

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra Fyziologie živočichů a vývojové biologie

EXPRESSE CTL1 (CHOLINE-TRANSPORTER-LIKE 1)

PROTEINU

A JEHO ÚLOHA PŘI TRANSPORTU CHOLINU

EXPRESSION OF CTL1 (CHOLINE-TRANSPORTER-LIKE 1)

PROTEIN AND ITS ROLE IN TRANSPORT OF CHOLINE

Bakalářská práce

studijního oboru Klinická a toxikologická analýza



UNIVERZITA KARLOVA v Praze
Přirodovědecká fakulta
Oborová knihovna chemie
Albertov 6, 128 43 Praha 2
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208
UK 22

*pr.č. 128b/08 stud
(fyziol.)*

Klíčová slova :

cholin, CTL1, transportery organických kationtů

Předmětová hesla :

izolace – RNA, transport – cholin, amplifikace - PCR

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele MUDr. Vladimíra Doležala, DrSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 18. května 2008.

Helena Píková

Úvodem své bakalářské práce bych chtěla poděkovat všem, kteří mi vytvořili podmínky pro její vypracování, zejména MUDr. Vladimíru Doležalovi, DrSc. a Doc. RNDr. Stanislavu Vybíralovi, CSc. za jejich trpělivost a poskytnuté konzultace při sepisování. V neposlední řadě děkuji rodině za důvěru a podporu při studiu.

Helena Pízová

Obsah

OBSAH	4
SEZNAM ZKRATEK	5
1. CÍLE PRÁCE	7
2. ÚVOD - STRUKTURA A METABOLISMUS CHOLINU	7
2.1. CHOLIN JAKO PREKURZOR ACETYLCHOLINU.....	8
2.2. CHOLIN JAKO PREKURZOR MEMBRÁNOVÝCH FOSFOLIPIDŮ	9
3. TRANSPORT CHOLINU	11
3.1. NÍZKOAFINNÍ TRANSPORT CHOLINU	11
3.2. VYSOKOAFINNÍ TRANSPORT CHOLINU	13
4. PROTEIN PODOBNÝ TRANSPORTÉRU CHOLINU	14
4.1. STRUKTURA	14
4.2. GENOMICKÉ USPOŘÁDÁNÍ.....	15
4.3. PŘEDPOKLÁDANÁ FUNKCE.....	18
5. ZÁVĚR	19
6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST: OPTIMALIZACE IZOLACE RNA Z MYŠÍHO MOZKU	20
6.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, KITY A PŘÍSTROJE	20
6.2. METODY IZOLACE RNA.....	21
6.2.1. <i>Varianta Chomczynského metody- RNAwiz</i>	22
6.2.2. <i>Varianta Chomczynského metody- Trizol a Tripure</i>	22
6.2.3. <i>Izolace HighPure kolonkou</i>	23
6.3. OVĚŘENÍ KVALITY IZOLOVANÉ RNA.....	23
6.4. RT-PCR.....	24
6.4.1. <i>Reverzní transkripce</i>	24
6.4.2. <i>PCR</i>	24
6.5. VÝSLEDKY A DISKUZE	25
6.6. ZÁVĚR.....	27
7. SEZNAM LITERATURY	28

Seznam zkratk

ACh - acetylcholin

AMK - aminokyselina

Bp – páry bází

cAMP - cyklický adenosinmonofosfát

cDNA - komplementární DNA(complementary DNA)

CoA - koenzym A

COS-7 - opičí fibroblastová buněčná linie

CTL - protein podobný cholinovému přenašeči (Choline Transporter Like protein)

CTP – cytidin trifosfát

DEPC - diethylpyrokarbonát

DNA - deoxyribonukleová kyselina

GAPDH – glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáza

GITC – guanidium isothiokyanát

CHT1 - vysokoafinní cholinový přenašeč (Choline Transporter 1)

Kb – kilobáze = 1000bp

kDa - kilodalton

Ki - Inhibiční konstanta

Km - Michaelisova konstanta

MMLV – Moloneyho virus myší leukemie

mRNA - messengerová RNA

mTOR - mitochondriální cíl rapamycinu (mitochondrial target of rapamycine)

OCT - přenašeč organických kationtů (Organic Cation Transporter)

OCTN – antiporter organický kationt/karnitin

PC - fosfatidylcholin

PCR – polymerázová řetězová reakce

PE - fosfatidyletanolamin

PKC - proteinkináza C

RNA - ribonukleová kyselina

RT – reverzní transkripce

SAM - S-adenosylmethionin

SDS – dodecylsulfát sodný

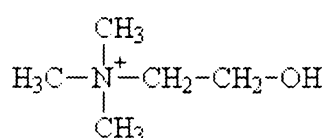
TMD – transmembránová doména

1. Cíle práce

- 1) Provést literární rešerši na téma transportu cholinu CTL1
- 2) Optimalizovat metodu izolace RNA z myšního mozku pro použití při RT-PCR
- 3) Ověřit kvalitu izolované RNA při PCR pro detekci CTL1 a referenčního genu GAPDH

2. Úvod - Struktura a metabolismus cholinu

Cholin je základní živina pro všechny živočichy (9). Byl objeven dr. Streckerem roku 1862 [1]. Nedostatek cholinu v potravě a poruchy jeho metabolismu mají negativní dopady v organismu. Nedostatek cholinu způsobuje poruchy funkce jater (tzv. nealkoholická ztučnělá játra) a ovlivňuje proces kancerogeneze. Tyto procesy souvisejí se změnami exprese genů regulujících apoptózu a růst buněk [2, 3]. Ovlivněn je také fosfolipidový metabolismus [4]. Ve vývoji plodu působí nedostatek a poruchy transportu cholinu defekty neurální trubice a množství cholinu ovlivňuje celkový vývoj mozku plodu [5]. U krys bylo pozorováno, že přídavek cholinu do potravy březích samic potkanů má pozitivní efekt na behaviorální schopnosti narozených potomků a tento efekt přetrvává i v dospělosti. [6-8]. Cholinová molekula po chemické stránce představuje kvarterní amin – (2-hydroxyetyl) trimetylamoniumhydroxid (obr.1).

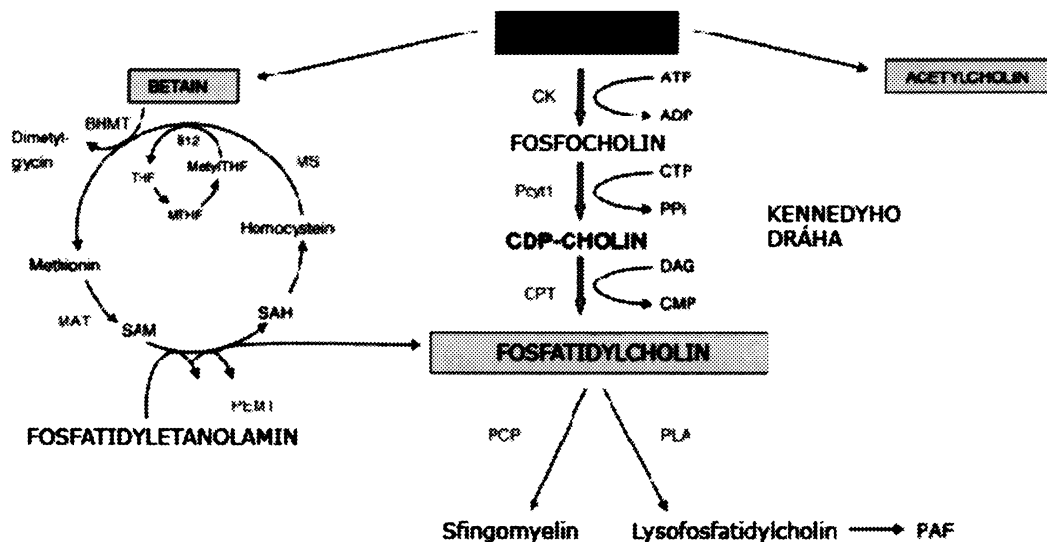


Cholin

Obr. 1. Chemická struktura molekuly cholinu

Cholin je metabolizován třemi hlavními cestami (obr. 2). Většina cholinu v buňkách je vázána ve formě fosfatidylcholinu (PC), který je hlavním fosfolipidem buněčných membrán [9]. Dále se účastní metabolismu methioninu, jako donor metylové skupiny. Po oxidaci na betain a průchodu jednouhlíkovým cyklem, na jehož konci potom vzniká S-adenosylmethionin (SAM),

dále působí jako metylační látka v biologických dějích [10]. Třetí nezastupitelnou rolí cholinu je jeho funkce prekurzoru pro syntézu neurotransmiteru acetylcholinu [11, 12]. (obr. 3)

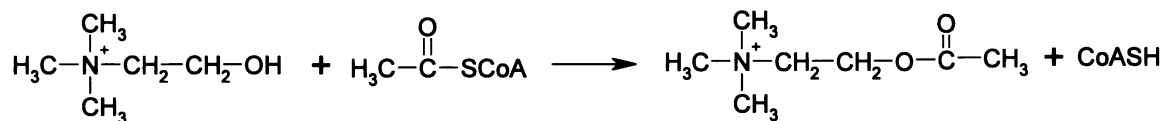


Obr. 2. Metabolismus cholinu: vlevo – jednouhlíkatý cyklus a metylace; uprostřed – syntéza fosfolipidů; vpravo syntéza acetylcholinu.

ADP, adenosindifosfát; ATP, adenosintrifosfát; BHMT, betain:homocystein metyltransferáza; B12, vitamin B12; CDP, cytidindifosfát; CK, cholin kináza; CPT, CDP-cholin:DAG cholinofosfotransferáza; CMP, cytidinmonofosfát; CTP, cytidintrifosfát; DAG, diacylglycerol; MAT, methioninadenosyltransferáza; methylTHF, 5-metyl-tetrahydrofolát; MS, methionin syntáza; MTHF, 5,10-metylen-tetrahydrofolát; PAF, destičky aktivující faktor; PCP, fosfatidylcholin:ceramidcholin fosfotransferáza; Pcyt1, CTP:fosfocholincytidyltransferáza; PEMT, fosfatidyletanolamin *N*-metyltransferáza; PLA, fosfolipáza A2; PPI, pyrofosfát; SAH, *S*-adenosylhomocystein; SAM, *S*-adenosylmethionin; THF, tetrahydrofolát. Převzato z Michel et al. 2006 [13]

2.1. Cholin jako prekurzor acetylcholinu

V zakončeních neuronů slouží cholin jako prekurzor pro syntézu acetylcholinu. Acetylcholin vzniká acylací cholinu pomocí Acetyl-CoA enzymem cholinacetyltransferázou.



Obr. 3 Syntéza acetylcholinu z cholinu a Acetyl-SCoA

Acetyl koenzym A pro tuto reakci vzniká v mitochondriích v Krebsově cyklu. Z mitochondrií se transportuje do cytoplazmy, kde dochází k syntéze acetylcholinu. Cholin pro tuto syntézu pochází téměř výhradně z extracelulární tekutiny a do zakončení musí být transportován jako volný cholin pomocí přenašeče. Pouze velmi malá část cholinu pro syntézu acetylcholinu pochází z degradace fosfolipidů nervového zakončení. Naopak významným zdrojem volného extracelulárního cholinu pro syntézu acetylcholinu je cholin, který vzniká rozštěpením uvolněného acetylcholinu enzymy acetylcholinesterázou nebo butyrylcholinesterázou.

2.2. Cholin jako prekurzor membránových fosfolipidů

Další významnou cestou metabolického využití cholinu (viz obr. 2) je jeho použití pro syntézu fosfolipidů. Volný intracelulární cholin je fosforylován cholinkinázou na fosforylcholin, následně je cittydylován CTP pomocí Pcyt1 (CTP:cholincitydyltransferáza) a přeměněn na fosfatidylcholin reakcí s diacylglycerolem DAG:cholinfosfotransferázou. Tato metabolická dráha de novo syntézy fosfatidylcholinu, která vyžaduje volný cholin, se nazývá Kennedyho metabolická dráha. Regulačním enzymem této dráhy je Pcyt1, dráha není regulována ve svých dalších krocích nebo transportem cholinu [13]. Vzniklý fosfatidylcholin může být kromě své strukturní funkce využíván pro syntézu sfingomyelinu pomocí fosfatidylcholin:ceramidcholinfosfotransferázy. Dále může být štěpen fosfolipázou A2 na lysofosfatidylcholin a přeměněn na destičky aktivující faktor. Při štěpení fosfolipázou D dochází k uvolnění volného cholinu.

Kromě této dráhy existuje ještě záložní cesta syntézy fosfatidylcholinu, jejíž funkce se zachovala jen v játrech pro případ omezení příjmu cholinu z potravy (např. při hladovění nebo těhotenství). Je to u savců jediná dráha pro de novo syntézu fosfatidylcholinu, který může sloužit jako zdroj volného cholinu. Skládá se ze tříkrokové metylace fosfatidyletanolaminu pomocí SAM enzymem fosfatidyletanolamin-N-methyltransferázou. Tato dráha je spojena s třetí cestou utilizace cholinu. Tou je jeho mitochondriální oxidace na betain. Betain následně slouží jako donor metylové skupiny pro metylaci homocysteinu na methionin. Ten se

methioninadenosyltransferázou mění na SAM, který následně slouží jako univerzální metylační látka v biologických metylacích a jednou z částých je právě výše zmiňovaná metylace fosfatidyletanolaminu na fosfatidylcholin. Jak bylo ukázáno experimenty na myších knockoutovaných pro komponenty těchto dvou drah, jsou tyto dráhy do jisté míry komplementární, avšak rovnováha mezi PC, PE a SAM je nezbytná pro správnou fyziologickou funkci jater [14].

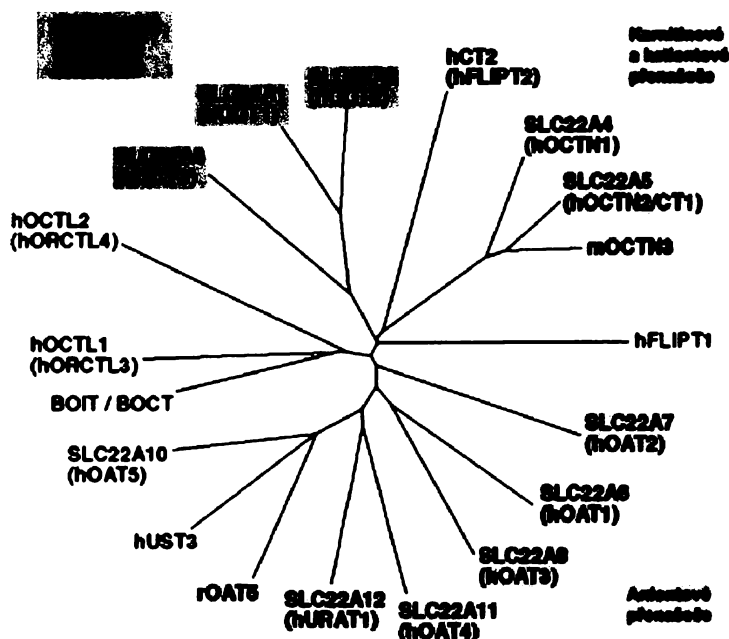
3. Transport cholinu

Transport molekul přes buněčné membrány je charakterizován : přenosem molekuly z jedné strany membrány na druhou, chemickou specificitou transportované látky pro přenašeč, specificitou pro optické izomery, kompeticí mezi strukturně podobnými látkami a satureovatelností dle kinetiky Michaelise-Mentenové.

Transport cholinu přes buněčnou membránu můžeme rozdělit na dva systémy na základě míry afinity pro cholin a závislosti na potenciálu Na^+ [15]. Oba systémy vykazují odlišné parametry a lokalizaci v organismu. Nízkoafinní transportní systém vykazuje K_m pro cholin $> 30\text{--}100\ \mu\text{M}$ a je v organismu přítomný všeobecně. Dodává cholin pro biosyntézu fosfolipidů (17) a je nezávislý na potenciálu Na^+ iontů. Vysokoafinní transport má K_m pro cholin $< 10\ \mu\text{M}$, je lokalizován převážně v cholinergních presynaptických nervových zakončeních, kde poskytuje cholin pro syntézu acetylcholinu [13], a je naopak závislý na potenciálu Na^+ iontů [15]. Cholin je schopen také samovolné difuze přes membránu, avšak nikoli za fyziologického pH [16, 17].

3.1. Nízkoafinní transport cholinu

Nízkoafinní transport cholinu se vyskytuje v podstatě ve všech tkáních (hepatocyty, placenta, enterocyty, atd.). Původně se uvažovalo, že se jedná pouze o pasivní difuzi [18]. Pozdější práce však ukázaly, že i tento transport probíhá pomocí přenašečů (byla zjištěna stereospecificita transportu a kinetické parametry odpovídající aktivnímu procesu). Je nezávislý na Na^+ a je inhibovatelný různými strukturními analogy cholinu. V některých tkáních byla ukázána inhibice transportu cholinovým analogem hemicholiniem-3 [19], který je při nízkých koncentracích specifickým inhibítozem vysokoafinního transportu cholinu, a také závislost na teplotě, což ukazuje na mechanismus závislý na proteinu [20]. Později se ukázalo, že při tomto typu transportu se uplatňuje rodina nespecifických transporterových proteinů 22, viz obr. 4., které se nazývají transportéry organických kationtů (organic cation transporter, OCT).



Obr. 4. Fylogenetický strom eukaryotických přenašečů rodiny 22. Jako o možných cholinových přenašečích se uvažuje o červené skupině a části žlutě označené skupiny (OCTNx). Jde o přenašeče kationtů. Ostatní přenašeče jsou strukturně i funkčně odlišné, přesto sdílejí jistou míru sekvenční podobnosti. Převzato z Koepsell et al. [21].

Tyto bílkoviny se s různou specificitou podílejí na transportu endogenních organických kationtů, léků a exogenních toxických kationtů. [22]. Doposud bylo identifikováno šest členů rodiny OCT : OCT1, OCT2, OCT3 [23], OCTN1 [24], OCTN2 a OCTN3 [25]. OCT1 a OCT2 jsou exprimované převážně v ledvinách a játrech, méně pak ve střevě [23, 26, 27]. OCT3 je výrazně exprimován v mozku krysy [28-30]. [31]. Studie které se zabývaly schopností rodiny OCT transportovat cholin se do značné míry rozcházejí a výsledky jsou závislé na použitém modelu. Bylo ukázáno, že OCT1 je schopen transportovat cholin při expresi v 293T buňkách, zatímco OCT2 zde ne [32]. Ve studii prováděné na žabích oocytech transportovaly cholin oba proteiny [33]. *In vivo* studie ukázala, že OCT2 má významnou roli v homeostáze cholinu v mozku krysy a že cholin není substrátem OCT3 [33]. OCTN1 i OCTN2 byly nalezeny jak u člověka tak u krysy [24, 25, 34, 35]. Bylo však zjištěno, že cholin není substrátem ani OCTN1 ani OCTN2 [25, 35]. Některá pozorování ukazují na úlohu OCT2 jako nízkoafinního přenašeče cholinu v mozku.

3.2. Vysokoafinní transport cholinu

Vysokoafinní transport cholinu byl nejdříve charakterizován farmakologicky v nervových zakončeních mozku [14, 36, 37]. Je lokalizován převážně na presynaptických cholinergních zakončeních a jeho úlohou je dodávat cholin pro syntézu acetylcholinu. Je zprostředkován přenašečem (CHT1) [38] závislým na přítomnosti Na^+ a Cl^- iontů. Specifickým inhibitorem tohoto transportu je hemicholinium-3. Hemicholinium-3 se váže na přenašeč s vysokou afinitou, ale netransportuje se. Lze ho tedy využít k autoradiografickému znázornění lokalizace proteinu [36, 39]. Autoradiografická analýza pomocí ^3H -hemicholinia ukázala v mozku vysokou koncentraci vysokoafinních transportních míst v nucleus interpeduncularis, bazálních gangliích (nucleus caudatus a putamen), jádrech bazálního mozku a tuberculum olfactorium. Tato distribuce vazebných míst odpovídá oblastem mozku bohatým na cholinergní nervová zakončení [40, 41] a zachovává se v průběhu vývoje [42]. Vysokoafinní transport cholinu do cholinergních zakončení je pravděpodobně nejdůležitějším limitujícím krokem při syntéze acetylcholinu, protože nervové buňky savců nedokáží syntetizovat dostatečné množství cholinu a jsou odkázány na jeho získávání z mimobuněčného prostoru [43-45].

Vysokoafinní cholinový přenašeč CHT1 by naklonován Okudou a spolupracovníky (2000). Má stejné farmakologické vlastnosti jako vysokoafinní transport blokovatelný hemicholinem-3 a je exprimován v mozkových oblastech bohatých na cholinergní neurony jako je koncový mozek, striatum, mozkový kmen a páteřní mícha [16, 17, 46-48]. V poslední době byl také nalezen v některých neneuronálních buňkách, avšak jeho funkce mimo neurony není objasněna [49-51].

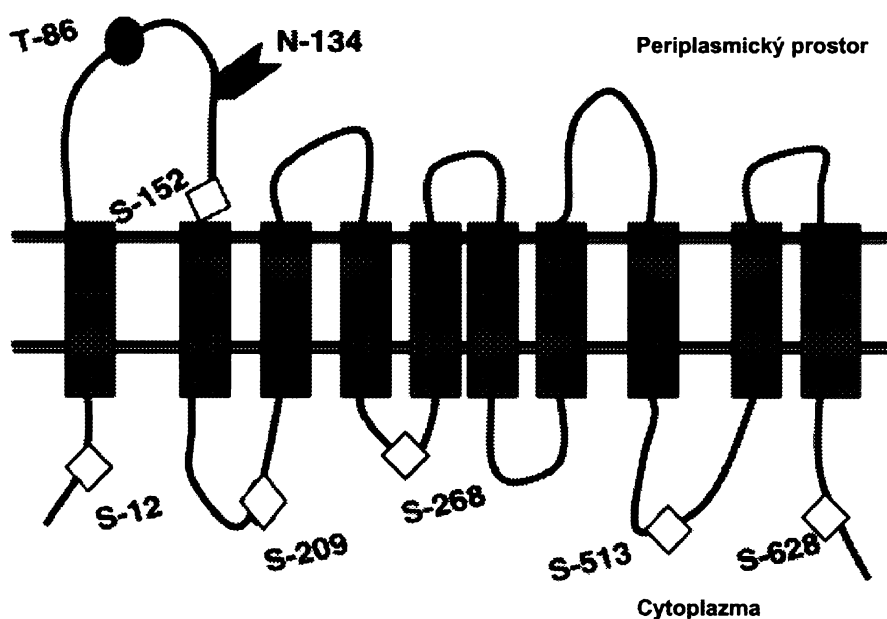
CHT1 obsahuje serin/threoninová fosforylační místa pro regulaci funkce a povrchové exprese pomocí proteinkinázy C a proteinfosfatázy 1 a 2A [48]. Tento způsob regulace je běžný pro transportéry neurotransmitterů [52]. Bylo ukázáno, že protein par-4 (prostate apoptosis response – 4) hraje důležitou roli v neuronální dysfunkci a buněčné smrti u neurodegenerativních onemocnění a je přímým interakčním partnerem CHT1. Interakce par-4 a CHT1 má inhibiční vliv na transport cholinu a snižuje povrchovou expresi CHT1 [53]. Funkce CHT1 je pro organismus nezbytná. Bylo ukázáno, že jeho knockout má letální následky [44]. Bylo zjištěno, že špatná funkce CHT1 vede k poruchám vnímání [54].

4. Protein podobný transportéru cholinu

Do rodiny cholinových transportérů v poslední době přibyl nový člen – CTL (Choline Transporter Like) protein. Gen pro CTL protein byl poprvé klonován z cDNA připravené z elektrického orgánu paúhoře elektrického jako supresor kvasinkového mutanta s defektem v transportu cholinu [55, 56]. Krysí CTL1 byl klonován jako homolog CTL proteinu z paúhoře [56]. Lidský homolog byl naklonován nezávisle po zjištění, že monoklonální protilátka proti lidskému antigenu dendritických buněk CDw92 rozpoznává CTL1 [57]. Byly nalezeny myší proteiny CTL2-4 při hledání v genbankových knihovnách cDNA. Vzhledem k nízké expresi (v cDNA knihovnách ve kterých byl hledán, měl velmi nízkou frekvenci a nebyl ihned nalezen) byl až později nalezen myší homolog CTL1.

4.1. Struktura

Proteiny CTL rodiny jsou transmembránové proteiny obsahující 10 konzervovaných transmembránových domén s intracelulární lokalizací N a C konce proteinu (obr. 5).

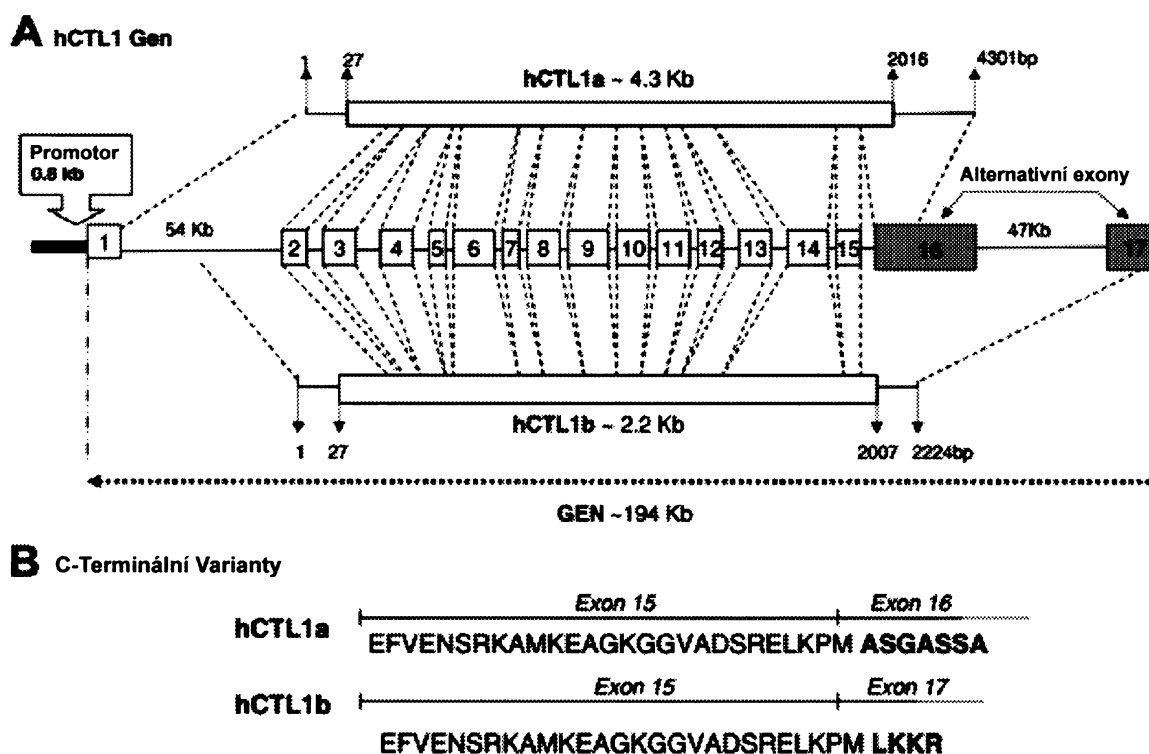


Obr. 5 Struktura CTL1 – CTL1 obsahuje 10 TMD s velkou variabilní smyčkou mezi TMD1 a TMD2, která obsahuje možné glykosylační místo (N-134). Cytoplazmatické smyčky obsahují celou řadu fosforylačních míst pro PKC. Převzato z Michel et al. 2006 [13].

Protein také obsahuje jeden na cystein bohatý úsek a jednu konzervovanou doménu (cadmium resistantní transporterová doména) pokrývající TMD 3-5.

4.2. Genomické uspořádání

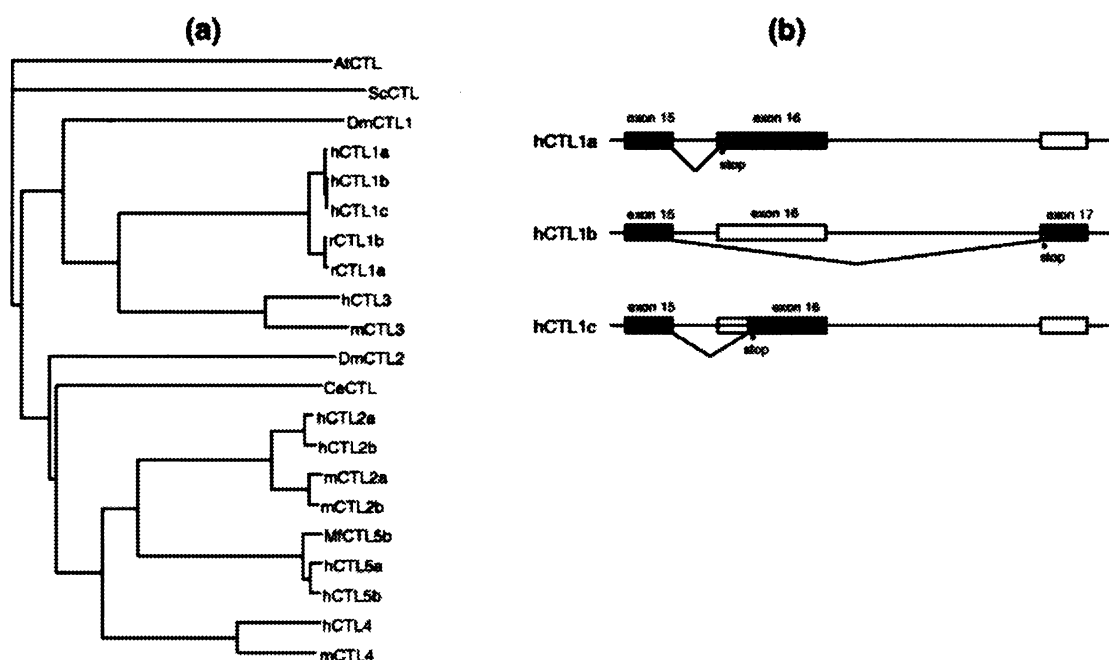
Gen pro CTL1 patří mezi větší geny. Pokrývá 194 kilobází na lidském chromozómu 9 – oblast 9q31.2. Skládá se ze 17 exonů a 16 intronů. Dva z exonů vykazují alternativní sestřih. Velikost exonů se pohybuje od 75 bp (exon 1) po 2221 bp (exon 17). Velikost intronů se také velmi významně liší, nejkratší je intron 10 (919 bp) a nejdelší intron 1 (54 kb). První a poslední intron v genu jsou nejdelšími součástmi tohoto genu a zabírají více než polovinu celé jeho délky [58] obr.6.



Obr.6 Genomová struktura lidského genu CTL1. A - exon intronová struktura genu a alternativní sestřih hCTL1a a hCTL1b. B - výsledek alternativního sestřihu – odlišná proteinová C terminální sekvence. Převzato z Michel et al. 2006 [13]

Promotor genu CTL1 vykazuje vlastnosti typické pro promotor tzv. „housekeeping genů“, jejichž exprese je nutná pro udržení chodu buňky. Neobsahuje TATA box (místo obvykle tvořící u genů jádro promotoru), avšak obsahuje úsek bohatý na guanosin, který může zastávat obdobnou funkci a nalézáme jej i u jiných „housekeeping genů“. Dále obsahuje vazebná místa pro obecné transkripční faktory jako je například Sp1 a GATA1/2 [58].

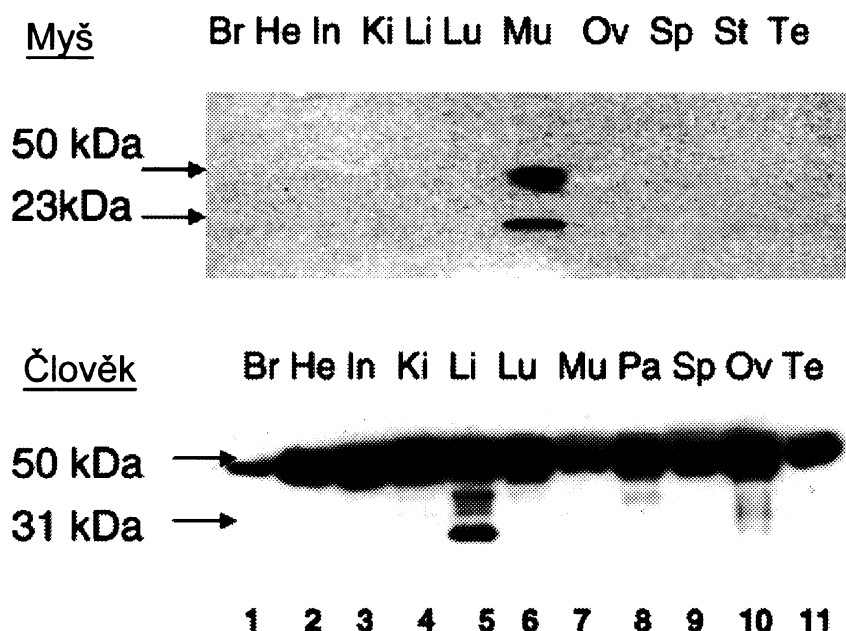
U genu CTL1 nalézáme významné odlišnosti v tkáňové expresi mezi druhy živočichů. U myši byla nalezena exprese CTL1 mRNA téměř ve všech tkáních, zatímco u krysy byla nalezena jen v mozku, prodloužené míše a tračníku. mRNA pro CTL1 vykazuje alternativní sestřih, který vede ke vzniku isoform CTL1a a CTL1b. Tyto isoformy mají odlišnou tkáňovou expresi. Strukturně se tyto isoformy liší posledním exonem. U CTL1a je použit exon 16 zatímco u CTL1b exon 17. Tato změna způsobuje odlišnost C terminálního peptidu A⁶⁵¹SGASSA⁶⁵⁷ u CTL1a a L⁶⁵¹KKR⁶⁵⁴ u CTL1b. KKXX motiv přítomný v CTL1b formě je známá signální sekvence, která směřuje daný protein do endoplazmatického retikula [58, 59]. U člověka byla ve studii Wille et al. 2001 [57] nalezena ještě třetí forma sestřihu CTL1c, u které bylo popsáno interní sestřihové místo v exonu 16. Homology CTL1 a genomická struktura isoform viz obr. 7.



Obr. 7. Fylogenetická analýza a genomické uspořádání CTL genů. A – fylogenetický strom homologů CTL. B – Alternativní sestřih lidského CTL1. Převzato z Traiffort et al. 2005 [59].

Další proteiny z rodiny CTL (CTL2 a CTL5) vykazují také alternativní sestřih a podobnou délku intronů. Odlišují se však tím, že u nich dochází k alternativnímu sestřihu i na N konci proteinu. U proteinů CTL3 a CTL4 nebyl alternativní sestřih nalezen [59].

CTL1 protein byl nalezen jako dva peptidy o molekulové hmotnosti 23 a 50 kDa u myši a 31 a 50 kDa u člověka. Exprese proteinu byla u myši nalezena pouze v kosterním svalu, zatímco u člověka byla větší forma nalezena ve všech studovaných tkáních, kdežto malá forma i velká forma pouze v játrech obr. 8.



Obr. 8 Expresa CTL1 proteinu detekovaného protilátkou na western blotu. Nahoře panel myších tkání, dole panel lidských vzorků. Šípkami naznačeny formy proteinu a molekulové hmotnosti. Br – mozek, He – srdce, In – tenké střevo, Ki – ledviny, Li – játra, Lu – plíce, Mu – kosterní sval, Ov – vaječník, Pa – pankreas, St – žaludek, Sp – slezina, Te – varle. Upraveno z Michel et al. 2006 [13].

Expresa ostatních členů rodiny CTL nebyla zatím tak detailně studována. Byla nalezena slabá exprese CTL2 v jazyce, kosterním svalu, ledvinách, srdci a plicích. U ostatních členů byla exprese jen stěží detekovatelná [59].

4.3. Předpokládaná funkce

CTL1 byl naklonován jako předpokládaný specifický cholinergní vysokoafinní přenašeč cholinu ve stejné době, jako skutečný CHT1 [46, 56]. Podobně jako CHT1 má K_T odpovídající vysoké afinitě a je blokovatelný HC-3. Na rozdíl od CHT1 však jeho funkce nezávisí na gradientu Na^+ iontů a jeho tkáňová distribuce neodpovídá rozložení cholinergních zakončení. V poslední době byla funkce CTL1 jako vysokoafinního cholinového přenašeče, vzhledem k jeho neschopnosti komplementovat defektní kvasinky s porušenou de novo syntézou a transportem cholinu, zpochybněna [55, 56]. Na druhou stranu bylo ukázáno, že zvýšená exprese CTL1 v COS-7 buňkách 2,5 x zvyšuje transport cholinu [60] a také, že CTL1 je hlavním cholinovým přenašečem v THP-1 buňkách (prekurzory makrofágů). Po diferenciaci této linie v makrofágy pomocí forbolového esteru se tento transport významně snižuje a toto snížení přímo koreluje se sníženou expresí CTL1 proteinu v buněčné membráně [61]. Dále bylo v THP1 buňkách zjištěno, že transport cholinu je plně inhibovatelný hemicholinem-3, ale není nijak ovlivněn inhibitory OCT přenašečů, což ukazuje na úlohu CTL1 v transportu cholinu. Kromě hemicholinia-3 byl nalezen také další inhibitor CTL1, látka s názvem Gefitinib. Tato látka se používá jako ústně podávaný lék na rakovinu plic a jeho primární funkcí je inhibice EGFR-TK (tyrosinová kináza receptoru pro epidermální růstový faktor) [62].

CTL1 protein byl nalezen ve všech doposud zkoumaných buněčných liniích. U buněk neuronové linie NG108-15 byl zjištěn jak na úrovni genové, tak i proteinové exprese (61) jako jediný vysokoafinní přenašeč cholinu. Jeho aktivita se zvyšovala při inhibici proteinové kinázy C staurosporinem. Další pokusy ukázaly, že exprese mRNA pro CHT1 jsou zvýšeny leukemickým inhibičním faktorem (LIF), což dále podporuje hypotézu o vlivu PKC na expresi CTL1 [63].

Protein CTL1 byl také ve zvýšené míře nalezen ve svalích pacientů se svalovou dystrofií. Promotor genu pro CTL1 obsahuje vazebné místo pro MyoD, což je transkripční faktor, který moduluje svalovou myogenezi udržováním rychlých vláken a má i další regulační funkce [64]. Sval vykazuje velmi vysokou regenerační schopnost a v poškozeném a nemocném svalu byly nalezeny makrofágy [13]. To ukazuje na možnou roli CTL1 ve svalových onemocněních a nabízí jej jako jeden z možných terapeutických cílů těchto onemocnění. Ve studii Wang a kol. [65] bylo ukázáno, že na regulaci transportu cholinu se podílí také dráha PI3 kináza/AKT/mTOR, a byla diskutována možnost využití snížení přísunu cholinu jako terapeutický nástroj u denokarcinomů plic.

5. Závěr

Protein CTL1 je nový vysokoafinní přenašeč cholinu nebo součást komplexu proteinů, které zajišťují vysokoafinní transport cholinu. Na rozdíl od cholinergního CHT1 nebyl před naklonováním charakterizován farmakologicky. Jedná se o vysokoafinní transportní systém, který je podobně jako CHT1 inhibovatelný hemicholiniem-3, ale je nezávislý na gradientu sodných iontů. Na rozdíl od specifického cholinergního CHT1, který zabezpečuje transport cholinu pro syntézu acetylcholinu, se nachází nejen v neuronech, ale jeho přítomnost byla prokázána téměř ve všech tkáních. Jeho fyziologická role zatím není zcela objasněna. Změny funkce a abnormální exprese byly popsány při některých patologických procesech jako je kancerogeneze a svalová dystrofie. Při studiu molekuly CDw92, což je lidský homolog CTL1, se ukázalo, že se účastní imunomodulačních dějů. Z hlediska neurodegenerativních onemocnění je zajímavým nálezem vysoká exprese této bílkoviny v myelinových strukturách mozku. Koncentrace volného extracelulárního cholinu v mozku je podstatně nižší než v krevní plasmě [66, 67], což ukazuje na význam existence vysokoafinního přenašeče cholinu pro syntézu fosfolipidů nezbytných pro obnovu membrán ve všech buňkách mozku. Zvýšený rozpad membránových fosfolipidů byl nalezen například u Alzheimerovy nemoci [68]. CTL1 tak představuje perspektivní cíl pro terapii Alzheimerovy choroby a dalších neurodegenerativních onemocnění. Další studium je nezbytné pro získání detailnějších informací o jeho fyziologické úloze a mechanismech, které se uplatňují při patologických procesech.

6. Experimentální část: Optimalizace izolace RNA z myšního mozku

Pro spolehlivé stanovení exprese cílového genu je nezbytnou součástí experimentů izolace kvalitní, nedegradované RNA v dostatečném množství z biologického materiálu. V rámci práce byly testovány různé metody izolace RNA. Izolovaná RNA byla následně testována pomocí RT-PCR pro budoucí měření exprese CTL1 genu a referenčního genu GAPDH (Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza) v rámci navazující diplomové práce.

6.1. Použité chemikálie, kity a přístroje

Trizol isolation reagent	Invitrogen (USA)
Isopropanol	Fluka (USA)
Chloroform	Lachner (CR)
Etanol	Lachner (CR)
Dietylpyrokarbonát (DEPC)	Sigma (USA)
Tripure isolation reagent	Roche (USA)
RNAWiz RNA isolation reagent	Ambion (USA)
HighPURE RNA Tissue Kit	Roche (USA)
MMLV reverse transcriptase kit	Promega (USA)
OligodT primer	Sigma (USA)
dNTP mix	TopBio (CR)
PCR HotStarTaq DNA Polymerase	QIAGEN (USA)
Tris	Serva (SRN)
Ethidium Bromid	TopBio (CR)
Kyselina Boritá	Sigma (USA)
EDTA	Sigma (USA)
Marker molekulových hmotností PCR-100 low	Sigma (USA)
Agaróza	TopBio (CR)

Přístroje:

DNA Engine Tetrade	MJ Research (USA)
Elektroforetická aparatura	OmniBio (CR)
Elektroforetický zdroj – PowerPac 3000	BioRad (USA)
NanoDrop UV Spektrofotometr	NanoDrop Technologies (USA)
Dokumentační systém - BioDocAnalyze	Biometra (USA)
Centrifuga Sigma 3k18	Sigma (SRN)

6.2. Metody izolace RNA

Vlastní izolace RNA představuje experimentálně náročný proces spojený s problematikou stability izolovaného materiálu. RNA, na rozdíl od DNA, představuje labilní látku, která je snadno degradovatelná působením jednak chemických a fyzikálních faktorů a jednak enzymaticky RNázami. RNA je snadno degradovatelná působením teplot nad 65°C, dále na ni negativně působí alkalické prostředí a opakované cykly rozmrazování a zamrazování. Kromě těchto faktorů je kritické působení enzymů RNáz. Tyto enzymy představují jedny z nejstabilnějších enzymů a vzhledem k tomu, že jsou přítomny ve všech živých organismech, je nutné předpokládat, že jsou jimi potenciálně kontaminované všechny povrchy.

Pro samotnou izolaci RNA existuje celá řada postupů. Mezi nejběžnější patří Chomczynského metoda [69] a její modifikace, které jsou dnes dostupné ve formě komerčních reagensů pro izolaci RNA. Tento postup je založen na mechanickém rozrušení materiálu, ze kterého izolujeme RNA a současném působení komponent RNA izolačního reagens, které inhibují endogenní buněčné RNázy a degradují proteiny (GITC, LiCl, SDS, fenol). Následuje přidání chloroformu a fázová separace. RNA se ve vzniklém třífázovém systému nachází ve vrchní vodné fázi. Pod vodnou fází nalézáme interfázní pruh precipitovaných proteinů a pod nimi následuje fenolická fáze. Po odebrání vodné fáze precipitujeme RNA rozpuštěnou v roztoku přidávkem nadbytku isopropanolu. Peleta obsahuje kromě izolované RNA také sole, které byly isopropanolem precipitovány a pro jejich odstranění používáme roztok 70% etanolu, kterým peletu promyjeme a sole tak odstraníme. Následně RNA sušíme na vzduchu pro odstranění etanolu, který by mohl nevhodně interferovat s následujícími experimenty a rozpuštíme v DEPC ošetřené destilované vodě.

Druhou velmi rozšířenou variantou pro izolaci buněčných RNA je použití kolonek se silikagelovou membránou nebo jinou maticí, která je chemicky upravena tak, aby specificky vážala RNA. Umožňuje její promytí od ostatních kontaminujících látek a snadnou následnou eluci změnou pH a složení elučního roztoku. Tyto metody poskytují sice nižší výtěžek, nicméně RNA izolovaná touto metodou je obvykle čistější. Jsou také často používány při malém množství vstupního materiálu vzhledem k postupu, který je pro tento druh izolace vhodnější.

6.2.1. Varianta Chomczynskeho metody- RNAwiz

Pro první izolace z tkání myši bylo použito reagens RNAwiz (Ambion – ABI,USA). Pro izolaci RNA tímto protokolem byl proveden následující postup. Kousky tkáně odebrané ihned po zabítí zvířete uložené v -70 °C byly bez rozmrazování ponořeny do roztoku RNAwiz (1ml roztoku na 100 mg tkáně) a homogenizovány Dounceovým homogenizátorem (homogenizátor sklo-sklo). Následně byl roztok inkubován 5 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci bylo přidáno 0,2 ml chloroformu na 1 ml objemu RNAwizu. Vzorek byl protřepán 20 vteřin (vortex) a inkubován 10 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci byl roztok centrifugován 20 minut 12000 g při 4 °C. Po fázové separaci byla odebrána vodná fáze. Ta byla naředěna 0,5 ml destilované vody (DEPC ošetřené) k níž byl přidán 1 ml isopropanolu. Roztok byl důkladně promíchán a inkubován 10 minut při pokojové teplotě a následně centrifugován 15 min 12 000 g při 4 °C. Supernatant byl opatrně odstraněn a peletka promyta vortexováním v 1 ml 75% etanolu (předchlazený). Následně byl roztok opět centrifugován 5 min 12 000 g při 4 °C. Etanol byl odstraněn odsátím a zbytky odstraněny sušením na vzduchu přibližně 10 minut. Poté byla peleta rozpuštěna v DEPC destilované vodě.

6.2.2. Varianta Chomczynskeho metody- Trizol a Tripure

Pro srovnání byla provedena izolace pomocí reagens Trizol a Tripure. Kousky tkáně 50-150 mg byly přidány do 1ml činidla a homogenizovány sklo-teflonovým homogenizátorem. Následně byl roztok inkubován 5 minut při pokojové teplotě. Poté bylo přidáno 0,2 ml chloroformu a vzorek byl důkladně promíchán vortexováním (15 vteřin). Následovala dvouminutová inkubace při pokojové teplotě a centrifugace 15 min 12 000 g při 4 °C. Po této fázové separaci byla odebrána vrchní vodná fáze obsahující RNA. K této fázi bylo přidáno 0,5 ml isopropanolu a vzorek byl inkubován 10 minut při pokojové teplotě. Následovala centrifugace 10 min 12 000 g při 4 °C. Isopropanol byl odstraněn a peleta byla promyta 1 ml 75% etanolu.

Po promytí byl vzorek opět centrifugován 5 min 7500 g při 4 °C. Etanol byl slit a zbytek odpařen sušením při pokojové teplotě (5 minut). Peleta byla rozpuštěna v DEPC destilované vodě.

6.2.3. Izolace HighPure kolonkou

20-25 mg zmrzlé tkáně bylo umístěno do zkumavky a následně bylo přidáno 400 µl lyzačního pufru. Následovala homogenizace vzorku pomocí Dounceova homogenizátoru. Lyzát byl centrifugován po dobu 2 min při maximální rychlosti ve stolní centrifuze (cca 13 000 g). K supernatantu bylo přidáno 200 µl etanolu a vzorek byl promíchán. Po sestavení kolonky byl do horního rezervoáru napipetován celý objem supernatantu a kolonka byla znovu centrifugována. Ve sterilní 1,5 ml zkumavce bylo smícháno 90 µl inkubačního pufru a 10 µl DNázy 1. Do znovu sestavené kolonky byl do horního rezervoáru napipetován připravený roztok DNázy. Kolonka byla inkubována 15 min při pokojové teplotě. Poté bylo přidáno 500 µl promývacího pufru 1 a následovala centrifugace 15 s při 8 000 g. Kolonka byla znovu promyta 500 µl promývacího pufru 2. Naposledy byla promyta 300 µl promývacího pufru 2 a 2 min centrifugována na maximální rychlost pro odstranění zbytků promývacího pufru. Na závěr byla kolonka opatrně vyjmuta ze spodní části a vložena do nové zkumavky o objemu 1,5 ml. Navázaná RNA byla eluována 100 µl elučního pufru. Eluce byla provedena centrifugací 1 min 8 000 g.

6.3. Ověření kvality izolované RNA

Pro další použití RNA potřebujeme znát její koncentraci a čistotu. Pro stanovení koncentrace RNA používáme spektrofotometrickou metodu, založenou na absorpci aromatických struktur bází v UV oblasti. Pokud jsou v roztoku přítomny pouze nukleové kyseliny, pak míra absorpce odpovídá koncentraci nukleové kyseliny. Vzhledem k tomu, že RNA izolujeme z tkáně, jsou v preparaci RNA často přítomna malá množství bílkovin, jejichž aromatické aminokyseliny také absorbují v UV oblasti. Intenzita absorpce UV záření se liší při různých vlnových délkách, lze tedy čistotu vzorku posoudit na základě poměru absorbancí při 260 nm a 280 nm. Koncentraci RNA zjistíme použitím vzorce:

$$C_{RNA} = 40 \cdot A_{260} \cdot \text{redeni}$$

Poměr absorbancí RNA by měl být větší než 1,6, aby byla RNA použitelná pro další aplikace. Nižší poměr ukazuje na vysokou míru kontaminace proteiny (např. chyba při rozebírání fází).

Pro stanovení koncentrace byl použit spektrofotometr Nanodrop, který umožňuje přímé měření koncentrace v 2 μ l kapce roztoku pomocí optického vlákna.

6.4. RT-PCR

6.4.1. Reverzní transkripce

Reverzní transkripce je nutným mezikrokem při detekci genové exprese pomocí PCR. Virový enzym reverzní transkriptáza, který je v této reakci využíván, je DNA polymeráza závislá na RNA. Tento enzym umožňuje syntézu DNA řetězců komplementárních k izolované RNA. Pro zahájení syntézy, jako všechny DNA polymerázy, vyžaduje volný 3' konec, na který přidává další nukleotidy. V našem případě byla použita reverzní transkriptáza M-MLV společně s oligo dT primerem. Toto nastavení reakce vede k překladu všech buněčných mRNA do cDNA. To je zajištěno přítomností polyA sekvencí na jejich koncích. Reakce byla provedena následujícím způsobem : k 1 μ g RNA byly přidány 2 μ l (1 μ g) oligo dT a přidána DEPC destilovaná voda na objem 15,7 μ l. Směs byla inkubována 5 minut při 70 °C. Dále bylo do směsi přidáno při 4 °C 1,25 μ l dNTP mixu (10mM), 5 μ l 5x koncentrovaného reakčního pufru a 1 μ l M-MLV enzymu (200 jednotek). Poté byla směs inkubována 60 minut při 42 °C a 10 minut při 72 °C. Všechny inkubace byly prováděny v PCR stripech v termocykleru. Připravené cDNA byly skladovány při -20 °C.

6.4.2. PCR

PCR – polymerázová řetězová reakce, je metoda, při které se pomocí termostabilní DNA polymerázy (Taq) provádí exponenciální amplifikace úseku DNA, který leží mezi dvěma primery navrženými na cílovou DNA. Primery jsou navrženy tak, aby jejich teplota tání byla co nejbližší a aby obsahovaly co nejméně repetitivních sekvencí. Amplifikace probíhá v tříkrokových cyklech. Začíná počáteční denaturací při 95°C, kdy se oddělují dvouvláknové DNA molekuly od sebe a aktivuje se PCR polymeráza. Následuje vlastní amplifikační cyklus zahájený opět krátkou denaturací, následovanou snížením teploty na 58°C. Při této teplotě nasedají primery na cDNA. Poté je teplota zvýšena na 72°C a zahajuje se polymerace. Tento cyklus byl 30x opakován. Na konci bylo ještě ponecháno 10 minut při 72°C pro doplnění eventuelních nedosyntetizovaných řetězců. Složení reakce bylo : 5 μ l 10x PCR pufru, 2 μ l $MgCl_2$, 1 μ l dNTP, 0,25 μ l Taq polymerázy, 0,125 μ l (100 μ M) primerů, 39 μ l destilovaná voda a 2,5 μ l směsi

z reverzní transkripce. Použité primery GAPDH-A (GAACATCATCCCTGCATCC), GAPDH-B(GCTTCACCACCTTCTTGATG),CTL1-A (GAATGCATACACAGCCACAG) a CTL1-B (GTTGAGCAGGATAATCCCAG) syntetizované u firmy Metabion.

6.5. Výsledky a diskuze

Pro izolaci RNA byly odebrány vzorky mozkové tkáně z právě usmrcené myši, přeneseny do mikrozkmavek a zamrazeny v kapalném dusíku, aby byla zastavena degradace RNA v tkáni. Následně byla z těchto vzorků izolována RNA pomocí výše uvedených metod. Izolovaná RNA byla dále analyzována pomocí UV spektrofotometrie pro zjištění koncentrace a čistoty izolované RNA. Množství RNA izolované pomocí jednotlivých metod viz tabulka 1.

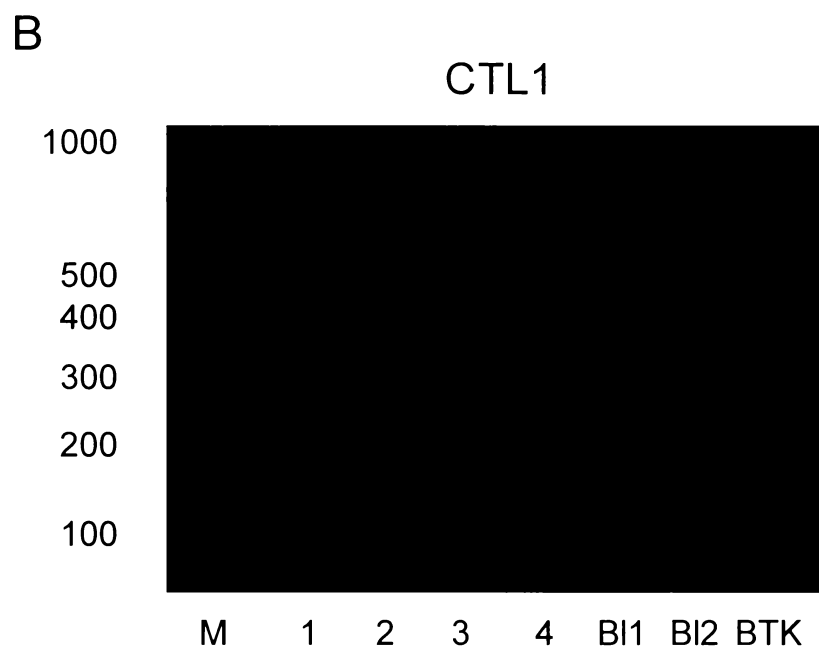
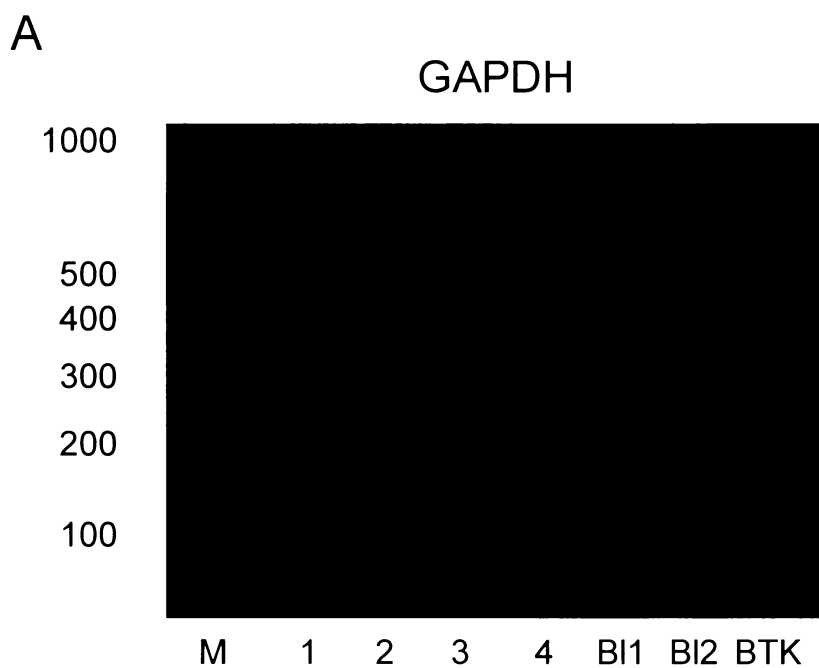
Metoda izolace	Množství tkáně mg	Koncentrace µg/µl	Poměr A260/280	Objem µl	Celkové množství RNA µg	Výtěžek µg RNA/mg tkáně
RNAWIZ	77	1,761	1,93	25	44,03	0,57
TRIZOL	80	2,660	1,94	25	66,50	0,83
TRIPURE	70	2,148	1,96	25	53,70	0,77
HighPURE	19	0,080	2,06	100	8,02	0,42

Tab. 1 Výtěžky izolace RNA z myšního mozku pomocí testovaných metod.

Všechny čtyři používané metody poskytovaly kvalitní čistou RNA, jejíž čistota se pohybovala mezi 1,93 a 2,06. Výtěžek izolované RNA z miligramu použité mozkové tkáně byl nejnižší u „kolonkové“ izolace, kdy bylo získáno jen méně než 0,5 ug RNA z mg tkáně, zatímco nejvyšší výtěžek poskytovalo reagens TRIZOL – 0,83 ug z jednoho mg tkáně.

Po izolaci RNA byl proveden přepis izolované RNA do cDNA pomocí reverzní transkriptázy MMLV a oligo-d(T) primeru pro zahájení syntézy cDNA řetězce. Připravená cDNA byla použita v PCR pro detekci exprese genu CTL1 a referenčního genu GAPDH.

Primery pro tuto amplifikační reakci byly navrženy tak, aby vznikal produkt o délce přibližně 200 bp. Tento návrh souvisí s dalším plánovaným použitím pro kvantifikaci CTL1 transkriptu. Po amplifikaci byly PCR produkty rozděleny pomocí agarózové elektroforézy v tris-borátovém pufru a proužky DNA byly detekovány pomocí barvení Ethidium Bromidem (interkalační činidlo, které po vazbě na DNA fluoreskuje po UV excitaci). Výsledek viz obr 9.



Obr. 9 PCR amplifikace GAPDH (A) a CTL1(B) cDNA. 1 – RNAWiz, 2 – TRIZOL, 3 – TRIPURE, 4 – HighPURE, BL1 – slepý vzorek (HighPURE) BL2 – slepý vzorek (ostatní), BTK – kontrola specifity PCR (reakce bez templátu), nanášeno vždy 5ul PCR reakce.

Amplifikace obou genů proběhla na všech použitých vzorcích RNA. Amplifikace GAPDH úseku nebyla ovlivněna použitou izolační metodou. Jedná se o očekávatelný výsledek vzhledem k tomu, že se jedná o gen, jehož exprese je velmi silná a neměnná. Amplifikace CTL1 proběhla na všech izolovaných RNA, ale s odlišnou účinností. Nejsilnější amplifikační produkt vykazovaly metody TRIZOL a TRIPURE. RNAWiz a HighPURE, přestože poskytovaly podobné koncentrace a množství RNA, vykazují slabší amplifikaci. To je pravděpodobně dáno kvalitou připravené RNA (intaktnost, délka RNA atd.). Druhou možností ovlivnění PCR jsou stopová množství zbytku izolačních reagens. Ta mohou snižovat účinnost reakce.

6.6. Závěr

Byly otestovány čtyři metody izolace RNA pro detekci CTL1 genu pomocí PCR. Výsledkem bylo zjištění, že nejúčinnější metodou byla izolace pomocí TRIZOLu. Poskytovala nejvyšší výtěžky izolované RNA z tkáně a nejlepší amplifikaci z ní připravené cDNA.

7. Seznam Literaturny

1. Strecker, A., *Über einige neue Bestandtheile der Schweingalle*. Ann. Chem. Pharmacie, 1862. **183**: p. 964-965.
2. Albright, C.D., et al., *Choline deficiency induces apoptosis in SV40-immortalized CWSV-1 rat hepatocytes in culture*. FASEB J, 1996. **10**(4): p. 510-6.
3. Zeisel, S.H., et al., *Choline deficiency selects for resistance to p53-independent apoptosis and causes tumorigenic transformation of rat hepatocytes*. Carcinogenesis, 1997. **18**(4): p. 731-8.
4. Ghoshal, A.K., *New insight into the biochemical pathology of liver in choline deficiency*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1995. **30**(4): p. 263-73.
5. Blusztajn, J.K., *Choline, a vital amine*. Science, 1998. **281**(5378): p. 794-5.
6. Meck, W.H., R.A. Smith, and C.L. Williams, *Organizational changes in cholinergic activity and enhanced visuospatial memory as a function of choline administered prenatally or postnatally or both*. Behav Neurosci, 1989. **103**(6): p. 1234-41.
7. Meck, W.H. and C.L. Williams, *Simultaneous temporal processing is sensitive to prenatal choline availability in mature and aged rats*. Neuroreport, 1997. **8**(14): p. 3045-51.
8. Meck, W.H. and C.L. Williams, *Characterization of the facilitative effects of perinatal choline supplementation on timing and temporal memory*. Neuroreport, 1997. **8**(13): p. 2831-5.
9. Zeisel, S.H., *Choline: essential for brain development and function*. Adv Pediatr, 1997. **44**: p. 263-95.
10. Fisher, M.C., et al., *Inhibitors of choline uptake and metabolism cause developmental abnormalities in neurotating mouse embryos*. Teratology, 2001. **64**(2): p. 114-22.
11. Blusztajn, J.K. and R.J. Wurtman, *Choline and cholinergic neurons*. Science, 1983. **221**(4611): p. 614-20.
12. Wessler, I., et al., *The biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans*. Jpn J Pharmacol, 2001. **85**(1): p. 2-10.
13. Michel, V., et al., *Choline transport for phospholipid synthesis*. Exp Biol Med (Maywood), 2006. **231**(5): p. 490-504.

14. Li, Z., L.B. Agellon, and D.E. Vance, *Phosphatidylcholine homeostasis and liver failure*. J Biol Chem, 2005. **280**(45): p. 37798-802.
15. Lockman, P.R. and D.D. Allen, *The transport of choline*. Drug Dev Ind Pharm, 2002. **28**(7): p. 749-71.
16. Apparsundaram, S., S.M. Ferguson, and R.D. Blakely, *Molecular cloning and characterization of a murine hemicholinium-3-sensitive choline transporter*. Biochem Soc Trans, 2001. **29**(Pt 6): p. 711-6.
17. Apparsundaram, S., et al., *Molecular cloning of a human, hemicholinium-3-sensitive choline transporter*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **276**(3): p. 862-7.
18. Cooper, J.R., F.E. Bloom, and R.H. Roth, *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. 1996, New York: Oxford University Press.
19. Hemsworth, B.A. and H.B. Bosmann, *The incorporation of triethylcholine into isolated guinea pig cerebral cortex synaptosoma and synaptic vesicle fractions*. Eur J Pharmacol, 1971. **16**(2): p. 164-70.
20. Hegazy, E. and M. Schwenk, *Choline uptake by isolated enterocytes of guinea pig*. J Nutr, 1984. **114**(12): p. 2217-20.
21. Koepsell, H. and H. Endou, *The SLC22 drug transporter family*. Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 666-76.
22. Jonker, J.W., et al., *Reduced hepatic uptake and intestinal excretion of organic cations in mice with a targeted disruption of the organic cation transporter 1 (Oct1 [Slc22a1]) gene*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(16): p. 5471-7.
23. Okuda, M., et al., *cDNA cloning and functional expression of a novel rat kidney organic cation transporter, OCT2*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **224**(2): p. 500-7.
24. Tamai, I., et al., *Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1*. FEBS Lett, 1997. **419**(1): p. 107-11.
25. Wu, X., et al., *cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **246**(3): p. 589-95.
26. Grundemann, D., et al., *Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter*. Nature, 1994. **372**(6506): p. 549-52.

27. Koepsell, H., V. Gorboulev, and P. Arndt, *Molecular pharmacology of organic cation transporters in kidney*. J Membr Biol, 1999. **167**(2): p. 103-17.
28. Inazu, M., H. Takeda, and T. Matsumiya, *Expression and functional characterization of the extraneuronal monoamine transporter in normal human astrocytes*. J Neurochem, 2003. **84**(1): p. 43-52.
29. Takeda, H., M. Inazu, and T. Matsumiya, *Astroglial dopamine transport is mediated by norepinephrine transporter*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2002. **366**(6): p. 620-3.
30. Wu, X., et al., *Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monoamine transporter (uptake2) and evidence for the expression of the transporter in the brain*. J Biol Chem, 1998. **273**(49): p. 32776-86.
31. Inazu, M., H. Takeda, and T. Matsumiya, *Molecular and functional characterization of an Na⁺-independent choline transporter in rat astrocytes*. J Neurochem, 2005. **94**(5): p. 1427-37.
32. Grundemann, D., et al., *Selective substrates for non-neuronal monoamine transporters*. Mol Pharmacol, 1999. **56**(1): p. 1-10.
33. Sweet, D.H., D.S. Miller, and J.B. Pritchard, *Ventricular choline transport: a role for organic cation transporter 2 expressed in choroid plexus*. J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 41611-9.
34. Wu, X., et al., *Structural and functional characteristics and tissue distribution pattern of rat OCTN1, an organic cation transporter, cloned from placenta*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1466**(1-2): p. 315-27.
35. Wu, X., et al., *Functional characteristics and tissue distribution pattern of organic cation transporter 2 (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **290**(3): p. 1482-92.
36. Haga, T. and H. Noda, *Choline uptake systems of rat brain synaptosomes*. Biochim Biophys Acta, 1973. **291**(2): p. 564-75.
37. Yamamura, H.I. and S.H. Snyder, *Choline: high-affinity uptake by rat brain synaptosomes*. Science, 1972. **178**(61): p. 626-8.

38. Nakata, K., T. Okuda, and H. Misawa, *Ultrastructural localization of high-affinity choline transporter in the rat neuromuscular junction: enrichment on synaptic vesicles*. Synapse, 2004. **53**(1): p. 53-6.
39. Happe, H.K. and L.C. Murrin, *High-affinity choline transport sites: use of [3H]hemicholinium-3 as a quantitative marker*. J Neurochem, 1993. **60**(4): p. 1191-201.
40. Manaker, S., C.M. Wieczorek, and T.C. Rainbow, *Identification of sodium-dependent, high-affinity choline uptake sites in rat brain with [3H]hemicholinium-3*. J Neurochem, 1986. **46**(2): p. 483-8.
41. Shimon, M., et al., *Vascular cholinesterases and choline uptake in isolated rat forebrain microvessels: a possible link*. J Neurochem, 1989. **53**(2): p. 561-5.
42. Happe, H.K. and L.C. Murrin, *Development of high-affinity choline transport sites in rat forebrain: a quantitative autoradiography study with [3H]hemicholinium-3*. J Comp Neurol, 1992. **321**(4): p. 591-611.
43. Collier, B., *About the coupling of acetylcholine hydrolysis and choline uptake at cholinergic nerve terminals*. J Neurochem, 1988. **50**(1): p. 323-4.
44. Ferguson, S.M., et al., *Lethal impairment of cholinergic neurotransmission in hemicholinium-3-sensitive choline transporter knockout mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(23): p. 8762-7.
45. Mullen, G.P., et al., *Choline transport and de novo choline synthesis support acetylcholine biosynthesis in Caenorhabditis elegans cholinergic neurons*. Genetics, 2007. **177**(1): p. 195-204.
46. Okuda, T. and T. Haga, *Functional characterization of the human high-affinity choline transporter*. FEBS Lett, 2000. **484**(2): p. 92-7.
47. Okuda, T., et al., *Identification and characterization of the high-affinity choline transporter*. Nat Neurosci, 2000. **3**(2): p. 120-5.
48. Wang, Y., et al., *Molecular cloning of a cDNA for a putative choline co-transporter from Limulus CNS*. Gene, 2001. **268**(1-2): p. 123-31.
49. Haberberger, R.V., et al., *Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the neuronal and non-neuronal cholinergic system of human and rat skin*. J Invest Dermatol, 2002. **119**(4): p. 943-8.

50. Pfeil, U., et al., *Expression of the high-affinity choline transporter CHT1 in epithelia*. Life Sci, 2003. **72**(18-19): p. 2087-90.
51. Pfeil, U., et al., *Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the rat trachea*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. **28**(4): p. 473-7.
52. Torres, G.E., R.R. Gainetdinov, and M.G. Caron, *Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function*. Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(1): p. 13-25.
53. Xie, J. and Q. Guo, *Par-4 inhibits choline uptake by interacting with CHT1 and reducing its incorporation on the plasma membrane*. J Biol Chem, 2004. **279**(27): p. 28266-75.
54. Sarter, M. and V. Parikh, *Choline transporters, cholinergic transmission and cognition*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(1): p. 48-56.
55. O'Regan, S. and F.M. Meunier, *Selection and characterization of the choline transport mutation suppressor from Torpedo electric lobe, CTL1*. Neurochem Res, 2003. **28**(3-4): p. 551-5.
56. O'Regan, S., et al., *An electric lobe suppressor for a yeast choline transport mutation belongs to a new family of transporter-like proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(4): p. 1835-40.
57. Wille, S., et al., *Characterization of CDw92 as a member of the choline transporter-like protein family regulated specifically on dendritic cells*. J Immunol, 2001. **167**(10): p. 5795-804.
58. Yuan, Z., et al., *Genomic organization, promoter activity, and expression of the human choline transporter-like protein 1*. Physiol Genomics, 2006. **26**(1): p. 76-90.
59. Traiffort, E., et al., *Molecular characterization of the family of choline transporter-like proteins and their splice variants*. J Neurochem, 2005. **92**(5): p. 1116-25.
60. Yuan, Z., et al., *Identification and expression of a mouse muscle-specific CTL1 gene*. Gene, 2004. **341**: p. 305-12.
61. Fullerton, M.D., et al., *Impaired trafficking of choline transporter-like protein-1 at plasma membrane and inhibition of choline transport in THP-1 monocyte-derived macrophages*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **290**(4): p. C1230-8.
62. Ishiguro, N., et al., *Decreased biosynthesis of lung surfactant constituent phosphatidylcholine due to inhibition of choline transporter by gefitinib in lung alveolar cells*. Pharm Res, 2008. **25**(2): p. 417-27.

63. Lecomte, M.J., et al., *Differential expression and regulation of the high-affinity choline transporter CHT1 and choline acetyltransferase in neurons of superior cervical ganglia*. Mol Cell Neurosci, 2005. **28**(2): p. 303-13.
64. Vissing, K., et al., *Gene expression of myogenic factors and phenotype-specific markers in electrically stimulated muscle of paraplegics*. J Appl Physiol, 2005. **99**(1): p. 164-72.
65. Wang, T., et al., *Choline transporters in human lung adenocarcinoma: expression and functional implications*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2007. **39**(9): p. 668-74.
66. Klein, J., A. Koppen, and K. Loffelholz, *Regulation of free choline in rat brain: dietary and pharmacological manipulations*. Neurochem Int, 1998. **32**(5-6): p. 479-85.
67. Klein, J., et al., *Uptake and metabolism of choline by rat brain after acute choline administration*. J Neurochem, 1992. **58**(3): p. 870-6.
68. Walter, A., et al., *Glycerophosphocholine is elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients*. Neurobiol Aging, 2004. **25**(10): p. 1299-303.
69. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.