es mir ermöglichte, in seiner Arbeitsgruppe an der GSF-Neuherberg, die Herstellung einer Knockout-Maus durchzuführen. Es hat sehr viel Spaß gemacht unter einem so enthusiastischen Mausgenetiker zu arbeiten.

Martina Herget für ihre kompetente und gleichzeitig sehr spaßige Einarbeitung in die molekularbiologischen und Zellkultur-Techniken.

Michael Boll für die Einarbeitung in molekularbiologische Methoden, für seine Unterstützung und für die Korrektur meiner Dissertation. Ich weiß daß es eine „harte Arbeit“ war.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Daniel, denn die Zusammenarbeit hat sehr viel Spaß gemacht ebenso wie die guten Zeiten zu feiern. Die Aufzählung wäre zu lang, deshalb will ich mich bei allen zusammen herzlich bedanken, insbesondere bei Stephan Theis auch für das Korrekturlesen meiner Dissertation.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Balling, insbesondere allen Mitgliedern der Service-Einrichtung für die Herstellung von Transgenen und Knockout-Mäusen für die technische Unterstützung, Susanne Bourier für die Einarbeitung in ES-Zellkultur-Techniken und Ralf Kist und Veronique Blanquet für viele wertvolle Informationen.

Mamá, muchas gracias por tu apoyo incondicional a lo largo de toda mi trayectoria tanto academica como personal, y Moncho y Pablo, gracias pues a pesar de la distancia, siempre me habeis apoyado.

Allen Freunden, die sowohl direkt am Ort geholfen haben als auch in Spanien.

V Lebenslauf

Name: Isabel Rubio-Aliaga

Adresse: Landshuterstr. 94
85356 Freising

Geburtsdatum: 1.9.1969

Geburtsort: Valencia, Spanien

Staatsangehörigkeit: Spanisch

Familienstand: Geschieden

Schulbildung: 1975-1987
Grundschule und Gymnasium
Deutsche Schule Valencia, Spanien

Abitur: Mai 1987

Studium: Oktober 1987 – Juli 1989
Maschinenbau, Technische Universität Valencia, Spanien
Oktober 1989 – Juli 1994
Pharmazie, Universität Valencia, Spanien

Diplom: Juli 1994
Diplom in Pharmazie, Fachrichtung Gesundheitswesen

Aufbaustudium: September 1994 – September 1995
MSc in Humanernährung und Metabolismus
Universität Aberdeen, Großbritannien
MSc-Arbeit bei Prof. Dr. P. Trayhurn (Abteilung für Biochemie)
Thema: „*Ob* (obese) gene expression in white adipose tissue during lactation in mice“

Staatsexamen: Juli 1996
Universität Valencia, Fachrichtung Pharmazie
Staatsexamenarbeit bei Dr. A. Frígola und Dr. I. Frasquet (Abteilung Ernährungswissenschaften)
Thema: „Gehalt an Vitamin C des Blutplasmas einer repräsentativen Bevölkerung (Erwachsener) der Comunidad Valenciana“

Promotion:

seit Oktober 1996,

bei Prof. Dr. H. Daniel z.Z. Abteilung für Ernährungs-
physiologie, TU München

November 1998 – März 2000

Forschungsaufenthalt am Institut für Säugetiergenetik, GSF, bei
Prof. Dr. R. Balling

Oktober 1996 – Juli 1999

DAAD Stipendiatin

August 1999 – Juli 2000

Bund der Freunde der TU-München Stipendiatin