

Aus dem Pharmakologischen Institut der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Elektrophysiologische Charakterisierung und
PKC-vermittelte Regulation des humanen
Transporters für basische Aminosäuren hCAT-1**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Alexander Rotmann
geboren am 17.09.1970
in Lima / Peru

Mainz, 2003

Dekan:

Prof. Dr. H. Paulsen

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Feb. 2004

Meinen Eltern

Danksagung

Ich möchte mich bei meiner Betreuerin für die Betreuung der vorliegenden Arbeit bedanken. Ihre Unterstützung zur jeder Zeit und in allen Bereichen dieser Dissertation war von unschätzbarem Wert. Ihre Korrekturvorschläge und die anregenden Diskussionen der Ergebnisse haben sicherlich zum Gelingen dieser Arbeit in großem Maße beigetragen.

Bei meinem zweiten Betreuer möchte ich mich für die Betreuung des elektrophysiologischen Abschnittes dieser Arbeit bedanken.

Bei meinem Betreuer in der Biologie möchte ich mich für die Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Dank an alle Doktoranden und Mitstreiter im Labor: Nicole, Sabine, Alexandra, Davina, Günter, Lars, Iris, Marco. Nicole danke ich besonders für Korrekturen und vor allem für gute Laune im Labor. Sabine speziellen Dank für die Motivation zu Ausdauersportarten. Weiterhin möchte ich mich ganz besonders bei Uschi für ihre andauernde Unterstützung mit Zellkultur, Western-Blots, Bestellungen und für die Herstellung der hCAT-1-Mutante bedanken. Alice sei für ihre Anleitung in die Geheimnisse der Oozyten-Handhabung und der radioaktiven Aufnahmen gedankt.

Im elektrophysiologischen Labor möchte ich mich bei Jörg W. und Johanna für kompetente Einführung in die Theorie und Praxis der Elektrophysiologie bedanken. Dank auch an Hacki, Wolfgang und andere medizinische Doktoranden für die Auflockerung der Arbeitsstunden.

Tom sei besonders für seine kompetente und schnörkellose Einführung in die RPA gedankt, sowie für immer gute Gesellschaft im Büro. Allen anderen, nicht namentlich erwähnten Laborkollegen, sei ganz besonders dafür gedankt, dass sie die Arbeitsstunden im Labor erträglicher gemacht haben.

Vielen Dank auch an Jürgen für seine Zeit und Geduld bei den Korrekturen.

Dank an Ulli für ihre Unterstützung in den verschiedenen Phasen dieser Arbeit, mit all den privaten Höhen und Tiefen.

Doro sei für ihre Liebe und für ihre Hilfe bei den unendlichen Korrekturen dieser Arbeit ganz besonders gedankt.

Meinem Sohn gilt besonderen Dank für die Erheiterung meiner Arbeitsstunden zu Hause mit Yu-Gi-Oh-Karten und mit Flipperspielen am Computer. Dank auch für seine Versuche mir das Yu-Gi-Oh-Kartenspiel beizubringen. Dank auch an den Rest meiner Familie überall auf dieser Welt.

Summary

The human cationic amino acid transporter hCAT-1 belongs to the family of Na⁺- and pH-independent transporters for cationic amino acids (CAA). The present study addresses different aspects of the hCAT-1-mediated transport and is divided into two sections.

In the first section, the transport properties of hCAT-1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes were examined with electrophysiological methods and compared to the transport properties of the isoforms hCAT-2A and -2B. These studies revealed, that the expression of hCAT-2A and -2B, but not hCAT-1, in oocytes leads to the formation of a CAA-potential. The high transstimulation of the hCAT-1 protein may be responsible for this difference. The membrane potential influences the accumulation of CAA through hCAT-proteins. However, this was only observed in hCAT-2A-expressing oocytes, but not in hCAT-1 and -2B expressing oocytes incubated with high concentrations of CAA (10 mM). The high efflux rate mediated by hCAT-1 and -2B under this condition may explain this difference. L-arginine-induced maximal currents (V_{max}) and conductances of hCAT-proteins were measured using the voltage clamp technique. The calculated V_{max} values from electrophysiological studies were two fold lower than the values determined by flux experiments, most likely due to a counter-transport of positive charge (substrate). Further on, the different hCAT-isoforms showed two different conductance states in dependence of the intracellular CAA concentration. In CAA-depleted hCAT-expressing oocytes L-arginine increased the conductance. In contrast in CAA containing oocytes, the conductance was unchanged (in hCAT-1 and -2B expressing oocytes) or little changed (in hCAT-2A) after the application of L-arginine. However in substrate equilibrium, the conductance of all three hCAT-isoforms studied increased with increasing arginine concentrations. Surprisingly, all hCAT-isoforms evoked leak currents in the absence of CAA. An increased conductance for K⁺-ions was found in hCAT-2B-expressing oocytes. The physiological role of this „channel“ function is unknown.

The aim of the second part of this thesis was to elucidate the mechanism by which protein kinase C (PKC) activation leads to a decrease of the hCAT-1-mediated transport activity. To this end, hCAT-1/EGFP fusion constructs were expressed in both, *Xenopus laevis* oocytes and U373MG glioblastoma cells. Using confocal fluorescence microscopy and Western blot analysis of biotinylated cell surface proteins it was demonstrated that the reduction of the hCAT-1 transport activity was due to a reduction of the cell surface expression of hCAT-1. Similar results were obtained with hCAT-1 expressed endogenously in DLD-1 colon carcinoma cells. To find out, if PKC directly phosphorylates hCAT-1, we removed all three potential PKC recognition sequences in hCAT-1. The mutant exhibited the same PMA-induced internalization as wild type hCAT-1, suggesting an indirect action of PKC on hCAT-1. The PKC-induced change in the cell surface expression of hCAT-1 represents a new regulation mechanism of hCAT-proteins, that might explains why changes of CAT protein expression correspond not always to changes in their transport activity.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1. Einleitung	4
1.1 Carrier-vermittelter Aminosäure-Transport in Säugerzellen	4
1.2 Bedeutung der basischen Aminosäuren im Zellstoffwechsel	7
1.3 Carrier für basische Aminosäuren	9
1.3.1 Identifizierung der Transportproteine für basische Aminosäuren (CATs)	9
1.3.2 Transporteigenschaften der murinen CAT-Proteine (mCATs)	12
1.3.3 Die Familie humaner CAT-Proteine (hCATs)	13
1.3.4 Transporteigenschaften der hCAT-Proteine	15
1.3.5 Regulation der CAT-Proteine	17
2. Ziele der Arbeit	20
3. Materialien	22
3.1 Laborgeräte	22
3.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien	24
3.3 Chemikalien	25
3.3.1 Allgemeine Chemikalien	25
3.3.2 Radiobiochemika	26
3.4 Enzyme und Kits	26
3.5 Materialien für die Zellkultur	27
3.5.1 Nährmedien und Medienzusätze	27
3.5.2 Zelllinien	27
3.5.3 Verbrauchsmaterialien	30
3.6 Oligonukleotide	30
3.7 Vektoren	31
3.8 Antikörper	32
3.9 Allgemein verwendete Puffer und Lösungen	33
3.10 Sitz der Hersteller in Deutschland	34
4. Methoden	36
4.1 <i>Xenopus laevis</i>-Oozyten als Expressionssystem	36
4.1.1 Gewinnung und Behandlung der Oozyten	36
4.1.2 <i>In vitro</i> -Synthese von cRNA	37
4.1.3 Injektion von cRNA in die Oozyten	39
4.1.4 Inkubation der Oozyten	39
4.1.5 Gefrierschnitte von Oozyten	39
4.1.6 Transportstudien mit Oozyten	40
4.1.7 Messung der Radioaktivität	42
4.1.8 Berechnung des L-[³ H]Arginin-Verteilungsvolumens	43

4.2 Elektrophysiologische Untersuchungen an hCAT-exprimierenden Oozyten	44
4.2.1 Die voltage clamp-Methode	44
4.2.2 Messung des Membranpotentials	46
4.2.3 Messung von transmembranären Strömen	46
4.2.4 Auswertung der elektrophysiologischen Daten	49
4.3 Molekularbiologische Methoden	50
4.3.1 Extraktion von Nukleinsäuren mit Phenol	50
4.3.2 Bestimmung der Konzentration von DNA oder RNA	51
4.3.3 Auftrennung von Nukleinsäuren über Agarosegelelektrophorese	51
4.3.4 Arbeiten mit Restriktionsendonukleasen	52
4.3.5 Extraktion von DNA aus einem Agarosegel	52
4.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten	53
4.3.7 Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	53
4.3.8 Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i> -Zellen	55
4.3.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)	56
4.4 Biochemische Methoden	57
4.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen	57
4.4.2 RNase-Verdauungsschutzanalyse	57
4.4.3 DNA-Sequenzierung	62
4.4.4 Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen	62
4.4.5 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	63
4.4.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	64
4.5 Mutagenese von hCAT-1	68
4.5.1 Benutzte Oligonukleotide	68
4.5.2 PCR-Bedingungen und Transformation	69
4.5.3 Klonierungsschritte	70
4.5.4 Herstellung des hCAT-1 S/A ⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ .EGFP-Konstrukts	71
4.6 Methoden der Zellkultur	73
4.6.1 Kultivieren von Zellen	73
4.6.2 Transfektion der hCAT-1.EGFP-Konstrukte in adhärenente Zellen	75
4.6.3 Fixierung von transfizierten Zellen	76
4.6.4 Konfokale Mikroskopie an lebenden Zellen	76
4.6.5 Behandlung von Zellen mit PMA	77
4.6.6 Transportstudien an humanen Zellen	77
4.7 Auswertung und Berechnungen	79
4.7.1 Regressionen	79
4.7.2 Statistik	79
5. Ergebnisse	80
Abschnitt I: Elektrophysiologische Charakterisierung von hCAT-1 im Vergleich zu hCAT-2A und hCAT-2B	80
5.1 Rolle des Membranpotentials für die Verteilung basischer Aminosäuren in hCAT-1-, hCAT-2A- und hCAT-2B-exprimierenden Oozyten	80
5.1.1 Im Gegensatz zu hCAT-2A und -2B war das Membranpotential von hCAT-1-exprimierenden Oozyten nicht vom Beladungszustand der Zellen mit basischen Aminosäuren abhängig	80
5.1.2 Im depletierten Zustand wurde das Membranpotential der hCAT-exprimierenden Oozyten ausschließlich vom K ⁺ -Potential bestimmt	82

5.1.3	Das Membranpotential und die L-Arginin-Konzentration beeinflussten die Akkumulation von L-Arginin in hCAT-exprimierenden Oozyten _____	83
5.1.4	Im Gleichgewicht war der hCAT-vermittelte Influx und Efflux von L-Arginin spiegelbildlich _____	85
5.2	Durch basische Aminosäuren induzierte Membranströme in hCAT-1-, hCAT-2A- und hCAT-2B-exprimierenden Oozyten _____	86
5.2.1	Die BAS-induzierten Membranströme der hCAT-Isoformen waren unterschiedlich groß _____	86
5.2.2	Die Leitfähigkeit der einzelnen hCAT-Isoformen war abhängig vom Beladungszustand der Oozyten mit basischen Aminosäuren _____	90
5.2.3	Transportkinetik in Abhängigkeit des Membranpotentials _____	93
5.2.4	Im Equilibrium-exchange nahm die Leitfähigkeit der einzelnen hCAT-Isoformen in Abhängigkeit der L-Arginin-Konzentration zu _____	95
5.3	Leck-Ströme hCAT-exprimierender Oozyten in Abwesenheit von basischen Aminosäuren _____	98
5.3.1	hCAT-1-exprimierende Oozyten zeigten auch in Abwesenheit von basischen Aminosäuren eine höhere Leitfähigkeit als H ₂ O-injizierte Oozyten _____	98
5.3.2	Einwertige Kationenströme in hCAT-2B-exprimierenden Oozyten _____	100
5.3.3	⁸⁶ Rb ⁺ -Efflux und -Influx an hCAT-exprimierenden Oozyten _____	103
Abschnitt II: Mechanismus der PKC-vermittelten Inhibition der Transportaktivität von hCAT-1 _____		105
5.4	Einfluss der PKC-Aktivierung auf die Expression und Transportaktivität von hCAT-1 _____	105
5.4.1	PMA verminderte die Expression von hCAT-1 an der Zelloberfläche von <i>X. laevis</i> -Oozyten und in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen _____	105
5.4.2	PKC-Aktivierung verminderte die Transportaktivität von hCAT-1.EGFP in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen _____	110
5.4.3	PMA verminderte auch die endogene Zelloberflächenexpression und Transportaktivität von hCAT-1 in DLD-1 Kolonkarzinom-Zellen _____	111
5.5	Wirkung der PKC-Aktivierung auf den y⁺-vermittelten L-Arginin-Transport von unterschiedlichen humanen Zelllinien _____	114
5.5.1	Der y ⁺ -vermittelte L-Arginin-Transport wurde unter Einfluss von PMA in allen untersuchten humanen Zelllinien vermindert _____	114
5.5.2	Expression der hCAT-Isoformen in verschiedenen humanen Zelllinien _____	117
5.6	Charakterisierung der hCAT-1-Mutante hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ _____	120
5.6.1	hCAT-1 und hCAT-1 S/A ⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ Sequenzvergleich _____	120
5.6.2	hCAT-1 S/A ⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ .EGFP zeigte eine ähnliche subzelluläre Verteilung wie hCAT-1.EGFP _____	120
5.6.3	Die Transportaktivitäten von hCAT-1 S/A ⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ und hCAT-1 unterschieden sich nicht _____	123
5.7	Einfluss der PKC-Aktivierung auf die Zelloberflächenexpression und die Transportaktivität von hCAT-1S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ _____	124
5.7.1	PMA verminderte auch die Zelloberflächenexpression von hCAT-1S/A ⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen _____	124
5.7.2	Die Transportaktivität von hCAT-1 S/A ⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ wurde auch durch PKC-Aktivierung reduziert _____	127

6. Diskussion	130
6.1 Elektrophysiologische Charakterisierung von hCAT-1 im Vergleich zu hCAT-2A und -2B	130
6.1.1 Fehlen des BAS-Potentiales in hCAT-1 und Akkumulation von BAS in Abhängigkeit vom Membranpotential und der BAS-Konzentration	130
6.1.2 Durch L-Arginin induzierte Membranströme in hCATs	134
6.1.3 Substratunabhängige Ströme (Leck-Ströme)	139
6.1.4 Schlussfolgerungen aus den elektrophysiologischen Untersuchungen	142
6.2 Mechanismus der PKC-vermittelten Regulation von hCAT-1	143
6.2.1 PKC-vermittelte Reduktion der hCAT-1-Expression und -Transportaktivität	143
6.2.2 Direkte oder indirekte PKC-vermittelte Phosphorylierung von hCAT-1 ?	145
6.2.3 Schlussfolgerungen der PKC-vermittelten Regulation von hCAT-1	147
6.3 Subzelluläre Verteilung vom hCAT-1-Protein in humanen Zellen	147
6.4 Neue Erkenntnisse über die hCAT-Isoformen und Ausblick	149
7. Zusammenfassung	153
8. Literaturverzeichnis	155
Abbildungsverzeichnis	166
Tabellenverzeichnis	167

Abkürzungsverzeichnis

4 α -PDD	4 α -Phorbol-12,13-didecanoat
[L-Arg] _o	extrazelluläre L-Arginin-Konzentration
[K ⁺] _o	extrazelluläre Kalium-Konzentration
4F2hc	schwere Kette des 4F2 Oberflächenantigens (4F2 heavy chain)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
as	nicht kodogener Strang (antisense)
BAS	basische Aminosäuren
BCH	2-Aminobizyko-[2,2,1]-heptan-2-carbonsäure
BIM I	Bisindolylmaleimid I (3-[-1-Dimethyl-aminopropyl]indol-3-yl)-4-(indol-3-yl)maleimid
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum-Albumin
CAT	Transporter für kationische Aminosäuren (cationic amino acid transporter) (h für human, m für murin, r für Ratte)
CMV	Cytomegalovirus
cpm	Zählrate pro Minute (counts per minute)
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	mit DEPC behandeltes Aqua bidest.
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxynucleosidtriphosphate
dpm	Zerfälle pro Minute (desintegrations per minute)
E	Einheit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein (enhanced green fluorescent protein)
EGTA	Ethylenbis(oxyethylenitrilo)tetraessigsäure

E_m	Membranpotential
E_R	Umkehrpotential (reversal potential)
FBS	Fötale Rinderserum
G418	Geneticin 418 Sulfat
GFP	grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
HAT	hetero(di)mere Aminosäure-Transporter
I	Membranstrom
I/V-Kurven	Strom-Spannungs-Beziehungen
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
kb	Kilo Basenpaare
kDa	Kilo Dalton
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
LAT	System L-Aminosäuretransporter
LPI	lysinurische Proteinintoleranz
MCS	multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)
MuLV	murine Leukämieviren
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
nt	Nukleotide
NTPs	Nukleosidtriphosphate
OD	optische Dichte
p.a.	für analytische Zwecke (pro analysis)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PBS-CM	PBS mit Ca^{++} und Mg^{++}
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDBu	Phorbol-12,13-dibutyrat
PIPES	Piperazin-1,4-(2-Ethansulfonsäure)
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat

rBAT	verwandt zu Aminosäure-Transporter $b^{0,+}$ (related to $b^{0,+}$ amino acid transporter)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler (standard error of mean)
ss	kodogener Strang (sense strand)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEACl	Tetraethylammoniumchlorid
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TEVC	two-electrode voltage clamp
TM	Transmembrandomäne(n)
TMACl	Tetramethylammoniumchlorid
ÜN	über Nacht
V_{\max}	maximale Transportgeschwindigkeit
ΔG	Differenzleitfähigkeit
ΔI	Differenzstrom

1. Einleitung

Die Aufnahme von großen polaren Molekülen wie Aminosäuren (AS) durch biologische Zellmembranen wird von spezialisierten Transportproteinen, so genannten Carriern vermittelt (Stein, 1990). Die vorliegende Arbeit befasst sich mit einer Familie verwandter Carrierproteine, die basische Aminosäuren (BAS) durch die Plasmamembran transportieren (CAT, cationic amino acid transporters). Die Merkmale eines Carrier-vermittelten AS-Transportes und die Bedeutung von BAS in Säugerzellen werden im Folgenden kurz vorgestellt, bevor auf die CAT-Familie detailliert eingegangen wird.

1.1 Carrier-vermittelter Aminosäure-Transport in Säugerzellen

Anders als Kanäle, die Poren in der Membran bilden und gleichzeitig nach beiden Seiten offen sind, binden Carrier ihr Substrat abwechselnd an einer Seite der Membran. Über eine Konformationsänderung des Carriers findet der Transport statt. Die Substratbindestelle wandert dabei von einer Seite der Membran auf die andere (Stein, 1990; Closs, 1998). Ähnlich wie Enzyme weist der Carrier-vermittelte Transport eine Sättigungskinetik auf. Der Transportvorgang wird durch die Substratkonzentration und durch die Geschwindigkeit der Konformationsänderung des Carriers bestimmt. Experimentell ermittelte Werte für die Michaelis-Menten-Konstante (K_M , Substratkonzentration bei halbmaximaler Sättigung) und die maximale Transportgeschwindigkeit (V_{max}) beschreiben diese Parameter.

Im Gegensatz zu Kanälen können Carrier einen Nettotransport des Substrates gegen einen Konzentrationsgradienten vermitteln. Die Energie für diesen Prozess wird in Säugerzellen durch Hydrolyse von ATP bereitgestellt (*primärer aktiver Transport*, z.B. die Na^+/K^+ -ATPase). Die Energie für den aktiven Transport großer Moleküle wie AS wird durch den elektrochemischen Gradienten, der von primär aktiven Transportern aufgebaut wird, zur Verfügung gestellt (Abb. 1). Ist der AS-Transport an den elektrochemischen Gradienten gekoppelt, wird der Vorgang als *sekundärer aktiver Transport* bezeichnet (Stein, 1990; Adam *et al.*, 2003). So kann der Transport von AS an den Cotransport von Na^+ , Cl^- -Ionen (Castagna *et al.*, 1997) oder an den Gegentransport von K^+ , H^+ - oder OH^- -Ionen gekoppelt (Broer, 2002), aber auch vom Membranpotential angetrieben werden (Kavanaugh, 1993; Kavanaugh *et al.*, 1994). Zudem gibt es Transporter, die H^+ -gekoppelt arbeiten (Thwaites *et al.*, 1993). Dabei wird der von der basolateralen Na^+/K^+ -ATPase hervorgerufene Na^+ -Gradient von dem in der Bürstensaummembran gelegenen Na^+/H^+ -Austauscher genutzt, um

einen einwärts gerichteten H^+ -Gradienten zu erzeugen. Bei den H^+ -gekoppelten Systemen handelt es sich somit um einen *tertiären aktiven Transport*.

Die meisten Carrier-Proteine für BAS vermitteln eine dem elektrochemischen Gleichgewicht folgende "erleichterte Diffusion", d.h. der Transport erfolgt in beide Richtungen. Sie nutzen aber bei der positiven Ladung des Substrates das negative Membranpotential im Inneren der Zelle als treibende Kraft aus (Kavanaugh, 1993; Nawrath *et al.*, 2000). Eine besondere Eigenschaft von einigen BAS-Transportern, die sie gemeinsam mit vielen anderen Transportern haben, ist die so genannte Transstimulierbarkeit. Dieses Phänomen beschreibt eine Erhöhung der Transportaktivität der Proteine durch Anwesenheit von Substrat auf der Seite der Plasmamembran, zu der hin transportiert wird (*trans*-Seite) (Stein, 1990). Es gibt jedoch auch BAS-Transporter, die als obligate Austauschler („Antiporter“) fungieren. Der BAS-Transport erfolgt in diesem Fall nur im Austausch gegen neutrale AS (Chillarón *et al.*, 1996).

Einteilung der BAS-Transporter in Transportsysteme

AS-Transporter wurden anhand ihrer Substratspezifität, des benutzten Transportmechanismus und ihrer Regulationseigenschaften in verschiedene Transportsysteme eingeordnet. Die verantwortlichen Proteine für die meisten dieser Transportaktivitäten sind in den letzten Jahren durch molekulare Klonierung identifiziert worden (Übersichten: Palacin *et al.*, 1998; Hyde *et al.*, 2003). Für BAS sind bis heute sechs verschiedene Transportsysteme bekannt (Übersicht: Closs und Mann, 1999). Die wichtigsten Eigenschaften der Transportsysteme für BAS werden im Folgenden vorgestellt.

System y^+

Lange Zeit wurde nur ein Transportsystem für BAS in Säugerzellen beschrieben, das so genannte System y^+ (Christensen, 1964; Christensen und Antonioli, 1969). Es zeichnet sich durch eine Na^+ -unabhängige, pH-unabhängige und transstimulierbare Aktivität mit einer K_M für BAS aus, die im Bereich der Plasmakonzentration von ca. 0,2mM liegt (White *et al.*, 1982; White, 1985). System y^+ -Aktivität kommt mit Ausnahme der Leber in allen untersuchten Geweben vor (White und Christensen, 1982). In neuerer Zeit wurden neben der System y^+ -Transportaktivität vier weitere Na^+ -unabhängige Transportsysteme für kationische AS beschrieben, die sich untereinander und vom System y^+ durch ihre Interaktion mit neutralen AS unterscheiden. Dagegen ist das Transportsystem $B^{0,+}$ als das einzige Na^+ -abhängige Transportsystem für BAS bekannt (Christensen, 1990; Devés und Boyd, 1998).

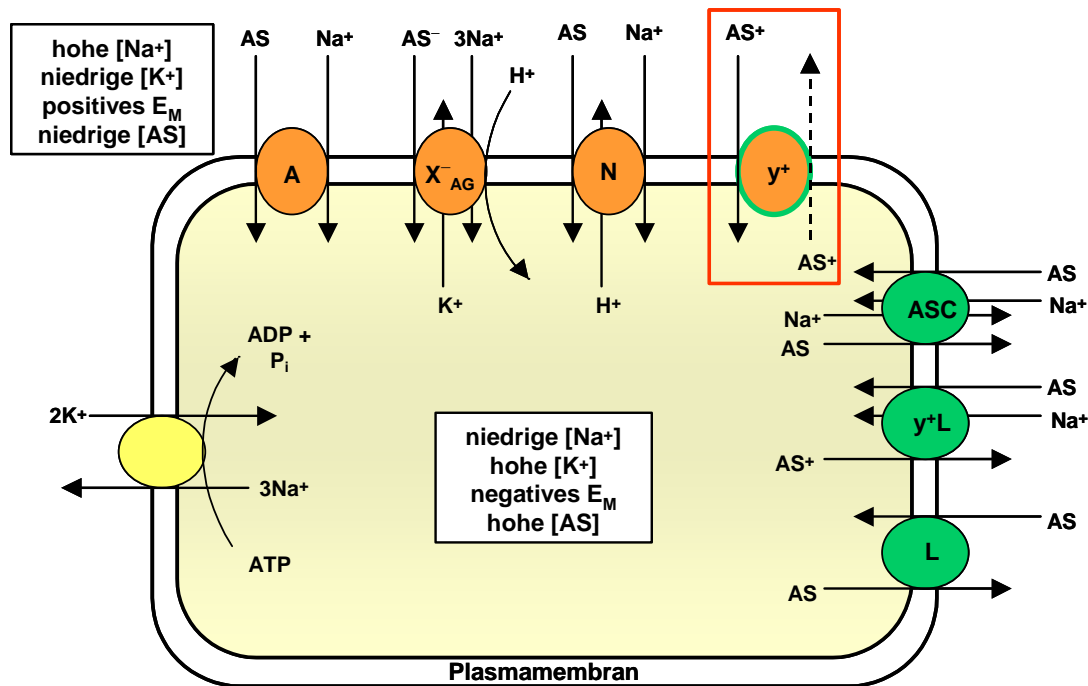


Abbildung 1: Carrier-vermittelter AS-Transport in Säugerzellen (modifiziert nach Hyde *et al.*, 2003)

AS-Transporter unterscheiden sich durch den verwendeten Transportmechanismus voneinander. Die Akkumulation von AS ist in erster Linie von der Aufrechterhaltung des Membranpotentials und des Na^+ und K^+ -Gradienten durch primär aktive Transporter wie die Na^+/K^+ -ATPase (linke Seite) abhängig. Sekundär aktive Transporter (obere Seite), wie z.B. die Systeme A (Transport von kurzkettigen AS), X_{AG}^- (Transport von Glu) und N (Transport von Gln, Asn und His) koppeln den AS-Transport an den elektrischen und chemischen Gradienten, der durch primär aktive Transporter hervorgerufen wird. AS-Austauscher („Exchanger“, rechte Seite), wie z.B. Systeme ASC (Austauscher für kleine neutrale AS), y^+L (Austauscher für BAS und neutrale AS) und L (Austauscher für große hydrophobe AS) transportieren AS durch Antipportmechanismen. Das System y^+ (rot eingerahmt) nutzt das Membranpotential für den Transport von BAS (CAT-vermittelter Transport, s.a. 1.3). Es fungiert aber gleichzeitig auch als (nicht obligater) Austauscher, da sich der AS-Transport durch Substrat auf der Seite der Plasmamembran erhöht, zu der hintransportiert wird (Transstimulation). Der eingerahmte Text gibt die generellen Eigenschaften des Intra- und Extrazellulärraumes an.

System y^+L

System y^+L besitzt eine sehr hohe Affinität für BAS (K_M für L-Lys bei $10 \mu M$). Dieses System wurde in humanen Erythrozyten beschrieben (Devés *et al.*, 1992), ebenso im Darm sowie in der Niere (Fei *et al.*, 1995; Harvey *et al.*, 1993). In der Anwesenheit von Natrium- oder Lithiumionen weist die y^+L -Transportaktivität vergleichbare Affinitäten zu neutralen AS (z.B. L-Leucin, L-Methionin oder L-Glutamin) wie zu BAS auf. Die Transportaktivität von System y^+L wird im Gegensatz zum System y^+ nicht durch N-Ethylmaleimid (NEM)

inhibiert. Deshalb kann diese Substanz zur Unterscheidung der beiden Transportsysteme in intakten Zellen benutzt werden (Devés *et al.*, 1993).

Systeme b_1^+ und b_2^+

Die Transportsysteme b_1^+ und b_2^+ sind auch in Gegenwart von Natriumionen durch L-Homoserin und L-Leucin nicht hemmbar (Van Winkle und Campione, 1990). Sie besitzen eine im Vergleich zu den anderen BAS erhöhte Affinität zu L-Arginin, wohingegen das System y^+ keine Präferenz unter den BAS zeigt. Die Präferenz für L-Arginin ist ausgeprägter im System b_2^+ . Diese Transportaktivitäten wurden in unbefruchteten und befruchteten Eizellen der Maus beobachtet (Van Winkle und Campione, 1990).

System $b^{0,+}$

System $b^{0,+}$ besitzt zu basischen und neutralen AS die gleiche Affinität und transportiert sie Na^+ -unabhängig. Diese Transportaktivität wurde zuerst in Mäuseembryonen gefunden (Van Winkle *et al.*, 1988), danach aber auch im Dünndarm- und Nierentubulusepithel (Magagnin *et al.*, 1992).

System $B^{0,+}$

Das System $B^{0,+}$ repräsentiert das einzige Na^+ -abhängige Transportsystem für BAS (Van Winkle *et al.*, 1985). System $B^{0,+}$ -Aktivität ist in den gleichen Gewebe wie für System $b^{0,+}$ beschrieben worden. Seine Substratspezifität ähnelt der von System $b^{0,+}$ mit dem Unterschied, dass das System $B^{0,+}$ auch kleine neutrale AS (L-Alanin, L-Serin) und solche, die am α - und β -C-Atom verzweigt sind (z.B. 2-Amino[2,2,1] heptan-2-carboxylsäure (BCH)), transportiert.

1.2 Bedeutung der basischen Aminosäuren im Zellstoffwechsel

BAS sind an einer Vielzahl von Stoffwechsel-Prozessen beteiligt (Abb. 2). Für Säugetiere ist L-Lysin eine essentielle AS und wird ausschließlich als Baustein von Proteinen verwendet. L-Arginin zählt ebenso zu den so genannten proteinogenen AS, gilt aber als "semi-essentiell", da es im Körper durch die Enzyme des Harnstoffzyklus aus L-Ornithin über das Zwischenprodukt L-Citrullin synthetisiert werden kann. L-Ornithin wird seinerseits aus L-Arginin mit Hilfe von Arginasen gebildet oder durch *de novo*-Synthese ausgehend von der nicht essentiellen AS L-Glutamat hergestellt. Allerdings scheint die Neusynthese dieser basischen AS nicht ausreichend zu sein, um den Bedarf des Säuger-Organismus zu decken, vor allem in Situationen, in denen vermehrt BAS gebraucht werden, z.B. während Wachstums- oder Wundheilungsprozessen (Jenkinson *et al.*, 1996). L-Arginin fungiert als

Substrat für eine Familie dreier Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS I-III). Diese Enzyme katalysieren die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) aus L-Arginin. NO ist ein kurzlebiges, lipophiles, gasförmiges Radikal, das wichtige physiologische Wirkungen besitzt, so z.B. Vasodilatation, Neurotransmission und unspezifische Immunabwehr (Förstermann *et al.*, 1994; Förstermann *et al.*, 1995). L-Ornithin wird nicht in Proteine eingebaut, es ist allerdings die Vorstufe der proteinogenen AS L-Prolin oder von Polyaminen, die ihrerseits wichtige Regulatoren bei Zellwachstum und -differenzierung darstellen (Morgan, 1994).

Einige pathologische Zustände sind auf den Defekt von BAS-Transportern in der Plasmamembran zurückzuführen (Übersicht: Palacin *et al.*, 1998). Dazu zählen die Hartnup-Krankheit, die Cystinurie und die lysinurische Proteinintoleranz (LPI). Gekennzeichnet sind diese Krankheitsbilder durch eine Aminoazidurie, die auf einer Störung der tubulären Reabsorption von spezifischen AS beruht.

Bei der Hartnup-Krankheit handelt es sich um eine Stoffwechselstörung, bei der die Resorption von neutralen AS defekt ist. Charakteristisch für das Krankheitsbild sind ein Pellagra-ähnlicher, lichtsensitiver Hautausschlag, zerebelläre Ataxie und emotionale Instabilität (Baron *et al.*, 1956; Levy, 2001). Das Krankheitsbild der Cystinurie ist gekennzeichnet durch hohe Spiegel von Cystin und dibasischen AS im Urin (Tate, 1996; Palacin, 2000). Die LPI wird durch eine Mutation des Transporters für BAS γ^+ LAT1 hervorgerufen (Borsani *et al.*, 1999). Bei der LPI sind die klinischen Symptome Entwicklungsstörungen, Hepatomegalie, Osteoporose, Hyperammonämie, Nierenschädigungen und geistige Retardierung. Patienten mit LPI scheiden große Mengen von BAS, vornehmlich Lysin, mit dem Urin aus. Eine hohe Zufuhr von Proteinen kann Hyperammonämie und dadurch Übelkeit und Erbrechen hervorrufen. Dadurch kommt es meistens zu einer Aversion gegen Proteine (Palacin, 2000).

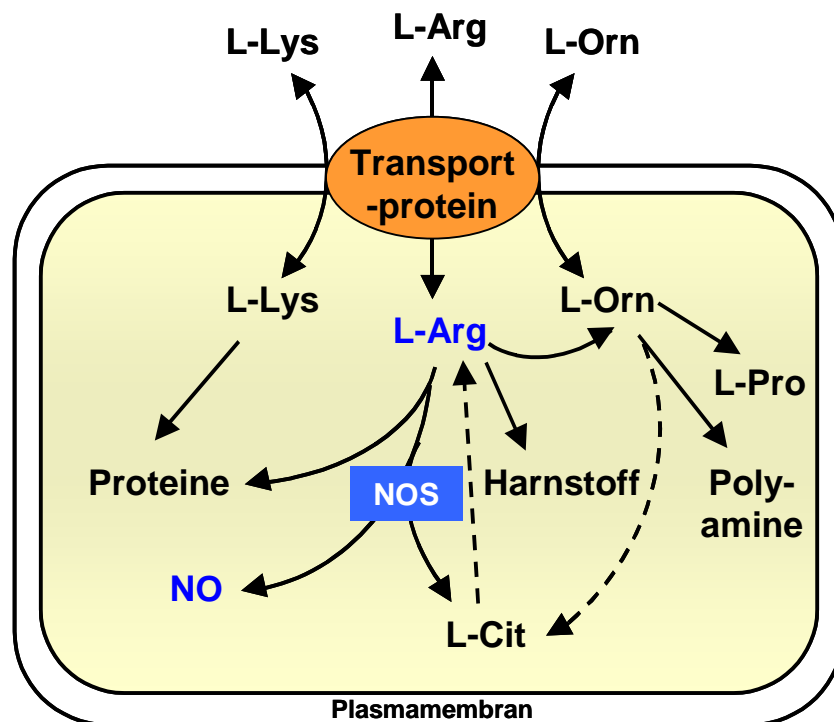


Abbildung 2: Beteiligung basischer AS an Stoffwechsel-Prozessen im Menschen

Die basischen AS L-Arg, L-Lys sowie L-Orn sind in der Zelle an einer Vielzahl von Stoffwechsel-Prozessen beteiligt. Sie passieren die Zellmembran über spezielle in der Plasmamembran von Säugerzellen exprimierte Transportproteine, so genannte Carrier. Die „semi-essentielle“ AS L-Arg hat vor allem eine große Bedeutung als Substrat der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS I-III). Dabei handelt es sich um Enzyme, die in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff unter Verwendung der Guanidinogruppe des L-Arginins Stickstoffmonoxid (NO) synthetisieren.

1.3 Carrier für basische Aminosäuren

1.3.1 Identifizierung der Transportproteine für basische Aminosäuren (CATs)

Innerhalb der vergangenen vierzehn Jahre wurden cDNAs aus Säugerzellen kloniert, die für vier der oben beschriebenen Transportsysteme für BAS kodieren. Zum einen handelt es sich um die Gruppe von Transportproteinen, die aufgrund ihrer Spezifität für BAS als cationic amino acid transporters, kurz CAT bezeichnet worden ist (System y^+) (Übersicht: Verrey *et al.*, 2003). Zum anderen handelt es sich um Glykoprotein-assoziierte AS-Transporter, auch leichte Ketten der hetero(di)meren AS-Transporter (HATs) genannt (Systeme y^+L , $b^{0,+}$). Die HATs kommen assoziiert mit den Glykoproteinen (schweren Ketten) 4F2hc (CD98) und rBAT (related to $b^{0,+}$ amino acid transporter) vor (Übersichten: Palacin *et al.*, 2000; Verrey *et al.*, 2003). Die schweren Ketten sind über eine Disulfidbrücke zu den leichten Ketten kovalent gebunden. Die leichten Ketten besitzen 12 putative Transmembran-Domänen (TM) und

zeigen ca. 25% Identität in der AS-Sequenz zu der CAT-Familie. Diese beiden Gruppen werden in der Genbank zur Familie der Carrierproteine SLC7 (für solute carrier family 7) eingeordnet. Weiterhin wurde das Protein ATB(0,+) kloniert, das dem Transport-System B^{0,+} zugeordnet wird (Van Winkle *et al.*, 1985). Die CAT-Familie ist Hauptgegenstand der vorliegenden Arbeit und wird im Folgenden im Detail dargestellt.

Bis heute sind insgesamt vier unterschiedliche Isoformen der CAT-Proteinfamilie gefunden worden (s. Tab. 1). Das erste Mitglied dieser Proteinfamilie wurde bei der Erforschung der retroviralen Infektion entdeckt. Ekotrope murine Leukämieviren (MuLV) können ausschließlich Zellen von Mäusen und verwandten Nagetieren infizieren. Albritton und Mitarbeiter machten sich diese enge Wirtsspezifität zunutze und transfizierten genomische DNA von Mäusezellen in menschliche Zellen und erhielten so eine menschliche Zelllinie, die durch ekotrope MuLV infizierbar ist. Diese Zelllinie erlaubte die Isolierung einer cDNA, die für den Rezeptor für ekotrope MuLV kodiert (Albritton *et al.*, 1989). Aus der Analyse des offenen Leserahmens dieser cDNA leitet sich ein Protein ab, das aus 622 AS besteht, woraus sich ein Molekulargewicht von 67 Kilodalton (kDa) errechnet. Es handelt sich um ein integrales Membranprotein mit 12 - 14 möglichen TM. Ähnlichkeiten zwischen den Sekundärstrukturen des Rezeptorproteins und der L-Histidin- bzw. L-Arginin-Permease aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wiesen auf eine mögliche zelluläre Funktion als Transportprotein hin (Kim *et al.*, 1991). Expression des MuLV Rezeptors in Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) mit nachfolgenden Aufnahmestudien radioaktiv markierter Substanzen zeigten, dass der Rezeptor einen Na⁺-unabhängigen Transport kationischer AS vermittelt (Kim *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1991). Damit wurde der Rezeptor in mCAT-1 (mouse cationic amino acid transporter) umbenannt. Northern-Blot-Analysen zeigten, dass der Transporter mit Ausnahme der Leber ubiquitär exprimiert wird (Kim *et al.*, 1991). Nach partieller Hepatektomie wird CAT-1-mRNA jedoch für 2h in der Leber exprimiert und kann zusätzlich durch Hormone (Insulin, Glukokortikoide) induziert werden (Wu *et al.* 1994, Liu und Hatzoglou, 1998).

Auf der Suche nach Genen, die in der T-Zell-Funktion bei der Entstehung von Tumoren eine Rolle spielen, wurde ein Fragment einer zu mCAT-1 homologen cDNA isoliert (Tea, für T-cell early-activation gene) (MacLeod *et al.*, 1990; Reizer *et al.*, 1993). Neben der Expression von Tea in aktivierten T-Zellen wurde die mRNA auch in der Leber gefunden. Das Tea-Fragment wurde genutzt, um die vollständige cDNA aus der Leber bzw. aus aktivierten Makrophagen zu klonieren (Closs *et al.*, 1993a; Closs *et al.*, 1993b; Reizer *et al.*, 1993; Kavanaugh *et al.* 1994). Die Sequenzen der beiden cDNAs, die dabei gefunden wurden,

Tabelle 1: Die Familie der kationischen AS-Transporter (CAT)

Protein-Name	Genbank-Name	Spezies	Weitere Bezeichnungen (versch. Spezies)	Substrate	Referenzen
CAT-1	SLC7A1	h, m, r	EcoR, ERR, MLV-R, ATRC1, H13, y1+	L-Arg, L-Lys, L-Orn	Albritton <i>et al.</i> , 1989; Yoshimoto <i>et al.</i> , 1991; Albritton <i>et al.</i> , 1992; Closs <i>et al.</i> , 1997
CAT-2A	SLC7A2A	h, m, r	CAT-2a, CAT-2 α , y2+	L-Arg, L-Lys, L-Orn	Closs <i>et al.</i> , 1993a; Closs <i>et al.</i> , 1997; Schwartz <i>et al.</i> , 2002
CAT-2B	SLC7A2B	h, m, r	CAT-2, ATRC2, Tea, CAT-2 β	L-Arg, L-Lys, L-Orn	Reizer <i>et al.</i> , 1993; Closs <i>et al.</i> , 1993b; Hoshida <i>et al.</i> , 1996; Closs <i>et al.</i> , 1997; Schwartz <i>et al.</i> , 2002
CAT-3	SLC7A3	h, m, r		L-Arg, L-Lys, L-Orn	Ito und Groudine, 1997; Hosokawa <i>et al.</i> , 1997; Vékony <i>et al.</i> , 2001
(CAT-4)	SLC7A4	h		unbekannt	Sperandeo <i>et al.</i> , 1998; Wolf <i>et al.</i> , 2002

Bei SLC7A4 (CAT-4) ist die Zugehörigkeit zu der CAT-Familie noch nicht ganz geklärt (s. 1.3.4). Spezies: Mensch (h), Maus (m) oder Ratte (r).

sind bis auf 20 AS-Reste in einem Bereich von 42 AS in der vierten intrazellulären Schleife und Teile der TM IX (nach dem 14 TM-Modell) identisch. Dieser Bereich enthält die Domäne, die für die Substrataffinität bestimmend ist („funktionelle Domäne“, Closs *et al.*, 1993b). Die Expression der entsprechenden cRNAs in *X. laevis*-Oozyten zeigte, dass beide Proteine die Aufnahme von BAS vermitteln (Closs *et al.*, 1993a, Closs *et al.*, 1993b, Kakuda *et al.*, 1993). Die Transporter wurden mCAT-2A (Isoform aus der Leber) und mCAT-2B (Isoform aus T-Zellen bzw. Makrophagen) genannt. Die von den cDNAs kodierten Proteine bestehen aus 658 bzw. 659 AS. Die beiden Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen der primären Transkripte von einem Gen (Closs *et al.*, 1993a; Kavanaugh *et al.*, 1994). Vergleicht man die AS-Sequenzen der mCAT-2 Isoformen mit der mCAT-1-Sequenz, so ergibt sich eine 60%ige Identität.

Die vierte Isoform (CAT3) wurde durch Absuchen einer cDNA-Bank aus dem Gehirn der Ratte mit einer mCAT-1-Sonde gefunden (Hosokawa *et al.*, 1997). Das murine Homolog wurde kurze Zeit später aus einer cDNA-Bank aus embryonalem Mesoderm isoliert (Ito und Groudine, 1997). CAT-3 aus Ratte und Maus zeigen 53-58%ige Identität in der AS-Sequenz zu CAT-1, CAT-2A und CAT-2B.

1.3.2 Transporteigenschaften der murinen CAT-Proteine (mCATs)

Proteine mit einer oder mehreren TM sind meist toxisch für Bakterien, daher ist eine Expression der CAT-Proteine in Bakterien nicht möglich. In Säugerzellen ist eine Überexpression nur in begrenztem Maß möglich. Somit werden die Transporteigenschaften der CAT-Proteine zumeist mit Hilfe von *X. laevis*-Oozyten untersucht. Die Oozyten können sehr gut mit einer zur Expression in Oozyten geeigneten cRNA oder mRNA injiziert werden (s. 4.1.3). Sie synthetisieren große Mengen an Protein und sind zudem imstande diese posttranslational zu modifizieren. Außerdem können sie Membranproteine in die Plasmamembran integrieren. Für die Transportstudien wird entweder radioaktiv markiertes Substrat eingesetzt oder bei elektrogenem Transport auch elektrophysiologische Messmethoden, insbesondere die two-electrode voltage clamp (TEVC)-Methode (s. Methoden 4.2.1) angewendet.

Alle mCAT-Isoformen sind spezifisch für BAS. Mit mCAT-cRNA injizierte Oozyten können aber auch kleine neutrale AS wie L-Cystein und L-Homoserin mit niedriger Affinität transportieren (Wang *et al.*, 1991). mCAT-1, -2B, und -3 zeigen Transportaktivitäten, die mit der Aktivität von System y^+ übereinstimmen. Der Transport von BAS ist Na^+ -unabhängig mit K_M -Werten zwischen 70 und $250\mu\text{M}$ und für diese drei Isoformen transstimulierbar (Closs *et al.*, 1997; Ito und Groudine, 1997). Dagegen zeigt mCAT-2A eine 10-fach niedrigere Affinität (K_M -Werte zwischen 2,1 und $5,20\text{mM}$), aber eine 2- bis 6-fach höhere V_{max} . Der L-Arginin-Transport ist bei mCAT-2A nur schwach transstimulierbar (Closs *et al.*, 1993a).

Mit Hilfe der TEVC-Methode wurde gezeigt, dass der L-Arginin-Transport an mCAT-1-, -2A- und -2B-exprimierenden Oozyten elektrogen ist (Wang *et al.*, 1991; Kavanaugh, 1993; Kavanaugh *et al.*, 1994). Die Zugabe von BAS führt in spannungsgeklemmten mCAT-injizierten Oozyten zu einem einwärtsgerichteten Strom, der konzentrations- und membranpotentialabhängig ist. Der L-Arginin-Einstrom in mCAT-1-exprimierenden Oozyten nimmt exponentiell mit steigender Hyperpolarisation der Oozyten zu, ohne eine Sättigung zu erreichen (Messung bis -180mV). Mit steigender Hyperpolarisation nehmen die K_M -Werte ab, während V_{max} zunimmt. Kavanaugh *et al.* konnten außerdem beobachten, dass die Expression der mCAT-Isoformen in Oozyten zu einer Veränderung des Membranpotentials führt (Kavanaugh *et al.*, 1994).

1.3.3 Die Familie humaner CAT-Proteine (hCATs)

Neben den anfangs beschriebenen hCAT-1, -2A und -2B (Closs *et al.*, 1997) ist nun vor kurzer Zeit das vierte Mitglied der Familie, hCAT-3 identifiziert und beschrieben worden (Vékony *et al.*, 2001). Weiterhin wurde auch ein verwandter Transporter anhand der Homologie zu den anderen hCAT-Isoformen (s. Tab. 2) identifiziert und als SLC7A4 (hCAT-4) bezeichnet (Sperandeo *et al.*, 1998). Seine Funktion ist aber noch ungeklärt (Wolf *et al.*, 2002).

hCAT-1

Zwei Arbeitsgruppen isolierten cDNAs, die für das menschliche Homolog zu mCAT-1 kodieren (Yoshimoto *et al.*, 1991; Albritton *et al.*, 1992). Albritton *et al.* zeigten die chromosomale Lokalisation des Gens auf Chromosom 13. Yoshimoto *et al.* und Albritton *et al.* zeigten neben Northern-Blot-Analysen, die eine ubiquitäre Expression der hCAT-1-RNA demonstrierten, die Nukleotidsequenz, aus der sich ein Protein von 629 AS (67 kDa) ableitet, das zu 87,6% identisch zur mCAT-1 Sequenz ist. Im Bereich der „funktionellen Domäne“, findet man 7 unterschiedliche AS beim Vergleich von hCAT-1 und mCAT-1.

hCAT-2A und -2B

In unserer Arbeitsgruppe wurden cDNAs kloniert, die für die humanen Homologe zu mCAT-2A und mCAT-2B kodieren (Closs *et al.*, 1997). hCAT-2A wurde aus einer humanen Leber-cDNA-Bibliothek isoliert, die humane Hepatom-Zelllinie HepG2 diente als Ausgangsmaterial für die Klonierung von hCAT-2B. Aus den offenen Leserahmen resultierten Proteine von 657 bzw. 658 AS. Aus einem Sequenzvergleich mit den mCAT-Proteinen ergab sich eine 90%ige Übereinstimmung. Die humanen CAT-Proteine unterscheiden sich ebenso wie ihre murinen Homologe nur durch 20 AS, die in einem Abschnitt von 42 AS liegen. In diesem Bereich unterscheiden sich hCAT-2A und hCAT-2B in je einer AS von dem jeweils entsprechenden murinen Protein.

hCAT-3

Auch der zu mCAT-3 und rCAT-3 Orthologe hCAT-3 wurde in unserer Arbeitsgruppe kloniert (Vékony *et al.*, 2001). Das hCAT-3-Protein besteht aus 619 AS. Die AS-Sequenz von hCAT-3 zeigt eine 83,4%ige und 82%ige Übereinstimmung, jeweils zu rCAT-3 und mCAT-3. Transportstudien ergaben, dass hCAT-3 in Bezug auf Substrataffinität und Empfindlichkeit gegenüber Transstimulierung am meisten dem induzierbaren hCAT-2B ähnelte.

Tabelle 2: Sequenzvergleich zwischen den humanen CAT-Proteinen (nach Closs und Mann, 1999)

	hCAT-1	hCAT-2A	hCAT-2B	hCAT-3	SLC7A4 (hCAT-4)
hCAT-1	—	60	62	61	41
hCAT-2A	54	—	96	58	42
hCAT-2B	83	50	—	59	41
hCAT-3	71	52	71	—	42
SLC7A4 (hCAT-4)	51	52	43	43	—

Vergleich der AS-Sequenzen der vier humanen CAT-Isoformen und SLC7A4 (hCAT-4). Die fett gedruckten Zahlen geben den Prozentsatz an identischen AS-Resten nach einer optimalen Ausrichtung der vollständigen AS-Sequenz an. Die nicht fett gedruckten Zahlen geben die Identität in Prozent nach einer optimalen Ausrichtung der kurzen AS-Sequenz, in der hCAT-2A sich von -2B unterscheidet, an.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu CAT-3 aus Maus und Ratte, für die sehr geringe Transportaktivitäten gezeigt worden waren und die auch mit neutralen und sauren AS sowie mit D-Arginin interagieren sollen (Hosokawa *et al.*, 1997; Ito und Groudine, 1997). Außerdem war die Expression von CAT-3 in erwachsenen Ratten und Mäusen ausschließlich in zentralen Neuronen gefunden worden. Die Expression des hCAT-3 war dagegen nicht auf das Gehirn beschränkt. Die weitaus stärkste Expression von hCAT-3 fand sich im Thymus, aber auch andere periphere Gewebe wiesen eine gleich hohe oder höhere Expression von hCAT-3 auf als die meisten Hirnareale. Dies zeigt, dass hCAT-3 kein neuronspezifischer Transporter ist.

SLC7A4 (hCAT-4)

SLC7A4, das auch als hCAT-4 bezeichnete Protein weist signifikante Homologien zu den CAT-Proteinen auf (Sperandeo *et al.*, 1998) (s. Tab. 2). Die AS-Sequenz kodiert für ein Protein aus 636 AS mit einem errechneten Molekulargewicht von 68kDa. Allerdings ist für dieses Protein bisher noch keine überzeugende Transportaktivität gezeigt worden. Eine endogene Expression von SLC7A4 wurde in NT2 Teratokarzinom-Zellen gefunden, die mit Retinsäure behandelt wurden. Doch auch für den endogen exprimierten SLC7A4 konnte keine Transportaktivität für L-Arginin gezeigt werden (Wolf *et al.*, 2002). Die fehlende Transportaktivität von SLC7A4 war nicht auf eine fehlende Expression des Proteins an der Plasmamembran zurückzuführen, da mit Hilfe von Konstrukten zwischen SLC7A4 und dem verstärkt grün fluoreszierenden Protein EGFP die Lokalisation von SLC7A4.EGFP an der Oberfläche von *X. laevis*-Oozyten und U373MG Glioblastom-Zellen gezeigt werden konnte.

Anscheinend reicht die Expression von SLC7A4 in der Plasmamembran nicht aus, um eine Transportaktivität für AS zu induzieren. SLC7A4 benötigt daher wahrscheinlich zusätzliche (Protein-)Faktoren, um funktionell zu sein.

1.3.4 Transporteigenschaften der hCAT-Proteine

Die Substratspezifität der vier hCAT-Isoformen ist fast identisch. Sie vermitteln stereoselektiv, Na^+ - und pH-unabhängig (hCAT-2A und -2B leicht pH-abhängig) den Transport von kationischen L-AS (Closs *et al.*, 1997; Vékony *et al.*, 2001). Interaktionen der hCATs mit neutralen AS, wie für die mCATs, sind bis jetzt nicht gezeigt worden. Die humanen CAT-Proteine lassen sich anhand ihrer Transporteigenschaften unterscheiden. Tab. 3 fasst die Transporteigenschaften der hCAT-Proteine zusammen. Ähnlich zu den mCAT- und rCAT-Homologen weisen hCAT-1, -2B und -3 System γ^+ -Aktivität auf, wohingegen sich hCAT-2A davon deutlich unterscheidet.

Aus L-Arginin-Aufnahmestudien und elektrophysiologischen Studien an hCAT-exprimierenden Oozyten sind K_M sowie V_{\max} der hCAT-Proteine ermittelt worden. Die in der Literatur berechneten K_M -Werte für den L-Arginin-Transport zeigen, dass hCAT-1 die höchste Affinität besitzt. Für hCAT-2B und hCAT-3 wurde eine etwas geringere Affinität als für hCAT-1 ermittelt. hCAT-2A-exprimierende Oozyten zeigen dagegen 10-fach höhere K_M -Werte. Für den Transport von L-Lysin sowie L-Ornithin durch die einzelnen hCAT-Isoformen ergeben sich vergleichbare K_M -Werte (Closs *et al.*, 1997; Vékony *et al.*, 2001). Ein weiterer Parameter zur Unterscheidung der CAT-Proteine ist die Transstimulierung. Bei physiologischen Konzentrationen von 0,25mM L-Arginin (*trans*-Substrat) wurde die Transportaktivität von hCAT-1 um das 10-fache erhöht, gegenüber der Situation, in der sich keine BAS auf der *trans*-Seite der Membran befanden. Auch hCAT-2B und -3 zeigten eine 2-fache Transstimulierung. hCAT-2A zeigte dagegen keine Transstimulierung (Closs *et al.*, 1997; Vékony *et al.*, 2001).

Für die Isoformen hCAT-2A und -2B wurde mit Hilfe der TEVC-Methode, wie zuvor bei den mCATs dargestellt, ein elektrogener Transport von BAS gezeigt (Nawrath *et al.*, 2000). Die Zugabe von L-Arginin führte auch bei den hCAT-Isoformen zu einem Einwärtsstrom, der konzentrations- und membranpotentialabhängig war. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden hCAT-2-Isoformen wurde aber in ihrer Leitfähigkeit für L-Arginin gefunden. Während bei hCAT-2A die L-Arginin-Zugabe zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit führte, konnte für hCAT-2B nur eine Verschiebung des Umkehrpotentials zu positiveren Werten ohne Zunahme der Leitfähigkeit gezeigt werden. Elektrophysiologisch

konnten die durch radioaktive Aufnahme ermittelten kinetischen Parameter für beide Isoformen bestätigt werden, jedoch zeigten hCAT-2A-injizierte Oozyten bei -60mV eine höhere Affinität. Diese Diskrepanz kann nur mit der Membranpotentialabhängigkeit des hCAT-2A-Proteins erklärt werden und weist darauf hin, dass das Membranpotential bei der Bestimmung der K_M -Werte durch radioaktive Aufnahmen positiver als -60mV gewesen sein muss (Nawrath *et al.*, 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch die Expression von hCAT-2A und -2B das Membranpotential der Oozyten verändert wurde. Mit BAS beladene hCAT-injizierte Oozyten zeigten im Vergleich zu H_2O -injizierten Kontroll-Oozyten ein hyperpolarisiertes Membranpotential. Diese zusätzlich zum K^+ -Diffusionspotential vorhandene Membranpotential-Komponente wurde durch die Zugabe sättigender Konzentrationen von L-Arginin aufgehoben. Eine weitere Beobachtung aus den Untersuchungen von Nawrath *et al.* betrifft die Anwesenheit von unspezifischen Strömen (Leck-Ströme) in Abwesenheit von BAS durch die Expression von hCAT-2A und -2B in *X. laevis*-Oozyten. Ob diese Leck-Ströme womöglich mit einer CAT-induzierten Expression eines weiteren Proteins (Kanal oder Transporter) zusammenhängen oder direkt durch die CAT-Proteine vermittelt werden, ist noch ungeklärt, ebenso wie die Frage nach den hierfür verantwortlichen Ionen. Daher gilt es als eines der Ziele der vorliegenden Arbeit, dieses Phänomen zu untersuchen. hCAT-1 und -3 waren bisher elektrophysiologisch noch nicht untersucht worden.

Tabelle 3: Vergleich der Transporteigenschaften der hCAT-Proteine

Transporter	K_M (mM L-Arg)		V_{\max}		Trans- stimulation ^a
	L-[³ H]Arg- Aufnahme	TEVC bei -60mV	(nmol L-Arg/ Oozyte/h)	(nA)	
	L-[³ H]Arg- Aufnahme	TEVC bei -60mV	L-[³ H]Arg- Aufnahme	TEVC bei -60mV	
hCAT-1[*]	0,11-0,16	n.b.	1,6-1,8	n.b.	9,8
hCAT-2A[*]	3,36-3,90	0,97 [‡]	2,2-8,4	-84 [‡]	1,1
hCAT-2B[*]	0,32-0,73	0,13 [‡]	1,2-4,0	-194 [‡]	1,8
hCAT-3[#]	0,45	n.b.	1,4	n.b.	2,0

^{*}) Daten aus Closs *et al.*, 1997; [#]) Daten aus Vékony *et al.*, 2001; [‡]) Daten aus Nawrath *et al.*, 2000
^a) Transportaktivität in $0,25\text{mM}$ versus 0 trans-Substrat; n.b.) nicht bestimmt; TEVC) two-electrode voltage clamp

Ein Vergleich der maximalen Transportgeschwindigkeiten der hCAT-Proteine zeigt, dass hCAT-2A eine recht hohe Transportkapazität gegenüber hCAT-1, -2B und -3 hat. Bei der Angabe der V_{\max} -Werte ist zu bedenken, dass sich die Werte auf eine CAT-exprimierende Oozyte beziehen und die Menge an exprimiertem Protein nicht berücksichtigen. Weiterhin konnten Closs *et al.* in HPLC- und radioaktiven Aufnahme-Studien zeigen, dass hCAT-1, -2A und -2B nach 6h Inkubation mit 10mM L-Arginin unterschiedliche Mengen an Substrat in den Oozyten akkumulieren (Closs *et al.*, 1997). hCAT-2A-exprimierende Oozyten akkumulierten eine 10-fach bzw. 2-fach höhere Menge an L-Arginin als jeweils hCAT-1- bzw. hCAT-2B-exprimierende Oozyten. Diese Unterschiede wurden auf die differierenden Affinitäten und die Transstimulierbarkeit der hCAT-Isoformen zurückgeführt, die bewirken, dass die L-Arginin-Akkumulation unterschiedliche intrazelluläre Konzentrationen erreichte.

1.3.5 Regulation der CAT-Proteine

Die Regulation der CAT-Proteine ist vor allem am ubiquitär exprimierten CAT-1 untersucht worden. Für rCAT-1 ist eine komplexe transkriptionelle wie auch translationale Regulation gezeigt worden (Yaman *et al.*, 2003). Wie von mehreren Gruppen berichtet worden ist, kann die CAT-1-Aktivität auch auf der posttranslationalen Ebene reguliert werden (Übersicht: Closs, 2002). Posttranslationale Modifikationen führen zu einer enormen Steigerung der Komplexität der Proteome im Vergleich zum Genom. Die am häufigsten vorkommenden posttranslationalen Modifikationen von Proteinen sind Glykosylierungen und Phosphorylierungen.

Glykosylierung der CAT-Proteine

Bei der Anordnung der CAT-Proteine in der Membran geht man von 12 bis 14 TM aus, die durch kurze hydrophile Schleifen verbunden sind. Dabei liegt sowohl der N- als auch der C-Terminus intrazellulär (Closs, 1996). Die AS-Sequenzen von hCAT-1, -2A und -2B weisen nach dem 14 TM-Modell je zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen, hCAT-3 nur eine Glykosylierungsstelle auf, die in der dritten extrazellulären Schleife liegen. Zudem besitzen hCAT-2A und -2B noch eine putative Glykosylierungsstelle in der zweiten extrazellulären Schleife, während die Sequenz von hCAT-1 eine weitere Glykosylierungsstelle in der vierten extrazellulären Schleife aufweist (Abb. 3A).

Phosphorylierung der CAT-Proteine

Die posttranslationale Phosphorylierung von Proteinen stellt eines der wichtigsten Regulationsmittel höherer Zellen dar. Nahezu alle biologischen Prozesse, von der Regulation metabolischer Prozesse wie des Zucker- und Fettstoffwechsels, über die Weiterleitung

und Verarbeitung hormoneller Signale, die Regulation der Genexpression, bis hin zur Wachstumskontrolle und zur Informationsverarbeitung im Nervensystem werden durch Phosphorylierung reguliert oder beeinflusst. Ein wesentliches Kennzeichen dieses Regulationsprinzips ist die Reversibilität. Durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung eines Proteins lässt sich zwischen verschiedenen Funktionszuständen "hin- und herschalten". Entsprechend der vielfältigen Aufgaben gibt es eine große Anzahl an Proteinkinasen, die diese Prozesse steuern. Das menschliche Genom kodiert für ca. 530 verschiedene Kinasen, wobei die Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinasen, zu denen die Proteinkinasen A (PKA) und C (PKC) gehören, die meist untersuchte Gruppe darstellen (Übersicht zu PKC: Toker, 1998). Die Aktivierung der PKC reguliert die Aktivität einer Vielzahl von Transportproteinen direkt oder auch indirekt, z. B. des GABA-Transporters GAT1, des Dopamin-Transporters DAT oder des Glutamat-Transporters GLAST-1 (Corey *et al.*, 1994, Huff *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1997; Conradt und Stoffel, 1997).

Für hCAT-1 konnten Gräf *et al.* eine Abnahme der Transportaktivität nach PKC-Aktivierung, sowohl in *X. laevis*-Oozyten, als auch in humanen endothelialen EA.hy 926 Zellen zeigen (Gräf *et al.*, 2001). Die Reduktion der Transportaktivität wurde nicht von einer Verminderung der Gesamtprotein-Expression begleitet. Weiterhin konnte von Krotova *et al.* gezeigt werden, dass die klassischen PKC-Isoformen, mit großer Wahrscheinlichkeit PKC α , für die Reduktion der hCAT-1-Transportaktivität verantwortlich sind (Krotova *et al.*, 2003). Von anderen Arbeitsgruppen konnte auch eine PKC-vermittelte Erhöhung der L-Arginin-Aufnahme in intestinalen Caco-2 Epithelzellen und in Peritonealmakrophagen beobachtet werden (Pan und Stevens, 1995; Hortelano *et al.*, 1993).

Vergleicht man das Vorkommen des Sequenzmotivs für eine Phosphorylierung durch PKC (RXXS/TXRX, wobei X für eine beliebige AS steht) bei den CATs, so ist auffällig, dass die humanen CAT-Proteine mit den CAT-Proteinen von Maus und Ratte konservierte putative PKC-Erkennungsstellen aufweisen (Gräf, 1998). Die putativen Phosphorylierungsstellen der einzelnen hCAT-Proteine sind in Abb. 3B zusammengefasst. Es fällt auf, dass eine Phosphorylierungsstelle in den Isoformen hCAT-1 (AS 476), -2A und -2B (beide AS 474) konserviert ist. Dieser Sequenzbereich liegt in der fünften intrazellulären Schleife und wäre somit ein möglicher Kandidat für eine Phosphorylierung durch die PKC. Eine weitere konservierte PKC-Erkennungsstelle zwischen den Isoformen hCAT-2A, -2B und -3 befindet sich in unmittelbarer Nähe der erstgenannten. hCAT-1 könnte außerdem in der sechsten intrazellulär gelegenen Schleife, hCAT-2A an einer im Bereich der „funktionellen Domäne“ und hCAT-3 an einer am C-Terminus befindlichen putativen

PKC-Erkennungsstelle phosphoryliert werden. Die in der dritten extrazellulären Schleife der hCAT-1-, -2A- und -2B-Proteine gelegenen putativen PKC-Erkennungsstellen spielen aufgrund ihrer Lokalisation wahrscheinlich für eine Phosphorylierung keine Rolle.

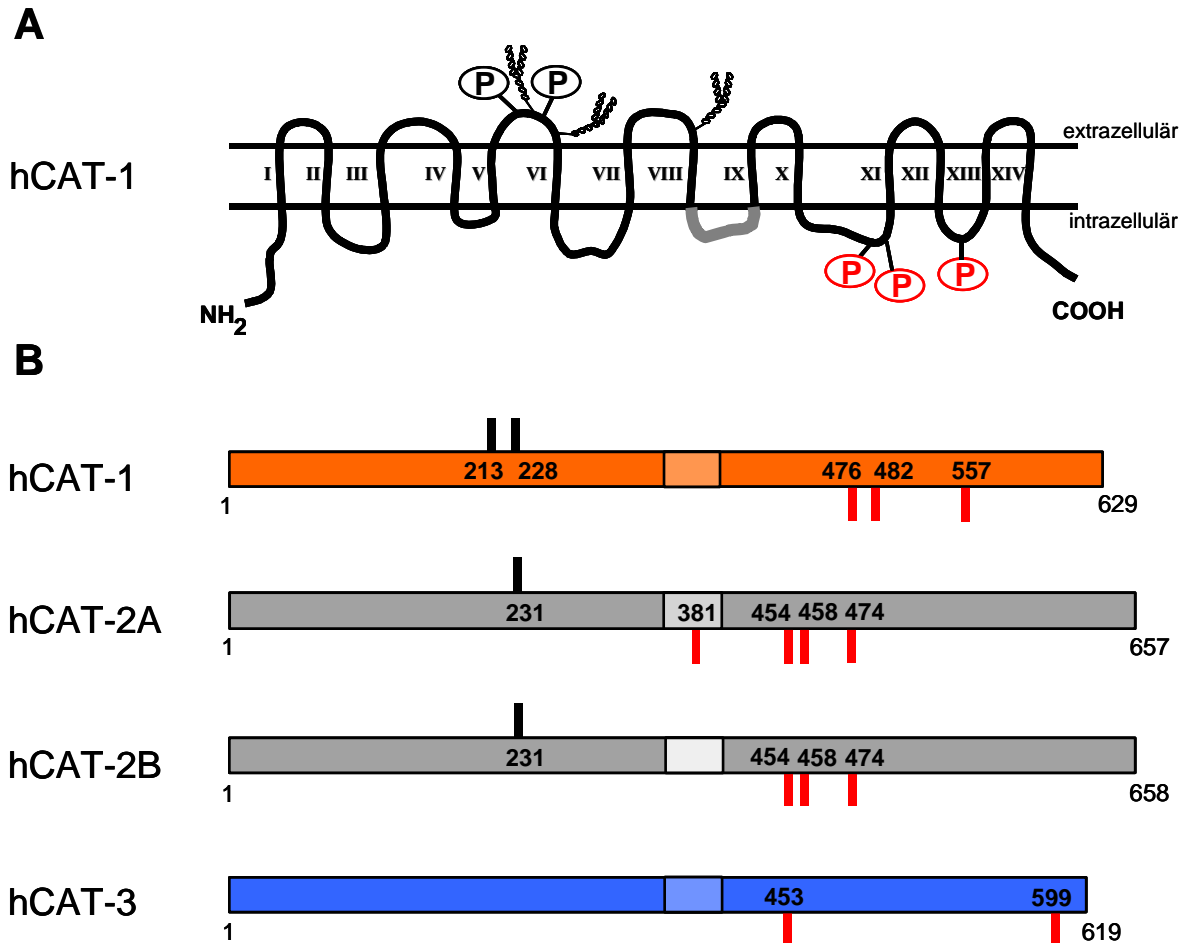


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Struktur der humanen hCAT-Proteine mit potentiellen PKC-Erkennungsstellen und Glykosylierungsstellen

A) Modell zur Struktur der hCAT-Proteine am Beispiel von hCAT-1 mit 14 TM-Modell. NH₂- und COOH-Termini liegen intrazellulär. Die potentiellen PKC-Phosphorylierungsstellen sind mit P-Symbolen gekennzeichnet (in rot die PKC-Erkennungsstellen, die intrazellulär liegen). Die geästelten Gebilde in der dritten und vierten extrazellulären Schleife stellen potentielle N-Glykosylierungsstellen dar.

B) Die vier hCAT-Proteine sind jeweils schematisch als Balken dargestellt. Die putativen PKC-Phosphorylierungsstellen sind als kleine Balken eingezeichnet und die jeweiligen AS-Positionen angegeben: fünf bei hCAT-1 und -2A, vier bei hCAT-2B und zwei bei hCAT-3, wobei intrazellulär bzw. extrazellulär liegende PKC-Erkennungsstellen jeweils nach unten und rot bzw. nach oben und schwarz gezeichnet sind. Ein Bereich von 40 AS in der vierten intrazellulären Schleife (als helles Rechteck dargestellt und in Teilabb. A grau hervorgehoben) stellt die putative „funktionelle Domäne“ dar. hCAT-2A unterscheidet sich hier in 20 AS von hCAT-2B.

2. Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich hauptsächlich mit dem kationischen Aminosäure-Transporter hCAT-1. Dieser Transporter wird mit Ausnahme der Leber ubiquitär in humanen Zellen exprimiert und ist daher mit großer Wahrscheinlichkeit der wichtigste Transporter für die Versorgung humaner Zellen mit basischen Aminosäuren (BAS). Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte hCAT-1 im Vergleich zu Isoformen hCAT-2A und -2B mit Hilfe von elektrophysiologischen Untersuchungsmethoden weiterführend charakterisiert werden. Im zweiten Teil der Arbeit sollte der Mechanismus der PKC-vermittelten Hemmung der hCAT-1-Transportaktivität gefunden werden.

Elektrophysiologische Charakterisierung des hCAT-1

Der Einfluss des Membranpotentials auf den Transport und die Verteilung von BAS sollte in hCAT-1-exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten analysiert werden. Außerdem sollten hCAT-1-vermittelte transmembranäre L-Arginin-Ströme mit Hilfe der two-electrode voltage clamp-Methode (s. 4.1.3) charakterisiert werden. Hierbei sollten die Eigenschaften von hCAT-1 zu Isoformen hCAT-2A und -2B verglichen werden. Weiterhin sollten die zuvor von Nawrath *et al.* beobachteten, durch hCAT-2A- und -2B-vermittelten unspezifischen Ionenströme in Abwesenheit von BAS, so genannte Leck-Ströme, an den hCAT-Isoformen untersucht werden (Nawrath *et al.*, 2000). Die hierfür verantwortlichen Ionen sollten herausgefunden werden.

Zur Regulation von hCAT-1 durch die PKC

Um den Mechanismus der PKC-vermittelten Inhibition der hCAT-1 Transportaktivität näher zu beleuchten, sollte der Einfluss der PKC-Aktivierung auf die Zelloberflächenexpression von hCAT-1 untersucht werden. Hierfür sollten Fusionsproteine zwischen hCAT-1 und dem verstärkt grün fluoreszierenden Protein (EGFP) in *X. laevis*-Oozyten und humanen Zellen exprimiert werden. Mit Hilfe konfokaler Mikroskopie sollten hiermit eventuelle Änderungen der subzellulären Lokalisation von hCAT-1 nach PKC-Aktivierung visualisiert werden. Durch Biotinylierung der Zelloberflächenproteine und anschließender Western-Blot-Analyse sollten eventuelle hCAT-1-Expressionsänderungen an der Zelloberfläche quantifiziert werden. Anhand von Transportstudien mit radioaktiv markiertem L-Arginin sollte der Effekt der PKC-Aktivierung auf die Transportaktivität sowohl des überexprimierten, als auch des endogenen hCAT-1 untersucht und miteinander verglichen werden.

Um die Frage zu klären, ob die PKC-vermittelte Regulation des hCAT-1 Zelltypspezifisch ist, sollte außerdem der Einfluss der PKC-Aktivierung auf die hCAT-1-Transportaktivität in verschiedenen humanen Zelllinien untersucht werden.

Weiterhin sollte die Frage beantwortet werden, ob die PKC direkt das hCAT-1-Protein phosphoryliert. Dazu sollte Transport und subzelluläre Verteilung einer hCAT-1-Mutante untersucht werden, in der alle putativen PKC-Erkennungsstellen durch Mutagenese entfernt wurden.

3. Materialien

3.1 Laborgeräte

β-Strahlen-Zähler	Tri-Carb 1600 CA Liquid Scintillation Analyzer (Packard)
Begasungsbrutschränke	Function Line (5 und 10% CO ₂) (Heraeus)
Binokular	Leica GZ 6 (Leica)
Digitalkamera	Nikon DXM1200 digital camera (Nikon)
Filmkassetten mit Screen	Biomax MS Intensifying Screen (Amersham)
Fluoreszenzmikroskop	Leitz DMRB (Leica)
Gelelektrophoresekammern	Mini-Protean [®] & Protean [®] II Xi (Bio-Rad)
Geltrockner	Modell 543 und 583 Gel Dryer (Bio-Rad)
Gleichstromquelle	Power Pac 3000 (Bio-Rad)
Heizplatte mit Magnetrührer	Ikamag [®] RCT (Janke & Kunkel)
Hochgeschwindigkeitszentrifugen	J2-MC mit Rotoren JS13.1 und JA14; Avanti [™] J-30I mit Rotoren JA25.50 und JLA16.250 (Beckmann)
Kaltlichtquelle	KL 1500 electronic (Schott)
Kapillarziehmaschine	Eigenbau (Werkstatt des Pharmakologischen Institutes)
Kreisschüttler	KS 250 basic und KS 501 digital (Janke & Kunkel); Heidolph UNIMAX 1010 (Heidolph)
Kryostat	Cryocut 1800 V 1.3 D (Leica Instruments, Jung)
Kühlfalle	Refrigerated Vapor Trap RVT 100 (Bio-Rad)
Kühlgerät	UKS 3602 (Liebherr)
Kühlschrank (18 °C)	7080900 (Liebherr)
Kühlzentrifuge	Megafuge 1.0 R (Heraeus)
Laborwaage	Sartorius (Werner Wolfinger)
Mikrobiologische Brutschränke	WTC binder (Janke & Kunkel)
Mikrotiterplatten-Photometer	EL 340 Biokinetics Reader (BIOTEK [™] Instruments)

Molecular Imager	GS-250, Phosphor Imaging System (Bio-Rad)
Multipipette	Multipette (Eppendorf)
PCR-Geräte	i-Cycler (Bio-Rad); DNA Thermo Cycler TR 3 (Hybaid)
pH-Elektrode	Ingold (Schott)
pH-Meter	Schott CG 809 (Schott)
Photometer	Gene Quant RNA/DNA Calculator (Amersham)
Pipetten	Eppendorf 1-10 μ l, 10-100 μ l, 50-250 μ l, 200-1000 μ l (Eppendorf); Achtkanalpipetten 50-1500 μ l Biohit Proline Modelle 710800 und ePET (Biohit)
Pipettierhilfe	Pipetus, Hirschmann Laborgeräte (Merck)
Pneumatischer Injektor	Transjector 5246 (Eppendorf)
Präzisionsküvette aus Quarzglas	Suprasil [®] , Schichtdicke 10mm, Hellma (Merck)
Reagiergefäßschüttler	Heidolph REAX 2000 (Heidolph); MS 1 Minishaker (Janke & Kunkel)
sterile Werkbank	Biohazard (BDK)
Taumlergerät	Heidolph REAX 3 (Heidolph)
Tischzentrifugen	Biofuge 13 (Heraeus); Eppendorf 5417C und 3200 (Eppendorf)
UV-Leuchttisch	Mini-Transilluminator (Bio-Rad)
UV-Sterilisationskammer	GS Gene Linker (Bio-Rad)
Vakuumpumpe	Vacuubrand Typ R25 (Vacuubrand)
Vakuumentrifuge	Speed Vac [®] SC 110 (Savant Instruments Inc.)
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q-Plus (Millipore/Waters)
Wasserbad mit Badthermostat	Thermomix [®] BU mit Frigomix [®] B (B. Braun)
γ -Strahlen-Zähler	Cobra II [®] - Series (Packard)
<u>Für die Elektrophysiologie</u>	
A/D Wandler	DigiData 1200 und DigiData 1320A (Axon Instruments Inc.)
Binokular	Olympus SZX9 (Olympus)
Kaltlichtquelle	Highlight 3100 (Olympus)

Kapillarziehmaschine	P-97 (Sutter Instruments Co.)
Mikromanipulatoren	Micromanipulator MMJ (Märzhäuser)
Oszillographen	Nicolet 310 (Nicolet Instruments); HM 203.6 (Hameg)
Temperaturregler	TC-10 Temperature Controller (Dagan Co.)
Tisch mit Dämpfung	Newport micro-controlle (Newport)
Verstärker	Turbo TEC-05 (npi electronic GmbH); Dagan CA-1B oocyte clamp amplifier (Dagan Co.)
Wasserbad mit Badthermostat	Thermo Haake (Haake)

3.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Mikrotiterplatten	96-Loch mit abgeflachtem Boden (Greiner)
Entwickler	LX 24 Verdünnung 1:5 mit H ₂ O (Kodak)
Fixierer	AL 4 Verdünnung 1:5 mit H ₂ O (Kodak)
Glaskapillaren für die cRNA-Injektion	Glass replacement 3,5nl (World Precision Instruments)
Glaskapillaren für die Elektrophysiologie	GB150TF-8P (Science Products GmbH)
Kapillarenauffüller	Microloader (Eppendorf)
Mikrokapillaren	Microfill 34 AWG (World Precision Instruments)
Nahtmaterial, chirurgisches	Vicryl [®] 2/0 (3-metric) V-6, resorbierbar Prolene [®] 3-0 usp (2-metric) V-7 (Ethicon, Johnson & Johnson)
Netzmaterial für Oozyteninjektion und TEVC (Woven Polymer Filters)	Spectra/Mesh [®] , 1000 µm Weite, 1020 µm Dicke (Spectrum Laboratories Inc.)
Nitrozellulose Transfermembran	0,2 µM, Protran [®] 83 (Schleicher & Schuell)
Parafilm [®] „M“	Laboratory Film, American National Can [™] (Merck)
Pasteur-Kapillarpipetten	“Volac”, 150 mm, John Poulton LTD (Schuch)
PS-Röhrchen	Polystyrol Röhrchen mit rundem Boden, 5ml (Greiner)
Pipettenspitzen	0,5-10µl, 10-100µl, 50-1000µl, 50-1500µl (Sarstaed); Biohit Proline Tip 1200µl (Biohit)

Reaktionsgefäße	0,5 ml Safe-Lock, 1,5 ml; 2,0 ml, 1,5 ml mit Schraubdeckel (Eppendorf)
Röntgenfilme	X-ray film (Agfa)
Sterilfilter	Filter 0,2µm (Schleicher & Schuell)
Szintillationsröhrchen	Polyethylene (PE) Vials (Packard)
Transformationsröhrchen	14ml Rundboden 2059 Falcon Polypropylenreagenzröhrchen (Schuch)
Whatman 3MM Papier	(Machery & Nagel)

3.3 Chemikalien

3.3.1 Allgemeine Chemikalien

Acrylamid 30% (37,5:1) (AppliChem)
 3-Aminobenzoesäureethylester (Sigma)
 Acrylamid 40% (19:1) (AppliChem)
 Agar (Invitrogen Life Technologies)
 Ammoniumperoxodisulfat (APS) (Sigma)
 Ampicillin (Apotheke der Uniklinik Mainz, Ratiopharm)
 Bradfordreagenz, 40%ige Lösung (Bio-Rad)
 Bromphenolblau (Sigma)
 Chemilumineszenz Reagenz Plus (Perkin Elmer)
 Diethylpyrocarbonat (Sigma)
 Dimethylchlorsilan (Sigma)
 Effectene[®] Transfektions Reagenz (Qiagen)
 EZ-Link[™] Sulfo-NHS-SS-Biotin (Sulfosuccinimidyl-2-(biotinoamido)ethyl-1,3-dithiopropionate) (Pierce)
 Kaliumpermanganat (Sigma)
 Kanamycin (Apotheke der Uniklinik Mainz, Ratiopharm)
 Nucleosidtriphosphate (NTPs) und Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs) (Amersham)
 Piperazin-1,4-(2-Ethansulfonsäure) (PIPES) (Roth)
 Protease-Inhibitor-Cocktail Tabletten, complete Mini (Roche)
 RNase-Inhibitor 40U/µl (Amersham)
 Szintillationsflüssigkeit Luma Safe (Perkin Elmer)
 Szintillationsflüssigkeit Quicksafe A (Zinsser Analytic)
 Tetramethylammoniumchlorid (TMACl) (ICN)
 UltraLink[™] Immobilized NeutrAvidin (Pierce)

Nicht gesondert aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Sigma, Merck oder Roth in p.a. -Qualität bezogen.

3.3.2 Radiobiochemika

Arginin, L-[4,5- ³ H]	H ₂ NC(=NH)NH(CH ₂) ₂ CH ₂ CH(NH ₂)COOH spezifische Aktivität: 39 Ci/mmol (ICN)
Rubidium, ⁸⁶ Rb	spezifische Aktivität: 1 mCi/mmol (Perkin Elmer)
UTP [α - ³² P]	spezifische Aktivität: 3 mCi/mmol (ICN)
ATP [γ - ³² P]	spezifische Aktivität: 4,5 mCi/mmol (ICN)

3.4 Enzyme und Kits

Alkalische Phosphatase 10U/ μ l (New England Biolabs)
 Collagenase A (Roche)
 DNase I 10U/ μ l, RNase-frei (Roche)
 ExpandTM High Fidelity PCR System (Roche)
 mMessage mMachineTM SP6-Kit für *in vitro*-Transkription (Ambion)
 N-Glycosidase F 1U/ μ l (Roche)
 NucleoBond[®] PC 100 (Macherey-Nagel)
 NucleoSpin[®] Extract (Macherey-Nagel)
 Proteinase K (Roche)
 Qiaprep-Spin-Miniprep-Kit (Qiagen)
 QuickChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)
 RNase A 20mg/ml (Sigma)
 RNase T1 100U/ μ l (Roche)
 T3 RNA-Polymerase 20U/ μ l (Roche)
 T7 RNA-Polymerase 10U/ μ l (Roche)
 T4 DNA-Ligase (New England Biolabs)
 T4 Polynukleotid-Kinase (Promega)
 TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen Life Technologies)

Die Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs, Promega, Roche oder Hybaid bezogen.

3.5 Materialien für die Zellkultur

3.5.1 Nährmedien und Medienzusätze

Die benutzten Nährmedien enthielten L-Glutamin. Bei Nährmedien, die länger gelagert waren, wurde L-Glutamin zugesetzt.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (PAA Laboratories GmbH)

DMEM / Nut Mix F-12 (Ham) (PAA Laboratories GmbH)

Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (PAA Laboratories GmbH)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Roth)

Fötales Rinderserum (FBS) (PAA Laboratories GmbH). Komplementinaktivierung durch Inkubation bei 56°C für 30 Min.

Geneticin 418 sulfat (G418) (PAA Laboratories GmbH)

L-Glutamin 200mM (Invitrogen Life Technologies)

Penicillin/Streptomycin 100× (Invitrogen Life Technologies)

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) (Apotheke der Uniklinik Mainz)

Pyruvat 100× (Invitrogen Life Technologies)

Trypsin/ Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 10× (Sigma)

3.5.2 Zelllinien

U-373MG

Zelltyp: humanes Glioblastom-Astrozytom

Herkunft: generiert aus einem Glioblastom eines 61 Jahre alten kaukasischen Mannes

Morphologie: epithelähnliche, adhärente Zellen

Referenz: Ponten und Macintyre, 1968

Medium: IMDM + 10%FBS

Inkubation: bei 37°C mit 5%CO₂

Einfriermedium: IMDM + 10%FBS + 10% DMSO

A549/8

Zelltyp: humane Lungenkarzinom Zelllinie (Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase-defizienter Klon)

Herkunft: generiert aus einem Lungentumor eines 58 Jahre alten kaukasischen Mannes

Morphologie: epithelähnliche, adhärente Zellen

Referenz: Giard *et al.*, 1973

Medium: DMEM + 10%FBS

Inkubation: bei 37°C mit 10%CO₂

Einfriermedium: DMEM + 10%FBS + 10%DMSO

EA.hy 926

Zelltyp: humane endotheliale Zelllinie
Herkunft: Fusionsprodukt aus der humanen A549/8 Zelllinie (s.o.) mit humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC)
Morphologie: epithelähnliche, adhärenente Zellen
Referenz: Edgell *et al.*, 1983
Medium: DMEM + 10%FBS
Inkubation: bei 37°C mit 10%CO₂
Einfriermedium: DMEM + 10%FBS + 10%DMSO

DLD-1

Zelltyp: humanes Kolon-Adenokarzinom
Herkunft: generiert aus einem kolorektalen Adenokarzinom
Morphologie: epithelähnliche, adhärenente Zellen
Referenz: Dexter *et al.*, 1979; Dexter *et al.*, 1981
Medium: DMEM + 10%FBS
Inkubation: bei 37°C mit 10%CO₂
Einfriermedium: DMEM + 10%FBS + 10%DMSO

ECV 304

Zelltyp: humanes Blasenkarzinom
Herkunft: Subtyp der humanen Blasenkarzinomzelllinie T-24
Morphologie: epithelähnliche, adhärenente Zellen
Referenz: Takahashi *et al.*, 1990
Medium: DMEM + 10%FBS
Inkubation: bei 37°C mit 10%CO₂
Einfriermedium: DMEM + 10%FBS + 10%DMSO

HaCaT

Zelltyp: humane Keratinozyten-ähnliche Zelllinie
Herkunft: spontan veränderte Zellen aus einer histologischen Gewebeprobe eines Melanompatienten
Morphologie: epithelähnliche, adhärenente Zellen
Referenz: Boukamp *et al.*, 1988
Medium: DMEM + 10%FBS
Inkubation: bei 37°C mit 10%CO₂
Einfriermedium: DMEM + 10%FBS + 10%DMSO

A-673

Zelltyp: humanes Rhabdomyosarkom
Herkunft: generiert aus einem Rhabdomyosarkom eines 15 Jahre alten Mädchens
Morphologie: epithelähnliche, adhärenente Zellen
Referenz: McCune *et al.*, 1993
Medium: DMEM + 10%FBS
Inkubation: bei 37°C mit 5%CO₂
Einfriermedium: DMEM + 20%FBS + 10%DMSO

SK-N-MC

Zelltyp: humanes Neuroblastom
Herkunft: die Zellen stammen von einem 14 Jahre alten kaukasischen Mädchen
Morphologie: fibroblastenähnliche, adhärenente Zellen
Referenz: Biedler *et al.*, 1973; Barnes *et al.*, 1981
Medium: IMDM + 10%FBS
Inkubation: bei 37°C mit 5% CO₂
Einfriermedium: IMDM + 10%FBS + 10%DMSO

NT2

Zelltyp: humanes Teratokarzinom, mittels Retinsäure zu Neuronen differenzierbar
Herkunft: generiert aus einem Teratokarzinom eines 22 Jahre alten kaukasischen Mannes
Morphologie: epitheliale, adhärenente Zellen
Referenz: Pleasure und Lee, 1993
Medium: DMEM/Nut Mix F-12 (Ham) + 5% FBS + 1% Penicillin/Streptomycin
Inkubation: bei 37°C mit 5%CO₂
Einfriermedium: 95%FBS + 5% DMSO

SK-N-SH

Zelltyp: humanes Neuroblastom
Herkunft: die Zellen wurden generiert aus einer Knochenmarksbiopsie eines 4 Jahre alten Mädchens mit metastasierendem Neuroblastom
Morphologie: neuroblasten- oder epithelähnliche, adhärenente Zellen
Referenz: Biedler *et al.*, 1973; Barnes *et al.*, 1981
Medium: IMDM + 10%FBS
Inkubation: bei 37°C mit 5% CO₂
Einfriermedium: IMDM + 10%FBS + 10%DMSO

SH-SY-5Y

Zelltyp: humanes Neuroblastom
Herkunft: klonierte Sublinie der Zelllinie SK-N-SH (s. oben)
Morphologie: epithelähnliche, adhärenente Zellen
Referenz: Biedler *et al.*, 1973; Barnes *et al.*, 1981
Medium: DMEM + 10%FBS
Inkubation: bei 37°C mit 5%CO₂
Einfriermedium: DMEM + 20% FBS + 10%DMSO

U-87MG

Zelltyp: humanes Glioblastom-Astrozytom
Herkunft: generiert aus einem Glioblastom einer 44 Jahre alten kaukasischen Frau
Morphologie: epithelähnliche, adhärenente Zellen
Referenz: Ponten und Macintyre, 1968
Medium: IMDM + 10%FBS
Inkubation: bei 37°C mit 5%CO₂
Einfriermedium: IMDM + 10%FBS + 10%DMSO

U-138MG

Zelltyp: humanes Glioblastom

Herkunft: generiert aus einem Glioblastom eines 47 Jahre alten kaukasischen Mannes

Morphologie: fibroblastenähnliche, fusiforme Zellen

Referenz: Ponten und Macintyre, 1968

Medium: IMDM + 10%FBS

Inkubation: bei 37°C mit 5%CO₂

Einfriermedium: IMDM + 10%FBS + 10%DMSO

3.5.3 Verbrauchsmaterialien

Für die Zellkultur wurden sämtliche Plastikwaren in steriler Verpackung bezogen oder autoklaviert und ausschließlich unter der sterilen Werkbank geöffnet.

Deckgläser	Ø 22mm (Roth)
Deckglas- Gewebekulturkammern	Lab-Tek [®] Chambered coverglass, 4 und 8 chambers (Nunc)
Einbettmedium	Tissue Freezing Medium [™] (Leica Instruments, Jung)
Eindeckmedium	Permafluor [™] (Immunotech)
Einfrierröhrchen	Cryogenic vials (Nalgene)
Einweg-Auslaufpipetten	1ml, 5ml, 10ml und 25ml (Falcon)
Gewebekulturplatten	Multiwell [™] 6-Loch, 24-Loch und 96-Loch (Greiner; Falcon)
Gewebekulturschalen	3cm, 6cm, 10cm und 15cm Durchmesser (Greiner)
Kulturflaschen	25cm ² und 75cm ² Fläche (Falcon)
Objektträger	76 × 36mm (Roth)
Pasteur-Kapillarpipetten	“Volac”, 230 mm, John Poulton LTD (Schuch)
Zählkammer für Zellen	Neubauer-Zählkammer (Roth)
Zentrifugenröhrchen	14ml Rundboden, 15ml und 50ml Spitzboden (Greiner; Sarstedt)

3.6 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden entweder für die Polymerasekettenreaktion (PCR), und/oder für die Sequenzierung eingesetzt. Sie wurden anhand der cDNA-Sequenz des hCAT-1 in sense (ss) und antisense (as) Orientierung entworfen und bei Pharmacia oder MWG Biotech AG zur Synthese in Auftrag gegeben. Eine detaillierte Auflistung der benutzten Oligonukleotide befindet sich in den Kapiteln 4.5.1 und 4.5.4.

Die Anforderungen an die individuell synthetisierten Oligonukleotide waren Folgende:

- Eines der beiden Oligonukleotide musste zum kodogenen (as-Primer), das andere zum nicht kodogenen Strang (ss-Primer) komplementär sein.

- Die Länge der Oligonukleotide sollte zwischen 25 und 45 Basenpaaren (bp) liegen und die Schmelztemperatur (T_m), die nach folgender Formel berechnet wurde, größer oder gleich 78 °C sein:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \% \text{ mismatch}$$

(N = Primerlänge in bp; G = Guanidin; C = Cytosin).

- Der Primer sollte während der Reaktion im Überschuss vorliegen, wohingegen die Konzentration der Template DNA variiert werden konnte.

3.7 Vektoren

pSP64T (Melton et al., 1984)

Der Klonierungsvektor pSP64T enthält einen SP6-Promotor, der vor einer multiplen Klonierungsstelle (MCS) liegt. Restriktionsenzyme, die in die MCS schneiden, können zur Linearisierung der eingesetzten DNA genutzt werden. Außerdem ist eine *Bgl* II Stelle zwischen dem SP6-Promotor und der MCS eingeführt worden, die eine Insertion von DNA ermöglicht. Zwischen SP6-Promotor und der *Bgl* II Stelle liegt die 5'-untranslatierte Region einer β -Globin cDNA und zwischen der *Bgl* II Stelle und der MCS die 3'-untranslatierte Region der β -Globin-Sequenz. Diese untranslatierten β -Globin-Sequenzen tragen zu einer verbesserten Stabilität der *in vitro*-transkribierten cRNA in Oozyten bei. Der Vektor besitzt zudem ein Resistenzgen gegen Ampicillin und eine Ori-Stelle (origin of replication). Eine blau/weiß Selektion ist nicht möglich.

pEGFP-N1 (Clontech)

Das Plasmid pEGFP-N1 enthält die Sequenz für eine Variante des grün fluoreszierenden Proteins (GFP). Das Wildtyp GFP Gen stammt aus der Qualle *Aequorea victoria* (Shimomura et al., 1962; Chalfie et al., 1994). Das verstärkt grün fluoreszierende Protein (EGFP) enthält zwei Aminosäure(AS)-Substitutionen, zum einen Phenylalanin-64 zu Leucin, zum anderen Serin-65 zu Threonin (Cormack et al., 1996). Dadurch können eine stärkere Fluoreszenz und eine höhere Expression in Säugerzellen erreicht werden. Die MCS des Vektors sitzt zwischen dem Cytomegalovirus (CMV)-Promotor und der kodierenden Sequenz für EGFP. In die MCS eingesetzte Gene werden an den N-Terminus von EGFP fusioniert, sofern sie sich im offenen Leserahmen befinden. Durch SV40 Polyadenylierungssignale am Ende des EGFP Gens ist die richtige Prozessierung des 3'-Endes der mRNA gewährleistet. Ein Neomycin-Resistenz-Gen, dem ein SV40-Promotor vorgeschaltet ist, ermöglicht die Selektion transfizierter

eukaryotischer Zellen mit G418. Ein bakterieller Promotor vor diesem Gen bewirkt Kanamycin-Resistenz in *E. coli*.

pBluescript II SK(+) und *pCR-ScriptTM SK(+)* (Stratagene)

Das Plasmid *pCR-ScriptTM SK(+)* wurde durch Einfügen einer *Srf I* Stelle in die Polylinker Region von *pBluescript II SK (+)* hergestellt. Der Vektor ist aus dem Bakteriophagen *pUC19* abgeleitet. Durch das Vorhandensein des *lacZ* Gens ist eine blau/weiß Selektion möglich. Die Bezeichnung SK weist darauf hin, dass die MCS so orientiert ist, dass die Transkription von *lacZ* von der *Sac I* Restriktionsstelle zur *Kpn I* Restriktionsstelle erfolgt. Zudem ist eine pUC und eine *f1 (+)* Ori-Stelle vorhanden. Die MCS ist von einem T3- und T7-RNA-Promotor flankiert. Ein Ampicillin-Resistenzgen ermöglicht die Selektion durch dieses Antibiotikum.

pCR[®] II-TOPO[®] (InvitrogenTM)

Mit dem *pCR[®] II-TOPO[®]* Vektor lassen sich PCR-Produkte klonieren. Dabei werden die überhängenden 3'-Desoxythymidin(T)-Enden des linearisierten Vektors an die durch die Taq-Polymerase hinzugefügten 3'-Desoxyadenosin(A)-Enden des PCR-Produktes mit Hilfe der an den T-Enden des Vektors gebundenen Topoisomerase I ligiert. Durch das Vorhandensein des *lacZ* Gens ist eine blau/weiß Selektion möglich. Zudem sind eine *f1* und eine pUC Ori-Stelle vorhanden. Ein Ampicillin- und Kanamycin-Resistenzgen ermöglicht die Selektion durch die jeweiligen Antibiotika. Die MCS ist von einem SP6- und T7-Promotor flankiert.

3.8 Antikörper

Primär-Antikörper:

EGFP, Living ColorsTM Peptid-Antikörper (polyklonal), Verdünnungsfaktor 1:300 (Clontech)

anti-hCAT-1 (Kh5) C-Terminus polyklonal, Verdünnungsfaktor 1:200 (Gräf *et al.*, 2001)

anti-h β -Tubulin monoklonal, Verdünnungsfaktor 1:1000 (Sigma)

Sekundär-Antikörper:

anti-Maus-IgG, Peroxidase gekoppelt, Verdünnungsfaktor 1:3.000 (Sigma)

anti-Kaninchen-IgG, Peroxidase gekoppelt, Verdünnungsfaktor 1:10.000 (Calbiochem)

3.9 Allgemein verwendete Puffer und Lösungen

DEPC-Wasser (dH₂O)

200µl Diethylpyrocarbonat (DEPC) in 1l Aqua bidest.

Die Lösung wurde über Nacht geschüttelt und zur Entfernung von restlichem DEPC 1h autoklaviert.

Repellsilan

200µl Dimethyldichlorsilan in 5ml Chloroform

PBS (phosphate-buffered saline) (10×) pH 7,4

1,4M	NaCl
26,8mM	KCl
17,6mM	KH ₂ PO ₄
101mM	Na ₂ HPO ₄

Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (10×) pH 8,5

400mM	Tris Base
1,14vol%	Eisessig
10mM	EDTA pH 8,0

pH 8,5 mit 1N NaOH eingestellt

Tris-Borat-EDTA (TBE-Puffer) (10×) pH 8,0

900mM	Tris Base
900mM	Borsäure
20mM	EDTA pH 8,0

Tris-EDTA (TE)-Puffer (1×) pH 8,0

10mM	Tris HCl pH 8,0
1mM	EDTA pH 8,0

3.10 Sitz der Hersteller in Deutschland

Agfa - Leverkusen
Ambion - über Ambion (Europe) Ltd, Huntingdon, Cambridgeshire, UK
Amersham Life Science - Freiburg
AppliChem - Darmstadt
Axon Instruments Inc. - über Science Products, Hofheim
B. Braun - Melsungen
BDK - Sonnenbühl Genkingen
Beckmann - Dreieich-Buchsschlag
Biohit GmbH - Köln, Rodenkirchen
Bio-Rad - München
BIOTEK™ Instruments - Bio-Tek European Coordination Center, Bad Friedrichshall
Calbiochem - Bad Soden
Clontech - Heidelberg
Dagan Co. - über Science Products, Hofheim
Eppendorf - Hamburg
Ethicon GmbH - Norderstedt
Falcon - BD Biosciences, Heidelberg
Fisher Scientific - Schwerte
Gibco BRL (Invitrogen Life Technologies) - Karlsruhe
Greiner - Frickenhausen
Haake - über Fisher Scientific, Schwerte
Hameg - Frankfurt am Main
Heidolph - Schwabach
Heraeus - Hanau
Hybaid - Heidelberg
ICN Biomedicals - Eschwege
Immunotech - Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Janke & Kunkel, IKA Labortechnik - Staufen im Breisgau
Kodak - Stuttgart
Leica - Bensheim
Macherey-Nagel - Düren
Märzhäuser - Wetzlar
MBI Fermentas - St. Leon-Roth
Merck Eurolab GmbH - Darmstadt
Millipore/Waters - Eschborn
MWG Biotech AG - Ebersberg
Nalgene - über Nalge Europe Ltd, Neerijse, Belgien
New England Biolabs - Schwalbach
Newport - Darmstadt
Nicolet Instruments - nur über Madison, WI, USA
Nikon - Düsseldorf
npi electronic GmbH - Tamm
Nunc - über Nalge Europe Ltd, Neerijse, Belgien
Olympus - Hamburg
PAA Laboratories GmbH - Cölbe
Packard - Frankfurt am Main
Perkin Elmer - Köln
Pharmacia - über Amersham Life Science, Freiburg
Pierce (Perbio) - Bonn

Promega - Mannheim
Qiagen - Hilden
Ratiopharm - Ulm
Roche Diagnostik - Mannheim
Roth - Karlsruhe
Sarstedt - Nürnbrecht
Savant Instruments Inc. - über Thermo Electron GmbH Bioscience Technologies, Dreieich
Schleicher & Schuell - Dassel
Schott - Hofheim
Schuch - Langgöns
Science Products - Hofheim
Sigma-Aldrich - Deisenhofen
Spectrum Laboratories Inc. - über MembraPure GmbH, Bodenheim
Stratagene - Heidelberg
Sutter Instruments Co. - über Science Products, Hofheim
Vacuubrand GmbH - Wertheim
World Precision Instruments - Berlin

4. Methoden

4.1 *Xenopus laevis*-Oozyten als Expressionssystem

Die Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* werden in der experimentellen Biologie vielfach als Expressionssystem für verschiedene Transportproteine, Ionenkanäle und Rezeptoren eingesetzt, denn sie bieten besondere Vorteile, die sie gegenüber anderen Expressionssystemen interessant machen. Die Oozyten sind in den letzten Wachstumsstadien der Oogenese im Vergleich zu anderen Zellen sehr groß (etwa 1mm) und einfach zu handhaben. Dadurch können die Zellen individuell behandelt werden und funktionelle Analysen in Einzelzellen sind auf verhältnismäßig einfache Weise möglich.

4.1.1 Gewinnung und Behandlung der Oozyten

Ca⁺⁺-freier Puffer

96mM	NaCl
2mM	KCl
1mM	MgCl ₂
5mM	Hepes (pH 7,6)

Der Frosch wurde ca. 25 Min. in eiskaltem Wasser mit 0,1% 3-Aminobenzoensäureethylester anästhesiert. Neben der betäubenden Wirkung von 3-Aminobenzoensäure bewirkte auch die niedrige Temperatur der Lösung, dass die Sensorik des Frosches herabgesetzt wurde. Der anästhesierte Frosch wurde mit dem Rücken auf eine mit Eis gefüllte Wanne gelegt. Die Haut und die Bauchwand wurden mit einem 1cm langen Schnitt an der Seite des Abdomens geöffnet. Teile der Ovarien wurden mit einer sterilen Pinzette aus der Bauchhöhle entnommen und sofort in Ca⁺⁺-freien Puffer überführt. Anschließend wurden die Bauchwand mit resorbierbarem und die Haut mit nicht resorbierbarem, sterilem chirurgischem Nahtmaterial zugenäht. Nach der Operation wurde der Frosch in ein Wasserbecken gesetzt und so lange beobachtet, bis die Narkose nachgelassen hatte und das Tier eigenständig an der Wasseroberfläche Luft holen konnte. Um einer Infektion der Wunde vorzubeugen, wurden einige Körner Kaliumpermanganat in das Wasser gegeben.

ND96-Puffer (Ca⁺⁺-haltiger Puffer)

Ca⁺⁺-freier Puffer mit 1,8mM CaCl₂

Oozyten-Kulturmedium

50vol%	L-15 Leibovitz Medium (Sigma)
1mM	L-Glutamin 200mM (Gibco)
100µg/ml	Gentamycin 50mg/ml (Gibco)
15mM	Hepes (pH 7,6)

Die Ovarienstücke wurden mit einer Schere grob zerkleinert und in ein 15ml Schraubdeckel-Röhrchen überführt. Nach viermaligem Waschen mit Ca⁺⁺-freiem Puffer wurden die Oozyten mit Kollagenase behandelt, um Follikelzellen zu entfernen und die Oozyten zu vereinzeln. Da Calcium Proteasen aktiviert, würde eine Behandlung mit Kollagenase in Anwesenheit von Calcium die Oozyten zerstören (Goldin, 1992), daher wurde die Kollagenaselösung (2mg/ml) in Ca⁺⁺-freiem Puffer hergestellt und vor der Anwendung durch einen 40µm Filter filtriert. Die Oozyten wurden für ca. 30 Min. bei Raumtemperatur (RT) in der Kollagenaselösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Zur Entfernung der Kollagenase wurden die Oozyten 15mal mit Ca⁺⁺-freiem Puffer gewaschen. Danach wurden die Oozyten in ND96-Puffer überführt, unter einem Lichtmikroskop Oozyten des Reifestadiums V oder VI (nach Dumont, 1972; Abb. 4) ausgesucht und diese in eine Petrischale mit Oozyten-Kulturmedium überführt. Die ausgesuchten Oozyten wurden über Nacht (ÜN) oder bis zu 7 Tagen bei 4°C aufbewahrt, bevor sie mit cRNA injiziert wurden.

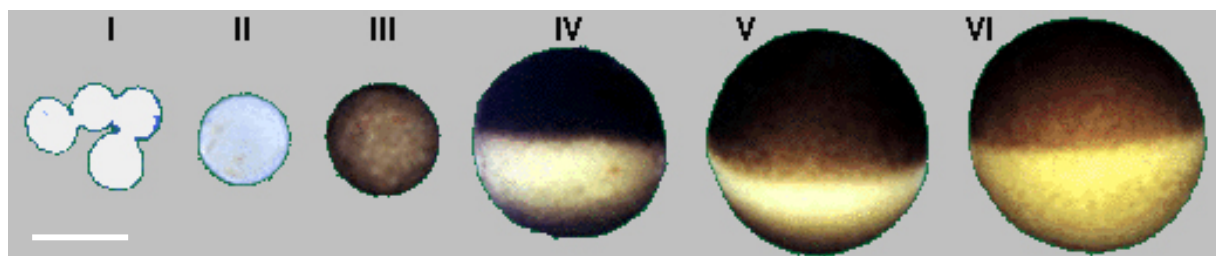


Abbildung 4: Reifestadien von *X. laevis*-Oozyten (Vorlage aus Smith *et al.*, 1991)

Einteilung der Oozyten Reifestadien nach Dumont, 1972. Für die cRNA-Injektion wurden Oozyten des Reifestadiums V oder VI ausgewählt. Der weiße Balken unten links entspricht 500µm

4.1.2 *In vitro*-Synthese von cRNA

Zur Vermeidung einer Kontamination mit RNasen wurde bei der Herstellung der cRNA möglichst RNase-frei gearbeitet. Es wurden nur sterile Gefäße und Pipettenspitzen benutzt, und zu dem Transkriptionsansatz wurde DEPC behandeltes Aqua bidest. (dH₂O) und RNase-

Inhibitoren zupipettiert. Alle Arbeiten wurden mit Handschuhen verrichtet. Die DNA wurde mit einem Restriktionsenzym, das hinter der codierenden Sequenz schneidet, linearisiert. Hierfür ist ein Restriktionsenzym geeignet, das einen 5'-Überhang oder ein glattes Ende hervorruft, da ein überhängendes 3'-Ende als Erkennungsstelle für die RNA-Polymerase dienen kann, was folglich zur Synthese von as-RNA führen würde (Goldin, 1992). In Tab. 4 sind die benutzten Plasmide mit den entsprechenden Enzymen zur Linearisierung aufgeführt. Die linearisierte DNA wurde durch Phenolextraktion (s. 4.3.1) gereinigt, mit Ethanol präzipitiert und in dH₂O resuspendiert.

Tabelle 4: Benutzte Plasmide für die *in vitro*-Transkription von cRNA in *X. laevis*-Oozyten

Transporter	Bezeichnung des Plasmids	Enzyme zur Linearisierung
hCAT-1	pSPPhCAT-1-AB1C	<i>Eco RI</i> , <i>Sal I</i> , <i>Bam HI</i> , <i>Xma I</i>
hCAT-1 S/A ⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ (PKC-Erkennungsstellen-Mutante)	pSPPhC-1 S/A476+482+557	<i>Eco RI</i> , <i>Sal I</i> , <i>Bam HI</i> , <i>Xma I</i>
hCAT-2A	phCAT-2A-118	<i>Bam HI</i> , <i>Afl III</i> , <i>Sal I</i> , <i>Acc I</i>
hCAT-2B	phCAT-2B-181	<i>Sal I</i> , <i>Acc I</i> , <i>Xma I</i> , <i>Afl III</i>

Hervorgehoben sind die Restriktionsenzyme, die am häufigsten zur Linearisierung verwendet wurden.

Die cRNA *in vitro*-Transkription erfolgte nach Anleitung des mMessage mMachine™ SP6-Kits. Folgende Reagenzien wurden bei RT in ein steriles 1,5ml Reaktionsgefäß gegeben:

- 2µl 10× Transkriptionspuffer
- 10µl 2× Ribonukleotid-Mix (NTP-Mix) (10mM ATP, CTP, UTP, 2mM GTP und 8mM Cap-Analog)
- 1µg linearisierte Template DNA
- 2µl 10× Enzym-Mix (SP6-RNA-Polymerase, RNase-Inhibitor)

Mit dH₂O auf ein Endvolumen von 20µl aufgefüllt.

Der Ansatz wurde gemischt, kurz zentrifugiert und 2h bei 37°C inkubiert. Danach wurde 1µl RNase-freie DNase I (2E/µl) zugesetzt, gemischt, kurz zentrifugiert und für 15 Min. bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 30µl dH₂O und 25µl LiCl-Präzipitationslösung (7,5M LiCl, 75mM EDTA) wurde die Reaktion gestoppt und die RNA für mindestens 30 Min. bei -20°C gefällt. Nach der Zentrifugation (20 Min., 4°C, 14.000rpm, Tischzentrifuge) wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in dH₂O resuspendiert und 1µl zur Bestimmung der RNA-Konzentration (s. 4.3.2) eingesetzt. Ein Aliquot der Probe wurde auf ein Agarosegel aufgetragen (s. 4.3.3), um die gewonnene RNA-Menge zu überprüfen. Die cRNA wurde bei -70°C gelagert.

4.1.3 Injektion von cRNA in die Oozyten

Die Injektion der gewünschten cRNA-Menge erfolgte mit Hilfe eines pneumatischen Injektors und eines Binokulares. Als Injektionsnadel diente eine Glaskapillare, die mit einer Kapillarziehmaschine hergestellt wurde. Die Spitze der Kapillare wurde mit einer Pinzette abgebrochen, bis die Öffnung für die Injektion groß genug war. Die Injektionsnadel wurde mit Hilfe eines Kapillarenauffüllers mit 1-2µl der cRNA luftblasenfrei aufgefüllt und am Kapillarenhalter des pneumatischen Injektors festgeschraubt. Anschließend wurde die richtige Dosierung der cRNA-Menge anhand der Tropfengröße ein- bis zweimal unter dem Binokular überprüft. Die Menge der injizierten cRNA betrug 30ng in 40nl dH₂O. Für die Injektion wurden die Oozyten in einer Petrischale auf ein Netz mit einer Maschengröße von 1mm gelegt und mit ND96-Puffer überdeckt. Die Injektion der cRNA erfolgte in den vegetativen Pol, um zu vermeiden, dass RNA in den Zellkern injiziert wurde, da dieser in der animalen Hälfte der Oozyte lokalisiert ist. Als Kontrollen wurden Oozyten mit 40nl dH₂O injiziert.

4.1.4 Inkubation der Oozyten

Nach der Injektion wurden die Oozyten 2 - 5 Tage in einer Petrischale mit Oozyten-Kulturmedium (enthält 1,45mM L-Arg und 0,25mM L-Lys, BAS-beladene Oozyten) oder mit ND96-Puffer (BAS depletierte Oozyten) bei 18°C inkubiert. Das Inkubationsmedium wurde einmal täglich erneuert und beschädigte Oozyten aussortiert, da diese Salze bzw. Proteasen abgeben, welche die Lösung toxisch für die verbleibenden Oozyten machen (Goldin, 1992). Nach der Expressionszeit wurden die Oozyten entweder für Transportstudien (s. 4.1.6), für elektrophysiologische Untersuchungen (s. 4.2) oder Gefrierschnitte (4.1.5) verwendet.

4.1.5 Gefrierschnitte von Oozyten

Drei Tage nach Injektion der cRNA wurden die Oozyten viermal mit PBS gewaschen und in Tissue Freezing MediumTM eingebettet. Dafür wurden je drei Oozyten in eine Halbkugel (Ø 1cm) aus Alufolie mit ein paar Tropfen Einbettmedium gegeben, bis die Oozyten gut eingedeckt waren. Anschließend wurde die Alufolie in 2-Methylbutan, das in einem Plastikbecher mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, gehalten. Sobald das Einbettmedium fest war, wurde die Alufolie verschlossen und in flüssigen Stickstoff gegeben, damit das Einbettmedium vollständig einfro. Die eingebetteten Oozyten wurden entweder bei -20°C zwischengelagert oder es wurden direkt im Kryostat bei -15°C 12µm dünne Schnitte angefertigt und auf Objektträger gezogen. Die Schnitte wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und fotografiert.

4.1.6 Transportstudien mit Oozyten

Na⁺-Aufnahmepuffer (10×)

20mM	KCl
10mM	MgCl ₂
10mM	CaCl ₂
1M	NaCl
50mM	Tris·HCl (pH 7,4)
50mM	Hepes (pH 7,6)

K⁺-Puffer (96mM K⁺-Puffer)

96mM	KCl
2mM	NaCl
1mM	MgCl ₂
1,8mM	CaCl ₂
5mM	Hepes

mit 1 M KOH auf pH 7,6 eingestellt

Langzeit-Aufnahmestudien

Die Oozyten wurden dreimal mit Na⁺-Aufnahmepuffer gewaschen und in einem 2ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 200µl Na⁺-Aufnahmepuffer oder K⁺-Puffer mit einer definierten Konzentration von L-Arginin und 10µCi/ml L-[³H]Arginin für 6h in einem Wasserbad bei 20°C inkubiert. 4-6 Oozyten wurden bei jedem Ansatz zusammen inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Oozyten viermal auf Eis mit der entsprechenden Inkubationslösung gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Oozyten einzeln in Szintillationsröhrchen überführt und mit 200µl 2% SDS lysiert. Anschließend wurde die aufgenommene Radioaktivität gemessen (s. 4.1.7).

L-Arginin-Influx und -Efflux unter Gleichgewichtsbedingungen

(„Equilibrium-exchange“- Kurven)

Die kinetischen Eigenschaften eines Transporters sind von der Substratkonzentration auf beiden Seiten der Zellmembran und - bei geladenen Substraten - vom Membranpotential abhängig. Aus diesem Grund ist der Transport eines Substrates in den meisten Fällen asymmetrisch (Stein, 1990). Nach Zugabe von K⁺-Puffer (Membranpotential (E_m) aufgehoben) und gleichzeitige Vorinkubation mit der gleichen Konzentration an Substrat wie für die Transportmessung verwendet, ist es möglich, den Transport im Gleichgewicht zu messen („Equilibrium-exchange“). Equilibrium-exchange-Influx- und -Efflux-Zeitverläufe wurden für den hCAT-1, -2A und 2B bestimmt.

L-Arginin-Influx

Die Oozyten wurden 4-6h in einem 2ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 200µl 1mM L-Arginin in K⁺-Puffer bei 20°C vorinkubiert. Anschließend wurde 10µCi/ml L-[³H]Arginin zu den Proben pipettiert. Gruppen von 3-5 Oozyten wurden zusammen für 0,5, 1, 3, 10, 30, 100 und 300 Min. bei 20°C inkubiert. Nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurden die Oozyten auf Eis viermal in der entsprechenden Inkubationslösung gewaschen, dann mit 200µl 2% SDS einzeln in Szintillationsröhrchen lysiert und die aufgenommene Radioaktivität gemessen.

L-Arginin-Efflux

Gruppen von 3-5 Oozyten wurden mit 1mM L-[³H]Arginin (10µCi/ml) in K⁺-Puffer für 3-4h bei 20°C aufgeladen. Der Efflux wurde bei 20°C in einem 2ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 200µl K⁺-Puffer, der 1mM kaltes L-Arginin enthielt, durch Auswechseln der Inkubationslösung nach 0,5, 1, 3, 10, 30, 100 und 300 Min. bestimmt. Die verbleibende Radioaktivität der einzelnen Oozyten wurde nach lysieren der Zellen mit 200µl 2% SDS in Szintillationsröhrchen gemessen.

L-Arginin-Aufnahmestudien unter Einfluss von PMA

Gruppen von 6 Oozyten wurden dreimal in Na⁺-Aufnahmepuffer gewaschen und anschließend in einem Reaktionsgefäß mit 200µl Na⁺-Aufnahmepuffer, der 100µM L-Arginin enthielt, für 30 Min. bei 20 °C vorinkubiert (Kontrollen). Parallele Ansätze wurden während der Vorinkubation entweder mit 100 nM Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) in 0,1% DMSO oder nur 0,1 % DMSO zugesetzt. Nach der Vorinkubation wurden die Oozyten in neue Reaktionsgefäße mit 100µM L-Arginin in Na⁺-Aufnahmepuffer überführt, 5 µCi/ml L-[³H]Arginin zu den Proben pipettiert und die Aufnahme für 15 Minuten bei 20 °C bestimmt. Die aufgenommene Radioaktivität der einzelnen Oozyten wurde nach Lysieren der Zellen mit 200µl 2% SDS in Szintillationsröhrchen gemessen.

⁸⁶Rb⁺-Influx und -Efflux

Rubidiumionen (Rb⁺) benutzen die gleichen Transportmechanismen wie K⁺-Ionen, daher gilt die Untersuchung von ⁸⁶Rb⁺-Flux als Marker für den K⁺-Transport (Tannen *et al.*, 1986; Miller und Edelman, 1990). ⁸⁶Rb⁺ hat gegenüber K⁺-Isotopen (z.B. ⁴²K⁺) den Vorteil, dass es eine deutlich längere Halbwertszeit (18 Tage) besitzt, was die Arbeit mit diesem Marker erleichtert. Der ⁸⁶Rb⁺-Influx und -Efflux wurde an hCAT-exprimierenden Oozyten bestimmt.

$^{86}\text{Rb}^+$ -Influx

Über die gesamte Expressionszeit in ND96-Puffer depletierte Oozyten bzw. für 3h in 1mM L-Arginin vorinkubierte Oozyten wurden in einem 2ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß mit ND-96-Puffer und $10\mu\text{Ci/ml } ^{86}\text{Rb}^+$ für unterschiedliche Zeiten inkubiert. Nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurden die Oozyten auf Eis viermal in der entsprechenden Inkubationslösung gewaschen, in PS-Röhrchen überführt und die aufgenommene Radioaktivität bestimmt.

 $^{86}\text{Rb}^+$ -Efflux

In ND96-Puffer depletierte Oozyten wurden in einem 2ml-Reaktionsgefäß mit 1 ml ND96-Puffer oder K^+ -Puffer und $20\mu\text{Ci/ml } ^{86}\text{Rb}^+$ für 3h mit oder ohne 1mM L-Arginin vorinkubiert. Anschließend wurden die Oozyten in ein neues 2ml-Reaktionsgefäß mit 1,2ml der entsprechenden Inkubationslösung überführt. Der Efflux wurde durch Auswechseln von 1ml der Inkubationslösung nach 0,5, 1, 3, 10, 30 und 60 Min. bestimmt. Die radioaktive Lösung wurde in PS-Röhrchen überführt und die aufgenommene Radioaktivität bestimmt.

4.1.7 Messung der Radioaktivität*Messung von L-[^3H]Arginin*

Szintillatoren werden durch β -Strahlen angeregt und strahlen dadurch Lichtquanten ab. Ein primärer Szintillator (z.B. 2,5 Diphenyloxazol) nimmt die Energie aus dem Szintillator auf und fluoresziert bei höherer Wellenlänge. Diese Lichtquanten treffen auf einen sekundären Szintillator (z.B. 1,4 Bis(5-phenyloxazol-2-yl)-benzol), der dadurch angeregt wird und Licht bei einer Wellenlänge aussendet, die eine gute Zählausbeute ermöglicht (Wilson und Goulding, 1991).

Zur Bestimmung der von den Oozyten aufgenommenen oder abgegebenen Menge an L-[^3H]Arginin wurden je 2ml Szintillationsflüssigkeit zu den lysierten Oozyten in Szintillationsröhrchen vermischt und die Proben in den β -Strahlen-Zähler gestellt. Die Radioaktivität wurde in Zerfälle pro Minute (dpm) gemessen. Daraus ließ sich die aufgenommene bzw. abgegebene Menge an L-Arginin mit folgender Formel berechnen:

$$n(\text{mol}) = \text{dpm} \frac{c(\text{Arg})}{2.22 \times 10^{12} a(\text{Arg})}$$

$c(\text{Arg})$: L-Arg-Konzentration (mol/l)
 $a(\text{Arg})$: spezifische Aktivität von L-[^3H]Arg (Ci/l)
 2.22×10^{12} : Konstante, um dpm in Ci umzurechnen

Messung von $^{86}\text{Rb}^+$

Das Isotop $^{86}\text{Rb}^+$ erzeugt neben β -Strahlen auch γ -Strahlen. Daher wurde die von den Oozyten auf- bzw. abgegebene Menge an ^{86}Rb mit einem γ -Strahlen-Zähler detektiert. Für die Messung wurden die Oozyten bzw. 1ml der Inkubationsflüssigkeit in PS-Röhrchen überführt und in den γ -Strahlen-Zähler gestellt. Die aufgenommene Radioaktivität wurde in Zählrate pro Minute (cpm) gemessen.

4.1.8 Berechnung des L- ^3H Arginin-Verteilungsvolumens

Das L- ^3H Arginin-Verteilungsvolumen wurde analog zur Methode von Grossman und Furchgott für das Ca^{45} Verteilungsvolumen berechnet (Grossman und Furchgott, 1964). Das Verteilungsvolumen ist definiert als die Menge einer radioaktiven Substanz (in Zerfällen pro Minute, dpm), die sich in ein definiertes Gewicht an Gewebe verteilt, bezogen auf die gleiche Menge der Substanz, die in der Inkubationslösung ein der Gewebemenge entsprechendes Volumen einnimmt. Daraus ergibt sich für das L- ^3H Arginin-Verteilungsvolumen in Oozyten die folgende Berechnung:

$$L\text{-}^3\text{H}\text{Arginin-Verteilungsvolumen (ml/g)} = \frac{L\text{-}^3\text{H}\text{Arg (dpm)} / 1\text{g Oozyten}}{L\text{-}^3\text{H}\text{Arg (dpm)} / 1\text{ml Lösung}}$$

Die Masse einer einzelnen Oozyte wurde mit Hilfe einer Laborwaage bestimmt. Es wurde das Abtropfgewicht von vier Gruppen von 100 Oozyten aus zwei verschiedenen Fröschen bestimmt und der Mittelwert für eine Oozyte ermittelt. Daraus ergab sich ein Oozytengewicht von $0,78 \pm 0,08\text{mg}$ (\pm SD).

4.2 Elektrophysiologische Untersuchungen an hCAT-exprimierenden Oozyten

Das Ruhemembranpotential einer Zelle stellt sich in einem Gleichgewichtszustand ein, bei dem über die Zellmembran kein Nettofluss elektrischer Ladung stattfindet. Wird die Zelle mit Hilfe einer Spannungsklemme (s. 4.2.1 Voltage clamp-Methode) auf ein anderes Potential gezwungen, wirkt auf die geladenen Teilchen um die Zellmembran, entlang des elektrischen Feldes, eine elektromechanische Kraft, welche die Teilchen bei einer entsprechenden Leitfähigkeit über die Zellmembran bewegt. Der Nettofluss der Ladung ist als elektrischer Strom messbar. Konventionsgemäß wird ein Anionenstrom der sich von der Masse weg bewegt mit einem positiven Vorzeichen belegt. In der Elektrophysiologie wird der Extrazellulärraum als Masse definiert und entsprechend ein Einwärtsstrom von Kationen mit einem negativen, ein Auswärtsstrom von Kationen mit einem positiven Vorzeichen belegt. Für Anionen ergibt sich das jeweils gegensätzliche Vorzeichen.

4.2.1 Die voltage clamp-Methode

Mit Hilfe der voltage clamp-Methode (Spannungsklemme) lassen sich die elektrischen Eigenschaften von Zellmembranen messen. Da die elektrophysiologischen Studien in der vorliegenden Arbeit ausschließlich an *X. laevis* Oozyten durchgeführt wurden, wird im Folgenden nur auf die two-electrode voltage clamp (TEVC)-Methode für Oozyten eingegangen. Bei der TEVC-Methode werden zwei Glaspipettenelektroden in die Oozyte eingestochen, eine dritte Elektrode befindet sich außerhalb der Zelle (Abb. 5). Sie wird auch als Badelektrode bezeichnet, und gilt als Referenzelektrode (Masse). Eine der intrazellulären Elektroden bezeichnet man als Potentialelektrode. Sie misst passiv (d.h. ohne dass ein Strom fließt) das Potential, das über der Oozytenmembran anliegt. Die andere intrazelluläre Elektrode bezeichnet man als Stromelektrode. Sie reguliert aktiv, durch einen injizierten Strom in die Zelle das Membranpotential. Legt man mit der Stromelektrode einen Strom über der Membran an und hält damit das Membranpotential konstant, spricht man von Spannungsklemme. Bei konstantem Membranpotential fließt dann durch die Stromelektrode in umgekehrter Richtung genau so viel Strom wie über die gesamte Membranoberfläche der Zelle. Mit dieser Technik können Änderungen im transmembranären Strom detektiert werden.

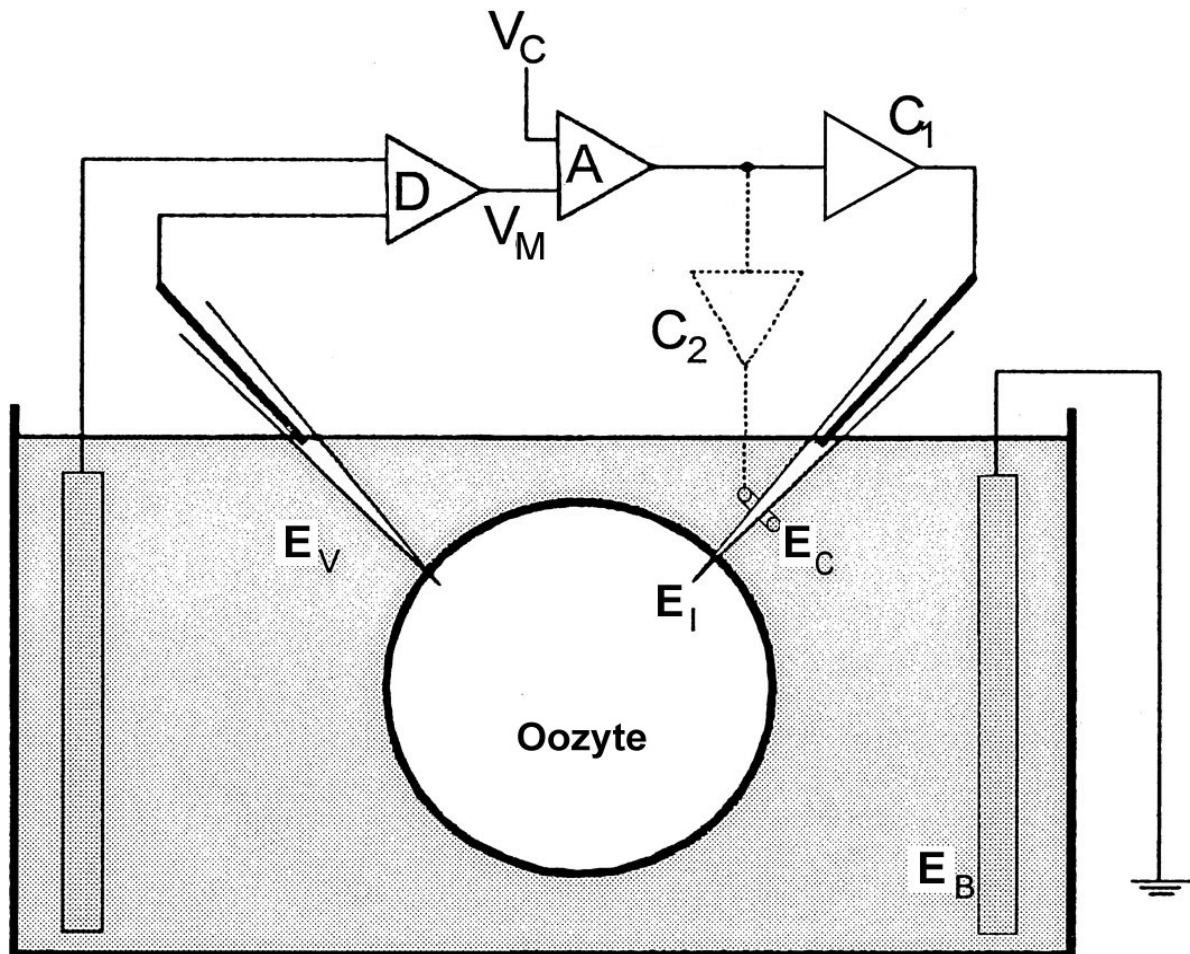


Abbildung 5: Die two-electrode voltage clamp (TEVC)-Methode (modifiziert nach Baumgartner *et al.*, 1999)

Bei der TEVC-Methode befindet sich eine Oozyte in einer Kammer mit Pufferlösung. Zwei Glaspipettenelektroden werden in die Oozyte eingestochen. Über die Potentialelektrode (E_V) wird passiv (d.h., ohne dass ein Strom fließt) das Potential, das über der Oozytenmembran anliegt, gemessen. Die Stromelektrode (E_I) reguliert aktiv, durch einen injizierten Strom in die Zelle das Membranpotential. Als Referenzelektrode (Masse) wird die Badelektrode (E_B) benutzt, die sich außerhalb der Zelle befindet. Mit Hilfe eines Voltage clamp Verstärkers kann das Membranpotential konstant gehalten werden. Dafür wird das Membranpotential (V_M) der Zelle am Verstärker (D) gemessen und anschließend mit dem Steuerpotential (V_C) am Differenzverstärker (A) verglichen. Unterschiede im Membranpotential werden von Verstärker (C_1) durch Injizieren eines Stromes in die Zelle über die Stromelektrode ausgeglichen. Falls erforderlich, werden kapazitive Ströme vom Verstärker (C_2) durch eine extrazelluläre Strominjektion über die kapazitive Elektrode (E_C) kompensiert.

Herstellung der Mikropipetten und der Elektroden

Die Mikropipetten wurden mit Hilfe einer Kapillarziehmaschine aus Glaskapillaren hergestellt. Dafür wurde die Kapillare in der Kapillarziehmaschine zwischen zwei Schrauben festgeklemmt, vom Gerät nach einem festgelegten Programm erhitzt und seitlich auseinander

gezogen, wobei sich die erhitzte Stelle zu zwei feinen Spitzen formte. Die Pipetten wurden mit einer 3M KCl-Lösung blasenfrei gefüllt, um die elektrische Leitfähigkeit zwischen der Zelle und der Elektrode herzustellen. Als Elektroden wurden chlorierte Silberdrähte (Ag/AgCl-Elektroden) benutzt. Zur Chlorierung wurden die Silberdrähte in 1M HCl-Lösung eingetaucht und 45 bis 60 Min. bei 1V galvanisiert. Anschließend wurde die Elektrode in die mit KCl-Lösung befüllte Mikropipette eingeführt und der Widerstand der Mikroelektrode bestimmt. Für die Versuche wurden Mikroelektroden mit einem elektrischen Widerstand zwischen 0,8 - 2M Ω (bei Spannungsklemme) oder zwischen 10 - 20M Ω (bei Messung des Membranpotentials) benutzt.

Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau bestand aus einem Binokular, zwei Mikromanipulatoren mit Pipettenhaltern und einem Plexiglasbad. Die Oozyte lag in einem ca. 2ml fassenden Kompartiment, das über eine Bohrung mit einem 100ml-Reservoir verbunden war. Während des Experiments wurde die Oozyte von ND96-Puffer umspült. Die Umwälzung der Lösung im Bad erfolgte mittels Gasdruck durch einen Gas- Flüssigkeitsmischer. Zur Begasung des Bades wurde Sauerstoff verwendet. So war es möglich, die Experimentierlösung des Reservoirs zu wechseln, ohne die Oozyte mechanisch oder elektrisch zu beeinflussen. Die Temperatur der Badlösung wurde für alle Versuche mit Hilfe eines Temperaturreglers oder eines Wasserbades mit Kühlung konstant auf 20°C gehalten. Die elektrophysiologischen Messungen wurden mit Hilfe eines Voltage clamp Verstärkers durchgeführt.

4.2.2 Messung des Membranpotentials

Das Membranpotential von BAS-depletierten Oozyten, mit BAS beladenen Oozyten oder über mindestens 6h ND96-Puffer mit einer definierten Menge an L-Arginin inkubierten Oozyten wurde in ND96-Puffer oder in der jeweiligen Vorinkubationslösung mit der Potentialelektrode bestimmt. Dabei wurde gewartet, bis die Oozyte nach dem Einstechen der Elektrode ausheilte, und das Membranpotential über mindestens fünf Minuten konstant blieb.

4.2.3 Messung von transmembranären Strömen

Für die Messung von transmembranären Strömen wurden die beiden Mikropipetten mit Hilfe der Mikromanipulatoren in die Oozyte eingebracht. Nach dem Einstechen der Mikropipetten in die Oozyte wurde gewartet, bis sich zwischen Pipettenaußenseite und Zellmembran ein Gigaohm(G Ω)-Widerstand gebildet hatte. Zur Messung dieses Widerstandes wurde die Oozyte auf ein Potential von -60mV geklemmt und anschließend ein Rechteckpuls

von 10mV angelegt; dabei wurde der Stromverlauf beobachtet. Änderte sich dieser nicht um mehr als 1nA, konnte von einem Widerstand von mehr als 1G Ω zwischen Mikropipette und Zellmembran ausgegangen werden. Nach einer Wartezeit von 5 bis 10 Min. wurde das Membranpotential der Oozyte über einen Zeitraum von 2 bis 3 Min. beobachtet. Hielt sich das Membranpotential der Zelle konstant, konnte mit dem Versuch begonnen werden.

Zur Messung transmembranärer Ströme wurde das Membranpotential bei der bei den einzelnen Versuchen jeweils angegebenen Spannung konstant gehalten (geklemmt). Die gemessenen Ströme und Spannungen wurden simultan auf der Anzeige eines digitalen Oszilloskops sichtbar gemacht. Zur Steuerung des Verstärkers (Höhe und zeitlicher Verlauf des Klemmpotentials) und zur Aufnahme der gemessenen Ströme wurde die Steuerungssoftware pClamp 8.0 (Axon Laboratories) verwendet. Die Verbindung zwischen Verstärker und Computer wurde mit einem A/D-Wandler hergestellt. Die elektro-physiologischen Messungen wurden mit zwei unterschiedlichen Protokollen durchgeführt:

Zeitverlauf

Die Oozyte wurde über einen definierten Zeitraum auf ein bestimmtes Potential geklemmt. Über diese Zeit wurde fortlaufend der Membranstrom aufgezeichnet. Wurde durch Zugabe einer zu testenden Substanz in die Badlösung die Membranleitfähigkeit verändert, konnte dieser Effekt direkt an einer Veränderung des Ausgleichstromes gesehen werden.

Strom-Spannungs-Beziehungen (I/V-Kurven)

Die Oozyte wurde auf ein bestimmtes Potential geklemmt. Alle 1-4s wurde die Klemmspannung in Form eines Rechteckpulses in 10 oder 20mV Schritten sukzessiv auf Werte zwischen -140mV und +60mV verändert. Die resultierenden Transmembranströme wurden an einem IBM-Computer mit Pentium-Prozessor mit Hilfe des Programmes pClamp 8 aufgezeichnet und ausgewertet. Zur Darstellung von I/V-Kurven wurde die Größe der transmembranären Ströme am Ende der Spannungspulse (Signal im Gleichgewicht) abgelesen und gegen die angelegte Spannung aufgetragen.

Messung der durch BAS-induzierten Ströme

Zur Messung von BAS-Strömen wurden die Oozyten bei -60mV geklemmt. Anschließend wurde eine Kontroll-I/V-Kurve in Abwesenheit von BAS bestimmt und danach der Stromverlauf nach Zugabe einer bestimmten kationischen AS registriert. In Anwesenheit der zugegebenen kationischen AS wurde erneut eine I/V-Kurve bestimmt. Nach fünfmaligem

Spülen des Bades mit ND96-Puffer konnte erneut ein Versuch (z.B. mit einer anderen BAS) durchgeführt werden. Dies erfolgte nur, wenn die Oozyte ein konstantes Membranpotential unter Kontrollbedingungen zeigte. Für die Bestimmung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve einer bestimmten BAS wurden die Konzentrationen der untersuchten AS additiv ins Bad zugegeben. Dabei wurden der Stromverlauf und die konzentrationsabhängigen Maximalströme registriert.

Messung des L-Arginin-Stromes unter Gleichgewichtsbedingungen

Die Messungen von L-Arginin-Strömen unter Gleichgewichtsbedingungen („Equilibrium-exchange“) erfolgte nach einer Inkubation der Oozyten in K^+ -Puffer mit unterschiedlichen L-Arginin-Konzentrationen über 4 bis 6h in der jeweils gleichen Inkubationslösung. Dabei wurden die Zellen bei 0V geklemmt und eine I/V-Kurve zwischen -60 mV und $+60\text{ mV}$ in 20mV -Schritten bestimmt.

Messung von einwertigen Kationenströmen

TMACl-Puffer (Kontrollpuffer)

98 mM	Tetramethylammoniumchlorid (TMACl)
1,8mM	CaCl ₂
1mM	Mg Cl ₂
5mM	Hepes

pH 7,6 mit 1M TMAOH eingestellt

Für die einzelnen Kationenlösungen wurde TMACl durch die entsprechende Konzentration von NaCl, KCl, RbCl, CsCl oder LiCl ersetzt. Der pH-Wert von 7,6 wurde durch Zugabe der entsprechenden Hydroxide eingestellt.

Einwertige Kationenströme wurden an hCAT-2B exprimierenden Oozyten gemessen. Die Oozyten wurden bei -60mV geklemmt und das Strominkrement wurde nach Zugabe der einzelnen Kationenlösungen registriert. Anschließend wurde eine I/V-Kurve zwischen Werten von -140mV bis $+40\text{mV}$ in 20mV Schritten bestimmt. Als Kontroll- und Spüllösung wurde Tetramethylammoniumchlorid-Puffer (TMACl-Puffer) benutzt. Mehrere Kationen konnten bei einer einzelnen Oozyte gemessen werden, solange das Membranpotential der Oozyte nach dem Spülen unter Kontrollbedingungen stabil blieb. Zum Blockieren von Kaliumströmen wurden 5mM Tetraethylammoniumchlorid (TEACl) und/oder 1mM Bariumchlorid (BaCl_2) eingesetzt.

4.2.4 Auswertung der elektrophysiologischen Daten

Berechnung der Leitfähigkeit

Durch lineare Regression der I/V-Kurven zwischen Membranpotentialwerten von -100mV bis 0mV wurde die Steigung der I/V-Kurven ermittelt, die als Maß für die Leitfähigkeit (G) gilt, entsprechend der Gleichung: $G = \delta I / \delta E$, wobei δI für die Membranstromdifferenz und δE für die Membranpotentialdifferenz steht. Um die Veränderung der Membranleitfähigkeit bei Änderung von Ionenkonzentrationen in der Badlösung darzustellen, wurde jeweils vor und nach Austausch der Badlösung die Größe der Leitfähigkeit bestimmt, miteinander verrechnet und als Differenzleitfähigkeit (ΔG) bezeichnet. In manchen Fällen wurde ΔG durch Subtraktion der Leitfähigkeit H_2O -injizierter Kontroll-Oozyten von der Leitfähigkeit der hCAT-Isoformen berechnet.

L-Arginin-induzierter Strom

Subtraktion der Ströme aus einer I/V-Kurve unter Kontrollbedingungen (in Abwesenheit von L-Arginin) von denen nach L-Arginin-Zugabe ergab den L-Arginin-induzierten Strom (ΔI) in Abhängigkeit von angelegter Spannung und der zugegebenen L-Arginin-Konzentration.

Equilibrium-exchange und Transport-Kinetik

Bei Equilibrium-exchange-Versuchen wurde die Leitfähigkeit für jede L-Arginin-Konzentration nach Subtraktion der entsprechenden Leitfähigkeiten in H_2O -injizierten Oozyten bestimmt. Die errechneten Leitfähigkeiten wurden gegen die L-Arginin-Konzentration aufgetragen. Unter der Annahme, dass der L-Arginin-Transport der Michaelis-Menten-Kinetik folgte, wurde für die Konzentrations-Wirkungs-Kurve die maximale Leitfähigkeit G_{max} (V_{max}) und die Michaelis-Menten-Konstante K_M berechnet.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Extraktion von Nukleinsäuren mit Phenol

Ein Gemisch aus Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25:24:1) dient zur Entfernung von Proteinen aus einer Nukleinsäure-Präparation. Chloroform denaturiert Proteine und erleichtert die Trennung der wässrigen und organischen Phase. Isoamylalkohol vermindert das Schäumen während der Extraktion (Sambrook *et al.*, 1989).

Tris-gepuffertes Phenol (pH 8,0)

Das Phenol (1l) wurde bei 68°C geschmolzen und solange mit 0,5M Tris-HCl pH 8,0 versetzt bis der pH Wert 8,0 betrug, dann wurde die Lösung mit 100ml 100mM Tris-HCl pH 8,0 überschichtet und mit 0,1% (m/V) Hydroxyquinolin versetzt.

Die Nukleinsäureproben wurden mit dem gleichen Volumen Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol versetzt. Der Ansatz wurde gut vermischt und anschließend zentrifugiert (8 Min., Raumtemperatur (RT), 14.000rpm, Tischzentrifuge). Die wässrige Oberphase wurde möglichst vollständig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bei einigen Proben wurde die Phenolextraktion ein zweites Mal durchgeführt. Um eventuell mitgeführte Phenolreste zu entfernen, wurde zuletzt noch einmal das gleiche Volumen Chloroform : Isoamylalkohol (24:1) zu der Probe gegeben und wie zuvor gemischt, zentrifugiert und die obere Phase abgenommen. Anschließend wurden die Nukleinsäuren mit Ethanol präzipitiert.

Präzipitation von Nukleinsäuren mit Ethanol

Zur Konzentrierung von Nukleinsäuren kann eine Fällung mit Ethanol durchgeführt werden. Das Präzipitat wird in Gegenwart moderater Konzentrationen von monovalenten Kationen gebildet. Dabei können Typ und Konzentration der monovalenten Kationen variieren. Gängig sind Ammoniumacetat (2,0 - 2,5M), Lithiumchlorid (0,8M), Natriumchlorid (0,2M) und Natriumacetat (0,3M, pH 5,2) (Sambrook *et al.*, 1989).

Nachdem eine der oben angegebenen Salzlösungen in der entsprechenden Konzentration zupipettiert war, wurde der Ansatz gemischt und das Zweifache des Volumens an Ethanol zugefügt. Die Fällung erfolgte bei -20°C für mindestens 1h oder bei -70°C für mindestens 30 Min.. Danach wurde zentrifugiert (20 Min., 4°C, 14.000rpm, Tischzentrifuge) und das Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Um die noch vorhandene Flüssigkeit vollständig zu entfernen, wurde das Reaktionsgefäß mit geöffnetem Deckel auf ein Papiertuch gestellt. Das getrocknete Pellet wurde dann in sterilem Aqua bidest. oder TE-Puffer resuspendiert.

4.3.2 Bestimmung der Konzentration von DNA oder RNA

Die Konzentration der DNA- bzw. RNA-Proben wurde über die optische Dichte (OD) bei 260nm bestimmt. Eine OD_{260nm} von 1,0 entspricht dabei einer Konzentration von 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 μ g/ml einzelsträngiger RNA. Das Verhältnis OD_{260nm}/OD_{280nm} sollte 1,8 für DNA und 2 für RNA betragen, kleinere Verhältnisse zeigen Verunreinigungen mit Proteinresten an. Bei 320nm können Verunreinigungen mit Phenol detektiert werden. Die OD_{320nm} sollte Null betragen, da Nukleinsäuren diese Wellenlänge nicht absorbieren. Die Proben wurden für die Messung in der Regel 1:100 oder 1:50 verdünnt. Die gemessene DNA-Konzentration wurde mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese (s. 4.3.3) überprüft. Dazu wurde die linearisierte DNA auf einem Gel aufgetrennt und die Intensität der Bande mit den Banden eines Größenmarkers verglichen, dessen Konzentration bekannt war.

4.3.3 Auftrennung von Nukleinsäuren über Agarosegelelektrophorese

Ladepuffer (6 \times)

0,25% (m/V)	Bromphenolblau
0,25% (m/V)	Xylencyanol
Glycerol	30vol%

Mit der Agarosegelelektrophorese können Nukleinsäurefragmente nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Da die Nukleinsäuren bei einem neutralen pH-Wert aufgrund der Phosphatgruppen im Phosphodiesterückgrat polyanionisch sind, wandern die Moleküle im elektrischen Feld zur positiven Elektrode. Die zurückgelegte Wegstrecke linearer Nukleinsäuren ist umgekehrt proportional zum \log_{10} der Anzahl der bp (Helling *et al.*, 1974). Die aufgetrennten Nukleinsäuren können dann unter UV-Licht mittels des interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid bis zu einer Konzentration von 5ng sichtbar gemacht werden (Sharp *et al.*, 1973). Superhelicale ringförmige, entspiralisierte ringförmige und linearisierte DNA des gleichen Molekulargewichts laufen unterschiedlich schnell durch das Agarosegel (Thorne, 1966). Eine eindeutige Aussage über die Größe der DNA kann somit nur getroffen werden, wenn die DNA im linearen Zustand vorliegt.

In der Regel wurden 1%ige Agarosegele angefertigt. Hierzu wurden 1g Agarose in 100ml TAE-Puffer eingewogen und in der Mikrowelle aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. 20 μ l Ethidiumbromid (1mg/ml) wurden in die Agaroselösung zupipettiert und das Gel in den vorbereiteten Gelschlitten gegossen. Die Elektrophoresekammer wurde mit TAE-Puffer gefüllt und der Gelschlitten mit dem fest gewordenen Gel hineingestellt. Die Probe wurde mit $1/5$ tel Volumen Ladepuffer versetzt und

in die Taschen des Gels pipettiert. Als DNA-Größenmarker diente mit *Eco* 91I geschnittene Lambda-DNA, von der stets 6µl (0,5µg) mit auf das Gel aufgetragen wurden. Eine Spannung von 50 - 100V (0,5 - 1V/cm²) wurde angelegt, bis die Proben weit genug aufgetrennt waren. Die zurückgelegte Strecke konnte anhand der Farbmarker, die dem Ladepuffer zugesetzt waren, abgeschätzt werden. Dabei lief die dunkelblaue Bromphenolblaubande in Höhe von ca. 300 bp und die hellblaue Xylencyanolbande in Höhe von ca. 4 Kilobasenpaaren (kb). Das Ergebnis konnte dann unter UV-Licht überprüft werden.

4.3.4 Arbeiten mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA-Moleküle an bestimmten Nukleotidsequenzen spalten. Jede Nuklease erkennt eine spezifische in der Regel palindromische Sequenz von vier bis acht Nukleotiden. Je nach Art des Enzyms wird durch die Restriktion ein überhängendes Ende oder ein glattes Ende erzeugt. Allgemein gilt, dass 1 Einheit (E) eines Enzyms bei dem jeweiligen Temperaturoptimum in 1h 1µg Lambda-DNA schneidet.

Für einen analytischen Restriktionsverdau, bei dem die geglückte Insertion einer Fremd-DNA in ein Plasmid überprüft werden sollte, wurden 1-2µg DNA eingesetzt. In einem 20µl Ansatz wurden 2µl Reaktionspuffer (10×) des jeweiligen Enzyms und 2E des Enzyms mit der DNA vermischt und für 2h im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Da in den Plasmidpräparationen teilweise noch RNA vorhanden war, wurde der Ansatz mit 1µl RNase A (1µg/µl) versetzt und 15 Min. bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Verdau mit 6× Ladepuffer versetzt und auf ein Agarosegel aufgetragen. Für einen präparativen Restriktionsverdau wurden 10µg DNA in einem 200µl Ansatz mit 30E Enzym geschnitten. Bevor die Probe auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen wurde, wurde sie mit Ethanol präzipitiert und in einem kleineren Volumen aufgenommen.

4.3.5 Extraktion von DNA aus einem Agarosegel

Die DNA wurde über ein frisch hergestelltes Agarosegel bei einer Spannung von 50V aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel auf eine saubere Klarsichtfolie gelegt. Unter UV-Licht wurden mit einem sterilen Skalpell die betreffenden Banden ausgeschnitten. Dabei wurde eine UV-Lampe mit langwelligem UV-Licht so kurz wie möglich eingesetzt, um Strangbrüche in der DNA durch das UV-Licht zu vermeiden. Die Agarosestücke wurden in sterile Reaktionsgefäße überführt und bei 50°C in einem Wasserbad geschmolzen. Die Probe wurde auf eine Säule (NucleoSpin[®] Extract) überführt und nach Angaben des Herstellers (Macherey-Nagel) eluiert.

4.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationspuffer (10×)

500mM	Tris·HCl (pH 7,6)
100mM	MgCl ₂
100mM	DTT
0,5mg/ml	bovines Serum-Albumin (BSA)

Die Ligasen besitzen die Eigenschaft, sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige DNA-Fragmente zu verbinden. Die T4 DNA-Ligase katalysiert in Gegenwart von ATP die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 3'-Hydroxylende und einem 5'-Phosphatrest. Die Effizienz der Ligation ist größer bei DNA-Fragmenten mit überhängenden Enden („sticky ends“), die komplementär zueinander sind, als bei glatten Enden („blunt ends“).

Die Plasmid-DNA und das Insertionsfragment wurden im Verhältnis 1:3 gemischt und in einem 10µl Ansatz mit 1µl Ligationspuffer (10×), 1 µl 10 mM ATP und 1 µl (1E) T4 DNA-Ligase gemischt. Als Kontrolle diente derselbe Ansatz ohne Zugabe des Insertionsfragmentes. Die Inkubation erfolgte ÜN bei 16°C im Wasserbad. Anschließend wurde eine Transformation durchgeführt (s. 4.3.7) und resistente Klone für Minipräparation (s. 4.3.8) gepickt. Nach Isolierung der Plasmide mittels Minipräparation erfolgten ein Restriktionsverdau verschiedener Klone und eine Analyse der geschnittenen DNA mit Hilfe der Gelelektrophorese. Die Plasmid-DNA positiver Klone wurde in größeren Mengen durch Midipräparation (s. 4.3.8) gewonnen.

4.3.7 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Um Fremd-DNA in Bakterien einbringen zu können, müssen diese zunächst kompetent gemacht werden. Diese Kompetenz, ringförmige oder linearisierte DNA aufzunehmen, erhalten Bakterien durch die Behandlung mit eiskalter CaCl₂-Lösung (Mandel und Higa, 1970; Hanahan, 1983). Zur Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen wurde die von Inoue *et al.* beschriebene Methode angewandt (Inoue *et al.*, 1990).

TB-Puffer

10mM	PIPES
15mM	CaCl ₂
250mM	KCl
55mM	MnCl ₂

Vor Zugabe von MnCl₂ den pH mit KOH auf 6,7 einstellen. Lösung steril filtrieren.

Am Vortag wurden die Bakterien (Epicurian Coli[®] XL1-Blue oder DH5 α [™] superkompetente Zellen) auf einer LB-Platte ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 10 bis 12 große Kolonien von der Platte in 250ml SOB Medium in einem 2 l Kolben angeimpft. Die Kultur wurde bei 18°C unter Schütteln (200-250 rpm) inkubiert, bis eine OD_{600nm} von 0,6 erreicht war. Der Kolben wurde für 10 Min. auf Eis gestellt und anschließend die Bakterien abzentrifugiert (10 Min., 4°C, 4000rpm, JLA 16.250 Rotor, Avanti J-30 I). Das Pellet wurde in 80ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und 10Min. auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (10 Min., 4°C, JLA 16.250 Rotor, Avanti J-30 I) wurde das Pellet in 20ml TB-Puffer resuspendiert. Unter leichtem Schütteln wurde DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7% zugefügt. Nach 10 Min. Inkubation auf Eis wurden die Bakterien in vorgekühlte 1,5ml-Reaktionsgefäße aliquotiert (je 200 μ l) und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Kompetenz (mind. 1 \times 10⁷/ μ g Kolonien) wurde anhand einer Kontroll-Transformation getestet und die Bakterien bei -70°C gelagert.

Transformation kompetenter Bakterien

LB-Medium

10g/l Caseinhydrolysat Pepton 140
5g/l Hefeextrakt
10g/l NaCl
mit NaOH pH 7,0 einstellen

LB-Platten

LB-Medium

15g/l Agar
Ggf. Zugabe von 50 μ g/ml Ampicillin oder 10 μ g/ml Kanamycin

Zu dem Ligationsansatz oder zu 10ng Plasmid-DNA wurden 50 μ l kompetente Bakterien, die zuvor auf Eis aufgetaut worden waren, pipettiert. Zur Kontrolle wurde stets ein Ansatz mit 10 μ l Aqua bidest. mitgeführt. Nach einer Inkubation von 30 Min. auf Eis wurden die Bakterien mit der DNA für 45s bei 42°C inkubiert. Der Ansatz wurde für 2 Min. auf Eis abgekühlt und mit 1ml LB-Medium vermischt. Nach 1h Inkubation im 37°C-Brutschrank unter leichtem Schütteln wurden 100 μ l des Ansatzes auf LB-Platten mit Ampicillin oder Kanamycin ausgestrichen und ÜN in den 37°C-Brutschrank gestellt. Am nächsten Tag wurden Flüssigkulturen für Plasmidpräparationen mit den gewachsenen Kolonien angeimpft.

4.3.8 Plasmid-Präparation aus *E. coli*-Zellen

Sollte Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen für einen analytischen Restriktionsverdau isoliert werden, so wurde die Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly angewandt (Birnboim und Doly, 1979).

Minipräparation

SET-Puffer

20vol%	Sucrose
50mM	Tris·HCl (pH 8,0)
50mM	EDTA (pH 8,0)

Eine Bakterienkolonie wurde ÜN in 2ml LB-Medium mit Zusatz von Ampicillin bzw. Kanamycin im 37°C-Brutschrank unter Schütteln kultiviert. 1,5ml der Bakterienkultur wurden in ein 2ml-Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (1 Min., 4°C, 11000rpm, Tischzentrifuge). Das Pellet wurde in 100µl SET-Puffer resuspendiert und die Bakterien durch Zugabe von 200µl 0,2N NaOH / 1%SDS und leichtem Schwenken für 5 Min. auf Eis lysiert. Auf die lysierten Zellen wurden 150µl 3M K-Acetat (pH 4,8) gegeben, geschüttelt und die Probe 5 Min. auf Eis gestellt. Der Ansatz wurde zentrifugiert (10 Min., 4°C, 14.000rpm, Tischzentrifuge). Danach wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1× Volumen Phenol/Chloroform extrahiert. Für die nachfolgende DNA-Präzipitation mit 2× Volumen Ethanol mussten keine zusätzlichen Ionen zu der Probe gegeben werden und es genügten 5 Min. bei RT zur Bildung des Niederschlags. Nach den Waschschrinen mit 70% Ethanol wurde das getrocknete Pellet in 50µl TE-Puffer aufgenommen. Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese wurde die Plasmidausbeute überprüft.

Sollte die DNA für Klonierungen oder zur Herstellung von Sonden verwendet werden, wurde DNA mit höherem Reinheitsgrad benötigt. Die DNA wurde über den Qiaprep-Spin-Miniprep-Kit isoliert und nach den Angaben des Herstellers (Qiagen) verfahren.

Midipräparation

Für die Midipräparation wurde 1 ml der Übernachtskultur einer Minipräparation in 200ml LB-Medium mit Zusatz von Ampicillin bzw. Kanamycin ÜN im 37°C-Brutschrank unter leichtem Schütteln kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die Extraktion der Plasmide mit dem NucleoBond® PC100 Kit nach den Angaben des Herstellers (Macherey-Nagel).

4.3.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion dient zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten. Zwei Oligonukleotide dienen als Primer für eine Serie synthetischer Reaktionen, die durch eine DNA-Polymerase katalysiert werden. Die Matrizen DNA wird durch Erhitzen denaturiert und der Ansatz auf eine Temperatur abgekühlt, bei der sich die Oligonukleotide an die komplementären Sequenzen der DNA anlagern können. Durch den Einsatz von hitzestabilen DNA-Polymerasen lässt sich die PCR automatisieren, da man im Gegensatz zu den hitzeempfindlichen Polymerasen nach dem Denaturierungsschritt keine neue Polymerase zusetzen muss (Saiki *et al.*, 1988). Die Bedingungen für die durchgeführten PCRs sind unter 4.5.2 und 4.5.4 aufgeführt.

4.4 Biochemische Methoden

4.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

GIT-Puffer

4M	Guanidinisothiocyanat
25mM	Natriumcitrat (pH 7,0)
0,5%	Natriumlaurylsarcosin
0,72vol%	2-Mercaptoethanol

H₂O-gesättigtes Phenol (Roth)

Der Puffer sowie alle anderen Lösungen für Arbeiten mit RNA wurde mit dH₂O angesetzt.

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi, 1987). Die Zellen wurden auf 10cm-Kulturschalen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, danach in 800µl GIT-Puffer lysiert. Das Lysat wurde mit einem Zellschaber abgeschabt und in ein steriles 2ml-Reaktionsgefäß überführt. Zu dem Reaktionsgefäß wurden 80µl 2M Na-Acetat (pH 4,0), 800µl H₂O-gesättigtes Phenol und 160µl Chloroform/Isoamylalkohol pipettiert. Der Ansatz wurde wiederholt gemischt, bis eine milchige Trübung zu sehen war, dann auf Eis gestellt. Nach 15 Min. wurde zur Trennung der Phasen zentrifugiert (10 Min., 4°C, 4000rpm, Tischzentrifuge). Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und die RNA durch Zugabe von 800µl Isopropanol und einer Inkubation bei -20°C für 1h oder ÜN gefällt. Nach der Zentrifugation (30 Min., 4°C, 14000rpm, Tischzentrifuge) wurde der Überstand entfernt und das Pellet zweimal mit 1ml 80% Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 50-100µl dH₂O resuspendiert und 1µl zur Konzentrationsbestimmung entnommen.

4.4.2 RNase-Verdauungsschutzanalyse

Mit Hilfe der RNase-Verdauungsschutzanalyse kann überprüft werden, ob und in welchem Maße ein bestimmtes Gen in einer Zelle oder einem Gewebe exprimiert ist (Zinn *et al.*, 1983). Dazu muss die Gesamt-RNA aus den Zellen bzw. dem Gewebe isoliert und mit einer radioaktiven RNA-Sonde hybridisiert werden. Diese Sonde besteht aus einem kleinen Fragment von 200 bis 300bp, das komplementär zu der nachzuweisenden mRNA ist und zusätzlich ein Stück Vektorsequenz enthält. Nachdem die Sonde mit der mRNA hybridisiert hat, wird noch einzelsträngige RNA durch RNasen verdaut. Dabei werden auch die einzelsträngigen, nicht hybridisierten Enden des Sonden-mRNA-Hybrids abgespalten, und es

bleibt nur das geschützte, doppelsträngige Fragment zurück, das dann über Gelelektrophorese aufgetrennt werden kann. Um die Signale standardisieren zu können, wird parallel eine Sonde für ein konstitutiv exprimiertes Gen (wie β -Aktin) zu der Probe gegeben. Die photographische Dichte der Banden von beiden geschützten Fragmenten kann dann zueinander ins Verhältnis gesetzt werden.

Synthese radioaktiv markierter RNA-Sonden

Transkriptionspuffer (10 \times)

400mM	Tris·HCl (pH 7,5)
100mM	NaCl
60mM	MgCl ₂
20mM	Spermidin

Die in Tab. 5 aufgeführten Plasmide für Sonden der humanen CAT-Isoformen und für humanes β -Aktin mussten zunächst mit dem jeweiligen Enzym linearisiert werden. Der Ansatz wurde mit Ethanol gefällt und in dH₂O resuspendiert. Anhand der OD_{260nm} wurde die Konzentration der linearisierten DNA bestimmt und anschließend die Konzentration auf 0,5 μ g/ μ l mit dH₂O verdünnt.

Tabelle 5: Benutzte RNA-Sonden für die RNase-Verdauungsschutzanalyse

Plasmid	Enzym zur Linearisierung	RNA-Polymerase	unverdautes Fragment (nt)	geschütztes Fragment (nt)
phCAT-1/ riboII	<i>Xba</i> I	T3	252	201
phCAT-2A/9	<i>Pvu</i> II	T3	272	185 (168)
phCAT-2B/131	<i>Eco</i> RI	T7	307	289
pXCMI HC-3/4	<i>Eco</i> RI	T3	292	243
ph β -Aktin/5	<i>Asp</i> 718	T3	222	107
PKS-hu- β -Aktin	<i>Hind</i> III	T7	188	108

Die jeweiligen Plasmide wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen für die Herstellung von radioaktiv markierten Sonden linearisiert. Das geschützte Fragment war im Falle von phCAT-2A/9 durch ein Mismatch der Sonde nicht immer gleich groß und variierte zwischen zwei Größen (zweite Größe in Klammer angegeben). Bei der Auftrennung in der Gelelektrophorese wurden daher zwei Banden sichtbar.

Der Transkriptionsansatz wurde nach folgendem Schema in einem sterilen 1,5ml-Reaktionsgefäß hergestellt:

	hCAT-Sonden	h β -Aktin
Transkriptionspuffer (10 \times)	2 μ l	2 μ l
RNase-Inhibitor (40U/ μ l)	1 μ l	1 μ l
DNA-Matrize (0,5 μ g/ μ l)	1 μ l	1 μ l
Nukleotidmix A,C,G (3,3mM)	3 μ l	3 μ l
UTP[α - ³² P]	4 μ l	2 μ l
UTP (100 μ M)	1 μ l	3 μ l
dH ₂ O	7 μ l	7 μ l
RNA-Polymerase (10U/ μ l) (T3 od. T7)	1 μ l	1 μ l

Der Ansatz wurde bei 37°C im Wasserbad für 1h inkubiert. Danach wurde die DNA-Matrize durch Zugabe von 20E RNase-freier DNase I in 30 μ l Transkriptionspuffer und Inkubation bei 37°C für 45 Min. verdaut. Zur Fällung der RNA wurden 50 μ l dH₂O, 50 μ l 7,5M NH₄Acetat, 2 μ l tRNA (10 μ g/ μ l) und 600 μ l Ethanol zugegeben und bei -70°C für 1h inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation (30 Min., 4°C, 14000rpm, Tischzentrifuge) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 1ml 80% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 100 μ l dH₂O resuspendiert, 1 μ l davon wurde mit 4ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und im β -Strahlen-Zähler gemessen.

Fällung und Hybridisierung der Proben

AL-Puffer (2 \times)

2M Ammoniumacetat (pH 5,0)
0,2% Laurylsarcosin

Hybridisierungspuffer

400mM NaCl
40mM PIPES (pH 6,7)
1mM EDTA
50vol% Formamid, entionisiert

20 μ g Gesamt-RNA aus Zellen wurden mit dem gleichen Volumen an AL-Puffer (2 \times) versetzt. Als Kontrolle wurden 20 μ g tRNA in einem gesonderten Ansatz mitgeführt. Zu jedem Ansatz wurden 100.000cpm einer CAT-Sonde und 30.000cpm der β -Aktin-Sonde pipettiert und die RNA nach Zugabe von 1ml eiskaltem, 100%igem Ethanol bei -70°C für 1h gefällt. Nach der Zentrifugation (30 Min., 4°C, 14.000rpm, Tischzentrifuge) wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit eiskaltem, 80%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 50 μ l dH₂O gelöst und in einer Vakuumzentrifuge für 30 Min. lyophilisiert. Die getrockneten Pellets wurden in 40 μ l Hybridisierungspuffer resuspendiert

und in 1,5ml-Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel überführt. Die Reaktionsgefäße wurden in Bleibomben gestellt und in einem Wasserbad eingetaucht. Zur Denaturierung der Proben wurde das Wasserbad für 10 Min. auf 85°C hochgeheizt. Nach langsamem Abkühlen auf 51°C wurden die Proben ÜN hybridisiert.

Verdau der nicht hybridisierten Fragmente mit RNase

RNase A/T1-Verdauungspuffer

300mM	NaCl
10mM	Tris·HCl (pH 7,5)
5mM	EDTA

Proteinase K-Puffer

10mM	Tris·HCl (pH 7,4)
10mM	EDTA

Stopp-Puffer

20µl	10% SDS
2,5µl	Proteinase K (20µg/µl)
47,5µl	Proteinase K-Puffer
2µl	tRNA (10µg/µl)

Formamid-Probenpuffer

80vol%	Formamid, entionisiert
0,1% (m/V)	SDS
10mM	EDTA
0,1% (m/V)	Xylencyanol
0,1% (m/V)	Bromphenolblau

Um die nicht hybridisierte RNA zu verdauen, wurde zu jedem Ansatz 0,35µl RNase A (10mg/ml) und 0,25µl RNase T1 (100E/µl) in 300µl RNase A/T1-Verdauungspuffer zupipettiert. Die Proben wurden für 30 Min. bei 30°C inkubiert und die Reaktion wurde durch Zugabe von 70µl Stopp-Puffer und einer Inkubation von 15 Min. bei 37°C beendet. Für die Extraktion der Hybride wurden 500µl Phenol-Chloroform zugegeben und der Ansatz intensiv geschüttelt. Nach der Zentrifugation (10 Min., 4°C, 2.000rpm, Tischzentrifuge) wurden 380µl der oberen Phase in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung erfolgte durch Zugabe von 1ml eiskaltem, 100%igem Ethanol bei -70°C für 1h. Die RNA wurde abzentrifugiert (30 Min., 4°C, 14.000rpm, Tischzentrifuge) und mit 80%igem, eiskaltem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 7µl Formamid-Probenpuffer gelöst.

Synthese des radioaktiv markierten Molekulargewichtsmarkers

Für die Synthese des radioaktiv markierten Molekulargewichtsmarkers wurde das Plasmid ØX174 mit dem Restriktionsenzym *Hinf* I linearisiert und anschließend mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Die DNA wurde zweimal mit Phenol extrahiert und mit Ethanol präzipitiert. 3µg der linearisierten DNA wurden mit 3µl ATP[γ-³²P] und 25E T4 Polynukleotid-Kinase in 200µl Polynukleotid-Kinase-Puffer bei 37°C ÜN inkubiert. Anschließend wurden ca. 6.000cpm des radioaktiven Markers in einem Endvolumen von 7µl mit Formamid-Probenpuffer verdünnt.

Auftrennung der Proben über Gelelektrophorese

Gel-Lösung

12g Harnstoff
2,5ml TBE (10×)
4ml Acrylamid 40% (19:1 Bisacrylamid)

Mit Aqua bidest. auf 25ml auffüllen, filtrieren und unter Vakuum entgasen. Unmittelbar vor dem Gießen 250µl Ammoniumperoxodisulfat (APS) (10%) und 25µl Tetramethylethylendiamin (TEMED) zugeben.

Die Gel-Lösung wurde zwischen zwei gesäuberte Glasplatten, von denen eine zuvor mit Repell-Silan beschichtet wurde, gegossen und zum Auspolymerisieren waagrecht gelegt. Das auspolymerisierte Gel wurde in eine Elektrophoresekammer gespannt, die mit TBE gefüllt wurde. Um das elektrische Feld der Gele zu equilibrieren, wurde ein Vorlauf von 30 Min. bei 25mA durchgeführt. In der Zwischenzeit wurden die Proben, der Molekulargewichtsmarker (s. oben) und die unbehandelten RNA-Sonden (1µl, etwa 3.000cpm) in Formamid-Laufpuffer für 5 Min. bei 95°C denaturiert. Die Taschen des Gels wurden mit TBE-Puffer ausgespült und die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 25mA, bis die Xylencyanolbande 1cm über dem unteren Rand des Gels gelaufen war. Das Gel wurde 15 Min. fixiert (10% Essigsäure und 10% Methanol), auf ein Whatmann 3MM Papier gezogen, mit Klarsichtfolie abgedeckt und 45 Min. im Geltrockner getrocknet. Anschließend wurde ein Molecular Imager Screen zwischen 6 und 12h oder ein Röntgenfilm für mindestens 24h dem Gel exponiert.

4.4.3 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) ermöglicht es DNA-Sequenzen zu bestimmen. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma GENterprise in Mainz. Hierfür wurden etwa 5µg der zur analysierenden DNA in einer Konzentration von 0,5µg/µl mit 10pmol/µl der benötigten Oligonukleotide (s. 4.5.1 und 4.5.4) sequenziert. Das Ergebnis wurde anschließend am Computer mit Hilfe der MacDNASIS[®] Software (Hitachi Software, Ltd.) ausgewertet.

4.4.4 Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen

Durch die Biotinylierung mit dem membranundurchlässigen N-Hydroxysulfosuccinimid (NHS)-Biotin ist es möglich, Zelloberflächenproteine von intrazellulären Proteinen zu trennen. Dabei reagieren bei neutralem pH freie Aminogruppen eines Proteins mit dem NHS-ester des Biotins und bilden eine kovalente Amidbindung. Die auf diese Weise biotinylierten Membranproteine können durch eine anschließende Kopplung an immobilisiertes Avidin reversibel gebunden und so von intrazellulären Proteinen getrennt werden. Hiermit ist es möglich, Veränderungen in der Membranständigkeit von Zelloberflächenproteinen wie den hCATs genauer zu untersuchen.

Biotinylierung

PBS-CM-Puffer (PBS mit Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺)

1mM	MgCl ₂
0,1mM	CaCl ₂

in PBS gelöst

Quenching-Puffer

400ml	PBS-CM-Puffer
3g	Glyzin

RIPA-Puffer

150mM	NaCl
1mM	EDTA
100mM	Tris HCl 40

Mit NaOH pH 7,4 einstellen, anschließend die folgenden Substanzen dazugeben:

1%	Triton X-100
1%	Na-deoxycholat
0,1%	SDS

Am Gebrauchstag Protease-Inhibitor-Cocktail dazugeben (1 Tablette in 10ml RIPA-Puffer)

Die Zellen wurden in 10cm Zellkulturplatten bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen nach dem gewünschten Versuchsprotokoll vorbehandelt (s. 4.6.5). Nach der Behandlung wurden die Zellen jeweils dreimal mit eiskaltem PBS-CM-Puffer gewaschen und 20 Min. im Kühlraum (bei 4 °C) unter leichtem Schütteln in 2ml PBS-CM-Puffer in dem 1mg/ml EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin gelöst waren, inkubiert. Anschließend wurden die 2ml Biotinylierungsreagenz abgesaugt und zweimal mit 5ml eiskaltem Quenching-Puffer gewaschen. Es erfolgte eine Inkubation der Zellen mit 5ml Quenching-Puffer für 30 Min. bei 4°C, um überschüssiges Biotin zu binden. Nach zweimaligen Spülen mit PBS-CM-Puffer wurden die Zellen durch Zugabe von 1ml RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitoren für 60 Min. bei 4°C auf dem Kreisschüttler lysiert. Die lysierten Zellen wurden von den Zellkulturplatten abgeschabt, in 1,5ml-Reaktionsgefäße übertragen und anschließend 20 Min. bei 12400rpm und 4°C (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Sediment verworfen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde bestimmt (s. 4.4.5).

Avidin-Kopplung

Je 100µl (bei stabil transfizierten Zellen) oder 150µl (bei Untersuchungen des nativen Transporters) der biotinylierten Lysate wurden mit der entsprechenden Menge UltraLink® Immobilized NeutrAvidin ÜN bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben 15 Min. bei 12500rpm abzentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und als intrazelluläre Fraktion bei -70°C eingefroren. Die Avidin-Sedimente wurden viermal mit je 400µl Ripa-Puffer gewaschen. Die so aufgereinigten Avidin-Sedimente wurden in je 30µl SDS-Probenpuffer (s. 4.4.6) für Zelllysate aufgenommen und 30 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben 5 Min. bei 12500rpm abzentrifugiert und der Überstand als Membranprotein-Fraktion direkt über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) (s. 4.4.6) aufgetrennt oder bis zum Auftragen bei -70 °C aufbewahrt.

4.4.5 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau Proteine bindet, und dass dadurch sein Absorptionsmaximum von 465nm nach 595nm verschoben wird (Sedmak und Grossberg, 1977).

In eine 96-Loch-Mikrotiterplatte wurde ein definiertes Volumen der zu messenden Probe pipettiert und mit Aqua bidest. auf 100µl aufgefüllt. Als Standard diente eine BSA-Verdünnungsreihe (0 bis 6µg BSA), die ebenfalls in einem Endvolumen von 100µl pipettiert wurde. Für jede Probe und jeden Standard wurden Doppelbestimmungen

durchgeführt. 5 Min. bis 1h nach der Zugabe von 100µl einer 40%igen Lösung des Bradfordreagenz (Bio-Rad) wurde die Extinktion bei 595nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer bestimmt. Die Proteinkonzentration der Proben wurde anhand der mit dem BSA-Standard erstellten Eichkurve bestimmt.

4.4.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Trenngel :

Substanz	Stocklösung	8% Gel	10% Gel
		Menge (ml)	Menge (ml)
Aqua bidest.		7,1	6,0
Tris-HCl (pH 8,8)	1,5M	3,75	3,75
SDS	10% (m/V)	0,15	0,15
Acrylamid (37,5:1 Bisacrylamid)	30%	4,0	5,0
APS	10% (m/V)	0,1	0,1
TEMED		0,01	0,01

Sammelgel (3,88%):

Substanz	Stocklösung	Menge (ml)
Aqua bidest.		3,05
Tris-HCl (pH 6,8)	0,5M	1,25
SDS	10% (m/V)	0,05
Acrylamid (37,5:1 Bisacrylamid)	30%	1,15
APS	10% (m/V)	0,033
TEMED		0,007

Die SDS-PAGE dient zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Das anionische Detergens SDS bindet an hydrophobe Regionen von Proteinen, wodurch diese denaturiert werden. Durch die Bindung wird eine negative Ladung in die denaturierten Polypeptidketten eingeführt, die somit im elektrischen Feld zum Pluspol wandern. Durch Zugabe von einem reduzierenden Agens, wie β -Mercaptoethanol, zu dem Protein-SDS-Gemisch können zusätzlich über Disulfidbrücken verbundene Untereinheiten von Proteinen getrennt werden. Der Trennung der Proteine im Trenngel aufgrund ihres Molekulargewichts (der Trennbereich eines 8%igen Gels liegt bei 32 bis 89kD), geht eine Konzentrierung der Proteine in einem Sammelgel voraus. Dadurch wird ein besseres Trennergebnis während der Elektrophorese erzielt.

Die Lösung für das Trenngel wurde gemischt und zwischen zwei zuvor mit Ethanol gereinigte Glasplatten gegossen. Die Trenngeloberfläche wurde direkt nach dem Gießen mit

n-Butanol überschichtet und dadurch geglättet. Nach dem Auspolymerisieren des Gels, wurde das n-Butanol entfernt und mehrfach mit Aqua bidest. gespült. Anschließend wurde das Trenngel über das Sammelgel gegossen und der Probenkamm zwischen die Glasplatten geschoben.

Vorbereitung und Auftragung der Proben

SDS-Probenpuffer für Zelllysate (2×)

50mM	Tris·HCl (pH 6,8)
2mM	EDTA
4% (m/V)	SDS
8M	Harnstoff
0,001% (m/V)	Bromphenolblau
3,5vol%	2-Mercaptoethanol (frisch zugeben)

SDS-Elektrophoresepuffer (10×)

240mM	Tris Base
1,9M	Glycin
1% (m/V)	SDS

Wenn nicht anders vermerkt, wurden immer 12µl Lysat mit 12µl SDS-Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Bei Vorbehandlung mit PMA und dem PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid I (BIM I) (s. 4.6.5) wurde die Proteinmenge der Proben einer Versuchsreihe anhand der gemessenen Proteinkonzentration angeglichen. Die berechnete Menge der einzelnen Proben, jedoch maximal 12µl wurde bei Lysaten mit 12µl SDS-Probenpuffer versetzt, kurz bei RT stehen gelassen und auf das Gel aufgetragen. Die Proteinmenge der intrazellulären Proteinfraction und der Membranprotein-Fraction wurde vor der Avidin-Kopplung (s. 4.4.4) angepasst. Anschließend wurden 12µl der intrazellulären Proteinfraction mit 12µl SDS-Probenpuffer versetzt und aufgetragen bzw. 24µl der mit SDS-Probenpuffer eluierten Membranprotein-Fraction (s. 4.4.4) zum Auftragen abgenommen. Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurde stets 5µl Molekulargewichtsmarker (Prestained Protein Lader, MBI Fermentas) aufgetragen. Dieser besteht aus 10 vorgefärbten Standardproteinen mit bekannter Größe. Nachdem das Sammelgel auspolymerisiert war, wurden der Probenkamm herausgezogen und die Glasplatten in die Elektrophoresekammer eingespannt. Das Pufferreservoir der Elektrophoresekammer wurde mit SDS-Elektrophoresepuffer gefüllt. Die Geltaschen wurden mit Laufpuffer ausgespült und die Proben in die Geltaschen pipettiert. Bis die Proben in das Sammelgel eingelaufen waren, wurde eine Spannung von 200V angelegt, danach wurden die Proteine bei einer Spannung von 120V getrennt.

ImmunoblottingElektroblottingpuffer

20mM	Tris Base
150mM	Glycin
20vol%	Methanol

Zum Transfer der durch die SDS-PAGE nach ihrer Größe getrennten Proteine auf eine Membran wurde das Gel nach der Elektrophorese vorsichtig aus den Glasplatten genommen. Das Sammelgel wurde mit einem Skalpell abgetrennt und das verbleibende Trenngel 10 Min. in Elektroblottingpuffer equilibriert. Eine Nitrozellulosemembran und 6 Whatman 3MM Papiere wurden auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und in Elektroblottingpuffer getränkt. Das Gel wurde auf die Nitrozellulosemembran gelegt und zwischen je drei Lagen Whatman 3MM Papier auf jeder Seite, zwei grobmaschigen Schwämmen und zwei Plastikträgern eingeklemmt. Der gesamte Blot-Sandwich wurde in eine Elektrophoresekammer, gefüllt mit Elektrophorese-Puffer, eingespannt, sodass die Nitrozellulosemembran zur Anode zeigte. Der Transfer erfolgte ÜN bei 4°C und einer konstanten Stromstärke von 100mA.

Inkubation mit AntikörpernPonceau S-Färbelösung

0,5% (m/V)	Ponceau S (Sigma)
1vol%	konz. Essigsäure

Blotto

50mM	Tris-HCl (pH 8,0)
2mM	CaCl ₂
0,01vol%	Antifoam A
0,05vol%	Tween 20
5% (m/V)	Magermilchpulver (Frema)
[10vol%	Ziegenserum (Cedarlane)]

Antikörperverdünnungspuffer

1% (m/V)	BSA (ICN)
0,1vol%	Tween 20
in PBS (pH 7,4)	

TBS

10mM	Tris-HCl (pH 8,0)
150mM	NaCl

TBST

TBS mit 0,05vol% Tween 20

Die Effizienz des Transfers beim Immunoblotting wurde durch eine reversible Färbung der Proteine mit Ponceau S beurteilt. Nachdem das Ponceau S durch mehrmaliges Waschen mit Aqua bidest. wieder vollständig entfernt war, erfolgte eine zweistündige Inkubation der Membran bei RT in Blotto mit 10% Ziegenserum zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungen. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 Min. mit Antikörperverdünnungspuffer gewaschen. Danach wurde die Membran in einer Plastikfolie mit einem Primärantikörper in 3ml Antikörperverdünnungspuffer (Verdünnung s. 3.8) eingeschweißt, und beim anti-hCAT-1-Antikörper ÜN bei 4°C, bzw. beim EGFP-Antikörper 1h bei RT unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran aus der Plastikfolie entfernt und dreimal mit Blotto gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit einem sekundären Antikörper, der in Blotto verdünnt wurde (Verdünnung s. 3.8), für 1h bei RT. Nach dieser Inkubation wurde die Membran dreimal mit TBST und einmal mit TBS gewaschen, bevor 2ml einer 1:1-Mischung der Chemilumineszenz-Reagenzien (Luminol und Oxidationsreagenz) auf die Membran gegeben wurden. Als sekundärer Antikörper wurden stets Peroxidase-gekoppelte Antikörper verwendet. Peroxidase katalysiert die Oxidation des im Chemilumineszenz Reagens enthaltenen Luminols, wodurch Licht mit einer maximalen Emission bei 428nm entsteht. Die Signale wurden mit Hilfe von Röntgenfilmen, die 10s bis 120s auf die Membranen gelegt wurden, sichtbar gemacht. Die Banden des Molekulargewichtsmarkers wurden von der Membran auf den belichteten Röntgenfilm mit einem Folienstift übertragen.

Entfernen der Antikörper von der Membran

Waschlösung

2% (m/V)	SDS
62,5mM	Tris-HCl (pH 6,8)
100mM	2-Mercaptoethanol

Musste die Membran nochmals mit einem anderen Primärantikörper inkubiert werden, so konnten die gebundenen Antikörper durch eine Waschlösung entfernt werden. Die Membran wurde viermal mit PBS gewaschen und anschließend für 30 Min. bei 50°C in der Waschlösung inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen mit PBS und einer zweistündigen Inkubation der Membran bei RT in Blotto mit 10% Ziegenserum konnte die Membran erneut mit Antikörpern inkubiert werden.

4.5 Mutagenese von hCAT-1

Die Entfernung der PKC-Phosphorylierungsstellen im hCAT-1 wurden von U. Martiné im Labor von Dr. E. Closs mit Hilfe des QuickChange™ Site-Directed-Mutagenesis-Kits durchgeführt. Mit diesem Kit können Restriktionsschnittstellen oder Mutationen durch Punktmutation oder durch Austausch mehrerer Basen erstellt werden. Für die Mutagenese benötigt man die aufgereinigte Plasmid-DNA, die das zu verändernde DNA-Fragment enthält, Oligonukleotide mit den erforderlichen Mutationen, die PfuTurbo™ DNA Polymerase und eine PCR-Maschine.

4.5.1 Benutzte Oligonukleotide

Die Anforderungen an die Oligonukleotide für die Mutagenese waren folgende:

- Sowohl der ss-, als auch der as-Primer musste die gewünschte Mutation enthalten und zueinander komplementär sein.
- Die gewünschte Mutation sollte in der Mitte der Primer liegen mit ungefähr 10-15 korrekten Basen auf jeder Seite. Die Primer sollten mindestens zu 40 % aus Guanidin und Cytosin bestehen und mit ein oder mehreren C oder G Basen enden.

In Tab. 6 sind die Oligonukleotide in ss Orientierung aufgelistet, die bei der Mutagenese des hCAT-1 eingesetzt wurden. Neben den Oligonukleotiden zur Entfernung der drei Phosphorylierungsstellen im hCAT-1 wurde ein Oligonukleotid-Paar benutzt, um eine *Hind* III Schnittstelle einzuführen. Bei dieser Mutation handelte es sich um eine stille Mutation ohne Veränderung der AS-Sequenz von hCAT-1.

Tabelle 6: Benutzte Oligonukleotide für die Mutagenese von hCAT-1

Name der Oligonukleotide	Sequenz der Oligonukleotide (in ss Orientierung)	Mutation
HC1mut1668ss	CGAGAGCAAGACCA! <u>AGCTT</u> TCATTTAAGGTCCC	Punktmutation (C → T) <i>Hind</i> III Schnittstelle eingeführt
HC1mut1426ss	CAGAGGCAGAGATGTTTCGC TTTGAAAACCATACTC	Punktmutation (T → G) Mutation von Serin-476 zu Alanin
HC1mut1444ss	CTTTGAAAACCATACTCGCA CCCAAAAACATGGAGC	Punktmutation (T → G) Mutation von Serin-482 zu Alanin
HC1mut1669ss	GAGCAAGACCAAGCTTGCA TTTAAGGTCCCTTC	Punktmutation (T → G) Mutation von Serin-557 zu Alanin

Die Basen, die von der Sequenz der hCAT-1-cDNA abweichen (Punktmutationen) sind hervorgehoben. Die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *Hind* III ist unterstrichen. Das Ausrufezeichen markiert die Stelle, an der *Hind* III die DNA schneidet.

4.5.2 PCR-Bedingungen und Transformation

Die Effektivität des QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits wurde mit dem pWhitescript™ 4.5kb Kontrollplasmid nach Angaben des Herstellers (Stratagene) überprüft. Dieses Plasmid enthält eine Punktmutation, die die Funktion der hier kodierten β -Galaktosidase zerstört. Bakterien, die dieses Plasmid enthalten, wachsen auf einer LB-Ampicillinagarplatte, die IPTG und X-Gal enthält, als weiße Kolonien. Die mitgelieferten Kontroll-Oligonukleotide erzeugen eine Punktmutation, die wieder zu einer normalen β -Galaktosidase-Funktion führt. Dadurch erschienen die Kolonien nun blau gefärbt.

Für die Erzeugung der Mutationen im hCAT-1 wurde das pBluescript II SK(+) (pBC) HC1KB-Plasmid als Matrize benutzt. Bei diesem Plasmid wurde das 600bp *Kpn* I / *Bgl* II-Fragment aus dem phCAT-1 AB1C in pBChCAT-2A/41 eingesetzt, wobei das Insert des letztgenannten bis auf die *Bgl* II-Stelle herausgeschnitten wurde. Beide Plasmidstränge wurden mittels Pfu Turbo™ DNA Polymerase repliziert und dabei die mutagenen Primer inkorporiert. Anschließend wurde mit der *Dpn* I-Endonuklease die aus Bakterien stammende und deshalb methylierte, nicht mutierte parenterale DNA-Matrize abgebaut. Die Vektor-DNA, die die gewünschte Mutation enthielt, wurde in Epicurion Coli® XL-1 Blue superkompetente Zellen transformiert.

Die PCR wurde folgendermaßen angesetzt:

5 μ l	10 x Reaktionspuffer
X μ l (5-10 ng)	dsDNA-Matrize
5 μ l (125 ng)	ss Oligonukleotide
5 μ l (125 ng)	as Oligonukleotide
1 μ l	dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
mit Aqua bidest. auf 50 μ l aufgefüllt.	

Zum Schluss wurde jeweils 1 μ l PfuTurbo™ DNA Polymerase (2,5U/ μ l) zu dem Ansatz zupipettiert, und die Probe mit 30 μ l Mineralöl bedeckt. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne die DNA-Matrize mitgeführt.

Die DNA-Synthese erfolgte unter folgenden Bedingungen (DNA Thermo Cycler TR3):

1 Zyklus:	95°C	30s
12-16 Zyklen:	95°C	30s
	55°C	1 Min.
	68°C	7 Min.

Im Anschluss an die DNA-Synthese wurde die Reaktion auf Eis 2 Min. auf $<37\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Dann wurde $1\ \mu\text{l}$ *Dpn* I-Endonuklease unter die Mineralölschicht pipettiert, vorsichtig gemischt, abzentrifugiert und für eine Stunde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurde die mit *Dpn* I-behandelte DNA in Bakterien transformiert und auf eine LB-Ampicillinagarplatte ausgestrichen. Am nächsten Tag wurden weiße Kolonien für eine Plasmid-Präparation (Minipräparation, s. 4.3.8) gepickt. Die Plasmid-DNA wurde anschließend durch Sequenzierung (s. 4.4.3) bzw. nach Kontrollrestriktion (s. 4.3.4) über Agarosegelelektrophorese (s. 4.3.3) analysiert.

4.5.3 Klonierungsschritte

Die einzelnen Mutationsschritte und resultierende Plasmide sind in Tab. 7 aufgeführt. Nach erfolgreicher Einführung der Mutationen wurde das mutationstragende Fragment in das pSPhCAT-1 AB1C Plasmid subkloniert, das für Expression in *X. laevis* Oozyten geeignet ist. Das 600bp *Kpn* I / *Bgl* II-Fragment aus den in Tab. 7 grau unterlegten Plasmiden wurde in das pSPhCAT-1 AB1C eingeführt (resultierende Plasmide: pSPHC1S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸² und pSPHC1S/A⁵⁵⁷). Schließlich wurde das 1600bp *Hind* III-Fragment aus dem pSPHC1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸² in pSPHC1 S/A⁵⁵⁷ eingesetzt. Damit waren Mutationen aller drei PKC-Erkennungsstellen in die hCAT-1-cDNA eingeführt. Das resultierende Plasmid wurde pSPHC1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ benannt.

Tabelle 7: Einführung der drei PKC-Erkennungsstellen-Mutationen in die hCAT-1-cDNA

eingesetztes Plasmid	Oligonukleotid	Mutationen	resultierendes Plasmid
pBC HC1KB	HC1mut1668ss	<i>Hind</i> III	pBC HC1KB I
pBC HC1KB I	HC1mut1444ss	<i>Hind</i> III + Ser ⁴⁸² → Ala	pBC HC1S/A ⁴⁸²
pBC HC1S/A ⁴⁸²	HC1mut1426ss	<i>Hind</i> III + Ser ⁴⁸² → Ala + Ser ⁴⁷⁶ → Ala	pBC HC1S/A ⁴⁷⁶⁺⁴⁸²
pBC HC1KB I	HC1mut1669ss	<i>Hind</i> III + Ser ⁵⁵⁷ → Ala	pBC HC1S/A ⁵⁵⁷

In jedem Schritt neu eingeführte Mutationen sind hervorgehoben. Die grau unterlegten Plasmide wurden für die Subklonierung der mutationstragenden Fragmente in das pSPhCAT-1 AB1C benutzt.

4.5.4 Herstellung des hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP-Konstrukts

Für die Transfektion von Zellen wurden vorhandene Fusionskonstrukte zwischen EGFP und hCAT-1 benutzt. Die Mutationen der PKC-Erkennungsstellen aus dem pSPhCAT-1S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ (s. 4.5.3) wurden durch Subklonierung in phCAT-1.EGFP-N1 (Wolf *et al.*, 2002) eingesetzt. Hierfür wurde über PCR ein Fragment von 840bp, das die drei Mutationen der PKC-Erkennungsstellen enthielt, aus dem pSPhCAT-1S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ amplifiziert. In Tab. 8 sind die hierfür benötigten Oligonukleotide aufgeführt. Für die PCR wurde das Expand™ High Fidelity PCR System eingesetzt. Dies ist ein Enzymmix aus Taq- und *Pwo*-DNA-Polymerase. Durch die Korrektüreigenschaft der *Pwo*-DNA-Polymerase ist eine dreifach höhere Genauigkeit bei den PCR-Produkten gegeben.

In ein steriles 0,5ml-Reaktionsgefäß wurden 10µl Expand™ Puffer (10×), 200µM dNTPs, 300nM ss- und as-Primer und 0,5µg der zu amplifizierenden DNA pipettiert und mit Aqua bidest. auf 100µl aufgefüllt. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit Aqua bidest. anstelle von DNA mitgeführt, um eine Kontamination mit Fremd-DNA ausschließen zu können. Zuletzt wurden 2,6E des Enzymmixes zugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde sofort in das PCR-Gerät (i-Cycler) gestellt, in dem folgende Zyklen automatisch abliefen:

1 Zyklus:	95°C	5 Min.
30-40 Zyklen:	95°C	1 Min.
	55°C	2 Min.
	72°C	3 Min.
1 Zyklus:	72°C	20 Min.

Zur Kontrolle der amplifizierten DNA-Fragmente wurde stets ein Aliquot auf ein Agarosegel aufgetragen. War keine Bande in dem Gel zu sehen, wurde die Hybridisierungstemperatur verändert.

Anschließend wurde das amplifizierte Fragment mit dem TOPO TA Cloning® Kit nach Angaben des Herstellers (Invitrogen™) in den pCR®II-TOPO® Vektor ligiert (resultierender Vektor: pCRIIT HC1mutPCR). Nach Transformation von pCRIIT HC1mutPCR in Bakterien wurden LB-Kanamycinagarplatte ausgestrichen. Am nächsten Tag wurden resistente Klone für eine Plasmid-Präparation (Minipräparation, s. 4.3.8) gepickt und über Agarosegelelektrophorese (s. 4.3.3) und Sequenzierung (s. 4.4.3) mittels SP6- und T7-Primer analysiert. Nach Auswahl eines positiven Klones wurde über *Kpn* I / *Xma* I Restriktion das 600bp mutationstragende Fragment aus dem pCR®II-TOPO® Vektor in den entsprechend geschnittenen phCAT-1.EGFP-N1 eingesetzt. Das resultierende Plasmid wurde

phCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP-N1 benannt. Die Sequenz wurde mit den in Tab. 8 angegebenen Oligonukleotidprimern durch Sequenzierung überprüft.

Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide für die Subklonierung der PKC-Erkennungsstellen-Mutationen in das phCAT-1.EGFP-N1-Plasmid

Matrize	ss Oligonukleotide	as Oligonukleotide	Verwendung
pSPhCAT-1 S/A ⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷	HC-1/21Mut ss (HC1ss1051) CTTCTAGGATCCATGTTT CC	HC-1.EGFP (HC1as1890) GATCCCGGGCCTTGCA CTGGTCCAAGT	PCR
phCAT-1 S/A ⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ EGFP-N1	HC-1/21Mut ss (HC1ss1051) HC-1/1242 ss (HC1ss1242) CTCTCCTGGCTTACTCGT TGG	HC-1.EGFP (HC1as1890)	Sequenzierung

In Klammern sind die Namen der Oligonukleotide mit der jeweiligen Startposition in der codierenden Sequenz des hCAT-1 angegeben.

4.6 Methoden der Zellkultur

Sämtliche Arbeiten mit Zellen wurden unter einer sterilen Werkbank mit sterilen Plastikwaren, Glasgegenständen und Lösungen durchgeführt. Die Zellen wurden in Begasungsbrutschränken bei 37°C und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die benötigte CO₂-Konzentration, sowie das Kultur- und Einfriermedium richteten sich nach der Art der Zelllinie und sind bei der Beschreibung der Zelllinien unter 3.5.1 aufgeführt.

4.6.1 Kultivieren von Zellen

Umsetzen von Zellen

Zellen müssen in regelmäßigen Abständen mit neuem Medium versorgt bzw. verdünnt werden, um ein kontinuierliches Wachstum gewährleisten zu können.

Die konfluenten Zellen wurden zweimal mit 10ml PBS gewaschen, anschließend wurde 1ml Trypsin auf die Zellen gegeben, sodass der Boden der Kulturflasche vollständig bedeckt war. Das Trypsin wurde sofort wieder abgesaugt und die Zellen für 1 bis 10 Min. (je nach Zelllinie) im Brutschrank inkubiert. Zum Ablösen der Zellen wurde die Kulturflasche mehrmals auf die Hand geschlagen. Durch Zugabe von 10ml vorgewärmtem Medium wurden die Zellen von dem Flaschenboden gelöst und kräftig auf- und abpipettiert, um die Zellen zu vereinzeln. Ein Teil (1/3 bis 1/20) der Zellen verblieb in der Flasche und wurde mit neuem Medium aufgefüllt. Die restlichen Zellen wurden verworfen oder bei Bedarf zum Ansetzen von neuen Kulturflaschen oder Gewebekulturplatten für Versuche benutzt. Die Zellen wurden ein- oder zweimal pro Woche umgesetzt.

Einfrieren von Zellen

Durch das Einfrieren von Zellen kann man einerseits Zellen in Reserve behalten und verhindert andererseits, dass die Zellen zu oft umgesetzt werden. Letzteres ist wichtig, da bei jeder Zellteilung die Gefahr von Mutationen besteht und somit auch bei höheren Passagennummern die Wahrscheinlichkeit einer Degeneration der Zellen zunimmt.

Die konfluenten Zellen wurden ein- bis zweimal mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Die abgelösten Zellen wurden in ein 15ml-Spitzbodenröhrchen überführt und abzentrifugiert (5 Min., 4°C, 900rpm, Megafuge). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 3ml vorgekühltem Einfriermedium resuspendiert. Je 1ml der Zellsuspension wurde in Einfrierröhrchen pipettiert und in einem Styropor-Behälter auf Eis gestellt. Der Behälter wurde ÜN bei -70°C gelagert. Hierdurch wurde die Temperatur stufenweise abgesenkt und

verhindert, dass sich beim Einfrieren der Zellen Kristalle bildeten. Am nächsten Tag wurden die Zellen in einen Tank mit flüssigen Stickstoff überführt.

Einige Tage später wurde eine Auftaukontrolle (s. u.) durchgeführt, indem ein Aliquot aufgetaut, und das Anheften und Anwachsen der Zellen überprüft wurde.

Auftauen von Zellen

Da im Einfriermedium stets DMSO enthalten ist, sollten die Zellen so rasch wie möglich aufgetaut werden. Das Einfrierrohrchen wurde aus dem flüssigen Stickstoff genommen und in der Hand aufgewärmt. Die Zellen wurden entnommen und in ein 15ml-Spitzbodenrohrchen mit bereits vorgewärmten 9ml Kulturmedium überführt, gemischt und sofort abzentrifugiert (5 Min., RT, 900rpm, Megafuge). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 10ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden in eine Kulturflasche überführt und in den 37°C-Brutschrank gestellt. Nach 24h wurde das Medium erneuert.

Mycoplasmen-Nachweis

In regelmäßigen Abständen sollten Zellen auf Mycoplasmen-Kontamination überprüft werden. Hierbei wird die DNA durch den Farbstoff 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) sichtbar gemacht, sodass man scharf abgegrenzte Zellkerne erkennen kann. Bei einer Kontamination wird die gefärbte DNA der Mycoplasmen sowohl innerhalb, als auch zwischen den Zellen sichtbar.

Die Zellen wurden mit geringer Konfluenz auf eine 6cm-Gewebekulturschale ausgesät. Nach drei Tagen wurden das Medium abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem Methanol/Eisessig (2:1) für 3 Min. fixiert. Die Fixierlösung wurde entfernt und die Zellen bei RT getrocknet. Anschließend wurden die Zellen mit DAPI gefärbt. Hierzu wurden 2µl einer DAPI-Lösung (0,1% DAPI in Methanol) in 1ml PBS für 5 Min. auf die Zellen gegeben und im Dunkeln inkubiert. Die DAPI-Lösung wurde durch mehrmaliges Spülen mit H₂O entfernt, und die Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop mit einem Filter zur UV-Anregung (Absorptionsspektrum 340nm-380nm) auf Mykoplasmenkontamination durchsucht.

Bestimmung der Zellzahl

Die Neubauer-Zählkammer ist aus vier großen Quadraten aufgebaut, die sich jeweils in 16 kleine Quadrate aufteilen. Bei korrekt aufliegendem Deckglas, erkennbar an den Newton'schen Ringen, entsteht in der Kammer ein definiertes Volumen. Unter dem Mikroskop werden die Zellen auf den großen Quadraten ausgezählt. Der Mittelwert der vier Quadrate wird mit 10⁴ multipliziert. Damit erhält man die Anzahl der Zellen pro ml Medium.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen, wie beim Umsetzen mit Trypsin, abgelöst und vereinzelt. Eine 1:3-Verdünnung der Zellsuspension wurde in eine Neubauer-Zählkammer überführt und die Zellzahl bestimmt.

4.6.2 Transfektion der hCAT-1.EGFP-Konstrukte in adhärenente Zellen

Mit Hilfe der Transfektion kann Fremd-DNA in eukaryotische Zellen geschleust werden. Die Zellen können entweder transient oder stabil transfiziert werden. Bei der transienten Transfektion wird das Fremdgen nicht in das Genom integriert und nur für einen kurzen Zeitraum exprimiert. Bei der stabilen Transfektion wird die DNA in das Genom integriert und somit auf die Tochterzellen weitergegeben. Um die wenigen Zellen, in denen eine Integration stattgefunden hat, selektionieren zu können, werden in der Regel Vektoren benutzt, die eine Antibiotikaresistenz vermitteln. Sämtliche Transfektionen in dieser Arbeit wurden mit dem Effectene[®] Transfektions-Reagenz nach Angaben des Herstellers (Qiagen) durchgeführt.

Transiente Transfektion

Am Tag vor der Transfektion wurden 2×10^5 Zellen in eine 6-Loch-Platte ausgesät. Die Zellen waren am Tag der Transfektion 60-80% konfluent. 0,4µg bis 1µg der Fusionskonstrukte phCAT-1.EGFP-N1, phCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP-N1, bzw. EGFP-N1 (als Kontrolle) wurden in ein steriles 1,5ml-Reaktionsgefäß pipettiert. 3,2µl des mitgelieferten Enhancers wurden zupipettiert und mit dem Transfektionspuffer auf 100µl aufgefüllt. Zu der Probe wurden 10µl Effectene[®]-Reagenz gegeben, der gesamte Ansatz 10s kräftig gemischt und für 5 Min. bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Dann wurde 600µl serumhaltiges Medium zu dem Ansatz gegeben und durch zweimaliges Auf- und Abziehen mit der Probe vermischt. Das Gemisch wurde tropfenweise auf die Zellen gegeben und für 6h im 37°C-Begasungsbrutschrank inkubiert. Nach 6h wurde das Medium durch frisches Kulturmedium ersetzt.

Da sämtliche Transfektionen mit EGFP-Konstrukten bzw. mit EGFP-N1 durchgeführt wurden, konnte die Transfektionseffizienz nach zwei Tagen unter dem Fluoreszenzmikroskop bestimmt werden. Das GFP sowie die Variante EGFP haben die Eigenschaft UV- und Blaulicht zu absorbieren und grünes Licht zu emittieren (Ward *et al.*, 1980). Somit waren die transfizierten Zellen anhand ihrer grünen Fluoreszenz von den nicht transfizierten Zellen deutlich zu unterscheiden (Blaufilter: 350nm-490nm). Transient transfizierte Zellen wurden nach zwei Tagen auf Objektträger umgesetzt und fotografiert.

Stabile Transfektion

Um stabil transfizierte Zellklone zu erhalten wurden die Zellen am zweiten Tag nach der Transfektion auf 15cm-Gewebekulturschalen in einer Verdünnung von 1:10 umgesetzt und zur Selektion mit G418-haltigem Medium kultiviert. Bei den U373MG Glioblastom-Zellen wurde eine Konzentration von 600µg G418 pro ml Kulturmedium eingesetzt. Nach einigen Tagen starben die nicht transfizierten Zellen ab und es bildeten sich Kolonien von transfizierten Zellen. Die Zellkolonien wurden mit Hilfe von Klonierungsringen isoliert, mit Trypsin abgelöst und zunächst in 24-Loch-Platten und anschließend in 25cm²-Kulturflaschen einzeln hochgezogen.

4.6.3 Fixierung von transfizierten Zellen

Da das grün fluoreszierende Protein empfindlich auf Methanol und sonstige Alkohole reagiert und bereits nach kurzem Kontakt seine Fluoreszenz verliert, wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert. Die Zellen wurden auf Deckgläsern in 6-Loch-Platten oder in Deckglas-Gewebekulturkammern kultiviert. Für die Fixierung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit eiskalter 4%iger Paraformaldehyd-Lösung für 5 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen und die getrockneten Deckgläser mit Permafluor[™] auf Objektträgern festgemacht bzw. die Deckglas-Gewebekulturkammern damit eingedeckt. Die Zellen wurden dann unter dem konfokalen Mikroskop von Dr. Strand aus der Inneren Medizin der Universitätsklinik in Mainz abgelichtet.

4.6.4 Konfokale Mikroskopie an lebenden Zellen

Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie konnten auch lebende, mit den EGFP-Konstrukten transfizierte Zellen beobachtet werden. Damit war es möglich, eventuelle Änderungen der subzellulären Lokalisation von hCAT-1 an einer Zelle am Mikroskop zu verfolgen. Dafür wurden die Zellen am Vortag in Deckglas-Gewebekulturkammern dünn ausgesät. Am Mikroskop wurde eine geeignete Zelle ausgesucht und die Belichtungsparameter eingestellt. Die Zelle wurde abgelichtet und anschließend mit 100nM (Endkonzentration) PMA im Medium behandelt. Ohne die Einstellungen des Mikroskops zu verändern, wurde die Zelle in bestimmten Zeitabständen nach Beginn der Behandlung abgelichtet. Als Kontrolle wurden die Zellen mit 0,1% DMSO wie oben beschrieben behandelt.

4.6.5 Behandlung von Zellen mit PMA

Vor der Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen (s. 4.4.4) wurden die Zellen mit PMA und mit dem PKC-Inhibitor BIM I vorbehandelt. Hierbei wurden die Zellen in 10cm-Zellkulturplatten bis zur Konfluenz kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen im jeweiligen Inkubationsmedium mit 100nM PMA inkubiert, je nach Zelllinie für 30 Min. bzw. 4h. Als Kontrolle wurden Zellen mit 0,1% DMSO behandelt. Bei einer Behandlung mit BIM I wurden die Zellen für 30 Min. vor der Zugabe von PMA mit 1 μ M der Substanz inkubiert und während der PMA-Inkubation im Medium beibehalten. Die Kontrollzellen wurden entsprechend mit 0,1% DMSO vorbehandelt. Am Ende der Behandlung wurde die Zellen mit PBS gespült und nach dem Biotinylierungsprotokoll (s. 4.4.4) weiterbehandelt.

4.6.6 Transportstudien an humanen Zellen

Locke's Lösung (10 \times)

1,54M	NaCl
56mM	KCl
10mM	MgCl ₂
36mM	NaHCO ₃
100mM	Hepes

Mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

Am Versuchstag wurde die Lösung 1:10 verdünnt und 2mM CaCl₂ und 5,6mM Glukose dazugegeben.

Für die Aufnahmeversuche wurden die Zellen in 96-Loch-Platten oder 24-Loch-Platten ausgesät, sodass sie am Versuchstag konfluent waren. Wenn nicht anders vermerkt, bestand die Aufnahmelösung aus Locke's Lösung mit 100 μ M L-[³H]Arginin (10 μ Ci/ml).

L-Arginin-Aufnahme

Die L-Arginin-Aufnahme wurde durch Zugabe der Aufnahmelösung mit Hilfe einer Acht-Kanal-Pipette direkt nach dem Spülen der Zellen mit 100 μ M (96-Loch-Platten) bzw. 400 μ l (24-Loch-Platte) Locke's Lösung gemessen. Dafür wurden 50 μ l bzw. 200 μ l der Aufnahmelösung zu den Zellen so schnell wie möglich zupipettiert und die Platte für 30s in einem 37°C-Wasserbad inkubiert. Die Aufnahmelösung wurde durch Ausschlagen der Platte auf Papier entfernt und die Zellen sofort 3mal in eiskalter Locke's Lösung gespült. Um die unspezifische Bindung von L-[³H]Arginin an der Platte bzw. den Zellen zu bestimmen, wurde immer eine Zellreihe erst unmittelbar vor dem Ausschlagen der Platte mit der Aufnahmelösung versetzt. Dieser unspezifische Wert wurde von dem L-[³H]Arginin-Aufnahmewerten abgezogen.

Phorbol-12-myristat-13-acetat

Die konfluenten Zellen wurden vor dem Aufnahmeversuch mit den in Tab. 9 angegebenen Substanzen im jeweiligen Kulturmedium der Zellen, bei kurzen Inkubationen (< 1h) auch in Locke's Lösung mit 100µM L-Arginin, vorbehandelt. Die benutzten Konzentrationen der Substanzen sind in Tab. 9 aufgeführt. Die Behandlung mit den Substanzen erfolgte wie in 4.6.5 für PMA beschrieben. Die Inkubationszeit variierte zwischen 30Min. und 4h und ist bei den jeweiligen Abbildungslegenden im Kapitel 5 angegeben. Nach der Vorbehandlung wurde das Inkubationsmedium abgesaugt oder auf Papier ausgeschlagen. Die Zellen wurden mit 100µM L-Arginin enthaltende Locke's Lösung gespült. Anschließend konnte mit dem Aufnahmeversuch wie oben beschrieben begonnen werden.

Tabelle 9: Verwendete Substanzen für die Phorbol-12-myristat-13-acetat-Behandlung der Zellen

Substanz	Abkürzung	verwendete Konzentrationen	Wirkung
Phorbol-12-myristat-13-acetat	PMA oder TPA	1 - 300nM	PKC-Aktivator
Phorbol-12,13-dibutyrat	PDBu	100 - 150nM	PKC-Aktivator
4α-Phorbol-12,13-didecanoat	4α-PDD	100nM	Inaktiver Phorbol-12-myristat-13-acetat
Bisindolylmaleimid I	BIM I	0,5 - 1µM	PKC-Inhibitor
Dimethylsulfoxid	DMSO	0,1 - 0,3%	Lösungsmittel für die Substanzen

*Lysieren der Zellen und Radioaktivitätsbestimmung*Puffer P

50mM Tris-HCl (pH 7,4)
 0,5mM EDTA
 0,5mM Ethylenbis(oxyethylenitrilo)tetraessigsäure (EGTA)

Die Zellen wurden mit 50µl (96-Loch-Platte) bzw. 150µl (24-Loch-Platte) 0,5N NaOH 30 Min. bei Raumtemperatur lysiert, und die Lysate mit 50µl bzw. 150µl 0,5N HCl neutralisiert. Dann wurden 100µl respektive 300µl Puffer P zu den Proben gegeben und ein Aliquot von 100µl bzw. 150µl wurde in Szintillationsröhrchen überführt. Nach Zugabe von 2ml Szintillationsflüssigkeit wurde die enthaltene Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen (s. 4.1.7). Das restliche Zelllysate wurde für die Bestimmung der Proteinkonzentration eingesetzt (s. 4.4.5).

4.7 Auswertung und Berechnungen

4.7.1 Regressionen

Lineare und nicht lineare Regressionen wurde mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) auf IBM-Computer mit Pentium-Prozessor, Betriebssysteme NT4.0 / WinXP oder mit einem Macintosh-Computer mit MacOS 8.0-Betriebssystem berechnet.

Equilibrium-exchange -Kurven

Die L-Arginin-Influx und -Efflux Messpunkte wurden durch Regression an folgende Exponentialfunktionen angepasst:

$$\text{Für den Influx : } Y = Y_{\max} (1 - e^{-k \cdot X})$$

$$\text{Für den Efflux: } Y = A_1 e^{(-X - k_1 / \tau_{1/2})}$$

Daraus wurden Geschwindigkeitskonstante (τ) und Halbwertszeit ermittelt.

Bestimmung von V_{\max} und K_M aus Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden für die einzelnen hCAT-exprimierenden Oozyten durch Messung des Stromes oder der Leitfähigkeit bei unterschiedlichen BAS-Konzentrationen durchgeführt. Durch Auftragung der gemessenen Werte über deren zugehörige BAS-Konzentration erhielt man eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Die Punkte wurden an die *Michaelis-Menten-Gleichung* : $Y = V_{\max} \cdot [S] / (K_M + [S])$ angepasst. Unter der Annahme, dass der Transport von BAS der Michaelis-Menten-Kinetik folgte, wurde aus der erhaltenen Regressionskurve die maximale Geschwindigkeit V_{\max} und die Michaelis-Menten-Konstante K_M berechnet.

4.7.2 Statistik

Standardabweichungen, Standardfehler und alle Signifikanztests wurden am Computer mit Hilfe der Programme GraphPad Prism 3.0 und Microsoft[®] Excel 2000 (Microsoft Co.) berechnet. Statistische Analysen wurden mit dem ANOVA-Varianztest, gefolgt von dem t-Test nach Bonferroni durchgeführt. P-Werte von <0,05, <0,01 und <0,001 wurden als signifikant mit jeweils (*), (**) bzw. (***) gekennzeichnet. Keine Signifikanz wurde mit *ns* markiert.

5. Ergebnisse

Abschnitt I: Elektrophysiologische Charakterisierung von hCAT-1 im Vergleich zu hCAT-2A und hCAT-2B

Für die folgende elektrophysiologische Charakterisierung von hCAT-1 im Vergleich zu hCAT-2A und -2B wurden *X. laevis*-Oozyten als Expressionssystem benutzt. Die Oozyten wurden mit 40 ng hCAT-1-, -2A- oder -2B-cRNA injiziert. Als Kontrollen wurden dH₂O-injizierte Oozyten benutzt. Mit Hilfe der TEVC-Methode wurden nach 3-5 Tagen Expressions- und Inkubationszeit das Membranpotential und die -ströme gemessen. Um den Einfluss der intrazellulären BAS-Konzentration auf den Transport von L-Arginin zu untersuchen, wurden die Messungen an Oozyten durchgeführt, die über die gesamte Expressionszeit in ND96-Puffer (BAS-depletierte Oozyten) oder in Oozyten- Kulturmedium (BAS-beladene Oozyten) inkubiert worden waren. Um die Frage zu beantworten, auf welche Art und Weise Membranpotential und Substrat-Konzentration die Akkumulation von BAS durch die einzelnen hCAT-Isoformen beeinflussen, wurde die radioaktive Aufnahme von L-Arginin in 2mM und 96mM K⁺-Puffer mit verschiedenen L-Arginin-Konzentrationen in hCAT-exprimierenden Oozyten bestimmt. Zum Abschluss der elektrophysiologischen Untersuchungen wurden die in Abwesenheit von BAS in hCAT-injizierten Oozyten vorkommenden unspezifischen Membranströme, so genannte Leck-Ströme, genauer untersucht und nach den möglichen Ionen gesucht, die diese Ströme verursachen können.

5.1 Rolle des Membranpotentials für die Verteilung basischer Aminosäuren in hCAT-1-, hCAT-2A- und hCAT-2B-exprimierenden Oozyten

5.1.1 Im Gegensatz zu hCAT-2A und -2B war das Membranpotential von hCAT-1-exprimierenden Oozyten nicht vom Beladungszustand der Zellen mit basischen Aminosäuren abhängig

Mit hCAT-1, -2A, -2B-cRNA oder mit dH₂O-injizierte Oozyten wurden über die gesamte Expressionszeit von 3 Tagen in ND96-Puffer depletiert bzw. in Oozyten-Kulturmedium mit BAS beladen. Anschließend wurde das Membranpotential in BAS-freiem Puffer (ND96-Puffer) gemessen. Das Membranpotential der hCAT-1-injizierten Oozyten war nicht signifikant von dem der H₂O-injizierten Kontroll-Oozyten zu unterscheiden (Abb. 6),

obwohl hCAT-1-exprimierende Oozyten die Tendenz zu einem negativeren Membranpotential zeigten (hCAT-1: $-53 \pm 5\text{mV}$ bzw. $-45 \pm 2\text{mV}$ und H_2O : $-44 \pm 5\text{mV}$ bzw. $-35 \pm 3\text{mV}$, jeweils für BAS-beladene bzw. BAS-depletierte Oozyten). Im Vergleich dazu wiesen mit BAS-beladene hCAT-2A- und -2B-exprimierende Oozyten nach dem Überführen in BAS-freien Puffer ein signifikant negativeres Membranpotential auf (jeweils $-71 \pm 3\text{mV}$ bzw. $-68 \pm 5\text{mV}$). Wurde dagegen das Membranpotential dieser hCAT-Isoformen in BAS-depletierter Oozyten bestimmt, konnte kein signifikanter Unterschied zum Membranpotential der entsprechenden H_2O -Kontrollen beobachtet werden. Die Bildung eines BAS-Potentials wurde also nur in hCAT-2A- und -2B-exprimierenden Oozyten beobachtet und dieses nur nach Beladung der Oozyten mit BAS.

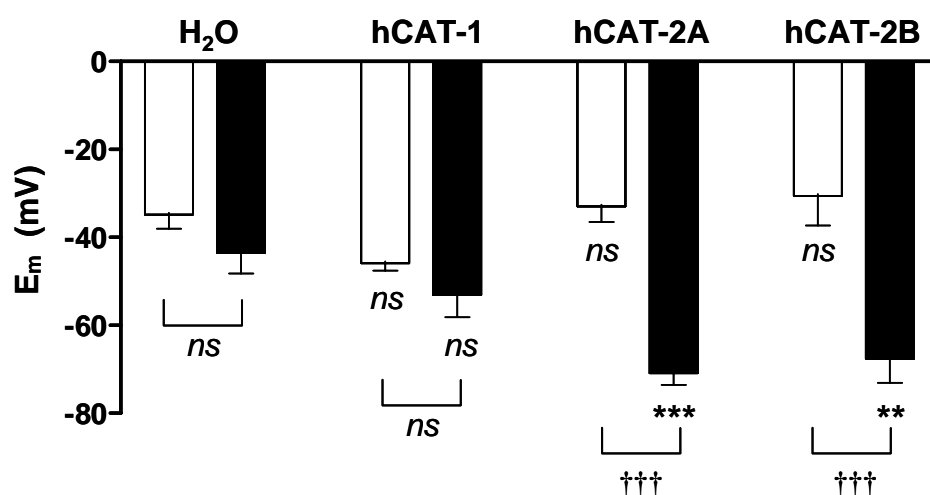


Abbildung 6: Abhängigkeit des Membranpotentials hCAT-exprimierender Oozyten vom Beladungszustand der Zellen mit basischen Aminosäuren

Oozyten wurden mit 30ng (in 40nl dH_2O) cRNA der angegebenen hCAT-Isoformen oder mit 40nl dH_2O injiziert und über die Expressionszeit von 3 - 5 Tagen in ND96-Puffer (BAS -depletierter Oozyten, weiße Balken) oder in Oozyten-Kulturmedium (enthält 1,45mM L-Arg und 0,25mM L-Lys, BAS -beladene Oozyten, schwarze Balken) inkubiert. Anschließend wurde das Membranpotential der einzelnen Oozyten in ND96-Puffer ohne BAS bestimmt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM (n=12-20 Oozyten). Statistische Analysen wurden mit dem ANOVA-Varianztest, gefolgt von dem t-Test nach Bonferroni durchgeführt. Die hCAT-exprimierenden Oozyten wurden zu den respektiven H_2O -injizierten Kontroll-Oozyten verglichen, P-Werte von $<0,01$ und $<0,001$ sind jeweils mit (**) und (***) gekennzeichnet. Vergleich zwischen den unterschiedlichen Inkubationsbedingungen, P-Werte von $<0,001$ sind mit (†††) markiert, keine Signifikanz mit *ns*.

5.1.2 Im depletierten Zustand wurde das Membranpotential der hCAT-exprimierenden Oozyten ausschließlich vom K^+ -Potential bestimmt

Im vorhergehenden Abschnitt konnte gezeigt werden, dass das Membranpotential von hCAT-2A- und -2B-exprimierenden, mit BAS beladenen Oozyten, aus einer weiteren Komponente besteht: dem BAS-Potential. Zusätzlich zum K^+ -Potential trägt das BAS-Potential zur Hyperpolarisierung der Zellen bei. Um zu klären, ob demzufolge das Membranpotential in BAS-depletierten Oozyten ausschließlich durch das K^+ -Potential bestimmt wird, wurde das Membranpotential der Oozyten in K^+ -Puffer (96mM K^+ , E_m aufgehoben) gemessen und mit den zuvor bestimmten Werten in ND96-Puffer (2mM K^+ , E_m vorhanden) aus Abb. 6 verglichen. Die Ergebnisse in Abb. 7 zeigen, dass das Membranpotential hCAT-exprimierender Oozyten auf ähnliche Weise wie bei H_2O -Kontrollen durch die Zugabe von K^+ -Puffer auf Werte zwischen $-5mV$ und $-7mV$ nahezu vollständig aufgehoben wurde.

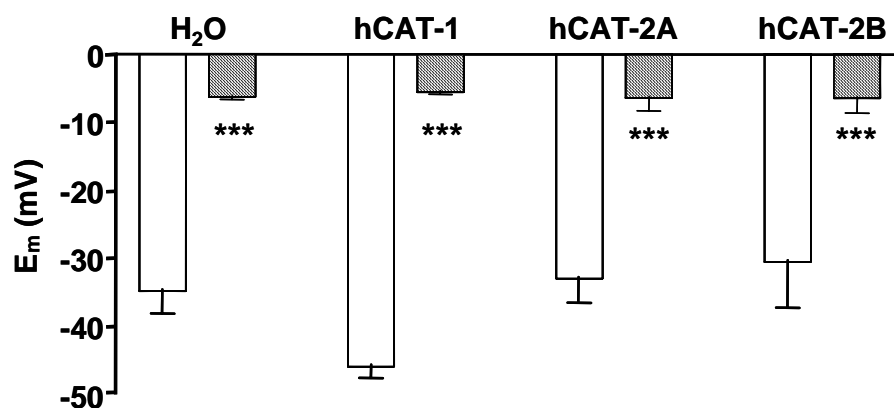


Abbildung 7: Membranpotential depletierter Oozyten in Abhängigkeit von der K^+ -Konzentration

Oozyten wurden mit 30ng (in 40nl dH_2O) cRNA der angegebenen hCAT-Isoformen oder mit 40nl dH_2O injiziert. Die Oozyten wurden während der gesamten Expressionszeit von 3 - 5 Tagen in ND96-Puffer depletiert. Anschließend wurde das Membranpotential in K^+ -Puffer (96mM K^+ , gestreifte Balken) bestimmt und mit dem Membranpotential der Oozyten in ND96-Puffer (2 mM K^+ , weiße Balken) verglichen. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM (n=9-22). Die statistische Analyse wurde mit dem ANOVA-Varianztest durchgeführt. Es wurden die jeweiligen ND96- gegen K^+ -Puffer-Werte verglichen. P-Werte von $< 0,001$ sind mit (***) gekennzeichnet.

5.1.3 Das Membranpotential und die L-Arginin-Konzentration beeinflussten die Akkumulation von L-Arginin in hCAT-exprimierenden Oozyten

Um die Frage zu klären, welche Rolle das Membranpotential und die BAS-Konzentration für die Akkumulation von BAS durch die einzelnen hCAT-Isoformen spielt, wurde die Aufnahme von verschiedenen Konzentrationen an L-Arginin für hCAT-1-, -2A-, und -2B-exprimierende Oozyten in Na^+ -Aufnahmepuffer (2mM K^+) und in K^+ -Puffer (96mM K^+) bestimmt. Hierbei wurden jeweils $10\mu\text{Ci/ml}$ L-[^3H]Arginin verwendet. Daraus wurde das L[^3H]-Arginin-Verteilungsvolumen errechnet (siehe Methoden, 4.1.8), welches das intra- und extrazelluläre Konzentrationsverhältnis von L-Arginin angibt. In Abb. 8 sind die Ergebnisse zusammengefasst. In Anwesenheit des Membranpotentials in Na^+ -Aufnahmepuffer (für die verschiedenen $[\text{L-Arg}]_o$ zwischen -22 und -30mV , s. Tab. 10) akkumulierten die Oozyten deutlich mehr L-Arginin als in K^+ -Puffer. Die Akkumulation von L-Arginin in K^+ -Puffer wurde bei L-Arginin-Konzentrationen zwischen $0,01 - 1\text{mM}$ 2- bis 3-fach reduziert. Bei 10mM L-Arginin konnte nur bei hCAT-2A-injizierten Oozyten nach Aufhebung des Membranpotentials in K^+ -Puffer eine Reduktion der L-Arginin-Akkumulation auf etwa die Hälfte beobachtet werden (von 1ml/g auf $0,6\text{ml/g}$). Dagegen zeigten mit hCAT-1- oder -2B-injizierte Oozyten bei 10mM L-Arginin keinen Unterschied der L-Arginin-Akkumulation in Abhängigkeit von der K^+ -Konzentration. Das Verteilungsvolumen erreichte hier jeweils $0,3$ bzw. $0,5\text{ml/g}$. Bemerkenswert ist, dass bei einer L-Arginin-Konzentration von 1mM bei allen hCAT-Isoformen eine ähnliche Verteilung von L-Arginin intra- und extrazellulär beobachtet werden konnte. Das L-Arginin-Verteilungsvolumen in Na^+ -Aufnahmepuffer lag bei $2 - 2,4\text{ml/g}$, in K^+ -Puffer betrug der Wert 1ml/g .

Um das Membranpotential der Oozyten bei den verschiedenen Inkubationsbedingungen der Langzeit-Aufnahmeversuche überprüfen zu können, wurde in Parallelversuchen das Membranpotential der hCAT-exprimierenden Oozyten unter exakt gleichen Inkubationsbedingungen nach 6h bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 10 zusammengefasst und zeigen, dass das Membranpotential hauptsächlich vom K^+ -Diffusionspotential getragen wurde und im Equilibrium durch die unterschiedlichen L-Arginin-Konzentrationen wenig beeinflusst wurde.

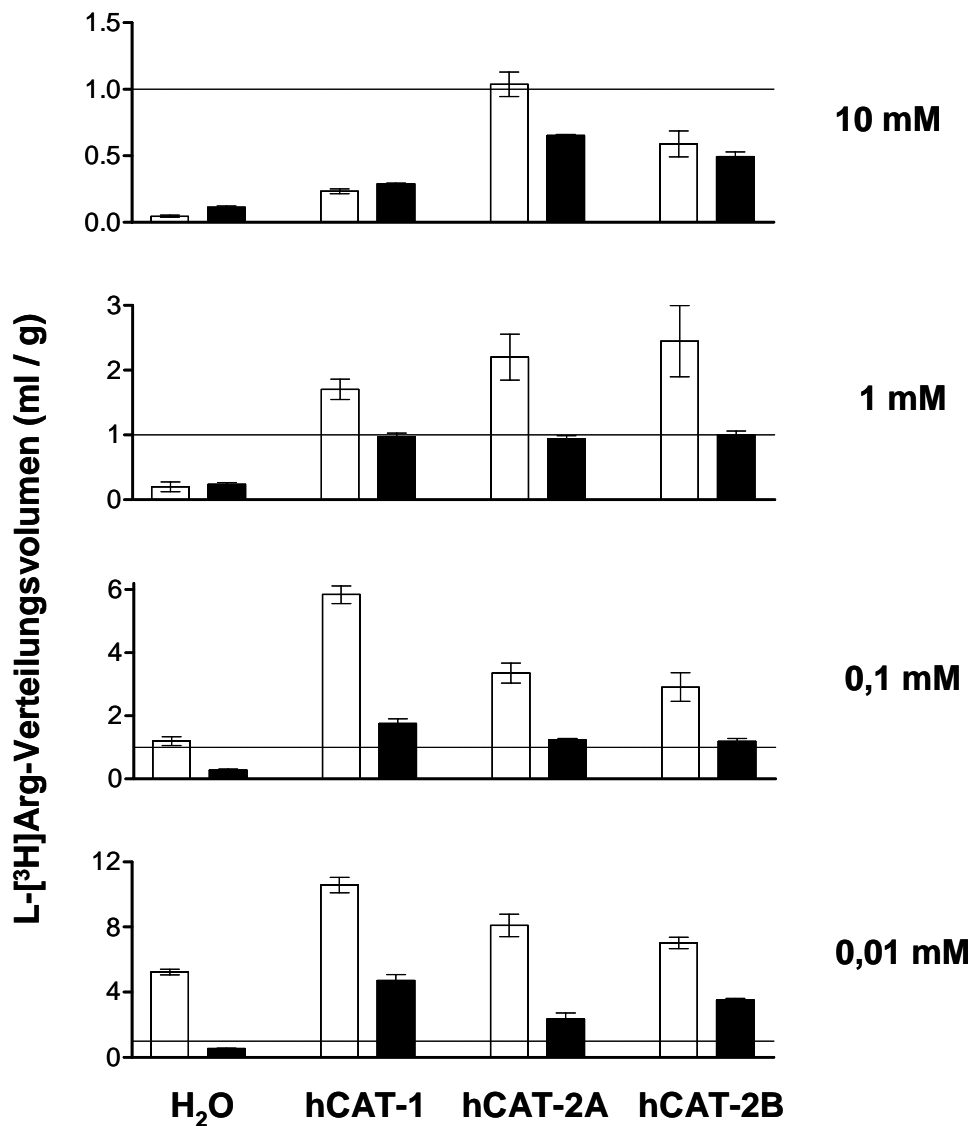


Abbildung 8: Einfluss des Membranpotentials und der L-Arginin-Konzentration auf die L-Arginin-Akkumulation in hCAT-exprimierenden Oozyten

Drei bis fünf Tage nach der Injektion von 30ng cRNA der angegebenen hCAT-Isoformen oder 40nl H₂O in Oozyten wurde die Aufnahme von 10 μ Ci/ml L-[³H]Arginin (in den rechts neben den Graphen angegebenen Konzentrationen) über 6 Stunden in Na⁺-Aufnahmepuffer (weiße Balken) oder in K⁺-Puffer (schwarze Balken) bestimmt. Daraus wurde das L-[³H]Arginin-Verteilungsvolumen errechnet (siehe Methoden, 4.1.8). Ein Verteilungsvolumen von eins bedeutet eine Gleichverteilung der intra- und extrazellulären L-Arginin-Konzentration (gestrichelte Linie). Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM (n=9-15).

Tabelle 10: Membranpotential von hCAT-injizierten Oozyten nach 6h Inkubation in unterschiedlichen L-Arginin- und K⁺-Konzentrationen

Membranpotential (mV)								
[L-Arg] _o	0,01 mM		0,1 mM		1 mM		10 mM	
[K ⁺] _o	2mM	96mM	2mM	96mM	2mM	96mM	2mM	96mM
hCAT-1	-22 ± 1	-6 ± 1	-28 ± 1	-6 ± 0,5	-26 ± 1	-5 ± 0,5	-26 ± 2	-5 ± 0,4
hCAT-2A	-26 ± 4	-8 ± 1	-28 ± 1	-8 ± 1	-30 ± 1	-3 ± 0,3	-21 ± 1	-4 ± 0,4
hCAT-2B	-22 ± 2	-7 ± 1	-27 ± 3	-8 ± 1	-28 ± 1	-2 ± 0,4	-21 ± 1	-5 ± 0,7

Nach dem Equilibrieren der hCAT-injizierten Oozyten über 6h in ND96-Puffer ([K⁺]_o=2mM) oder K⁺-Puffer ([K⁺]_o=96mM) mit unterschiedlichen L-Arginin-Konzentrationen wurde das Membranpotential in der jeweiligen Inkubationslösung bestimmt. Daten sind Mittelwerte ± SEM (n=4-6).

5.1.4 Im Gleichgewicht war der hCAT-vermittelte Influx und Efflux von L-Arginin spiegelbildlich

Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt wurde, konnte nach der 6-stündigen Inkubation der Oozyten in K⁺-Puffer mit einer extrazellulären L-Arginin-Konzentration von 1mM ein Equilibrium der intra- und extrazellulären L-Arginin-Konzentration bei allen hCAT-Isoformen beobachtet werden. Unter diesen Bedingungen unterscheidet sich also das elektrochemische Gleichgewicht für L-Arginin zwischen den einzelnen hCAT-injizierten Oozyten nicht. Der Influx und Efflux von L-Arginin müsste also unter diesen Bedingungen gleich sein. Um dies zu überprüfen, wurden Influx- bzw. Efflux-Kurven durch Zugabe von 10µCi/ml L-[³H]Arginin zu den 4 - 6h in K⁺-Puffer und 1mM L-Arginin equilibrierten hCAT-exprimierenden Oozyten bestimmt: so genannte Equilibrium-exchange-Kurven (Abb. 9). Die L-Arginin Influx- und Efflux-Kurven der einzelnen hCAT-Isoformen waren spiegel-symmetrisch mit identischen Zeitkonstanten (hCAT-1: τ = 34 Min.; hCAT-2A: τ = 59 Min.; hCAT-2B: τ = 30 Min.), und die L-Arginin-Aufnahme bzw. -Abgabe erfolgte deutlich schneller als in H₂O-injizierten Oozyten (nicht gezeigt, τ = 550 Min.). hCAT-2A-exprimierende Oozyten benötigten unter diesen Bedingungen doppelt so lange, um das Tracer-Gleichgewicht zu erreichen wie hCAT-1- bzw. hCAT-2B-injizierte Oozyten.

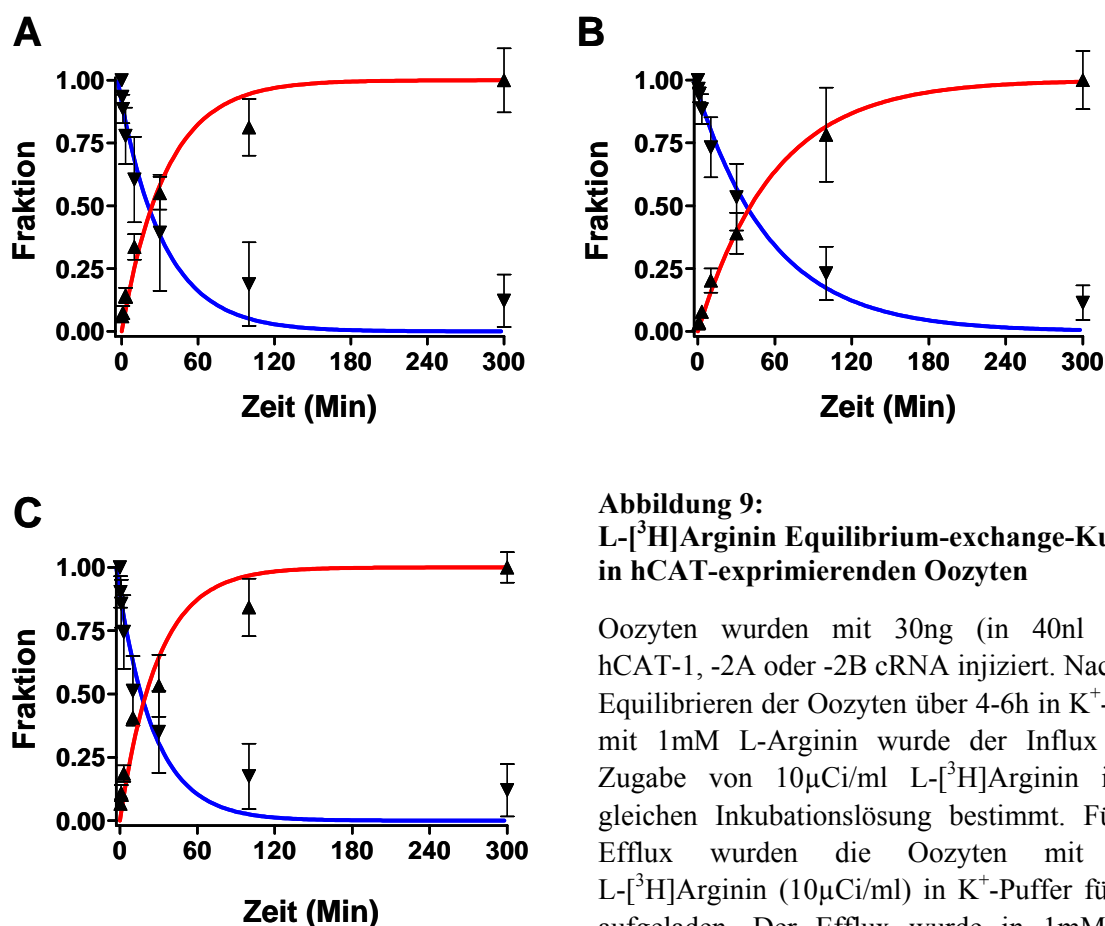


Abbildung 9:
L-[³H]Arginin Equilibrium-exchange-Kurven
in hCAT-exprimierenden Oozyten

Oozyten wurden mit 30ng (in 40nl dH₂O) hCAT-1, -2A oder -2B cRNA injiziert. Nach dem Equilibrieren der Oozyten über 4-6h in K⁺-Puffer mit 1mM L-Arginin wurde der Influx durch Zugabe von 10μCi/ml L-[³H]Arginin in der gleichen Inkubationslösung bestimmt. Für den Efflux wurden die Oozyten mit 1mM L-[³H]Arginin (10μCi/ml) in K⁺-Puffer für 3-4h aufgeladen. Der Efflux wurde in 1mM nicht

radioaktivem L-Arginin durch Auswechseln der Inkubationslösung bestimmt. Die L-Arginin-Influx- und -Efflux-Kurven der einzelnen hCAT-Isoformen wurden durch Regression an Exponentialfunktionen bestimmt (s. Methoden 4.7.1). Die Kurven waren spiegelsymmetrisch mit identischen Zeitkonstanten: A) hCAT-1: $\tau = 34$ Min.; B) hCAT-2A: $\tau = 59$ Min.; C) hCAT-2B: $\tau = 30$ Min.. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=12-20).

5.2 Durch basische Aminosäuren induzierte Membranströme in hCAT-1-, hCAT-2A- und hCAT-2B-exprimierenden Oozyten

5.2.1 Die BAS-induzierten Membranströme der hCAT-Isoformen waren unterschiedlich groß

Nach der Expression von hCAT-1, -2A oder -2B in *X. laevis*-Oozyten wurde der L-Arginin-induzierte Strom mit Hilfe der two-electrode voltage clamp (TEVC)-Methode (s. 4.2.1) gemessen. Bei einem Haltepotential von -60 mV wurde der Stromverlauf durch die Oozyten nach Zugabe sättigender Konzentrationen an L-Arginin gemessen (1mM bei hCAT-1 bzw. -2B und 10mM bei hCAT-2A bzw. H₂O-Kontrollen). Außerdem wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven von L-Arginin und L-Ornithin bestimmt.

L-Arginin-Maximalströme

In Abb. 10A sind repräsentative Spuren der L-Arginin-induzierten Maximalströme für die einzelnen hCAT-exprimierenden Oozyten bei einem Haltepotential von -60mV gezeigt. Alle hCAT-Isoformen zeigten einen L-Arginin-induzierten Einwärtsstrom. Bei hCAT-1-exprimierenden Oozyten war der L-Arginin-induzierte Strom am kleinsten, im Mittel $29 \pm 7\text{nA}$ (Abb. 10B). In manchen Fällen war es schwierig, in hCAT-1-exprimierenden Oozyten überhaupt einen L-Arginin-Strom zu detektieren, da der Strom bei Werten um 5nA lag, was nur unter einer starken Amplifizierung des Signals zu erkennen war. Die L-Arginin-induzierten Ströme bei hCAT-2B-exprimierenden Oozyten waren im Mittel bei $94 \pm 13\text{nA}$. Dagegen wurden bei hCAT-2A-exprimierenden Oozyten die größten L-Arginin-induzierten Ströme mit Werten zwischen 140 bis 200nA beobachtet, im Mittel bei $162 \pm 30\text{nA}$, in seltenen Fällen auch bis zu 300nA . Bei H_2O -injizierten Oozyten wurden bei -60mV in der Regel keine Änderungen des Membranstromes durch die L-Arginin-Zugabe beobachtet (Abb. 10A), in manchen Fällen jedoch ein Einwärtsstrom von maximal 5nA . Erst bei hyperpolarisierenden Haltepotentialen von -90mV bis -140mV wurden auch leichte Änderungen des Membranstromes auf Werte zwischen 5nA bis 15nA beobachtet (s. a. Abb. 12).

Konzentrations-Wirkungs-Kurven von L-Arginin und L-Ornithin

Durch den geringen L-Arginin-induzierten Strom bei hCAT-1-injizierten Oozyten war es nicht möglich, eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve bei -60mV oder auch bei negativeren Membranpotentialen durchzuführen. Daher wurde die konzentrationsabhängige Zunahme des L-Arginin-Stromes unter Gleichgewichtsbedingungen bestimmt (s. 5.2.4). In hCAT-2A- und -2B-exprimierenden Oozyten wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven bei -60mV bestimmt. In Abb. 11A und C sind die konzentrationsabhängigen L-Arginin- (für hCAT-2B auch L-Ornithin) induzierten Ströme an einer hCAT-2A- bzw. hCAT-2B-exprimierenden Oozyte gezeigt. Der Membranstrom nahm konzentrationsabhängig zu. Durch Auftragung der gemessenen Ströme über deren zugehörige BAS-Konzentration erhielt man eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Unter der Annahme, dass der Transport von BAS der Michaelis-Menten-Kinetik folgte, wurden die Punkte an die Michaelis-Menten-Gleichung (s. 4.7.1) angepasst (Abb. 11B und D). Aus der erhaltenen Regressionskurve konnten die K_M - und V_{max} -Werte für L-Arginin bzw. L-Ornithin berechnet werden. Für das gezeigte Beispiel mit der hCAT-2A-exprimierenden Oozyte betragen K_M und V_{max} für L-Arginin $0,94\text{mM}$ und 262nA . In dem Beispiel mit der hCAT-2B-injizierten Oozyte betragen K_M und V_{max} für

L-Arginin bzw. L-Ornithin jeweils 0,13mM und 124nA bzw. 0,18mM und 87nA. Der K_M -Wert für die jeweilige BAS änderte sich nicht, wenn die Reihenfolge der BAS-Zugabe geändert wurde (L-Arg: $0,1 \pm 0,06$ mM bzw. L-Orn: $0,14 \pm 0,02$ mM; Mittelwerte \pm SEM, $n=4$).

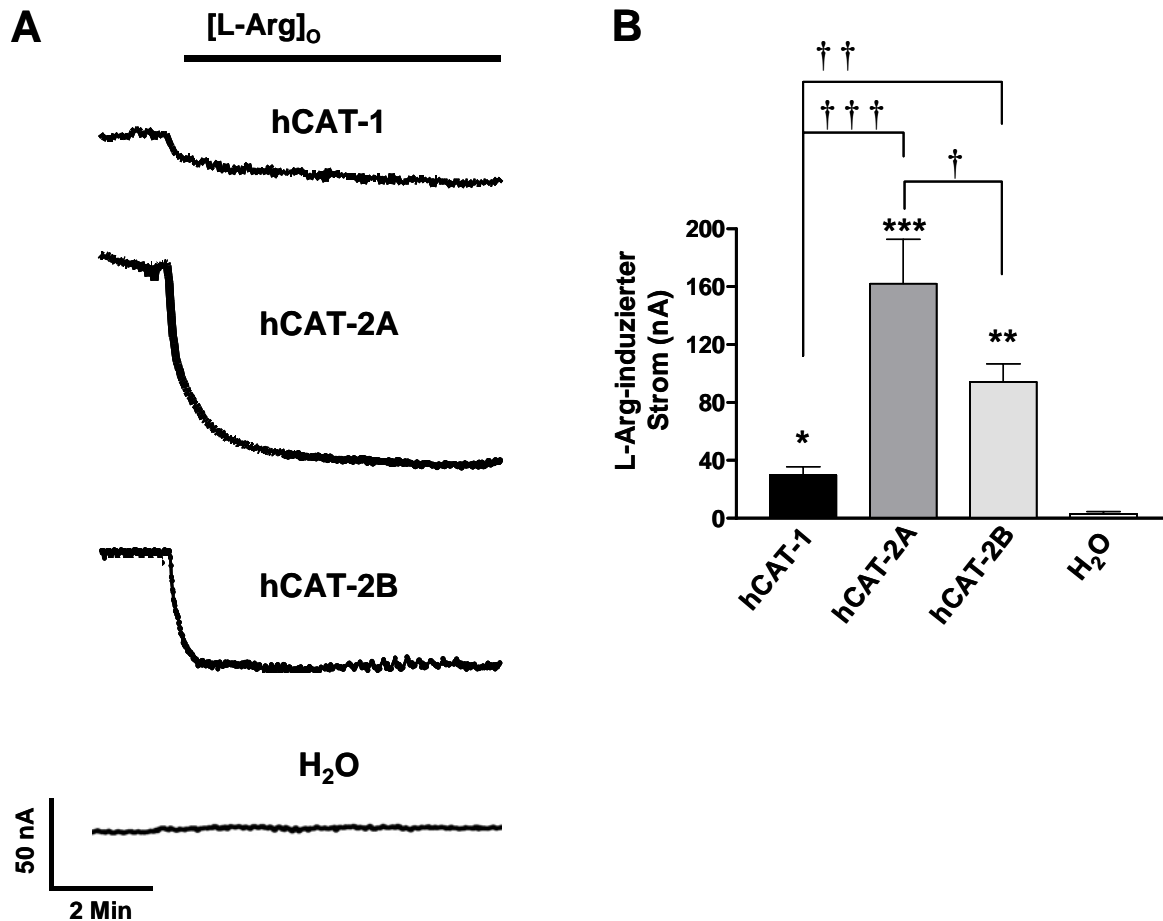


Abbildung 10: L-Arginin-induzierte Membranströme in hCAT-exprimierenden Oozyten

X. laevis-Oozyten wurden mit 30ng (in 40nl dH₂O) cRNA der angegebenen hCAT-Isoformen oder 40nl dH₂O injiziert. Nach 3-5 Tagen Inkubation in ND96-Puffer (BAS-depletierte Oozyten) wurde der induzierte Strom nach Zugabe von sättigenden Konzentrationen L-Arginin (1mM bei hCAT-1 bzw. -2B und 10 mM bei hCAT-2A bzw. H₂O-Kontrollen) bei einem Haltepotential von -60 mV gemessen. A) Repräsentative Stromspuren von jeweils einer hCAT-exprimierenden und H₂O-injizierten Oozyte. Der schwarze Balken repräsentiert die L-Arginin-Zugabe. B) Zusammenfassung der L-Arginin-induzierten Maximalströme. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM (hCAT-1, $n=25$; hCAT-2A, $n=12$; hCAT-2B, $n=10$; H₂O-Kontrollen $n=9$). Statistische Analysen wurden mit dem ANOVA-Varianztest, gefolgt von dem t-Test nach Bonferroni durchgeführt. Vergleich zwischen hCAT-1, -2A bzw. -2B zur H₂O-Kontrolle: P-Werte von $<0,5$, $<0,01$ und $<0,001$ sind jeweils mit (*), (**) und (***) gekennzeichnet. Vergleich zwischen den hCAT-Isoformen: P-Werte von $<0,5$, $<0,01$ und $<0,001$ sind mit (†), (††) und (†††) markiert.

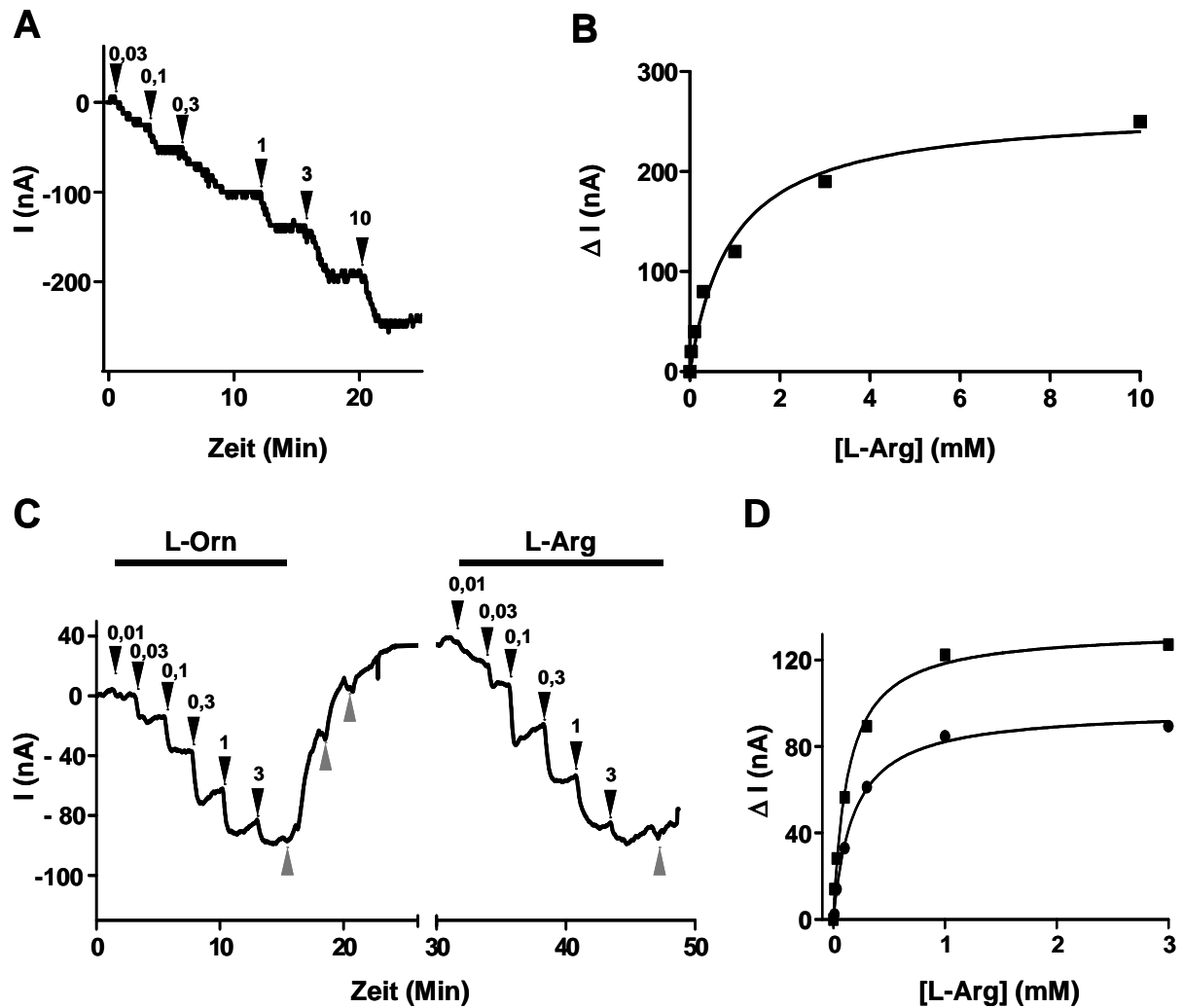


Abbildung 11: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von hCAT-2A- und hCAT-2B-exprimierenden Oozyten

Oozyten wurden mit 30ng (in 40nl dH₂O) hCAT-2A- bzw. hCAT-2B-cRNA injiziert. Nach 3-5 Tagen wurde durch Zugabe der angegebenen Konzentrationen an L-Arginin bzw. L-Ornithin der induzierte Stromverlauf bei einem Haltepotential von -60mV registriert. A) Repräsentative Stromspur von einer hCAT-2A-exprimierenden Oozyte die mit steigenden Konzentrationen von L-Arginin behandelt wurde B) Konzentrations-Wirkungs-Kurven der in A gezeigten L-Arginin-induzierten Ströme. C) Repräsentative Stromspuren von einer hCAT-2B-exprimierenden Oozyte die nacheinander mit steigenden Konzentrationen von L-Ornithin bzw. L-Arginin behandelt wurde. Die grauen Pfeile zeigen die Waschschritte mit ND96-Puffer an. D) Konzentrations-Wirkungs-Kurven der in C gezeigten L-Arginin-(■) und L-Ornithin-(●) induzierten Ströme.

5.2.2 Die Leitfähigkeit der einzelnen hCAT-Isoformen war abhängig vom Beladungszustand der Oozyten mit basischen Aminosäuren

Durch sukzessive Veränderungen der Klemmspannung in 10mV-Schritten zwischen -140mV und +40mV wurden Strom-Spannungs(I/V)-Beziehungen von hCAT-1-, -2A-, -2B- und H₂O-injizierten Oozyten jeweils vor und nach der Zugabe von sättigenden Konzentrationen an L-Arginin bestimmt (Abb. 12). Dabei wurden Oozyten untersucht, die während der gesamten Expressionszeit in ND96-Puffer von BAS depletiert oder in Oozyten-Kulturmedium mit BAS beladen worden waren. Durch lineare Regression der I/V-Kurven zwischen Membranpotentialwerten von -100mV bis 0mV wurde die Steigung der I/V-Kurven ermittelt, die als Maß für die Leitfähigkeit (G) gilt, entsprechend der Gleichung: $G = \delta I / \delta E$. Die Leitfähigkeit gilt als Maß für die Ionenmenge, die die Zellmembran passiert, und kann daher für den Vergleich der elektrischen Eigenschaften der hCAT-injizierten Oozyten benutzt werden.

Die Leitfähigkeiten der einzelnen hCAT- und der H₂O-injizierten Oozyten sind in Tab. 11 zusammengefasst. Betrachtet man zunächst die Leitfähigkeiten der Oozyten vor der L-Arginin-Zugabe, so kann man erkennen, dass alle hCAT-exprimierenden Oozyten eine höhere Leitfähigkeit als die H₂O-injizierten Kontroll-Oozyten aufweisen, unabhängig von der Vorinkubationsbedingung. hCAT-2A und -2B weisen eine höhere Leitfähigkeit in BAS-depletierten als in BAS-beladenen Oozyten auf, wohingegen die Verhältnisse bei hCAT-1 umgekehrt sind. Die Zugabe von L-Arginin führte in BAS-depletierten Oozyten bei allen hCAT-Isoformen zu einem Einwärtsstrom mit einer Erhöhung der Leitfähigkeit (Abb. 12A, C und E und Tab. 11). Dagegen führte die L-Arginin-Zugabe bei BAS-beladenen Oozyten zwar ebenfalls zu einem Einwärtsstrom, aber zu keiner Erhöhung der Leitfähigkeit von hCAT-1 und hCAT-2B (Abb. 12B und F und Tab. 11). Das Umkehrpotential (E_R) wurde hier deutlich von -74mV auf -46mV (hCAT-1) und von -79mV auf -27mV (hCAT-2B) verschoben (-55mV auf -44mV bzw. -43 auf -27 bei BAS-depletierten Oozyten). Unter diesen Bedingungen zeigten hCAT-2A-injizierte Oozyten eine geringere Zunahme der Leitfähigkeit als in BAS-depletierten Oozyten. Das E_R wurde auch hier deutlich von -69mV auf -14mV verschoben (-21mV auf 0mV bei BAS-depletierten Oozyten) (Abb. 12D).

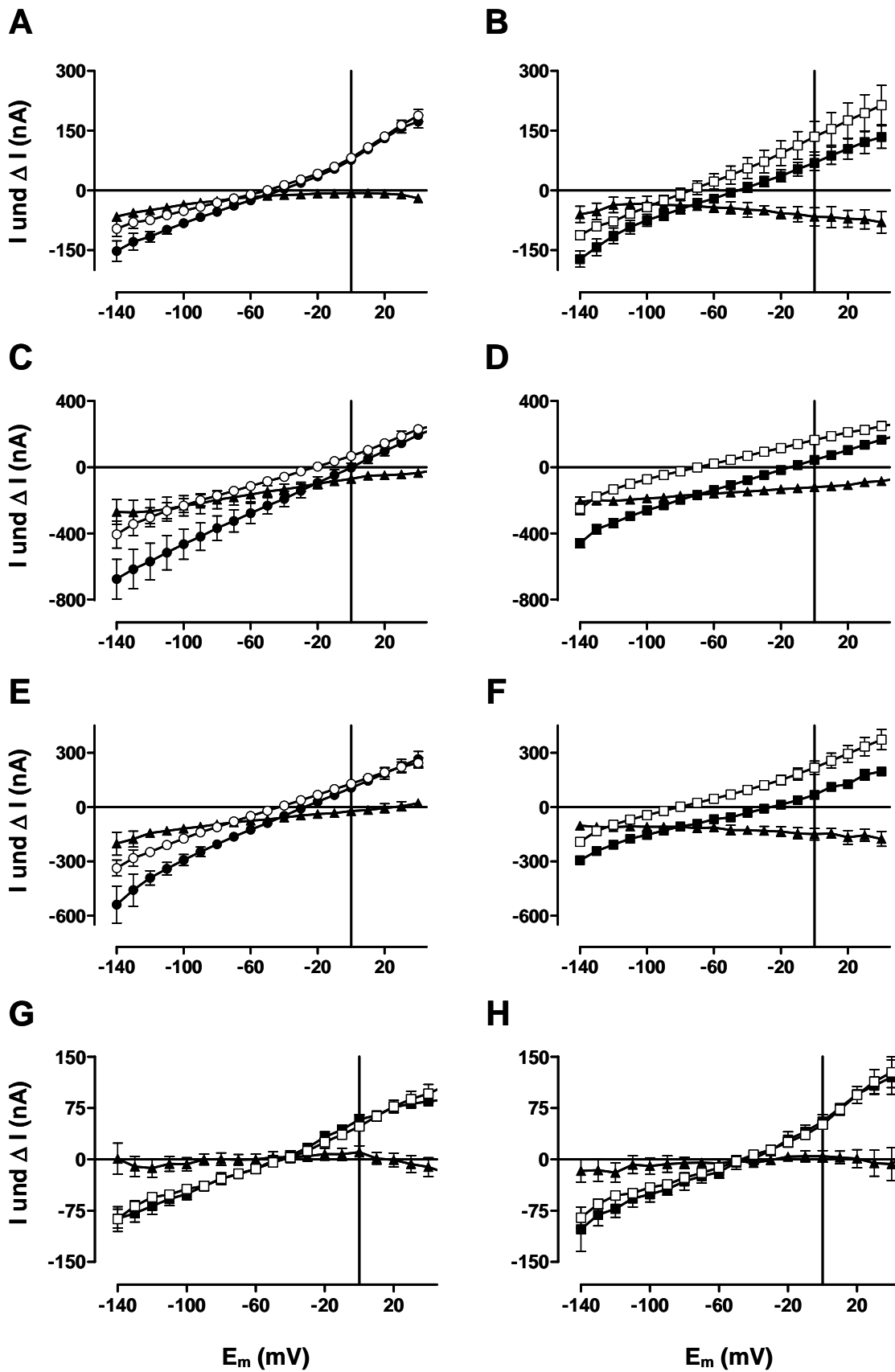


Abbildung 12: I/V-Beziehungen hCAT-exprimierender Oozyten in Abhängigkeit vom Beladungszustand der Zellen mit basischen Aminosäuren

(Legende zu Abb. 12)

X. laevis-Oozyten wurden mit 30ng (in 40nl dH₂O) cRNA der unten angegebenen hCAT-Isoformen injiziert und wie in Abb. 6 angegeben inkubiert. Darauf folgend wurden I/V-Beziehungen durch sukzessive Veränderung des Membranpotentials auf Werte zwischen -140mV und +40mV aus einem Haltepotential von -60mV gemessen. Der Strom der jeweiligen hCAT-Isoform und der H₂O-injizierten Kontroll-Oozyten wurde vor der L-Arginin-Zugabe (weiße Kreise bzw. Quadrate) und nach der L-Arginin-Zugabe (schwarze Kreise bzw. Quadrate) von sättigenden Konzentrationen L-Arginin (1mM bei hCAT-1 bzw. -2B und 10 mM bei hCAT-2A und Kontroll-Oozyten) bestimmt. A + B) hCAT-1; C + D) hCAT-2A; E + F) hCAT-2B und G + H) Kontroll-Oozyten, jeweils für BAS-depletierte (A, C, E + G) bzw. BAS-beladene (B, D, F + H) Oozyten. Der L-Arginin-induzierte Strom (ΔI) wurde durch Subtraktion der Werte vor der L-Arginin-Zugabe von denen nach der L-Arginin-Zugabe bestimmt (schwarze Dreiecke). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM (hCAT-1, n=7-15; hCAT-2A, n=5-9; hCAT-2B, n=6; H₂O-Kontrollen, n=4-6).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Leitfähigkeit der hCAT-injizierten Oozyten (insbesondere hCAT-1 und -2B) stark von der intra- und extrazellulären Konzentration an BAS abhängig ist. Die Zugabe von gesättigten L-Arginin-Konzentrationen steigerte die Leitfähigkeit der hCAT-Isoformen in BAS-depletierten Oozyten, während in BAS-beladenen Oozyten keine (hCAT-1 und -2B) bzw. nur eine geringe (hCAT-2A) Zunahme der Leitfähigkeit beobachtet werden konnte. Aus diesem Grund sollten bei der Bestimmung von K_M und V_{max} der hCAT-Isoformen die Inkubationsbedingungen genau kontrolliert werden und am ehesten im BAS-Gleichgewicht ermittelt werden (s. 5.2.4).

Tabelle 11: Leitfähigkeiten der einzelnen hCAT-Isoformen in Abhängigkeit des Beladungszustandes der Oozyten mit basischen Aminosäuren

Transporter	Leitfähigkeit (μ S)					
	BAS-depletierte Oozyten			BAS-beladene Oozyten		
	-L-Arg	+L-Arg	ΔG	-L-Arg	+L-Arg	ΔG
hCAT-1	1,3	1,6	+0,3	1,7	1,4	-0,3
hCAT-2A	3,0	4,6	+1,6	2,3	3,0	+0,7
hCAT-2B	3,0	3,9	+0,9	2,5	2,1	-0,4
H₂O	0,8	0,9	+0,1	0,9	0,9	0

Die angegebenen Leitfähigkeiten wurden durch lineare Regression der in Abb. 12 gezeigten I/V-Kurven vor (-L-Arg) und nach (+L-Arg) L-Arginin-Zugabe bestimmt. Die jeweilige Differenzleitfähigkeit (ΔG) wurde durch Subtraktion der -L-Arg-Werte von den +L-Arg-Werten berechnet.

5.2.3 Transportkinetik in Abhängigkeit des Membranpotentials

Das Membranpotential beeinflusst die Transportparameter K_M und V_{max} der CAT-Proteine (Kavanaugh, 1993). Daher sollte der Einfluss des Membranpotentials auf die Transportparameter der einzelnen hCAT-Isoformen durch Bestimmung von I/V-Beziehungen bei unterschiedlichen L-Arginin-Konzentrationen untersucht werden. Hierbei wurde der L-Arginin-induzierte Strom (ΔI) durch Subtraktion der Ströme aus der I/V-Kurve unter Kontrollbedingungen (in Abwesenheit von L-Arginin) von denen nach der L-Arginin-Zugabe berechnet.

hCAT-2A-exprimierende Oozyten zeigten eine Erhöhung des L-Arginin-Stromes in Abhängigkeit vom Membranpotential und gleichzeitig eine Zunahme der Leitfähigkeit (steilere I/V-Kurven bei zunehmender L-Arginin-Konzentration) in Abhängigkeit von der L-Arginin-Konzentration (Abb. 13A). Aus den dargestellten I/V-Kurven bei unterschiedlichen L-Arginin-Konzentrationen wurden für die in Abb. 13B angegebenen Membranpotentiale Konzentrations-Wirkungs-Kurven für L-Arginin erstellt. Nach Anpassung der Punkte an die Michaelis-Menten-Gleichung wurden die Transportparameter K_M und V_{max} der hCAT-2A-exprimierenden Oozyten in Abhängigkeit des Membranpotentials bestimmt (Tab. 12). Während V_{max} durch hyperpolarisierende Membranpotentiale zunahm, wurden die K_M -Werte von hCAT-2A erniedrigt.

Bei hCAT-1 und -2B-exprimierenden Oozyten führte die Zugabe von L-Arginin zwar zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme des Membranstroms, aber mit steigender L-Arginin-Konzentration zu keiner Zunahme, ja sogar zu einer Abnahme der Leitfähigkeit (Steigung der I/V-Kurve) für L-Arginin (Abb. 13C-D). Diese Beobachtung wurde sowohl in BAS-beladenen, als auch in BAS-depletierten Oozyten gemacht. Womöglich wurde durch die Zugabe von steigenden L-Arginin-Konzentrationen während eines Versuches die intrazelluläre L-Arginin-Konzentration der BAS-depletierten Oozyten ausreichend verändert, um die Leitfähigkeit von hCAT-1 und hCAT-2B nicht mehr verändern zu können (s. a. im vorherigen Abschnitt Leitfähigkeit für BAS-beladenen Oozyten).

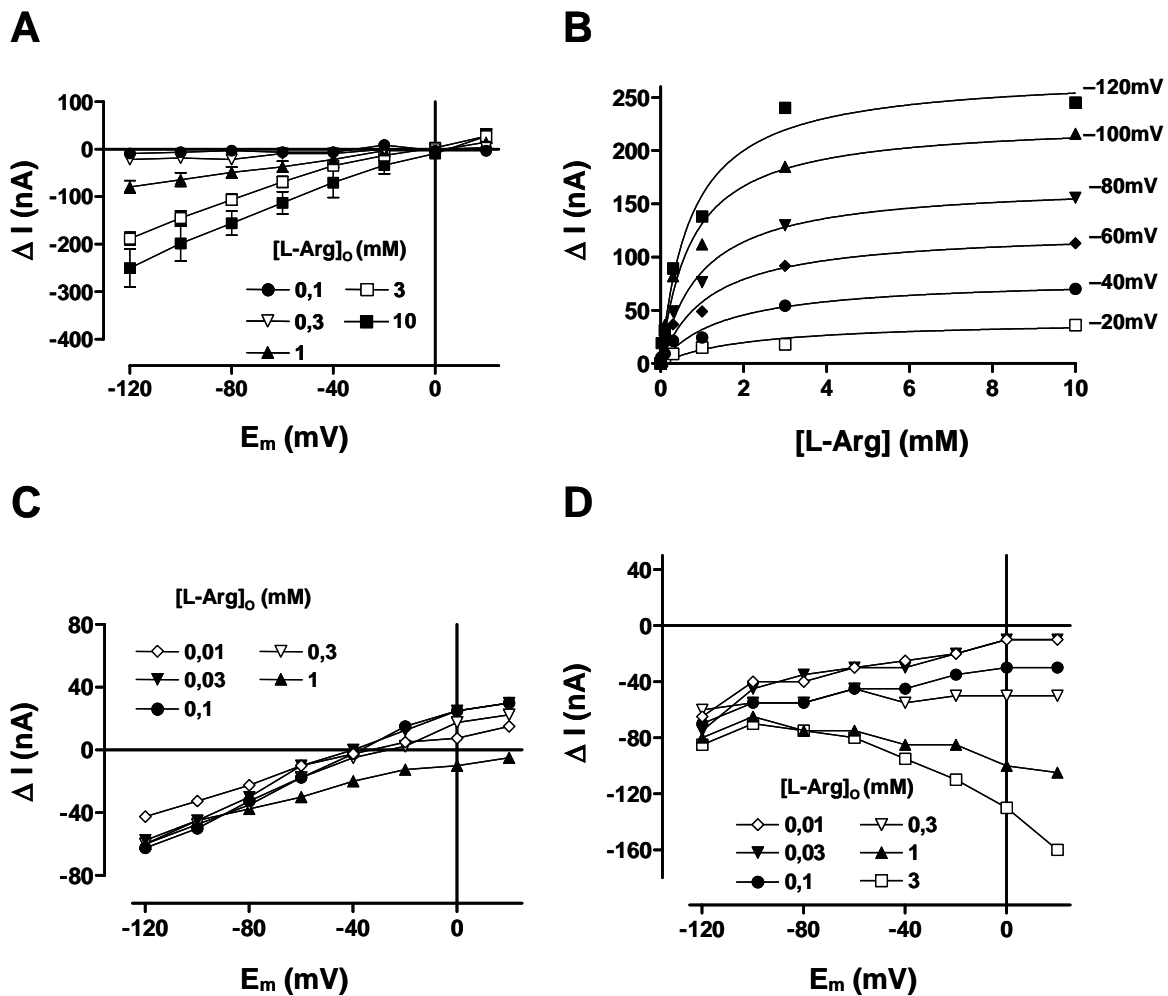


Abbildung 13: L-Arginin-Transportkinetik in Abhängigkeit vom Membranpotential bei hCAT-1-, 2A- und -2B-exprimierenden Oozyten

Oozyten wurden mit 30ng (in 40nl dH₂O) hCAT-2A- (A und B), hCAT-1- (C) oder hCAT-2B-cRNA (D) injiziert. Nach 3-5 Tagen wurden Membranströme bei den angegebenen L-Arginin-Konzentrationen durch sukzessive Veränderung des Membranpotentials auf Werte zwischen -120mV und +20mV aus einem Haltepotential von -60mV gemessen. A) Die angegebenen L-Arginin-induzierten Ströme (ΔI) von hCAT-2A-exprimierenden Oozyten wurden durch Subtraktion der I/V-Kurve in L-Arginin-freiem Medium von den I/V-Kurven in den angegebenen L-Arginin-Konzentrationen bestimmt. Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM (n=3). B) Die L-Arginin-Differenz-Ströme aus A wurden als Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die angegebenen Membranpotentiale dargestellt. Durch Anpassung der Punkte an Exponentialfunktionen wurden K_M - und V_{max} -Werte berechnet (s. Tab. 12). C + D) L-Arginin-induzierte I/V-Kurven einer hCAT-1- (C) und hCAT-2B-exprimierenden Oozyte (D) für die angegebenen L-Arginin-Konzentrationen. Differenzströme (ΔI) wurden wie in Teilabb. A beschrieben berechnet. Datenpunkte aus einem repräsentativen Versuch.

Tabelle 12: Transportkinetik hCAT-2A-exprimierender Oozyten in Abhängigkeit vom Membranpotential

E_m (mV)	K_M (mM L-Arg)	V_{max} (nA)
-120	$0,72 \pm 0,05$	272 ± 16
-100	$0,74 \pm 0,05$	227 ± 13
-80	$0,9 \pm 0,05$	170 ± 8
-60	$1,1 \pm 0,09$	125 ± 9
-40	$1,5 \pm 0,17$	80 ± 9
-20	$2,1 \pm 0,35$	41 ± 7

Die angegebenen K_M - und V_{max} -Werte wurden durch Anpassung der L-Arginin-induzierten Ströme bei den angegebenen Membranpotentialen (E_m) an die Michaelis-Menten-Gleichung berechnet (siehe auch Abb. 13).

5.2.4 Im Equilibrium-exchange nahm die Leitfähigkeit der einzelnen hCAT-Isoformen in Abhängigkeit der L-Arginin-Konzentration zu

Wie in den Abschnitten 5.2.2 und 5.2.3 gezeigt werden konnte, nahm die Leitfähigkeit von hCAT-1 und -2B-exprimierenden Oozyten nur in BAS-depletierten Oozyten zu. Wurden die Oozyten über 2 - 3 Tage mit BAS beladen, so kam es durch die Zugabe von L-Arginin zu keiner Veränderung oder sogar zu einer Abnahme der Leitfähigkeit für BAS. Unter diesen Bedingungen war es also nicht möglich, anhand der Leitfähigkeiten eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve für L-Arginin in hCAT-1- und -2B-exprimierenden Oozyten zu berechnen. Aus diesem Grund wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven von L-Arginin für die einzelnen hCAT-Isoformen dadurch ermittelt, dass die Leitfähigkeit hCAT-exprimierender Oozyten im L-Arginin-Equilibrium bestimmt wurde. Die Oozyten wurden hierfür in K^+ -Puffer mit den in Abb. 14 angegebenen L-Arginin-Konzentrationen über 4 - 6h equilibriert. Da im Equilibrium-exchange der BAS-Strom durch die hCAT-Proteine zwar maximal, aber nicht messbar ist, wurde die Leitfähigkeit in den respektiven Inkubationslösungen im voltage clamp-Experiment dadurch bestimmt, dass das Membranpotential verändert wurde. Ausgehend von einem Haltepotential von 0mV (nahe des E_m der Oozyten im L-Arginin-Equilibrium, s. Tab. 10) wurden durch sukzessive Veränderung des Membranpotentials auf Werte zwischen -60mV und +60mV die Stromänderungen registriert und daraus I/V-Kurven ermittelt. Die respektiven Werte H₂O-injizierter Oozyten wurden bei den in Abb. 14A, C und E dargestellten I/V-Kurven von denen der hCAT-exprimierenden Oozyten abgezogen und die Leitfähigkeit durch lineare Regression der I/V-Kurven bestimmt.

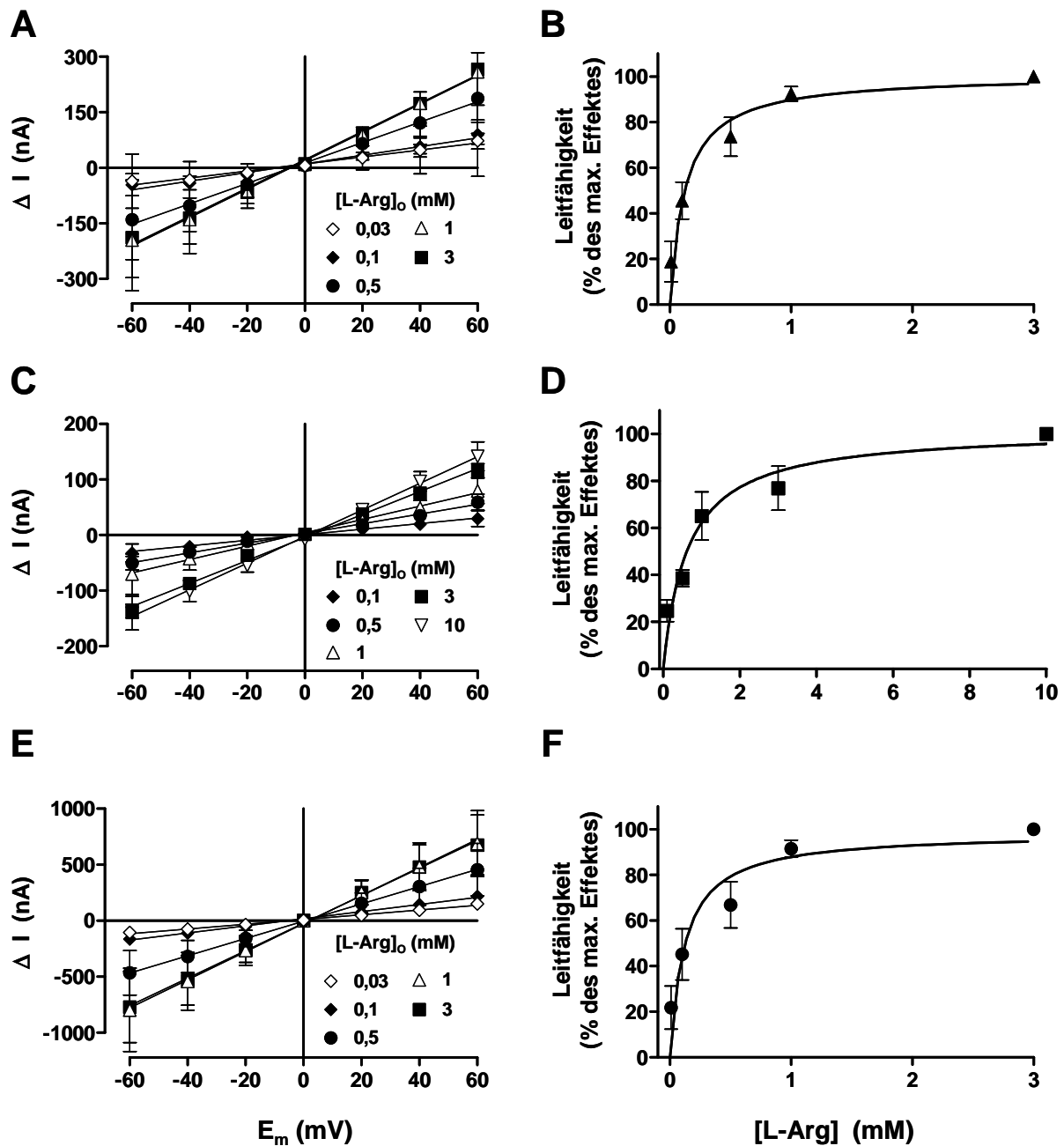


Abbildung 14: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von L-Arginin für die einzelnen hCAT-Isoformen im Equilibrium-exchange

A + C + E Oozyten wurden mit 30ng (in 40nl H₂O) (A) hCAT-1-, (C) hCAT-2A-, (E) hCAT-2B-cRNA oder mit 40nl dH₂O injiziert. Nach 2 - 3 Tagen Expressionszeit wurden die Oozyten 4 - 6h in K⁺-Puffer mit den angegebenen Konzentrationen an L-Arginin inkubiert. Anschließend wurden I/V-Beziehungen in der jeweiligen Inkubationslösung (im Equilibrium-exchange) durch sukzessive Veränderung des Membranpotentials auf Werte zwischen -60mV und +60mV aus einem Haltepotential von 0mV gemessen. Die dargestellten I/V-Kurven wurden durch Subtraktion der Werte H₂O-injizierter Oozyten von denen der hCAT-exprimierenden Oozyten berechnet. Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte ± SEM (n=6-9). B + D + F Für jede L-Arginin-Konzentration wurde die Leitfähigkeit durch lineare Regression der respektiven I/V-Kurve bestimmt. Damit wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven für hCAT-1 (B), hCAT-2A (D) und hCAT-2B (F) im Equilibrium-exchange bestimmt und die jeweiligen K_M und G_{max}-Werte berechnet (s. Tab. 13).

Eine konzentrationsabhängige Zunahme der L-Arginin-Leitfähigkeit konnte bei allen hCAT-Isoformen beobachtet werden (Abb. 14 B, D und F). Nach Auftragung der respektiven Leitfähigkeiten über der zugehörigen L-Arginin-Konzentration wurden die maximale Leitfähigkeit G_{\max} und der K_M -Wert durch Anpassung der Messpunkte an die Michaelis-Menten-Gleichung berechnet. Tab. 13 fasst die Werte zusammen. Diese K_M^{ee} - und G_{\max}^{ee} -Werte geben die Transportparameter der hCAT-Isoformen im Substratgleichgewicht (Equilibrium-exchange) an. Die Affinität von hCAT-1 und -2B war im Gleichgewicht gleich groß und deutlich höher als die Affinität von hCAT-2A. Dagegen war G_{\max} im Equilibrium-exchange von hCAT-2A am niedrigsten, während für hCAT-2B die höchste maximale Leitfähigkeit beobachtet wurde.

Tabelle 13: Equilibrium-exchange K_M - und G_{\max} -Werte der hCAT-Isoformen für L-Arginin

Transporter	K_M^{ee} (mM L-Arg)	G_{\max}^{ee} (μ S)
hCAT-1	$0,16 \pm 0,07$	$8,4 \pm 1,5$
hCAT-2A	$1,1 \pm 0,5$	$2,8 \pm 0,2$
hCAT-2B	$0,12 \pm 0,05$	$12,2 \pm 4,4$

K_M - und V_{\max} -Werte wurden aus den Leitfähigkeiten von hCAT-exprimierenden Oozyten bestimmt, die in K^+ -Puffer mit unterschiedlichen L-Arginin-Konzentrationen equilibriert wurden (vgl. Abb. 14). Die Bezeichnung K_M^{ee} und G_{\max}^{ee} bedeutet, dass die Parameter K_M und G_{\max} im Substrat-Gleichgewicht (Equilibrium-exchange) bestimmt worden sind (nach Stein, 1990).

5.3 Leck-Ströme hCAT-exprimierender Oozyten in Abwesenheit von basischen Aminosäuren

Das Auftreten von unspezifischen Strömen, so genannten Leck-Strömen in hCAT-exprimierenden Oozyten wurde von Nawrath *et al.* bereits in hCAT-2A und -2B-injizierten Oozyten beobachtet (Nawrath *et al.*, 2000), jedoch nicht näher untersucht. In dieser Arbeit sollte auch für hCAT-1-exprimierende Oozyten das Vorkommen dieser Leck-Ströme überprüft und mit denen der hCAT-2A- und -2B-exprimierenden Oozyten verglichen werden. Weiterhin sollte in Austauschversuchen mit unterschiedlichen Kationenpufferlösungen nach den verantwortlichen Ionen für die hCAT-vermittelten Leck-Ströme gesucht werden.

5.3.1 hCAT-1-exprimierende Oozyten zeigten auch in Abwesenheit von basischen Aminosäuren eine höhere Leitfähigkeit als H₂O-injizierte Oozyten

Eine höhere Leitfähigkeit der hCAT-exprimierenden Oozyten im Vergleich zu den H₂O-injizierten Kontroll-Oozyten konnte bereits bei der Bestimmung der I/V-Kurven und der daraus errechneten Leitfähigkeiten der einzelnen hCAT-Isoformen vor der Zugabe von L-Arginin beobachtet werden (s. Abb. 12 und Tab. 11). Diese erhöhte Leitfähigkeit der hCAT-injizierten Oozyten in BAS-freiem Medium zeigt die Anwesenheit von Leck-Strömen an. Um die hCAT-vermittelten Leck-Ströme genauer analysieren und miteinander vergleichen zu können, wurden die I/V-Kurven H₂O-injizierter Kontroll-Oozyten von denen der einzelnen hCAT-exprimierenden Oozyten abgezogen. Die hieraus berechneten Differenzströme (ΔI) zeigen Leck-Ströme an, die von den einzelnen hCAT-Isoformen vermittelt werden.

In Abb. 15 ist eine Zusammenfassung der Differenzströme der hCAT-Isoformen in Abwesenheit von BAS, jeweils für BAS-depletierte und BAS-beladene Oozyten dargestellt. Der unspezifische Einwärtsstrom in hCAT-2A- und -2B-injizierten Oozyten war in depletiertem Zustand deutlich höher als in BAS-beladenen Oozyten. In BAS-beladenen Oozyten war wiederum ein höherer Auswärtsstrom zu beobachten. hCAT-1-exprimierende Oozyten zeigten unter beiden Vorinkubationsbedingungen einen sehr geringen unspezifischen Einwärtsstrom. Dagegen war der Auswärtsstrom ähnlich hoch wie bei hCAT-2A und -2B. Die Verschiebungen des E_R durch die Vorinkubation der Oozyten mit BAS war für hCAT-2A bzw. -2B ausgeprägter (jeweils -46mV zu -99mV bzw. -18mV zu -84mV) als für hCAT-1 (-83mV zu -106mV). Die aus den I/V-Kurven berechneten Differenzleitfähigkeiten sind in Tab. 14 zusammengefasst.

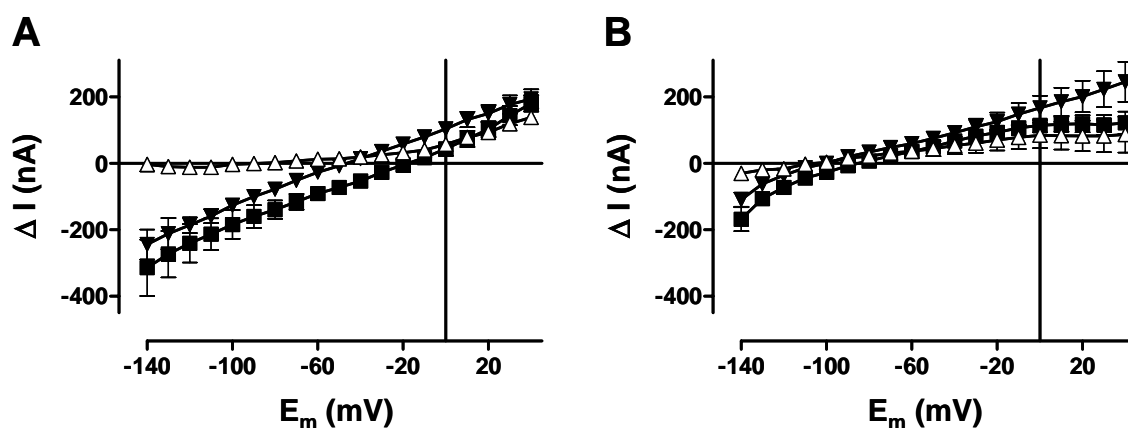


Abbildung 15: Leck-Ströme der hCAT-Isoformen

Oozyten wurden mit 40nl H₂O oder mit 30ng (in 40nl H₂O) hCAT-1- (Δ), hCAT-2A- (\blacksquare), hCAT-2B-cRNA (\blacktriangledown) injiziert und über die Expressionszeit von 3 - 5 Tagen in ND96 (A, BAS-depletierte Oozyten) oder Oozyten-Kulturmedium (B, BAS-beladene Oozyten) inkubiert. Nach der Expressionszeit wurden I/V-Beziehungen durch sukzessive Veränderung des Membranpotentials auf Werte zwischen -140mV und $+40\text{mV}$ aus einem Haltepotential von -60mV bestimmt. Die dargestellten I/V-Kurven wurden nach Subtraktion der Werte H₂O-injizierter Oozyten von denen der hCAT-exprimierenden Oozyten berechnet. Daraus wurden die Leitfähigkeiten der einzelnen hCAT-Isoformen bestimmt, die in Tab. 14 zusammengefasst sind. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM (hCAT-1, n=7-15; hCAT-2A, n=5-9; hCAT-2B, n=6).

Um den Einfluss der intrazellulären BAS auf die substratunabhängige Leitfähigkeit der einzelnen hCAT-Isoformen zu analysieren, wurde die Leitfähigkeit sowohl für BAS-depletierte, als auch für BAS-beladene Oozyten berechnet. Unabhängig vom Beladungszustand der Oozyten mit BAS war die Leitfähigkeit der hCAT-exprimierenden Oozyten höher als die der Kontroll-Oozyten. Die Differenzleitfähigkeiten von hCAT-2A- und hCAT-2B-exprimierenden Oozyten waren gleich hoch, nahmen aber durch die Vorinkubation mit BAS geringfügig ab. Dagegen war die Differenzleitfähigkeit von hCAT-1 deutlich niedriger als die von hCAT-2A und -2B, nahm aber in BAS-beladenen Oozyten leicht zu.

Tabelle 14: Differenzleitfähigkeit von hCAT-1, hCAT-2A und hCAT-2B in BAS-freiem Medium

Transporter	ΔG (μS)		
	A) BAS-depletierte Oozyten	B) BAS-beladene Oozyten	B - A
hCAT-1	+0,5	+0,8	+0,3
hCAT-2A	+2,2	+1,4	-0,6
hCAT-2B	+2,2	+1,6	-0,8

Die Differenzleitfähigkeit (ΔG) wurde durch Subtraktion der Leitfähigkeit von H₂O-injizierten Kontroll-Oozyten ($0,8\mu\text{S}$ bzw. $0,9\mu\text{S}$) von den Leitfähigkeiten der hCAT-exprimierenden Oozyten berechnet.

5.3.2 Einwertige Kationenströme in hCAT-2B-exprimierenden Oozyten

Um die unspezifischen Membranströme genauer zu untersuchen, wurden Austauschversuche mit einwertigen Kationenlösungen (98mM) an hCAT-2B-injizierten Oozyten durchgeführt. Dafür wurden I/V-Beziehungen an hCAT-2B- und H₂O-injizierten Oozyten in LiCl, NaCl, KCl, RbCl und CsCl bestimmt. Als Kontrolllösung wurde 98mM Tetramethylammoniumchlorid (TMACl) benutzt, um alle monovalenten Kationen im Puffer ersetzen zu können. In Abb. 16A+B sind die gemessenen I/V-Kurven zusammengefasst. In H₂O-injizierten Kontroll-Oozyten wurde eine Erhöhung des Membranstromes in der Reihenfolge: LiCl < NaCl < CsCl < KCl < RbCl beobachtet. In hCAT-2B-injizierten Oozyten konnte eine Erhöhung des Membranstromes in einer ähnlichen Reihenfolge beobachtet werden, allerdings waren hier die K⁺- und Rb⁺-induzierten Membranströme etwa gleich groß und deutlich höher als die restlichen Kationen-Ströme. Aus den in Abb. 16A + B dargestellten I/V-Kurven wurde durch lineare Regression für die einzelnen Kationenströme die Leitfähigkeit bestimmt. Wie in Abb. 16C gezeigt, war die hCAT-2B-vermittelte Leitfähigkeit für die einzelnen Kationen höher als für die H₂O-injizierten Kontroll-Oozyten. Betrachtet man aber die Differenzleitfähigkeit (Werte für Kontroll-Oozyten abgezogen) in den einzelnen Kationenlösungen, so zeigte sich, dass vor allem die K⁺- und Rb⁺-Leitfähigkeit bei hCAT-2B-exprimierenden Oozyten erhöht war und die Differenzleitfähigkeit aller anderen Kationen nicht größer war, als die in der Kontrolllösung TMACl (Abb. 16D). Diese Ergebnisse zeigen, dass hCAT-2B neben dem spezifischen Transport von BAS auch als „Kanal“ für K⁺-Ionen fungieren kann.

Um ausschließen zu können, dass die K⁺-Leitfähigkeit in hCAT-2B-exprimierenden Oozyten durch eine Erhöhung der Expression von endogenen K⁺-Kanälen zustande kam, wurden die K⁺-Ströme in Anwesenheit der K⁺-Kanal-Inhibitoren BaCl₂ (1mM) und Tetraethylammoniumchlorid (TEACl) (5mM) untersucht. Wie in Abb. 17 dargestellt, wurde der K⁺-Strom H₂O-injizierter Oozyten in Anwesenheit der Inhibitoren signifikant reduziert. Dagegen wurde der K⁺-Strom in hCAT-2B-exprimierenden Oozyten nicht beeinflusst, was darauf hinweist, dass der zusätzliche K⁺-Strom nicht auf die induzierte Expression von K⁺-Kanälen zurückzuführen ist.

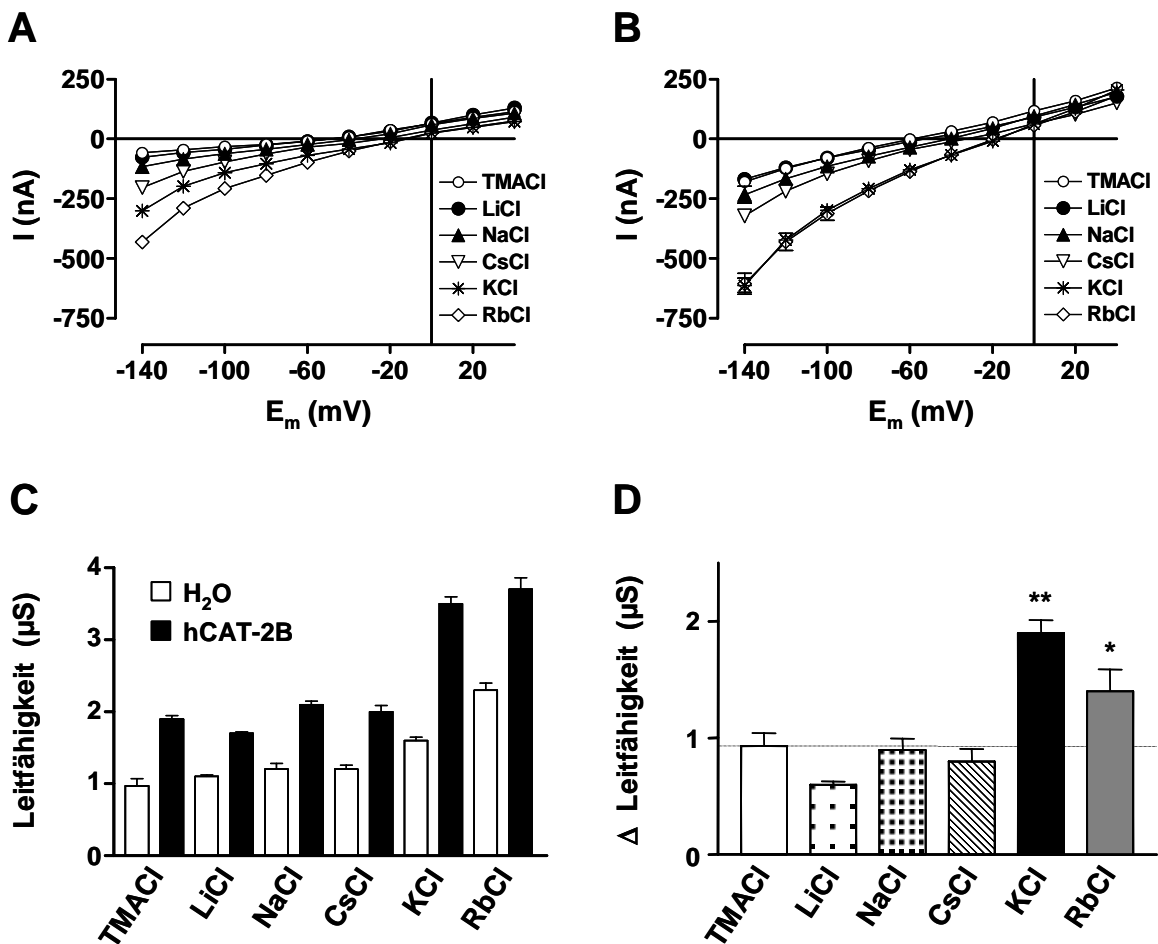


Abbildung 16: Kationische Ionenströme in hCAT-2B-injizierten Oozyten.

Oozyten wurden mit 40nl H₂O (A) oder mit 30ng (in 40nl H₂O) hCAT-2B-cRNA (B) injiziert. 3 - 5 Tage nach der Injektion wurden I/V-Beziehungen durch sukzessive Veränderung des Membranpotentials auf Werte zwischen -140 mV und +40 mV aus einem Haltepotential von -60mV jeweils in Pufferlösung mit 98mM der angegebenen Kationen gemessen. Als Kontrolllösung wurde Tetramethylammoniumchlorid(TMACl)-Puffer benutzt.

C) Die Leitfähigkeit der Oozyten wurde aus den in A und B dargestellten I/V-Kurven durch lineare Regression bestimmt. D) Die Differenzleitfähigkeit der jeweiligen Kationenlösungen wurde durch Subtraktion der Leitfähigkeiten H₂O-injizierter Oozyten von den Leitfähigkeiten hCAT-2B-exprimierender Oozyten berechnet. Die Datenpunkte und die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM (n=6-12). Statistische Analysen wurden mit dem ANOVA-Varianztest, gefolgt von dem t-Test nach Bonferroni durchgeführt. P-Werte von <0,05 und <0,01 sind jeweils mit (*) und (**) gekennzeichnet.

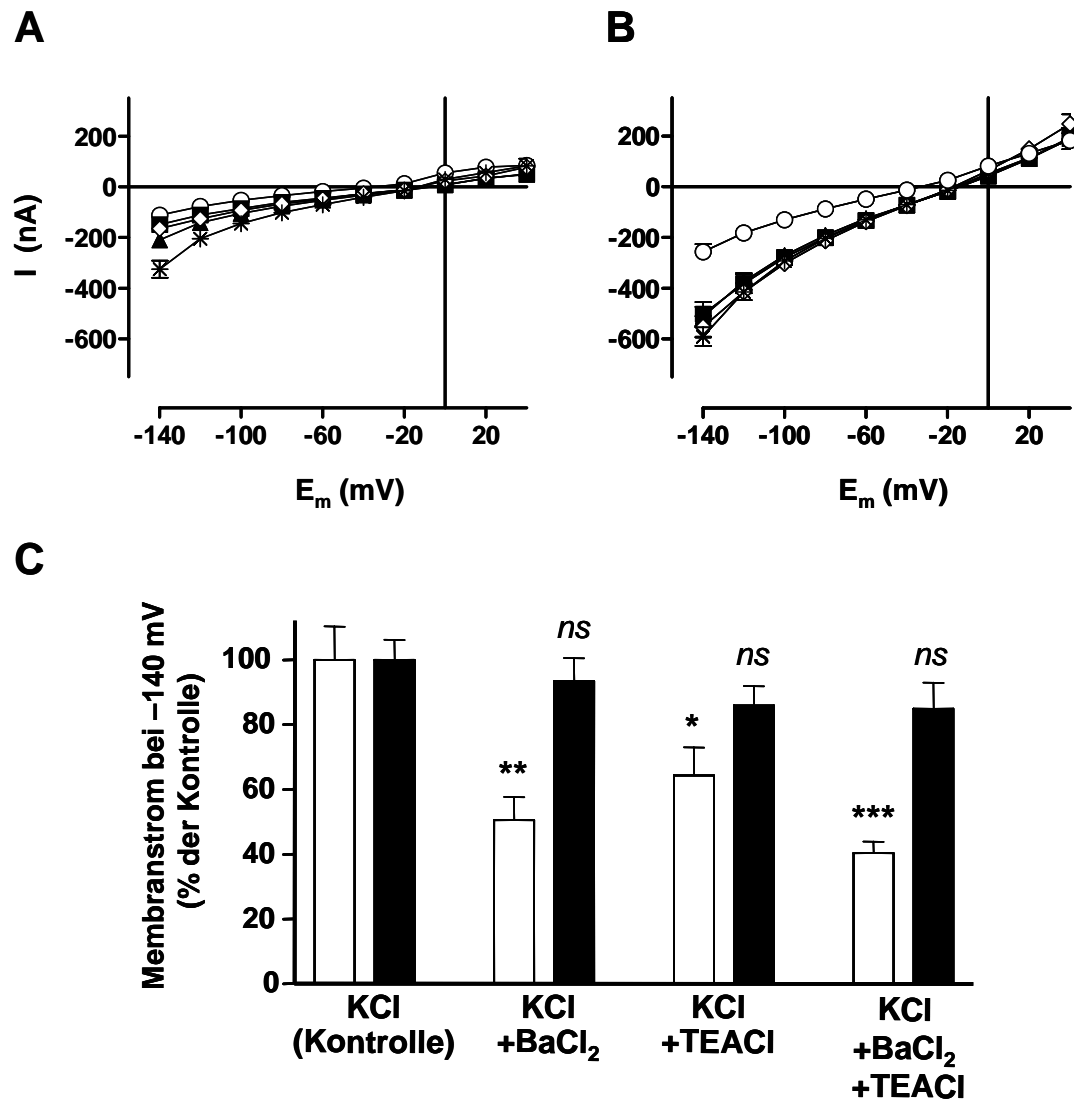


Abbildung 17: Wirkung von K⁺-Kanalinhibitoren auf den hCAT-2B-vermittelten Kaliumstrom

Oozyten wurden mit 40nl dH₂O oder mit 30ng (in 40nl dH₂O) hCAT-2B-cRNA injiziert. 3 - 5 Tage nach der Injektion wurde der Einfluss von K⁺-Kanalinhibitoren auf den K⁺-Strom untersucht.

A + B) Original I/V-Beziehungen von H₂O-injizierten Oozyten (A) und hCAT-2B-exprimierenden Oozyten (B) in ND96-Puffer (○), in K⁺-Puffer ohne Zugabe von K⁺-Kanalinhibitoren (*), und nach Zugabe von 5mM TEACl (▲), 1mM BaCl₂ (◇) oder von TEACl + BaCl₂ (■).

C) Quantitative Auswertung der Veränderung der K⁺-Maximalströme bei -140mV. Die Werte sind in Prozent der jeweiligen Kontrollen angegeben (H₂O (weiße Balken): 325 ± 33nA und hCAT-2B (schwarze Balken): 591 ± 36nA). Datenpunkte und Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM (n=6-9). Statistische Analysen wurden mit dem ANOVA-Varianztest, gefolgt von dem t-Test nach Bonferroni durchgeführt. Statistische Auswertung jeweils zur Kontrolle: P-Werte von <0,05, <0,01 und <0,001 sind jeweils mit (*), (**) und (***) gekennzeichnet, keine Signifikanz ist mit *ns* markiert.

5.3.3 $^{86}\text{Rb}^+$ -Efflux und -Influx an hCAT-exprimierenden Oozyten

Um die elektrophysiologisch gezeigte Erhöhung der K^+ -Leitfähigkeit in hCAT-2B-exprimierenden Oozyten zu überprüfen, wurden Influx- und Efflux-Experimente mit radioaktivem Rubidium ($^{86}\text{Rb}^+$) als Marker für den K^+ -Strom durchgeführt.

$^{86}\text{Rb}^+$ -Efflux

Der $^{86}\text{Rb}^+$ -Efflux wurde an hCAT-1-, -2A- und -2B-exprimierenden Oozyten und H_2O -injizierten Kontroll-Oozyten in ND96-Puffer und in K^+ -Puffer bestimmt. Hierfür wurden die Oozyten mit $10\mu\text{Ci } ^{86}\text{Rb}^+$ über 3h aufgeladen. Die $^{86}\text{Rb}^+$ -Effluxraten waren bei allen hCAT-exprimierenden Oozyten und bei den Kontroll-Oozyten ähnlich, jedoch zeigte der höhere Ausgangswert für den Efflux, dass die hCAT-exprimierenden Oozyten im Vergleich zu den Kontroll-Oozyten mehr $^{86}\text{Rb}^+$ akkumulierten (Abb. 18A). Die $^{86}\text{Rb}^+$ -Akkumulation war in hCAT-2A- und -2B-injizierten Oozyten deutlich höher als bei hCAT-1-exprimierenden Zellen. In K^+ -Puffer zeigten hCAT-2B-exprimierende Oozyten eine weitere Erhöhung der $^{86}\text{Rb}^+$ -Akkumulation (Abb. 18B), die Efflux-Rate war jedoch auch hier nicht höher als bei H_2O -injizierten Oozyten.

$^{86}\text{Rb}^+$ -Influx

Wie beim $^{86}\text{Rb}^+$ -Efflux schon zu erkennen war, akkumulierten die hCAT-injizierten Oozyten mehr $^{86}\text{Rb}^+$ als die Kontroll-Oozyten. Daher wurde der $^{86}\text{Rb}^+$ -Influx und ein möglicher Einfluss von L-Arginin auf den Rb^+ -Flux genauer analysiert. Hierfür wurde der $^{86}\text{Rb}^+$ -Influx an hCAT-2B-injizierten Oozyten in ND96-Puffer mit oder ohne Zugabe von 1mM L-Arginin bestimmt. hCAT-2B-exprimierende Oozyten zeigten eine signifikante Erhöhung der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme über die Zeit im Vergleich zu den Kontroll-Oozyten. Die Inkubation mit L-Arginin führte zu einer Reduktion der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme auf Kontrollniveau (Abb. 19). Dagegen hatte L-Arginin keinen Einfluss auf die $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in Kontroll-Oozyten (in dpm / Oocyte: 382 ± 38 bzw. 406 ± 13 jeweils für die Inkubation ohne bzw. mit 1mM L-Arginin nach 180Min.).

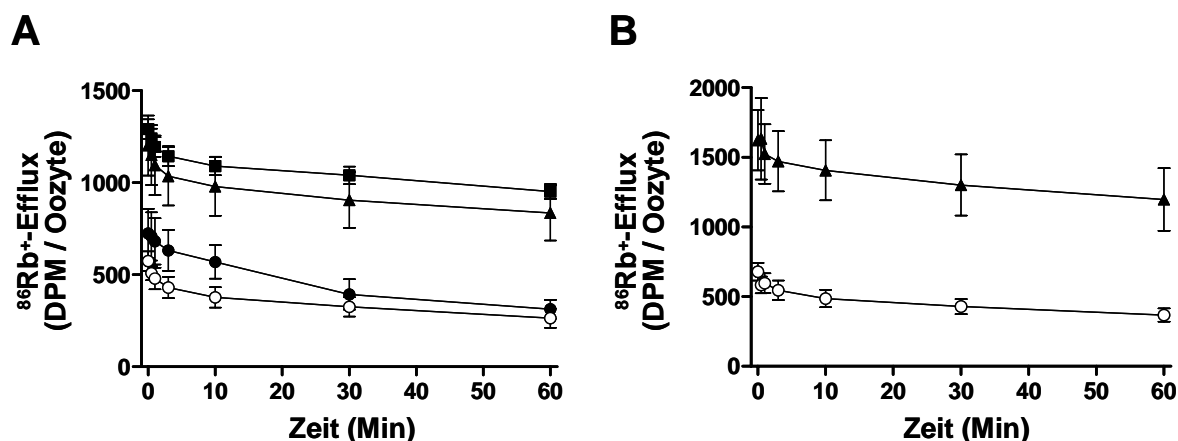


Abbildung 18: $^{86}\text{Rb}^+$ -Efflux-Kurven hCAT-exprimierender Oozyten

Mit 30 ng (in 40nl H₂O) hCAT-1-, -2A-, -2B-cRNA oder mit 40 nl H₂O injizierte Oozyten wurden in ND96-Puffer oder K⁺-Puffer und 20μCi/ml $^{86}\text{Rb}^+$ für 3h vorinkubiert. Anschließend wurde der $^{86}\text{Rb}^+$ -Efflux im entsprechenden Puffer ohne Radioaktivität durch Auswechseln der Inkubationslösung bestimmt. A) $^{86}\text{Rb}^+$ -Efflux-Kurven von H₂O-Kontrollen (○), hCAT-1 (●), hCAT-2A (■) und hCAT-2B (▲) in ND96-Puffer. Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte ± SEM (H₂O, n=11; hCAT-1, n=4; hCAT-2A, n=4; hCAT-2B, n=4). B) $^{86}\text{Rb}^+$ -Efflux-Kurven von hCAT-2B-exprimierenden (▲) und H₂O-injizierten (○) Oozyten in K⁺-Puffer. Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte ± SEM (n=4).

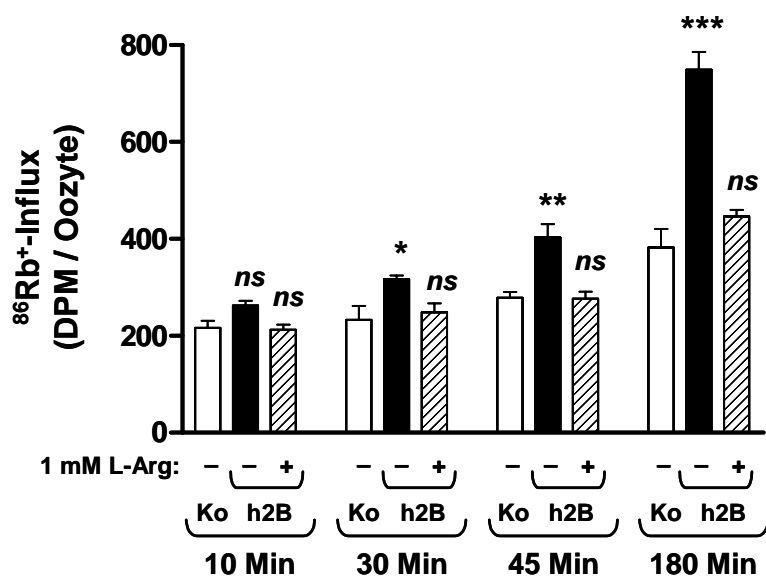


Abbildung 19: $^{86}\text{Rb}^+$ -Influx in hCAT-2B-exprimierende Oozyten

Der $^{86}\text{Rb}^+$ -Influx wurde für H₂O-injizierte Oozyten (weiße Balken) und hCAT-2B-exprimierende Oozyten in ND96-Puffer ohne (schwarze Balken) oder mit 1 mM L-Arginin (gestreifte Balken) durch Zugabe von 10 μCi/ml $^{86}\text{Rb}^+$ zur jeweiligen Inkubationslösung bestimmt. Die $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme der H₂O-Kontrollen wurde durch die L-Arginin-Zugabe nicht beeinflusst. Mittelwerte ± SEM (n=6). Die statistische Analyse wurde mit dem ANOVA-Varianztest zur jeweiligen Kontrolle durchgeführt. P-Werte von <0,05, <0,01 und <0,001 sind jeweils mit (*), (**) und (***) gekennzeichnet, keine Signifikanz ist mit *ns* markiert.

Abschnitt II: Mechanismus der PKC-vermittelten Inhibition der Transportaktivität von hCAT-1

Die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) führt in *X. laevis*-Oozyten und in den humanen endothelialen EA.hy 926-Zellen zur Inhibition der hCAT-1-vermittelten L-Arginin-Aufnahme (Gräf *et al.*, 2001). Der Mechanismus der PKC-vermittelten Inhibition der hCAT-1-Transportaktivität ist noch ungeklärt und sollte daher in dieser Arbeit näher analysiert werden. Zunächst wurden durch Zugabe des PKC-aktivierenden Phorbolestester Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) Änderungen der subzellulären Lokalisation von hCAT-1 an Fusionsproteinen zwischen hCAT-1 und dem verstärkt grün fluoreszierenden Protein (EGFP) in *X. laevis*-Oozyten und humanen Zellen untersucht. Durch Biotinylierung der Zelloberflächen-Proteine und anschließende Western-Blot-Analysen wurden PKC-vermittelte Änderungen der Expression des hCAT-1 an der Plasmamembran quantifiziert. Weiterhin wurde in L-Arginin-Aufnahmestudien die PKC-vermittelte Inhibition des hCAT-1-Transportes in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen untersucht. Letztere Untersuchungen wurden auch am endogen exprimierten hCAT-1 durchgeführt.

Um die Frage zu beantworten, ob die PKC direkt das hCAT-1-Protein phosphoryliert, wurden die drei putativen PKC-Erkennungsstellen des hCAT-1 durch Mutagenese entfernt. Anschließend wurden PKC-vermittelte Änderungen der Zelloberflächenexpression und der Transportaktivität untersucht. Um festzustellen, ob es eventuelle zelllinienabhängige Unterschiede der PKC-vermittelten hCAT-Regulation gibt, wurde weiterhin der Einfluss von PMA auf die Transportaktivität in verschiedenen humanen Zelllinien untersucht.

5.4 Einfluss der PKC-Aktivierung auf die Expression und Transportaktivität von hCAT-1

5.4.1 PMA verminderte die Expression von hCAT-1 an der Zelloberfläche von *X. laevis*-Oozyten und in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen

Um die Expression des hCAT-1 visualisieren zu können, wurde hCAT-1 an dem verstärkt grün fluoreszierenden Protein EGFP fusioniert. Das hCAT-1.EGFP Fusionsprotein (hergestellt von S. Wolf; Wolf *et al.*, 2002) wurde in *X. laevis*-Oozyten exprimiert und in humane U373MG Glioblastom-Zellen stabil transfiziert. Mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie konnten nun Veränderungen in der Zelloberflächenexpression von hCAT-1

sichtbar gemacht werden. Weiterhin wurde die Transportaktivität von hCAT-1.EGFP nach PKC-Aktivierung untersucht. Messungen von Wolf *et al.* haben gezeigt, dass die Transporteigenschaften vom hCAT-1.EGFP-Konstrukt sich nicht von denen des nativen hCAT-1 unterscheiden (Wolf *et al.*, 2002).

Änderung der hCAT-1-Expression und -Transportaktivität nach PKC-Aktivierung in *X. laevis*-Oozyten

In Gefrierschnitten von hCAT-1.EGFP-exprimierenden Oozyten konnte durch mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen gezeigt werden, dass die Expression des hCAT-1 an der Zelloberfläche durch PMA-Behandlung (100nM, 30 Min.) deutlich abnahm (Abb. 20C und D). Nur mit 0,1% DMSO behandelte Oozyten zeigten dagegen keinen Unterschied zu den unbehandelten Zellen (Abb. 20A, B und E). Entsprechend zu der Reduktion der Zelloberflächenexpression konnte auch eine Verminderung des L-Arginin-Transportes in PMA-behandelten Oozyten beobachtet werden. PMA reduzierte die Transportaktivität der hCAT-1.EGFP-injizierten Oozyten ähnlich dem Wildtyp hCAT-1 auf $55 \pm 7\%$ der DMSO-Kontrolle (Abb. 20F).

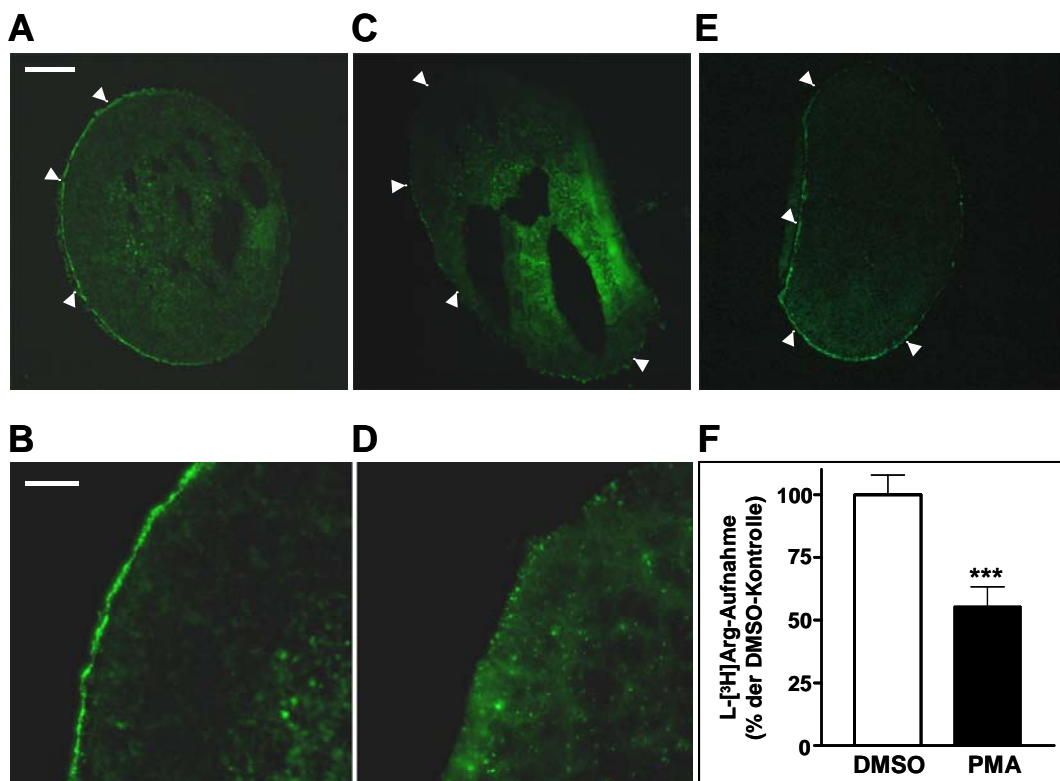


Abbildung 20: PMA verminderte die Expression von hCAT-1 an der Zelloberfläche von *X. laevis*-Oozyten

(Legende zu Abb. 20)

X. laevis-Oozyten wurden mit 30ng cRNA (in 40nl Wasser) des Fusionsproteins hCAT-1.EGFP injiziert. Nach drei Tagen wurden die Oozyten über 30 Min. mit 0,1% DMSO (A, B) oder 100nM PMA (C, D) in ND96-Puffer behandelt (in E unbehandelte Kontrolle). Anschließend wurden Gefrierschnitte mit einer Dicke von 12µm angefertigt, auf Objektträger gezogen und unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Der Balken entspricht 200µm (A, C und E) bzw. 50µm (B und D). Pfeile in A, C, und E zeigen die Expression des hCAT-1 an der Zelloberfläche an.

F) Transportaktivität von hCAT-1.EGFP nach der Behandlung der Oozyten über 0,5h mit 0,1% DMSO bzw. 100nM PMA. Die Aufnahme von 100 µM L-[³H]Arginin (5 µCi/ml) wurde für 15 Min. bei 20°C gemessen. Als Kontrollen wurden H₂O-injizierte Oozyten entsprechend behandelt und der erhaltene Wert (0,02 nmol/Oozyte/h) von den Messwerten hCAT-1-injizierter Oozyten abgezogen. Die Werte (Mittelwerte ± SEM, n=20) sind in Prozent der DMSO-behandelten Zellen angegeben (100% entsprechen 0,38 ± 0,06 nmol/Oozyte/h). Die statistische Analyse wurde mit dem ANOVA-Varianztest durchgeführt. (***) kennzeichnet P-Wert < 0,001.

Änderung der hCAT-1-Expression nach PMA-Behandlung in U373MG Glioblastom-Zellen

hCAT-1.EGFP wurde stabil in U373MG Glioblastom-Zellen transfiziert. Die Transportaktivität von vereinzelt hCAT-1.EGFP Klonen unterschied sich dabei nicht voneinander und lag deutlich über der Aktivität der EGFP-Kontrollen (s. a. Wolf, 2001). Die Wirkung von PMA auf die Zelloberflächenexpression des Transporters wurde mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie und in Western-Blot-Analysen von biotinylierten Zelloberflächen-Proteinen untersucht.

A) Konfokale Mikroskopie von stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen

Konfokale Mikroskopie von stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen zeigte, dass sich das Expressionsmuster des hCAT-1.EGFP-Konstruktes in diesen Zellen deutlich von der EGFP-Expression (Kontrolltransfektion) unterscheidet. Während die mit EGFP transfizierten Zellen eine diffuse Verteilung über die gesamte Zelle mit einer Anreicherung im Zellkern zeigten, wurde hCAT-1.EGFP an der Zelloberfläche (speziell im Bereich der Plasmamembranausläufer, „ruffled borders“), aber auch in intrazellulären Vesikeln exprimiert (Abb. 21 und Abb. 31). Eine 30 Min.-Behandlung der mit hCAT-1.EGFP stabil transfizierten Zellen mit 100nM PMA führte zu einer deutlichen Reduktion der Zelloberflächenexpression des Transportes. Dagegen führte die Behandlung der Zellen mit 0,1% DMSO zu keiner Veränderung des Expressionsmusters (Bildabfolge Abb. 21).

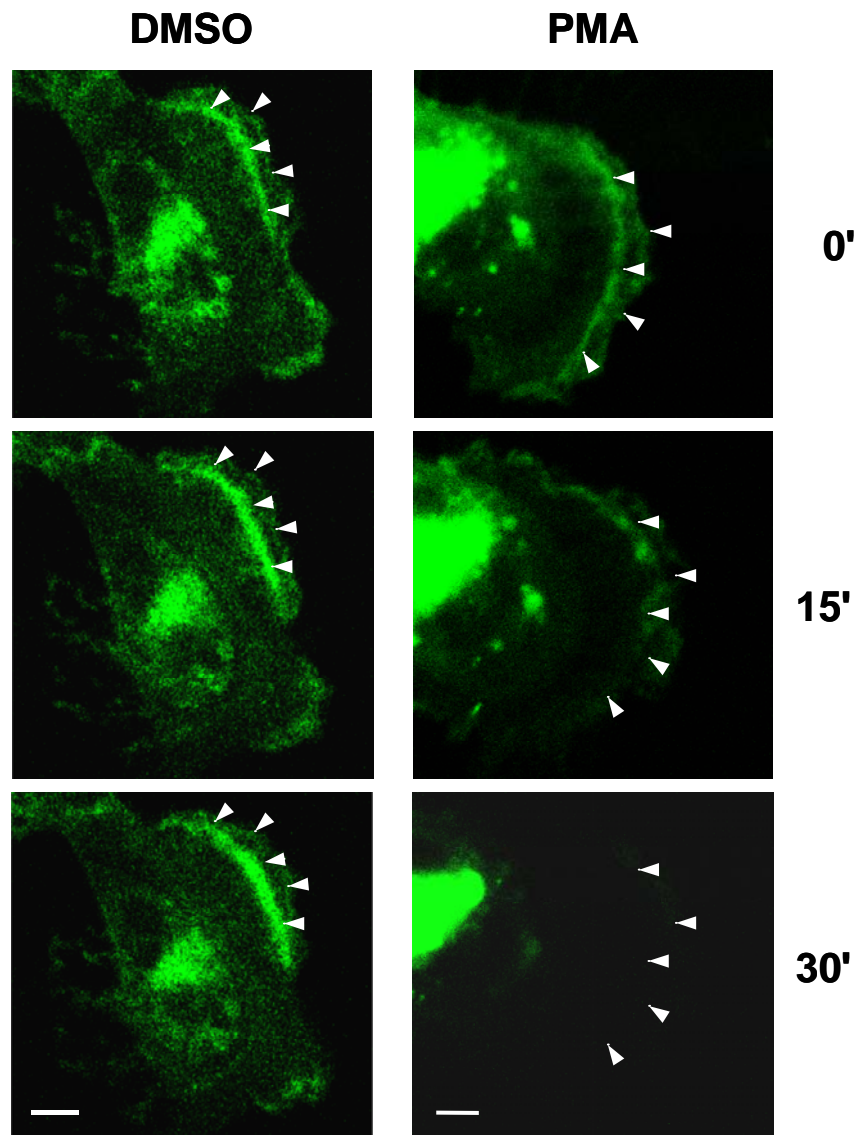


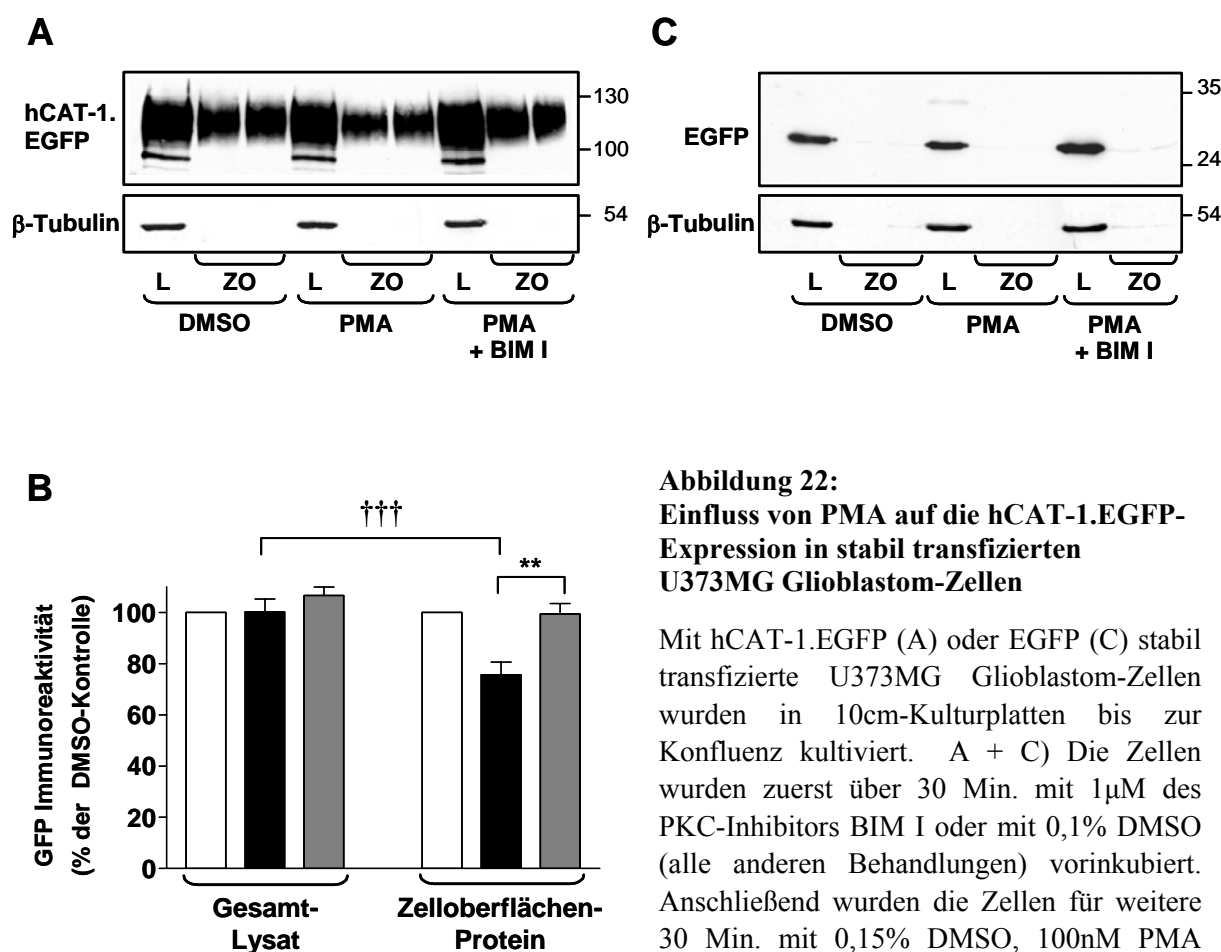
Abbildung 21: Einfluss von PMA auf die Zelloberflächenexpression von hCAT-1.EGFP in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen

Mit hCAT-1.EGFP stabil transfizierte U373MG Glioblastom-Zellen wurden in Deckglas-Gewebekulturkammern ausgesät und am folgenden Tag unter dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop abgelichtet. Die Abbildung zeigt eine repräsentative Abfolge mikroskopischer Fluoreszenzaufnahmen einer Zelle bei gleichen Einstellungsparametern für die respektive Behandlung mit 0,1% DMSO bzw. 100nM PMA. Die Pfeile zeigen die Expression von hCAT-1 an der Plasmamembran („ruffled borders“). Die Balken entsprechen 10 μ m.

B) Western-Blot-Analysen von biotinylierten Zelloberflächen-Proteinen in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen

Die mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie gezeigte Verminderung der Zelloberflächenexpression von hCAT-1.EGFP wurde in Western-Blot-Analysen von biotinylierten Zelloberflächen-Proteinen quantifiziert (Biotinylierungsmethode s. 4.4.4). Die Expression von

hCAT-1.EGFP wurde mit dem EGFP-Antikörper nachgewiesen. In Abb. 22A ist in einem repräsentativen Western-Blot gezeigt, dass durch die PMA-Behandlung die Expression von hCAT-1.EGFP in der Zelloberflächen-Proteinfraction deutlich abnahm.



behandelt. Nach der Behandlung wurden die Zelloberflächen-Proteine mit dem membranundurchlässigen Sulfo-NHS-Biotin biotinyliert, danach lysiert und durch Bindung an immobilisiertes Avidin extrahiert. Nach dem Ablösen der Zelloberflächen-Proteine vom Avidin wurden diese bzw. die unbehandelten Gesamtlysate (15µg/Spur) über 10 % SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und die Membran mit dem EGFP-Antikörper inkubiert. Die hCAT-1.EGFP- und EGFP-Expression ist für Gesamtlysate (L) in einfacher Auftragung bzw. für die Zelloberflächen-Proteine (ZO) in doppelter Auftragung gezeigt. Nach Entfernung des EGFP-Antikörpers aus der Membran wurde diese mit dem anti-β-Tubulin-Antikörper inkubiert. Mit Hilfe eines Chemolumineszenzreagenz wurden die Signale sichtbar gemacht und ein Röntgenfilm den Membranen für 15s (hCAT-1.EGFP und β-Tubulin) bzw. 3s (EGFP) exponiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Western-Blots.

B) Auswertung von 5 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit hCAT-1.EGFP. Für die Auswertung wurde die densitometrische Dichte der Western-Blot-Banden einer Versuchsreihe zusammen quantifiziert. Die Werte (Mittelwerte ± SEM) sind in Prozent der jeweiligen DMSO-Kontrolle (weiße Balken) für PMA (schwarze Balken) bzw. mit PMA + BIM I (graue Balken) behandelten Zellen dargestellt. Statistische Analysen wurden mit dem ANOVA-Varianztest, gefolgt von dem t-Test nach Bonferroni durchgeführt. P-Werte von <0,01 und <0,001 sind jeweils mit (**) und (†††) gekennzeichnet.

Eine Behandlung der Zellen mit dem PKC-Inhibitor BIM I in Anwesenheit von PMA führte zu einer Aufhebung des PMA-Effektes. Die quantitative Analyse mehrerer Versuche zeigte, dass die Expression von hCAT-1.EGFP in den Zellen nach Behandlung mit PMA nur an der Zelloberfläche signifikant auf $75 \pm 5\%$ abnahm (Gesamtlysate $100 \pm 3\%$). Dieser Effekt ließ sich durch Inkubation mit BIM I signifikant aufheben ($99 \pm 4\%$) (Abb. 22B). β -Tubulin wurde nur in den Gesamtlysaten nachgewiesen, was die Effizienz der Auftrennungsmethode bestätigte, und zeigte keine Veränderung durch die PMA-Behandlung. Auch in EGFP-transfizierten Zellen (Kontrollen) konnte keine Veränderung der Expression durch die PMA-Behandlung nachgewiesen werden (Abb. 22C). Die EGFP-Expression wurde nur in den Gesamtlysaten nachgewiesen.

5.4.2 PKC-Aktivierung verminderte die Transportaktivität von hCAT-1.EGFP in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen

Um festzustellen, in welchem Zeitraum ein linearer Anstieg der L-Arginin-Aufnahme vorliegt, wurde die zeitabhängige Aufnahme von L-Arginin in mit hCAT-1.EGFP transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen bestimmt. Die Messpunkte wurden über 1 Min. in 5s bis 15s-Abständen gewählt. In Abb. 23A ist die zeitabhängige Aufnahme von L-Arginin am Beispiel von hCAT-1.EGFP/Klon 3 gezeigt. Die Aufnahme war linear in den ersten 30s und ging dann in eine Sättigungskurve über. Somit wurden die 30s als geeigneter Zeitpunkt für die nachfolgenden Aufnahmestudien in humanen Zellen gewählt.

In Transportstudien mit L- ^3H]Arginin konnte gezeigt werden, dass die Verminderung der Zelloberflächenexpression des hCAT-1.EGFP durch PMA mit einer Reduktion der L-Arginin-Aufnahme einhergeht (Abb. 23B). Die Transportaktivität der stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen nahm durch die Behandlung mit 100nM der PKC-Aktivatoren PMA und PDBu ab (jeweils $57 \pm 4\%$ und $63 \pm 4\%$ der DMSO-Kontrolle). Vorinkubation der Zellen mit dem PKC-Inhibitor BIM I reduzierte den PMA-Effekt ($85 \pm 4\%$). Dagegen zeigte die Behandlung mit dem inaktiven Phorbolster 4α -PPD und mit BIM I alleine keinen Effekt (jeweils $99 \pm 5\%$ und $103 \pm 3\%$).

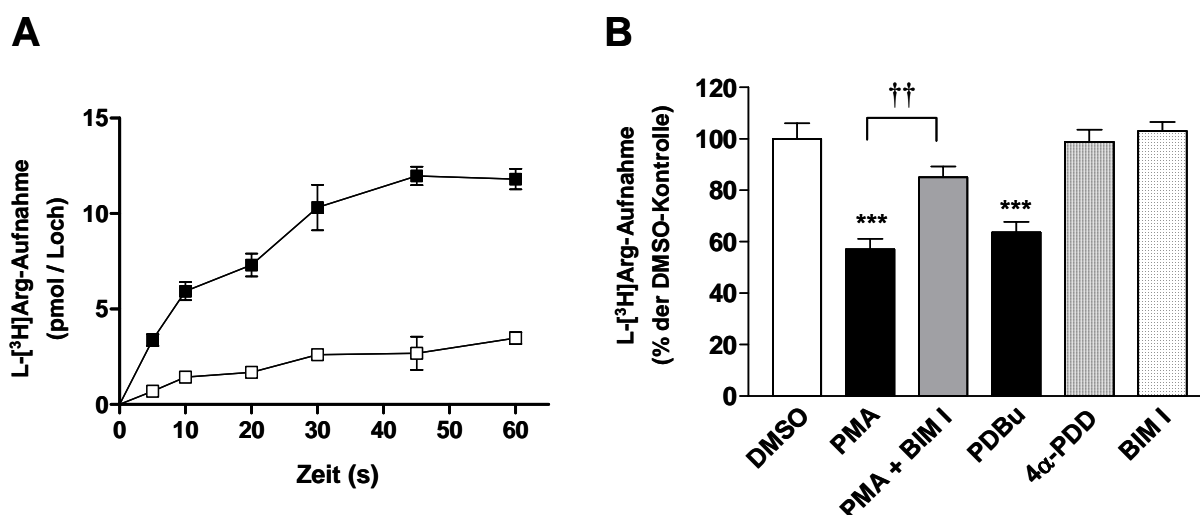


Abbildung 23: Zeitabhängige L-[³H]Arginin-Aufnahme und Einfluss der PKC-Aktivierung auf die hCAT-1-vermittelte Transportaktivität in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen

Mit hCAT-1.EGFP oder EGFP-N1 stabil transfizierte U373MG Glioblastom-Zellen wurden in 96-Loch-Platten bis zur Konfluenz kultiviert.

A) Zeitabhängige L-Arginin-Aufnahme von hCAT-1.EGFP/Klon 3 (■) und EGFP-N1/Klon 1 (□). Die Aufnahme von 100µM L-[³H]Arginin (10µCi/ml) wurde bei 37°C für die angegebenen Zeitpunkte gemessen. Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte ± SEM, n=4-6.

B) Unmittelbar vor Messung der L-Arginin-Aufnahme wurden die Zellen über 30 Min. mit 1 µM des PKC-Inhibitors BIM I oder mit 0,1% DMSO (alle anderen Balken) behandelt. Anschließend wurden die Zellen für weitere 30 Min. mit 0,15% DMSO, 100nM der Phorbolster PMA, PDBu, 4α-PPD oder mit 0,5µM BIM I behandelt. Die Aufnahme von 100µM L-[³H]Arginin (10µCi/ml) wurde danach bei 37°C über 30s gemessen. Mit EGFP-N1 stabil transfizierte Zellen wurden auf gleiche Weise behandelt und die erhaltenen Werte von den Messwerten der hCAT-1.EGFP-transfizierten Zellen abgezogen. Die L-[³H]Arginin-Aufnahme der Zellen ist in Prozent der DMSO-Kontrolle angegeben (100% entsprechen 11 ± 0,6 pmol/µg Protein/Min.). Mittelwerte ± SEM, n=24-30. Statistische Analysen wurden mit dem ANOVA-Varianztest, gefolgt von dem t-Test nach Bonferroni durchgeführt. P-Werte von <0,01 und <0,001 sind jeweils mit (††) und (***) gekennzeichnet.

5.4.3 PMA verminderte auch die endogene Zelloberflächenexpression und Transportaktivität von hCAT-1 in DLD-1 Kolonkarzinom-Zellen

Im vorherigen Abschnitt wurde die PKC-vermittelte Verminderung der hCAT-1-Expression an der Zelloberfläche und der hCAT-1-Transportaktivität in überexprimierenden Zellen gezeigt. Um diesen Effekt auch für den endogen exprimierten hCAT-1 zu untersuchen, wurde die hCAT-1-Expression in verschiedenen humanen Zelllinien untersucht (s. 5.5.2). Die humane Kolonkarzinom-Zelllinie DLD-1 zeigte die höchste Expression an hCAT-1 und wurde daher für die Analysen ausgewählt.

Western-Blot-Analysen von biotinylierten Zelloberflächen-Proteinen in DLD-1
Kolonkarzinom-Zellen

In Abb. 24A ist in einem repräsentativen Western-Blot die hCAT-1-Expression in DLD-1 Kolonkarzinom-Zellen dargestellt. Die hCAT-1-Expression wurde mit dem hCAT-1/Kh5 Antikörper (spezifisch gegen den C-Terminus von hCAT-1) nachgewiesen. Ähnlich wie bei den stabil transfizierten Zellen nahm die hCAT-1-Expression durch die Behandlung mit PMA nur an der Zelloberfläche ab. Der PKC-Inhibitor BIM I war in der Lage, den PMA-Effekt aufzuheben. Die quantitative Auswertung mehrerer Western-Blot-Analysen bestätigte die signifikante Abnahme der hCAT-1-Expression nur an der Zelloberfläche.

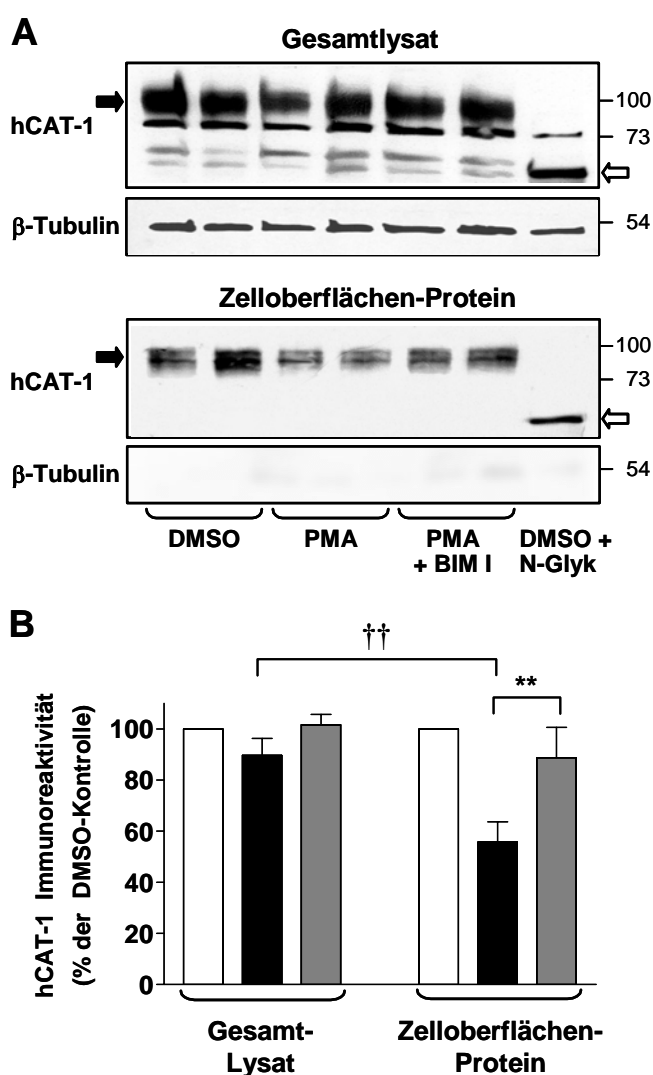


Abbildung 24:
Einfluss von PMA auf die endogene hCAT-1-Expression in DLD-1 Kolonkarzinom-Zellen

DLD-1 Kolonkarzinom-Zellen wurden in 10cm-Kulturplatten bis zur Konfluenz kultiviert. Die Behandlung der Zellen und die Trennung der Zelloberflächenproteine erfolgte wie in Abb. 22 beschrieben, mit dem Unterschied, dass die PMA-Behandlung 4h betrug. A) Gesamtlysate (78µg/Spur) und Zelloberflächen-Proteine wurden über 10% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Blots wurden mit dem anti-hCAT-1(Kh5)-Antikörper inkubiert (jeweils obere Teilabb.). Die hCAT-1-Expression ist für jede Behandlung jeweils in doppelter Auftragung gezeigt. Die letzte Probe (DMSO + N-Glyk) wurde vor der SDS-Auftrennung mit N-Glykosidase F behandelt (weiße Pfeile, deglykosylierter hCAT-1; schwarze Pfeile glykosylierter hCAT-1). Nach Entfernung des hCAT-1-Antikörpers aus der Membran wurde diese mit dem anti-β-Tubulin Antikörper inkubiert (jeweils untere Teilabb.). Die Abbildung zeigt repräsentative Western-Blots.

B) Die Quantifizierung und statistische Analyse der Proteinexpression wurde wie in Abb. 22 beschrieben durchgeführt. Mittelwerte ± SEM (n=6-8) von unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Die Werte sind in Prozent der respektiven DMSO-Kontrolle (weiße Balken) nach Behandlung mit PMA (schwarze Balken) bzw. mit PMA + BIM I (graue Balken) dargestellt. Statistische Analysen wurden mit dem ANOVA-Varianztest, gefolgt von dem t-Test nach Bonferroni durchgeführt. P-Werte von <0,01 sind jeweils mit (**) bzw. (††) gekennzeichnet.

Nach 4h Behandlung mit 100nM PMA war diese auf 55 ± 8 % der DMSO-Kontrolle gesunken (Gesamtlysate $90 \pm 7\%$) (Abb. 24B). Dieser Effekt ließ sich durch Inkubation mit $1\mu\text{M}$ BIM I auf $89 \pm 11\%$ signifikant reduzieren (Gesamtlysate $102 \pm 4\%$). β -Tubulin wurde nur in den Gesamtlysaten nachgewiesen und wurde nicht durch die PMA-Behandlung beeinflusst.

L-[³H]Arginin-Transportstudien in DLD-1 Kolonkarzinom-Zellen

Die Abnahme der hCAT-1-Expression durch die PKC-Aktivierung korrelierte mit der Reduktion der L-Arginin-Aufnahme in DLD-1 Kolonkarzinom-Zellen (Abb. 25). Die Transportaktivität der Zellen wurde in Aufnahmeversuchen mit $100\mu\text{M}$ L-[³H]Arginin ($10\mu\text{Ci}$) durchgeführt. Um die L-Arginin-Aufnahme anderer Transportsysteme als System y^+ (hCAT-1) zu inhibieren, wurden die Aufnahmeversuche in Anwesenheit von 2mM Leucin durchgeführt. Die Transportaktivität nahm durch die Behandlung mit den aktiven Phorbolestern PMA und PDBu signifikant ab (jeweils $73 \pm 5\%$ bzw. $72 \pm 4\%$). Dieser Effekt ließ sich durch Vorinkubation mit BIM I in beiden Fällen inhibieren (jeweils $107 \pm 5\%$ bzw. $100 \pm 6\%$). Die Behandlung mit dem inaktiven Phorbol ester 4α -PPD und BIM I alleine zeigte dagegen keinen Effekt (jeweils $97 \pm 6\%$ bzw. $104 \pm 7\%$).

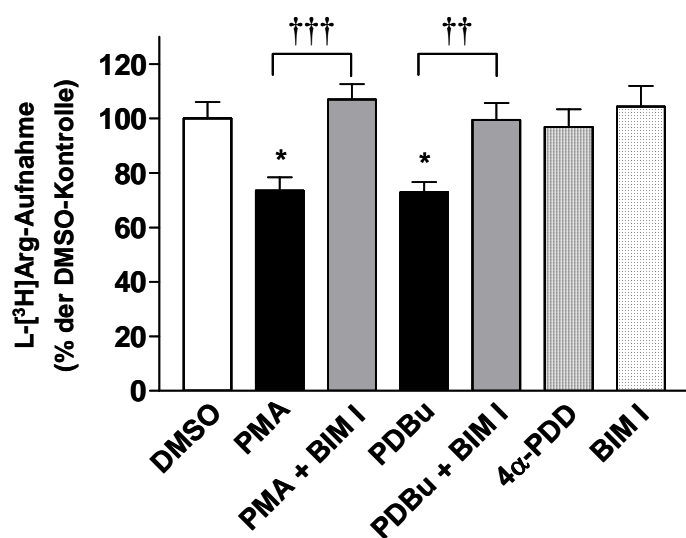


Abbildung 25:
Endogene hCAT-1-vermittelte L-[³H]Arginin-Aufnahme unter Einfluss von Phorbolestern in DLD-1 Kolonkarzinom-Zellen

Die Behandlung und die Messung der Transportaktivität konfluenter DLD-1 Kolonkarzinom-Zellen wurden wie in Abb. 23B beschrieben durchgeführt, mit der Ausnahme, dass die Aufnahme von $100\mu\text{M}$ L-[³H]Arginin ($10\mu\text{Ci/ml}$) in Anwesenheit von 2mM L-Leucin gemessen wurde. Damit sollte der Transport von L-Arginin durch andere Transportsysteme als System y^+

(hCAT-1) blockiert werden. Die L-[³H]Arginin-Aufnahme der Zellen ist in Prozent der DMSO-Kontrolle angegeben (100% entsprechen $1,3 \pm 0,05$ pmol/ μg Protein/Min.). Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM (n=24-30). Statistische Analysen wurden mit dem ANOVA-Varianztest, gefolgt von dem t-Test nach Bonferroni durchgeführt. P-Werte von $<0,05$, $<0,01$ und $<0,001$ sind jeweils mit (*), (††) und (†††) gekennzeichnet.

5.5 Wirkung der PKC-Aktivierung auf den γ^+ -vermittelten L-Arginin-Transport von unterschiedlichen humanen Zelllinien

Wie in der Einleitung erwähnt wurde, sind in der Literatur unterschiedliche Auswirkungen der PKC-Aktivierung auf den L-Arginin-Transport in Säugetierzellen gezeigt worden. Ob diese Unterschiede auf eine vielfältige Wirkung der PKC auf die L-Arginin-Transportaktivität in verschiedenen Zelltypen zurückzuführen sind, ist noch ungeklärt. Aus diesem Grund wurde in L-[³H]Arginin-Aufnahmestudien die Transportaktivität von verschiedenen humanen Zelllinien nach PMA-Behandlung untersucht. Um auf eventuelle Unterschiede in der PMA-Wirkung auf einzelne hCAT-Isoformen zurückschließen zu können, wurde außerdem die Expression von hCAT-1, -2A, -2B und -3 in den verschiedenen Zelllinien mit Hilfe der RNase-Verdauungsschutzanalyse untersucht.

5.5.1 Der γ^+ -vermittelte L-Arginin-Transport wurde unter Einfluss von PMA in allen untersuchten humanen Zelllinien vermindert

Der Einfluss der PKC-Aktivierung durch PMA auf die Transportaktivität von verschiedenen humanen Zelllinien wurde in L-Arginin-Aufnahmestudien untersucht. Die Zelllinien SK-N-SH und SH-SY-5Y (Neuroblastom-Zellen), U-87-MG und U-138-MG (Glioblastom-Zellen) und NT2 (Teratokarzinom-Zellen) wurden von der Untersuchung ausgeschlossen, da diese Zellen während des Transport-Assays nicht an den Zellkulturplatten haften blieben. In 7 weiteren Zelllinien konnte der Einfluss von PMA auf die endogene Transportaktivität untersucht werden, jeweils für den Gesamttransport bzw. für den System- γ^+ -vermittelten Transport (unter Zugabe von 2mM L-Leucin zur Hemmung anderer Transportsysteme). In Abb. 26 und in Tab. 15 sind die Ergebnisse zusammengefasst. In allen untersuchten Zelllinien wurde eine Abnahme der L-Arginin-Aufnahme durch die PMA-Behandlung sowohl für den Gesamttransport, als auch für den γ^+ -vermittelten Transport beobachtet.

In den Zelllinien EA.hy 926, A549/8 und U373MG wurde außerdem die konzentrationsabhängige Wirkung von PMA untersucht. Die PMA-Behandlung führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der L-Arginin-Aufnahme in den Zelllinien A549/8 und EA.hy 926. Bei U373MG war nur eine schwache, nicht dosisabhängige Abnahme der Transportaktivität zu beobachten (Abb. 27).

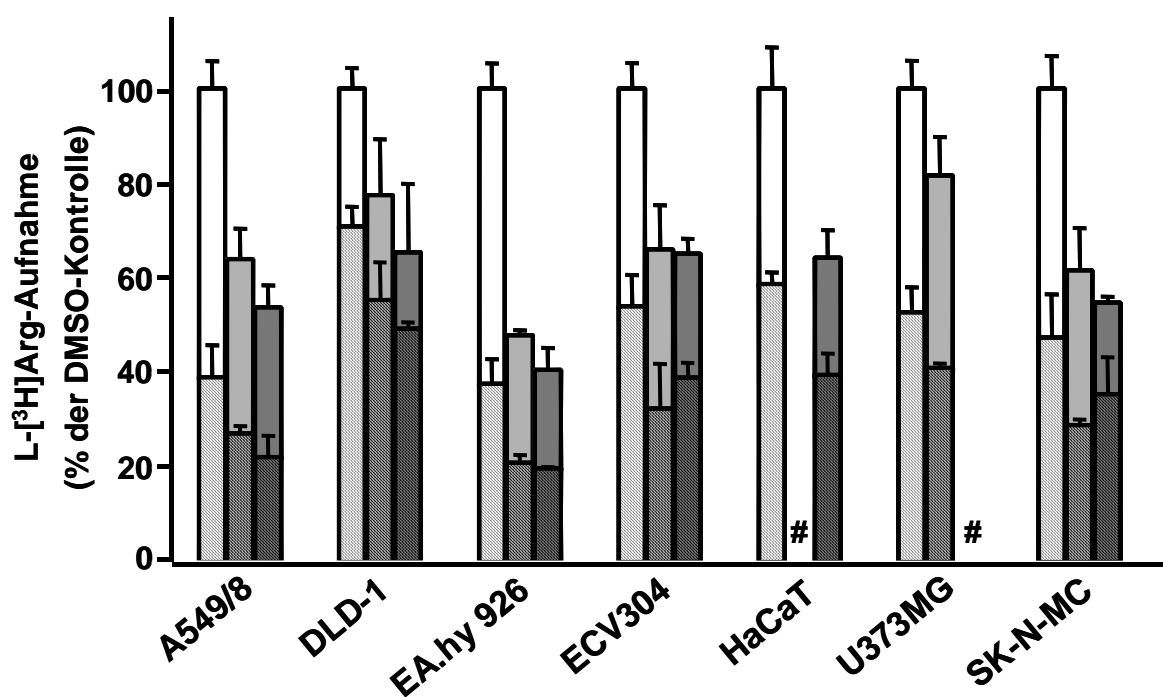


Abbildung 26: Einfluss von PMA auf die L-Arginin-Aufnahme in verschiedenen humanen Zelllinien

Die angegebenen Zelllinien wurden in 96-Loch-Platten bis zur Konfluenz kultiviert. A) Die Zellen wurden für 0,5h (hellgraue Balken) bzw. 4h (graue Balken) bei 37 °C mit je 100 µl Locke's Lösung/Loch inkubiert, die 100 nM PMA in 0,1 % DMSO enthielt. Als Kontrolle wurden die Zellen 4h mit 0,1 % DMSO behandelt (weiße Balken). Anschließend wurde die Aufnahme von 100µM L-³H]Arginin (5µCi/ml) wie in Abb. 23 beschrieben bestimmt, mit der Ausnahme, dass die Transportaktivität zusätzlich in Anwesenheit von 2mM L-Leu gemessen wurde (gestreifte Balken), um damit den Transport von L-Arginin durch andere Transportsysteme als System y⁺ (hCAT-vermittelt) zu blockieren. Zwei Sekunden vor Beendigung der L-Arginin-Aufnahme wurde zu unbehandelten Zellen 100µl Locke's Lösung/Loch, die 100 µM ³H]L-Arginin (5 µCi/ml) enthielt, pipettiert ("Nullwert"). Nach Lyse der Zellen wurde die Proteinkonzentration/Loch bestimmt und anschließend die Menge an Radioaktivität in den Lysaten bestimmt. Die Werte sind als Prozentanteile der jeweiligen DMSO-Kontrollen angegeben (in pmol/µg/Min.: A549/8, 2,0 ± 0,1; DLD-1, 2,0 ± 0,1; EA.hy 926, 1,5 ± 0,1; ECV 304, 1,4 ± 0,1; HaCaT, 1,0 ± 0,1; U373MG, 0,9 ± 0,1; SK-N-MC, 2,2 ± 0,1). Die Werte stellen Mittelwerte ± SEM (n=15-25) dar. Das #-Symbol kennzeichnet fehlende Daten.

Tabelle 15: Einfluss von PMA auf die L-Arginin-Aufnahme in unterschiedlichen humanen Zelllinien

Zelllinie	Transportaktivität (% der DMSO-Kontrolle)				y ⁺ -Anteil am Gesamttransport (%)
	Gesamttransport		y ⁺ -vermittelter Transport (+ 2mM L-Leu)		
	PMA (0,5h)	PMA (4h)	PMA (0,5h)	PMA (4h)	
A549/8	60 ± 6	52 ± 4	69 ± 2	57 ± 4	39 ± 7
DLD-1	76 ± 12	55 ± 14	78 ± 7	70 ± 2	71 ± 4
EA.hy 926	43 ± 2	33 ± 5	56 ± 2	53 ± 1	38 ± 5
ECV 304	73 ± 9	57 ± 3	60 ± 9	72 ± 3	54 ± 7
HaCaT	k.D.	60 ± 6	k.D.	67 ± 5	59 ± 3
U373MG	86 ± 8	k.D.	77 ± 1	k.D.	53 ± 5
SK-N-MC	62 ± 8	37 ± 2	61 ± 1	74 ± 7	47 ± 9

PMA-Effekte sind in Prozent der jeweiligen DMSO-Kontrolle angegeben (Mittelwerte ± SEM, n=15-25). Fehlende Daten sind mit k.D. (keine Daten) markiert. Grau unterlegt der berechnete y⁺-Anteil am Gesamttransport.

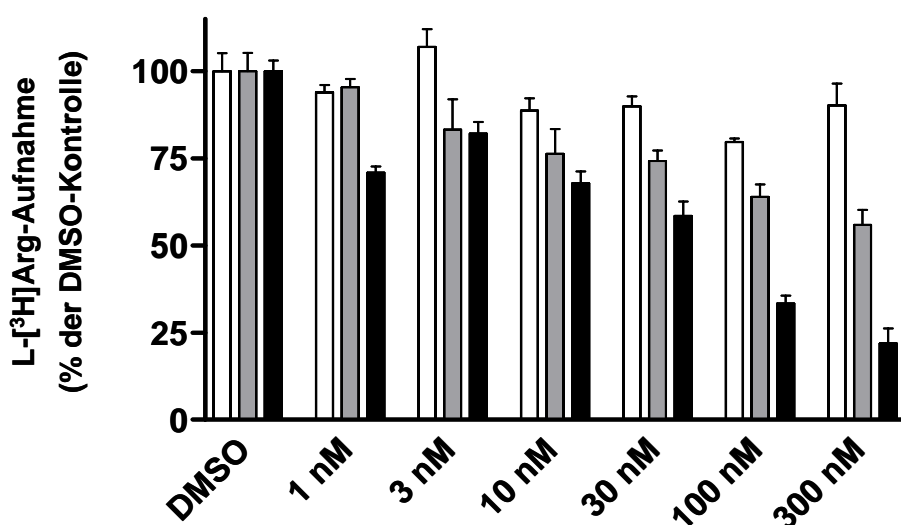


Abbildung 27: Konzentrationsabhängiger PMA-Effekt auf die L-Arginin-Aufnahme in U373MG Glioblastom- A549/8 Lungenkarzinom- und endothelialen EA.hy 926-Zellen

Konzentrationsabhängiger PMA-Effekt auf die Transportaktivität von U373MG Glioblastom- (weiße Balken), A549/8 Lungenkarzinom- (graue Balken) und endothelialen EA.hy 926-Zellen (schwarze Balken). Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an PMA über 0,5h behandelt und anschließend die Aufnahme von 100µM L-[³H]Arginin (5µCi/ml) wie in Abb. 26 beschrieben in Anwesenheit von 2mM L-Leu gemessen. Die Daten sind als Prozentanteile der DMSO-Kontrolle angegeben (100 % entsprachen 2,6 ± 0,06, 1,5 ± 0,05 bzw. 1,1 ± 0,03 pmol /µg Protein/Min., jeweils für U373MG, A549/8 bzw. EA.hy 926). Die Werte stellen Mittelwerte ± SEM aus einer Anzahl von je 6 Einzelpunkten dar. Vergleichbare Ergebnisse wurden in drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen erzielt.

5.5.2 Expression der hCAT-Isoformen in verschiedenen humanen Zelllinien

Nachweis der Expression der hCAT-Isoformen mit Hilfe der RNase-Verdauungsschutzanalyse

Die Expression von hCAT-1, -2A, -2B und -3 in verschiedenen humanen Zelllinien wurde mit Hilfe der RNase-Verdauungsschutzanalyse untersucht. Repräsentative Autoradiogramme sind in Abb. 28 dargestellt, die quantitative Auswertung von 3-4 Autoradiogrammen wurde in Tab. 16 zusammengefasst. Dabei wurde die mRNA-Expression der hCAT-Isoformen auf die zur Standardisierung mitgeführte h- β -Aktin-Bande bezogen. Die relative mRNA-Expression wurde in % der NT2-Werte berechnet, da in dieser Zelllinie - mit Ausnahme von hCAT-2A - eine deutliche Expression aller hCAT-Isoformen gezeigt werden konnte. Für hCAT-2A konnte auch in allen anderen untersuchten Zelllinien keine mRNA-Expression nachgewiesen werden. Die mRNA-Expression von hCAT-1 konnte in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Dabei zeigten die Zelllinien A549/8 und EA.hy 926 die geringste, DLD-1 und A673 die höchste hCAT-1 Expression. hCAT-2B wurde vor allem in den Zelllinien A549/8, A673 und SK-N-MC nachgewiesen, aber auch in DLD-1, NT2 und an der Nachweisgrenze in U373MG -Zellen. Es sollte bemerkt werden, dass die Werte für Zelllinien A549/8 und DLD-1 zwischen den einzelnen Analysen schwankten. hCAT-3 wurde vor allem in NT2-Zellen nachgewiesen, in geringeren Mengen auch in der Zelllinie SK-N-MC und an der Nachweisgrenze in A673-Zellen.

Tabelle 16: mRNA-Expression der hCAT-Isoformen in verschiedenen humanen Zelllinien

Zelllinie	relative mRNA-Expression (Fraktion der NT2-Expression)			vorwiegend exprimierte hCAT-Isoform
	hCAT-1	hCAT-2B	hCAT-3	
A549/8	0,5 \pm 0,07	7,9 \pm 3,7	n. n.	hCAT-2B
A673	5,3 \pm 1,1	4,0 \pm 1,2	0,03 \pm 0,01	hCAT-1 = hCAT-2B
DLD-1	7,2 \pm 2,5	2,2 \pm 1,7	n. n.	hCAT-1
EA.hy 926	0,4 \pm 0,02	n. n.	n. n.	hCAT-1
ECV 304	0,9 \pm 0,2	n. n.	n. n.	hCAT-1
HaCaT	2,3 \pm 0,2	n. n.	n. n.	hCAT-1
NT2	1	1	1	hCAT-3
U373MG	0,7 \pm 0,03	0,02 \pm 0,01	n. n.	hCAT-1
SK-N-MC	1,0 \pm 0,3	1,6 \pm 0,4	0,2 \pm 0,02	hCAT-1 = hCAT-2B

Quantitative Auswertung der mit Hilfe der RNase-Verdauungsschutzanalyse untersuchten mRNA-Expression der hCAT-Isoformen. Für hCAT-2A wurde keine Expression in den untersuchten Zelllinien nachgewiesen. Fehlende Expression einer hCAT-Isoform ist mit n. n. (nicht nachweisbar) gekennzeichnet. Daten sind Mittelwerte \pm SEM (n=3-4).

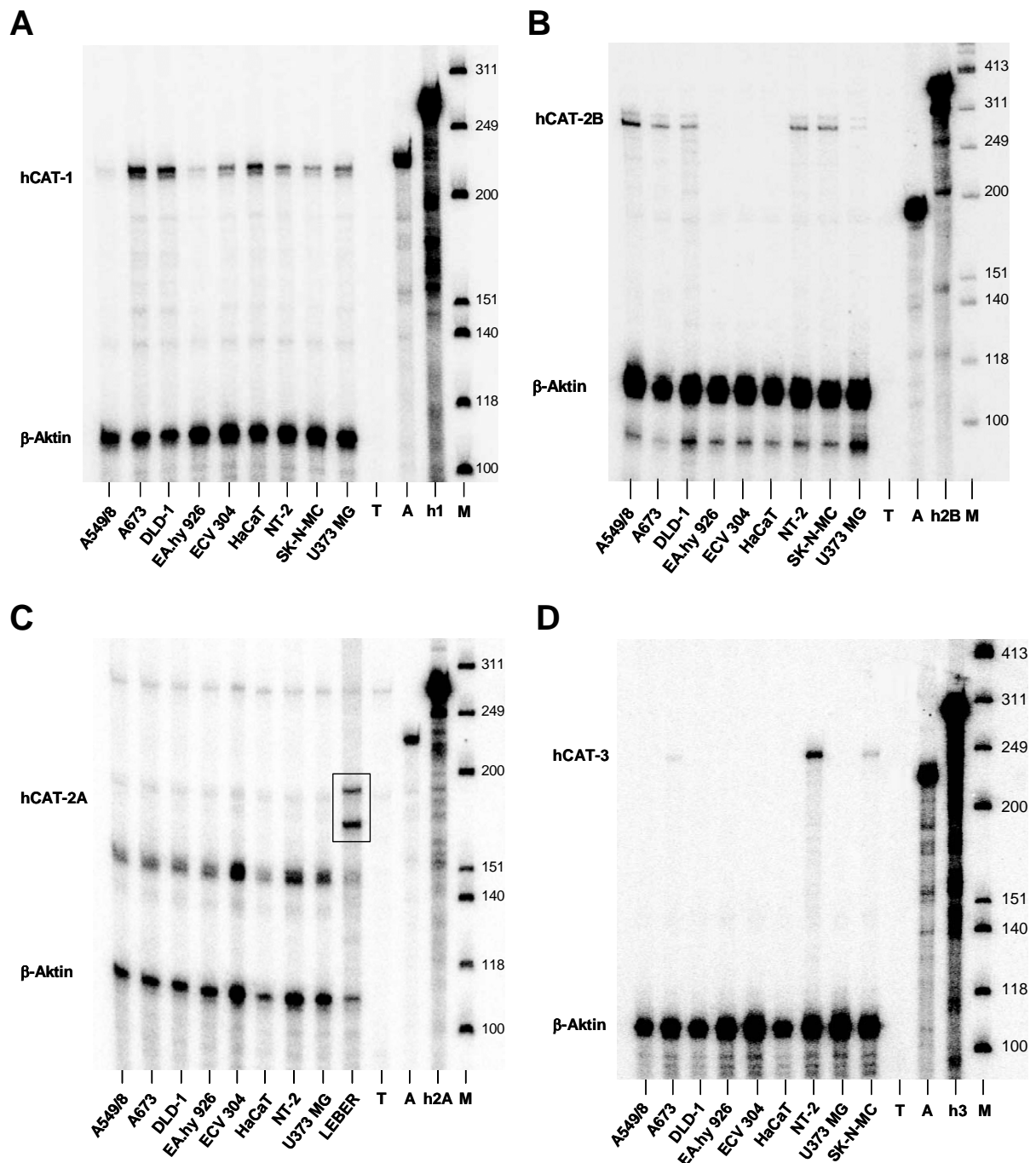


Abbildung 28: Nachweis der mRNA-Expression in verschiedenen humanen Zelllinien

Gesamt-RNA wurde aus den betreffenden Zelllinien nach der Methode von Chomczynski und Sacchi isoliert und jeweils 20 µg für eine RNase-Verdauungsschutzanalyse eingesetzt (Chomczynski und Sacchi, 1987). Zur Hybridisierung wurden spezifische Sonden für hCAT-1 (A), hCAT-2B (B), hCAT-2A (C) oder hCAT-3 (D) in Kombination mit einer hβ-Aktin-Sonde eingesetzt. Ein Röntgenfilm wurde den Gelen für einen Tag exponiert. h1: hCAT-1-Sonde (unverdautes Fragment 252nt, geschütztes Fragment 201nt); h2A: hCAT-2A-Sonde (unverdautes Fragment 272nt, geschütztes Fragment 185 (168) nt); h2B: hCAT-2B-Sonde (unverdautes Fragment 307nt, geschütztes Fragment 289 nt); h3: hCAT-3-Sonde (unverdautes Fragment 292nt, geschütztes Fragment 243nt); A₁: h-β-Aktin/5-Sonde (unverdautes Fragment 222nt, geschütztes Fragment 107nt); A₂: KS-hu-β-Aktin-Sonde (unverdautes Fragment 188nt, geschütztes Fragment 109nt); T: tRNA; M: Molekulargewichtsmarker ØX174 *Hinf*I. Die Abb. zeigt repräsentative Autoradiogramme.

Transiente Expression von hCAT-1.EGFP in den Zelllinien EA.hy 926, A549/8 und DLD-1

Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie wurde die Expression und Verteilung des hCAT-1.EGFP-Konstruktes in transient transfizierten EA.hy 926-, A549/8- und DLD-1-Zellen visualisiert. Eine Expression von hCAT-1.EGFP an der Zelloberfläche konnte bei diesen Zelllinien detektiert werden. Jedoch konnte auch bei diesen Zelllinien auf ähnliche Weise wie zuvor bei den U373MG Glioblastom-Zellen eine starke Anreicherung des hCAT-1 in intrazellulären Vesikel beobachtet werden (Abb. 29). Der Versuch, die Zelllinien EA.hy 926 und A549/8 mit hCAT-1.EGFP stabil zu transfizieren scheiterte dadurch, dass die Zellen während des Auswahlprozesses abstarben (EA.hy 926) oder nach einiger Zeit die Transportaktivität des überexprimierten hCAT-1.EGFP und damit einhergehend die Leuchtintensität verloren ging (A549/8).

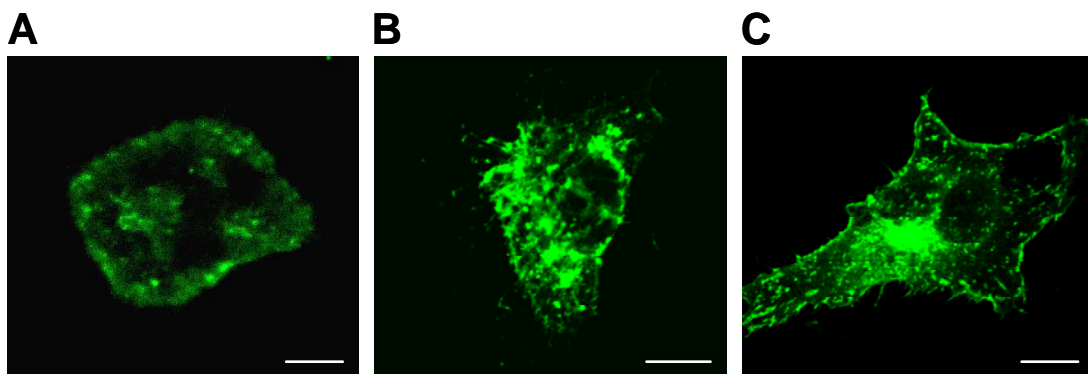


Abbildung 29: Transiente hCAT-1.EGFP-Expression in den Zelllinien A549/8, DLD-1 und EA.hy 926

Mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen von hCAT-1.EGFP transient transfiziert in A549/8 (A), DLD-1 (B) und EA.hy 926-Zellen (C). Die Zellen wurden in Deckglas-Gewebekulturkammern ausgesät und am folgenden Tag mit 4% Paraformaldehyd fixiert und anschließend unter dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop bei gleichen Einstellungsparametern abgelichtet. Die Abb. zeigt repräsentative Aufnahmen. Der Balken entspricht 10µm.

5.6 Charakterisierung der hCAT-1-Mutante hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷

Um zu überprüfen ob die PKC direkt das hCAT-1-Protein phosphoryliert, wurden die drei putativen PKC-Erkennungsstellen am hCAT-1-Protein durch einen Serin zu Alanin Austausch an den AS-Positionen 476, 482 und 557 entfernt (s. Mutagenese von hCAT-1, 4.5). Anschließend sollte die Zelloberflächenexpression der hCAT-1-Mutante nach PMA-Behandlung mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie und in Western-Blots von biotinylierten Zelloberflächen-Proteinen untersucht werden. Die Transportaktivität sollte analog zu den Untersuchungen am hCAT-1-Wildtyp in L-Arginin-Aufnahmestudien nach Phorbol esterbehandlung untersucht werden. Davor aber sollte die hCAT-1-Mutante (hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷) im Vergleich zu hCAT-1 charakterisiert werden.

5.6.1 hCAT-1 und hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ Sequenzvergleich

Die drei putativen PKC-Erkennungsstellen im hCAT-1-Protein wurden durch Punktmutation (T → G Austausch) an den bp-Positionen 1426, 1444 und 1669 entfernt. Dadurch wurden in der Proteinsequenz die Serine an den AS-Positionen 476, 482 und 557 gegen Alanine ausgetauscht (Abb. 30). Die resultierende hCAT-1-Mutante wurde hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ bezeichnet. Die für die Subklonierung benötigte *Hind* III Restriktionsstelle wurde als stille Mutation durch C → T Austausch an der bp-Position 1668 eingeführt. Die Überprüfung der gesamten hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ cDNA-Sequenz über DNA-Sequenzierung zeigte keine unerwünschten Mutationen.

5.6.2 hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP zeigte eine ähnliche subzelluläre Verteilung wie hCAT-1.EGFP

Nachweis der hCAT-1S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP-Expression mit Hilfe konfokaler Mikroskopie

Das hCAT-1S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP-Konstrukt wurde durch Subklonierung der mutierten PKC-Erkennungsstellen des hCAT-1 aus dem pSPHC1S/A476+482+557-Vektor in das hCAT-1.EGFP-Konstrukt hergestellt (s. 4.5.4). Damit konnte die subzelluläre Expression der Mutante analog zu den Untersuchungen des hCAT-1-Wildtyps mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie visualisiert werden. Nach der Transfektion von hCAT-1S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP in U373MG Glioblastom-Zellen wurden durch Selektion mit G418 einzelne, stabil transfizierte Klone isoliert. Die Expression der hCAT-1-Mutante war vergleichbar mit der Expression des Wildtyps (Abb. 31). Neben der Lokalisation an der Zelloberfläche wurde auch eine starke

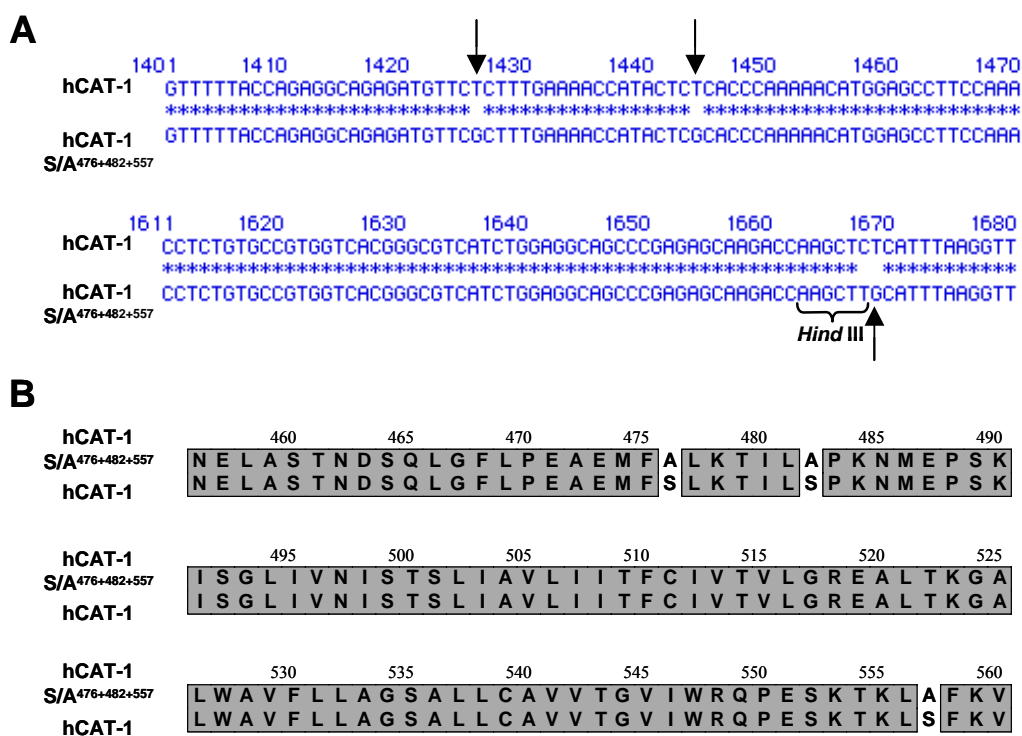


Abbildung 30: Sequenzvergleich von hCAT-1 und hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷

Die Gesamtsequenz von hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ wurde mit Hilfe von DNA-Sequenzierung überprüft. Die Sequenz der Mutante wurde mit Hilfe des Programms MacDNASIS[®] mit der Sequenz von hCAT-1 verglichen. A) Vergleich der cDNA-Sequenz zwischen den bp 1401 und 1608. Die Pfeile zeigen die T → G Mutationen, die zur Mutation der drei PKC-Erkennungsstellen führte. Die durch eine stille C → T Mutation eingeführte *Hind* III-Schnittstelle ist angezeigt. B) Vergleich der AS-Sequenz im Bereich zwischen den AS 456 und 560 mit den S → A Austausch an den AS-Positionen 476, 482 und 557.

Expression des mutierten hCAT-1-Transporters in perinukleär liegenden Vesikeln bei allen untersuchten Zellen beobachtet. Mit EGFP-N1 transfizierte Zellen zeigten dagegen eine diffuse Expression über die gesamte Zelle mit einer sichtbaren Anreicherung im Zellkern (Abb. 31).

Vergleich der hCAT-1S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP- und hCAT-1.EGFP-Expression in Western-Blots von biotinylierten Zelloberflächen-Proteinen

In Western-Blots von biotinylierten Zelloberflächen-Proteinen konnte gezeigt werden, dass die Expression von hCAT-1S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP keinen Unterschied im Vergleich zur Expression des nativen hCAT-1 aufwies (Abb. 31D). Der mutierte Transporter konnte an der Zelloberfläche nachgewiesen werden und zeigte eine glykosylierte Bande bei etwa 110kDa, die durch Behandlung mit N-Glykosidase F ähnlich wie bei nativen hCAT-1 auf etwa 75kDa verschoben wurde.

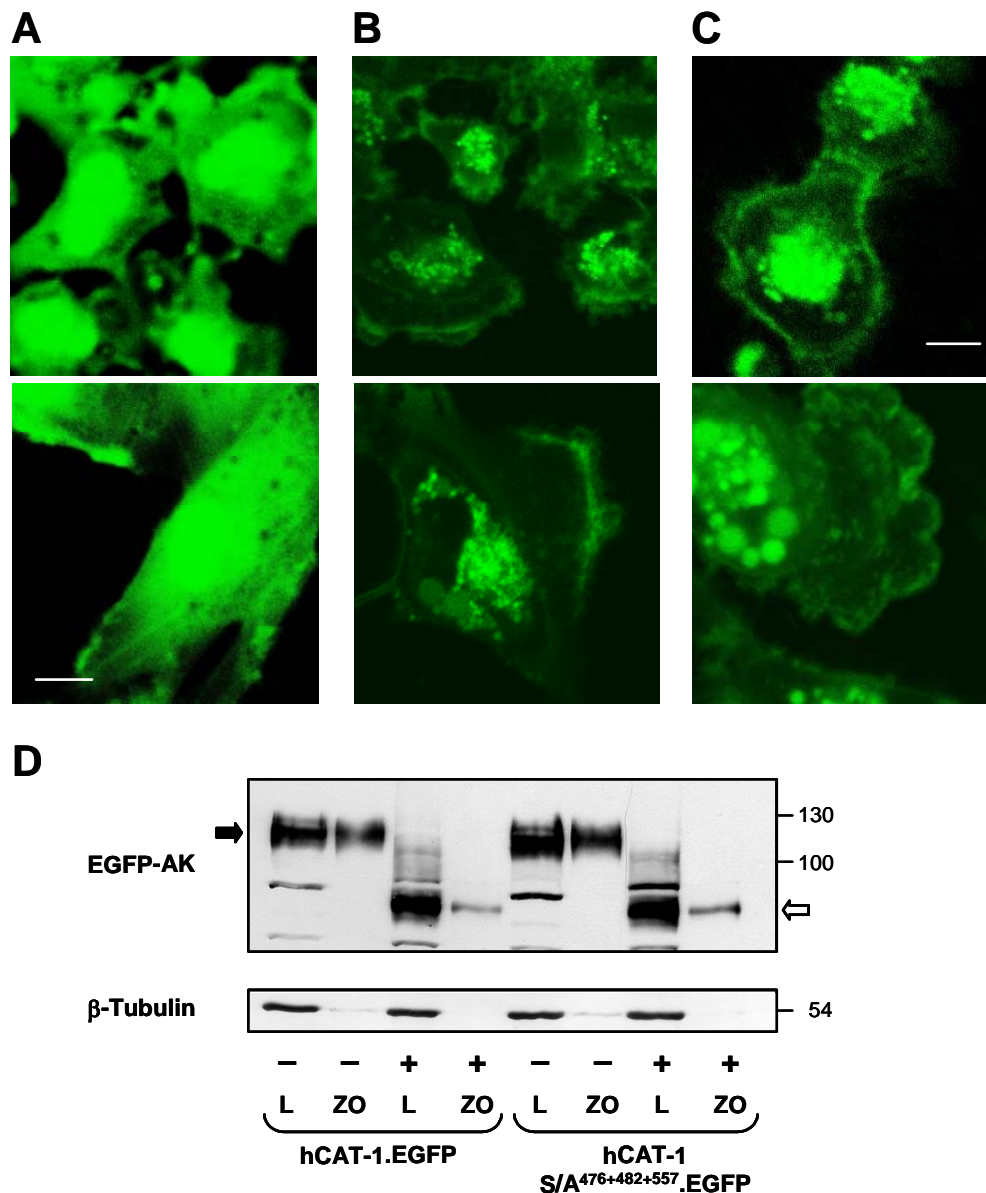


Abbildung 31: Expression von hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen

Mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen von U373MG Glioblastom-Zellen stabil transfiziert mit A) EGFP-N1 (Kontrolle), B) hCAT-1.EGFP oder C) hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP. Die Zellen wurden wie in Abb. 29 angegeben in Deckglas-Gewebekulturkammern fixiert und anschließend unter dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop abgelichtet. Die Abb. zeigt repräsentative Aufnahmen, jeweils in 2 Vergrößerungen. Der Balken oben rechts entspricht 20µm, unten links 10µm, jeweils für die obere bzw. untere Reihe D) Mit hCAT-1.EGFP bzw. hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ stabil transfizierte U373MG Glioblastom-Zellen wurden in 10cm-Kulturplatten bis zur Konfluenz kultiviert. Zelloberflächen-Proteine (ZO) wurden wie in Abb. 22 angegeben durch Biotinylierung extrahiert, und zusammen mit Gesamtlysaten (L) über 10% SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die Blots mit dem EGFP-Antikörper inkubiert. Nach Entfernung des EGFP-Antikörpers aus der Membran wurde diese mit dem anti-β-Tubulin-Antikörper inkubiert. Unbehandelte (-) oder mit N-Glykosidase F behandelte Proben (+) jeweils von Gesamtlysaten (40 µg) oder biotinylierten Zelloberflächen-Proteinen wurden aufgetragen. Glykosylierte Bande (schwarzer Pfeil) bei etwa 110 kDa. Deglykosylierte Bande (weißer Pfeil) bei etwa 75 kDa.

5.6.3 Die Transportaktivitäten von hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ und hCAT-1 unterschieden sich nicht

Um sicher zu gehen, dass durch die Einführung der Mutationen der hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ Transporter uneingeschränkt funktionsfähig war, wurde die Transportaktivität in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen und in *X. laevis*-Oozyten untersucht und mit der Transportaktivität des hCAT-1-Wildtyps verglichen.

Transportaktivität von hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ in stabil transfizierten U373MG-Zellen

Die L-Arginin-Aufnahme wurde für verschiedene mit hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP stabil transfizierte U373MG-Zellklone bestimmt (Abb. 32A). Im Vergleich zu den EGFP transfizierten Zellen waren die Transportaktivitäten der meisten hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP-Klone 3-4-fach höher. Die hCAT-1S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP-Klone mit der höchsten Transportaktivität zeigten in L-[³H]Arginin-Aufnahmestudien keinen Unterschied zur Transportaktivität des hCAT-1-Wildtyps (Abb. 32B). Die weiteren Analysen an der hCAT-1-Mutante wurden am hCAT-1S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP/Klon 8 durchgeführt.

Transportaktivität von hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷-injizierten *X. laevis*-Oozyten

Aufnahmestudien mit 100µM L-[³H]Arginin wurden an hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷-injizierten Oozyten durchgeführt und mit der Transportaktivität des nativen hCAT-1 verglichen. Wie in Abb. 32A gezeigt, unterschied sich der L-Arginin-Transport von hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷- und hCAT-1-exprimierender Oozyten nicht. In beiden Fällen wurde eine 10-12-fach höhere Transportaktivität im Vergleich zu den H₂O-injizierten Kontroll-Oozyten (0,02 nmol/Oozyte/h) beobachtet.

A

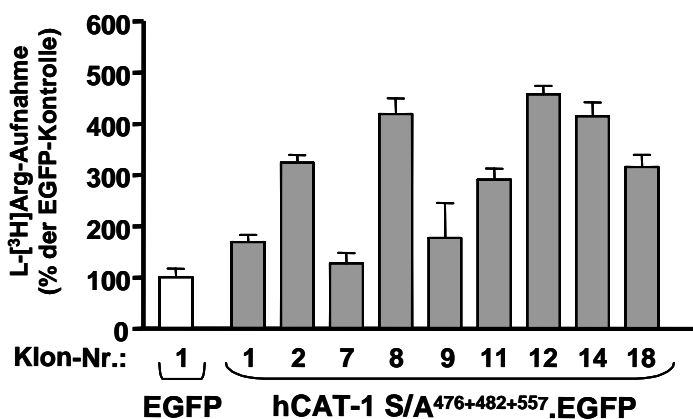
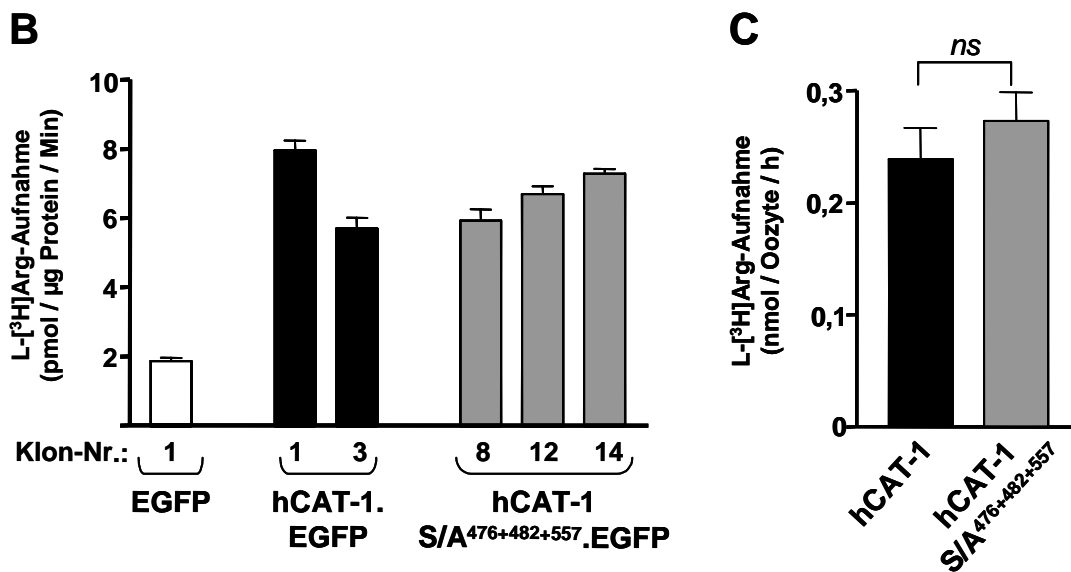


Abbildung 32:
Transportaktivität von hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen und in *X. laevis*-Oozyten

A) + B) Die Transportaktivität einzelner mit hCAT-1S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP in U373MG Glioblastom-Zellen stabil transfizierter Klone wurde durch Messung der Aufnahme von 100µM L-[³H]Arginin (10µCi/ml) bei 37°C über 30s bestimmt. A) Transportaktivität einzelner hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP-Klone. Die Werte sind als Prozentanteile der EGFP-Kontrolle angegeben (100% entsprachen 1,8 ± 0,2). Die Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM (n=6-18).



(Fortsetzung von Abb. 32) B) Vergleich der Transportaktivitäten einzelner hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP-Klone (mit der höchsten Aktivität) zu Klonen des hCAT-1.EGFP-Wildtyps. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM (n=12-15) C) Transportaktivität der hCAT-1-Mutante in *X. laevis*-Oozyten. Die Aufnahme von 100 μ M L-³H]Arginin (5 μ Ci/ml) wurde in hCAT-1- und hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷-injizierten Oozyten wie in Abb. 20F beschrieben durchgeführt (jedoch ohne PMA-Behandlung). Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM (n=20). Die statistische Analyse wurde mit dem ANOVA-Varianztest durchgeführt. ns kennzeichnet keine Signifikanz.

5.7 Einfluss der PKC-Aktivierung auf die Zelloberflächenexpression und die Transportaktivität von hCAT-1S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷

Analog zu den durchgeführten Versuchen am hCAT-1-Wildtyp sollte der Einfluss der PKC-Aktivierung durch Phorbolster auf die Zelloberflächenexpression und auf die Transportaktivität des mutierten hCAT-1 untersucht werden. Eventuelle Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der Mutante sollten Aufschluss über eine mögliche direkte Phosphorylierung des hCAT-1-Proteins durch die PKC an den drei PKC-Erkennungsstellen geben.

5.7.1 PMA verminderte auch die Zelloberflächenexpression von hCAT-1S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen

Der Einfluss von PMA auf die Zelloberflächenexpression des mutierten hCAT-1 wurde mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie und in Western-Blot-Analysen von biotinylierten Zelloberflächen-Proteinen untersucht.

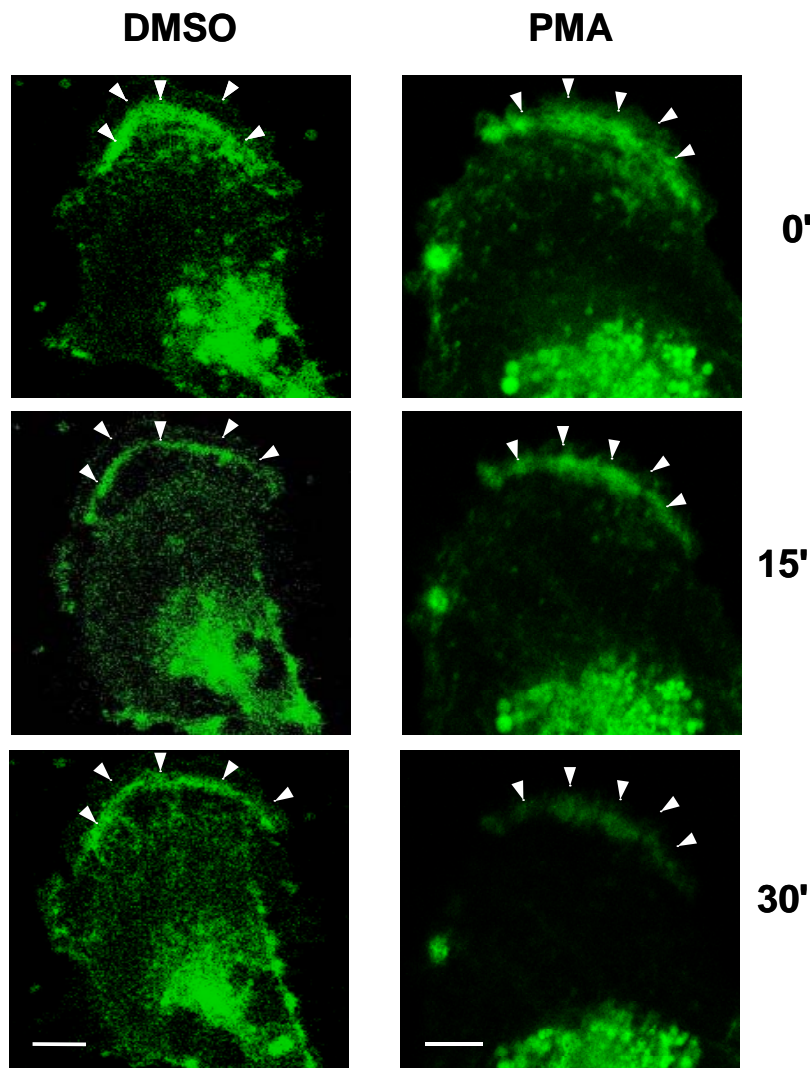


Abbildung 33: Einfluss von PMA auf die Zelloberflächenexpression von hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen

Mit hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP stabil transfizierte U373MG Glioblastom-Zellen wurden in Deckglas-Gewebekulturkammern ausgesät und am folgenden Tag unter dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop abgelichtet. Die Abb. zeigt eine repräsentative Abfolge mikroskopischer Fluoreszenzaufnahmen einer Zelle bei gleichen Einstellungsparametern für die respektive Behandlung mit 0,1% DMSO bzw. 100nM PMA. Die Pfeile zeigen die Expression von hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP an der Plasmamembran („ruffled borders“). Die Balken entsprechen 10µm.

A) Konfokale Mikroskopie von stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen

In mit hCAT-1S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen wurde mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie die Wirkung von PMA auf die subzelluläre Verteilung des Transporters untersucht (Abb. 33). Dabei wurde durch die PKC-Aktivierung eine ähnliche Verminderung der Zelloberflächenexpression beobachtet wie bei hCAT-1

transfizierten Zellen. Die Behandlung mit DMSO zeigte dagegen keine Veränderung der subzellulären Verteilung des mutierten Transporters.

B) Western-Blot-Analysen von biotinylierten Zelloberflächen-Proteinen

In Western-Blot-Analysen von biotinylierten Zelloberflächen-Proteinen wurde die PMA induzierte Verminderung der Zelloberflächenexpression vom mutierten hCAT-1 quantitativ erfasst. Auch beim hCAT-1S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP nahm die Zelloberflächen-expression in PMA behandelten Zellen auf ähnliche Weise ab wie beim Wildtyp hCAT-1 (Abb. 34A). Die quantitative Analyse mehrerer Versuche zeigte, dass die Expression von hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP nach Behandlung mit PMA nur an der Zelloberfläche abnahm (auf $69 \pm 4\%$ der DMSO-Kontrolle; Gesamtllysate $101 \pm 3\%$) (Abb. 34B). Dieser Effekt ließ sich durch Inkubation mit BIM I aufheben ($93 \pm 7\%$ der DMSO-Kontrolle; Gesamtllysate $107 \pm 2\%$).

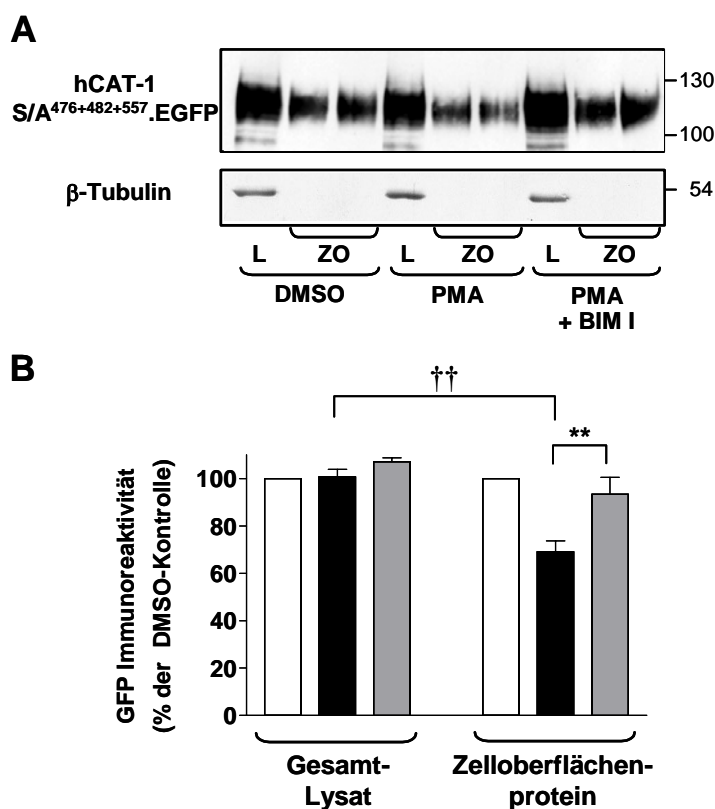


Abbildung 34:
Einfluss von PMA auf die hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP Expression in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen

Mit hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP stabil transfizierte U373MG Glioblastom-Zellen wurden in 10cm-Kulturplatten bis zur Konfluenz kultiviert. A) Die Zellen wurden wie in Abb. 22 beschrieben mit DMSO, PMA, PMA + BIM I vorinkubiert und anschließend biotinyliert. Nach dem Ablösen der Zelloberflächen-Proteine vom Avidin wurden diese bzw. die unbehandelten Gesamtllysate (15 μ g/Spur) über 10 % SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und die Membran mit dem EGFP-Antikörper inkubiert. Die hCAT-1

S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP-Expression ist für Gesamtllysate (L) in einfacher Auftragung bzw. für die Zelloberflächen-Proteine (ZO) in doppelter Auftragung gezeigt. Nach Entfernung des EGFP-Antikörpers aus der Membran wurde diese mit dem anti- β -Tubulin-Antikörper inkubiert. Die Abb. zeigt einen repräsentativen Western-Blot. B) Auswertung von 3-5 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Für die Auswertung wurde jeweils die densitometrische Dichte der Western-Blot-Banden einer Versuchsreihe zusammen quantifiziert. Die Werte (Mittelwerte \pm SEM) sind in Prozent der DMSO-Kontrolle (weiße Balken) dargestellt, nach Behandlung mit PMA (schwarze Balken) bzw. mit PMA + BIM I (graue Balken). Statistische Analysen wurden mit dem ANOVA-Varianztest mit anschließendem t-Test nach Bonferroni durchgeführt. P-Wert von $<0,01$ ist mit (**) bzw. (††) gekennzeichnet.

5.7.2 Die Transportaktivität von hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ wurde auch durch PKC-Aktivierung reduziert

Der Einfluss der PKC-Aktivierung auf die Transportaktivität des mutierten hCAT-1 wurde analog zu den Studien am hCAT-1-Wildtyp in L-Arginin-Aufnahmestudien an stabil transfizierten humanen Zellen und an injizierten Oozyten untersucht.

Einfluss der PKC-Aktivierung auf die Transportaktivität von hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen

Die Transportaktivität der mit hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen nahm durch die Behandlung mit den aktiven Phorbolestern PMA und PDBu signifikant ab (jeweils $63 \pm 3\%$ bzw. $65 \pm 7\%$). Dieser Effekt ließ sich durch Vorinkubation mit BIM I inhibieren ($94 \pm 5\%$, nur für PMA gezeigt). Die Behandlung mit dem inaktiven Phorbol ester 4α -PPD und nur mit BIM I zeigte keinen Effekt (jeweils $104 \pm 7\%$ bzw. $115 \pm 6\%$, Abb. 35A). Die Transportaktivität der mit hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen nahm bei den PMA-behandelten Zellen in gleicher Weise ab wie bei hCAT-1.EGFP-transfizierten Zellen (s.a. Abb. 23).

Der konzentrationsabhängige Einfluss von PMA auf die Transportaktivität von hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP und hCAT-1.EGFP wurde in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen miteinander verglichen. In beiden Fällen war der PMA-Effekt konzentrationsabhängig und unterschied sich kaum voneinander. Die ermittelte halbmaximale Inhibition der Transportaktivität durch PMA (K_I -Wert) lag bei einer Konzentration von $2,9 \pm 0,2\text{nM}$ bzw. $6,3 \pm 0,5\text{nM}$, jeweils für hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP bzw. hCAT-1.EGFP (Abb. 35C).

Einfluss der PKC-Aktivierung auf die Transportaktivität von hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ in X. laevis-Oozyten

hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ wurde in *X. laevis*-Oozyten exprimiert, und die Oozyten anschließend mit 0,1% DMSO und 100nM PMA über 30 Min. behandelt. Die Transportaktivität der PMA behandelten Oozyten nahm auf $57 \pm 6\%$ der DMSO-Kontrolle ab (Abb. 35B). Die Reduktion der L-Arginin-Aufnahme durch PMA war bei hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷-injizierten Oozyten ähnlich wie bei hCAT-1-exprimierenden Oozyten (s.a. Abb. 20F).

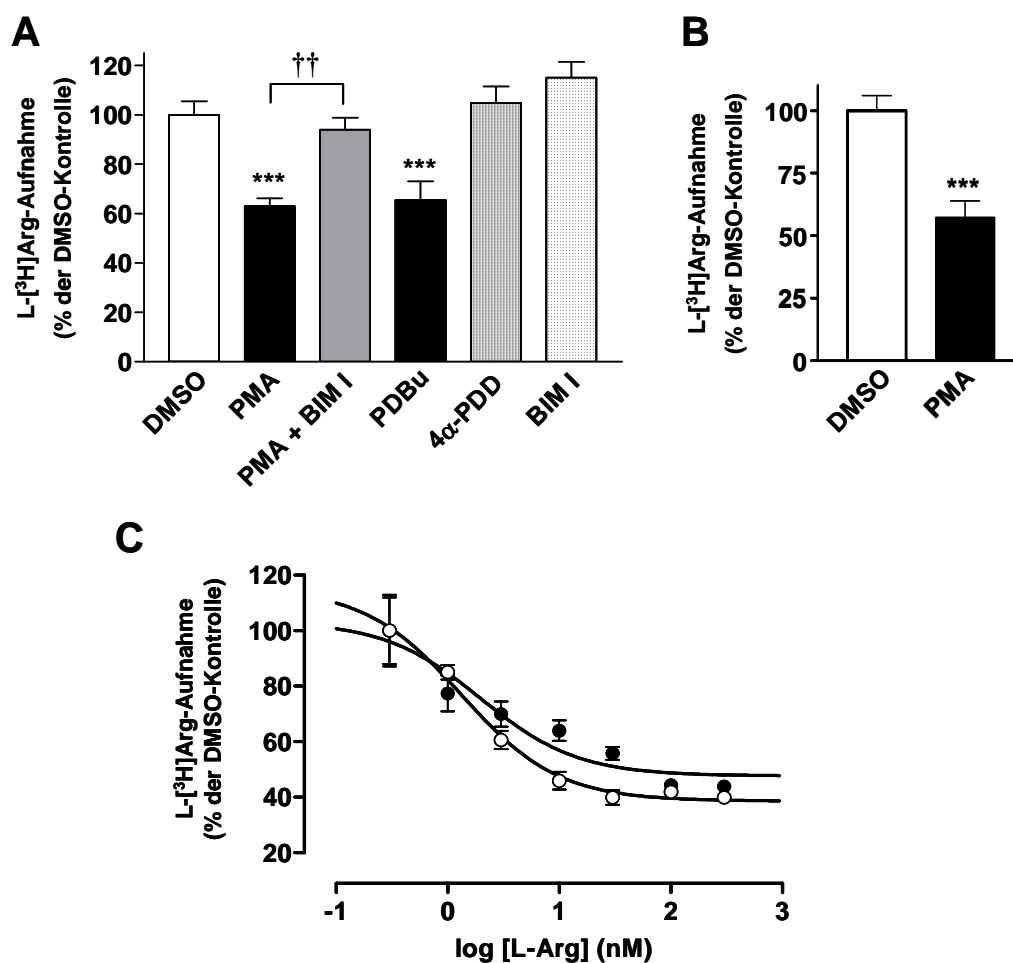


Abbildung 35: Einfluss der PKC-Aktivierung auf die Transportaktivität von hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷

A) Konfluente, mit hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP stabil transfizierte U373MG Glioblastom-Zellen wurden wie in Abb. 23B beschrieben behandelt und die Transportaktivität bestimmt. Die L-[³H]Arginin-Aufnahme der Zellen ist in Prozent der DMSO-Kontrolle angegeben (100% entsprachen $9 \pm 0,5$ pmol/ μ g Protein/Min.). Die Abnahme der Transportaktivität des mutierten hCAT-1 war ähnlich wie bei dem Wildtyp hCAT-1. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM (n=18-30). Die statistische Analyse wurde mit dem ANOVA-Varianztest mit anschließendem t-Test nach Bonferroni durchgeführt. P-Werte von $<0,01$ und $<0,001$ sind jeweils mit ($\dagger\dagger$) und (***) gekennzeichnet. B) *X. laevis*-Oozyten wurden mit 30ng hCAT-1 S/A476+482+557 cRNA injiziert. Nach drei Tagen Expressionszeit wurden die Oozyten 30 Min. in 100 μ M L-Arginin enthaltenden Na⁺-Aufnahmepuffer mit 0,1% DMSO (weiße Balken) oder 100nM PMA (schwarze Balken) vorinkubiert. Die Aufnahme von 100 μ M L-[³H]Arginin wurde auf gleiche Weise durchgeführt wie in Abb. 20F beschrieben. Die Werte (Mittelwerte \pm SEM, n=20) sind in Prozent der DMSO behandelten Zellen angegeben (100% entsprachen $0,42 \pm 0,07$ nmol/Oozyte/h). Die statistische Analyse wurde mit Student's t-Test durchgeführt. (***) kennzeichnet P-Wert $< 0,001$.

C) Vergleich des konzentrationsabhängigen PMA-Effektes auf die Transportaktivität von hCAT-1 (○) und hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP (●) in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen. Die L-[³H]Arginin-Aufnahme wurde nach 30 Min. Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen an PMA wie in Abb. 23 beschrieben durchgeführt. Die Werte sind in Prozent der DMSO-Kontrolle angegeben (100% entsprachen jeweils $8,5 \pm 1$ bzw. $7,3 \pm 0,8$ pmol/ μ g Protein/Min.) und repräsentieren Mittelwerte \pm SEM (n=6) aus einem repräsentativen Versuch.

Einfluss der PKC-Aktivierung auf die Transportaktivität von hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ in transfizierten A549/8 Lungenkarzinom-Zellen

A549/8 Lungenkarzinom-Zellen wurden auch mit dem hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP zur Herstellung von „stabilen“ Klonen transfiziert. Vereinzelt isolierte Klone zeigten eine höhere Aktivität als die EGFP-Kontrollen. Die Transportaktivität des Wildtyps und der Mutante war auch in diesen Zellen vergleichbar und zeigte eine ähnliche Abnahme der Transportaktivität nach PMA-Behandlung (Abb. 36). Die aktiven Klone verloren nach 2-3 Wochen jedoch ihre Aktivität und konnten deshalb nicht für weitere Versuche verwendet werden.

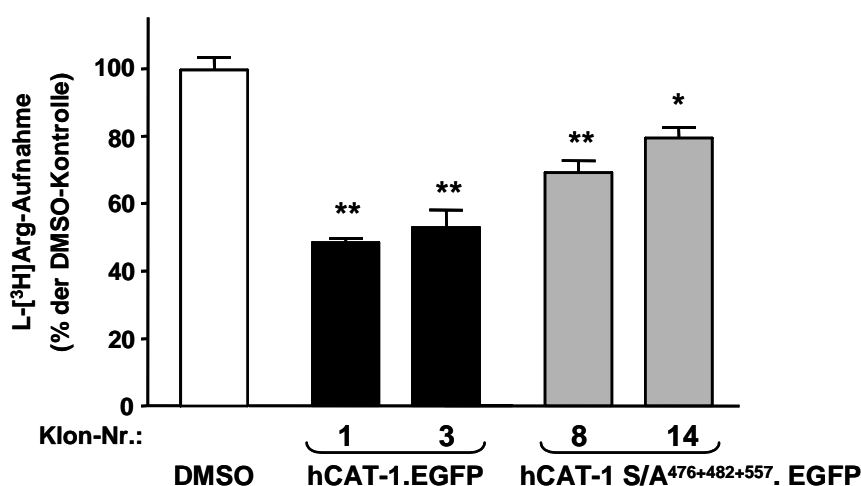


Abbildung 36: Einfluss von PMA auf die Transportaktivität von transfizierten A549/8 Lungenkarzinom-Zellen

Konfluente A549/8 Lungenkarzinom-Zellen wurden mit hCAT-1.EGFP und hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP transfiziert. Die Transportaktivität wurde nach PMA-Behandlung wie in Abb. 23B beschrieben bestimmt. Die L-[³H]Arginin-Aufnahme der Zellen ist in Prozent der jeweiligen DMSO-Kontrolle angegeben (100% entsprachen zwischen 3 - 6 pmol/μg Protein/Min., je nach Zellklon). Die Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM (n=6-15). Die statistische Analyse wurde mit dem ANOVA-Varianztest mit anschließendem t-Test nach Bonferroni durchgeführt. Es wurden die Werte der einzelnen PMA-behandelten Klone zu den respektiven DMSO-Kontrollwerten verglichen. P-Werte von <0,05 und <0,01 sind jeweils mit (*) und (**) gekennzeichnet.

6. Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit zwei unterschiedlichen Aspekten des basischen Aminosäure(BAS)-Transportes durch hCAT-1. Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde hCAT-1 im Vergleich zu Isoformen hCAT-2A und -2B mit Hilfe von elektrophysiologischen Untersuchungsmethoden in *Xenopus laevis*-Oozyten analysiert und weiterführend charakterisiert. Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurde der Mechanismus der Proteinkinase C (PKC)-vermittelten Inhibition der hCAT-1-Transportaktivität in Oozyten, in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen und endogen in DLD-1-Kolonkarzinom-Zellen untersucht. In der nachfolgenden Diskussion der Ergebnisse werden die beiden Teilbereiche dieser Arbeit getrennt behandelt und zum Schluss die neuen Erkenntnisse dieser Arbeit zusammengefasst.

6.1 Elektrophysiologische Charakterisierung von hCAT-1 im Vergleich zu hCAT-2A und -2B

6.1.1 Fehlen des BAS-Potentiales in hCAT-1 und Akkumulation von BAS in Abhängigkeit vom Membranpotential und der BAS-Konzentration

Nawrath *et al.* konnten an hCAT-2A- und -2B-exprimierenden Oozyten den Aufbau eines BAS-Potentiales nachweisen (Nawrath *et al.*, 2000). Zusätzlich zum K^+ -Diffusionspotential wurden die Zellen durch das BAS-Potential hyperpolarisiert, was durch die Zugabe von sättigenden L-Arginin-Konzentrationen aufgehoben werden konnte. In der vorliegenden Arbeit konnte für hCAT-2A und -2B-exprimierende Oozyten gezeigt werden, dass die Bildung eines BAS-Potentiales vom Beladungszustand der Oozyten mit BAS abhängig ist. Das Vorkommen eines BAS-Potentiales in diesen hCAT-Isoformen wurde nur beobachtet, wenn die Oozyten zuvor mit BAS beladen worden waren. Hingegen konnte in BAS-depletierten Oozyten keine Hyperpolarisation beobachtet werden. Das Membranpotential in depletierten hCAT-exprimierenden Oozyten wird nahezu ausschließlich durch das K^+ -Diffusionspotential bestimmt. Für hCAT-1-exprimierende Oozyten konnte im Gegensatz zu den Befunden für hCAT-2A und -2B die Bildung eines BAS-Potentiales nicht nachgewiesen werden, obwohl eine Tendenz zur Hyperpolarisation in BAS-beladenen Oozyten beobachtet wurde. Eine Erklärung für das Fehlen eines BAS-Potentiales in hCAT-1-

exprimierenden Oozyten könnte die fehlende Transstimulation des hCAT-1-Proteins unter diesen Bedingungen geben. Das BAS-Potential entsteht dadurch, dass beim Überführen der BAS-beladenen Oozyten ins BAS-freie Medium ein Efflux von BAS hervorgerufen wird. Durch diese Verschiebung von positiver Ladung wird das Membranpotential der Oozyten hyperpolarisiert (Nawrath *et al.*, 2000). Wird aber der Efflux von BAS durch fehlende Transstimulation des hCAT-1-Proteins nahezu vollständig verhindert, wie im BAS-freien Medium gezeigt worden ist (Closs *et al.*, 1997), dann verändert sich auch das Membranpotential nicht.

Einen weiteren Hinweis, dass die BAS-Abgabe durch die fehlende Transstimulation des hCAT-1-Proteins verhindert wird, kann beim Vergleich des Membranpotentials der einzelnen hCAT-Isoformen in BAS-depletierten Oozyten gefunden werden. Unter diesen Bedingungen wurde bei hCAT-1-exprimierenden Oozyten ein negativeres Membranpotential als bei hCAT-2A- und -2B-injizierten Oozyten gemessen. Dieser Unterschied hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass die Abgabe an BAS durch hCAT-2A- und -2B-injizierte Oozyten während der 3-tägigen Inkubation in BAS-freiem Medium höher war, als in hCAT-1-exprimierenden Oozyten. Dadurch war die Teildepolarisation des Membranpotentials in hCAT-2A- und -2B-exprimierenden Oozyten höher als die in hCAT-1-injizierten Oozyten. Die geringere Abgabe von BAS in hCAT-1-exprimierenden Oozyten über längere BAS-freie Inkubationsperioden müsste daher eine höhere intrazelluläre Konzentration an BAS im Vergleich zu den beiden anderen hCAT-Isoformen zur Folge haben. Diese erwartete Tendenz konnte in den Langzeit-Aufnahmen mit einer extrazellulären L-Arginin-Konzentration von 0,01mM beobachtet werden, einer Konzentration bei der kaum eine extrazelluläre Transstimulation von hCAT-1 beobachtet werden konnte (Closs *et al.*, 1997). Unter diesen Bedingungen akkumulierten hCAT-1-injizierte Oozyten 40% mehr Substrat als hCAT-2A und -2B. Da es sich hierbei nur um einen Hinweis handelt, wäre es notwendig, den BAS-Gehalt von depletierten Oozyten zu bestimmen, wozu HPLC-Messungen sich am besten eignen würden.

Ähnlich wie bei hCAT-2A und -2B wurde ein Einfluss auf das Membranpotential auch in mCAT-2A- und -2B-injizierten Oozyten beobachtet (Kavanaugh *et al.*, 1994). Ob es sich hierbei nur um ein Phänomen der CAT-Überexpression in Oozyten handelt, kann nicht ganz ausgeschlossen werden, denn es sind keine Untersuchungen bekannt, die direkt die Bildung eines BAS-Potentiales endogen in Säugerzellen zeigen. Da aber die meisten Zellen eine höhere intrazelluläre als extrazelluläre AS-Konzentration besitzen, ist es denkbar, dass die Expression von CAT-2A und -2B auch zu einer Hyperpolarisation der Säugerzellen beitragen

könnte, in denen diese CAT-Isoformen vorkommen. Hinweise hierfür liefern Studien zur L-Arginin-abhängigen Insulin-Sekretion in β -Zellen des Pankreas. In verschiedenen Studien ist gezeigt worden, dass das Membranpotential dieser Zellen durch die Zugabe von L-Arginin teildepolarisiert werden kann (Charles *et al.*, 1982; Smith *et al.*, 1997; Thams und Capito, 1999). Da CAT-2A im Pankreas exprimiert wird (Hoshida *et al.*, 1996) und bei den hohen L-Arginin-Konzentrationen hauptsächlich für den elektrogenen Transport von L-Arginin verantwortlich sein dürfte, müsste die beobachtete Depolarisation der β -Zellen auf diesen Transporter zurückzuführen sein. Folglich dürfte CAT-2A für die L-Arginin hervorgerufene Depolarisation verantwortlich sein und damit die Glukose-bedingte Insulinsekretion im Pankreas begünstigen.

Weiterhin wurde in Langzeit-Aufnahmeversuchen der Frage nachgegangen, warum hCAT-1-, -2A- und -2B-exprimierende Oozyten nach der Langzeit-Inkubation mit 10mM L-Arginin unterschiedliche Mengen an Substrat akkumulieren (Closs *et al.*, 1997 und Abb. 8). Kavanaugh *et al.* vermuteten, dass verschiedene Membranpotentiale der hCAT-exprimierenden Oozyten für diesen Unterschied zwischen den hCAT-Isoformen verantwortlich seien (Kavanaugh *et al.*, 1994). Diese Vermutung konnte durch Messungen des Membranpotentials nach einer 6h-Inkubation in verschiedenen L-Arginin-Konzentrationen in dieser Arbeit widerlegt werden. Das gemessene Membranpotential zwischen den hCAT-exprimierenden Oozyten war in den einzelnen Inkubationsbedingungen kaum zu unterscheiden (Tab. 10). Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei einer extrazellulären Konzentration von 10mM L-Arginin das Membranpotential nur bei hCAT-2A-exprimierenden Oozyten eine entscheidende Rolle für die Akkumulation spielt. Wurde das Membranpotential in 96mM K^+ -Puffer nahezu vollständig aufgehoben, war die Akkumulation von L-Arginin in hCAT-2A-injizierten Oozyten 40% verringert. Dagegen hatte das Membranpotential keinen Einfluss auf die Akkumulation von L-Arginin in hCAT-1- und -2B-exprimierenden Oozyten. Die Akkumulation von L-Arginin in hCAT-2A bzw. -2B-injizierten Oozyten in 96mM K^+ -Puffer war immer noch 6-fach bzw. 5-fach höher im Vergleich zu hCAT-1. Somit kann das Membranpotential nicht alleine für die unterschiedliche Akkumulation von BAS durch die einzelnen hCAT-Isoformen verantwortlich sein.

Man kann annehmen, dass hCAT-1 und -2B bei dieser hohen L-Arginin-Konzentration nicht in der Lage sind, höhere Mengen an Substrat zu akkumulieren, weil sie extra- wie intrazellulär gesättigt sind und daher unter diesen Bedingungen als reine Austauscher fungieren. Durch die Bestimmung des L-Arginin-Verteilungsvolumens konnte gezeigt

werden, dass nach der 6-stündigen Inkubation mit 10mM L-Arginin in Abwesenheit des Membranpotentials (in K^+ -Puffer) hCAT-1- bzw. hCAT-2B-exprimierende Oozyten nur 30% (3mM) bzw. 50% (5mM) der extrazellulären L-Arginin-Konzentration enthalten. Bei sättigenden Substratkonzentrationen ist der Transport dieser hCAT-Isoformen daher wahrscheinlich nicht vom Membranpotential abhängig. Dies wurde durch Bestimmung der Leitfähigkeit unter diesen Bedingungen bestätigt (s. Abb. 12 und Diskussion der Leitfähigkeit unter 6.1.2). hCAT-2A-exprimierende Oozyten akkumulieren unter diesen Bedingungen 65% (6,5mM) der extrazellulären L-Arginin-Konzentration. Diese Konzentration liegt im Bereich des K_M -Wertes von hCAT-2A. Unter nicht gesättigten Bedingungen kann das Membranpotential die Akkumulation von L-Arginin offensichtlich noch beeinflussen. Dass hCAT-1- und -2B-exprimierende Oozyten bei längeren Inkubationszeiten nicht größere Menge an L-Arginin akkumulieren können, wurde in HPLC-Messungen von BAS-beladenen Oozyten nach einer 6-stündigen Inkubation mit 10mM L-Arginin nachgewiesen (Closs *et al.*, 1997).

Die Langzeit-Aufnahmestudien haben weiterhin gezeigt, dass bei einer L-Arginin-Konzentration von 1mM und einem Membranpotential nahe 0mV in 96mM K^+ -Puffer eine symmetrische Bedingung gefunden worden ist, bei der die einzelnen hCAT-exprimierenden Oozyten die gleiche Menge an Substrat akkumulieren. Unter diesen Bedingungen konnte außerdem eine ausgeglichene intra- und extrazelluläre L-Arginin-Konzentration in allen hCAT-injizierten Oozyten erreicht werden. Um die Annahme zu bestätigen, dass unter symmetrischen Bedingungen der Influx und Efflux an L-Arginin für alle hCAT-Isoformen gleich sein müsste, wurden Influx- und Efflux-Kurven im Equilibrium-exchange bestimmt (nach Stein, 1990). Die ermittelten Kurven waren spiegelsymmetrisch, jedoch konnten die Oozyten beim Efflux eine Residualmenge an L-Arginin nicht abgeben und dadurch nicht vollständig entleert werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass diese nicht austauschbare Menge an radioaktivem L-Arginin metabolisiert wurde und dadurch für den Efflux nicht mehr zur Verfügung stand. Auch wenn durch diese nicht austauschbare Menge an radioaktivem L-Arginin der Efflux nicht exakt den Influx widerspiegelte, konnte gezeigt werden, dass unter equilibrierten Substratbedingungen der Transport durch die hCAT-Proteine symmetrisch ist. Da aber symmetrische AS-Konzentrationen unter physiologischen Bedingungen jedoch nicht die Regel, sondern eher die Ausnahme sind, erscheint der Transport von AS in den meisten Fällen asymmetrisch (Stein, 1990).

Zusammenfassend kann man sagen, dass hCAT-1 bei geringen extrazellulären Konzentrationen an BAS ($\leq 0,1$ mM) durch die hohe Transstimulierbarkeit und Affinität eher als hCAT-2A und -2B in der Lage ist, BAS in der Zelle anzureichern. Bei AS-Mangel wird

der Efflux an BAS durch die fehlende Transstimulation verhindert. hCAT-2B und vor allem hCAT-2A spielen erst bei höheren BAS-Konzentrationen ($> 1\text{mM}$) eine wichtige Rolle für die Akkumulation von BAS in der Zelle. Diese Ergebnisse bestätigen die Ansicht, dass unter physiologischen Bedingungen (Plasmakonzentration von BAS bei $0,2\text{mM}$) hCAT-1 die wichtigste Rolle für die Versorgung der meisten humanen Zellen mit BAS spielt (Closs, 2002; Verrey *et al.*, 2003). Wie gut und in welche Richtung die einzelnen hCAT-Proteine bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen und Membranpotentialen transportieren, hängt also von ihrer Affinität, Transportkapazität und von der Höhe der Transstimulation ab.

6.1.2 Durch L-Arginin induzierte Membranströme in hCATs

L-Arginin-induzierte Maximalströme in hCATs

Mit Hilfe der two-electrode voltage clamp (TEVC)-Methode wurden die L-Arginin-induzierten Maximalströme von hCAT-1, -2A und -2B bei einem Haltepotential von -60mV unter gesättigten Bedingungen (1mM bei hCAT-1 und -2B; 10mM bei hCAT-2A) bestimmt. Hierbei unterschieden sich die gemessenen L-Arginin-Ströme zwischen den untersuchten hCAT-Isoformen deutlich in ihrer Ausprägung, wobei die Reihenfolge der elektrophysiologisch gemessenen maximalen Transportaktivität für die einzelnen hCAT-Isoformen mit den zuvor in radioaktiven Aufnahmen bestimmten V_{max} -Werten übereinstimmen ($\text{hCAT-1} \ll \text{hCAT-2B} < \text{hCAT-2A}$) (Closs *et al.*, 1997). Quantitativ können die elektrophysiologisch ermittelten Werte der einzelnen hCAT-Isoformen nach Berechnung von V_{max} in mol/s mit den von Closs *et al.* beschriebenen V_{max} -Werten verglichen werden. Die V_{max} -Werte aus den elektrophysiologischen Versuchen wurden wie folgt berechnet:

Aus dem L-Arginin-induzierten Strom (I_{Arg}), der die Zellmembran bei einem voltage clamp-Versuch passiert, kann mit folgender Formel die aufgenommene Menge an L-Arginin berechnet werden:

$$(1) \quad n(\text{mol}) = \left| \int_0^t \frac{I_{\text{Arg}}}{e_0 z N_A} dt \right|$$

I_{Arg} : L-Arg-induzierter Strom (A)

t: Zeit (s)

e_0 : elektrische Elementarladung (C)

z: Wertigkeit des Ions

N_A : Avogadrozahl (mol^{-1})

Nach Michaelis-Menten wird I_{Arg} wie folgt definiert, wobei $U_m G_{max}$ hier I_{max} (V_{max}) entspricht:

$$(2) \quad I_{Arg}(A) = U_m G_{max} \frac{[Arg]}{[Arg] + K_M}$$

G_{max} : maximale Leitfähigkeit des Transporters in gesättigtem Zustand (S)

U_m : Membranpotential (V)

$[Arg]$: Konzentration von L-Arg (mol/l)

K_M : Michaelis-Menten-Konstante (mol/l)

I_{Arg} aus Formel 2 in Formel 1 eingesetzt und nach t differenziert ergibt die maximale Transportgeschwindigkeit (V_{max}), mit der L-Arginin über die Zellmembran transportiert wird.

$$V_{max} (mol / s) = \frac{d}{dt} n = \left| \frac{U_m G_{max} [Arg]}{([Arg] + K_M) e_0 z N_A} \right|$$

In Tab. 17 sind die berechneten V_{max} -Werte aus den elektrophysiologischen Experimenten im Vergleich zu den von Habermeier *et al.* und Closs *et al.* publizierten V_{max} -Werten der drei hCAT-Isoformen zusammengefasst (Habermeier *et al.*, 2003; Closs *et al.*, 1997). Die V_{max} -Werte aus den elektrophysiologischen Experimenten wurden für einen besseren Vergleich für ein Membranpotential von $-30mV$ ausgerechnet. Für den hCAT-vermittelten L-Arginin-Strom divergiert V_{max} elektrophysiologisch und radioaktiv bestimmt um den Faktor 2, wobei die radioaktiven Werte höher liegen. Dieses Ergebnis spricht für einen Gegentransport an positiver Ladung durch die hCAT-Isoformen während der Bestimmung des L-Arginin-Stromes. Höchstwahrscheinlich werden hierbei BAS gegen L-Arginin ausgetauscht, jedoch wäre der Austausch mit einer anderen positiven Ladung (K^+ -Ionen ?, s. u.) nicht ganz auszuschließen. Da in den radioaktiven Aufnahmeversuchen Initialfluxe gemessen werden, d. h. Fluxe im linearen Anstieg der Aufnahme, spielt der Gegentransport an L-Arginin keine Rolle. Elektrophysiologisch wird dagegen der Nettostrom gemessen. Hierdurch wird elektrophysiologisch der L-Arginin-Influx durch hCAT-Isoformen um fast 50% unterschätzt. Um den Netto-Influx von L-Arginin radioaktiv messen zu können, müsste in Aufnahmeversuchen durch gleichzeitige Messung des Effluxes mit einem zweiten radioisotopmarkierten L-Arginin (z.B. L- $[^{14}C]$ Arginin) der Gegentransport berücksichtigt werden. Um eine ähnliche intra- und extrazelluläre L-Arginin-Konzentration zu erreichen, müssten die Oozyten davor in K^+ -Puffer mit einer festgelegten L-Arginin-Konzentration equilibriert werden (siehe Equilibrium-exchange-Versuche).

Vergleicht man nun die elektrophysiologisch ermittelten V_{\max} -Werte in BAS-depletierten und in BAS-beladenen Oozyten, so fällt auf, dass in BAS-depletierten Oozyten die Werte höher lagen. Eine wahrscheinliche Erklärung hierfür ist der geringere Efflux an BAS unter diesen Bedingungen. Durch einen geringeren Efflux an BAS ist der elektrophysiologisch gemessene Nettotransport an L-Arginin in BAS-depletierten Oozyten höher, als in BAS-beladenen Oozyten, in denen der Nettostrom an L-Arginin durch Efflux vermindert wäre. Jedoch ist die Möglichkeit nicht ganz auszuschließen, dass in BAS-depletierten Oozyten eine zusätzliche Leitfähigkeit vorhanden ist. Es wäre eigentlich zu erwarten, dass V_{\max} bei den transstimulierbaren Isoformen hCAT-1 und -2B in depletierten Oozyten geringer sein müsste als in BAS-beladenen (Closs *et al.*, 1997). Da dies in den elektrophysiologischen Versuchen nicht der Fall ist, wäre es möglich, dass ein unspezifischer Strom (Leck-Strom), der höher als der BAS-Strom der CAT-Proteine ist, durch sättigende BAS-Bedingung auf beiden Seiten der Transporter inhibiert wird. Dadurch könnte erklärt werden, warum in BAS-beladenen Oozyten der L-Arginin-Strom kleiner ist als in BAS-depletierten Oozyten. Die gefundene Leitfähigkeit für K^+ -Ionen in den hCATs (s. auch 6.1.3) würde diese Vermutung stützen. Jedoch bedingt dies auch, dass der Ionen- und der Substratstrom zwei unterschiedliche Zustände (Transport- und Kanalmodus) der hCAT-Proteine darstellen.

Tabelle 17: Maximale Transportgeschwindigkeit (V_{\max}) für L-Arginin aus elektrophysiologischen Experimenten

Transporter	(V_{\max}) (nmol L-Arg / Oozyte / h)		(V_{\max}) (nmol L-Arg / Oozyte / h)	
	TEVC bei -30mV	L-[3 H]Arg- Aufnahme	TEVC bei -60mV	
	BAS-beladen	BAS-beladen	BAS-depletiert	BAS-beladen
hCAT-1	0,5	$1,8 \pm 0,19^{\ddagger}$	1,4	1,0
hCAT-2A	2,1	$5,1 \pm 0,88^{\ddagger}$	7,5	4,2
hCAT-2B	1,2	$2,6 \pm 1,2^*$	5,6	2,4

Für einen besseren Vergleich mit den publizierten V_{\max} -Werten aus radioaktiven Aufnahmen wurden die elektrophysiologisch ermittelten V_{\max} -Werte links in der Tabelle für ein Membranpotential von -30mV berechnet. Die rechte Seite der Tabelle zeigt den Vergleich der berechneten V_{\max} -Werte bei -60mV für hCAT-injizierte Oozyten, die in Oozyten-Kulturmedium (BAS-beladen) bzw. in ND96-Puffer (BAS-depletiert) inkubiert wurden. Für die V_{\max} -Berechnung wurden die Leitfähigkeiten aus Tab. 11 berücksichtigt. Die Leitfähigkeit der H_2O -injizierten Oozyten (0,9 μ S) wurde jeweils abgezogen. V_{\max} -Werte aus radioaktiven Aufnahmen aus (\ddagger) Habermeier *et al.*, 2003 und (*) Closs *et al.*, 1997 (Mittelwert).

Leitfähigkeit der einzelnen hCAT-Isoformen in Abhängigkeit von der L-Arginin-Konzentration

Neben den Maximalströmen bei -60mV wurden für die hCAT-exprimierenden Oozyten auch die maximalen Ströme in Abhängigkeit des Membranpotentials bestimmt. Durch Auftragung der gemessenen Ströme gegen die Spannung wurden Strom-Spannungs-Beziehungen (I/V-Kurven) ermittelt. Durch lineare Regression wurde die Steigung der I/V-Kurven bestimmt, die die Leitfähigkeit der einzelnen hCAT-exprimierenden Oozyten angibt, entsprechend $G = \delta I / \delta E$, wobei δI für die Membranstromdifferenz und δE für die Membranpotentialdifferenz steht.

Eine entscheidende neue Erkenntnis der vorliegenden Arbeit ist, dass die Leitfähigkeit der hCAT-Isoformen für L-Arginin nicht immer durch eine Zugabe von extrazellulärem L-Arginin zunimmt. Die intrazelluläre Konzentration an BAS spielt hierbei eine entscheidende Rolle. In BAS-beladenen Oozyten kam es bei hCAT-1 und -2B zu keiner und für hCAT-2A nur zu einer schwachen Zunahme der Leitfähigkeit. Dabei wurde das Umkehrpotential (E_R , Potential, bei dem Influx und Efflux gleich sind) zu positiveren Membranpotentialwerten verschoben. Dagegen führte die Zugabe sättigender L-Arginin-Konzentrationen in depletierten, hCAT-injizierten Oozyten immer zu einer Zunahme der Leitfähigkeit. Nawrath *et al.* untersuchten zuvor die Leitfähigkeiten von hCAT-2A und -2B nur in BAS-beladenen Oozyten und postulierten durch die fehlende Zunahme der Leitfähigkeit nach L-Arginin-Zugabe in hCAT-2B-exprimierenden Oozyten für hCAT-2B keinen Membranpotential-abhängigen L-Arginin-Transport (Nawrath *et al.*, 2000). Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen jedoch eine klare Abhängigkeit aller hCAT-Isoformen vom Membranpotential, die jedoch bei den transstimulierbaren Isoformen hCAT-1 und -2B im höheren Maße von der intrazellulären Konzentration an BAS abhängig ist. Durch sättigende intrazelluläre Konzentrationen an BAS wird die Membranpotential-Abhängigkeit dieser hCAT-Isoformen sichtbar reduziert.

Keine Zunahme der Leitfähigkeit, sondern wiederum nur eine Verschiebung des E_R wurde in dieser Arbeit auch durch die additive Zugabe von steigenden L-Arginin-Konzentrationen in hCAT-1- und -2B-exprimierenden Oozyten gezeigt. Es sei bemerkt, dass diese Abnahme der Leitfähigkeit sowohl in BAS-depletierten als auch in BAS-beladenen Oozyten auftrat. Außerdem konnte an ein und derselben BAS-depletierten hCAT-2B-exprimierenden Oozyte Folgendes beobachtet werden: wurde zweimal hintereinander L-Arginin zugegeben, so konnte bei der ersten Zugabe eine Leitfähigkeitszunahme beobachtet werden, jedoch nicht nach dem Spülen und der erneuten Zugabe von L-Arginin. Auch an

einer hCAT-2A-exprimierenden Oozyte konnte durch die zeitlich versetzte Bestimmung von I/V-Kurven nach der L-Arginin-Zugabe beobachtet werden, dass die Leitfähigkeit über einen Zeitraum von bis zu 4h stetig abnahm (Nawrath, persönliche Mitteilung). Es scheint, dass die Leitfähigkeitszunahme nur durch die akute Zugabe von L-Arginin in BAS-depletierten Oozyten zustande kommt. Diese Beobachtungen sprechen für eine Abnahme der Leitfähigkeit durch die Zunahme der intrazellulären L-Arginin-Konzentration. Bei hCAT-1 und -2B reichen geringe intrazelluläre Konzentrationen, um die Leitfähigkeit zu vermindern. Bei hCAT-2A müssen dagegen über eine längere Zeit größere Mengen an L-Arginin aufgenommen werden, um einen ähnlichen Effekt beobachten zu können.

Diese durch die L-Arginin-Konzentration bedingte Veränderung der Leitfähigkeit könnte die Ergebnisse bei der Bestimmung der Transportparameter der hCAT-Proteine verzerren, da die genaue intrazelluläre Konzentration in den Zellen nicht kontrollierbar ist. Daher sollten K_M - und V_{max} -Bestimmungen unter Kontrolle der intrazellulären BAS-Konzentration erfolgen. Hierfür bietet sich die cut-open voltage clamp-Methode an, die jedoch nicht einfach durchzuführen ist (Stefani und Benzanilla, 1998; Kaneko *et al.*, 1998). In dieser Arbeit wurde nun für den hCAT-vermittelten L-Arginin-Transport die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) und die maximale Leitfähigkeit (G_{max}) im Equilibrium-exchange bestimmt. Bei dieser Methode wird die intrazelluläre Substrat-Konzentration durch Anpassung an die extrazellulär angebotene Substrat-Konzentration eingestellt. hCAT-injizierte Oozyten wurden hierfür in K^+ -Puffer mit verschiedenen L-Arginin-Konzentrationen über 6h inkubiert. Anschließend wurden die Oozyten in den respektiven Inkubationslösungen bei 0mV geklemmt (ähnlich dem Membranpotential der Oozyten im Inkubationsmedium, s. a. Tab. 10). Da im Substrat-Equilibrium keine Ströme erkennbar sind, wurden die Membranströme durch Veränderung der Spannung induziert. Die hieraus bestimmten I/V-Kurven zeigten einen symmetrischen Influx und Efflux, was eine nahezu symmetrische L-Arginin-Konzentration widerspiegelt. Die aus den I/V-Kurven berechneten Leitfähigkeiten nahmen konzentrationsabhängig zu. Die Leitfähigkeiten wurden gegen die respektiven L-Arginin-Konzentrationen aufgetragen und für die einzelnen hCAT-Isoformen Konzentrations-Wirkungs-Kurven nach Michaelis-Menten berechnet. Die hierdurch ermittelten K_M - und G_{max} -Werte spiegeln die Transportparameter im Equilibrium-exchange (K_M^{ee} und G_{max}^{ee} , nach Stein, 1990). Im Unterschied zu den Maximalströmen waren die G_{max}^{ee} -Werte unter diesen Bedingungen für hCAT-1 und -2B höher als für hCAT-2A. Im Equilibrium-exchange also besitzen die beiden transstimulierbaren Transporter hCAT-1 und -2B eine höhere Leitfähigkeit für L-Arginin als hCAT-2A. Jedoch könnte es auch sein, dass

bei den Messungen mit 10mM L-Arginin hCAT-2A intrazellulär nicht gesättigt war. Die berechnete intrazelluläre L-Arginin-Konzentration in K^+ -Puffer betrug bei den Langzeitaufnahmen nur 6,5mM (s. o). Ob hCAT-2A bei höheren L-Arginin-Konzentrationen eine zu hCAT-1 und -2B vergleichbare G_{max} hätte, müsste in weiteren Versuchen mit höheren L-Arginin-Konzentrationen überprüft werden.

6.1.3 Substratunabhängige Ströme (Leck-Ströme)

Nawrath *et al.* beobachteten die Anwesenheit von unspezifische Strömen (Leck-Strömen) für hCAT-2A und -2B in BAS-freiem Medium (Nawrath *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass auch hCAT-1-injizierte Oozyten eine höhere Leitfähigkeit als H_2O -injizierte Kontroll-Oozyten in BAS-freiem Medium zeigten. Die Ausprägung der Leck-Ströme bei hCAT-1 war aber deutlich schwächer als bei den beiden anderen hCAT-Isoformen. Ionen-Austauschversuche mit hCAT-2B-injizierten Oozyten ergaben eine erhöhte Leitfähigkeit für K^+ -Ionen. Die Zugabe der K^+ -Kanal-Inhibitoren Ba_2Cl und Tetraethylammoniumchlorid (TEACl) konnte den K^+ -Strom in hCAT-2B-exprimierenden Oozyten nicht reduzieren, was eine hCAT-induzierte Expression von K^+ -Kanälen ausschließen lässt. Nawrath *et al.* zeigten, dass der L-Arginin-induzierte Strom in K^+ -Puffer unverändert war (Nawrath *et al.*, 2000). Somit scheinen K^+ -Ionen den Transport von BAS nicht zu beeinträchtigen.

Auch für hCAT-3 sind solche Leck-Ströme beobachtet worden, wobei hier hauptsächlich Na^+ -Ionen für die Leck-Ströme verantwortlich sind (Nawrath, persönliche Mitteilung). Daher kann man die Anwesenheit von Leck-Strömen in hCAT-Proteinen als generelles Phänomen betrachten. Das bedeutet, dass die hCAT-Proteine neben ihrer Transporterfunktion für BAS in Abwesenheit von Substrat auch eine Kanalfunktion besitzen. Diese Kanalfunktion scheint mit der Funktionsfähigkeit der Transporter zu korrelieren, da der nicht aktive Transporter SLC7A4 (hCAT-4) keine Leck-Ströme zeigte (eigene Beobachtungen und Gilles, persönliche Mitteilung). Weiterhin scheint der Ionenstrom durch die Zugabe von BAS inhibierbar zu sein, wie durch die Hemmung der $^{86}Rb^+$ -Aufnahme (als Marker für den K^+ -Strom) in hCAT-2B-exprimierenden Oozyten nach L-Arginin-Zugabe gezeigt wurde. Diese Hemmung lässt vermuten, dass der BAS-Strom und der K^+ -Strom durch die gleiche Pore vermittelt werden. Auch die höhere Leitfähigkeit der hCAT-injizierten Oozyten in BAS-freiem Medium im Vergleich zu der Leitfähigkeit in Anwesenheit von BAS weist auf eine mögliche Hemmung des K^+ -Stromes durch Substrat. Die hCAT-Proteine scheinen demnach in zwei Funktionsmodi zu arbeiten: Kanal- und Transportermodus. Die

Abnahme der hCAT-1 und -2B Leitfähigkeit nach Zugabe von steigenden Konzentrationen an L-Arginin könnte ein Hinweis für einen Übergang vom Kanal- in den Transportmodus der CAT-Proteine sein. Dies würde aber auch bedeuten, dass die CAT-Proteine eine höhere Leitfähigkeit im Kanal- als im Transportmodus besitzen. Die höhere Leitfähigkeit der hCAT-Isoformen in BAS-depletierten Oozyten würde diese Vermutung stützen.

In den Austauschversuchen mit monovalenten Kationen an hCAT-2B-injizierten Oozyten konnte weiterhin eine höhere Leitfähigkeit für alle gemessenen Kationen im Vergleich zu den H₂O-injizierten Kontroll-Oozyten beobachtet werden. Auch für die Kontrolllösung Tetramethylammoniumchlorid (TMACl) wurde eine ähnlich erhöhte Leitfähigkeit beobachtet. Welche Ionen hierfür verantwortlich sind ist noch unklar. Weitere Untersuchungen, in denen die Ströme von weiteren Ionen untersucht werden sollten sind notwendig, um diese Frage klären zu können.

Mögliche Bedeutung der Ionenströme für den hCAT-vermittelten BAS-Transport

Die Bedeutung der Leck-Stöme für den BAS-Transport durch die hCAT-Proteine ist noch ungeklärt, jedoch scheint die Anwesenheit von Leck-Strömen ein weit verbreitetes Phänomen in vielen Transportern zu sein. Substratunabhängige Ströme sind bei einer Reihe anderer AS-Transportern beobachtet worden, so z.B. für den Na⁺-unabhängigen 4F2hc-assoziierten Transporter LAT1 (4F2hc/LAT1, Wagner *et al.*, 2000) oder für die Na⁺-abhängigen Transporter ASCT1-2 (Zerangue und Kavanaugh, 1996; Broer *et al.*, 2000) und KAAT1 (Bossi *et al.*, 1999a; Bossi *et al.*, 1999b). Für den 4F2hc/LAT1-Transporter wurde die Anwesenheit dieser unspezifischen Ströme nur nach Bildung der Disulfidbrücke zwischen den Heteromeren 4F2hc und LAT-1 in *X. laevis*-Oozyten gezeigt. Wurden die für die Disulfidbrückenbildung nötigen Cysteine mutiert, wurde der unspezifische Kationenstrom fast vollständig aufgehoben ohne den Substrattransport zu beeinflussen (Wagner *et al.*, 2000). Diese Untersuchung zeigt, dass beim AS-Transporter LAT-1 eine Kanalfunktion nur im Zusammenhang mit dem akzessorischen Protein 4F2hc auftritt. Auch bei den hCATs könnte es möglich sein, dass die beobachteten Leck-Ströme nur in Verbindung mit einem noch unbekanntem hCAT-assoziierten Protein auftreten. Jedoch sind bisher noch keine Partnerproteine für die CATs bekannt.

Im Gegensatz zum ionenabhängigen AS-Transport beispielweise bei den AS-Transportern KAAT1, ASCT1 oder auch bei den Glutamat-Transportern EAAT1- 4 sind die Ionenströme bei den hCATs nicht notwendig für den Transport von BAS. Aus diesem Grund muss den Leck-Strömen eine andere Rolle zukommen. Die Kanalfunktion der hCAT-Proteine

könnte ein Relikt eines vormals sekundär aktiven Transporters sein, bei dem der AS-Transport an Na^+ - und K^+ -Gradienten gekoppelt war. Die vorhandene Abhängigkeit der hCAT-Proteine vom Membranpotential und die dadurch bedingte Akkumulation von BAS gegen den Gradienten zeigt die Abhängigkeit der CAT-Proteine von dem Na^+ und K^+ -Gradienten, ohne jedoch den BAS-Transport direkt an diese Ionen zu koppeln. Dies erklärt jedoch nicht die physiologische Bedeutung der Leck-Ströme.

Für K^+ -Ionen gibt es Hinweise, dass sie für die Transstimulation eine Rolle spielen könnten. In einer Studie von Zharikov und Block an isolierten Membranvesikeln von endothelialen Lungenarterien-Zellen wurde gezeigt, dass eine transstimulierbare L-Arginin-Aufnahme nur in Anwesenheit von K^+ -Ionen an der *trans*-Seite der Membran möglich war (Zharikov und Block, 1997). Wurde K^+ -Puffer auf der *trans*-Seite durch Na^+ -Puffer ersetzt, so wurde keine *trans*-Substrat-abhängige Aufnahme mehr beobachtet. Der Mechanismus, wie K^+ -Ionen die Transstimulation beeinflussen, ist noch unklar. Es wäre denkbar, dass K^+ -Ionen die Bindungsaffinität der CAT-Proteine für L-Arginin an einer modulatorischen Stelle im Protein erhöhen oder selbst die Reorientierung des Carriers von der *trans*- zur *cis*-Seite der Membran fördern. Da die K^+ -Konzentration extrazellulär gering ist, würde eine von der K^+ -Konzentration abhängige Transstimulation - zusätzlich zur Substrat-Transstimulation (s. o.) - eine weitere Schutzbarriere bilden, die die Zellen in Zeiten von AS-Mangel vor der Depletion des intrazellulären Pools an BAS bewahrt. Eine ähnliche modulatorische Rolle von K^+ -Ionen wird von Adams und DeFelice für den Serotonin-Transporter hSERT vorgeschlagen (Adams und DeFelice, 2003).

Weiterhin ist für einige Transporter beschrieben worden, dass die Substratspezifität sich abhängig von den Kationen im Medium ändert. Für den AS-Transporter CAATCH1 (cation-anion-activated amino acid transporter/channel) ist bekannt, dass in Anwesenheit von K^+ -Ionen bevorzugt Threonin und in der Anwesenheit von Na^+ -Ionen bevorzugt Prolin transportiert wird (Feldman *et al.* 2000). Eine mögliche Regulation der Substratspezifität der CAT-Proteine durch unterschiedliche Ionen ist bisher noch nicht untersucht worden.

6.1.4 Schlussfolgerungen aus den elektrophysiologischen Untersuchungen

Aus den gezeigten elektrophysiologischen Untersuchungen der hCAT-exprimierenden Oozyten kann man folgende Schlüsse ziehen:

1. Die Bildung eines BAS-Potentiales in Oozyten kann durch die Expression von hCAT-2A und -2B, jedoch nicht durch die Expression von hCAT-1 hervorgerufen werden. Hierfür dürfte die hohe Transstimulierbarkeit des hCAT-1-Proteins verantwortlich sein.
2. Das Membranpotential einer Zelle beeinflusst die Akkumulation von BAS durch die hCAT-Proteine. Jedoch ist bei sehr hohen extrazellulären BAS-Konzentrationen die Akkumulation durch hCAT-1 und -2B im Gegensatz zu hCAT-2A nicht vom Membranpotential abhängig, da hierbei der Efflux limitierend wirkt.
3. Die L-Arginin-induzierten Maximalströme (V_{\max}) der hCAT-Proteine unterscheiden sich nicht von den zuvor aus radioaktiven Aufnahmen beschriebenen V_{\max} -Werten (hCAT-1 \ll hCAT-2B $<$ hCAT-2A). Jedoch muß von einem Gegentransport an positiver Ladung (Substrat) ausgegangen werden, da die elektrophysiologisch ermittelten V_{\max} -Werte nur halb so groß waren, wie die V_{\max} -Werte aus radioaktiven Aufnahmen.
4. Die untersuchten hCAT-Isoformen zeigen zwei unterschiedliche Leitfähigkeitszustände für BAS, die von der intrazellulären BAS-Konzentration abhängig sind. Eine Leitfähigkeitszunahme durch Zugabe von extrazellulärem L-Arginin konnte bei allen hCAT-Isoformen in depletierten Oozyten beobachtet werden. In BAS-beladenen Oozyten führt die Zugabe von L-Arginin dagegen zu keiner (hCAT-1 und hCAT-2B) bzw. zu einer geringen (hCAT-2A) Zunahme der Leitfähigkeit der Transporter.
5. Im Equilibrium-exchange nimmt die durch Spannungsänderung hervorgerufene Leitfähigkeit der drei untersuchten hCAT-Isoformen in Abhängigkeit von der L-Arginin-Konzentration zu (jeweils für hCAT-1, -2A bzw. -2B: K_M^{ee} (in mM) $0,16 \pm 0,07$, $1,1 \pm 0,5$ bzw. $0,12 \pm 0,05$; G_{\max}^{ee} (in μS) $8,4 \pm 1,5$, $2,8 \pm 0,2$ bzw. $12,2 \pm 4,4$)
6. Alle untersuchten hCAT-Isoformen zeigen unspezifische Ionenströme (Leck-Ströme). Die „Kanalfunktion“ der Transporter scheint mit ihrer Transportaktivität zu korrelieren. Die physiologische Bedeutung des „Kanals“ ist noch ungeklärt.

6.2 Mechanismus der PKC-vermittelten Regulation von hCAT-1

6.2.1 PKC-vermittelte Reduktion der hCAT-1-Expression und -Transportaktivität

In einer vorhergehenden Untersuchung unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die Transportaktivität von hCAT-1 sowohl in *X. laevis*-Oozyten, als auch in humanen endothelialen EA.hy 926-Zellen nach Aktivierung der PKC durch Phorbol ester reduziert wird (Gräf *et al.*, 2001). Die PKC-Aktivierung führte zu keiner Änderung der Gesamtprotein-Expression, während die hCAT-1-mRNA-Expression sogar erhöht war. Das Ziel im zweiten Abschnitt dieser Arbeit war, den Mechanismus der PKC-vermittelten Reduktion der Transportaktivität von hCAT-1 aufzuklären.

Um festzustellen, ob die PKC-vermittelte Inaktivierung des Transporters auf einer Verminderung seiner Expression an der Zelloberfläche beruht, wurde das hCAT-1-EGFP-Konstrukt in Oozyten exprimiert und in U373MG Glioblastom-Zellen stabil transfiziert. Dadurch war es möglich, die Expression von hCAT-1 an der Zelloberfläche mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zu visualisieren. Die Behandlung dieser Zellen mit dem PKC-Aktivator Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) zeigte eine deutliche Reduktion der hCAT-1-Expression an der Zelloberfläche. Durch Biotinylierung der Zelloberflächenproteine und anschließende Western-Blot-Analysen konnte bestätigt werden, dass die Expression des Transporters an der Zelloberfläche durch die PMA-Behandlung signifikant reduziert wurde. Sowohl in Oozyten, als auch in U373MG-Zellen wurde die Reduktion der Zelloberflächenexpression von hCAT-1 von einer Verminderung der Transportaktivität begleitet. Durch einen weiteren PKC-Aktivator, den Phorbol ester Phorbol-12,13-dibutyrat (PDBu), jedoch nicht durch den inaktiven Phorbol ester 4 α -Phorbol-12,13-didecanoat (4 α -PDD) wurde eine ähnliche Reduktion der Transportaktivität beobachtet. Damit konnte davon ausgegangen werden, dass die beobachtete Reduktion der Transportaktivität nicht auf einem unspezifischen Phorbol ester-Effekt beruht. Weiterhin wurde durch eine Vorbehandlung der Zellen mit dem PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid I (BIM I) sowohl die PMA-vermittelte Reduktion der Zelloberflächenexpression von hCAT-1, als auch die Inhibition des L-Arginin-Transportes verhindert. Hiermit wurde bestätigt, dass die beobachtete Reduktion der Zelloberflächenexpression und der Transportaktivität des hCAT-1-Proteins in *X. laevis*-Oozyten und U373MG-Zellen PKC vermittelt waren.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit dem endogen in humanen DLD-1 Kolonkarzinom-Zellen exprimierten hCAT-1 erzielt. Diese Zelllinie wurde aus einer Reihe von neun Zelllinien ausgewählt, da für sie die höchste Expression an hCAT-1-mRNA

nachgewiesen wurde. Zwar wurde im geringeren Maße auch hCAT-2B mRNA nachgewiesen, jedoch war die Expression von hCAT-1-mRNA in diesen Zellen überwiegend. Der Transport von L-Arginin wurde in diesen Zellen in Anwesenheit von 2mM L-Leucin gemessen, um den System γ^+ -vermittelten Transport (hCAT-1-vermittelt) isoliert untersuchen zu können. Dadurch werden alle anderen Transportsysteme für BAS inhibiert. Die Ergebnisse in den DLD-1-Zellen zeigen, dass sowohl die Inhibition des L-Arginin-Transportes als auch die Reduktion der Zelloberflächenexpression des endogen exprimierten hCAT-1 in ähnlichem Ausmaß erfolgt, wie beim überexprimierten Fusionsprotein. Die Fusion des hCAT-1-Proteins mit dem EGFP-Protein scheint also die Wirkung der PKC auf das hCAT-1-Protein nicht zu verändern.

Die Ergebnisse dieser Arbeit erklären die PKC-vermittelte Inhibition der hCAT-1-Transportaktivität durch eine Verminderung der Zelloberflächenexpression des Transporters. Ob es sich hierbei um eine Internalisierung oder um einen verminderten Einbau des Transporters in die Plasmamembran handelt, müsste in weiteren Versuchen durch Einsatz spezifischer Inhibitoren für Exozytose und Endozytose bzw. für vesikulären Transport geklärt werden.

Übereinstimmend mit den Daten dieser Arbeit zeigten Bode *et al.* eine signifikante Erniedrigung der System γ^+ -Transportaktivität in humanen Hepatomzellen nach PMA-Behandlung (Bode *et al.*, 1998). Weiterhin wurde in einer neueren Studie an Lungenarterien-Endothelzellen ebenso eine Reduktion der CAT-1-Transportaktivität nach PKC-Aktivierung gezeigt und eine Beteiligung der klassischen PKC-Isoformen bei der Reduktion der CAT-1-Transportaktivität nachgewiesen (Krotova *et al.*, 2003). Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um PKC α , deren Translokation (und damit Aktivierung) in die Plasmamembran durch PMA gezeigt wurde. Jedoch konnten Krotova *et al.* auch eine Erhöhung der hCAT-1-Transportaktivität bei längeren Inkubationszeiten (≥ 4 h) der Zellen mit PMA beobachten. Auch von anderen Arbeitsgruppen wurde eine Erhöhung der System γ^+ -Transportaktivität nach PKC-Aktivierung festgestellt. In PMA-behandelten humanen Umbilikalvenen Endothelzellen (HUVEC) wurde ein Anstieg der System γ^+ -Transportaktivität um das 5-fache beobachtet (Pan *et al.*, 1995). Auch in intestinalen Caco-2-Epithelzellen wurde ein Anstieg der L-Arginin-Aufnahme nach PMA-Behandlung (≥ 3 h) beobachtet (Pan und Stevens, 1995; Pan *et al.*, 2002). Weiterhin wurde nach Behandlung von Peritoneal-makrophagen mit PDBu (nach 4 bis 6h) eine 5 bis 6-fach gesteigerte System γ^+ -Aktivität gezeigt (Hortelano *et al.*, 1993).

Diese unterschiedlichen Effekte der PKC auf den System y^+ -vermittelten L-Arginin-Transport könnten zelllinienspezifisch sein oder auf der Expression von verschiedenen hCAT-Isoformen in den einzelnen Zelllinien beruhen. Um diesen Fragen nachzugehen, wurden in der vorliegenden Arbeit der L-Arginin-Transport in unterschiedlichen humanen Zelllinien nach PMA-Behandlung bestimmt und mit Hilfe der Verdauungsschutzanalyse die Expression der einzelnen hCAT-Isoformen in den Zelllinien bestimmt. In allen untersuchten Zelllinien wurde eine Reduktion sowohl des Gesamttransportes, als auch des System y^+ -vermittelten Transportes durch die PMA-Behandlung beobachtet. Weiterhin konnte mit diesen Ergebnissen gezeigt werden, dass der PKC-Effekt auch in Zelllinien mit überwiegender Expression anderer hCAT-Isoformen (A549/8, SK-N-MC und A673) ähnlich war. Es ist somit unwahrscheinlich, dass eine Erhöhung der System y^+ -Aktivität auf einer unterschiedlichen Wirkung der PKC auf die einzelnen hCAT-Isoformen beruht. Dies bestätigen noch nicht publizierte Untersuchungen in unserem Labor, die gezeigt haben, dass die Transportaktivitäten von hCAT-2A, -2B und -3 in *X. laevis*-Oozyten und von hCAT-3 auch in U373MG-Zellen durch PKC-Aktivierung reduziert werden. Die in anderen Arbeiten gezeigte Erhöhung der L-Arginin-Transportaktivität durch die PKC muss daher spezifisch für die dort untersuchten Zelllinien sein. Womöglich beruhen diese Effekte auf der längeren Inkubation der Zellen mit den PKC-aktivierenden Phorbolestern, da in diesen Untersuchungen Inkubationszeiten von ≥ 3 h gewählt wurden. Gräf *et al.* zeigten auch nach einer 15h-Inkubation von EA.hy 926-Zellen mit PMA eine moderate Erhöhung (maximal 1,6-fache) der hCAT-1-Proteinexpression in Gesamtlisaten. Allerdings war die Transportaktivität nicht erhöht (Gräf *et al.*, 2001). Da längere Inkubationen mit PMA in U373MG-Zellen und Oozyten durch morphologische Veränderungen der Zellen nicht möglich waren, müsste in weiteren Untersuchungen mit anderen Zelllinien und unterschiedlichen PMA-Inkubationszeiten diese Frage geklärt werden.

6.2.2 Direkte oder indirekte PKC-vermittelte Phosphorylierung von hCAT-1 ?

In dieser Arbeit wurde weiterhin der Frage nachgegangen, ob die PKC-Wirkung auf die hCAT-1-Transportaktivität durch eine direkte oder indirekte Phosphorylierung des hCAT-1-Proteins zustandekommt. Hierfür wurden die putativen PKC-Erkennungssequenzen am hCAT-1-Protein durch einen Serin- zu Alanin-Austausch an den Aminosäurepositionen 476, 482 und 557 entfernt. Von der hCAT-1-Mutante (hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷) wurden Fusionskonstrukte mit dem EGFP-Protein hergestellt. Nach Transfektion des hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP-Konstruktes in U373MG-Zellen wurde wie zuvor beim hCAT-1-Wildtyp

die PKC-Wirkung auf die Zelloberflächenexpression und die Transportaktivität des hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP analysiert. Durch konfokale Mikroskopie und Western-Blot-Analysen von biotinylierten Zelloberflächenproteinen wurde gezeigt, dass die Expression des mutierten Transporters an der Zelloberfläche durch die PMA-Behandlung auf ähnlicher Weise reduziert wurde wie beim Wildtyp. Auch die Transportaktivität von hCAT-1 S/A⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷.EGFP in U373 MG-Zellen und in *X. laevis*-Oozyten wurde ähnlich wie beim Wildtyp reduziert. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass der gezeigte Effekt der PKC auf die hCAT-1-Transportaktivität über einen indirekten Mechanismus erfolgt. Jedoch kann die Möglichkeit nicht außer Acht gelassen werden, dass eine direkte Phosphorylierung des hCAT-1-Proteins durch die PKC an einer anderen Stelle des Proteins, als an den Konsensussequenzen erfolgen kann.

Die Frage, ob die PKC direkt oder indirekt die Transportaktivität eines Transporters reguliert, ist auch für andere Transporter noch nicht ganz geklärt worden. Für den hochaffinen Glutamattransporter GLAST-1 zeigten Conradt und Stoffel, dass die Transportaktivität in GLAST-1-exprimierenden Oozyten oder auch in mit GLAST-1-cDNA transfizierten HEK 293-Zellen nach PMA-Behandlung deutlich erniedrigt ist (Conradt und Stoffel, 1997). Auch hier war die Mutagenese aller in Frage kommender PKC-Erkennungsstellen ohne Auswirkung auf die Inhibition der Transportaktivität durch den aktiven Phorbolester PMA. Das mutierte GLAST-1-Protein wurde wie das Wildtyp-Protein *in vitro* phosphoryliert. Die Autoren schließen, dass eine Phosphorylierung an einer anderen Stelle als der PKC-Erkennungsstelle stattfinden muss. In diesem Fall ist es wahrscheinlich, dass ein regulatorisches Protein zwischengeschaltet wird. Auch Corey *et al.* konnten durch Mutagenese der PKC-Erkennungsstellen am GABA-Transporter GAT-1 keine Änderung der PKC-vermittelten Erhöhung der GAT-1-Transportaktivität beobachten (Corey *et al.*, 1994). Auch diese Autoren vermuteten eine indirekte Wirkung der PKC auf die Transportaktivität des Transporters oder eine Phosphorylierung des GAT-1-Proteins an einer anderen Stelle. Huff und Mitarbeiter zeigten in LLC-PK-Zellen, die den Dopamintransporter der Ratte (rDAT) stabil exprimierten, eine Phosphorylierung nach PMA-Behandlung (Huff *et al.*, 1997). Die PMA-Behandlung verminderte die Transportaktivität von rDAT, jedoch konnte eine direkte Phosphorylierung des rDAT-Proteins durch die PKC nicht nachgewiesen werden. Einen Schritt weiter kamen Kalandadze *et al.*, die am Glutamat-Transporter GLT1 zeigen konnten, dass die C-terminale Domäne des GLT1-Proteins, speziell das Serin 486 in dieser Domäne, partiell für die PKC-vermittelte Reduktion der Zelloberflächenexpression verantwortlich ist (Kalandadze *et al.*, 2002). Dabei wird Serin 486 in keiner bekannten Konsensussequenz für

bisher bekannte Proteinkinasen gefunden. Die Beteiligung von Serin-, Threonin- und Tyrosin-Resten, die nicht in Konsensussequenzen für Proteinkinasen enthalten sind, sollte man daher auch für eine direkte Phosphorylierung von Transporterproteinen durch Proteinkinasen in Betracht ziehen.

Im hCAT-1-Protein findet man insgesamt 44 Serine, 35 Threonine und 17 Tyrosine. Es ist daher sehr schwer vorausszusagen welche dieser AS direkt durch die PKC phosphoryliert werden könnte. Jedoch wurde in einer kürzlich erschienenen Untersuchung am mCAT-1 gezeigt, dass eine Region von 30 Aminosäuren am N-Terminus die subzelluläre Verteilung des Transporters beeinflussen kann (Ou und Silver, 2003). In dieser Region befinden sich zwei Serine und ein Threonin, die als Kandidaten für eine direkte PKC Phosphorylierung in Frage kämen. Eine genauere Untersuchung der Serin-, Threonin- und Tyrosin-Reste im N- und auch im C-Terminus des hCAT-1-Proteins könnte helfen, die Frage nach einer direkten Phosphorylierung durch die PKC zu klären.

6.2.3 Schlussfolgerungen der PKC-vermittelten Regulation von hCAT-1

1. Die PKC-vermittelte Reduktion der hCAT-1-Transportaktivität beruht auf einer Reduktion der hCAT-Expression an der Zelloberfläche.
2. Vermutlich reguliert die PKC die hCAT-1-Transportaktivität über einen indirekten Mechanismus, d. h. nicht über eine direkte Phosphorylierung des hCAT-1-Proteins.
3. Die PKC-Aktivierung verändert die Verteilung vom hCAT-1-Protein an der Zellmembran.

6.3 Subzelluläre Verteilung vom hCAT-1-Protein in humanen Zellen

Das hCAT-1.EGFP-Fusionskonstrukt erlaubte, die subzelluläre Verteilung des hCAT-1-Proteins in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen und auch in transient transfizierten Zelllinien mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie zu visualisieren. Während mit EGFP transfizierte Zellen eine homogene Verteilung der Fluoreszenz in der Zelle mit einer Anreicherung im Zellkern aufwiesen, wurde das hCAT-1.EGFP-Fusionsprotein differenzierter exprimiert. Neben einer Expression an der Zelloberfläche wurde jedoch auch eine vesikuläre Akkumulation von grüner Fluoreszenz im Zytoplasma beobachtet. Diese vesikuläre Anreicherung von hCAT-1.EGFP-Protein wurde auch bei transient transfizierten DLD-1 Kolonkarzinom-, EA.hy 926 Endothel- und im geringeren Maße auch für A549/8 Lungenkarzinom-Zellen beobachtet.

Durch Western-Blot-Analysen der biotinylierten Zelloberflächen-Proteine wurden diese durch konfokale Mikroskopie erhobenen Befunde bestätigt. Außerdem wurde gezeigt, dass die intrazelluläre Expression von hCAT-1 nicht nur in den stabil transfizierten und hCAT-1-überexprimierenden U373MG-Zellen vorkommt. Auch für den in DLD-1-Zellen endogen exprimierten hCAT-1 war die intrazelluläre Expression höher als an der Zelloberfläche. Berücksichtigt man die unterschiedlichen Mengen an Protein, die in den Western-Blot-Analysen für Gesamtllysate und für das Zelloberflächen-Protein eingesetzt wurden (s. Methoden 4.4.4), so ergibt sich für das Verhältnis von Gesamtlysat- zu Zelloberflächen-Protein ein Faktor zwischen 5 bis 10, sowohl für den endogenen als auch für den überexprimierten hCAT-1. D. h., dass vom hCAT-1-Gesamtprotein in der Zelle nur etwa 10 bis 20% an der Zellmembranoberfläche exprimiert werden.

Eine zytoplasmatische Anhäufung wurde auch in den mit hCAT-2B.EGFP und SLC7A4 (hCAT-4).EGFP transfizierten U373MG-Zellen beobachtet (Wolf *et al.*, 2002; Wolf, 2001). Dabei zeigten verschiedene Klone der jeweiligen CAT-Isoformen immer das gleiche Muster. In den mit hCAT-3.EGFP stabil transfizierten U373MG-Zellen wurde dagegen eine geringere intrazelluläre Anreicherung des Transporters beobachtet (Vékony *et al.*, 2001). Auch von Masuda *et al.* wurde in mit mCAT-1.EGFP transfizierten humanen embryonalen Nieren (HEK) 293-Zellen neben einer hohen Expression an der Zelloberfläche auch eine moderate grüne Fluoreszenz in granulären Vesikeln beschrieben. Immunfärbungen mit unterschiedlichen Zellorganellenmarkern führten dabei zu dem Schluss, dass das mCAT-1.EGFP-Protein intrazellulär im Golgi-Apparat akkumuliert (Masuda *et al.* 1999). Bei Versuchen in unserem Labor wurde in U373MG -Zellen mittels Immunfärbungen keine Kollokalisierung von hCAT-1.EGFP mit dem Golgi-Apparat gefunden. Auch mit Lysosomen, Endosomen und dem endoplasmatischen Retikulum konnte keine Übereinstimmung festgestellt werden (Closs, unveröffentlichte Ergebnisse). In polarisierten Madin-Darby canine Nieren-Zellen (MDCK) wurde jedoch gezeigt, dass die hCAT-1-Expression fast ausschließlich an der Basolateralmembran zu finden ist (Cariappa *et al.*, 2002; Kizhatil und Albritton, 2002).

Die subzelluläre Lokalisation der CAT-Proteine ist offensichtlich je nach Zelltyp unterschiedlich. Die Akkumulation der CAT-Proteine in intrazellulären Vesikeln scheint eine Besonderheit dieser Proteine in bestimmten Zelllinien zu sein. Diese Vesikeln stellen womöglich Speicherreservoirs der CAT-Proteine dar, die bei Bedarf durch eine posttranslationale Regulation zur Verfügung gestellt werden könnten.

6.4 Neue Erkenntnisse über die hCAT-Isoformen und Ausblick

Durch die vorliegende Arbeit sind folgende entscheidende neue Erkenntnisse über die hCAT-Proteine gewonnen worden:

1. Die hCAT-Isoformen besitzen neben der Transporterfunktion für BAS auch eine Kanalfunktion für Kationen. Kanal- und Transporterfunktion stellen möglicherweise zwei verschiedene Funktionsmodi der CAT-Proteine dar (Abb. 37). In Abwesenheit von BAS befindet sich der Transporter im Kanalmodus und die CAT-Proteine zeigen Leck-Ströme (I_{Leck}) mit einer hohen Leitfähigkeit für K^+ . In Anwesenheit von BAS ist der Transportermodus überwiegend und der Strom wird durch den Transport von BAS getragen (I_{BAS}). Ob die CAT-Proteine von einem Funktionsmodus zum anderen über Zwischenzustände übergehen, bei dem K^+ -Ionen mit BAS in einem Transporterzyklus zusammentransportiert werden, oder ob dieser Prozess eher wie bei Kanälen durch ein Hin und Herschalten zwischen zwei Zuständen geschieht, ist noch ungeklärt. Damit gehören die CAT-Proteine zu einer immer größer werdenden Gruppe von Transportern, die neben der Transportfunktion auch eine Kanalfunktion besitzen.

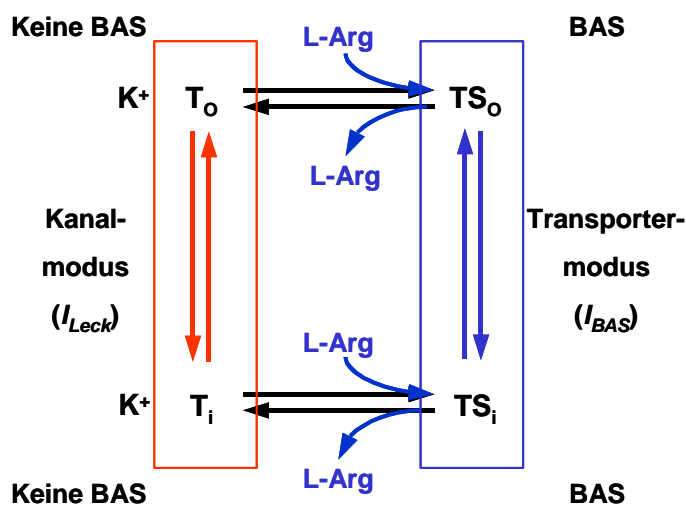


Abbildung 37: Die zwei möglichen Funktionsmodi der hCAT-Proteine

Simple-carrier Modell mit den zwei Leitfähigkeitszuständen der hCAT-Proteine: BAS-Strom in Anwesenheit von BAS (I_{BAS}) und Leck-Strom von Kationen (K^+) in Abwesenheit von BAS (I_{Leck}). T_o und T_i bzw. TS_o und TS_i repräsentieren den Substrat-unbeladenen bzw. -beladenen Transporter auf der extra- und intrazellulären Seite der Plasmamembran.

2. Die hCAT-1-Expression an der Zelloberfläche kann über einen PKC-vermittelten Mechanismus posttranslational reguliert werden. Durch die Regulation der Zelloberflächenexpression von hCAT-1 auf Proteinebene kann eine schnellere Anpassung der Zelle an veränderte Substratbedingungen und -anforderungen gewährleistet werden. Dieser neu gefundene Regulationsmechanismus für die CAT-Proteine kann erklären, warum sich Veränderungen in der RNA- bzw. Proteinexpression der CAT-Proteine oft nicht in entsprechenden Veränderungen der Transportaktivität widerspiegeln.

Weiterführende Versuche

Elektrophysiologische Versuche an hCATs

Durch die Versuche im Equilibrium-exchange war es möglich, unter annähernd symmetrischen Substratkonzentrationen, die Transportparameter der hCATs zu bestimmen. Jedoch ist der große Nachteil dieser Methode, dass die Messungen an verschiedenen Oozyten-Gruppen durchgeführt werden müssen und dadurch die Ergebnisse Schwankungen unterworfen sind. Daher müsste mit Hilfe einer weiteren Methode, bei der der intra- und extrazelluläre Raum der Oozyten kontrolliert werden kann, die Leitfähigkeit der hCAT-Proteine weiterführend untersucht werden. Hierfür bieten sich die cut-open voltage clamp-Methode und/oder Makropatch-Messungen an. Damit könnten Strom-Messungen mit unterschiedlichen intra- und extrazellulären Substratkonzentrationen unter dem Einfluss von verschiedenen Kationenpufferlösungen durchgeführt werden. Hiermit könnte erklärt werden, welche Substratbedingungen eine Veränderung der Leitfähigkeit der hCAT-Proteine bedingen und ob hierbei auch Kationen eine modulatorische Wirkung auf den BAS-Transport haben.

Da für hCAT-1 eine geringere Ausprägung der Leck-Ströme beobachtet wurde, wäre es denkbar, durch Untersuchungen der unspezifischen Ionenströme mit der TEVC-Methode an Chimären zwischen hCAT-1 und hCAT-2A nach den Protein-Domänen zu suchen, die für die Kanalfunktion des Transporters verantwortlich sind. Damit könnte auch die Frage beantwortet werden, ob Substrattransport und Ionenleitfähigkeit in den selben oder in unterschiedlichen Proteinbereichen lokalisiert sind und ob bestimmte Ionenleitfähigkeiten an bestimmte Transporteigenschaften (z.B. der Empfindlichkeit gegenüber Transstimulation) gekoppelt sind. Das Einbeziehen von hCAT-1/hCAT-2-Chimären oder Mutanten, die keine Transportfunktion aufweisen, würde zeigen, ob AS-Transport und Ionenleitfähigkeit immer gepaart auftreten oder ob sie voneinander zu trennen sind.

Weiterhin wäre es bei den CAT-Proteinen - ähnlich wie bei 4F2hc/LAT - denkbar, dass die Kanalfunktion durch ein assoziiertes Protein induziert wird. Hierfür müsste nach möglichen CAT-assoziierten-Proteinen gesucht werden. Hierbei könnten Leitfähigkeitsmessungen an dem inaktiven SLC7A4 (hCAT-4) bei der Suche eines Partnerproteins genutzt werden. In der Annahme, dass das putative Partnerprotein zur Ausbildung einer Leitfähigkeit notwendig ist und in Zellen exprimiert wird, die auch SLC7A4 exprimieren, könnte die Leitfähigkeiten von *X. laevis*-Oozyten gemessen werden, die mit SLC7A4-cRNA und mRNA aus SLC7A4-exprimierenden Geweben (z. B. Plazenta) koinjiziert wurden. Sollte auf diese Weise eine SLC7A4-induzierte Leitfähigkeit detektiert werden, könnte im Anschluss

SLC7A4-cRNA mit cRNA-Fraktionen koinjiziert werden, die durch *in vitro*-Transkription aus Plazenta-cDNA-Banken gewonnen werden könnten. Durch schrittweise Aufteilung positiver Fraktionen könnte das Partnerprotein von SLC7A4 identifiziert werden.

Um die Vermutung zu bestätigen, dass hCAT-1, jedoch nicht die anderen hCAT-Isoformen die BAS-Abgabe bei fehlenden extrazellulären BAS-Konzentrationen verhindert, müsste der BAS-Gehalt von depletierten Oozyten durch HPLC-Messungen bestimmt werden.

Regulation der hCAT-Proteine durch die PKC und subzelluläre Verteilung der hCATs

Es müsste geklärt werden, ob die PKC-Wirkung durch eine Internalisierung von hCAT-1 oder durch einen verminderten Einbau des neu synthetisierten oder in Speicher-Vesikeln befindlichen Transporters in die Plasmamembran zustande kommt. Der Einbau von neu synthetisiertem Protein in die Plasmamembran könnte durch Hemmung der Proteinsynthese unterdrückt werden. Sollte die PKC-Wirkung auch dann noch unvermindert bestehen, könnte ausgeschlossen werden, dass die PKC-Wirkung durch eine verminderte Prozessierung von neu synthetisiertem hCAT-1 zustande kommt. Durch Einsatz spezifischer Inhibitoren für Exozytose und Endozytose bzw. für vesikulären Transport könnte der Mechanismus der PKC-Wirkung weiter differenziert werden.

Durch *in vivo*-Phosphorylierung der stabil transfizierten U373MG-Zellen mit ³²P-markiertem Orthophosphat und anschließender Immunpräzipitation könnte nachgewiesen werden, ob hCAT-1 (und auch die anderen hCAT-Isoformen) phosphoryliert wird oder nicht. Außerdem wäre es notwendig zu überprüfen, ob hCAT-1 durch andere Kinasen auf ähnliche Weise wie durch die PKC reguliert wird. Hierfür könnten Aktivatoren der einzelnen Kinasen in den Aufnahmeversuchen eingesetzt werden. Ob andere Kinasen „downstream“ in einer von PKC regulierten Kaskade eine Rolle spielen, könnte weiterhin durch Einsatz von spezifischen Kinaseinhibitoren untersucht werden.

Neben einer Phosphorylierung der CAT-Proteine selbst ist auch eine indirekte PKC-Wirkung auf die CAT-Proteine denkbar, z.B. durch Phosphorylierung eines assoziierten Proteins. Daher könnten Proteindomänen der CAT-Proteine, die für die PKC-Wirkung wichtig sind, über Deletionsanalysen lokalisiert werden. Mit diesem Ansatz würden auch Proteinbereiche erfasst, die selbst nicht phosphoryliert werden, die aber z.B. durch Interaktion mit einem assoziierten Protein die Lokalisation des Transporters verändern können. Da in den meisten Membranproteinen die N- und C-terminalen Sequenzen die subzelluläre Lokalisation beeinflussen, müssten diese Proteinbereiche auch bei den hCATs genauer untersucht werden. In beiden Bereichen finden sich konservierte Serin-, Threonin- und Tyrosinreste, die für eine

(indirekte) Phosphorylierung nach PKC-Aktivierung in Frage kommen. Durch Herstellung von Deletionsmutanten hCAT-1.EGFP-Fusionsproteinen könnte zunächst ihre subzelluläre Lokalisation vor und nach PKC-Aktivierung untersucht werden. Nach Identifizierung interessanter Proteinbereiche könnten die beteiligten AS-Reste durch Mutationsanalysen eruiert werden.

Die PKC-Wirkung müsste auch für die anderen hCAT-Isoformen vergleichend zu hCAT-1 untersucht werden. Hierfür können die gleichen Methoden wie für die vorliegende Untersuchung von hCAT-1 angewendet werden.

Durch Expression von hCAT-1.EGFP in MDCK oder HEK 293-Zellen könnte die Frage geklärt werden, ob die PKC auch in polarisierten Zellen eine Reduktion der Zelloberflächenexpression bewirkt. Auch für die anderen hCAT-Isoformen sollte untersucht werden, ob ihre subzelluläre Lokalisation und die PKC-Wirkung vom Zelltyp abhängig sind. Außerdem sind weitere Untersuchungen der PKC-Wirkung mit unterschiedlichen PMA-Inkubationszeiten in verschiedenen Zelllinien notwendig, um die gegensätzliche Wirkung der PKC auf den System γ^+ -vermittelten L-Arginin-Transport zu erklären.

7. Zusammenfassung

Der humane kationische Aminosäure-Transporter hCAT-1 (CAT für cationic amino acid transporter) gehört zur Familie der Na^+ - und pH-unabhängigen Transporter für basische Aminosäuren (BAS). Die vorliegende Arbeit befasst sich mit unterschiedlichen Aspekten des hCAT-1-vermittelten Transportes, die in zwei Teilabschnitten behandelt werden.

Im ersten Abschnitt wurden die Transporteigenschaften von hCAT-1-exprimierenden *X. laevis*-Oozyten mit Hilfe von elektrophysiologischen Methoden untersucht und mit denen der Isoformen hCAT-2A und -2B verglichen. Dabei zeigte sich, dass es durch die Expression von hCAT-2A und -2B in Oozyten zur Bildung eines BAS-Potentiales kommt, jedoch nicht durch die Expression von hCAT-1. Hierfür dürfte die hohe Transstimulierbarkeit des hCAT-1-Proteins verantwortlich sein. Obwohl das Membranpotential einer Zelle die Akkumulation von BAS durch die hCAT-Proteine beeinflusst, war bei sehr hohen extrazellulären BAS-Konzentrationen die Akkumulation durch hCAT-1 und -2B im Gegensatz zu hCAT-2A nicht vom Membranpotential abhängig, da unter diesen Bedingungen der Efflux limitierend wirkte. Mit Hilfe der voltage clamp-Methode wurden die L-Arginin-induzierten Maximalströme (V_{\max}) und die Leitfähigkeiten der hCAT-Proteine bestimmt. Die so ermittelten V_{\max} -Werte sind nur halb so groß wie die durch Flux-Studien bestimmten. Daher muss von einem Gegentransport an positiver Ladung (Substrat) ausgegangen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die hCAT-Isoformen zwei unterschiedliche Leitfähigkeitszustände für BAS besitzen, die von der intrazellulären BAS-Konzentration abhängig sind. Eine Leitfähigkeitszunahme durch Zugabe von extrazellulärem L-Arginin konnte bei allen hCAT-Isoformen in depletierten Oozyten beobachtet werden. In BAS-beladenen Oozyten führte die Zugabe von L-Arginin dagegen zu keiner (hCAT-1 und hCAT-2B) bzw. zu einer geringen (hCAT-2A) Zunahme der Leitfähigkeit der Transporter. Im Substratgleichgewicht jedoch nahm die Leitfähigkeit der drei untersuchten hCAT-Isoformen in Abhängigkeit von der Substratkonzentration zu. Überraschenderweise wurden für die untersuchten hCAT-Isoformen Leck-Ströme in Abwesenheit von BAS nachgewiesen. An hCAT-2B-exprimierenden Oozyten wurde eine erhöhte Leitfähigkeit für K^+ -Ionen gezeigt. Die physiologische Bedeutung dieser Kanalfunktion ist jedoch noch völlig ungeklärt.

Im zweiten Abschnitt wurde der Mechanismus der Proteinkinase C (PKC)-vermittelten Inhibition der hCAT-1-Transportaktivität untersucht. Hierfür wurden hCAT-1-EGFP-Konstrukte in Oozyten und in U373MG Glioblastom-Zellen exprimiert. Mit Hilfe konfokaler

Mikroskopie und Western-Blot-Analysen von biotinylierten Zelloberflächen-Proteinen wurde gezeigt, dass die PKC-vermittelte Reduktion der hCAT-1-Transportaktivität auf einer Reduktion der hCAT-Expression an der Zelloberfläche beruht. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit dem endogen in humanen DLD-1 Kolonkarzinom-Zellen exprimierten hCAT-1 erzielt. Der PKC-Effekt war auch noch nach Entfernung der putativen PKC-Erkennungsstellen am hCAT-1-Protein vorhanden. Daher reguliert die PKC die hCAT-1-Transportaktivität vermutlich über einen indirekten Mechanismus, d. h. nicht über eine direkte Phosphorylierung des hCAT-1-Proteins. Die Veränderung der Zelloberflächenexpression stellt einen neuen Regulationsmechanismus für die CAT-Proteine dar, der erklären kann, warum sich Modifikationen in der CAT-Proteinexpression oft nicht in entsprechenden Veränderungen der Transportaktivität widerspiegeln.

8. Literaturverzeichnis

- Adam, G., Läuger, P. and Stark, G. (2003) *Physikalische Chemie und Biophysik*. Springer-Verlag, Berlin.
- Adams, S.V. and DeFelice, L.J. (2003) Ionic currents in the human serotonin transporter reveal inconsistencies in the alternating access hypothesis. *Biophys J*, **85**, 1548-1559.
- Albritton, L.M., Bowcock, A.M., Eddy, R.L., Morton, C.C., Tseng, L., Farrer, L.A., Cavalli-Sforza, L.L., Shows, T.B. and Cunningham, J.M. (1992) The human cationic amino acid transporter (ATRC1): physical and genetic mapping to 13q12-q14. *Genomics*, **12**, 430-434.
- Albritton, L.M., Tseng, L., Scadden, D. and Cunningham, J.M. (1989) A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *Cell*, **57**, 659-666.
- Barnes, E.N., Biedler, J.L., Spengler, B.A. and Lyser, K.M. (1981) The fine structure of continuous human neuroblastoma lines SK-N-SH, SK-N-BE(2), and SK-N-MC. *In Vitro*, **17**, 619-631.
- Baron, D.N., Dent, C.E., Harris, H., Hart, E.W. and Jepson, J.B. (1956) Hereditary pellagra-like skin rash with temporary cerebellar ataxia, constant renal amino-aciduria, and other bizarre biochemical features. *Lancet*, **271**, 421-428.
- Baumgartner, W., Islas, L. and Sigworth, F.J. (1999) Two-microelectrode voltage clamp of *Xenopus* oocytes: voltage errors and compensation for local current flow. *Biophys J.*, **77**, 1980-1991.
- Biedler, J.L., Helson, L. and Spengler, B.A. (1973) Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*, **33**, 2643-2652.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Bode, B.P., Reuter, N., Conroy, J.L. and Souba, W.W. (1998) Protein kinase C regulates nutrient uptake and growth in hepatoma cells. *Surgery*, **124**, 260-267; discussion 267-268.
- Borsani, G., Bassi, M.T., Sperandio, M.P., De Grandi, A., Buoninconti, A., Riboni, M., Manzoni, M., Incerti, B., Pepe, A., Andria, G., Ballabio, A. and Sebastio, G. (1999) SLC7A7, encoding a putative permease-related protein, is mutated in patients with lysinuric protein intolerance. *Nat Genet*, **21**, 297-301.

- Bossi, E., Centinaio, E., Castagna, M., Giovannardi, S., Vincenti, S., Sacchi, V.F. and Peres, A. (1999a) Ion binding and permeation through the lepidopteran amino acid transporter KAAT1 expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol*, **515** (Pt 3), 729-742.
- Bossi, E., Sacchi, V.F. and Peres, A. (1999b) Ionic selectivity of the coupled and uncoupled currents carried by the amino acid transporter KAAT1. *Pflugers Arch*, **438**, 788-796.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. and Fusenig, N.E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol*, **106**, 761-771.
- Broer, A., Wagner, C., Lang, F. and Broer, S. (2000) Neutral amino acid transporter ASCT2 displays substrate-induced Na⁺ exchange and a substrate-gated anion conductance. *Biochem J*, **346 Pt 3**, 705-710.
- Broer, S. (2002) Adaptation of plasma membrane amino acid transport mechanisms to physiological demands. *Pflugers Arch*, **444**, 457-466.
- Cariappa, R., Heath-Monnig, E., Furesz, T.C., Kamath, S.G. and Smith, C.H. (2002) Stable polarized expression of hCAT-1 in an epithelial cell line. *J Membr Biol*, **186**, 23-30.
- Castagna, M., Shayakul, C., Trotti, D., Sacchi, V.F., Harvey, W.R. and Hediger, M.A. (1997) Molecular characteristics of mammalian and insect amino acid transporters: implications for amino acid homeostasis. *J Exp Biol*, **200** (Pt 2), 269-286.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. and Prasher, D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, **263**, 802-805.
- Charles, S., Tamagawa, T. and Henquin, J.C. (1982) A single mechanism for the stimulation of insulin release and ⁸⁶Rb⁺ efflux from rat islets by cationic amino acids. *Biochem J*, **208**, 301-308.
- Chillarón, J., Estevez, R., Mora, C., Wagner, C.A., Suessbrich, H., Lang, F., Gelpi, J.L., Testar, X., Busch, A.E., Zorzano, A. and Palacin, M. (1996) Obligatory amino acid exchange via systems bo,+L-like and y⁺L-like. A tertiary active transport mechanism for renal reabsorption of cystine and dibasic amino acids. *J Biol Chem*, **271**, 17761-17770.
- Chomeczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159.
- Christensen, H.N. (1964) A Transport System Serving for Mono- and Diamino Acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **51**, 337-344.
- Christensen, H.N. (1990) Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev*, **70**, 43-77.

- Christensen, H.N. and Antonioli, J.A. (1969) Cationic amino acid transport in the rabbit reticulocyte. Na⁺-dependent inhibition of Na⁺-independent transport. *J Biol Chem*, **244**, 1497-1504.
- Closs, E.I. (1996) CATs, a family of three distinct amino acid transporters. *Amino Acids*, **11**, 193-208.
- Closs, E.I. (1998) Virusrezeptoren und Transportproteine: Entdeckung einer neuen Familie von Carrier-Proteinen für basische Aminosäuren (CATs). *Habilitationsschrift*.
- Closs, E.I. (2002) Expression, regulation and function of carrier proteins for cationic amino acids. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **11**, 99-107.
- Closs, E.I., Albritton, L.M., Kim, J.W. and Cunningham, J.M. (1993a) Identification of a low affinity, high capacity transporter of cationic amino acids in mouse liver. *J Biol Chem*, **268**, 7538-7544.
- Closs, E.I., Graf, P., Habermeier, A., Cunningham, J.M. and Forstermann, U. (1997) Human cationic amino acid transporters hCAT-1, hCAT-2A, and hCAT-2B: three related carriers with distinct transport properties. *Biochemistry*, **36**, 6462-6468.
- Closs, E.I., Lyons, C.R., Kelly, C. and Cunningham, J.M. (1993b) Characterization of the third member of the MCAT family of cationic amino acid transporters. Identification of a domain that determines the transport properties of the MCAT proteins. *J Biol Chem*, **268**, 20796-20800.
- Closs, E.I. and Mann, G.E. (1999) Identification of carrier systems in plasma membranes of mammalian cells involved in transport of L-arginine. *Methods Enzymol*, **301**, 78-91.
- Conradt, M. and Stoffel, W. (1997) Inhibition of the high-affinity brain glutamate transporter GLAST-1 via direct phosphorylation. *J Neurochem.*, **68**, 1244-1251.
- Corey, J.L., Davidson, N., Lester, H.A., Brecha, N. and Quick, M.W. (1994) Protein kinase C modulates the activity of a cloned gamma-aminobutyric acid transporter expressed in *Xenopus* oocytes via regulated subcellular redistribution of the transporter. *J Biol Chem*, **269**, 14759-14767.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H. and Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, **173**, 33-38.
- Devés, R., Angelo, S. and Chavez, P. (1993) N-ethylmaleimide discriminates between two lysine transport systems in human erythrocytes. *J Physiol*, **468**, 753-766.
- Devés, R. and Boyd, C.A. (1998) Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol Rev*, **78**, 487-545.

- Devés, R., Chavez, P. and Boyd, C.A. (1992) Identification of a new transport system (y⁺L) in human erythrocytes that recognizes lysine and leucine with high affinity. *J Physiol*, **454**, 491-501.
- Dexter, D.L., Barbosa, J.A. and Calabresi, P. (1979) N,N-dimethylformamide-induced alteration of cell culture characteristics and loss of tumorigenicity in cultured human colon carcinoma cells. *Cancer Res*, **39**, 1020-1025.
- Dexter, D.L., Spemulli, E.N., Fligiél, Z., Barbosa, J.A., Vogel, R., VanVoorhees, A. and Calabresi, P. (1981) Heterogeneity of cancer cells from a single human colon carcinoma. *Am J Med*, **71**, 949-956.
- Dumont, J.N. (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol*, **136**, 153-179.
- Edgell, C.J., McDonald, C.C. and Graham, J.B. (1983) Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 3734-3737.
- Fei, Y.J., Prasad, P.D., Leibach, F.H. and Ganapathy, V. (1995) The amino acid transport system y⁺L induced in *Xenopus laevis* oocytes by human choriocarcinoma cell (JAR) mRNA is functionally related to the heavy chain of the 4F2 cell surface antigen. *Biochemistry*, **34**, 8744-8751.
- Feldman, D.H., Harvey, W.R. and Stevens, B.R. (2000) A novel electrogenic amino acid transporter is activated by K⁺ or Na⁺, is alkaline pH-dependent, and is Cl⁻-independent. *J Biol Chem*, **275**, 24518-24526.
- Förstermann, U., Closs, E.I., Pollock, J.S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I. and Kleinert, H. (1994) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, **23**, 1121-1131.
- Förstermann, U., Gath, I., Schwarz, P., Closs, E.I. and Kleinert, H. (1995) Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem Pharmacol*, **50**, 1321-1332.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H. and Parks, W.P. (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*, **51**, 1417-1423.
- Goldin, A.L. (1992) Maintenance of *Xenopus laevis* and oocyte injection. *Methods Enzymol*, **207**, 266-279.
- Gräf, P. (1998) Charakterisierung der Transportproteine für basische Aminosäuren: CAT-1, CAT-2A und CAT-2B. *Inauguraldissertation. Fachbereich Chemie und Pharmazie. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.*

- Gräf, P., Forstermann, U. and Closs, E.I. (2001) The transport activity of the human cationic amino acid transporter hCAT-1 is downregulated by activation of protein kinase C. *Br J Pharmacol*, **132**, 1193-1200.
- Grossman, A. and Furchgott, R.F. (1964) The effects of external calcium concentration on the distribution and exchange of calcium in resting and beating guinea-pig auricles. *JPET*, **143**, 107-119.
- Habermeier, A., Wolf, S., Martine, U., Graf, P. and Closs, E.I. (2003) Two amino acid residues determine the low substrate affinity of human cationic amino acid transporter-2A. *J Biol Chem*, **278**, 19492-19499.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Harvey, C.M., Muzyka, W.R., Yao, S.Y., Cheeseman, C.I. and Young, J.D. (1993) Expression of rat intestinal L-lysine transport systems in isolated oocytes of *Xenopus laevis*. *Am J Physiol*, **265**, G99-106.
- Helling, R.B., Goodman, H.M. and Boyer, H.W. (1974) Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdaoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol*, **14**, 1235-1244.
- Hortelano, S., Genaro, A.M. and Bosca, L. (1993) Phorbol esters induce nitric oxide synthase and increase arginine influx in cultured peritoneal macrophages. *FEBS Lett*, **320**, 135-139.
- Hoshida, R., Ikeda, Y., Karashima, S., Matsuura, T., Komaki, S., Kishino, T., Niikawa, N., Endo, F. and Matsuda, I. (1996) Molecular cloning, tissue distribution, and chromosomal localization of human cationic amino acid transporter 2 (hCAT2). *Genomics*, **38**, 174-178.
- Hosokawa, H., Sawamura, T., Kobayashi, S., Ninomiya, H., Miwa, S. and Masaki, T. (1997) Cloning and characterization of a brain-specific cationic amino acid transporter. *J Biol Chem*, **272**, 8717-8722.
- Huff, R.A., Vaughan, R.A., Kuhar, M.J. and Uhl, G.R. (1997) Phorbol esters increase dopamine transporter phosphorylation and decrease transport Vmax. *J Neurochem*, **68**, 225-232.
- Hyde, R., Taylor, P.M. and Hundal, H.S. (2003) Amino acid transporters: roles in amino acid sensing and signalling in animal cells. *Biochem J*, **373**, 1-18.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**, 23-28.
- Ito, K. and Groudine, M. (1997) A new member of the cationic amino acid transporter family is preferentially expressed in adult mouse brain. *J Biol Chem*, **272**, 26780-26786.

- Jenkinson, C.P., Grody, W.W. and Cederbaum, S.D. (1996) Comparative properties of arginases. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **114**, 107-132.
- Kakuda, D.K., Finley, K.D., Dionne, V.E. and MacLeod, C.L. (1993) Two distinct gene products mediate y⁺ type cationic amino acid transport in *Xenopus* oocytes and show different tissue expression patterns. *Transgene*, **1**, 91-101.
- Kalandadze, A., Wu, Y. and Robinson, M.B. (2002) Protein kinase C activation decreases cell surface expression of the GLT-1 subtype of glutamate transporter. Requirement of a carboxyl-terminal domain and partial dependence on serine 486. *J Biol Chem*, **277**, 45741-45750.
- Kaneko, S. (1998) ['Cut-open' method: a new method for *Xenopus* oocytes that enables intracellular perfusion and stable current recording]. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **111**, 157-166.
- Kavanaugh, M.P. (1993) Voltage dependence of facilitated arginine flux mediated by the system y⁺ basic amino acid transporter. *Biochemistry*, **32**, 5781-5785.
- Kavanaugh, M.P., Wang, H., Zhang, Z., Zhang, W., Wu, Y.N., Dechant, E., North, R.A. and Kabat, D. (1994) Control of cationic amino acid transport and retroviral receptor functions in a membrane protein family. *J Biol Chem*, **269**, 15445-15450.
- Kim, J.W., Closs, E.I., Albritton, L.M. and Cunningham, J.M. (1991) Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature*, **352**, 725-728.
- Kizhatil, K. and Albritton, L.M. (2002) System y⁺ localizes to different membrane subdomains in the basolateral plasma membrane of epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **283**, C1784-1794.
- Krotova, K.Y., Zharikov, S.I. and Block, E.R. (2003) Classical isoforms of PKC as regulators of CAT-1 transporter activity in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **284**, L1037-1044.
- Levy, H.L. (2001) Hartnup disorder. In Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D. (ed.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, pp. 3629-3642.
- Liu, J. and Hatzoglou, M. (1998) Control of expression of the gene for the arginine transporter Cat-1 in rat liver cells by glucocorticoids and insulin. *Amino Acids*, **15**, 321-337.
- MacLeod, C.L., Finley, K., Kakuda, D., Kozak, C.A. and Wilkinson, M.F. (1990) Activated T cells express a novel gene on chromosome 8 that is closely related to the murine ecotropic retroviral receptor. *Mol Cell Biol*, **10**, 3663-3674.

- Magagnin, S., Bertran, J., Werner, A., Markovich, D., Biber, J., Palacin, M. and Murer, H. (1992) Poly(A)⁺ RNA from rabbit intestinal mucosa induces b⁰,⁺ and y⁺ amino acid transport activities in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem*, **267**, 15384-15390.
- Mandel, M. and Higa, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol*, **53**, 159-162.
- Masuda, M., Kakushima, N., Wilt, S.G., Ruscetti, S.K., Hoffman, P.M. and Iwamoto, A. (1999) Analysis of receptor usage by ecotropic murine retroviruses, using green fluorescent protein-tagged cationic amino acid transporters. *J Virol*, **73**, 8623-8629.
- McCune, B.K., Patterson, K., Chandra, R.S., Kapur, S., Sporn, M.B. and Tsokos, M. (1993) Expression of transforming growth factor-beta isoforms in small round cell tumors of childhood. An immunohistochemical study. *Am J Pathol*, **142**, 49-58.
- Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K. and Green, M.R. (1984) Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res*, **12**, 7035-7056.
- Miller, S.S. and Edelman, J.L. (1990) Active ion transport pathways in the bovine retinal pigment epithelium. *J Physiol*, **424**, 283-300.
- Morgan, D.M. (1994) Polyamines, arginine and nitric oxide. *Biochem Soc Trans*, **22**, 879-883.
- Nawrath, H., Wegener, J.W., Rupp, J., Habermeier, A. and Closs, E.I. (2000) Voltage dependence of L-arginine transport by hCAT-2A and hCAT-2B expressed in oocytes from *Xenopus laevis*. *Am J Physiol Cell Physiol*, **279**, C1336-1344.
- Ou, W. and Silver, J. (2003) Role of a conserved amino-terminal sequence in the ecotropic MLV receptor mCAT1. *Virology*, **308**, 101-113.
- Palacin, M. (2000) The family of heteromultimeric amino acid transporters reveals aminoaciduria genes. *Nephrol Dial Transplant*, **15 Suppl 6**, 5-8.
- Palacin, M., Bertran, J. and Zorzano, A. (2000) Heteromeric amino acid transporters explain inherited aminoacidurias. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **9**, 547-553.
- Palacin, M., Estevez, R., Bertran, J. and Zorzano, A. (1998) Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol Rev*, **78**, 969-1054.
- Pan, M., Meng, Q.H., Wolfgang, C.L., Lin, C.M., Karinch, A.M., Vary, T.C. and Souba, W.W. (2002) Activation of intestinal arginine transport by protein kinase C is mediated by mitogen-activated protein kinases. *J Gastrointest Surg*, **6**, 876-882.
- Pan, M. and Stevens, B.R. (1995) Protein kinase C-dependent regulation of L-arginine transport activity in Caco-2 intestinal cells. *Biochim Biophys Acta*, **1239**, 27-32.

- Pan, M., Wasa, M., Lind, D.S., Gertler, J., Abbott, W. and Souba, W.W. (1995) TNF-stimulated arginine transport by human vascular endothelium requires activation of protein kinase C. *Ann Surg*, **221**, 590-600; discussion 600-591.
- Pleasure, S.J. and Lee, V.M. (1993) NTera 2 cells: a human cell line which displays characteristics expected of a human committed neuronal progenitor cell. *J Neurosci Res*, **35**, 585-602.
- Ponten, J. and Macintyre, E.H. (1968) Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand*, **74**, 465-486.
- Reizer, J., Finley, K., Kakuda, D., MacLeod, C.L., Reizer, A. and Saier, M.H., Jr. (1993) Mammalian integral membrane receptors are homologous to facilitators and antiporters of yeast, fungi, and eubacteria. *Protein Sci*, **2**, 20-30.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Schwartz, I.F., Schwartz, D., Traskonov, M., Chernichovsky, T., Wollman, Y., Gnessin, E., Topilsky, I., Levo, Y. and Iaina, A. (2002) L-Arginine transport is augmented through up-regulation of tubular CAT-2 mRNA in ischemic acute renal failure in rats. *Kidney Int*, **62**, 1700-1706.
- Sedmak, J.J. and Grossberg, S.E. (1977) A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal Biochem*, **79**, 544-552.
- Sharp, P.A., Sugden, B. and Sambrook, J. (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry*, **12**, 3055-3063.
- Shimomura, O., Johnson, F.H. and Saiga, Y. (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*, **59**, 223-239.
- Smith, L.D., Xu, W.L. and Varnold, R.L. (1991) Oogenesis and oocyte isolation. *Methods Cell Biol*, **36**, 45-60.
- Smith, P.A., Sakura, H., Coles, B., Gummerson, N., Proks, P. and Ashcroft, F.M. (1997) Electrogenic arginine transport mediates stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic beta-cells. *J Physiol*, **499** (Pt 3), 625-635.

- Sperandeo, M.P., Borsani, G., Incerti, B., Zollo, M., Rossi, E., Zuffardi, O., Castaldo, P., Tagliatalata, M., Andria, G. and Sebastio, G. (1998) The gene encoding a cationic amino acid transporter (SLC7A4) maps to the region deleted in the velocardiofacial syndrome. *Genomics*, **49**, 230-236.
- Stefani, E. and Bezanilla, F. (1998) Cut-open oocyte voltage-clamp technique. *Methods Enzymol*, **293**, 300-318.
- Stein, W.D. (1990) *Channels, carriers, and pumps*. Academic Press, Inc.
- Takahashi, K., Sawasaki, Y., Hata, J., Mukai, K. and Goto, T. (1990) Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol*, **26**, 265-274.
- Tannen, R.L., Marino, R. and Dawson, D.C. (1986) K⁺ transport by rat colon: adaptation to a low potassium diet. *Am J Physiol*, **250**, F483-487.
- Tate, S.S. (1996) Evidence suggesting that the minimal functional unit of a renal cystine transporter is a heterodimer and its implications in cystinuria. *Amino Acids*, **11**, 209-224.
- Thams, P. and Capito, K. (1999) L-arginine stimulation of glucose-induced insulin secretion through membrane depolarization and independent of nitric oxide. *Eur J Endocrinol*, **140**, 87-93.
- Thorne, H.V. (1966) Electrophoretic separation of polyoma virus DNA from host cell DNA. *Virology*, **29**, 234-239.
- Thwaites, D.T., McEwan, G.T., Cook, M.J., Hirst, B.H. and Simmons, N.L. (1993) H(+)-coupled (Na(+)-independent) proline transport in human intestinal (Caco-2) epithelial cell monolayers. *FEBS Lett*, **333**, 78-82.
- Toker, A. (1998) Signaling through protein kinase C. *Front Biosci*, **3**, D1134-1147.
- Van Winkle, L.J. and Campione, A.L. (1990) Functional changes in cation-preferring amino acid transport during development of preimplantation mouse conceptuses. *Biochim Biophys Acta*, **1028**, 165-173.
- Van Winkle, L.J., Campione, A.L. and Gorman, J.M. (1988) Na⁺-independent transport of basic and zwitterionic amino acids in mouse blastocysts by a shared system and by processes which distinguish between these substrates. *J Biol Chem*, **263**, 3150-3163.
- Van Winkle, L.J., Christensen, H.N. and Campione, A.L. (1985) Na⁺-dependent transport of basic, zwitterionic, and bicyclic amino acids by a broad-scope system in mouse blastocysts. *J Biol Chem*, **260**, 12118-12123.

- Vékony, N., Wolf, S., Boissel, J.P., Gnauert, K. and Closs, E.I. (2001) Human cationic amino acid transporter hCAT-3 is preferentially expressed in peripheral tissues. *Biochemistry*, **40**, 12387-12394.
- Verrey, F., Closs, E.I., Wagner, C.A., Palacin, M., Endou, H. and Kanai, Y. (2003) CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch.*
- Wagner, C.A., Broer, A., Albers, A., Gamper, N., Lang, F. and Broer, S. (2000) The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/LAT1 is associated in *Xenopus* oocytes with a non-selective cation channel that is regulated by the serine/threonine kinase sgk-1. *J Physiol*, **526 Pt 1**, 35-46.
- Wang, H., Kavanaugh, M.P., North, R.A. and Kabat, D. (1991) Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter. *Nature*, **352**, 729-731.
- Ward, W.W., Cody, C.W., Hart, R.C. and Cormier, M.J. (1980) Spectrophotometric identity of the energy transfer chromophores in *Renilla* and *Aequorea* green-fluorescent proteins. *Photochemistry and photobiology*, **31**, 611-615.
- White, M.F. (1985) The transport of cationic amino acids across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, **822**, 355-374.
- White, M.F. and Christensen, H.N. (1982) Cationic amino acid transport into cultured animal cells. II. Transport system barely perceptible in ordinary hepatocytes, but active in hepatoma cell lines. *J Biol Chem*, **257**, 4450-4457.
- White, M.F., Gazzola, G.C. and Christensen, H.N. (1982) Cationic amino acid transport into cultured animal cells. I. Influx into cultured human fibroblasts. *J Biol Chem*, **257**, 4443-4449.
- Wilson, K. and Goulding, K.H. (1991) *Methoden der Biochemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Wolf, S. (2001) Funktionsanalyse des als kationischer Aminosäure-Transporter bezeichneten, humanen Membranproteins, hCAT-4. *Fachbereich Medizin*. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Wolf, S., Janzen, A., Vekony, N., Martine, U., Strand, D. and Closs, E.I. (2002) Expression of solute carrier 7A4 (SLC7A4) in the plasma membrane is not sufficient to mediate amino acid transport activity. *Biochem J*, **364**, 767-775.
- Wu, J.Y., Robinson, D., Kung, H.J. and Hatzoglou, M. (1994) Hormonal regulation of the gene for the type C ecotropic retrovirus receptor in rat liver cells. *J Virol*, **68**, 1615-1623.

- Yaman, I., Fernandez, J., Liu, H., Caprara, M., Komar, A.A., Koromilas, A.E., Zhou, L., Snider, M.D., Scheuner, D., Kaufman, R.J. and Hatzoglou, M. (2003) The zipper model of translational control: a small upstream ORF is the switch that controls structural remodeling of an mRNA leader. *Cell*, **113**, 519-531.
- Yoshimoto, T., Yoshimoto, E. and Meruelo, D. (1991) Molecular cloning and characterization of a novel human gene homologous to the murine ecotropic retroviral receptor. *Virology*, **185**, 10-17.
- Zerangue, N. and Kavanaugh, M.P. (1996) ASCT-1 is a neutral amino acid exchanger with chloride channel activity. *J Biol Chem*, **271**, 27991-27994.
- Zharikov, S.I. and Block, E.R. (1998) Characterization of L-arginine uptake by plasma membrane vesicles isolated from cultured pulmonary artery endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*, **1369**, 173-183.
- Zhu, S.-J., Kavanaugh, M.P., Sonders, M.S., Amara, S.G. and Zahniser, N.R. (1997) Activation of protein kinase C inhibits uptake, currents and binding associated with the human dopamin transporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, **282**, 1358-1365.
- Zinn, K., DiMaio, D. and Maniatis, T. (1983) Identification of two distinct regulatory regions adjacent to the human beta-interferon gene. *Cell*, **34**, 865-879.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 : Carrier-vermittelter AS-Transport in Säugerzellen (modifiziert nach Hyde et al. , 2003)	6
Abbildung 2 : Beteiligung basischer AS an Stoffwechsel-Prozessen im Menschen	9
Abbildung 3 : Schematische Darstellung der Struktur der humanen hCAT-Proteine mit potentiellen PKC-Erkennungsstellen und Glykosylierungsstellen	19
Abbildung 4 : Reifestadien von <i>X. laevis</i> -Oozyten (Vorlage aus Smith et al., 1991)	37
Abbildung 5 : Die two-electrode voltage clamp (TEVC)-Methode (modifiziert nach Baumgartner et al., 1999)	45
Abbildung 6 : Abhängigkeit des Membranpotentials hCAT-exprimierender Oozyten vom Beladungszustand der Zellen mit basischen Aminosäuren	81
Abbildung 7 : Membranpotential depletierter Oozyten in Abhängigkeit von der K^+ -Konzentration	82
Abbildung 8 : Einfluss des Membranpotentials und der L-Arginin-Konzentration auf die L-Arginin-Akkumulation in hCAT-exprimierenden Oozyten	84
Abbildung 9 : L-[3H]Arginin Equilibrium-exchange-Kurven in hCAT-exprimierenden Oozyten	86
Abbildung 10: L-Arginin-induzierte Membranströme in hCAT-exprimierenden Oozyten.....	88
Abbildung 11: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von hCAT-2A- und hCAT-2B- exprimierenden Oozyten	89
Abbildung 12: I/V-Beziehungen hCAT-exprimierender Oozyten in Abhängigkeit vom Beladungszustand der Zellen mit basischen Aminosäuren	91
Abbildung 13: L-Arginin-Transportkinetik in Abhängigkeit vom Membranpotential bei hCAT-1-, 2A- und -2B-exprimierenden Oozyten	94
Abbildung 14: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von L-Arginin für die einzelnen hCAT- Isoformen im Equilibrium-exchange	96
Abbildung 15: Leck-Ströme der hCAT-Isoformen	99
Abbildung 16: Kationische Ionenströme in hCAT-2B-injizierten Oozyten.	101
Abbildung 17: Wirkung von K^+ -Inhibitoren auf den hCAT-2B-vermittelten Kaliumstrom .	102
Abbildung 18: $^{86}Rb^+$ -Efflux-Kurven hCAT-exprimierender Oozyten.....	104
Abbildung 19: $^{86}Rb^+$ -Influx in hCAT-2B-exprimierende Oozyten.....	104
Abbildung 20: PMA verminderte die Expression von hCAT-1 an der Zelloberfläche von <i>X. laevis</i> -Oozyten.....	106
Abbildung 21: Einfluss von PMA auf die Zelloberflächenexpression von hCAT-1.EGFP in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen	108
Abbildung 22: Einfluss von PMA auf die hCAT-1.EGFP-Expression in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen	109
Abbildung 23: Zeitabhängige L-[3H]Arginin-Aufnahme und Einfluss der PKC-Aktivierung auf die hCAT-1-vermittelte Transportaktivität in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen	111
Abbildung 24: Einfluss von PMA auf die endogene hCAT-1-Expression in DLD-1 Kolonkarzinom-Zellen	112
Abbildung 25: Endogene hCAT-1-vermittelte L-[3H]Arginin-Aufnahme unter Einfluss von Phorbolestern in DLD-1 Kolonkarzinom-Zellen	113
Abbildung 26: Einfluss von PMA auf die L-Arginin-Aufnahme in verschiedenen humanen Zelllinien.....	115
Abbildung 27: Konzentrationsabhängiger PMA-Effekt auf die L-Arginin-Aufnahme in U373MG Glioblastom- A549/8 Lungenkarzinom- und endothelialen EA.hy 926-Zellen	116

Abbildung 28: Nachweis der mRNA-Expression in verschiedenen humanen Zelllinien.....	118
Abbildung 29: Transiente hCAT-1.EGFP-Expression in den Zelllinien A549/8, DLD-1 und EA.hy 926.....	119
Abbildung 30: Sequenzvergleich von hCAT-1 und hCAT-1 S/A ⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷	121
Abbildung 31: Expression von hCAT-1 S/A ⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ .EGFP in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen.....	122
Abbildung 32: Transportaktivität von hCAT-1 S/A ⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen und in <i>X. laevis</i> -Oozyten.....	123
Abbildung 33: Einfluss von PMA auf die Zelloberflächenexpression von hCAT-1 S/A ⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ .EGFP in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen ...	125
Abbildung 34: Einfluss von PMA auf die hCAT-1 S/A ⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷ .EGFP Expression in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen	126
Abbildung 35: Einfluss der PKC-Aktivierung auf die Transportaktivität von hCAT-1 S/A ⁴⁷⁶⁺⁴⁸²⁺⁵⁵⁷	128
Abbildung 36: Einfluss von PMA auf die Transportaktivität von transfizierten A549/8 Lungenkarzinom-Zellen.....	129
Abbildung 37: Die zwei möglichen Funktionsmodi der hCAT-Proteine	149

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 : Die Familie der kationischen AS-Transporter (CAT)	11
Tabelle 2 : Sequenzvergleich zwischen den humanen CAT-Proteinen (nach Closs und Mann, 1999)	14
Tabelle 3 : Vergleich der Transporteigenschaften der hCAT-Proteine	16
Tabelle 4 : Benutzte Plasmide für die in vitro-Transkription von cRNA in <i>X. laevis</i> -Oozyten	38
Tabelle 5 : Benutzte RNA-Sonden für die RNase-Verdauungsschutzanalyse	58
Tabelle 6 : Benutzte Oligonukleotide für die Mutagenese von hCAT-1	68
Tabelle 7 : Einführung der drei PKC-Erkennungsstellen-Mutationen in die hCAT-1-cDNA	70
Tabelle 8 : Verwendete Oligonukleotide für die Subklonierung der PKC-Erkennungsstellen-Mutationen in das phCAT-1.EGFP-N1-Plasmid	72
Tabelle 9 : Verwendete Substanzen für die Phorbolster-Behandlung der Zellen	78
Tabelle 10: Membranpotential von hCAT-injizierten Oozyten nach 6h Inkubation in unterschiedlichen L-Arginin- und K ⁺ -Konzentrationen	85
Tabelle 11: Leitfähigkeiten der einzelnen hCAT-Isoformen in Abhängigkeit des Beladungszustandes der Oozyten mit basischen Aminosäuren	92
Tabelle 12: Transportkinetik hCAT-2A-exprimierender Oozyten in Abhängigkeit vom Membranpotential	95
Tabelle 13: Equilibrium-exchange K _M - und G _{max} -Werte der hCAT-Isoformen für L-Arginin	97
Tabelle 14: Differenzleitfähigkeit von hCAT-1, hCAT-2A und hCAT-2B in BAS-freiem Medium	99
Tabelle 15: Einfluss von PMA auf die L-Arginin-Aufnahme in unterschiedlichen humanen Zelllinien.	116
Tabelle 16: mRNA-Expression der hCAT-Isoformen in verschiedenen humanen Zelllinien	117
Tabelle 17: Maximale Transportgeschwindigkeit (V _{max}) für L-Arginin aus elektrophysiologischen Experimenten	136

LEBENS LAUF

Name: R o t m a n n
Vornamen: Alexander Darius
Geburtsdatum: 17. September 1970
Geburtsort: Lima / Peru
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Konfession: Röm. katholisch
E-Mail arotmann@yahoo.com

Schulbildung:
1976 – 1980 Deutsch peruanische Schule „Beata-Imelda“,
Chosica / Peru
1981 – 1986 Deutsch peruanische Schule „Alexander v. Humboldt“,
Lima / Peru
1986 – 1987 Helene-Lange-Gymnasium, Wiesbaden
Abschluss: **mittlere Reife**
1987 – 1990 Oberstufengymnasium Martin-Niemöller, Wiesbaden
Abschluss: **allgemeine Hochschulreife**

Zivildienst:
1990 – 1992 Kindergruppe Eulenspiegel e.V., Wiesbaden

Studium:
1992 – 1998 Biologie-Studium an der Johannes Gutenberg-Universität,
Mainz. Abschluss: **Diplom-Biologe**
05/1999 – 11/2003 Dissertation am Pharmakologischen Institut der
Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
Disputation: Feb. 2004

Arbeitstätigkeiten:
WS 1995 / 96 - SS 1998 Wissenschaftliche Hilfskraft an der Universität Mainz im
„Zytologischen Kurs für Biologen“ unter der Leitung von
Prof. Dr. W. Sachsse
SS 1996 - WS 1999 / 2000 Wissenschaftliche Hilfskraft an der Universität Mainz im
„Biologischen Praktikum für Mediziner“ unter der
Leitung von Prof. Dr. F. Romer

Wiesbaden, 20.11.2003

Teilveröffentlichungen der vorliegenden Arbeit

Artikelpublikationen

Rotmann A., Strand D., Martiné U. and Closs E.I., Protein kinase C activation promotes the internalization of the human cationic amino acid transporter hCAT-1: A new regulatory mechanism for hCAT-1 activity. (in Bearbeitung)

Rotmann A., Closs E.I., Liewald J. and Nawrath H. (2003), Intracellular accumulation of L-Arg, kinetics of transport, and potassium leak conductance in oocytes from *Xenopus laevis* expressing hCAT-1, hCAT-2A and hCAT-2B. *BBA Biomembranes*, **1660**, 138 - 143

Abstracts

A. Rotmann, A. Simon, U. Martiné, and E. I. Closs (2004), Reduction of hCAT-1 transport activity by PKC in different human cell lines. (Abstract) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. of Pharmacol.*, Vol. **369**, Supplement 1

A. Rotmann, U. Martiné, D. Strand and E. I. Closs (2003), PKC activation promotes the internalization of the human cationic amino acid transporter hCAT-1. (Abstract) *Amino Acids*, Vol. **25**, Number 2

A. Rotmann, U. Martiné, D. Strand and E. I. Closs (2003), Indirect inhibitory action of protein kinase C (PKC) on L-arginine transport mediated by hCAT-1. (Abstract) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. of Pharmacol.*, Vol. **367**, Supplement 1

A. Rotmann, E.I. Closs and H. Nawrath (2001), Steady-state kinetics of the human cationic amino acid transporters hCAT-1, hCAT-2A, and hCAT-2B, expressed in *Xenopus laevis* oocytes. (Abstract) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. of Pharmacol.*, Supplement to Vol. **363**