



Araştırma Yazısı

İnsan Dopamin Taşıyıcısında FRET Çalışmalarında Kullanabilmek Amacıyla Floresan Proteinlerle İşaretlenebilen İşlevsel Bölgelerinin Belirlenmesi

Oya ORUN

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul

Özet

Dopamin taşıyıcıları presinaptik uçtan salınan dopaminin sinaptik boşluktan geri alınarak (uptake) dopaminerjik sinyalin sonlandırılmasında çok önemli rol oynarlar. Bu çalışmada 12 zarı kateden bölge içeren bir zar proteini olan insan dopamin taşıyıcısının çeşitli bölgelerine eCFP proteininin yerleştirilmesi ve etiketli proteinlerin işlevsel durumunun saptanması amaçlandı. eCFP proteini, insan DAT proteininin N-ucu bölgesine ve 515 ve 587.amino asitlerin bulunduğu bölgelere takıldı. Böylelikle, bir sonraki aşamada gerçekleştirilecek FRET analizlerinde kullanılabilir pozisyonlar belirlenmiş olacaktır. Gerilim testleri yalnızca N-ucu bölgesinin işlevsel olduğunu, p515 ve p587 bölgelerinin ise yabancı tip benzer ilginlikte olmalarına rağmen geri alım hızlarının çok düşük olduğunu gösterdi. Bu sonuç mikroskopla elde edilen yüzey ekspresyonu sonuçları ile de doğrulandı. eCFP proteinine eklenen esnek bağlaç dizileri de bu sonucu değiştirmedir.

Anahtar Kelimeler: Dopamin taşıyıcı, FRET, yapı-işlev, eCFP

Determination of Functional Regions of Human DAT For Labeling With Fluorescent Proteins For Further Use in FRET Studies

Abstract

The dopamine transporter tightly regulates dopamine neurotransmission by the rapid uptake of released dopamine back into the presynaptic nerve terminal. This study aimed to determine functional positions for eCFP insertion into the human dopamine transporter, a membrane protein with 12 transmembrane domains. eCFP has been inserted into the N-terminus of human DAT and at positions 515 and 587. This will reveal available regions for further FRET analyses. Uptake assays showed that only the N-terminus is functional, while the other two positions exhibit extremely low rate of transport, even though their affinities are close to the wild type. These results were supported by surface expression profile observed on the microscope. Linker sequences attached to the terminals of eCFP did not change this pattern.

Keywords: Dopamine transporter, FRET, structure-function, eCFP

GİRİŞ

Dopamin taşıyıcıları presinaptik terminalden salınan dopaminin sinaptik boşluktan geri alınarak (uptake) dopaminerjik sinyalin sonlandırılmasında çok önemli rol oynarlar ⁽¹⁾. Böylelikle dopaminerjik yanıtın kuvveti ve süresi belirlenmiş olur. Bu taşıyıcı protein norepinefrin, serotonin ve gama - amino butirik asit taşıyıcıları (sırasıyla NET,

SERT ve GAT) ile beraber Na⁺/Cl⁻ eşlenmiş çözücü taşıyıcıları (Na⁺/Cl⁻ coupled solute transporters) sınıfına girerler⁽⁸⁾.

Monoamin taşıyıcılarının biyolojik önemi bu proteinlerin bazı ilaçların doğrudan hedefini oluşturmalarından kaynaklanır. Bunlar özellikle antidepresan ilaçlar ve kokain, amfetamin ve ekstazi gibi

alışkanlık yapıcı psikolojik uyarıları içine alır^(6,12).

Zarı kateden 12 bölgeye sahip olduğu düşünülen bu proteinlerin üç boyutlu yapısı hakkındaki bilgilerimiz, protein saflaştırılmasında karşılaşılan güçlükler nedeniyle, daha çok işlevsel çalışmalara veya protein bölgelerinin hareketlerini dolaylı tekniklerle saptamaya dayalıdır (elektron kütle spektroskopisi, atomik absorpsiyon, floresans spektroskopisi gibi). Günümüzde işlevsel çalışmalar ve bakteriyel benzeşiklerin (homolog) yapı analizleri sonucu bu taşıyıcıların zarı kateden 12 bölgesi bulunduğu ve bu bölgelerin hücre dışı ve hücre içi halkalarla birbirine bağlandığı bilinmektedir⁽¹³⁾. N- ve C-uçları ise hücre içerisine dönüktür. Ancak ligand bağlama bölgesi ve proteinin işlevini gerçekleştirme sırasında geçirdiği katlanma değişiklikleri henüz açıklığa kavuşmamıştır.

Dolaylı işlev çalışmaları N-ucunun fosforillenme ve amfetamin tetikli dopamin dışakışında (amphetamine induced dopamine efflux) rolü olduğunu, C-ucunun ise proteinin endoplazmik retikulumdan taşınması, olgun formunu kazanması (maturation) ve zara taşınarak zar içerisine sokulmasında, yani protein trafiğinin gerçekleşmesinde önem taşıdığını göstermiştir^(9,2).

Her iki ucun yapısal öneminin açığa çıkarılması bakımından, bu bölgelerin uygun floresan proteinlerle etiketlenerek aralarındaki mesafelerin FRET analiziyle ortaya konması, böylelikle uzaysal yakınlıkların belirlenmesi yararlı olacaktır. Ancak bu amaçla günümüzde yaygın olarak kullanılan yeşil floresan protein ve türevleri oldukça büyük proteinlerdir (~30 kDa) ve takıldıkları proteinde konformasyonel değişikliklere ve işlev bozukluklarına yol açabilirler^(3,10).

Bu çalışmada CFP'nin dopamin taşıyıcısının farklı bölgelerine yerleştirilmesi ve etiketli proteinlerin işlevsel durumunun belirlenmesi amaçlanmıştır. CFP proteininin

yerleştirildiği üç pozisyondan yalnızca bir tanesi işlevini koruyabilmiştir. N-ucu beklenildiği gibi tümüyle işlevsel bir yapı oluştururken, beş numaralı hücre içi halkanın (IL5) bu tip bir işaretlemeye uygun olmadığı gösterilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Yönlendirilmiş Mutageniz

Yönlendirilmiş mutageniz çalışmalarında daha önceden genetik kodu birçok restriksiyon enzim bölgesini içerecek şekilde değiştirilmiş insan dopamin taşıyıcısı (sentetik dopamin taşıyıcı, SynDAT) kalıp olarak kullanıldı. Bu gen bisitronik ekspresyon vektörü pCIHygro'ya takıldı⁽⁷⁾. eCFP (enhanced CFP) ise orijinal pLP-eCFP-C1 vektör serisinden çoğaltıldı (Clontech). CFP etiketini çeşitli yerlere yerleştirebilmek için öncelikle yönlendirilmiş mutageniz yöntemiyle SynDAT'ın farklı yerlerine BsrGI enzim kesim bölgeleri yerleştirildi, oluşturulan bu vektörler dizi analizi ile kontrol edildi, daha sonra yine BsrGI enzim kesim bölgesini içeren primerlerle çoğaltılan CFP bu vektörlere takıldı. Ayrıca aynı vektörler eCFP genine bir bağlaç eklenerek tekrarlandı. Bu amaçla eCFP geninin baş ve sonlarına dört adet glisin rezidüsü eklendi ve aynı vektörler paralel olarak eCFP+bağlaç dizisi ile oluşturularak işlevleri kontrol edildi. Tüm çalışmalarda polimeraz olarak Phusion enzimi (Finnzymes), kesili bölgeleri yapıştırmak için Takara ligaz tamponu (Takara) kullanıldı. Oluşturulan vektörler bir kez daha otomatik dizi analizi ile doğrulandı (MWG Biotech, Germany).

Hücre Kültürü ve Transfeksiyon

İnsan embriyonik böbrek hücreleri (HEK 293) %10 fetal sıgır serumu ve 0.01 mg/ml gentamisin (Invitrogen) içeren DMEM ortamında, 37°C'ta, %5 CO₂ altında büyütüldü. Geçici transfeksiyon (transient transfection) için hücreler 75 cm²'lik kültür kabına 3-3.5 x 10⁶ hücre gelecek şekilde yayıldı ve ertesi gün Lipofektamin kullanılarak (Invitrogen) uygun vektörlerle

transfekte edildi. Kararlı hücre soyları da benzer yöntemle transfekte edilerek transfekte hücreler higromisin (300 mg/ml, Invitrogen) kullanılarak seçildi ve çoğaltıldı. Bu hücrelerden ayrıca hücre stokları oluşturuldu.

Dopamin Geri Alım Testi (uptake experiments)

[H³ dopamin geri alım testi transfeksiyondan üç gün sonra, [H³ dopamin (7-21 Ci/mmol) (Amersham Biosciences) kullanılarak gerçekleştirildi. Testin gerçekleştirilmesinden iki gün önce hücreler 2 x poli lizin ile işleme tabi tutulmuş 24 kuyulu hücre kaplarına 100.000 hücre/kuyu olacak şekilde yayıldı. Geri alım tamponu her zaman taze olarak testin yapılacağı gün hazırlandı (25 mM HEPES, pH 7.4, 130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 1 mM L-askorbik asit, 5 mM D-glükoz ve 1 M katekol-O-metiltransferaz baskılayıcı (COMT, Ro 41-0960, Sigma). Daha sonra işaretli ve işaretli olmayan dopamin içeren geri alım tamponu eklenerek geri alım tepkimesi başlatıldı. Tepkime 5 dak., 37°C ta sürdürüldü. Reaksiyon durdurulduktan

sonra tüm örnekler 24 kuyulu sayım plakalarına aktararak Wallac Tri-Lux sintilasyon sayacında sayıldı. Her örnek üçlü çalışıldı ve sonuçlar Prism 3.02 yazılımı kullanılarak değerlendirildi (GraphPad San Diego, CA).

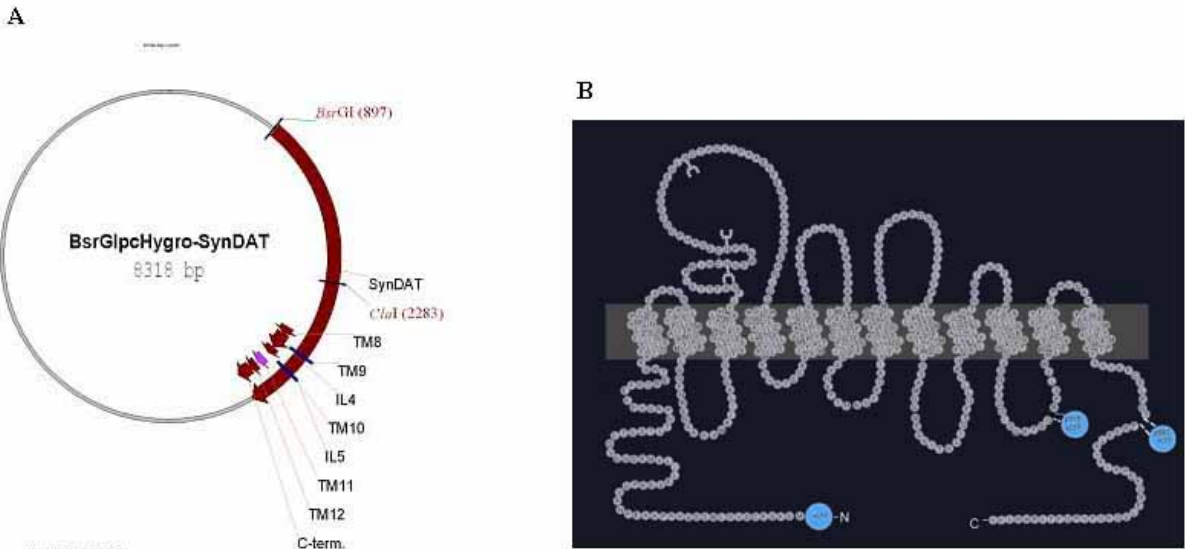
Floresans Görüntüleme:

Canlı hücre görüntülenmesi için analiz öncesi hücreler 48 saat, 8 kuyulu özel Lab-Tek II görüntüleme kutucuklarında (Nalge) büyütüldü. Hücreler Epifloresan Mikroskobu kullanılarak (Zeiss) görüntüledi. Görüntüleme için 63 büyütme yağ objektifi, MetaMorph yazılım programı ve CFP filtresi kullanıldı (uyarım dalgaboyu: 439 nm; yayılım dalgaboyu: 476 nm).

BULGULAR

1-Yönlendirilmiş Mutagenез:

Yönlendirilmiş mutagenез ile aşağıda listelenen rekombinant vektörler oluşturuldu. N-ucu pozisyon 1 eCFP ve diğer iki pozisyonun SynDAT üzerindeki şematik görüntüsü şekilde görülmektedir (Şekil 1).



Şekil 1: (A) N-ucuna BsrGI enzim kesim bölgesi yerleştirilmiş pcHygroSynDAT vektörünün şematik görünüşü. (B) eCFP dizisinin takıldığı pozisyonların SynDAT dizisi üzerinde şematik gösterilişi.

pcHygroSynDAT N terminal p1 eCFP
 pcHygroSynDAT p515 eCFP
 pcHygroSynDAT p587 eCFP
 pcHygroSynDAT p515 eCFP + Bağlaç
 pcHygroSynDAT p587 eCFP + Bağlaç
 Bu amaçla kullanılan primerler Tablo 1’de verilmiştir.

2- Geri alım testi sonuçları:

Tüm rekombinant vektörler yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde geri alım testine tabi tutuldu. Her deneyde kontrol olarak kararlı SynDAT hücre soyu kullanıldı. Geçici hücre soyunun kullanıldığı deneylerde transfeksiyon etkinliğini arttırmak için Lipofectamine 2000 kullanıldı ve aktivite değerleri çok düşük olduğundan, testler 100 – 150 bin

hücre / kuyu olacak şekilde düzenlendi. N-ucu eCFP’nin yaban tip proteine yakın ölçüde aktivite gösterdiği saptandı (Şekil 2). Ancak grafiklerden görüldüğü gibi bu yapılm (konstrakt) dışındaki yapılmaların (p515, p515±B eCFP, p587 ve p587±B) düşük de olsa yaban tip dopamin taşıyıcısına benzer bir ilginlik (afinite, K_m) gösterdiği (Tablo 2), ancak dopamin geri alımının çok düşük olduğu, yani dört proteinin de etiketin takılmasıyla işlevlerini kaybettiği saptandı (Şekil 3B,D). Hem p515 hem de p587 için bağlaç içeren ve içermeyen formlarda da işlev bakımından bir farklılık saptanmadı (Şekil 3C,E).

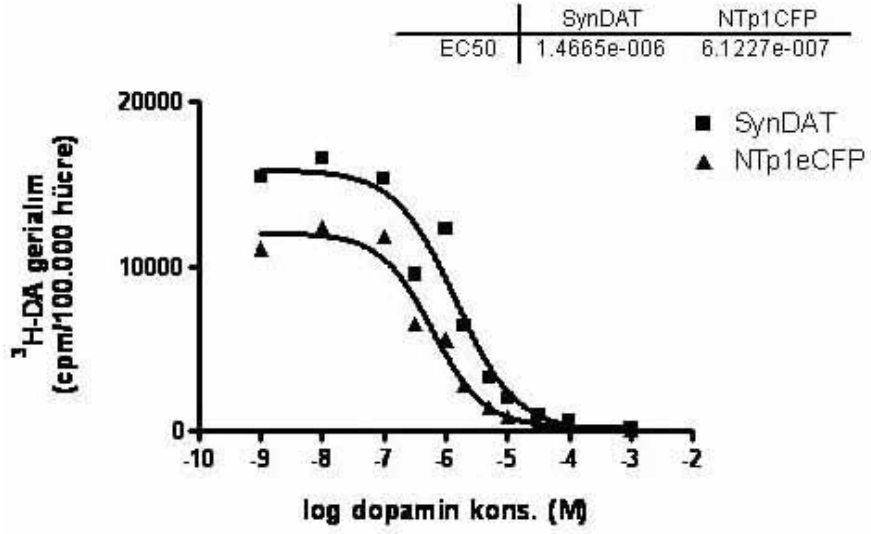
Tablo 1: Aşağıda yalnızca "ileri" yönelimli primerler verilmiştir. "Ters" primerler aynı dizilerin bütünleyici (komplementer) tersinin alınması ile oluşturulmuştur.

Nucu p1 BsrGI SynDAT	5’-ACCCAAGCTTCTGTACAAGATGAGCAAGTCCA-3’
p515 BsrGI SynDAT	5’- CAGATGACCGGTCAGTGTACACGGCCCAGCC -3’
p587 BsrGI SynDAT	5’- AGCCTGCCCCGGAAGCTGTACATTCCGGGAGAAG -3’
eCFP_for	5’- GGTCTGTACAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG -3’
eCFP+B_for	5’ -GCCACCTGTACAGGAGGTGGAGGTATGGTGGAGCAAGGGC -3’

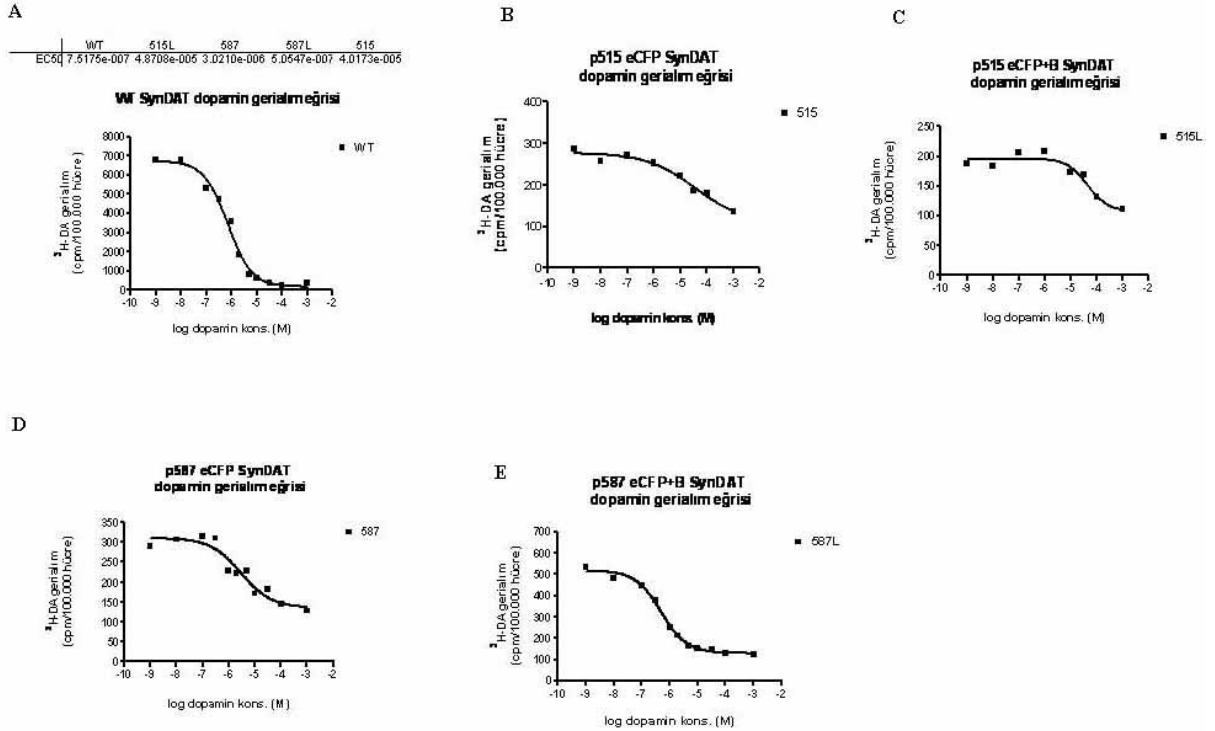
Tablo 2: eCFP ile etiketlenmiş ve dopamin taşıyıcısı eksprese eden yapılmaların geri alım değerlerine ait kinetik sabitler*.

	EC_{50} μM	K_m (DA) μM	V_{max} pmol/dak/ 10^5 hücre
Kontrol (SynDAT)	1.4 (0.9-2.3)	1.4	12.2
N-ucu p1eCFP	0.6 (0.43-0.85)	0.55	3.8
p515 eCFP	40	40	3.2
p515 +B eCFP	48.7	48.7	2.0
p587 eCFP	3.0	2.9	0.2
p587 +B eCFP	0.45	0.5	0.09

NTp1eCFP dopamin gerialım eğrisi



Şekil 2: Sentetik insan dopamin taşıyıcısı (SynDAT)'nın N-ucuna eCFP geninin takılmasıyla oluşturulan pcHygro NTp1eCFP SynDAT vektörünün dopamin geri alım eğrisi. Her iki deney de kararlı hücre soylarında 100.000 hücre üzerinde gerçekleştirilmiştir.



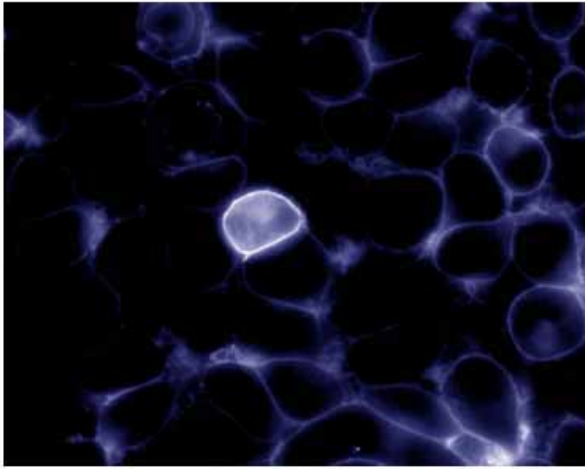
Şekil 3: Sentetik insan dopamin taşıyıcısı (SynDAT)'nın p515 ve p587. amino asitlerinin yer aldığı noktalara eCFP geninin eklenmesiyle oluşturulan pcHygro p515 eCFP SynDAT ve pcHygro p587 eCFP SynDAT vektörlerinin ve eCFP'nin bağlaç içeren formlarının dopamin geri alım eğrisi. Bu deneyler geçici hücre soylarında 100.000 hücre üzerinde gerçekleştirilmiştir.

3- Mikroskopik Görüntüleme:

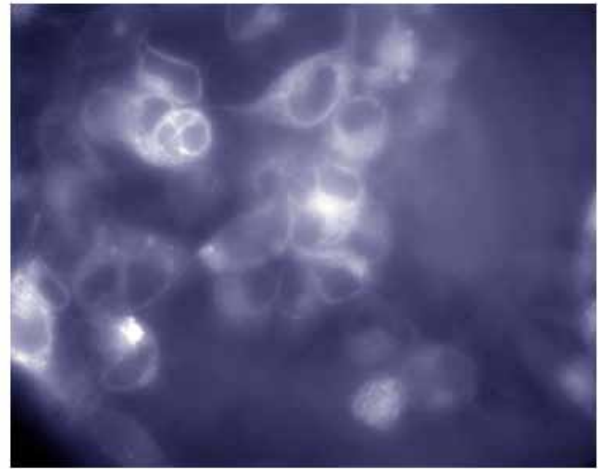
CFP filtresi kullanılarak elde edilen resimler Şekil 4 A ve 4 B'de görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi N-ucu etiketlemesi protein işlevini bozmadığından, beklendiği gibi protein zarfa eksprese olmuştur ve net bir yüzey ekspresyonu gözlenmektedir (Şekil 4A). p587+B'de ise yüzey ekspresyonu ile hücre içi dağılım birbirine yakın miktarlarda görülmektedir (Şekil 4B).

Gerçekten de, p587+B'nin geri alım testi sonuçları yaban tip proteine en yakın değerleri verdi ve dopamin geri alımı da diğer yapımlara görece en yüksek değerde elde edildi. Mikroskopta diğer yapımların görüntülenmesi ise bu hücrelerde hem protein ekspresyonunun çok düşük olduğunu, hem de eksprese olan proteinin hücre yüzeyine taşınmadığını ortaya koydu (veriler gösterilmemiştir).

A



B



Şekil 4: *pcHygro NTp1eCFP SynDAT* ve *pcHygro p587+B eCFP SynDAT* vektörleri ile transfekte edilen HEK 293 hücrelerinin epifloresan mikroskopunda görüntülenmesi. Panel A'da görüldüğü gibi, geri alım testleriyle de uyumlu olarak *NTp1eCFP* yapılımları için düzgün yüzey ekspresyonu gözlenmiş, B panelinde görülen *p587+B* yapılımlarında ise yüzey ekspresyonu ile birlikte yoğun bir sitoplazmik dağılım saptanmıştır.

TARTIŞMA

Dopamin taşıyıcılar kokain ve amfetamin gibi psikolojik uyarıların temel hedefidir. Amfetamin dopaminle yarışarak dopamin geri-alımını baskılar ve bu da sinaptik boşluktaki dopamin seviyesinin yükselmesine neden olur. Bundan ayrı olarak amfetaminin dopaminin DAT üzerinden ters yönde (içeriden dışarıya) salınımını da arttırdığı saptanmıştır (dopamine efflux)⁽⁴⁾. Bu dışakının DAT'ın substrat bağlama bölgelerinin amfetamin uyarımı sonucu büyük ölçüde hücre içine dönmesi nedeniyle mi, yoksa amfetamin indüklü akımların etkisiyle mi gerçekleştiği henüz açıklığa kavuşmamıştır.

Amfetaminin bir başka etkisi ise DAT'ın hücre içine alınması (internalization) ile kendini gösterir. Amfetaminin protein kinaz C (PKC) aktivasyonunu arttırdığı, PKC'nin ise DAT'ın N-ucunu fosforillelediği saptanmıştır; ancak, bu bulgulara rağmen DAT'ın N-ucundan 22 amino asidin kaldırılmasının PKC fosforilasyonunu engellediği halde, internalizasyona etkisi olmadığı gözlenmiştir. N-ucundan kesilmiş DAT'ın substrat bağlama, inhibitör bağlama gibi özellikleri de yaban tipe yakın bulunmuştur. Bu nedenle N-ucu fosforillenmesinin fizyolojik önemi anlaşılamamıştır. Javitch ve ark. N-ucu fosforillenmesinin PKC-aktivasyonu ile

indüklenen DA dış salınımını etkilediğini, buradaki serin rezidülerinin alanin'e mutasyonu ile AMPH-indüklü DA dışakısında önemli ölçüde azalma saptandığını göstermişlerdir⁽⁵⁾.

Dopamin taşıyıcısının C-ucunun ise daha önce açıklandığı gibi endoplazmik retikulumdan proteinin doğru katlanmış şekilde çıkararak zara yerleşmesinde (yüzey ekspresyonu), yani protein trafiği ve sürecinde etkili olduğu düşünülmektedir⁽¹¹⁾. Gerçekten de, DAT'ın PDZ bölgesine sahip PICK1 proteini ile etkileştiği gösterilmiş, ancak yeni çalışmalar bu etkileşimin ER ihracında rol almadığını gösterdiğinden PDZ etkileşimlerinin tam rolü de net olarak açığa çıkarılamamıştır⁽²⁾.

Bu çalışmada N- ve C-uçlarının DAT konformasyonunda ne gibi değişikliklere yol açtığını inceleyebilmek amacıyla, FRET çalışmalarında kullanabilmek üzere floresan proteinler için olası işlevsel bölgelerin saptanması amaçlanmıştır. Bu amaçla C-ucuna yakın iki bölgeye ve N-ucuna eCFP proteini takılmıştır. Yeşil floresan protein türevi olan bu protein 30 kDa civarında büyük bir proteindir ve iki ucu arasındaki uzaklık 20 Å'a yakındır. Bu uzaklığın yol açabileceği yapısal sınırlamalar göz önüne alınarak eCFP'nin uçlarına esneklik sağlayabilecek dört aminoasit takılmış, böylelikle bu bağlaç diziyi içeren ve içermeyen formların yaratabileceği işlevsel farklılık karşılaştırılmıştır.

Bu çalışmada p515 ve p587 pozisyonlarının eCFP etiketlenmesi için uygun olmadığını saptamış olduk. Bu makalede sonuçları gösterilmemekle birlikte diğer çalışmalarımızda p513, p597 ve C-ucuna benzer şekilde takılmış eCFP etiketlerinin de protein işlevini bozduğunu gözlemledik. Daha önce yaptığımız tetrasistein (FlAsH) etiketleme çalışmalarında p511 konumunun bu etikete uygun olduğunu göstermiştik (yayına hazırlanmaktadır). Ancak bu konuma yerleştirilen YFP yine fonksiyonel

olmayan bir proteine yol açmıştır. Diğer çalışmalarımızda ise bu çalışmayla uyumlu olarak N-ucu pozisyon 1 ve pozisyon 55'e yerleştirilen YFP etiketlerinin fonksiyonel protein oluşturduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak hücre içi 5 no'lu halka (IL5) ve C-ucuna takılan floresan proteinlerin protein işlevini bozduğunu, N-ucunun ise bu etiketler için uygun olduğunu belirledik. Buna ek olarak p587'nin bağlaç ile etiketlenmiş formunda dopamin geri alım düzeyleri çok düşük olsa da yaban tipe yakın bir substrat ilginliği saptandı. Geri alım düzeyindeki düşüklük yüzey ekspresyonu ile de paralellik göstermektedir. Proteinin C-ucundan etiketli bu formu muhtemelen olgunlaşma ve zara yönelimde oluşan bozukluk nedeniyle düşük yüzey ekspresyonu göstermektedir.

Epifloresan mikroskopların konfokal mikroskoplardan farklı olarak yüzey odaklı çalışmaları yüzey ekspresyonu konusunda net bir yorum yapmayı güçleştirse de p587+B için her iki dağılımın (hücre içi ve yüzey) aynı seviyelerde olduğu söylenebilir.

Bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak N-ucu p1 ve p55 konumları ile protein substrat bağlama ve serbestleme kapısını oluşturan hücre içi 3 ve 4 no'lu halkalar (IL3 ve IL4) üzerinde olası işlevsel konumları belirleyerek ilerideki çalışmaların bu yönde odaklanması, C-ucunun FRET çalışmalarında kullanılabilmesi için ise GFP ve türevleri gibi büyük proteinlerle etiketleme yerine farklı problemlerin denenmesinin akıllıca bir yaklaşım olacağı sonucu çıkarılabilir.

Teşekkür:

Çalışmanın gerçekleştirilmesindeki yardımları nedeniyle Dr.Julie KNIAZEFF ve Prof.Dr.Ulrik GETHER'e; makalenin yayına hazırlanmasındaki değerli katkıları nedeniyle Prof.Dr.Beki KAN'a teşekkür ederim.

İletişim:

Oya Orun

E-mail: oyaorun@yahoo.com

Gönderilme Tarihi: Eylül 28 2006

Kabul Tarihi: Kasım 01 2006

The Online Journal of Neurological Sciences (Turkish) 1984-2005

This e-journal is run by Ege University

Faculty of Medicine,

Dept. of Neurological Surgery, Bornova,

Izmir-35100TR

as part of the Ege Neurological Surgery

World Wide Web service.

Comments and feedback:

E-mail: editor@jns.dergisi.org

URL: <http://www.jns.dergisi.org>

Journal of Neurological Sciences (Turkish)

ISSNe 1302-1664

KAYNAKLAR

1. Amara SG, Kuhar MJ, Neurotransmitter transporters: recent progress. *Annu. Rev.Neurosci.* 1993, 16:73-93.
2. Bjergaard C, Fog JU, Hastrup H, Madsen K, Loland CJ, Javitch JA, Gether U. Surface targeting of the dopamine transporter involves discrete epitopes in the distal C terminus but does not require canonical PDZ domain interactions. *J.Neurosci.*,2004, 24(31):7024-7036.
3. Griffin BA, Adams SR, Jones J, Tsien RY. Fluorescent labeling of recombinant proteins in living cells with FAsH. *Methods Enzymol.*, 2000, 327: 565-579.
4. Kahlig KM, Binda F, Khoshbouei H, Blakely RD, McMahon DG, Javitch JA, Gali A. Amphetamine induces dopamine efflux through a dopamine transporter channel. *Proc.Natl. Acad.Sci. USA*, 2005, 102: 3495-3500.
5. Khoshbouei H, Sen N, Guptaroy B, Johnson L, Lund D, Gnegy ME, Gali A, Javitch JA. N-terminal phosphorylation of the dopamine transporter is required for amphetamine-induced efflux. *PLoS Biology*, 2004, 2(3):387-393.
6. Norregaard L, Gether U. The monoamine neurotransmitter transporters: structure, conformational changes and molecular gating. *Curr.Opin.Drug Discov.Dev.* , 2001, 4: 591-601.
7. Rees S, Coote J, Stables J, Goodson S, Harris S, Lee MG. Bicistronic vector fort he creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein. *Biotechniques*, 1996, 20:102-110.
8. Rudnick G , Bioenergetics of neurotransmitter transport., *J. Bioenergetics and Biomembranes*, 1998, 30(2):173-185.
9. Saunders C, Ferrer JV, Shi L, Chen J, Merrill G, Lamb ME, Leeb-Lundberg LM, Carvelli L, Javitch JA, Galli A. Amphetamine-induced loss of human dopamine transporter activity: an internalization dependent and cocaine-sensitive mechanism. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*, 2000, 97:6850-6855.
10. Siegel RM, Chan FK, Zacharias DA, Swofford R, Holmes KL, Tsien RY, Lenardo MJ. Measurement of molecular interactions in living cells by fluorescence resonance energy transfer between variants of the green fluorescent protein. *Sci STKE*, 2000, 38, 1-6.
11. Torres GE, Carneiro A, Seamans K, Fiorentini C, Sweeney A, Yao WD, Caron MG. Oligomerization and trafficking of the human dopamine transporter. Mutational analysis identifies critical domains important for the functional expression of the transporter. *J.Biol.Chem.*, 2003, 278: 2731-2739.
12. Torres GE, Gainetdinov RR, Caron MG. Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat.Rev. Neurosci.*, 2003, 4, 13-25.
13. Yamashita A, Singh SK, Kawate T, Jin Y, Gouaux E. Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. *Nature*, 2003,437 (7056): 215-223.